ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 58254— 2018

МЕД НАТУРАЛЬНЫЙ

Определение водорастворимых витаминов методом капиллярного электрофореза

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2018

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным научным учреждением «Федеральный научный центр пчеловодства» (ФГБНУ «ФНЦ пчеловодства»)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 432 «Пчеловодство»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 23 октября 2018 г. № 831-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Правила применения настоящего стандарта установлены в статье 26 Федерального закона от 29 июня 2015 г. № 162-ФЗ «О стандартизации в Российской Федерации». Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет (*gost.e-ecolog.ru

© Стандартинформ, оформление, 2018

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 Термины и определения 2
4 Метод измерения 2
5 Требования к условиям измерений 2
6 Требования к квалификации оператора 2
7 Требования к показателям точности метода 2
8 Требования безопасности проведения работ 4
9 Отбор и подготовка проб 4
10 Определение содержания витаминов 4
10.1 Средства измерений, оборудование, материалы и реактивы 4
10.2 Подготовка к проведению измерений 5
10.3 Контроль стабильности градуировочной характеристики 11
10.4 Проведение измерений 11
10.5 Обработка результатов измерений 12
10.6 Проверка приемлемости результатов измерений 12
10.7 Оформление результатов измерений 12
10.8 Оценка приемлемости результатов, получаемых в условиях вспроизводимости 12
11 Контроль точности результатов измерений при реализации метода 13
11.1 Контроль с использованием образцов для контроля 13
11.2 Контроль стабильности 13
Библиография 15

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

МЕД НАТУРАЛЬНЫЙ

Определение водорастворимых витаминов методом капиллярного электрофореза

Natural honey. Determination of water-soluble vitamins by capillary electrophoresis method

Дата введения — 2019—10—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на натуральный мед и устанавливает метод капиллярного электрофореза для определения содержания водорастворимых витаминов: B_1 (тиаминхлорида), B_2 (рибофлавина), B_3 (пантотеновой кислоты), B_5 (никотиновой кислоты и никотинамида), B_6 (пиридоксина), B_c (фолиевой кислоты), С (аскорбиновой кислоты) с целью идентификации их естественного содержания.

Настоящий стандарт не применяется для идентификации различных видов меда или его фальсификатов.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 12.0.004 Система стандартов безопасности труда. Организация обучения безопасности труда. Общие положения

ГОСТ 12.1.004 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.007 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.018 Система стандартов безопасности труда. Пожаровзрывобезопасность статического электричества. Общие требования

ГОСТ 12.4.009 Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание

ГОСТ OIML R 76-1 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

ГОСТ 1770 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 3118 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 4199 Реактивы. Натрий тетраборнокислый 10-водный. Технические условия

ГОСТ 4328 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 5644 Сульфит натрия безводный. Технические условия

ГОСТ 9656 Реактивы. Кислота борная. Технические условия

ГОСТ 14919 Электроплиты, электроплитки и жарочные электрошкафы бытовые. Общие технические условия

ГОСТ 16317 Приборы холодильные электрические бытовые. Общие технические условия

ГОСТ 19792 Мед натуральный. Технические условия

ГОСТ 22180 Реактивы. Кислота щавелевая. Технические условия

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

Издание официальное

ГОСТ 25629 Пчеловодство. Термины и определения

ГОСТ 29227 (ИСО 835-1–81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

ГОСТ Р 12.1.019 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ Р ИСО 5725-6–2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике

ГОСТ Р 58144 Вода дистиллированная. Технические условия

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана недатированная ссылка, то рекомендуется использовать действующую версию этого стандарта с учетом всех внесенных в данную версию изменений. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, то рекомендуется использовать версию этого стандарта с указанным выше годом утверждения (принятия). Если после утверждения настоящего стандарта в ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение рекомендуется применять без учета данного изменения. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, рекомендуется применять в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины по ГОСТ 25629.

4 Метод измерения

Метод капиллярного электрофореза основан на разделении сложных смесей компонентов в кварцевом капилляре при приложении к нему электрического напряжения. Возникающее в капилляре электрическое поле вызывает миграцию зоны пробы и ее разделение. Разделение пробы происходит вследствие различия скоростей перемещения зараженных частиц в растворе под влиянием электрического поля.

В зависимости от состава анализируемой пробы натурального меда используют два варианта метода капиллярного электрофореза:

- метод капиллярного зонного электрофореза (далее — КЗЭ) не применяют для определения B_2 (рибофлавина) и B_5 в форме никотинамида;
- метод мицеллярной электрокинетической хроматографии (далее — МЭКХ) не применяют для определения B_1 (тиаминхлорида).

5 Требования к условиям измерений

При выполнении измерений следует соблюдать следующие условия:

- температура окружающего воздуха ..... (25 ± 5) °С;
- относительная влажность воздуха ..... (55 ± 25) %;
- атмосферное давление ..... 97,1—101,1 кПа (730—760 мм рт. ст.).

6 Требования к квалификации оператора

Выполнение измерений должен проводить инженер-химик, техник или лаборант, квалификацией не ниже 4-го разряда, подготовленный по ГОСТ 12.0.004, имеющий высшее или специальное образование, опыт работы в химической лаборатории, изучивший техническую документацию на капиллярный электрофорез.

7 Требования к показателям точности метода

Диапазоны измерений содержания витаминов и значения показателей повторяемости, воспроизводимости и точности при вероятности $P = 0,95$ приведены в таблице 1.

Таблица 1 — Диапазоны измерений и значения показателей повторяемости, воспроизводимости и точности

Наименование определяемого компонента и диапазон измерений, г/кг	Вариант метода капиллярного электрофореза	Показатель повторяемости (относительное среднеквадратичное отклонение повторяемости) σ_r,%	Показатель воспроизводимости (относительное среднеквадратичное отклонение воспроизводимости) σ_R, %	Предел повторяемости (относительное значение допускаемого расхождения между двумя результатами определений, полученными в условиях повторяемости) r, %, P = 0,95	Предел воспроизводимости (относительное значение допускаемого расхождения между двумя результатами определений, полученными в условиях воспроизводимости) R, %, P = 0,95	Показатель точности (границы относительной погрешности) σ, %, P = 0,95
B_1 (тиаминхлорид) от 01 до 5,0	КЗЭ	5	10	14	28	20
B_2 (рибофлавин) от 01 до 5,0	МЭКХ	8	14	22	39	28
B_3 (пантотеновая кислота) от 1,0 до 25,0	КЗЭ; МЭКХ	5	10	14	28	20
B_5 (никотиновая кислота) от 2 до 100,0	КЗЭ; МЭКХ	5	9	14	25	18
B_5 (никотинамид) от 0,1 до 5,0	МЭКХ	9	14	25	39	28
B_6 (пиридоксин) от 0,2 до 10,0	КЗЭ; МЭКХ	6	10	17	28	20
B_c (фолиевая кислота) от 0,1 до 5,0	КЗЭ; МЭКХ	7	10	19	28	20
С (аскорбиновая кислота) от 2,0 до 50,0	КЗЭ; МЭКХ	7	17	19	47	34

По мере накопления информации в процессе внутреннего контроля показатели качества результатов измерений по настоящей методике могут быть уточнены с учетом фактически обеспечиваемых лабораторией значений с оформлением протокола по [1].

Показатели качества методики измерений были установлены путем проведения межлабораторного эксперимента.

8 Требования безопасности проведения работ

8.1 При проведении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007, требования пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004, ГОСТ 12.1.018 и требования электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ Р 12.1.019, иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

8.2 Помещение, в котором проводят измерения, должно быть снабжено приточно-вытяжной вентиляцией. Работу с реактивами необходимо проводить в вытяжном шкафу.

8.3 При работе с концентрированными кислотами и щелочами и при приготовлении растворов витаминов необходимо использовать респираторы и резиновые перчатки.

9 Отбор и подготовка проб

Отбор проб — по ГОСТ 19792.

10 Определение содержания витаминов

10.1 Средства измерений, оборудование, материалы и реактивы

Система капиллярного электрофореза, снабженная кварцевым капилляром (полная длина — 75 см, эффективная длина — 65 см, внутренний диаметр — 50 мкм).

Весы лабораторные по ГОСТ OIML R 76-1 с пределом допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания не более ±0,001 и ±0,02 г.

Холодильник бытовой по ГОСТ 16317.

pH-метр лабораторный (погрешность измерения — не более ±0,05 единиц pH).

Центрифуга лабораторная марки ШХ 2.779.040 со скоростью вращения не менее 5000 об/мин.

Шкаф сушильный лабораторный с терморегулятором, обеспечивающим поддержание температуры (150 ± 2) °С.

Электроплитка бытовая по ГОСТ 14919.

Устройство перемешивающее.

Баня водяная с регулятором нагрева.

Пробирки центрифужные полипропиленовые.

Дозаторы переменного объема 10—100 мм^3, 100—1000 мм^3, 1000—5000 мм^3 и с пределом допускаемой погрешности измерения не более ±5 %.

Наконечники полипропиленовые для дозаторов, вместимостью 0,3 см^3, 1,0 см^3 и 5,0 см^3.

Сосуды из темного стекла с герметично завинчивающимися крышками и тефлоновыми прокладками вместимостью 10—40 см^3 для приготовления основных растворов витаминов.

Колбы плоскодонные с притертыми пробками Кн-2-50-18(22) по ГОСТ 25336.

Стаканы химические В-1-100 (150,250) ТС по ГОСТ 25336.

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

Цилиндры 1(3)-10(25) по ГОСТ 1770.

Пипетки градуированные 1(2,3,5)-1(1а,2,2а)-2-1(5,10) по ГОСТ 29227.

Фильтры целлюлозно-ацетатные, размер пор — 0,2 мкм, диаметр — 25 мм.

Насадки для фильтров.

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328, раствор молярной концентрации c (NaOH) = 0,5 моль/дм^3.

Кислота соляная по ГОСТ 3118.

Кислота борная по ГОСТ 9656.

Натрия сульфит безводный по ГОСТ 5644.

Кислота щавелевая по ГОСТ 22180.

Натрий тетраборнокислый, стандарт-титр.

Натрий тетраборнокислый 10-водный по ГОСТ 4199.
Натрия додецилсульфат.
Витамин B_1 (тиаминхлорид).
Витамин B_2 (рибофлавин).
Витамин B_3 (пантотеновая кислота).
Витамин B_5 (никотиновая кислота).
Витамин B_5 (никотинамид).
Витамин B_6 (пиридоксин).
Витамин B_c (фолиевая кислота).
Витамин С (L-аскорбиновая кислота).
Вода дистиллированная по ГОСТ Р 58144.

Примечания

1 Допускается применение средств измерений и оборудования с такими же или лучшими метрологическими и техническими характеристиками, а также материалов по качеству не ниже вышеуказанных.

2 Все применяемые средства измерений должны быть проверены (калиброваны), испытательное оборудование — аттестовано.

3 Все реактивы должны быть квалификации х. ч. или ч. д. а.

10.2 Подготовка к проведению измерений

10.2.1 Приготовление вспомогательных растворов

10.2.1.1 Приготовление раствора соляной кислоты молярной концентрации c (HCl) = 6 моль/дм^3

50 см^3 концентрированной соляной кислоты смешивают в химическом стакане вместимостью 200 см^3 с 50 см^3 дистиллированной воды. Смесь переносят в стеклянную емкость с притертой пробкой для хранения. Срок хранения не ограничен.

10.2.1.2 Приготовление раствора соляной кислоты молярной концентрации c (HCl) = 1 моль/дм^3

17 см^3 раствора соляной кислоты, приготовленного по 10.2.1.1, смешивают в химическом стакане вместимостью 200 см^3 с 83 см^3 дистиллированной воды. Смесь переносят в стеклянную емкость с притертой пробкой для хранения. Срок хранения не ограничен.

10.2.1.3 Приготовление раствора гидроокиси натрия молярной концентрации c (NaOH) = = 0,5 моль/дм^3

Навеску гидроокиси натрия массой 2,000 г растворяют в мерной колбе вместимостью 100 см^3 с 50—60 см^3 дистиллированной воды и объем в колбе доводят дистиллированной водой до метки. Раствор перемешивают и хранят в емкости из полиэтилена с плотно завинчивающейся крышкой. Срок хранения — не более 2 мес.

Примечание — Растворы по 10.2.1.2, 10.2.1.3 предназначены только для промывок капилляра.

10.2.1.4 Приготовление раствора борной кислоты молярной концентрации c (1/3 H_3BO_3) = = 0,2 моль/дм^3

Навеску борной кислоты массой 1,236 г растворяют в мерной колбе вместимостью 100 см^3 в 50—60 см^3 дистиллированной воды, доводят объем раствора в колбе до метки дистиллированной водой и перемешивают. Раствор хранят в емкости из полиэтилена с плотно завинчивающейся крышкой. Срок хранения — не более 2 мес.

10.2.1.5 Приготовление раствора соляной кислоты объемной концентрации 1 %

2 см^3 раствора соляной кислоты, приготовленной по 10.2.1.1, растворяют в 98 см^3 дистиллированной воды в стеклянной емкости вместимостью 100—150 см^3 и тщательно перемешивают. Раствор хранят в стеклянной емкости с притертой пробкой. Срок хранения не ограничен.

10.2.1.6 Приготовление раствора щавелевой кислоты с массовой долей 1 %

Навеску безводной щавелевой кислоты массой 1,000 г или 2-водной щавелевой кислоты массой 1,400 г растворяют в мерной колбе вместимостью 100 см^3 в дистиллированной воде, доводят объем раствора в колбе до метки дистиллированной водой и перемешивают. Раствор хранят в стеклянной емкости с притертой пробкой. Срок хранения не ограничен.

10.2.1.7 Приготовление раствора тетраборнокислого натрия молярной концентрации c ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$) = 0,05 моль/дм^3

Раствор готовят из стандарт-титра по прилагаемой к нему инструкции и хранят в полиэтиленовой емкости с плотно завинчивающейся крышкой. Срок хранения — не более 2 мес.

Примечание — При отсутствии стандарт-титра раствор готовят из 10-водного тетраборнокислого натрия. Для этого навеску препарата массой 19,071 г растворяют в мерной колбе вместимостью 1 $дм^3$ в свежепрокипяченной и охлажденной без доступа воздуха дистиллированной воде. pH раствора при 20 °С должен быть (9,22 ± 0,10).

10.2.1.8 Приготовление раствора тетраборнокислого натрия молярной концентрации c ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$) = 0,01 моль/$дм^3$

20 $см^3$ раствора тетраборнокислого натрия, приготовленного по 10.2.1.7, помещают в химический стакан вместимостью 100 $см^3$, добавляют 20 $см^3$ раствора борной кислоты (см. 10.2.1.4) и тщательно перемешивают. Раствор хранят в стеклянной емкости с притертой пробкой. Срок хранения — не более 2 мес.

10.2.1.9 Приготовление ведущего электролита № 1

40 $см^3$ тетраборнокислого натрия, приготовленного по 10.2.1.7, помещают в химический стакан вместимостью 100 $см^3$, добавляют 20 $см^3$ раствора борной кислоты (см. 10.2.1.4) и тщательно перемешивают. Раствор хранят в стеклянной емкости с притертой пробкой. Срок хранения — не более 2 мес.

10.2.1.10 Приготовление ведущего электролита № 2

Навеску додецилсульфата натрия массой 0,576 г помещают в мерную колбу вместимостью 25 $см^3$, добавляют 15—17 $см^3$ ведущего электролита № 1 (см. 10.2.1.9) и перемешивают. Доводят объем в колбе до метки этим же раствором и снова перемешивают. Раствор хранят в стеклянной емкости с притертой пробкой. Срок хранения — не более 1 мес.

10.2.1.11 Подготовка растворов ведущих электролитов для проведения измерений

Непосредственно перед началом измерений растворы ведущих электролитов необходимо:

- профильтровать через ацетатно-целлюлозный фильтр, отбросив первые порции фильтрата (1—1,5 $см^3$);
- дегазировать центрофугированием в течение 3—5 мин при скорости вращения 5000 об/мин.

10.2.1.12 Приготовление раствора сульфита натрия молярной концентрации c (1/2 Na_2SO_3) = 0,1 моль/$дм^3$.

Навеску безводного сульфита натрия массой 0,630 г помещают в мерную колбу вместимостью 50 $см^3$, добавляют 20—30 $см^3$ дистиллированной воды, перемешивают до полного растворения препарата и доводят объем раствора в колбе дистиллированной водой до метки.

Раствор используют только в день приготовления, поэтому указанный выше объем (50 $см^3$) не является строго определенным. Его изменяют в зависимости от интенсивности использования раствора в течение предстоящего рабочего дня.

10.2.1.13 Приготовление экстрагирующего раствора для получения вытяжки витаминов из испытуемых проб

Раствор тетраборнокислого натрия (см. 10.2.1.7) смешивают с раствором сульфита натрия (см. 10.2.1.12) в соотношении 3:2 в химическом стакане вместимостью 250 $см^3$. Раствор хранят в стеклянной емкости с притертой пробкой и используют только в день приготовления.

10.2.2 Подготовка капилляра к работе

10.2.2.1 Подготовка нового капилляра к работе

Подготовку нового капилляра к работе проводят в соответствии с руководством по эксплуатации системы капиллярного электрофореза.

10.2.2.2 Ежедневная подготовка капилляра к работе

Если капилляр оставлен на ночь заполненным дистиллированной водой, то перед работой его необходимо промыть раствором гидроокиси натрия (см. 10.2.1.3) и дистиллированной водой по 5 мин, затем раствором соответствующего ведущего электролита в течение времени, предусмотренного инструкцией к прибору.

В том случае, если накануне в капилляре был оставлен раствор ведущего электролита, то на следующий день в зависимости от предстоящего метода определения витаминов капилляр промывают следующим образом:

- при работе методом КЗЭ — свежей порцией ведущего электролита (см. 10.2.1.9) в течение 10—15 мин без напряжения;
- при работе методом МЭКХ следует проводить последовательную промывку дистиллированной водой, раствором гидроокиси натрия (см. 10.2.1.3) и снова дистиллированной водой по 5 мин, а затем ведущим электролитом (см. 10.2.1.10) в течение 10—15 мин без напряжения.

Во всех случаях следует проверять состояние капилляра, проанализировав контрольный раствор (см. 10.2.3.6).

Между анализами капилляр промывают соответствующим ведущим электролитом в течение 3 мин.

После работы с испытуемыми образцами в конце рабочего дня необходимо проводить последовательную промывку капилляра дистиллированной водой в течение 10 мин, раствором соляной кислоты (см. 10.2.1.2) и дистиллированной водой по 5 мин, а затем раствором гидроокиси натрия (см. 10.2.1.3) и дистиллированной водой по 10 мин.

При определении витаминов методом КЗЭ капилляр оставляют на ночь заполненным дистиллированной водой.

При определении витаминов методом МЭКХ капилляр промывают ведущим электролитом № 1 (см. 10.2.1.9) в течение 10—15 мин и оставляют на ночь с этим же раствором.

Примечание — При работе с испытуемыми пробами на электрофореграмме может наблюдаться дрейф базовой линии, появление ступеней и смещение времени выхода компонентов, что связано с возможным мешающим влиянием матричных компонентов или примесей. В этом случае рекомендуется:

- во время проведения анализов увеличить время промывки капилляра между анализами;
- проводить промывку в течение 3 мин под напряжением;
- при появлении ступеней заменить свежими порциями ведущий электролит в пробирках.

10.2.2.3 Хранение капилляра

Порядок хранения капилляра при перерывах в работе зависит от интенсивности использования прибора.

При перерывах в работе на 2—3 сут (до недели) капилляр следует промыть дистиллированной водой и оставить заполненным дистиллированной водой.

При перерывах на срок более недели капилляр необходимо после тщательной промывки дистиллированной водой высушить и оставить в сухом состоянии. В этом случае для восстановления работоспособности капилляра его нужно подготовить к работе, как новый капилляр.

10.2.3 Приготовление градуировочных растворов

10.2.3.1 Приготовление основных растворов витаминов B_1 (тиаминхлорида), B_3 (пантотеновой кислоты), B_5 (никотиновой кислоты), B_5 (никотинамида), B_6 (пиридоксина) с номинальными значениями массовых концентраций 1 мг/см^3.

Навески витаминов в соответствии с таблицей 2 вносят в отдельные емкости из темного стекла и растворяют в 5 см^3 дистиллированной воды. Растворы хранят в герметично закрытых емкостях в холодильнике. Срок хранения — 3 мес.

Таблица 2 — Рекомендуемые навески с учетом форм витаминов, необходимых для приготовления основных растворов, и коэффициенты пересчета навески на массу соответствующего витамина

Витамин в форме взвешивания	Масса навески m, г	Коэффициент пересчета
Витамин B_1	0,0056	0,893
Витамин B_2	0,0050	1,000
Витамин B_3	0,0054	0,916
Витамин B_5 (никотиновая кислота)	0,0050	1,000
Витамин B_5 (никотинамид)	0,0050	1,000
Витамин B_6	0,0061	0,823
Витамин B_c	0,0050	1,000
Витамин С	0,0100	1,000

Массовые концентрации витаминов в каждом растворе C_i, мг/см^3, вычисляют по формуле

$$C_i = \frac{m_i I_i}{V_i}, \quad (1)$$

где m_i — масса навески соответствующего витамина в форме взвешивания, мг;

I_i — коэффициент пересчета массы навески на массу соответствующего витамина;

V_i — объем основного раствора соответствующего витамина, см^3.

10.2.3.2 Приготовление основного раствора витамина B_c (фолиевой кислоты) с номинальным значением массовой концентрации 0,5 мг/см^3

Навеску фолиевой кислоты массой в соответствии с таблицей 2 вносят в емкость из темного стекла вместимостью 10—15 см^3, добавляют 10 см^3 раствора тетраборнокислого натрия (см. 10.2.1.8) и тщательно перемешивают до полного растворения навески. Массовую концентрацию витамина B_c (фолиевой кислоты) в полученном растворе вычисляют по формуле (1). Раствор хранят в герметично закрытой емкости в холодильнике. Срок хранения — 1 мес.

10.2.3.3 Приготовление основного раствора витамина С (аскорбиновой кислоты) с номинальным значением массовой концентрации 2 мг/см^3

Навеску аскорбиновой кислоты массой в соответствии с таблицей 2 вносят в емкость из темного стекла вместимостью 10—15 см^3, добавляют 1 см^3 раствора соляной кислоты (см. 10.2.1.5), 4 см^3 раствора щавелевой кислоты (см. 10.2.1.6) и перемешивают до полного растворения навески. Массовую концентрацию витамина С (аскорбиновой кислоты) в полученном растворе вычисляют по формуле (1). Раствор хранят в герметично закрытой емкости в холодильнике. Срок хранения — одна неделя.

10.2.3.4 Приготовление основного раствора витамина B_2 (рибофлавина) с номинальным значением массовой концентрации 0,5 мг/см^3

Навеску рибофлавина массой в соответствии с таблицей 2 вносят в емкость из темного стекла вместимостью 10—15 см^3, добавляют 0,2 см^3 раствора соляной кислоты (см. 10.2.1.1), перемешивают до полного растворения, добавляют 8 см^3 раствора щавелевой кислоты (см. 10.6.1.6), 1,8 см^3 дистиллированной воды и тщательно перемешивают. В случае неполного растворения навески следует нагреть раствор в закрытом сосуде на водяной бане при температуре 80 °С. Массовую концентрацию витамина B_2 (рибофлавина) в полученном растворе вычисляют по формуле (1). Раствор хранят в герметично закрытой емкости в холодильнике. Срок хранения — 1 мес.

10.2.3.5 Приготовление градуировочных растворов витаминов

Основные растворы витаминов помещают в стеклянную емкость в объемах, указанных в таблице 3. Добавляют 1065 мм^3 раствора тетраборнокислого натрия (см. 10.2.1.8), 240 мм^3 раствора щавелевой кислоты (см. 10.2.1.6), 60 мм^3 раствора соляной кислоты (см. 10.2.1.5) и тщательно перемешивают. Массовые концентрации витаминов в градуировочном растворе C_z, мг/дм^3, вычисляют по формуле

$$C_z = \frac{C_1 V_1 1000}{2000}, \qquad (2)$$

где C_1 — массовая концентрация витамина в основном растворе, мг/дм^3;

V_1 — объем основного раствора соответствующего витамина, мм^3;

1000 — коэффициент пересчета см^3 в дм^3;

2000 — общий объем градуировочного раствора, мм^3.

Градуировочный раствор используют в течение 2 ч с момента приготовления.

Таблица 3 — Объемы основных растворов витаминов, используемых для приготовления градуировочных растворов

Витамин	Объем раствора, мм^3
Витамин B_1	100
Витамин B_2	90
Витамин B_3	70
Витамин B_5 (никотиновая кислота)	80
Витамин B_5 (никотинамид)	25
Витамин B_6	15
Витамин B_c	205
Витамин С	50
Итого	635

10.2.3.6 Приготовление контрольного раствора витаминов

В пробирку помещают 20 мм^3 основного раствора пиридоксина и 40 мм^3 основного раствора рибофлавина, специально приготовленных для этой цели по 10.2.3.1 и 10.2.3.4 соответственно. Добавляют 940 мм^3 раствора тетраборнокислого натрия (см. 10.2.1.8) и перемешивают. Массовые концентрации витаминов в контрольном растворе C_c вычисляют по формуле

$$C_c = \frac{C_1 V_1 1000}{1000}, \quad (3)$$

где C_1 — массовая концентрация витамина в основном растворе, мг/дм^3;

V_1 — объем основного раствора соответствующего витамина, мм^3;

1000 — коэффициент пересчета см^3 в дм^3;

1000 — общий объем градуировочного раствора, мм^3.

Контрольный раствор следует использовать в течение 2 ч с момента приготовления для проверки работоспособности прибора и для контроля стабильности градуировочной характеристики (см. 10.2.5).

10.2.4 Градуировка системы

10.2.4.1 Градуировка системы методом КЗЭ

Рекомендуемые параметры ввода и условия анализа представлены в таблице 4. Непосредственно перед анализом растворы центрифугируют в течение 5 мин при 5000—6000 об/мин.

Таблица 4 — Условия анализа градуировочного раствора методом КЗЭ

Наименование показателя	Значения показателя
Определяемые витамины в порядке выхода	B_1 (тиамин), B_2 (рибофлавин), B_6 (пиридоксин), С (аскорбиновая кислота), B_3 (пантотеновая кислота), B_5 (никотиновая кислота), B_c (фолиевая кислота)
Ввод градуировочного раствора (пробы)	30 мбар, 20 с
Длина волны, нм	200
Напряжение, кВ	Плюс 25
Давление, мбар	В начале анализа — 0, после появления пика B_6 (пиридоксина) прикладывают давление 30 до конца анализа
Температура, °С	30
Время, мин	16—18
Ведущий электролит	№ 1 (приготовление по 10.2.1.9)

При выполнении анализа необходимо изменение условий регистрации электрофореграммы, а именно приложения давления после появления пика пиридоксина.

Для определения момента времени, по истечении которого необходимо приложить давление, готовят пробный раствор витаминов в соответствии с 10.2.3.5 и снимают пробную электрофореграмму. В этом случае после регистрации пиридоксина (третьего компонента анализируемого раствора) в ручном режиме задают давление 30 мбар и ведут анализ до появления пика последнего компонента (фолиевой кислоты) пробы. Пробную электрофореграмму не используют для построения градуировочной зависимости. Операцию нахождения времени включения давления, описанную выше, можно выполнить один раз и использовать полученный параметр до тех пор, пока время выхода пиридоксина будет меньше задаваемого.

Установленный промежуток времени вносят в программу поэтапного анализа системы капиллярного электрофореза и используют ее для записи электрофореграммы градуировочного раствора и анализа растворов, полученных из испытуемых проб.

Для проведения градуировки системы последовательно, не менее трех раз, готовят и сразу же анализируют градуировочный раствор (см. 10.2.3.5). В таблице концентраций создают столько градуировочных уровней, сколько получено электрофореграмм, при этом концентрации компонентов в каждом уровне будут одинаковые.

Градуировку следует считать успешной, если отклонения времени выхода пиков компонентов не превышают 5 % от среднеарифметических значений. Если градуировку признают неудовлетворительной, продолжают готовить и анализировать градуировочный раствор, создавая дополнительные градуировочные уровни до тех пор, пока указанные условия не будут выполнены. При этом допускается отбраковывать неудовлетворительные данные, однако число принятых к градуировке точек должно быть не менее трех.

10.2.4.2 Градуировка системы методом МЭКХ

Рекомендуемые параметры ввода и условия анализа представлены в таблице 5. Непосредственно перед анализом растворы центрифугируют в течение 5 мин при 5000—6000 об/мин.

Таблица 5 — Условия анализа градуировочного раствора методом МЭКХ

Наименование показателя	Значения показателя
Определяемые витамины в порядке выхода	B_5 (никотинамид), B_6 (пиридоксин), B_2 (рибофлавин), С (аскорбиновая кислота), B_3 (пантотеновая кислота), B_5 (никотиновая кислота), B_c (фолиевая кислота), B_1 (тиаминхлорид)
Ввод градуировочного раствора (пробы)	30 мбар, 20 с
Длина волны, нм	200 (в начале анализа) 240 (после пика пантотеновой кислоты)
Напряжение, кВ	Плюс 25
Давление, мбар	В начале анализа — 0, после появления пика B_3 (пантотеновой кислоты) прикладывают давление 50 до конца анализа
Температура, °С	40
Время, мин	17—20
Ведущий электролит	№ 2 (приготовление по 10.2.1.10)

При выполнении анализа необходимо изменение условий регистрации электрофореграммы, а именно приложение давления и изменение рабочей длины волны после появления пика пантотеновой кислоты.

Для определения момента времени, по истечении которого необходимо приложить давление и изменить длину волны, готовят пробный раствор витаминов в соответствии с 10.2.3.5 и регистрируют пробную электрофореграмму при длине волны 200 нм. В этом случае после регистрации пантотеновой кислоты (пятого компонента анализируемого раствора) в ручном режиме задают давление 50 мбар и ведут анализ до появления пика последнего компонента (тиаминхлорида) пробы. В ручном режиме длина волны без остановки анализа не может быть установлена, поэтому заканчивают пробную электрофореграмму при измерении на длине волны 200 нм. Пробную электрофореграмму не используют для построения градуировочной зависимости. Операцию нахождения времени включения давления и изменения длины волны регистрации, описанную выше, можно выполнить один раз и использовать полученный параметр до тех пор, пока время выхода пантотеновой кислоты будет меньше задаваемого.

Установленный промежуток времени вносят в программу поэтапного анализа вместе с изменением длины волны регистрации и используют ее для записи электрофореграмм градуировочных растворов и анализа растворов, полученных из испытуемых проб.

Для проведения градуировки системы последовательно, не менее трех раз, готовят и сразу же анализируют градуировочные растворы (см. 10.2.3.5). На полученных электрофореграммах проверяют правильность автоматической разметки пиков, при необходимости, корректируют разметку, удаляют лишние пики. В таблице компонентов должно быть столько строк, сколько витаминов анализируют. В таблице концентраций создают столько градуировочных уровней, сколько получено электрофореграмм, при этом концентрации компонентов в каждом уровне будут одинаковые.

Градуировку следует считать успешной, если отклонения времени выхода пиков компонентов не превышают 5 % среднеарифметических значений. Если градуировка признается неудовлетворительной, продолжают готовить и анализировать градуировочные растворы, создавая дополнительные градуировочные уровни до тех пор, пока указанное условие не будет выполнено. При этом допускается

отбраковывать неудовлетворительные данные, однако число принятых к градуировке точек должно быть не меньше трех.

10.3 Контроль стабильности градуировочной характеристики

Контроль стабильности градуировочной характеристики проводят в начале рабочего дня перед измерениями анализируемых проб.

Для проверки работоспособности системы и контроля стабильности градуировочной характеристики используют свежеприготовленный контрольный раствор витаминов (см. 10.2.3.6), который анализируют в условиях, соответствующих анализу градуировочных растворов.

Градуировка признается стабильной, если выполняется неравенство

$$|X - C_f| \le 0{,}01 G\, C_f, \qquad (4)$$

где X — измеренное значение массовой концентрации соответствующего витамина в контрольном растворе, мг/дм^3;

C_f — массовая концентрация соответствующего витамина в контрольном растворе, мг/дм^3;

G — норматив контроля стабильности градуировочной характеристики, %.

На стадии освоения метода в качестве значения G принимают значения, равные 10 % для пиридоксина и 16 % для рибофлавина.

При накоплении статистических данных лаборатория вправе устанавливать собственные нормативы контроля стабильности градуировочной характеристики, не превышающие значений, приведенных выше.

При невыполнении условия (4) заново анализируют контрольный раствор еще два раза. При повторных отклонениях, превышающих указанные нормативы хотя бы один раз, градуировку системы проводят заново, начиная с приготовления новых запасных растворов.

Также необходимо обращать внимание на время выхода пиков компонентов, отклонения которых не должны превышать 5 % средних значений.

10.4 Проведение измерений

Рекомендуется начинать работу с пробами только после проведения градуировки системы. Однако анализ получаемых растворов необходимо проводить в течение первых 1,5—2 ч после их приготовления.

10.4.1 Получение вытяжки витаминов из испытуемой пробы

Навеску меда массой 1,000 г помещают в плоскодонную колбу вместимостью 50 см^3, добавляют 25 см^3 экстрагирующего раствора, приготовленного по 10.2.1.13, и ставят в перемешивающее устройство при комнатной температуре на 15 мин.

Часть полученной вытяжки переносят в центрифужную пробирку и центрифугируют в течение 5 мин при 5000—6000 об/мин. Раствор над осадком отбирают в чистую пробирку.

Примечание — Вытяжку из навески исследуемой пробы необходимо анализировать в течение первых 1,5—2 ч после ее получения, что связано с низкой стабильностью витамина С (аскорбиновой кислоты).

10.4.2 Анализ полученных водных вытяжек

10.4.2.1 Анализ полученных вытяжек витаминов методом КЗЭ

Промывают капилляр ведущим электролитом № 1 в течение 10—15 мин. Далее устанавливают на выходе в рабочее положение пробирку с этим же электролитом, а на входе — пробирку с пробой и проводят ее ввод.

На полученных электрофореграммах необходимо проверить правильность автоматической разметки пиков, удалить лишние пики и настроить отчет так, чтобы маркировка пиков включала наименование компонента и его массовую концентрацию.

10.4.2.2 Анализ полученных водных вытяжек методом МЭКХ

Рекомендуется приступать к работе в мицеллярном варианте после проведения всех необходимых измерений в капиллярном зонном варианте, что связано с нежелательным частым кондиционированием капилляра при переходе с одного ведущего электролита на другой. Смена ведущего электролита чаще одного раза в течение рабочего дня может привести к загрязнению капилляра, которое потребует длительной промывки.

Промывают капилляр ведущим электролитом № 2 в течение 10—15 мин. Далее устанавливают на выходе в рабочее положение пробирку с этим же ведущим электролитом и проверяют стабильность

градуировочной характеристики по 10.2.5. Если стабильность удовлетворительная, проводят ввод пробы и затем анализ. Если стабильность градуировочной характеристики признают неудовлетворительной, то для сохранения приготовленного раствора сначала проводят анализ подготовленных проб, затем градуировку системы повторяют, создают на этой основе новый метод и обрабатывают полученные электрофореграммы в новом методе.

10.5 Обработка результатов измерений

Содержание соответствующего витамина в пробе X_i, г/кг, вычисляют по формуле

$$X_i = \frac{C_i V_i}{m}, \quad (5)$$

где C_i — массовая концентрация соответствующего витамина в экстракте, указанная на электрофореграмме или прочитанная в отчете, мг/дм^3;

V_i — объем полученного экстракта, равный 0,025 дм^3;

m — масса навески пробы, г.

10.6 Проверка приемлемости результатов измерений

В случае проведения экспресс-анализов возможно получение результата измерения содержания витаминов по единичному определению.

При проведении контрольных измерений в качестве результата измерения принимают среднеарифметическое результатов параллельных определений, если выполняется условие приемлемости

$$\frac{C_1 - C_2}{C_{ср}} 100 \le r, \quad (6)$$

где C_1, C_2 — результаты двух параллельных определений измерений массовой концентрации соответствующего витамина в пробе, мг/дм^3;

$C_{ср}$ — среднее значение двух параллельных определений измерений массовой концентрации соответствующего витамина в пробе, мг/дм^3;

r — значение предела повторяемости (таблица 1), %.

Если условие (6) не выполняется, то находят и устраняют причины нестабильности, заново регистрируют электрофореграммы и обрабатывают полученные результаты.

10.7 Оформление результатов измерений

Результат измерения представляют в виде $X \pm \Delta_i$, г/кг, $P = 0{,}95$.

По полученному результату анализа C_i и значению относительной погрешности рассчитывают абсолютную погрешность по формуле

$$\Delta_i = 0{,}01 \delta C_i, \quad (7)$$

где C_i — среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений, мг/дм^3.

Допускается результат измерения в документах, выдаваемых лабораторией, представлять в виде $X \pm \Delta_i$, г/кг, $P = 0{,}95$, при условии $\Delta_л < \Delta_i$, где $\pm \Delta_л$ — значение характеристики погрешности результатов измерений, установленное при реализации методики в конкретной лаборатории и обеспечиваемое контролем стабильности результатов измерений.

10.8 Оценка приемлемости результатов, получаемых в условиях воспроизводимости

Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 5725-6, проводят в следующем порядке.

Проверку проводят при получении результатов измерений двумя лабораториями. При этом пробы для выполнения измерений должны быть однородны, их количество должно быть подготовлено с необходимым для возможных повторных измерений резервом.

Каждая лаборатория получает результаты двух последовательных определений и проводит проверку их приемлемости по 10.5.

Совместимость окончательных результатов измерений, полученных двумя лабораториями, проверяют, сравнивая абсолютное расхождение между двумя средними результатами измерений с критической разностью $CD_{0,95}$ по формуле

$$CD_{0,95} = \sqrt{R^2 - \frac{r^2}{2}}, \quad (8)$$

где R — предел воспроизводимости;

r — предел повторяемости.

Примечание — Формула (8) применяется в случае, если средние значения получены как среднеарифметические двух последовательных определений ($n_1 = n_2 = 2$).

Если критическая разность превышена, то выполняют процедуры, изложенные в ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002 (пункт 5.3.3).

11 Контроль точности результатов измерений при реализации метода

11.1 Контроль с использованием образцов для контроля

В качестве таких образцов применяют образцы, для которых содержание анализируемых витаминов установлено на основании межлабораторного сличительного эксперимента или в данной лаборатории стандартизованными методами.

Сравнивают результат контрольной процедуры $K_к$ с нормативом контроля K. Результат контрольной процедуры вычисляют по формуле

$$K_к = |X - C|, \quad (9)$$

где X — результат измерения содержания витамина в образце для контроля, г/кг;

C — аттестованное значение, г/кг.

В качестве норматива контроля $K_к$ принимают значение характеристики погрешности измерений, установленное в лаборатории при реализации методики ($\Delta_л$,г/кг); если эти значения еще не установлены (например, при освоении методики), то вместо $\Delta_л$ используют значение 0,84 — Δ [где Δ — границы абсолютной погрешности измерений для доверительной вероятности P = 0,95, вычисляемые по формуле (5)]. Качество контрольной процедуры признают удовлетворительным, если $K_к \le K$. При невыполнении равенства (9) процедуру контроля повторяют. При повторном неудовлетворительном результате находят и устраняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам.

11.2 Контроль стабильности

Контроль качества результатов измерений при реализации методики в лаборатории предусматривает:

- оперативный контроль процедуры измерений на основе оценки погрешности при реализации отдельно взятой контрольной процедуры;
- контроль стабильности результатов измерений на основе контроля стабильности среднего квадратичного отклонения (СКО) повторяемости, СКО промежуточной (внутрилабораторной) прецизионности и погрешности.

Периодичность контроля исполнителем процедуры выполнения измерений на основе оценки погрешности измерений при реализации отдельной контрольной процедуры, а также реализуемые процедуры контроля стабильности результатов измерений регламентируются в Руководстве по качеству лаборатории. Если периодичность не указана, то руководствуются рекомендациями [1] по выбору числа контрольных процедур в зависимости от объема анализируемых проб.

Параметры контрольных карт Шухарта для контроля стабильности повторяемости и погрешности рассчитывают в соответствии с [1].

При построении контрольных карт Шухарта по оси ординат откладывают результат контрольной процедуры измерения содержания витамина x — при реализации контроля стабильности повторяемости, δ — при реализации контроля стабильности погрешности; по оси абсцисс откладывают дату проведения анализа.

Признаками возможного нарушения стабильности процесса измерений массовой доли витаминов являются следующие особенности: одна точка вышла за пределы действия; все точки подряд находятся по одну сторону от средней линии; шесть возрастающих (убывающих) точек подряд.

Если появляется хотя бы один из вышеперечисленных признаков, необходимо проверить соблюдение условий хранения подготовленных проб для анализа, проведения пробоподготовки и выполнения измерений, а также условий эксплуатации системы капиллярного электрофореза.

Библиография

[1] РМГ 76—2014 Государственная система обеспечения единства измерений. Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа

УДК 638.16:006.354 ОКС 65.140

Ключевые слова: мед натуральный, водорастворимые витамины, капиллярный электрофорез

БЗ 11—2018/19

Редактор *Л.В. Коретникова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *О.В. Лазарева*
Компьютерная верстка *Л.А. Круговой*

Сдано в набор 25.10.2018. Подписано в печать 13.11.2018. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,32. Уч.-изд. л. 2,10.
Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении 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