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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

**ГОСТ EN 14152— 2013**

# ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

## Определение витамина $B_2$ с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии

(EN 14152:2003, IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2014

gost.e-ecolog.ru

## Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0—92 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2009 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, применения, обновления и отмены»

**Сведения о стандарте**

1 ПОДГОТОВЛЕН Государственным научным учреждением Всероссийским научно-исследовательским институтом консервной и овощесушильной промышленности Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ ВНИИКОП Россельхозакадемии)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии (Росстандарт)

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 5 ноября 2013 г. № 61-П)

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 |
| Узбекистан | UZ | Узстандарт |

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 6 марта 2014 г. № 100-ст межгосударственный стандарт ГОСТ EN 14152—2013 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2015 г.

5 Настоящий стандарт идентичен европейскому региональному стандарту EN 14152:2003 Foodstuffs — Determination of vitamin $B_2$ by HPLC (Продукты пищевые. Определение витамина $B_2$ с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии).

Европейский региональный стандарт разработан техническим комитетом CEN/TC 275 «Анализ пищевых продуктов. Горизонтальные методы», секретариатом которого считается DIN.

Перевод с немецкого языка (de).

Официальные экземпляры европейского регионального стандарта, на основе которого подготовлен настоящий межгосударственный стандарт, имеются в Федеральном агентстве по техническому регулированию и метрологии Российской Федерации.

Сведения о соответствии межгосударственных стандартов ссылочным международным стандартам приведены в дополнительном приложении ДА.

Степень соответствия — идентичная (IDT)

6 ВЗАМЕН ГОСТ 25999—83 в части раздела 2

*Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячном информационном указателе «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*

© Стандартинформ, 2014

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 . . . 3
6 Проведение анализа . . . 4
7 Обработка результатов . . . 5
8 Прецизионность . . . 6
9 Протокол результатов испытаний . . . 6
Приложение А (справочное) Типичная хроматограмма . . . 7
Приложение В (справочное) Данные по прецизионности методики . . . 8
Приложение С (справочное) Альтернативные условия хроматографического анализа . . . 9
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии межгосударственных стандартов ссылочным международным стандартам . . . 10
Библиография . . . 11

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

# ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

## Определение витамина $B_2$ с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии

Foodstuffs. Determination of vitamin $B_2$ by HPLC

Дата введения — 2015—07—01

## 1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения витамина $B_2$ в пищевых продуктах с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Содержание витамина $B_2$ определяется как содержание рибофлавина.

## 2 Нормативные ссылки

Настоящий стандарт содержит отдельные положения из другого нормативного документа, обозначенного приведенной в данном разделе недатированной нормативной ссылкой, предполагающей использование последнего издания документа, 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) (ISO 3696:1987))

## 3 Сущность метода

Метод основан на экстракции рибофлавина из пробы путем кислотного гидролиза, последующем ферментативном дефосфорилировании рибофлавина и его количественном определении с помощью ВЭЖХ с флюориметрическим детектированием [1]—[8].

## 4 Реактивы

### 4.1 Общие положения

Для проведения анализа при отсутствии особо оговоренных условий используют только реактивы гарантированной аналитической чистоты и воду не ниже первой степени чистоты по EN ISO 3696 или бидистиллированную воду.

### 4.2 Реактивы и растворы

4.2.1 Метанол чистотой не менее 99,8 %.

4.2.2 Натрий уксуснокислый трехводный чистотой не менее 99 %.

4.2.3 Натрий уксуснокислый, раствор молярной концентрации $c(CH_3COONa \cdot 3H_2O) = 0{,}1$ моль/дм$^3$.

4.2.4 Натрий уксуснокислый, раствор молярной концентрации $c(CH_3COONa \cdot 3H_2O) = 2{,}5$ моль/дм$^3$.

4.2.5 Кислота уксусная ледяная чистотой не менее 99,8 %.

4.2.6 Кислота уксусная, раствор молярной концентрации $c\ (CH_3COOH) = 0{,}02$ моль/дм$^3$.

4.2.7 Кислота соляная массовой долей 35 %.

4.2.8 Кислота соляная, раствор молярной концентрации $c(HCl) = 0{,}1$ моль/дм$^3$.

Издание официальное

4.2.9 Кислота соляная, раствор молярной концентрации $c(HCl)$ = 0,01 моль/дм$^3$.

4.2.10 Кислота серная, раствор молярной концентрации $c(H_2SO_4)$ = 0,05 моль/дм$^3$.

4.2.11 Натрия гидроокись чистотой не менее 99 %.

4.2.12 Натрия гидроокись, раствор молярной концентрации $c(NaOH)$ = 0,5 моль/дм$^3$.

4.2.13 Фосфора пентоксид чистотой не менее 98 %.

4.2.14 Дефосфорилирующий фермент, пригодный для гидролиза связанного рибофлавина в пробе.

Примечание — При установлении характеристик прецизионности методики использована така-диастаза*.

**4.2.15 Подвижные фазы для ВЭЖХ**

Варианты подвижных фаз подходящего состава приведены в пояснении к рисунку А.1 приложения А и в приложении С. В качестве подвижных фаз используют смеси метанола (см. 4.2.1) с водой, фосфатным или ацетатным буферным раствором при объемной доле метанола от 10 % до 50 %, а также подвижные фазы с добавлением ион-парных реагентов.

4.2.16 Раствор буферный фосфатный (pH = 3,5) молярной концентрации однозамещенного фосфата калия $c(KH_2PO_4)$ = 9,0 ммоль/дм$^3$.

4.2.17 Тетраэтиламмония хлорид чистотой не менее 98 %.

4.2.18 Натрия гептансульфонат чистотой не менее 98 %.

**4.3 Образцы сравнения**

**4.3.1 Рибофлавин ($C_{17}H_{20}N_4O_6$) чистотой не менее 98 %**

Рибофлавин выпускают многие производители, при этом его чистота может различаться. Это обусловливает необходимость определения концентрации градуировочного раствора рибофлавина спектрофотометрическим методом по 4.4.3.

**4.3.2 Рибофлавин-5′-фосфат**

Натриевая соль рибофлавин-5′-фосфата ($C_{17}H_{20}N_4NaO_9P$) чистотой не менее 95 %.

**4.4 Основной раствор рибофлавина**

**4.4.1 Меры предосторожности**

Рибофлавин весьма чувствителен к свету, поэтому образец сравнения рибофлавина и его растворы необходимо защищать от действия света путем всевозможных приемов, например, путем использования для их хранения сосудов из темного стекла.

**4.4.2 Приготовление основного раствора рибофлавина массовой концентрации $\rho(C_{17}H_{20}N_4O_6)$ = 100 мкг/см$^3$**

Образец сравнения рибофлавина перед использованием высушивают и хранят в темноте в эксикаторе с помещенным в него пентоксидом фосфора (см. 4.2.13) или под вакуумом. Около 50 мг образца сравнения, измеренного с точностью до 1 мг, помещают в мерную колбу темного стекла вместимостью 500 см$^3$ и растворяют в растворе уксусной кислоты (см. 4.2.6).

Срок хранения полученного раствора в темноте при температуре 4 °С — 2 мес.

Рибофлавин трудно растворим, поэтому для облегчения его растворения в мерную колбу с образцом сравнения вносят сначала 300 см$^3$ раствора уксусной кислоты (см. 4.2.6). Колбу выдерживают на паровой бане при постоянном перемешивании до полного растворения рибофлавина. После охлаждения объем содержимого колбы доводят до метки раствором уксусной кислоты (см. 4.2.6). В качестве альтернативы в колбу с образцом сравнения вносят 5 см$^3$ раствора гидроокиси натрия (см. 4.2.12). Поскольку рибофлавин нестабилен в щелочной среде, немедленно после его растворения в колбу вносят 1,5 см$^3$ уксусной кислоты (см. 4.2.5), после чего объем содержимого колбы доводят до метки раствором уксусной кислоты (см. 4.2.6). Точную концентрацию основного раствора рибофлавина определяют по 4.4.3.

**4.4.3 Определение точной концентрации основного раствора рибофлавина**

В мерную колбу вместимостью 200 см$^3$ помещают 20 см$^3$ основного раствора рибофлавина (см. 4.4.2) и 3,5 см$^3$ раствора ацетата натрия (см. 4.2.3), объем содержимого в колбе доводят до метки водой, полученный раствор используют для спектрофотометрического измерения. Для приготовления

* Така-диастаза № T00040 — торговое наименование изделия, выпускаемого Platz and Bauer, Waterbury, CT 06708, США. Данная информация приведена для удобства применения настоящего стандарта и не является рекламной поддержкой МГС данного изделия. Допускается использовать аналогичные изделия при условии обеспечения идентичных результатов.

раствора сравнения в мерную колбу вместимостью 200 см$^3$ помещают 20 см$^3$ раствора уксусной кислоты (см. 4.2.6) и 3,5 см$^3$ раствора ацетата натрия (см. 4.2.3), объем содержимого колбы доводят водой до метки.

Измеряют оптическую плотность раствора рибофлавина против раствора сравнения на спектрофотометре (см. 5.1) в кварцевой кювете длиной оптического пути 1 см при длине волны 444 нм. Массовую концентрацию рибофлавина в основном растворе (см. 4.4.2) $\rho$, мкг/см$^3$, рассчитывают по формуле

$$\rho = \frac{A_{444} \cdot 10^4 \cdot 10}{328}, \quad (1)$$

где $A_{444}$ — значение оптической плотности при длине волны 444 нм;

$10^4$ — коэффициент пересчета концентрации измеряемого раствора в микрограммы на кубический сантиметр;

10 — коэффициент, учитывающий кратность разбавления основного стандартного раствора;

328 — коэффициент экстинкции $A^{1\%}_{1см}$ раствора рибофлавина в ацетатном буферном растворе с pH = 3,8 при длине волны 444 нм [9], соответствующий условной оптической плотности раствора рибофлавина массовой концентрации 10 г/дм$^3$.

### 4.5 Стандартные растворы

#### 4.5.1 Стандартный раствор рибофлавина массовой концентрации $\rho(C_{17}H_{20}N_4O_6)$ = 10 мкг/см$^3$

Раствор готовят десятикратным разбавлением основного раствора рибофлавина (см. 4.4.2). Пипеткой отмеряют 10 см$^3$ основного раствора рибофлавина (см. 4.4.2) и помещают в мерную колбу темного стекла вместимостью 100 см$^3$. Объем содержимого в колбе доводят до метки раствором уксусной кислоты (см. 4.2.6).

Раствор готовят в день использования.

#### 4.5.2 Градуировочные растворы рибофлавина массовой концентрации от 0,1 мкг/см$^3$ до 1 мкг/см$^3$

Пипеткой отмеряют от 1 см$^3$ до 10 см$^3$ стандартного раствора рибофлавина (см. 4.5.1) и помещают в мерную колбу вместимостью 100 см$^3$. Объем содержимого в колбе доводят до метки раствором подвижной фазой (см. 4.2.15).

Растворы готовят в день использования.

## 5 Аппаратура

При проведении анализа используют лабораторное оборудование, в частности, перечисленное ниже.

5.1 Спектрофотометр, пригодный для измерений оптической плотности в видимой области спектра при заданной длине волны, в комплекте с кюветами длиной оптического пути 1 см.

### 5.2 Автоклав или нагревательный прибор

Автоклав для экстракции проб с возможностью контроля температуры и давления или плитка электрическая, или баня водяная с контролем температуры.

### 5.3 Хроматограф жидкостный

Система для ВЭЖХ, состоящая из насоса, инжектора, флюориметрического детектора, позволяющего проводить измерения при длине волны возбуждения 468 нм и длине волны эмиссии 520 нм, и устройства регистрации и обработки аналитического сигнала, например, интегратора.

### 5.4 Колонка аналитическая для ВЭЖХ

Колонка внутренним диаметром от 4,0 мм до 4,6 мм, длиной от 100 мм до 250 мм, заполненная обращенно-фазовым сорбентом размером частиц от 3 мкм до 10 мкм. Допускается использовать колонку других размеров, заполненную сорбентом другого размера частиц, по сравнению с теми, что указаны в настоящем стандарте. Условия хроматографического разделения подбирают применительно к используемой колонке для обеспечения сопоставимости результатов анализов. В приложении С приведены варианты параметров хроматографического анализа, обеспечивающие приемлемую степень отделения пика рибофлавина от пиков сопутствующих компонентов матрицы пробы.

### 5.5 Установка для фильтрации

Фильтрование подвижной фазы перед ее использованием и раствора пробы для хроматографического анализа перед инжекцией через мембранный фильтр размером пор, например, 0,45 мкм, продлевает срок службы аналитических колонок для ВЭЖХ.

## 6 Проведение анализа

### 6.1 Меры предосторожности

Витамин $B_2$ весьма чувствителен к свету, поэтому при проведении испытания пробу для анализа и ее растворы необходимо защищать от действия света путем всевозможных приемов, например, используя сосуды из темного стекла.

### 6.2 Подготовка пробы

Пробу гомогенизируют, продукты твердой консистенции измельчают с помощью подходящей мельницы, после чего перемешивают. Перед измельчением пробу рекомендуется охладить, чтобы не подвергать ее длительному воздействию высоких температур.

### 6.3 Приготовление раствора пробы для анализа

#### 6.3.1 Экстракция

От 2 до 10 г анализируемой пробы, измеренной с точностью до 1 мг, помещают в коническую колбу. Добавляют раствор соляной кислоты (см. 4.2.8) или серной кислоты (см. 4.2.10) объемом от 50 до 200 см$^3$. Значение pH полученной смеси должно быть не более 2,0. Колбу закрывают часовым стеклом и выдерживают либо в автоклаве при температуре 121 °С в течение 30 мин, либо на водяной бане при температуре 100 °С в течение 60 мин.

Примечание — Согласно результатам исследований, кислотный гидролиз допустимо проводить при различных условиях, в частности, при температуре от 95 °С до 130 °С и продолжительности гидролиза от 15 до 60 мин. При этом чем выше температура, тем меньше времени требуется для проведения гидролиза. Однако более длительное тепловое воздействие может привести к потерям рибофлавина и рибофлавин-5′-фосфата. Установлено, что, в частности, для продуктов, содержащих шоколад, эффективность экстракции оказывается ниже при значениях pH экстракта выше 2.

#### 6.3.2 Ферментативная обработка

После охлаждения до комнатной температуры к экстракту добавляют раствор ацетата натрия (см. 4.2.4) до достижения значения pH, оптимального для действия предполагаемого к использованию фермента. В экстракт вносят необходимое количество дефосфорилирующего фермента (см. 4.2.14). Полученную смесь выдерживают в течение определенного промежутка времени и при температуре, оптимальных для используемого фермента. После охлаждения до комнатной температуры полученный раствор переносят в защищенную от света мерную колбу с помощью раствора уксусной кислоты (см. 4.2.6) или другого подходящего растворителя и доводят объем содержимого в колбе до метки ($V_E$).

Для каждого ферментного препарата устанавливают оптимальное значение pH и оптимальные температуру и продолжительность инкубации.

Для установления оптимальных условий дефосфорилирования проводят процедуру ферментативной обработки проб с добавлением рибофлавин-5′-фосфата (см. 4.3.2), а также проб, аналогичных исследуемой пробе по составу матрицы и являющихся аттестованными образцами сравнения.

При использовании для дефосфорилирования така-диастазы возможно привнесение в пробу с ферментным препаратом некоторого количества рибофлавина, что необходимо учитывать при расчете результата испытания.

Примечания

1 При установлении характеристик прецизионности, приведенных в настоящем стандарте, для проведения дефосфорилирования использована така-диастаза при следующих условиях. Значение pH экстракта доводилось до 4,0 добавлением раствора ацетата натрия по 4.2.4, после чего в экстракт вносили така-диастазу из расчета 100 мг препарата на грамм пробы. Полученную смесь инкубировали при температуре от 37 °С до 46 °С, продолжительность инкубирования составляла от 16 до 24 ч.

2 Скорость дефосфорилирования зависит от используемого ферментного препарата и матрицы пробы [7], [10], [11].

#### 6.3.3 Разбавление экстракта

Раствор пробы по 6.3.2 фильтруют через бумажный фильтр или мембранный фильтр размером пор 0,45 мкм. Осветление раствора допускается также проводить путем его центрифугирования при подходящем центробежном ускорении. Аликвотную часть прозрачного фильтрата ($V_A$) разбавляют до определенного объема ($V$) подходящим растворителем, совместимым с подвижной фазой для ВЭЖХ, например, к 1 см$^3$ экстракта по 6.3.2 добавляют 1 см$^3$ метанола (см. 4.2.1). Полученный раствор используют для анализа с помощью ВЭЖХ.

### 6.4 Идентификация аналита

Пик рибофлавина на хроматограмме раствора пробы идентифицируют по совпадению его времени удерживания со временем удерживания пика рибофлавина на хроматограмме градуировочного раствора. В качестве альтернативы пик рибофлавина на хроматограмме раствора пробы идентифицируют путем ее сопоставления с хроматограммой раствора пробы с добавлением малого количества стандартного раствора рибофлавина.

Примечание — Ниже приведены условия хроматографического анализа, гарантированно обеспечивающие удовлетворительное качество хроматографического разделения и количественного определения (см. также рисунок А.1 приложения А). Альтернативные условия приведены в приложении С.

Аналитическая колонка длиной 250 мм, внутренним диаметром 4,6 мм, заполненная сорбентом* диаметром частиц 5 мкм.

Состав подвижной фазы: смесь метанола (см. 4.2.1) с фосфатным буферным раствором (pH = 3,5) по 4.2.16, содержащим 1 г/дм$^3$ хлорида тетраэтиламмония (см. 4.2.17) и 5 ммоль/дм$^3$ гептансульфоната натрия (см. 4.2.18) в объемном соотношении 35:65.

Скорость протока подвижной фазы — 1,0 см$^3$/мин.

Объем инжекции — 20 мм$^3$.

Условия флюориметрического детектирования: длина волны возбуждения 468 нм, длина волны эмиссии 520 нм.

### 6.5 Количественное определение

Проводят хроматографический анализ градуировочных растворов (см. 4.4.2) и раствора пробы по 6.3.3 при одинаковых объемах инжекции (до 100 мм$^3$). Количественное определение проводят по методу внешнего стандарта путем соотнесения площади или высоты пика аналита на хроматограмме раствора пробы с аналогичными параметрами пиков на хроматограммах градуировочных растворов. Проверяют соблюдение требования проведения измерений в линейной области градуировочной зависимости.

## 7 Обработка результатов

Результат определения рассчитывают с использованием градуировочного графика либо с применением соответствующей программы расчета системы обработки данных, либо используют приведенный ниже упрощенный способ расчета.

Содержание витамина $B_2$ в пробе $w$, мг/100 г, рассчитывают по формуле

$$w = \frac{A_s \rho V V_E}{A_{ST} m_s V 1000} 100 - \frac{m_E E}{m_s}, \quad (2)$$

где $A_s$ — площадь или высота пика рибофлавина на хроматограмме раствора пробы, выраженная в единицах площади или высоты;

$\rho$ — массовая концентрация рибофлавина в градуировочном растворе (см. 4.4.2), мкг/см$^3$;

$V$ — объем раствора пробы для хроматографического анализа, приготовленного по 6.3.3, см$^3$;

$V_E$ — объем приготовленного экстракта из пробы по 6.3.2, см$^3$;

$A_{ST}$ — площадь или высота пика рибофлавина на хроматограмме градуировочного раствора, выраженная в единицах площади или высоты;

$m_s$ — масса ферментного препарата, добавленная к экстракту из пробы для ферментативной обработки, г;

1000 — коэффициент пересчета результата из мкг/100 г в мг/100 г;

100 — коэффициент пересчета результата как содержания аналита в 100 г пробы;

$V_A$ — объем приготовленного экстракта из пробы по 6.2.2, см$^3$;

$m_E$ — масса пробы для анализа, г;

$E$ — содержание рибофлавина в ферментном препарате, использованном для ферментативной обработки экстракта, мг/100 г.

---

* Например, Supelco(R) LC-18-DB, пригодный для целей применения настоящего стандарта. Данная информация приведена для удобства применения настоящего стандарта, не является рекламной поддержкой МГС данного изделия и не исключает возможность использования других изделий с аналогичными свойствами.

## 8 Презиционность

### 8.1 Общие положения

Значения характеристик прецизионности методики при использовании различных параметров ВЭЖХ-анализа при определении рибофлавина установлены в 1996 г. для сухого молока (CRM 421) и свиной печени сублимационной сушки (CRM 487) в результате межлабораторных испытаний, организованных Европейской Комиссией в рамках «Программы стандартных измерений и испытаний». Статистические данные, полученные в результате межлабораторных испытаний, приведены в приложении В. Значения метрологических характеристик, полученные в результате межлабораторных испытаний, могут быть не применимы к другим содержаниям аналита и другим типам матриц, по сравнению с теми, что указаны в приложении В.

### 8.2 Повторяемость

Абсолютное расхождение между результатами двух независимых единичных определений, полученными одним методом на идентичном объекте определений в одной лаборатории одним оператором с использованием одного оборудования в течение короткого промежутка времени, не должно превышать предел повторяемости $r$ более чем в 5 % случаев.

Значения предела повторяемости равны:

для сухого молока $\bar{x}$ = 14,54 мг/100 г, $r$ = 1,304 мг/100 г;

для свиной печени $\bar{x}$ = 105,46 мг/100 г, $r$ = 5,1104 мг/100 г.

### 8.3 Воспроизводимость

Абсолютное расхождение между результатами двух единичных определений, полученными одним методом на идентичном объекте определений в разных лабораториях разными операторами с использованием разного оборудования не должно превышать предел воспроизводимости $R$ более чем в 5 % случаев.

Значения предела воспроизводимости равны:

для сухого молока $\bar{x}$ = 14,54 мг/100 г, $R$ = 3,007 мг/100 г;

для свиной печени $\bar{x}$ = 105,46 мг/100 г, $R$ = 23,5342 мг/100 г.

## 9 Протокол результатов испытаний

Протокол результатов испытаний должен содержать как минимум следующие сведения:

a) фамилию и подпись лица, ответственного за проведение анализа;

b) всю информацию, необходимую для идентификации пробы;

c) указание использованного метода анализа со ссылкой на настоящий стандарт;

d) дату и способ отбора пробы (если известен);

e) дату поступления пробы в лабораторию;

f) дату проведения анализа;

g) результаты испытаний с указанием единиц измерения;

h) все особенности, наблюдавшиеся при проведении анализа;

i) все операции, не оговоренные в методике или рассматриваемые как необязательные, которые могли повлиять на результат испытания.

**Приложение А**
**(справочное)**

## Типичная хроматограмма

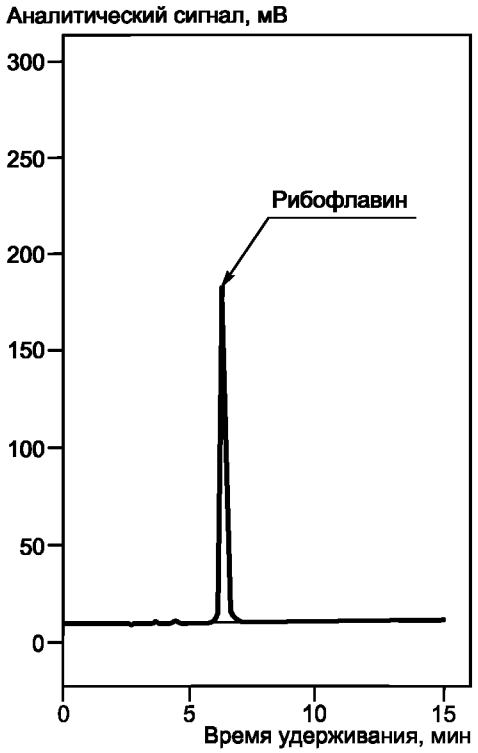



Рисунок А.1 — Пример хроматограммы градуировочного раствора рибофлавина

Условия хроматографического анализа:

Колонка длиной 250 мм, внутренним диаметром 4,0 мм, заполненная сорбентом Supelco® LC-18-DB* диаметром частиц 5 мкм.

Состав подвижной фазы — смесь метанола (см. 4.2.1) с фосфатным буферным раствором (pH = 3,5) по 4.2.16, содержащим 1 г/дм$^3$ хлорида тетраэтиламмония (см. 4.2.17) и 5 ммоль/дм$^3$ гептансульфоната натрия (см. 4.2.18) в объемном соотношении 35:65.

Скорость протока подвижной фазы — 1,5 см$^3$/мин.

Объем инжекции — 20 мм$^3$.

Условия детектирования — измерение флюоресценции при длине волны возбуждения 468 нм и длине волны эмиссии 520 нм.

---

* Supelco® LC-18-DB — пример изделия, пригодного для целей применения настоящего стандарта. Данная информация приведена для удобства применения настоящего стандарта, не является рекламной поддержкой МГС данного изделия и не исключает возможность использования других изделий с аналогичными свойствами.

**Приложение В**
**(справочное)**

## Данные по прецизионности методики

Следующие метрологические характеристики различных методов определения витамина $B_2$ (рибофлавина) получены в результате международных межлабораторных испытаний, организованных Европейской Комиссией в рамках «Программы стандартных измерений и испытаний» [10].

Таблица В.1

| Проба | CRM 421 Сухое молоко | CRM 487 Печень свиная |
|---|---|---|
| Аналит | Рибофлавин | Рибофлавин |
| Год проведения испытаний | 1996 | 1996 |
| Количество лабораторий-участников | 13 | 11 |
| Количество проб | 1 | 1 |
| Количество лабораторий, оставшихся после исключения выбросов | 12 | 11 |
| Количество выбросов (лабораторий) | 1 | 0 |
| Количество принятых результатов | 12 | 11 |
| Количество повторных испытаний единичной пробы | 5 | 5 |
| Среднее значение $\bar{x}$, мг/кг | 14,54 | 105,46 |
| Стандартное отклонение повторяемости $s_r$, мг/100 г | 0,4611 | 1,8058 |
| Относительное стандартное отклонение повторяемости, % | 3,17 | 1,71 |
| Предел повторяемости $r$ ($r = 2,83 s_r$), мг/100 г | 1,3048 | 5,1104 |
| Стандартное отклонение воспроизводимости $s_R$, мг/100 г | 1,0628 | 6,3160 |
| Относительное стандартное отклонение воспроизводимости $RSD_r$, % | 7,31 | 7,89 |
| Предел воспроизводимости $R$ ($R = 2,83 s_R$), мг/100 г | 3,0078 | 23,5342 |

Примечание — Приведенные результаты международных межлабораторных испытаний получены при использовании лабораториями — участниками идентичных процедур проведения испытания и параметров ВЭЖХ-анализа, указанных в приложении С.

**Приложение С**
**(справочное)**

## Альтернативные условия хроматографического анализа

В таблице С.1 приведены условия хроматографического анализа, гарантированно обеспечивающие удовлетворительное качество хроматографического разделения и количественного анализа.

Таблица С.1 — Альтернативные условия хроматографического анализа*

| Марка и размер частиц сорбента колонки для ВЭЖХ | Размеры колонки, мм (длина х внутренний диаметр) | Состав подвижной фазы (объемное соотношение компонентов) | Скорость подачи подвижной фазы, $см^3$/мин | Параметры флюориметрического детектирования (длины волн возбуждения/эмиссии) |
|---|---|---|---|---|
| Hypersil ODS, 5 мкм | 125 ×4,6 | Смесь метанола с водой (50:50) | 1,0 | 462/520 |
| Supelco® LC-18 DB, 5 мкм | 250 ×4,6 | Смесь метанола с фосфатным буферным раствором (pH = 3,5) по 4.2.16, содержащим 1 г/$дм^3$ хлорида тетрахэтиламмония и 5 ммоль/$дм^3$ гептансульфоната натрия, (35:65) | 1,0 | 468/520 |
| Lichrospher® RP 18, 5 мкм | 25 ×4 + 125 ×4 | Смесь метанола с водным раствором аммиака массовой долей 0,025 % с добавлением 1 г гексансульфоновой кислоты (250:500), pH = 3,6 | 1,5 | 467/525 |
| Apex® C 18,3 мкм | 250 ×4,6 | Смесь метанола с водой (1:1) | 1,0 | 460/510 |
| Bondapak® C18 radial-pak cartridges | 100 ×8 | Смесь метанола с фосфатным буферным раствором концентрации 5 ммоль/$дм^3$ с pH = 7 (35:65) | 1,0 | 440/520 |
| Spherisorb® ODS 2, 5 мкм | 250 ×4,6 | Смесь метанола с водой (50:50) | 1,0 | 450/510 |
| μ-Bondapak® C18, 10 мкм | 100 ×8 | Смесь метанола с буферным раствором на основе ацетата натрия с pH = 4,5 (40:60) | 1,0 | 422/522 |
| Kromasil® C18, 5 мкм | 250 ×4,6 | Смесь метанола с водой (40:60) | 1,0 | 440/520 |
| Eurospher® 100 C18, 5 мкм | 250 ×4,6 | Смесь метанола с водой (50:50) | 1,0 | 445/530 |
| Spherisorb® ODS, 5 мкм | 250 ×4,6 | Смесь метанола с водой (50:50) | 1,0 | 410/510 |
| Spherisorb® ODS, 5 мкм | 250 ×4,6 | Смесь раствора однозамещенного фосфата калия с ацетонитрилом и метанолом (60:10:30) | 0,8 | 450/520 |

* Приведенные в таблице марки сорбентов — примеры изделий, пригодных для целей применения настоящего стандарта. Данная информация приведена для удобства применения настоящего стандарта, не является рекламной поддержкой МГС данных изделий и не исключает возможности использования других изделий с аналогичными свойствами.

**Приложение ДА**
**(справочное)**

## Сведения о соответствии межгосударственных стандартов ссылочным международным стандартам

Таблица ДА.1

| Обозначение и наименование международного стандарта | Степень соответствия | Обозначение и наименование межгосударственного стандарта |
|---|---|---|
| ISO 3696:1987 Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы испытаний | — | * |
| * Соответствующий межгосударственный стандарт отсутствует. До его принятия рекомендуется использовать перевод на русский язык данного международного стандарта. Перевод данного международного стандарта находится в Федеральном информационном фонде технических регламентов и стандартов. | | |

## Библиография


[1] Lumley, I. D. und Wiggins, R. A.: Determination of riboflavin and flavin mononucleotide in foodstuffs using high-performance liquid chromatography and a column-enrichment technique. Analyst 106, 1981, 1103—1108

[2] Finglas, P. M. und Faulks, R. M: Critical review of HPLC methods for the determination of thiamin, riboflavin and niacin in food. J. Micronutr. Anal. 3, 1987, 251—283

[3] Ball, G. F. M, in G. F. M. Ball (Ed.): Water-Soluble Vitamin Assays in Food Analysis. Elsevier Applied Science, London, 1994, 237—246

[4] Hasselmann, C., Franck, D., Grimm, P., Diop, P. A. und Soules, C.: High-performance liquid chromatographic analysis of thiamin and riboflavin in dietic foods. J. Micronutr. Anal. 5, 1989, 269—279

[5] Ollilainen, V., Mattila P., Varo, P., Koivistoinen, P. und Huttunen. J.: The HPLC determination of total riboflavin in foods. J. Micronutr. Anal. 8, 1990, 199—207

[6] Hägg, M. und Kumpulainen, J.: Thiamin and riboflavin contents in domestic and imported cereal products in Finland. J. Food Comp. Anal. 6, 1993, 299—306

[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. 77, 1994, 681—686

[8] Eitenmiller, R. R. und Landen, W. O.: Vitamin Analysis for the Health and Food Sciences. CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington, D.C., 1999, 299—337

[9] European Pharmacopoeia 1997: 1997: 0292; Riboflavine. 1442—1443

[10] Finglas, P. M., Scott, K. J., Witthoft, C. M., van den Berg, H. & de Froidmont-Gortz, I. (1999). 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

[11] 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 Chemistry 71, 2000, 129—138

УДК 618.857.06.001.4:006.354 МКС 67.050 IDT

Ключевые слова: продукты пищевые, определение витамина $B_2$, рибофлавин, метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, флюориметрическое детектирование

Редактор *М.И. Максимова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *М.И. Першина*
Компьютерная верстка *А.Н. Золотаревой*

Сдано в набор 29.10.2014. Подписано в печать 18.11.2014. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,30. Тираж 48 экз. Зак. 4656.

Издано и отпечатано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.

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

gost.e-ecolog.ru