

---

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

---

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
СТАНДАРТ

ГОСТ  
EN 14152—  
2020

---

## ПРОДУКЦИЯ ПИЩЕВАЯ

Определение содержания витамина B<sub>2</sub>  
методом высокоэффективной жидкостной  
хроматографии

(EN 14152:2014, IDT)

Издание официальное

Москва  
Российский институт стандартизации  
2024

## 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 Научно-производственным республиканским унитарным предприятием «Белорусский государственный институт стандартизации и сертификации» (БелГИСС) на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии стандарта, указанного в пункте 5

2 ВНЕСЕН Государственным комитетом по стандартизации Республики Беларусь

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 30 июня 2020 г. № 131-П)

За принятие стандарта 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	ЗАО «Национальный орган по стандартизации и метрологии» Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Кыргызстан	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 24 апреля 2024 г. № 535-ст межгосударственный стандарт ГОСТ EN 14152—2020 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 ноября 2024 г. с правом досрочного применения

5 Настоящий стандарт идентичен европейскому стандарту EN 14152:2014 «Продукты пищевые. Определение витамина B<sub>2</sub> методом высокоэффективной жидкостной хроматографии» («Foodstuffs — Determination of vitamin B<sub>2</sub> by high performance liquid chromatography», IDT).

Европейский стандарт разработан техническим комитетом по стандартизации CEN/TC 275 «Анализ пищевых продуктов. Горизонтальные методы» Европейского комитета по стандартизации (CEN).

При применении настоящего стандарта рекомендуется использовать вместо ссылочного европейского стандарта соответствующий ему межгосударственный стандарт, сведения о котором приведены в дополнительном приложении ДА

6 ВЗАМЕН ГОСТ EN 14152—2013\*

\* Отменяется ГОСТ 25999—83 «Продукты переработки плодов и овощей. Методы определения витаминов B1 и B2» (в части раздела 3) с момента введения в действие настоящего стандарта.

*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»*

© Оформление. ФГБУ «Институт стандартизации», 2024



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 . . . . .	2
5 Оборудование . . . . .	3
6 Методика проведения испытания . . . . .	4
7 Вычисление . . . . .	6
8 Прецизионность . . . . .	6
9 Протокол испытания . . . . .	7
Приложение А (справочное) Примеры хроматограмм . . . . .	8
Приложение В (справочное) Данные прецизионности . . . . .	9
Приложение С (справочное) Альтернативные системы высокоэффективной жидкостной хроматографии . . . . .	12
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии ссылочного европейского стандарта межгосударственному стандарту . . . . .	13
Библиография . . . . .	14

**ПРОДУКЦИЯ ПИЩЕВАЯ****Определение содержания витамина В<sub>2</sub> методом высокоэффективной жидкостной хроматографии**Foodstuffs. Determination of vitamin B<sub>2</sub> by high performance liquid chromatographyДата введения — 2024—11—01  
с правом досрочного применения

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

**1 Область применения**

Настоящий стандарт устанавливает метод определения содержания витамина В<sub>2</sub> в пищевой продукции с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и флуоресцентного детектирования. Данный метод был валидирован в двух межлабораторных исследованиях. В первом исследовании проводился анализ проб сухого молока и свиной печени в пределах от 1,45 до 10,68 мг/100 г. Во втором исследовании анализировали пробы раствора для энтерального питания, пищевой продукции для детского питания, сухого молока, цельнозерновой муки с фруктами, дрожжей, продуктов переработки зерна, шоколадного порошка в диапазоне от 0,21 до 87,10 мг/100 г. Содержание витамина В<sub>2</sub> представляет собой массовую долю общего рибофлавина, включая его фосфорилированные производные.

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

**2 Нормативные ссылки**

Для применения настоящего стандарта необходимы следующие ссылочные стандарты. Для датированных ссылок применяют только указанное издание ссылочного стандарта, для недатированных ссылок применяют последнее издание ссылочного стандарта (включая все его изменения).

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

**3 Сущность метода**

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

## 4 Реактивы

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

- 4.1 **Метанол** для ВЭЖХ, массовая доля  $w(\text{CH}_3\text{OH}) \geq 99,8 \%$ .
- 4.2 **Натрия ацетат тригидрат**,  $w(\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}) = 99 \%$ .
- 4.3 **Раствор ацетата натрия**, молярная концентрация  $c(\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}) = 0,1$  моль/дм<sup>3</sup>.
- 4.4 **Раствор ацетата натрия**,  $c(\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}) = 2,5$  моль/дм<sup>3</sup>.
- 4.5 **Ледяная уксусная кислота**,  $w(\text{CH}_3\text{COOH}) = 99,8 \%$ .
- 4.6 **Раствор уксусной кислоты**,  $c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 0,02$  моль/дм<sup>3</sup>.
- 4.7 **Раствор соляной кислоты**,  $w(\text{HCl}) = 36 \%$ .
- 4.8 **Раствор соляной кислоты**,  $c(\text{HCl}) = 0,1$  моль/дм<sup>3</sup>.
- 4.9 **Раствор соляной кислоты**,  $c(\text{HCl}) = 0,01$  моль/дм<sup>3</sup>.
- 4.10 **Раствор серной кислоты**,  $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05$  моль/дм<sup>3</sup>.
- 4.11 **Раствор гидроксида натрия**,  $w(\text{NaOH}) \geq 99 \%$ .
- 4.12 **Раствор гидроксида натрия**,  $c(\text{NaOH}) = 0,5$  моль/дм<sup>3</sup>.
- 4.13 **Оксид фосфора**,  $w(\text{P}_2\text{O}_5) = 98 \%$ .
- 4.14 **Фермент или смесь ферментов**, способные высвобождать витамин В<sub>2</sub> из пищевой продукции в виде свободного рибофлавина.

**Примечание 1** — Для получения прецизионных данных, указанных в таблице В.1, была использована така-диастаза, произведенная компанией Pfaltz and Bauer<sup>1)</sup>. Для получения прецизионных данных, указанных в таблицах В.2 и В.3, была использована смесь  $\beta$ -амилазы из ячменя и така-диастазы, произведенной Serva<sup>1)</sup>.

### 4.15 Подвижные фазы ВЭЖХ

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

- 4.16 **Фосфатный буфер (рН 3,5)**,  $c(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 9,0$  ммоль/дм<sup>3</sup>.
- 4.17 **Тетраэтиламмоний хлорид**,  $w(\text{C}_8\text{H}_{20}\text{NCl}) \geq 98 \%$ .
- 4.18 **Натрия гептансульфонат**,  $w(\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NaO}_3\text{S}) \geq 98 \%$ .
- 4.19 **Стандартные вещества**

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

Витамин В<sub>2</sub> в виде рибофлавина может быть получен от различных поставщиков, поэтому степень его чистоты может различаться. В связи с этим необходимо определять концентрацию градуировочного раствора методом УФ-спектрометрии (см. проверку концентрации 4.20.3).

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

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

### 4.20 Основные растворы

#### 4.20.1 Меры предосторожности

Витамин В<sub>2</sub> является очень чувствительным к свету. Поэтому необходимо защитить витамин В<sub>2</sub> и соответствующие растворы в течение всей процедуры подготовки проб, например, посредством использования посуды из темного стекла.

- 4.20.2 **Основной раствор рибофлавина**,  $M = 376,36$ ,  $\rho(\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_6) \approx 100$  мкг/см<sup>3</sup>.

Взвешивают около 50 мг стандартного вещества рибофлавина (см. 4.19.1) с точностью до 1 мг, которое было предварительно высушено и хранилось в темноте в эксикаторе под вакуумом и/или заполненным оксидом фосфора (см. 4.13), помещают в мерную колбу из темного стекла вместимостью 500 см<sup>3</sup> и растворяют в растворе уксусной кислоты (см. 4.6). Полученный раствор хранят в темноте при температуре 4 °С в течение двух месяцев.

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

Рибофлавин труднорастворим. Для облегчения его растворения в мерную колбу со стандартным веществом рибофлавина вносят около 300 см<sup>3</sup> раствора уксусной кислоты (см. 4.6) и выдерживают колбу на водяной бане при постоянном перемешивании до полного растворения рибофлавина, затем раствор охлаждают и объем содержимого колбы доводят до метки раствором уксусной кислоты (см. 4.6). В качестве альтернативы в мерную колбу вместимостью 500 см<sup>3</sup> со стандартным веществом рибофлавина вносят 5 см<sup>3</sup> раствора гидроксида натрия (см. 4.12). Поскольку рибофлавин нестабилен в щелочной среде, сразу же после его растворения в колбу вносят 1,5 см<sup>3</sup> ледяной уксусной кислоты (см. 4.5), после чего объем содержимого колбы доводят до метки раствором уксусной кислоты (см. 4.6) или другой соответствующей кислотой. Точную концентрацию свежеприготовленного основного раствора рибофлавина и при необходимости хранившегося следует определять (см. 4.20.3).

#### 4.20.3 Определение точной концентрации основного раствора рибофлавина

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

Измеряют оптическую плотность раствора рибофлавина на спектрометре (см. 5.1) при длине волны 444 нм ( $A_{444}$ ) в кювете с длиной оптического пути 1 см, используя холостой раствор в качестве раствора сравнения. Рассчитывают массовую концентрацию основного раствора рибофлавина (см. 4.20.2)  $\rho$ , мкг/см<sup>3</sup>, по формуле

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

где  $\varepsilon$  — молярный коэффициент поглощения рибофлавина при максимальной длине волны приблизительно 444 нм,  $\varepsilon = 12\,340 \text{ дм}^3 \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ . Данное значение рассчитывается исходя из коэффициента экстинкции  $E_{1\text{см}}^{1\%} = 328$  в ацетатном буфере (рН = 3,8) при 444 нм [9] и молярной массы  $M = 376,36$ . Значение округляют до четырех значащих цифр;

$M$  — молярная масса, г/моль. Значение равно 376,36;

$A_{444}$  — значение оптической плотности раствора рибофлавина.

#### 4.21 Стандартные растворы

##### 4.21.1 Стандартный раствор рибофлавина, $\rho(\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_6) \approx 10 \text{ мкг/см}^3$ .

Готовят разведение 1 : 10 основного раствора рибофлавина (см. 4.20.2). Переносят пипеткой 10 см<sup>3</sup> основного раствора рибофлавина в мерную колбу из темного стекла вместимостью 100 см<sup>3</sup> и объем содержимого колбы доводят до метки раствором уксусной кислоты (см. 4.6) или другим подходящим растворителем. Используют свежеприготовленный раствор.

##### 4.21.2 Стандартный аналитический раствор рибофлавина, $\rho(\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_6) \approx \text{от } 0,1 \text{ до } 1 \text{ мкг/см}^3$ .

В мерную колбу из темного стекла вместимостью 100 см<sup>3</sup> переносят пипеткой от 1,0 до 10,0 см<sup>3</sup> стандартного раствора (см. 4.21.1) и объем содержимого колбы доводят до метки подвижной фазой (см. 4.15). Используют свежеприготовленный раствор.

### 5 Оборудование

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

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

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



### 5.3 Система ВЭЖХ

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

### 5.4 Колонка для ВЭЖХ

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

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

### 5.5 Фильтровальное устройство

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

## 6 Методика проведения испытания

### 6.1 Меры предосторожности

Витамин В<sub>2</sub> является очень чувствительным к свету. Необходимо предпринимать меры, чтобы защитить витамин В<sub>2</sub> и соответствующие растворы в течение всей процедуры подготовки проб, например, посредством использования посуды из темного стекла.

### 6.2 Подготовка анализируемой пробы

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

### 6.3 Подготовка раствора анализируемой пробы

#### 6.3.1 Экстракция

В мерном стакане или конической колбе взвешивают от 2 до 10 г анализируемой пробы с точностью до 1 мг. Добавляют определенный объем от 50 до 200 см<sup>3</sup> раствора соляной (см. 4.8) или серной кислоты (см. 4.10). Значение pH раствора не должно быть выше 2,0. Накрывают колбу предметным стеклом и автоклавируют пробу для испытания при температуре 121 °C в течение 30 мин или нагревают ее при температуре 100 °C в течение 60 мин.

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

#### 6.3.2 Ферментативная обработка

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

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



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

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

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

### 6.3.3 Раствор анализируемой пробы

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

При необходимости разбавляют аликвоту  $V_a$  определенным объемом  $V$  смеси растворителя, совместимого с системой элюирования ВЭЖХ. Например, 1,0 см<sup>3</sup> экстракта (см. 6.3.2) разбавляют 1,0 см<sup>3</sup> метанола (см. 4.2.1). Полученный раствор является раствором анализируемой пробы для анализа ВЭЖХ.

## 6.4 Идентификация

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

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

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

## 6.5 Определение

В систему ВЭЖХ вводят равные соответствующие объемы (до 100 мм<sup>3</sup>) раствора рибофлавина (см. 4.21.2)\*, а также раствора анализируемой пробы (см. 6.3.3). Для выполнения количественного определения методом внешнего стандарта интегрируют площади пиков или определяют высоты пиков пробы, результаты сравнивают с соответствующими значениями стандартного раствора.

Проверяют линейность градуировочной зависимости.

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

\* Исправлена ошибка, допущенная в EN 14152:2014: заменена ссылка «4.20.2» на «4.21.2».

## 7 Вычисление

Результат определения вычисляют, используя градуировочный график, или соответствующие программы системы обработки данных, или приведенный ниже упрощенный способ вычисления. Рассчитывают массовую долю витамина В<sub>2</sub>  $w$ , мг/100 г пробы, по формуле

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

- где  $A_S$  — площадь или высота пика рибофлавина на хроматограмме раствора анализируемой пробы (см. 6.3.3), выраженные в единицах площади или высоты;
- $A_{ST}$  — площадь или высота пика рибофлавина на хроматограмме раствора рибофлавина (см. 4.21.2)\*, выраженные в единицах площади или высоты;
- $V$  — общий объем раствора анализируемой пробы (см. 6.3.3), см<sup>3</sup>;
- $V_E$  — объем экстракта пробы (см. 6.3.2), см<sup>3</sup>;
- $V_A$  — объем аликвоты, используемый для разбавления (см. 6.3.3), см<sup>3</sup>;
- $\rho$  — массовая концентрация рибофлавина в растворе рибофлавина (см. 4.21.2)\*, мкг/см<sup>3</sup>;
- $m_S$  — масса пробы, г;
- 1 000 — коэффициент пересчета микрограммов в миллиграммы;
- 100 — коэффициент пересчета массовой доли на 100 г;
- $E$  — массовая доля рибофлавина, присутствующего в ферменте, мг/100 г;
- $m_E$  — масса фермента, используемого в анализе, г;

Результат определения содержания витамина В<sub>2</sub>, мг/100 г, представляют в пересчете на рибофлавин.

## 8 Прецизионность

### 8.1 Общие положения

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

### 8.2 Повторяемость

Абсолютная разность между двумя независимыми результатами испытаний, полученными при исследовании идентичного анализируемого материала одним и тем же оператором, использовавшим одно и то же оборудование в пределах самого короткого промежутка времени, не должна превышать предел повторяемости  $r$  более чем в 5 % случаев.

Значения для рибофлавина:

Сухое молоко	$\bar{x} = 1,45$ мг/100 г	$r = 0,13$ мг/100 г
Свиная печень	$\bar{x} = 10,5$ мг/100 г	$r = 0,51$ мг/100 г
Раствор для энтерального питания	$\bar{x} = 0,21$ мг/100 г	
Детское питание с овощами	$\bar{x} = 0,30$ мг/100 г	$r = 0,02$ мг/100 г
Сухое молоко	$\bar{x} = 1,13$ мг/100 г	$r = 0,08$ мг/100 г

Цельнозерновая мука с фруктами	$\bar{x} = 0,60$ мг/100 г	$r = 0,06$ мг/100 г
Дрожжи	$\bar{x} = 4,34$ мг/100 г	$r = 0,37$ мг/100 г
Продукты переработки зерна	$\bar{x} = 0,43$ мг/100 г	$r = 0,06$ мг/100 г
Продукты переработки зерна	$\bar{x} = 2,48$ мг/100 г	$r = 0,18$ мг/100 г
Шоколадный порошок	$\bar{x} = 1,26$ мг/100 г	$r = 0,14$ мг/100 г
Биологически активная добавка к пище	$\bar{x} = 87,1$ мг/100 г	$r = 9,5$ мг/100 г

### 8.3 Воспроизводимость

Абсолютная разность между двумя независимыми результатами испытаний, полученными при исследовании идентичного анализируемого материала в двух лабораториях, не должна превышать предел воспроизводимости  $R$  более чем в 5 % случаев.

Значения для рибофлавина:

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

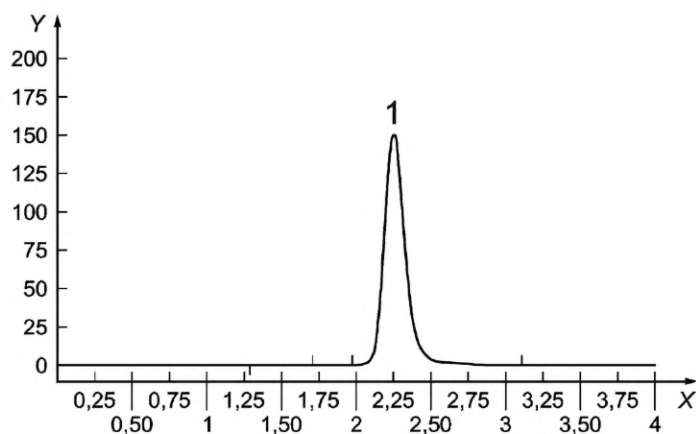
## 9 Протокол испытания

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

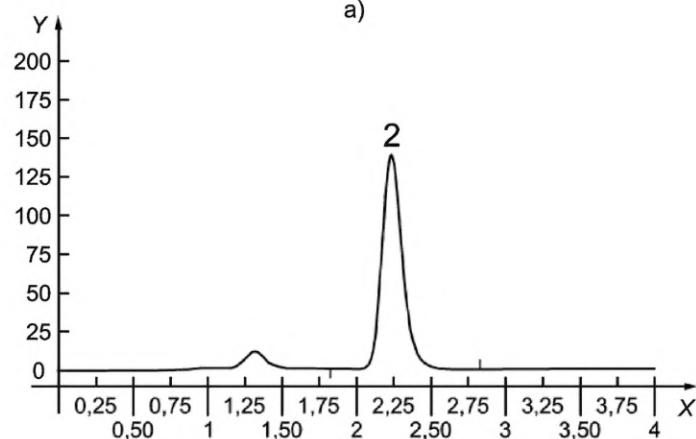
- а) всю информацию, необходимую для идентификации пробы;
- б) ссылку на настоящий стандарт или используемый метод;
- в) дату и время отбора проб (если известно);
- г) дату получения пробы;
- д) дату проведения испытания;
- е) результаты и единицы измерения, в которых выражены результаты;
- ж) любые особенности, которые наблюдались в ходе проведения испытания;
- з) любые операции, не установленные в настоящем стандарте или рассматриваемые в качестве дополнительных, которые могли повлиять на результаты.

**Приложение А**  
**(справочное)**

**Примеры хроматограмм**



a)



b)

Y — флюоресценция; X — время, мин; 1 — витамин В<sub>2</sub> в стандартном растворе рибофлавина (0,05 мкг/см<sup>3</sup>), время удерживания 2,3 мин; 2 — витамин В<sub>2</sub> в смеси для детского питания, время удерживания 2,3 мин

Колонка: SymmetryShield RP18, 5 мкм, 150 × 3,0 мм.

Подвижная фаза: метанол (см. 4.1): ацетат натрия (0,05 моль/дм<sup>3</sup>) (30 : 70).

Скорость потока: 1,0 см<sup>3</sup>/мин.

Объем введенной пробы: 10 мм<sup>3</sup>.

Детектор: флуориметрический: длина волны возбуждения 468 нм, длина волны эмиссии 520 нм.

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

**Приложение В**  
**(справочное)**

**Данные прецизионности**

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

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

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

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

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

Пробы	Раствор для энтерального питания	Детское питание с овощами	Сухое молоко	Цельнозерновая мука с фруктами	Дрожжи
Год исследования	1995	1995	1995	1995	1995
Количество лабораторий	8	11	11	11	11
Количество проб	1	1	1	1	1

Окончание таблицы В.2

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

Таблица В.3 — Данные прецизионности для продуктов переработки зерна, шоколадного порошка и биологически активной добавки к пище

Пробы	Продукт переработки зерна	Продукт переработки зерна	Шоколадный порошок	Биологически активная добавка к пище
Год исследования	1995	1995	1995	1995
Количество лабораторий	11	11	11	9
Количество проб	1	1	1	1
Количество лабораторий, оставшихся после исключения выбракованных	10	10	11	9
Количество выбракованных лабораторий	1	1	0	0
Количество полученных результатов	20	20	22	18
Среднее значение $\bar{x}$ , мг/100 г	0,143	2,48	1,26	87,1
Стандартное отклонение повторяемости $s_r$ , мг/100 г	0,02	0,07	0,05	3,4
Коэффициент вариации повторяемости, %	5	3	4	4
Значение предела повторяемости $r$ [ $r = 2,83 \cdot s_r$ ], мг/100 г	0,06	0,18	0,14	9,5



Окончание таблицы В.3

Пробы	Продукт переработки зерна	Продукт переработки зерна	Шоколадный порошок	Биологически активная добавка к пище
Стандартное отклонение воспроизводимости $s_R$ , мг/100 г	0,07	0,19	0,13	5,9
Коэффициент вариации воспроизводимости, %	16	8	11	7
Значение предела воспроизводимости $R$ [ $R = 2,83 \cdot s_R$ ], мг/100 г	0,19	0,53	0,37	16,6
Значение индекса Горвица в соответствии с [14]	1,2	0,8	1,0	1,2

**Приложение С**  
**(справочное)**

**Альтернативные системы высокоэффективной жидкостной хроматографии**

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

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

Колонка <sup>а</sup>	Размеры колонки, мм × мм	Подвижная фаза	Поток, см <sup>3</sup> /мин	Параметры флуориметрического детектирования, нм
Hypersil® ODS, 5 мкм	125 × 4,6	Метанол : вода (50 : 50)	1,0	Возбуждение: 462 Эмиссия: 520
Supelco® LC-18-DB, 5 мкм	250 × 4,6	Метанол : фосфатный бу- фер (см. 4.16), содержащий тетраэтиламмоний хлорид, $\rho(\text{C}_8\text{H}_{20}\text{NCl}) = 1 \text{ г/дм}^3$ и натрия гептансульфонат, $c(\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NaO}_3\text{S}) = 5 \text{ ммоль/дм}^3$ (35 : 65)	1,0	Возбуждение: 468 Эмиссия: 520
Lichrospher® RP18, 5 мкм	25 × 4 + 125 × 4	Метанол : 0,025 % аммиака (+ 1 г гексансульфоновой кис- лоты) (250 : 500), pH 3,6	1,5	Возбуждение: 467 Эмиссия: 525
Apex® C18, 3 мкм	250 × 4	Метанол : вода (50 : 50)	1,0	Возбуждение: 450 Эмиссия: 510
Bondapak® C18 ra- dial-pak cartridges	100 × 8	Метанол : фосфатный буфер концентрации 5 ммоль/дм <sup>3</sup> , pH = 7 (35 : 65)	1,0	Возбуждение: 440 Эмиссия: 520
Spherisorb® ODS2, 5 мкм	250 × 4,6	Метанол : вода (50 : 50)	1,0	Возбуждение: 450 Эмиссия: 510
μBondapak® C18, 10 мкм	100 × 8	Метанол : натрий-ацетат- ный буфер концентрации 0,05 моль/дм <sup>3</sup> , pH = 4,5 (40 : 60)	1,0	Возбуждение: 422 Эмиссия: 522
Kromasil® C-18, 5 мкм	250 × 4,6	Метанол : вода (40 : 60)	1,0	Возбуждение: 440 Эмиссия: 520
Eurospher® C18, 5 мкм	250 × 4,6	Метанол : вода (50 : 50)	1,0	Возбуждение: 445 Эмиссия: 530
Spherisorb® ODS, 5 мкм	250 × 4,6	Метанол : вода (50 : 50)	1,0	Возбуждение: 410 Эмиссия: 510
Spherisorb® ODS, 5 мкм	250 × 4,6	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ : ацетонитрил : мета- нол (60 : 10 : 30)	0,8	Возбуждение: 450 Эмиссия: 520
<sup>а</sup> Указанные торговые марки являются примерами подходящей продукции для целей применения настоящего стандарта, имеющейся в продаже. Информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламой CEN указанной продукции.				

**Приложение ДА  
(справочное)**

**Сведения о соответствии ссылочного европейского стандарта  
межгосударственному стандарту**

Таблица ДА.1

Обозначение ссылочного европейского стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование соответствующего межгосударственного стандарта
EN ISO 3696 (ISO 3696)	IDT	ГОСТ ISO 3696—2013 «Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы контроля» <sup>1)</sup> (ISO 3696:1987)
<p>Примечание — В настоящей таблице использовано следующее условное обозначение степени соответствия стандарта:</p> <p>- IDT — идентичный стандарт.</p>		

<sup>1)</sup> В Российской Федерации действует ГОСТ Р 52501—2005 (ИСО 3696:1987) «Вода для лабораторного анализа. Технические условия».

## Библиография

- [1] LUMLEY I.D., WIGGINS R.A. Determination of riboflavin and flavin mononucleotide in foodstuffs using high-performance liquid chromatography and a column-enrichment technique. *Analyst* (Lond.). 1981, 106 pp. 1103—1108 (Определение рибофлавина и флавин-моноклеотида в пищевой продукции с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии и метода колонного обогащения)
- [2] FINGLAS P.M., FAULKES R. M: Critical review of HPLC methods for the determination of thiamin, riboflavin and niacin in food. *J. Micronutr. Anal.* 1987, 3 pp. 251—283 (Критический обзор методов ВЭЖХ для определения тиамина, рибофлавина и ниацина в пищевой продукции)
- [3] BALL F.M. in g. F. M. Ball (Ed.): *Water-Soluble Vitamin Assays in Food Analysis*. Elsevier Applied Science, London, 1994, 237—246 (Химические анализы растворимых в воде витаминов при анализе пищевой продукции)
- [4] HASSELMANN C., FRANCK D., GRIMM P., DIOP P.A., SOULES C. High-performance liquid chromatographic analysis of thiamin and riboflavin in dietic foods. *J. Micronutr. Anal.* 1989, 5 pp. 269—279 (Высокоэффективный хроматографический анализ тиамина и рибофлавина в диетической пищевой продукции)
- [5] OLLILAINEN V., MATTILA P., VARO P., KOIVISTOINEN P., HUTTUNEN J. The HPLC determination of total riboflavin in foods. *J. Micronutr. Anal.* 1990, 8 pp. 199—207 (Определение общего содержания рибофлавина методом ВЭЖХ в пищевой продукции)
- [6] HÄGG M., KUMPULAINEN J. Thiamin and riboflavin contents in domestic and imported cereal products in Finland. *J. Food Compos. Anal.* 1993, 6 pp. 299—306 (Содержание тиамина и рибофлавина в отечественных и импортируемых в Финляндию крупяных продуктах)
- [7] HÄGG M. Effect of various commercially available enzymes in the liquid chromatographic determination with external standardization of thiamin and riboflavin in foods. *J. AOAC Int.* 1994, 77 pp. 681—686 (Влияние различных имеющихся в продаже ферментов в жидкостном хроматографическом определении с применением внешних стандартов тиамина и рибофлавина в пищевой продукции)
- [8] EITENMILLER R.R., LANDEN W.O. *Vitamin Analysis for the Health and Food Sciences*. CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington, D.C., 1999, pp. 271—297 (Анализ витаминов для валеологии и науки о продуктах питания)
- [9] FINGLAS P.M., SCOTT K.J., WITTHOFT C.M., VAN DEN BERG H., DE FROIDMONT-GORTZ I. The certification of the mass fractions of vitamins in four reference materials: Wholemeal flour (CRM 121), milk powder (CRM 421), lyophilised mixed vegetables (CRM 485) and lyophilised pig's liver (CRM 487). EUR-report 18320, Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, 1999 (Сертификация массовых долей витаминов в четырех эталонных материалах: цельнозерновой муке (CRM 121), сухом молоке (CRM 421), смеси лиофилизированных овощей (CRM 485) и лиофилизированной свиной печени (CRM 487))
- [10] ARELLA F., LAHÉLY S., BOURGUIGNON J.B., HASSELMANN C. Liquid chromatographic determination of vitamin B1 and B2 in foods. A collaborative study. *Food Chem.* 1996, 56 pp. 81—86 (Жидкостное хроматографическое определение витамина B<sub>1</sub> и B<sub>2</sub> в пищевой продукции)
- [11] OLLILAINEN V., FINGLAS P.M., VAN DEN BERG H., DE FROIDMONT-GORTZ I. Certification of B-Group Vitamins (B1, B2, B6, and B12) in Four Food Reference Materials. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49 pp. 315—321 (Сертификация витаминов группы B (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub> и B<sub>12</sub>) в четырех эталонных материалах пищевой продукции)
- [12] *European Pharmacopoeia 1997: 1997: 0292; Riboflavine. 1442-1443* (Европейская фармакопея 1997: 1997: 0292; рибофлавин)
- [13] NDAW S., BERGAENZLE M., AOUDE-WERNER D., HASSELMANN C. Extraction procedures for the liquid chromatography determination of thiamine, riboflavin and vitamin B<sub>6</sub> in foodstuffs. *Food Chem.* 2000, 71 pp. 129—138 (Процедуры экстракции для определения методом жидкостной хроматографии тиамина, рибофлавина и витамина B<sub>6</sub> в пищевой продукции)
- [14] HORWITZ W., ALBERT R. The Horwitz Ratio (HorRat): A useful Index of Method Performance with Respect to Precision. *J. AOAC Int.* 2006, 89 pp. 1095—1109 (Индекс Горвица: приемлемый индекс эффективности метода с точки зрения прецизионности)
- [15] THOMPSON M. Recent trends in inter-laboratory precision at and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing. *Analyst* (Lond.). 2000, 125 pp. 385—386 (Последние тенденции в межлабораторной точности в концентрациях частей на млрд (ppb) и субчастей на млрд (sub-ppb) в отношении пригодности критериев назначения в квалификационных испытаниях)

- [16] JAKOBSEN J. Food Chem. 2008, 106 pp. 1209—1217. Optimisation of the determination of thiamin, 2-(1-hydroxyethyl)thiamine, and riboflavin in food samples by use of HPLC (Оптимизация определения тиаминa 2-(1-гидроксиэтил)тиаминa и рибофлавина в пробах пищевой продукции с помощью ВЭЖХ)
- [17] EN ISO/IEC 17025:2005 Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrier-laboratorien (ISO/IEC 17025:2005) (Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий)

Ключевые слова: пищевая продукция, определение, витамин В<sub>2</sub>, рибофлавин, высокоэффективная жидкостная хроматография

---

Технический редактор *И.Е. Черепкова*  
Корректор *Е.Д. Дульнева*  
Компьютерная верстка *А.Н. Золотаревой*

Сдано в набор 25.04.2024. Подписано в печать 13.05.2024. Формат 60×84%. Гарнитура Ариал.  
Усл. печ. л. 2,32. Уч.-изд. л. 1,90.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

---

Создано в единичном исполнении в ФГБУ «Институт стандартизации» для комплектования Федерального информационного фонда стандартов, 117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.  
[www.gostinfo.ru](http://www.gostinfo.ru) [info@gostinfo.ru](mailto:info@gostinfo.ru)