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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ
СТАНДАРТ

ГОСТ
34258—
2017

**СРЕДСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫЕ
ДЛЯ ВЕТЕРИНАРНОГО ПРИМЕНЕНИЯ,
КОРМОВЫЕ ДОБАВКИ**

**Метод определения содержания
водорастворимых витаминов с помощью
высокоэффективной жидкостной хроматографии
со спектрофотометрическим детектированием**

Издание официальное



Москва
Стандартинформ
2017

Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены в ГОСТ 1.0—2015 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2015 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным учреждением «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 30 августа 2017 г. № 102-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
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 8 ноября 2017 г. № 1677-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 34258—2017 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 2019 г.

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

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 (www.gost.ru)

© Стандартиформ, 2017

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

Поправка к ГОСТ 34258—2017 Средства лекарственные для ветеринарного применения, кормовые добавки. Метод определения содержания водорастворимых витаминов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии со спектрофотометрическим детектированием

В каком месте	Напечатано	Должно быть
Пункт 5.1, первое перечисление	максимальной нагрузкой не более 500 г и пределами допускаемой погрешности не более $\pm 0,001$ г;	пределами допускаемой погрешности не более $\pm 0,01$ г;
Пункт 9.4, последний абзац	микрограммах	миллиграммах

(ИУС № 12 2019 г.)

СРЕДСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ДЛЯ ВЕТЕРИНАРНОГО ПРИМЕНЕНИЯ, КОРМОВЫЕ ДОБАВКИ**Метод определения содержания водорастворимых витаминов
с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии
со спектрофотометрическим детектированием**

Veterinary preparations, feed additives. Method for determination of water-soluble vitamins content by high performance liquid chromatography with spectrophotometric detection

Дата введения — 2019—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на лекарственные средства для ветеринарного применения, кормовые добавки и устанавливает метод высокоэффективной жидкостной хроматографии со спектрофотометрическим детектированием (далее — ВЭЖХ) для определения содержания водорастворимых витаминов в диапазоне измерений для В₁, РР: от 60 до 4800 мг/кг; для В₂, В₆, В₁₂, Н, В₉: от 25 до 2000 мг/кг; для В₅: от 125 до 10000 мг/кг.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

ГОСТ 12.1.005—88 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

ГОСТ 12.1.007—76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.019—79 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты¹

ГОСТ OIML R 76-1—2011 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

ГОСТ 201—76 Тринатрийфосфат. Технические условия

ГОСТ 1770—74 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 4204—77 Реактивы. Кислота серная. Технические условия

ГОСТ 4220—75 Реактивы. Калий двухромовокислый. Технические условия

ГОСТ 4328—77 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ ИСО 5725-6—2003 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике^{**}

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 9147—80 Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия

ГОСТ 13496.0—2016 Комбикорма, комбикормовое сырье. Методы отбора проб

ГОСТ 25336—82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 31929—2013 Средства лекарственные для ветеринарного применения. Правила приемки, методы отбора проб

* В Российской Федерации действует ГОСТ Р 12.1.019—2009.

** В Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002.

П р и м е ч а н и е — 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 ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Сущность метода

Определение содержания водорастворимых витаминов проводят методом внешнего стандарта по площадям пиков идентифицированных соединений с помощью градуировочной характеристики высокоэффективной жидкостной хроматографии со спектрофотометрическим детектированием. Детектирование осуществляется на диодной матрице в диапазоне длин волн, соответствующем поглощению каждого витамина.

Параметры идентификации витаминов В₁, В₂, В₅, В₆, В₉, В₁₂, РР, Н приведены в таблице 1.

Т а б л и ц а 1 — Параметры идентификации витаминов В₁, В₂, В₅, В₆, В₉, В₁₂, РР, Н

Витамин	Время удерживания, мин	Длина волны, λ, нм, при максимуме светопоглощения
Тиамин гидрохлорид (В ₁)	4,9—5,2	250 ± 2
Никотинамид (РР)	8,0—8,3	
Пиридоксин (В ₆)	12,3—12,5	210 ± 2
Пантотеновая кислота (В ₅)	14,0—14,1	
Фолиевая кислота (В ₉)	14,9—15,0	
Цианокобаламин (В ₁₂)	15,1—15,2	
Биотин (Н)	16,5—16,6	
Рибофлавин (В ₂)	15,9—16,0	275 ± 2

4 Требования безопасности и условия выполнения измерений

4.1 Применяемые в работе реактивы относятся к веществам 1-го и 2-го класса опасности по ГОСТ 12.1.007, при работе с ними необходимо соблюдать требования безопасности, установленные для работ с токсичными, едкими и легковоспламеняющимися веществами по ГОСТ 12.1.005.

4.2 Помещения, в которых проводят анализ и подготовку проб, должны быть оборудованы приточно-вытяжной вентиляцией.

4.3 Приготовление и дозирование градуировочных растворов проводят в вытяжном шкафу.

4.4 Применяемые при определении содержания витаминов средства измерений должны иметь свидетельства о поверке, вспомогательные устройства — свидетельства об аттестации, оформленные в соответствии с требованиями национального законодательства в области обеспечения единства измерений, действующего на территории государства, принявшего стандарт.

4.5 При выполнении измерений на высокоэффективном жидкостном хроматографе следует соблюдать правила по электробезопасности в соответствии с ГОСТ 12.1.019 и инструкцией по эксплуатации прибора.

4.6 К выполнению подготовки проб и измерений на высокоэффективном жидкостном хроматографе допускаются специалисты, имеющие высшее или среднее специальное образование, прошедшие соответствующий курс обучения, владеющие техникой ВЭЖХ и изучившие инструкции по эксплуатации используемого оборудования.

4.7 При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

- температура окружающего воздуха от 15 °С до 30 °С;
- относительная влажность воздуха от 20 % до 80 %.

5 Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, посуда и реактивы

5.1 Для определения содержания витаминов применяют следующие средства измерений, вспомогательные устройства, материалы и посуду:

- весы неавтоматического действия высокого класса точности по ГОСТ OIML R 76-1 с максимальной нагрузкой не более 500 г и пределами допускаемой погрешности не более $\pm 0,001$ г;
- весы утвержденного типа с пределами допускаемой погрешности не более $\pm 0,1$ мг;
- высокоэффективный жидкостный хроматограф с насосом высокого давления, диодноматричным детектором, позволяющим проводить измерения оптической плотности на нескольких длинах волн в диапазоне от 190 до 800 нм;
- колонку хроматографическую для ВЭЖХ длиной 250 мм, внутренним диаметром 4,60 мм, заполненную обращено-фазным сорбентом C18 с размером частиц не более 5 мкм;
- компьютер с установленным программным обеспечением для управления хроматографом и обработки результатов измерений;
- образец с аттестованными значениями анализируемых витаминов (SRM);
- рН-метр или универсальный иономер диапазоном измерения от 4 до 9 ед. рН с погрешностью измерения $\pm 0,05$ ед. рН;
- одноканальные пипетки переменной вместимости 40—200 мм³, 200—1000 мм³, 1—5 см³ с допустимой относительной погрешностью дозирования по метанолу и ацетонитрилу не более ± 1 %;
- колбы мерные 1—10(50,100,500)—2 по ГОСТ 1770;
- баню ультразвуковую с рабочей частотой не менее 20 Гц и объемом не менее 1 дм³;
- систему получения деионизированной воды высокой чистоты с удельным сопротивлением 18 МОм·см;
- центрифугу лабораторную рефрижераторную со скоростью вращения не менее 15000 об/мин и диапазоном температур от 4 °С до 20 °С с адаптерами для микроцентрифужных пробирок вместимостью 1,5 см³;
- мельницу лабораторную;
- виалы (флаконы) стеклянные вместимостью 2 см³ с завинчивающимися крышками и тефлоновыми прокладками;
- пробирки микроцентрифужные вместимостью 1,5 см³;
- шприцы медицинские вместимостью 2 см³;
- фильтры мембранные с диаметром пор 0,45 мкм;
- стакан В-1—600 ТС по ГОСТ 25336;
- ступка с пестиком по ГОСТ 9147;
- цилиндры 1—50—2 и 1—500—2 по ГОСТ 1770;
- холодильник бытовой с цифровым контроллером температуры и рабочим диапазоном температур от 2 °С до 8 °С.

5.2 Для определения содержания витаминов применяют следующие реактивы:

- ацетонитрил для ВЭЖХ с массовой долей основного вещества не менее 99,9 %;
- воду деионизированную для ВЭЖХ, полученную с использованием системы производства ультрачистой воды из дистиллированной воды по ГОСТ 6709;
- калий двуххромовокислый по ГОСТ 4220;
- кислоту серную по ГОСТ 4204, х. ч.;
- кислоту трифторуксусную для ВЭЖХ с массовой долей основного вещества не менее 99,9 %;
- натрия гидроокись по ГОСТ 4328, ч. д. а.;
- натрий фосфорнокислый двузамещенный с массовой долей основного вещества не менее 98,0 %;
- натрий фосфорнокислый однозамещенный (моногидрат) с массовой долей основного вещества не менее 98,0 %;
- тринатрийфосфат по ГОСТ 201.

5.3 При измерении содержания витаминов для приготовления исходного раствора в качестве образцов сравнения применяют следующие вещества:

- биотин с массовой долей основного вещества не менее 98,0 %;
- никотинамид с массовой долей основного вещества не менее 98,0 %;
- пантотеновую кислоту с массовой долей основного вещества не менее 98,0 %;

- пиридоксин с массовой долей основного вещества не менее 98,0 %;
- рибофлавин с массовой долей основного вещества не менее 98,0 %;
- тиамина гидрохлорид с массовой долей основного вещества не менее 99,9 %;
- фолиевую кислоту с массовой долей основного вещества не менее 98,0 %;
- цианокобаламин с массовой долей основного вещества не менее 98,9 %.

5.4 Допускается применение других средств измерений и посуды, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам и обеспечивающим необходимую точность измерения, а также вспомогательных устройств, реактивов и материалов по качеству не ниже вышеуказанных.

6 Подготовка к проведению измерений

6.1 Подготовка лабораторной посуды

6.1.1 Мойку и сушку посуды проводят в отдельном помещении, оборудованном приточно-вытяжной вентиляцией.

6.1.2 Стеклопосуду подвергают стандартной процедуре очистки лабораторной посуды. Для удаления жировых загрязнений колбы моют хромовой смесью (смесь серной кислоты с двуххромовокислым калием), горячим раствором тринатрийфосфата и т. п. Затем несколько раз промывают водопроводной водой и ополаскивают дважды деионизированной водой, сушат.

6.1.3 Процедуру промывки растворителями следует проводить в вытяжном шкафу.

6.2 Приготовление растворов

6.2.1 Приготовление раствора подвижной фазы А

Для приготовления подвижной фазы А в мерную колбу вместимостью 500 см³ вносят приблизительно 200 см³ деионизированной воды, добавляют 0,125 см³ трифторуксусной кислоты, и доводят объем раствора до метки деионизированной водой, перемешивают.

Срок хранения раствора при комнатной температуре — не более 1 мес.

6.2.2 Приготовление раствора натрия гидроокиси молярной концентрации 2 моль/дм³

В мерную колбу вместимостью 50 см³ вносят приблизительно 40 см³ деионизированной воды и 4,0 г гидроокиси натрия, перемешивают и после полного растворения доводят объем раствора до метки деионизированной водой.

Срок хранения раствора при комнатной температуре — не более 1 мес.

6.2.3 Приготовление раствора натрия фосфорнокислого двузамещенного молярной концентрации 1 моль/дм³

В мерную колбу вместимостью 50 см³ вносят приблизительно 40 см³ деионизированной воды и 7,10 г натрия фосфорнокислого двузамещенного, перемешивают и после полного растворения доводят объем раствора до метки деионизированной водой.

Используют свежеприготовленный раствор.

6.2.4 Приготовление раствора натрия фосфорнокислого однозамещенного моногидрата молярной концентрации 1 моль/дм³

В мерную колбу вместимостью 500 см³ вносят приблизительно 200 см³ деионизированной воды и 69,0 г натрия фосфорнокислого однозамещенного моногидрата, перемешивают и после полного растворения доводят объем раствора до метки деионизированной водой.

Используют свежеприготовленный раствор.

6.2.5 Приготовление буферного раствора с рН 5,5 ед. рН

В стакан вместимостью 600 см³ вносят 400 см³ раствора натрия фосфорнокислого однозамещенного моногидрата по 6.2.4, опускают в него электрод и, регистрируя показания рН-метра, приливают раствор натрия фосфорнокислого двузамещенного по 6.2.3 до тех пор, пока значение полученного раствора не будет (5,5 ± 0,1) ед. рН.

Срок хранения раствора при температуре от 2 °С до 8 °С — не более 1 недели.

6.3 Приготовление градуировочных растворов

6.3.1 Приготовление исходного раствора витаминов C_0

Для приготовления исходного раствора C_0 с массовыми концентрациями витаминов B_2 , B_6 , B_9 , B_{12} , H — 100 мкг/см³; B_1 , PP — 240 мкг/см³, B_5 — 500 мкг/см³ рассчитывают необходимую массу i -го вещества, мкг, по формуле

$$m_i = \frac{C_0 \cdot V}{M_i} \cdot 100, \quad (1)$$

где C_0 — концентрация i -го вещества в исходном растворе, мкг/см³;

V — объем мерной колбы, см³;

M_i — массовая доля основного вещества, %.

В мерную колбу вместимостью 100 см³ вносят рассчитанные массы витаминов, взвешенные с точностью до четвертого десятичного знака, добавляют 40 см³ деионизированной воды, 4 см³ раствора гидроксида натрия по 6.2.2 и перемешивают. Как только раствор станет прозрачным, добавляют 50 см³ буферного раствора по 6.2.5 и доводят деионизированной водой до метки.

Используют свежеприготовленный раствор.

6.3.2 Приготовление градуировочных растворов витаминов $G_1—G_4$

Для построения градуировочной зависимости готовят из основного раствора C_0 ряд градуировочных растворов витаминов $G_1—G_4$ по четырем уровням от меньшей массовой концентрации к большей.

Для этого, в мерные колбы вместимостью 50 см³ (для градуировочных растворов витаминов G_1 и G_2) и в мерные колбы вместимостью 10 см³ (для градуировочных растворов витаминов G_3 и G_4) вносят исходный раствор C_0 в количестве: для G_1 — 0,25 см³; для G_2 — 1,00 см³; для G_3 — 0,80 см³; для G_4 — 4 см³. Объемы растворов доводят деионизированной водой до метки и перемешивают.

Используют свежеприготовленные растворы.

Массовые концентрации витаминов в полученных градуировочных растворах $G_1—G_4$, мкг/см³, приведены в таблице 2.

Т а б л и ц а 2 — Массовая концентрация витаминов в градуировочных растворах $G_1—G_4$

Витамин	Массовая концентрация витаминов в полученном градуировочном растворе, мкг/см ³			
	G_1	G_2	G_3	G_4
Тиамин гидрохлорид (B_1)	1,2	4,8	19,2	96
Никотинамид (PP)	1,2	4,8	19,2	96
Пиридоксин (B_6)	0,5	2,0	8,0	40
Пантотеновая кислота (B_5)	2,5	10,0	40,0	200
Фолиевая кислота (B_9)	0,5	2,0	8,0	40
Цианокобаламин (B_{12})	0,5	2,0	8,0	40
Рибофлавин (B_2)	0,5	2,0	8,0	40
Биотин (H)	0,5	2,0	8,0	40

7 Отбор и подготовка проб

7.1 Отбор проб

7.1.1 Отбор проб лекарственных средств для ветеринарного применения — по ГОСТ 31929.

7.1.2 Отбор проб кормовых добавок, сырья для производства кормовых добавок — по ГОСТ 13496.0.

7.2 Подготовка проб

Пробы в форме таблеток или гранул растирают в ступке, кормовые добавки измельчают на лабораторной мельнице, перемешивают. Пастообразные, порошкообразные и жидкие пробы тщательно перемешивают.

Взвешивают от 0,0500 до 1,0000 г подготовленной пробы (в зависимости от исходной концентрации витаминов) в мерной колбе вместимостью 50 см³, приливают 20 см³ деионизированной воды и помещают на 10 мин в ультразвуковую баню при комнатной температуре. Добавляют 2 см³ раствора гидроокиси натрия по 6.2.2, перемешивают в течение 10 с, приливают 25 см³ буферного раствора по 6.2.5 и доводят деионизированной водой до метки.

Если раствор анализируемой пробы мутный, его переливают в микроцентрифужную пробирку и центрифугируют при 15000 об/мин в течение 5 мин. Если этого недостаточно, то анализируемый раствор фильтруют с помощью шприца через мембранный фильтр в виалу для ВЭЖХ анализа.

8 Порядок выполнения анализа

8.1 Условия хроматографических измерений

8.1.1 Высокоэффективный жидкостный хроматограф включают в соответствии с руководством (инструкцией) по эксплуатации и устанавливают параметры рабочих режимов хроматографического разделения.

Измерения проводят при следующих параметрах:

- температура термостата колонки — 25 °С;
- скорость потока подвижной фазы — 800 мм³/мин;
- объем вводимой пробы — 20 мм³.

8.1.2 Разделение проводят в режиме градиентного элюирования (подвижная фаза А по 6.2.1, в качестве подвижной фазы Б используют ацетонитрил) в соответствии с таблицей 3.

Т а б л и ц а 3 — Условия градиентного элюирования

Время, мин	Подвижная фаза А, %	Подвижная фаза Б, %
5	100	0
11	75	25
19	60	40
21	60	40
22	100	0
25	100	0

8.2 Построение градуировочной характеристики

8.2.1 Для установления градуировочной характеристики в инжектор хроматографа вводят 20 мм³ каждого градуировочного раствора G₁—G₄ по 6.3.2.

8.2.2 С помощью компьютерной системы обработки данных строят градуировочную зависимость концентраций от площади пика каждого витамина методом внешнего стандарта.

Расчеты коэффициентов градуировочной характеристики выполняются системой обработки данных в автоматическом режиме.

8.2.3 При построении градуировочной характеристики используют линейную функцию, при этом коэффициент корреляции должен быть не менее 0,98.

8.2.4 Градуировочную характеристику строят заново при каждой серии измерений.

8.3 ВЭЖХ измерение

8.3.1 В инжектор хроматографа вводят по 20 мм³ раствора анализируемой пробы, подготовленной по 7.2, и проводят измерения в условиях, указанных в 8.1. Для каждой анализируемой пробы получают два результата измерений.

Регистрируют на хроматограммах пики, соответствующие временам удерживания витаминов (таблица 1), найденных при измерении градуировочных растворов.

8.3.2 Массовая концентрация индивидуальных витаминов в пробе, должна находиться в диапазоне концентраций градуировочной зависимости. В противном случае, пробу разводят деионизированной водой до нужной концентрации витаминов.

Пример хроматограммы определяемых витаминов приведен в приложении А.

9 Обработка и оформление результатов измерений

9.1 В соответствии с данными, полученными при анализе градуировочных растворов по 6.3.2, с помощью программного обеспечения хроматографа, создают таблицу пиков витаминов. Метод обработки хроматограмм — внешний стандарт.

Расчеты массовой концентрации i -го витамина и площади пика выполняются системой обработки данных в автоматическом режиме.

9.2 Содержание i -го витамина в анализируемой пробе C_i , мкг/г, рассчитывают по формуле

$$C_i = \frac{C_{гр} \cdot V \cdot K}{m_i}, \quad (2)$$

где $C_{гр}$ — массовая концентрация i -го витамина в растворе анализируемой пробы, найденная с помощью установленной градуировочной характеристики, мкг/см³;

V — объем колбы, см³;

K — коэффициент разведения пробы;

m_i — масса пробы, г.

Содержание i -го витамина в жидкой анализируемой пробе C_i (мкг/см³), рассчитывают по формуле

$$C_i = \frac{C_{гр} \cdot V \cdot K}{m_i} \cdot \rho, \quad (3)$$

где $C_{гр}$ — массовая концентрация i -го витамина в растворе анализируемой пробы, найденная с помощью установленной градуировочной характеристики, мкг/см³;

V — объем колбы, см³;

K — коэффициент разведения пробы;

m_i — масса пробы, г;

ρ — плотность анализируемой пробы, г/см³.

Все вычисления проводят с точностью до второго десятичного знака.

9.3 За окончательный результат измерения принимают среднеарифметическое значение результатов вычислений двух параллельных измерений анализируемой пробы, если выполняется условие приемлемости по ГОСТ ИСО 5725-6 (пункт 5.2.2).

$$\frac{2 \cdot |X_1 - X_2| \cdot 100}{(X_1 + X_2)} \leq r, \quad (4)$$

где X_1, X_2 — результаты вычислений двух параллельных измерений содержания витаминов, (мг/кг);

r — значение предела повторяемости, %, указанное в таблице 4.

9.4 Результат анализа в документах, предусматривающих их использование, представляют в виде

$$\bar{X}_i \pm 0,01 \cdot U_i \cdot \bar{X}_i, \text{ при } P = 0,95, \quad (5)$$

где \bar{X}_i — среднеарифметическое значение вычислений n параллельных измерений, содержания i -го витамина в анализируемой пробе, мг/кг;

U_i — значение относительной расширенной неопределенности содержания i -го витамина, %, указанное в таблице 4.

Числовое значение результата измерений должно оканчиваться цифрой того же разряда, что и значение расширенной неопределенности, содержащее не более двух значащих цифр выраженное в микрограммах на килограмм (мг/кг).

10 Метрологические характеристики

Установленный в настоящем стандарте метод обеспечивает выполнение измерений содержания витаминов с относительной расширенной неопределенностью результатов измерений при коэффициенте охвата $k = 2$, и доверительной вероятности $P = 0,95$, указанной в таблице 4.

Т а б л и ц а 4 — Показатели точности и прецизионности метода при определении массовой доли (содержания) витаминов

Витамин	Диапазон измерений содержания, мг/кг	Значение относительной расширенной неопределенности U_i , % при коэффициенте охвата $k = 2$	Показатель повторяемости (относительное стандартное отклонение повторяемости) σ_r , %	Показатель воспроизводимости (относительное стандартное отклонение воспроизводимости) σ_R , %	Предел повторяемости r , %
Тиамин гидрохлорид (B_1)	От 60 до 900 включ.	19	6	9	17
	Св. 900 до 4800 включ.	15	4	7	11
Никотинамид (PP)	От 60 до 900 включ.	18	5	9	14
	Св. 900 до 4800 включ.	14	4	7	11
Пиридоксин (B_6)	От 25 до 400 включ.	19	6	9	17
	Св. 400 до 2000 включ.	14	4	7	11
Пантотеновая кислота (B_5)	От 125 до 2000 включ.	18	6	9	17
	Св. 2000 до 10000 включ.	14	4	7	11
Фолиевая кислота (B_9)	От 25 до 400 включ.	20	7	10	19
	Св. 400 до 2000 включ.	16	5	8	14
Цианокобаламин (B_{12})	От 25 до 400 включ.	12	4	6	11
	Св. 400 до 2000 включ.	11	3	5	8
Рибофлавин (B_2)	От 25 до 400 включ.	16	5	8	14
	Св. 400 до 2000 включ.	12	4	6	11
Биотин (H)	От 25 до 400 включ.	12	4	6	11
	Св. 400 до 2000 включ.	11	3	5	8

11 Контроль качества измерений

11.1 Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости (сходимости) и воспроизводимости, проводят с учетом требований ГОСТ ИСО 5725-6 (разделы 5 и 6).

11.2 Для проведения внутрилабораторного контроля точности используют образец с аттестованными значениями анализируемых витаминов (SRM).

Точность контрольных анализов признают удовлетворительной, если

$$|\bar{X} - X_{\text{атт}}| \leq K, \quad (6)$$

где \bar{X} — результат контрольных измерений пробы;

$X_{\text{атт}}$ — аттестованный результат пробы;

K — норматив оперативного контроля точности.

Норматив оперативного контроля точности при проведении внутрилабораторного контроля ($P = 0,95$) рассчитывают по формуле

$$K = 0,84 \cdot \sqrt{(0,01 \cdot \bar{X} \cdot U_i)^2 + (0,01 \cdot X_{\text{атт}} \cdot U_{\text{атт}})^2}, \quad (7)$$

где U_i — значение относительной расширенной неопределенности содержания i -го витамина в анализируемой пробе, (таблица 4);

$U_{\text{атт}}$ — значение относительной расширенной неопределенности аттестованной пробы.

Контроль точности проводят при проведении каждой серии измерений. При превышении нормативов оперативного внутреннего контроля точности проводят повторные анализы. При повторном превышении указанных нормативов анализы приостанавливают, выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и устраняют их.

11.3 Контроль стабильности результатов измерений в пределах лаборатории осуществляют ГОСТ ИСО 5725-6 (пункт 6.2.3) с использованием контрольных карт Шухарта.

**Приложение А
(справочное)****Пример хроматограммы витаминов В₁, В₂, В₅, В₆, В₉, В₁₂, РР, Н**

Пример хроматограммы витаминов В₁ (Thiamine), В₂ (Riboflavin), В₅ (Pantothenic acid), В₆ (Pyridoxine), В₉ (Folic acid), В₁₂ (Cyanocobalamin), РР (Nicotinamide), Н (Biotin) приведен на рисунке А.1.

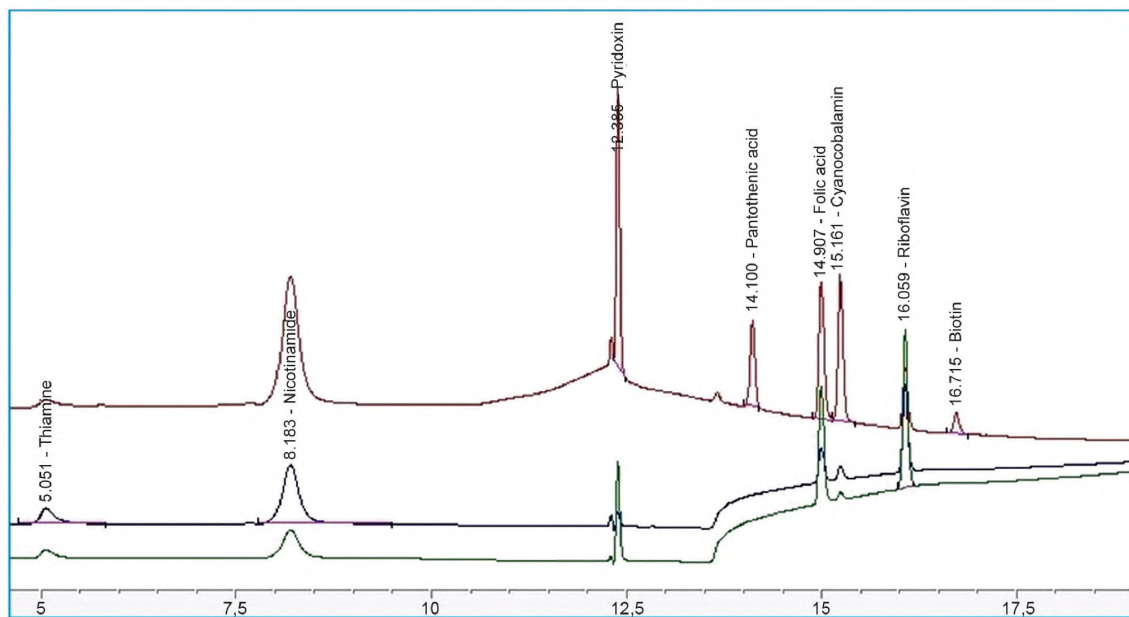


Рисунок А.1

Ключевые слова: лекарственные средства для ветеринарного применения, кормовые добавки, метод определения содержания витаминов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии со спектрофотометрическим детектированием

БЗ 11—2017/188

Редактор *Л.В. Коретникова*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *М.С. Кабашова*
Компьютерная верстка *А.А. Ворониной*

Сдано в набор 10.11.2017. Подписано в печать 21.11.2017. Формат 60×84¹/₈. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,40. Уч.-изд. л. 1,26. Тираж 23 экз. Зак. 2364.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Издано и отпечатано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123001 Москва, Гранатный пер., 4.
www.gostinfo.ru info@gostinfo.ru