
МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ
СТАНДАРТ

ГОСТ EN
15607—
2015

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

**Определение D-биотина методом
высокоэффективной жидкостной хроматографии**

(EN 15607:2009, IDT)

Издание официальное



Москва
Стандартинформ
2016

Предисловие

Цели, основные принципы и 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 Открытым акционерным обществом «Всероссийский научно-исследовательский институт сертификации» на основе аутентичного перевода на русский язык европейского регионального стандарта, указанного в пункте 5

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

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

За принятие проголосовали:

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

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

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

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

Перевод с немецкого языка (de).

Официальные экземпляры европейского регионального стандарта, на основе которого подготовлен настоящий межгосударственный стандарт, и европейского регионального стандарта, на который дана ссылка, имеются в Федеральном информационном фонде технических регламентов и стандартов.

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

Степень соответствия — идентичная (IDT)

6 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

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Определение D-биотина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

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

Дата введения — 2017—01—01

1 Область применения

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

Примечания

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

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

2 Нормативные ссылки

Приведенные ниже ссылочные нормативные документы являются обязательными для применения настоящего стандарта. Для датированных ссылок применимо только цитируемое издание. В случае недатированных ссылок используют последнее издание 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)

3 Сущность метода

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

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

4 Реактивы

4.1 Общие положения

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

4.2 Требования к химическим реактивам и приготовление растворов

4.2.1 Метанол для ВЭЖХ, массовая доля основного вещества $w(\text{CH}_3\text{OH})$ не менее 99,8 %.

4.2.2 Раствор серной кислоты молярной концентрации $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 1$ моль/дм³.

4.2.3 Раствор серной кислоты молярной концентрации $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 1,5$ моль/дм³.

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

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

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

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

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

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

4.2.10 Приготовление цитратного буферного раствора

0,462 г моногидрата лимонной кислоты (4.2.4) и 1,05 г гидрофосфата натрия 2-водного (4.2.5) растворяют в 450 см³ дистиллированной воды. Устанавливают значение pH раствора, равное 5,7, при помощи раствора серной кислоты (4.2.3) и затем разбавляют раствор до объема 500 см³.

Срок хранения раствора — 1 день.

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

30 мг глутатиона (4.2.6) растворяют в 3 см³ дистиллированной воды.

Срок хранения раствора — 1 день.

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

0,1 г ЭДТА (4.2.7) растворяют в 10 см³ дистиллированной воды.

Срок хранения раствора — 1 день.

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

17,4 г гидрофосфата калия (4.2.8) растворяют в 1000 см³ воды.

Срок хранения раствора — 2 дня.

4.2.14 Приготовление раствора дигидрофосфата калия молярной концентрации $c(KH_2PO_4) = 0,1 \text{ моль/дм}^3$

13,6 г дигидрофосфата калия (4.2.9) растворяют в 1000 см³ воды.

Срок хранения раствора — 2 дня.

4.2.15 Приготовление фосфатного буферного раствора с pH 6,0

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

Срок хранения раствора — 7 дней при комнатной температуре.

4.2.16 Приготовление фосфатного буферного раствора с pH 7,0

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

Срок хранения раствора — 7 дней при комнатной температуре.

4.2.17 Папаин порошкообразный (CAS 9001-73-4) с удельной каталитической активностью 15 нкат/мг¹⁾ по отношению к этиловому эфиру N-бензоил-L-аргинина (BAEE) при pH 6,2 и 25 °C. Удельная каталитическая активность 15 нкат/мг соответствует 1 МЕ/мг (МЕ — международная единица каталитической активности).

4.2.18 Раствор папаина массовой концентрации 20 г/дм³

4.2.18.1 Приготовление раствора

1 г порошкообразного папаина (4.2.17) растворяют в 50 см³ цитратного буферного раствора (4.2.10). Срок хранения раствора — 5 дней при 4 °C.

4.2.18.2 Проверка активности папаина

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

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

П р и м е ч а н и е — При межлабораторных сравнительных испытаниях был использован порошкообразный папаин, поставщиком которого была компания VWR International GmbH, Hilpertstraße 20a, 64295 Darmstadt, Ref.-Nr 26.146.180¹⁾.

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

4.2.20 Исходный раствор для послеклоночной дериватизации массовой концентрации $\rho(\text{Avidin-FITC}) = 50 \text{ мг/см}^3$

2,5 мг конъюгата авидин - флуоресцеинизотиоцианат (4.2.19) растворяют в 50 см³ фосфатного буферного раствора с pH 7,0 (4.2.16). Срок хранения раствора — 14 дней при 4 °C.

4.2.21 Рабочий раствор для послеклоночной дериватизации массовой концентрации $\rho(\text{Avidin-FITC}) = 2 \text{ мг/см}^3$

25 см³ исходного раствора для послеклоночной дериватизации (4.2.20) смешивают с 600 см³ фосфатного буферного раствора с pH 7,0 (4.2.16). Полученный раствор фильтруют через фильтр с размером пор 0,45 мкм (5.5). Раствор устойчив при хранении в темноте в течение 8 ч.

4.2.22 Подвижная фаза для ВЭЖХ

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

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

4.3 Образцы сравнения

4.3.1 Общие положения

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

4.3.2 D-Биотин, массовая доля основного вещества $w(\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S})$ не менее 99 %.

4.3.3 D-Биоцитин, массовая доля основного вещества $w(\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_4\text{S})$ не менее 98 %.

4.4 Исходные растворы

4.4.1 Приготовление исходного раствора D-биотина массовой концентрации $\rho(\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}) = 100 \text{ мкг/см}^3$

Приблизительно 10 мг образца сравнения D-биотина (4.3.2), взвешенного с погрешностью $\pm 0,1 \text{ мг}$, растворяют в 100 см³ дистиллированной воды. Растворение может продолжаться от 4 до 5 ч. Срок хранения раствора — 2 мес при минус 18 °C.

4.4.2 Приготовление исходного раствора D-биоцитина массовой концентрации $\rho(\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}) = 100 \text{ мкг/см}^3$

Приблизительно 10 мг образца сравнения D-биоцитина (4.3.3), взвешенного с погрешностью $\pm 0,1 \text{ мг}$, растворяют в 100 см³ дистиллированной воды. Срок хранения раствора — 2 мес при минус 18 °C.

4.5 Стандартные растворы

4.5.1 Стандартные растворы D-биотина массовой концентрации $\rho(\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S})$ от 0,05 до 0,30 мкг/см³

Приготавливают промежуточный раствор D-биотина путем разбавления 1 см³ исходного раствора (4.4.1) до 10 см³ дистиллированной водой. Затем готовят шесть градуировочных растворов, разбавляя 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 и 3,0 см³ промежуточного раствора до 100 см³ дистиллированной водой. Срок хранения растворов 1 день.

4.5.2 Стандартный раствор D-биоцитина массовой концентрации $\rho(\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}) = 0,30 \text{ мкг/см}^3$

Приготавливают промежуточный раствор путем разбавления 1 см³ исходного раствора (4.4.2) до 10 см³ дистиллированной водой. Затем 3,0 см³ промежуточного раствора разбавляют до 100 см³ дистиллированной воды. Срок хранения раствора 1 день.

5 Аппаратура

5.1 Общие положения

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

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

5.2 Термостат, поддерживающий температуру на уровне $(37 \pm 2) ^\circ\text{C}$.

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

5.4 Обращенно-фазовые аналитические колонки, например LiChrosper® 100 RP-18 endcapped¹⁾

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

- а) длина колонки 250 мм;
- б) внутренний диаметр 4,0 мм;
- в) размер частиц 5 мкм.

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

5.5 Устройства для фильтрования

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

П р и м е ч а н и е — Фильтрование подвижной фазы и растворов проб через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм перед применением или инжектированием продлевает срок жизни колонок.

5.6 Послеколоночный реактор, состоящий из системы для ввода реагента, например Т-образного смесителя со следующим за ним капиллярным реактором длиной 10 м, выполненным из политетрафторэтиленовой трубки внутреннего диаметра 0,5 мм, смотанной по спирали диаметром 14 мм, изготовленной, например, по [7] (модель КОТ2). Капиллярные реакторы могут быть приобретены у компаний Супелко или MicroSolv Tech¹⁾.

6 Проведение испытаний

6.1 Подготовка испытуемой пробы

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

6.2 Экстракция

Пробу массой от 0,5 до 10 г (что приблизительно соответствует содержанию D-биотина от 2 до 15 мкг) взвешивают с точностью до 1 мг и помещают в колбу Эрленмейера. К пробе добавляют 300 мм³ раствора глутатиона (4.2.11), 300 мм³ раствора ЭДТА (4.2.12), 30 см³ цитратного буферного раствора (4.2.10) и 3 см³ раствора папаина (4.2.18). При высоком содержании крахмала добавляют 100 мг така-диатазы (4.2.23). Смесь выдерживают в течение ночи в термостате при 37 °C при постоянном перемешивании. После охлаждения раствор переносят в мерную колбу вместимостью 50 см³ и разбавляют дистиллированной водой до метки. Раствор перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр. Перед вводом в хроматограф его фильтруют еще раз через фильтр с размером пор 0,45 мкм (5.5).

П р и м е ч а н и е — Фильтрование как подвижной фазы, так и растворов проб через мембранный фильтр перед применением или вводом в хроматограф продлевает срок службы колонок.

6.3 Проведение хроматографического анализа

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

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

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

Хроматографическая колонка: LiChrospher® 100 RP-18 endcapped, 5 мкм, 250 × 4,0 мм;
 Подвижная фаза: 80 объемных частей фосфатного буферного раствора с pH 6 (4.2.15) и 20 объемных частей метанола (4.2.1);
 Расход подвижной фазы: 0,4 см³/мин;
 Объем инъектирования: 30 мм³;
 Флуоресцентное детектирование: длина волны возбуждения 490 нм, длина волны регистрации 520 нм;
 Расход реагента для послеполоночной дериватизации: 1 см³/мин.

П р и м е ч а н и е — Этот метод может быть также использован для оценки содержания D-биотина.

7 Обработка результатов

При использовании метода внешнего стандарта определяют площади или высоты пиков и затем устанавливают градуировочную характеристику, аппроксимируемую уравнением второго порядка. Содержание D-биотина, w , мкг/100 г пробы, вычисляют по формуле (1):

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

где ρ — массовая концентрация D-биотина в растворе пробы (6.2), мкг/см³, вычисленная при помощи

градуировочной характеристики;
 V_e — объем раствора пробы (6.2), см³;
 m_s — масса пробы, г;
 100 — множитель для пересчета содержания D-биотина к 100 г пробы.

8 Прецизионность

8.1 Общие положения

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

Полученные статистические данные приведены в приложении В.

8.2 Предел повторяемости

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

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

8.3 Предел воспроизводимости

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

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

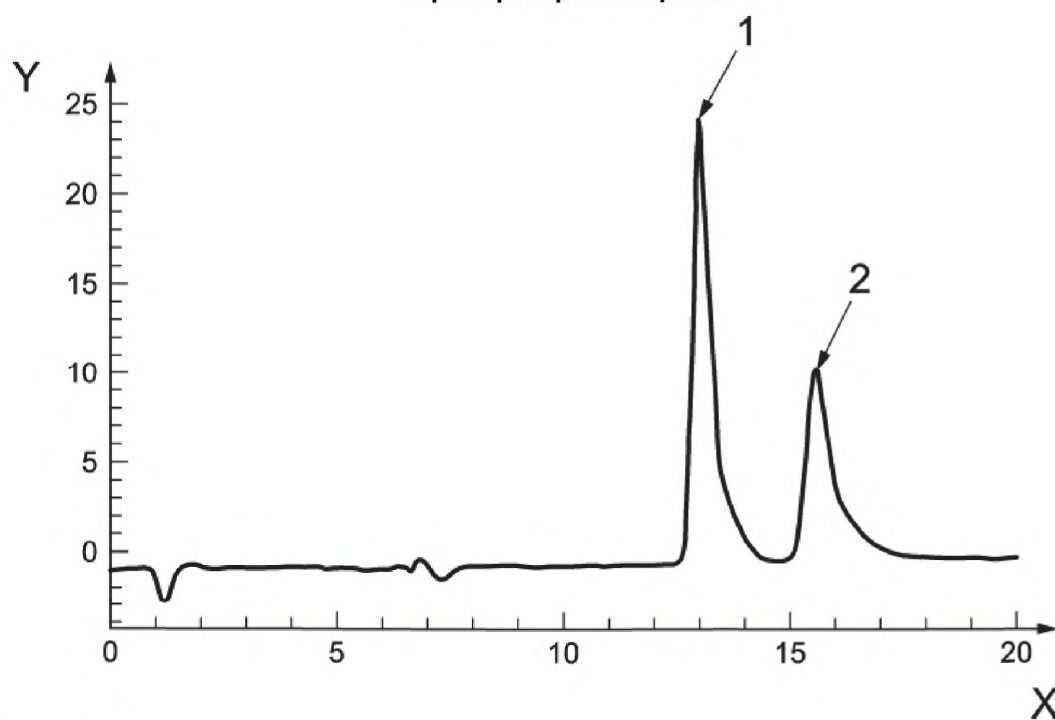
9 Протокол испытаний

Протокол испытаний должен содержать, по меньшей мере, следующие сведения:

- a) всю информацию, необходимую для идентификации пробы;
- b) ссылку на настоящий стандарт или используемый метод;
- c) результаты испытаний с указанием единиц измерений, в которых результат испытаний выражен;
- d) дату и способ отбора проб (если он известен);
- e) дату поступления пробы;
- f) дату проведения испытаний;
- g) все особенности, наблюдавшиеся при проведении испытаний;
- h) любые применявшиеся операции, не оговоренные в методе или рассматриваемые как необязательные, которые могли повлиять на результат испытаний.

Приложение А
(справочное)

Примеры хроматограмм



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

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

Условия анализа:

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

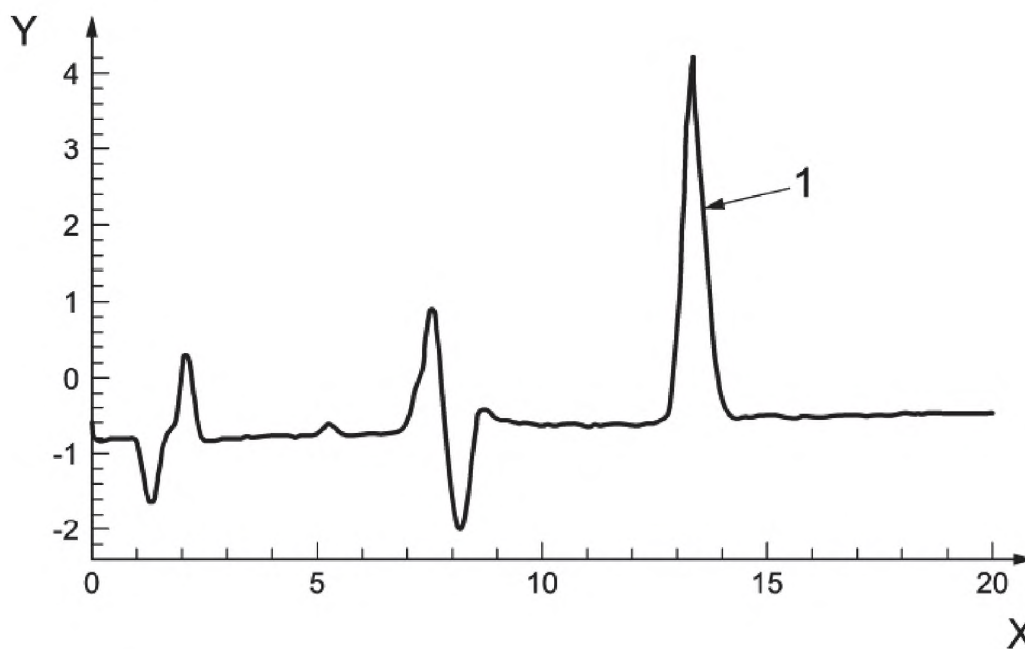
Подвижная фаза: смесь восьми объемных частей фосфатного буферного раствора с pH 6 (4.2.15) и двух объемных частей метанола (4.2.1)

Расход подвижной фазы: 0,4 см³/мин

Объем инъектирования: 30 мм³

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

Расход реагента для послеколонной дериватизации: 1,0 см³/мин



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

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

Условия анализа:
 Хроматографическая колонка: LiChrospher® 100 RP-18 endcapped, 5 мкм, 250 мм-4,0 мм
 Подвижная фаза: смесь восьми объемных частей фосфатного буферного раствора с pH 6 (4.2.15) и двух объемных частей метанола (4.2.1)
 Расход подвижной фазы: 0,4 см³/мин
 Объем инжектирования: 30 мм³
 Флуоресцентное детектирование: возбуждение при 490 нм, регистрация при 520 нм
 Расход реагента для послеколонной дериватизации: 1,0 см³/мин

Приложение В
(справочное)

Данные по прецизионности

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

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

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

Приложение ДА
(справочное)

**Сведения о соответствии межгосударственных
стандартов ссылочным европейским региональным стандартам**

Т а б л и ц а ДА.1

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

Библиография

- [1] ISO 5725-2, *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results— Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method*
- [2] Lahely, S., Ndaw, S., Arella, F., Hasselmann, C.: *Determination of biotin in foods by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization and fluorimetric detection*, Food chem., 65, 253-258 (1999)
- [3] Arella, F., Deborde, J. L., Bourguignon, J. B., Bergaentze, M., Ndaw, S., Hasselmann, C.: *Liquid chromatographic determination of biotin in foods. A collaborative study*, Ann. Fals. Exp. Chim., 93. 951, 193-200 (2000)
- [4] Hentz, N. G., Bachas, L. G.: *Class-selective detection systems for liquid chromatography based on the streptavidin-biotin interaction*, Anal. Chem., 67, 1014-1018 (1995)
- [5] Przyjazny, A., Hentz, N. G., Bachas, L. G.: *Sensitive and selective liquid chromatographic post-column reaction detection system for biotin and biocytin using an homogeneous fluorophore-linked assay*, J. chromatogr., 654, 79-86 (1993)
- [6] European Pharmacopoeia 5.0, 01/2005:1073, Seite 110
- [7] Selavska, C. M., Jino, K. S., Krull, I. S.: *Construction and comparison of open tubular reactors for post-column reaction detection in liquid chromatography*. Anal. Chem., 59, 2221 -2224 (1987)
- [8] Horwitz, W.: *Evaluation of Analytical Methods used for Regulation of Foods and Drugs*, Anal. Chem. 1982, 54 (1), 67A-76A

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

Редактор *К.В. Дудко*

Корректор *Е.Д. Дульнева*

Компьютерная верстка *Е.К. Кузиной*

Подписано в печать 08.02.2016. Формат 60х84^{1/8}.
Усл. печ. л. 1,86. Тираж 40 экз. Зак. 3980.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»

123995 Москва, Гранатный пер., 4.
www.gostinfo.ru info@gostinfo.ru