МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ ISO 20634— 2018

СМЕСИ АДАПТИРОВАННЫЕ ДЛЯ ИСКУССТВЕННОГО ВСКАРМЛИВАНИЯ ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА И СМЕСИ ДЛЯ ЭНТЕРАЛЬНОГО ПИТАНИЯ ВЗРОСЛЫХ

Определение витамина B_{12} методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии

(ISO 20634:2015, IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2018

gost.e-ecolog.ru

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 ПОДГОТОВЛЕН Акционерным обществом «Всероссийский научно-исследовательский институт сертификации» (АО «ВНИИС») совместно с Федеральным государственным бюджетным учреждением науки Федеральным исследовательским центром питания, биотехнологии и безопасности пищи (ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии») на основе собственного перевода на русский язык международного стандарта, указанного в пункте 5

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 30 мая 2018 г. № 109-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
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Институт стандартизации Молдовы
Россия	RU	Росстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 9 августа 2018 г. № 478-ст межгосударственный стандарт ГОСТ ISO 20634—2018 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 сентября 2019 г.

5 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 20634:2015 «Смеси адаптированные для искусственного вскармливания детей раннего возраста и смеси для энтерального питания взрослых. Определение витамина B_{12} методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии» («Infant formula and adult nutritionals — Determination of vitamin B_{12} by reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC)», 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 (*gost.e-ecolog.ru

© ISO, 2015 — Все права сохраняются
© Стандартинформ, оформление, 2018

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 Термины и определения 1
3 Сущность метода 1
4 Реактивы и материалы 2
5 Лабораторное оборудование 4
6 Процедура проведения испытания 5
7 Обработка результатов 9
Приложение А (справочное) Примеры хроматограмм 10
Приложение В (справочное) Данные по прецизионности метода 11
Приложение С (справочное) Типовая методика проверки пригодности патронов для твердофазной экстракции (ТФЭ) 14
Библиография 15

Поправка к ГОСТ ISO 20634—2018 Смеси адаптированные для искусственного вскармливания детей раннего возраста и смеси для энтерального питания взрослых. Определение витамина B_{12} методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии

В каком месте	Напечатано	Должно быть		
Предисловие. Таблица согласования	—	Армения	AM	ЗАО «Национальный орган по стандартизации и метрологии» Республики Армения

(ИУС № 1 2024 г.)

М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й С Т А Н Д А Р Т

СМЕСИ АДАПТИРОВАННЫЕ ДЛЯ ИСКУССТВЕННОГО ВСКАРМЛИВАНИЯ ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА И СМЕСИ ДЛЯ ЭНТЕРАЛЬНОГО ПИТАНИЯ ВЗРОСЛЫХ

Определение витамина B_{12} методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии

Infant formula and adult nutritionals.
Determination of vitamin B_{12} by reversed phase high performance liquid chromatography

Дата введения —2019—09—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод количественного определения витамина B_{12} в адаптированных смесях для искусственного вскармливания детей раннего возраста и смесях для энтерального питания для взрослых (порошках, готовых к употреблению жидких продуктах и жидких концентратах) методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии.

2 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

2.1 **витамин B_{12}:** Цианкобаламин или другие корриноиды, содержащие кобальт, обладающие биологической активностью витамина B_{12}, такие как аквокобаламин, гидроксикобаламин, метилкобаламин и аденозилкобаламин, преобразуемые в цианкобаламин.

2.2 **смесь для энтерального питания для взрослых** (adult nutritional): Полноценный в питательном отношении специализированный пищевой продукт, изготовленный из молока, сои, риса, молочной сыворотки, гидролизата белка, крахмала и аминокислот в любом сочетании, содержащий или не содержащий интактный белок, употребляемый в жидком виде, который может являться единственным источником питания.

Примечание — Определение термина 2.2[1)].

2.3 **адаптированная смесь для искусственного вскармливания детей раннего возраста** (infant formula): Заменитель грудного молока, специально изготовленный для того, чтобы полностью удовлетворять потребности в питании младенцев первых месяцев жизни до введения соответствующего дополнительного питания.

Примечание — Определение термина 2.3[1)].

3 Сущность метода

Цианкобаламин и другие корриноиды, содержащие кобальт, экстрагируют из пробы буферным раствором ацетата натрия (pH = 4,5 ед. pH), последние преобразуют в цианкобаламин с помощью цианида калия при 105 °С. Экстракт очищают и концентрируют на патронах для твердофазной экстракции с сорбентом — модифицированным С8 или С18 силикагелем, после чего анализируют методом эксклю-

[1)] Определения терминов 2.2 и 2.3 взято из Codex Standard 72—1981.

Издание официальное

зионной и обращенно-фазовой хроматографии. Количественное определение витамина B_{12} проводят методом жидкостной хроматографии с детектированием в видимой области спектра при длине волны 550 нм.

4 Реактивы и материалы

Для проведения анализа при отсутствии особо оговоренных условий используют только реактивы гарантированной аналитической чистоты и дистиллированную или деминерализованную воду или аналогичную по чистоте воду.

4.1 Кислота уксусная ледяная.

4.2 Ацетонитрил для ВЭЖХ.

4.3 Дриерит (осушающий агент, представляющий собой безводный сульфат кальция размером частиц 8 меш).

4.4 Этанол денатурированный.

4.5 Кислота муравьиная массовой долей основного вещества не менее 88 %.

4.6 Калий цианистый массовой долей основного вещества не менее 97 %.

4.7 Рибофлавин массовой долей основного вещества от 98 % до 102 %.

4.8 Натрий уксуснокислый безводный или трехводный.

4.9 Фермент така-диастаза[1)].

4.10 Триэтиламин для ВЭЖХ.

4.11 Витамин B_{12} (цианкобаламин), первичный стандартный образец сравнения[2)]. Следует хранить в эксикаторе в условиях защиты от дневного света.

4.12 Приготовление растворов реактивов и стандартных растворов

4.12.1 Общие положения

Все растворы допускается готовить в большем или меньшем объеме при условии соблюдения правил надлежащей лабораторной практики. Растворы можно хранить в охлажденном виде или при комнатной температуре в плотно укупоренных емкостях из инертных материалов, если не оговорено другое.

4.12.2 Приготовление растворов реактивов

4.12.2.1 Подвижная фаза А для ВЭЖХ

Растворяют 4,0 $см^3$ триэтиламина в 1 000 $см^3$ воды. Доводят pH раствора до значения, лежащего в интервале от 5 до 7, добавлением приблизительно 1,25 $см^3$ концентрированной муравьиной кислоты (см. 4.5). Срок годности — одна неделя при хранении в плотно укупоренной емкости.

4.12.2.2 Подвижная фаза В для ВЭЖХ

Смешивают 4,0 $см^3$ триэтиламина и 250 $см^3$ ацетонитрила с 750 $см^3$ воды. Доводят pH раствора до значения, лежащего в интервале от 5 до 7 ед. pH, добавлением приблизительно 1,25 $см^3$ концентрированной муравьиной кислоты (см. 4.5). Срок годности — одна неделя при хранении в плотно укупоренной емкости.

4.12.2.3 Подвижная фаза С для ВЭЖХ

Смешивают 4,0 $см^3$ триэтиламина и 750 $см^3$ ацетонитрила с 250 $см^3$ воды. Доводят pH раствора до значения, лежащего в интервале от 5 до 7, добавлением приблизительно 1,25 $см^3$ концентрированной муравьиной кислоты (см. 4.5). Срок годности — одна неделя при хранении в плотно укупоренной емкости.

4.12.2.4 Подвижная фаза D для ВЭЖХ

Разбавляют 50 $см^3$ ацетонитрила водой до объема 2 000 $см^3$. Срок годности — одна неделя при хранении в плотно укупоренной емкости.

[1)] Например, производства Accurate Chemical Co или аналогичная. Это пример подходящего изделия, доступного в коммерческой сети. Информация приведена для удобства пользователей этого стандарта и не является рекламной поддержкой указанного изделия. Допускается использовать аналогичные изделия, если может быть показано, что они приводят к таким же результатам.

[2)] Например, USP Reference 1152009 массовой долей (приблизительно 10 мкг/мг). Это пример подходящего изделия, доступного в коммерческой сети. Информация приведена для удобства пользователей этого стандарта и не является рекламной поддержкой указанного изделия. Допускается использовать аналогичные изделия, если может быть показано, что они приводят к таким же результатам.

4.12.2.5 Смесь ацетонитрила с водой объемной долей ацетонитрила 10 %

Разбавляют 150 см^3 ацетонитрила водой до объема 1 500 см^3. Срок годности — одна неделя при хранении в плотно укупоренной емкости.

4.12.2.6 Смесь ацетонитрила с водой объемной долей ацетонитрила 30 % (элюент для твердофазной экстракции)

Разбавляют 30 см^3 ацетонитрила водой до объема 100 см^3. Срок годности — 1 мес при хранении в плотно укупоренной емкости.

4.12.2.7 Смесь ацетонитрила с водой объемной долей ацетонитрила 50 % (раствор для промывки и хранения колонки)

Разбавляют 500 см^3 ацетонитрила водой до объема 1 000 см^3. Срок годности — 6 мес при хранении в плотно укупоренной емкости.

4.12.2.8 Смесь этанола с водой объемной долей этанола 25 %

Разбавляют 50 см^3 этанола водой до объема 200 см^3. Срок годности — один год при хранении в плотно укупоренной емкости.

4.12.2.9 Раствор цианида калия массовой концентрации ρ = 4 г/дм^3

Растворяют 0,02 г цианида калия в ацетатном буферном растворе (см. 4.12.2.11) концентрации 0,25 моль/дм^3 и доводят объем раствора этим буферным раствором до 5 см^3. Раствор готовят непосредственно перед использованием.

4.12.2.10 Раствор цианида калия массовой концентрации ρ = 10 г/дм^3

Растворяют 0,25 г цианида калия в воде и доводят объем раствора до 25 см^3. Раствор готовят непосредственно перед использованием.

4.12.2.11 Буферный раствор ацетата натрия концентрации c = 0,25 моль/дм^3

Растворяют 41,0 г безводного ацетата натрия или 68,0 г трехводного ацетата натрия приблизительно в 1800 см^3 воды. Значение pH раствора доводят до 4,6 ед. pH концентрированной уксусной кислотой (около 40 см^3). Разбавляют водой до 2000 см^3. Срок годности раствора — 3 мес.

4.12.2.12 Раствор для проверки степени хроматографического разделения

Берут навеску около 0,005 г рибофлавина на бумаге для взвешивания. Навеску переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и доводят объем содержимого колбы до метки смесью ацетонитрила с водой объемной долей ацетонитрила 10 %. Раствор перемешивают до достижения растворения. Смешивают равные объемы полученного раствора и градуировочного раствора витамина B_{12} самой высокой концентрации. Срок годности раствора — одна неделя.

4.12.2.13 Раствор така-диастазы массовой концентрации ρ = 60 г/дм^3

Растворяют 0,6 г така-диастазы в 10 см^3 воды. Раствор готовят в день использования.

4.12.3 Приготовление стандартных растворов

4.12.3.1 Общие положения

Все стандартные растворы готовят при свете люминесцентной лампы с применением светового экрана, задерживающего ультрафиолетовое излучение, и хранят при температуре от 2 °С до 8 °С в плотно укупоренных мерных колбах.

4.12.3.2 Основной стандартный раствор витамина B_{12} массовой концентрации ρ = 10 000 мкг/дм^3

Берут точную навеску стандартного образца витамина B_{12} (см. 4.11) такой массы, чтобы концентрация основного стандартного раствора составила 10 000 мкг/дм^3. Растворяют в смеси этанола с водой объемной долей этанола 25 % (см. 4.12.2.8), объем раствора доводят до 100 см^3 тем же растворителем. Срок годности раствора — 6 мес.

Необходимую массу навески стандартного образца витамина B_{12} m_w, мг, вычисляют по формуле

$$m_w = 10\,000 \cdot 0{,}1\,\frac{1}{P}, \qquad (1)$$

где 10 000 — требуемая концентрация основного стандартного раствора, мкг/дм^3;

0,1 — объем разбавления, дм^3;

P — чистота стандартного образца витамина B_{12} (см. 4.11) в микрограммах цианкобаламина на миллиграмм стандартного образца.

4.12.3.3 Стандартный раствор витамина B_{12} промежуточной концентрации ρ = 1 000 мкг/дм^3

Разбавляют 10 см^3 основного стандартного раствора (см. 4.12.3.2) до 100 см^3 водой. Срок годности раствора — одна неделя.

4.12.3.4 Градуировочные стандартные растворы витамина B_{12} массовыми концентрациями от $\rho = 2{,}5$ мкг/дм^3 до $\rho = 25$ мкг/дм^3

В отдельных мерных колбах разбавляют 0,5 см^3, 1 см^3, 2 см^3, 3 см^3, 4 см^3 и 5 см^3 стандартного раствора промежуточной концентрации (см. 4.12.3.3) до 200 см^3 смесью ацетонитрила с водой объемной долей ацетонитрила 10 % (см. 4.12.2.5). Срок годности растворов — 1 мес.

5 Лабораторное оборудование

5.1 Система для ВЭЖХ, состоящая из градиентного насоса, крана переключения колонок, изократического насоса, спектрофотометрического детектора с вольфрамовой лампой накаливания, пригодного для детектирования при 550 нм и автосамплера, пригодного для ввода проб объемом от 900 мм^3 до 2 000 мм^3.

5.2 Колонка для ВЭЖХ аналитическая эксклюзионная со следующими характеристиками:

- размером частиц сорбента 4 мкм, длиной 250 мм, внутренним диаметром 9,4 мм[1)].
- размером частиц сорбента 5 мкм, длиной 300 мм, внутренним диаметром 8 мм[2)].

5.3 Колонка для ВЭЖХ аналитическая обращенно-фазовая со следующими характеристиками:

- заполненная сорбентом типа С18, размером частиц сорбента 3 мкм, длиной 100 мм, внутренним диаметром 4,6 мм[3)] с предколонкой размером частиц сорбента 3 мкм, длиной 10 мм, внутренним диаметром 4,6 мм[4)];
- заполненная фенилгексильным сорбентом размером частиц 3 мкм и размером пор 120 ангстрем, длиной 100 мм и внутренним диаметром 4,6 мм[5)], с подходящей предколонкой, или аналогичная обращенно-фазовая колонка, совместимая с подвижной фазой, состоящей на 100 % из воды.

5.4 Термостат суховоздушный, пригодный для поддержания температур (95 ± 5) °С и (105 ± 5) °С.

5.5 pH-метр в комплекте с калибровочными буферными растворами.

5.6 Весы аналитические точностью не менее 0,00001 г.

5.7 Стаканы лабораторные стеклянные различной вместимости.

5.8 Дозирующая насадка на бутыль, обеспечивающая объем дозирования 30 см^3 или аналогичная.

5.9 Цилиндры градуированные стеклянные различной вместимости.

5.10 Эксикатор.

5.11 Колбы конические вместимостью 125 см^3 или аналогичная стеклянная посуда.

5.12 Бумага фильтровальная[6)] или аналогичная.

---

1) Например, Zorbax GF-250, каталожный номер 884973-901. Это пример подходящего продукта, доступного в коммерческой сети. Информация приведена для удобства пользователей этого стандарта и не является рекламной поддержкой указанного изделия. Допускается использовать аналогичные изделия, если может быть показано, что они приводят к таким же результатам.

2) Например, Shodex Protein® KW-802.5, каталожный номер F6989000 или аналогичная. Это пример подходящего продукта, доступного в коммерческой сети. Информация приведена для удобства пользователей этого стандарта и не является рекламной поддержкой указанного изделия. Допускается использовать аналогичные изделия, если может быть показано, что они приводят к таким же результатам.

3) Например, Thermo Scientific Aquasil™, каталожный номер 77503-104630. Это пример подходящего продукта, доступного в коммерческой сети. Информация приведена для удобства пользователей этого стандарта и не является рекламной поддержкой указанного изделия. Допускается использовать аналогичные изделия, если может быть показано, что они приводят к таким же результатам.

4) Например, Thermo Scientific Aquasil™, каталожный номер 77503-014001. Это пример подходящего продукта, доступного в коммерческой сети. Информация приведена для удобства пользователей этого стандарта и не является рекламной поддержкой указанного изделия. Допускается использовать аналогичные изделия, если может быть показано, что они приводят к таким же результатам.

5) Например, Epic Phenyl Hexyl, ES Industries 125191-EPHX. Это пример подходящего продукта, доступного в коммерческой сети. Информация приведена для удобства пользователей этого стандарта и не является рекламной поддержкой указанного изделия. Допускается использовать аналогичные изделия, если может быть показано, что они приводят к таким же результатам.

6) Например, Whatman 2V. Это пример подходящего изделия, доступного в коммерческой сети. Информация приведена для удобства пользователей этого стандарта и не является рекламной поддержкой указанного изделия. Допускается использовать аналогичные изделия, если может быть показано, что они приводят к таким же результатам.

5.13 Воронки пластиковые, пригодные для использования с фильтровальной бумагой.

5.14 Перчатки одноразовые.

5.15 Дозатор пипеточный переменного объема дозирования от 100 мм^3 до 1 000 мм^3.

5.16 Лабораторные световые экраны, желтые или бесцветные экраны с границей пропускания не ниже 385 нм.

5.17 Патроны для твердофазной экстракции (ТФЭ) с сорбентом — силикагелем, модифицированным группами С8, массой сорбента 900 мг[1)], или модифицированным группами С18, массой сорбента 900 мг[2)] или аналогичные. Типовая методика проверки пригодности патронов для ТФЭ приведена в приложении С.

5.18 Шприцы одноразовые различной вместимости.

5.19 Насадка на шприц фильтрующая, с нейлоновым фильтром диаметром пор 0,45 мкм.

5.20 Установка вакуумная для твердофазной экстракции (манифолд) на 24 гнезда с запорными кранами или аналогичная установка.

5.21 Пипетки с одной отметкой различной вместимости.

5.22 Колбы мерные различной вместимости.

6 Процедура проведения испытания

6.1 Общие положения

Подготовку всех проб проводят при свете люминесцентной лампы с применением светового экрана, задерживающего ультрафиолетовое излучение. Анализ приготовленных растворов проб можно провести не позднее чем через 14 дней после их приготовления при хранении растворов проб при температуре от 2 °С до 8 °С в плотно укупоренных мерных колбах. Все пробы продуктов должны быть однородными и представительными, насколько это возможно. Этого достигают путем тщательного перемешивания или взбалтывания продукта перед отбором пробы.

6.2 Приготовление растворов проб для анализа

6.2.1 Общие положения

При испытании продуктов, содержащих крахмал, добавляют 1 см^3 раствора така-диастазы (см. 4.12.2.13). Дожидаются прохождения реакции така-диастазы с пробой в течение 30 мин прежде, чем перейти к этапу экстракции.

6.2.1.1 Жидкие пробы

При испытании жидких продуктов, готовых к употреблению, лабораторную пробу тщательно перемешивают для обеспечения гомогенности и берут точную навеску смеси для энтерального питания для взрослых массой около 20,0 г или адаптированной смеси для искусственного вскармливания детей раннего возраста массой около 25,0 г, которую помещают в мерную колбу вместимостью 100 см^3. Далее переходят к этапу экстракции.

6.2.1.2 Порошкообразные пробы

Если степень гомогенности порошкообразной пробы неизвестна, исходят из предположения, что проба не гомогенна, и все операции с ней проводят, как с пробами сухих порошкообразных смесей (см. 6.2.1.3).

6.2.1.3 Пробы сухих порошкообразных смесей

При испытании проб негомогенных сухих порошкообразных смесей берут точную навеску массой около 25,0 г. Добавляют 200,0 г воды, предварительно нагретой до 40 °С, и перемешивают до получения гомогенной суспензии. При необходимости используют гомогенизатор. Из полученной суспензии берут точную навеску смеси для энтерального питания для взрослых массой около 20,0 г или адаптирован-

---

[1)] Например, Alltech/Grace Davidson, каталожный номер 20966. Это пример подходящего изделия, доступного в коммерческой сети. Информация приведена для удобства пользователей этого стандарта и не является рекламной поддержкой указанного изделия. Допускается использовать аналогичные изделия, если может быть показано, что они приводят к таким же результатам.

[2)] Например, Alltech/Grace Davidson, каталожный номер 20942. Это пример подходящего изделия, доступного в коммерческой сети. Информация приведена для удобства пользователей этого стандарта и не является рекламной поддержкой указанного изделия. Допускается использовать аналогичные изделия, если может быть показано, что они приводят к таким же результатам.

ной смеси для искусственного вскармливания детей раннего возраста массой около 25,0 г, которую помещают в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$.

6.2.1.4 Пробы влажных порошкообразных смесей

При испытании проб влажных порошкообразных смесей точную навеску пробы массой около 3,0 г помещают в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$. Добавляют 25 $см^3$ воды и перемешивают до полного растворения порошка.

6.2.1.5 Смеси, предназначенные для элементного питания

При испытании продуктов, содержащих свободные аминокислоты и не содержащих интактный белок, добавляют 0,5 г казеината кальция или обезжиренного сухого молока к навеске пробы гомогенной влажной порошкообразной смеси массой 3,0 г, разбавленной 25 $см^3$ воды, или к навеске негомогенной жидкой пробы или восстановленной сухой порошкообразной смеси массой от 20 до 25 г. Тщательно перемешивают для растворения белка, после чего сразу же добавляют 30 $см^3$ буферного раствора ацетата натрия (см. 4.12.2.11) и 1 $см^3$ раствора цианида калия массовой концентрации 10 г/$дм^3$. Разбавляют до требуемого объема водой, фильтруют, фильтрат подвергают очистке и концентрированию до 60 $см^3$ на предварительно кондиционированном патроне С8 или С18 массой сорбента 900 мг. Нагрев пробы в термостате при 105 °С не проводят.

6.2.2 Экстракция

К каждому раствору пробы для анализа добавляют 30 $см^3$ буферного раствора ацетата натрия (см. 4.12.2.11) и взбалтывают до полного перемешивания. В вытяжном шкафу к раствору каждой пробы добавляют 1 $см^3$ свежеприготовленного раствора цианида калия массовой концентрации 10 г/$дм^3$ (см. 4.12.2.10) и взбалтывают до перемешивания. Растворы проб выдерживают в термостате при 105 °С в течение не менее 60 мин, но не более 120 мин. Следует принимать во внимание, что температура в термостате понизится при открывании дверцы. Отсчет времени начинают с момента повторного достижения температуры в термостате 105 °С.

Вынимают растворы проб из термостата и сразу же охлаждают на бане со льдом. Разбавляют растворы проб до заданного объема водой и тщательно перемешивают. Растворы проб фильтруют через фильтровальную бумагу (см. 5.12) в коническую колбу вместимостью 125 $см^3$ или аналогичную стеклянную емкость. При необходимости допускается заменять фильтр, если он засоряется. Если приготовленные растворы проб непрозрачны и содержат нерастворимые частицы очень малого размера, их центрифугируют и переносят надосадочную жидкость в воронки с уложенной в них фильтровальной бумагой. Растворы проб, в которые был добавлен казеинат кальция, нагревать не допускается (см. 6.2.1.5).

6.2.3 Концентрирование растворов проб

Для очистки и концентрирования раствора пробы поверх запорного крана вакуумного манифолда помещают патрон для ТФЭ массой сорбента 900 мг (см. 5.17) и в верхнее отверстие патрона устанавливают цилиндр одноразового шприца вместимостью 30 $см^3$. Каждый патрон кондиционируют не менее 20 $см^3$ ацетонитрила (пропускание под действием силы тяжести), после чего промывают не менее 20 $см^3$ воды. С помощью пипеток с одной отметкой в патроны вносят фильтраты растворов проб, руководствуясь указаниями в таблице 1. Если концентрация витамина B_{12} неизвестна, руководствуются указаниями для готовых к употреблению продуктов, содержащих от 1 мкг/$дм^3$ до 10 мкг/$дм^3$ витамина B_{12}. При необходимости применяют вакуум так, чтобы обеспечивалась постоянная скорость протекания растворов проб через патроны. Скорость протекания растворов проб через патроны не должна превышать 120 капель в минуту. Элюат отбрасывают.

Таблица 1 — Указания по внесению фильтратов растворов проб в патроны для ТФЭ

Витамин B_{12} в продуктах, готовых к употреблению, мкг/$дм^3$	Объем фильтрата, внесенный в патрон для ТФЭ, $см^3$	Конечный объем разбавления, $см^3$
< 1	80	5
1—10	70—80	10
11—20	50—60	10
21—50	20—40	10
Примечание — Не следует вносить более 60 $см^3$ растворов проб смесей для энтерального питания для взрослых на патроны Alltech С8 или С18.		

После протекания через патрон всего фильтрата раствора пробы каждый патрон промывают 5 см^3 воды, элюат отбрасывают. Высушивают каждый патрон потоком воздуха путем приложения вакуума до полного прекращения вытекания элюата. Закрывают все запорные краны.

Руководствуясь указаниями в таблице 1, под каждый патрон помещают мерную колбу вместимостью 5 см^3 или 10 см^3. В каждый патрон вносят 4,4 см^3 смеси ацетонитрила с водой объемной долей ацетонитрила 30 % (см. 4.12.2.6). Открывают все запорные краны и элюируют витамин B_{12} с применением вакуума в мерные колбы. Элюент должен протекать через патроны со скоростью не более 120 капель в минуту.

При разбавлении на конечной стадии растворы проб, собранные в мерные колбы вместимостью 10 см^3, разбавляют до метки водой.

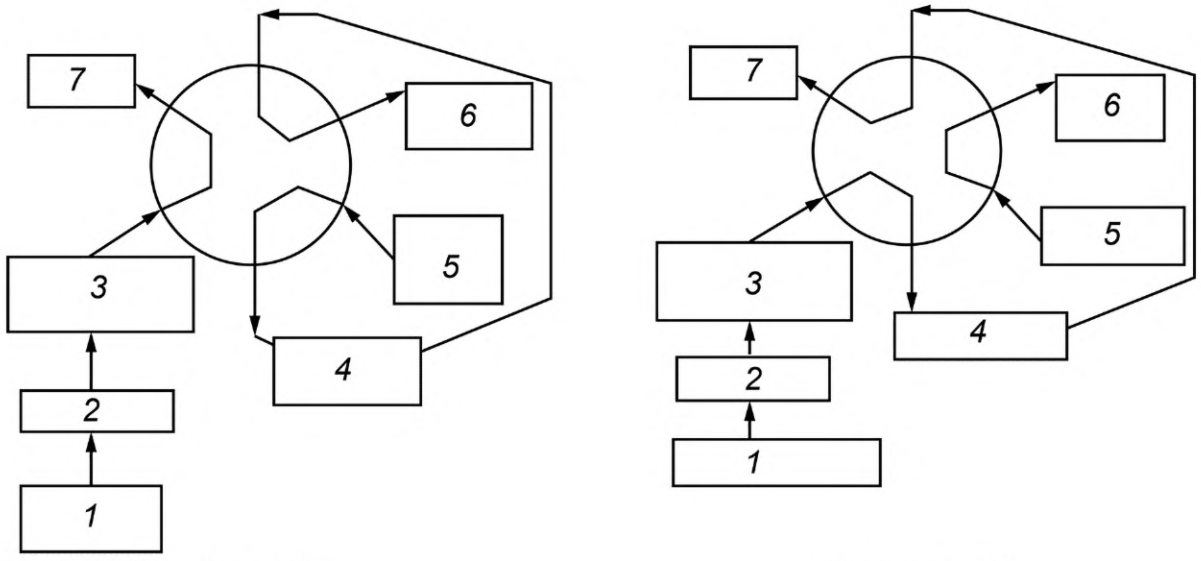
В случае растворов проб, собранных в мерные колбы вместимостью 5 см^3, в вытяжном шкафу в каждую колбу добавляют по 0,1 см^3 свежеприготовленного раствора цианида калия концентрации 4 г/дм^3 (см. 4.12.2.9). Подготовленные таким образом растворы проб помещают в термостат, нагретый до температуры 95 °С, не менее чем на 1,5 ч, но не более чем на 4 ч. Далее вынимают растворы проб из термостата и охлаждают до комнатной температуры. Объем содержимого в колбах доводят водой до метки.

Фильтруют аликвоты каждого стандартного раствора и приготовленного раствора пробы через фильтрующую насадку на шприц (см. 5.19) в виалу автосамплера.

6.3 Хроматографический анализ

6.3.1 Устройство и конфигурация хроматографической системы

Устройство и конфигурация системы для ВЭЖХ приведены на рисунке 1.



Конфигурация 1 Конфигурация 2

1 — изократический насос; *2* — автосамплер; *3* — аналитическая эксклюзионная колонка; *4* — аналитическая колонка С18; *5* — градиентный насос; *6* — спектрофотометрический детектор; *7* — емкость для сбора элюата

Рисунок 1 — Устройство и конфигурация системы для ВЭЖХ

6.3.2 Параметры работы хроматографической системы:

- продолжительность одного анализа: от 30 до 35 мин;
- объем инжекции: от 0,9 до 2,0 см^3;
- конфигурация системы: см. таблицу 2.

Таблица 2 — Конфигурация системы для ВЭЖХ

Время, мин	Конфигурация крана-переключателя потока (см. рисунок 1)
0—10,5	1
10,5—14,5	2
14,5—30,0 (или 35,0)	1

- параметры работы изократического насоса:
  - подвижная фаза D (см. 4.12.2.4);
  - подбирают такую скорость подачи подвижной фазы, чтобы витамин B_{12} элюировался с эксклюзионной колонки между 10,5 мин и 14,5 мин. Типичные значения скорости подачи подвижной фазы составляют от 1,1 до 1,2 $см^3$/мин.

Для определения подходящей скорости подачи подвижной фазы эксклюзионную колонку присоединяют непосредственно к спектрофотометрическому детектору и инжектируют стандартный раствор высокой концентрации. Подбирают такую скорость подачи подвижной фазы, чтобы витамин B_{12} элюировался с эксклюзионной колонки между 10,5 мин и 14,5 мин;

- параметры работы градиентного насоса:
  - подвижная фаза A (см. 4.12.2.1), B (см. 4.12.2.2) и C (см. 4.12.2.3);
  - градиентная программа, обеспечивающая элюирование витамина B_{12} в промежуток между 24 мин и 30 мин, приведена в таблице 3.

Таблица 3 — Градиентная программа для обращенно-фазовой колонки (см. 5.3)

Время, мин	Объемная доля подвижной фазы A, %	Объемная доля подвижной фазы B, %	Объемная доля подвижной фазы C, %
0	90	10	0
14,5	90	10	0
14,6	40—60[a]	60—40[a]	0
27,0—30,0	40—60[a]	60—40[a]	0
27,1—30,1	0	10	90
29,9—33,0	0	10	90

[a] Применительно к каждой колонке следует устанавливать подходящие условия градиентного элюирования так, чтобы обеспечивалось достаточное разделение витамина B_{12} и рибофлавина в промежуток приблизительно между 24 мин и 30 мин. Для определения подходящих условий градиентного элюирования применительно к новой колонке устанавливают соотношение подвижных фаз в моменты времени 14,6 мин и от 27,0 мин до 30,0 мин на середине диапазона, указанного в таблице. Инжектируют раствор для проверки степени хроматографического разделения (см. 4.12.2.12) и рассчитывают степень хроматографического разделения (R) пиков витамина B_{12} и рибофлавина. Подбирают состав подвижной фазы в моменты времени 14,6 мин и от 27,0 мин до 30,0 мин для достижения $R > 1,5$. После элюирования витамина B_{12} с колонки C18 или фенильной колонки, колонку промывают подвижной фазой, состоящей на 90 % из подвижной фазы C, в течение не менее 2,8 мин.

- скорость подачи подвижной фазы 1,0 $см^3$/мин;
- параметры работы детектора: длина волны детектирования 550 нм и ширина полосы светопропускания 10 нм.

После уравновешивания системы проводят анализ градуировочных стандартных растворов и серии растворов проб. После анализа последнего раствора пробы анализируют как минимум один градуировочный стандартный раствор для проверки стабильности системы.

Образцы хроматограмм приведены в приложении А.

7 Обработка результатов

7.1 Общие положения

Содержание витамина B_{12} в пробах рассчитывают путем соотнесения площади пика на хроматограмме раствора пробы известной массы навески с площадями пиков на хроматограммах стандартных растворов известной концентрации.

Просматривают все хроматограммы градуировочных растворов и растворов проб и контролируют, чтобы пик витамина B_{12} был разделен со всеми остальными пиками на хроматограммах.

Площади пиков измеряются системой обработки данных. Перед расчетом содержания витамина B_{12} в пробах сопоставляют площади пиков витамина B_{12} на хроматограммах стандартных растворов с площадями пиков витамина B_{12} на хроматограммах растворов проб и контролируют, чтобы площади пиков на хроматограммах растворов проб находились в границах диапазона площадей пиков на хроматограммах стандартных растворов.

7.2 Расчет концентрации стандартных растворов

Массовую концентрацию витамина B_{12} ρ_{ws}, мкг/дм^3, в градуировочных стандартных растворах (см. 4.12.3.4) вычисляют по формуле

$$\rho_{ws} = S_W \cdot P \cdot \frac{A}{200}, \quad (2)$$

где S_W — масса навески стандартного образца витамина B_{12}, мг;

P — чистота стандартного образца витамина B_{12} (см. 4.11) в микрограммах цианкобаламина (витамина B_{12}) на миллиграмм стандартного образца;

A — использованная аликвота стандартного раствора витамина B_{12} промежуточной концентрации (см. 4.12.3.3), см^3 (здесь: 0,5 см^3, 1,0 см^3, 2,0 см^3, 3,0 см^3, 4,0 см^3 или 5,0 см^3);

200 — объем приготовленного градуировочного стандартного раствора, см^3.

7.3 Построение градуировочного графика

Для каждой концентрации градуировочных растворов определяют среднее арифметическое значение из площадей пиков аналита, полученных при анализе соответствующего градуировочного раствора до и после анализа серии растворов проб. Градуировочный график строят с помощью линейного регрессионного анализа методом наименьших квадратов в системе координат «концентрация градуировочного раствора — площадь пика аналита».

7.4 Расчет содержания витамина B_{12} в пробах

По градуировочному графику, построенному по 7.3, определяют массовую концентрацию витамина B_{12} в каждом анализированном растворе пробы.

Массовую долю витамина B_{12} в каждой пробе w_p, мг/100 г, вычисляют по формуле

$$w_p = \rho_i \cdot \frac{V_1}{m_s} \cdot \frac{V_2}{V_f} \cdot \frac{m_{pr}}{m_{rp}} \cdot \frac{1}{10}, \quad (3)$$

где ρ_i — массовая концентрация витамина B_{12} в растворе пробы для анализа, определенная по градуировочному графику, мкг/дм^3;

V_1 — объем первого разбавления, см^3 (здесь V_1 = 100 см^3);

m_s — масса навески пробы, г;

V_2 — объем второго (окончательного) разбавления, см^3;

V_f — объем фильтрата, внесенный в патрон для ТФЭ, см^3;

m_{pr} — общая масса пробы, полученной после восстановления порошкообразной пробы, г (если применимо для данного случая);

m_{rp} — масса порошкообразной пробы, взятая для восстановления, г (если применимо для данного случая).

Примечание — m_{pr} и m_{rp} равны 1 для жидких проб и проб, испытываемых без восстановления.

Приложение А
(справочное)

Примеры хроматограмм

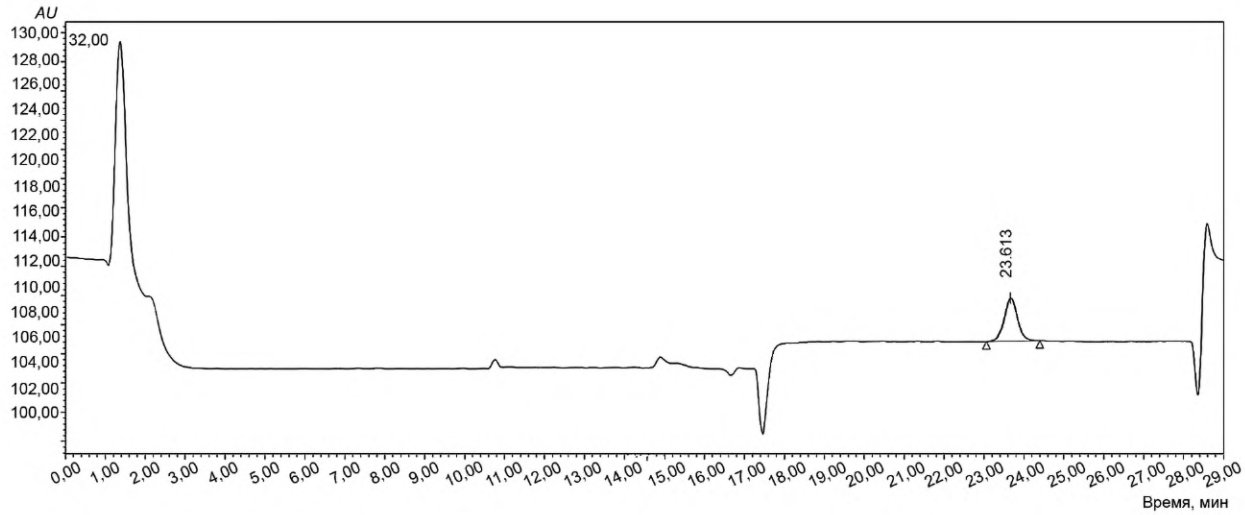


Рисунок А.1 — Типичная хроматограмма стандартного раствора

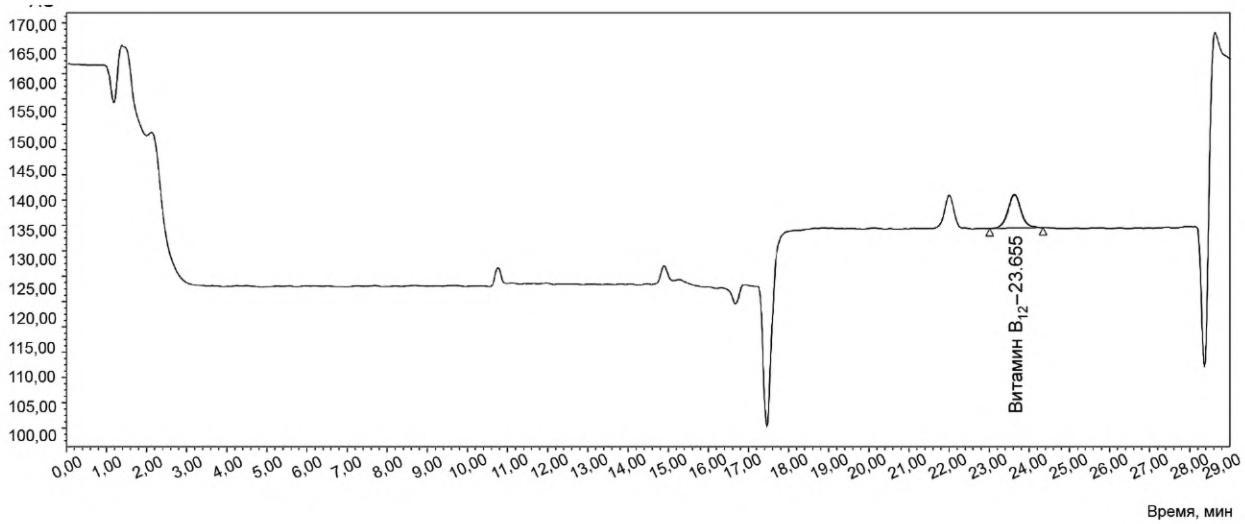


Рисунок А.2 — Типичная хроматограмма раствора пробы

Приложение В
(справочное)

Данные по прецизионности метода

Данные, приведенные в таблице В.1, опубликованы в 2015 г. [1] и получены в результате межлабораторных испытаний, проведенных в соответствии с ISO 5725-2 [2] и Согласованным Протоколом по проведению межлабораторных испытаний для оценки характеристик прецизионности методов анализа [3]. В основе процедуры проведения испытаний лежали требования, указанные в библиографической ссылке [4].

Дополнительная информация о валидации метода может быть получена по ссылке gost.e-ecolog.ru iso/20634.

Таблица В.1 — Данные по прецизионности метода определения витамина B_{12}

Образец	NIST SRM 1849[a]	1[a]	2[b]	3[c]	4[d]	5[e]	6[f]	7[g]	8[h]	9[i]	10[j]	11[k]
Год проведения межлабораторных испытаний	2014	2014	2014	2014	2014	2014	2014	2014	2014	2014	2014	2014
Число лабораторий	11	9	10	11	10	10	10	10	11	10	9	10
Число лабораторий, не отвечающих требованиям	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Число лабораторий, оставшихся после исключения выбросов	10	9	10	11	9	10	10	9	10	9	8	10
Число выбросов (лабораторий)	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0
Число принятых результатов	20	18	20	22	18	20	20	14	20	20	16	20
Среднее значение $\bar{x}$, мкг/100 г	43,7[l]	0,272	0,300	0,373	0,543	0,250	0,636	1,48	0,428	0,227	0,967	1,08
Стандартное отклонение повторяемости s_r, мкг/100 г	3,01[l]	0,0257	0,0270	0,0200	0,0169	0,0244	0,0348	0,122	0,0208	0,0111	0,0289	0,0730
Коэффициент вариации повторяемости $C_{V,r}$, %	6,90	9,46	8,99	5,35	3,11	9,77	5,47	8,23	4,85	4,90	2,98	6,74
Предел повторяемости r ($r = 2,8s_r$), мкг/100 г	8,43[l]	0,0720	0,0756	0,0560	0,0473	0,0683	0,0974	0,342	0,0582	0,0311	0,0809	0,204
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мкг/100 г	3,86[l]	0,0427	0,0416	0,0694	0,0603	0,0487	0,0587	0,171	0,0305	0,0202	0,0342	0,190
Коэффициент вариации воспроизводимости $C_{V,R}$, %	8,84	15,7	13,8	18,6	11,1	19,5	9,23	11,5	7,13	8,90	3,54	17,5
Предел воспроизводимости R ($R = 2,8s_R$), мкг/100 г	10,8[l]	0,120	0,116	0,194	0,169	0,136	0,164	0,479	0,0854	0,0566	0,0958	0,532
Индекс Горвица HorRat в соответствии с библиографической ссылкой [5]	0,34	0,40	0,36	0,50	0,32	0,50	0,27	0,38	0,20	0,22	0,11	0,55

Окончание таблицы В.1

[a] Готовая к употреблению адаптированная смесь для искусственного вскармливания детей раннего возраста на молочной основе.

[b] Порошкообразная смесь для энтерального питания для взрослых на молочной основе.

[c] Порошкообразная адаптированная смесь для искусственного вскармливания детей раннего возраста на молочной основе, частично гидролизованная.

[d] Порошкообразная смесь для элементного питания для детей раннего возраста.

[e] Порошкообразная адаптированная смесь для искусственного вскармливания детей раннего возраста на соевой основе, частично гидролизованная.

[f] Порошкообразная смесь для энтерального питания для взрослых с низким содержанием жира.

[g] Готовая к употреблению смесь для энтерального питания для взрослых с высоким содержанием жира (единичное определение в четырех лабораториях из-за неправильной маркировки банок с продуктом).

[h] Порошкообразная адаптированная смесь для искусственного вскармливания детей раннего возраста на соевой основе.

[i] Порошкообразная адаптированная смесь для искусственного вскармливания детей раннего возраста на молочной основе.

[j] Порошкообразная смесь для детского питания.

[k] Готовая к употреблению высокобелковая порошкообразная смесь для энтерального питания для взрослых.

[l] Результаты приведены в мкг/кг для продукта в порошкообразной форме.

Приложение С
(справочное)

Типовая методика проверки пригодности патронов для твердофазной экстракции (ТФЭ)

Для установления пригодности патронов для ТФЭ или для подтверждения пригодности новой партии патронов, может использоваться следующая методика.

Готовят водный раствор витамина B_{12} массовой концентрации 160 мкг/дм^3.

Готовят три раствора пробы для анализа из одной представительной лабораторной пробы любого продукта с самым высоким содержанием белка из всех продуктов, которые предполагается анализировать по этой методике, при этом проводят экстракцию по методике, описанной в 6.2.1 и 6.2.2.

Объединяют все фильтраты растворов проб. Добавляют 1 см^3 водного раствора витамина B_{12} массовой концентрации 160 мкг/дм^3 к порции фильтрата раствора пробы объемом 80 см^3 или 100 см^3 (проба с добавкой аналита) и 1 см^3 воды к другой порции фильтрата раствора пробы объемом 80 см^3 или 100 см^3 (проба без добавки аналита).

Продолжают подготовку растворов проб для анализа с добавкой и без добавки аналита, при этом проводят концентрирование, и конечное разбавление проводят по методике, описанной в 6.2.3.

Проводят хроматографический анализ обоих растворов проб. Рассчитывают содержание витамина B_{12} в пробах с добавкой и без добавки аналита и полноту обнаружения добавки.

Патроны считаются пригодными для применения, если полнота обнаружения добавки составляет не менее 90 %.

Библиография

[1] 2011.10, Determination of Vitamin B_{12} in Infant, Adult, and Pediatric Formulas by HPLC-UV and Column Switching: Collaborative Study

[2] ISO 5725-2:1994. 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[1)]

[3] AOAC International. AOAC Official Methods Program, Associate Referee's Manual on development, Study, Review, and Approval Process. Part IV AOAC Guidelines for Collaborative Studies, 1995, pp. 23—51

[4] AOAC SMPR 2011.005, Standard Method Performance Requirements for Vitamin B_{12} in infant formula and Adult/ Pediatric Nutritional formula

[5] Thompson M. Recent Trends in Inter-Laboratory Precision at ppb and sub-ppb Concentrations in Relation to Fitness for Purpose Criteria in Proficiency Testing. Analyst (Lond.). 2000, 125 pp. 385—386

[1)] Официальный перевод этого стандарта находится в Федеральном информационном фонде стандартов.

УДК 613.22:664:543.544.5.068.7:006.354 МКС 67.050

Ключевые слова: смеси адаптированные для искусственного вскармливания детей раннего возраста, смеси для энтерального питания для взрослых, определение витамина B_{12}, цианкобаламин, метод высокоэффективной жидкостной хроматографии

БЗ 6—2018/78

Редактор *Л.В. Коретникова*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *Е.Ю. Митрофанова*
Компьютерная верстка *Е.А. Кондрашовой*

Сдано в набор 10.08.2018. Подписано в печать 21.08.2018. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,32. Уч.-изд. л. 2,10.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»
для комплектования Федерального информационного фонда стандартов,
123001 Москва, Гранатный пер., 4. gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

Поправка к ГОСТ ISO 20634—2018 Смеси адаптированные для искусственного вскармливания детей раннего возраста и смеси для энтерального питания взрослых. Определение витамина B_{12} методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии

В каком месте	Напечатано	Должно быть		
Предисловие. Таблица согласования	—	Армения	AM	ЗАО «Национальный орган по стандартизации и метрологии» Республики Армения

(ИУС № 1 2024 г.)

gost.e-ecolog.ru