ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫНЫҢ ҰЛТТЫҚ СТАНДАРТЫ

Балалар тағамына және ересектерге арналған қоспалар

КЕРІ ФАЗАЛЫ ЖОҒАРЫ ТИІМДІЛІКТІ СҰЙЫҚТЫҚ ХРОМАТОГРАФИЯСЫ (RP-HPLC) АРҚЫЛЫ B_{12} ДӘРУМЕНІНІҢ МӨЛШЕРІН АНЫҚТАУ

Смеси для детского питания и взрослых

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ВИТАМИНА B_{12} С ПОМОЩЬЮ ОБРАЩЕННО-ФАЗОВОЙ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ (RP-HPLC)

ҚР СТ ISO 20634–2016

(ISO 20634:2015 Infant formula and adult nutritionals – Determination of vitamin B_{12} by reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC), IDT)

Ресми басылым

Қазақстан Республикасы Инвестициялар және даму министрлігі
Техникалық реттеу және метрология комитеті
(Мемстандарт)

Астана

gost.e-ecolog.ru

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫНЫҢ ҰЛТТЫҚ СТАНДАРТЫ

Балалар тағамына және ересектерге арналған қоспалар

КЕРІ ФАЗАЛЫ ЖОҒАРЫ ТИІМДІЛІКТІ СҰЙЫҚТЫҚ ХРОМАТОГРАФИЯСЫ (RP-HPLC) АРҚЫЛЫ B_{12} ДӘРУМЕНІНІҢ МӨЛШЕРІН АНЫҚТАУ

ҚР СТ ISO 20634–2016

(ISO 20634:2015 Infant formula and adult nutritionals – Determination of vitamin B_{12} by reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC), IDT)

Ресми басылым

Қазақстан Республикасы Инвестициялар және даму министрлігі
Техникалық реттеу және метрология комитеті
(Мемстандарт)

Астана

Алғысөз

1 «Kazakhstan Business Solution» жауапкершілігі шектеулі серіктестігі (ТК 91 «Химия» стандарттау бойынша техникалық комитеті) **ӘЗІРЛЕП ЕНГІЗДІ**

2 Қазақстан Республикасы Инвестициялар және даму министрлігінің Техникалық реттеу және метрология комитеті Төрағасының 2016 жылғы 23 қарашадағы № 296-од бұйрығымен **БЕКІТІЛІП ҚОЛДАНЫСҚА ЕНГІЗІЛДІ**

3 Осы стандарт ISO 20634:2015 Infant formula and adult nutritionals – Determination of vitamin B12 by reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) (Балалардың тамақтануына және ересектерге арналған қоспалар. Кері фазалы жоғары тиімділікті сұйықтық хроматографиясы (RP-HPLC) арқылы B12 витаминінің мөлшерін анықтау) халықаралық стандартына сәйкес келеді.

Халықаралық стандартты AOAC INTERNATIONAL қауымдастығымен бірлесіп ISO/TC 34 «Тамақ өнімдері» техникалық комитеті әзірледі.

Ағылшын тілінен аударылған (en).

Осы ұлттық стандарт халықаралық стандарттың ресми нұсқасы негізінде әзірленді және осында берілген сілтемелер Нормативтік техникалық құжаттардың бірыңғай мемлекеттік қорында бар.

Ресми нұсқа дегеніміз мемлекеттік және орыс тілдеріндегі мәтін болып табылады

Сәйкестік деңгейі – бірдей (IDT).

4 Осы стандартта Қазақстан Республикасының «Техникалық реттеу туралы» 2004 жылғы 9 қарашадағы № 603-II, «Қазақстан Республикасындағы тілдер туралы» 1997 жылғы 11 шілдедегі № 151 Заңдарының нормалары іске асырылды

5 БІРІНШІ ТЕКСЕРУ МЕРЗІМІ 2023 жылы
ТЕКСЕРУДІҢ КЕЗЕҢДІЛІГІ 5 жыл

6 АЛҒАШ РЕТ ЕНГІЗІЛДІ

Осы стандартқа енгізілген өзгерістер туралы ақпарат «Стандарттау бойынша нормативтік құжаттар» сілтемесінде, ал өзгеріс мәтіні «Мемлекеттік стандарттар» ай сайынғы ақпараттық сілтемесінде жарияланады. Осы стандарт қайта қаралған (жойылған) немесе ауыстырылған жағдайда тиісті ақпарат «Мемлекеттік стандарттар» ақпараттық сілтемесінде жарияланады.

Осы стандарт Қазақстан Республикасы Инвестициялар және даму министрлігі Техникалық реттеу және метрология комитетінің рұқсатынсыз ресми басылым ретінде Қазақстан Республикасы аумағында толықтай немесе бөлшектеліп басылып шығарыла, көбейтіле және таратыла алмайды

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫНЫҢ ҰЛТТЫҚ СТАНДАРТЫ

Балалар тағамына және ересектерге арналған қоспалар

КЕРІ ФАЗАЛЫ ЖОҒАРЫ ТИІМДІЛІКТІ СҰЙЫҚТЫҚ ХРОМАТОГРАФИЯСЫ (RP-HPLC) АРҚЫЛЫ B_{12} ДӘРУМЕНІНІҢ МӨЛШЕРІН АНЫҚТАУ

Енгізілген күні 2018-01-01

1 Қолданылу саласы

Осы стандарт шикі пальма майының түссіздену көрсеткішінің нашарлауын (DOBI) және шикі немесе түссізденген пальма майындағы және спектрдің ультракүлгін және көзге көрінетін саласында спектрфотометрлік сараптама жолымен оның екшеміндегі каротин мөлшерін анықтау әдісін белгілейді.

Осы стандартты дәлдіктің белгіленген нормасын ескеріп нақты міндеттер үшін ГОСТ 8.010 сәйкес жұмыс процедурасын жасау үшін нұсқаулық ретінде қолдануға болады.

2 Терминдер мен анықтамалар

Осы стандартта тиісті анықтамалары бар мынадай терминдер қолданылады:

2.1 B_{12} витамині (vitamin B_{12}): Цианокобаламин және цианокобаламинге түрленетін аквокобаламин, гидроксикобаламин, метилкобаламин және аденозилкобаламин іспеттес B_{12} витамині биологиялық белсенділігі бар кобальттан тұратын корриноидтар.

2.2 Ересектерге арналған қоспа (adult nutritional): Түрлендірілмеген ақуызды қосып және қоспай, сүт, соя, күріш, сүт сарысуы, гидролизденген ақуыз, крахмал мен амин қышқылдарының үйлесімінен әзірленген бірден-бір қорек көзі бола алатын, сұйық күйде тұтынылатын, құнарлы заттары теңдестірілген, арнайы әзірленген тамақ өнімдері.

2.3 Адапталған немесе жартылай адапталған бастапқы немесе соңғы сүт қоспалары (infant formula): Өмірінің бірінші айынан бастап тиісті тамақты қолдану күніне дейін (72-1981 [1] Стандарт Кодексіне сәйкес) тамақтануда сәбилердің қажеттілігін қанағаттандыру үшін арнайы дайындалған емшектегі сүттің жасанды алмастырғышы.

3 Әдістің мәні

Цианокобаламин және кобальттан тұратын корриноидтар натрий ацетат буферін (pH = 4,5) қолдану арқылы үлгіден бөліп алынады, соңғысы калий цианидін қолдану арқылы 105 °С температурада цианокобаламинге түрленеді. Сірінділерді (SPE) қатты фазалық экстракцияға арналған С8 және С18 картриджердің көмегімен тазартады және шоғырландырады және SEC ығыстырғыш хроматография, яғни молекулалық електер хроматографиясы, және қайтарымды-фазалық хроматография көмегімен бөледі. B_{12} витаминінің мөлшері 550 нм-да көрінетін сезгіштігі бар сұйықтық хроматография көмегімен анықталады.

Ресми басылым

4 Реагенттер мен заттар

Зерттеу кезінде, егер басқасы көрсетілмесе, белгілі аналитикалық тазалық дәрежесіндегі реагенттерді және дистилденген немесе минералсызданған суды, немесе баламалы тазалық дәрежесіндегі суды қолданады.

4.1 Мұз сірке қышқылы

4.2 Ацетонитрил, HPLC дәрежесі.

4.3 Драйерит, десиккант, сусыз кальций сульфаты, 8 қап.

4.4 Денатурленген этанол

4.5 Құмырсқа қышқылы, 88 %.

4.6 Калий цианиді, 97 %.

4.7 Рибофлавин, тазалық дәрежесі 98 %-дан бастап 102 %-ға дейін.

4.8 Сусыз натрий ацетаты немесе натрий ацетатының тригидраты, ЕРТ.

4.9 Такадиастаза, Accurate Chemical Co.1 өндірілген немесе баламалы өнім.

4.10 Триэтиламин, HPLC дәрежесі.

4.11 B_{12} витаминінің бастапқы стандартты үлгісі (цианокобаламин), мысалы Американдық фармакопеяның 1152009 стандартты үлгісі (шамамен 10 мкг/мг), Ресми топтама[1]). Күндізгі жарықтан қорғалған эксикаторда сақтау қажет.

4.12 Ерітінділер мен стандартты ерітінділерді дайындау.

4.12.1 Жалпы ережелер

Қолайлылық үшін зертханалық іс-тәжірибе ережелері сақталған жағдайда барлық ерітінділердің мөлшерін ұлғайтады немесе азайтады. Ерітінділерді салқындатылған күйінде немесе қоршаған орта температурасында инертті заттармен толтырылған герметикалық контейнерлерде, егер басқасы көрсетілмесе, сақтауға болады.

4.12.2 Ерітінділерді дайындау

4.12.2.1 HPLC-дегі қозғалмалы А фазасы. 4,0 мл триэтиламинді 1000 мл сумен сұйылтады. pH деңгейін 5-тен 7-ге дейін шамамен 1,25 мл шоғырланған құмырсқа қышқылы көмегімен жеткізеді (4,5). Жарамдылық мерзімі: 1 апта.

4.12.2.2 HPLC-дегі қозғалмалы В фазасы. 4,0 мл триэтиламин мен 250 мл ацетонитрилді 750 мл сумен сұйылтады. pH деңгейін 5-тен 7-ге дейін шамамен 1,25 мл шоғырланған құмырсқа қышқылы көмегімен жеткізеді. Жарамдылық мерзімі: тығыздап жабылған контейнерде 1 апта.

4.12.2.3 HPLC-дегі қозғалмалы С фазасы. 4,0 мл триэтиламин мен 750 мл ацетонитрилді 250 мл сумен сұйылтады. pH деңгейін 5-тен 7-ге дейін шамамен 1,25 мл шоғырланған құмырсқа қышқылы көмегімен жеткізеді. Жарамдылық мерзімі: тығыздап жабылған контейнерде 1 апта.

4.12.2.4 HPLC-дегі қозғалмалы D фазасы. 50 мл ацетонитрилді сумен 2000 мл-ге дейін сұйылтады. Жарамдылық мерзімі: тығыздап жабылған контейнерде 1 апта.

4.12.2.5 Ацетонитрил және су қоспасы, мөлшерлік үлесі 10 %. 150 мл ацетонитрилді сумен 1500 мл-ге дейін сұйылтады. Жарамдылық мерзімі: тығыздап жабылған контейнерде 1 ай.

4.12.2.6 Ацетонитрил мен су қоспасы, SPE элюирлеуге арналған еріткіш, мөлшерлік үлесі 30 %. 30 мл ацетонитрилді сумен 100 мл-ге дейін сұйылтады. Жарамдылық мерзімі: тығыздап жабылған контейнерде 1 ай.

---

[1]) Сатылымда бар жарамды өнім үлгісі. Осы ақпарат осы стандартты пайдаланушыларға қолайлы болу үшін берілген және ISO тарапынан осы өнім мақұлданғанын растамайды. Егер баламалы өнімдер осындай нәтиже беретіні көрсетілсе, оларды пайдалануға болады.

4.12.2.7 Ацетонитрил мен су қоспасы, бағананы тазарту және сақтауға арналған ерітінді, мөлшерлік үлесі 50 %. 500 мл ацетонитрилді сумен 1000 мл-ге дейін өлшеуіш жұмыр шыныда сұйылтады.

Жарамдылық мерзімі: 6 ай.

4.12.2.8 Этанол мен су қоспасы, мөлшерлік үлесі 25 %. 50 мл этанолды сумен 200 мл-ге дейін сұйылтады. Жарамдылық мерзімі: тығыздап жабылған контейнерде 1 жыл.

4.12.2.9 Калий цианиді ерітіндісі, массалық концентрациясы ρ = 4 г/л. 0,02 г калий цианидін натрий ацетаты буферінде ерітіп, 5 мл дейін натрий ацетаты буферімен сұйылтады (4 қараңыз) зат концентрациясы c = 0,25 моль/л). Ерітіндіні тікелей қолдану алдында дайындау қажет.

4.12.2.10 Калий цианиді ерітіндісі, ρ = 10 г/л. 0,25 г калий цианидін суда ерітеді және сумен 25 мл-ге дейін сұйылтады. Ерітіндіні тікелей қолдану алдында дайындау қажет.

4.12.2.11 Натрий ацетаты буфері, c = 0,25 моль/л. 41,0 г сусыз натрий ацетатын немесе 68,0 г натрий ацетаты тригидратын 1800 мл суда сұйылтады. Шоғырланған сірке қышқылы көмегімен (шамамен 40 мл) pH деңгейін 4,5с дейін жеткізеді. Сумен 2000 мл-ге дейін сұйылтады. Жарамдылық мерзімі: 3 ай.

4.12.2.12 Бөлетін стандартты ерітінді. Өлшегіш қағазға шамамен 0,005 г рибофлавинді салып өлшейді. Оны сыйымдылығы 100 мл өлшеуіш жұмыр шыныға салып, 10 %-дық ацетонитрилмен қажетті мөлшерге дейін жеткізеді. Компоненттерді еріту үшін ерітіндіні араластырады. Ерітіндінің тең мөлшерін жоғары концентрациялы B_{12} витаминінің стандартты жұмысшы ерітіндісімен араластырады. Жарамдылық мерзімі: 1 апта.

4.12.2.13 Такадиастаз ерітіндісі, ρ = 60 г/л. Такадиастаздың 0,6 г 10 мл суда ерітеді. Ерітіндіні күнделікті қолдану алдында дайындау қажет.

4.12.3 Стандартты ерітінділерді дайындау

4.12.3.1 Жалпы ережелер. Барлық стандартты ерітінділер экрандалған УК күндізгі жарық шамдарының әсерімен дайындалады және тығыздап жабылған өлшеуіш шыныда 2 °С-ден бастап 8 °С-ге дейінгі температурада сақталады.

4.12.3.2 B_{12} витаминінің бастапқы стандартты ерітіндісі, ρ = 10 000 мкг/л. Концентрациясы 10 000 мкг/л аналық стандартты ерітіндіні алу үшін B_{12} витаминінің стандартты ерітіндісінің тиісті мөлшері (4.11 қараңыз) мұқият өлшенеді. 25% этанолда ерітеді және 25 %-дық этанолмен 100 мл-ге дейін сұйылтады (4.12.2.8 қараңыз). Жарамдылық мерзімі: 6 ай.

(1) формуланы пайдалана отырып, миллиграммен, m_w, өлшенетін B_{12} витаминінің стандартты ерітіндісінің мөлшері есептеледі:

$$m_W = 10\,000 \times 0,1 \times \frac{1}{P}, \quad (1)$$

мұндағы 10 000 – бастапқы стандартты ерітіндінің қажетті шоғырлануы, мкг/л;
0,1 – сұйылтылған ерітінді мөлшері, л;
P –стандартты ерітінді мг-ның цианокобаламин мкг-не шаққандағы B_{12} витаминінің стандартты ерітіндісінің тазалық дәрежесі (5.11 қараңыз).

4.12.3.3 B_{12} витаминінің аралық стандартты ерітіндісі, ρ = 1000 мкг/л. Бастапқы 10 мл стандартты ерітіндіні (5.12.3.2 қараңыз) сумен 100 мл дейін сұйылтады. Жарамдылық мерзімі: 1 апта.

4.12.3.4 B_{12} витаминінің стандартты калибрлеу ерітіндісі, ρ 2,5 мкг/л бастап 25,0 мкг/л дейінгіге тең. Бөлек өлшеуіш жұмыр шыныларда 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 және 5,0 мл аралық стандартты ерітіндіні (4.12.3.3 қараңыз) 10 %-дық ацетонитрилмен (4.12.2.5 қараңыз) 200 мл-ге дейін сұйылтады. Жарамдылық мерзімі: 1 ай.

5 Аспаптар мен құрылғылар

Стандартты зертханалық шыны ыдыс пен жабдық, атап айтқанда, мыналар:

5.1 900 мкг-нан бастап 2 000 мкг-ға дейін үлгіні бүрку мүмкіндігіне ие автоматты сынама алғышпен және 550 нм-мен мониторинг жасай алатын вольфрам шамымен жарақталған ультракүлгін және көзге көрінетін диапазондар детекторынан, изократикалық сорғыдан және бағананы ауыстырғыш клапаннан, градиенттік сорғыдан тұратын HLPC жүйесі.

5.2 HPLC бағанасы, талдамалы эксклюзионды бағана:

– бөлшектер өлшемі 4 мкм, (250,0 × 9,4) мм (мысалы, Zorbax GF-2502 P/N 884973-901);

– 5 мкм, (300 × 8) мм (мысалы, Shodex Protein® KW-802.52, P/N F6989000) немесе баламасы.

5.3 HPLC бағанасы, талдамалы С18 бағанасы:

– бөлшектер өлшемі 3 мкм, (100,0 × 4,6) мм (мысалы, Thermo Scientific Aquasil™2 P/N 77503-104630) көлемі кішірейтілген С18 қорғаныш картриджбермен 3 мкм, 10 мм × 4,6 мм (мысалы, Thermo Scientific Aquasil™2 P/N 77503-014001);

– 3 мкм, 120 А, (100,0 × 4,6) мм (мысалы, Epic Phenyl Hexyl_ (ES Industries 125191-EPHX)[1)] тиісті қорғаныш картриджбен, немесе 100% судан тұратын қозғалмалы фазамен үйлесімді қайтарымды-фазалық хроматография баламалы бағанасы).

5.4 (95 ± 5) °С және (105 ± 5) °С температураны бірқалыпты ұстап тұру мүмкіндігі бар пеш.

5.5 pH өлшеуге арналған аспап, калибрлеу буфері бар.

5.6 Аналитикалық таразы, ең жақын 0,00001 г дейінгі дәлдікпен.

5.7 Мензуркалар, шыны, өлшемдері әр түрлі.

5.8 Мөлшерлегіш саптама, 30 мл мөлшерлемесі бар немесе балама.

5.9 Цилиндрлер, градуирленген, шыны, өлшемдері әр түрлі.

5.10 ГОСТ 25336-82 бойынша эксикатор.

5.11 Конусты жұмыр шынылар, сыйымдылығы 125 мл немесе баламалы шыны ыдыс.

5.12 Сүзгіш қағаз, ватман қағазы 2V[2)] немесе балама.

5.13 Құйғылар, пластмассалы, фильтр-қағазбен бірге қолдануға жарайтын.

5.14 Қолғаптар, бір рет пайдаланатын.

5.15 Тамызғыш мөлшерлеуіш, мөлшері өзгермелі, 100 мкл бастап 1 000 мкл дейін.

5.16 Зертханалық жарық жапқыштар, 385 нм кем емес өткізгіштік шегі бар сары немесе мөлдір жапқыштар.

5.17 Қатты фазалық экстракцияға арналған картридждер (SPE), С8, 900 мг (мысалы, Alltech/Grace Davidson P/N 20966[1)]), С18, 900 мг (мысалы, Alltech/Grace Davidson P/N 20942[1)]), немесе баламасы. SPE картриджді білікті сынау әдістемесінің үлгісі С қосымшасында келтірілген.

5.18 Шприцтер, бір рет пайдаланатын, өлшемдері әр түрлі.

5.19 Шприцтік сүзгілер, 0,45 мкм, полиамидті.

5.20 Вакуумдық коллектор, клапандары бар 24 арна немесе баламасы.

5.21 Градуирленген тамызғыштар, өлшемдері әр түрлі.

5.22 Өлшеуіш жұмыр шынылар, өлшемдері әр түрлі.

[1)] Сатылымда бар жарамды өнім үлгісі. Осы ақпарат осы стандартты пайдаланушыларға қолайлы болу үшін берілген және ISO және IDF тарапынан осы өнім мақұлданғанын растамайды. Егер баламалы өнімдер осындай нәтиже беретіні көрсетілсе, оларды пайдалануға болады.

Ескертпе 1 мкл-ден бастап 500 мкл-ге дейінгі шприц мөлшерлі автоматты сынама алғыш. Шприцті тасымалдауға арналған қосымша құрылғысы бар 250 және 500 мкл екі шприцті бір мезгілде пайдалануға мүмкіндік береді (мысалы, Аджилент 7693А).

6 Сынақтарды өткізу

6.1 Жалпы ережелер

Экрандалған УК күндізгі жарық шамдарының әсерімен барлық үлгілерді дайындайды. Дайындалған өнім үлгілері тығыздап жабылған өлшеуіш жұмыр шыныларда 2 °С-ден бастап 8 °С-ге дейінгі температурада сақталған жағдайда әзірленгеннен кейін 14 күн ішінде сыналады. Өнімнің барлық үлгілері бірдей және репрезентативтік болып келеді, бұған үлгілерді іріктеудің алдында өнімдерді мұқият араластыру жолымен қол жеткізіледі.

6.2 Үлгілерді дайындау

6.2.1 Жалпы ережелер

Құрамында крахмал бар өнімдерге 1 мл такадиастаз ерітіндісі қосылады (5.12.2.13 қараңыз). Алуға кіріспес бұрын кем дегенде 30 мин ішінде такадиастаздың үлгілермен рекцияға түсуін қамтамасыз етеді.

6.2.1.1 Сұйық үлгілер

Тұтынуға дайын сұйықтықтар үшін біркелкілігін қамтамасыз ету үшін үлгілерді жақсылап араластырады және сыйымдылығы 100 мл өлшеуіш жұмыр шынымен шамамен 20,0 г ересектерге арналған қоспа немесе 25,0 г балалардың тамақтануына арналған қоспа дәл өлшеп алынады. Алуға кіріседі.

6.2.1.2 Ұнтақ тәрізді үлгілер

Егер ұнтақ тәрізді үлгінің біркелкілігі белгісіз болса, үлгі біркелкі емес деп топшыланып, құрғақ қоспалар/ біркелкі емес ұнтақ тәрізді үлгілерден алынған ұнтақ тәрізді үлгілерге берілген әрекеттерді ұстанады (7.2.1.3 қараңыз).

6.2.1.3 Құрғақ қоспалардан алынған ұнтақ тәрізді үлгілер

Құрғақ қоспалар/ әртекті ұнтақ тәрізді үлгілерден алынған ұнтақ тәрізді үлгілер үшін шамамен 25,0 г өлшенеді. Біркелкі суспензия болғанға дейін араластыру алдында 40 °С температурада 200,0 г су қосылады. Зертханалық гомогендеуішті қажеттілік туындағанда қолданылады. Сыйымдылығы 100 мл өлшеуіш жұмыр шынымен шамамен 20,0 г ересектерге арналған қоспа немесе балалардың тамақтануына арналған 25,0 г қоспа дәл өлшеп алынады.

6.2.1.4 Сулы қоспалардан алынған ұнтақ тәрізді үлгілер

Сұйық қоспалардан алынған біркелкі ұнтақ тәрізді үлгілер үшін сыйымдылығы 100 мл өлшеуіш жұмыр шынымен шамалап 3,0 г ұнтақ дәл өлшеп алынады. 25 мл су қосылып, бар ұнтақ ерігенше араластырылады.

6.2.1.5 Қарапайым құрамдар

Құрамында еркін аминқышқылдары бар және интакт ақуызы жоқ өнімдерге 25 мл сумен сұйылтылған сулы қоспалардан алынған 3,0 г біркелкі ұнтаққа 0,5 г кальций казеинатын немесе майсыздандырылған құрғақ сүтті, немесе 20 г бастап 25 г дейін сұйықтықты немесе құрғақ қоспалардан алынған қалыпқа келтірілген әртекті ұнтақты қосу қажет. Ақуызды еріту үшін жақсылап араластырады. Бірден 30 мл натрий ацетаты буферін (5.12.2.11 қараңыз) және 1%-дық 1 мл калий цианидін қосады. Қажетті мөлшерге дейін су қосылады, сүзіледі, тазартылады және алдын-ала өңделген 900 мг С8 немесе С 18

картриджінде сүзілген ерітінді 60 мл-ге дейін шоғырландырады. Бірқалыпты 10 °С температура сақтайтын тұмшапеште үлгіні қыздырмайды.

6.2.2 Бөліп алу

Үлгінің әрбір сіріндісіне 30 мл натрий ацетаты буферін қосады (4.12.2.11 қараңыз) және араластырады. Әрбір үлгіге жаңадан дайындалған 1%-дық калий цианидтің 1 мл сорғыш шкафта қосады (4.12.2.10 қараңыз) және араластырады. Үлгілерді пеште 105°С температурада 60 минуттан кем емес, бірақ 120 мин. ұзақ емес уақыт бойы қыздырады. Есігі ашық болса, пештегі температура төмендейді. Пеш температурасы 105 °С-ге қайтадан көтерілген кезде уақытты есептеуді бастайды.

Үлгілерді пештен шығарып, бірден мұз (моншада) құрылғыда салқындатады. Қажетті мөлшерге дейін үлгілерді сумен сұйылтады. Жақсылап араластырады. Сыйымдылығы 125 мл конусты жұмыр шыныларда немесе ұқсас шыны ыдыста үлгілерді сүзгіш қағаздан сүзіп өткізеді (5.12 қараңыз). Бітеліп қалғанда сүзгіш қағазды қажеттілік туындағанда ауыстыру қажет. Егер дайындалған үлгілер тұнық болмаса және құрамында өте ұсақ ерімейтін түйірлері болса, үлгілерді центрифугада тазартып, сұйықтық қабатын сүзгіш қағазбен қапталған құйғыларға қарай орнын ауыстыру қажет. Кальций казеинаты қосылған үлгілерді қыздырмайды, 6.2.1.5 қараңыз.

6.2.3 Үлгілерді шоғырландыру

Үлгілерді тазарту және шоғырландыру үшін вакуумдық коллектор клапанына 900 мг SPE картридж (5.17 қараңыз) енгізіледі және әрбір картридждің жоғарғы бөлігіне сыйымдылығы 30 мл бір рет пайдаланатын шприц цилиндрі жалғанады. Картриджерді кем дегенде 20 мл ацетонитрилмен өңдейді (ауырлық күшінің әсерімен элюирлеу) және картридждерді кем дегенде 10 мл сумен жуады. 1-кестедегі басқарушылық қағидаттарды қолдана отырып, үлгілердің сүзілген ерітінділері картриджге градуирленген тамызғыштарды пайдаланып алмастырылып салынады. Егер B_{12} витаминінің концентрациясы белгісіз болса, 1 - 10 мкг/л-ден тұратын тұтынуға дайын өнімдерге арналған басқарушылық қағидаттарды пайдалану қажет. Үлгілерді картридж арқылы үздіксіз ағызу үшін вакуумның жеткілікті мөлшерін қажеттілік туындағанда пайдаланылады. Үлгілердің сүзілген ерітінділері картридж арқылы 120 тамшы/мин артық емес жылдамдықпен өтеді. Элюентті кәдеге жаратады.

1-кесте. SPE картриджге үлгілердің сүзілген ерітінділерін жүктеуге арналған басқарушылық қағидаттар

Тұтынуға дайын өнімдердегі B_{12} витамині мкг/л	SPE картриджге батырылған сүзілген ерітінді мөлшері мл	Сұйылтылған ерітіндінің ақырғы мөлшері мл
< 1	80	5
1 - 10	70 - 80	10
11 - 20	50 - 60	10
21 - 50	20 - 40	10
Ескертпе –Alltech C8 немесе C18 картриджіне 60 мл артық ересектерге арналған қоспаны орналастыруға болмайды.		

Үлгілердің барлық сүзілген ерітінділері картриджден өткеннен кейін картриджді 5 мл сумен жуып, элюентті кәдеге жарату қажет. Элюент құрғағанша вакуум жасап, картриджді ауада кептіреді. Клапандарды жабады.

1-кестедегі басқарушылық қағидаттарды пайдалана отырып, 5 мл немесе сыйымдылығы 10 мл өлшеуіш жұмыр шыныны әр картриждің астына орналастырады. 30 %-дық 4,4 мл ацетонитрил мен су қоспасын (4.12.2.6 қараңыз) барлық 900 мг SPE картриджге қосады. Клапандар ашылады және B_{12} витамині вакуум көмегімен өлшеуіш жұмыр шыныларға элюирленеді. Элюент картриждер арқылы 120 тамшы/мин аспайтын жылдамдықпен өтеді.

Сыйымдылығы 10 мл өлшеуіш жұмыр шыныларға жиналған үлгілерге арналған соңғы сұйылтылған ерітіндіні дайындау кезінде оны қажетті мөлшерге дейін сумен сұйылту қажет.

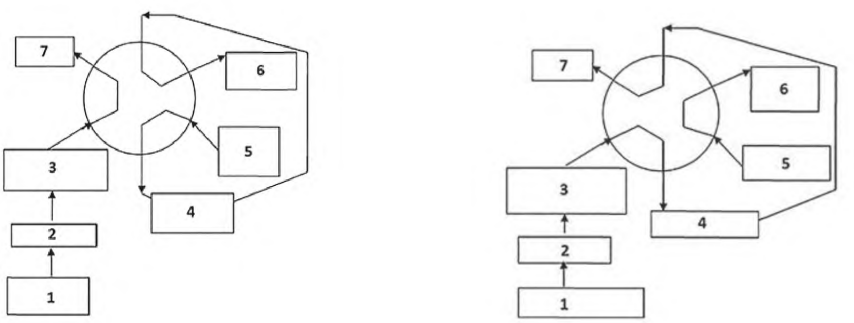
Сыйымдылығы 5 мл өлшеуіш жұмыр шыныларға жиналған үлгілер үшін, әрбір өлшеуіш жұмыр шыныға калий цианидінің жаңадан дайындалған 0,4%-дық 0,1 мл ерітіндісі қалпақшамен қосады. 1,5 сағ кем емес, бірақ 4 сағ артық емес уақытқа 95 °С температурамен істеп жатқан пешке дайындалған үлгілер салынады. Үлгілерді пештен шығарып, бөлме температурасына дейін суытады. Қажетті мөлшерге дейін сумен сұйылтады.

Әрбір стандартты ерітінді мен дайындалған зерттелетін ерітіндіні шприцтік сүзгіш арқылы (5.19 қараңыз) автоматты сынама алғыш түтікшеге айдап сүзіп алады.

6.3 Тиімділігі жоғары сұйықтық хроматография әдісімен талдау

6.3.1 Жүйені орнату және конфигурациясы

Жүйені орнату және конфигурациясы 1-суретте келтірілген.



a) 1-ші конфигурация

b) 2-ші конфигурация

Шартты белгіленулер:

1 – изократикалық сорғы
2 – автоматты сынама алғыш
3 – эксклюзионды бағана
4 – С18 талдамалы бағана
5 – градиенттік сорғы
6 – ультракүлгін және көзге көрінетін диапазондар детекторы
7 – қалдық

1-сурет. HPLC жүйесін орнату және конфигурациясы

6.3.2 Аспаптарды пайдалану шарттары

- жұмыс уақыты: 30-дан 35 мин-ке дейін;
- енгізілетін мөлшер: 0,9 мл бастап 2,0 мл дейін;
- жүйе конфигурациясы, 2-кестені қараңыз.

2-кесте. Жүйе конфигурациясы

Уақыт, мин	Клапан конфигурациясы (1-суретті қараңыз)
0,0 – 10,5	1
10,5 – 14,5	2
14,5 – 30,0 – 35,0	1

– изократикалық сорғы;

– D қозғалмалы фазасы (4.12.2.4);

– B_{12} витамині 10,5 мин және 14,5 мин аралығында эксклюзивті бағанадан элюирлеу үшін ағын жылдамдығын реттеу. Ағынның стандарт жылдамдығы 1,1-ден бастап 1,2 мл/мин дейін жетеді.

Ағынның тиісті жылдамдығын анықтау үшін эксклюзионды бағананы ультракүлгін және көзге көрінетін диапазондар детекторына тікелей жалғайды және жоғары құрамды стандартты енгізеді. B_{12} витамині 10,5 мин және 14,5 мин аралығында элюирлеу үшін ағын жылдамдығы қажеттілік туындағанда реттейді.

– градиенттік сорғы;

– A (4.12.2.1), B (4.12.2.2) және C(4.12.2.3) қозғалмалы фазасы;

– B_{12} витаминін 24 мин бастап 30 мин дейін элюирлеуге арналған градиенттер 3-кестеде келтірілген.

3-кесте. Бағанаға арналған градиент (5.3 қараңыз)

Уақыт, мин	A қозғалмалы фазасының %	B қозғалмалы фазасының %	C қозғалмалы фазасының %
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)] B_{12} витамині мен рибофлавинді бөлу үшін және шамамен 24 және 30 мин аралығында B_{12} витаминін элюирлеу үшін әр бағанада градиент үшін тиісті жағдайлар жасалады. Жаңа бағанада градиент үшін тиісті жағдайлар жасау үшін градиенттің 14,6 минуттегі және 27,0 бастап 30,0 мин дейінгі диапазонындағы құрамын осы кестеде рұқсат етілген диапазонның орташа нүктесіне теңестіру қажет. Бөлінген стандартты ерітінді енгізіледі (см. 4.12.2.12) және B_{12} витамині мен рибофлавин пикі арасындағы ыдырау (R) есептеледі. 14,6 минуттегі және 1,5 асатын R мәніне дейін 27,0 мин бастап 30,0 мин дейінгі диапазондағы қозғалмалы фазаның құрамы реттеледі. C 18-ден немесе фенил бағанадан B_{12} витаминін элюирлегеннен кейін бағананы кем дегенде 2,8 мин 90%-дық қозғалмалы C фазасымен жуу қажет.

– ағын жылдамдығы: 1,0 мл/мин;

– детекторды баптау: детектрлеу толқынының ұзындығы 550 нм және жолақтың ені 10 нм.

Жүйені теңестіргеннен кейін стандартты калибрлеу үлгілері мен үлгілер жиынтығы енгізіледі. Соңғы үлгіні енгізгеннен кейін жүйенің тұрақтылығын растау үшін кем дегенде бір стандартты калибрлеу үлгісіне талдау жасау қажет. Хроматограмма үлгісі А-қосымшасында келтірілген.

7 Есептеу

7.1 Жалпы ережелер

Үлгілердегі B_{12} витаминінің концентрациялары белгілі салмағы бар үлгілердің пиктерінің аудандарын белгілі концентрациясы бар стандартты үлгілер пиктерінің аудандарымен салыстыру жолымен есептеледі.

Әрбір стандартты ерітінді мен хроматограмма үлгісін қарап шығады және B_{12} витамині хроматограммалардағы барлық пиктерден бөлінгеніне көз жеткізеді.

Пиктер ауданы деректер жүйесі көмегімен өлшенеді. B_{12} витамині үлгілерінің шоғырлануын есептеу алдында B_{12} витамині стандартты ерітінділері пиктері аумағын B_{12} витаминімен үлгілер пиктерінің аудандарымен салыстырып, B_{12} витамині үлгісіндегі пиктер аудандары стандартты B_{12} витамині пиктері аудандары диапазондарының шегінде екеніне көз жеткізу қажет.

7.2 Стандартты ерітінділердің шоғырлануын есептеу

(2) формуланы қолданып, B_{12} витаминінің (5.12.3.4 қараңыз) стандартты калибрлеу ерітіндісінің, мкг/л, массалық концентрациясын ρ_{ws} есептеу:

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

мұнда S_w – B_{12} витаминінің өлшенген стандартты ерітіндісінің мөлшері, мг;

P – B_{12} витаминінің стандартты ерітіндісінің тазалық дәрежесі (5.11 қараңыз), стандартты ерітіндінің мг цианокобаламин мкг шаққанда (B_{12} витамині);

A – B_{12} витаминінің қолданыстағы аралық стандартты ерітіндісінің аликвотасы (5.12.3.3 қараңыз), мл (бұл ретте: 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 мл);

200 – сұйылтылған ерітінді мөлшері, мл.

7.3 Градуирлеуге арналған стандартты ерітінділерді дайындау

Үлгілерді жинақтағаннан кейін стандартты ерітінді пиктердің аудандары бар үлгілерді жинақтауды енгізу алдында енгізілетін стандартты үлгінің әрбір концентрациясындағы стандартты ерітінділер пиктері аудандарының орташа мәнін шығару керек. Жұмысшы стандартты ерітінділер пиктері аудандарына байланысты концентрациясы бойынша градуирлеуге арналған стандартты ерітінді сызықтық квадраттар әдісінің (регрессия) көмегімен әзірленеді.

7.4 Талданатын ерітінділердегі B_{12} витаминінің концентрациясын есептеу

Әрбір енгізілетін дайындалған үлгідегі B_{12} витаминінің концентрациясы 8.3-те алынған градуирлеуге арналған B_{12} витамині стандартты ерітіндісінен экстраполяцияланады.

(3) формуланы қолдана отырып, әр өнімдегі B_{12} витаминінің массалық үлесін, w_p, мкг/100г, есептейді:

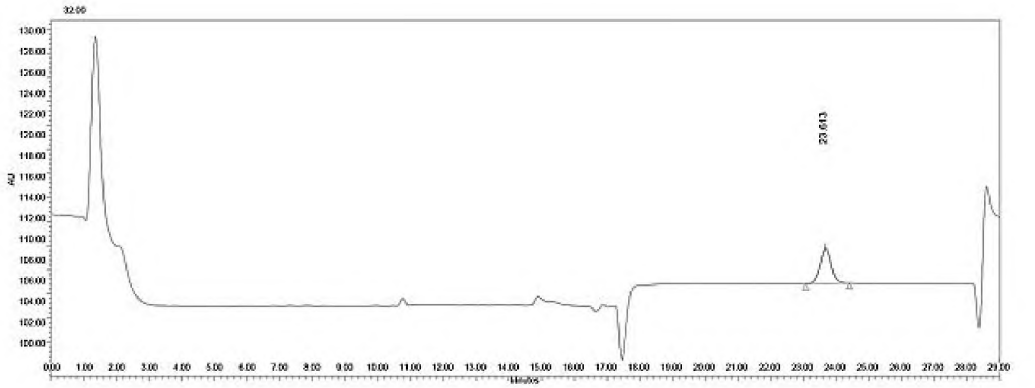
$$w_p = \rho_i \cdot \frac{V_1}{m_s} \cdot \frac{V_2}{V_f} \cdot \frac{m_{pr}}{m_{rp}} \times \frac{1}{10}, \quad (3)$$

мұндағы ρ_i – градуирлеуге арналған стандартты ерітіндіден экстраполяцияланған B_{12} витаминінің енгізілетін дайындалған үлгісі массасының концентрациясы, мкг/л;
V_1 – бірінші сұйылтылған ерітінді мөлшері, мл (бұл ретте: V_1 = 100 мл);
m_s – үлгі массасы, г;
V_2 – екінші (соңғы) сұйылтылған ерітінді мөлшері, мл;
V_f – картриджге орналастырылған сүзілген ерітінді мөлшері, мл;
m_{pr} –ұнтақты қалпына келтіру жалпы массасы, г (қолданған кезде);
m_{rp} –ұнтақ тәрізді үлгінің сұйылтылған массасы, г (қолданған кезде).

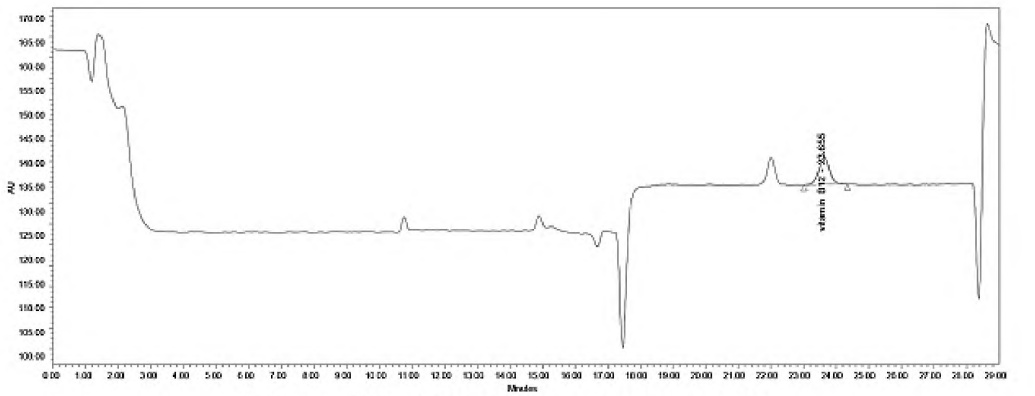
Ескертпе - абсолют салмақтағы сұйық және ұнтақ тәрізді үлгілер үшін m_{pr} және m_{rp} 1-ге тең.

А қосымшасы
(ақпараттық)

Хроматограмма үлгілері



А.1-суреті. Стандартты ерітіндінің типтік хроматограммасы



А.2-суреті. Үлгінің типтік хроматограммасы

В қосымшасы
(ақпараттық)

Деректер дәлдігі

В.1 кестесінде берілген деректер зертхана аралық зерттеулерде алынған және ISO 5725-2 [3] стандартына және талдау әдісінің сипаттамасының дәлдігін бағалау үшін бірлескен зерттеу процедуралары үшін AOAC-IUPAC бірегейленген хаттамасына сәйкес [47] 2015 жылы жарияланды [2]. Зерттеу [5] берілген талаптар негізінде жүргізілді.

Әдісті тексеру туралы толығырақ ақпарат мына сайтта берілген:

gost.e-ecolog.ru

В.1 кестесі. B_{12} витамині үшін деректер дәлдігі

Үлгі	NIST SRM 1849a	1[a)]	2[b)]	3[c)]	4[d)]	5[e)]
Зертханааралық сынақтар жылы	2014	2014	2014	2014	2014	2014
Зертханалар саны	11	9	10	11	10	10
Ережеден ауытқитын зертханалар саны	0	0	0	0	0	0
Күрт ауытқитын мәндерді жойғаннан кейін қалған зертханалар саны	10	9	10	11	9	10
Күрт ауытқитын мәндер (зертхананың) саны	1	0	0	0	1	0
Қабылданған нәтижелер саны	20	18	20	22	18	20
Орташа мәні, $\bar{x}$, мкг/100 г	43,700[1]	0,272	0,300	0,373	0,543	0,250
Қайталанушылықтың орташа квадраттық ауытқуы S_r, мкг/100 г	3,0100[1]	0,0257	0,0270	0,0200	0,0169	0,0244
Қайталанушылық өзгеруінің коэффициенті $C_{V,r}$, %	6,90	9,46	8,99	5,35	3,11	9,77
Қайталанушылық шегі r [$r = 2,8 \times S_r$], мкг/100 г	8,4300[1]	0,0720	0,0756	0,0560	0,0473	0,0683
Жаңғыртушылықтың орташа квадраттық ауытқуы S_R, мкг/100 г	3,8600[1]	0,0427	0,0416	0,0694	0,0603	0,0487
Жаңғыртушылық өзгеруінің коэффициенті $C_{V,R}$, %	8,84	15,70	13,80	18,60	11,10	19,50
Қайталанушылық шегі R [$R = 2,8 \times S_R$], мкг/100 г	10,800[1]	0,120	0,116	0,194	0,169	0,136
Хорвитц коэффициенті мәні, [6] сәйкес	0,34	0,40	0,36	0,50	0,32	0,50

В.1 кестенің жалғасы

Үлгі	6[f]	7[g]	8[h]	9[i]	10[j]	11[k]
Зертханааралық сынақтар жылы	2014	2014	2014	2014	2014	2014
Зертханалар саны	10	10	11	10	9	10
Ережеден ауытқитын зертханалар саны	0	0	0	0	0	0
Күрт ауытқитын мәндерді жойғаннан кейін қалған зертханалар саны	10	9	10	9	8	10
Күрт ауытқитын мәндер (зертхананың) саны	0	1	1	1	1	0
Қабылданған нәтижелер саны	20	14	20	18	16	20
Орташа мәні, $\bar{x}$, мкг/100 г	0,636	1,480	0,428	0,227	0,967	1,080
Қайталанушылықтың орташа квадраттық ауытқуы S_r, мкг/100 г	0,0348	0,1220	0,0208	0,0111	0,0289	0,0730
Қайталанушылық өзгеруінің коэффициенті $C_{V,r}$, %	5,47	8,23	4,85	4,90	2,98	6,74
Қайталанушылық шегі r [$r = 2{,}8 \times S_r$], мкг/100 г	0,0974	0,3420	0,0582	0,0311	0,0809	0,2040
Жаңғыртушылықтың орташа квадраттық ауытқуы S_R, мкг/100 г	0,0587	0,1710	0,0305	0,0202	0,0342	0,1900
Жаңғыртушылық өзгеруінің коэффициенті $C_{V,R}$, %	9,23	11,5	7,13	8,90	3,54	17,5
Қайталанушылық шегі R [$R = 2{,}8 \times S_R$], мкг/100 г	0,1640	0,4790	0,0854	0,0566	0,0958	0,5320
Хорвитц коэффициенті мәні, [6] сәйкес	0,27	0,38	0,20	0,22	0,11	0,55

[a] Сүт негізінде ТД балалар тамақтануына арналған қоспа.
[b] Сүт негізіндегі ересектерге арналған ұнтақ тәрізді қоспа.
[c] Ішінара гидролизденген ұнтақ тәрізді қоспа.
[d] Балалар тағамына арналған қарапайым ұнтақ тәрізді қоспа.
[e] Соя негізіндегі балалар тағамына арналған ішінара гидролизденген ұнтақ тәрізді қоспа.
[f] Майдың аз мөлшері бар ересектерге арналған ұнтақ тәрізді қоспа.
[g] Майдың жоғары мөлшері бар ТД ересектерге арналған қоспа (өнімі бар құтыларды дұрыс таңбаламаудан төрт зертханаға арналған жекелеген нәтижелер).
[h] Соя негізіндегі балалар тағамына арналған ұнтақ тәрізді қоспа.
[i] Сүт негізіндегі балалар тағамына арналған ұнтақ тәрізді қоспа.
[j] Балалар тағамына арналған ұнтақ тәрізді қоспа.
[k] Белоктың жоғары мөлшері бар ТД ересектерге арналған қоспа.
[l] нәтижелер мкг/кг-мен берілген.
ТД – тұтынуға дайын.

С қосымшасы
(ақпараттық)

SPE картриджді білікті сынау әдістемесінің үлгісі

SPE картридждің баламалығын анықтау немесе жаңа картридждер топтамаларының жарамдылығын тексеру үшін мынадай біліктілікті сынау әдістемесін қолданады.

Құрамында суда B_{12} витаминінің 160 мкг/л бар ерітіндіні дайындау.

5.2.1 және 5.2.2 сипатталған экстракциялау рәсімін пайдалана отырып осы әдістің көмегімен талданатын кез келген өнімнің ең көп мөлшердегі ақуызынан тұратын бір типтік өнімнен үш үлгі алынып дайындалады.

Сүзілген ерітінділерден алынған барлық үлгілер араластырылады. Үлгінің сүзілген ерітіндісінің (ішкі стандарты бар үлгі) 80 мл немесе 100 мл сулы ерітіндіге B_{12} витаминінің 1 мл 160 мкг/л қосылады және үлгінің сүзілген ерітіндісінің (ішкі стандарты жоқ үлгі) 80 мл немесе 100 мл-не 1 мл су қосылады.

Үлгі концентрациясын және үлгіні дайындау рәсімінде сипатталған соңғы араластыру рәсімдерін пайдалана отырып, ішкі стандарты бар және ішкі стандарты жоқ үлгілерді дайындау жалғастырылады (5.2.3 қараңыз).

Хроматографиялық тәсілмен екі үлгіге талдау жасау. Ішкі стандарты бар және ішкі стандарты жоқ үлгілердегі B_{12} витаминінің шоғырлануын есептеу, және алыну дәрежесін есептеу.

Картридждердің жарамдылығы үшін алыну дәрежесі 90 % кем емес.

Библиография

[1] Codex Standard 72-1981 Standard for Infant Formula and Formulas for Special Medical Purposes Intended for Infants (72-1981 кодексінің стандарты. Балаларға арналған арнайы медициналық мақсатты балалар және сүт қоспасы).

[2] 2011.10, Determination of Vitamin B12 in Infant, Adult, and Pediatric Formulas by HPLC-UV and Column Switching: Collaborative Study (2011.10, Балалар тағамына және ересектерге арналған қоспасындағы пантотен қышқылы (B5 витамині). Тиімділігі жоғары сұйықтық хроматография және тандемді масс-спектрометрия әдісі: бірлескен зерттеу).

[3] 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 (Өлшеу әдістері мен нәтижелерінің дәлдігі (дұрыстығы мен прецизиондығы). 2-бөлім. Өлшеудің стандартты әдісінің қайталанушылығы мен жаңғыртушылығын анықтаудың негізгі әдісі).

[4] 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. (AOAC INTERNATIONAL. AOAC ресми әдістерінің бағдарламасы, Әзірлеу, зерделеу, қарау және бекіту процесі бойынша қауымдасқан соттар нұсқалығы. IV бөлім, Бірлескен зерттеулерге арналған нұсқаулық AOAC, 1995 ж., 23-51-бет).

[5] AOAC SMPR 2011.005, Standard Method Performance Requirements for Vitamin B_{12} in infant formula and Adult/Pediatric Nutritional formula (AOAC SMPR 2011.005, Балалар тағамына және ересектерге арналған қоспадағы B12 витаминіне арналған стандартты әдістердің сипаттамасына қойылатын талаптар).

[6] 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 (М. ТОМПСОН. Бағалау сынақтарында арналу критерийі үшін жарамдылыққа қатысты миллиард және миллиардтан кем бөліктер шоғырлануы кезінде зертханааралық прецизиондықтағы соңғы даму қарқыны. Аналитик (Лонд.). 2000 ж., 125 бет. 385-386).

[7] ГОСТ 25336-82 Ыдыс және зертханалық шыны жабдығы. Типтері, негізгі параметрлер мен өлшемдер

ӘОЖ 637.1:543.544.5:006:354 **МСЖ 67.050**

Түйінді сөздер: балалар тамақтануына арналған қоспалар, ересектерге арналған қоспалар, B_{12} витамині, сұйықтық хроматографии, RP-HPLC

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Смеси для детского питания и взрослых

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ВИТАМИНА B_{12} С ПОМОЩЬЮ ОБРАЩЕННО-ФАЗОВОЙ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ (RP-HPLC)

СТ РК ISO 20634–2016

(ISO 20634:2015 Infant formula and adult nutritionals – Determination of vitamin B_{12} by reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC), IDT)

Издание официальное

**Комитет технического регулирования и метрологии
Министерства по инвестициям и развитию Республики Казахстан
(Госстандарт)**

Астана

Предисловие

1 ПОДГОТОВЛЕН И ВНЕСЕН Товариществом с ограниченной ответственностью «Kazakhstan Business Solution» (Технический комитет по стандартизации ТК 91 «Химия»)

2 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Председателя Комитета технического регулирования и метрологии Министерства по инвестициям и развитию Республики Казахстан от № 296-од от 23 ноября 2016 года

3 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 20634:2015 *Infant formula and adult nutritionals – Determination of vitamin B_{12} by reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC)* (Смеси для детского питания и взрослых. определение содержания витамина B_{12} с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (RP-HPLC))

Международный стандарт разработан Техническим комитетом ISO/TC 34 «Пищевые продукты совместно с ассоциацией AOAC INTERNATIONAL

Перевод с английского языка (en).

Официальный экземпляр международного стандарта, на основе которого подготовлен настоящий национальный стандарт и на которые даны ссылки, имеется в Едином государственном фонде нормативных технических документов

Официальной версией является текст на государственном и русском языке

Степень соответствия – идентичная (IDT).

4 В настоящем стандарте реализованы нормы законов Республики Казахстан «О техническом регулировании» от 9 ноября 2004 года № 603-II, «О языках в Республике Казахстан» от 11 июля 1997 года № 151-I

5 СРОК ПЕРВОЙ ПРОВЕРКИ 2023 год
ПЕРИОДИЧНОСТЬ ПРОВЕРКИ 5 лет

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном указателе «Нормативные документы по стандартизации», а текст изменений и поправок – в ежемесячно издаваемых информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты»

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован или распространен в качестве официального издания без разрешения Комитета технического регулирования и метрологии Министерства по инвестициям и развитию Республики Казахстан

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Смеси для детского питания и взрослых

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ВИТАМИНА B_{12} С ПОМОЩЬЮ ОБРАЩЕННО-ФАЗОВОЙ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ (RP-HPLC)

Дата введения 2018-01-01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод количественного определения содержания витамина B_{12} в смесях для детского питания и взрослых (порошки, готовые к употреблению жидкости и жидкие концентраты) с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии.

2 Термины и определения

В настоящем стандарте применяются следующие термины с соответствующими определениями:

2.1 Витамин B_{12} (vitamin B_{12}): Цианокобаламин и кобальтсодержащие корриноиды с биологической активностью витамина B_{12}, такие как аквокобаламин, гидроксикобаламин, метилкобаламин и аденозилкобаламин, преобразуемые в цианокобаламин.

2.2 Смесь для взрослых (adult nutritional): Сбалансированные по питательным веществам, специально разработанные продукты питания, потребляемые в жидкой форме, которые могут представлять собой единственный источник питания, изготовленный из сочетания молока, сои, риса, молочной сыворотки, гидролизованного белка, крахмала и аминокислот, с добавлением и без добавления немодифицированного белка.

2.3 Адаптированные или частично адаптированные начальные или последующие молочные смеси (infant formula): Искусственный заменитель грудного молока, специально изготовленный для удовлетворения потребности младенцев в питании в течение первых месяцев жизни до использования соответствующего прикорма (согласно Стандарт Кодекса 72-1981 [1]).

3 Сущность метода

Цианокобаламин и кобальтсодержащие корриноиды извлекаются из образца с использованием буфера ацетата натрия (pH 4,5), а последний преобразуется в цианокобаламин с использованием цианида калия при температуре 105 °С. Экстракты очищают и концентрируют с помощью С8 или С18 картриджей для твердофазной экстракции (SPE) и разделяют с помощью вытеснительной хроматографии SEC, т.е. хроматографией на молекулярных ситах, и обращенно-фазовой хроматографии. Содержание витамина B_{12} определяется с помощью жидкостной хроматографии с видимым улавливанием при 550 нм.

Издание официальное

4 Реагенты и вещества

Во время исследования, если не указано иное, используют реагенты известной аналитической степени чистоты и дистиллированную или деминерализованную воду, или воду эквивалентной степени чистоты.

4.1 Ледяная уксусная кислота.

4.2 Ацетонитрил, степень HPLC.

4.3 Драйерит, десиккант, безводный сульфат кальция, 8 меш.

4.4 Денатурированный этанол.

4.5 Муравьиная кислота, 88 %.

4.6 Цианид калия, 97 %.

4.7 Рибофлавин, со степенью чистоты от 98 % до 102 %.

4.8 Безводный ацетат натрия или тригидрат ацетата натрия, ОСЧ.

4.9 Такадиастаза, производства Accurate Chemical Co.1 или эквивалентный продукт.

4.10 Триэтиламин, степень HPLC.

4.11 Первичный стандартный образец витамина B_{12} (цианокобаламин), например Стандартный образец Американской фармакопеи 1152009 (приблизительно 10 мкг/мг), Официальная партия[1)]). Хранить в эксикаторе, защищенном от дневного света.

4.12 Подготовка растворов и стандартных растворов

4.12.1 Общие положения

Для удобства все растворы увеличить или уменьшить при условии соблюдения правил лабораторной практики. Растворы могут храниться в охлажденном виде или при температуре окружающей среды в герметических контейнерах, наполненных инертными веществами, если не указано иное.

4.12.2 Подготовка растворов

4.12.2.1 Подвижная фаза A в HPLC. Развести 4,0 мл триэтиламина с 1000 мл воды. Довести уровень pH с 5 до 7 с помощью приблизительно 1,25 мл концентрированной муравьиной кислоты (4,5). Срок годности: 1 неделя.

4.12.2.2 Подвижная фаза B в HPLC. Смешать 4,0 мл триэтиламина и 250 мл ацетонитрила с 750 мл воды. Довести уровень pH с 5 до 7 с помощью приблизительно 1,25 мл концентрированной муравьиной кислоты. Срок годности: 1 неделя в плотно закрытом контейнере.

4.12.2.3 Подвижная фаза C в HPLC. Смешать 4,0 мл триэтиламина и 750 мл ацетонитрила с 250 мл воды. Довести уровень pH с 5 до 7 с помощью приблизительно 1,25 мл концентрированной муравьиной кислоты. Срок годности: 1 неделя в плотно закрытом контейнере.

4.12.2.4 Подвижная фаза D в HPLC. Развести 50 мл ацетонитрила водой до 2000 мл. Срок годности: 1 неделя в плотно закрытом контейнере.

4.12.2.5 Смесь ацетонитрила и воды, объемная доля 10 %. Развести 150 мл ацетонитрила водой до 1500 мл. Срок годности: 1 месяц в плотно закрытом контейнере.

4.12.2.6 Смесь ацетонитрила и воды, растворитель для элюирования SPE, объемная доля 30 %. Развести 30 мл ацетонитрила водой до 100 мл. Срок годности: 1 месяц в плотно закрытом контейнере.

4.12.2.7 Смесь ацетонитрила и воды, раствор для очистки и хранения колонки, объемная доля 50 %. Развести 500 мл ацетонитрила водой до 1000 мл в мерной колбе.

[1)] Пример подходящего продукта, имеющегося в продаже. Данная информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением того, что данный продукт одобрен ISO. Эквивалентные продукты могут использоваться, если продемонстрировано, что они приводят к тем же результатам.

Срок годности: 6 месяцев.

4.12.2.8 Смесь этанола и воды, объемная доля 25 %. Развести 50 мл этанола водой до 200 мл. Срок годности: 1 год в плотно закрытом контейнере.

4.12.2.9 Раствор цианида калия, массовая концентрация ρ = 4 г/л. Растворить 0,02 г цианида калия в буфере ацетата натрия и разбавить буфером ацетата натрия до 5 мл (см. 4.12.2.11) концентрация вещества c = 0,25 моль/л). Раствор необходимо приготовить непосредственно перед использованием.

4.12.2.10 Раствор цианида калия, ρ = 10 г/л. Растворить 0,25 г цианида калия в воде и разбавить водой до 25 мл. Раствор необходимо приготовить непосредственно перед использованием.

4.12.2.11 Буфер ацетата натрия, c = 0,25 моль/л. Растворить 41,0 г безводного ацетата натрия или 68,0 г тригидрата ацетата натрия в 1800 мл воды. Довести уровень pH до 4,5 с помощью концентрированной уксусной кислоты (приблизительно 40 мл). Разбавить водой до 2000 мл. Срок годности: 3 месяца.

4.12.2.12 Разделительный стандартный раствор. Взвесить приблизительно 0,005 г рибофлавина на бумаге для взвешивания. Переложить его в мерную колбу вместимостью 100 мл и довести до нужного объема 10 %-ным ацетонитрилом. Перемешать раствор для растворения компонентов. Смешать равное количество раствора со стандартным рабочим раствором витамина B_{12} высокой концентрации. Срок годности: 1 неделя.

4.12.2.13 Раствор такадиастаза, ρ = 60 г/л. Растворить 0,6 г такадиастаза в 10 мл воды. Раствор необходимо готовить ежедневно перед использованием.

4.12.3 Подготовка стандартных растворов

4.12.3.1 Общие положения. Приготовить все стандартные растворы под действием экранированных УФ ламп дневного света и хранить при температуре от 2 °C до 8 °C в плотно закрытых мерных колбах.

4.12.3.2 Исходный стандартный раствор витамина B_{12}, ρ = 10 000 мкг/л. Тщательно взвесить соответствующее количество стандартного раствора витамина B_{12} (см. 4.11) для получения маточного стандартного раствора концентрацией 10 000 мкг/л. Растворить в 25 %-ном этаноле и разбавить 25 %-ным этанолом до 100 мл (см. 4.12.2.8). Срок годности: 6 месяцев.

Подсчитать количество взвешиваемого стандартного раствора витамина B_{12}, m_w, в миллиграммах, используя формулу

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

где 10 000 – необходимая концентрация исходного стандартного раствора, мкг/л;

0,1 – объем разбавленного раствора, л;

P – степень чистоты стандартного раствора витамина B_{12} (см. 4.11) в мкг цианокобаламина на мг стандартного раствора.

4.12.3.3 Промежуточный стандартный раствор витамина B_{12}, ρ = 1000 мкг/л. Развести 10 мл исходного стандартного раствора (см. 4.12.3.2) водой до 100 мл. Срок годности: 1 неделя.

4.12.3.4 Калибровочный стандартный раствор витамина B_{12}, ρ равен от 2,5 до 25,0 мкг/л. В отдельных мерных колбах развести 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 и 5,0 мл промежуточного стандартного раствора (см. 4.12.3.3) 10 %-ным ацетонитрилом (см. 4.12.2.5) до 200 мл. Срок годности: 1 месяц.

5 Оборудование

Стандартная лабораторная стеклянная посуда и оборудование, а именно, следующее.

5.1 Система HPLC, состоящая из градиентного насоса, клапана-переключателя колонок и изократического насоса, детектора ультрафиолетового и видимого диапазонов, оснащенного вольфрамовой лампой, способной осуществлять мониторинг при 550 нм и автоматическим пробозабором, способным впрыскивать от 900 до 2 000 мкг образца.

5.2 Колонка HPLC, аналитическая эксклюзионная колонка:

– размер частиц 4 мкм, (250,0 × 9,4) мм (например, Zorbax GF-2502 P/N 884973-901);

– 5 мкм, (300 × 8) мм (например, Shodex Protein® KW-802.52, P/N F6989000) или эквивалент.

5.3 Колонка HPLC, аналитическая колонка C18:

– размер частиц 3 мкм, (100,0 × 4,6) мм (например, Thermo Scientific Aquasil™2 P/N 77503-104630) с уменьшенными защитными картриджами C18 3 мкм, 10 мм × 4,6 мм (например, Thermo Scientific Aquasil™2 P/N 77503-014001);

– 3 мкм, 120 A, (100,0 × 4,6) мм (например, Epic Phenyl Hexyl_ (ES Industries 125191-EPHX)[1)] с соответствующим защитным картриджем, или эквивалентная колонка для обращенно-фазовой хроматографии, совместимая со 100% -ной водосодержащей подвижной фазой).

5.4 Печь, способная поддерживать температуру (95 ± 5) °C и (105 ± 5) °C.

5.5 Прибор для измерения pH, с буфером калибровки.

5.6 Аналитические весы, с точностью до ближайших 0,00001 г.

5.7 Мензурки, стеклянные, различных размеров.

5.8 Дозирующая насадка, с дозировкой 30 мл или эквивалент.

5.9 Цилиндры, градуированные, стеклянные, различных размеров.

5.10 Эксикатор по [7].

5.11 Конические колбы, вместимостью 125 мл или эквивалентная стеклянная посуда.

5.12 Фильтровальная бумага, ватманская бумага 2V[2)] или эквивалент.

5.13 Воронки, пластмассовые, подходящие для использования с фильтровальной бумагой.

5.14 Перчатки, одноразовые.

5.15 Пипеточный дозатор, переменного объема, от 100 до 1 000 мкл.

5.16 Лабораторные световые заслонки, желтые или прозрачные заслонки с границей пропускания не менее 385 нм.

6.17 Картриджи для твердофазной экстракции (SPE), C8, 900 мг (например, Alltech/Grace Davidson P/N 20966[1)]), C18, 900 мг (например, Alltech/Grace Davidson P/N 20942[1)]), или эквивалент. Пример методики квалификационных испытаний SPE картриджа приведен в приложении C.

5.18 Шприцы, одноразовые, различных размеров.

5.19 Шприцевые фильтры, 0,45 мкм, полиамидные.

5.20 Вакуумный коллектор, 24 канала с клапанами или эквивалент.

5.21 Градуированные пипетки, различных размеров.

5.22 Мерные колбы, различных размеров.

[1)] Пример подходящего продукта, имеющегося в продаже. Данная информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением того, что данный продукт одобрен ISO или IDF. Эквивалентные продукты могут использоваться, если продемонстрировано, что они приводят к тем же результатам.

Примечание – Автоматический пробоотборник с размером шприца от 1 до 500 мкл. Возможно использование одновременное использование двух шприцев 250 и 500 мкл с дополнительным устройством для транспортировки шприца (например, Аджилент 7693А).

6 Проведение испытаний

6.1 Общие положения

Приготовить все образцы под действием экранированных УФ ламп дневного света. Подготовленные образцы продукции испытывают в течение 14 дней после приготовления при условии хранения при температуре от 2 °С до 8 °С в плотно закрытых мерных колбах. Все образцы продукции одинаковые и репрезентативные, что достигается путем тщательного перемешивания продуктов до отбора образцов.

6.2 Подготовка образцов

6.2.1 Общие положения

Для продуктов, содержащих крахмал, добавить 1 мл раствора такадиастаза (см. 4.12.2.13). Обеспечить вступление такадиастаза в реакцию с образцами в течение не менее 30 мин, прежде чем приступить к извлечению.

6.2.1.1 Жидкие образцы

Для готовых к употреблению жидкостей хорошо смешать образцы для обеспечения однородности и точно взвесить приблизительно 20,0 г смеси для взрослых или 25,0 г адаптированных или частично адаптированных начальных или последующих молочных смесей в мерной колбе вместимостью 100 мл. Приступить к извлечению.

6.2.1.2 Порошкообразные образцы

Если однородность порошкообразного образца неизвестна, предполагается, что образец не является однородным и придерживаются тех же действий, указанных для порошкообразных образцов из сухих смесей/неоднородных порошкообразных образцов (см. 6.2.1.3).

6.2.1.3 Порошкообразные образцы из сухих смесей

Для порошкообразных образцов из сухих смесей/неоднородных порошкообразных образцов точно взвесить приблизительно 25,0 г. Добавить 200,0 г воды при температуре 40 °С перед смешиванием до получения однородной суспензии. При необходимости используют лабораторный гомогенизатор. Точно взвесить приблизительно 20,0 г смеси для взрослых или 25,0 г адаптированных или частично адаптированных начальных или последующих молочных смесей в мерной колбе вместимостью 100 мл.

6.2.1.4 Порошкообразные образцы из водных смесей

Для однородных порошкообразных образцов из жидких смесей необходимо точно взвесить приблизительно 3,0 г порошка в мерной колбе вместимостью 100 мл. Добавить 25 мл воды и перемешивать до тех пор, пока не растворится весь порошок.

6.2.1.5 Элементарные составы

Для продуктов, содержащих свободные аминокислоты и не содержащих интактный белок, необходимо добавить 0,5 г казеината кальция или обезжиренного сухого молока к 3,0 г однородного порошка из водных смесей, разбавленного 25 мл воды, или от 20 г до 25 г жидкости или неоднородного восстановленного порошка из сухих смесей. Хорошо перемешать для растворения белка. Сразу же добавить 30 мл буфера ацетата натрия (см. 4.12.2.11) и 1 мл 1 %-ного цианида калия. Разбавить до нужного объема водой, отфильтровать, очистить и сконцентрировать до 60 мл отфильтрованного раствора на

предварительно обработанном 900 мг картридже С8 или С18. Не нагревать образец в духовке, поддерживающей температуру в 10 °С.

6.2.2 Извлечение

Добавить 30 мл буфера ацетата натрия (см. 4.12.2.11) к каждому экстракту образца и перемешать. В вытяжном шкафу добавить 1 мл свежеприготовленного 1%-ного цианида калия (см. 4.12.2.10) к каждому образцу и перемешать. Нагреть образцы в печи при температуре 105 °С в течение не менее 60 мин, но не более 120 мин. При открытой двери температура в печи будет уменьшаться. Отсчет времени начинает, когда температура в печи снова достигнет 105 °С.

Извлечь образцы из печи и сразу же охладить в ледяной бане. Разбавить образцы водой до нужного объема. Хорошо перемешать. Отфильтровать образцы через фильтровальную бумагу (см. 5.12) в конических колбах вместимостью 125 мл или в аналогичной стеклянной посуде. При необходимости заменить фильтровальную бумагу при засорении. Если приготовленные образцы непрозрачны и содержат очень мелкие нерастворимые частицы, необходимо очистить на центрифуге образцы и переместить слой жидкости к воронкам, футерованным фильтровальной бумагой. Не нагревать образцы, к которым был добавлен казеинат кальция, см. 6.2.1.5.

6.2.3 Концентрация образцов

Для очистки и концентрирования образца вставить 900 мг SPE картридж (см. 5.17) в клапан вакуумного коллектора и подсоединить цилиндр одноразового шприца вместимостью 30 мл к верхней части каждого картриджа. Обработать картриджи не менее 20 мл ацетонитрила (элюировать под действием силы тяжести) и промыть картриджи не менее 10 мл воды. Используя градуированные пипетки, переместить отфильтрованные растворы образцов в картриджи, пользуясь руководящими принципами из таблицы 1. Если концентрация витамина B_{12} неизвестна, необходимо пользоваться руководящими принципами для готовых к употреблению продуктов, содержащих от 1 до 10 мкг/л. При необходимости применить достаточное количество вакуума, чтобы образцы непрерывно стекали через картриджи. Отфильтрованные растворы образцов проходят через картриджи со скоростью не более 120 капель/мин. Утилизировать элюент.

Таблица 1 – Руководящие принципы для загрузки отфильтрованных растворов образцов в SPE картриджи

Витамин B_{12} в готовых к употреблению продуктах мкг/л	Объем отфильтрованного раствора, погруженного в SPE картридж мл	Конечный объем разбавленного раствора мл
< 1	80	5
1–10	70–80	10
11–20	50–60	10
21–50	20–40	10
Примечание – Не помещать более 60 мл смеси для взрослых в картридж С8 или С18 Alltech.		

После того, как все отфильтрованные растворы образцов прошли через картридж, необходимо промыть картриджи 5 мл воды и утилизировать элюент. Высушить на воздухе картриджи, создавая вакуум до исчезновения элюента. Закрыть клапаны.

Используя руководящие принципы из таблицы 1, поместить 5 мл или мерную колбу вместимостью 10 мл под каждый картридж. Добавить 4,4 мл 30 %-ной смеси ацетонитрила и воды (см. 4.12.2.6) ко всем 900 мг SPE картриджам. Открыть клапаны и элюировать витамин B_{12} в мерные колбы с помощью вакуума. Элюент проходит через картриджи со скоростью не более 120 капель/мин.

При подготовке окончательного разбавленного раствора для образцов, собранных в мерные колбы вместимостью 10 мл, необходимо разбавить водой до нужного объема.

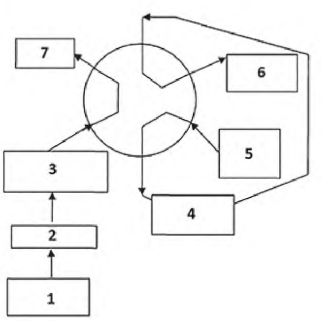
Для образцов, собранных в мерные колбы вместимостью 5 мл, в колпачке добавить 0,1 мл свежеприготовленного 0,4 %-ного раствора цианида калия (см. 4.12.2.9) в каждую мерную колбу. Поместить подготовленные образцы в печь, работающую при температуре 95 °С не менее чем на 1,5 ч, но не более чем на 4 ч. Вынуть образцы из печи и охладить до комнатной температуры. Разбавить водой до нужного объема.

Отфильтровать аликвоту каждого стандартного раствора и приготовленного исследуемого раствора через шприцевой фильтр (см. 5.19) в трубку автоматического пробоотборника.

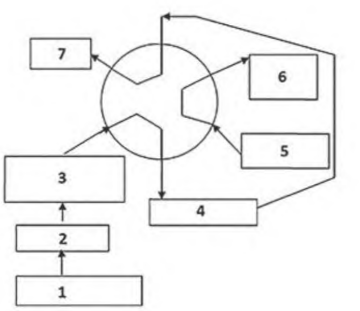
6.3 Анализ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

6.3.1 Установка и конфигурация системы

Установка и конфигурация системы приведены на рисунке 1.



a) Конфигурация 1



b) Конфигурация 2

Условные обозначения:

1 – изократический насос
2 – автоматический пробоотборник
3 – эксклюзионная колонка
4 – аналитическая колонка С18
5 – градиентный насос
6 – детектор ультрафиолетового и видимого диапазонов
7 – остаток

Рисунок 1 — Установка и конфигурация системы HPLC

6.3.2 Условия эксплуатации приборов

- время работы: от 30 до 35 мин;
- вводимый объем: от 0,9 до 2,0 мл;
- конфигурация системы, см. таблицу 2;

Таблица 2 – Конфигурация системы

Время, мин	Конфигурация клапана (см. рисунок 1)
0,0–10,5	1
10,5–14,5	2
14,5–30,0–35,0	1

– изократический насос;
– подвижная фаза D (4.12.2.4);
– отрегулировать скорость потока, чтобы витамин B_{12} элюировал из эксклюзионной колонки между 10,5 мин и 14,5 мин. Стандартные скорости потока достигают от 1,1 до 1,2 мл/мин.

Для определения соответствующей скорости потока, подсоединяют эксклюзионную колонку непосредственно к детектору ультрафиолетового и видимого диапазонов и вводят стандартный раствор с высоким содержанием. Регулируют скорость потока по мере необходимости, чтобы витамин B_{12} элюировал между 10,5 мин и 14,5 мин.

– градиентный насос;
– подвижная фаза A (4.12.2.1), B (4.12.2.2) и C (4.12.2.3);
– градиенты для элюирования витамина B_{12} от 24 до 30 мин приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Градиент для колонки (см. 5.3)

Время, мин	% подвижной фазы A	% подвижной фазы B	% 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)] Создаются соответствующие условия для градиента в каждой колонке для разделения витамина B_{12} и рибофлавина и элюирования витамина B_{12} примерно между 24 и 30 мин. Для создания соответствующих условий для градиента в новой колонке необходимо приравнять состав градиента на 14,6 мин и с 27,0 мин до 30,0 мин к средней точке допустимого диапазона из этой таблицы. Ввести разделенный стандартный раствор (см. 4.12.2.12) и вычислить разложение (R) между витамином B_{12} и пиком рибофлавина. Отрегулировать состав подвижной фазы при 14,6 мин и в диапазоне от 27,0 до 30,0 мин до значения R более 1,5. После элюирования витамина B_{12} из C18 или фениловой колонки необходимо промыть колонку 90 %-ной подвижной фазой C не менее 2,8 мин.

– скорость потока: 1,0 мл/мин;
– настройки детектора: длина волны детектирования 550 нм и ширина полосы 10 нм.

После уравновешивания системы ввести калибровочные стандартные образцы и набор образцов. После введения последнего образца необходимо проанализировать не менее одного калибровочного стандартного образца для подтверждения стабильности системы.

Пример хроматограммы приведен в приложении А.

7 Вычисления

7.1 Общие положения

Концентрации витамина B_{12} в образцах рассчитываются путем сравнения площадей пиков образцов с известным весом с площадями пиков стандартных образцов с известной концентрацией.

Осматривают каждый стандартный раствор и образец хроматограммы и убедиться, что витамин B_{12} отделен от всех пиков в хроматограммах.

Площади пиков измеряются с помощью системы данных. Перед вычислением концентрации образцов витамина B_{12}, необходимо сравнить площади пиков стандартных растворов витамина B_{12} с витамином B_{12} площадями пиков образцов и убедиться, что площади пиков образца витамина B_{12} находятся в пределах диапазона площадей пиков стандартного витамина B_{12}.

7.2 Вычисление концентрации стандартных растворов

Вычислить массовую концентрацию, p_{ws}, в микрограммах на литр, калибровочного стандартного раствора витамина B_{12} (см. 4.12.3.4), используя формулу (2):

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

где S_w – количество взвешенного стандартного раствора витамина B_{12}, мг;

P – степень чистоты стандартного раствора витамина B_{12} (см. 4.11), в мкг цианокобаламина (витамин B_{12}) на мг стандартного раствора;

A – аликвота используемого промежуточного стандартного раствора витамина B_{12} (см. 4.12.3.3), мл (в данном случае: 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 мл);

200 – объем разбавленного раствора, мл.

7.3 Приготовление стандартных растворов для градуировки

В каждой концентрации стандартного образца необходимо вывести среднее значение площадей пиков стандартных растворов, вводимых перед вводом набора образцов с площадями пиков стандартных растворов после набора образцов. Приготовить стандартный раствор для градуировки с помощью метода линейных наименьших квадратов (регрессии) по концентрации в зависимости от площадей пиков рабочих стандартных растворов.

7.4 Вычисление концентрации витамина B_{12} в анализируемых растворах

Концентрация витамина B_{12} в каждом вводимом приготовленном образце экстраполируется из стандартного раствора витамина B_{12} для градуировки, полученного в 7.3.

Вычислить массовую долю, w_p, витамина B_{12} в каждом продукте, в мкг/100 г, используя формулу (3):

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

где ρ_i – концентрация массы вводимого приготовленного образца витамина B_{12}, экстраполированного из стандартного раствора для градуировки, мкг/л;
V_1 – объем первого разбавленного раствора, мл (в данном случае: V_1 = 100 мл);
m_s – масса образца, г;
V_2 – объем второго (конечного) разбавленного раствора, мл;
V_f – объем отфильтрованного раствора, помещенного в картридж, мл;
m_{pr} – общая масса восстановления порошка, г (при применимости);
m_{rp} – масса разбавленного порошкообразного образца, г (при применимости).

Примечание – m_{pr} и m_{rp} равны 1 для жидких и порошкообразных образцов абсолютного веса.

Приложение А
(информационное)

Примеры хроматограмм

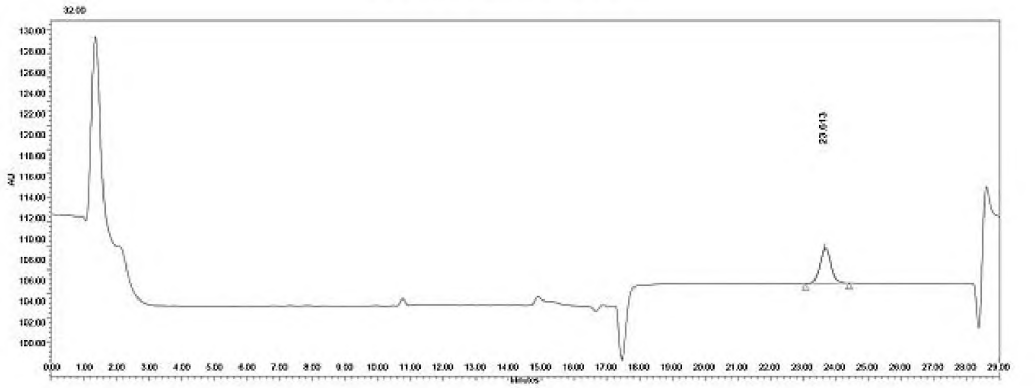


Рисунок А.1 – Типичная хроматограмма стандартного раствора

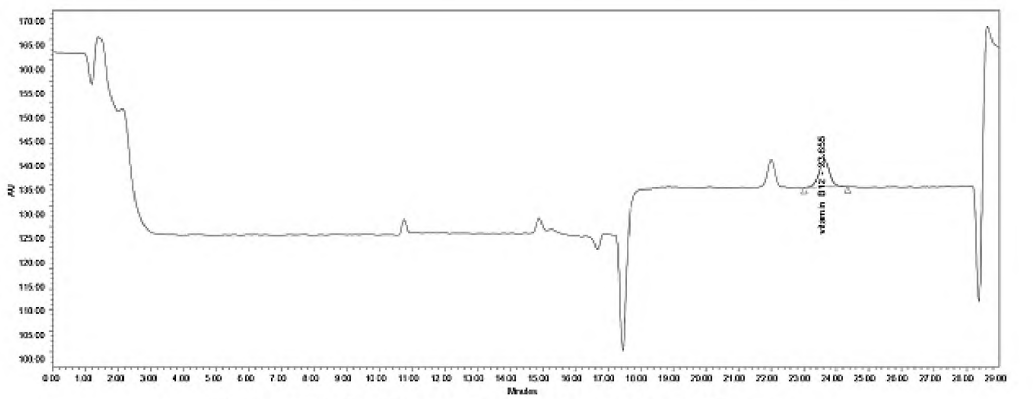


Рисунок А.2 – Типичная хроматограмма образца

Приложение В
(информационное)

Точность данных

Данные, приведенные в таблице В.1, были получены в ходе межлабораторных исследований и опубликованы в 2015 году [2] в соответствии со стандартом ISO 5725-2 [3] и Унифицированным протоколом AOAC-IUPAC для процедур совместного исследования с целью оценки точности характеристик метода анализа [4]. Исследование проводилось на основе требований, приведенных в Источнике [5].

Более подробная информация о проверке метода размещена на сайте:

gost.e-ecolog.ru

Таблица В.1 – Точность данных для витамина B_{12}

Образец	NIST SRM 1849a	1[a)]	2[b)]	3[c)]	4[d)]	5[e)]
Год межлабораторных испытаний	2014	2014	2014	2014	2014	2014
Количество лабораторий	11	9	10	11	10	10
Количество отклоняющихся от правил лабораторий	0	0	0	0	0	0
Количество лабораторий, оставшихся после выбросов	10	9	10	11	9	10
Количество резко отклоняющихся значений (лабораторий)	1	0	0	0	1	0
Количество принятых результатов	20	18	20	22	18	20
Среднее значение, $\bar{x}$, мкг/100 г	43,700[1]	0,272	0,300	0,373	0,543	0,250
Среднеквадратическое отклонение повторяемости S_r, мкг/100 г	3,0100[1]	0,0257	0,0270	0,0200	0,0169	0,0244
Коэффициент вариации повторяемости $C_{V,r}$, %	6,90	9,46	8,99	5,35	3,11	9,77
Предел повторяемости r [$r = 2,8 \times S_r$], мкг/100 г	8,4300[1]	0,0720	0,0756	0,0560	0,0473	0,0683
Среднеквадратическое отклонение воспроизводимости S_R, мкг/100 г	3,8600[1]	0,0427	0,0416	0,0694	0,0603	0,0487
Коэффициент вариации воспроизводимости $C_{V,R}$, %	8,84	15,70	13,80	18,60	11,10	19,50
Предел повторяемости R [$R = 2,8 \times S_R$], мкг/100 г	10,800[1]	0,120	0,116	0,194	0,169	0,136
Значение коэффициента Хорвитца, согласно [6]	0,34	0,40	0,36	0,50	0,32	0,50

Продолжение таблицы В.1

Образец	6[f]	7[g]	8[h]	9[i]	10[j]	11[k]
Год межлабораторных испытаний	2014	2014	2014	2014	2014	2014
Количество лабораторий	10	10	11	10	9	10
Количество отклоняющихся от правил лабораторий	0	0	0	0	0	0
Количество лабораторий, оставшихся после выбросов	10	9	10	9	8	10
Количество резко отклоняющихся значений (лабораторий)	0	1	1	1	1	0
Количество принятых результатов	20	14	20	18	16	20
Среднее значение, $\bar{x}$, мкг/100 г	0,636	1,480	0,428	0,227	0,967	1,080
Среднеквадратическое отклонение повторяемости S_r, мкг/100 г	0,0348	0,1220	0,0208	0,0111	0,0289	0,0730
Коэффициент вариации повторяемости $C_{V,r}$, %	5,47	8,23	4,85	4,90	2,98	6,74
Предел повторяемости r [$r = 2{,}8 \times S_r$], мкг/100 г	0,0974	0,3420	0,0582	0,0311	0,0809	0,2040
Среднеквадратическое отклонение воспроизводимости S_R, мкг/100 г	0,0587	0,1710	0,0305	0,0202	0,0342	0,1900
Коэффициент вариации воспроизводимости $C_{V,R}$, %	9,23	11,5	7,13	8,90	3,54	17,5
Предел повторяемости R [$R = 2{,}8 \times S_R$], мкг/100 г	0,1640	0,4790	0,0854	0,0566	0,0958	0,5320
Значение коэффициента Хорвитца, согласно [6]	0,27	0,38	0,20	0,22	0,11	0,55

[a] Адаптированные или частично адаптированные начальные или последующие молочные смеси ГУ на основе молока.

[b] Порошкообразная смесь для взрослых на основе молока.

[c] Частично гидролизованная порошкообразная смесь.

[d] Элементарная порошкообразная адаптированная или частично адаптированная начальная или последующая молочная смесь.

[e] Частично гидролизированная порошкообразная адаптированная или частично адаптированная начальная или последующая молочная смесь на основе сои.

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

[g] Смесь для взрослых ГУ с высоким содержанием жира (отдельные результаты для четырех лабораторий из-за неправильно промаркированных банок с продукцией).

[h] Порошкообразная адаптированная или частично адаптированная начальная или последующая молочная смесь на основе сои.

[i] Порошкообразная адаптированная или частично адаптированная начальная или последующая молочная смесь на основе молока.

[j] Порошкообразная адаптированная или частично адаптированная начальная или последующая молочная смесь.

[k] Смесь для взрослых ГУ с высоким содержанием белка.

[l] результаты приведены в мкг/кг порошка.

ГУ – готовый к употреблению.

Приложение С
(информационное)

Пример методики квалификационных испытаний SPE картриджа

Для определения эквивалентности SPE картриджа или проверки пригодности новых партий картриджей, придерживаются следующей методики квалификационных испытаний.

Приготовить раствор, содержащий 160 мкг/л витамина B_{12} в воде.

Приготовить три образца из одного типичного продукта, содержащего наибольшее количество белка любого продукта, который будет проанализирован с помощью данного метода с использованием процедуры экстракции, описанной в 5.2.1 и 5.2.2

Смешать все извлеченные образцы отфильтрованных растворов. Добавить 1 мл 160 мкг/л витамина B_{12} в водный раствор к 80 мл или 100 мл отфильтрованного раствора образца (образец с внутренним стандартом) и добавить 1 мл воды к 80 мл или 100 мл отфильтрованного раствора образца (образец без внутреннего стандарта).

Продолжить приготовление образца с внутренним стандартом и без внутреннего стандарта, используя концентрацию образца и окончательные процедуры для разбавления, описанные в процедуре подготовки образца (см. 5.2.3).

Проанализировать два образца хроматографически. Вычислить концентрацию витамина B_{12} в образцах с внутренним стандартом и без внутреннего стандарта, и вычислить степень извлечения.

Для пригодности картриджей степень извлечения не менее 90 %.

Библиография

[1] Codex Standard 72-1981 Standard for Infant Formula and Formulas for Special Medical Purposes Intended for Infants (Стандарт Кодекса 72-1981 Стандарт на детские и молочные смеси для специальных медицинских целей, предназначенных для детей).

[2] 2011.10, Determination of Vitamin B12 in Infant, Adult, and Pediatric Formulas by HPLC-UV and Column Switching: Collaborative Study (2011.10, Определение содержания витамина B12 в смеси для детского питания и взрослых с помощью переключения колонок HPLC-UV: совместное исследование).

[3] 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 (Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерения).

[4] 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. (AOAC INTERNATIONAL. Программа официальных методов AOAC, Руководство ассоциированного судьи по процессу разработки, изучения, рассмотрения и утверждения. Часть IV, Руководство для совместных исследований AOAC, 1995 г., стр. 23-51).

[5] AOAC SMPR 2011.005, Standard Method Performance Requirements for Vitamin B_{12} in infant formula and Adult/Pediatric Nutritional formula (AOAC SMPR 2011.005, Требования к характеристикам стандартного метода для витамина B_{12} в смеси для детского питания и взрослых).

[6] 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 (М. ТОМПСОН. Последние тенденции в межлабораторной точности при концентрациях частиц на миллиард и ниже одной частицы на миллиард по отношению к критериям приемлемости для выполнения поставленной цели в квалификационном испытании. Аналитик (Лонд.). 2000 г., 125 стр. 385-386).

[7] ГОСТ 25336-82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры.

УДК 637.1:543.544.5:006:354 **МКС 67.050** **IDT**

Ключевые слова: смеси для детского питания, смеси для взрослых, витамин B_{12}, жидкостная хроматографии, RP-HPLC

Басуға _____ ж. қол қойылды Пішімі 60х84 1/16
Қағазы офсеттік. Қаріп түрі «KZ Times New Roman»,
«Times New Roman»
Шартты баспа табағы 1,86. Таралымы ____ дана. Тапсырыс ____

«Қазақстан стандарттау және сертификаттау институты»
республикалық мемлекеттік кәсіпорны
010000, Астана қаласы, Мәңгілік Ел данғылы, 11 үй,
«Эталон орталығы» ғимараты
Тел.: 8 (7172) 27-08-01, 79-34-22

gost.e-ecolog.ru