



## **ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫНЫҢ ҰЛТТЫҚ СТАНДАРТЫ**

---

**Балалар тағамына және ересектерге арналған қоспалар**

**КЕРІ ФАЗАЛЫ ЖОҒАРЫ ТИІМДІЛІКТІ СҮЙЫҚТЫҚ ХРОМАТОГРАФИЯСЫ  
(RP-HPLC) АРҚЫЛЫ В<sub>12</sub> ДӘРУМЕҢІНІҢ МӨЛШЕРІН АНЫҚТАУ**

**Смеси для детского питания и взрослых**

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ВИТАМИНА В<sub>12</sub> 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<sub>12</sub> 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**



## **ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫНЫҢ ҰЛТТЫҚ СТАНДАРТЫ**

---

**Балалар тағамына және ересектерге арналған қоспалар**

**КЕРІ ФАЗАЛЫ ЖОҒАРЫ ТИІМДІЛІКТІ СҮЙЫҚТЫҚ ХРОМАТОГРАФИЯСЫ  
(RP-HPLC) АРҚЫЛЫ В<sub>12</sub> ДӘРУМЕНІНІҢ МӨЛШЕРІН АНЫҚТАУ**

**ҚР СТ ISO 20634-2016**

*(ISO 20634:2015 Infant formula and adult nutritionals – Determination of vitamin B<sub>12</sub> 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**

**АЛҒЫСОЗ**

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

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

**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 витаминін мөлшерін анықтау) халықаралық стандарттың 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 нұска 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 Занңдарының нормалары іске асырылды

**5 БІРІНШІ ТЕКСЕРУ МЕРЗІМІ  
ТЕКСЕРУДІҢ КЕЗЕҢДІЛІГІ**

2023 жылы  
5 жыл

**6 АЛҒАШ РЕТ ЕҢГІЗІЛДІ**

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

**ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫНЫҢ ҰЛТТЫҚ СТАНДАРТЫ****Балалар тағамына және ересектерге арналған қоспалар****КЕРІ ФАЗАЛЫ ЖОҒАРЫ ТИІМДІЛІКТІ СҮЙЫҚТЫҚ ХРОМАТОГРАФИЯСЫ  
(RP-HPLC) АРҚЫЛЫ В<sub>12</sub> ДӘРУМЕНІНІҢ МӨЛШЕРІН АНЫҚТАУ****Енгізілген күні 2018-01-01****1 Қолданылу саласы**

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

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

**2 Терминдер мен анықтамалар**

Осы стандартта тиісті анықтамалары бар мынадай терминдер қолданылады:

**2.1 В<sub>12</sub> витамині** (vitamin B<sub>12</sub>): Цианокобаламин және цианокобаламинге түрленетін аквокобаламин, гидроксикобаламин, метилкобаламин және аденоцилкобаламин іспеттес B<sub>12</sub> витамині биологиялық белсенділігі бар кобальттан тұратын корриноидтар.

**2.2 Ересектерге арналған қоспа** (adult nutritional): Түрлендірілмеген ақуызды қосып және көспай, сүт, соя, күріш, сүт сарысы, гидролизденген ақуыз, крахмал мен амин қышқылдарының үйлесімінен әзірленген бірден-бір қорек көзі бола алатын, сүйкі күйде тұтынылатын, құнарлы заттары тенденстірілген, арнағы 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 сәбілердің қажеттілігін қанағаттандыру үшін арнағы дайындалған емшектегі сүттің жасанды алмастырышы.

**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 °C температурада цианокобаламинге түрленеді. Сірінділерді (SPE) қатты фазалық экстракцияға арналған C8 және C18 картридждердің көмегімен тазартады және шоғырландырады және SEC ығыстырығыш хроматография, яғни молекулалық електер хроматографиясы, және қайтарылды-фазалық хроматография көмегімен бөледі. В<sub>12</sub> витаминінің мөлшері 550 нм-да көрінетін сезігіштігі бар сүйықтық 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, суыз кальций сульфаты, 8 кап.

4.4 Денатурленген этанол

4.5 Құмырса қышқылы, 88 %.

4.6 Калий цианиді, 97 %.

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

4.8 Суыз натрий ацетаты немесе натрий ацетатының тригидраты, EPT.

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<sup>1)</sup>). Құндізгі жарықтан корғалған эксикаторда сақтау кажет.

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 салқындастылған күйінде немесе коршаган 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 сүйылтады. pH деңгейін 5-тен 7-ге дейін шамамен 1,25 мл шоғырланған құмырса 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 сүйылтады. pH деңгейін 5-тен 7-ге дейін шамамен 1,25 мл шоғырланған құмырса 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 сүйылтады. pH деңгейін 5-тен 7-ге дейін шамамен 1,25 мл шоғырланған құмырса 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 сүйылтады. 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 сүйылтады. 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 сүйылтады. Жарамдылық мерзімі: тығыздап жабылған контейнерде 1 ай.

<sup>1)</sup> Сатылымда бар жарамды өнім үлгісі. Осы ақпарат осы стандартты пайдаланушыларға қолайлы болу үшін берілген және ISO тарағынан осы өнім макұлданғанын растамайды. Егер баламалы өнімдер осындағы нәтиже беретіні көрсетілсе, оларды пайдалануга болады.

4.12.2.7 Ацетонитрил мен су қоспасы, бағананы тазарту және сактауға 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  $\rho = 4$  г/л. 0,02 г калий цианидін натрий ацетаты буферінде ерітіп, 5 мл дейін натрий ацетаты буферімен сұйылтады (4 қараныз) зат концентрациясы  $c = 0,25$  моль/л). Ерітіндіні тікелей қолдану алдында дайындау қажет.

4.12.2.10 Калий цианиді ерітіндісі,  $\rho = 10$  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 қөмегімен (шамамен 40 мл) pH деңгейін 4,5 дейін жеткізеді. Сумен 2000 мл-ге дейін сұйылтады. Жарамдылық мерзімі: 3 ай.

4.12.2.12 Бөлөтін 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 тен мөлшерін жоғары концентрациялы  $B_{12}$  витаминінің стандартты жұмысшы ерітіндісімен араластырады. Жарамдылық мерзімі: 1 апта.

4.12.2.13 Такадиастаз ерітіндісі,  $\rho = 60$  г/л. Такадиастаздың 0,6 г 10 мл суда ерітеді. Ерітіндінің 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 сакталады.

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

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

$$m_w = 10\ 000 \times 0,1 \times \frac{1}{\rho} \quad (1)$$

мұндағы 10 000 – бастапқы стандартты ерітіндінің қажетті шоғырлануы, мкг/л; 0,1 – сұйылтылған ерітінді мөлшері, л;

$\rho$  – стандартты ерітінді мг-ның цианокобаламин мкг-не шаққандағы  $B_{12}$  витаминінің стандартты ерітіндісінің тазалық дәрежесі (5.11 қараныз).

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

4.12.3.4  $B_{12}$  витаминінің стандартты калибрлеу ерітіндісі,  $\rho = 2,5$  мкг/л бастап 25,0 мкг/л дейінгігі тен. 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 қараныз) 10 %-дық ацетонитрилмен (4.12.2.5 қараныз) 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 үлтіні бүркү мүмкіндігіне ие автоматты сынама алғышпен және 550 нм-мен мониторинг жасай алатын вольфрам шамымен жаракталаған ультракүлгін және көзге көрінетін диапазондар детекторынан, изократикалық сорғыдан және бағананы ауыстырып кларапнан, градиенттік сорғыдан тұратын HPLC жүйесі.

5.2 HPLC бағанасы, талдамалы эксклюзиянды 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 C18 бағанасы:

- бөлшектер өлшемі 3 мкм, (100,0 × 4,6) мм (мысалы, Thermo Scientific Aquasil™2 P/N 77503-104630) көлемі кішірейтілген C18 қорғаныш картридждермен 3 мкм, 10 мм × 4,6 мм (мысалы, Thermo Scientific Aquasil™2 P/N 77503-014001);
- 3 мкм, 120 A, (100,0 × 4,6) мм (мысалы, Epic Phenyl Hexyl\_ (ES Industries 125191-EPHX)<sup>1)</sup> тиісті қорғаныш картриджбен, немесе 100% судан тұратын қозғалмалы фазамен үйлесімді қайтарымды-фазалық хроматография баламалы бағанасы).

5.4 (95 ± 5) °C және (105 ± 5) °C температуралы 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, градиурленген, 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 Сұзгіш қағаз, ватман қағазы 2V<sup>2)</sup> 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 жалқыштар, 385 нм кем емес өткізгіштік шегі бар сары немесе мөлдір жапқыштар.

5.17 Қатты фазалық экстракцияға арналған картридждер (SPE), C8, 900 мг (мысалы, Alltech/Grace Davidson P/N 20966<sup>1)</sup>), C18, 900 мг (мысалы, Alltech/Grace Davidson P/N 20942<sup>1)</sup>), немесе баламасы. SPE картриджді білікті сынау әдістемесінің үлтісі C қосымшасында келтірілген.

5.18 Шприцтер, бір рет пайдаланатын, өлшемдері әр түрлі.

5.19 Шприцтік сұзгілер, 0,45 мкм, полиамидті.

5.20 Вакуумдық коллектор, кларапандары бар 24 арна немесе баламасы.

5.21 Градиурленген тамызғыштар, өлшемдері әр түрлі.

5.22 Өлшеуіш жұмыр шынылар, өлшемдері әр түрлі.

<sup>1)</sup> Сатылымда бар жарамды өнім үлгісі. Осы ақпарат осы стандартты пайдаланушыларға қолайлы болу үшін берілген және ISO және IDF тарапынан осы өнім макұлданғанын растамайды. Егер баламалы өнімдер осындай нәтиже беретіні корсетілсе, оларды пайдалануға болады.

Ескертпе 1 мкл-ден бастап 500 мкл-ге дейінгі шприц мөлшерлі автоматты сынама алғыш. Шприцті тасымалдауға арналған косымша 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 дайындауды. Дайындалған өнім үлгілері тығыздап жабылған өлшеуіш жұмыр шыныларда 2 °C-ден бастап 8 °C-ге дейінгі температурада сакталған жағдайда әзірленгеннен кейін 14 күн ішінде сыналады. Өнімнің барлық үлгілері бірдей және репрезентативтік болып келеді, бұған үлгілерді іріктеудің алдында өнімдерді мүкият араластыру жолымен кол жеткізіледі.

### 6.2 Үлгілерді дайындау

#### 6.2.1 Жалпы ережелер

Құрамында крахмал бар өнімдерге 1 мл тақадиастаз ерітіндісі қосылады (5.12.2.13 қараныз). Алуға кіріспес бұрын кем дегенде 30 мин ішінде тақадиастаздың үлгілермен рекцияға түсүін 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 тамактануына 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 қараныз).

#### 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 °C температурада 200,0 г су қосылады. Зертханалық ғомогендеуішті қажеттілік туындағанда қолданылады. Сыйымдылығы 100 мл өлшеуіш жұмыр шынымен шамамен 20,0 г ересектерге арналған қоспа немесе балалардың тамактануына 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 сүмен сұйылтылған сулы қоспалардан алынған 3,0 г біркелкі ұнтаққа 0,5 г кальций казеинатын немесе майсыздандырылған құрғақ сұтті, 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 қараныз) және 1%-дың 1 мл калий цианидін қосады. Қажетті мөлшерге дейін су қосылады, сүзіледі, тазартылады және алдын-ала өнделген 900 мг С8 немесе С 18

## ҚР СТ ISO 20634-2016

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

### 6.2.2 Бөліп алу

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

Улгілерді пештен шығарып, бірден мұз (моншада) құрылғыда салқыннатады. Қажетті мөлшерге дейін үлгілерді сумен сұйылтады. Жақсылап арапастырады. Сыйымдылығы 125 мл конусты жұмыр шыныларда немесе ұқсас шыны ыдыста үлгілерді сүзгіш қағаздан сүзіп өткізеді (5.12 қараныз). Бітеліп қалғанда сүзгіш қағазды қажеттілік тұындағанда ауыстыру қажет. Егер дайындалған үлгілер тұнық болмаса және құрамында өте ұсак 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 қараныз.

### 6.2.3 Үлгілерді шоғырландыру

Үлгілерді тазарту және шоғырландыру үшін вакуумдық коллектор клапанына 900 мг SPE картридж (5.17 қараныз) енгізіледі және әрбір картридждің жоғарғы бөлігіне сыйымдылығы 30 мл бір рет пайдаланатын шприц цилиндрі жалғанады. Картридждерді кем дегенде 20 мл ацетонитрилмен өндейді (ауырлық күшінің эсерімен 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 тұтынууга дайын өнімдерге арналған басқарушылық қағидаттарды пайдалану қажет. Үлгілерді картридж арқылы үздіксіз ағызу үшін вакуумның жеткілікті мөлшерін қажеттілік тұындағанда 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

Тұтынууга 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

Ескерткіс –Alltech C8 немесе C18 картриджіне 60 мл артық ересектерге арналған қоспаны орналастыруға болмайды.

Үлгілердің барлық сүзілген ерітінділері картриджден өткеннен кейін картридждерді 5 мл сумен жуып, элюентті көдеге жарату қажет. Элюент құргағанша вакуум жасап, картридждерді ауда кептіреді. Клапандарды жабады.

1-кестедегі басқарушылық қагидаттарды пайдалана отырып, 5 мл немесе сыйымдылығы 10 мл өлшеуіш жұмыр шыныны әр картриждің астынан орналастырады. 30 %-дық 4,4 мл ацетонитрил мен су қоспасын (4.12.2.6 қараныз) барлық 900 мг SPE картридждерге қосады. Клапандар ашылады және В<sub>12</sub> 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 сонғы сүйілтүлған ерітіндін дайындау кезінде оны қажетті мөлшерге дейін сумен сүйілту қажет.

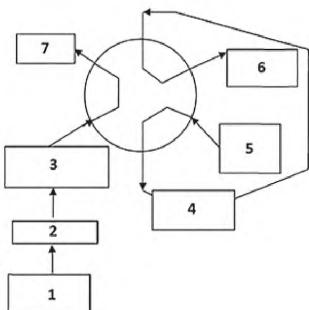
Сыйымдылығы 5 мл өлшеуіш жұмыр шыныларға жиналған үлгілер үшін, әрбір өлшеуіш жұмыр шыныға калий цианидінің жанадан дайындалған 0,4%-дық 0,1 мл ерітіндісі қалпақшамен қосады. 1,5 сағ кем емес, бірақ 4 сағ артық емес уақытқа 95 °C температурамен істеп жатқан пешке дайындалған үлгілер салынады. Үлгілерді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

Әрбір стандартты ерітінді мен дайындалған зерттелетін ерітіндіні шприцтік сүзгіш арқылы (5.19 қараныз) автоматтты сынама алғыш түтікшеге айдан сүзіп алады.

### 6.3 Тиімділігі жоғары сүйіктық хроматография әдісімен талдау

#### 6.3.1 Жүйені орнату және конфигурациясы

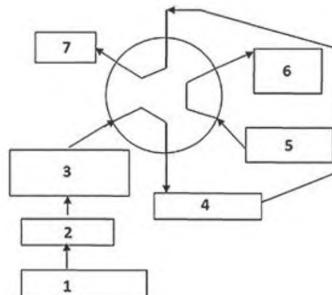
Жүйені орнату және конфигурациясы 1-суретте келтірілген.



а) 1-ші конфигурация

Шартты белгіленулер:

- 1 – изократикалық сорғы
- 2 – автоматты сынама алғыш
- 3 – эксклюзионды бағана
- 4 – C18 талдамалы бағана



б) 2-ші конфигурация

- 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 қараныз.

**2-кесте. Жүйе конфигурациясы**

Уақыт, мин	Клапан конфигурациясы (1-суретті қарандыз)
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<sub>12</sub> 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<sub>12</sub> 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<sub>12</sub> витаминін 24 мин бастап 30 мин дейін элюирлеуге арналған градиенттер 3-кестеде көлтірілген.

**3-кесте. Бағанаға арналған градиент (5.3 қарандыз)**

Уақыт, мин	A қозғалмалы фазасының %	B қозғалмалы фазасының %	C қозғалмалы фазасының %
0	90	10	0
14,5	90	10	0
14,6	40 – 60 <sup>a)</sup>	60 – 40 <sup>a)</sup>	0
27,0 – 30,0	40 – 60 <sup>a)</sup>	60 – 40 <sup>a)</sup>	0
27,1 – 30,1	0	10	90
29,9 – 33,0	0	10	90

<sup>a)</sup> B<sub>12</sub> витамині мен рибофлавинді бөлу үшін және шамамен 24 және 30 мин аралығында B<sub>12</sub> 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 нұктесіне теңестіруге қажет. Болшеген стандартты ерітінді енгізіледі (см. 4.12.2.12) және B<sub>12</sub> 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. С 18-ден немесе фенил бағанадан B<sub>12</sub> витаминін элюирлегенен кейін бағананы кем дегенде 2,8 мин 90%-дық қозғалмалы С фазасымен жуу қажет.

– ағын жылдамдығы: 1,0 мл/мин;

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

Жүйені тенестіргеннен 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 қараныз) стандартты калибрлеу ерітіндісінің, мкг/л, массалық концентрациясын  $\rho_{ws}$  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 қараныз), стандартты ерітіндінің мг цианокобаламин мкг шакқанда ( $B_{12}$  витамині);

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

200 – сұйылтылған ерітінді мөлшері, мл.

### 7.3 Градиурлеуге 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 градиурлеуге арналған стандартты ерітінді сзықтық 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 градиурлеуге арналған  $B_{12}$  витамині стандартты ерітіндісінен экстраполяцияланады.

## КР СТ ISO 20634–2016

(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  $\rho_i$  – 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 (сонғы) сұйылтылған ерітінді мөлшері, мл;

$V_f$  – картриджге орналастырылған сұзілген ерітінді мөлшері, мл;

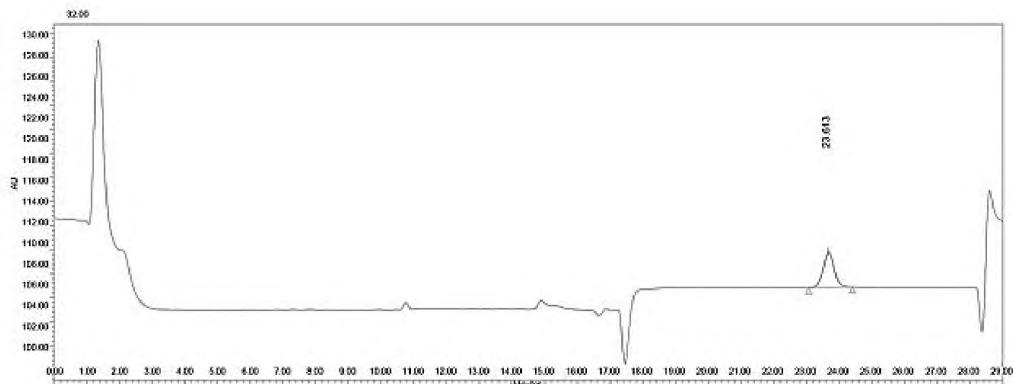
$m_{pr}$  –ұнтақты қалпына келтіру жалпы массасы, г (қолданған кезде);

$m_{rp}$  –ұнтақ тәрізді үлгінің сұйылтылған массасы, г (қолданған кезде).

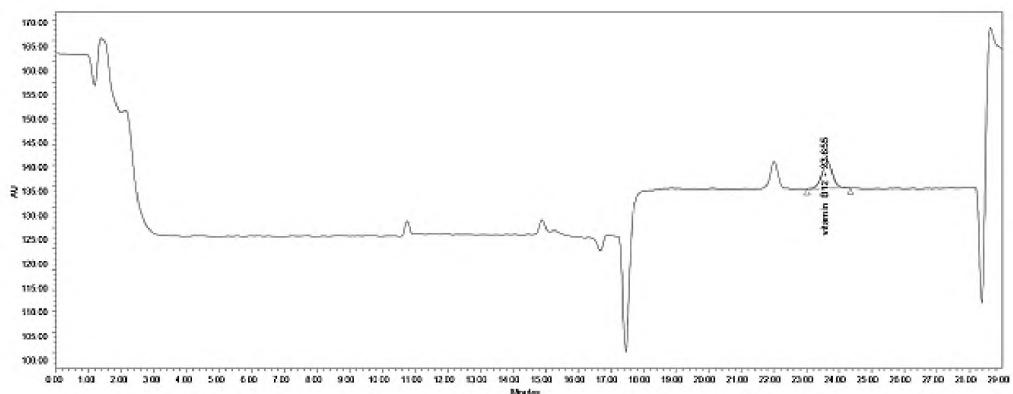
Ескертпе - абсолют салмақтағы сұйық және ұнтақ тәрізді үлгілер үшін  $m_{pr}$  және  $m_{rp}$  1-ге тең.

**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:

<http://standards.iso.org/iso/20634>.

**В.1 кестесі. В<sub>12</sub> витамині үшін деректер дәлдігі**

Үлгі	NIST SRM 1849a	1 <sup>a)</sup>	2 <sup>b)</sup>	3 <sup>c)</sup>	4 <sup>d)</sup>	5 <sup>e)</sup>
Зертханаарапалық сынақтар жылы	2014	2014	2014	2014	2014	2014
Зертханалар саны	11	9	10	11	10	10
Ережеден ауытқытын зертханалар саны	0	0	0	0	0	0
Құрт ауытқытын мәндерді жойғаннан кейін қалған зертханалар саны	10	9	10	11	9	10
Құрт ауытқытын 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 <sup>l</sup>	0,272	0,300	0,373	0,543	0,250
Қайталанушылықтың орташа квадраттық ауытқуы $S_r$ , мкг/100 г	3,0100 <sup>l</sup>	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 <sup>l</sup>	0,0720	0,0756	0,0560	0,0473	0,0683
Жаңғыртушылықтың орташа квадраттық ауытқуы $S_R$ , мкг/100 г	3,8600 <sup>l</sup>	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 <sup>l</sup>	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

## B.1 кестенің жалғасы

Үлгі	6 <sup>f)</sup>	7 <sup>g)</sup>	8 <sup>h)</sup>	9 <sup>i)</sup>	10 <sup>j)</sup>	11 <sup>k)</sup>
Зертханааралық сынақтар жылы	2014	2014	2014	2014	2014	2014
Зертханалар саны	10	10	11	10	9	10
Ережеден ауытқытын зертханалар саны	0	0	0	0	0	0
Күрт ауытқытын мәндердің жойғаннан кейін қалған зертханалар саны	10	9	10	9	8	10
Күрт ауытқытын 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
Қайталаңушылықтың орташа квадраттық ауытқуы $S_r$ , мкг/100 г	0,0348	0,1220	0,0208	0,0111	0,0289	0,0730
Қайталаңушылық өзгеруінің коэффициенті $C_{V,r}$ , %	5,47	8,23	4,85	4,90	2,98	6,74
Қайталаңушылық 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
Қайталаңушылық шегі $R$ [ $R = 2,8 \times S_R$ ], мкг/100 г	0,1640	0,4790	0,0854	0,0566	0,0958	0,5320
Хорвітц коэффициенті мәні, [6] сәйкес	0,27	0,38	0,20	0,22	0,11	0,55

<sup>a)</sup> Сүт негізінде ТД балалар тағамына арналған қоспа.

<sup>b)</sup> Сүт негізінде ересектерге арналған ұнтақ тәрізді қоспа.

<sup>c)</sup> Ішінара гидролизденген ұнтақ тәрізді қоспа.

<sup>d)</sup> Балалар тағамына арналған қарапайым ұнтақ тәрізді қоспа.

<sup>e)</sup> Соя негізінде балалар тағамына арналған ішінара гидролизденген ұнтақ тәрізді қоспа.

<sup>f)</sup> Майдың аз мөлшері бар ересектерге арналған ұнтақ тәрізді қоспа.

<sup>g)</sup> Майдың жоғары мөлшері бар ТД ересектерге арналған қоспа (өнімі бар құтыларды дұрыс таңбаламаудан төрт зертханага арналған жекелеген нәтижелер).

<sup>h)</sup> Соя негізінде балалар тағамына арналған ұнтақ тәрізді қоспа.

<sup>i)</sup> Сүт негізінде балалар тағамына арналған ұнтақ тәрізді қоспа.

<sup>j)</sup> Балалар тағамына арналған ұнтақ тәрізді қоспа.

<sup>k)</sup> Белоктың жоғары мөлшері бар ТД ересектерге арналған қоспа.

<sup>l)</sup> нәтижелер мкг/кг-мен берілген.

ТД – тұтынуга 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  $B_{12}$  витаминің 160 мкг/л бар ерітіндінің 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 арапастырылады. Үлгінің сүзілген ерітіндісінің (ішкі стандарты бар үлгі) 80 мл немесе 100 мл сулы ерітіндіге  $B_{12}$  витаминің 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 арапастыру рәсімдерін пайдалана отырып, ішкі стандарты бар және ішкі стандарты жоқ үлгілерді дайындау жалғастырылады (5.2.3 караңыз).

Хроматографиялық тәсілмен екі үлгіге талдау жасау. Ішкі стандарты бар және ішкі стандарты жоқ үлгілердегі  $B_{12}$  витаминің 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 жаңғыртушылығының 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, Өзірлеу, зерделеу, қараша және бекіту процесі бойынша қауымдастырған соптар 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<sub>12</sub> 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 критерийін үшін жарамдылыққа катысты миллиард және миллиардтан кем бөліктер шоғырлануы кезінде зертханааралық прецизиондықтағы соңғы даму қарқыны. Аналитик (Лонд.). 2000 ж., 125 бет. 385-386).

[7] ГОСТ 25336-82 Үйдіс 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, В<sub>12</sub> витамині, сұйықтық хроматография, RP-HPLC

---



---

**НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

---

**Смеси для детского питания и взрослых**

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ВИТАМИНА B<sub>12</sub> 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<sub>12</sub> 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<sub>12</sub> by reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC)* (Смеси для детского питания и взрослых. определение содержания витамина В<sub>12</sub> 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 (ен).

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-П, «О языках в Республике Казахстан» от 11 июля 1997 года № 151-І

**5 СРОК ПЕРВОЙ ПРОВЕРКИ  
ПЕРИОДИЧНОСТЬ ПРОВЕРКИ**

2023 год  
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

**Смеси для детского питания и взрослых****ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ВИТАМИНА В<sub>12</sub> 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 В<sub>12</sub> в смесях для детского питания и взрослых (порошки, готовые к употреблению жидкости и жидкие концентраты) с помощью обращенно-фазовой высокоеффективной жидкостной хроматографии.

**2 Термины и определения**

В настоящем стандарте применяются следующие термины с соответствующими определениями:

**2.1 Витамин В<sub>12</sub> (vitamin B<sub>12</sub>):** Цианокобаламин и кобальтсодержащие корриноиды с биологической активностью витамина В<sub>12</sub>, такие как аквокобаламин, гидроксикобаламин, метилкобаламин и аденоцилкобаламин, 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 (рН 4,5), а последний преобразуется в цианокобаламин с использованием цианида калия при температуре 105 °С. Экстракты очищают и концентрируют с помощью C8 или C18 картриджей для твердофазной экстракции (SPE) и разделяют с помощью вытеснительной хроматографии SEC, т.е. хроматографией на молекулярных ситах, и обращенно-фазовой хроматографии. Содержание витамина В<sub>12</sub> определяется с помощью жидкостной хроматографии с видимым улавливанием при 550 нм.

#### 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 В<sub>12</sub> (цианокобаламин), например Стандартный образец Американской фармакопеи 1152009 (приблизительно 10 мкг/мг), Официальная партия<sup>1)</sup>). Хранить в экскаторе, 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 А 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 В 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 С 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.

<sup>1)</sup> 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  $\rho = 4$  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,  $\rho = 10$  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<sub>12</sub> высокой концентрации. Срок годности: 1 неделя.

4.12.2.13 Раствор такадиастаза,  $\rho = 60$  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 °С до 8 °С в плотно закрытых мерных колбах.

4.12.3.2 Исходный стандартный раствор витамина B<sub>12</sub>,  $\rho = 10\,000$  мкг/л. Тщательно взвесить соответствующее количество стандартного раствора витамина B<sub>12</sub> (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<sub>12</sub>,  $m_w$ , в миллиграммах, используя формулу

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

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

0,1 – объем разбавленного раствора, л;

$P$  – степень чистоты стандартного раствора витамина B<sub>12</sub> (см. 4.11) в мкг цианокобаламина на мг стандартного раствора.

4.12.3.3 Промежуточный стандартный раствор витамина B<sub>12</sub>,  $\rho = 1000$  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<sub>12</sub>,  $\rho$  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 А, (100,0 × 4,6) мм (например, Epic Phenyl Hexyl\_ (ES Industries 125191-EPHX)<sup>1)</sup> 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) °С и (105 ± 5) °С.

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<sup>2)</sup> 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<sup>1)</sup>), C18, 900 мг (например, Alltech/Grace Davidson P/N 20942<sup>1)</sup>), или эквивалент. Пример методики квалификационных испытаний SPE картриджа приведен в приложении С.

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.

<sup>1)</sup> 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 IIDF. 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 °C до 8 °C 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 таукаиниаза (см. 4.12.2.13). Обеспечить вступление таукаиниаза 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 °C 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

## СТ РК ISO 20634–2016

предварительно обработанном 900 мг картридже C8 или C18. Не нагревать образец в духовке, поддерживающей температуру в 10 °C.

### 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 °C 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 °C.

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<sub>12</sub> 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 <sub>12</sub> 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 C8 или C18 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<sub>12</sub> 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.

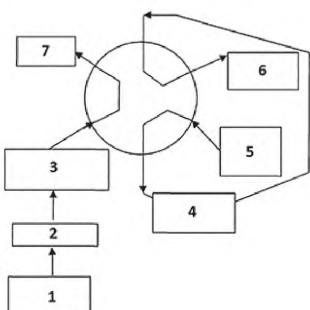
Для образцов, собранных в мерные колбы вместимостью 5 мл, в колпачке добавить 0,1 мл свежеприготовленного 0,4 %-ного раствора цианида калия (см. 4.12.2.9) в каждую мерную колбу. Поместить подготовленные образцы в печь, работающую при температуре 95 °С не менее чем на 1,5 ч, но не более чем на 4 ч. Вынуть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

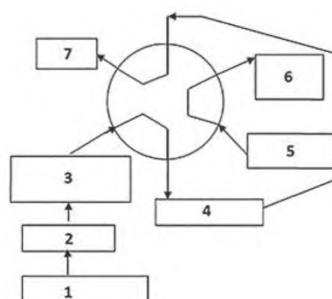
## 6.3 Анализ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

### 6.3.1 Установка и конфигурация системы

Установка и конфигурация системы приведены на рисунке 1.



а) Конфигурация 1



б) Конфигурация 2

Условные обозначения:

- 1 – изократический насос
- 2 – автоматический пробоотборник
- 3 – эксклюзационная колонка
- 4 – аналитическая колонка C18

- 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<sub>12</sub> 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<sub>12</sub> 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<sub>12</sub> от 24 до 30 мин приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Градиент для колонки (см. 5.3)

Время, мин	% подвижной фазы А	% подвижной фазы В	% подвижной фазы С
0	90	10	0
14,5	90	10	0
14,6	40–60 <sup>a)</sup>	60–40 <sup>a)</sup>	0
27,0–30,0	40–60 <sup>a)</sup>	60–40 <sup>a)</sup>	0
27,1–30,1	0	10	90
29,9–33,0	0	10	90

<sup>a)</sup> Создаются соответствующие условия для градиента в каждой колонке для разделения витамина B<sub>12</sub> и рибофлавина и элюирования витамина B<sub>12</sub> 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<sub>12</sub> 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<sub>12</sub> из C18 или фениловой колонки необходимо промыть колонку 90 %-ной подвижной фазой С 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,  $\rho_{ws}$ , в микрограммах на литр, калибровочного стандартного раствора витамина  $B_{12}$  (см. 4.12.3.4), используя формулу (2):

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

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;  
 $A$  – аликовта 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.

## СТ РК ISO 20634–2016

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  $\rho_i$  – 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**

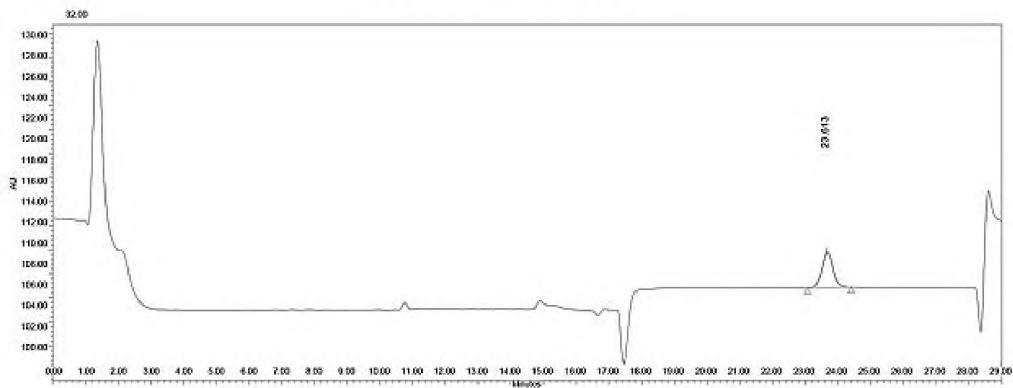


Рисунок А.1 – Типичная хроматограмма стандартного раствора

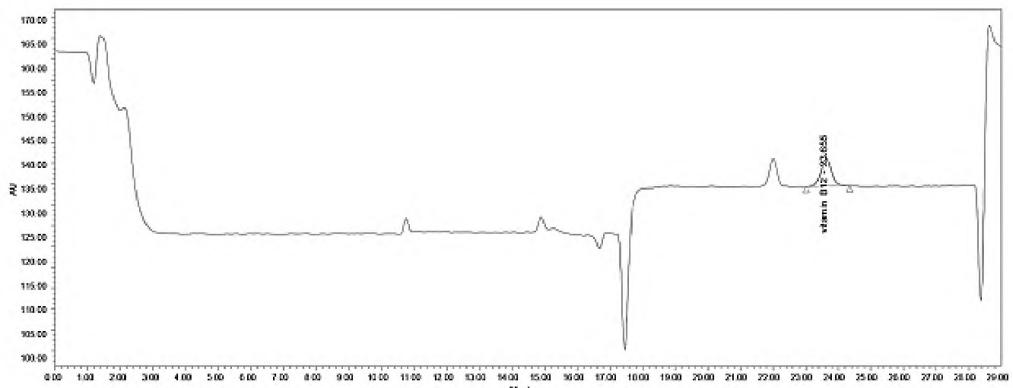


Рисунок А.2 – Типичная хроматограмма образца

**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: <http://standards.iso.org/iso/20634>.

**Таблица В.1 – Точность данных для витамина B<sub>12</sub>**

Образец	NIST SRM 1849a	1 <sup>a)</sup>	2 <sup>b)</sup>	3 <sup>c)</sup>	4 <sup>d)</sup>	5 <sup>e)</sup>
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 <sup>1</sup>	0,272	0,300	0,373	0,543	0,250
Среднеквадратическое отклонение повторяемости $S_r$ , мкг/100 г	3,0100 <sup>1</sup>	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 <sup>1</sup>	0,0720	0,0756	0,0560	0,0473	0,0683
Среднеквадратическое отклонение воспроизводимости $S_R$ , мкг/100 г	3,8600 <sup>1</sup>	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 <sup>1</sup>	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 <sup>f)</sup>	7 <sup>g)</sup>	8 <sup>h)</sup>	9 <sup>i)</sup>	10 <sup>j)</sup>	11 <sup>k)</sup>
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

<sup>a)</sup> Адаптированные или частично адаптированные начальные или последующие молочные смеси ГУ на основе молока.

<sup>b)</sup> Порошкообразная смесь для взрослых на основе молока.

<sup>c)</sup> Частично гидролизованная порошкообразная смесь.

<sup>d)</sup> Элементарная порошкообразная адаптированная или частично адаптированная начальная или последующая молочная смесь.

<sup>e)</sup> Частично гидролизованная порошкообразная адаптированная или частично адаптированная начальная или последующая молочная смесь на основе сои.

<sup>f)</sup> Порошкообразная смесь для взрослых с низким содержанием жира.

<sup>g)</sup> Смесь для взрослых ГУ с высоким содержанием жира (отдельные результаты для четырех лабораторий из-за неправильно промаркированных банок с продукцией).

<sup>h)</sup> Порошкообразная адаптированная или частично адаптированная начальная или последующая молочная смесь на основе сои.

<sup>i)</sup> Порошкообразная адаптированная или частично адаптированная начальная или последующая молочная смесь на основе молока.

<sup>j)</sup> Порошкообразная адаптированная или частично адаптированная начальная или последующая молочная смесь.

<sup>k)</sup> Смесь для взрослых ГУ с высоким содержанием белка.

<sup>l)</sup> 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 В<sub>12</sub> 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 В<sub>12</sub> 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 В<sub>12</sub> 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 АОАС, Руководство ассоциированного судьи по процессу разработки, изучения, рассмотрения и утверждения. Часть IV, Руководство для совместных исследований АОАС, 1995 г., стр. 23-51).

[5] AOAC SMPR 2011.005, Standard Method Performance Requirements for Vitamin B<sub>12</sub> in infant formula and Adult/Pediatric Nutritional formula (AOAC SMPR 2011.005, Требования к характеристикам стандартного метода для витамина B<sub>12</sub> 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.



Басуға \_\_\_\_\_ ж. кол қойылды Пішімі 60x84 1/16  
Қағазы оғсеттік. Қаріп түрі «KZ Times New Roman»,  
«Times New Roman»  
Шартты баспа табағы 1,86. Тарапалмы \_\_\_\_\_ 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