МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ ISO 20637—2018

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

Определение мио-инозита методом жидкостной хроматографии и импульсной амперометрии

(ISO 20637:2015, IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2018

Предисловие

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

Сведения о стандарте

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

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 27 июня 2018 г. № 53)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004 —97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004 – 97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Институт стандартизации Молдовы
Россия	RU	Росстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 9 августа 2018 г. № 479-ст межгосударственный стандарт ГОСТ ISO 20637—2018 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 сентября 2019 г.

5 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 20637:2015 «Смеси адаптированные для искусственного вскармливания детей раннего возраста и смеси для энтерального питания взрослых. Определение мио-инозита методом жидкостной хроматографии и импульсной амперометрии» («Infant formula and adult nutritionals — Determination of myo-inositol by liquid chromatography and pulsed amperometry», IDT)

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет (www.gost.ru)

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

В Российской Федерации настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения 1
2 Термины и определения 1
3 Сущность метода 1
4 Реактивы и материалы 2
5 Лабораторное оборудование 3
6 Процедура проведения испытания 4
6.1 Свободный мио-инозит 4
6.1.1 Подготовка проб 4
6.1.2 Экстракция 4
6.2 Мио-инозит, связанный в виде фосфатидилинозита 5
6.2.1 Подготовка проб 5
6.2.2 Экстракция 5
6.2.3 Очистка экстракта 5
6.2.4 Гидролиз 5
6.3 Анализ методом ВЭЖХ 6
6.3.1 Параметры работы хроматографической системы 6
6.3.2 Рабочие параметры импульсного амперометрического детектора с золотым электродом 7
6.3.3 Подготовка хроматографа к работе 7
6.3.4 Анализ стандартных растворов и растворов проб 7
7 Обработка результатов 8
7.1 Общие положения 8
7.2 Расчет концентрации градуировочных стандартных растворов 8
7.3 Построение градуировочного графика 8
7.4 Расчет массовой доли в пробах свободного мио-инозита или суммарной массовой доли свободного и связанного мио-инозита 8
7.4.1 Расчет массовой доли свободного мио-инозита 8
7.4.2 Расчет массовой доли связанного мио-инозита 9
7.4.3 Расчет суммарной массовой доли свободного и связанного мио-инозита 9
Приложение А (справочное) Образцы хроматограмм 10
Приложение В (справочное) Данные по прецизионности метода 11
Библиография 15

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

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

Определение мио-инозита методом жидкостной хроматографии и импульсной амперометрии

Infant formula and adult nutritionals.
Determination of myo-inositol by liquid chromatography and pulsed amperometry

Дата введения — 2019—09—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на адаптированные смеси для искусственного вскармливания детей раннего возраста и смеси для энтерального питания для взрослых и устанавливает метод количественного определения мио-инозита* (свободного или суммы свободного и связанного в виде фосфатидилинозита) с применением жидкостной хроматографии и импульсной амперометрии с переключением колонок.

2 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

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

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

Примечание — Определение термина 2.2***.

3 Сущность метода

Свободный мио-инозит и мио-инозит, связанный в виде фосфатидилинозита, экстрагируют с применением двух различных методик подготовки пробы. Свободный мио-инозит экстрагируют из проб разбавленной соляной кислотой и водой. Фосфатидилинозит экстрагируют из проб хлороформом и отделяют от других жиров на патронах для твердофазной экстракции с силикагелем. Далее мио-инозит отщепляют от глицеринового остатка с применением концентрированных уксусной и муравьиной

* Мио-инозит — циклический шестиатомный спирт, присутствует в природных объектах в свободном и связанном виде. В связанном виде входит в состав некоторых липидов, участвует в регуляции уровней внутриклеточного кальция, передаче сигнала от рецептора инсулина, расщеплении жиров и снижении уровня холестерина в крови, модуляции активности нейротрансмиттеров.

** Термин в соответствии с ТР ТС 021/2011.

*** Определение термина 2.2 взято из Codex Standard 72—1981.

Издание официальное

кислот при 120 °С. Анализ проводят методом ионной хроматографии с применением комбинации двух различных ионообменных колонок и переключения колонок и с импульсным амперометрическим детектированием. Концентрацию мио-инозита рассчитывают по методу внешнего стандарта путем сопоставления с результатом анализа стандартного раствора известной концентрации.

4 Реактивы и материалы

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

4.1 Реактивы и растворы

4.1.1 Кислота уксусная ледяная.

4.1.2 Хлороформ высокой степени чистоты, для ВЭЖХ.

4.1.3 Диэтиловый эфир безводный, для ВЭЖХ.

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

4.1.5 Гелий нулевой.

4.1.6 Гексан для ВЭЖХ.

4.1.7 Кислота соляная концентрированная массовой долей от 36 % до 38 %.

4.1.8 Кислота метафосфорная.

4.1.9 Метанол для ВЭЖХ.

4.1.10 Мио-инозит, первичный стандартный образец сравнения.

Хранить в эксикаторе. Для учета степени чистоты используют информацию, указанную в маркировке стандартного образца.

4.1.11 Натрий хлористый.

4.1.12 Натрия гидроксид, раствор массовой долей 50 % с низким содержанием карбонатов.

4.2 Приготовление растворов реактивов и стандартных растворов

4.2.1 Общие положения

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

4.2.2 Основной стандартный раствор мио-инозита массовой концентрации около 2 000 мг/дм^3

Берут точную навеску мио-инозита массой около 0,1000 г и количественно переносят ее в мерную колбу вместимостью 50 см^3. Содержимое колбы разбавляют до метки водой и тщательно перемешивают. Раствор хранят в охлажденном виде. Срок годности — 3 мес.

4.2.3 Стандартный раствор мио-инозита промежуточной концентрации (около 200 мг/дм^3)

Разбавляют 10,0 см^3 основного стандартного раствора (см. 4.2.2) до 100 см^3 водой, тщательно перемешивают. Полученный раствор утилизируют после использования.

4.2.4 Приготовление градуировочных стандартных растворов

4.2.4.1 Градуировочные стандартные растворы мио-инозита высокой концентрации (около 4 мг/дм^3, 2 мг/дм^3, 1 мг/дм^3 и 0,5 мг/дм^3)

В отдельных мерных колбах разбавляют 2,0 см^3, 1,0 см^3 и 0,5 см^3 стандартного раствора мио-инозита промежуточной концентрации (см. 4.2.3) до 100 см^3 водой. Разбавляют 0,5 см^3 стандартного раствора мио-инозита промежуточной концентрации (см. 4.2.3) до 200 см^3 водой. Срок годности растворов — две недели.

4.2.4.2 Градуировочные стандартные растворы мио-инозита низкой концентрации (около 0,2 мг/дм^3 и 0,05 мг/дм^3)

В отдельных мерных колбах разбавляют 4 см^3 и 1 см^3 градуировочного стандартного раствора мио-инозита массовой концентрации 0,5 мг/дм^3 до 10 см^3 водой. Срок годности растворов — две недели.

4.2.5 Соляная кислота, раствор массовой долей около 0,5 %

В мерной колбе вместимостью 250 см^3 разбавляют 1,25 см^3 концентрированной соляной кислоты в 200 см^3 воды. Объем содержимого в колбе доводят до метки водой, полученный раствор тщательно перемешивают. Срок годности раствора — 6 мес.

4.2.6 Натрий хлористый, раствор концентрации 1 моль/дм^3

В мерной колбе вместимостью 100 см^3 растворяют 5,8 г хлорида натрия, объем раствора в колбе доводят до 100 см^3 водой. Срок годности раствора — 1 мес.

4.2.7 Натрия гидроксид, раствор массовой концентрации 1,2 г/дм^3 или 30 ммоль/дм^3 (подвижная фаза для насоса 1)

Быстро взвешивают (4,8 ± 0,1) г раствора гидроксида натрия массовой долей 50 % в мерной колбе вместимостью 2000 см^3, содержащей около 1900 см^3 воды. Важно, чтобы гидроксид натрия не поглощал диоксид углерода из воздуха. Содержимое колбы тщательно перемешивают путем взбалтывания. Полученный раствор разбавляют до метки водой и тщательно перемешивают. Срок годности раствора — 1 мес.

4.2.8 Натрия гидроксид, раствор массовой долей 40 г/дм^3 или 1 ммоль/дм^3 (подвижная фаза для насоса 2)

Быстро взвешивают (160 ± 3) г раствора гидроксида натрия массовой долей 50 % в мерной колбе вместимостью 2000 см^3, содержащей около 1900 см^3 воды. Важно, чтобы гидроксид натрия не поглощал диоксид углерода из воздуха. Содержимое колбы тщательно перемешивают путем взбалтывания. Разбавляют до метки водой и тщательно перемешивают. Срок годности раствора — 1 мес.

4.2.9 Кислота метафосфорная, раствор массовой долей 6 %

Взвешивают 6,0 г метафосфорной кислоты в колбе вместимостью 100 см^3. Содержимое колбы растворяют в воде и разбавляют до метки водой. Полученный раствор тщательно перемешивают. Хранят в охлажденном виде. Срок годности — одна неделя.

4.2.10 Растворы для экстракции фосфатидилинозита

Растворы готовят в день использования.

4.2.10.1 Хлороформ:метанол (2:1)

Смешивают 60 см^3 хлороформа и 30 см^3 метанола.

4.2.10.2 Гексан:диэтиловый эфир (80:20)

Смешивают 80 см^3 гексана и 20 см^3 диэтилового эфира.

4.2.10.3 Гексан:диэтиловый эфир (50:50)

Смешивают 50 см^3 гексана и 50 см^3 диэтилового эфира.

4.2.10.4 Метанол:хлороформ:вода (75:15:10)

Смешивают 75 см^3 метанола, 15 см^3 хлороформа и 10 см^3 воды.

5 Лабораторное оборудование

5.1 Весы аналитические с наименьшим пределом взвешивания не выше 0,0001 г.

5.2 Центрифуга.

5.3 Эксикатор.

5.4 Устройство для выпаривания в токе азота с водяной баней или аналогичное устройство.

5.5 Термостат суховоздушный, пригодный для поддержания температуры 120 °С.

5.6 pH-метр в комплекте с буферными растворами с pH 4 и 7.

5.7 Мешалка магнитная многопозиционная в комплекте с перемешивающими элементами.

5.8 Вакуумный манифолд.

5.9 Миксер типа Вортекс.

5.10 Система для ВЭЖХ, изготовленная из деталей, устойчивых к коррозии, включающая в себя автосамплер, два изократических насоса, шестиканальный кран-переключатель потока, импульсный амперометрический детектор с золотым электродом и капиллярами из полиэфирэфиркетона (ПЭЭК) или политетрафторэтилена (ПТФЭ) внутренним диаметром от 0,18 до 0,25 мм (от 0,007 дюйма до 0,01 дюйма). Автосамплер должен обеспечивать объем инжекции 20 мм^3.

5.11 Колонки аналитические анионообменные для ВЭЖХ* или аналогичные.

5.12 Стаканы лабораторные различной вместимости.

---

* Например, Dionex CarboPac MA1 (4 мм × 250 мм), каталожный номер 44066, MA1 (4 мм × 50 мм), каталожный номер 44067 и PA1 (4 мм × 50 мм), каталожный номер 43096. Это примеры подходящих изделий, доступных в коммерческой сети. Эта информация приведена для удобства пользователей этого стандарта и не является рекламной поддержкой указанных изделий. Допускается использовать аналогичные изделия, если может быть доказано, что они приводят к таким же результатам.

5.13 Пробирки центрифужные, вместимостью 50 см^3 с крышками, покрытыми политетрафторэтиленом (ПТФЭ).

5.14 Фильтрующие насадки на шприц с полиамидным фильтром, 0,45 мкм и 0,2 мкм.

5.15 Бумага фильтровальная* или аналогичная.

5.16 Колбы конические вместимостью 50 см^3 или 125 см^3, или аналогичные.

5.17 Колбы мерные различной вместимости.

5.18 Воронки, пригодные для использования с фильтровальной бумагой.

5.19 Пипетки с одной отметкой различной вместимости.

5.20 Патроны для твердофазной экстракции (ТФЭ), заполненные силикагелем, массой сорбента 1 г**.

5.21 Шприцы одноразовые вместимостью 1 см^3 и стеклянные газонепроницаемые вместимостью 25 см^3 с иглами из нержавеющей стали длиной 100 мм (4 дюйма).

6 Процедура проведения испытания

6.1 Свободный мио-инозит

6.1.1 Подготовка проб

6.1.1.1 Общие положения

Подготовленные пробы можно хранить в закрытых емкостях до пяти дней при постоянной температуре от 1 °С до 8 °С. По истечении пяти дней пробу следует приготовить заново. Жидкие пробы тщательно перемешивают для обеспечения гомогенности. Если степень гомогенности порошкообразной пробы неизвестна, исходят из предположения, что проба не гомогенна и все операции с ней проводят, как с пробами сухих порошкообразных (негомогенных) смесей, как указано в 6.1.1.3.

6.1.1.2 Жидкие пробы

При испытании готовых к употреблению жидких проб точную навеску пробы массой от (0,5 ± 0,05) г до (5 ± 0,5) г отвешивают в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и регистрируют массу навески с точностью до 0,0001 г.

6.1.1.3 Пробы сухих порошкообразных смесей

При испытании проб негомогенных сухих порошкообразных смесей пробу восстанавливают в соответствии с инструкцией на этикетке продукта. Отвешивают точную навеску восстановленного продукта массой от 0,5 до 5 г в мерную колбу вместимостью 100 см^3. Регистрируют массу навески с точностью до 0,0001 г.

6.1.1.4 Пробы влажных порошкообразных смесей

При испытании проб влажных порошкообразных смесей точную навеску пробы массой от 0,25 г до 1,5 г отвешивают в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и регистрируют массу навески с точностью до 0,0001 г. В мерную колбу добавляют от 10 см^3 до 15 см^3 воды и взбалтывают или перемешивают содержимое колбы до полного растворения порошка.

6.1.2 Экстракция

К каждой навеске пробы добавляют раствор соляной кислоты массовой долей 0,5 % (см. 4.2.5) в количестве, достаточном для доведения значения pH раствора пробы до (4,5 ± 0,2) ед. pH, и перемешивают путем взбалтывания.

Растворы проб выдерживают для проведения реакции с раствором соляной кислоты массовой долей 0,5 % в течение не менее 2 мин, затем разбавляют до метки водой. Тщательно перемешивают. Растворы проб фильтруют через фильтровальную бумагу (см. 5.15) в коническую колбу вместимостью 125 см^3 или другую подходящую стеклянную емкость.

Примечание — Фильтраты растворов некоторых проб получаются мутными, тем не менее, они пригодны для использования.

---

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

** Например, J.T. Baker P/N 7086-07 (www.avantormaterials.com). Это пример подходящего изделия, доступного в коммерческой сети. Эта информация приведена для удобства пользователей этого стандарта и не является рекламной поддержкой указанного изделия. Допускается использовать аналогичные изделия, если может быть доказано, что они приводят к таким же результатам.

Аликвоту фильтрата раствора пробы фильтруют через шприцевой фильтр (см. 5.14) в виалу автосамплера.

6.2 Мио-инозит, связанный в виде фосфатидилинозита

6.2.1 Подготовка проб

6.2.1.1 Общие положения

Подготовленные пробы можно хранить в закрытых емкостях до пяти дней при постоянной температуре от 1 °С до 8 °С. По истечении пяти дней пробу следует приготовить заново. Жидкие пробы тщательно перемешивают для обеспечения гомогенности. Если степень гомогенности порошкообразной пробы неизвестна, исходят из предположения, что проба не гомогенна и все операции с ней проводят, как с пробами сухих порошкообразных (негомогенных) смесей, как указано в 6.2.1.3.

6.2.1.2 Жидкие пробы

При испытании проб готовых к употреблению жидких продуктов точную навеску пробы массой (4 ± 0,4) г отвешивают в центрифужную пробирку вместимостью 50 см^3 и регистрируют массу навески с точностью до 0,0001 г.

6.2.1.3 Пробы сухих порошкообразных смесей

При испытании проб негомогенных сухих порошкообразных смесей пробу восстанавливают в соответствии с инструкцией на этикетке продукта. Отвешивают точную навеску восстановленного продукта массой (4 ± 0,4) г в центрифужную пробирку вместимостью 50 см^3. Регистрируют массу навески с точностью до 0,0001 г.

6.2.1.4 Пробы влажных порошкообразных смесей

При испытании проб влажных порошкообразных смесей точную навеску пробы массой (1 ± 0,1) г отвешивают в центрифужную пробирку вместимостью 50 см^3 и регистрируют массу навески с точностью до 0,0001 г. В центрифужную пробирку добавляют 4 см^3 воды, содержимое пробирки тщательно перемешивают.

6.2.2 Экстракция

В вытяжном шкафу к каждой пробе для анализа добавляют 10 см^3 метанола и перемешивают в течение не менее 20 мин или обрабатывают на миксере типа Вортекс в течение не менее 1 мин, после чего пробы выдерживают для осаждения взвеси не менее 20 мин. Добавляют 20 см^3 хлороформа и перемешивают в течение не менее 5 мин или обрабатывают на миксере типа Вортекс в течение не менее 1 мин, после чего выдерживают пробы для осаждения взвеси не менее 5 мин. Если после добавления хлороформа образуются крупные комки, пробирку укупоривают и интенсивно встряхивают в течение не менее 1 мин для перемешивания пробы. Добавляют 5 см^3 раствора метафосфорной кислоты массовой долей 6 % (см. 4.2.9) и 1 см^3 раствора хлористого натрия концентрации 1 моль/дм^3 (см. 4.2.6) и тщательно перемешивают. Центрифугируют до разделения слоев. Используя стеклянный газонепроницаемый шприц вместимостью 25 см^3 с иглой из нержавеющей стали (см. 5.21), переносят нижний хлороформный слой в чистую центрифужную пробирку вместимостью 50 см^3 и выпаривают хлороформ в токе азота на водяной бане при 60 °С.

6.2.3 Очистка экстракта

В вытяжном шкафу патрон для твердофазной экстракции (ТФЭ), содержащий 1 г силикагеля (см. 5.20), кондиционируют 6 см^3 гексана. Остаток в центрифужной пробирке растворяют в 1 см^3 смеси хлороформ:метанол (2:1). Перерастворенный остаток количественно переносят в кондиционированный патрон с силикагелем для ТФЭ. Центрифужную пробирку ополаскивают 3 см^3 смеси гексан:диэтиловый эфир (80:20) и переносят смыв в патрон для ТФЭ. Элюат отбрасывают. Центрифужную пробирку ополаскивают 3 см^3 смеси гексан:диэтиловый эфир (50:50) и переносят смыв в патрон для ТФЭ. Элюат собирают в чистую центрифужную пробирку вместимостью 50 см^3. Центрифужную пробирку из-под неочищенного экстракта ополаскивают 4 см^3 смеси метанол:хлороформ:вода (75:15:10) и переносят смыв в патрон для ТФЭ. Элюат объединяют в центрифужной пробирке с предыдущей порцией элюата. Объединенный элюат выпаривают в токе азота на водяной бане при 60 °С.

6.2.4 Гидролиз

В вытяжном шкафу к остатку в центрифужной пробирке после проведения очистки экстракта добавляют 0,04 см^3 ледяной уксусной кислоты (см. 4.1.1) и 2 см^3 концентрированной соляной кислоты (см. 4.1.7). Пробирку плотно укупоривают и выдерживают в суховоздушном термостате при 120 °С в течение 2 ч. Затем пробирку охлаждают, добавляют в нее около 10 см^3 воды и перемешивают содержимое путем взбалтывания. Добавляют 1,25 см^3 раствора гидроксида натрия массовой долей 50 %

(см. 4.1.12). Раствор пробы переносят в мерную колбу вместимостью 50 см^3 и доводят водой объем содержимого в колбе до метки. Аликвоту раствора пробы фильтруют через шприцевой фильтр размером пор 0,45 мкм в виалу автосамплера.

6.3 Анализ методом ВЭЖХ

6.3.1 Параметры работы хроматографической системы

Верхний предел рабочего давления для насоса 1—13 790 кПа (2 000 фунтов на квадратный дюйм).

Подвижная фаза для насоса 1 — раствор гидроксида натрия массовой концентрации 1,2 г/дм^3 (30 ммоль/дм^3).

Скорость подачи подвижной фазы насосом 1—0,40 см^3/мин.

Верхний предел рабочего давления для насоса 2—13 790 кПа (2 000 фунтов на квадратный дюйм).

Подвижная фаза для насоса 2 — раствор гидроксида натрия массовой концентрации 40 г/дм^3 (1 моль/дм^3).

Скорость подачи подвижной фазы насосом 2—0,40 см^3/мин.

Объем инжекции — 20 мм^3.

Время удерживания мио-инозита — от 11 мин до 13 мин.

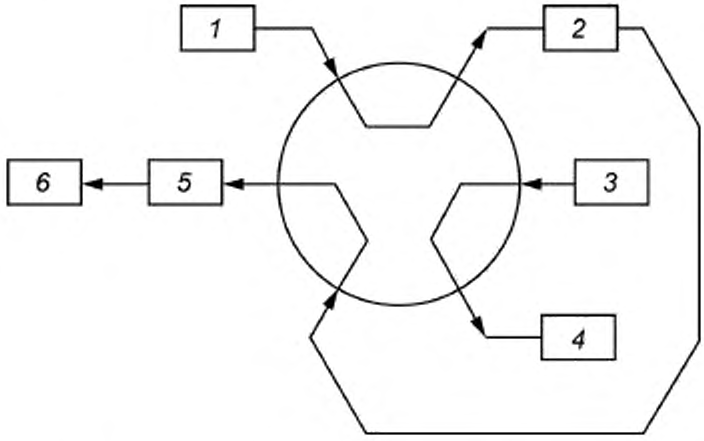
Продолжительность хроматографического анализа — 25 мин.

Временная программа работы крана-переключателя потока подвижной фазы:

0,00 мин — конфигурация 1 (см. рисунок 1);

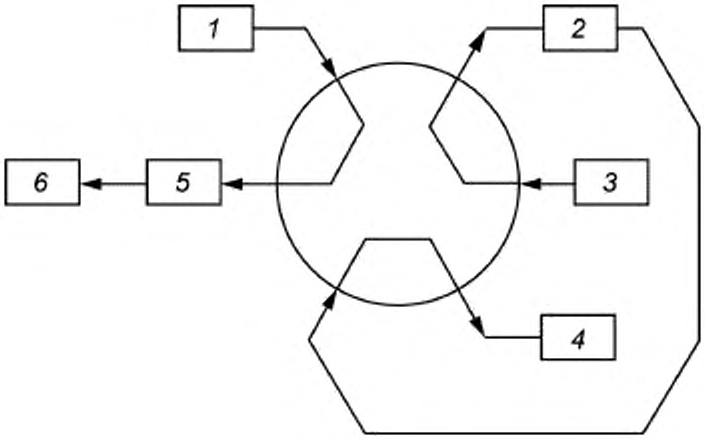
1,50 мин — конфигурация 2 (см. рисунок 2);

13,50 мин — конфигурация 1 (см. рисунок 1)



1 — насос 1; *2* — предколонка PA1; *3* — насос 2; *4* — емкость для сбора элюата. *5* — предколонка и аналитическая колонка MA1; *6* — электрохимический детектор

Рисунок 1 — Конфигурация 1 крана-переключателя потока подвижной фазы



1 — насос 1; *2* — предколонка PA1, *3* — насос 2; *4* — емкость для сбора элюата; *5* — предколонка и аналитическая колонка MA1, *6* — электрохимический детектор

Рисунок 2 — Конфигурация 2 крана-переключателя потока подвижной фазы

6.3.2 Рабочие параметры импульсного амперометрического детектора с золотым электродом

Аналоговый диапазон 1 мкКл.

Программа работы для детекторов Dionex ICS 3000 или ICS 5000*:

0,0 с: + 0,10 В
0,20 с: + 0,10 В
0,40 с: + 0,10 В
0,41 с: – 2,00 В
0,42 с: – 2,00 В
0,43 с: + 0,60 В
0,44 с: – 0,10 В
0,50 с: – 0,10 В

Период интегрирования: от 0,20 с до 0,40 с.

Образцы типичных хроматограмм приведены в приложении А.

6.3.3 Подготовка хроматографа к работе

Готовят подвижные фазы. При необходимости через подвижные фазы барботируют гелий и/или герметизируют резервуары с подвижными фазами. При необходимости очищают и полируют золотой рабочий электрод. Включают детектор и прокачивают подвижную фазу через колонку при скорости потока 0,40 см^3/мин в течение не менее 30 мин для того, чтобы привести систему в равновесие. Проверяют стабильность сигнала детектора перед началом анализа. Инжектируют 20 мм^3 градуировочного стандартного раствора наиболее высокой концентрации по меньшей мере 5 раз и регистрируют площадь или высоту пиков. Если система уравновешена, относительное стандартное отклонение площади или высоты пика для последних трех инжекций стандартного раствора не должно превышать 2,0 %.

6.3.4 Анализ стандартных растворов и растворов проб

Если система уравновешена, проводят единичный анализ градуировочных стандартных растворов каждой концентрации (см. 4.2.4.1 и 4.2.4.2). После окончания анализа серии градуировочных растворов проводят анализ серии растворов проб и контрольной пробы, после чего проводят повторный анализ серии градуировочных растворов.

---

* Это пример подходящего изделия, доступного в коммерческой сети. Эта информация приведена для удобства пользователей этого стандарта и не является рекламной поддержкой указанного изделия. Допускается использовать аналогичные изделия, если может быть доказано, что они приводят к таким же результатам.

7 Обработка результатов

7.1 Общие положения

Перед тем, как проводить расчет массовой доли мио-инозита в пробах, сопоставляют форму пика мио-инозита на хроматограммах градуировочных растворов с формой пиков мио-инозита на хроматограммах растворов проб и убеждаются в том, что помехи от каких-либо компонентов отсутствуют, и площадь или высота пика мио-инозита на хроматограмме раствора пробы находится в границах диапазона площадей или высот пиков на хроматограммах градуировочных растворов. Не допускается рассчитывать массовую долю мио-инозита в пробе при наличии помех от других компонентов или при плохом разделении пиков. Время удерживания мио-инозита должно быть от 11 до 13 мин в зависимости от индивидуальных особенностей аналитической колонки.

7.2 Расчет концентрации градуировочных стандартных растворов

Массовую концентрацию градуировочных стандартных растворов вычисляют по формуле

$$C_W = m \cdot \frac{1}{0{,}05} \cdot \frac{1}{10} \cdot \frac{A_1}{V_1} \cdot \frac{A_2}{V_2} \cdot p = m \cdot 2 \cdot \frac{A_1}{V_1} \cdot \frac{A_2}{V_2} \cdot p, \quad (1)$$

где C_W — концентрация градуировочного стандартного раствора, мг/дм^3;

m — масса навески стандартного образца мио-инозита, мг;

0,05 — объем разбавления при приготовлении основного стандартного раствора, дм^3 (см. 4.2.2);

1/10 — разбавление, примененное при приготовлении стандартного раствора промежуточной концентрации (10 см^3 основного стандартного раствора разбавлены до 100 см^3);

A_1 — аликвота стандартного раствора промежуточной концентрации, см^3 (см. 4.2.4.1);

V_1 — объем разбавления при приготовлении градуировочных стандартных растворов высокой концентрации, см^3 (см. 4.2.4.1);

A_2 — аликвота градуировочного стандартного раствора высокой концентрации, см^3, взятая для приготовления градуировочного раствора низкой концентрации, если применимо к данному случаю (см. 4.2.4.2);

V_2 — объем разбавления при приготовлении градуировочных стандартных растворов низкой концентрации, см^3, если применимо к данному случаю (см. 4.2.4.2);

p — чистота первичного стандартного образца, мг/мг, указанная в его маркировке или определенная экспериментально.

7.3 Построение градуировочного графика

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

7.4 Расчет массовой доли в пробах свободного мио-инозита или суммарной массовой доли свободного и связанного мио-инозита

7.4.1 Расчет массовой доли свободного мио-инозита

По градуировочному графику, построенному по 7.3, определяют массовую концентрацию свободного мио-инозита в подготовленном соответствующим образом растворе пробы для анализа. Исходя из найденной концентрации массовую долю аналита в пробе вычисляют по формуле

$$C_f = \frac{C_d \cdot 100}{m_s}, \quad (2)$$

где C_f — массовая доля свободного мио-инозита в пробе продукта, млн$^{-1}$;

C_d — массовая концентрация мио-инозита в растворе пробы для анализа, мг/дм^3;

100 — объем раствора пробы для анализа, готовый к хроматографическим измерениям, см^3;

m_s — масса навески пробы, г.

7.4.2 Расчет массовой доли связанного мио-инозита

По градуировочному графику, построенному по 7.3, определяют массовую концентрацию связанного мио-инозита в подготовленном соответствующим образом растворе пробы для анализа. Исходя из найденной концентрации массовую долю аналита в пробе вычисляют по формуле

$$C_b = \frac{C_d \cdot 50}{m_s}, \quad (3)$$

где C_b —массовая доля связанного мио-инозита в пробе продукта, млн$^{-1}$;

C_d — массовая концентрация мио-инозита в растворе пробы для анализа, мг/дм^3;

50 — объем раствора пробы для анализа, готовый к хроматографическим измерениям, см^3;

m_s — масса навески пробы, г.

7.4.3 Расчет суммарной массовой доли свободного и связанного мио-инозита

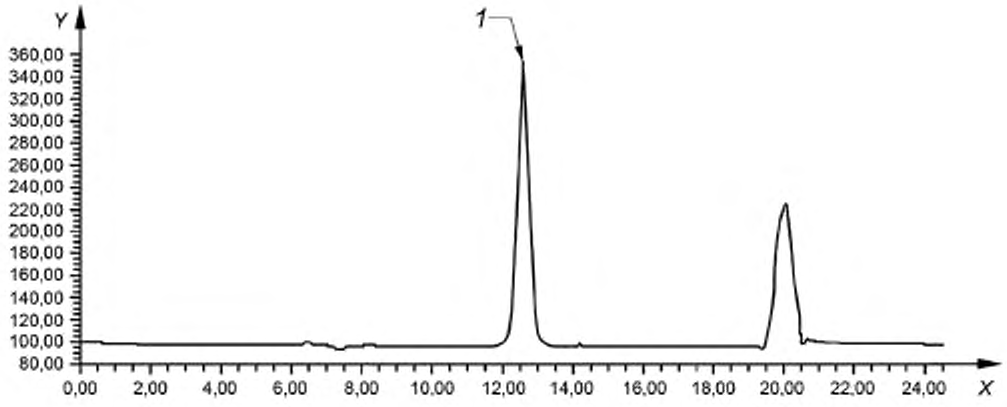
Суммарную массовую долю свободного и связанного мио-инозита в пробе вычисляют по формуле

$$C_T = C_f + C_b \quad (4)$$

где C_T — суммарная массовая доля свободного и связанного мио-инозита в пробе продукта, млн$^{-1}$.

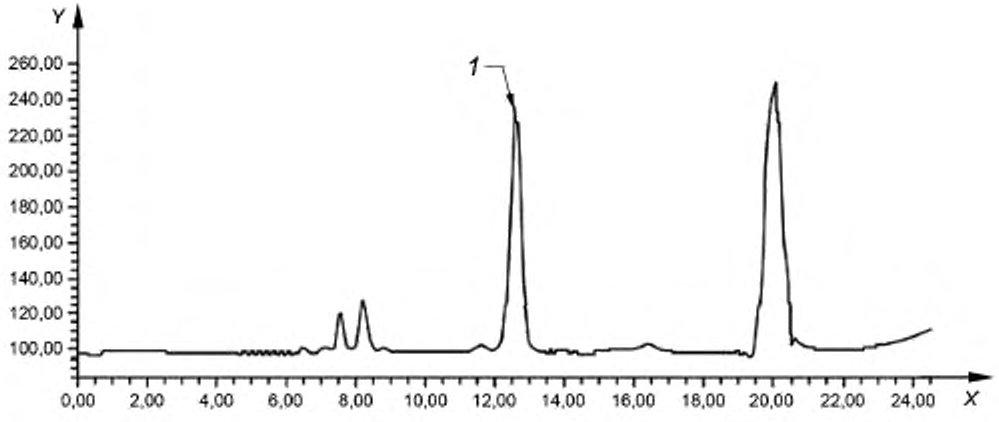
Приложение А
(справочное)

Образцы хроматограмм



X — время, мин; *Y* — величина сигнала детектора, усл. ед.; *1* — пик мио-инозита

Рисунок А.1 — Типичная хроматограмма стандартного раствора



X — время, мин; *Y* — величина сигнала детектора, усл. ед.; *1* — пик мио-инозита

Рисунок А.2 — Типичная хроматограмма аттестованного образца сравнения SRM 1849a

Приложение В
(справочное)

Данные по прецизионности метода

Данные, приведенные в таблицах В.1, В.2 и В.3, опубликованы в 2015 г. [3] и получены в результате межлабораторных испытаний, проведенных в соответствии с ISO 5725-2 [2] и Согласованным Протоколом по проведению межлабораторных испытаний для оценки характеристик прецизионности методов анализа [5]. Валидация метода проведена в аспекте количественного определения свободного мио-инозита и мио-инозита, связанного в виде фосфатидилинозита, в адаптированных смесях для детей раннего возраста и продуктах энтерального питания для взрослых. Повторяемость определена по результатам двукратных анализов, выполненных в различные дни. Правильность оценена по результатам определения полноты обнаружения в пробах с внесением аналита (в отношении свободного мио-инозита и мио-инозита, связанного в виде фосфатидилинозита). Пределы обнаружения и количественного определения для приборов определены статистически путем хроматографического анализа стандартных растворов низкой концентрации и растворов проб с внесением малых количеств свободного мио-инозита. В основе процедуры проведения испытаний лежали требования, указанные в библиографической ссылке [6].

Дополнительная информация о валидации метода может быть получена по ссылке http://standards.iso.org/iso/206347

Таблица В.1 — Данные по прецизионности определения несвязанного (свободного) мио-инозита

Тип образца	Общее число лабораторий, за исключением выбросов	Число выбросов (лабораторий)	Общее число принятых параллельных определений	Среднее значение (мг/100 г продукта, готового к употреблению)	s_r	s_R	$C_{V,r}$	$C_{V,R}$	Индекс Горвица HorRat[a]
NIST SRM 1849a	10	0	22	412[b]	11,3	11,4	2,75	2,77	0,43
Заменитель грудного молока на соевой основе, в порошкообразной форме	10	0	22	4,22	0,127	0,305	3,03	7,26	0,80
Заменитель грудного молока на молочной основе в порошкообразной форме	10	0	20	4,26	0,168	0,232	3,95	5,43	0,60
Заменитель грудного молока на молочной основе, готовый к употреблению	9	0	20	7,17	0,095	0,207	1,33	2,89	0,34
Заменитель грудного молока на молочной основе, частично гидролизованный, в порошкообразной форме	10	0	22	3,65	0,035	0,412	0,97	11,4	1,22
Заменитель грудного молока на соевой основе, частично гидролизованный, в порошкообразной форме	10	0	22	3,11	0,0899	0,389	2,92	12,61	1,32
Заменитель грудного молока в порошкообразной форме	10	0	22	5,10	0,185	0,246	3,61	4,81	0,54

Окончание таблицы В.1

Тип образца	Общее число лабораторий, за исключением выбросов	Число выбросов (лаборатории)	Общее число принятых пар результатов параллельных определений	Среднее значение (мг/100 г продукта, готового к употреблению)	s_r	s_R	$C_{V,r}$	$C_{V,R}$	Индекс Горвица HorRat[a]
Мономерная порошкообразная смесь для детей раннего возраста	10	0	22	5,10	0,227	0,318	4,45	6,24	0,71
Готовая к употреблению адаптированная смесь для питания детей раннего возраста на молочной основе, не витаминизированная	9	0	20	3,17	0,0582	0,0910	1,84	2,87	0,30

[a] Индекс Горвица в соответствии с библиографической ссылкой [7].

[b] Результаты приведены в мг/кг порошка.

Таблица В.2 — Данные по прецизионности определения мио-инозита, связанного в виде фосфатидилинозита

Тип образца	Общее число лабораторий, за исключением выбросов	Число выбросов (лабораторий)	Общее число принятых пар результатов параллельных определений	Среднее значение (мг/100 г продукта, готового к употреблению)	s_r	s_R	$C_{V,r}$	$C_{V,R}$	Индекс Горвица HorRat[a]
NIST SRM 1849a	9	0	20	9,51[b]	1,92	2,62	18,7	26,8	2,36
Заменитель грудного молока на соевой основе в порошкообразной форме	9	0	20	2,10	0,150	0,501	6,94	23,2	2,30
Заменитель грудного молока на молочной основе в порошкообразной форме	9	0	18	0,667	0,0261	0,172	3,92	25,9	2,15
Заменитель грудного молока на молочной основе, готовый к употреблению	8	0	18	0,348	0,0301	0,0909	8,36	25,2	1,91
Заменитель грудного молока на молочной основе, частично гидролизованный, в порошкообразной форме	9	0	20	0,214	0,0103	0,0576	4,72	26,4	1,86
Заменитель грудного молока на соевой основе, частично гидролизованный, в порошкообразной форме	9	0	20	1,64	0,0836	0,358	5,53	21,1	2,02

Окончание таблицы В.2

Тип образца	Общее число лабораторий, за исключением выбросов	Число выбросов (лабораторий)	Общее число принятых пар результатов параллельных определений	Среднее значение (мг/100 г продукта, готового к употреблению)	s_r	s_R	$C_{V,r}$	$C_{V,R}$	Индекс Горвица HorRat[a]
Заменитель грудного молока в порошкообразной форме	9	0	20	0,328	0,0234	0,0678	6,89	25,8	1,94
Мономерная порошкообразная смесь для детей раннего возраста	9	0	20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Готовая к употреблению адаптированная смесь для питания детей раннего возраста на молочной основе, не витаминизированная	8	0	18	0,305	0,0244	0,0850	7,71	26,9	2,00

[a] Индекс Горвица в соответствии с библиографической ссылкой [7].

[b] Результаты приведены в мг/кг порошка.

Таблица В.3 — Данные по прецизионности определения суммарной массовой доли несвязанного (свободного) и связанного в виде фосфатидилинозита мио-инозита

Тип образца	Общее число лабораторий, за исключением выбросов	Число выбросов (лабораторий)	Общее число принятых пар результатов параллельных определений	Среднее значение (мг/100 г продукта, готового к употреблению)	s_r	s_R	$C_{V,r}$	$C_{V,R}$	Индекс Горвица HorRat[a]
NIST SRM 1849a	9	0	20	422[b]	11,9	11,9	2,83	2,83	0,44
Заменитель грудного молока на соевой основе, в порошкообразной форме	9	0	20	6,27	0,147	0,446	2,32	7,05	0,82
Заменитель грудного молока на молочной основе в порошкообразной форме	9	0	18	4,92	0,184	0,314	3,74	6,38	0,72
Заменитель грудного молока на молочной основе, готовый к употреблению	8	0	18	7,50	0,106	0,218	1,41	2,90	0,35
Заменитель грудного молока на молочной основе, частично гидролизованный, в порошкообразной форме	9	0	20	3,84	0,035	0,426	0,91	11,2	1,21

Окончание таблицы В.3

Тип образца	Общее число лабораторий, за исключением выбросов	Число выбросов (лабораторий)	Общее число принятых пар результатов параллельных определений	Среднее значение (мг/100 г продукта, готового к употреблению)	s_r	s_R	$C_{V,r}$	$C_{V,R}$	Индекс Горвица HorRat[a]
Заменитель грудного молока на соевой основе, частично гидролизованный, в порошкообразной форме	9	0	20	4,71	0,152	0,357	3,22	7,55	0,84
Заменитель грудного молока в порошкообразной форме	9	0	20	5,42	0,203	0,307	3,73	5,63	0,64
Мономерная порошкообразная смесь для детей раннего возраста	9	0	20	5,08	0,237	0,324	4,67	6,40	0,72
Готовая к употреблению адаптированная смесь для питания детей раннего возраста на молочной основе, не витаминизированная	8	0	18	3,46	0,0659	0,128	1,90	3,70	0,39

[a] Индекс Горвица в соответствии с библиографической ссылкой [7].

[b] Результаты приведены в мг/кг порошка.

Библиография

[1] AOAC Int. 2012, 95 p. 937

[2] AOAC Int. 2012, 95 p. 295

[3] 2011.18, Determination of Myo-Inositol in Infant, Pediatric, and Adult Formulas by IC-PAD and Column Switching: Collaborative Study

[4] 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*

[5] 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

[6] AOAC SMPR 2011.07, Standard Method Performance Requirements for Myo-inositol in infant formula and Adult/Pediatric Nutritional formula

[7] 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

* Официальный перевод этого стандарта находится в Федеральном информационном фонде стандартов.

УДК 613.22:664:543.544.5.068.7:006.354 МКС 67.050

Ключевые слова: смеси адаптированные для искусственного вскармливания детей раннего возраста и смеси для энтерального питания для взрослых, определение мио-инозита, метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, амперометрическое детектирование

БЗ 6—2018/80

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

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

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»
для комплектования Федерального информационного фонда стандартов,
123001 Москва, Гранатный пер., 4. www.gostinfo.ru info@gostinfo.ru