МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ EN 14663– 2014

ПРОДУКЦИЯ ПИЩЕВАЯ

Определение витамина B_6 (включая гликозилированные формы) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

(EN 14663:2005, IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2016

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены 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 Научно-производственным республиканским унитарным предприятием «Белорусский государственный институт стандартизации и сертификации» (БелГИСС) на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии стандарта, указанного в пункте 5

2 ВНЕСЕН Государственным комитетом по стандартизации Республики Беларусь

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 25 июня 2014 г. № 45-2014)

За принятие стандарта 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	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 29 июня 2016 г. № 733-ст межгосударственный стандарт ГОСТ EN 14663–2014 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июня 2017 г.

5 Настоящий стандарт идентичен европейскому стандарту EN 14663:2005 «Продукты пищевые. Определение витамина B_6 (включая гликозилированные формы) с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии» [(«Foodstuffs – Determination of vitamin B_6 (including its glycosylated forms) by HPLC», IDT].

Европейский стандарт разработан Техническим комитетом по стандартизации CEN/TC 275 «Анализ пищевых продуктов. Горизонтальные методы» Европейского комитета по стандартизации (CEN).

При применении настоящего стандарта рекомендуется вместо ссылочного европейского стандарта использовать межгосударственный стандарт, сведения о котором приведены в дополнительном приложении ДА.

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

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

© Стандартинформ, 2016

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
2 Нормативные ссылки
3 Сущность метода
4 Реактивы
5 Оборудование
6 Методика проведения испытания
7 Вычисление результата
8 Прецизионность
9 Протокол испытания
Приложение А (справочное) Данные по прецизионности
Приложение В (справочное) Примеры подходящих условий проведения ВЭЖХ для определения соединений витамина B_6
Приложение С (справочное) Примеры молярных коэффициентов поглощения
Приложение D (справочное) Примеры хроматограмм
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии ссылочных европейских стандартов межгосударственным стандартам
Библиография

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

ПРОДУКЦИЯ ПИЩЕВАЯ
Определение витамина B_6 (включая гликозилированные формы) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Foodstuffs.
Determination of vitamin B_6 (including its glycosylated forms) by high performance liquid chromatography

Дата введения – 2017–06–01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения витамина B_6 в пищевой продукции с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Витамин B_6 определяется как сумма пиридоксина, пиридоксаля, пиридоксамина, включая их фосфорилированные производные, а также β-гликозилированные формы, в пересчете на пиридоксин.

Настоящий метод был успешно проверен на манной крупе с молоком (детское питание), картофельном пюре, овощах с ветчиной (типичная пищевая продукция) и мультивитаминном напитке в диапазоне концентраций от 0,034 мг/100 г до 1,210 мг/100 г.

2 Нормативные ссылки

Для применения настоящего стандарта необходим следующий ссылочный стандарт. Для недатированных ссылок применяют последнее издание ссылочного стандарта (включая все его изменения).

EN ISO 3696 Water for analytical laboratory use — Specification and test methods (Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы испытаний)

3 Сущность метода

Производные витамина B_6 (пиридоксаль, пиридоксамин и пиридоксин) извлекают из пищевой продукции путем кислотного гидролиза, затем подвергают ферментативному воздействию: дефосфорилируют, используя кислую фосфатазу, и дегликозилируют, используя β-глюкозидазу.

Полученные производные витамина B_6 разделяют и количественно определяют методом ВЭЖХ с флуоресцентным детектированием ([1], [2]).

4 Реактивы

4.1 Общие положения

В ходе анализа используют только реактивы признанной аналитической чистоты и воду не ниже первой степени чистоты в соответствии с EN ISO 3696 или бидистиллированную воду.

4.2 Фосфат калия двузамещенный, массовая доля w ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$) ≥ 99,9 %.

4.3 Ацетат натрия безводный, w (CH_3COONa) ≥ 99,0 %.

4.4 Трихлоруксусная кислота (ТХУ), w ($Cl_3CCOOOH$) ≥ 99,0 %.

4.5 Раствор ацетата натрия молярной концентрацией $c(CH_3COONa)$ = 2,5 моль/дм³

205 г ацетата натрия (см. 4.3) растворяют в 1 дм³ воды.

4.6 Реагент послеколоночный (дополнительно), K_2HPO_4 раствор с концентрацией c (K_2HPO_4) = 0,15 моль/дм³.

Растворяют 34,2 г фосфата калия двузамещенного (см. 4.2) в воде, доводят до 1000 см³, перемешивают и дегазируют.

4.7 Соляная кислота, c(HCl) = 1 моль/дм³.

4.8 Соляная кислота, c(HCl) = 0,1 моль/дм³.

4.9 Соляная кислота, c(HCl) = 0,2 моль/дм³.

4.10 Серная кислота, c(H_2SO_4) = 1 моль/дм³.

4.11 Эфир петролейный, диапазон кипения от 40 °С до 60 °С.

4.12 Фосфатаза кислая из картофеля. Ферментативная активность составляет около 5,3 U/мг[1)].

[1)] U – данная единица измерения (международная или стандартная единица) определяется количеством фермента, который катализирует трансформацию 1 мкмоль субстрата в минуту при стандартных условиях.

Необходимо, чтобы используемый фермент с положительным результатом проходил проверку ферментативной активности согласно 4.13.2 (более подробная информация приведена в [2], [7]).

4.13 Раствор кислой фосфатазы

4.13.1 Общие положения

Растворяют 60 мг кислой фосфатазы (см. 4.12) в 10 см^3 воды в конической колбе, перемешивая в течение 2 мин.

Раствор готовят в день проведения анализа.

4.13.2 Проверка ферментативной активности кислой фосфатазы

Взвешивают 10 г свинины, 5 г картофельного пюре или 5 г муки из цельного зерна в конической колбе и экстрагируют кислотой, как описано в 6.2.1. Добавляют к 12,5 см^3 раствора экстрагированной пробы 1 см^3 раствора кислой фосфатазы (см. 4.13.1) и опционально 1 см^3 раствора β-глюкозидазы (см. 4.15) и перемешивают. Инкубируют раствор в течение не менее 12 ч или в течение ночи при температуре 37 °С при постоянном перемешивании. Повторяют эту операцию с двойным количеством раствора кислой фосфатазы.

Определяют массовую концентрацию витаминов в соответствии с 6.6. Ферментативная активность используемого фермента считается достаточной, если значения массовой концентрации соединений витамина B_6 в обоих растворах пробы эквивалентны. На хроматограмме должен отсутствовать пик фосфата пиридоксамина.

Примечание – Для межлабораторного испытания использовали кислую фосфатазу производства Sigma Nr P 3752[1)].

4.14 β-глюкозидаза из миндаля с ферментативной активностью приблизительно 3,2 U/мг

Необходимо, чтобы используемый фермент с положительным результатом проходил проверку ферментативной активности согласно 4.15.2 (более подробная информация приведена в [2], [7]).

4.15 Раствор β-глюкозидазы

4.15.1 Общие положения

[1)] Данная информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламой указанного продукта со стороны CEN. Допускается использовать аналогичную продукцию, если она позволяет получать сопоставимые результаты.

Растворяют 100 мг β-глюкозидазы (см. 4.14) в 10 см^3 воды в конической колбе, перемешивая в течение 2 мин.

Раствор готовят в день проведения анализа.

4.15.2 Проверка ферментативной активности β-глюкозидазы

Взвешивают 10 г свинины, 5 г картофельного пюре или 5 г муки из цельного зерна в конической колбе и экстрагируют кислотой, как описано в 6.2.1. Добавляют к 12,5 см^3 раствора экстрагированной пробы 1 см^3 раствора кислой фосфатазы (см. 4.13.1) и 1 см^3 раствора β-глюкозидазы (см. 4.15.1) и перемешивают. Инкубируют раствор в течение не менее 12 ч или в течение ночи при температуре 37 °С при постоянном перемешивании. Данную операцию повторяют с двойным количеством раствора β-глюкозидазы.

Определяют массовую концентрацию витаминов в соответствии с 6.6. Ферментативная активность используемого фермента считается достаточной, если значения массовой концентрации соединений витамина B_6 в обоих растворах пробы эквивалентны. На хроматограмме должен отсутствовать пик фосфата пиридоксамина.

Примечание – Для межлабораторного испытания использовали кислую фосфатазу Sigma Nr G-0395[1)].

4.16 Подвижная фаза для ВЭЖХ (серная кислота, $c(H_2SO_4)$ = 0,015 моль/дм^3, содержащая 0,005 моль/дм^3 трихлоруксусной кислоты)

(817 ± 5) мг трихлоруксусной кислоты (см. 4.4) растворяют в 15 см^3 серной кислоты молярной концентрацией 1 моль/дм^3 (см. 4.10), переливают в мерную колбу вместимостью 1000 см^3, объем содержимого в колбе доводят до метки водой, перемешивают и дегазируют.

4.17 Силиконовое масло для удаления пены.

4.18 Образцы сравнения

4.18.1 Общие положения

Пиридоксамин (PM), пиридоксаль (PL) и пиридоксин (PN) могут быть получены у различных поставщиков. Чистота образцов сравнения может варьироваться, поэтому необходимо определить их концентрацию и чистоту (см.

[1)] Данная информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламой указанного продукта со стороны CEN. Допускается использовать аналогичную продукцию, если она позволяет получать сопоставимые результаты.

4.19.4 и 4.20.7).

4.18.2 Пиридоксамина (PM) дигидрохлорид, w ($C_8H_{12}N_2O_2 \cdot 2HCl$) ≥ 98 %.

4.18.3 Пиридоксаля (PL) гидрохлорид, w ($C_8H_9NO_3 \cdot HCl$) ≥ 98 %.

4.18.4 Пиридоксина (PN) гидрохлорид, w ($C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$) ≥ 98 %.

4.19 Исходные растворы

4.19.1 Исходный раствор пиридоксамина (PM), массовой концентрацией ρ(PM) приблизительно 500 мкг/см³

71,7 мг пиридоксамина дигидрохлорида (см. 4.18.2) растворяют в соляной кислоте молярной концентрацией 0,1 моль/дм³ (см. 4.8) в мерной колбе вместимостью 100 см³, объем содержимого в колбе доводят до метки этим же раствором соляной кислоты.

Срок хранения раствора - 1 неделя при температуре 4 °С или 2 мес при температуре минус 18 °С.

4.19.2 Исходный раствор пиридоксаля (PL) массовой концентрацией ρ(PL) приблизительно 500 мкг/см³

60,9 мг пиридоксаля гидрохлорида (см. 4.18.3) растворяют в соляной кислоте молярной концентрацией 0,1 моль/дм³ (см. 4.8) в мерной колбе вместимостью 100 см³, объем содержимого в колбе доводят до метки этим же раствором соляной кислоты.

Срок хранения раствора - 1 неделя при температуре 4 °С или 2 мес при температуре минус 18 °С.

4.19.3 Исходный раствор пиридоксина (PN), массовой концентрацией ρ(PN) приблизительно 500 мкг/см³

60,8 мг пиридоксина гидрохлорида (см. 4.18.4) растворяют в соляной кислоте молярной концентрацией 0,1 моль/дм³ (см. 4.8) в мерной колбе вместимостью 100 см³, объем содержимого в колбе доводят до метки этим же раствором соляной кислоты.

Срок хранения раствора - 1 неделя при температуре 4 °С или 2 мес при температуре минус 18 °С.

4.19.4 Определение концентраций растворов

Отбирают пипеткой 1 см³ исходного раствора пиридоксамина (см. 4.19.1), пиридоксаля (см. 4.19.2) и пиридоксина (см. 4.19.3) соответственно в мерные колбы вместимостью 50 см³ и содержимое колб доводят до метки 0,1 моль/дм³ HCl (см.

4.8). Измеряют оптическую плотность растворов в кювете из кварцевого стекла с толщиной поглощающего слоя 1 см при длинах волн, соответствующих максимумам поглощения относительно 0,1 моль/дм³ HCl (см. таблицу 1).

Таблица 1 – Примеры молярных коэффициентов поглощения соединений витамина B_6

Соединение	Растворитель	λ_{max}	ε_i ммоль$^{-1}$см$^{-1}$	M_i, г/моль	F
PM·2HCl[a)]	0,1 моль/дм³ HCl, pH ~ 1	292	8,2	241,1	0,698
PL·HCl[b)]	0,1 моль/дм³ HCl, pH ~ 1	288	9,0	203,6	0,821
PN·HCl[c)]	0,1 моль/дм³ HCl, pH ~ 1	291	8,6	205,6	0,823

[a)] PM·2HCl – Пиридоксамина дипидрохлорид (4.18.2).
[b)] PL·HCl – Пиридоксаля гидрохлорид (4.18.3).
[c)] PN·HCl – Пиридоксина гидрохлорид (4.18.4).

Массовую концентрацию пиридоксамина, пиридоксаля и пиридоксина в исходных растворах ρ_i, мкг/см³, вычисляют, используя молярный коэффициент поглощения, по формуле

$$\rho_i = \frac{A \cdot M_i}{\varepsilon_i} \cdot V \cdot F \,, \qquad (1)$$

где A – значение оптической плотности растворов пиридоксамина, пиридоксаля и пиридоксина при длинах волн, соответствующих максимумам поглощения λ_{max} (см. таблицу 1);

M_i – молярная масса образцов сравнения PM, PL или PN соответственно согласно таблице 1, г/моль;

V – коэффициент разбавления, см³ (в данном случае V = 50 см³);

F – коэффициент для вычисления доли свободных форм соединений витамина B_6;

ε_i – молярный коэффициент поглощения PM, PL или PN при соответствующем pH согласно таблице 1, ммоль$^{-1}$см$^{-1}$.

Данные значения массовой концентрации используют для вычисления точных концентраций веществ, приведенных в пунктах 4.19.1 – 4.19.3 и 4.20.1 – 4.20.6.

4.20 Стандартные растворы

4.20.1 Стандартный раствор пиридоксамина (PM) I, массовой концентрацией ρ(PM) приблизительно 10 мкг/см³

Разбавляют 2 см³ исходного раствора пиридоксамина (см. 4.19.1)

0,1 моль/дм³ HCl (см. 4.8) и доводят до 100 см³. Полученный раствор хранению не подлежит.

4.20.2 Стандартный раствор пиридоксаля (PL) I, ρ(PL) приблизительно 10 мкг/см³

Разбавляют 2 см³ исходного раствора пиридоксаля (см. 4.19.2) 0,1 моль/дм³ HCl (см. 4.8) и доводят до 100 см³. Полученный раствор хранению не подлежит.

4.20.3 Стандартный раствор пиридоксина (PN) I, ρ(PL) приблизительно 10 мкг/см³

Разбавляют 2 см³ исходного раствора пиридоксаля (см. 4.19.3) 0,1 моль/дм³ HCl (см. 4.8) и доводят до 100 см³. Полученный раствор хранению не подлежит.

4.20.4 Стандартный раствор пиридоксамина (PM) II, ρ(PM) приблизительно 1 мкг/см³

Разбавляют 10 см³ исходного раствора пиридоксамина (см. 4.20.1) 0,1 моль/дм³ HCl (см. 4.8) и доводят до 100 см³. Полученный раствор хранению не подлежит.

4.20.5 Стандартный раствор пиридоксаля (PL) II, ρ(PL) приблизительно 1 мкг/см³

Разбавляют 10 см³ стандартного раствора пиридоксаля (см. 4.20.2) 0,1 моль/дм³ HCl (см. 4.8) до 100 см³. Полученный раствор хранению не подлежит.

4.20.6 Стандартный раствор пиридоксина (PN) II, ρ(PL) приблизительно 1 мкг/см³

Разбавляют 10 см³ стандартного раствора пиридоксина (см. 4.20.3) 0,1 моль/дм³ HCl (см. 4.8) и доводят до 100 см³. Полученный раствор хранению не подлежит.

4.20.7 Проверка хроматографической чистоты методом ВЭЖХ

Чистота образцов сравнения может быть проверена методом ВЭЖХ, как описано ниже: вводят соответствующие объемы PM, PL и PN стандартных растворов I (см. 4.20.1, 4.20.2, 4.20.3) в систему ВЭЖХ и анализируют, как установлено в 6.4.

Степень чистоты образцов сравнения R_i, %, вычисляют по формуле

$$R_i = \frac{x_i \cdot 100}{x_i + B}, \qquad (2)$$

где x_i – площадь пика образца сравнения i;

B – сумма площадей пиков загрязняющих веществ (без пика растворителя).

Хроматографическая чистота образцов сравнения должна быть не менее 98 %, в ином случае используют новые образцы сравнения или готовят новые стандартные растворы.

4.21 Смешанный градуировочный раствор (например ρ(PM, PL, PN) = 0,1 мкг/см³ до 10 мкг/см³)

Отбирают пипеткой подходящие объемы исходных растворов PM, PL и PN (см. 4.19.1 – 4.19.3) или стандартных растворов (см. 4.20.1 – 4.20.6) в мерную колбу вместимостью 20 см³ и при необходимости доводят 0,1 моль/дм³ HCl (см. 4.8) до объема 6,5 см³. Доводят pH до значения 4,8 ед. pH, используя раствор ацетата натрия молярной концентрацией 2,5 моль/дм³ (см. 4.5), а затем доводят pH до значения 3,0 ед. pH, используя серную кислоту (см. 4.10), объем содержимого в колбе доводят водой до метки и перемешивают (градуировочные растворы). Рекомендуется использовать не менее трех градуировочных точек. При необходимости допускается разбавление смешанных градуировочных растворов подвижной фазой до ввода в хроматограф.

5 Оборудование

5.1 Общие положения

Используют общепринятое лабораторное оборудование, стеклянную посуду, вспомогательное оборудование и следующие средства измерений.

5.2 УФ-спектрофотометр, пригодный для измерения оптической плотности при определенных длинах волн.

5.3 Нагревательные приборы

Используют лабораторный автоклав и печь или водяную баню, оборудованные мешалками и позволяющие устанавливать температуру на уровне 37 °C.

5.4 Система для ВЭЖХ

Система для ВЭЖХ состоит из насоса, устройства для ввода проб, флуоресцентного детектора, обеспечивающего длину волны возбуждения 290 нм и длину волны регистрации 390 нм, интегратора или устройства для обработки данных, устройства для постколоночной дериватизации.

5.5 Колонки для ВЭЖХ

Используют обращенно-фазовую колонку со следующими характеристиками:

Luna™ RP C_{18}, 5 мкм[1)], размер частицы 5 мкм, диаметр 4,0 мм, длина 250 мм[2)]. Другие примеры подходящих колонок для ВЭЖХ приведены в приложении В.

5.6 Устройства фильтровальные

Фильтрация подвижной фазы, а также раствора анализируемой пробы через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм перед использованием или вводом проб увеличит срок службы колонок.

6 Методика проведения испытания

6.1 Подготовка анализируемой пробы

Отбирают и гомогенизируют анализируемую пробу. Измельчают материал в соответствующем смесителе-мельнице и снова перемешивают. Чтобы не подвергать пробу воздействию высокой температуры в течение длительного периода времени, необходимо предварительно ее охладить. После гомогенизации пробу сразу анализируют.

6.2 Подготовка раствора анализируемой пробы

6.2.1 Экстракция

6.2.1.1 Общие положения

Из проб с высоким содержанием жира (более 25 %) следует удалить жир, например, путем обработки петролейным эфиром перед кислотным гидролизом.

Для обработки пенящихся материалов рекомендуется использование нескольких капель силиконового масла (см. 4.17).

Значение pH экстрагированного раствора должно быть приблизительно 1 ед. pH. В ином случае рекомендуется уменьшить массу пробы или использовать соляную кислоту с более высокой концентрацией [(например, 0,2 моль/дм^3 (см. 4.9)

[1)] Luna™ – это пример продукта, доступного на рынке, поставляемого фирмой Phenomenex. Данная информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламой указанного продукта со стороны CEN. Допускается использовать аналогичную продукцию, если она позволяет получать сопоставимые результаты.

[2)] Допускается использовать размеры частиц или колонок, которые отличаются от установленных в настоящем стандарте. Параметры разделения должны адаптироваться к таким материалам, чтобы гарантировать эквивалентные результаты. Критерий эффективности функционирования подходящих аналитических колонок является базовым разрешением рассматриваемых веществ, определяемых при анализе.

или 1 моль/дм^3 (см. 4.7)].

6.2.1.2 Экстракция из сухих продуктов (содержание воды менее 20 %; например, в крупах, сухом молоке, сушеных овощах)

Взвешивают от 1 до 10 г гомогенизированной анализируемой пробы (см. 6.1) с точностью до миллиграмма в конической колбе вместимостью 150 см^3, добавляют 50 см^3 0,1 моль/дм^3 соляной кислоты (см. 4.8), перемешивают и проверяют, чтобы значение pH составляло приблизительно 1 ед. pH.

Нагревают в автоклаве (см. 5.3) в течение 30 мин при температуре 120 °С, затем охлаждают до комнатной температуры, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3, объем содержимого в колбе доводят водой до 100 см^3 (с возможным силиконовым слоем выше метки) и перемешивают.

Фильтруют или центрифугируют при 3000 об/мин аликвотную часть (приблизительно 50 см^3) пробы, обработанной кислотой, и отбирают верхний слой в герметичные стеклянные емкости (данный раствор является экстрактом пробы).

6.2.1.3 Экстракция из продуктов с высоким содержанием влаги (более 20 %) и жидких продуктов (например, в мясе, овощах, соках)

Взвешивают от 2 до 40 г гомогенизированной пробы (см. 6.1) с точностью до миллиграмма в конической колбе вместимостью 150 см^3, добавляют 10 см^3 1 моль/дм^3 соляной кислоты (см. 4.7), доводят водой до приблизительно 50 см^3, перемешивают и проверяют, чтобы значение pH составляло приблизительно 1 ед. pH.

Нагревают в автоклаве (см. 5.3) в течение 30 мин при температуре 120 °С, затем охлаждают до комнатной температуры, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и объем содержимого в кобле доводят водой до 100 см^3 (с возможным силиконовым слоем выше метки) и перемешивают.

Фильтруют или центрифугируют при 3000 об/мин аликвотную часть (приблизительно 50 см^3) пробы, обработанной кислотой, и отбирают верхний слой в герметичные стеклянные емкости (данный раствор является экстрактом пробы).

Примечание – Во время автоклавирования может произойти взаимное превращение различных форм витамина, например, путем трансаминирования. Это часто наблюдается в приготовленном мясе или в пробах с высоким содержанием свободных аминогрупп (см. [2], [7]).

6.2.2 Ферментативная обработка и этапы подготовки проб трансформации

Для проб пищевой продукции животного происхождения (свинина, молоко, рыба и т. д.), которые не содержат β-глюкозилированного связанного пиридоксина, ферментативная обработка β-глюкозидазой не является необходимой. Лабораторные эксперименты показывают, что результаты определения общего содержания витамина B_6 в пищевой продукции, полученные с применением и без применения β-глюкозидазы для ферментативной обработки, были приблизительно одинаковыми (см. [2], [7]).

Отбирают пипеткой 12,5 см³ экстракта пробы по 6.2.1.2, 6.2.1.3 в коническую колбу вместимостью 20 см³ и доводят pH до значения (4,8 ± 0,1) ед. pH, используя раствор ацетата натрия (см. 4.5). Добавляют 1 см³ раствора кислой фосфатазы (см. 4.13) и 1 см³ раствора β-глюкозидазы (см. 4.15) и перемешивают. Накрывают коническую колбу и инкубируют раствор в течение не менее 12 ч или в течение ночи при температуре 37 °С, постоянно перемешивая.

После охлаждения до комнатной температуры доводят pH до значения приблизительно 3 ед. pH, используя серную кислоту (см. 4.10), переливают отрегулированный раствор количественно в мерную колбу вместимостью 20 см³ и объем содержимого в колбе доводят до метки водой. Встряхивают и фильтруют через сухой складчатый бумажный фильтр, удаляют первые 5 см³ фильтрата.

Подготовленный раствор пробы хранят до 3 сут в холодильнике при температуре около 4 °С.

Перед хроматографическим анализом фильтруют аликвоту (приблизительно 2 см³) через мембранный фильтр (см. 5.6) и разбавляют подвижной фазой, если необходимо.

6.3 Подготовка «холостой» пробы

Отбирают пипеткой 12,5 см³ раствора соляной кислоты (см. 4.8) в коническую колбу вместимостью 20 см³ и доводят pH до значения (4,8 ± 0,1) ед. pH, используя раствора ацетата натрия молярной концентрацией 2,5 моль/дм³ (см. 4.5). Добавляют 1 см³ раствора кислой фосфатазы (см. 4.13) и 1 см³ раствора β-глюкозидазы (см. 4.15) и перемешивают. Инкубируют раствор в течение не менее 12 ч или в течение ночи при температуре 37 °С при постоянном перемешивании.

После охлаждения до комнатной температуры доводят pH до значения приблизительно 3 ед. pH, используя серную кислоту (см. 4.10), переливают количественно в мерную колбу вместимостью 20 см³, объем содержимого в колбе

доводят водой до метки, встряхивают и фильтруют через сухой складчатый бумажный фильтр, удаляя первые 5 см³ фильтрата.

Перед хроматографическим анализом фильтруют аликвоту (приблизительно 2 см³) через мембранный фильтр (см. 5.6) и разбавляют подвижной фазой, если необходимо.

6.4 Условия хроматографического анализа

Эффективность системы ВЭЖХ должна обеспечивать разделение пиков PM, PL и PN друг от друга, а также от пиков всех других веществ пробы до базовой линии.

Установлено, что разделение и количественное определение является удовлетворительным при следующих условиях:

Колонка ВЭЖХ – в соответствии с 5.5;

Подвижная фаза – в соответствии с 4.16;

Расход жидкости – 1,5 см³/мин;

Вводимый объем – от 1 до 50 мм³;

Детектор – флуоресцентный: длина волны возбуждения (E_x) – 290 нм;

длина волны эмиссии (E_m) – 390 нм.

6.5 Идентификация

Вводят одинаковые подходящие объемы раствора анализируемой пробы (см. 6.2.2), «холостой» пробы (см. 6.3) и смешанных градуировочных растворов (см. 4.21) в систему ВЭЖХ в условиях по 6.4.

Идентифицируют пики PM, PL и PN путем сравнения времени удерживания пиков на хроматограммах раствора анализируемой пробы и стандартного раствора. Идентификацию пика допускается также проводить с помощью сдвига значения pH в сторону увеличения, например при установлении pH = 6,6 ед. pH при использовании устройства постколоночной дериватизации (см. 5.4) при скорости потока послеколоночного реагента 0,1 см³/мин (см. 4.6). Обнаружение осуществляется при возбуждении при 330 нм и регистрации при 390 нм (см. [2], [4], [5]).

Примечание – Увеличение значения pH путем использования послеколоночного реагента (см. 4.6) приводит к сдвигу длины волны возбуждения до 330 нм. Кроме того, избирательность матриц улучшается в связи с уменьшением матрицы пиков ([2], [4], [5]).

6.6 Определение

Вводят одинаковые подходящие объемы стандартного раствора, а также раствора анализируемой пробы в систему ВЭЖХ согласно условиям по 6.4. Для

определения содержания методом внешней градуировки определяют среднее значение площади пиков или высоты пиков и сравнивают результаты с соответствующими значениями образца сравнения.

7 Вычисление результата

7.1 Вычисление проводят с использованием градуировочной зависимости, либо соответствующих программ интегратора, либо в соответствии с нижеприведенными формулами (3) – (6).

Массовую долю пиридоксамина (PM), пиридоксаля (PL) или пиридоксина (PN), w, мг/100 г пробы вычисляют по формуле

$$w = \frac{y_i}{m} \cdot \frac{F \cdot 100}{1000}, \quad (3)$$

где y_i – содержание PM, PL и PN, определенное по площади пика или высоте пика с использованием линейной регрессии или градуировочной зависимости, мкг/20 см^3 раствора анализируемой пробы (см. 6.2.2)

m – масса пробы, г;

F – коэффициент разбавления из формулы (6);

Значение y_i вычисляют по формуле

$$y_i = b_i x_i + a_i, \quad (4)$$

где b_i, a_i – коэффициенты регрессии для PM, PL или PN, вычисленные методом линейной регрессии на основе концентрации и площади пика в градуировочных растворах;

x_i – откорректированная площадь пика раствора анализируемой пробы PM, PL или PN;

Значение x_i вычисляют по формуле

$$x_i = P_i - B_i, \quad (5)$$

где P_i – площади пика PM, PL или PN для раствора анализируемой пробы;

B_i – площади пика PM, PL или PN для «холостой» пробы.

Коэффициент разбавления F вычисляют по формуле

$$F = \frac{V}{V_1}, \quad (6)$$

где V – общий объем раствора кислой вытяжки пробы (см. 6.2.1.2), (см. 6.2.1.3), см^3;

V_1 – общий объем раствора кислой вытяжки пробы, подвергнутый ферментативной обработке (см. 6.2.2), см^3.

7.2 Массовую долю витамина B_6 в пересчете на пиридоксин w, мг/100 г пробы вычисляют по формуле

$$w = 1{,}006 w_{PM} + 1{,}012 w_{PL} + w_{PN}, \quad (7)$$

где

1,006 – коэффициент для пересчета PM на PN;

w_{PM} – содержание пиридоксамина, мг/100 г пробы;

1,012 – коэффициент для пересчета PL на PN.

w_{PL} – содержание пиридоксаля, мг/100 г пробы;

w_{PN} – содержание пиридоксина, мг/100 г пробы;

7.3 Массовую долю витамина B_6 в пересчете на пиридоксин выражают в миллиграммах на 100 г пробы.

Примечание – Если необходимо представить результат в пересчете на гидрохлорид пиридоксина, используют коэффициент пересчета 1,216. Сведения о проведении пересчета должны быть четко указаны в протоколе испытания.

8 Прецизионность

8.1 Общие положения

Данные по прецизионности для определения витамина B_6 были установлены в ходе межлабораторных испытаний в соответствии с [8], проведенных бывшим BgVV (Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (Немецкий федеральный институт по защите прав потребителей и ветеринарной медицине).

Подробная информация о совместном испытании точности метода приведена в приложении А. Значения, полученные в ходе межлабораторных испытаний, могут быть не применимы к диапазонам концентраций и пробам, не приведенным в приложении А.

Применимость и надежность настоящего метода были подтверждены в ходе испытаний различной пищевой продукции, например мяса, рыбы, молока, овощей, фруктов и злаков (см. [2], [3]). Полученные результаты были в достаточной степени воспроизводимы, и только иногда наблюдались относительно небольшие мешающие влияния матричных пиков проб, которые могут быть легко устранены. Для градуировочных растворов наблюдается сильно выраженная корреляция и линейная регрессия между площадью пика и концентрацией PM, PL и PN соответственно. Относительные стандартные отклонения от общего содержания витамина B_6 в последовательности, включающей от трех до пяти определений в различных продуктах, варьируются от 2 % до 6 %.

Полнота извлечения PM, PL и PN варьируется от 85 % до 105 % (см. [2], [3]). Определение общего содержания витамина B_6 настоящим методом дает в результате значительно более высокие значения в пищевой продукции растительного происхождения (содержащих гликозилированный пиридоксин), чем другие методы, в которых не используется обработка β-глюкозидазой (см. [2], [3], [7]).

8.2 Повторяемость

Абсолютное расхождение между двумя отдельными результатами испытания, которые были получены при использовании одного и того же метода на идентичном испытательном материале одним и тем же оператором на одном и том же оборудовании в течение короткого промежутка времени, не должно превышать предел повторяемости *r* более чем в 5 % случаев.

Значения для порошковой манной крупы с молоком:

Пиридоксамин	$\bar{x}$ = 0,065 мг/100 г	r = 0,008
Пиридоксаль	$\bar{x}$ = 0,080 мг/100 г	r = 0,022
Пиридоксин	x = 0,523 мг/100 г	r = 0,067
Витамин B_6	$\bar{x}$ = 0,667 мг/100 г	r = 0,084

Значения для порошкового картофельного пюре:

Пиридоксамин	$\bar{x}$ = 0,163 мг/100 г	r = 0,016
Пиридоксаль	$\bar{x}$ = 0,032 мг/100 г	r = 0,012
Пиридоксин	$\bar{x}$ = 1,008 мг/100 г	r = 0,080
Витамин B_6	$\bar{x}$ = 1,204 мг/100 г	r = 0,089

Значения для овощей с ветчиной (детское питание):

Пиридоксамин	$\bar{x}$ = 0,043 мг/100 г	r = 0,005
Пиридоксаль	$\bar{x}$ = 0,009 мг/100 г	r = 0,004
Пиридоксин	$\bar{x}$ = 0,047 мг/100 г	r = 0,010
Витамин B_6	$\bar{x}$ = 0,107 мг/100 г	r = 0,011

Значения для мультивитаминного напитка:

Пиридоксамин	$\bar{x}$ = 0,004 мг/100 г	r = 0,003
Пиридоксаль	$\bar{x}$ = 0,004 мг/100 г	r = 0,003
Пиридоксин	$\bar{x}$ = 0,374 мг/100 г	r = 0,056
Витамин B_6	$\bar{x}$ = 0,380 мг/100 г	r = 0,056

8.3 Воспроизводимость

Абсолютное расхождение между результатами двух единичных испытаний, полученными на идентичном объекте испытаний, двумя лабораториями должно превышать предел воспроизводимости R не более чем в 5 % случаев.

Значения для порошковой манной крупы с молоком:

Пиридоксамин	$\bar{x}$ = 0,065 мг/100 г	R = 0,035
Пиридоксаль	$\bar{x}$ = 0,080 мг/100 г	R = 0,071
Пиридоксин	$\bar{x}$ = 0,523 мг/100 г	R = 0,151
Витамин B_6	$\bar{x}$ = 0,667 мг/100 г	R = 0,193

Значения для порошкового картофельного пюре:

Пиридоксамин	$\bar{x}$ = 0,163 мг/100 г	R = 0,089
Пиридоксаль	$\bar{x}$ = 0,032 мг/100 г	R = 0,022
Пиридоксин	$\bar{x}$ = 1,008 мг/100 г	R = 0,314
Витамин B_6	$\bar{x}$ = 1,204 мг/100 г	R = 0,369

Значения для овощей с ветчиной (детское питание):

Пиридоксамин	$\bar{x}$ = 0,043 мг/100 г	R = 0,013
Пиридоксаль	$\bar{x}$ = 0,009 мг/100 г	R = 0,013
Пиридоксин	$\bar{x}$ = 0,047 мг/100 г	R = 0,021
Витамин B_6	$\bar{x}$ = 0,107 мг/100 г	R = 0,039

Значения для мультивитаминного напитка:

Пиридоксамин	$\bar{x}$ = 0,004 мг/100 г	R = 0,005
Пиридоксаль	$\bar{x}$ = 0,004 мг/100 г	R = 0,005

Пиридоксин	$\bar{x}$ = 0,374 мг/100 г	R = 0,086
Витамин B_6	$\bar{x}$ = 0,380 мг/100 г	R = 0,095

9 Протокол испытания

Протокол испытания должен содержать по меньшей мере следующие сведения:

a) всю информацию, необходимую для полной идентификации пробы;

b) ссылку на настоящий стандарт или используемый метод;

c) дату и метод отбора пробы (если они известны);

d) дату поступления пробы в лабораторию;

e) дату проведения испытания;

f) результаты и единицы, в которых выражены результаты испытания;

g) информацию о других специфичных особенностях, которые наблюдались в ходе проведения испытания;

h) информацию о других особенностях, не установленных в настоящем методе или рассматриваемых как дополнительные, которые могут повлиять на результаты испытания.

Приложение А
(справочное)

Данные по прецизионности

Имеющиеся данные были получены с использованием методов ВЭЖХ, установленных в приложении С. Данные результатов испытаний для определения витамина B_6 были установлены в ходе межлабораторных испытаний в соответствии с [8], проведенных бывшим BgVV [Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (Немецкий федеральный институт по защите прав потребителей и ветеринарной медицине)].

Таблица А.1 – Данные результатов испытаний для порошковой манной крупы с молоком

Проба	Порошковая манная крупа с молоком			
Вещество, определяемое при анализе	Пиридоксамин	Пиридоксаль	Пиридоксин	Витамин B_6[a)]
Год совместного исследования	2000			
Количество лабораторий	11			
Количество проб	5			
Количество лабораторий, оставшихся после исключения выбросов	10			
Количество оставшихся результатов	53			
Среднее значение x, мг/100 г	0,065	0,080	0,523	0,667
Стандартное отклонение повторяемости s_r, мг/100 г	0,003	0,008	0,024	0,030
Относительное стандартное отклонение повторяемости RSD_r, %	4,6	10,0	4,6	4,5
Значение повторяемости r $(2{,}8 \cdot s_r)$, мг/100 г	0,008	0,022	0,067	0,084
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мг/100 г	0,013	0,025	0,053	0,068
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости RSD_R, %	20,5	31,3	10,1	10,2
Значение воспроизводимости R $(2{,}8 \cdot s_R)$, мг/100 г	0,035	0,071	0,151	0,193
Среднее значение коэффициента извлечения компонента, %	97,2	94,7	93,9	–
Стандартное отклонение коэффициента извлечения компонента, %	9	8,2	9,7	–
Количество результатов, использованных для расчета	23	20	23	–

[a)] См. формулу (7).

Таблица А.2 – Данные результатов испытаний для порошкового картофельного пюре

Проба	Порошковое картофельное пюре			
Вещество, определяемое при анализе	Пиридоксамин	Пиридоксаль	Пиридоксин	Витамин B_6[a)]
Год совместного исследования	2000			
Количество лабораторий	10			
Количество проб	5 (9)			
Количество лабораторий, оставшихся после исключения выбросов	9			
Количество оставшихся результатов	49			
Среднее значение $\bar{x}$, мг/100 г	0,163	0,032	1,008	1,204
Стандартное отклонение повторяемости s_r, мг/100 г	0,006	0,004	0,028	0,032
Относительное стандартное отклонение повторяемости RSD_r, %	3,7	12,3	2,8	2,7
Значение повторяемости r ($2,8 \cdot s_r$), мг/100 г	0,016	0,012	0,080	0,089
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мг/100 г	0,031	0,008	0,111	0,131
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости RSD_R, %	19,0	25,0	11,0	10,9
Значение воспроизводимости R ($2,8 \cdot s_R$), мг/100 г	0,089	0,022	0,314	0,369
Среднее значение коэффициента извлечения компонента, %	97,7	85,2	90,8	–
Стандартное отклонение коэффициента извлечения компонента, %	9,4	7,4	9,9	–
Количество результатов, использованных для расчета	19	20	20	–

[a)] См. формулу (7).

Таблица А.3 – Данные результатов испытаний для овощей с ветчиной (детское питание)

Проба	Овощи с ветчиной (детское питание)			
Вещество, определяемое при анализе	Пиридоксамин	Пиридоксаль	Пиридоксин	Витамин B_6[a)]
Год совместного исследования	2000			
Количество лабораторий	9			
Количество проб	5(2)			
Количество лабораторий, оставшихся после исключения выбросов	8			
Количество оставшихся результатов	37			
Среднее значение $\bar{x}$, мг/100 г	0,043	0,009	0,047	0,107
Стандартное отклонение повторяемости s_r, мг/100 г	0,002	0,001	0,003	0,004
Относительное стандартное отклонение повторяемости RSD_r, %	4,4	15,4	7,2	3,6
Значение повторяемости r $(2,8 \cdot s_r)$, мг/100 г	0,005	0,004	0,010	0,011
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мг/100 г	0,005	0,005	0,007	0,014
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости RSD_R, %	11,0	50,5	15,7	12,8
Значение воспроизводимости R $(2,8 \cdot s_R)$, мг/100 г	0,013	0,013	0,021	0,039
Среднее значение коэффициента извлечения компонента, %	95,1	90,6	88,9	–
Стандартное отклонение коэффициента извлечения компонента, %	4,5	12,0	10,2	–
Количество результатов, использованных для расчета	18	16	19	–

[a)] См. формулу (7).

Таблица А.4 – Данные результатов испытаний для мультивитаминного напитка

Проба	Мультивитаминный напиток			
Вещество, определяемое при анализе	Пиридоксамин	Пиридоксаль	Пиридоксин	Витамин B_6[a)]
Год совместного исследования	2000			
Количество лабораторий	11			
Количество проб	5			
Количество лабораторий, оставшихся после исключения выбросов	10			
Количество оставшихся результатов	53			
Среднее значение $\bar{x}$, мг/100 г	0,004	0,004	0,373	0,380
Стандартное отклонение повторяемости s_r, мг/100 г	0,001	0,001	0,020	0,020
Относительное стандартное отклонение повторяемости RSD_r, %	25,0	25,0	5,4	5,3
Значение повторяемости r $(2,8 \cdot s_r)$, мг/100 г	0,003	0,003	0,056	0,056
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мг/100 г	0,002	0,002	0,030	0,034
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости RSD_R, %	38,6	49	8,0	8,8
Значение воспроизводимости R $(2,8 \cdot s_R)$, мг/100 г	0,005	0,005	0,086	0,095
Среднее значение коэффициента извлечения компонента, %	98,1	94,5	98,2	–
Стандартное отклонение коэффициента извлечения компонента, %	11,4	6,2	8,4	–
Количество результатов, использованных для расчета	23	23	23	–

[a)] См. формулу (7).

Приложение В
(справочное)

Примеры подходящих условий проведения ВЭЖХ для определения соединений витамина B_6

Таблица В.1 – Примеры подходящих условий ВЭЖХ для определения соединений витамина B_6

Лаборатория	Разделительная колонка	Размеры, мм × мм	Температура, °С	Подвижная фаза	Расход, $см^3$/мин	Обнаружение, нм		Время удерживания, мин		
						E_x	E_m	PM [b]	PL [c]	PN [d]
1a	LUNA RP C_{18}, 5 мкм	250 × 4,0	30	H_2SO_4 (c = 0,015 моль/$дм^3$), содержание ТХУ(c = 0,005 моль/$дм^3$)	1,5	290	390	~3	~7	~11,4
1b	LUNA RP C_{18}, 5 мкм	250 × 4,0	30	H_2SO_4 (c = 0,015 моль/$дм^3$), содержание ТХУ(c = 0,005 моль/$дм^3$)	1,5	330	390	~2,4	~6,9	~11,2
				и послеколоночный реагент: K_2HPO_4 (c = 0,15 моль/$дм^3$)	0,5					
2	LUNA RP C_{18}, 5 мкм	250 × 4,0	30	H_2SO_4 (c = 0,015 моль/$дм^3$), содержание ТХУ(c = 0,005 моль/$дм^3$)	1,5	290	390	~3	~7,9	~13,0
3	AQUA C_{18}, 5 мкм [a]	250 × 4,6	30	H_2SO_4 (c = 0,015 моль/$дм^3$), содержание ТХУ(c = 0,005 моль/$дм^3$)	2,0	290	390	~2,2	~4,7	~6,4
	Предколонка: RP C_{18}, 5 мкм	4,0 × 3,0			1,5			~2,7	~5,4	~6,9
4	LiChrospher 60 RP C_8	250 × 4,0	30	H_2SO_4 (c = 0,03 моль/$дм^3$), содержание ТХУ (c = 0,05 моль/$дм^3$) от 0 до 14 мин В: Метанол, от 14 до 21 мин						
	Выборка В, 5 мкм				3,0	290	390	~2,5	~4,8	~6,1

Окончание таблицы В.1

Лаборатория	Разделительная колонка	Размеры, мм × мм	Температура, °С	Подвижная фаза	Расход, см³/мин	Обнаружение, нм		Время удерживания, мин		
						E_x	E_m	PM [b]	PL [c]	PN [d]
5	Nucleosil 120 C_{18}, 5 мкм Предколонка: RP C_{18}	250 × 4,0	~ 20	H_2SO_4 (c = 0,015 моль/дм³), содержание ТХУ (c = 0,005 моль/дм³)	2,0	290	390	~2,0	~4,9	~7,0
6	LUNA RP C_{18}, 5 мкм	250 × 4,0	30	H_2SO_4 (c = 0,015 моль/дм³), содержание ТХУ (c = 0,005 моль/дм³)	2,0	290	390	~2,5	~6,3	~9,2
7	LUNA RP C_{18}, 5 мкм	250 × 4,0	30	H_2SO_4 (c = 0,015 моль/дм³), содержание ТХУ (c = 0,005 моль/дм³)	2,0	290	390	~2,8	~6,5	~11,8
8	LUNA RP C_{18}, 5 мкм	250 × 4,0	30	H_2SO_4 (c = 0,015 моль/дм³), содержание ТХУ (c = 0,005 моль/дм³)	2,0	290	390	~2,8	~6,9	~11,4
9	Spherisorb 80 ODS-2, 5 мкм	250 × 4,6	30	H_2SO_4 (c = 0,015 моль/дм³), содержание ТХУ (c = 0,005 моль/дм³)	2,0	290	390	~5,5	~10,4	~16,1
10	LUNA RP C_{18}, 5 мкм	250 × 4,0	30	H_2SO_4 (c = 0,015 моль/дм³), содержание ТХУ (c = 0,005 моль/дм³) и послеколоночный реагент: K_2HPO_4 (c = 0,15 моль/дм³)	1,0 0,5	330	390	~6,9	~17,9	~28,4

[a] Phenomenex, 125 A.
[b] PM – пиридоксамин.
[c] PL – пиридоксаль.
[d] PN – пиридоксин.

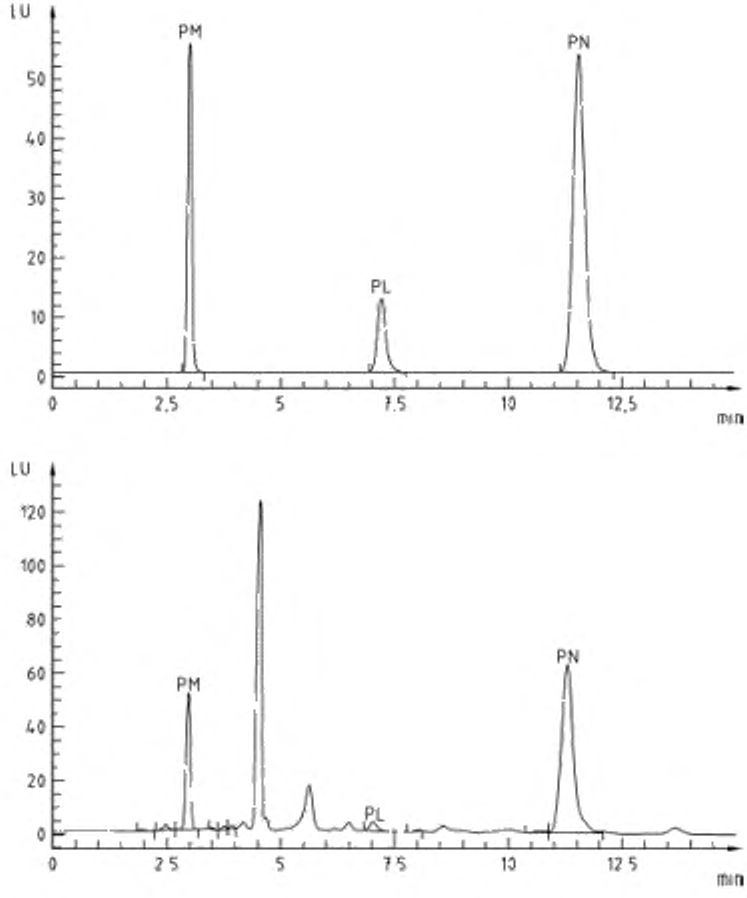
Приложение С
(справочное)

Примеры молярных коэффициентов поглощения

Таблица С.1 – Примеры молярных коэффициентов поглощения *E* соединений витамина B_6 (см. [3], [4])

Соединение	Растворитель	λ_{max}, нм	*E*, ммоль$^{-1}$ см$^{-1}$	M_w, г моль$^{-1}$
Пиридоксина гидрохлорид	0,1 моль/дм^3 HCl, pH приблизительно 1	290	8,6	205,6
Пиридоксина гидрохлорид	0,1 моль/дм^3 фосфатный буферный раствор, pH 7	323,8	7,3	205,6
Пиридоксаля гидрохлорид	0,1 моль/дм^3 HCl, pH приблизительно 1	288	8,96 (9,0)	203,6
Пиридоксаль-5'-фосфат	0,1 моль/дм^3 фосфатный буферный раствор, pH 7	388	5,02	247,1
Пиридоксамина дигидрохлорид	0,1 моль/дм^3 HCl, pH приблизительно 1	292	8,2	241,1
Пиридоксамина дигидрохлорид	0,1 моль/дм^3 фосфатный буферный раствор, pH 7	253	4,6	241,1
Пиридоксамин-5'-фосфат гидрохлорид	0,1 моль/дм^3 фосфатный буферный раствор, pH 7	326	8,37	241,1

Приложение D
(справочное)
Примеры хроматограмм



Обозначения:

LU – интенсивность флуоресценции

Рисунок D.1 – Хроматограммы образцов сравнения и пробы картофельного пюре

Условия хроматографического анализа:
колонка ВЭЖХ – в соответствии с 5.5;
подвижная фаза – в соответствии с 4.16;
расход – 1,5 см^3/мин.
детектор – флуоресцентный: длина волны возбуждения – 290 нм;
длина волны эмиссии – 390 нм.

Приложение ДА
(справочное)

Сведения о соответствии ссылочных европейских стандартов межгосударственным стандартам

Таблица ДА.1

Обозначение ссылочного европейского стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование межгосударственного стандарта
EN ISO 3696	IDT	ГОСТ ISO 3696–2013[1)] «Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы контроля»
Примечание – В настоящей таблице использовано следующее условное обозначение степени соответствия стандарта: IDT – идентичный стандарт		

[1)] В Российской Федерации действует ГОСТ Р 52501–2005 «Вода для лабораторного анализа. Технические условия».

Библиография

[1] Bognar, A.: Bestimmung von Vitamin B_6 in Lebensmitteln mit Hilfe der Hochdruckflüssig-Chromatographie (HPLC) Z Lebensm Unters Forsch A, 1985, 181: 200–205 (Определение содержания витамина B_6 в продуктах питания с использованием ВЭЖХ)

[2] Bognár, A., Ollilainen, V.: Influence of Extraction on the Determination of Vitamin B6 in Food by HPLC Z Lebensm Unters Forsch A, 1997, 204: 327–335 (Влияние экстракции на определение витамина B_6 в пищевых продуктах методом ВЭЖХ)

[3] Metzler, D. E., and Snell, E. E.: Spectra and Ionisation Constants of the Vitamin B6 – Group and Related 3-Hydroxypyridine Derivates Journal of the American Chemical Society. 1955, 77:2431–2437 (Константы спектра и ионизации группы витамина B_6 – группа и связанные производные3-гидроксипиридина)

[4] Bitsch, R., Möller, J., J Chromatogr 1989, 463: 207–211 (Журнал хроматографии)

[5] Ollilainen, V.: HPLC Analysis of Vitamin B6 in Agricultural and Food Science in Finland Department of Applied Chemistry and Microbiology University of Helsinki 1999. Vol. 8:No. 6: 515–619 (Анализ ВЭЖХ витамина B_6 в науках о сельском хозяйстве и продуктах питания в Финляндии)

[6] Bergaentzle, M., Arella, F., Bourguignon, J.B., Hasselmann, C.: Determination of vitamin B6 in foods by HPLC A collaborative study. Food Chemistry, 1995, 52: 81–86 (Определение витамина B_6 в пищевых продуктах методом ВЭЖХ)

[7] Ndaw, S., Bergaentzle, M., Aoude–Werner, D., Hasselmann, C.: Extraction procedures for the liquid chromatographic determination of thiamin Riboflavin and vitamin B6 in foodstuffs Food Chemistry 2000, 71, 129–138 (Процедуры экстракции для определения тиамина, рибофлавина и витамина B_6 в пищевых продуктах методом жидкостной хроматографии)

[8] ISO 5725:1986[1)] Precision of test methods – Determination of repeatability and reproducibility for a standard test method by inter-laboratory tests (Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений)

[1)] ISO 5725:1986 отменен и заменен на ISO 5725-1:1994, ISO 5725-2:1994, ISO 5725-3:1994, ISO 5725-4:1994, ISO 5725-5:1998, ISO 5725-6:1994.

УДК 664:543.544.5.068.7:006.354 МКС 67.050 IDT

Ключевые слова: продукция пищевая, определение, витамин B_6, гликозилированные формы, высокоэффективная жидкостная хроматография

gost.e-ecolog.ru