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)

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	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 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Сущность метода 1
4 Реактивы 1
5 Оборудование 5
6 Методика проведения испытания 5
7 Вычисление результата 7
8 Прецизионность 8
9 Протокол испытания 9
Приложение А (справочное) Данные по прецизионности 10
Приложение В (справочное) Примеры подходящих условий проведения ВЭЖХ для определения соединений витамина B_6 13
Приложение С (справочное) Примеры молярных коэффициентов поглощения 14
Приложение D (справочное) Примеры хроматограмм 15
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии ссылочных европейских стандартов межгосударственным стандартам 16
Библиография 17

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 method

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/дм^3

205 г ацетата натрия (см. 4.3) растворяют в 1 дм^3 воды.

4.6 Реагент послеколоночный (дополнительно), K_2HPO_4 раствор с концентрацией c (K_2HPO_4) = = 0,15 моль/дм^3.

Издание официальное

Растворяют 34,2 г фосфата калия двузамещенного (см. 4.2) в воде, доводят до 1000 см^3, перемешивают и дегазируют.

4.7 Соляная кислота, c(HCl) = 1 моль/дм^3.

4.8 Соляная кислота, c(HCl) = 0,1 моль/дм^3.

4.9 Соляная кислота, c(HCl) = 0,2 моль/дм^3.

4.10 Серная кислота, $c(H_2SO_4)$ = 1 моль/дм^3.

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)].

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[2)].

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

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[2)].

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

[2)] 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.

4.16 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. 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/см^3

71,7 мг пиридоксамина дигидрохлорида (см. 4.18.2) растворяют в соляной кислоте молярной концентрацией 0,1 моль/дм^3 (см. 4.8) в мерной колбе вместимостью 100 см^3, 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/см^3

60,9 мг пиридоксаля гидрохлорида (см. 4.18.3) растворяют в соляной кислоте молярной концентрацией 0,1 моль/дм^3 (см. 4.8) в мерной колбе вместимостью 100 см^3, 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/см^3

60,8 мг пиридоксина гидрохлорида (см. 4.18.4) растворяют в соляной кислоте молярной концентрацией 0,1 моль/дм^3 (см. 4.8) в мерной колбе вместимостью 100 см^3, 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 см^3 исходного раствора пиридоксамина (см. 4.19.1), пиридоксаля (см. 4.19.2) и пиридоксина (см. 4.19.3) соответственно в мерные колбы вместимостью 50 см^3 и содержимое колб доводят до метки 0,1 моль/дм^3 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/дм^3 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/дм^3 HCl, pH ~ 1	292	8,2	241,1	0,698
PL·HCl[b)]	0,1 моль/дм^3 HCl, pH ~ 1	288	9,0	203,6	0,821
PN·HCl[c)]	0,1 моль/дм^3 HCl, pH ~ 1	291	8,6	205,6	0,823

[a)] PM·2HCl – Пиридоксамина дигидрохлорид (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/см^3, вычисляют, используя молярный коэффициент поглощения, по формуле

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

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, см^3 (в данном случае V = 50 см^3);

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/см^3

Разбавляют 2 см^3 исходного раствора пиридоксамина (см. 4.19.1) 0,1 моль/дм^3 HCl (см. 4.8) и доводят до 100 см^3. Полученный раствор хранению не подлежит.

4.20.2 Стандартный раствор пиридоксаля (PL) I, ρ(PL) приблизительно 10 мкг/см^3

Разбавляют 2 см^3 исходного раствора пиридоксаля (см. 4.19.2) 0,1 моль/дм^3 HCl (см. 4.8) и доводят до 100 см^3. Полученный раствор хранению не подлежит.

4.20.3 Стандартный раствор пиридоксина (PN) I, ρ(PL) приблизительно 10 мкг/см^3

Разбавляют 2 см^3 исходного раствора пиридоксаля (см. 4.19.3) 0,1 моль/дм^3 HCl (см. 4.8) и доводят до 100 см^3. Полученный раствор хранению не подлежит.

4.20.4 Стандартный раствор пиридоксамина (PM) II, ρ(PM) приблизительно 1 мкг/см^3

Разбавляют 10 см^3 исходного раствора пиридоксамина (см. 4.20.1) 0,1 моль/дм^3 HCl (см. 4.8) и доводят до 100 см^3. Полученный раствор хранению не подлежит.

4.20.5 Стандартный раствор пиридоксаля (PL) II, ρ(PL) приблизительно 1 мкг/см^3

Разбавляют 10 см^3 стандартного раствора пиридоксаля (см. 4.20.2) 0,1 моль/дм^3 HCl (см. 4.8) до 100 см^3. Полученный раствор хранению не подлежит.

4.20.6 Стандартный раствор пиридоксина (PN) II, ρ(PL) приблизительно 1 мкг/см^3

Разбавляют 10 см^3 стандартного раствора пиридоксина (см. 4.20.3) 0,1 моль/дм^3 HCl (см. 4.8) и доводят до 100 см^3. 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

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

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/см^3 до 10 мкг/см^3)

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 см^3 и при необходимости доводят 0,1 моль/дм^3 HCl (см. 4.8) до объема 6,5 см^3. Доводят pH до значения 4,8 ед. pH, используя раствор ацетата натрия молярной концентрацией 2,5 моль/дм^3 (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 °С.

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) 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.

---

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.

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 $см^3$ экстракта пробы по 6.2.1.2, 6.2.1.3 в коническую колбу вместимостью 20 $см^3$ и доводят pH до значения (4,8 ± 0,1) ед. pH, используя раствор ацетата натрия (см. 4.5). Добавляют 1 $см^3$ раствора кислой фосфатазы (см. 4.13) и 1 $см^3$ 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 $см^3$ и объем содержимого в колбе доводят до метки водой. Встряхивают и фильтруют через сухой складчатый бумажный фильтр, удаляют первые 5 $см^3$ фильтрата.

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

Перед хроматографическим анализом фильтруют аликвоту (приблизительно 2 $см^3$) через мембранный фильтр (см. 5.6) и разбавляют подвижной фазой, если необходимо.

6.3 Подготовка «холостой» пробы

Отбирают пипеткой 12,5 $см^3$ раствора соляной кислоты (см. 4.8) в коническую колбу вместимостью 20 $см^3$ и доводят pH до значения (4,8 ± 0,1) ед. pH, используя раствор ацетата натрия молярной концентрацией 2,5 моль/$дм^3$ (см. 4.5). Добавляют 1 $см^3$ раствора кислой фосфатазы (см. 4.13) и 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.

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 $см^3$, объем содержимого в колбе доводят водой до метки, встряхивают и фильтруют через сухой складчатый бумажный фильтр, удаляя первые 5 $см^3$ фильтрата.

Перед хроматографическим анализом фильтруют аликвоту (приблизительно 2 $см^3$) 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 $см^3$/мин;

Вводимый объем – от 1 до 50 $мм^3$;

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 $см^3$/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	$\bar{x}$ = 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 $\bar{x}$, 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

Окончание таблицы А.2

Проба	Порошковое картофельное пюре			
Вещество, определяемое при анализе	Пиридоксамин	Пиридоксаль	Пиридоксин	Витамин B_6 [a)]
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).				

Т а б л и ц а 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

Т а б л и ц а В.1 – Примеры подходящих условий ВЭЖХ для определения соединений витамина В6

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/$дм^3$) и послеколоночный реагент: K_2HPO_4 (c = 0,15 моль/$дм^3$)	1,5 0,5	330	390	~2,4	~6,9	~11,2
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 Выборка В, 5 мкм	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	3,0	290	390	~2,5	~4,8	~6,1
5	Nucleosil 120 C_{18}, 5 мкм Предколонка: RP C_{18}	250 × 4,0	~ 20	H_2SO_4 (c = 0,015 моль/$дм^3$), содержание ТХУ (c = 0,005 моль/$дм^3$)	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/$дм^3$), содержание ТХУ (c = 0,005 моль/$дм^3$)	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/$дм^3$), содержание ТХУ (c = 0,005 моль/$дм^3$)	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/$дм^3$), содержание ТХУ (c = 0,005 моль/$дм^3$)	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/$дм^3$), содержание ТХУ (c = 0,005 моль/$дм^3$)	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/$дм^3$), содержание ТХУ (c = 0,005 моль/$дм^3$) и послеколоночный реагент: K_2HPO_4 (c = 0,15 моль/$дм^3$)	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)

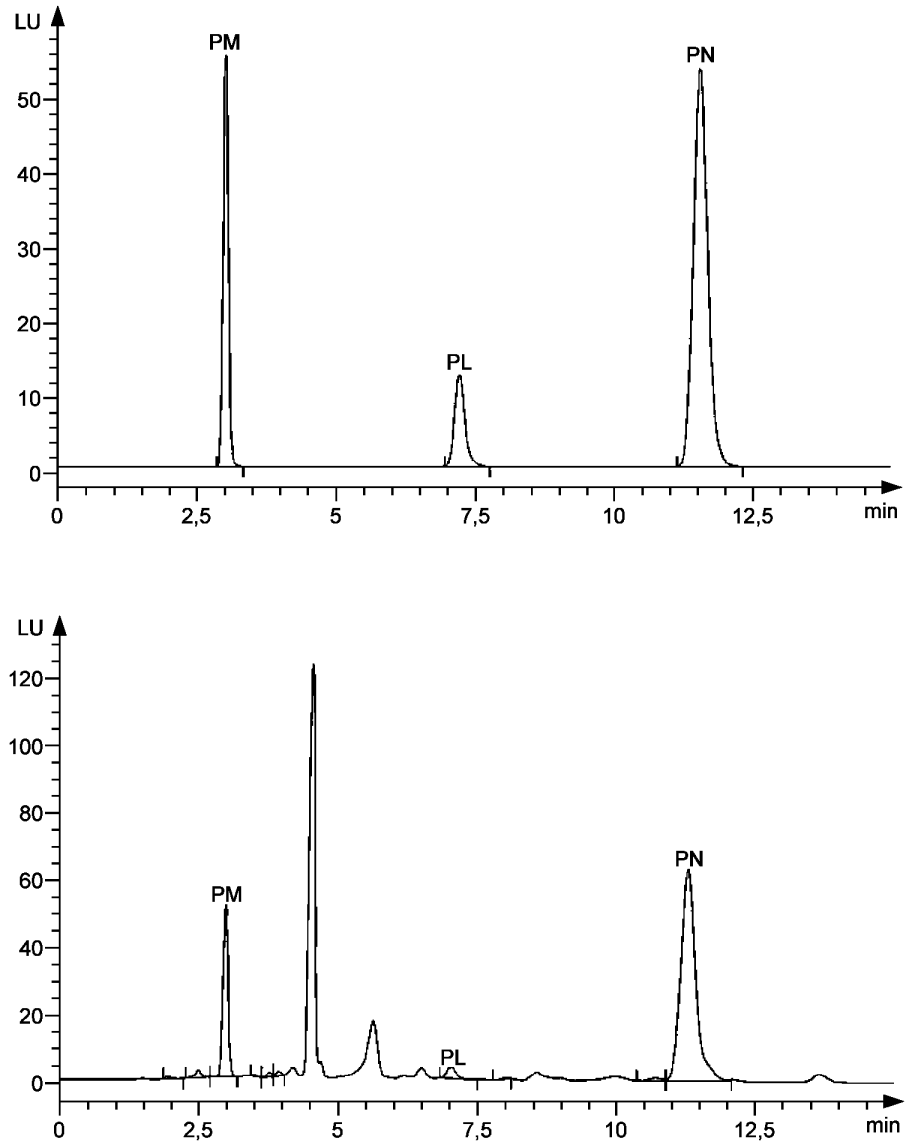
Примеры молярных коэффициентов поглощения

Т а б л и ц а С.1 — Примеры молярных коэффициентов поглощения Е 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 B_6 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 B_6 — 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 производные 3-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 B_6 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 B_6 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

Редактор *К.В. Дудко*
Технический редактор *В.Ю. Фотиева*
Корректор *М.И. Першина*
Компьютерная верстка *Е.О. Асташина*

Сдано в набор 14.07.2016. Подписано в печать 20.07.2016. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,79. Уч.-изд. л. 2,48. Тираж 43 экз. Зак. 1715.
Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Издано и отпечатано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru