МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)
INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ EN 14164— 2014

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Определение витамина B_6 с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии

(EN 14164:2008, IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2016

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и основной 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 Республиканским государственным предприятием «Казахстанский институт стандартизации и сертификации» Комитета технического регулирования и метрологии и Техническим комитетом по стандартизации ТК № 71 «Экологическая безопасность сырья, материалов, веществ и сооружений»*

2 ВНЕСЕН Комитетом технического регулирования и метрологии Министерства индустрии и новых технологий Республики Казахстан

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 29 августа 2014 г. № 69-П)

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
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 11 мая 2016 г. № 295-ст межгосударственный стандарт ГОСТ EN 14164—2014 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2017 г.

5 Настоящий стандарт идентичен европейскому стандарту EN 14164:2008 «Продукты пищевые. Определение витамина B_6 с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии» («Foodstuffs — Determination of vitamin B6 by HPLC», IDT).

Европейский стандарт EN 14164:2008 подготовлен Техническим комитетом CEN/TC 275 «Анализ пищевых продуктов. Горизонтальные методы» Европейского комитета по стандартизации (CEN).

Официальный экземпляр европейского стандарта, на основе которого подготовлен настоящий межгосударственный стандарт, и европейского стандарта, на который дана ссылка, имеются в Федеральном информационном фонде технических регламентов и стандартов.

Сведения о соответствии ссылочных европейских региональных стандартов межгосударственным стандартам приведены в дополнительном приложении ДА.

Степень соответствия — идентичная (IDT)

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

* На основе собственного перевода немецкоязычной версии стандарта, указанного в пункте 5.

*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 4
6 Проведение испытаний 4
7 Обработка результатов 5
8 Протокол испытаний 6
Приложение А (справочное) Пример хроматограммы 7
Приложение В (справочное) Данные о прецизионности 8
Приложение С (справочное) Факультативный способ подготовки пробы без кислотного гидролиза 10
Приложение D (справочное) Примеры молярных коэффициентов поглощения 11
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии ссылочных европейских стандартов межгосударственным стандартам 12
Библиография 13

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

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Определение витамина B_6 с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии

Foodstuffs.
Determination of vitamin B6 by high performance chromatography

Дата введения — 2017—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения витамина B_6 в пищевых продуктах с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (далее — ВЭЖХ). Витамин B_6 представляет собой сумму массовых долей пиридоксина, пиридоксаля, пиридоксамина, включая их фосфорилированные продукты замещения, в пересчете на пиридоксин. Они определяются по методу, указанному в [1], при помощи которого могут быть разделены и количественно определены как индивидуальные соединения — различные витамеры витамина B_6 (пиридоксаль, пиридоксамин, пиридоксин). В [2] определяется общее содержание витамина B_6 микробиологическим методом.

2 Нормативные ссылки

Для применения настоящего стандарта необходим следующий ссылочный нормативный документ. Для датированных ссылок применяют только указанное издание ссылочного документа, для недатированных ссылок применяют последнее издание ссылочного документа (включая все его изменения):

EN ISO 3696:1997 Water for analytical laboratory use — Specification and test methods (Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы испытаний)

3 Сущность метода

Пиридоксаль, пиридоксамин, пиридоксин извлекают из продуктов питания в ходе гидролиза в кислой среде и дефосфорилируют ферментативным путем, используя кислую фосфатазу. В результате реакции с глиоксиловой кислотой в присутствии Fe^{2+} в качестве катализатора пиридоксамин превращается в пиридоксаль, который далее переходит в пиридоксин под воздействием борогидрида натрия в щелочной среде.

Затем пиридоксин количественно определяют в растворе пробы с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуориметрическим детектором [3], [4].

4 Реактивы

4.1 Общие положения

Для испытаний используют реактивы гарантированной чистоты и воду не ниже 1-й степени чистоты в соответствии с EN ISO 3696.

Издание официальное

4.2 Реактивы

4.2.1 Кислая фосфатаза из картофеля, ферментная активность составляет 33 нанокатал/мг[1)] с субстратом нитрофенилфосфатом (при pH = 4,8 и температуре 37 °С), например, производства Boehringer или Sigma. Активность 33 нанокатал/мг соответствует 2 U/мг.

4.2.1.1 Раствор кислой фосфатазы

Готовят раствор кислой фосфатазы в растворе ацетата натрия (см. 4.2.14) массовой концентрации 20 мг/см^3.

Необходимо использовать кислую фосфатазу, а не Така-диастазу для достижения полного гидролиза фосфорилированных форм витамина B_6. Там, где требуется 300 мг Така-диастазы для получения хорошего дефосфорилирования, кислой фосфатазы потребуется всего 0,5 мг (см. [5]).

4.2.1.2 Проверка активности кислой фосфатазы

Проверяют активность каждой новой партии кислой фосфатазы следующим образом. Готовят исходный раствор пиридоксальфосфата массовой концентрации 0,1 мг/см^3 (см. 4.2.9) в воде. Отбирают для экстракции 5,0 см^3 этого раствора и проводят операции, предусмотренные в 6.2.1, 6.2.2, 6.2.3, 6.2.4 и 7.

Рассчитывают коэффициент извлечения пиридоксина из этого раствора и делят на теоретическое количество пиридоксина, выделенного из пиридоксальфосфата. Вычисляют теоретическую массовую концентрацию пиридоксина ρ_{PN}, мг/см^3, выделенного из пиридоксальфосфата по формуле:

$$\rho_{PN} = \frac{\rho_{PLPUV} \cdot M_{PN} \cdot 2 \cdot 5{,}0}{100 \cdot M_{PLP}}, \quad (1)$$

где ρ_{PLPUV} — массовая концентрация пиридоксальфосфата, определенная спектрофотометрическим методом в УФ-области;

M_{PN} — молярная масса образца сравнения витамина B_6 — пиридоксина (M_{PN} = 169,1), г/моль;

2 — коэффициент разбавления при реакции с борогидритом натрия;

5,0 — объем раствора, взятого для экстракции (см. 4.2.1.2), см^3;

100 — общий объем исследуемого раствора пробы, см^3;

M_{PLP} — молярная масса пиридоксальфосфата (M_{PLP} = 265,16), г/моль.

Смешивают 3,0 см^3 исходного раствора пиридоксальфосфата и 10 см^3 соляной кислоты (см. 2.21) в мерной колбе вместимостью 20 см^3 и разбавляют до метки водой. Проверяют концентрацию пиридоксальфосфата путем измерения поглощения при 295 нм в кювете с толщиной слоя 1 см, используя спектрофотометр для УФ-области спектра (см. 5.2) относительно раствора соляной кислоты (см. 4.2.20). Молярный коэффициент поглощения (ε) пиридоксальфосфата в растворе соляной кислоты молярной концентрации 0,1 моль/дм^3 равен 8353.

Рассчитывают массовую концентрацию исходного раствора пиридоксальфосфата ρ_{PLP}, мг/см^3, по формуле:

$$\rho_{PLP} = \frac{A_{295} \cdot M_{PLP}}{\varepsilon} \cdot F, \quad (2)$$

где A_{295} — оптическая плотность раствора при 295 нм;

M_{PLP} — молярная масса пиридоксальфосфата (M_{PLP} = 265,16), г/моль;

F — коэффициент разбавления (в данном случае F = 20/3);

ε — молярный коэффициент поглощения пиридоксальфосфата в 0,1 моль/дм^3 соляной кислоты при 295 нм, дм^{3}моль$^{-1}$см$^{-1}$ (ε = 8353).

4.2.2 Ацетат натрия трехводный (тригидрат), с массовой долей $\omega(CH_3COONa \cdot 3H_2O) \geq 99{,}0$ %.

4.2.3 Ледяная уксусная кислота, с массовой долей $\omega(CH_3COOH) \geq 99{,}8$ %.

4.2.4 Глиоксиловая кислота, с массовой долей $\omega(C_2H_2O_3 \cdot H_2O) \geq 97{,}0$ %.

4.2.5 Сульфат железа (II) 7-водный (гептагидрат), с массовой долей $\omega(FeSO_4 \cdot 7H_2O) \geq 99{,}5$ %.

4.2.6 Гидроксид натрия, с массовой долей $\omega(NaOH) \geq 99{,}0$ %.

4.2.7 Борогидрид натрия, с массовой долей $\omega(NaBH_4) \geq 97{,}0$ %.

4.2.8 Дигидрофосфат калия, с массовой долей $\omega(KH_2PO_4) \geq 99{,}0$ %.

4.2.9 Пиридоксальфосфат (PLP), с массовой долей $\omega \geq 99{,}0$ %.

4.2.10 Ортофосфорная кислота, с массовой долей $\omega(H_3PO_4) \geq 84{,}0$ %.

[1)] Катал (обозначается «кат») — единица измерения активности катализатора в системе СИ. Активность катализатора в один катал увеличивает скорость реакции на один моль/с в заданных условиях.

4.2.11 1-октансульфонат натрия, с массовой долей $\omega(C_8H_{17}NaO_3S) \geq 98,0$ % или 1-гептансульфонат натрия, с массовой долей $\omega(C_7H_{15}NaO_3S) \geq 98,0$ %.

4.2.12 Ацетонитрил (квалификации «для ВЭЖХ»), с массовой долей $\omega(C_2H_3N) \geq 99,8$ %.

4.2.13 Раствор ацетата натрия, массовой концентрации $c(CH_3COONa \cdot 3H_2O) = 2,5$ моль/дм^3.

Растворяют 170,1 г ацетата натрия трехводного (см. 4.2.2) в 500 см^3 воды.

4.2.14 Раствор ацетата натрия, $c(CH_3COONa \cdot 3H_2O) = 0,05$ моль/дм^3 (pH = 4,5).

Растворяют 6,8 г ацетата натрия трехводного (см. 4.2.2) в 1 дм^3 воды. Устанавливают pH = 4,5, используя ледяную уксусную кислоту (см. 4.2.3).

4.2.15 Раствор сульфата железа, $c(FeSO_4 \cdot 7H_2O) = 0,0132$ моль/дм^3.

Растворяют 36,6 мг сульфата железа (II) 7-водного (см. 4.2.5) в 10 см^3 раствора ацетата натрия (см. 4.2.14). Раствор готовят в день использования.

Примечание — В исследовании, описанном в [10], использовался раствор сульфата железа с массовой концентрацией 10 г/дм^3. Эта концентрация была выбрана для осуществления полного превращения пиридоксамина в пиридоксаль на уровне содержания пиридоксамина в 8 раз большего минимального уровня витамина B_6, установленного законодательством США о детских смесях (см. [9]). Такая концентрация не является обязательной для европейских стран.

4.2.16 Раствор гидроксида натрия, $c(NaOH) = 0,2$ моль/дм^3.

Растворяют 800 мг гидроксида натрия (см. 4.2.6) в 100 см^3 воды.

4.2.17 Раствор гидроксида натрия, $c(NaOH) = 6,0$ моль/дм^3.

Растворяют 24 г гидроксида натрия (см. 4.2.6) в 100 см^3 воды.

4.2.18 Раствор борогидрида натрия, $c(NaBH_4) = 0,1$ моль/дм^3.

Растворяют 378 мг борогидрида натрия (см. 4.2.7) в 100 см^3 раствора гидроксида натрия (см. 4.2.16). Раствор готовят в день использования.

4.2.19 Раствор глиоксиловой кислоты, $c(C_2H_2O_3 \cdot H_2O) = 1$ моль/дм^3 (pH = 4,5).

Растворяют 4,7 г моногидрата глиоксиловой кислоты (см. 4.2.4) в 30 см^3 раствора ацетата натрия (см. 4.2.13).

Устанавливают значение pH 4,5, используя раствор гидроксида натрия (см. 4.2.17), и доводят водой до метки в мерной колбе вместимостью 50 см^3. Раствор готовят в день использования.

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

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

4.2.22 Подвижная фаза для ВЭЖХ.

В лабораторный стакан добавляют 940 см^3 воды, 40 см^3 ацетонитрила (см. 4.2.12), 160 мг 1-октансульфоната натрия или 1-гептансульфоната натрия (см. 4.2.11) и 6,8 г дигидрофосфата калия (см. 4.2.8).

После растворения 1-октансульфоната натрия или 1-гептансульфоната натрия и дигидрофосфата калия устанавливают значение pH 2,5, используя ортофосфорную кислоту (см. 4.2.10). Раствор переносят в мерную колбу вместимостью 1 дм^3. Доводят до метки водой. Фильтруют через фильтр с размером пор 0,45 мкм.

4.3 Пиридоксина гидрохлорид (образец сравнения витамина B_6), $\omega(C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl) \geq 99$ %

4.4 Исходный раствор пиридоксина гидрохлорида с массовой концентрацией 0,5 мг/см^3

Растворяют 50 мг пиридоксина гидрохлорида в 100 см^3 воды. Исходный раствор стабилен в течение четырех недель при хранении при температуре 4 °С в темном месте.

Для определения массовой концентрации разбавляют 0,5 см^3 исходного раствора пиридоксина гидрохлорида в 20 см^3 раствора соляной кислоты (см. 4.2.20) молярной концентрации 0,1 моль/дм^3 и измеряют оптическую плотность при 290 нм в кювете с толщиной поглощающего слоя 1 см, используя спектрофотометр для УФ-области спектра (см. 5.2) относительно раствора соляной кислоты молярной концентрации 0,1 моль/дм^3. Рассчитывают массовую концентрацию исходного раствора, мкг/см^3, по формуле:

$$c_{PNHC1} = \frac{A_{290} \cdot M_{PNHC1} \cdot 1000}{\varepsilon} \cdot F, \qquad (3)$$

где A_{290} — оптическая плотность раствора при 290 нм;

M_{PN} — молярная масса стандартного вещества витамина B_6, в г/моль ($M_{PN} = 205,64$);

F — коэффициент разбавления ($F = 40$);

ε — молярный коэффициент поглощения пиридоксина гидрохлорида в растворе соляной кислоты молярной концентрации 0,1 моль/дм^3 при 291 нм, в дм^3/моль$^{-1}$см$^{-1}$ ($\varepsilon = 8600$ по [6]).

Дополнительная информация о молярных коэффициентах поглощения в других растворах, кроме раствора соляной кислоты молярной концентрации 0,1 моль/дм^3 HCl (pH = 1), приведена в приложении D.

4.5 Стандартные растворы

4.5.1 Стандартный раствор пиридоксина гидрохлорида, с($C_8H_{11}NO_3$·HCl) = 10 мкг/см^3

При помощи пипетки переносят 1 см^3 исходного раствора витамина B_6 (см. 4.4) в мерную колбу вместимостью 50 см^3 и доводят водой до метки. Раствор готовят в день использования.

4.5.2 Стандартные рабочие растворы пиридоксина гидрохлорида для ВЭЖХ, с($C_8H_{11}NO_3$· HCl) от 0,1 до 1 мкг/см^3

Готовят ряд соответствующих стандартных рабочих растворов пиридоксина гидрохлорида, массовая концентрация которых варьируется от 0,1 до 1 мкг/см^3, используя стандартный раствор пиридоксина (см. 4.5.1). Эти растворы готовят в день использования.

Проводят проверку пригодности хроматографической системы путем инжектирования смешанного стандартного рабочего раствора пиридоксина (PN) и пиридоксаля (PL). Пиридоксин (PN) и пиридоксаль (PL) должны иметь известную концентрацию в стандартном рабочем растворе для ВЭЖХ. Пиридоксаль (PL) элюируется перед пиридоксином (PN). Пара PN/PL должна иметь разделение до базовой линии. К отдельной пробе добавляют пиридоксамин (PM), чтобы удостовериться в полноте дезаминирования и окисления.

5 Оборудование

Используется следующее лабораторное оборудование:

5.1 Стеклянная посуда.

5.2 Спектрофотометр для УФ-области спектра, предназначенный для измерений оптической плотности при заданных длинах волн.

5.3 Нагревательный прибор.

Печь или водяная баня с приспособлениями для встряхивания.

5.4 Система для высокоэффективной жидкостной хроматографии, состоящая из насоса, устройства для ввода пробы, флуоресцентного детектора с длинами волн возбуждения и регистрации, установленными на 290 и 395 нм соответственно, и системы обработки данных, например, интегратора.

5.5 ВЭЖХ-колонка, например, колонка для обращенно-фазовой хроматографии, такая как LiChrosper®60 RP C8 Select B, размер частиц 5 мкм, диаметр 4,0 мм, длина 250 мм.

Помимо указанных в настоящем стандарте, могут использоваться колонки других типоразмеров и с частицами другого размера. Параметры разделения должны быть адаптированы для таких материалов, чтобы гарантировать получение объективных результатов. Критерий эффективности для аналитических колонок — это полное разделение пиков рассматриваемых анализируемых веществ.

5.6 Фильтровальный прибор.

Фильтрование подвижной фазы, а также исследуемого раствора пробы через мембранный фильтр, например с размером пор фильтра 0,45 мкм, перед использованием или впрыскиванием продлит срок службы колонок.

6 Проведение испытаний

6.1 Подготовка проб для испытаний

Пробу гомогенизируют. Измельчают крупнозернистый материал, используя подходящий измельчитель, и снова перемешивают. Необходимо проводить предварительное охлаждение для избежания длительного воздействия высоких температур.

6.2 Подготовка раствора пробы

6.2.1 Извлечение

Взвешивают соответствующее количество пробы с точностью до 1 мг, например 2,5 г (если содержание витамина B_6 превышает 2 мкг/г) или 5 г (если содержание витамина менее 2 мкг/г), в коническую колбе. Добавляют 50 см^3 раствора соляной кислоты (см. 4.2.20). Нагревают в течение 30 мин. в кипящей водяной бане.

Примечания

1 — Для проб с высоким содержанием воды или низким содержанием витамина B_6 будет полезно увеличить массу пробы, например до 20 г, добавить соответствующий ей объем воды, например 25 см^3, и сразу же добавить непосредственно 5 см^3 соляной кислоты массовой концентрацией c(HCl) = 1 моль/дм^3.

2 — Для проб с высоким содержанием жира желательно удалить его при помощи, например, петролейного эфира перед проведением кислотного гидролиза.

3 — Главным преимуществом предварительного кислотного гидролиза является улучшение этапа фильтрации для проб, содержащих крахмал. Имеющиеся в приложении В данные были в основном получены без проведения кислотного гидролиза. Модификация процедуры (без кислотного гидролиза) приведена в приложении С.

6.2.2 Ферментативная обработка

После охлаждения до комнатной температуры устанавливают в экстракте значение pH, равное 4,5, используя раствор ацетата натрия (см. 2.13), и добавляют 2,5 см^3 раствора глиоксиловой кислоты массовой концентрации 1 моль/дм^3 (см. 4.2.19), 400 мм^3 раствора сульфата железа (см. 4.2.15) и 1 см^3 раствора кислой фосфатазы (см. 4.1.1). Оставляют раствор на ночь при температуре 37 °С при непрерывном перемешивании.

После охлаждения до комнатной температуры доводят раствор водой до метки в мерной колбе вместимостью 100 см^3. Встряхивают и фильтруют. Смешивают 5,0 см^3 отфильтрованного раствора и 4,5 см^3 раствора борогидрида натрия молярной концентрации 0,1 моль/дм^3 (см. 4.2.18). Встряхивают в течение 3 мин. Для обеспечения полного разложения остатка борогидрида натрия можно добавить 0,5 см^3 ледяной уксусной кислоты (см. 4.2.3). При этом принимают во внимание коэффициент разбавления. Встряхивают в течение 1 мин.

Фильтруют через фильтр с размером пор 0,45 мкм. Используют этот отфильтрованный раствор для хроматографического анализа.

6.2.3 Идентификация

Идентифицируют пиридоксин путем сравнения времени удерживания отдельных пиков на хроматограммах раствора анализируемой пробы и стандартного раствора. Идентификацию пиков также можно провести путем добавления образца сравнения витамина B_6 в исследуемый раствор пробы.

Разделение и количественное определение являются удовлетворительными при соблюдении следующих условий испытаний (см. также рисунок А.1).

Неподвижная фаза:	LiChrosper®60 RP C8 Select B, размер частиц 5 мкм, 250 мм x 4,0 мм
Подвижная фаза:	В соответствии с 4.2.22
Скорость потока:	1 см^3/мин
Объем впрыскивания:	30 мм^3
Детектирование: флуориметрическое	Возбуждение: 290 нм, регистрация: 395 нм

6.2.4 Определение методом ВЭЖХ

В хроматографическую систему последовательно вводят равные объемы (до 50 мм^3) стандартного рабочего раствора и раствора анализируемой пробы. При использовании внешнего стандарта вычисляют площадь пика путем интегрирования или же определяют его высоту и сравнивают полученные значения с соответствующими значениями для образца сравнения.

7 Обработка результатов

Вычисление результата проводят либо при помощи градуировочной характеристики, либо с использованием соответствующих программ интегратора или же применяют следующую упрощенную процедуру.

Вычисляют массовую долю витамина B_6 в пересчете на пиридоксин в мг/100 г пробы (W) по формуле:

$$W = \frac{A_S \cdot c \cdot 100 \cdot 2}{A_{st} \cdot m \cdot 1000} \cdot 100 \cdot 0{,}822, \qquad (4)$$

где A_s — площадь или высота пика пиридоксина, полученная для исследуемого раствора исследуемой пробы, в единицах площади или высоты;

c — массовая концентрация пиридоксина гидрохлорида в стандартном рабочем растворе, мкг/см^3;

A_{st} — площадь или высота пика пиридоксина, полученная при использовании стандартного рабочего раствора, в единицах площади или высоты;

m — масса пробы, г;
100 — общий объем исследуемого раствора пробы, $см^3$;
2 — коэффициент разбавления реакции с борогидридом натрия при добавлении уксусной кислоты, в противном случае коэффициент разбавления равен 1,9;
1000 — коэффициент для перевода микрограммов в миллиграммы;
100 — коэффициент для приведения массовой доли к 100 г пробы;
0,822 — коэффициент для пересчета содержания пиридоксина гидрохлорида на пиридоксин.

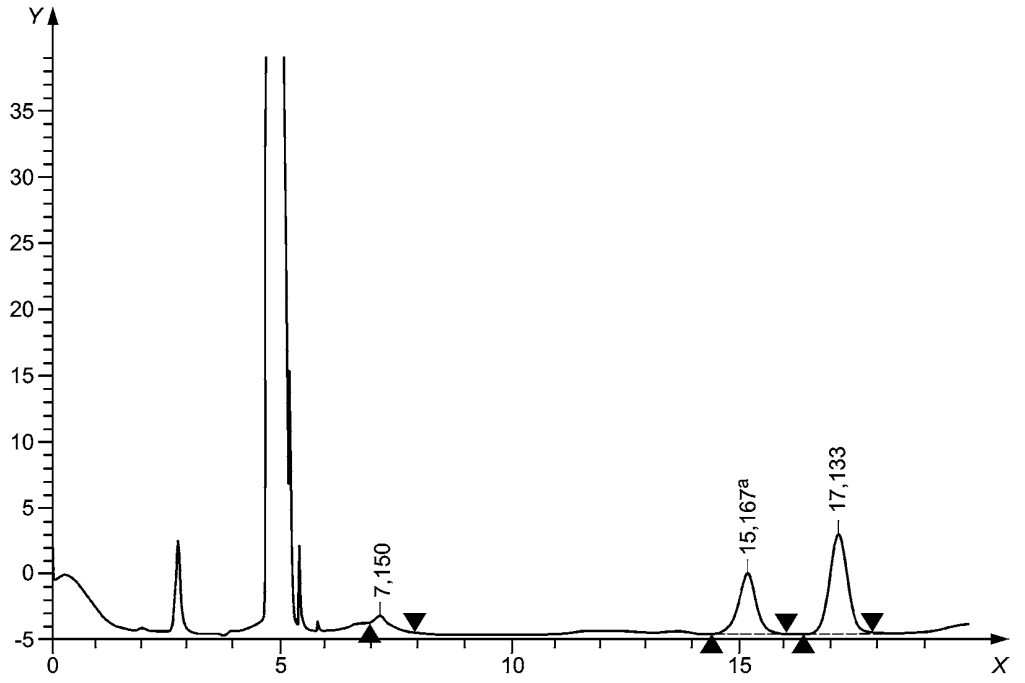
В протоколе испытаний результат для витамина B_6 представляют в пересчете на пиридоксин и выражают в мг/100 г.

8 Протокол испытаний

В протоколе испытания должны содержаться следующие данные:
a) информация об идентификации пробы;
b) ссылка на настоящий стандарт;
c) дата отбора проб и процедура (если известны);
d) дата поступления пробы;
e) дата проведения испытания;
f) результаты и единицы измерений, в которых выражены результаты;
g) любые особенности, которые наблюдались в ходе испытания;
h) любые операции, не указанные в методе, или относящиеся к факультативным, которые могли повлиять на результаты.

Приложение А
(справочное)

Пример хроматограммы



Ось X — время в минутах
Ось Y — мВ
[a] — пиридоксин

Неподвижная фаза:	LiChrosper®60 RP C8 Select B, размер частиц 5 мкм, 250 x 4,0 мм
Подвижная фаза:	В соответствии с 4.2.22
Скорость потока:	1 $см^3$/мин
Объем впрыскивания:	30 $мм^3$
Детектирование: флуориметрическое	Возбуждение: 290 нм, регистрация: 395 нм

Рисунок А.1 — Пример количественного определения пиридоксина в сухом молоке методом ВЭЖХ

Приложение В
(справочное)

Данные о прецизионности

Данные были получены главным образом при использовании метода, описанного в приложении С, который не предусматривает гидролиза. Кислотный гидролиз не влияет на результаты испытания.

Данные о прецизионности для определения витамина B_6 в таблице В.1 были установлены в ходе межлабораторного испытания в соответствии с [7], которое проводилось Главным управлением в области конкуренции, потребления и преследования мошенничества законом (DGCCRF).

При межлабораторном испытании была использована аналитическая колонка LiChrosper®60 RP 8 Select B, размер частиц 5 мкм, диаметр 4,0 мм, длина 250 мм.

Данные о прецизионности для определения содержания витамина B_6 в таблице В.2 были установлены в ходе межлабораторного испытания в соответствии с положениями Ассоциации химиков-аналитиков, работающих в государственных организациях (AOAC Guidelines), для проведения совместного изучения для подтверждения характеристик метода анализа (см. [8]), (см. [9], [10] и основанные на методе (см. [3]). Совместное изучение проводилось с использованием Luna ® 5 мкм фенил-гексиловой колонки для ВЭЖХ[1)].

Таблица В.1 — Данные о прецизионности для определения содержания витамина B_6

Проба[1)]	1	2	3	4	5	6	7	8
Год проведения межлабораторного испытания	1993	1993	1993	1993	1993	1993	1993	1993
Количество лабораторий	12	12	12	12	12	12	12	12
Количество лабораторий, оставшихся после удаления выбросов	11	10	11	12	11	11	12	11
Количество оставшихся результатов	32	29	31	36	33	33	35	33
Среднее значение, $\overline{X}$, мг/100 г	0,06	0,14	0,22	0,53	0,55	0,67	1,50	3,28
Стандартное отклонение повторяемости S_r, мг/100 г	0,01	0,02	0,02	0,04	0,02	0,03	0,10	0,09
Относительное стандартное отклонение повторяемости RSD_r, %	18	3	10	8	4	4	6	3
Предел повторяемости r [$r = 2{,}8 \cdot S_r$], мг/100 г	0,03	0,05	0,06	0,12	0,06	0,08	0,27	0,26
Стандартное отклонение воспроизводимости S_R, мг/100 г	0,02	0,05	0,07	0,14	0,07	0,08	0,18	0,43
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости RSD_R, %	30	35	30	26	1	12	12	13
Предел воспроизводимости R [$R = 2{,}8 \cdot S_R$], мг/100 г	0,05	0,14	0,19	0,39	0,20	0,23	0,51	1,22
Индекс Горвица [11]	1,7	2,3	2,1	2,1	1,1	1,1	1,1	1,4
1) 1 — детское питание; 2 — печенье; 3 — зерновой продукт В; 4 — дрожжи; 5 — раствор для зондового питания; 6 — шоколадный порошок; 7 — злаковые А; 8 — сухое молоко.								

1) Luna ® 5 мкм фенил-гексиловая колонка для ВЭЖХ — это пример подходящего продукта, имеющегося в продаже. Данная информация приведена только для удобства пользователей и не является рекламированием CEN названного продукта. Можно использовать эквивалентные продукты, если они приводят к получению аналогичных результатов.

Таблица В.2 — Данные о прецизионности для определения содержания витамина B_6 в восстановленных детских смесях

Проба[1)]	1	2	3	4	5	6	7	8
Год проведения межлабораторного испытания	2003	2003	2003	2003	2003	2003	2003	2003
Количество лабораторий	11	11	11	11	11	11	11	11
Количество лабораторий, оставшихся после удаления выбросов	9	9	8	9	7	9	9	9
Количество оставшихся результатов	18	18	16	18	14	18	18	18
Среднее значение $\overline{X}$, мг/100 г	0,013	0,036	0,057	0,101	0,005	0,028	0,056	0,106
Стандартное отклонение повторяемости S_r, мг/100 г	0,001	0,001	0,001	0,004	0,001	0,002	0,003	0,004
Относительное стандартное отклонение повторяемости RSD_r, %	10	3,3	2,0	4,0	16,4	5,9	4,5	3,5
Предел повторяемости r [$r = 2{,}8 \cdot S_r$], мг/100 г	0,0028	0,0028	0,0028	0,0112	0,0028	0,0056	0,0084	0,0112
Стандартное отклонение воспроизводимости S_R, мг/100 г	0,002	0,003	0,005	0,006	0,002	0,003	0,004	0,007
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости RSD_R, %	17,5	8,2	8,4	8,4	52,1	11,2	7,4	6,4
Предел воспроизводимости R [$R = 2{,}8 \cdot S_R$], мг/100 г	0,0056	0,0084	0,014	0,0168	0,0056	0,0084	0,0112	0,0196
Индекс Горвица [11]	0,81	0,44	0,48	0,53	2,06	0,58	0,42	0,43

[1)] 1 — невитаминизированная молочная детская смесь; (2—4) — витаминизированная молочная детская смесь; 5 — невитаминизированная соевая детская смесь; (6—8) — витаминизированная соевая детская смесь.

Приложение С
(справочное)

Факультативный способ подготовки пробы без кислотного гидролиза

Пункты 6.2.1—6.2.2 настоящего стандарта могут быть заменены следующей процедурой:

Взвешивают в конической колбе необходимое количество пробы с точностью до 1 мг, например, 2,5 г (если содержание витамина B_6 превышает 2 мкг/г) или 5,0 г (если содержание витамина менее 2 мкг/г). Добавляют 25 $см^3$ раствора ацетата натрия массовой концентрации 0,05 моль/$дм^3$ (см. 4.2.14), 2,5 $см^3$ раствора глиоксиловой кислоты молярной концентрации 1 моль/$дм^3$ (см. 4.2.19), 400 $мм^3$ раствора сульфата железа (см. 4.2.15) и 20 мг раствора кислой фосфатазы (см. 4.2.1). Оставляют раствор на ночь при температуре 37 °С при непрерывном перемешивании.

После охлаждения до комнатной температуры доводят водой до метки в мерной колбе вместимостью 50 $см^3$. Встряхивают и фильтруют. Смешивают 5,0 $см^3$ отфильтрованного раствора и 4,5 $см^3$ раствора борогидрида натрия молярной концентрации 0,1 моль/$дм^3$ (см. 4.2.18). Встряхивают в течение 3 мин. Добавляют 0,5 $см^3$ ледяной уксусной кислоты (см. 4.2.3). Встряхивают в течение 1 мин. Фильтруют через фильтр с размером пор 0,45 мкм. Этот отфильтрованный раствор используют для хроматографического анализа.

При проведении вычислений в формуле (4) заменяют общий объем исследуемого раствора пробы 100 $см^3$ на 50 $см^3$.

Приложение D
(справочное)

Примеры молярных коэффициентов поглощения

D.1 Примеры молярных коэффициентов поглощения (ε) производных витамина B_6 [6], [12] приведены в таблице D.1.

Таблица D.1

Соединения	Растворитель	$\lambda_{макс}$, нм	ε, $дм^3$ $моль^{-1}$ $см^{-1}$	M_ω, г $моль^{-1}$
Пиридоксина гидрохлорид	0,1 моль/$дм^3$ HCl, pH = 1	291	8600	205,6
Пиридоксина гидрохлорид	0,1 моль/$дм^3$ фосфатный буфер, pH = 7	323,8	7300	205,6
Пиридоксаля гидрохлорид	0,1 моль/$дм^3$ HCl, pH = 1	288	8960 (9000)	203,6
Пиридоксаль-5'-фосфат	0,1 моль/$дм^3$ фосфатный буфер, pH = 7	388	5020	247,1
Пиридоксамина дигидрохлорид	0,1 моль/ $дм^3$ HCl, pH = 1	292	8200	241,1
Пиридоксамина дигидрохлорид	0,1 моль/$дм^3$ фосфатный буфер, pH = 7	253	4600	241,1
Пиридоксамин-5'-фосфат гидрохлорид	0,1 моль/$дм^3$ фосфатный буфер, pH = 7	326	8370	241,1

Приложение ДА
(справочное)

Сведения о соответствии ссылочных европейских стандартов межгосударственным стандартам

Таблица ДА.1

Обозначение и наименование европейского стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование межгосударственного стандарта
EN ISO 369	—	*
* Соответствующий межгосударственный стандарт отсутствует. До его утверждения рекомендуется использовать перевод на русский язык данного европейского стандарта. Перевод данного европейского стандарта находится в Федеральном информационном фонде технических регламентов и стандартов.		

Библиография

[1] EN 14663 Foodstuffs — Determination of vitamin B6 (including its glycosylated forms) by HPLC [Продукты пищевые. Определение витамина B6 (включая гликозилированные формы) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии]

[2] EN 14166 Foodstuffs — Determination of vitamin B6 by microbiological assay (Продукты пищевые. Определение содержания витамина B_6 с помощью микробиологического анализа)

[3] Bergaentzle M., Arella F., Bourguignon J.B., Hasselmann C. Determination of vitamin B6 in foods by HPLC: a collaborative study. Food Chem (1995), 52, 81—86 (Определение витамина B_6 в пищевых продуктах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: совместное изучение, Food Chem (1995), 52, 81—86)

[4] Reitzer-Bergaentzle M., Marchioni E., Hasselmann C. HPLC determination of vitamin B6 in foods after pre-column derivatization of free and phosphorylated vitamers into pyridoxol. Food Chem (1993), 48, 321—324 (Определение витамина B_6 в пищевых продуктах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии после предколоночной дериватизации свободных и фосфорилируемых витамеров в пиридоксоле, Food Chem (1993), 48, 321—324)

[5] Ndaw S., Bergaentzle M., Aoude-Werner D., Hasselmann C. Extraction procedures for the Liquid hromatographic determination of thiamin, riboflavin and vitamin B6 in foodstuffs. Food Chem, (2000), 71, 129—138 (Процедуры экстракции для жидкостно-хроматографического определения тиамина, рибофлавина и витамина B_6 в продовольственных продуктах. Food Chem, (2000), 71, 129—138)

[6] Metzlerand Snell (1955): Spectra and ionisation constants of the vitamin B6 group and related 3-hydroxypyridine derivates. Journal of the American Chemical Society 77:2431—2437 (Константы спектра и ионизации витаминов группы B_6 и относящихся к ним производных 3-гидроксипиридинов. Журнал Американского химического общества 77:2431—2437)

[7] ISO 5725 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results [Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений]

[8] International 1995. AOAC Official Methods Program, Associate Referee's Manual on development, Study, Review, and Approval Process. Part IV AOAC Guidelines for Collaborative Studies, p. 23—51 (Международная Ассоциация химиков-аналитиков, состоящих на государственной службе. 1995, Программа официальных методов, руководство по разработке, изучению обзору и процессу одобрения. Часть IV. Рекомендации AOAC по совместным изучениям, стр. 23—51)

[9] Mann D.L., Chase G.W., Eitenmiller R.R. Liquid Chromatographic analysis of vitamin B6 in soy-based infant formula. JAOAC (2001). 84, 5:1596 (Жидкостно-хроматографический анализ витамина B_6 в соевых молочных смесях. JAOAC (2001). 84, 5:1596)

[10] Mann D.L., Ware G.W., Bonnin E. Liquid Chromatographic analysis of vitamin B6 in reconstituted infant formula: Collaborative Study. JAOAC (2005), 88,1:30—37 (Жидкостно-хроматографический анализ витамина B_6 в витаминизированных детских смесях. Совместное изучение. JAOAC (2005), 88,1:30—37)

[11] Evaluation of Analylical Methods used for Regulation of Foods and Drugs, W. Horwitz, Anal. Chem. 1982,54 (1). 67A—76A) Оценка аналитических методов, используемых в регулировании пищевых продуктов и лекарственных средств)

[12] Oiliiainen V. (1999): HPL Canalysisofvitamin B6 infoods. Agriculturaland Food Sciencein Finland 8.559 (Анализ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии витамина B_6 в пищевых продуктах. Наука о сельском хозяйстве и продуктах питания в Финляндии 8.559)

УДК 641.1:577.164.13:543.544.5:006.354 МКС 67.050 IDT

Ключевые слова: витамин B_6, высокоэффективная жидкостная хроматография

Редактор *К.В. Дудко*
Корректор *Е.Р. Ароян*
Компьютерная верстка *Ю.В. Поповой*

Сдано в набор 16.05.2016. Подписано в печать 29.08.2016. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,10.

Набрано в ИД «Юриспруденция», 115419, Москва, ул. Орджоникидзе, 11.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

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

gost.e-ecolog.ru