
МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ ГОСТ
СТАНДАРТ EN 14663–
 2014

ПРОДУКЦИЯ ПИЩЕВАЯ

**Определение витамина B₆ (включая гликозилированные формы)
методом высокоэффективной жидкостной хроматографии**

(EN 14663:2005, IDT)

Издание официальное



**Москва
Стандартинформ
2016**

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 В₆ (включая гликозилированные формы) с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии» [(«Foodstuffs – Determination of vitamin B₆ (including its glycosylated forms) by HPLC», IDT].

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

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 (www.gost.ru)

© Стандартиформ, 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 В 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.....	

ПРОДУКЦИЯ ПИЩЕВАЯ**Определение витамина В₆ (включая гликозилированные формы)
методом высокоэффективной жидкостной хроматографии**

Foodstuffs.

Determination of vitamin В₆ (including its glycosylated forms)
by high performance liquid chromatography

Дата введения – 2017–06–01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения витамина В₆ в пищевой продукции с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Витамин В₆ 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 В₆ (пиридоксаль, пиридоксамин и пиридоксин) извлекают из пищевой продукции путем кислотного гидролиза, затем подвергают ферментативному воздействию: дефосфорируют, используя кислую фосфатазу, и дегликозилируют, используя β-глюкозидазу.

Полученные производные витамина В₆ 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 ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$) $\geq 99,9$ %.

4.3 Ацетат натрия безводный, w (CH_3COONa) $\geq 99,0$ %.

4.4 Трихлоруксусная кислота (ТХУ), w (Cl_3CCOOH) $\geq 99,0$ %.

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/мг¹).

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 см³ 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 см³ раствора экстрагированной пробы 1 см³ раствора кислой фосфатазы (см. 4.13.1) и опционально 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. 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 В₆ в обоих растворах пробы эквивалентны. На хроматограмме должен отсутствовать пик фосфата пиридоксамина.

Примечание – Для межлабораторного испытания использовали кислую фосфатазу производства Sigma Nr P 3752¹⁾.

4.14 β-глюкозидаза из миндаля с ферментативной активностью приблизительно 3,2 У/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 СЕН. Допускается использовать аналогичную продукцию, если она позволяет получать сопоставимые результаты.

Растворяют 100 мг β -глюкозидазы (см. 4.14) в 10 см³ 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 см³ раствора экстрагированной пробы 1 см³ раствора кислой фосфатазы (см. 4.13.1) и 1 см³ 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 В₆ в обоих растворах пробы эквивалентны. На хроматограмме должен отсутствовать пик фосфата пиридоксамина.

Примечание — Для межлабораторного испытания использовали кислую фосфатазу Sigma Nr G-0395¹⁾.

4.16 Подвижная фаза для ВЭЖХ (серная кислота, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,015$ моль/дм³, содержащая 0,005 моль/дм³ трихлоруксусной кислоты)

(817 ± 5) мг трихлоруксусной кислоты (см. 4.4) растворяют в 15 см³ серной кислоты молярной концентрацией 1 моль/дм³ (см. 4.10), переливают в мерную колбу вместимостью 1000 см³, 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, $w(C_8H_{12}N_2O_2 \cdot 2HCl) \geq 98\%$.

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

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

4.19 Исходные растворы

4.19.1 Исходный раствор пиридоксамина (PM), массовой концентрацией $\rho(PM)$ 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 $\rho(PL)$ 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 $\rho(PN)$ 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.

ГОСТ EN 14663–2014

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).

Т а б л и ц а 1 – Примеры молярных коэффициентов поглощения соединений витамина B₆

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/см³, вычисляют, используя молярный коэффициент поглощения, по формуле

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

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, см³ (в данном случае $V = 50$ см³);

F – коэффициент для вычисления доли свободных форм соединений витамина B₆;

ϵ_i – молярный коэффициент поглощения PM, PL или PN при соответствующем pH согласно таблице 1, ммоль⁻¹см⁻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

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

ГОСТ EN 14663–2014

где x_i – площадь пика образца сравнения i ;

V – 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 $\rho(\text{PM}, \text{PL}, \text{PN}) = 0,1 \text{ мкг/см}^3$ 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 $0,1 \text{ моль/дм}^3 \text{ HCl}$ (см. 4.8) до объема $6,5 \text{ см}^3$. Доводят pH до значения 4,8 ед. pH, используя раствор ацетата натрия молярной концентрацией $2,5 \text{ моль/дм}^3$ (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 $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

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 C₁₈, 5 мкм¹⁾, размер частицы 5 мкм, диаметр 4,0 мм, длина 250 мм²⁾. 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/дм³ (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/дм³ (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 см³, добавляют 50 см³ 0,1 моль/дм³ соляной кислоты (см. 4.8), перемешивают и проверяют, чтобы значение рН составляло приблизительно 1 ед. рН.

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 см³, объем содержимого в колбе доводят водой до 100 см³ (с возможным силиконовым слоем выше метки) и перемешивают.

Фильтруют или центрифугируют при 3000 об/мин аликвотную часть (приблизительно 50 см³) 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 см³, добавляют 10 см³ 1 моль/дм³ соляной кислоты (см. 4.7), доводят водой до приблизительно 50 см³, перемешивают и проверяют, чтобы значение рН составляло приблизительно 1 ед. рН.

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 см³ и объем содержимого в колбе доводят водой до 100 см³ (с возможным силиконовым слоем выше метки) и перемешивают.

Фильтруют или центрифугируют при 3000 об/мин аликвотную часть (приблизительно 50 см³) 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 B₆ 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

ГОСТ EN 14663–2014

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 РМ, РL и РN 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 РМ, РL и РN путем сравнения времени удерживания пиков на хроматограммах раствора анализируемой пробы и стандартного раствора. Идентификацию пика допускается также проводить с помощью сдвига значения рН в сторону увеличения, например при установлении рН = 6,6 ед. рН при использовании устройства постколоночной дериватизации (см. 5.4) при скорости потока постколоночного 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 рН путем использования постколоночного 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), пиридоксала (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 см³ 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 – коэффициенты регрессии для PM, PL или PN, вычисленные методом a_i 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), см³;

V_1 – общий объем раствора кислой вытяжки пробы, подвергнутый ферментативной обработке (см. 6.2.2), см³.

7.2 Массовую долю витамина В₆ в пересчете на пиридоксин w , мг/100 г пробы вычисляют по формуле

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

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 В₆ 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 В₆ 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 B₆ 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 B₆ 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 B₆ $\bar{x} = 0,667$ 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 B₆ $\bar{x} = 1,204$ мг/100 г $r = 0,089$

ГОСТ EN 14663–2014

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 В 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 В 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 В 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 В 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 В 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 В 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 специфических 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 В₆ 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			
	Пиридоксамин	Пиридоксаль	Пиридоксин	Витамин В ₆ ^{a)}
Вещество, определяемое при анализе				
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			
	Пиридоксамин	Пиридоксаль	Пиридоксин	Витамин В ₆ ^{a)}
Вещество, определяемое при анализе				
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)			
	Пиридоксамин	Пиридоксаль	Пиридоксин	Витамин В 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 коэф ф ициента извлечения компонента, %	95,1	90,6	88,9	–
Стандартное отклонение коэф ф ициента 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			
	Пиридоксамин	Пиридоксаль	Пиридоксин	Витамин В ₆ ^{a)}
Вещество, определяемое при анализе				
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 ($2,8 s_r$), 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 ($2,8 s_R$), 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 В₆

Таблица 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)}
1 а	LUNA RP C ₁₈ , 5 мкм	250 × 4,0	30	H ₂ SO ₄ (c = 0,015 моль/дм ³), содержание ТХУ (c = 0,005 моль/дм ³)	1,5	290	390	~3	~7	~11,4
1 b	LUNA RP C ₁₈ , 5 мкм	250 × 4,0	30	H ₂ SO ₄ (c = 0,015 моль/дм ³), содержание ТХУ (c = 0,005 моль/дм ³) и послеколоночный реагент: K ₂ HPO 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 ₂ SO 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 ₂ SO 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					
4	LiChrospher 60 RP C ₈ Выборка В, 5 мкм	250 × 4,0	30	H ₂ SO 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

Окончание таблицы В.1

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)}
5	Nucleosil 120 C ₁₈ , 5 мкм Предколонка: RP C ₁₈	250 × 4,0	~ 20	H ₂ SO 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 ₂ SO 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 ₂ SO 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 ₂ SO 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 ₂ SO 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 ₂ SO ₄ (c = 0,015 моль/дм ³), содержание ТХУ (c = 0,005 моль/дм ³) и послеколонный реагент: K ₂ HPO ₄ (c = 0,15 моль/дм ³)	1,0 0,5	330	390	~6,9	~17,9	~28,4
<p>a) Phenomenex, 125 А. b) PM – пиридоксамин. c) PL – пиридоксаль. d) PN – пиридоксин.</p>										

Приложение С
(справочное)

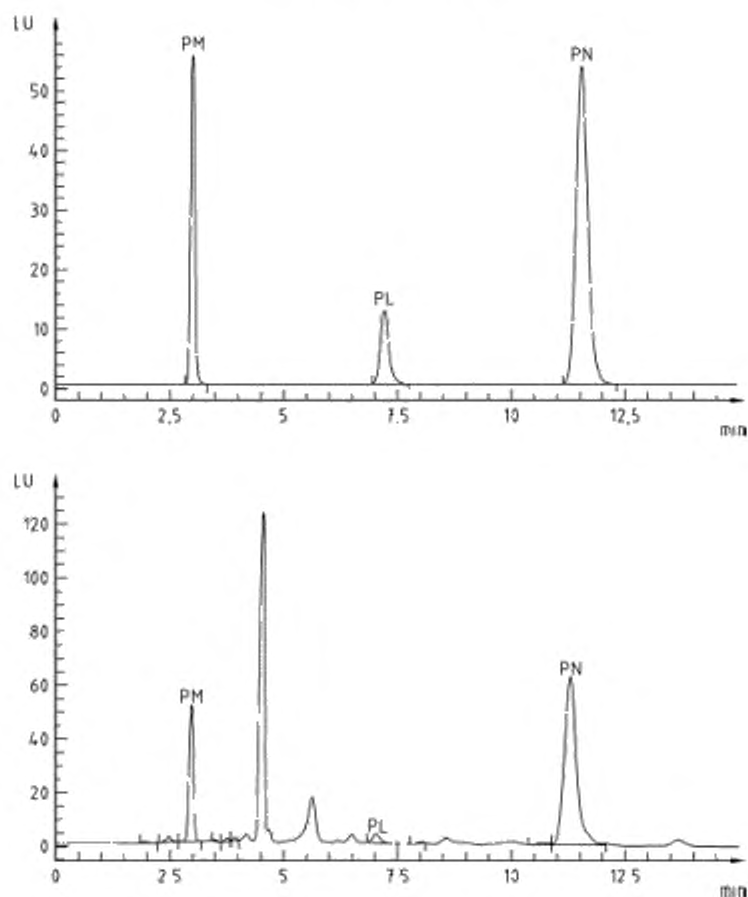
Примеры молярных коэффициентов поглощения

Таблица С.1 – Примеры молярных коэффициентов поглощения E соединений витамина В₆ (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, рН приблизительно 1	290	8,6	205,6
Пиридоксина гидрохлорид	0,1 моль/дм ³ фосфатный буферный раствор, рН 7	323,8	7,3	205,6
Пиридоксаль гидрохлорид	0,1 моль/дм ³ HCl, рН приблизительно 1	288	8,96 (9,0)	203,6
Пиридоксаль-5'-фосфат	0,1 моль/дм ³ фосфатный буферный раствор, рН 7	388	5,02	247,1
Пиридоксамина дигидрохлорид	0,1 моль/дм ³ HCl, рН приблизительно 1	292	8,2	241,1
Пиридоксамина дигидрохлорид	0,1 моль/дм ³ фосфатный буферный раствор, рН 7	253	4,6	241,1
Пиридоксамин 5'-фосфат гидрохлорид	0,1 моль/дм ³ фосфатный буферный раствор, рН 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 см³/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»
<p>Примечание – В настоящей таблице использовано следующее условное обозначение степени соответствия стандарта: IDT – идентичный стандарт</p>		

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

Библиография

- [1] Bognar, A.: Bestimmung von Vitamin B₆ in Lebensmitteln mit Hilfe der Hochdruckflüssig-Chromatographie (HPLC) Z Lebensm Unters Forsch A, 1985, 181: 200–205 (Определение содержания витамина B₆ 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 B₆ 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 B₆ – 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 B₆ 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 B₆ 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 B₆ в пищевых продуктах методом жидкостной хроматографии)
- [8] ISO 5725:1986¹⁾ 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.

Ключевые слова: продукция пищевая, определение, витамин В₆, гликозилированные формы, высокоэффективная жидкостная хроматография
