
ЕВРАЗИЙСКИЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(EASC)

EURO-ASIAN COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(EASC)



МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ
СТАНДАРТ

**ГОСТ EN
14164**

*(проект, ВУ,
первая редакция)*

ПРОДУКЦИЯ ПИЩЕВАЯ

Определение содержания витамина В₆
методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

(EN 14164:2014, IDT)

Настоящий проект стандарта не подлежит применению до его принятия

Предисловие

Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации (ЕАСС) представляет собой региональное объединение национальных органов по стандартизации государств, входящих в Содружество Независимых Государств. В дальнейшем возможно вступление в ЕАСС национальных органов по стандартизации других государств.

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 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 4.

2 ВНЕСЕН Госстандартом Республики Беларусь

3 ПРИНЯТ Евразийским советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол № _____ от _____ 20____ г.)

За принятие стандарта проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ISO 3166) 004—97	Код страны по МК (ISO 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации

4 Настоящий стандарт идентичен европейскому стандарту EN 14164:2014 Foodstuffs – Determination of vitamin B₆ by high performance liquid chromatography (Продукты пищевые. Определение витамина B₆ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии).

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

Официальные экземпляры европейского стандарта, на основе которого подготовлен настоящий межгосударственный стандарт, и европейских стандартов, на которые даны ссылки, имеются в Госстандарте Республики Беларусь.

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

5 ВЗАМЕН ГОСТ EN 14164-2014

Исключительное право официального опубликования настоящего стандарта на территории указанных выше государств принадлежит национальным (государственным) органам по стандартизации этих государств

ГОСТ EN 14164

(проект, ВУ, первая редакция)

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных (государственных) стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных (государственных) органов по стандартизации.

В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация также будет опубликована в сети Интернет на сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты»

ГОСТ EN 14164

(проект, ВУ, первая редакция)

Содержание

1 Область применения.....	
2 Нормативные ссылки	
3 Сущность метода.....	
4 Реактивы	
5 Оборудование	
6 Методика проведения испытания	
7 Вычисление.....	
8 Протокол испытания.....	
Приложение А (справочное) Пример хроматограммы.....	
Приложение В (справочное) Данные прецизионности.....	
Приложение С (справочное) Вариант обработки пробы без кислотного гидролиза	
Приложение D (справочное) Примеры молярных коэффициентов поглощения	
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии ссылочного европейского стандарта межгосударственному стандарту	
Библиография	

ПРОДУКЦИЯ ПИЩЕВАЯ
Определение содержания витамина В₆
методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Foodstuffs
Determination of vitamin В₆ by high performance liquid chromatography

Дата введения — _____

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ – Применение настоящего стандарта может быть связано с проведением опасных операций, использованием вредных веществ, опасного оборудования. В задачи настоящего стандарта не входит решение всех вопросов безопасности, связанных с его применением. Ответственность за соблюдение техники безопасности и установление необходимых ограничений при применении настоящего стандарта несет его пользователь.

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения содержания витамина В₆ в пищевой продукции с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Витамин В₆ определяется как сумма массовых долей пиридоксина, пиридоксаля и пиридоксамина, включая их фосфорилируемые производные, определяемые как пиридоксины, кроме β-гликозилированных. Они могут быть определены методом, установленным в EN 14663 [1], с помощью которого различные витаминеры витамина В₆ (пиридоксаль, пиридоксамин и пиридоксин) могут быть разделены и количественно определены в индивидуальном порядке. Определение суммарного содержания витамина В₆ микробиологическим методом приведено в EN 14166 [2].

2 Нормативные ссылки

Для применения настоящего стандарта необходимы следующие ссылочные документы. Для датированных ссылок применяют только указанное издание ссылочного документа, для недатированных ссылок применяют последнее издание ссылочного документа (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

Пиридоксаль, пиридоксамин и пиридоксин извлекают из пищевой продукции путем кислотного гидролиза и ферментативно дефосфорилируют, используя кислотную фосфатазу.

В ходе реакции с глиоксиловой кислотой в присутствии ионов железа (II) Fe²⁺ в качестве катализатора пиридоксамин преобразуется в пиридоксаль, который под действием боргидрида натрия в щелочной среде превращается в пиридоксин. Пиридоксин определяют в растворе пробы методом ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием [3], [4].

4 Реактивы

Для проведения анализа, если не указано иное, используют только реактивы признанной аналитической чистоты и воду не ниже первой степени чистоты по EN ISO 3696 или бидистиллированную воду.

ГОСТ EN 14164

(проект, ВУ, первая редакция)

Кислая фосфатаза, (CAS 9001-77-8) из картофеля, активность фермента составляет 33 нкат/мг¹⁾ с субстратом п-нитрофенил фосфата при pH = 4,8 и T = 37°C, например, Boehringer или Sigma²⁾. 33 нкат/мг соответствует 2 МЕ/мг.

4.1.1 Раствор кислой фосфатазы.

Готовят раствор с концентрацией 20 мг/мл кислой фосфатазы в растворе ацетата натрия (4.14).

Для получения полного гидролиза фосфорилированных форм витамина B₆ необходимо использовать кислую фосфатазу, а не така-диастазу. Если для получения хорошего дефосфорилирования необходимо 300 мг така-диастазы, то кислой фосфатазы – только 0,5 мг, см. [5].

4.1.2 Проверка активности кислой фосфатазы

Активность кислой фосфатазы можно проверить следующим образом.

Используя воду готовят основной раствор пиридоксальфосфата (PLP) (4.9) с концентрацией около 0,1 мг/мл.

В мерной колбе вместимостью 20 мл смешивают 3,0 мл основного раствора PLP и 10 мл соляной кислоты (4.21), и объем содержимого колбы доводят до метки водой.

Проверяют концентрацию PLP путем измерения оптической плотности на УФ-спектрометре (5.1) при длине волны 293 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см, используя раствор соляной кислоты (4.20) в качестве раствора сравнения. Молярный коэффициент поглощения PLP в соляной кислоте с концентрацией 0,1 моль/л (ϵ) равен 7200.

Рассчитывают массовую концентрацию основного раствора ρ_{PLP} , мг/мл, по формуле

$$\rho_{PLP} = \frac{A_{293} \cdot M_{PLP}}{\epsilon} \cdot F \quad (1)$$

где A_{293} – значение оптической плотности раствора при длине волны 293 нм;

M_{PLP} – молярная масса стандартного вещества витамина B₆, г/моль ($M_{PLP} = 247,14$);

F – коэффициент разбавления (здесь $F = 20/3$);

ϵ – молярный коэффициент поглощения PLP в соляной кислоте с концентрацией 0,1 моль/л при длине волны 293 нм, л моль⁻¹см⁻¹ (в данном случае $\epsilon = 7200$), см.[6].

Для экстракции берут 1,0 мл основного раствора PLP и далее следуют 6.2.1 – 6.2.4.

Рассчитывают коэффициент извлечения пиридоксина (PN) из дефосфорилированного раствора пиридоксальфосфата, %, по формуле

$$\text{коэффициент извлечения} = \frac{\rho_{PN-HCl} \cdot A_S \cdot 2 \cdot 100 \cdot 0,822 \cdot 100 \cdot M_{PLP}}{A_{ST} \cdot 1000 \cdot \rho_{PLP} \cdot M_{PN}} \quad (2)$$

где ρ_{PN-HCl} – массовая концентрация пиридоксина гидрохлорида в стандартном растворе, мкг/мл;

A_S – площадь или высота пика пиридоксина на хроматограмме раствора анализируемой пробы, выраженная в единицах площади или высоты

2 – коэффициент разбавления реакции с борогидридом натрия при добавлении уксусной кислоты, в других случаях коэффициент разбавления равен 1,9;

100 – общий объем раствора анализируемой пробы, мл;

0,822 – коэффициент пересчета пиридоксина гидрохлорида на пиридоксин;

100 – коэффициент пересчета в процент;

M_{PLP} – молярная масса пиридоксальфосфата (PLP), г/моль ($M_{PLP} = 247,14$);

A_{ST} – площадь или высота пика пиридоксина на хроматограмме стандартного раствора, выраженная в единицах площади или высоты;

1000 – коэффициент пересчета микрограммов в миллиграммы;

¹⁾ Катал (обозначение «кат») является производной единицей активности ферментов в системе СИ. Один катал представляет собой такую каталитическую активность, которая повысит скорость реакции на один моль/с в указанной системе анализа.

²⁾ Информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламой CEN поставщиков. Допускается использовать аналогичную продукцию при условии обеспечения идентичных результатов.

- ρ_{PLP} – массовая концентрация пиридоксальфосфата (PLP) в основном растворе, мг/мл;
 M_{PN} – молярная масса пиридоксина (PN), г/моль ($M_{PN} = 169,1$).

4.2 Ацетат натрия тригидрат, массовая доля $w(\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}) \geq 99,0 \%$.

4.3 Ледяная уксусная кислота, $w(\text{CH}_3\text{COOH}) \geq 99,8 \%$.

4.4 Глиоксиловая кислота, $w(\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}) \geq 97,0 \%$.

4.5 Сульфат железа (II) гептагидрат, $w(\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}) \geq 99,5 \%$.

4.6 Гидроксид натрия, $w(\text{NaOH}) \geq 99 \%$.

4.7 Боргидрид натрия, $w(\text{NaBH}_4) \geq 97,0 \%$.

4.8 Дигидрофосфат калия, $w(\text{KH}_2\text{PO}_4) \geq 99,0 \%$.

4.9 Пиридоксальфосфат (PLP), $w \geq 99,0 \%$.

4.10 Ортофосфорная кислота, $w(\text{H}_3\text{PO}_4) \geq 84,0 \%$.

4.11 Октансульфонат натрия, $w(\text{C}_8\text{H}_{17}\text{NaO}_3\text{S}) \geq 98,0 \%$, или гептансульфонат натрия, $w(\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NaO}_3\text{S}) \geq 98,0 \%$.

4.12 Ацетонитрил (для ВЭЖХ), $w(\text{C}_2\text{H}_3\text{N}) \geq 99,8 \%$.

4.13 Раствор ацетата натрия, концентрация вещества $c(\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}) = 2,5$ моль/л.

Растворяют 170,1 г ацетата натрия тригидрата (4.2) в 500 мл воды.

4.14 Раствор ацетата натрия, $c(\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}) = 0,05$ моль/л ($\text{pH} = 4,5$).

Растворяют 6,8 г ацетата натрия тригидрата (4.2) в 1 л воды. Показатель pH раствора доводят до значения 4,5, используя ледяную уксусную кислоту (4.3).

4.15 Раствор сульфата железа, $c(\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}) = 0,0132$ моль/л.

Растворяют 36,6 мг сульфата железа (II) гептагидрата (4.5) в 10 мл раствора ацетата натрия (4.14). Раствор готовят в день использования.

Примечание – В исследовании, описанном в работе Манна и др., см. [7], использовался раствор сульфата железа с концентрацией 10 г/л. Данная концентрация была основана на завершении преобразования пиридоксамина в пиридоксаль при уровнях пиридоксамина до 8 раз превышающем минимальный уровень содержания витамина B₆, необходимого в соответствии с законом США о смесях для детского питания, см. работу Манна и др. [8]. Такая концентрация не является обязательной для европейских стран.

4.16 Раствор гидроксида натрия, $c(\text{NaOH}) = 0,2$ моль/л.

Растворяют 800 мг гидроксида натрия (4.6) в 100 мл воды.

4.17 Раствор гидроксида натрия, $c(\text{NaOH}) = 6,0$ моль/л.

Растворяют 24 г гидроксида натрия (4.6) в 100 мл воды.

4.18 Раствор боргидрида натрия, $c(\text{NaBH}_4) = 0,1$ моль/л.

Растворяют 378 мг боргидрида натрия (4.7) в 100 мл раствора гидроксида натрия (4.16). Раствор готовят в день использования.

4.19 Раствор глиоксиловой кислоты, $c(\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}) = 1$ моль/л ($\text{pH} = 4,5$).

Растворяют 4,7 г глиоксиловой кислоты (4.4) в 30 мл раствора ацетата натрия (4.13). Регулируют pH до 4,5 раствором гидроксида натрия (4.17), раствор переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и объем содержимого колбы доводят до метки водой. Раствор готовят в день использования.

4.20 Соляная кислота, $c(\text{HCl}) = 0,1$ моль/л.

4.21 Соляная кислота, $c(\text{HCl}) = 0,2$ моль/л.

4.22 Подвижная фаза для ВЭЖХ

В лабораторный стакан добавляют 940 мл воды, 40 мл ацетонитрила (4.12), 160 мг октансульфоната натрия или гептансульфоната (4.11) и 6,8 г дигидрофосфата калия (4.8).

После растворения октансульфоната натрия или гептансульфоната и дигидрофосфата калия при помешивании, pH регулируют до 2,5 ортофосфорной кислотой (4.10). Раствор переносят в мерную

ГОСТ EN 14164

(проект, ВУ, первая редакция)

колбу вместимостью 1 л, объем содержимого колбы доводят до метки водой и фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

4.23 Пиридоксина гидрохлорид (стандартное вещество витамина В₆), $w(\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3 \cdot \text{HCl}) \geq 99 \%$.

4.24 Основной раствор пиридоксина гидрохлорида, массовая концентрация $\rho \approx 0,5$ мг/мл.

Растворяют точно взвешенное количество пиридоксина гидрохлорида (4.23), около 50 мг, в 100 мл воды. Основной раствор годен в течение 4 нед при хранении в темном месте при температуре 4 °С.

Для проверки концентрации 0,5 мл основного раствора пиридоксина гидрохлорида (4.24) разбавляют 20 мл HCl (4.20) с концентрацией 0,1 моль/л и измеряют оптическую плотность на УФ-спектрометре (5.1) при длине волны 290 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см, используя раствор HCl с концентрацией 0,1 моль/л в качестве раствора сравнения. Рассчитывают массовую концентрацию основного раствора ρ_{PNHCl} , мкг/мл, по формуле

$$\rho_{\text{PNHCl}} = \frac{A_{290} \cdot M_{\text{PNHCl}} \cdot 1000}{\varepsilon} \cdot F, \quad (3)$$

где A_{290} – значение оптической плотности раствора при длине волны 290 нм;

M_{PNHCl} – молярная масса стандартного вещества витамина В₆, г/моль ($M_{\text{PNHCl}} = 205,64$);

F – коэффициент разбавления (в данном случае $F = 40$);

ε – молярный коэффициент поглощения пиридоксина гидрохлорида в соляной кислоте с концентрацией 0,1 моль/л при длине волны 291 нм, л моль⁻¹см⁻¹ (в данном случае $\varepsilon = 8\,600$), см. [9].

Дополнительная информация о молярных коэффициентах поглощения соединений витамина В₆ в соляной кислоте с концентрацией 0,1 моль/л ($\text{pH} \approx 1$) и других растворителях приведена в приложении D.

4.25 Стандартные растворы

4.25.1 Промежуточный стандартный раствор пиридоксина гидрохлорида, $\rho(\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3 \cdot \text{HCl}) \approx 10$ мкг/мл.

Пипеткой отбирают 1 мл основного раствора витамина В₆ (4.24), переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и объем содержимого колбы доводят до метки водой. Раствор готовят в день использования.

4.25.2 Стандартные аналитические растворы пиридоксина гидрохлорида для ВЭЖХ, $\rho(\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3 \cdot \text{HCl}) \approx 0,1$ до 1 мкг/мл.

Готовят серию соответствующих аналитических стандартных растворов пиридоксина гидрохлорида с концентрацией от 0,1 до 1 мкг/мл, используя промежуточный стандартный раствор пиридоксина гидрохлорида (4.25.1). Растворы готовят в день использования.

Проводят испытание на пригодность системы путем введения смешанного стандартного аналитического раствора для ВЭЖХ пиридоксина (PN) и пиридоксаля (PL). PN и PL должны иметь приблизительно такую же концентрацию как в аналитическом стандартном растворе для ВЭЖХ. PL элюируют перед PN. Пара PN/PL должна иметь разделение на уровне базовой линии. Добавляют пиридоксамин (PM) для извлечения при прогонке одной пробы, чтобы обеспечить полное дезаминирование и окисление.

5 Оборудование

Используют стандартные лабораторное оборудование, стеклянную посуду, в том числе перечисленные ниже:

5.1 УФ-спектрометр, пригодный для измерения оптической плотности при определенной длине волны.

5.2 Нагревательные приборы, печь или водяная баня с приспособлениями для встряхивания.

5.3 Система для высокоэффективной жидкостной хроматографии, состоящая из насоса, устройства ввода проб, флуоресцентного детектора, обеспечивающего длину волны возбуждения 290 нм и длину волны эмиссии 395 нм, а также устройства для обработки данных (интегратора).

5.4 Колонки для ВЭЖХ, например обращенно-фазовая колонка, такая как LiChrospher® 60 RP C8 Select B³⁾, размер частиц 5 мкм, диаметр 4,0 мм, длина 250 мм.

Допускается использовать колонку другого внутреннего диаметра и длины, и заполненную сорбентом с размером частиц, отличным от указанных в настоящем стандарте. Условия хроматографического разделения подбирают применительно к используемой колонке для обеспечения сопоставимости результатов анализов. Критерием эффективности подходящих аналитических колонок является разделение анализируемых веществ на уровне базовой линии.

5.5 Фильтровальное устройство, фильтрация подвижной фазы, а также раствора анализируемой пробы, через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм, до использования или ввода проб продлевает срок службы колонок.

6 Методика проведения испытания

6.1 Подготовка анализируемой пробы

Гомогенизируют анализируемую пробу. Твердую продукцию измельчают в соответствующей мельнице и снова перемешивают. Перед измельчением пробу рекомендуется охладить, чтобы не подвергать ее воздействию высоких температур в течение длительного времени.

6.2 Подготовка раствора анализируемой пробы

6.2.1 Экстракция

В конической колбе взвешивают с точностью до 1 мг соответствующее количество анализируемой пробы: 2,5 г (если предполагаемое содержание витамина В₆ превышает 2 мкг/г) или 5 г (если предполагаемое содержание витамина В₆ составляет менее 2 мкг/г). Добавляют 50 мл соляной кислоты (4.20). Нагревают в течение 30 мин на кипящей водяной бане.

Примечание 1 – Для проб с высоким содержанием воды или низким содержанием витамина В₆ может быть полезным увеличение массы пробы, например, до 20 г, добавить скорректированный объем воды, например, 25 мл воды и сразу добавить 5 мл соляной кислоты с(НСl) = 1 моль/л.

Примечание 2 – Для проб с высоким содержанием жира желательнее удалить жир, например, путем обработки петролейным эфиром перед проведением кислотного гидролиза.

Примечание 3 – Главным преимуществом предварительного кислотного гидролиза является улучшение этапа фильтрации для проб с крахмалом. Данные в приложении В были получены в основном без проведения кислотного гидролиза. Модификация процедуры (без кислотного гидролиза) описана в приложении С.

6.2.2 Ферментативная обработка и этапы преобразования

После охлаждения до комнатной температуры значение рН экстракта доводят до 4,5 раствором ацетата натрия (4.13) и добавляют 2,5 мл раствора глиоксиловой кислоты с концентрацией 1 моль/л (4.19), 400 мкл раствора сульфата железа (4.15) и 1 мл раствора кислой фосфатазы (4.1.1). Оставляют раствор на ночь при температуре 37 °С при непрерывном перемешивании.

После охлаждения до комнатной температуры раствор переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и объем содержимого колбы доводят до метки водой. Раствор встряхивают и фильтруют. Смешивают 5,0 мл фильтрата и 4,5 мл раствора боргидрида натрия с концентрацией 0,1 моль/л (4.18). Встряхивают в течение 3 мин. В целях обеспечения полного разложения избытка боргидрида натрия можно добавить 0,5 мл ледяной уксусной кислоты (4.3). Следует учитывать коэффициент разбавления. Перемешивают в течение 1 мин. Фильтруют, используя мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. Используют полученный 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. Идентификация пиков также может быть выполнена путем добавления определенного количества стандартного вещества пиридоксина в раствор анализируемой пробы.

Ниже приведены условия хроматографического анализа, которые обеспечивают удовлетворительное качество хроматографического разделения и количественного определения (см. также рисунок А.1).

³⁾ LiChrospher® 60 RP C8 Select B – пример подходящей продукции, имеющейся в продаже. Информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламой CEN указанной продукции. Допускается использовать аналогичную продукцию при условии обеспечения идентичных результатов.

ГОСТ EN 14164

(проект, ВУ, первая редакция)

Колонка:	LiChrospher® 60 RP C8 Select B, 5 мкм, 250 × 4,0 мм.
Подвижная фаза:	в соответствии с 4.22.
Скорость потока:	1 мл/мин.
Объем введенной пробы:	30 мкл.
Детектор:	Флуорометрический: длина волны возбуждения 290 нм, длина волны эмиссии 395 нм.

6.2.4 Определение посредством ВЭЖХ

В систему ВЭЖХ вводят соответствующие объемы (до 50 мкл) стандартного раствора, а также раствора анализируемой пробы. Для выполнения количественного определения методом внешнего стандарта интегрируют площади пиков или определяют высоты пиков пробы и результаты сравнивают с соответствующими значениями стандартного раствора.

7 Вычисление

Результат определения вычисляют, используя градуировочный график или соответствующие программы системы обработки данных, или приведенный ниже упрощенный способ вычисления.

Рассчитывают массовую долю витамина В₆ в пересчете на пиридоксин w , мг/100 г пробы, по формуле

$$w = \frac{A_s \cdot \rho \cdot 100 \cdot 2}{A_{st} \cdot m \cdot 1000} \cdot 100 \cdot 0,822, \quad (4)$$

- где A_s – площадь или высота пика пиридоксина на хроматограмме раствора анализируемой пробы, выраженная в единицах площади или высоты;
- A_{st} – площадь или высота пика пиридоксина на хроматограмме стандартного раствора, выраженная в единицах площади или высоты;
- ρ – массовая концентрация пиридоксина гидрохлорида в стандартном растворе, мкг/мл;
- m – масса пробы, г;
- 100 – общий объем раствора анализируемой пробы, мл;
- 2 – коэффициент разбавления реакции с борогидридом натрия при добавлении уксусной кислоты, в других случаях коэффициент разбавления равен 1,9;
- 1000 – коэффициент пересчета микрограммов в миллиграммы;
- 100 – коэффициент пересчета содержания на 100 г;
- 0,822 – коэффициент пересчета пиридоксина гидрохлорида на пиридоксин.

Результат определения содержания витамина В₆, мг/100г, представляют в пересчете на пиридоксин.

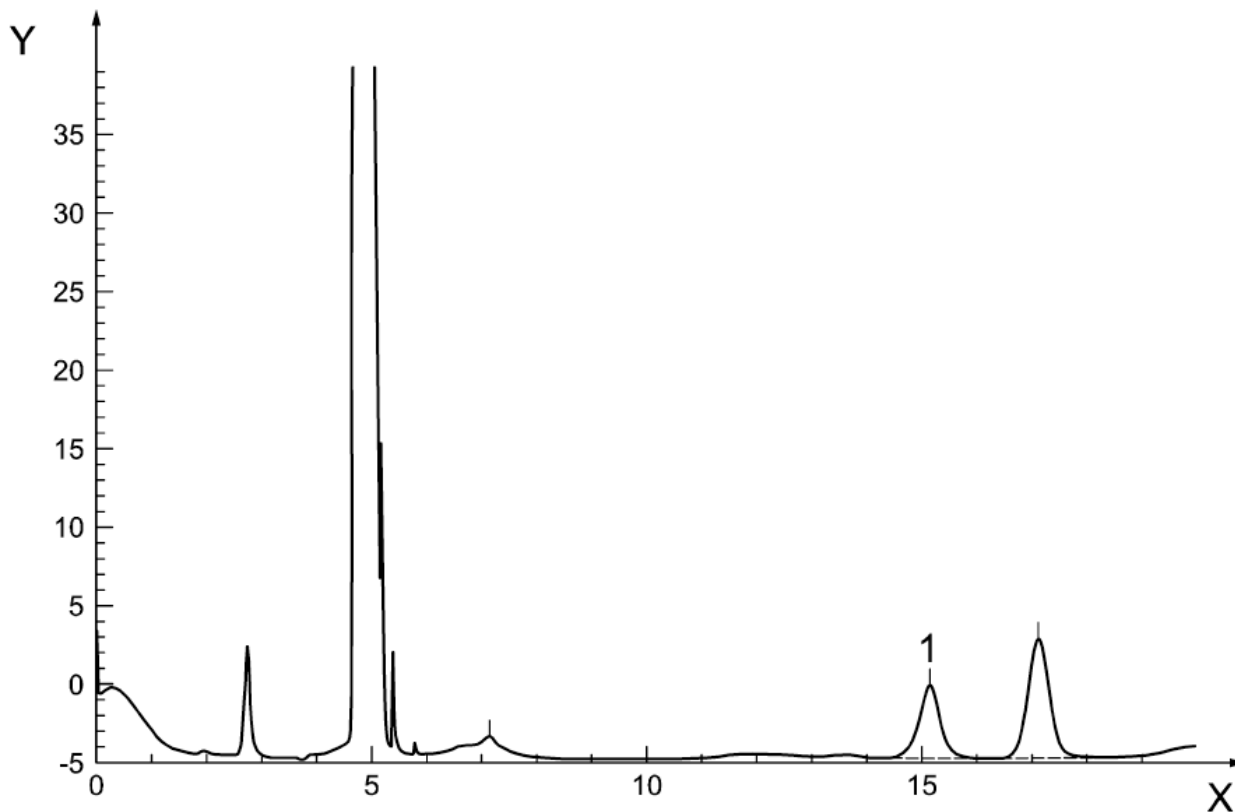
8 Протокол испытания

Протокол испытания должен соответствовать требованиям EN ISO/IEC 17025 [14] и содержать следующие данные:

- а) всю информацию, необходимую для идентификации пробы;
- б) ссылку на настоящий стандарт или используемый метод;
- в) дату и время отбора проб (если известно);
- г) дату получения пробы;
- д) дату проведения испытания;
- е) результаты и единицы измерения, в которых выражены результаты;
- ж) любые особенности, которые наблюдались в ходе проведения испытания;
- з) любые операции, не установленные в настоящем стандарте или рассматриваемые в качестве дополнительных, которые могли повлиять на результаты.

Приложение А
(справочное)

Пример хроматограммы



Пояснение:

Y Флуоресценция
X Время, мин
1 пиридоксин

Колонка: LiChrospher® 60 RP C 8 Select B, 5 мкм, 250 × 4 мм;
Подвижная фаза: в соответствии с 4.2.2;
Скорость потока: 1 мл/мин;
Объем введенной пробы: 30 мкл;
Детектор: Флуориметрический: длина волны возбуждения 290 нм, длина волны эмиссии 395 нм.

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

Приложение В (справочное)

Данные прецизионности

Данные были получены в основном с помощью метода, изложенного в приложении С без кислотного гидролиза. При кислотном гидролизе результаты не изменились.

Данные прецизионности для определения витамина В₆, указанные в таблице В.1, были установлены в ходе межлабораторных испытаний в соответствии с ISO 5725 [10], которые проводились генеральным управлением по вопросам конкуренции, потребления и пресечения мошенничества (DGCCRF). Совместное исследование было проведено с помощью следующей аналитической колонки: LiChrospher® 60 RP 8 Select В, размер частиц 5 мкм, диаметр 4,0 мм и длина 250 мм.

Данные прецизионности для определения витамина В₆, указанные в таблице В.2 были получены в ходе межлабораторных испытаний в соответствии с Руководством для совместных процедур исследования для проведения валидации характеристик метода анализа ассоциации аналитических сообществ (АОАС), см. [11], проведенного Манном и др., см. [7], [8] и основанного на методе Bergaentzlé, см. [3]. Совместное исследование было проведено с использованием Luna® 5 мкм колонки фенил-гексил ВЭЖХ⁴).

Таблица В.1 – Данные прецизионности для определения витамина В₆

Проба ^a	1	2	3	4	5	6	7	8
Год межлабораторного испытания	1993	1993	1993	1993	1993	1993	1993	1993
Количество лабораторий	12	12	12	12	12	12	12	12
Количество лабораторий, оставшихся после исключения выбросов	11	10	11	12	11	11	12	11
Количество выбросов (лабораторий)	32	29	31	36	33	33	35	33
Среднее значение \bar{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	13	10	8	4	4	6	3
Предел повторяемости r [$r = 2,8 \times s_r$], 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	13	12	12	13
Предел воспроизводимости R [$R = 2,8 \times s_R$], мг/100 г	0,05	0,14	0,19	0,39	0,20	0,23	0,51	1,22
Значение индекса Горвица (HorRat) в соответствии с [12]	1,7	2,3	2,1	2,1	1,1	1,1	1,1	1,4
^a 1 – детское питание; 2 – печень; 3 – продукты переработки зерна В; 4 – дрожжи; 5 – раствор для энтерального питания; 6 – шоколадный порошок; 7 – продукты переработки зерна А; 8 – сухое молоко								

⁴) Luna® 5 мкм фенил-гексил-овая колонка ВЭЖХ – пример продукции, имеющейся в продаже. Информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламой CEN указанной продукции. Допускается использовать аналогичную продукцию при условии обеспечения идентичных результатов.

Таблица В.2 – Данные прецизионности для определения витамина В₆ в разведенной смеси для детского питания

Проба ^а	1	2	3	4	5	6	7	8
Год межлабораторного испытания	2003	2003	2003	2003	2003	2003	2003	2003
Количество лабораторий	11	11	11	11	11	11	11	11
Количество лабораторий, оставшихся после исключения выбросов	9	9	8	9	7	9	9	9
Количество выбросов (лабораторий)	18	18	16	18	14	18	18	18
Среднее значение \bar{x} , мг/100 г	0,013	0,036	0,057	0,101	0,005	0,028	0,56	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 [$r = 2,8 \times s_r$], 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 [$R = 2,8 \times s_R$], мг/100 г	0,0056	0,0084	0,014	0,0168	0,0056	0,0084	0,0112	0,0196
Значение индекса Горвица (HorRat) в соответствии с [12]	0,81	0,44	0,48	0,53	2,06	0,58	0,42	0,43
^а 1 – смесь для детского питания на основе необогащенного молока; 2 – 4 – смесь для детского питания на основе обогащенного молока; 5 – необогащенная смесь для детского питания на основе сои; 6 – 8 – обогащенная смесь для детского питания на основе сои.								

**Приложение С
(справочное)**

Вариант обработки пробы без кислотного гидролиза

Следует заменить 6.2.1, 6.2.2 следующей процедурой:

В конической колбе взвешивают с точностью до 1 мг соответствующее количество пробы: 2,5 г (если предполагаемое содержание витамина В₆ превышает 2 мкг/г) или 5,0 г (если предполагаемое содержание витамина В₆ составляет менее 2 мкг/г). Добавляют 25 мл раствора ацетата натрия с концентрацией 0,05 моль/л (4.14), 2,5 мл глиоксиловой кислоты с концентрацией 1 моль/л (4.19), 400 мкл раствора сульфата железа (4.15) и 20 мг кислой фосфатазы (4.1). Оставляют раствор на ночь при температуре 37 °С при непрерывном перемешивании.

После охлаждения до комнатной температуры раствор переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и объем содержимого колбы доводят до метки водой. Встряхивают и фильтруют. Смешивают 5,0 мл фильтрата и 4,5 мл раствора боргидрида натрия с концентрацией 0,1 моль/л (4.18). Встряхивают в течение 3 мин. Добавляют 0,5 мл ледяной уксусной кислоты (4.3). Встряхивают в течение 1 мин. Отфильтровывают, используя мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. Используют данный фильтрат для хроматографии. При расчете по формуле 4 заменяют 100 на 50 (общий объем раствора анализируемой пробы в миллилитрах).

Приложение D
(справочное)

Примеры молярных коэффициентов поглощения

Таблица D.1 – Примеры молярных коэффициентов поглощения (ϵ) соединений витамина B₆ [6], [13]

Соединение	Растворитель	$\lambda_{\text{макс}}$, нм	ϵ , л моль ⁻¹ см ⁻¹	M , г·моль ⁻¹
Пиридоксина гидрохлорид	0,1 моль/л HCl, pH \approx 1	290	8600	205,6
Пиридоксина гидрохлорид	0,1 моль/л фосфатный буфер, pH 7	323,8	7300	205,6
Пиридоксаль гидрохлорид	0,1 моль/л HCl, pH \approx 1	288	8960 (9000)	203,6
Пиридоксаль-5'-фосфат	0,1 моль/л фосфатный буфер, pH 7	388	5020	247,1
Пиридоксамина дигидрохлорид	0,1 моль/л HCl, pH \approx 1	292	8200	241,1
Пиридоксамина дигидрохлорид	0,1 моль/л фосфатный буфер, pH 7	253	4600	241,1
Пиридоксамин-5'-фосфат гидрохлорид	0,1 моль/л фосфатный буфер, pH 7	326	8370	241,1
Пиридоксаль-5'-фосфат	0,1 моль/л HCl, pH \approx 1	293	7200	247,1

**Приложение ДА
(справочное)**

**Сведения о соответствии ссылочного европейского стандарта
межгосударственному стандарту**

Таблица ДА.1

Обозначение ссылочного европейского стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование соответствующего межгосударственного стандарта
EN ISO 3696	IDT	ГОСТ ISO 3696-2013 «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>		

Библиография

- 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)
- EN 14166 Foodstuffs - Determination of vitamin B₆ by microbiological assay
(Продукты пищевые. Определение содержания витамина B₆ с помощью микробиологического анализа)
- BERGAENTZLÉ M., ARELLA F., BOURGUIGNON J.B., HASSELMANN C. Determination of vitamin B₆ in foods by HPLC: a collaborative study. Food Chem. 1995, 52 pp. 81–86
(Определение содержания витамина B₆ в продуктах с помощью ВЭЖХ: совместные исследования)
- REITZER-BERGAENTZLÉ 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 pp. 321–324
(Определение витамина B₆ в продуктах после предколоночного образования производных свободных и фосфорилированных витаминеров в пиридоксоле)
- NDAW S., BERGAENTZLÉ M., AOUDE-WERNER D., HASSELMANN C. Extraction procedures for the Liquid Chromatographic determination of thiamin, riboflavin and vitamin B₆ in foodstuffs. Food Chem. 2000, 71 pp. 129–138
(Процедуры экстракции для определения тиамин посредством жидкостной хроматографии, рибофлавин и витамин B₆ в продуктах питания)
- MACHLIN L.J., ed. Handbook of Vitamins. Second Edition
(Справочник по витаминам. Второе издание)
- MANN D.L., WARE G.W., BONNIN E. Liquid Chromatographic analysis of vitamin B₆ in reconstituted infant formula: Collaborative Study. JAOAC. 2005, 88 (1) pp. 30–37
(Определение витамина B₆ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в продукции для питания детей раннего возраста. Совместное исследование)
- 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
(Определение витамина B₆ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в продукции для питания детей раннего возраста на основе сои)
- METZLER AND SNELL. Spectra and ionisation constants of the vitamin B₆ group and related 3-hydroxypyridine derivatives. J. Am. Chem. Soc. 1955, 77 pp. 2431–2437
(Постоянные спектров и ионизации группы витамина B₆ и связанные с ними производные 3-гидроксипиридина)
- ISO 5725 Precision of test methods — Determination of repeatability and reproducibility for a standard test method by inter-laboratory tests
(Точность методов испытаний. Определение повторяемости и воспроизводимости стандартного метода испытаний с помощью межлабораторных испытаний)
- AOAC INTERNATIONAL. AOAC Official Methods Program, Associate Referee's Manual on development, Study, Review, and Approval Process. Part IV AOAC Guidelines for Collaborative Studies, 1995, pp. 23–51.
(Руководство по разработке, исследованию, анализу и процессу утверждения. Часть IV AOAC Руководства по совместному исследованию)

ГОСТ EN 14164

(проект, ВУ, первая редакция)

Evaluation of Analytical Methods used for Regulation of Foods and Drugs, W. Horwitz. Anal. Chem. 1982, 54 (1) pp. 67A–76A

(Оценка аналитических методов, используемых для контроля над пищевыми продуктами и лекарствами)

OLLILAINEN V. HPLC analysis of vitamin B6 in foods. Agricultural and Food Science in Finland. 1999, 8 p. 559

(Анализ ВЭЖХ витамина В₆ в продуктах питания. Сельское хозяйство и пищевая наука в Финляндии)

EN ISO/IEC 17025:2005 Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien (ISO/IEC 17025:2005)

(Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий)

УДК МКС 67.050 IDT

Ключевые слова: витамин В₆, пиридоксин, пиридоксаль, пиридоксамин, высокоэффективная жидкостная хроматография, отбор проб

Научно-производственное республиканское унитарное предприятие
«Белорусский государственный институт стандартизации и сертификации» (БелГИСС)

Заместитель директора
по техническому нормированию,
стандартизации и методологии
оценки соответствия _____ О.Ф.Ильянкова

Начальник сектора
отдела ведения Национального
фонда технических нормативных
правовых актов _____ Т.В.Мысько

Начальник сектора
отдела технического нормирования
и стандартизации пищевой
и сельскохозяйственной продукции _____ К.А.Родригес

Ведущий инженер
отдела сертификации
услуг _____ Е.В.Филиппова

Ведущий инженер
отдела сертификации
услуг _____ А.В.Богданова

Ведущий инженер
отдела технического нормирования
и стандартизации пищевой
и сельскохозяйственной продукции _____ Н.Ю.Павленок

ГОСТ EN 14164

(проект, ВУ, первая редакция)

Инженер 1 категории
отдела технического нормирования
и стандартизации пищевой
и сельскохозяйственной продукции

_____ Н.Н.Шиманович