

---

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ  
(МГС)

---

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION  
(ISC)

---

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
СТАНДАРТ

ГОСТ  
ЕН 14663–  
2014

---

**ПРОДУКЦИЯ ПИЩЕВАЯ**

**Определение витамина В<sub>6</sub> (включая гликозилированные формы)  
методом высокозэффективной жидкостной хроматографии**

**(ЕН 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 B<sub>6</sub> (включая гликозилированные формы) с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии» [(«Foodstuffs – Determination of vitamin B<sub>6</sub> (including its glycosylated forms) by HPLC», IDT].

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

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

## 6 ВВЕДЕНИЕ

*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](http://www.gost.ru))*

© Стандартинформ, 2016

В Российской Федерации настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

**Содержание**

1 Область применения.....
2 Нормативные ссылки.....
3 Сущность метода.....
4 Реактивы.....
5 Оборудование.....
6 Методика проведения испытания.....
7 Вычисление результата.....
8 Прецизионность.....
9 Протокол испытания.....
Приложение А (справочное) Данные по прецизионности.....
Приложение В (справочное) Примеры подходящих условий проведения ВЭЖХ для определения соединений витамина В <sub>6</sub> .....
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 В<sub>6</sub> (включая гликозилированные формы)  
методом высокоэффективной жидкостной хроматографии**

Foodstuffs.

Determination of vitamin B<sub>6</sub> (including its glycosylated forms)  
by high performance liquid chromatography

Дата введения – 2017-06-01

**1 Область применения**

Настоящий стандарт устанавливает метод определения витамина В<sub>6</sub> в пищевой продукции с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Витамин В<sub>6</sub> определяется как сумма пиридоксина, пиридоксала, 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 В<sub>6</sub> (пиридоксаль, пиридоксамин и пиридоксин) извлекают из пищевой продукции путем кислотного гидролиза, затем подвергают ферментативному воздействию: дефосфорилируют, используя кислую фосфатазу, и дегликозилируют, используя  $\beta$ -глюкозидазу.

Полученные производные витамина В<sub>6</sub> 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),  $w$  ( $Cl_3CCOOOH$ )  $\geq 99,0\%$ .

**4.5 Раствор ацетата натрия молярной концентрацией  $c(CH_3COONa) = 2,5$  моль/дм<sup>3</sup>**

205 г ацетата натрия (см. 4.3) растворяют в 1 дм<sup>3</sup> воды.

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

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

4.7 Соляная кислота,  $c(HCl) = 1$  моль/дм<sup>3</sup>.

4.8 Соляная кислота,  $c(HCl) = 0,1$  моль/дм<sup>3</sup>.

4.9 Соляная кислота,  $c(HCl) = 0,2$  моль/дм<sup>3</sup>.

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

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

4.12 Фосфатаза кислая из картофеля. Ферментативная активность составляет около 5,3 U/mg<sup>1)</sup>.

<sup>1)</sup> U – данная единица измерения (международная или стандартная единица) определяется количеством фермента, который катализирует трансферформацию 1 мкмоль субстрата в минуту при стандартных условиях.

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

#### **4.13 Раствор кислой фосфатазы**

##### **4.13.1 Общие положения**

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

Раствор готовят в день проведения анализа.

##### **4.13.2 Проверка ферментативной активности кислой фосфатазы**

Взвешивают 10 г свинины, 5 г картофельного пюре или 5 г муки из цельного зерна в конической колбе и экстрагируют кислотой, как описано в 6.2.1. Добавляют к 12,5 см<sup>3</sup> раствора экстрагированной пробы 1 см<sup>3</sup> раствора кислой фосфатазы (см. 4.13.1) и дополнительно 1 см<sup>3</sup> раствора  $\beta$ -глюкозидазы (см. 4.15) и перемешивают. Инкубируют раствор в течение не менее 12 ч или в течение ночи при температуре 37 °C 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 В<sub>6</sub> в обоих растворах пробы эквивалентны. На хроматограмме должен отсутствовать пик фосфата пиридоксамина.

Примечание – Для межлабораторного испытания использовали кислую фосфатазу производства Sigma Nr P 3752<sup>1)</sup>.

#### **4.14 $\beta$ -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 $\beta$ -глюкозидазы**

##### **4.15.1 Общие положения**

<sup>1)</sup> 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.

## ГОСТ EN 14663–2014

Растворяют 100 мг  $\beta$ -глюкозидазы (см. 4.14) в 10 см<sup>3</sup> воды в конической колбе, перемешивая в течение 2 мин.

Раствор готовят в день проведения анализа.

### 4.15.2 Проверка ферментативной активности $\beta$ -глюкозидазы

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

Определяют массовую концентрацию витаминов в соответствии с 6.6. Ферментативная активность используемого фермента считается достаточной, если значения массовой концентрации соединений витамина В<sub>6</sub> в обоих растворах пробы эквивалентны. На хроматограмме должен отсутствовать пик фосфата пиридоксамина.

Примечание – Для межлабораторного испытания использовали кислую фосфатазу Sigma Nr G-0395<sup>1)</sup>.

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

(817 ± 5) мг трихлоруксусной кислоты (см. 4.4) растворяют в 15 см<sup>3</sup> серной кислоты молярной концентрацией 1 моль/дм<sup>3</sup> (см. 4.10), переливают в мерную колбу вместимостью 1000 см<sup>3</sup>, 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.

<sup>1)</sup> 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 Пиридоксала (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/см<sup>3</sup>

71,7 мг пиридоксамина дигидрохлорида (см. 4.18.2) растворяют в соляной кислоте молярной концентрацией 0,1 моль/дм<sup>3</sup> (см. 4.8) в мерной колбе вместимостью 100 см<sup>3</sup>, объем содержимого в колбе доводят до метки этим же раствором соляной кислоты.

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

##### 4.19.2 Исходный раствор пиридоксала (PL) массовой концентрацией $\rho$ (PL) приблизительно 500 мкг/см<sup>3</sup>

60,9 мг пиридоксала гидрохлорида (см. 4.18.3) растворяют в соляной кислоте молярной концентрацией 0,1 моль/дм<sup>3</sup> (см. 4.8) в мерной колбе вместимостью 100 см<sup>3</sup>, объем содержимого в колбе доводят до метки этим же раствором соляной кислоты.

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

##### 4.19.3 Исходный раствор пиридоксина (PN), массовой концентрацией $\rho$ (PN) приблизительно 500 мкг/см<sup>3</sup>

60,8 мг пиридоксина гидрохлорида (см. 4.18.4) растворяют в соляной кислоте молярной концентрацией 0,1 моль/дм<sup>3</sup> (см. 4.8) в мерной колбе вместимостью 100 см<sup>3</sup>, объем содержимого в колбе доводят до метки этим же раствором соляной кислоты.

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

#### 4.19.4 Определение концентраций растворов

Отбирают пипеткой 1 см<sup>3</sup> исходного раствора пиридоксамина (см. 4.19.1), пиридоксала (см. 4.19.2) и пиридоксина (см. 4.19.3) соответственно в мерные колбы вместимостью 50 см<sup>3</sup> и содержимое колб доводят до метки 0,1 моль/дм<sup>3</sup> 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/дм<sup>3</sup> HCl (см. таблицу 1).

Таблица 1 – Примеры молярных коэффициентов поглощения соединений витамина B<sub>6</sub>

Соединение	Растворитель	$\lambda_{\max}$	$\varepsilon_i$ , ммоль <sup>-1</sup> см <sup>-1</sup>	$M_i$ , г/моль	$F$
PM·2HCl <sup>a)</sup>	0,1 моль/дм <sup>3</sup> HCl, pH ~ 1	292	8,2	241,1	0,698
PL·HCl <sup>b)</sup>	0,1 моль/дм <sup>3</sup> HCl, pH ~ 1	288	9,0	203,6	0,821
PN·HCl <sup>c)</sup>	0,1 моль/дм <sup>3</sup> HCl, pH ~ 1	291	8,6	205,6	0,823

<sup>a)</sup> PM·2HCl – Пиридоксамина дидрохлорид (4.18.2).

<sup>b)</sup> PL·HCl – Пиридоксала пидрохлорид (4.18.3).

<sup>c)</sup> PN·HCl – Пиридоксина пидрохлорид (4.18.4).

Массовую концентрацию пиридоксамина, пиридоксала и пиридоксина в исходных растворах  $\rho_i$ , мкг/см<sup>3</sup>, вычисляют, используя молярный коэффициент поглощения, по формуле

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

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

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

$V$  – коэффициент разбавления, см<sup>3</sup> (в данном случае  $V = 50$  см<sup>3</sup>);

$F$  – коэффициент для вычисления доли свободных форм соединений витамина B<sub>6</sub>;

$\varepsilon_i$  – молярный коэффициент поглощения PM, PL или PN при соответствующем pH согласно таблице 1, ммоль<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup>.

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 $\rho$ (PM) приблизительно 10 мкг/см<sup>3</sup>

Разбавляют 2 см<sup>3</sup> исходного раствора пиридоксамина (см. 4.19.1)

0,1 моль/дм<sup>3</sup> HCl (см. 4.8) и доводят до 100 см<sup>3</sup>. Полученный раствор хранению не подлежит.

**4.20.2 Стандартный раствор пиридоксала (PL) I, ρ(PL) приблизительно 10 мкг/см<sup>3</sup>**

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

**4.20.3 Стандартный раствор пиридоксина (PN) I, ρ(PL) приблизительно 10 мкг/см<sup>3</sup>**

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

**4.20.4 Стандартный раствор пиридоксамина (PM) II, ρ(PM) приблизительно 1 мкг/см<sup>3</sup>**

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

**4.20.5 Стандартный раствор пиридоксала (PL) II, ρ(PL) приблизительно 1 мкг/см<sup>3</sup>**

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

**4.20.6 Стандартный раствор пиридоксина (PN) II, ρ(PL) приблизительно 1 мкг/см<sup>3</sup>**

Разбавляют 10 см<sup>3</sup> стандартного раствора пиридоксина (см. 4.20.3) 0,1 моль/дм<sup>3</sup> HCl (см. 4.8) и доводят до 100 см<sup>3</sup>. Полученный раствор хранению не подлежит.

**4.20.7 Проверка хроматографической чистоты методом ВЭЖХ**

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

Степень чистоты образцов сравнения  $R_i$ , %, вычисляют по формуле

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

где  $x_i$  – площадь пика образца сравнения  $i$ ;

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

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

#### **4.21 Смешанный градуировочный раствор (например $\rho(\text{PM}, \text{PL}, \text{PN}) = 0,1 \text{ мкг/см}^3$ до $10 \text{ мкг/см}^3$ )**

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<sup>3</sup> и при необходимости доводят 0,1 моль/дм<sup>3</sup> HCl (см. 4.8) до объема 6,5 см<sup>3</sup>. Доводят pH до значения 4,8 ед. pH, используя раствор ацетата натрия молярной концентрацией 2,5 моль/дм<sup>3</sup> (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 водянную баню, оборудованные мешалками и позволяющие устанавливать температуру на уровне 37 °C.

#### **5.4 Система для ВЭЖХ**

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

## 5.5 Колонки для ВЭЖХ

Используют обращенно-фазовую колонку со следующими характеристиками:

Luna™ RP C<sub>18</sub>, 5 мкм<sup>1)</sup>, размер частицы 5 мкм, диаметр 4,0 мм, длина 250 мм<sup>2)</sup>. Другие примеры подходящих колонок для ВЭЖХ приведены в приложении В.

## 5.6 Устройства фильтровальные

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

# 6 Методика проведения испытания

## 6.1 Подготовка анализируемой пробы

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

## 6.2 Подготовка раствора анализируемой пробы

### 6.2.1 Экстракция

#### 6.2.1.1 Общие положения

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

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

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

<sup>1)</sup> 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.

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

или 1 моль/дм<sup>3</sup> (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 миллиграммма в конической колбе вместимостью 150 см<sup>3</sup>, добавляют 50 см<sup>3</sup> 0,1 моль/дм<sup>3</sup> соляной кислоты (см. 4.8), перемешивают и проверяют, чтобы значение pH составляло приблизительно 1 ед. pH.

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

Фильтруют или центрифугируют при 3000 об/мин аликовотную часть (приблизительно 50 см<sup>3</sup>) 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 миллиграммма в конической колбе вместимостью 150 см<sup>3</sup>, добавляют 10 см<sup>3</sup> 1 моль/дм<sup>3</sup> соляной кислоты (см. 4.7), доводят водой до приблизительно 50 см<sup>3</sup>, перемешивают и проверяют, чтобы значение pH составляло приблизительно 1 ед. pH.

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

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

При мечание – Во время автоклавирования может произойти взаимное превращение различных форм витамина, например, путем трансамигрирования. 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  $\beta$ -глюкозилированного связанного пиридоксина, ферментативная обработка  $\beta$ -глюкозидазой не является необходимой. Лабораторные эксперименты показывают, что результаты определения общего содержания витамина В<sub>6</sub> в пищевой продукции, полученные с применением и без применения  $\beta$ -глюкозидазы для ферментативной обработки, были приблизительно одинаковыми (см. [2], [7]).

Отбирают пипеткой 12,5 см<sup>3</sup> экстракта пробы по 6.2.1.2, 6.2.1.3 в коническую колбу вместимостью 20 см<sup>3</sup> и доводят pH до значения (4,8 ± 0,1) ед. pH, используя раствор ацетата натрия (см. 4.5). Добавляют 1 см<sup>3</sup> раствора кислой фосфатазы (см. 4.13) и 1 см<sup>3</sup> раствора  $\beta$ -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 °C, постоянно перемешивая.

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

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

Перед хроматографическим анализом фильтруют аликвоту (приблизительно 2 см<sup>3</sup>) через мембранный фильтр (см. 5.6) и разбавляют подвижной фазой, если необходимо.

### 6.3 Подготовка «холостой» пробы

Отбирают пипеткой 12,5 см<sup>3</sup> раствора соляной кислоты (см. 4.8) в коническую колбу вместимостью 20 см<sup>3</sup> и доводят pH до значения (4,8 ± 0,1) ед. pH, используя раствора ацетата натрия молярной концентрацией 2,5 моль/дм<sup>3</sup> (см. 4.5). Добавляют 1 см<sup>3</sup> раствора кислой фосфатазы (см. 4.13) и 1 см<sup>3</sup> раствора  $\beta$ -глюкозидазы (см. 4.15) и перемешивают. Инкубируют раствор в течение не менее 12 ч или в течение ночи при температуре 37 °C при постоянном перемешивании.

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

## ГОСТ EN 14663–2014

доводят водой до метки, встряхивают и фильтруют через сухой складчатый бумажный фильтр, удаляя первые 5 см<sup>3</sup> фильтрата.

Перед хроматографическим анализом фильтруют аликвоту (приблизительно 2 см<sup>3</sup>) 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, РЛ и РН друг от друга, а также от пиков всех других веществ пробы до базовой линии.

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

Колонка ВЭЖХ – в соответствии с 5.5;

Подвижная фаза – в соответствии с 4.16;

Расход жидкости – 1,5 см<sup>3</sup>/мин;

Вводимый объем – от 1 до 50 мм<sup>3</sup>;

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, РЛ и РН путем сравнения времени удерживания пиков на хроматограммах раствора анализируемой пробы и стандартного раствора. Идентификацию пика допускается также проводить с помощью сдвига значения pH в сторону увеличения, например при установлении pH = 6,6 ед. pH при использовании устройства постколоночной дериватизации (см. 5.4) при скорости потока послеколоночного реагента 0,1 см<sup>3</sup>/мин (см. 4.6). Обнаружение осуществляется при возбуждении при 330 нм и регистрации при 390 нм (см. [2], [4], [5]).

Примечание – Увеличение значения pH путем использования послеколоночного реагента (см. 4.6) приводит к сдвигу длины волны возбуждения до 330 нм. Кроме того, избирательность матриц улучшается в связи с уменьшением матрицы пико в ([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 см<sup>3</sup> 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 линейной регрессии на основе концентрации и площади пика в градуировочных растворах;

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

Значение  $x_i$  вычисляют по формуле

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

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

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

Коэффициент разбавления  $F$  вычисляют по формуле

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

где  $V$  – общий объем раствора кислой вытяжки пробы (см. 6.2.1.2), (см. 6.2.1.3), см<sup>3</sup>;

$V_1$  – общий объем раствора кислой вытяжки пробы, подвергнутый ферментативной обработке (см. 6.2.2), см<sup>3</sup>.

7.2 Массовую долю витамина В<sub>6</sub> 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 РМ на РН;

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

1,012 – коэффициент для пересчета РЛ на РН.

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

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

7.3 Массовую долю витамина В<sub>6</sub> 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 В<sub>6</sub> 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 наблюдалась 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 РМ, РЛ и РН соответственно. Относительные стандартные отклонения от общего содержания витамина В<sub>6</sub> в последовательности, включающей от трех до пяти определений в различных продуктах, варьируются от 2 % до 6 %.

Полнота извлечения РМ, РЛ и РН варьируется от 85 % до 105 % (см. [2], [3]). Определение общего содержания витамина В<sub>6</sub> 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  $\beta$ -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 В <sub>6</sub>	$\bar{x} = 0,667$ 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 В <sub>6</sub>	$\bar{x} = 1,204$ мг/100 г	$r = 0,089$

## ГОСТ EN 14663–2014

Значения для овощей с ветчиной (детское питание):

Пиридоксамин	$\bar{x} = 0,043 \text{ мг}/100 \text{ г}$	$r = 0,005$
Пиридоксаль	$\bar{x} = 0,009 \text{ мг}/100 \text{ г}$	$r = 0,004$
Пиридоксин	$\bar{x} = 0,047 \text{ мг}/100 \text{ г}$	$r = 0,010$
Витамин B <sub>6</sub>	$\bar{x} = 0,107 \text{ мг}/100 \text{ г}$	$r = 0,011$

Значения для мультивитаминного напитка:

Пиридоксамин	$\bar{x} = 0,004 \text{ мг}/100 \text{ г}$	$r = 0,003$
Пиридоксаль	$\bar{x} = 0,004 \text{ мг}/100 \text{ г}$	$r = 0,003$
Пиридоксин	$\bar{x} = 0,374 \text{ мг}/100 \text{ г}$	$r = 0,056$
Витамин B <sub>6</sub>	$\bar{x} = 0,380 \text{ мг}/100 \text{ г}$	$r = 0,056$

### 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	$\bar{x} = 0,065 \text{ мг}/100 \text{ г}$	$R = 0,035$
Пиридоксаль	$\bar{x} = 0,080 \text{ мг}/100 \text{ г}$	$R = 0,071$
Пиридоксин	$\bar{x} = 0,523 \text{ мг}/100 \text{ г}$	$R = 0,151$
Витамин B <sub>6</sub>	$\bar{x} = 0,667 \text{ мг}/100 \text{ г}$	$R = 0,193$

Значения для порошкового картофельного пюре:

Пиридоксамин	$\bar{x} = 0,163 \text{ мг}/100 \text{ г}$	$R = 0,089$
Пиридоксаль	$\bar{x} = 0,032 \text{ мг}/100 \text{ г}$	$R = 0,022$
Пиридоксин	$\bar{x} = 1,008 \text{ мг}/100 \text{ г}$	$R = 0,314$
Витамин B <sub>6</sub>	$\bar{x} = 1,204 \text{ мг}/100 \text{ г}$	$R = 0,369$

Значения для овощей с ветчиной (детское питание):

Пиридоксамин	$\bar{x} = 0,043 \text{ мг}/100 \text{ г}$	$R = 0,013$
Пиридоксаль	$\bar{x} = 0,009 \text{ мг}/100 \text{ г}$	$R = 0,013$
Пиридоксин	$\bar{x} = 0,047 \text{ мг}/100 \text{ г}$	$R = 0,021$
Витамин B <sub>6</sub>	$\bar{x} = 0,107 \text{ мг}/100 \text{ г}$	$R = 0,039$

Значения для мультивитаминного напитка:

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

Пиридоксин	$\bar{x} = 0,374$ мг/100 г	$R = 0,086$
Витамин В <sub>6</sub>	$\bar{x} = 0,380$ мг/100 г	$R = 0,095$

## 9 Протокол испытания

Протокол испытания должен содержать по меньшей мере следующие сведения:

- а) всю информацию, необходимую для полной идентификации пробы;
- б) ссылку на настоящий стандарт или используемый метод;
- с) дату и метод отбора пробы (если они известны);
- д) дату поступления пробы в лабораторию;
- е) дату проведения испытания;
- ф) результаты и единицы, в которых выражены результаты испытания;
- г) информацию о других специфичных особенностях, которые наблюдались в ходе проведения испытания;
- х) 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 В<sub>6</sub> были установлены в ходе межлабораторных испытаний в соответствии с [8], проведенных бывшим BgVV [Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (Немецкий федеральный институт по защите прав потребителей и ветеринарной медицине)].

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

Проба	Порошковая манная крупа с молоком			
Вещество, определяемое при анализе	Пиридоксамин	Пиридоксаль	Пиридоксин	Витамин В <sub>6</sub> <sup>a)</sup>
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 $RSR$ , %	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 $RSR$ , %	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	–

<sup>a)</sup> См. формулу (7).

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

Проба	Порошковое картофельное пюре			
Вещество, определяемое при анализе	Пиридоксамин	Пиридоксаль	Пиридоксин	Витамин В <sub>6</sub> <sup>а)</sup>
Год совместного исследования	2000			
Количество лабораторий	10			
Количество проб	5 (9)			
Количество лабораторий, оставшихся после исключения выбросов	9			
Количество оставшихся результатов	49			
Среднее значение $x$ , 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	–

<sup>а)</sup>См. формулу (7).

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

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

<sup>а)</sup> См. формулу (7).

Таблица А.4 – Данные результатов испытаний для мультивитаминного напитка

Проба	Мультивитаминный напиток			
	Пиридоксамин	Пиридоксаль	Пиридоксин	Витамин В <sub>6</sub> <sup>а</sup>
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 $r$ ( $2,8 \cdot s_r$ ), мг/100 г	0,003	0,003	0,056	0,056
Стандартное отклонение воспроизводимости $s_R$ , мг/100 г	0,002	0,002	0,030	0,034
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости $RSD_R$ , %	38,6	49	8,0	8,8
Значение воспроизводимости $R$ ( $2,8 \cdot s_R$ ), мг/100 г	0,005	0,005	0,086	0,095
Среднее значение коэффициента извлечения компонента, %	98,1	94,5	98,2	–
Стандартное отклонение коэффициента извлечения компонента, %	11,4	6,2	8,4	–
Количество результатов, использованных для расчета	23	23	23	–

<sup>а</sup>См. формулу (7).

**Приложение В**  
**(справочное)**

**Примеры подходящих условий проведения ВЭЖХ для определения соединений витамина В<sub>6</sub>**

Таблица В.1 – Примеры подходящих условий ВЭЖХ для определения соединений витамина В<sub>6</sub>

Лаборатория	Разделительная колонка	Размеры, мм × мм	Температура, °C	Подвижная фаза	Расход, см <sup>3</sup> /мин	Обнаружение, нм		Времяудерживания, мин		
						<i>E<sub>x</sub></i>	<i>E<sub>m</sub></i>	PM <sup>b)</sup>	PL <sup>c)</sup>	PN <sup>d)</sup>
1a	LUNA RP C <sub>18</sub> , 5 мкм	250 × 4,0	30	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (с = 0,015 моль/дм <sup>3</sup> ), содержание ТХУ (с = 0,005 моль/дм <sup>3</sup> )	1,5	290	390	~3	~7	~11,4
1b	LUNA RP C <sub>18</sub> , 5 мкм	250 × 4,0	30	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (с = 0,015 моль/дм <sup>3</sup> ), содержание ТХУ (с = 0,005 моль/дм <sup>3</sup> ) и постеколоночный реагент: K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (с = 0,15 моль/дм <sup>3</sup> )	1,5 0,5	330	390	~2,4	~6,9	~11,2
2	LUNA RP C <sub>18</sub> , 5 мкм	250 × 4,0	30	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (с = 0,015 моль/дм <sup>3</sup> ), содержание ТХУ (с = 0,005 моль/дм <sup>3</sup> )	1,5	290	390	~3	~7,9	~13,0
3	AQUA C <sub>18</sub> , 5 мкм <sup>a)</sup> Предколонка: RP C <sub>18</sub> , 5 мкм	250 × 4,6 4,0 × 3,0	30	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (с = 0,015 моль/дм <sup>3</sup> ), содержание ТХУ (с = 0,005 моль/дм <sup>3</sup> )	2,0 1,5	290	390	~2,2 ~2,7	~4,7 ~5,4	~6,4 ~6,9
4	LiChrospher 60 RP C <sub>6</sub> Выборка В, 5 мкм	250 × 4,0	30	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (с = 0,03 моль/дм <sup>3</sup> ), содержание ТХУ (с = 0,05 моль/дм <sup>3</sup> ) 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 <sup>3</sup> /мин	Обнаружение, нм		Времяудерживания, мин		
						$E_x$	$E_m$	PM <sup>b)</sup>	PL <sup>c)</sup>	PN <sup>d)</sup>
5	Nucleosil 120 C <sub>18</sub> , 5 мкм Предколонка: RP C <sub>18</sub>	250 × 4,0	~ 20	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (c = 0,015 моль/дм <sup>3</sup> ), содержание ТХУ (c = 0,005 моль/дм <sup>3</sup> )	2,0	290	390	~2,0	~4,9	~7,0
6	LUNA RP C <sub>18</sub> , 5 мкм	250 × 4,0	30	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (c = 0,015 моль/дм <sup>3</sup> ), содержание ТХУ (c = 0,005 моль/дм <sup>3</sup> )	2,0	290	390	~2,5	~6,3	~9,2
7	LUNA RP C <sub>18</sub> , 5 мкм	250 × 4,0	30	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (c = 0,015 моль/дм <sup>3</sup> ), содержание ТХУ (c = 0,005 моль/дм <sup>3</sup> )	2,0	290	390	~2,8	~6,5	~11,8
8	LUNA RP C <sub>18</sub> , 5 мкм	250 × 4,0	30	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (c = 0,015 моль/дм <sup>3</sup> ), содержание ТХУ (c = 0,005 моль/дм <sup>3</sup> )	2,0	290	390	~2,8	~6,9	~11,4
9	Spherisorb 80 ODS-2, 5 мкм	250 × 4,6	30	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (c = 0,015 моль/дм <sup>3</sup> ), содержание ТХУ (c = 0,005 моль/дм <sup>3</sup> )	2,0	290	390	~5,5	~10,4	~16,1
10	LUNA RP C <sub>18</sub> , 5 мкм	250 × 4,0	30	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (c = 0,015 моль/дм <sup>3</sup> ), содержание ТХУ (c = 0,005 моль/дм <sup>3</sup> ) и послеколоночный реагент: K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (c = 0,15 моль/дм <sup>3</sup> )	1,0 0,5	330	390	~6,9	~17,9	~28,4

<sup>a)</sup>Phenomenex, 125 A.<sup>b)</sup>PM – пиридоксамин.<sup>c)</sup>PL – пиридоксаль.<sup>d)</sup>PN – пиридоксин.

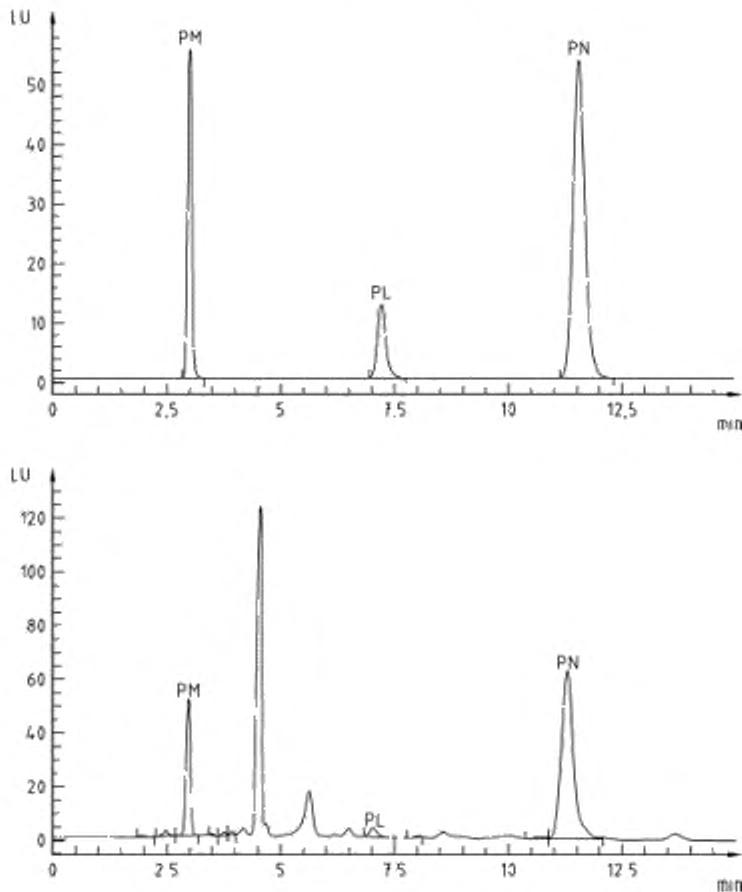
**Приложение С**  
**(справочное)**

**Примеры молярных коэффициентов поглощения**

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

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

**Приложение D**  
**(справочное)**  
**Примеры хроматограмм**



Обозначения:

LU – интенсивность флуоресценции

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

Условия хроматографического анализа:

колонка ВЭЖХ – в соответствии с 5.5;

подвижная фаза – в соответствии с 4.16;

расход – 1,5 см<sup>3</sup>/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 <sup>1)</sup> «Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы контроля»
<p>Примечание – В настоящей таблице использовано следующее условное обозначение степени соответствия стандарта:</p> <p>IDT – идентичный стандарт</p>		

<sup>1)</sup> В Российской Федерации действует ГОСТ Р 52501-2005 «Вода для лабораторного анализа. Технические условия».

## Библиография

- [1] Bognar, A.: Bestimmung von Vitamin B<sub>6</sub> in Lebensmitteln mit Hilfe der Hochdruckflüssig-Chromatographie (HPLC) Z Lebensm Unters Forsch A, 1985, 181: 200–205 (Определение содержания витамина B<sub>6</sub> в продуктах питания с использованием ВЭЖХ)
- [2] Bognár, A., Ollilainen, V.: Influence of Extraction on the Determination of Vitamin B6 in Food by HPLC Z Lebensm Unters Forsch A, 1997, 204: 327–335 (Влияние экстракции на определение витамина B<sub>6</sub> в пищевых продуктах методом ВЭЖХ)
- [3] Metzler, D. E., and Snell, E. E.: Spectra and Ionisation Constants of the Vitamin B6 – Group and Related 3-Hydroxypyridine Derivates Journal of the American Chemical Society. 1955, 77:2431–2437 (Константы спектра и ионизации группы витамина B<sub>6</sub> – группа и связанные производные 3-гидроксиридина)
- [4] Bitsch, R., Möller, J., J Chromatogr 1989, 463: 207–211 (Журнал хроматографии)
- [5] Ollilainen, V.: HPLC Analysis of Vitamin B6 in Agricultural and Food Science in Finland Department of Applied Chemistry and Microbiology University of Helsinki 1999. Vol. 8:No. 6: 515–619 (Анализ ВЭЖХ витамина B<sub>6</sub> в науках о сельском хозяйстве и продуктах питания в Финляндии)
- [6] Bergaentzle, M., Arella, F., Bourguignon, J.B., Hasselmann, C.: Determination of vitamin B6 in foods by HPLC A collaborative study. Food Chemistry, 1995, 52: 81–86 (Определение витамина B<sub>6</sub> в пищевых продуктах методом ВЭЖХ)
- [7] Ndaw, S., Bergaentzle, M., Aoude-Werner, D., Hasselmann, C.: Extraction procedures for the liquid chromatographic determination of thiamin Riboflavin and vitamin B6 in foodstuffs Food Chemistry 2000, 71, 129–138 (Процедуры экстракции для определения тиамина, рибофлавина и витамина B<sub>6</sub> в пищевых продуктах методом жидкостной хроматографии)
- [8] ISO 5725:1986<sup>1)</sup> 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)

<sup>1)</sup> 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 В<sub>6</sub>, гликозилированные формы, высокоэффективная жидкостная хроматография