

---

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ

(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION  
(ISC)

---

М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й  
С Т А Н Д А Р Т

ГОСТ  
ЕН 14663—  
2014

---

## ПРОДУКЦИЯ ПИЩЕВАЯ

Определение витамина В<sub>6</sub>  
(включая гликозилированные формы)  
методом высокоэффективной 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 собственноного перевода на русский язык англоязычной версии стандарта, указанного в пункте 5

2 ВНЕСЕН Государственным комитетом по стандартизации Республики Беларусь

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 25 июня 2014 г. № 45)

За принятие проголосовали:

| Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97 | Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97 | Сокращенное наименование национального органа по стандартизации |
|---|------------------------------------|---|
| Беларусь  | BY                                 | Госстандарт Республики Беларусь                                 |
| Киргизия  | KG                                 | Кыргызстандарт  |
| Молдова   | MD                                 | Молдова-Стандарт  |
| Россия  | RU                                 | Росстандарт   |
| Таджикистан   | TJ                                 | Таджикстандарт  |
| Узбекистан  | UZ                                 | Узстандарт  |

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 29 июня 2016 г. № 733-ст межгосударственный стандарт ГОСТ EN 14663—2014 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июня 2017 г.

5 Настоящий стандарт идентичен европейскому стандарту EN 14663:2005 «Продукты пищевые. Определение витамина B<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 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](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 .....   | 1  |
| 2 Нормативные ссылки .....   | 1  |
| 3 Сущность метода .....  | 1  |
| 4 Реактивы .....   | 1  |
| 5 Оборудование .....   | 5  |
| 6 Методика проведения испытания .....  | 5  |
| 7 Вычисление результата .....  | 7  |
| 8 Прецизионность .....   | 8  |
| 9 Протокол испытания .....   | 9  |
| Приложение А (справочное) Данные по прецизионности .....   | 10 |
| Приложение В (справочное) Примеры подходящих условий проведения ВЭЖХ<br>для определения соединений витамина В <sub>6</sub> ..... | 13 |
| Приложение С (справочное) Примеры молярных коэффициентов поглощения .....  | 14 |
| Приложение D (справочное) Примеры хроматограмм .....   | 15 |
| Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии ссылочных европейских<br>стандартов межгосударственным стандартам .....       | 16 |
| Библиография .....   | 17 |

## ПРОДУКЦИЯ ПИЩЕВАЯ

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

Foodstuffs.

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

Дата введения — 2017—06—01

**1 Область применения**

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

Витамин B<sub>6</sub> определяется как сумма пиридоксина, пиридоксала, пиридоксамина, включая их фосфорилированные производные, а также  $\beta$ -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 недокументированных ссылок применяют последнее издание ссылочного стандарта (включая все его изменения).

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

**3 Сущность метода**

Производные витамина B<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 B<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),  $w$  ( $Cl_3CCOOH$ )  $\geq 99,0\%$ .

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,  $c(\text{HCl}) = 1$  моль/дм<sup>3</sup>.

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

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

4.10 Серная кислота,  $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 1$  моль/дм<sup>3</sup>.

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

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

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 °С при постоянном перемешивании. Повторяют эту операцию с двойным количеством раствора кислой фосфатазы.

Определяют массовую концентрацию витаминов в соответствии с 6.6. Ферментативная активность используемого фермента считается достаточной, если значения массовой концентрации соединений витамина  $B_6$  в обоих растворах пробы эквивалентны. На хроматограмме должен отсутствовать пик фосфата пиридоксамина.

П р и м е ч а н и е — Для межлабораторного испытания использовали кислую фосфатазу производства Sigma Nr P 3752<sup>2)</sup>.

#### 4.14 $\beta$ -глюкозидаза из миндаля с ферментативной активностью приблизительно 3,2 U/мг

Необходимо, чтобы используемый фермент с положительным результатом проходил проверку ферментативной активности согласно 4.15.2 (более подробная информация приведена в [2], [7]).

#### 4.15 Раствор $\beta$ -глюкозидазы

##### 4.15.1 Общие положения

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 °С 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  $B_6$  в обоих растворах пробы эквивалентны. На хроматограмме должен отсутствовать пик фосфата пиридоксамина.

П р и м е ч а н и е — Для межлабораторного испытания использовали кислую фосфатазу Sigma Nr G-0395<sup>2)</sup>.

<sup>1)</sup> У — данная единица измерения (межнародная или стандартная единица) определяется количеством фермента, который катализирует трансформацию 1 мкмоль субстрата в минуту при стандартных условиях.

<sup>2)</sup> Данная информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламой указанного продукта со стороны СЕN. Допускается использовать аналогичную продукцию, если она позволяет получать сопоставимые результаты.

#### 4.16 Подвижная фаза для ВЭЖХ (серная кислота, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,015$ 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. 4.19.4 и 4.20.7).

4.18.2 Пиридоксамина (PM) дигидрохлорид,  $w(\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot 2\text{HCl}) \geq 98\%$ .

4.18.3 Пиридоксала (PL) гидрохлорид,  $w(\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}_3 \cdot \text{HCl}) \geq 98\%$ .

4.18.4 Пиридоксина (PN) гидрохлорид,  $w(\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3 \cdot \text{HCl}) \geq 98\%$ .

#### 4.19 Исходные растворы

##### 4.19.1 Исходный раствор пиридоксамина (PM), массовой концентрацией $\rho(\text{PM})$ приблизительно 500 мкг/дм<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 $\rho(\text{PL})$ приблизительно 500 мкг/дм<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 $\rho(\text{PN})$ приблизительно 500 мкг/дм<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. 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).

Т а б л и ц а 1 — Примеры молярных коэффициентов поглощения соединений витамина B<sub>6</sub>

| Соединение            | Растворитель                         | $\lambda_{\text{max}}$ | $\varepsilon_{\rho}$ , ммоль <sup>-1</sup> см <sup>-1</sup> | $M_{\rho}$ , 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 дигидрохлорид (4.18.2).

<sup>b)</sup> PL·HCl — Пиридоксала гидрохлорид (4.18.3).

<sup>c)</sup> PN·HCl — Пиридоксина гидрохлорид (4.18.4).

Массовую концентрацию пиридоксамина, пиридоксала и пиридоксина в исходных растворах  $\rho_{\rho}$ , мкг/дм<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 $\rho(\text{PM})$ 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, $\rho(\text{PL})$ 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, $\rho(\text{PL})$ приблизительно 10 мкг/см<sup>3</sup>

Разбавляют 2 см<sup>3</sup> исходного раствора пиридоксина (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, $\rho(\text{PM})$ 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, $\rho(\text{PL})$ 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, $\rho(\text{PL})$ 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 $\rho(\text{PM}, \text{PL}, \text{PN}) = 0,1$ мкг/см<sup>3</sup> до 10 мкг/см<sup>3</sup>)

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 водяную 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<sup>TM</sup> 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) 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.

<sup>1)</sup> Luna<sup>TM</sup> — 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.

Нагревают в автоклаве (см. 5.3) в течение 30 мин при температуре 120 °С, затем охлаждают до комнатной температуры, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см<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 миллиграмма 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 °С, 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).

**П р и м е ч а н и е** — 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 связанных пиридоксина, ферментативная обработка β-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 β-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 β-глюкозидазы (см. 4.15) и перемешивают. Накрывают коническую колбу и инкубируют раствор в течение не менее 12 ч или в течение ночи при температуре 37 °С, постоянно перемешивая.

После охлаждения до комнатной температуры доводят pH до значения приблизительно 3 ед. pH, используя серную кислоту (см. 4.10), переливают отрегулированный раствор количественно в мерную колбу вместимостью 20 см<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 °С.

Перед хроматографическим анализом фильтруют аликовоту (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 раствор 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 β-глюкозидазы (см. 4.15) и перемешивают. Инкубируют раствор в течение не менее 12 ч или в течение ночи при температуре 37 °С при постоянном перемешивании.

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

Перед хроматографическим анализом фильтруют аликовоту (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 PM, PL и PN путем сравнения времени удерживания пиков на хроматограммах раствора анализируемой пробы и стандартного раствора. Идентификацию пика допускается также проводить с помощью сдвига значения pH в сторону увеличения, например при установлении pH = 6,6 ед. pH при использовании устройства постколоночной дериватизации (см. 5.4) при скорости потока постколоночного 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]).

**П р и м е ч а н и е** — Увеличение значения pH 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

$$w = \frac{y_i \cdot F \cdot 100}{m \cdot 1000}, \quad (3)$$

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  $b_i$ ,  $a_i$  — коэффициенты регрессии для PM, PL или PN, вычисленные методом линейной регрессии на основе концентрации и площади пика в градуировочных растворах;

$x_i$  — откорректированная площадь пика раствора анализируемой пробы PM, PL или PN.

Значение  $x_i$  вычисляют по формуле

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

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

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

Коэффициент разбавления  $F$  вычисляют по формуле

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

где  $V$  — общий объем раствора кислой вытяжки пробы (см. 6.2.1.2), (см. 6.2.1.3), см<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  $B_6$  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 пиридоксала, мг/100 г пробы;

$w_{PN}$  — содержание пиридоксина, мг/100 г пробы.

7.3 Массовую долю витамина  $B_6$  в пересчете на пиридоксин выражают в миллиграммах на 100 г пробы.

П р и м е ч а н и е — Если необходимо представить результат в пересчете на гидрохлорид пиридоксина, используют коэффициент пересчета 1,216. Сведения о проведении пересчета должны быть четко указаны в протоколе испытания.

## 8 Прецизионность

### 8.1 Общие положения

Данные по прецизионности для определения витамина  $B_6$  были установлены в ходе межлабораторных испытаний в соответствии с [8], проведенных бывшим BgVV (Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (Немецкий федеральный институт по защите прав потребителей и ветеринарной медицине)).

Подробная информация о совместном испытании точности метода приведена в приложении А. Значения, полученные в ходе межлабораторных испытаний, могут быть не применимы к диапазонам концентраций и пробам, не приведенным в приложении А.

Применимость и надежность настоящего метода были подтверждены в ходе испытаний различной пищевой продукции, например мяса, рыбы, молока, овощей, фруктов и злаков (см. [2], [3]). Полученные результаты были в достаточной степени воспроизводимы, и только иногда 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 PM, PL и PN соответственно. Относительные стандартные отклонения от общего содержания витамина  $B_6$  в последовательности, включающей от трех до пяти определений в различных продуктах, варьируются от 2 % до 6 %.

Полнота извлечения PM, PL и PN варьируется от 85 % до 105 % (см. [2], [3]). Определение общего содержания витамина  $B_6$  настоящим методом дает в результате значительно более высокие значения в пищевой продукции растительного происхождения (содержащих гликозилированный пиридоксин), чем другие методы, в которых не используется обработка  $\beta$ -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 B <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 B <sub>6</sub>                            | $\bar{x} = 1,204$ мг/100 г | $r = 0,089$ |
| Значения для овощей с ветчиной (детское питание): |                            |             |
| Пиридоксамин                                      | $\bar{x} = 0,043$ мг/100 г | $r = 0,005$ |
| Пиридоксаль                                       | $\bar{x} = 0,009$ мг/100 г | $r = 0,004$ |
| Пиридоксин  | $\bar{x} = 0,047$ мг/100 г | $r = 0,010$ |
| Витамин B <sub>6</sub>                            | $\bar{x} = 0,107$ мг/100 г | $r = 0,011$ |
| Значения для мультивитаминного напитка:           |                            |             |
| Пиридоксамин                                      | $\bar{x} = 0,004$ мг/100 г | $r = 0,003$ |
| Пиридоксаль                                       | $\bar{x} = 0,004$ мг/100 г | $r = 0,003$ |
| Пиридоксин  | $\bar{x} = 0,374$ мг/100 г | $r = 0,056$ |
| Витамин B <sub>6</sub>                            | $\bar{x} = 0,380$ мг/100 г | $r = 0,056$ |

### 8.3 Воспроизводимость

Абсолютное расхождение между результатами двух единичных испытаний, полученными на идентичном объекте испытаний двумя лабораториями, должно превышать предел воспроизводимости  $R$  не более чем в 5 % случаев.

|   |                            |             |
|---|----------------------------|-------------|
| Значения для порошковой манной крупы с молоком:   |                            |             |
| Пиридоксамин                                      | $\bar{x} = 0,065$ мг/100 г | $R = 0,035$ |
| Пиридоксаль                                       | $\bar{x} = 0,080$ мг/100 г | $R = 0,071$ |
| Пиридоксин  | $\bar{x} = 0,523$ мг/100 г | $R = 0,151$ |
| Витамин B <sub>6</sub>                            | $\bar{x} = 0,667$ мг/100 г | $R = 0,193$ |
| Значения для порошкового картофельного пюре:      |                            |             |
| Пиридоксамин                                      | $\bar{x} = 0,163$ мг/100 г | $R = 0,089$ |
| Пиридоксаль                                       | $\bar{x} = 0,032$ мг/100 г | $R = 0,022$ |
| Пиридоксин  | $\bar{x} = 1,008$ мг/100 г | $R = 0,314$ |
| Витамин B <sub>6</sub>                            | $\bar{x} = 1,204$ мг/100 г | $R = 0,369$ |
| Значения для овощей с ветчиной (детское питание): |                            |             |
| Пиридоксамин                                      | $\bar{x} = 0,043$ мг/100 г | $R = 0,013$ |
| Пиридоксаль                                       | $\bar{x} = 0,009$ мг/100 г | $R = 0,013$ |
| Пиридоксин  | $\bar{x} = 0,047$ мг/100 г | $R = 0,021$ |
| Витамин B <sub>6</sub>                            | $\bar{x} = 0,107$ мг/100 г | $R = 0,039$ |
| Значения для мультивитаминного напитка:           |                            |             |
| Пиридоксамин                                      | $\bar{x} = 0,004$ мг/100 г | $R = 0,005$ |
| Пиридоксаль                                       | $\bar{x} = 0,004$ мг/100 г | $R = 0,005$ |
| Пиридоксин  | $\bar{x} = 0,374$ мг/100 г | $R = 0,086$ |
| Витамин B <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:

- всю информацию, необходимую для полной идентификации пробы;
- ссылку на настоящий стандарт или используемый метод;
- дату и метод отбора пробы (если они известны);
- дату поступления пробы в лабораторию;
- дату проведения испытания;
- результаты и единицы, в которых выражены результаты испытания;
- информацию о других специфических особенностях, которые наблюдались в ходе проведения испытания;
- информацию о других особенностях, не установленных в настоящем методе или рассматриваемых как дополнительные, которые могут повлиять на результаты испытания.

Приложение А  
(справочное)

## Данные по прецизионности

Имеющиеся данные были получены с использованием методов ВЭЖХ, установленных в приложении С. Данные результатов испытаний для определения витамина B<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)].

Т а б л и ц а А.1 — Данные результатов испытаний для порошковой манной крупы с молоком

| Проба   | Порошковая манная крупа с молоком |             |            |                                      |
|---|-----------------------------------|-------------|------------|--------------------------------------|
| Вещество, определяемое при анализе                                      | Пиридоксамин                      | Пиридоксаль | Пиридоксин | Витамин B <sub>6</sub> <sup>a)</sup> |
| Год совместного исследования  | 2000                              |             |            |                                      |
| Количество лабораторий  | 11                                |             |            |                                      |
| Количество проб   | 5                                 |             |            |                                      |
| Количество лабораторий, оставшихся после ис-<br>ключения выбросов       | 10                                |             |            |                                      |
| Количество оставшихся результатов                                       | 53                                |             |            |                                      |
| Среднее значение $\bar{x}$ , мг/100 г                                   | 0,065                             | 0,080       | 0,523      | 0,667                                |
| Стандартное отклонение повторяемости $s_r$ ,<br>мг/100 г                | 0,003                             | 0,008       | 0,024      | 0,030                                |
| Относительное стандартное отклонение повтор-<br>яемости $RSD_r$ , %     | 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<br>$s_R$ , мг/100 г            | 0,013                             | 0,025       | 0,053      | 0,068                                |
| Относительное стандартное отклонение вос-<br>производимости $RSD_R$ , % | 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<br>компоненты, %               | 97,2                              | 94,7        | 93,9       | —                                    |
| Стандартное отклонение коэффициента извле-<br>чения компонента, %       | 9                                 | 8,2         | 9,7        | —                                    |
| Количество результатов, использованных для<br>расчета                   | 23                                | 20          | 23         | —                                    |

<sup>a)</sup> См. формулу (7).

Т а б л и ц а А.2 — Данные результатов испытаний для порошкового картофельного пюре

| Проба   | Порошковое картофельное пюре |             |            |                                      |
|---|------------------------------|-------------|------------|--------------------------------------|
| Вещество, определяемое при анализе                                | Пиридоксамин                 | Пиридоксаль | Пиридоксин | Витамин B <sub>6</sub> <sup>a)</sup> |
| Год совместного исследования                                      | 2000                         |             |            |                                      |
| Количество лабораторий  | 10                           |             |            |                                      |
| Количество проб   | 5 (9)                        |             |            |                                      |
| Количество лабораторий, оставшихся после ис-<br>ключения выбросов | 9                            |             |            |                                      |
| Количество оставшихся результатов                                 | 49                           |             |            |                                      |
| Среднее значение $\bar{x}$ , мг/100 г                             | 0,163                        | 0,032       | 1,008      | 1,204                                |
| Стандартное отклонение повторяемости $s_r$ ,<br>мг/100 г          | 0,006                        | 0,004       | 0,028      | 0,032                                |

Окончание таблицы A.2

| Проба  | Порошковое картофельное пюре |             |            |                                      |
|--|------------------------------|-------------|------------|--------------------------------------|
| Вещество, определяемое при анализе                                 | Пиридоксамин                 | Пиридоксаль | Пиридоксин | Витамин B <sub>6</sub> <sup>a)</sup> |
| Относительное стандартное отклонение повторяемости $RSD_p$ , %     | 3,7                          | 12,3        | 2,8        | 2,7                                  |
| Значение повторяемости $r (2,8 \cdot s_p)$ , 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>a)</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 B <sub>6</sub> <sup>a)</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 $s_p$ , мг/100 г              | 0,002                              | 0,001       | 0,003      | 0,004                                |
| Относительное стандартное отклонение повторяемости $RSD_p$ , %     | 4,4                                | 15,4        | 7,2        | 3,6                                  |
| Значение повторяемости $r (2,8 \cdot s_p)$ , 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>a)</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>a)</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         | —                                    |

a) См. формулу (7).

Приложение В  
(справочное)

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

Т а б л и ц а В.1 – Примеры подходящих условий ВЭЖХ для определения соединений витамина В<sub>6</sub>

| Ла-<br>бо-<br>рато-<br>рия | Разделительная<br>колонка  | Размеры,<br>мм × мм | Тем-<br>пе-<br>ра-<br>тура,<br>°C | Подвижная фаза  | Расход,<br>см <sup>3</sup> /мин | Обнаружение,<br>нм |                | Время удерживания,<br>мин |                  |                  |
|----------------------------|--|---------------------|-----------------------------------|---|---------------------------------|--------------------|----------------|---------------------------|------------------|------------------|
|                            |  |                     |                                   |   |                                 | E <sub>x</sub>     | E <sub>m</sub> | 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> (c = 0,015 моль/дм <sup>3</sup> ), содержание ТХУ<br>(c = 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> (c = 0,015 моль/дм <sup>3</sup> ), содержание ТХУ<br>(c = 0,005 моль/дм <sup>3</sup> )<br>и послеколоночный реагент:<br>K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (c = 0,15 моль/дм <sup>3</sup> ) | 1,5<br>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> (c = 0,015 моль/дм <sup>3</sup> ), содержание ТХУ<br>(c = 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>                               | 250 × 4,6           | 30                                | H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (c = 0,015 моль/дм <sup>3</sup> ), содержание ТХУ<br>(c = 0,005 моль/дм <sup>3</sup> )   | 2,0                             | 290                | 390            | ~2,2                      | ~4,7             | ~6,4             |
|                            | Предколонка: RP C <sub>18</sub> , 5 мкм                                  | 4,0 × 3,0           |                                   |   | 1,5                             |                    | 390            | ~2,7                      | ~5,4             | ~6,9             |
| 4                          | LiChrospher 60 RP C <sub>8</sub><br>Выборка В, 5 мкм                     | 250 × 4,0           | 30                                | H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (c = 0,03 моль/дм <sup>3</sup> ), содержание ТХУ<br>(c = 0,05 моль/дм <sup>3</sup> )<br>от 0 до 14 мин В: Метанол, от 14 до 21 мин   | 3,0                             | 290                | 390            | ~2,5                      | ~4,8             | ~6,1             |
| 5                          | Nucleosil 120 C <sub>18</sub> , 5 мкм<br>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<br>(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<br>(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<br>(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<br>(c = 0,005 моль/дм <sup>3</sup> )   | 2,0                             | 290                | 390            | ~2,8                      | ~6,9             | ~11,4            |
| 9                          | Spherisorb 80 ODS-2,<br>5 мкм  | 250 × 4,6           | 30                                | H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (c = 0,015 моль/дм <sup>3</sup> ), содержание ТХУ<br>(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<br>(c = 0,005 моль/дм <sup>3</sup> ) и послеколоночный ре-<br>гент: K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (c = 0,15 моль/дм <sup>3</sup> )   | 1,0<br>0,5                      | 330                | 390            | ~6,9                      | ~17,9            | ~28,4            |

a) Phenomenex, 125 A.

b) PM – пиридоксамин.

c) PL – пиридоксаль.

d) PN – пиридоксин.

Приложение С  
(справочное)

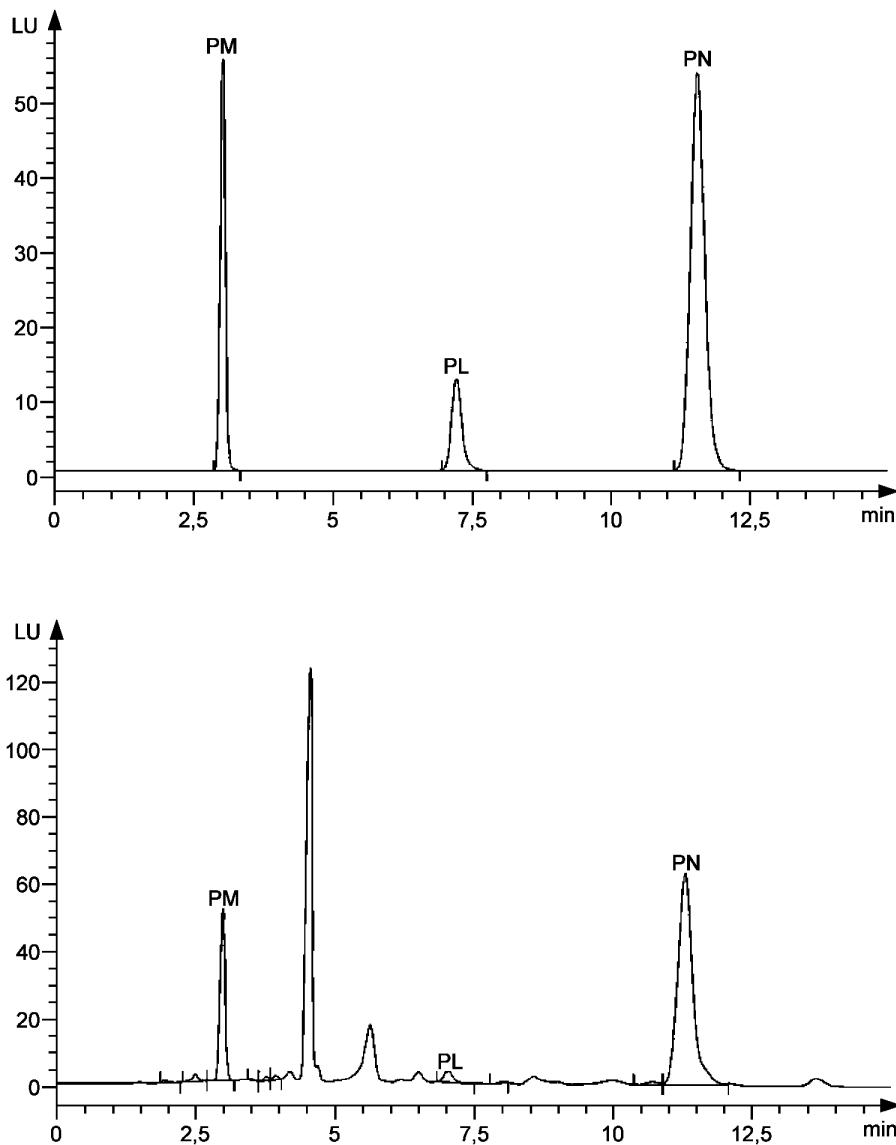
## Примеры молярных коэффициентов поглощения

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

| Соединение                         | Растворитель  | $\lambda_{\max}$ ,<br>нм | $E$ ,<br>ммоль <sup>-1</sup><br>см <sup>-1</sup> | $M_w$ ,<br>г моль <sup>-1</sup> |
|------------------------------------|---|--------------------------|--|---------------------------------|
| Пиридоксина гидрохлорид            | 0,1 моль/дм <sup>3</sup> HCl, pH 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                           |
| Пиридоксалия гидрохлорид           | 0,1 моль/дм <sup>3</sup> HCl, pH 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, pH 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**

Т а б л и ц а 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» |

П р и м е ч а н и е — В настоящей таблице использовано следующее условное обозначение степени соответствия стандарта:  
- IDT — идентичный стандарт.

<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 B<sub>6</sub> 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 B<sub>6</sub> — Group and Related 3-Hydroxy-pyridine 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-гидроксипиридина)
- [4] Bitsch, R., Möller, J., J Chromatogr 1989, 463: 207—211 (Журнал хроматографии)
- [5] Ollilainen, V.: HPLC Analysis of Vitamin B6 in Agricultural and Food Science in Finland Department of Applied Chemistry and Microbiology University of Helsinki 1999. Vol. 8:No. 6: 515—619 (Анализ ВЭЖХ витамина B<sub>6</sub> в науках о сельском хозяйстве и продуктах питания в Финляндии)
- [6] Bergaenzle, M., Arella, F., Bourguignon, J.B., Hasselmann, C.: Determination of vitamin B<sub>6</sub> 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., Bergaenzle, M., Aoude-Werner, D., Hasselmann, C.: Extraction procedures for the liquid chromatographic determination of thiamin Riboflavin and vitamin B<sub>6</sub> 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.

УДК 664:543.544.5.068.7:006.354

МКС 67.050

IDT

Ключевые слова: продукция пищевая, определение, витамин  $B_6$ , гликозилированные формы, высоко-эффективная жидкостная хроматография

---

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

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

---

Издано и отпечатано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.  
[www.gostinfo.ru](http://www.gostinfo.ru) [info@gostinfo.ru](mailto:info@gostinfo.ru)