INSO
17571
1st. Edition
2014

جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran
سازمان ملی استاندارد ایران
Iranian National Standardization Organization

استاندارد ملی ایران
۱۷۵۷۱
چاپ اول
۱۳۹۲

مواد غذایی - اندازه‌گیری ویتامین B_6 (شامل اشکال گلیکوزیله شده) به روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا

Foodstuffs - Determination of vitamin B_6(including its glycosylated forms) by High Performance Liquid Chromatography

ICS:67.050

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب بند یک مادهٔ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفه تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) ایران را به عهده دارد.

نام موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب یکصد و پنجاه و دومین جلسه شورای عالی اداری مورخ ۹۰/۶/۲۹ به سازمان ملی استاندارد ایران تغییر و طی نامه شماره ۲۰۶/۳۵۸۳۸ مورخ ۹۰/۷/۲۴ جهت اجرا ابلاغ شده است.

تدوین استاندارد در حوزه های مختلف در کمیسیون های فنی مرکب از کارشناسان سازمان، صاحب نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می شود وکوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانهٔ صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف‌کنندگان، صادرکنندگان و وارد کنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان های دولتی و غیر دولتی حاصل می شود . پیش نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی نفع و اعضای کمیسیون های فنی مربوط ارسال می‌شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادها در کمیتهٔ ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب به عنوان استاندارد ملی (رسمی) ایران چاپ و منتشر می شود.

پیش نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان های علاقه مند و ذی صلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می‌کنند درکمیتهٔ ملی طرح و بررسی و درصورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می شود. بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می شوند که بر اساس مفاد نوشته شده در استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ تدوین و در کمیتهٔ ملی استاندارد مربوط که سازمان ملی استاندارد ایران تشکیل می‌دهد به تصویب رسیده باشد.

سازمان ملی استاندارد ایران از اعضای اصلی سازمان بین المللی استاندارد (ISO)[1]،کمیسیون بین المللی الکتروتکنیک (IEC)[2] و سازمان بین المللی اندازه شناسی قانونی (OIML)[3] است و به عنوان تنها رابط[4] کمیسیون کدکس غذایی (CAC)[5] در کشور فعالیت می کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی های خاص کشور، از آخرین پیشرفت های علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین‌المللی بهره‌گیری می‌شود.

سازمان ملی استاندارد ایران می تواند با رعایت موازین پیش بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و/ یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری نماید. سازمان می‌تواند به منظور حفظ بازارهای بین‌المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه-بندی آن را اجباری نماید. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده کنندگان از خدمات سازمان ها و مؤسسات فعال در زمینهٔ مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدور گواهی سیستم‌های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی، آزمایشگاه‌ها و مراکز کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش، سازمان ملی استاندارد ایران این گونه سازمان ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می‌کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامهٔ تأیید صلاحیت به آن ها اعطا و بر عملکرد آن ها نظارت می‌کند. ترویج دستگاه بین‌المللی یکاها، کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این سازمان است.

---

1 - International Organization for Standardization
2 - International Electrotechnical Commission
3 - International Organization of Legal Metrology (Organisation Internationale de Metrologie Legale)
4 - Contact point
5 - Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

«مواد غذایی - اندازه‌گیری ویتامین B_6 (شامل اشکال گلیکوزیله شده) به روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا»

رئیس:	**سمت و/ یا نمایندگی**
معصوم، سعید (دکترای شیمی تجزیه)	دانشگاه کاشان
دبیر:	
انصاری، فرزانه (فوق لیسانس علوم بهداشتی در رشته تغذیه)	سازمان ملی استاندارد- پژوهشگاه استاندارد - پژوهشکده غذایی و کشاورزی
اعضاء: (اسامی به ترتیب حروف الفباء)	
بلقیسی، سبا (فوق لیسانس صنایع غذایی)	سازمان ملی استاندارد- پژوهشگاه استاندارد - پژوهشکده غذایی و کشاورزی
جلیلی، مریم (دکترای صنایع غذایی)	سازمان ملی استاندارد- پژوهشگاه استاندارد - پژوهشکده غذایی و کشاورزی
حاتم بیگی، نادر (فوق لیسانس شیمی تجزیه)	آزمایشگاه همکار کیمیا تست فام
شهرآشوب، حامد (لیسانس صنایع غذایی)	آزمایشگاه همکار کیمیا تست فام
علائی روزبهانی، زهرا (فوق لیسانس صنایع غذایی)	سازمان ملی استاندارد- پژوهشگاه استاندارد - پژوهشکده غذایی و کشاورزی
نجفی، الهام (دکترای شیمی معدنی)	پژوهشگاه شیمی و مهندسی شیمی
ولیدی، ملیحه (لیسانس صنایع غذایی)	آزمایشگاه همکار کیمیا تست فام

فهرست مندرجات

فهرست	صفحه
آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران	ج
کمیسیون فنی تدوین استاندارد	د
پیش‌گفتار	و
۱ هدف و دامنه کاربرد	۱
۲ مراجع الزامی	۱
۳ اصول آزمون	۲
۴ مواد و / یا واکنشگرها	۲
۵ وسایل	۸
۶ روش اجرای آزمون	۹
۷ روش محاسبه	۱۳
۸ دقت	۱۴
۹ گزارش آزمون	۱۷
پیوست الف (اطلاعاتی)- اطلاعات مربوط به دقت	۱۸
پیوست ب (اطلاعاتی)- مثال هایی ازشرایط بهینه HPLC جهت تعیین ترکیبات ویتامین B_6	۲۲
پیوست پ (اطلاعاتی)- مثال‌هایی برای ضریب جذب مولی	۲۳
پیوست ت (اطلاعاتی)- اشکال	۲۴
پیوست ث (اطلاعاتی)- کتابنامه	۲۵

پیش گفتار

استاندارد" مواد غذایی - اندازه‌گیری ویتامینB_6 (شامل اشکال گلیکوزیله شده) به روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا" که پیش نویس آن توسط کمیسیون‌های مربوط تهیه و تدوین شده و در یک هزار و سیصد و نوزدهمین اجلاس کمیتهٔ ملی استاندارد خوراک و فرآورده های کشاورزی مورخ ۱۳۹۲/۱۲/۵ مورد تصویب قرار گرفته است، اینک به استناد بند یک مادهٔ ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات سازمان ملی استاندارد ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱، به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت های ملی و جهانی در زمینهٔ صنایع، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران در مواقع لزوم تجدید نظر خواهد شد و هر پیشنهادی که برای اصلاح و تکمیل این استانداردها ارائه شود، هنگام تجدید نظر در کمیسیون فنی مربوط مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین، باید همواره از آخرین تجدیدنظر استانداردهای ملی استفاده کرد.

منبع و ماخذی که برای تهیه این استاندارد مورد استفاده قرار گرفته به شرح زیراست:

DIN EN 14663:2006-03, Foodstuffs – Determination of vitamin B_6 (including its glycosylated forms) by HPLC.

مواد غذایی - اندازه‌گیری ویتامین B6 (شامل اشکال گلیکوزیله شده) به روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد، تعیین روش اندازه‌گیری میزان ویتامین B_6 در مواد غذایی، با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا[1]، می‌باشد. این استاندارد، برای کلیه مواد غذایی خشک، مایع و آبدار کاربرد دارد.

یادآوری ۱: ویتامین B_6، مجموعه جزء جرمی *پیریدوکسین*[2]، *پیریدوکسال*[3]، *پیریدوکسامین*[4]، *مشتقات فسفوریله شده*[5] و *اشکال بتا-گلیکوزیله شده*[6] آن‌ها است، که برحسب *پیریدوکسین* بیان می‌شود.

یادآوری ۲: روش شرح داده شده در این استاندارد، بر روی سمولینا با شیر (غذای کودک)، پوره سیب زمینی، سبزیجات با گوشت، نوشیدنی ویتامینه[7] از ۰٫۰۳۴ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم تا ۱٫۲۱ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم، اعتبار بخشی[8] شده است.

۲ مراجع الزامی

مدارک زیر حاوی مقرراتی است که در متن این استاندارد ملی ایران به آن‌ها ارجاع داده شده است. بدین ترتیب آن مقررات جزیی از این استاندارد ملی ایران محسوب می‌شود. در صورتی که به مدرکی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده باشد، اصلاحیه‌ها و تجدید نظرهای بعدی آن مورد نظر این استاندارد ملی ایران نیست. در مورد مدارکی که بدون ذکر تاریخ انتشار به آن‌ها ارجاع داده شده است، همواره آخرین تجدیدنظر و اصلاحیه‌های بعدی آن‌ها مورد نظر است.

استفاده از مرجع زیر برای این استاندارد الزامی است:

۲-۱ استاندارد ملی ایران شماره ۱۷۲۸: سال ۱۳۸۱، آب- مورد مصرف درآزمایشگاه تجزیه - ویژگی‌ها و روش‌های آزمون.

---

[1] HPLC: High Performance Liquid Chromatography
[2] Pyridoxine
[3] Pyridoxal
[4] Pyridoxamine
[5] Phosphorylated derivatives
[6] β-glycosylated forms
[7] Multi vitamin
[8] Validation

۳ اصول آزمون

پیریدوکسال، پیریدوکسامین و پیریدوکسین طی هیدرولیز اسیدی و دِفسفوریله شدن و دِگلیکوزیله شدن آنزیمی با استفاده از فسفاتاز اسید و بتا-گلیکوزیداز، از مواد غذایی استخراج می‌شوند.

مشتقات مختلف ویتامین B_6 (پیریدوکسال، پیریدوکسامین و پیریدوکسین) توسط HPLC جداسازی شده و با آشکارساز فلوروسانس اندازه‌گیری می‌شوند (مراجع ۱ و ۲ از پیوست ث این استاندارد).

۴ مواد و/یا واکنشگرها

۴-۱ کلیات

در طی مراحل اندازه‌گیری، اگر دستور دیگری داده نشده باشد، فقط از واکنشگرهای تجزیه‌ای[1] خالص آزمایشگاهی شناخته شده بهره بگیرید. آب مصرفی برای آزمایش باید آب مقطر نوع ۱ مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۱۷۲۸، آب مورد مصرف در آزمایشگاه تجزیه – ویژگی ها و روش های آزمون، یا آب دوبار تقطیر باشد.

۴-۲ مواد شیمیایی و محلول ها

۴-۲-۲ دی پتاسیم هیدروژن فسفات ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$)، با جزء جرمی برابر و یا بیشتر از 99.9 %

۴-۲-۳ استات سدیم بدون کریستال آب (CH_3COONa) ، با درجه خلوص برابر و یا بیشتر از 99.0 %

۴-۲-۴ تری کلرواستیک اسید (TCA) (Cl_3CCOOH) ، با درجه خلوص برابر و یا بیشتر از 99.0 %

۴-۲-۵ محلول استات سدیم (CH_3COONa)، با غلظت برابر با 2.5 mol/l

۲۰۵ گرم از استات سدیم(طبق بند ۴-۳) را با آب مقطر به حجم ۱ لیتر برسانید.

۴-۲-۶ واکنشگر پس ستون (اختیاری)، محلول دی پتاسیم هیدروژن فسفات (K_2HPO_4) ، با غلظت برابر با 0.15 mol/l

۳۴٫۲گرم دی پتاسیم هیدروژن فسفات (طبق بند ۴-۲) را در آب مقطر حل کرده و آن را به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر برسانید. سپس، مخلوط کرده و گاز آن را بگیرید

[1] Analytical grade

۴-۲-۷ محلول هیدروکلریک اسید (HCl) ، با غلظت برابر با 1 mol/l

۴-۲-۸ محلول هیدروکلریک اسید (HCl) ، با غلظت برابر با 0.1 mol/l

۴-۲-۹ محلول هیدروکلریک اسید (HCl) ، با غلظت برابر با 0.2 mol/l

۴-۲-۱۰ محلول سولفوریک اسید (H_2SO_4) ، با غلظت برابر با 1 mol/l

۴-۲-۱۱ پترولیوم سبک، دامنه جوش ۴۰ درجه سلسیوس تا ۶۰ درجه سلسیوس

۴-۲-۱۲ فسفاتاز اسید، از سیب زمینی، فعالیت آنزیمی حدود ۵٫۳ U/mg[1]

فعالیت آنزیم مورد استفاده، باید با بند ۴-۲-۱۳-۲، مطابقت نماید. برای کسب اطلاعات بیشتر به مراجع ۲ و۷ پیوست ث این استاندارد مراجعه کنید.

۴-۲-۱۳ محلول فسفاتاز اسید

۴-۲-۱۳-۱ کلیات

مقدار ۶۰ میلی‌گرم فسفاتاز اسید (طبق بند ۴-۲-۱۲) را در یک بشر توزین کرده و به آن ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه نمایید. سپس به کمک هم زدن به مدت زمان ۲ دقیقه، آن را حل کنید. این محلول را تازه و به‌صورت روزانه تهیه کنید.

۴-۲-۱۳-۲ کنترل فعالیت فسفاتاز اسید

مقدار ۱۰ گرم گوشت، ۵ گرم پوره سیب زمینی یا ۵ گرم آرد کامل را در یک بشر توزین کرده و با اسید نوشته شده در بند ۶-۲-۱، استخراج کنید. یک میلی‌لیتر محلول فسفاتاز اسید (طبق بند ۴-۲-۱۳-۱) و یک میلی‌لیتر محلول بتا-گلوکزیداز (طبق بند ۴-۲-۱۵) را به ۱۲٫۵ میلی‌لیتر محلول نمونه استخراج شده بیافزایید و مخلوط کنید. محلول را به مدت حداقل ۱۲ ساعت انکوبه‌گذاری کرده و یا در طول شب در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، در حال به هم خوردن قرار دهید. این مرحله را با ۲ میلی‌لیتر محلول فسفاتاز اسید تکرار کنید.

غلظت جرمی ویتامین‌ها را مطابق با بند ۶-۶ اندازه‌گیری نمایید. چنان‌چه نتایج غلظت جرمی ترکیبات ویتامین B_6 در هر دو محلول حاوی نمونه برابر باشد، فعالیت آنزیم مورد استفاده کفایت می‌نماید. کروماتوگرام، پیک حاصل از پیریدوکسامین فسفات را نشان نمی‌دهد.

---

[1] U: این واحد (اغلب واحد بین المللی یا واحد استاندارد نامیده می شود) عبارت است از مقدار آنزیمی که در شرایط استاندارد، تغییر شکل یک میکرومول سوبسترا در دقیقه را کاتالیز می کند.

۴-۲-۱۴ بتا-گلوکزیداز، از بادام. فعالیت آنزیمی حدود ۳٫۲ U/mg

آنزیم مورد استفاده، باید با بند ۴-۲-۱۵-۲ مطابقت کند. برای کسب اطلاعات بیشتر به مراجع ۲ و ۷ از پیوست ث این استاندارد مراجعه کنید.

۴-۲-۱۵ محلول بتا-گلوکزیداز

۴-۲-۱۵-۱ کلیات

مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم بتا-گلوکزیداز (طبق بند ۴-۲-۱۴) را توزین کرده و به آن ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر بیافزایید. سپس به کمک هم زدن به مدت زمان ۲ دقیقه، آن را حل کنید. این محلول را تازه و به‌صورت روزانه تهیه کنید.

۴-۲-۱۵-۲ کنترل فعالیت بتا-گلوکزیداز

مقدار ۱۰ گرم گوشت، ۵ گرم پوره سیب زمینی یا ۵ گرم آرد کامل را در یک بشر توزین کرده و به وسیله اسید نوشته شده در بند ۶-۲-۱ عملیات استخراج را انجام دهید. یک میلی‌لیتر محلول فسفاتاز اسید (طبق بند ۴-۲-۱۳-۱) و یک میلی‌لیتر محلول بتا-گلوکزیداز (طبق بند ۴-۲-۱۵) را به ۱۲٫۵ میلی‌لیتر محلول نمونه استخراج شده اضافه کرده و مخلوط کنید. محلول را به مدت زمان حداقل ۱۲ ساعت انکوبه‌گذاری کرده و یا در طول شب در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، در حال به هم خوردن قرار دهید. این مرحله را با ۲ میلی‌لیتر محلول بتاگلیکوزیداز تکرار کنید.

غلظت جرمی ویتامین‌ها را مطابق با بند ۶-۶ اندازه‌گیری کنید. چنان‌چه نتایج غلظت جرمی ترکیبات ویتامین B_6 در هر دو محلول حاوی نمونه برابر باشد، فعالیت آنزیم مورد استفاده کفایت می کند. کروماتوگرام، پیک حاصل از پیریدوکسامین فسفات را نشان نمی‌دهد.

۴-۲-۱۶ فاز متحرک HPLC (سولفوریک اسید با غلظت برابر با 0.015 mol/l حاوی TCA= 0.005 mol/l)

مقدار ۵ ±۸۱۷ میلی‌گرم تری‌کلرواستیک اسید (طبق بند ۴-۲-۴) را در ۱۵ میلی‌لیتر محلول سولفوریک اسید یک مولار (طبق بند ۴-۲-۱۰) حل کرده و به بالن اندازه‌دار یک لیتری منتقل کنید. سپس با آب مقطر به حجم برسانید. سپس، مخلوط کرده و گاز آن را بگیرید.

۴-۲- ۱۷ روغن سیلیکون، برای کف زدایی

۴-۲-۱۸ مواد استاندارد[1]

۴-۲-۱۸-۱ کلیات

پیریدوکسامین (PM)، پیریدوکسال (PL) و پریدوکسین (PN) را می‌توان از تامین‌کنندگان مختلفی تهیه نمود. به دلیل احتمال اختلاف درجه خلوص مواد استاندارد، لازم است غلظت و درجه خلوص آن‌ها را اندازه‌گیری کنید (طبق بندهای ۴-۲-۱۹-۴ و ۴-۲-۲۰-۷).

۴-۲-۱۸-۲ پیریدوکسامین (PM) دی هیدروکلرید ($C_8H_{12}N_2O_2 \cdot 2HCl$)، با درجه خلوص برابر و یا بیشتر از % 98

۴-۲-۱۸-۳ پیریدوکسال (PL) هیدروکلرید ($C_8H_9NO_3 \cdot HCl$)، با درجه خلوص برابر و یا بیشتر از % 98

۴-۲-۱۸-۴ پریدوکسین (PN) هیدروکلرید ($C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$)، با درجه خلوص برابر و یا بیشتر از % 98

۴-۲-۱۹ محلول‌های ذخیره[2]

۴-۲-۱۹-۱ محلول ذخیره پیریدوکسامین دی هیدروکلرید، با جرم حجمی تقریبی (ppm) µg/ml ۵۰۰

مقدار ۷/۱۷ میلی‌گرم پیریدوکسامین‌دی‌هیدروکلرید (طبق بند ۴-۲-۱۸-۳) را توزین کرده و آن را با محلول هیدروکلریک اسید ۰/۱ مولار (طبق بند ۴-۲-۸) به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر برسانید. این محلول در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت یک هفته و در دمای ۱۸- درجه سلسیوس به مدت ۲ ماه پایدار است.

۴-۲-۱۹-۲ محلول ذخیره پیریدوکسال هیدروکلرید، با جرم حجمی تقریبی (ppm) µg/ml ۵۰۰

مقدار ۶۰/۹ میلی‌گرم پریدوکسال‌هیدروکلرید (طبق بند ۴-۲-۱۸-۳) را توزین کرده و آن را با محلول هیدروکلریک اسید ۰/۱ مولار (طبق بند ۴-۲-۸) به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر برسانید. این محلول در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱ هفته و در دمای ۱۸- درجه سلسیوس به مدت ۲ ماه پایدار است.

۴-۲-۱۹-۳ محلول ذخیره پریدوکسین هیدروکلرید، با جرم حجمی تقریبی (ppm) µg/ml ۵۰۰

مقدار ۶۰/۸ میلی‌گرم پریدوکسین هیدروکلرید (طبق بند ۴-۲-۱۸-۴) را توزین کرده و آن را با محلول هیدروکلریک اسید (طبق بند ۴-۲-۸) به حجم ۱۰۰ میلی برسانید. این محلول در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱ هفته و در دمای ۱۸- درجه سلسیوس به مدت ۲ ماه پایدار است.

۴-۲-۱۹-۴ آزمون‌های غلظت

به ترتیب، یک میلی‌لیتر از محلول‌های ذخیره پیریدوکسامین (طبق بند ۴-۲-۱۹-۱)، پیریدوکسال (طبق بند ۴-۲-۱۹-۲) و پریدوکسین (طبق بند ۴-۲-۱۹-۳) را به طور جداگانه به بالن‌های اندازه دار ۵۰

[1] Standard substances
[2] Stock solution

میلی‌لیتری منتقل کرده و آن را با محلول هیدروکلریک اسید (طبق بند ۴-۲-۸) به حجم برسانید. میزان جذب این محلول‌ها را در طول موج مربوط و در نمایه[1] کوارتز ۱ سانتی‌متری، در مقابل محلول هیدروکلریک اسید (طبق بند ۴-۲-۸) (به عنوان شاهد) به روش بیناب سنجی اندازه‌گیری نمایید (به جدول ۱ مراجعه کنید).

غلظت جرمی هر یک از ترکیبات ویتامین B_6 ، ρ_i ،را به میکروگرم در میلی‌لیتر، با استفاده از فرمول (۱) محاسبه کنید:

فرمول(۱):
$$\rho_i = \frac{A \times M_i}{\varepsilon_i} \times V \times F$$

که در آن:

ρ_i غلظت جرمی پیریدوکسامین، پیریدوکسال و پریدوکسین، به میکروگرم در میلی‌لیتر محلول ذخیره

A مقدار جذب محلول‌های پیریدوکسامین، پیریدوکسال و پریدوکسین در طول موج حداکثری λ_{max} (به جدول ۱ مراجعه کنید)

ε_i ضریب جذب مولکولی PM، PL یا PN در pH مناسب همان‌گونه که در جدول ۱ تعریف شده است

M_i جرم مولکولی PM، PL و PN به ترتیب مواد استاندارد، همان‌گونه که در جدول ۱ تعریف شده است

V ضریب رقت (در این‌جا V = 50)

F ضریب تبدیل ترکیبات ویتامین B_6 بدون اسید

این غلظت‌های جرمی را برای محاسبه غلظت‌های دقیق ۴-۲-۱۹-۲ به ۴-۲-۱۹-۳ و ۴-۲-۲۰به ۴-۲-۲۰-۶ به کار برید.

جدول ۱-مثال‌هایی برای ضرایب جذب مولی ترکیبات ویتامین B_6

ترکیبات	حلال	λ_{max}	ε_i mmol^{-1}.cm^{-1}	M_i g.mol^{-1}	F
PM . 2 HCl[a]	۰٫۱ mol/l HCl, pH ~1	۲۹۲	۸٫۲	۲۴۱٫۱	۰٫۶۹۸
PL . HCl[b]	۰٫۱ mol/l HCl, pH ~1	۲۸۸	۹٫۰	۲۰۳٫۶	۰٫۸۲۱
PN . HCl[c]	۰/۱ mol/l HCl, pH ~1	۲۹۱	۸٫۶	۲۰۳٫۶	۰٫۸۲۳

[a] PM . 2 HCl = پیریدوکسامین دی هیدروکلرید (طبق بند ۴-۲-۱۸-۲)

[b] PL . HCl = پیریدوکسال هیدروکلرید (طبق بند ۴-۲-۱۸-۳)

[c] PN . HCl = پریدوکسین هیدروکلرید (طبق بند ۴-۲-۱۸-۴)

[1] Cell

۴-۲-۲۰ محلول‌های استاندارد

۴-۲-۲۰-۱ محلول استاندارد I پیریدوکسامین (PM)، با جرم حجمی تقریبی 10 µg/ml (ppm)
مقدار ۲ میلی‌لیتر از محلول ذخیره پیریدوکسامین (طبق بند ۴-۲-۱۹-۱) را با محلول هیدروکلریک اسید ۰/۱مولار (طبق بند ۴-۲-۸) به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر برسانید. محلول را به صورت تازه و به طور روزانه تهیه کنید.

۴-۲-۲۰-۲ محلول استاندارد I پیریدوکسال (PL)، با جرم حجمی تقریبی 10 µg/ml (ppm)
مقدار ۲ میلی‌لیتر از محلول ذخیره پیریدوکسال (طبق بند ۴-۲-۱۹-۲) را با محلول هیدروکلریک اسید ۰/۱مولار (طبق بند ۴-۲-۸) به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر برسانید. محلول را به صورت تازه و به طور روزانه تهیه کنید.

۴-۲-۲۰-۳ محلول استاندارد I پریدوکسین (PN)، با جرم حجمی تقریبی 10 µg/ml (ppm)
مقدار ۲ میلی‌لیتر از محلول ذخیره پریدوکسین (طبق بند ۴-۲-۱۹-۳) را با محلول هیدروکلریک اسید ۰/۱مولار (طبق بند ۴-۲-۸) به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر برسانید. محلول را به صورت تازه و به طور روزانه تهیه کنید.

۴-۲-۲۰-۴ محلول استانداردII پیریدوکسامین (PM)، با جرم حجمی تقریبی 1 µg/ml (ppm)
مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از محلول استاندارد I پیریدوکسامین (طبق بند ۴-۲-۲۰-۱) را با محلول هیدروکلریک اسید ۰/۱مولار (طبق بند ۴-۲-۸) به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر برسانید. محلول را به صورت تازه و به طور روزانه تهیه کنید.

۴-۲-۲۰-۵ محلول استانداردII پیریدوکسال (PL)، با جرم حجمی تقریبی 1 µg/ml (ppm)
مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از محلول استاندارد I پریدوکسال (طبق بند ۴-۲-۲۰-۲) را با محلول هیدروکلریک اسید ۰/۱مولار (طبق بند ۴-۲-۸) به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر برسانید. محلول را به صورت تازه و به طور روزانه تهیه کنید.

۴-۲-۲۰-۶ محلول استانداردII پریدوکسین (PN)، با جرم حجمی تقریبی 1 µg/ml (ppm)
مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از محلول استاندارد I پریدوکسین (طبق بند ۴-۲-۲۰-۳) را با محلول هیدروکلریک اسید ۰/۱مولار (طبق بند ۴-۲-۸) به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر برسانید. محلول را به صورت تازه و به طور روزانه تهیه کنید.

۴-۲-۲۰-۷ کنترل درجه خلوص کروماتوگرافی توسط HPLC
خلوص مواد استاندارد را می‌توان با HPLC به صورت زیر کنترل نمود.
حجم‌های معینی از محلول‌های استاندارد I شامل PM, PL و PN را (طبق بندهای ۴-۲-۲۰-۱، ۴-۲-۲۰-۲ و ۴-۲-۲۰-۳) به دستگاه HPLC تزریق کرده و آنالیز کنید (طبق بند ۶-۴). درجه خلوص مواد استاندارد را با استفاده از فرمول (۲) محاسبه کنید:

فرمول(۲):

$$R_i = \frac{x_i \times 100}{x_i + B}$$

که در آن:

R_i درجه خلوص ماده استاندارد i، به درصد

x_i سطح زیر پیک ماده استاندارد i

B مجموع سطوح زیر پیک مواد آلوده کننده[1] (بدون در نظر گرفتن پیک محلول).

درجه خلوص کروماتوگرافی مواد استاندارد باید مساوی یا بیش از ۹۸ درصد باشد، در غیر این صورت، مواد استاندارد جدیدی به کار برید یا محلول‌های استاندارد جدیدی بسازید.

۴-۲-۲۱ محلول کالیبراسیون مخلوط شده (PM, PL, PN)[2]، با جرم حجمی µg/ml ۱۰ تا µg/ml ۰/۱

حجم‌های معینی از محلول‌های ذخیره PM، PL و PN (طبق بندهای ۴-۲-۱۹-۱ تا ۴-۲-۱۹-۳) یا محلول‌های استاندارد PM ، PL و PN (طبق بندهای ۴-۲-۲۰-۱ تا ۴-۲-۲۰-۶) را به یک بالن اندازه‌دار ۲۰ میلی‌لیتری منتقل کرده و در صورت لزوم، به آن ۶/۵ میلی‌لیتر محلول هیدروکلریک اسید (طبق بند ۴-۲-۸) اضافه کنید. سپس با محلول استات‌سدیم (طبق بند ۴-۲-۵)، در pH = ۴/۸ و در ادامه با محلول سولفوریک اسید (طبق بند ۴-۲-۱۰) در pH = ۳ تنظیم نمایید. سپس، آن‌را با آب مقطر به حجم برسانید و مخلوط کنید (محلول‌های کالیبراسیون).

حداقل ۳ نقطه کالیبراسیون پیشنهاد می‌شود. در صورت لزوم، قبل از تزریق به HPLC محلول کالیبراسیون مخلوط شده را با فاز متحرک رقیق سازی کنید.

۵ وسایل

۵-۱ کلیات

افزون بر وسایل معمولی آزمایشگاه، وسایل به شرح زیر نیز مورد نیاز است:

[1] Contaminating substances
[2] Mixed calibration solution

۵-۲ بیناب سنج ماورای بنفش[1]، قادر به اندازه‌گیری جذب در طول موج‌های معین.

۵-۳ دستگاه گرم‌کن، اتوکلاو آزمایشگاهی، آون یا حمام آب با قابلیت هم زدن، با قابلیت تنظیم در دمای ۳۷ درجه سلسیوس.

۵-۴ سیستم HPLC، دارای یک پمپ، وسیله تزریق کننده نمونه[2]، آشکار ساز فلوروسانس[3] با طول موج تهییج و نشر قابل تنظیم به ترتیب در طول موج های ۲۹۰ نانومتر و ۳۹۰ نانومتر و انتگرال‌گیر[4] و مجهز به مشتق ساز پس ستون[5] می‌باشد.

۵-۵ ستون های HPLC، برای مثال ستون فاز معکوس، مانند: $RP\ C_{18}$ با اندازه ذرات ۵ µm، قطر۴ mm ، طول ۲۵۰[6] mm. مثال‌های دیگر، در پیوست ب شرح داده شده است.

۵-۶ دستگاه صاف کننده حلال[7]، جهت صاف نمودن فاز متحرک و محلول آزمایه از میان صافی غشایی. صاف نمودن فاز متحرک و محلول آزمایه با عبور از صافی غشائی با اندازه منافذ ۰/۴۵میکرومتر، قبل از استفاده یا تزریق، طول عمر ستون را افزایش خواهد داد.

۶ روش اجرای آزمون

۶-۱ آماده سازی آزمایه

آزمایه یا نمونه آزمایشگاهی را همگن و یکنواخت کنید. مواد زبر و خشن را به وسیله یک آسیاب یا مایع‌کننده مناسب خرد کرده و آن را مجدداً مخلوط کنید. مراحلی از جمله سرد نمودن ابتدایی نمونه‌ها جهت اجتناب از قرار گرفتن در معرض دمای بالا در بلند مدت، باید انجام پذیرد.

۶-۲ آماده سازی محلول آزمایه[8]

۶-۲-۱ استخراج

۶-۲-۱-۱ کلیات

برای نمونه‌هایی با میزان چربی بالا (بیش از ۲۵ درصد)، بهتر است چربی آن جدا شود، برای مثال: با تیمارهای پی در پی به کمک پترولیوم سبک[9] قبل از هیدرولیز اسیدی.

---

[1] UV Spectrometer
[2] Sample injecting device
[3] Fluorescence detector
[4] Integrator
[5] post column derivatisation
[6] ستون هایی با قطر یا اندازه ذرات اختصاصی تر از آن‌چه در این استاندارد شرح داده شده است می‌تواند استفاده شوند.شاخص های جداسازی برای چنین موادی به منظور حصول نتایج معادل تضمین شده اند. فاکتور کارایی برای ستون های تجزیه ای مناسب قدرت تفکیک خط پایه نمونه های موردآزمون درنظر گرفته می شود.
[7] Filter device
[8] Sample test solution
[9] Light petroleum

در تیمار مواد کف زا، استفاده از چند قطره روغن سیلیکون (طبق بند ۴-۲-۱۷) پیشنهاد می‌شود.
pH محلول استخراج شده باید حدود یک باشد. در غیر این صورت سفارش می‌شود، وزن نمونه کاهش یابد یا از هیدروکلریک اسید با غلظت بالا (برای مثال: ۰٫۲ مولار (طبق بند ۴-۲-۹) یا حتی یک مولار (طبق بند ۴-۲-۷) استفاده شود.

۶-۲-۱-۲ استخراج از فرآورده‌های خشک (میزان آب کمتر از ۲۰ ٪ مانند: غلات، شیر خشک، سبزی‌های خشک)

یک گرم تا ۱۰ گرم آزمایه همگن شده (طبق بند ۶-۱) در حد میلی‌گرم را توزین کرده و به ارلن مایر ۱۵۰ میلی‌لیتری منتقل کنید. ۵۰ میلی‌لیتر محلول هیدروکلریک اسید ۰٫۱ مولار (طبق بند ۴-۲-۸) به آن بیافزایید و آن را مخلوط کرده و کنترل کنید تا pH محلول حدود یک باشد.
محلول را در دستگاه گرم کن (طبق بند ۵-۳) در دمای ۱۲۰ درجه سلسیوس به مدت زمان ۳۰ دقیقه قرار داده سپس، آن را تا رسیدن به دمای اتاق، خنک نمایید. سپس به بالن اندازه دار ۱۰۰ میلی‌لیتری منتقل کرده و آن را با آب مقطر به حجم برسانید (با روغن سیلیکون روی خط نشانه را بپوشانید) و مخلوط کنید.
حدود ۵۰ میلی‌لیتر محلول حاصل از هیدرولیز اسیدی را صاف کرده و یا سانتریفوژ (3000 g) کنید. لایه رویی محلول سانتریفوژ شده را به یک بطری شیشه‌ای قابل در بندی، منتقل کنید (محلول آزمایه استخراجی).

۶-۲-۱-۳ استخراج از فرآورده‌های مایع و آب دار (میزان آب بیشتر از ۲۰ ٪ مانند: گوشت، سبزی‌ها و آب میوه‌ها)

مقدار ۲ گرم تا ۴۰ گرم آزمایه همگن شده (طبق بند ۶-۱) را در حد میلی‌گرم توزین کرده و به ارلن مایر ۱۵۰ میلی‌لیتری منتقل کنید. ۱۰ میلی‌لیتر محلول هیدروکلریک اسید یک مولار (طبق بند ۴-۲-۸) به آن اضافه کرده و با آب مقطر تا حجم حدود ۵۰ میلی‌لیتر رقیق نمایید وکنترل کنید تا pH محلول حدود یک باشد.
محلول را در دستگاه گرم کن (طبق بند ۵-۳) در دمای ۱۲۰ درجه سلسیوس به مدت زمان ۳۰ دقیقه قرار داده سپس، آن را تا رسیدن به دمای اتاق، خنک کنید. سپس به بالن اندازه‌دار ۱۰۰ میلی‌لیتری منتقل کرده و آن را با آب مقطر به حجم برسانید (با روغن سیلیکون روی خط نشانه را بپوشانید) و مخلوط کنید.
حدود ۵۰ میلی‌لیتر محلول حاصل از هیدرولیز اسیدی را صاف کرده و یا سانتریفوژ (3000 g) کنید. لایه رویی محلول سانتریفوژ شده را به یک بطری شیشه‌ای قابل در بندی، منتقل کنید (محلول آزمایه استخراجی).

یادآوری: در هنگام اتوکلاو کردن، تغییر اشکال مختلف ویتامین به یکدیگر می‌تواند ایجاد شود. برای مثال: از راه انتقال گروه آمین[1]. این مورد به ویژه در گوشت پخته شده یا در نمونه‌هایی با تعداد بالای گروه آمین آزاد، مشاهده می‌شود (به مراجع ۲ و ۷ از پیوست ث این استاندارد مراجعه کنید).

[1] Transamination

۶-۲-۲ تیمار آنزیمی و مراحل تغییر شکل[1]

برای نمونه‌های غذایی با منشاء حیوانی (مانند: گوشت، شیر و ماهی) که دارای پیریدوکسین با پیوند بتا-گلوکزیدی هستند، عملیات آنزیمی با بتا-گلوکزیداز لازم نمی‌باشد.

آزمایش‌ها نشان می‌دهد، که نتایج میزان کل ویتامین B6 در مواد غذایی با منشاء حیوانی، با یا بدون استفاده از بتا-گلوکزیداز (برای عملیات آنزیمی) تقریباً مشابه یکدیگر است (به مراجع ۲ و ۷ از پیوست ث این استاندارد مراجعه کنید).

۱۲٫۵ میلی‌لیتر محلول آزمایه استخراجی از بندهای ۶-۲-۱-۲ و ۶-۲-۱-۳ را به ارلن مایر ۲۰ میلی‌لیتری منتقل کرده و pH آن‌را با محلول استات سدیم (طبق بند ۴-۲-۵) در ۴٫۸ ± ۰٫۱ تنظیم کنید. مقدار یک میلی‌لیتر محلول اسید فسفاتاز (طبق بند ۴-۲-۱۳) و یک میلی‌لیتر محلول بتا-گلوکزیداز (طبق بند ۴-۲-۱۵) را به آن بیافزایید و مخلوط کنید. ارلن مایر را پوشانده و به مدت زمان حداقل ۱۲ ساعت، انکوبه‌گذاری کرده و یا در طول شب در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، در حال به هم خوردن قرار دهید.

پس از خنک شدن تا دمای اتاق، pH آن را با محلول سولفوریک اسید (طبق بند ۴-۱۰) در حدود ۳ تنظیم کنید. سپس محلول را به بالن اندازه دار ۲۰ میلی‌لیتری منتقل کرده و آن را با آب مقطر به حجم برسانید. آنگاه تکان دهید و آن را با کاغذ صافی چین‌دار خشک صاف کنید. مقدار ۵ میلی‌لیتر از محلول صاف شده ابتدایی را دور بریزید. محلول آزمایه صاف شده، در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۳ روز قابل نگهداری می‌باشد.

برای آنالیز HPLC، حدود ۲ میلی‌لیتر را با صافی غشایی (طبق بند ۵-۶) صاف کرده و در صورت نیاز با فاز متحرک رقیق سازی کنید.

۶-۳ آماده سازی محلول واکنشگر شاهد[2]

مقدار ۱۲٫۵ میلی‌لیتر محلول هیدروکلریک اسید ۰٫۱ مولار (طبق بند ۴-۲-۸) را به ارلن مایر ۲۰ میلی‌لیتری منتقل کرده و pH آن را با ۲٫۵ میلی لیتر محلول استات سدیم (طبق بند ۴-۲-۵) در ۴٫۸ ±۰/۱ تنظیم کنید. مقدار یک میلی‌لیتر محلول فسفاتاز اسید (طبق بند ۴-۲-۱۳) و یک میلی‌لیتر محلول بتاگلوکزیداز (طبق بند ۴-۲-۱۵) را به آن بیافزایید و مخلوط کنید. ارلن مایر را پوشانده و به مدت زمان حداقل ۱۲ ساعت آن را گرمخانه‌گذاری کرده و یا در طول شب آن را در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، در حال به هم خوردن قرار دهید.

پس از خنک شدن تا دمای اتاق، pH آن‌را با محلول سولفوریک اسید (طبق بند ۴-۲-۱۰) در حدود ۳ تنظیم کنید. سپس محلول را به بالن اندازه دار ۲۰ میلی‌لیتری منتقل کرده و آن را با آب مقطر به حجم برسانید. آنگاه تکان دهید و با کاغذ صافی چین دار خشک آن را صاف کنید. ۵ میلی‌لیتر از محلول صاف شده ابتدایی را دور بریزید.

[1] Transformation
[2] Reagent blind solution

برای آنالیز HPLC، حدود ۲ میلی‌لیتر را با صافی غشایی (طبق بند ۵-۶) صاف نموده و در صورت نیاز با فاز متحرک رقیق سازی کنید.

۶-۴ شرایط HPLC

عملیات جداسازی در دستگاه HPLC، باید منجر به ایجاد خط پایه جداسازی[1] برای پیک‌های PM، PL و PN و دیگر مواد موجود در نمونه شود.

چنان‌چه آزمون طبق شرایط آزمایشگاهی زیر پیش رود، جداسازی و اندازه گیری رضایت بخش خواهد بود. (شکل‌های پیوست ب این استاندارد را ببینید).

ستون HPLC:	مطابق با بند ۵ -۵
فاز متحرک:	مطابق با بند ۴-۲-۱۶
شدت جریان:	۱٫۵ ml/min
حجم تزریق:	۱µl تا ۵۰µl
آشکارسازی:	فلوروسنجی؛ طول موج تهییج: ۲۹۰ nm ؛طول موج نشر: ۳۹۰ nm.

۶-۵ شناسایی

حجم‌های مناسبی از محلول آزمایه (طبق بند ۶-۲-۲)، محلول‌های واکنشگر شاهد (طبق بند ۶-۳) و محلول‌های کالیبراسیون مخلوط شده (طبق بند ۴-۲-۲۱) را در شرایط نوشته شده در بند ۶-۴، به دستگاه HPLC تزریق کنید.

با مقایسه زمان بازداری پیک های مجزای کروماتوگرام محلول حاوی نمونه و محلول های استاندارد، PM، PL و PN را شناسایی کنید. هم‌چنین می‌توانید با استفاده از پس ستون[2] ، شناسایی پیک را انجام دهید، که در این صورت، pH افزایش می‌یابد. مانند: pH=۶٫۶ با استفاده از مشتق ساز پس ستون[3] (طبق بند ۵-۴) با شدت جریان ۰٫۱ ml/min واکنشگر پس ستون (طبق بند ۴-۶).آشکارسازی با طول موج تهییج در ۳۳۰ nm و طول موج نشر در ۳۹۰ nm انجام می‌شود (به مراجع ۲ ، ۴ و ۵ پیوست ث این استاندارد مراجعه کنید).

یادآوری: افزایش pH، طی استفاده از واکنشگر پس ستون (طبق بند ۴-۲-۶) منجر به افزایش طول موج تهییج به ۳۳۰ نانومتر می‌شود، به علاوه، انتخاب پذیری برای بعضی ماتریکس ها به علت کاهش پیک‌های برخی از ماتریکس‌ها بهبود می‌یابد (به مراجع ۴،۲ و ۵ پیوست ث این استاندارد مراجعه کنید).

[1] Base-line separation
[2] post column
[3] post column derivatisation

۶-۶ اندازه‌گیری

حجم‌های مشابه‌ای از محلول استاندارد و محلول آزمایه تحت شرایط نوشته شده در بند ۶-۴، به دستگاه HPLC تزریق کنید. برای اندازه گیری به روش کالیبراسیون خارجی، سطح زیر منحنی حاصل از نمونه را انتگرال‌گیری کنید و یا ارتفاع پیک حاصل از نمونه را اندازه‌گیری کرده و مقادیر متناظر را با نتایج پیک مشابه حاصل از ماده استاندارد، مقایسه کنید.

۷ روش محاسبه

۷-۱ محاسبه را بر اساس منحنی کالیبراسیون، برنامه‌های انتگرال‌گیری یا طبق معادله‌های (۳) تا (۶) به شرح زیر انجام دهید:

معادله(۳):
$$w = \frac{y_i}{m} \times \frac{F \times 100}{1000}$$

معادله(۴):
$$y_i = bx_i + a_i$$

معادله(۵):
$$x_i = P_i - B_i$$

معادله(۶):
$$F = \frac{V}{V_1}$$

که در آن:

y_i جرم PM، PL یا PN به میکروگرم در ۲۰ میلی‌لیتر محلول آزمایه (**طبق بند ۶-۲-۲**) که با محاسبه سطح زیر منحنی **یا** ارتفاع پیک (قله) با استفاده از هم‌گرایی خطی[1] یا منحنی‌های کالیبراسیون اندازه‌گیری شده است.

m جرم نمونه به گرم

a_i و b_i ضرایب هم‌گرایی[2] برای PM، PL یا PN که با استفاده از هم‌گرایی خطی بر پایه غلظت و سطح زیر منحنی محلول‌های کالیبراسیون محاسبه شده اند.

a_i مقدار y منحنی کالیبراسیون برای PM، PL و PN

b_i شیب منحنی کالیبراسیون

x_i سطوح زیر منحنی تصحیح شده PM، PL و PN محلول آزمایه

P_i سطوح زیر منحنی PM، PL و PN محلول آزمایه

B_i سطوح زیر منحنی PM، PL و PN محلول واکنشگر شاهد

F خارج قسمت معادله (۶)

[1] Linear regression
[2] Regression coefficients

w جزء جرمی پیریدوکسامین (PM)، پیریدوکسال (PL) یا پیریدوکسین (PN) بـه میلـی‌گـرم در ۱۰۰ گرم نمونه

V حجم کل محلول حاصل از استخراج اسیدی نمونه بند (طبق بند ۶-۲-۱-۲) و (طبق بند ۶-۲-۱-)، به میلی‌لیتر

V_1 حجم محلول حاصل از استخراج اسیدی مورد استفاده در عملیات آنزیمـی (طبـق بنـد ۶-۲-۲)، بـه میلی‌لیتر

۷-۲ محاسبه جزء جرمی، w، ویتامین B_6 بر حسب پیریدوکسین به میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم نمونه با استفاده از معادله (۷):

معادله(۷): $$w = 1{,}006\, w_{PM} + 1{,}012\, w_{PL} + w_{PN}$$

که در آن :

w_{PM} مقدار پیریدوکسامین به میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم نمونه

w_{PL} مقدار پیریدوکسال به میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم نمونه

w_{PN} مقدار پیریدوکسین به میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم نمونه

1,006 فاکتور PM برای محاسبه بر حسب PN

1,012 فاکتور PL برای محاسبه بر حسب PN

۷-۳ مقدار ویتامین B6 را بر حسب پیریدوکسین به میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم نمونه، گزارش کنید.

یادآوری: در صورت لزوم، با استفاده از ضریب تبدیل ۱٫۲۱۶ نتیجه را برحسب پیریدوکسین هیدروکلرید گزارش کنید. ایـن تبدیل باید به طور مشخص در گزارش آزمون نوشته شود.

۸ دقت

۸-۱ کلیات

اطلاعات مربوط به دقت برای اندازه‌گیری ویتامین B_6 در یک آزمون بین آزمایشگاهی طبق ISO 5725، تهیه و تنظیم و توسط Bgvv [1] اجرا شده است (به پیوست الف این استاندارد مراجعه کنید).

جزئیات مطالعه مشترک بر روی دقتِ روش، به طور خلاصه در پیوست الف این استاندارد نوشته شده است. مقادیر به دست آمده از آزمون‌های بین آزمایشگاهی، در دامنه غلظت آنالیت و ماتریکس‌هایی غیر از مواردی که در پیوست الف این استاندارد شرح داده شده است، کاربرد ندارد.

[1] Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
(German Federal Institute for Consumer protection and veterinary medicine)

قابلیت اجرا و اعتبار این روش توسط مطالعات دیگر بر روی مواد غذایی مختلف از جمله گوشت، ماهی، شیر، سبزیجات، میوه‌ها و غلات، آزمون شده است (به مراجع ۲ و۳ پیوست ث این استاندارد مراجعه کنید). نتایج تجزیه‌ای به خوبی تجدیدپذیر است و تنها تعداد معدودی تداخل نسبی پیک‌های ماتریکس غذا با یکدیگر، که به راحتی قابل جداسازی‌اند، اتفاق می‌افتد. هم‌بستگی خوب و هم‌گرایی خطی بین سطح زیر پیک و غلظت PM، PL و PN در محلول کالیبراسیون وجود دارد. انحراف معیار نسبی کل ویتامین B_6 ، در یک مجموعه از سه تا پنج اندازه‌گیری در مواد غذایی مختلف، بین ۲ درصد تا ۶ درصد متغیر است.
بازیابی[1] PM، PL و PN اضافه شده به مواد غذایی، بین ۸۵ درصد تا ۱۰۵ درصد متغیر است (به مراجع ۲ و۳ پیوست ث این استاندارد مراجعه کنید). اندازه‌گیری کل ویتامین B_6 با این روش در مواد غذایی با منشاء گیاهی (حاوی پیریدوکسین گلیکوزیله شده)، از بازدهی بالاتری نسبت به روش‌های بدون عملیات آنزیمی، برخوردار است (به مراجع ۲، ۳ و ۷ پیوست ث این استاندارد مراجعه کنید).

۸-۲ تکرارپذیری[2]

تغییر پذیری در نتیجه به دست آمده از یک آزمایش که روی یک ماده مشخص مورد آزمون، به وسیله یک آزمایشگر، با به کارگیری همان تجهیزات، در کوتاهترین دوره زمانی ممکن به دست آمده باشد، نباید در بیشتر از ۵ درصد[3] موارد، از حد تکرار پذیری r بیشتر باشد.

سمولینا با شیر، پودر

پیریدوکسامین	$\bar{x} = 0.065\ mg/100\ g \quad r = 0.008$
پیریدوکسال	$\bar{x} = 0.080\ mg/100\ g \quad r = 0.022$
پیریدوکسین	$\bar{x} = 0.523\ mg/100\ g \quad r = 0.067$
ویتامین B_6	$\bar{x} = 0.667\ mg/100\ g \quad r = 0.084$

پوره سیب زمینی، پودر

پیریدوکسامین	$\bar{x} = 0.163\ mg/100\ g \quad r = 0.016$
پیریدوکسال	$\bar{x} = 0.032\ mg/100\ g \quad r = 0.012$
پیریدوکسین	$\bar{x} = 1.008\ mg/100\ g \quad r = 0.080$
ویتامین B_6	$\bar{x} = 1.204\ mg/100\ g \quad r = 0.089$

سبزی‌ها با گوشت (غذای کودک)

پیریدوکسامین	$\bar{x} = 0.043\ mg/100\ g \quad r = 0.005$
پیریدوکسال	$\bar{x} = 0.009\ mg/100\ g \quad r = 0.004$

[1] Recovery
[2] Repeatability
[3] در این استاندارد تکرار پذیری زمانی قابل قبول است که اختلاف تکرار آزمایش، بیشتر از ۵ درصد نباشد.

پیریدوکسین $\bar{x}$ =0.047 *mg*/100 g r = 0.010

ویتامین B_6 $\bar{x}$ =0.107 *mg*/100 g r = 0.011

نوشیدنی ویتامینه

پیریدوکسامین $\bar{x}$ =0.004 *mg*/100 g r = 0.003

پیریدوکسال $\bar{x}$ =0.004 *mg*/100 g r = 0.003

پیریدوکسین $\bar{x}$ =0.374 *mg*/100 g r = 0.056

ویتامین B_6 $\bar{x}$ =0.380 *mg*/100 g r = 0.056

۸-۳ تجدیدپذیری[1]

تغییر پذیری در نتیجه میانگین به دست آمده از نتایج آزمون‌های مستقل، روی یک ماده مشخص مورد آزمون، که در آزمایشگاه‌های مختلف و با استفاده از تجهیزات متفاوت توسط آزمایشگرهای متفاوت انجام گیرد، نباید در بیشتر از ۵ درصد موارد، از حد تجدید پذیری R بیشتر باشد. مقادیر عبارتند از:

سمولینا با شیر، پودر

پیریدوکسامین $\bar{x}$ =0.065 *mg*/100 g R = 0.035

پیریدوکسال $\bar{x}$ =0.080 *mg*/100 g R = 0.071

پیریدوکسین $\bar{x}$ =0.523 *mg*/100 g R = 0.151

ویتامین B_6 $\bar{x}$ =0.667 *mg*/100 g R = 0.193

پوره سیب زمینی، پودر

پیریدوکسامین $\bar{x}$ =0.163 *mg*/100 g R = 0.089

پیریدوکسال $\bar{x}$ =0.032 *mg*/100 g R = 0.022

پیریدوکسین $\bar{x}$ =1.008 *mg*/100 g R = 0.314

ویتامین B_6 $\bar{x}$ =1.204 *mg*/100 g R = 0.369

سبزی‌ها با گوشت (غذای کودک)

پیریدوکسامین $\bar{x}$ =0.043 *mg*/100 g R= 0.013

پیریدوکسال $\bar{x}$ =0.009 *mg*/100 g R= 0.013

پیریدوکسین $\bar{x}$ =0.047 *mg*/100 g R= 0.021

[1] Reproducibility

ویتامین B_6	$\bar{x}$ =0.107 $mg/100$ g R= 0.039

نوشیدنی ویتامینه

پیریدوکسامین	$\bar{x}$ =0.004 $mg/100$ g R= 0.005
پیریدوکسال	$\bar{x}$ =0.004 $mg/100$ g R= 0.005
پیریدوکسین	$\bar{x}$ =0.373 $mg/100$ g R= 0.086
ویتامین B_6	$\bar{x}$ =0.380 $mg/100$ g R= 0.095

۹ گزارش آزمون

گزارش آزمون باید دارای آگاهی‌های زیر باشد:

۹-۱ کلیه آگاهی‌های لازم برای شناسایی نمونه (نوع نمونه، منشاء نمونه، عنوان).

۹-۲ روش آزمون طبق استاندارد ملی ایران به شماره ....

۹-۳ تاریخ نمونه برداری.

۹-۴ روش نمونه برداری (در صورت وجود و اطلاع).

۹-۵ تاریخ دریافت نمونه از سوی آزمایشگاه.

۹-۶ نتایج به دست آمده و واحدهایی که با آن نتایج بیان شده است.

۹-۷ هرگونه نکته خاص مشاهده شده در جریان آزمون.

۹-۸ تاریخ انجام آزمون.

۹-۹ هر گونه کارهای دیگری که در این استاندارد نوشته نشده است یا به طور اختیاری انجام گرفته و ممکن است روی نتایج آزمون موثر باشد.

۹-۱۰ نام و نام خانوادگی و امضای آزمون کننده.

پیوست الف
(اطلاعاتی)
اطلاعات مربوط به دقت

اطلاعات موجود با به کارگیری روش های HPLC در پیوست پ شرح داده شده است. اطلاعات مربوط به دقت برای اندازه‌گیری ویتامین B_6 در یک آزمون بین آزمایشگاهی مطابق با ISO 5725، تهیه و تنظیم و از سوی انستیتوی ملی آلمان برای حمایت از مصرف کنندگان و داروهای دامپزشکی[1] اجرا شده است.

جدول الف – ۱- اطلاعات مربوط به دقت سمولینا با شیر، پودر

نمونه	سمولینا با شیر، پودر			
آنالیت	پریدوکسامین	پریدوکسال	پریدوکسین	ویتامین B_6[a]
سال آزمون بین آزمایشگاهی	۲۰۰۰	۲۰۰۰	۲۰۰۰	۲۰۰۰
تعداد آزمایشگاه‌ها	۱۱	۱۱	۱۱	۱۱
تعداد نمونه‌ها	۵	۵	۵	۵
تعداد آزمایشگاه‌های باقیمانده پس از حذف آزمایشگاه هایی که نتیجه عملکردشان خارج از محدوده بوده است	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰
تعداد نتایج پذیرفته شده	۵۳	۵۳	۵۳	۵۳
مقدار میانگین، $\bar{x}$ (mg /100 g)	۰٫۰۶۵	۰٫۰۸۰	۰٫۵۲۳	۰٫۶۶۷
انحراف معیار تکرارپذیری، S_r (mg /100 g)	۰٫۰۰۳	۰٫۰۰۸	۰٫۰۲۴	۰٫۰۳۰
ضریب پراکندگی تکرارپذیری، RSD_r %	۴٫۶	۱۰٫۰	۴٫۶	۴٫۵
حد تکرارپذیری، $r[r=2.8\times S_r]$ (mg /100 g)	۰٫۰۰۸	۰٫۰۲۲	۰٫۰۶۷	۰٫۰۸۴
انحراف معیار تجدید پذیری، S_R (mg /100 g)	۰٫۰۱۳	۰٫۰۲۵	۰٫۰۵۳	۰٫۰۶۸
ضریب پراکندگی تجدید پذیری، RSD_R %	۲۰٫۵	۳۱٫۳	۱۰٫۱	۱۰٫۲
حد تجدید پذیری، $R[R=2.8\times S_R]$ (mg /100 g)	۰٫۰۳۵	۰٫۰۷۱	۰٫۱۵۱	۰٫۱۹۳
مقدار متوسط بازیابی، %	۹۷٫۲	۹۴٫۷	۹۳٫۹	
انحراف معیار بازیابی، %	۹	۸٫۲	۹٫۷	
تعداد نتایج مورد استفاده برای محاسبه بازیابی	۲۳	۲۰	۲۳	

[a] ویتامین B_6 = پیریدوکسین + پیریدوکسال ۱/۰۱۲+ پیریدوکسامین ۱/۰۰۶

[1] BgVV (Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, German Federal Institute for Consumer protection and veterinary medicine).

جدول الف – ۲- اطلاعات مربوط به دقت پوره سیب زمینی، پودر

نمونه	پوره سیب زمینی، پودر			
آنالیت	پریدوکسامین	پریدوکسال	پریدوکسین	ویتامین B_6 [a]
سال آزمون بین آزمایشگاهی	۲۰۰۰	۲۰۰۰	۲۰۰۰	۲۰۰۰
تعداد آزمایشگاه‌ها	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰
تعداد نمونه‌ها	۵(۹)	۵(۹)	۵(۹)	۵(۹)
تعداد آزمایشگاه‌های باقیمانده پس از حذف آزمایشگاه هایی که نتیجه عملکردشان خارج از محدوده بوده است	۹	۹	۹	۹
تعداد نتایج پذیرفته شده	۴۹	۴۹	۴۹	۴۹
مقدار میانگین، $\bar{x}$ (mg /100 g)	۰٫۱۶۳	۰٫۰۳۲	۱٫۰۰۸	۱٫۲۰۴
انحراف معیار تکرارپذیری، S_r (mg /100 g)	۰٫۰۰۶	۰٫۰۰۴	۰٫۰۲۸	۰٫۰۳۲
ضریب پراکندگی تکرارپذیری، RSD_r %	۳٫۷	۱۲٫۳	۲٫۸	۲٫۷
حد تکرارپذیری، $r[r=2.8\times S_r]$ (mg /100 g)	۰٫۰۱۶	۰٫۰۱۲	۰٫۰۸۰	۰٫۰۸۹
انحراف معیار تجدید پذیری، S_R (mg /100 g)	۰٫۰۳۱	۰٫۰۰۸	۰٫۱۱۱	۰٫۱۳۱
ضریب پراکندگی تجدید پذیری، RSD_R %	۱۹٫۰	۲۵٫۰	۱۱٫۰	۱۰٫۹
حد تجدید پذیری، $R[R=2.8\times S_R]$ (mg /100 g)	۰٫۰۸۹	۰٫۰۲۲	۰٫۳۱۴	۰٫۳۶۹
مقدار متوسط بازیابی، %	۹۷٫۷	۸۵٫۲	۹۰٫۸	
انحراف معیار بازیابی، %	۹٫۴	۷٫۴	۹٫۹	
تعداد نتایج مورد استفاده برای محاسبه بازیابی	۱۹	۲۰	۲۰	

[a] ویتامین B_6 = ۱/۰۰۶ پیریدوکسامین + ۱/۰۱۲ پیریدوکسال + پیریدوکسین

جدول الف – ۳- اطلاعات مربوط به دقت سبزی‌ها با گوشت (غذای کودک)

نمونه	سبزی‌ها با گوشت			
آنالیت	پریدوکسامین	پریدوکسال	پریدوکسین	ویتامین B_6[a]
سال آزمون بین آزمایشگاهی	۲۰۰۰	۲۰۰۰	۲۰۰۰	۲۰۰۰
تعداد آزمایشگاه‌ها	۹	۹	۹	۹
تعداد نمونه‌ها	۵(۲)	۵(۲)	۵(۲)	۵(۲)
تعداد آزمایشگاه‌های باقیمانده پس از حذف آزمایشگاه هایی که نتیجه عملکردشان خارج از محدوده بوده است	۸	۸	۸	۸
تعداد نتایج پذیرفته شده	۳۷	۳۷	۳۷	۳۷
مقدار میانگین، $\bar{x}$ (mg /100 g)	۰/۰۴۳	۰/۰۰۹	۰/۰۴۷	۰/۱۰۷
انحراف معیار تکرارپذیری، S_r (mg /100 g)	۰/۰۰۲	۰/۰۰۱	۰/۰۰۳	۰/۰۰۴
ضریب پراکندگی تکرارپذیری، RSD_r %	۴/۴	۱۵/۴	۷/۲	۳/۶
حد تکرارپذیری، $r[r=2.8\times S_r]$ (mg /100 g)	۰/۰۰۵	۰/۰۰۴	۰/۰۱۰	۰/۰۱۱
انحراف معیار تجدید پذیری، S_R (mg /100 g)	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵	۰/۰۰۷	۰/۰۱۴
ضریب پراکندگی تجدید پذیری، RSD_R %	۱۱/۰	۵۰/۵	۱۵/۷	۱۲/۸
حد تجدید پذیری، $R[R=2.8\times S_R]$ (mg /100 g)	۰/۰۱۳	۰/۰۱۳	۰/۰۲۱	۰/۰۳۹
مقدار متوسط بازیابی، %	۹۵/۱	۹۰/۶	۸۸/۹	
انحراف معیار بازیابی، %	۴/۵	۱۲/۰	۱۰/۲	
تعداد نتایج مورد استفاده برای محاسبه بازیابی	۱۸	۱۶	۱۹	

[a] ویتامین B_6 = ۱/۰۰۶ پیریدوکسامین + ۱/۰۱۲ پیریدوکسال + پیریدوکسین

جدول الف – ۴- اطلاعات مربوط به دقت نوشیدنی چند ویتامینه

نمونه	نوشیدنی چند ویتامینه			
آنالیت	پریدوکسامین	پریدوکسال	پریدوکسین	ویتامین B_6[a]
سال آزمون بین آزمایشگاهی	۲۰۰۰	۲۰۰۰	۲۰۰۰	۲۰۰۰
تعداد آزمایشگاه‌ها	۱۱	۱۱	۱۱	۱۱
تعداد نمونه‌ها	۵	۵	۵	۵
تعداد آزمایشگاه‌های باقیمانده پس از حذف آزمایشگاه هایی که نتیجه عملکردشان خارج از محدوده بوده است	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰
تعداد نتایج پذیرفته شده	۵۳	۵۳	۵۳	۵۳
مقدار میانگین، $\bar{x}$ (mg /100 g)	۰/۰۰۴	۰/۰۰۴	۰/۳۷۳	۰/۳۸۰
انحراف معیار تکرارپذیری، S_r (mg /100 g)	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۲۰	۰/۰۲۰
ضریب پراکندگی تکرارپذیری، RSD_r %	۲۵/۰	۲۵/۰	۵/۴	۵/۳
حد تکرارپذیری، $r[r=2.8\times S_r]$ (mg /100 g)	۰/۰۰۳	۰/۰۰۳	۰/۰۵۶	۰/۰۵۶
انحراف معیار تجدید پذیری، S_R (mg /100 g)	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۳۰	۰/۰۳۴
ضریب پراکندگی تجدید پذیری، RSD_R %	۳۸/۶	۴۹	۸/۰	۸/۸
حد تجدید پذیری، $R[R=2.8\times S_R]$ (mg /100 g)	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵	۰/۰۸۶	۰/۰۹۵
مقدار متوسط بازیابی، %	۹۸/۱	۹۴/۵	۹۸/۲	
انحراف معیار بازیابی، %	۱۱/۴	۶/۲	۸/۴	
تعداد نتایج مورد استفاده برای محاسبه بازیابی	۲۳	۲۳	۲۳	

[a] B_6 ویتامین = ۱/۰۰۶ پیریدوکسامین + ۱/۰۱۲ پیریدوکسال + پیریدوکسین

پیوست ب

(اطلاعاتی)

مثال‌هایی ازشرایط بهینه HPLC جهت تعیین ترکیبات ویتامین B_6

آزمایشگاه	ستون جداسازی	قطر mm×mm	دما ^0C	فاز متحرک	جریان ml/min	تشخیص nm		زمان بازداری min		
						EM	EX	PN[d]	PL[c]	PM[b]
1a	LUNARP C_{18}, 5µm	۲۵۰×۴	۳۰	H_2SO_4(C=0.015mol/l) حاویTCA(C=0.005mol/l)	۱٫۵	۳۹۰	۲۹۰	~۱۱/۴	~۷	~۳
1b	LUNARP C_{18}, 5µm	۲۵۰×۴	۳۰	H_2SO_4(C=0.015mol/l) حاویTCA(C=0.005mol/l) و معرف پیش ستون: K_2HPO_4	۱٫۵ ۰٫۵	۳۹۰	۳۳۰	~۱۱/۲	~۶/۹	~۲/۴
2	LUNARP C_{18}, 5µm	۲۵۰×۴	۳۰	H_2SO_4(C=0.015mol/l) حاویTCA(C=0.005mol/l)	۱٫۵	۳۹۰	۲۹۰	~۱۳	~۷/۹	~۳
3	AQUA $C_{18,}$5µm[a] Precolumn:RP $C_{18,}$5µm	۲۵۰×۴ ۴×۳	۳۰	H_2SO_4(C=0.015mol/l) حاویTCA(C=0.005mol/l)	۲ ۱٫۵	۳۹۰	۲۹۰	~۶/۴ ~۶/۹	~۴/۷ ~۵/۴	~۲/۲ ~۲/۷
4	LiChrospher 60 RP C_8 Select B, 5µm	۲۵۰×۴	۳۰	H_2SO_4(C=0.015mol/l) حاویTCA(C=0.005mol/l) صفر تا ۱۴ دقیقه،متانول، ۱۴ تا ۲۱ دقیقه	۳	۳۹۰	۲۹۰	~۶/۱	~۴/۸	~۲/۵
5	Nucleosil 120 $C_{18,}$ 5µm Precolumn: RP C_{18}	۲۵۰×۴	~۲۰	H_2SO_4(C=0.015mol/l) حاویTCA(C=0.005mol/l)	۲	۳۹۰	۲۹۰	~۷	~۴/۹	~۲
6	LUNARP C_{18}, 5µm	۲۵۰×۴	۳۰	H_2SO_4(C=0.015mol/l) حاویTCA(C=0.005mol/l)	۲	۳۹۰	۲۹۰	~۹/۲	~۶/۳	~۲/۵
7	LUNARP C_{18}, 5µm	۲۵۰×۴	۳۰	H_2SO_4(C=0.015mol/l) حاویTCA(C=0.005mol/l)	۲	۳۹۰	۲۹۰	~۱۱/۸	~۶/۵	~۲/۸
8	LUNARP C_{18}, 5µm	۲۵۰×۴	۳۰	H_2SO_4(C=0.015mol/l) حاویTCA(C=0.005mol/l)	۲	۳۹۰	۲۹۰	~۱۱/۴	~۶/۹	~۲/۸
9	Spherisorb 80 ODS-2, 5µm	۲۵۰×۴	۳۰	H_2SO_4(C=0.015mol/l) حاویTCA(C=0.005mol/l)	۲	۳۹۰	۲۹۰	~۱۶/۱	~۱۰/۴	~۵/۵
10	LUNARP C_{18}, 5µm	۲۵۰×۴	۳۰	H_2SO_4(C=0.015mol/l) حاویTCA(C=0.005mol/l) و معرف پیش ستون: K_2HPO_4	۱ ۰٫۵	۳۹۰	۳۳۰	~۲۸/۴	~۱۷/۹	~۶/۹

[a] Phenomenex, 125A; [b] PM= Pyridoxamine, [c] PL= Pyridoxal, [d] PN= Pyridoxine

پیوست پ

(اطلاعاتی)

مثال‌هایی برای ضرایب جذب مولی

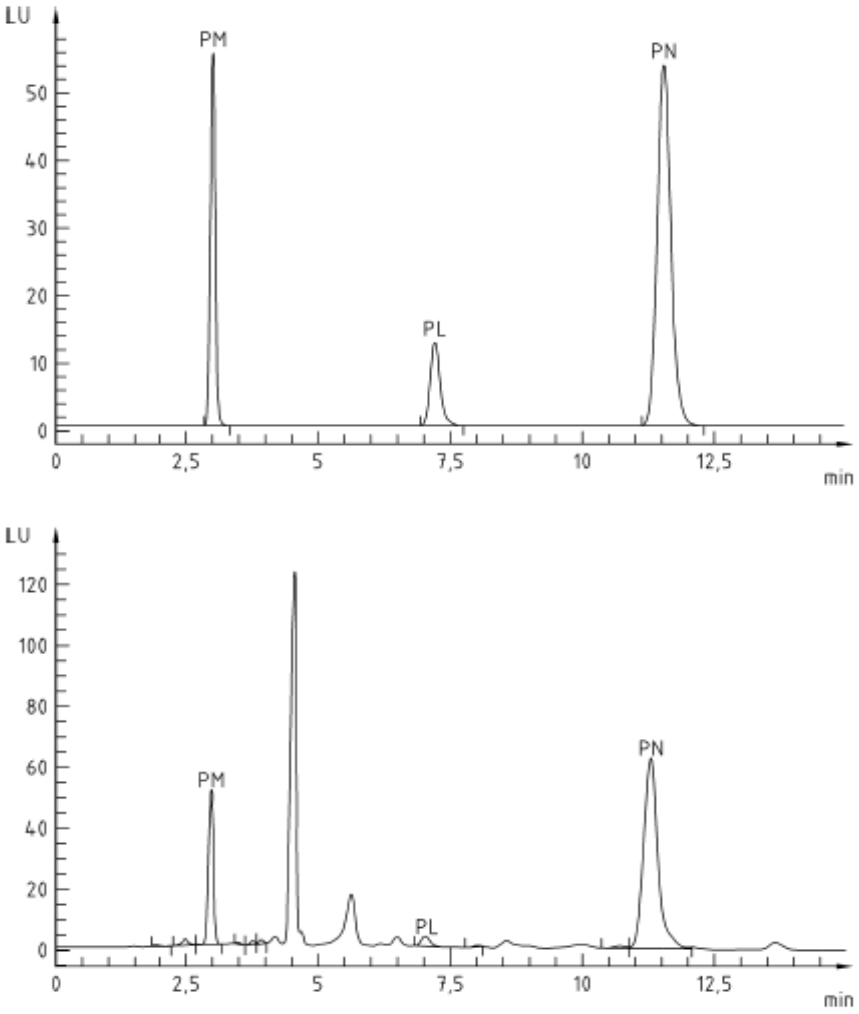
جدول ب-۱- مثال‌هایی برای ضرایب جذب مولی(ε) ترکیبات ویتامین B_6

ترکیب ها	حلال	λ_{max} nm	ε $mmol^{-1}.cm^{-1}$	M_w $g.mol^{-1}$
پیریدوکسین هیدروکلرید	هیدروکلریک اسید ۰٫۱ mol/l، pH~۱	۲۹۰	۸٫۶	۲۰۵٫۶
پیریدوکسین هیدروکلرید	بافر فسفات ۰٫۱ mol/l، pH=۷	۳۲۳٫۸	۷٫۳	۲۰۵٫۶
پیریدوکسال هیدروکلرید	هیدروکلریک اسید ۰٫۱ mol/l، pH~۱	۲۸۸	۸٫۹۶ (۹٫۰)	۲۰۳٫۶
پیریدوکسال-´۵-فسفات	بافر فسفات ۰٫۱ mol/l، pH=۷	۳۸۸	۵٫۰۲	۲۴۷٫۱
پیریدوکسامین دی هیدروکلرید	هیدروکلریک اسید ۰٫۱ mol/l، pH~۱	۲۹۲	۸٫۲	۲۴۱٫۱
پیریدوکسامین دی هیدروکلرید	بافر فسفات ۰٫۱ mol/l، pH=۷	۲۵۳	۴٫۶	۲۴۱٫۱
پیریدوکسامین-´۵-هیدروکلرید فسفات	بافر فسفات ۰٫۱ mol/l، pH=۷	۳۲۶	۸٫۳۷	۲۴۱٫۱

پیوست ت

(اطلاعاتی)

اشکال



راهنمای شکل: LU شدت فلورسانس

شرایط عملیات:

ستون HPLC: مطابق با ۵-۵

فاز متحرک: مطابق با ۴-۲-۱۶

شدت جریان: ۱٫۵ ml/min

آشکارسازی: فلورومتری ؛ طول موج تهییج: ۲۹۰ nm ، طول موج نشر: ۳۹۰ nm

شکل ت-۱- نمودارهای مواد استاندارد و نمونه پوره سیب زمینی

پیوست ث
(اطلاعاتی)
کتابنامه

[1] Bognár, A.: Bestimmung von Vitamin B6 in Lebensmitteln mit Hilfe der Hochdruckflüssig- Chromatographie (HPLC). Z Lebensm Unters Forsch A, 1985, 181: 200 – 205.

[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.

[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.

[4] Bitsch, R., Möller, J., J Chromatogr., 1989, 463: 207 – 211.

[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.

[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.

[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.

[8] ISO 5725, *Precision of test methods – Determination of repeatability and reproducibility for a standard test method by inter-laboratory tests*[1].

[1] ISO 5725:1986 is withdrawn and replaced by ISO 5725-1, ISO 5725-2, ISO 5725-3, ISO 5725-4 and ISO 5725-6, all edition 1994 as well as ISO 5725-5:1998.