

DIN EN 14663

ICS 67.050

**Lebensmittel –
Bestimmung von Vitamin B6 (einschließlich glucosidisch gebundener
Verbindungen) mit HPLC;
Deutsche Fassung EN 14663:2005**

Foodstuffs –

Determination of vitamin B6 (including its glycosylated forms) by HPLC;
German version EN 14663:2005

Produits alimentaires –

Dosage de la vitamine B6 (y compris ses formes glycosylées) par CLHP;
Version allemande EN 14663:2005

Gesamtumfang 25 Seiten

Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN

Nationales Vorwort

Diese Europäische Norm ist vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ (Sekretariat: DIN) erarbeitet worden.

Die Mitarbeit des DIN wird über den Arbeitsausschuss „Vitamine“ des Normenausschusses Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) wahrgenommen.

Für die im Inhalt zitierten Normen wird im Folgenden auf die entsprechende Deutsche Norm hingewiesen:

EN ISO 3696 siehe DIN ISO 3696
ISO 5725 siehe DIN ISO 5725¹⁾

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN ISO 3696, *Wasser für analytische Zwecke — Anforderungen und Prüfungen*

DIN ISO 5725, *Präzision von Messverfahren — Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision von festgelegten Messverfahren durch Ringversuche*¹⁾

1) Diese Norm, die für die Ermittlung der Präzisionsdaten verwendet wurde, ist inzwischen zurückgezogen und durch DIN ISO 5725-1:1997-11 und DIN ISO 5725-2:2002-12 ersetzt worden.

Deutsche Fassung

**Lebensmittel —
Bestimmung von Vitamin B6 (einschließlich glucosidisch
gebundener Verbindungen) mit HPLC**

Foodstuffs —
Determination of vitamin B6 (including its glycosylated
forms) by HPLC

Produits alimentaires —
Dosage de la vitamine B6 (y compris ses formes
glycosylées) par CLHP

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 26. Oktober 2005 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim Management-Zentrum oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Schweden, der Schweiz, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

Management-Zentrum: rue de Stassart, 36 B-1050 Brüssel

Inhalt

	Seite
Vorwort	3
1 Anwendungsbereich	4
2 Normative Verweisungen	4
3 Kurzbeschreibung	4
4 Reagenzien	4
5 Geräte	9
6 Durchführung	10
7 Berechnung	12
8 Präzision	13
9 Untersuchungsbericht	15
Anhang A (informativ) Präzisionsdaten	16
Anhang B (informativ) Beispiele für geeignete HPLC-Bedingungen für die Bestimmung von Vitamin B₆-Verbindungen	20
Anhang C (informativ) Beispiele für molare Extinktionskoeffizienten	21
Anhang D (informativ) Bilder	22
Literaturhinweise	23
 Bilder	
Bild D.1 — Standardsubstanzen und Probe Kartoffelpüree	22
 Tabellen	
Tabelle 1 — Beispiele für molare Extinktionskoeffizienten von Vitamin B₆-Verbindungen	7
Tabelle A.1 — Präzisionsdaten für Griesbrei mit Milch, als Pulver	16
Tabelle A.2 — Präzisionsdaten für Kartoffelpüree, als Pulver	17
Tabelle A.3 — Präzisionsdaten für Gemüse mit Schinken (Kleinkindernahrung)	18
Tabelle A.4 — Präzisionsdaten für ein Multivitamingetränk	19
Tabelle B.1 — Beispiele für geeignete HPLC-Bedingungen für die Bestimmung von Vitamin B₆-Verbindungen	20
Tabelle C.1 — Beispiele für molare Extinktionskoeffizienten (<i>E</i>) von Vitamin B₆-Verbindungen [3], [4]	21

Vorwort

Dieses Dokument (EN 14663:2005) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Juni 2006, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Juni 2006 zurückgezogen werden.

Entsprechend der CEN/CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Schweden, Schweiz, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Verfahren für die Bestimmung von Vitamin B₆ in Lebensmitteln mit Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) fest.

Vitamin B₆ ist der Massenanteil der Summe von Pyridoxin, Pyridoxal und Pyridoxamin einschließlich ihrer phosphorylierten Verbindungen, wie auch von β -glycosylierten Verbindungen, berechnet als Pyridoxin.

Dieses Verfahren wurde im Ringversuch erfolgreich für Massenanteile von 0,034 mg/100 g bis 1,21 mg/100 g in Milch-Griesbrei (Kleinkindernahrung), Kartoffelpüree, Schinken mit Gemüse (Fertignahrung) und einem Multivitamingetränk validiert.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden zitierten Dokumente sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

EN ISO 3696, *Wasser für analytische Zwecke — Anforderungen und Prüfungen (ISO 3696:1987)*

3 Kurzbeschreibung

Pyridoxal, Pyridoxamin und Pyridoxin werden aus dem Lebensmittel durch saure Hydrolyse extrahiert und mit saurer Phosphatase und β -Glucosidase enzymatisch dephosphoryliert und deglycosiliert.

Die verschiedenen Vitamin B₆-Derivate (Pyridoxal, Pyridoxamin und Pyridoxin) werden mit HPLC getrennt und mit fluorometrischer Detektion quantifiziert [1], [2].

4 Reagenzien

4.1 Allgemeines

Falls nicht anders angegeben, werden bei der Analyse nur analysenreine Chemikalien und Wasser von mindestens Qualität 1 nach EN ISO 3696 oder doppelt destilliertes Wasser verwendet.

4.2 Dikaliumhydrogenphosphat, Massenanteil $w(\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}) \geq 99,9 \%$

4.3 Natriumacetat, ohne Kristallwasser, $w(\text{CH}_3\text{COONa}) \geq 99,0 \%$

4.4 Trichloressigsäure (TCA), $w(\text{Cl}_3\text{CCOOH}) \geq 99,0 \%$

4.5 Natriumacetat-Lösung, Stoffmengenkonzentration $c(\text{CH}_3\text{COONa}) = 2,5 \text{ mol/l}$

205 g Natriumacetat (4.3) werden in 1 l Wasser gelöst.

4.6 Nachsäulenreagenz (wahlweise), K_2HPO_4 -Lösung, $c(\text{K}_2\text{HPO}_4) = 0,15 \text{ mol/l}$

34,2 g Dikaliumhydrogenphosphat (4.2) werden in Wasser gelöst, auf 1 000 ml aufgefüllt, gemischt und entgast.

4.7 Salzsäure, $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}$

4.8 Salzsäure, $c(\text{HCl}) = 0,1 \text{ mol/l}$

4.9 Salzsäure, $c(\text{HCl}) = 0,2 \text{ mol/l}$

4.10 Schwefelsäure, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 1 \text{ mol/l}$

4.11 Petroleumbenzin, Siedebereich von 40 °C bis 60 °C

4.12 Saure Phosphatase, von Kartoffeln, enzymatische Aktivität etwa 5,3 U/mg¹⁾.

Es ist wichtig, dass das verwendete Enzym der Aktivitätsprüfung 4.13.2 entspricht. Weitere Informationen, siehe [2], [7].

4.13 Saure Phosphatase-Lösung

4.13.1 Allgemeines

60 mg Saure Phosphatase (4.12) werden in einem Becherglas in 10 ml Wasser durch 2-minütiges Rühren gelöst bzw. solubilisiert. Diese Lösung wird an jedem Analysentag hergestellt.

4.13.2 Aktivitätsprüfung der sauren Phosphatase

10 g Schweinefleisch, 5 g Kartoffelpüree oder 5 g Vollkornmehl werden in ein Becherglas eingewogen und wie in 6.2.1 beschrieben, sauer extrahiert. 1 ml Saure Phosphatase-Lösung (4.13.1) und wahlweise 1 ml β -Glucosidase-Lösung (4.15) werden zu 12,5 ml der extrahierten Probenlösung gegeben und gemischt. Die Lösung wird mindestens 12 h oder über Nacht bei 37 °C unter dauerndem Rühren inkubiert. Dieser Schritt wird mit der doppelten Menge an Saure Phosphatase-Lösung wiederholt.

Die Massenkonzentration der Vitamine werden nach 6.6 bestimmt. Die Enzymaktivität ist ausreichend, wenn die entsprechenden Massenkonzentrationen der Vitamin B₆-Verbindungen in beiden Probenlösungen gleich sind. Das Chromatogramm darf keinen Peak aufweisen, der von Pyridoxaminphosphat herrührt.

ANMERKUNG Im Ringversuch wurde die Saure Phosphatase von Sigma Nr P 3752²⁾ verwendet.

4.14 β -Glucosidase, von Mandeln, enzymatische Aktivität etwa 3,2 U/mg.

Es ist wichtig, dass das verwendete Enzym der Aktivitätsprüfung 4.15.2 entspricht. Weitere Informationen siehe [2], [7].

4.15 β -Glucosidase Lösung

4.15.1 Allgemeines

100 mg β -Glucosidase (4.14) werden in einem Becherglas in 10 ml Wasser durch 2-minütiges Rühren gelöst/solubilisiert. Diese Lösung wird an jedem Analysentag hergestellt.

1) U, Diese Einheit (oft auch Internationale Einheit (International Unit IU) oder Standardeinheit) ist definiert als die Menge an Enzym, die 1 μmol Substrat je Minute unter standardisierten Bedingungen umsetzt.

2) Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.

4.15.2 Aktivitätsprüfung der β -Glucosidase

10 g Schweinefleisch, 5 g Kartoffelpüree oder 5 g Vollkornmehl werden in ein Becherglas eingewogen und wie in 6.2.1 beschrieben, sauer extrahiert. 1 ml Saure Phosphatase-Lösung (4.13.1) und 1 ml β -Glucosidase-Lösung (4.15) werden zu 12,5 ml der extrahierten Probenlösung gegeben und gemischt. Die Lösung wird mindestens 12 h oder über Nacht bei 37 °C unter dauerndem Rühren inkubiert. Dieser Schritt wird mit der doppelten Menge an β -Glucosidase-Lösung wiederholt.

Die Massenkonzentration der Vitamin B₆-Verbindungen wird nach 6.6 bestimmt. Die Enzymaktivität ist ausreichend, wenn die entsprechenden Massenkonzentrationen der Vitamin B₆-Verbindungen in beiden Probenlösungen gleich sind. Das Chromatogramm darf keinen Peak aufweisen, der von Pyridoxaminphosphat herrührt.

ANMERKUNG Im Ringversuch wurde die β -Glucosidase von Sigma Nr G-0395³⁾ verwendet.

4.16 Mobile Phase für die HPLC, (Schwefelsäure, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,015 \text{ mol/l}$ enthaltend $0,005 \text{ mol/l}$ TCA)

817 mg $\pm$ 5 mg Trichloressigsäure (4.4) werden in 15 ml 1 mol/l Schwefelsäure (4.10) gelöst, in einen 1 000-ml-Messkolben überführt, die Lösung wird bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt, gemischt und entgast.

4.17 Silikonöl,

zum Entschäumen

4.18 Standardsubstanzen

4.18.1 Allgemeines

Pyridoxamin (PM), Pyridoxal (PL) und Pyridoxin (PN) können von verschiedenen Lieferanten bezogen werden. Die Reinheit der Standardsubstanzen kann variieren, und daher ist es erforderlich, die Konzentration und Reinheit zu bestimmen (siehe 4.19.4 und 4.20.7).

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

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

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

4.19 Stammlösungen

4.19.1 Pyridoxamin (PM) Stammlösung, Massenkonzentration $\rho(\text{PM})$ etwa 500 $\mu\text{g/ml}$

71,7 mg Pyridoxamindihydrochlorid (4.18.2) werden in einem 100-ml-Messkolben in 0,1 mol/l HCl (4.8) gelöst, und der Messkolben wird mit 0,1 mol/l HCl bis zur Marke aufgefüllt. Die Lösung kann ohne Verluste bis zu einer Woche bei 4 °C oder bis zu zwei Monaten bei –18 °C aufbewahrt werden.

4.19.2 Pyridoxal (PL) Stammlösung, $\rho(\text{PL})$ etwa 500 $\mu\text{g/ml}$

60,9 mg Pyridoxalhydrochlorid (4.18.3) werden in einem 100-ml-Messkolben in 0,1 mol/l HCl (4.8) gelöst, und der Messkolben wird mit 0,1 mol/l HCl bis zur Marke aufgefüllt. Die Lösung kann ohne Verluste bis zu einer Woche bei 4 °C oder bis zu zwei Monaten bei –18 °C aufbewahrt werden.

3) Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen