Утверждена
Зам. Начальника Главного
санитарно-эпидемиологического
управления Минздрава СССР
Заиченко А.И.

« 10 » июля 1987 г.

№ 4401-87

ИНСТРУКЦИЯ

ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ НИАЦИНА (ВИТАМИНА РР) В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

РАЗРАБОТАНА в Институте питания АМН СССР лабораторией витаминизации пищевых продуктов

gost.e-ecolog.ru

Для количественного определения ниацина используют химический, роданбромидный метод и микробиологический с тест-организмом *Lactobacillus arabinosus* АТСС 8014.Микробиологический метод прост в исполнении, специфичен и позволяет определять ниацин во всех продуктах без исключения. Вместе с тем микробиологический метод более длительный, требует соблюдения условий, необходимых для проведения микробиологических исследований и специальной подготовки исполнителя.

Химический метод успешно применяется при анализе обогащенных витамином РР пищевых продуктов, а также мясных, рыбных, молочных и зерновых продуктов. В связи с более низкой чувствительностью химического метода он не пригоден для исследования объектов с низким содержанием ниацина и продуктов с высоким содержанием сахаров. Химический метод прошел широкую апробацию в различных лабораториях научных и практических учреждений, принимавших участие в работе по подготовке «Таблиц химического состава пищевых продуктов», одобрен Минздравом СССР и рекомендован для использования Междуведомственной комиссией по составлению справочных таблиц.

Принцип метода.

В основе химического метода определения ниацина лежит реакция взаимодействия пиридинового кольца никотиновой кислоты с бромистым роданом и затем с ароматическими аминами с образованием окрашенного производного. Интенсивность окраски образующегося соединения прямо пропорциональная количеству ниацина, измеряется колориметрически.

Оборудование Весы лабораторные общего назначения 2 класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г и поверочной ценой деления не более 0.5 мг; весы лабораторные общего назначения 3 класса точности с наиборльшим пределом взвешивания 500 г и поверочной ценой деления не более 50 мг; колориметр фотоэлектрический по ГОСТ 12083-78; насос водоструйный КН 123-0 или насос школьный, автоклав, термометр химический до100^{0}С, водяная баня.

Посуда. Бюретка на 50 см^3, колбы мерные вместимостью 50, 100 и 500 см^3; цилиндры мерные вместимостью 50 см^3; пробирки с притертыми пробками вместимостью 15 или 20 см^3; воронки фитровальные диаметром 5 и 10 см; пипетки градуированные на 1, 2, 5 и 10 см^3; воронки Бюхнера диаметром 10—12 см; колба Бунзена вместимостью 1000см^3; стаканы химические т.с.-В-2-1000; колбы конические вместимостью 50 см^3; палочки стеклянные.

Реактивы

1. Кислота серная х.ч.
2. Кислота соляная х.ч.
3. Натрия гидроокись х.ч.
4. Кальция гидроокись ч.д.а
5. Кальция карбонат х.ч.
6. Калий роданистый или аммоний роданистый х.ч.
7. Бром х.ч.
8. Уголь активированный
9. Цинка сульфат х.ч.
10. Метол техн.
11. Фенолфталеин ч.д.а
12. Спирт этиловый ректификат
13. Кислота никотиновая Госфармакопея СССР, ст.19

Приготовление реактивов

1. Стандартные растворы никотиновой кислоты. Растворяют 0.0500 мг никотиновой кислоты в 300 $см^3$ дистиллированной воды в мерной колбе вместимостью 500 $см^3$, добавляют 5 $см^3$ 5 н раствора серной кислоты, доводят объем водой до метки и перемешивают (раствор с массовой концентрацией никотиновой кислоты 100 $мкг/см^3$). Добавляют 0.5 $см^3$ толуола и сохраняют в темном месте на холоде не более 3-х месяцев. В день определения 2 $см^3$ этого раствора, предварительно нагретого до комнатной температуры, помещают в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$, доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают (раствор с массовой концентрацией никотиновой кислоты 2 $мкг/см^2$).

2. Бромная вода. Для лучшего насыщения воды бромом ее готовят за несколько дней до использования. В темную склянку с притертой пробкой наливают 100 $см^3$ дистиллированой воды. добавляют под тягой 5-6 $см^3$ брома, встряхивают и оставляют на 3-5 дней в защищенном от света месте.

3. Раствор калия роданистого или аммония роданистого 10%.

4. Растворы серной кислоты 0,1 н, 2 н, 5 н и 10 н.

5. Растворы соляной кислоты 0,5 н и 5 н.

6. Раствор гидроокиси натрия 4 н.

7. Раствор сульфата цинка 80%.

8. Раствор фенолфталеина спиртовой 1%; 1 г фенолфталеина помещают в колбу вместимостью 100 $см^3$, добавляют 74 $см^3$ 95% этилового спирта и дистиллированной воды до метки.

9. Роданбромидный раствор (готовится перед употреблениеми). К хорошо охлажденной на льду бромной воде (взятой в количестве требуемом для анализа), под тягой прибавляют по каплям раствор роданистого калия или аммония до полного обесцвечивания бромной воды. К обесцвеченному раствору добавляют постепенно, небольшими порциями кальция карбонат до прекращения выделения пузырьков газа и образования осадка. Раствор фильтруют (под тягой) в склянку темного стекла с притертой пробкой и до использования оставляют во льду.

10. Раствор метола 8%. (готовится перед употреблением). Растворяют 8 г перекристаллизованного метола в 92 $см^3$ 0,5 н раствора соляной кислоты.

Перекристаллизация метола.

Нагревают 500 $см^3$ 0,1 н раствора серной кислоты до кипения. К кипящему раствору добавляют 100 г метола и продолжают нагревать до начала кипения. Если раствор сильно окрашен, то добавляют к нему 10 г активированного угля. Затем немедленно раствор фильтруют через воронку Бюхнера, предварительно нагретую кипящей водой. Фильтрат переносят в большой химический стакан, добавляют 700 $см^3$ 96% этилового спирта. размешивают и помещают в ледяную баню. Оставляют в ледяной бане в темноте на несколько часов. Затем фильтруют через воронку Бюхнера; кристаллы на фильтре промывают небольшими (по 30-40 см) количествами спирта и высушивают на воздухе в темноте. Перекристаллизованный метол сохраняют в склянке из темного стекла с притертой пробкой в защищенном от света месте.

Ход определения

Интервал определяемых концентраций ниацина составляет 1-5 $мкг/см^3$. Величину навески продукта рассчитывают исходя из интервала указанных концентраций ниацина с учетом последующего разведения.

В зависимости от свойств исследуемого продукта для освобождения связанных форм ниацина используют различные виды гидролиза. При определении ниацина в мясе и ку-

линарных изделиях из мяса, рыбы и рыбных изделиях, в блюдах из творога применяют гидролиз с 2 н раствором серной кислоты.

При анализе хлебобулочных, крупяных и макаронных изделий, молока, молочных и творожных изделий, овощей, ягод и фруктов более предпочтительным является гидролиз с $Ca(OH)_2$. Гидроокись кальция образует с сахарами и крахмалом соединения, малорастворимые в охлажденных растворах. В результате гидролизат, полученный при обработке $Ca(OH)_2$ содержит меньше веществ, мешающих химическому определению.

Гидролиз с 2 н раствором серной кислоты

Навеску мелкоизмельченной средней пробы продукта, содержащую приблизительно 80-100 мкг ниацина (3-10 г), растирают в ступке с небольшим количеством 2 н раствора серной кислоты и переносят в коническую колбу емкостью 250 $см^3$, смывая ступку раствором кислоты. Кислоту отмеряют цилиндром емкостью 50 $см^3$. Содержимое перемешивают и колбу помещают в кипящую водяную баню на 90 мин., время от времени перемешивая содержимое или автоклавируют при 1 атм. 30 мин. По окончании гидролиза колбу охлаждают до комнатной температуры, доводят объем дистиллированной водой до 50 $см^3$, тщательно перемешивают и фильтруют через складчатый фильтр (первые 3-5 $см^3$ фильтрата отбрасывают. Помещают 25-30 $см^3$ фильтрата в цилиндр емкостью 50 $см^3$, добавляют 1-2 капли фенолфталеина и нейтрализуют 10 н раствором гидроокиси натрия до слабо-розового окрашивания, охлаждают.

Гидролиз с гидроокисью кальция

Навеску мелкоизмельченного исследуемого материала растирают в ступке с 1,5г $Ca(OH)_2$. Затем количественно переносят содержимое ступки в коническую колбу емкостью 250 $см^3$, смывая ступку и воронку дистиллированной водой (50-60 $см^3$). Содержимое колбы тщательно перемешивают и колбу помещают на кипящую водяную баню на 90 мин или автоклавируют 30 мин. при 1 атм. По окончании гидролиза колбы охлаждают, содержимое переносят в мерный цилиндр и доводят объем до 75 $см^3$ дистиллированной водой, перемешивают, помещают на 2 часа в ледяную баню или оставляют на ночь в холодильнике. Охлажденные гидролизаты фильтруют или центрифугируют 25-30 $см^3$ фильтрата помещают в цилиндр емкостью 50 $см^3$, добавляют 1-2 капли фенолфталеина и по каплям 5н раствора серной кислоты до обесцвечивания.

Очистка фильтратов

В цилиндр с нейтрализованным фильтратом вносят 2 $см^3$ раствор сернокислого цинка и добавляют по каплям 4 н раствора гидроокиси натрия до слабо-розового окрашивания. Содержимое цилиндра тщательно перемешивают стеклянной палочкой, розовое окрашивание удаляют 1-2 каплями 5 н серной кислоты. Оставляют стоять 10 мин., затем добавляют 1-2 капли изобутилового или этилового спирта (для устранения пены) и доводят объем водой до 40-50 $см^3$, перемешивают фильтруют через складчатый фильтр или центрифугируют при 2000 об/мин. Если необходимо, на этом этапе анализ можно прервать на 3-5 дней. Сохраняя фильтраты в холодильнике.

Цветная реакция

Для проведения цветной реакции используют 8 пробирок или стаканчиков с притертыми пробками. В 3 пробирки помещают по 5 $см^3$ рабочего стандартного раствора никотиновой кислоты. В 4 пробирки наливают по 5 $см^3$ полученного фильтрата. В одну пробирку – 5 $см^3$ дистиллированной воды (контроль на реактивы). Все пробирки помещают в водяную баню при $50^0 \pm 2^0$ на 5 мин. Затем в пробирки со стандартным раствором в пробирку с водой и в 2 пробирки с испытуемым фильтратом (условно обозначенные «опыт») из бюретки под тягой добавляют до 2 $см^3$ родан-бромидного раствора и пере-

мешивают содержимое встряхиванием. Оставляют пробирки в водяной бане при 50^0С на 10 мин.

В две другие пробирки с исследуемым раствором добавляют по 2 $см^3$ дистиллированной воды (контроль на присутствие окрашенных и способных реагировать с метолом веществ). Через 10 мин. все пробирки охлаждают водой до комнатной температуры, оставляют на 10 мин. в темном месте и затем в каждую из них добавляют по 3 $см^3$ раствора метола, перемешивают встряхиванием и оставляют на 1 час, в темном месте. После этого измеряют оптическую плотность растворов на фотоэлектроколориметре со светофильтром, имеющим максимум светопропускания в области 400-425 нм. Если растворы слегка мутные, их фильтруют через плотный бумажный фильтр в кювету флюориметра.

Содержание ниацина в мг на 100 г продукта вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(A - A1) * c * V * V2}{(B - B1) * a * V1 * V3 * 10},$$ где:

величина оптической плотности: А – испытуемого раствора; A_1 – контроля на окрашенные и аминореагирующие вещества; В – стандартного раствора; B_1 – контроля на реактивы; V – объем гидролизата ($см^3$); V_1 – количество гидролизата, взятого на очистку сернокислым цинком; V_2 – объем раствора после очистки сернокислым цинком ($см^3$); V_3 - объем раствора для проведения цветной реакции; с – содержание никотиновой кислоты в 5 $см^3$ стандартного раствора (мкг); а – навеска (г).

Вычисление проводят до второго знака после запятой. Расхождение между двумя параллельными определениями не должно превышать 10% от среднего арифметического значения.

gost.e-ecolog.ru