

Утверждена
Зам. Начальника Главного
санитарно-эпидемиологического
управления Минздрава СССР
Зайченко 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

Для количественного определения ниацина используют химический, роданбромидный метод и микробиологический с тест-организмом *Lactobacillus arabinosus* ATCC 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 Междугосударственной 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 наибольшим 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 до 100⁰С, водяная баня.

Посуда Бюретка на 50 см³, колбы мерные вместимостью 50, 100 и 500 см³; цилиндры мерные вместимостью 50 см³; пробирки с притертыми пробками вместимостью 15 или 20 см³; воронки фильтровальные диаметром 5 и 10 см; пипетки градуированные на 1, 2, 5 и 10 см³; воронки Бюхнера диаметром 10—12 см; колба Бунзена вместимостью 1000 см³; стаканы химические т.с.-В-2-1000; колбы конические вместимостью 50 см³; 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 см³ дистиллированной воды в мерной колбе вместимостью 500 см³, добавляют 5 см³ 5 н раствора серной кислоты, доводят объем водой до метки и перемешивают (раствор с массовой концентрацией никотиновой кислоты 100 мкг/см³). Добавляют 0,5 см³ толуола и сохраняют в темном месте на холоде не более 3-х месяцев. В день определения 2 см³ этого раствора, предварительно нагретого до комнатной температуры, помещают в мерную колбу вместимостью 100 см³, доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают (раствор с массовой концентрацией никотиновой кислоты 2 мкг/см³).

2. Бромная вода. Для лучшего насыщения воды бромом ее готовят за несколько дней до использования. В темную склянку с притертой пробкой наливают 100 см³ дистиллированной воды, добавляют под тягой 5-6 см³ 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 см³, добавляют 74 см³ 95% этилового спирта и дистиллированной воды до метки.

9. Роданбромидный раствор (готовится перед употреблением). 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 см³ 0,5 н раствора соляной кислоты.

Перекристаллизация метола.

Нагревают 500 см³ 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 см³ 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/см³. 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 $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Гидроокись кальция образует с сахарами и крахмалом соединения, малорастворимые в охлажденных растворах. В результате гидролизат, полученный при обработке $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 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 см³, смывая ступку раствором кислоты. Кислоту отмеряют цилиндром емкостью 50 см³. 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 см³, тщательно перемешивают и фильтруют через складчатый фильтр (первые 3-5 см³ фильтрата отбрасывают). Помещают 25-30 см³ фильтрата в цилиндр емкостью 50 см³, 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 $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Затем количественно переносят содержимое ступки в коническую колбу емкостью 250 см³, смывая ступку и воронку дистиллированной водой (50-60 см³). 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 см³ дистиллированной водой, перемешивают, помещают на 2 часа в ледяную баню или оставляют на ночь в холодильнике. Охлажденные гидролизаты фильтруют или центрифугируют 25-30 см³ фильтрата помещают в цилиндр емкостью 50 см³, добавляют 1-2 капли фенолфталеина и по каплям 5н раствора серной кислоты до обесцвечивания.

Очистка фильтратов

В цилиндр с нейтрализованным фильтратом вносят 2 см³ 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 см³, 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 см³ рабочего стандартного раствора никотиновой кислоты. В 4 пробирки наливают по 5 см³ полученного фильтрата. В одну пробирку – 5 см³ 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 см³ родан-бромидного раствора и пере-

мешивают содержимое встряхиванием. Оставляют пробирки в водяной бане при 50⁰С на 10 мин.

В две другие пробирки с исследуемым раствором добавляют по 2 см³ 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 см³ 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:

$$X = \frac{(A - A_1) * c * V * V_2}{(B - B_1) * a * V_1 * V_3 * 10}, \quad \text{где:}$$

величина оптической плотности: А – испытуемого раствора; А₁ – контроля на окрашенные и аминореагирующие вещества; В – стандартного раствора; В₁ – контроля на реактивы; V – объем гидролизата (см³); V₁ – количество гидролизата, взятого на очистку серноокислым цинком; V₂ – объем раствора после очистки серноокислым цинком (см³); V₃ – объем раствора для проведения цветной реакции; с – содержание никотиновой кислоты в 5 см³ 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.