

ZJEDNOCZENIE PRZEMYSŁU KONCENTRATÓW SPOŻYWCZYCH	N O R M A B R A N Ż O W A	BN-81
	Koncentraty spożywcze Oznaczanie witaminy B₁ i B₂	8130-05
		Grupa katalogowa 1299

1. WSTĘP

1.1. Przedmiot normy. Przedmiotem normy jest oznaczanie zawartości witaminy B₁ (tiaminy) i B₂ (ryboflawiny) w koncentratkach spożywczych.

1.2. Zakres stosowania normy. Normę należy stosować w zakresie oznaczania zawartości witaminy B₁ i B₂ pochodzenia naturalnego i syntetycznego w odżywkach dla dzieci, w koncentratkach napojów, w żywności o specjalnym przeznaczeniu (dla sportowców, diabetyków itp.).

2. METODA OZNACZANIA WITAMINY B₁

2.1. Metoda oznaczania witaminy B₁ pochodzenia naturalnego w żywności o specjalnym przeznaczeniu i odżywkach dla dzieci

2.1.1. Zasada metody polega na uwolnieniu witaminy B₁ przez ekstrakcję i hydrolizę enzymatyczną, utlenieniu wolnej witaminy do triochemu i pomiarze fluorescencji.

2.1.2. Aparatura, przyrządy i materiały

- Absorpcjometr „Specol” firmy Zeissa z przystawką fluorometryczną FK i kuwetami o grubości warstwy 1 cm.
- Lampa rtęciowa HQE-40.
- Wzmacniacz ZV.
- Filtr niebieski 3G-26 lub filtr niebieskozielony (maksimum fluorescencji triochemu 450 nm).
- Wzorzec szklany WG-9.
- Kolumna szklana o średnicy 10 mm.
- Wymiennik jonowy Amberlit IRC-50 o wielkości cząstek 20 ÷ 50 mesh.
- Łaźnia wodna z termoregulacją lub autoklaw.
- Młynek elektryczny lub młynek ręczny.
- Wirówka laboratoryjna.
- Cieplarka laboratoryjna.
- Probówki lub cylindry pojemności 50 cm³ z doszlifowanymi korkami.
- Kolby pojemności 50 cm³ z doszlifowanymi korkami.
- Sączone bezpopiołowe o średnicy 60 mm.

2.1.3. Odczynniki i roztwory

- Kwas solny, cz.d.a., roztwór 0,5 i 3N.
- Kwas siarkowy, cz.d.a., roztwór 0,1N.
- Octan sodowy, cz.d.a., roztwór 2,5M.
- Izobutanol lub butanol, cz.d.a., (redestylowany).
- Wodorotlenek sodowy, cz.d.a., roztwór 15-procentowy.
- Żelazianek potasowy, cz.d.a., roztwór 1-procentowy.
- Chlorek sodowy, cz.d.a., roztwór 10-procentowy.
- Chlorek potasowy, cz.d.a., roztwór 25-procentowy.
- Alkohol etylowy, cz.d.a., roztwór 96-procentowy.
- Siarczan chininy, cz.d.a.
- Chlorowodorek tiaminy, cz.d.a.
- Alkaliczny roztwór żelazianku potasowego (odczynnik utleniający): 4 cm³ 1-procentowego roztworu żelazianku potasowego uzupełnić w kolbie pomiarowej pojemności 100 cm³ 15-procentowym roztworem wodorotlenku sodowego. Odczynnik przygotować bezpośrednio przed użyciem i chronić od światła.
- Kwaśny roztwór chlorku potasowego 8,5 cm³ kwasu solnego (1,19) uzupełnić w kolbie pojemności 1000 cm³ 25-procentowym roztworem chlorku potasowego.
- Toluen, cz.d.a.
- Enzym fosfataza Claraze 300 (Taka-diastraza), roztwór 6-procentowy w 2,5M octanie sodowym.
- Pięciotlenek fosforu, cz.d.a.
- Azotan srebra, roztwór 1-procentowy.

Roztwory siarczanu chininy

- Roztwór podstawowy siarczanu chininy o stężeniu 100 µg w 1 cm³.
Na wadze analitycznej odważyć 10 mg siarczanu chininy z dokładnością do 0,001 g, przenieść ilościowo do kolby pomiarowej pojemności 100 cm³ 0,1N roztworu kwasu siarkowego, wymieszać i uzupełnić do kreski. Roztwór przechowywać w temperaturze 4°C i chronić od światła.
- Roztwór roboczy siarczanu chininy o stężeniu 1 µg w 1 cm³.

Zgłoszona przez Zjednoczenie Przemysłu Koncentratów Spożywczych
Ustanowiona przez Naczelnego Dyrektora Zjednoczenia Przemysłu Koncentratów Spożywczych dnia 20 lutego 1981 r.
jako norma obowiązująca od dnia 1 stycznia 1982 r.
(Dz. Norm. i Miar nr 7/1981 poz. 36)

1 cm³ roztworu podstawowego siarczanu chininy przenieść do kolby pomiarowej pojemności 100 cm³ i uzupełnić do kreski 0,1N roztworem kwasu siarkowego.

Roztwór należy stosować do sprawdzania absorpcjometru „Specol”.

Roztwory wzorcowe chlorowodorku tiaminy

a) Roztwór podstawowy chlorowodorku tiaminy o stężeniu 100 µg w 1 cm³.

Na wadze analitycznej odważyć 50 mg chlorowodorku tiaminy z dokładnością do 0,001 g uprzednio wysuszonego do stałej masy nad pięciotlenkiem fosforu, przenieść ilościowo do kolby pomiarowej pojemności 500 cm³ 0,1N roztworu kwasu siarkowego, wymieszać i uzupełnić do kreski. Roztwór przechowywany w ciemnej butelce w temperaturze 4°C wykazuje trwałość w ciągu 3 miesięcy.

b) Roztwór roboczy chlorowodorku tiaminy o stężeniu 1 µg w 1 cm³.

1 cm³ roztworu podstawowego chlorowodorku tiaminy przenieść do kolby pomiarowej pojemności 100 cm³ i uzupełnić do kreski 0,1N roztworem kwasu siarkowego uprzednio doprowadzonym do pH 6,0 za pomocą 2,5M roztworu octanu sodowego.

c) Roztwór roboczy chlorowodorku tiaminy o stężeniu 0,2 µg w 1 cm³.

5 cm³ roztworu wg poz. b) przenieść do kolby pomiarowej pojemności 25 cm³ i uzupełnić do kreski 0,1N roztworem kwasu siarkowego uprzednio doprowadzonym do pH 6,0.

Roztwór należy przygotować w dniu wykonywania oznaczania.

2.1.4. Przygotowanie kolumny. Wymiennik jonowy Amberlit IRC-50 zalać wodą destylowaną i pozostawić na co najmniej 24 h w celu spęcznienia. Następnie kolumnę szklaną o średnicy około 10 mm napełnić wymiennikiem jonowym na wysokość 5 cm. Kolumnę przemywać kolejno 3N roztworem kwasu solnego (przez 15 min) i wodą destylowaną do zaniku reakcji kwaśnej, a następnie 10-procentowym roztworem chlorku sodowego i wodą destylowaną do zaniku reakcji na chlorki (próba z azotanem srebra). Kolumnę przemywać z szybkością przepływu 1 ÷ 2 cm³/min. Wymiennik jonowy w kolumnie musi być stale przykryty warstwą wody w celu wyeliminowania dostępu powietrza.

Kolumnę należy regenerować po przeprowadzeniu kilkunastu rozdziałów, małymi porcjami 0,5N roztworu kwasu solnego lub 25-procentowym kwaśnym roztworem chlorku potasowego.

2.1.5. Sprawdzanie absorpcjometru „Specol”. Absorpcjometr „Specol” uruchomić zgodnie z instrukcją obsługi aparatu i sprawdzić za pomocą roztworu roboczego siarczanu chininy przygotowanego wg 2.1.3 lub wzorca szklanego WG-9. W tym celu ustawić regulator wzmocnienia (ZV) na 500, kuwetę z roztworem siarczanu chininy lub wzorcem szklanym umieścić w komorze kuwetowej i śrubę mikrometryczną ustawić w położeniu około 365 nm, a następnie ustalić maksymalne wychylenie wskazówki na 100 lub inne wybrane miejsce. Przed każdym pomiarem należy skorygować

położenie 0 i maksymalne wychylenie wskazówki przyrządu dla roztworu wzorcowego.

2.1.6. Wykonanie oznaczania

2.1.6.1. Przygotowanie próbki do badań. W zależności od przewidywanej zawartości tiaminy w badanym produkcie próbka do oznaczeń powinna zawierać 10 ÷ 25 µg tiaminy.

Ze średniej próbki laboratoryjnej uprzednio rozdrobnionej odważyć w kolbie stożkowej pojemności 200 cm³ 2 ÷ 10 g produktu z dokładnością do 0,001 g, dodać około 75 cm³ 0,1N roztworu kwasu siarkowego i wymieszać. Kolbę umieścić na wrzącej łaźni wodnej lub w autoklawie o temperaturze 120 ÷ 123°C i przeprowadzić hydrolizę przez 45 min. Następnie kolbę ochłodzić do temperatury 50°C i dodać 5 cm³ świeżo przygotowanego enzymu (pH próby powinno wynosić 4,2 ÷ 4,5) i inkubować w cieplarni w temperaturze 37°C przez 12 h lub w temperaturze 45°C przez 2 h. W przypadku stosowania temperatury 37°C należy dodać do próbki kilka kropli toluenu. Następnie próbkę ochłodzić, zakwasić do pH 1 i ogrzewać na wrzącej łaźni wodnej przez 5 min. Zawartość kolby ponownie ochłodzić, dodać 5 cm³ 2,5M roztworu octanu sodowego w celu doprowadzenia próbki do pH w zakresie 5,5 ÷ 6,0 i przenieść ilościowo do kolby pomiarowej pojemności 100 cm³, wymieszać i dopełnić do kreski wodą destylowaną. Następnie próbkę odwirować przez 15 min przy 5000 obr./min, roztwór przesączyć przez sączek bezpopiołowy, odrzucając pierwsze krople.

Przy oznaczaniu wolnej tiaminy nie należy stosować inkubacji enzymatycznej. Próbkę po hydrolizie kwasowej ochłodzić i doprowadzić do pH 5,5 ÷ 6,0 za pomocą 2,5M roztworu octanu sodowego, przenieść ilościowo do kolby pomiarowej pojemności 100 cm³, wymieszać, dopełnić do kreski wodą destylowaną i ochłodzić. Otrzymany ekstrakt stanowi próbkę wyjściową do dalszych badań. Oznaczanie tiaminy wykonywać w pomieszczeniu zaciemnionym.

2.1.6.2. Wyodrębnianie tiaminy (oczyszczanie ekstraktu). Odmierzyć pipetą 25 cm³ ekstraktu i przeprowadzić przez kolumnę z szybkością 1 ÷ 2 cm³/min. Wyciek z kolumny odrzucić. Następnie kolumnę przemyć 3 kolejnymi porcjami gorącej wody destylowanej w ilości 15 cm³. Tiaminę eluować z kolumny porcjami zakwaszonego roztworu chlorku potasowego (10, 10 i 5 cm³). Eluat zbierać do kolby pomiarowej pojemności 25 cm³, dopełnić do kreski i wymieszać.

W taki sam sposób przeprowadzić oczyszczanie roztworu roboczego chlorowodorku tiaminy przygotowanego wg 2.1.3, pobierając 25 cm³ roztworu.

2.1.6.3. Utlenianie tiaminy i ekstrakcja tiochromu. Do 2 probówek lub cylindrów pojemności 50 cm³ pobrać po 5 cm³ eluatu i 5 cm³ oczyszczonego roztworu roboczego chlorowodorku tiaminy, dodać po 3 cm³ alkalicznego roztworu żelazicjanku potasowego i po 10 cm³ izobutanolu, wytrząsać przez 2 min i następnie pozostawić w celu rozdzielania warstw. Z górnej warstwy izobutanolu pobrać pipetą 5 cm³ klarownego roztworu, przenieść do suchych kolb pojemności 50 cm³, dodać 0,5 cm³ alkoholu etylowego i wymieszać.

Równolegle przygotować próbę zerową. Do 2 próbek lub cylindrów pobrać po 5 cm³ eluatu i 5 cm³ oczyszczonego roztworu chlorowodoru tiaminy, dodać po 3 cm³ 15-procentowego roztworu wodorotlenku sodowego i 10 cm³ izobutanolu, dalej postępować jak w próbkach badanych.

2.1.6.4. Pomiar fluorescencji wykonać na absorpcjometrze „Specol” sprawdzonym wg 2.1.5, przy długości fali 365 nm. Kolejno przeprowadzić pomiar fluorescencji prób nieutlenionych (zerowych), a następnie utlenionych.

2.1.6.5. Obliczanie wyniku oznaczania. Zawartość tiaminy (x_1) wyrażoną w miligramach na 100 g produktu obliczyć wg wzoru

$$x_1 = \frac{(a - b) \cdot c \cdot 2}{(a_1 - b_1) \cdot g} \quad (1)$$

w którym:

- a — odczyt fluorescencji badanej próbki utlenionej,
- b — odczyt fluorescencji badanej próbki nieutlenionej (zerowej),
- a_1 — odczyt fluorescencji utlenionego roztworu roboczego tiaminy,
- b_1 — odczyt fluorescencji nieutlenionego roztworu roboczego tiaminy (zerowy),
- c — ilość tiaminy w roboczym roztworze standardowym, µg,
- g — masa produktu, g.

2.1.6.6. Wynik końcowy oznaczania. Za wynik przyjąć średnią arytmetyczną wyników co najmniej dwóch równoległych oznaczeń.

2.2. Metoda oznaczania witaminy B₁ pochodzenia syntetycznego w koncentratkach napojów

2.2.1. Zasada metody polega na utlenieniu witaminy B₁ do tiochromu i pomiarze fluorescencji.

2.2.2. Aparatura, przyrządy i materiały

a) Absorpcjometr „Specol” firmy Zeissa z przystawką fluorometryczną FK z kuwetami o grubości warstwy 1 cm.

b) Lampa rtęciowa HQE-40.

c) Wzmacniacz ZV.

d) Filtr wtórny niebieski 3G-26 lub filtr niebiesko-zielony (maksimum fluorescencji tiochromu przy 450 nm).

e) Wzorzec szklany WG-9.

f) Młyn elektryczny lub młyn ręczny.

g) Wirówka laboratoryjna.

h) Probówki lub cylindry pojemności 50 cm³ z doszlifowanymi korkami.

i) Kolby pojemności 50 cm³ z doszlifowanymi korkami.

j) Sączki bezpopiołowe o średnicy 60 mm.

2.2.3. Odczynniki i roztwory

a) Kwas siarkowy, cz.d.a., roztwór 0,1N.

b) Żelazicjanek potasowy, cz.d.a., roztwór 10-procentowy.

c) Wodorotlenek potasowy, roztwór 30-procentowy.

d) Alkaliczny roztwór żelazicjanu potasowego

(odczynnik utleniający) (5 cm³ 10-procentowego roztworu żelazicjanu potasowego uzupełnić w kolbie pojemności 50 cm³ 30-procentowym wodorotlenkiem potasowym).

e) Izobutanol, cz.d.a.

f) Chlorowodorek tiaminy lub monoazotan tiaminy, cz.d.a.

g) Pięciotlenek fosforu, cz.d.a.

h) Alkohol etylowy.

i) Siarczan chininy, cz.d.a.

Roztwory siarczanu chininy

a) Roztwór podstawowy siarczanu chininy o stężeniu 1 µg w 1 cm³.

Na wadze analitycznej odważyć 100 mg siarczanu chininy z dokładnością do 0,001 g, przenieść ilościowo do kolby pomiarowej pojemności 100 cm³ 0,1N roztworu kwasu siarkowego, wymieszać i uzupełnić do kreski. Roztwór przechowywać w temperaturze 4°C i chronić od światła.

b) Roztwór roboczy siarczanu chininy o stężeniu 3 µg w 1 cm³.

3 cm³ roztworu podstawowego siarczanu chininy przenieść do kolby pomiarowej pojemności 1000 cm³ i uzupełnić do kreski 0,1N roztworem kwasu siarkowego. Roztwór należy stosować do sprawdzania absorpcjometru „Specol”.

Roztwory wzorcowe chlorowodoru tiaminy

a) Roztwór podstawowy chlorowodoru tiaminy o stężeniu 0,5 mg w 1 cm³.

Na wadze analitycznej odważyć 50 mg chlorowodoru tiaminy z dokładnością do 0,001 g uprzednio wysuszonego do stałej masy nad pięciotlenkiem fosforu, przenieść ilościowo do kolby pomiarowej pojemności 100 cm³ 0,1N roztworu kwasu siarkowego, wymieszać i uzupełnić do kreski. Roztwór przechowywany w ciemnej butelce w temperaturze 4°C wykazuje trwałość w ciągu kilku miesięcy.

b) Roztwór roboczy chlorowodoru tiaminy o stężeniu 2 µg w 1 cm³.

1 cm³ roztworu podstawowego chlorowodoru tiaminy przenieść do kolby pomiarowej pojemności 250 cm³, uzupełnić do kreski 0,1N roztworem kwasu siarkowego i wymieszać.

Roztwór należy przygotować w dniu wykonywania oznaczania.

2.2.4. Sprawdzenie absorpcjometru „Specol” wykonać wg 2.1.5.

2.2.5. Wykonanie oznaczania

2.2.5.1. Przygotowanie próbki do badań. W zależności od przewidywanej zawartości tiaminy w badanym produkcie, próbka do oznaczeń powinna zawierać 100 ÷ 200 µg. Ze średniej próbki laboratoryjnej uprzednio rozdrobionej odważyć w zlewce 2 ÷ 5 g produktu z dokładnością do 0,001 g, przenieść ilościowo do kolby pomiarowej pojemności 100 cm³ za pomocą 0,1N roztworu kwasu siarkowego, uzupełnić do kreski, energicznie wytrząsać przez 20 min i odwirować przez 10 min przy 5000 obr./min. Roztwór przesączyć do suchej kolby przez sączek bezpopiołowy, odrzucając pierwsze krople.

Oznaczanie tiaminy wykonywać w pomieszczeniu zaciemnionym.

2.2.5.2. Utlenianie tiaminy i ekstrakcja tiochromu. Do probówek lub cylindrów pojemności 50 cm³ pobrać kolejno 1,5, 3, 4,5 cm³ klarownego roztworu. Równolegle pobrać 1,5, 3 i 4,5 cm³ roztworu roboczego tiaminy przygotowanego wg 2.2.3. Probówki uzupełnić 0,1N roztworem kwasu siarkowego do objętości 10 cm³, dodać po 8 cm³ alkalicznego roztworu żelazicjanku potasowego i po 10 cm³ izobutanolu. Silnie wytrząsać przez 2 min i pozostawić do rozdzielania się warstw. Z górnej warstwy izobutanolu pobrać pipetą 4,5 cm³ klarownego roztworu i przenieść do suchych kolb pojemności 50 cm³, dodać 1 cm³ alkoholu etylowego i wymieszać.

2.2.5.3. Pomiar fluorescencji wykonać na absorpcjometrze „Specol” sprawdzonym wg 2.1.5 przy długości fali 365 nm.

2.2.5.4. Obliczanie wyniku oznaczania. Zawartość tiaminy (x_2) wyrażoną w miligramach na 100 g produktu obliczyć wg wzoru

$$x_2 = \frac{(n_1 + n_2 + n_3) \cdot c}{3 \cdot g \cdot 10} \quad (2)$$

w którym:

- n_1, n_2, n_3 — stosunek wartości fluorescencji próbki badanej do fluorescencji wzorca dla odpowiednich kolejnych rozcieńczeń,
 c — ilość tiaminy w 1 cm³ roztworu standardowego, µg,
 g — masa próbki, g.

2.2.5.5. Wynik końcowy oznaczania. Za wynik przyjmując średnią arytmetyczną wyników co najmniej dwóch równoległych oznaczeń.

3. METODA OZNACZANIA WITAMINY B₂

3.1. Metoda oznaczania witaminy B₂ pochodzenia naturalnego w żywności o specjalnym przeznaczeniu

3.1.1. Zasada metody polega na uwolnieniu witaminy B₂ przez ekstrakcję i hydrolizę enzymatyczną, oczyszczeniu ekstraktu i pomiarze fluorescencji.

3.1.2. Aparatura, przyrządy i materiały

- Absorpcjometr „Specol” firmy Zeiss z przystawką fluorometryczną FK i kuwetami o grubości warstwy 1 cm.
- Lampa rtęciowa HQE-40.
- Wzmacniacz ZV.
- Filtr wtórny żółtozielony GVK-48 (maksimum fluorescencji ryboflawiny przy 535 nm).
- Wzorec szklany GG-17.
- Młyneczek elektryczny lub młódkierz.
- Łaźnia wodna lub autoklaw.
- Cieplarka laboratoryjna.
- Kolumna szklana o średnicy 10 mm.
- Wymiennik jonowy Amberlit IRC-50 o wielkości oczek 20 ÷ 50 mesh.
- Wirówka laboratoryjna.

l) Probówki lub cylindry pojemności 50 cm³ z doszlifowanymi korkami.

ł) Kolby pojemności 50 cm³ z doszlifowanymi korkami.

m) Sączi bezpopiołowe o średnicy 60 mm.

3.1.3. Odczynniki i roztwory

- Kwas solny, cz.d.a., roztwór 0,1, 0,5 i 3N.
- Kwas octowy lodowaty, cz.d.a. oraz roztwór 0,02N.
- Chlorek sodowy, cz.d.a., roztwór 10-procentowy.
- Kwaśny chlorek potasowy, cz.d.a., roztwór 25-procentowy.
- Perhydrol, cz.d.a., roztwór 3-procentowy.
- Nadmanganian potasowy, cz.d.a., roztwór 3-procentowy.
- Sól sodowa fluoresceiny, cz.d.a.
- Ryboflawina, cz.d.a.
- Hydrosulfit (Na₂S₂O₄), cz.d.a., firmy I. E. (należy przechowywać bez dostępu powietrza i światła).
- Pięciotlenek fosforu, cz.d.a.
- Toluen, cz.d.a.

Roztwory fluoresceiny

a) Roztwór podstawowy fluoresceiny o stężeniu 100 µg w 1 cm³.

Na wadze analitycznej odważyć 10 mg fluoresceiny z dokładnością do 0,001 g, przenieść ilościowo do kolby pomiarowej pojemności 100 cm³ wodą destylowaną, wymieszać i uzupełnić do kreski.

b) Roztwór roboczy fluoresceiny o stężeniu 1 µg w 1 cm³.

1 cm³ roztworu podstawowego fluoresceiny przenieść do kolby pomiarowej pojemności 100 cm³ i uzupełnić do kreski wodą destylowaną.

Roztwory wzorcowe ryboflawiny

a) Roztwór podstawowy ryboflawiny o stężeniu 100 µg w 1 cm³.

Na wadze analitycznej odważyć 50 mg ryboflawiny z dokładnością do 0,001 g, uprzednio wysuszonej do stałej masy nad pięciotlenkiem fosforu, przenieść ilościowo do kolby stożkowej za pomocą 200 cm³ 0,02N roztworu kwasu octowego i ogrzewać na łaźni wodnej o temperaturze 70°C do całkowitego rozpuszczenia ryboflawiny. Następnie kolbę ochłodzić, przenieść ilościowo do kolby pomiarowej pojemności 500 cm³ 0,02N roztworem kwasu octowego, uzupełnić do kreski i wymieszać.

Roztwór przenieść do butelki ze szkła oranżowego, dodać kilka kropli toluenu, przechowywać w temperaturze 10°C i chronić przed światłem.

b) Roztwór roboczy ryboflawiny o stężeniu 1 µg w 1 cm³.

1 cm³ roztworu podstawowego ryboflawiny przenieść do kolby pomiarowej pojemności 100 cm³, uzupełnić do kreski wodą destylowaną i wymieszać. Roztwór należy przygotować w dniu wykonywania oznaczania.

3.1.4. Przygotowanie kolumny. Kolumnę szklaną wypełnioną wymiennikiem jonowym Amberlit IRC-50 przygotować wg 2.1.4.

3.1.5. Sprawdzenie absorpcjometru „Specol”. Absorpcjometr „Specol” sprawdzić za pomocą roztworu roboczego fluoresceiny lub wzorca szklanego GG-17. Do wzbudzenia fluorescencji stosować światło o długości fali 435 nm i filtr wtórny żółtozielony GVK-48. Dalej postępować wg 2.1.5.

3.1.6. Wykonanie oznaczania

3.1.6.1. Przygotowanie próbki do badań. W zależności od przewidywanej zawartości ryboflawiny w badanym produkcie próbka do oznaczeń powinna zawierać $10 \div 25 \mu\text{g}$. Ze średniej próbki laboratoryjnej uprzednio rozdrobionej odważyć w zlewce $2 \div 10 \text{ g}$ produktu z dokładnością do 0,001 g, dodać około 75 cm^3 0,1N roztworu kwasu solnego i dalej postępować wg 2.1.6.1.

Oznaczanie ryboflawiny wykonywać w pomieszczeniu zaciemnionym.

3.1.6.2. Oczyszczanie ekstraktu. Do 4 probówek lub cylindrów pojemności 50 cm^3 pobrać po 10 cm^3 klarownego ekstraktu. Następnie do 2 wybranych próbek dodać po 1 cm^3 roztworu roboczego ryboflawiny przygotowanego wg 3.1.3, a do 2 pozostałych po 1 cm^3 wody destylowanej. Do wszystkich probówek dodać po 1 cm^3 kwasu octowego lodowatego, wymieszać i następnie dodać po $0,5 \text{ cm}^3$ 3-procentowego roztworu nadmanganianu potasowego, wymieszać, pozostawić na 2 min i dodać po $0,6 \text{ cm}^3$ 3-procentowego roztworu wody utlenionej. Próby wytrząsać i przesączyć przez sączek bezpopiołowy do suchych kolb.

3.1.6.3. Pomiar fluorescencji wykonać na absorpcjometrze „Specol” sprawdzonym wg 3.1.5 przy długości fali 435 nm. Pomiar fluorescencji wykonać w próbkach badanych ze standardem oraz w próbkach badanych z dodatkiem wody destylowanej. Dodatkowo wykonać pomiar fluorescencji po wygaszeniu. W tym celu do kuwet dodać po około 25 mg hydrosulfitu, wymieszać i w ciągu 5 s wykonać ponownie pomiar fluorescencji.

3.1.6.4. Obliczanie wyniku oznaczania. Zawartość ryboflawiny (x_3) wyrażoną w $\text{mg}/100 \text{ g}$ produktu obliczyć wg wzoru

$$x_3 = \frac{(a - a_1) \cdot c}{(b - a) \cdot g} \quad (3)$$

w którym:

- a — odczyt fluorescencji próbki badanej,
- a_1 — odczyt fluorescencji próbki badanej po wygaszeniu,
- b — odczyt fluorescencji próbki ze standardem,
- c — ilość ryboflawiny w 1 cm^3 roztworu standardowego, μg ,
- g — masa próbki, g.

3.1.6.5. Wynik końcowy oznaczania. Za wynik przyjąć średnią arytmetyczną wyników co najmniej dwóch równoległych oznaczeń.

3.2. Metoda oznaczania witaminy B₂ pochodzenia syntetycznego w koncentratkach napojów

3.2.1. Zasada metody polega na oczyszczeniu ekstraktu i pomiarze fluorescencji.

3.2.2. Aparatura, przyrządy i materiały

- a) Absorpcjometr „Specol” firmy Zeissa z przystawką fluorometryczną FK i kuwetami o grubości warstwy 1 cm.
- b) Lampa rtęciowa HQE-40.
- c) Wzmacniacz ZV.
- d) Filtr wtórny żółtozielony GVK-48 (maksimum fluorescencji ryboflawiny przy 535 nm).
- e) Wzorzec szklany GG-17.
- f) Młyn elektryczny lub młyn ręczny.
- g) Łaźnia wodna.
- h) Wirówka laboratoryjna.
- i) Probówki lub cylindry pojemności 50 cm^3 z doszlifowanym korkiem.
- j) Kolby pojemności 50 cm^3 z doszlifowanymi korkami.
- k) Sączki bezpopiołowe o średnicy 60 mm.

3.2.3. Odczynniki i roztwory

- a) Kwas solny, cz.d.a., roztwór 0,1N.
- b) Octan sodu, cz.d.a., roztwór 2,5 N.
- c) Pięciotlenek fosforu, cz.d.a.
- d) Ryboflawina, cz.d.a.
- e) Toluen, cz.d.a.

Roztwory wzorcowe ryboflawiny

- a) Roztwór podstawowy ryboflawiny o stężeniu $100 \mu\text{g}$ w 1 cm^3 .

Na wadze analitycznej odważyć 10 mg ryboflawiny z dokładnością do 0,001 g uprzednio wysuszonej do stałej masy nad pięciotlenkiem fosforu, przenieść ilościowo do kolby stożkowej za pomocą 70 cm^3 0,1N roztworu kwasu solnego, ogrzewać na łaźni wodnej o temperaturze 70°C przez 2,5 h, wstrząsając co 30 min. Następnie kolbę ochłodzić i przenieść ilościowo do kolby pomiarowej pojemności 100 cm^3 0,1N roztworu kwasu solnego, uzupełnić do kreski i wymieszać.

Roztwór przenieść do butelki ze szkła oranżowego, dodać kilka kropli toluenu, przechowywać w temperaturze 10°C i chronić od światła.

- b) Roztwór roboczy ryboflawiny o stężeniu $5 \mu\text{g}$ w 1 cm^3 .

10 cm^3 roztworu podstawowego ryboflawiny przenieść do kolby pomiarowej pojemności 200 cm^3 , uzupełnić do kreski 0,1N roztworem kwasu solnego i wymieszać. Roztwór należy przygotować w dniu wykonywania oznaczania.

3.2.4. Sprawdzenie absorpcjometru „Specol” wykonać wg 3.1.5 przy zastosowaniu wzorca szklanego GG-17.

3.2.5. Wykonanie oznaczania

3.2.5.1. Przygotowanie próbki do badań. W zależności od przewidywanej zawartości ryboflawiny w badanym produkcie, próbka do oznaczeń powinna zawierać $100 \div 300 \mu\text{g}$. Ze średniej próbki laboratoryjnej uprzednio rozdrobionej odważyć w kolbie stożkowej $2 \div 5 \text{ g}$ produktu z dokładnością do 0,001 g, dodać około 75 cm^3 0,1N roztworu kwasu solnego, ogrzewać na gorącej łaźni wodnej przez 2,5 h i wytrząsać co 30 min. Następnie ochłodzić i przenieść ilościowo do kolby pomiarowej pojemności 200 cm^3 za pomocą 0,1N roztworu solnego, uzupełnić do kreski i wymieszać. Następnie pobrać 50 cm^3 roztworu, odwirować

przez 15 min przy 5000 obr./min. Roztwór przesączyć przez sączek bezpopiołowy do suchej kolby, odrzucając pierwsze krople.

Oznaczanie ryboflawiny wykonać w pomieszczeniu zaciemnionym.

3.2.5.2. Oczyszczanie ekstraktu. Do 2 probówek lub cylindrów pojemności 50 cm³ pobrać pipetą po 2 cm³ klarownego ekstraktu i uzupełnić do objętości 20 cm³ 2,5N roztworem octanu sodowego. Do 2 następnych probówek pobrać pipetą po 1 cm³ roztworu roboczego ryboflawiny, przygotowanego wg 3.2.3 i uzupełnić do objętości 20 cm³ 2,5N roztworem octanu sodowego. Wszystkie probówki wymieszać.

3.2.5.3. Pomiar fluorescencji wykonać na absorpcjometrze „Specol” sprawdzonym wg 3.1.5 przy długości fali 435 nm. Pomiar fluorescencji wykonać w próbach badanych i próbach wzorcowych.

3.2.5.4. Obliczanie wyniku oznaczania. Zawartość ryboflawiny (x_4) wyrażoną w miligramach na 100 g produktu obliczyć wg wzoru

$$x_4 = \frac{n \cdot c \cdot 200}{n_1 \cdot g} \quad (4)$$

w którym:

- n — odczyt fluorescencji próbki badanej,
- n_1 — odczyt fluorescencji próbki wzorcowej,
- c — ilość ryboflawiny w 1 cm³ roztworu standardowego, µg,
- g — masa próbki, g.

3.2.5.5. Wynik końcowy oznaczania. Za wynik przyjmując średnią arytmetyczną wyników co najmniej dwóch równoległych oznaczeń.

K O N I E C

INFORMACJE DODATKOWE

1. Instytucja opracowująca normę — Zjednoczenie Przemysłu Koncentratów Spożywczych, Poznań.
2. Autorzy projektu normy — dr inż. Janina Sułkowska, mgr Lidia Chałcampowicz — Centralne Laboratorium Przemysłu Koncentratów Spożywczych, Poznań.