INSO
17570
1st. Edition
2014

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

استاندارد ملی ایران
۱۷۵۷۰
چاپ اول
۱۳۹۲

مواد غذایی - اندازه‌گیری نیاسین به روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا

Foodstuffs - Determination of niacin 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 نیاسین 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

عنوان		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	۶
۶	روش اجرای آزمون	۸
۷	روش محاسبه	۱۰
۸	دقت	۱۲
۹	گزارش آزمون	۱۴
پیوست الف (اطلاعاتی)- کروماتوگرام عادی		۱۵
پیوست ب (اطلاعاتی) - طلاعات مربوط به دقت (هیدرولیز اسیدی، آنزیمی و اسیدی/ قلیایی)		۱۶
پیوست پ (اطلاعاتی)- مقایسه بین سه روش مختلف هیدرولیز		۱۹
پیوست ت (اطلاعاتی)- کتابنامه		۲۱

پیش گفتار

استاندارد" مواد غذایی - اندازه‌گیری نیاسین به روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا" که پیش نـویس آن توسط کمیسیون‌های مربوط تهیه و تدوین شده و در یک هزار و سیصد و نـوزدهمین اجـلاس کمیتـۀ ملـی استاندارد خوراک و فرآورده های کشاورزی مورخ ۱۳۹۲/۱۲/۵ مورد تصویب قرار گرفته است، اینک به استناد بند یک مادۀ 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 زمینۀ صنایع، علـوم و خـدمات، استانداردهای ملی ایران در مواقع لزوم تجدید نظر خواهد شد و هر پیشنهادی که برای اصلاح و تکمیل ایـن استانداردها ارائه شود، هنگام تجدید نظر در کمیسیون فنی مربوط مورد توجه قرار خواهـد گرفـت. بنـابراین، باید همواره از آخرین تجدید نظر استانداردهای ملی استفاده کرد.

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

1- DIN EN 15652: 2009-09, Foodstuffs – Determination of niacin by HPLC.

مواد غذایی- اندازه‌گیری نیاسین به روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد، تعیین روش اندازه‌گیری جزء جرمی نیاسین در مواد غذایی، با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا[1]، به سه روش مختلف هیدرولیز شامل: هیدرولیز اسیدی (A)، هیدرولیز آنزیمی (B) و هیدرولیز اسیدی/ قلیایی (C) می‌باشد.

یادآوری ۱: روش شرح داده شده در این استاندارد، توسط آزمون‌های بین آزمایشگاهی بر روی نمونه‌های غنی شده و غنی‌نشده مانند: پودر غلات صبحانه، غلات شکلاتی، گوشت پخته شده، نخود سبز، نخود سبز لیوفیلیز[2] شده با گوشت، سوپ‌لیوفیلیزشده، آب پرتقال مغذی، شیر خشک و آرد گندم در سطوح ۰/۵ تا ۲۴ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم، اعتبار بخشی[3] شده است (به پیوست ب- اطلاعاتی این استاندارد مراجعه کنید).

یادآوری ۲: روش‌های A و B اندازه‌گیری نیاسین، نتایج مشابه‌ای می‌دهند. در این روش‌ها، نیاسین بر حسب مجموع نیکوتین‌آمید و نیکوتینیک اسید محاسبه می‌شود. روش C نسبت به روش‌های A و B بر روی غلات غیرمکمل، نتایج بهتری می‌دهد، اما در مورد دیگر محصولات، نتایج مشابه است. در روش C، نیاسین بر حسب نیکوتینیک اسید (پس از تبدیل نیکوتین‌آمید به نیکوتینیک اسید) محاسبه و گزارش می‌شود.

یادآوری ۳: روش A نسبت به روش های B و C، سریعتر و ارزانتر است.

یادآوری ۴: چنانچه اندازه‌گیریِ دقیق نیکوتین‌آمید و نیکوتینیک اسید مورد نیاز باشد، از روش B استفاده می‌شود. در روش A به علت تبدیل مقدار کمی از نیکوتین‌آمید به نیکوتینیک اسید طی هیدرولیز اسیدی، اندازه گیری دقیق امکان پذیر نیست.

یادآوری ۵: در روش C، مقدار نیاسین کل اندازه‌گیری می‌شود. هیدرولیز قلیایی، می‌تواند اشکال دیگری از نیاسین را آزاد نموده و نتایج بهتری به دست دهد. استفاده از این روش، در برخی از مواد غذایی مانند ذرت و غلات به علل بیولوژیکی فراهم نیست (اطلاعات مربوط به مقایسه بین سه روش هیدرولیز، در پیوست پ-اطلاعاتی این استاندارد شرح داده 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، اصلاحیه ها 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 تجدید نظر و اصلاحیه های 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] Lyophilise
[3] Validation

۳ اصول آزمون

ویتامین‌های نیاسین با عملیات اسیدی (روش A)، آنزیمی (روش B) یا اسیدی/ قلیایی (روش C) از مواد غذایی استخراج شده و توسط HPLC مشتق سازی بعد از ستونی[1] با تابش ماوراء بنفش به روش فلوروسنجی شناسایی می‌شوند. در روش‌های A و B، نیاسین برحسب مجموع نیکوتین آمید و نیکوتینیک اسید اندازه‌گیری می‌شود. نیاسین پس از تصحیح جرم مولکولی، بر حسب نیکوتینیک اسید بیان می‌شود. در روشC نیاسین برحسب نیکوتینیک اسید بیان می‌شود. عملیات قلیایی، تمام نیکوتین آمید را به نیکوتینیک‌اسید تبدیل می‌کند.

۴ مواد و/یا واکنشگرها

۴-۱ کلیات

در طی مراحل اندازه‌گیری، اگر دستور دیگری داده نشده باشد، فقط از واکنشگرهای تجزیه‌ای[2] 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 محلول‌ها

۴-۲-۱ استات سدیم ($C_2H_3NaO_2$) ، با درجه خلوص برابر و یا بیشتر از **% 99**

۴-۲-۲ پتاسیم مونوهیدروژن فسفات (K_2HPO_4)، با درجه خلوص برابر و یا بیشتر از **% 99.5**

۴-۲-۳ پتاسیم دی هیدروژن فسفات (KH_2PO_4)، با درجه خلوص برابر و یا بیشتر از **% 99.5**

۴-۲-۴ محلول پایدار نشده هیدروژن پراکسید (H_2O_2)، با درجه خلوص برابر با **% 30**

۴-۲-۵ سولفات مس ($Cu(II)SO_4{\cdot}5H_2O$)، با درجه خلوص بیشتر از **% 99**

۴-۲-۶ استیک اسید (CH_3COOH) ، با درجه خلوص بیشتر از **% 99.8**

۴-۲-۷ محلول هیدروکلریک اسید غلیظ (HCl) (روش A و C)، با درجه خلوص برابر با **% 37.0**

۴-۲-۸ آنزیم NADآز به دست آمده از نئوروسپرا کراسا[3](روش B)، با فعالیت آنزیمی **U/mg** ۰/۵۵ از پروتئین (در دمای زیر صفر درجه سلسیوس نگهداری شود)

یادآوری: در مطالعه بین آزمایشگاهی، آنزیم NAD آز به دست آمده از نئورو سپرا کراسا، به صورت پودر لیوفیلیز شده که حاوی u/mg ۰/۵تا ۳u/mg پروتئین می‌باشد، استفاده شده است.

---

[1] Post-Column derivatization

[2] Analytical grade

[3] Neurospora crassa

۴-۲-۹ محلول استیک اسید (CH_3COOH)، با غلظت برابر با 5 mol/l

۴-۲-۱۰ محلول استات سدیم ($C_2H_3NaO_2$)، با غلظت برابر با 2.5 mol/l

۴-۲-۱۱ محلول سولفات مس ($Cu(II)SO_4 . 5H_2O$)، با غلظت برابر با 0.005 mol/l

۴-۲-۱۲ محلول استات سدیم ($C_2H_3NaO_2$) (روش B)، با غلظت برابر با 0.05 mol/l و pH = 4.5

مقدار ۴٫۱۰ گرم استات سدیم (طبق بند ۴-۲-۱) را در ۹۰۰ میلی‌لیتر آب حل کنید. محلول را با استیک‌اسید (طبق بند ۴-۲-۶) در pH = ۴٫۵ تنظیم کنید. سپس با آب مقطر به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر برسانید.

۴-۲-۱۳ محلول بافر فسفات (K_2HPO_4) (روش B)، با غلظت برابر با 0.05 mol/l و محلول بافر فسفات (**KH_2PO_4**) با غلظت برابر با **0.05 mol/l** و **pH = ۶٫۸**

یک قسمت از حجم محلول K_2HPO_4 و یک قسمت از حجم محلول KH_2PO_4 را با هم مخلوط کنید.
در صورت نیاز با محلول استات سدیم (طبق بند ۴-۲-۱۰) آن را در pH = ۶٫۸ تنظیم کنید.

۴-۲-۱۴ محلول آنزیم NAD آز(روش B)

مقدار ۲٫۹ میلی‌گرم آنزیم NAD آز(طبق بند ۴-۲-۸) را در ۵ میلی‌لیتر محلول بافر فسفات (طبق بند ۴-۲-۱۳) حل کنید.
این محلول به مدت یک هفته در دمای ۱۸- درجه سلسیوس پایدار است.

۴-۲-۱۵ محلول هیدروکلریک اسید (HCl) (روش A و C)، با غلظت برابر با 0.1 mol/l

۴-۲-۱۶ فاز متحرک[1] HPLC

مقدار ۴٫۷۷ گرم پتاسیم هیدروژن فسفات (طبق بند ۴-۲-۳) را در ۴۰۰ میلی‌لیتر آب حل کنید. مقدار ۳٫۸ میلی‌لیتر محلول هیدروژن پراکسید (طبق بند ۴-۲-۴) و مقدار ۰٫۵ میلی‌لیتر محلول سولفات مس (طبق بند ۴-۲-۱۱) را به آن اضافه کنید.سپس، آن را با آب مقطر به حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر رسانده (pH تقریباً برابر۴٫۵ است) و با فیلتر غشایی (طبق بند ۵-۷) صاف کنید. این محلول به مدت یک روز پایدار است.

۴-۲-۱۷ سدیم هیدروکسید (روشC) (NaOH) ، با درجه خلوص برابر و یا بیشتر از 99 %

۴-۲-۱۸ محلول سدیم هیدروکسید (NaOH) (روشC)، با غلظت برابر با 5 mol/l

مقدار ۲۰ گرم از سدیم هیدروکسید (طبق بند ۴-۲-۱۷) را در ۸۰ میلی‌لیتر آب حل کنید. بعد از خنک شدن آن را به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر برسانید.

[1] Mobile phase

۴-۲-۱۹ محلول هیدروکلریک اسید (HCl) (روشC)، با درجه خلوص برابر با % 3.7

مقدار ۵ میلی‌لیتر محلول هیدروکلریک اسید غلیظ (طبق بند ۴-۲-۷) را با آب به حجم ۵۰ میلی‌لیتر برسانید.

۴-۳ مواد استاندارد[1]

۴-۳-۱ کلیات

نیکوتینیک اسید و نیکوتین آمید را می‌توانید از تامین کننده‌های مختلفی تهیه کنید. به دلیل احتمال تغییر درجه خلوص، لازم است غلظت محلول کالیبراسیون به روش بیناب سنجی تعیین شود (به بند ۴-۴-۳ مراجعه کنید).

۴-۳-۲ نیکوتینیک اسید ($C_6H_5NO_2$)، با درجه خلوص برابر و یا بیشتر از % 99.5

۴-۳-۳ نیکوتین آمید ($C_6H_6N_2O$) (روش A وB)، با درجه خلوص برابر و یا بیشتر از % 99.5

۴-۴ محلول های ذخیره[2]

۴-۴-۱ محلول ذخیره نیکوتینیک اسید ($C_6H_5NO_2$) ، با جرم حجمی برابر با 1 mg/ml

مقدار مشخصی از ماده‌ی استانداردِ نیکوتینیک اسید (طبق بند ۴-۳-۲)، به عنوان مثال حدود ۱ تا ۱۰۰ میلی‌گرم را در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کنید. این محلول به مدت یک هفته در دمای ۱۸- درجه سلسیوس پایدار است.

۴-۴-۲ محلول ذخیره نیکوتین آمید ($C_6H_6N_2O$)،(روش A وB)،با غلظت برابر با 1 mg/ml

مقدار مشخصی از ماده‌ی استاندارد نیکوتین آمید (طبق بند ۴-۳-۳)، به عنوان مثال حدود ۱ تا ۱۰۰ میلی‌گرم را در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب حل کنید. این محلول به مدت یک هفته در دمای ۱۸- درجه سلسیوس پایدار است.

۴-۴-۳ آزمون های غلظت

۴-۴-۳-۱ محلول نیکوتینیک اسید ($C_6H_5NO_2$) ، با غلظت برابر با 1 mg/ml

مقدار ۱ میلی‌لیتر از محلول ذخیره نیکوتینیک اسید (طبق بند ۴-۴-۱) را با ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول هیدروکلریک اسید (طبق بند ۴-۲-۱۵) به حجم برسانید و میزان جذب آن را در نمایه[3] کوارتز ۱

[1] Standard substances
[2] Stock solutions
[3] Cell

سانتی‌متری، در طول موج ۲۶۰ نانومتر در مقابل محلول هیدروکلریک اسید (طبق بند ۴-۲-۱۵) (به عنوان شاهد) به روش بیناب سنجی (طبق بند ۵-۲) اندازه‌گیری کنید.

غلظت(ρ) به میلی‌گرم در میلی‌لیتر محلول ذخیره را با استفاده از فرمول(۱) به شرح زیر محاسبه کنید:

فرمول(۱):

$$\rho = \frac{A_{260} \times 1000}{420}$$

که در آن:

A_{260} مقدار جذب محلول در ۲۶۰ نانومتر؛

۴۲۰ جذب محلول ۱ درصد نیکوتینیک اسید در محلول هیدروکلریک اسید (طبق بند ۴-۲-۱۵) در سل یک سانتی‌متری و طول موج ۲۶۰ نانومتر ($E_{1cm}^{1\%}$).

۴-۳-۴-۲ محلول نیکوتین آمید ($C_6H_6N_2O$)، با غلظت 1 mg/ml

مقدار ۱ میلی‌لیتر محلول ذخیره نیکوتین آمید (طبق بند ۴-۴-۲) را با ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول هیدروکلریک اسید (طبق بند ۴-۲-۱۵) به حجم برسانید و میزان جذب آن را در نمایه کوارتز ۱ سانتی‌متری، در طول موج ۲۶۰ نانومتر در مقابل محلول هیدروکلریک اسید (طبق بند ۴-۲-۱۵) (به عنوان شاهد) به روش بیناب‌سنجی (طبق بند ۵-۲) اندازه‌گیری کنید.

غلظت(ρ) به میلی‌گرم در میلی‌لیتر محلول ذخیره را با استفاده از فرمول (۲) به شرح زیر محاسبه کنید:

فرمول(۲):

$$\rho = \frac{A_{260} \times 1000}{410}$$

که در آن:

A_{260} مقدار جذب محلول در ۲۶۰ نانومتر؛

۴۱۰ جذب محلول ۱ درصد نیکوتین آمید در محلول هیدروکلریک اسید (طبق بند ۴-۲-۱۵) در سل یک سانتی‌متری و در طول موج ۲۶۰ نانومتر ($E_{1cm}^{1\%}$).

۴- ۵ محلول های استاندارد نیکوتینیک اسید ($C_6H_6N_2O$) و نیکوتین‌آمید ($C_6H_5N0_2$)، با غلظت 5 µg/ml تا 0.05 µg/ml

مقدار ۱ میلی‌لیتر محلول ذخیره (طبق بند ۴-۴-۱) یا محلول ذخیره (طبق بند ۴-۴-۲) را با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر برسانید. سپس به ترتیب ۰٫۵، ۲٫۵، ۱۰ و ۵۰ میلی‌لیتر از این محلول را به طور جداگانه به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر برسانید. این محلول‌ها به مدت یک روز در دمای اتاق پایدار می‌باشند.

۵ وسایل

۵-۱ وسایل عمومی

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

۵-۲ بیناب سنج ماورای بنفش[۱]، قادر به اندازه‌گیری جذب در طول موج های معین.

۵-۳ گرم‌خانه، قابل تنظیم در دمای ۳۷ درجه سلسیوس.

۵-۴ اتوکلاو، قابل تنظیم در دمای ۱۲۰ درجه سلسیوس.

۵-۵ سیستم HPLC ، شامل یک پمپ، تزریق کننده نمونه[۲]، آشکارساز فلوروسانس[۳] با طول موج برانگیخته و نشر قابل تنظیم به ترتیب در طول موج‌های ۳۲۲ و ۳۸۰ نانومتر و سیستم داده پرداز به عنوان مثال انتگرال‌گیر[۴].

۵-۶ ستون جداسازی تجزیه فاز معکوس[۵]، استفاده از ستون با مشخصات زیر، تفکیک پذیری مواد مورد تجزیه[۶] را تضمین می‌کند:

- طول ۲۵ سانتی‌متر؛
- قطر داخلی ۴ میلی‌متر؛
- اندازه ذرات ۵ میکرومتر.

از ستون‌هایی با اندازه ذرات و یا ابعاد دیگر نیز می‌توان استفاده کرد. جهت تضمین نتایج معادل پارامترهای جداسازی شده (در ستون‌های مختلف)، باید با یکدیگر منطبق باشند.

۵-۷ دستگاه صافی[۷]، صافی غشایی با اندازه روزنه ۰٫۴۵ میکرومتر.

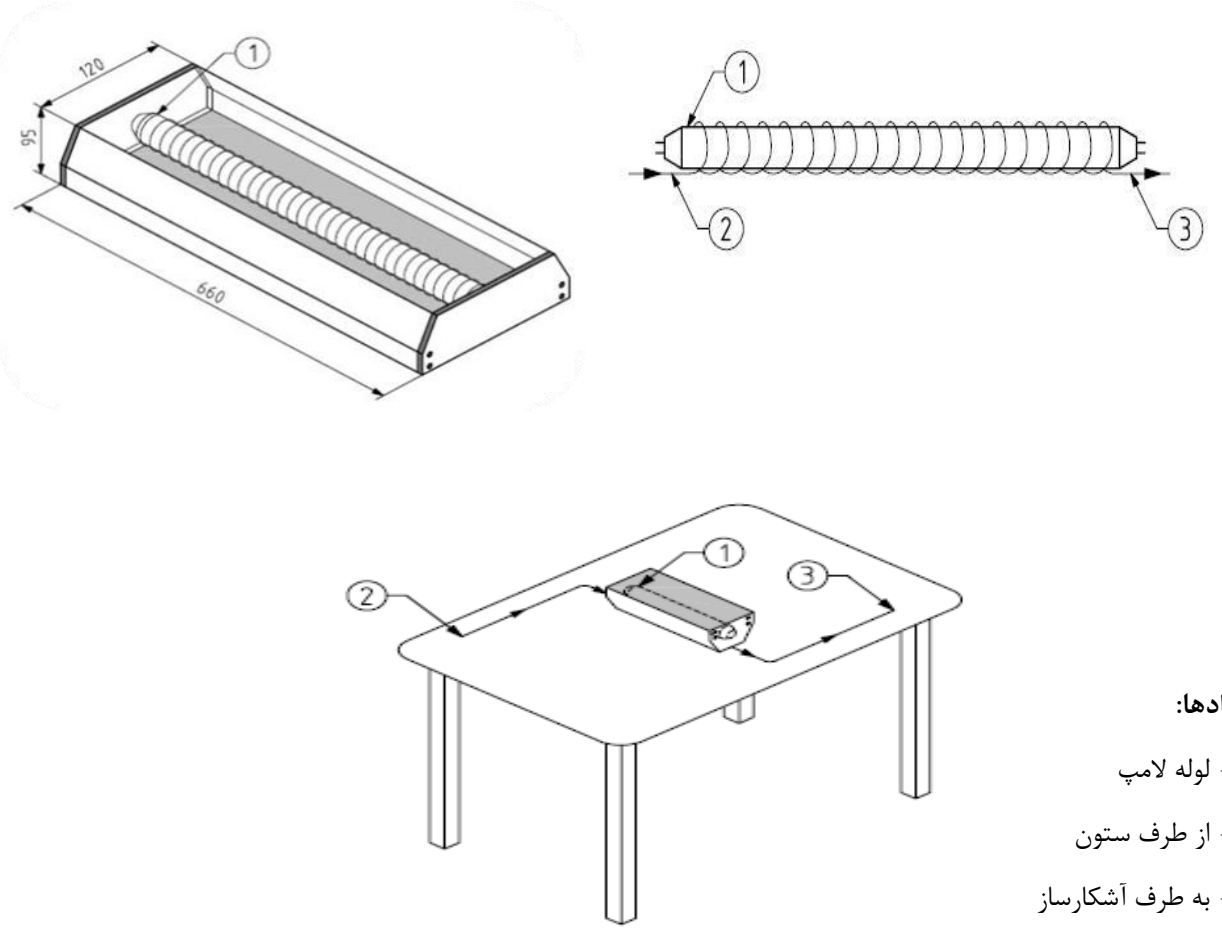
۵-۸ مشتق سازی بعد ستونی[۸] **و لامپ ماوراء بنفش،** لوله پلی تترا فلوئورو اتیلن[۹] (طول ۵ متر، قطر داخلی ۰٫۵ میلی‌متر و قطر خارجی ۱٫۶ میلی‌متر).
اطراف یک لامپ ماوراء بنفش سیاه-روشن-آبی[۱۰] با لوله فشار پایین[۱۱] (به شکل‌های ۱ و ۲ مراجعه کنید).

یادآوری ۱: نور مضر ماوراء بنفش می‌تواند از جعبه فلزی لامپ به بیرون تشعشع کند.

---

[1] UV-Spectrometer
[2] Sample injecting device
[3] Fluorescence detector
[4] Integrator
[5] Analytical reverse phase separating column (LiChrospher® 60 RP-18 Select B endcapped and VL-120 BLB)
[6] Analytes
[7] Filter device
[8] Post-column derivatization tube
[9] Polytetrafluoroethylene(PTFE)
[10] Black-Light-Blue(BLB)
[11] Low-pressure tube(VL-120 BLB, 20 W, 365 nm, intensity is 55 $\mu W/cm^2$ from Vilber Lourmat)

یادآوری ۲: اگر به علت حرارت بیش از حد، توده‌ای حبابی شکل[1] در لوله به وجود آید، باید آن را با جابجایی هوا خنک نمود (برای مثال با بیرون آوردن جعبه لامپ).



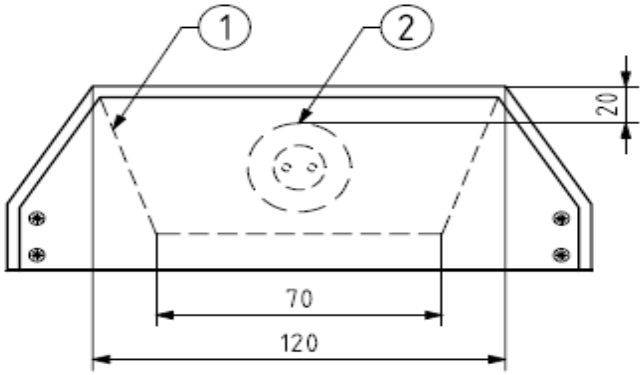
نمادها:

۱- لوله لامپ

۲- از طرف ستون

۳- به طرف آشکارساز

شکل ۱- شمایی از دیاگرام تصویری و ابعاد (میلی‌متر) لامپ، جعبه لامپ (در وضعیت بالا و پایین) و قرارگیری جعبه لامپ روی میز(در وضعیت اجرا)



نمادها:

۱- بازتابنده

۲- لوله لامپ

شکل ۲- شمایی از مقطع عرضی از جعبه و لوله لامپ (در وضعیت وارونه) همراه با ابعاد

[1] Bubble formation

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 مناسب خرد کرده و مجدداً ان را مخلوط کنید.

اقدامات احتیاطی مانند سرد نمودن ابتدایی نمونه‌ها، جهت جلوگیری از قرار گرفتن در معرض دمای بالا در بلند مدت، باید انجام پذیرد.

۶-۲ استخراج

۶-۲-۱ استخراج به روش A ، هیدرولیز اسیدی

در روش A مانند روش B، نتایج مشابه‌ای از میزان نیاسین به دست می‌آید. اما در این روش، طی مرحله هیدرولیز، مقدار کمی از نیکوتین آمید به نیکوتینیک اسید تبدیل می‌شود.

مقدار معینی از آزمایه، به عنوان مثال ۱ تا ۵ گرم را دقیقاً وزن کرده و به یک ارلن مایر منتقل کنید. ۵۰ میلی‌لیتر محلول هیدروکلریک اسید (طبق بند ۴-۲-۱۵) را به آن اضافه کنید. ارلن مایر را در حمام آب جوش به مدت ۱ ساعت قرار دهید. پس از خنک شدن، به آن محلول سدیم استات (طبق بند ۴-۲-۱۰) را تا رسیدن به pH = ۴٫۵ اضافه کنید. سپس، آن را به بالن حجمی ۱۰۰ میلی‌لیتری منتقل کرده و با آب مقطر به حجم برسانید. محلول را تکان داده و با کاغذ صافی، صاف کنید. قبل از تزریق، مجدداً آن را با صافی غشایی (طبق بند ۵-۷) صاف کنید.

یادآوری۱: قبل از استفاده یا تزریق، صاف کردن فاز متحرک و محلول آزمایه با عبور از صافی غشایی، طول عمر ستون را افزایش می‌دهد.

۶-۲-۲ استخراج روش B، هیدرولیز آنزیمی

در روش B مانند روش A، نتایج مشابه‌ای از میزان نیاسین به دست می‌آید. اما روش B، اندازه گیری دقیق نیکوتین آمید و نیکوتینیک اسید را در پی دارد.

مقدار معینی از آزمایه، به عنوان مثال ۱ تا ۵ گرم را دقیقاً وزن کرده و به یک ارلن مایر منتقل کنید. ۵۰ میلی‌لیتر محلول سدیم استات (طبق بند ۴-۲-۱۲) را به آن بیافزایید.مقدار ۲۰۰ میکرولیتر محلول NAD از (طبق بند ۴-۲-۱۴) را به آن بیافزایید. ارلن مایر را در گرم‌خانه (طبق بند ۵-۳) در دمای ۳۷ درجه سلسیوس همراه با هم زدن، به مدت ۱۸ ساعت قرار دهید. پس از خنک شدن، آن را به بالن حجمی ۱۰۰ میلی‌لیتری منتقل کرده و با آب مقطر به حجم برسانید. محلول را تکان داده و با کاغذ صافی، آن را صاف کنید. قبل از تزریق، مجدداً آن را با صافی غشایی (طبق بند ۵-۷) صاف کنید.

۶-۲-۳ استخراج روشC، هیدرولیز اسیدی/ قلیایی

این روش نسبت به روش‌های A و B، نتایج بهتری را بر روی غلات غیرمکمل در پی دارد. برای نمونه‌های غذایی دیگر، نتایج مشابه است. در روش C پس از تبدیل شدن نیکوتین آمید به نیکوتینیک اسید در مرحله قلیایی، مقدار کل نیاسین برحسب نیکوتینیک اسید اندازه‌گیری می‌شود.

مقدار معینی از آزمایه را به عنوان مثال ۱ گرم تا ۵ گرم وزن کرده و به یک ارلن مایر منتقل کنید. مقدار ۷۰ میلی‌لیتر محلول هیدروکلریک اسید (طبق بند ۴-۲-۱۵) را به آن بیافزایید. ارلن مایر را در حمام آب جوش به مدت یک ساعت قرار دهید. بعد از خنک کردن، مقدار ۱ میلی‌لیتر تا ۲ میلی‌لیتر محلول سدیم‌هیدروکسید (طبق بند ۴-۲-۱۸) را تا رسیدن به pH=۴٫۵ به آن بیافزایید. محلول را به بالن حجمی ۱۰۰ میلی‌لیتری منتقل کرده و با آب مقطر به حجم برسانید. سپس، آن را با کاغذ صافی صاف کنید. مقدار ۵۰ میلی‌لیتر از محلول صاف شده را به یک ارلن مایر منتقل کرده و به آن ۱۰ میلی‌لیتر محلول سدیم هیدروکسید (طبق بند ۴-۲-۱۸) بیافزایید. آن را در اتوکلاو با دمای ۱۲۰ درجه سلسیوس به مدت ۱ ساعت قرار دهید. سپس، ابتدا با افزودن محلول هیدروکلریک اسید غلیظ (طبق بند ۴-۲-۷) و در ادامه با افزودن محلول هیدروکلریک اسید رقیق (طبق بند ۴-۲-۱۹) در pH=۴٫۵ تنظیم کنید و آن را به بالن حجمی ۱۰۰ میلی‌لیتری منتقل کرده و با آب مقطر به حجم برسانید. سپس، توسط کاغذ صافی، صاف کنید. قبل از تزریق، مجدداً آن را با صافی غشایی (طبق بند ۵-۷) صاف کنید.

۶-۳ کروماتوگرافی

مقادیری برابر، از محلول‌های استاندارد و محلول‌های آزمایه را به دستگاه HPLC تزیق کنید.

مواد مورد تجزیه را در محلول آزمایه و محلول استاندارد با مقایسه زمان بازداری پیک‌های مجزای آن‌ها، شناسایی کنید. اضافه نمودن مواد استاندارد به محلول آزمایه، نیز می‌تواند به شناسایی پیک بیانجامد.

چنانچه شرایط آزمایشگاهی مطابق زیر باشد، جداسازی و اندازه گیری رضایت بخش خواهد بود.

فاز ساکن: ستون مناسب فاز معکوس، اندازه ذرات ۵ µm، قطر ۴٫۰ mm، طول ۲۵۰ mm؛

فاز متحرک: بافر فسفات (($c = 0.07\ mol/l$)، پراکسید هیدروژن ($c = 0.075\ mol/l$)، سولفات مس ($c = 5 \times 10^{-6}\ mol/l$)؛

شدت جریان: ۱ml/min؛

حجم تزریق: ۳۰ µl؛

آشکارسازی: فلوروسنجی؛ طول موج برانگیخته: ۳۲۲ nm و طول موج نشر: ۳۸۰ nm.

۷ روش محاسبه

۷-۱ کلیات

جهت اندازه‌گیری به روش کالیبراسیون خارجی، سطح زیر منحنی حاصل از نمونه را انتگرال‌گیری یا ارتفاع پیک حاصل از نمونه را اندازه‌گیری کرده و مقادیر متناظر را با نتایج پیک مشابه حاصل از ماده استاندارد مقایسه کنید. خطی بودن منحنی کالیبراسیون را کنترل کنید.

۲-۷ محاسبه برای روش A یا B

جزء جرمی (w) نیکوتینیک اسید را به میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم از نمونه، با استفاده از فرمول (۳) به شرح زیر محاسبه کنید:

فرمول(۳):

$$w = \frac{A_{TS} \times \rho \times \mathrm{V}_e}{A_{ST} \times 10 \times m_s}$$

که در آن:

A_{TS} سطح زیر منحنی یا ارتفاع پیک (قله) به دست آمده از محلول آزمایه، در واحدهای سطح یا ارتفاع؛

ρ غلظت نیکوتینیک اسید در محلول استاندارد (طبق بند ۴-۵)، برحسب میکروگرم در میلی‌لیتر؛

V_e حجم محلول آزمایه (طبق بندهای ۶-۲-۱ یا ۶-۲-۲)، برحسب میلی‌لیتر؛

A_{ST} سطح زیر منحنی یا ارتفاع پیک به دست آمده از محلول استاندارد، در واحدهای سطح یا ارتفاع؛

m_s جرم نمونه، برحسب گرم.

جزء جرمی (w´) نیکوتین آمید را برحسب میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم از نمونه، با استفاده از فرمول (۴) به شرح زیر محاسبه کنید:

فرمول(۴):

$$w' = \frac{A'_{TS} \times \rho' \times \mathrm{Ve}}{A'_{ST} \times 10 \times m_s}$$

که در آن:

A'_{TS} سطح زیر منحنی یا ارتفاع پیک به دست آمده از محلول آزمایه، در واحد های سطح یا ارتفاع؛

ρ' غلظت نیکوتینیک اسید در محلول استاندارد (طبق بند ۴-۵)، برحسب میکروگرم در میلی‌لیتر؛

V_e حجم محلول آزمایه (طبق بندهای ۶-۲-۱ یا ۶-۲-۲) برحسب میلی‌لیتر؛

A'_{ST} سطح زیر منحنی یا ارتفاع پیک به دست آمده از محلول استاندارد، در واحد های سطح یا ارتفاع؛

m_s جرم نمونه، برحسب گرم.

نتیجه نیاسین را به صورت (w + 1.008 w′) بر حسب نیکوتینیک اسید برحسب میکروگرم در۱۰۰ گرم نمونه گزارش کنید.

۳-۷ محاسبه روش C

جزء جرمی(w) نیکوتینیک اسید را برحسب میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم نمونه، با استفاده از فرمول (۵) به شرح زیر محاسبه نمایید:

فرمول(۵):

$$w = \frac{A_{TS} \times \rho \times v_e \times 2}{A_{ST} \times 10 \times m_s}$$

که در آن:

A_{TS} سطح زیر منحنی یا ارتفاع پیک به دست آمده از محلول آزمایه، در واحد های سطح یا ارتفاع؛

ρ غلظت نیکوتینیک اسید در محلول استاندارد (طبق بند ۵-۴)، برحسب میکروگرم در میلی‌لیتر؛

V_e حجم محلول آزمایه (طبق بند ۶-۲-۳)، به میلی‌لیتر؛

A_{ST} سطح زیر منحنی یا ارتفاع پیک به دست آمده از محلول استاندارد، در واحد های سطح یا ارتفاع؛

m_s جرم نمونه، برحسب گرم.

۸ دقت

۸-۱ کلیات

اطلاعات مربوط به دقت در این روش HPLC برای اندازه‌گیری نیاسین با روش های استخراج A و B، که بر اساس استاندارد ISO 5725-2 در سال ۲۰۰۲ طی یک مطالعه مشترک بین المللی توسط AéRIAL[۱] و[۲] CGd'UMA تهیه و تنظیم شده است (به جداول ب-۱ و ب-۲ در پیوست اطلاعاتی ب این استاندارد مراجعه کنید).

اطلاعات مربوط به دقت برای اندازه‌گیری نیاسین با روش استخراج C، که براساس استاندارد ISO 5725-2 در سال ۱۹۹۹ طی یک مطالعه مشترک فرانسوی توسط CGd'UMA تهیه و تنظیم شده است (به جدول ب-۳ در پیوست اطلاعاتی ب این استاندارد مراجعه کنید).

۸-۲ تکرارپذیری[۳]

تفاوت مطلق در نتیجه به دست آمده از دو آزمایش که روی یک ماده مشخص مورد آزمون، به وسیله یک آزمایشگر، با به کارگیری همان تجهیزات، در کوتاهترین دوره زمانی ممکن انجام گرفته است، نباید در بیشتر از ۵ درصد[۴] موارد، از حد تکرار پذیری r بیشتر باشد.

این مقادیر برای نیاسین به روش A (هیدرولیز اسیدی) عبارتند از:

شیر خشک : $\bar{x}$ =16.66 mg/100 g r = 1.31 mg/100 g

غلات شکلات : $\bar{x}$ =21.03 mg/100 g r = 0.68 mg/100 g

گوشت: $\bar{x}$ =16.91 mg/100 g r = 0.53 mg/100 g

---

[1] CRT: Centre de Ressources technologiques

[2] Commission Générale d'Unification des Méthodes d'Analyses

[3] Repeatability

[۴] در این استاندارد تکرار پذیری زمانی قابل قبول است که اختلاف تکرار آزمایش، بیشتر از ۵ درصد نباشد.

آرد گندم : $\bar{x}$ =0.72 $mg/100$ g r = 0.079 $mg/100$ g

نخود سبز: $\bar{x}$ =5.91 $mg/100$ g r = 0.93 $mg/100$ g

این مقادیر برای نیاسین به روش B (هیدرولیز آنزیمی) عبارتند از:

شیر خشک : $\bar{x}$ =17.08 $mg/100$ g r = 1.39 $mg/100$ g

غلات شکلات : $\bar{x}$ =21.24 $mg/100$ g r = 1.75 $mg/100$ g

گوشت: $\bar{x}$ =17.29 $mg/100$ g r = 0.70 $mg/100$ g

آرد گندم : $\bar{x}$ =0.54 $mg/100$ g r = 0.040 $mg/100$ g

نخود سبز: $\bar{x}$ =5.79 $mg/100$ g r = 0.33 $mg/100$ g

این مقادیر برای نیاسین به روش C (هیدرولیز اسیدی/ قلیایی) عبارتند از:

غلات صبحانه : $\bar{x}$ =23.92 $mg/100$ g r = 2.29 $mg/100$ g

غلات شکلات : $\bar{x}$ =16.98 $mg/100$ g r = 2.24 $mg/100$ g

شیر خشک: $\bar{x}$ =5.66 $mg/100$ g r = 0.92 $mg/100$ g

آب میوه : $\bar{x}$ =4.31 $mg/100$ g r = 0.49 $mg/100$ g

گوشت با نخود سبز لیوفیلیز شده: $\bar{x}$ =12.89 $mg/100$ g r = 1.78 $mg/100$ g

سوپ لیوفیلیز شده : $\bar{x}$ =11.06 $mg/100$ g r = 0.53 $mg/100$ g

۸-۳ تجدیدپذیری[1]

تغییر پذیری در نتیجه به دست آمده از دو آزمون 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.

این مقادیر برای نیاسین به روش A (هیدرولیز اسیدی) عبارتند از:

شیر خشک : $\bar{x}$ =16.66 $mg/100$ g R = 2.04 $mg/100$ g

غلات شکلات : $\bar{x}$ =21.03 $mg/100$ g R = 2.55 $mg/100$ g

گوشت: $\bar{x}$ =16.91 $mg/100$ g R = 1.75 $mg/100$ g

آرد گندم : $\bar{x}$ =0.72 $mg/100$ g R = 0.59 $mg/100$ g

نخود سبز: $\bar{x}$ =5.91 $mg/100$ g R = 3.68 $mg/100$ g

[1] Reproducibility

این مقادیر برای نیاسین به روش B (هیدرولیز آنزیمی) عبارتند از:

شیر خشک :	$\bar{x}$ =17.08 mg/100 g R = 2.07 mg/100 g
غلات شکلات :	$\bar{x}$ =21.24 mg/100 g R = 3.08 mg/100 g
گوشت:	$\bar{x}$ =17.29 mg/100 g R = 3.76 mg/100 g
آرد گندم :	$\bar{x}$ =0.54 mg/100 g R = 0.91 mg/100 g
نخود سبز:	$\bar{x}$ =5.79 mg/100 g R = 1.96 mg/100 g

این مقادیر برای نیاسین به روش C (هیدرولیز اسیدی/ قلیایی) عبارتند از:

غلات صبحانه :	$\bar{x}$ =23.92 mg/100 g R = 11.65 mg/100 g
غلات شکلات :	$\bar{x}$ =16.98 mg/100 g R = 7.02 mg/100 g
شیر خشک:	$\bar{x}$ =5.66 mg/100 g R = 2.82 mg/100 g
آب میوه :	$\bar{x}$ =4.31 mg/100 g R = 0.54 mg/100 g
گوشت با نخود سبز لیوفیلیز شده:	$\bar{x}$ =12.89 mg/100 g R = 6.61 mg/100 g
سوپ لیوفیلیز شده :	$\bar{x}$ =11.06 mg/100 g R = 3.51 mg/100 g

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.

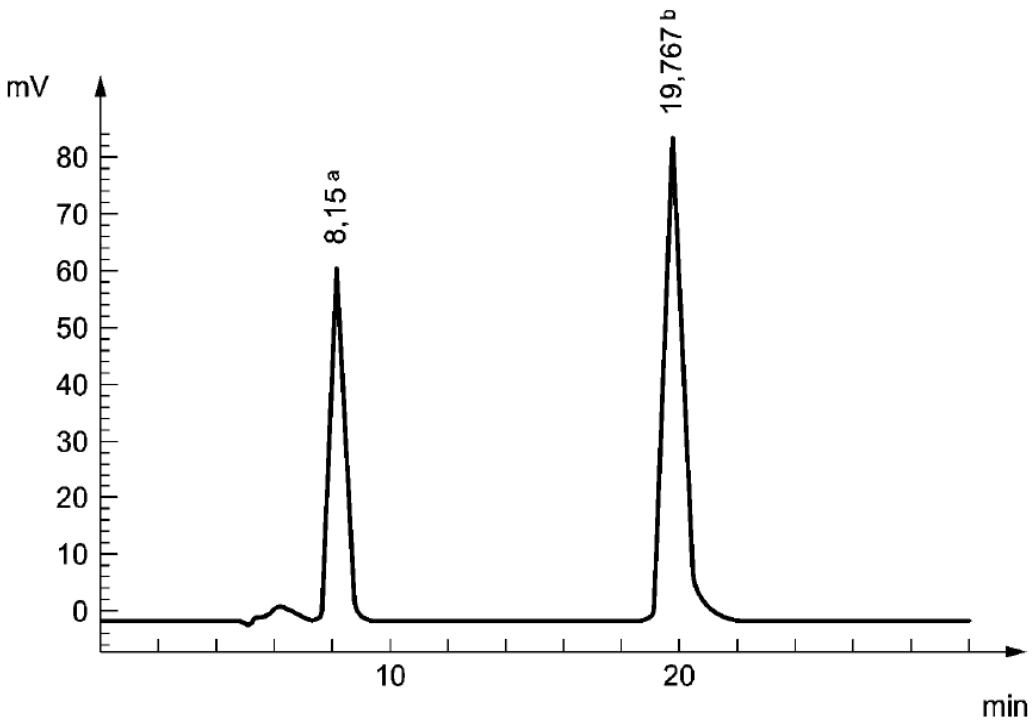
۹-۹ هر گونه کارهای دیگری که در این استاندارد نوشته نشده است یا به طور اختیاری انجام گرفته و ممکن است روی نتایج آزمون موثر باشد.

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

پیوست الف

(اطلاعاتی)

کروماتوگرام عادی



نماد ها:

a نیکوتینیک اسید

b نیکوتین آمید

شرایط آزمایشی برای شکل الف-۱ عبارت است از:

فاز ساکن: ستون مناسب فاز معکوس، اندازه ذرات ۵ µm، قطر ۴ mm و طول ۲۵۰ mm؛

فاز متحرک: بافر فسفات ($c = 0.07$ mol/l)، هیدروژن پراکسید($c = 0.075$ mol/l) ، سولفات مس ($c = 5\times10^{-6}$ mol/l)

شدت جریان: ۱ ml/min؛

حجم تزریق : ۳۰ µl ؛

آشکارسازی : فلوروسنجی؛ طول موج برانگیخته: ۳۲۲ nm و طول موج نشر: ۳۸۰ nm

شکل الف-۱- مثالی از یک سیستم جداسازی HPLC مربوط به محلول‌های استاندارد نیکوتینیک اسید و نیکوتین‌آمید با استفاده ازمشتق‌سازی بعد ستونی

پیوست ب

(اطلاعاتی)

اطلاعات مربوط به دقت (هیدرولیز اسیدی، آنزیمی و اسیدی/ قلیایی)

اطلاعات مربوط به دقت برای اندازه‌گیری نیاسین با روش هیدرولیز اسیدی (روش A) و آنزیمی (روش B) در جداول ب–۱ و ب–۲، که بر اساس استاندارد ISO 5725-2 در سال ۲۰۰۲ طی یک مطالعه مشترک بین‌المللی توسط AéRIAL و CGd'UMA تهیه و تنظیم شده است.

اطلاعات مربوط به دقت برای اندازه‌گیری نیاسین با روش هیدرولیز اسیدی/ قلیایی (روش C) در جدول ب–۳، که براساس استاندارد ISO 5725-2 در سال ۱۹۹۹ طی یک مطالعه مشترک فرانسوی توسط CGd'UMA تهیه و تنظیم شده است.

جدول ب – ۱- اطلاعات مربوط به دقت با روش هیدرلیز اسیدی

نمونه ها	شیر خشک (غنی شده)	غلات شکلات (غنی شده)	گوشت (غنی نشده)	آرد گندم (غنی نشده)	نخود سبز (غنی نشده)
سال آزمون بین آزمایشگاهی	۲۰۰۲	۲۰۰۲	۲۰۰۲	۲۰۰۲	۲۰۰۲
تعداد آزمایشگاه‌ها	۱۲	۱۲	۱۲	۱۲	۱۲
تعداد نمونه‌ها (دوپلیکیت)	۲	۲	۲	۲	۲
تعداد آزمایشگاه‌های باقیمانده پس از حذف آزمایشگاه هایی که نتیجه عملکردشان خارج از محدوده بوده است	۱۱	۱۰	۱۰	۱۲	۱۲
تعداد خارج از محدوده‌ها(آزمایشگاه ها)	۱	۲	۲	صفر	صفر
تعداد نتایج پذیرفته شده	۲۲	۲۰	۲۰	۲۴	۲۴
مقدار میانگین، $\bar{x}$ (mg /100 g)	۱۶٫۶۶	۲۱٫۰۳	۱۶٫۹۱	۰٫۷۲	۵٫۹۱
انحراف معیار تکرارپذیری، S_r (mg /100 g)	۰٫۴۶	۰٫۲۴	۰٫۱۹	۰٫۰۲۸	۰٫۳۳
ضریب پراکندگی تکرارپذیری، RSD_r %	۲٫۸	۱٫۱	۱٫۱	۳٫۹	۵٫۶
حد تکرارپذیری، $r[r=2.83\times S_r]$ (mg /100 g)	۱٫۳۱	۰٫۶۸	۰٫۵۳	۰٫۰۷۹	۰٫۹۳
انحراف معیار تجدید پذیری، S_R (mg /100 g)	۰٫۷۲	۰٫۹۰	۰٫۶۲	۰٫۲۱	۱٫۳۰
ضریب پراکندگی تجدید پذیری، RSD_R %	۴٫۳	۴٫۳	۳٫۷	۲۹٫۲	۲۲٫۰
حد تجدید پذیری، $R[R=2.83\times S_R]$ (mg /100 g)	۲٫۰۴	۲٫۵۵	۱٫۷۵	۰٫۵۹	۳٫۶۸
مقادیر هورات Horrat values	۰٫۶	۰٫۶	۰٫۵	۲٫۵	۲٫۵

جدول ب – ۲- اطلاعات مربوط به دقت با روش هیدرلیز آنزیمی

نمونه ها	شیر خشک	غلات شکلات	گوشت (غنی نشده)	آرد گندم (غنی	نخود سبز (غنی نشده)
سال آزمون بین آزمایشگاهی	۲۰۰۲	۲۰۰۲	۲۰۰۲	۲۰۰۲	۲۰۰۲
تعداد آزمایشگاه‌ها	۱۲	۱۲	۱۲	۱۲	۱۲
تعداد نمونه‌ها (دوپلیکیت)	۲	۲	۲	۲	۲
تعداد آزمایشگاه‌های باقیمانده پس از حذف آزمایشگاه هایی که نتیجه عملکردشان خارج از محدوده بوده است	۱۱	۱۰	۱۱	۱۲	۱۲
تعداد خارج از محدوده‌ها (آزمایشگاه ها)	۱	۲	۱	صفر	صفر
تعداد نتایج پذیرفته شده	۲۲	۲۰	۲۲	۲۴	۲۴
مقدار میانگین، $\bar{x}$ (mg /100 g)	۱۷٫۰۸	۲۱٫۲۴	۱۷٫۲۹	۰٫۵۴	۵٫۷۹
انحراف معیار تکرارپذیری، S_r (mg /100 g)	۰٫۴۹	۰٫۶۲	۰٫۲۵	۰٫۰۱۴	۰٫۱۲
ضریب پراکندگی تکرارپذیری، RSD_r %	۲٫۹	۲٫۹	۱٫۴	۲٫۶	۲٫۰
حد تکرارپذیری، $r[r=2.83\times S_r]$ (mg /100 g)	۱٫۳۹	۱٫۷۵	۰٫۷۰	۰٫۰۴۰	۰٫۳۳
انحراف معیار تجدید پذیری، S_R (mg /100 g)	۰٫۷۳	۱٫۰۹	۱٫۳۳	۰٫۳۲	۰٫۶۹
ضریب پراکندگی تجدید پذیری، RSD_R %	۴٫۳	۵٫۱	۷٫۷	۵۹٫۲	۱۱٫۹
حد تجدید پذیری، $R[R=2.83\times S_R]$ (mg /100 g)	۲٫۰۷	۳٫۰۸	۳٫۷۶	۰٫۹۱	۱٫۹۶
مقادیر هورات Horrat values	۰٫۶	۰٫۷	۱٫۰	۴٫۸	۱٫۴

جدول ب – ۳- اطلاعات مربوط به دقت با روش هیدرلیز اسیدی/قلیایی

نمونه ها	غلات صبحانه (غنی شده)	غلات شکلات (غنی نشده)	پودر گوشت (غنی نشده)	آب میوه (غنی شده)	نخود سبز با گوشت لیوفلیزه (غنی نشده)	سوپ لیوفلیزه (غنی نشده)
سال آزمون بین آزمایشگاهی	۱۹۹۹	۱۹۹۹	۱۹۹۹	۱۹۹۹	۱۹۹۹	۱۹۹۹
تعداد آزمایشگاه‌ها	۱۱	۱۱	۱۱	۱۰	۱۰	۱۰
تعداد نمونه‌ها (دوپلیکیت)	۲	۲	۲	۲	۲	۲
تعداد آزمایشگاه‌های باقیمانده پس از حذف آزمایشگاه هایی که نتیجه عملکردشان خارج از محدوده بوده است	۱۰	۱۱	۹	۸	۱۰	۱۰
تعداد خارج از محدوده‌ها (آزمایشگاه ها)	۱	صفر	۲	۳	صفر	صفر
تعداد نتایج پذیرفته شده	۲۰	۲۲	۱۸	۱۶	۲۰	۲۰
مقدار میانگین، $\bar{x}$ (mg /100 g)	۲۳/۹۲	۱۶/۹۸	۵/۶۶	۴/۳۱	۱۲/۸۹	۱۱/۰۶
انحراف معیار تکرارپذیری، S_r (mg /100 g)	۰/۸۱	۰/۷۹	۰/۳۲	۰/۱۷	۰/۶۳	۰/۱۹
ضریب پراکندگی تکرارپذیری، RSD_r %	۳/۴	۴/۷	۵/۷	۴/۰	۴/۹	۱/۷
حد تکرارپذیری، $r[r=2.83\times S_r]$ (mg /100 g)	۲/۲۹	۲/۲۴	۰/۹۲	۰/۴۹	۱/۷۸	۰/۵۳
انحراف معیار تجدید پذیری، S_R (mg /100 g)	۴/۱۱	۲/۴۸	۰/۹۹	۰/۱۹	۲/۳۴	۱/۲۴
ضریب پراکندگی تجدید پذیری، RSD_R %	۱۷/۲	۱۴/۶	۱۷/۶	۴/۵	۱۸/۱	۱۱/۲
حد تجدید پذیری، $R[R=2.83\times S_R]$ (mg /100 g)	۱۱/۶۵	۷/۰۲	۲/۸۲	۰/۵۴	۶/۶۱	۳/۵۱
مقادیر هورات Horrat values	۲/۵	۲/۰	۲/۰	۰/۵	۲/۴	۱/۴

پیوست پ

(اطلاعاتی)

مقایسه بین سه روش مختلف هیدرولیز

جدول پ–۱ میزان نیاسین به دست آمده در نمونه های مختلف را پس از هیدرولیز به سه روش مختلف، هیدرولیز اسیدی (A) و هیدرولیز آنزیمی (B) و هیدرولیز اسیدی/ قلیایی(C)، نشان می‌دهد.

جدول پ– ۱- مقایسه میزان نیاسین کل با سه روش مختلف هیدرولیز

نمونه ها	A	B	C
	به میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم		
غذای غیر مکمل			
جگر گوسفند	۵۱٫۶	۵۷٫۸	۴۳٫۰
گوشت	۱۶٫۹	۱۷٫۱	
زرده تخم مرغ خشک شده	۰٫۰۵	۰٫۰۵	۰٫۲۶
نخود سبز ۱	۷٫۲	۶/۴	۸/۷
نخود سبز ۲	۵٫۹	۵/۷	
آرد گندم ۱	۰٫۸	۰٫۵	۲٫۴
آرد گندم ۲	۰٫۷	۰٫۵	
مخمر خشک شده آبجو	۱۳٫۹	۱۳٫۴	۱۷٫۷
برنج ۱	۱٫۳	۱٫۳	۳٫۶
برنج ۲	۰٫۴	۰٫۳	۳٫۲
فراورده با فیبر بالا	۱٫۱	۱٫۱	۳٫۷
غذای مکمل			
پودر شکلات ۱	۲٫۱	۲٫۷	۱٫۲
پودر شکلات ۲	۰٫۴	۰٫۸	۰٫۷
پودر شیر ۱	۸٫۲	۷٫۹	۹٫۳
پودر شیر ۲	۱۶٫۷	۱۷٫۱	
پودر شیر ۳	۴٫۲	۴٫۳	۳٫۵
آب میوه	۰٫۳	۰٫۳	۰٫۳
غلات صبحانه ۱	۲۰٫۰	۱۹٫۶	۱۹٫۰
غلات صبحانه ۲	۲۱٫۰	۲۱٫۲	
غلات صبحانه ۳	۲۱٫۹	۲۰٫۷	۱۹٫۹
غلات صبحانه ۴	۱۲٫۵	۱۲٫۳	۱۲/۰
غلات صبحانه ۵	۱۶٫۱	۱۸٫۱	۱۶٫۵
غلات صبحانه ۶	۱۵٫۴	۱۵٫۶	۱۵٫۲
آرد برای غذای کودک	۴٫۰	۴٫۳	۴٫۷

جدول پ– ۱- مقایسه میزان نیاسین کل با سه روش مختلف هیدرولیز (ادامه)

نمونه ها	A	B	C
	به میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم		
Dietetic bars	۱۵٫۴	۱۶٫۴	۱۵٫۴
پودر حاوی پروتئین بالا ۱	۹٫۴	۱۱٫۴	۹٫۷
پودر حاوی پروتئین بالا ۲	۱۰٫۷	۱۰٫۳	۹٫۰
پودر حاوی پروتئین بالا ۳	۱۰٫۵	۱۰٫۰	۱۰٫۸
Meal substitute	۱۵٫۷	۱۵٫۴	۱۳٫۵
غذای مکمل ۱	۲۰۰۴	۲۱۹۷	۲۲۰۳
غذای مکمل ۲	۴۸۷	۵۰۵	۴۹۳
غذای مکمل ۳	۲۲۳۶	۲۴۹۸	۲۱۹۹
غذای مکمل ۴	۱۰۴۴	۱۲۰۱	۱۱۱۲
غذای مکمل ۵	۴۷٫۵	۴۷٫۴	۴۵٫۷

پیوست ت
(اطلاعاتی)
کتابنامه

[1] To be published: Bergantzlé M., *Validation study on the determination of niacin by HPLC in several matrices*.

[2] Lahély S., Bergantzlé M., Hasselmann, C.: *Fluorimetric determination of niacin in foods by highperformance liquid chromatography with post-column derivatization*, Food chem., 65, 129-133 (1999).

[3] Carter E.G.A. & Carpenter K.J.: *The available niacin values of foods for rats and their relation to analytical values*. Journal of Nutrition, 112, 2091-2103 (1982).

[4] Carter E.G.A. & Carpenter K.J.: The *bioavailability for humans of bound niacin from wheat bran*. American Journal of Clinical Nutrition, 36, 855-861 (1982).

[5] Van Niekerk P.J., Smit C.C.S., Strydom, S.P., and Armbruster, G.: *Comparison of a high-performance liquid chromatographic and microbiological method for the determination of niacin in foods*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 32, 304-307 (1984).

[6] *UV and IR specktren wichtiger pharmazeutisher Wirkstoffe*, Hans Werner Dibbern, Edition Cantor Aulendorg, 1978.

[7] Mawatari, K., Iinuma, F., Watanabe, M.: *Determination of nicotinic acid and nicotinamide in human serum by high-performance liquid chromatography with post-column ultraviolet irradiation and fluorescence detection*, Anal. Sci., 7, 733-736 (1991).

[8] Horwitz, W.: *Evaluation of Analytical Methods used for Regulation of Foods and Drugs*, Anal. Chem. 1982, 54 (1), 67A–76A.

[9] http://www.minefi.gouv.fr/dgccrf/01_presentation/activites/labos/2003/vitab3.htm

[10] ISO 5725-2, *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method*.