Утверждена
Зам.начальника Главного
Санитарно-эпидемиологического
Управления Минздрава СССР
Заиченко А.И.

« 10 » июля 1987 г.
№ 4400-87

ИНСТРУКЦИЯ

ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ВИТАМИНА *А* и *β*-КАРОТИНА В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

РАЗРАБОТАНА в Институте питания АМН СССР лабораторией витаминизации пищевых продуктов

gost.e-ecolog.ru

Колориметрический метод определения витамина А с треххлористой сурьмой широко используется для определения содержания витамина А в пищевых продуктах как в нашей стране, так и за рубежом. Для определения содержания β-каротина (провитамина А) применяют спектрофотометрический метод после отделения его от каротиноидов на окиси алюминия или других адсорбентах.

Методы прошли широкую апробацию в различных лабораториях отраслевых институтов пищевой промышленности и кафедр гигиены питания медицинских институтов, одобрены Минздравом СССР и рекомендованы для практического использования «Междуведомственной комиссией по составлению таблиц «Химический состав пищевых продуктов».

Принцип метода определения витамина А.

Метод основан на реакции витамина *А* с треххлористой сурьмой в хлороформе с образованием синей окраски, интенсивность которой прямо пропорциональна содержанию витамина *А*. Предварительно проводят щелочной гидролиз жира, экстракцию витамина *А* органическим растворителем и отделение его от других соединений с помощью адсорбционной хроматографии.

Принцип метода определения β -каротина

Метод основан на измерении интенсивности светопоглощения растворов β-каротина. Как соединения с сопряженными двойными связями каротиноиды имеют характерные спектры поглощения в видимой области. β-Каротиды экстрагируют органическим растворителем, отделяют от других каротиноидов с помощью адсорбционной хроматографии и измеряют поглощение его растворов на спектрофотометре при 450-452 нм.

При анализе молока, мяса, рыбы и блюд из них, приготовляемых без добавления растительных продуктов, возможно определение витамина А и β-каротина из одного экстракта после их разделения на одной колонке с окисью алюминия. При анализе продукта, состоящего из животного и растительного сырья, определение витамина А и β-каротина возможно из одного экстракта, но после выделения этих соединений на разных колонках.

Оборудование

Весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания 200 г, поверочной ценой деления не более 0,5 мг; весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания 500 г, поверочной ценой деления не более 50 мг; роторный испаритель; водяная баня с закрытым электрическим обогревом; фотоэлектроколориметр; спектрофотометр; гомогенизатор; шкаф сушильный.

Посуда

Ступка с пестиком; воронки фильтровальные 3, 5-7,5 см; воронки делительные вместимостью 250-500 $см^3$; колбы мерные вместимостью 50 и 100 $см^3$; колбы конические вместимостью 100 и 250 $см^3$; колбы круглодонные вместимостью 50, 100, 250, 500 $см^3$ со шлифом 14,5 и 29 мм; холодильник обратный, водяной со шлифом 14мм; хроматографическая колонка – стеклянная трубка длиной 9-11 см, внутренний диаметр 10 мм, в нижний конец колонки впаяна трубка с внутренним диаметром 5-6 мм, постепенно суживающаяся до 1,5-2,0 мм, колонка заканчивается отводом для создания разрежения и шлифом 14.5; пробирки со шлифом 14,5 градуированные на 5, 10, 15 $см^3$; пипетки градуированные на 1, 2, 5 и 10 $см^3$; микропипетки градуированные на 0,1 и 0,2 $см^3$; цилиндры мерные на 50, 100, 200 $см^3$; стаканы на 50, 100, 250 $см^3$.

Реактивы

Ретинола ацетат (Госфармакопея СССР, 10 изд., ст.578); аскорбиновая кислота (Госфармакопея СССР, 10 изд., ст.); алюминия окись по Брокману II, нейтральная; калия гидроокись; натрий сернокислый безводный; сурьма треххлористая; фенолфталеин; ацетон; гексан; спирт этиловый ректификованный; уксусный ангидрид; хлороформ; эфир этиловый; бумага фильтровальная. При работе с эфиром, ацетоном, гексаном, хлороформом соблюдать правила техники безопасности с органическими растворителями.

Приготовление реактивов

1. Стандартные растворы ретинола ацетата с массовой концентрацией 2900 МЕ/см^3 и 58 МЕ/см^3. Растворяют 0,1000 г ретинола ацетата в мерной колбе на 100 см^3 в хлороформе и доводят хлороформом до метки (раствор с массовой концентрацией 2900 МЕ/см^3). Для приготовления раствора 58 МЕ/см^3 1 см^3 раствора с концентрацией 2900 МЕ/см^3 вносят в мерную колбу вместимостью 50 см^3 и доводят до метки хлороформом. Соединения ретинола ацетата очень неустойчивы к кислороду воздуха и свету, поэтому растворы готовят сразу при вскрытии ампулы и в день построения калибровочного графика.

2. Раствор треххлористой сурьмы (реагент Карр-Прайса). Отвешивают 20 г $SbCl_3$ в коническую колбу вместимостью 250 см^3, в которую предварительно отмерено 100 см^3 хлороформа (в случае большой навески после взвешивания добавляют необходимое количество хлороформа) и растворяют при слабом (не выше 40 ^{0}C) нагревании на водяной бане, периодически встряхивая. Раствор охлаждают, добавляют 2-3 см^3 уксусного ангидрида, колбу плотно закрывают и оставляют на ночь для отстаивания. Затем прозрачный раствор осторожно сливают в темную склянку с плотно закрывающейся крышкой. $SbCl_3$ токсична и коррозионна, необходимо защищать от попадания на кожу, в глаза, дыхательные пути.

3. Раствор гидроокиси калия 50% 50 г КОН растворяют в 50 см^3 дистиллированной воды.

4. Окись алюминия. Для приготовления окиси алюминия определенной степени активности отвешивают в бюксе 6 г адсорбента и ставят в сушильный шкаф (t = 160-180 ^{0}C) на 60-90 мин. Затем окись алюминия дезактивируют, быстро добавляя воду микропипеткой с массовой долей 1% (0,06 см^3) или 3% (0,18 см^3). Бюкс закрывают крышкой и встряхивают до тех пор, пока масса не станет однородной. Подготавливают адсорбент и заполняют им колонку перед нанесением на нее исследуемого раствора.

5. Растворы ацетона в гексане 4:4; 10,15% (объем/объем).

6. Раствор фенолфталеина (спиртовой) с массовой концентрацией 1%.

Ход определения. 1. Щелочной гидролиз.

Интервал определяемых массовых концентраций витамина А составляет 1,5 – 10 М.Е. (0.4 – 3,0 мкг)/см^3 хлороформного экстракта, используемого для реакции с треххлористой сурьмой. Массу навески продукта и последующее разведение рассчитывают исходя из интервала указанных концентраций. Масса навески продукта должна находиться в диапазоне 1 – 20 г с массовой концентрацией витамина А 2 – 20 мкг.

Массу образца помещают в круглодонную колбу вместимостью 100 или 250 см^3, соединенную шлифом с обратным водяным холодильником, добавляют 40 – 60 см^3 этилового спирта, 0,1 – 0,2 г аскорбиновой кислоты и 50%-ный раствор КОН. Доля добавляемого раствора КОН зависит от вида продукта и от массовой доли и состава в нем жира. При анализе продукта с низкой массовой долей жира (менее 6%) и витамина А (мясо, рыба и готовые блюда из них) на 10 г массы образца добавляют 2 -4 см^3 раствора КОН. При более высокой массовой доле жира в этих продуктах на 10 г образца добавляют 6 – 10 см^3 раствора КОН. Для продуктов с более высокой массовой долей витамина А (яйцо, творог и готовые блюда из них) и жира >10% на массу образца 5-7 г берут 5-7 см^3 щелочи. При

анализе молока и молочных продуктов с низкой массовой долей жира и витамина А массу навески увеличивают до 20 г, щелочь добавляют 5-7 $см^3$. Для продуктов с высокой массовой долей жира 30% и выше (сыры, масло сливочное и др.) на массу образца 3-5 г берут 4-8 $см^3$ щелочи.

После добавления щелочи смесь нагревают на водяной бане с обратным водяным холодильником при температуре кипения смеси в течение 30 мин. Затем смесь охлаждают и переливают в делительную воронку. В воронку добавляют воду, чтобы окончательная концентрация этилового спирта была около 30-35%. Признаком полного окисления служит то, что после добавления воды смесь остается прозрачной. При образовании мути увеличивают массовую долю щелочи при омылении.

2. Экстрагирование.

Неомыляемый остаток экстрагируют этиловым эфиром 4 раза, сначала объемом эфира, равным объему добавленной воды, а затем объемами на 20% меньшими. Ополаскивают эфиром колбу после окисления. Объединенный эфирный экстракт отмывают от щелочи водой по фенолфталеину (при добавлении фенолфталеина промывная вода не должна окрашиваться). Экстракт фильтруют через слой безводного сернокислого натрия в круглодонную колбу роторного испарителя вместимостью 250 или 500 $см^3$ медленно, чтобы над сернокислым натрием не образовывался слой раствора, сернокислый натрий промывают эфиром. Затем эфир отгоняют под вакуумом и неомыляемый остаток растворяют в 5 $см^3$ гексана.

3. Хроматография.

В суконный конец хроматографической колонки помещают капроновую ткань, промытую гексаном. Затем непрерывной струей насыпают в колонку окись алюминия с массовой долей воды 3% (см. «Приготовление реактивов»), уплотняя ее легким постукиванием по колонке стеклянной палочкой. На верх адсорбента добавляют слой безводного сульфата натрия (0,5 – 1,0 см). Подготовленную колонку промывают 10 $см^3$ гексана и наносят 5 $см^3$ испытуемого экстракта. Затем снова пропускают 10 $см^3$ гексана (фракция 1). При анализе продуктов, не содержащих растительные продукты (молочные, мясные и т.д.) после гексана пропускают через колонку раствор ацетона в гексане с массовой долей 4%, до тех пор, пока элюат не станет бесцветным (фракция 2). В этом случае фракцию 1 и 2 объединяют, выпаривают под вакуумом на ротационном испарителе, остаток растворяют в гексане (5-10 $см^3$) и в растворе определяют β-каротин (V1).

При анализе образца, содержащего продукты животного и растительного происхождения после гексана через колонку пропускают раствор ацетона в гексане с массовой концентрацией 10% (30 см витамина А элюируют последующим пропусканием через колонку 30 $см^3$ раствора ацетона в гексане с массовой концентрацией 15% (фракция 3). Пропускают раствор через колонку при небольшом разрешении (2,5-3,0 $см^3$/мин). Фракцию 3, содержащую витамин А, выпаривают в роторном испарителе под вакуумом и растворяют остаток в хлороформе (2-6 $см^3$) (V2).

4. Определение витамина А.

1). Проведение определения. Вносят 0,4 см3 хлороформного раствора витамина А в кювету, помещают ее в кюветодержатель фотоэлектроколориметра, добавляют 4 см3 раствора треххлористой сурьмы и быстро измеряют оптическую плотность, так как окраска неустойчива и начинает исчезать через 5-6 сек. Измерение проводят при длине волны 620 нм. После измерения наблюдают за окраской раствора: синяя окраска должна исчезнуть и после этого раствор не должен быть окрашенным или мутным. Помутнение возможно в случае попадания воды с испытуемым раствором или с раствором сурьмы. Наличие окраски раствора через 15 сек после проведения реакции свидетельствует о недостаточно пол-

ном отделении витамина А от мешающих соединений. И в том и другом случае анализ необходимо повторить, учтя вышеуказанные замечания.

2). Построение калибровочного графика. Из стандартного раствора ретинола ацетата с массовой концентрацией 58 МЕ/см^3 готовят разведения с массовой концентрацией 1.2 МЕ/см^3 (1 см^3 стандартного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 см3 и доводят объем до метки хлороформом); 2.9 МЕ/см^3 (0,5 см^3 стандартного раствора помещают в градуированную пробирку на 10 см^3 и доводят объем хлороформом до 10 см^3); 5.8 МЕ/см^3 (1 см^3 стандартного раствора помещают в градуированную пробирку на 10 см^3 и доводят объем хлороформом до 10 см^3); 11,6 МЕ/см^3 (1 см^3 стандартного раствора помещают в градуированную пробирку на 5 см^3 и доводят объем хлороформом до 5 см^3). Приготовленные растворы хорошо перемешивают. Из каждого разведения отбирают по 0.4 см^3 раствора и проводят колориметрическую реакцию так же, как при анализе испытуемых растворов. Для построения калибровочного графика по оси ординат откладывают полученные значения оптической плотности, а по оси абсцисс – соответствующие им количества витамина А в 1 см^3 раствора в МЕ.

3). Расчет. Массовую долю витамина А в мг на 100 г продукта вычисляют по формуле:

$$X = \frac{K * V2 * 100}{3300 * a}, \qquad (1)$$

где К - массовая концентрация витамина А в 1 см^3 испытуемого раствора, определяемая по стандартной кривой, МЕ; V_2 - общий объем раствора в хлороформе, см^3; 100 – пересчет на 100 г продукта; 3300 пересчет на МЕ в мг; а – масса образца, г.

Вычисление проводят до третьего десятичного знака. За конечный результат принимают среднее арифметическое двух параллельных определений. Расхождение между двумя параллельными определениями не должно превышать 15% от среднего арифметического значения.

5. Определение β-каротина

1) Экстрагирование каротина из растительного материала (свежие и сухие овощи, плоды, ягоды).

Интервал определяемых концентраций β-каротина составляет 0,1 -1 мкг/см^3 раствора, оптическую плотность которого измеряют на спектрофотометре. Массу навески продукта (1-15 г с массовым содержанием β-каротина 0.01-0,05 мг) и последующее разведение рассчитывают исходя из интервала указанных концентраций.

Массу исследуемого образца, взятую из средней пробы, переносят в ступку или стакан смесителя, добавляют 0,1 – 0,2 г аскорбиновой кислоты и растирают с небольшим количеством измельченного стекла или гомогенизируют в смеси ацетон – гексан (1 : 1). Затем смеси дают отстояться и сливают прозрачный экстракт в дополнительную воронку. Экстракцию повторяют до тех пор, пока раствор не станет бесцветным. Отмывают объединенный экстракт от ацетона 3 раза порциями воды, равными объему ацетона, использованного при экстракции. Экстракт фильтруют через слой сернокислого безводного натрия в круглодонную колбу от роторного испарителя вместимостью 250 или 500 см^3 медленно и промывают слой сернокислого натрия на фильтре 2 раза небольшими порциями гексана. Выпаривают гексан на роторном испарителе до объема 4-5 см^3, если раствор интенсивно окрашен, его не выпаривают и измеряют объем раствора (V1).

2) Хроматография β-каротина при анализе растительного сырья. В хроматографическую колонку непрерывной струей насыпают окись алюминия, с массовой долей воды 1%, уплотняя ее легким постукиванием по колонке стеклянной палочкой. На верх адсорбента добавляют слой безводного сернокислого натрия высотой 0.5-1.0 см. Колонку промывают 10 см^3 гексана и наносят 5 см^3 раствора β-каротина в гексане, полученного раздел

2 при анализе продуктов из животного и растительного сырья или раздел 5.1 (в дальнейшем необходимо следить, чтобы верхний слой колонки был всегда покрывают раствором). Каротиноиды на высоте колонки (сверху вниз) располагаются в следующем порядке: хлорофилл, ксантофиллы, ликопин и каротины (бета и альфа). α- и β- каротины из всех каратиноидов обладают на окиси алюминия наименьшей адсорбционной способностью и их элюируют, пропуская 10 см3 гексана или пропуская после гексана раствор ацетата в гексане с массовой концентрацией 1% до тех пор, пока вытекающий с колонки раствор не станет бесцветным. После элюирования каротина с колонки измеряют объем элюата (V1).

3). Спектрофотометрическое определение β-каротина и расчет на спектрофотометре. Определяют оптическую плотность раствора β-каротина в гексане, полученных в разделах 3 и 5.2, при длине волны 450 – 455 нм и рассчитывают содержание, используя коэффициент удельного поглощения $E^{1\%}_{1см}$

Массовую долю β-каротина в мг на 100 г продукта вычисляют по формуле:

$$X = \frac{10 * Д * V1 * 100}{E\%см * a}, \qquad (2)$$

где 10 – содержание каротина в 1 $см^3$ 1%-ного раствора, мг; Д – оптическая плотность испытуемого раствора, $см^3$; V1 – объем элюата, $см^3$; 100 – пересчет на 100 г продукта; E%см = 2580; а – навеска.

При анализе растительного материала массовую долю β-каротина в мг на 100 г продукта вычисляют по формуле:

$$X = \frac{10 * Д * V1 * V3 * 100}{E\%см * 5 * a}, \qquad (3)$$

где V3 – общий объем испытуемого раствора, $см^3$; 5 – объем раствора нанесенный на колонку, $см^3$; остальные обозначения те же, что и к формуле (2).

Полноту отделения β-каротина от ликопина проверяют путем снятия спектра при длинах волн 420-430 нм с интервалами 5 нм. Если полученные максимумы соответствуют максимуму поглощения для β-каротина в гексане (450-451, 475 нм) то, следовательно β-каротин отделен от ликопина.

Вычисление проводят до третьего десятичного знака. За конечный результат принимают среднее арифметическое двух параллельных определений. Расхождение между двумя параллельными определениями не должно превышать 15% от среднего арифметического.

gost.e-ecolog.ru