ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СОКИ ФРУКТОВЫЕ И ОВОЩНЫЕ

Метод определения содержания общих каротиноидов и их фракционного состава

Издание официальное

БЗ 12—99/619

ГОССТАНДАРТ РОССИИ
Москва

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Всероссийским научно-исследовательским институтом консервной и овощесушильной промышленности (ВНИИКОП)

ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 93 «Продукты переработки плодов и овощей»

2 ПРИНЯТ И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Госстандарта России от 22 декабря 1999 г. № 598-ст

3 Стандарт гармонизирован с европейским стандартом ЕН 12136:1997 «Соки фруктовые и овощные. Определение содержания общих каротиноидов и их фракционного состава»

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

© ИПК Издательство стандартов, 2000

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Госстандарта России

Содержание

1 Область применения . . . . .
2 Нормативные ссылки . . . . .
3 Определения и обозначения . . . . .
4 Сущность метода. . . . . .
5 Средства измерений, лабораторное оборудование, реактивы и материалы . . . . .
6 Отбор и подготовка проб. . . . . .
7 Подготовка к проведению испытаний . . . . .
8 Проведение испытаний . . . . .
9 Обработка и оформление результатов . . . . .
Приложение А Библиография . . . . .

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СОКИ ФРУКТОВЫЕ И ОВОЩНЫЕ

Метод определения содержания общих каротиноидов и их фракционного состава

Fruit and vegetable juices.
Method for determination of total carotinoid content and content of individual carotinoid fractions

Дата введения 2001—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на фруктовые и овощные соки и подобные им продукты и устанавливает метод определения массовой концентрации или массовой доли общих каротиноидов и их фракционного состава.

Диапазон определения массовой концентрации каротиноидов — от 1 до 60 мг/дм^3, массовой доли — от 1 до 60 мг/кг, массовых долей отдельных фракций каротиноидов — от 3 до 60 % содержания общих каротиноидов.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 1770—74 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Технические условия

ГОСТ 2603—79 Ацетон. Технические условия

ГОСТ 4166—76 Натрий сернокислый. Технические условия

ГОСТ 4174—77 Цинк сернокислый 7-водный. Технические условия

ГОСТ 4207—75 Калий железистосинеродистый 3-водный. Технические условия

ГОСТ 5789—78 Толуол. Технические условия

ГОСТ 24104—88 Весы лабораторные общего назначения и образцовые. Общие технические условия

ГОСТ 25336—82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 26313—84 Продукты переработки плодов и овощей. Правила приемки, методы отбора проб

ГОСТ 26671—85 Продукты переработки плодов и овощей, консервы мясные и мясорастительные. Подготовка проб для лабораторных анализов

ГОСТ 29169—91 (ИСО 648—77) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной отметкой

ГОСТ 29227—91 (ИСО 835-1—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

ГОСТ Р 51431—99 Соки фруктовые и овощные. Метод определения относительной плотности

ИСО 3696—87* Вода для лабораторного анализа. Технические условия и методы испытаний

* Действует до введения в действие ГОСТ Р, разработанного на основе стандарта ИСО.

Издание официальное

3 Определения и обозначения

3.1 Определения

В настоящем стандарте применяют следующие термины с соответствующими определениями:

3.1.1 **фракция I каротиноидов (в основном углеводороды):** Вещества, элюируемые петролейным эфиром, как описано в 8.3.

3.1.2 **фракция II каротиноидов (эфиры криптоксантина):** Вещества, элюируемые смесью А, как описано в 8.3.

3.1.3 **фракция III каротиноидов (эфиры ксантофилла):** Вещества, элюируемые смесью Б, как описано в 8.3.

3.1.4 **фракция IV каротиноидов:** Вещества, элюируемые ацетоном, как описано в 8.3.

3.2 Обозначения

В настоящем стандарте используют следующее обозначение:

g — ускорение силы тяжести.

4 Сущность метода

Метод основан на количественном адсорбционном осаждении каротиноидов цинком гексаноферратом (II) при обработке растворами Карреза I и Карреза II, экстракции каротиноидов из осадка ацетоном и переэкстракции их петролейным эфиром с последующим спектрофотометрическим определением содержания общих каротиноидов (в пересчете на β-каротин). Спектрофотометрическое определение относительного содержания отдельных фракций каротиноидов осуществляется после их разделения с помощью хроматографической колонки с оксидом алюминия.

5 Средства измерений, лабораторное оборудование, реактивы и материалы

Спектрофотометр с диапазоном измерения, позволяющим проводить исследования при длине волны 450 нм, с допустимой абсолютной погрешностью измерений коэффициента пропускания не более 1 %; кюветы стеклянные или кварцевые, не имеющие существенного поглощения при длине волны 450 нм, рабочей длиной 10 мм.

Центрифуга, обеспечивающая ускорение 2000 g на дне центрифужной пробирки.

Примечание — Скорость вращения ротора центрифуги n, мин$^{-1}$, необходимую для создания требуемого ускорения, рассчитывают по формуле

$$n = 95{,}5\sqrt{\frac{F \cdot g}{r}}, \qquad (1)$$

где F — фактор разделения (отношение создаваемого центрифугой ускорения к ускорению силы тяжести g);

g — ускорение силы тяжести, м/сек^2 (g = 9,81 м/сек^2);

r — радиус центрифуги, измеряемый от средней точки (оси центрифуги) до дна центрифужной пробирки, когда пробирка при вращении находится в горизонтальном положении, см.

Центрифужные пробирки вместимостью от 60 до 100 см^3.

Хроматографическая колонка длиной от 250 до 300 мм внутренним диаметром 20 мм, снабженная запорным краном из полиэтилентетрафталата (ПЭТФ).

Ротационный вакуумный испаритель.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ: поскольку анализ предусматривает использование летучих пожароопасных растворителей, применяемая электрическая аппаратура должна отвечать установленным нормам, связанным с опасностью использования таких растворителей.

Весы лабораторные общего назначения по ГОСТ 24104 с наибольшим пределом взвешивания 200 г 2-го класса точности.

Колбы мерные по ГОСТ 1770 вместимостью 50 и 100 см^3.

Цилиндры мерные по ГОСТ 1770 исполнения 2 вместимостью от 10 до 250 см^3.

Воронка делительная по ГОСТ 25336 вместимостью 250 см^3.

Пипетки по ГОСТ 29227 вместимостью от 1 до 25 см^3.

Пипетки по ГОСТ 29169 вместимостью от 5 до 50 см^3.

Колба круглодонная по ГОСТ 25336 типа К вместимостью 250 см^3.

Колба коническая по ГОСТ 25336 типа Кн исполнения 1 вместимостью 250 см^3.

Калий железистосинеродистый 3-водный [$K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$] по ГОСТ 4207, ч. д. а. Раствор Карреза I: 15 г калия гексацианоферрата (II) растворяют в воде и доводят водой до 100 см^3.

Цинк сернокислый 7-водный ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) по ГОСТ 4174, ч. д. а. Раствор Карреза II: 30 г 7-водного сульфата цинка растворяют в воде и доводят водой до 100 $см^3$.

Натрий сернокислый безводный (Na_2SO_4) по ГОСТ 4166, ч. д. а.

Ацетон (CH_3COCH_3) по ГОСТ 2603, ч. д. а.

Толуол ($C_6H_5CH_3$) по ГОСТ 5789, ч. д. а.

Петролейный эфир с температурой кипения от 40 до 60 °С, очищенный на колонке, заполненной оксидом алюминия Al_2O_3.

Оксид алюминия (Al_2O_3) нейтральный, активированный, 1-й степени активности, для колоночной хроматографии и адсорбционного фильтрования, ч. д. а. [1].

Вода для лабораторного анализа по ИСО 3696 не ниже 3-й категории.

Допускается использование других средств измерений, лабораторного оборудования, реактивов и материалов с техническими и метрологическими характеристиками не ниже указанных.

6 Отбор и подготовка проб

6.1 Отбор проб — по ГОСТ 26313.

6.2 Подготовка проб — по ГОСТ 26671.

Концентрированные продукты разводят водой до заданного значения относительной плотности в соответствии с нормативным или техническим документом на конкретный вид продукта. Определяют относительную плотность разбавленного продукта по ГОСТ Р 51431 и ее значение указывают в протоколе.

7 Подготовка к проведению испытаний

7.1 Приготовление смесей элюентов

Смесь А готовят смешиванием четырех объемов петролейного эфира с одним объемом толуола.

Смесь Б готовят смешиванием двух объемом петролейного эфира с одним объемом толуола.

7.2 Приготовление частично деактивированного оксида алюминия

100 г активированного оксида алюминия помещают в колбу с притертой пробкой, добавляют 12 $см^3$ воды и тщательно встряхивают до тех пор, пока не будет получена тонкая однородная смесь. Колбу плотно закрывают пробкой и оставляют на 2 ч.

Деактивированный оксид алюминия имеет степень активности IV—V уровня. Поскольку степень активности изменяется при длительном хранении, требуемые количества должны быть использованы в течение 2—24 ч с момента приготовления.

8 Проведение испытаний

8.1 Условия проведения испытаний

Каротиноиды чувствительны к свету и теплу, поэтому анализы должны проводиться в месте, защищенном от прямого солнечного света и ультрафиолетового излучения.

8.2 Определение содержания общих каротиноидов

Проводят два параллельных определения.

Взятую с помощью пипетки пробу исследуемого продукта объемом от 5 до 50 $см^3$ (V_1) или навеску продукта массой от 5 до 50 г (m), хорошо перемешанную, переносят в центрифужную пробирку, разбавляют, если это необходимо, водой до 50 $см^3$, добавляют по 1 $см^3$ раствора Карреза I и раствора Карреза II, каждый раз тщательно перемешивая содержимое, и выдерживают примерно 2 мин, после чего центрифугируют при ускорении 2000 g в течение приблизительно 5 мин.

Примечание — Оптическая плотность конечного экстракта, объем которого доводят до 100 $см^3$, не должна превышать 0,5 единиц. Чтобы достигнуть этого, необходимо предварительно отрегулировать объем отбираемой для анализа пробы продукта. В качестве отправной точки можно указать следующие объемы пробы: 25 $см^3$ — для апельсинового сока, 50 $см^3$ — для апельсинового нектара, от 5 до 20 $см^3$ — для сока из плодов пассифлоры, 25 $см^3$ — для нектара из плодов пассифлоры, 20 $см^3$ — для мандаринового сока.

Почти бесцветный надосадочный раствор декантируют и отбрасывают.

К осадку в центрифужной пробирке добавляют 40 $см^3$ ацетона, тщательно перемешивают стеклянной палочкой и продолжают перемешивание примерно 3 мин. Смесь центрифугируют примерно 5 мин и декантируют желтый надосадочный слой ацетона в делительную воронку.

Повторяют экстракцию из осадка в центрифужной пробирке с помощью новой порции ацетона объемом 20 $см^3$ и повторяют все прежние операции, собирая после центрифугирования надосадочный органический экстракт в делительную воронку. Обычно оказывается достаточным однократное

повторение процесса экстракции. Если необходимо, экстракция может быть повторена большее число раз.

Примечание — Если приходится проводить экстракцию больше чем в два этапа, следует остерегаться образования эмульсии. Если имеется опасность неполной экстракции, рекомендуется начать процедуру с самого начала, используя меньший объем или массу исследуемой порции продукта.

С помощью мерного цилиндра в делительную воронку вносят 50 $см^3$ петролейного эфира. Воронку с содержимым интенсивно встряхивают и дают возможность смеси отстояться в течение небольшого промежутка времени, чтобы отделить органическую фазу.

Водную фазу объемом примерно 10 $см^3$ отбрасывают.

Органическую фазу промывают 50 $см^3$ воды, осторожно взбалтывая экстракт. Как только исчезнет слабое эмульгирование, которое может образоваться во время взбалтывания, отбрасывают водную фазу.

Переносят органическую фазу в центрифужную пробирку, содержащую 2 г безводного сульфата натрия, используемого в качестве обезвоживающего агента. Смесь хорошо перемешивают стеклянной палочкой и центрифугируют. Фазу петролейного эфира аккуратно сливают в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$.

Осадок в центрифужной пробирке суспензируют в свежей порции петролейного эфира объемом 30 $см^3$, перемешивая стеклянной палочкой, и снова центрифугируют. Добавляют полученную слабоокрашенную фракцию петролейного эфира к первой порции экстракта и доводят петролейным эфиром объем до 100 $см^3$ (V_2).

Измеряют оптическую плотность полученного раствора при длине волны 450 нм в кювете с оптическим промежутком 10 мм; в качестве раствора сравнения используют петролейный эфир.

8.3 Определение содержания отдельных фракций каротиноидов

Суспензируют от 28 до 30 г частично деактивированной окиси алюминия (по 7.2) примерно в 30 $см^3$ петролейного эфира и помещают суспензию в хроматографическую колонку, предварительно закупоренную небольшим тампоном из стеклянной ваты и частично заполненную петролейным эфиром. Петролейный эфир спускают до тех пор, пока уровень его не установится непосредственно над поверхностью слоя окиси алюминия. Для того чтобы защитить заполнитель колонки от образования в нем пузырьков, принимают меры к тому, чтобы температуры петролейного эфира и окиси алюминия значительно не различались между собой. Высота слоя, заполняющего колонку, должна быть примерно 8 см.

Экстракты общих каротиноидов в петролейном эфире, полученные по 8.2, количественно переносят в круглодонную колбу вместимостью 250 $см^3$ и удаляют растворитель при температуре примерно 40 °С под вакуумом, используя ротационный испаритель. Полученный остаток тотчас же растворяют в нескольких кубических сантиметрах петролейного эфира и с помощью пипетки количественно переносят в хроматографическую колонку. Чтобы гарантировать отсутствие потерь исследуемых веществ, круглодонную колбу ополаскивают небольшими порциями растворителя, используя его примерно 10 $см^3$.

Примечание — При внесении исследуемого раствора в колонку следует избегать какого-либо возмущения слоя оксида алюминия; уровень исследуемого раствора должен достигать поверхности адсорбента без всплеска, благодаря внесению растворителя небольшими порциями.

Элюируют отдельные фракции каротиноидов при скорости примерно 2 капли в секунду, используя:

петролейный эфир для фракции I;

элюирующую смесь А для фракции II;

элюирующую смесь Б для фракции III.

С целью уменьшения общего объема элюата первые бесцветные порции стекающего раствора отбрасывают. Чтобы гарантировать полное извлечение каждой из фракций, проводят элюирование до тех пор, пока элюат не становится бесцветным.

Поскольку содержание отдельных фракций каротиноидов зависит от вида фруктов и напитков, не представляется возможным указать определенные требуемые объемы элюентов. Однако практика показывает, что при определении фракций I и II требуется примерно 50 $см^3$ элюента в каждом случае. При высоком уровне содержания фракции II достаточно 100 $см^3$ элюента, для фракции III обычно достаточно от 80 до 100 $см^3$. Объем элюатов доводят петролейным эфиром и отмечают значение объема V_2 для каждой из фракций.

Измеряют оптическую плотность растворов для каждой из фракций против холостого раствора — петролейного эфира, при длине волны 450 нм, используя кюветы с 10 мм оптическим промежутком.

Примечание — Использование толуола в различных пропорциях не оказывает влияния на коэффициент поглощения.

Остаток каротиноидов в хроматографической колонке может быть элюирован ацетоном как фракция IV.

Сумма фракций каротиноидов, элюированных из колонки, как правило, должна составлять не менее 90 % от содержания общих каротиноидов. Если это число оказывается значительно меньше, то из этого следует, например, что в образец мог быть добавлен биксин. Это осадок красно-желтого цвета в хроматографической колонке после элюирования фракции IV.

Примечание — Биксин может быть элюирован смесью, состоящей из четырех частей ацетона и одной части аммиака (по объему). Его присутствие может быть подтверждено другими хроматографическими методами.

9 Обработка и оформление результатов

Массовую концентрацию общих каротиноидов $\rho(C_{40}H_{56})$, мг/дм^3, и их отдельных фракций, выраженную через β-каротин, вычисляют по формуле

$$\rho(C_{40}H_{56}) = A \cdot 4{,}00 \cdot \frac{V_2}{V_1}, \qquad (2)$$

где A — оптическая плотность раствора экстрагированных веществ;

4,00 — показатель, равный отношению массовой концентрации (в миллиграммах на кубический дециметр) раствора β-каротина в петролейном эфире к его оптической плотности при длине волны 450 нм и длине оптического пути 10 мм.

Примечание — Поскольку промышленно выпускаемый β-каротин может быть разного качества, количество отдельных каротиноидов не может быть оценено с помощью калибровочной кривой, но может быть определено через средний коэффициент поглощения для β-каротина, найденный в результате кругового эксперимента.

V_2 — объем экстракта в петролейном эфире (100 см^3, по 8.2) или объем различных элюатов (по 8.3), см^3;

V_1 — объем исследуемой пробы продукта (от 5 до 50 см^3, по 8.2), см^3.

Массовую долю β-каротина $\rho_1(C_{40}H_{56})$, мг/кг, вычисляют по формуле

$$\rho_1(C_{40}H_{56}) = A \cdot 4{,}00 \cdot \frac{V_2}{m}, \qquad (3)$$

где m — масса навески, г.

Аналогично определяют содержания отдельных фракций каротиноидов и выражают их в процентах от содержания общих каротиноидов.

Относительное расхождение между результатами двух определений, полученными при анализе одной и той же пробы продукта одним оператором с использованием одного и того же оборудования за возможно минимальный интервал времени, не должно превышать норматива оперативного контроля сходимости r, % (при $P = 0{,}95$):

для содержания общих каротиноидов — 10,

для фракции I — 20,

для фракции II — 12,

для фракции III — 17.

При соблюдении этого условия за окончательный результат испытания принимают среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений, указываемое с точностью до двух значащих цифр.

Относительное расхождение между результатами определений, полученными для одной и той же пробы продукта в двух различных лабораториях, не должно превышать норматива оперативного контроля воспроизводимости R, % (при $P = 0{,}95$):

для содержания общих каротиноидов — 23,

для фракции I — 50,

для фракции II — 30,

для фракции III — 35.

Пределы относительной погрешности определения при соблюдении условий, регламентируемых настоящим стандартом, не превышают, % (при $P = 0,95$):

для содержания общих каротиноидов ±16,

для фракции I ±35,

для фракции II ±21,

для фракции III ±25.

В протоколе испытаний указывают:

- информацию, необходимую для идентификации исследуемого продукта (вид продукта, происхождение, шифр);
- ссылку на настоящий стандарт;
- дату и способ отбора проб (по возможности);
- дату получения пробы для испытаний;
- дату проведения испытаний;
- результат испытаний с указанием погрешности и единицы измерения;
- соблюдение норматива контроля сходимости результатов;
- особенности проведения испытаний (разведение концентрированной пробы, относительную плотность разведенной пробы и пр.);
- отклонения условий проведения испытаний от описанных в стандарте, которые могли повлиять на результат.

ПРИЛОЖЕНИЕ А
(справочное)

Библиография

[1] ТУ 6-09-3916—75 Алюминия оксид 1-й степени активности для хроматографии

УДК 664.863.001.4:006.354 ОКС 67.160.20 Н59 ОКСТУ 9109

Ключевые слова: фруктовые и овощные соки, определение содержания, общие каротиноиды, фракции общих каротиноидов, метод анализа

Редактор *Л.И.Нахимова*
Технический редактор *Н.С.Гришанова*
Корректор *В.И.Варенцова*
Компьютерная верстка *А.Н. Золотаревой*

Изд. лиц. № 021007 от 10.08.95. Сдано в набор 22.02.2000. Подписано в печать 12.04.2000. Усл.печ.л. 0,93. Уч.-изд.л. 0,90.
Тираж 419 экз. С 4859. Зак. 322.

ИПК Издательство стандартов, 107076, Москва, Колодезный пер., 14
Набрано в Издательстве на ПЭВМ
Филиал ИПК Издательство стандартов — тип. "Московский печатник", 103062, Москва, Лялин пер., 6
Плр № 080102

gost.e-ecolog.ru