МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ПРОДУКТЫ МОЛОЧНЫЕ ДЛЯ ДЕТСКОГО ПИТАНИЯ

Метод измерения массовой доли витамина А (ретинола)

Издание официальное

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ
ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
Минск

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН МТК 186 и Научно-исследовательским институтом детского питания

ВНЕСЕН Госстандартом России

2 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 12 ноября 1998 г. № 14)

За принятие проголосовали:

Наименование государства	Наименование национального органа по стандартизации
Азербайджанская Республика	Азгосстандарт
Республика Беларусь	Госстандарт Беларуси
Грузия	Грузстандарт
Киргизская Республика	Киргизстандарт
Республика Молдова	Молдова-Стандарт
Российская Федерация	Госстандарт России
Республика Таджикистан	Таджикгосстандарт
Туркменистан	Главная Государственная инспекция Туркменистана
Республика Узбекистан	Узгосстандарт
Украина	Госстандарт Украины

3 Постановлением Государственного комитета Российской Федерации по стандартизации и метрологии от 28 апреля 1999 г. № 142 межгосударственный стандарт ГОСТ 30627.1—98 введен в действие непосредственно в качестве государственного стандарта Российской Федерации с 1 мая 2000 г.

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

5 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Июнь 2009 г.

© ИПК Издательство стандартов, 1999
© СТАНДАРТИНФОРМ, 2009

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания на территории Российской Федерации без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ПРОДУКТЫ МОЛОЧНЫЕ ДЛЯ ДЕТСКОГО ПИТАНИЯ

Метод измерения массовой доли витамина А (ретинола)

Infant milk products.
Method for determination of mass part of vitamin A (Retinoli)

Дата введения 2000—05—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на молочные продукты для детского питания и устанавливает колориметрический метод измерения массовой доли витамина А (ретинола).

Метод основан на реакции витамина А, выделенного из продукта при щелочном гидролизе, с треххлористой сурьмой (реакция Карра-Прайса) и колориметрическом измерении интенсивности окрашивания образовавшегося соединения.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 334—73 Бумага масштабно-координатная. Технические условия

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

ГОСТ 3145—84 Часы механические с сигнальным устройством. Общие технические условия

ГОСТ 4166—76 Реактивы. Натрий сернокислый. Технические условия

ГОСТ 4212—76 Реактивы. Приготовление растворов для колориметрического и нефелометрического анализа

ГОСТ 4919.1—77 Реактивы и особо чистые вещества. Методы приготовления растворов индикаторов

ГОСТ 4919.2—77 Реактивы и особо чистые вещества. Методы приготовления буферных растворов

ГОСТ 5815—77 Реактивы. Ангидрид уксусный. Технические условия

ГОСТ 5845—79 Реактивы. Калий-натрий виннокислый 4-водный. Технические условия

ГОСТ 5962—67* Спирт этиловый ректификованный. Технические условия

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 8981—78 Эфиры этиловый и нормальный бутиловый уксусной кислоты технические. Технические условия

ГОСТ 9147—80 Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия

ГОСТ 12026—76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 20015—88 Хлороформ. Технические условия

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

ГОСТ 24363—80 Реактивы. Калия гидроокись. Технические условия

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

ГОСТ 26809—86 Молоко и молочные продукты. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу

* На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р 51652—2000.

** С 1 июля 2002 г. действует ГОСТ 24104—2001.

Издание официальное

ГОСТ 28498—90 Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний

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

3 Методы отбора проб

Отбор проб и подготовка их к измерению по ГОСТ 26809.

4 Аппаратура, материалы и реактивы

Баня водяная с обогревом, позволяющая поддерживать температуру от 0 до 100 °С с погрешностью ±2 °С.

Бумага масштабно-координатная (миллиметровая) по ГОСТ 334.

Бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026.

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

Весы лабораторные общего назначения 4-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 500 г по ГОСТ 24104.

Воронки стеклянные лабораторные типа В по ГОСТ 25336.

Воронки делительные номинальной вместимостью 250, 500 $см^3$ по ГОСТ 25336.

Испаритель ротационный [1].

Колбы типа К исполнения 1 номинальной вместимостью 100, 250, 500 и 1000 $см^3$ по ГОСТ 25336.

Колбы мерные исполнения 1 2-го класса точности номинальной вместимостью 100, 200, 250, 500 $см^3$ по ГОСТ 1770.

Колориметр фотоэлектрический диапазоном измерения от 200 до 2000 нм, диапазоном измерения коэффициента пропускания от 100 до 1 % [2].

Пипетки исполнений 4, 6, 7 2-го класса точности номинальной вместимостью 1, 5, 10 $см^3$ по ГОСТ 29227.

Стакан фарфоровый номинальной вместимостью 500 $см^3$ по ГОСТ 9147.

Секундомер [3].

Термометр жидкостный (нертутный) диапазоном измерения от 0 до 100 °С ценой деления шкалы 1 °С по ГОСТ 28498.

Холодильник обратимый со шлифами и водяным охлаждением по ГОСТ 25336.

Фотометр фотоэлектрический диапазоном измерения от 220 до 1100 нм, диапазоном измерения коэффициента пропускания от 100 до 1 % [4].

Цилиндры исполнения 1 вместимостью 50, 100, 250, 500 $см^3$ по ГОСТ 1770.

Часы 2-го класса по ГОСТ 3145.

Шкаф сушильный лабораторный, обеспечивающий поддержание заданного температурного режима от 50 до 200 °С с погрешностью ±2 °С.

Эксикатор исполнения 2 по ГОСТ 25336.

Ангидрид уксусный ч.д.а. по ГОСТ 5815.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Калий-натрий виннокислый ч.д.а. по ГОСТ 5845.

Калия гидроокись х.ч. по ГОСТ 24363.

Кислота аскорбиновая (витамин С) [5].

Натрий сернокислый безводный х.ч. по ГОСТ 4166.

Ретинола пальмитат (витамина А пальмитат) [6] или масляный раствор массовой концентрации ретинола пальмитата 550 $г/дм^3$ (55 %-ный раствор пальмитата в масле) [7], или ретинола ацетата (витамин А ацетат) [8], или масляный раствор массовой концентрации ретинола ацетата 34,4; 68,8; 86,0 $г/дм^3$ (3,44; 6,88 или 8,60 % раствор ретинола ацетата в масле) [9].

Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962.

Сурьма треххлористая х.ч. [10].

Хлороформ х.ч. по ГОСТ 20015.

Фенолфталеин ч.д.а. [11].

Циклогексан [12].

Эфир петролейный, перегнанный при (50±10) °С, не содержащий перекисей [13].

Эфир этиловый по ГОСТ 8981.

Допускается применение других средств измерения с метрологическими характеристиками и оборудования с техническими характеристиками не хуже, а также реактивов и материалов по качеству не ниже вышеуказанных.

Хранение растворов по ГОСТ 4212.

Хранение реактивов и особо чистых веществ по ГОСТ 4919.1 и ГОСТ 4919.2.

5 Условия выполнения измерения

Измерение должно проводиться при красном или затемненном свете в помещении, в связи с разрушением витамина А под воздействием ультрафиолетовых лучей.

Треххлористая сурьма при попадании на кожу вызывает ожоги. Место поражения промывают ацетоном, затем водой.

Работу с хлороформом, уксусным ангидридом, диэтиловым и петролейным эфирами необходимо проводить в вытяжном шкафу и в хорошо вентилируемом помещении.

Посуду после раствора треххлористой сурьмы и кюветы после измерений нужно промывать водным раствором калия-натрия виннокислого массовой концентрации 0,1 г/см^3.

6 Подготовка к выполнению измерения

6.1 Приготовление раствора треххлористой сурьмы (реактив Карра-Прайса)

Взвешивают (60,0±0,4) г треххлористой сурьмы на весах 4-го класса точности в конической колбе вместимостью 500 см^3, в которую предварительно отмерено 300 см^3 хлороформа, и растворяют при подогревании на водяной бане (40±2) °С, периодически встряхивая. Раствор охлаждают до (20±5) °С, добавляют 6—9 см^3 уксусного ангидрида, колбу закрывают и оставляют на 14—18 ч для отстаивания. Полученный прозрачный раствор осторожно сливают в колбу из темного стекла с плотно закрывающейся пробкой. Срок хранения реактива — не более 40 сут при (20±5) °С.

6.2 Приготовление водного раствора гидроокиси калия массовой концентрации 0,5 г/см^3

Взвешивают (125,0±0,4) г гидроокиси калия на весах 4-го класса точности, растворяют в 100—150 см^3 дистиллированной воды в фарфоровом стакане, охлаждают до (20±5) °С, фильтруют в мерную колбу вместимостью 250 см^3, доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают.

6.3 Приготовление спиртового раствора фенолфталеина массовой концентрации 10 мг/см^3

(1,00±0,01) г фенолфталеина, взвешенного на весах 4-го класса точности, растворяют в 70 см^3 этилового спирта в мерной колбе вместимостью 100 см^3, добавляют 30 см^3 дистиллированной воды и перемешивают.

6.4 Обезвоживание сернокислого натрия

Сернокислый натрий высушивают в сушильном шкафу при (150±10) °С 8—12 ч. Хранят в эксикаторе.

6.5 Приготовление раствора калия-натрия виннокислого массовой концентрации 0,1 г/см^3

(10,0±0,4) г калия-натрия виннокислого (сегнетова соль), взвешенного на весах 4-го класса точности, растворяют в 40—60 см^3 дистиллированной воды в мерной колбе вместимостью 100 см^3, доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают.

6.6 Проверка препарата витамина А

Взвешивают (0,100±0,002) г препарата на весах 2-го класса точности, растворяют в абсолютном спирте в мерной колбе вместимостью 100 см^3, доводят объем раствора до метки тем же спиртом и перемешивают. Отбирают 2 см^3 полученного раствора при использовании раствора массовой концентрации ретинола ацетата в масле 86,0 г/дм^3, 2,5 см^3 — при использовании раствора массовой концентрации ретинола ацетата в масле 68,8 г/дм^3, 5 см^3 — при использовании раствора массовой

концентрации ретинола ацетата в масле 34,4 г/дм^3, 0,3 см^3 — при использовании раствора массовой концентрации ретинола пальмитата в масле 550 г/дм^3 и разводят в мерной колбе вместимостью 50 см^3, доводят до метки тем же спиртом, получая конечный раствор массовой концентрации ретинола ацетата или ретинола пальмитата 3 мкг/см^3 (8—10 МЕ/см^3).

Измеряют оптическую плотность полученного раствора на фотометре при длине волны 326 нм в кювете с толщиной слоя 1 см^3.

В качестве контрольного раствора применяют абсолютный спирт.

Массовую долю витамина А (ретинола ацетата или ретинола пальмитата) в препарате m, млн$^{-1}$, вычисляют по формуле

$$m = \frac{0{,}01DV_1100}{m_1EV}, \qquad (1)$$

где 0,01 — массовая концентрация витамина А для 1 %-ного раствора ретинола ацетата или ретинола пальмитата в абсолютном спирте, г/см^3;

D — оптическая плотность анализируемого раствора;

V_1 — объем раствора второго разведения, см^3;

100 — объем раствора первого разведения, взятый для приготовления раствора второго разведения, см^3;

m_1 — масса навески препарата, г;

E — удельный показатель поглощения при длине волны 326 нм, который для 100 %-ного раствора ретинола ацетата в абсолютном спирте равен 1550, а для 100 %-ного раствора ретинола пальмината в абсолютном спирте равен 975.

V — объем раствора, взятый для второго разведения, см^3;

Вычисления проводят до второго десятичного знака и округляют результат до первого десятичного знака.

Примечание — Определение может быть проведено с использованием циклогексана вместо абсолютного спирта. В этом случае готовят раствор препарата в циклогексане массовой концентрации ретинола ацетата 3 мкг/см^3 и измеряют оптическую плотность этого раствора при длине волны 327,5 нм. В данном случае E = 1515.

6.7 Построение калибровочного графика

Взвешивают (0,100±0,002) г препарата витамина А — ацетата или пальмитата на весах 2-го класса точности в мерной колбе вместимостью 100 см^3, растворяют в хлороформе, доводят хлороформом до метки и перемешивают.

Массовую концентрацию витамина А в растворе X_1, X_2, МЕ/см^3, вычисляют по формулам:

$$X_1 = \frac{m\,m_1 2907000}{100} \text{ (для ретинол ацетата)}, \qquad (2)$$

$$X_2 = \frac{m\,m_1 1807000}{100} \text{ (для ретинол пальмитата)}, \qquad (3)$$

где m — массовая доля витамина А (ретинол ацетата или ретинол пальмитата) в препарате, %;

m_1 — масса навески препарата, г;

2907000 — активность 1 г витамина А (ретинол ацетата) с массовой долей 100 % в абсолютном спирте, МЕ;

1807000 — активность 1 г витамина А (ретинол пальмитата) с массовой долей 100 % в абсолютном спирте, МЕ;

100 — объем хлороформенного раствора препарата витамина А, см^3.

Вычисления проводят до второго десятичного знака и округляют результат до первого десятичного знака.

Для построения калибровочного графика из полученного раствора витамина А рассчитанной массовой концентрации последовательно готовят разведения массовой концентрации 5—20 МЕ/см^3 с интервалом в 5 МЕ/см^3.

Из каждого разведения отбирают пипеткой номинальной вместимостью 1,0 см^3 по 0,4 см^3 раствора, вносят в кювету толщиной слоя 1 см, помещают кювету в кюветодержатель фотометра или колориметра, добавляют 4 см^3 раствора треххлористой сурьмы и быстро (не более 5 с) измеряют

оптическую плотность при длине волны 620 нм (красный светофильтр), устанавливая в параллельный световой поток такую же кювету, наполненную хлороформом.

Для построения калибровочного графика по оси ординат откладывают полученные значения оптической плотности, а по оси абсцисс — соответствующие им массовые концентрации витамина А в МЕ/см^3. Длина осей графика должна быть не менее 200 мм. При смене раствора треххлористой сурьмы построение калибровочного графика повторяют, используя при этом свежеприготовленный раствор витамина А в хлороформе.

6.8 Щелочной гидролиз продукта (омыление)

Отобранную для анализа пробу жидких продуктов прогревают при (37±1) °С 30—40 мин и перемешивают для равномерного распределения жира в продукте.

Навеску сухого продукта на гидролиз берут с учетом массовой доли витамина А в продукте.

Массовая доля витамина А, млн$^{-1}$	Навеска сухого продукта, г
0,5—1,5	6,00±0,01
1,5—3,0	4,00±0,01
3,0—5,0	3,00±0,01

Навеска жидкого продукта — (15,00±0,01) г.

Навеску продукта помещают в круглодонную колбу вместимостью 250 см^3, добавляют 20 см^3 дистиллированной воды (для сухих продуктов), перемешивают встряхиванием до полного растворения, добавляют (0,10±0,03) г аскорбиновой кислоты, взвешенной на весах 4-го класса точности, приливают 40 см^3 этилового ректификованного спирта и, перемешивая, вносят 5,0—7,0 см^3 водного раствора массовой концентрации гидроокиси калия 0,5 г/см^3.

Колбу соединяют с водяным обратным холодильником и выдерживают в кипящей водяной бане (30±2) мин.

6.9 Экстракция

По окончании омыления содержимое колбы охлаждают до (20±5) °С, и количественно переносят в делительную воронку вместимостью 500 см^3. Колбу ополаскивают 50 см^3 дистиллированной воды, воду сливают в ту же делительную воронку.

Признаком полного омыления служит то, что при добавлении воды к смеси муть не образуется. При образовании мути процесс омыления повторяют, при этом увеличивают объем щелочи до 10 см^3 и время омыления до (35±2) мин.

Неомыляемые вещества экстрагируют петролейным или диэтиловым эфиром три раза по 50 см^3. После чего нижний (водный) слой отбрасывают.

6.10 Промывка

Объединенный эфирный экстракт переносят в делительную воронку вместимостью 500 см^3 и отмывают от щелочи до нейтральной реакции по фенолфталеину, расходуя при этом 500—700 см^3 дистиллированной воды.

Промытую эфирную вытяжку фильтруют в сухую круглодонную колбу со шлифом через слой безводного сернокислого натрия (20—30 г), не допуская заполнения воронки выше уровня этого слоя. Фильтр промывают эфиром объемом не менее 15 см^3.

6.11 Отгонка растворителя

Эфир отгоняют на ротационном испарителе под вакуумом при температуре водяной бани (не более 30 °С — для диэтилового эфира и не более 50 °С — для петролейного эфира).

Неомыляемый остаток на стенках колбы немедленно растворяют в хлороформе. При расчетной массовой доле витамина А в продукте 0,5—1,5 млн$^{-1}$ остаток растворяют в 2 см^3 хлороформа, 1,5—5 млн$^{-1}$ — в 3 см^3 хлороформа. Закрыв колбу пробкой, смывают осадок со стенок колбы.

7 Проведение измерения

Измерение проводят при длине волны 620 нм (красный светофильтр), используя в качестве контрольного раствора хлороформ.

Пипеткой вместимостью 1 см^3 вносят 0,4 см^3 хлороформенного раствора испытуемой пробы в кювету толщиной слоя 1 см^3, помещают кювету в кюветодержатель фотометра, добавляют 4,0 см^3 раствора треххлористой сурьмы и быстро (не более 5 с) измеряют оптическую плотность. При наличии витамина проба окрашивается в голубой цвет. Окраска быстро исчезает и раствор становится прозрачным.

Помутнение раствора свидетельствует о попадании воды с испытуемым раствором или с раствором сурьмы. В этом случае следует проверить раствор треххлористой сурьмы и при необходимости приготовить свежий. Анализ повторить.

8 Обработка результатов измерения

Массовую долю витамина А (ретинола) X, млн$^{-1}$, вычисляют по формуле

$$X = \frac{CV\,0{,}303}{m}, \qquad (4)$$

где C — активность витамина А анализируемого раствора продукта, установленная по калибровочному графику, МЕ/см^3;

V — объем раствора неомыляемых веществ в хлороформе, см^3;

0,303 — коэффициент пересчета витамина А из МЕ в мкг;

m — масса навески продукта, г.

За окончательный результат измерения принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных измерений. Вычисления проводят до второго десятичного знака и округляют до первого десятичного знака.

Относительная погрешность измерения массовой доли витамина А — ±20 % при доверительной вероятности $P = 0{,}95$.

Расхождение между результатами двух параллельных измерений не должно превышать 10 % среднеарифметического значения результатов измерений.

Расхождение между результатами измерений, выполненных в двух разных лабораториях, не должно превышать 20 % среднеарифметического значения результатов измерений.

ПРИЛОЖЕНИЕ А
(справочное)

Библиография

[1] ТУ 25—11—917—76 Испаритель ротационный ИР-1М
[2] ТУ 3-КРАЮ.414216.001—90 Колориметр фотоэлектрический концентрационный КФК-2Ц
[3] ТУ 25—1819.0021—90 Секундомеры механические «Слава»
[4] ТУ 3—3.2164—89 Фотометр фотоэлектрический КФК-3
[5] ГФ СССР—X ст. 6 Кислота аскорбиновая
[6] ВФС 42—2229 Ретинола пальмитат (витамин А пальмитат)
[7] ФС 42—1875 Раствор ретинола пальмитата 55 % в масле
[8] ГФ СССР—X ст. 578 Ретинола ацетат (витамин А ацетат)
[9] ГФ СССР—X ст. 579 Раствор ретинола ацетата 3,44, 6, 88 или 8,60 % в масле
[10] ТУ 6—09—17—252—88 Сурьма (III) хлорид (сурьма треххлористая)
[11] ТУ 6—09—5360—87 Фенолфталеин
[12] ТУ 6—09—10—592—87 Циклогексан
[13] ТУ 6—02—1244—83 Эфир петролейный

УДК 637.1:543.06:006.354 МКС 67.100.10 Н19 ОКСТУ 9209

Ключевые слова: витамин А (ретинол), щелочной гидролиз (омыление), экстракция, отгонка растворителя, колориметрический метод

gost.e-ecolog.ru