

ПРОДУКТЫ МОЛОЧНЫЕ ДЛЯ ДЕТСКОГО ПИТАНИЯ

Метод измерения массовой доли витамина А (ретинола)

Издание официальное

БЗ 4—98/620

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ
ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
М и н с к

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	Молдовастандарт
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

© ИПК Издательство стандартов, 1999

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

II

Содержание

1 Область применения	1
2 Нормативные ссылки	1
3 Методы отбора проб	2
4 Аппаратура, материалы и реактивы	2
5 Условия выполнения измерения	3
6 Подготовка к выполнению измерения	3
7 Проведение измерения	6
8 Обработка результатов измерения	6
Приложение А Библиография	7

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 масштабнo-координатная. Технические условия
- ГОСТ 1770—74 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Технические условия
- ГОСТ 3145—84 Часы механические с сигнальным устройством. Общие технические условия
- ГОСТ 4166—76 Натрий серноокислый. 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 Ангидрид уксусный. Технические условия
- ГОСТ 5845—79 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 Калия гидроокись. Технические условия

Издание официальное

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 подготовки проб к анализу

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

ГОСТ 29227—91 Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. 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 см³ по ГОСТ 25336.

Испаритель ротационный [1].

Колбы типа К исполнения I номинальной вместимостью 100, 250, 500 и 1000 см³ по ГОСТ 25336.

Колбы мерные исполнения I 2-го класса точности номинальной вместимостью 100, 200, 250, 500 см³ 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 см³ по ГОСТ 29227.

Стакан фарфоровый номинальной вместимостью 500 см³ 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 I вместимостью 50, 100, 250, 500 см³ 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/дм³ (55 %-ный раствор пальмитата в масле) [7], или ретинола аце-

тата (витамин А ацетат) [8], или масляный раствор массовой концентрации ретинола ацетата 34,4; 68,8; 86,0 г/дм³ (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, перегнаный 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/см³.

6 Подготовка к выполнению измерения

6.1 Приготовление раствора треххлористой сурьмы (реактив Карра-Прайса)

Взвешивают $(60,0 \pm 0,4)$ г треххлористой сурьмы на весах 4-го класса точности в конической колбе вместимостью 500 см³, в которую предварительно отмерено 300 см³ хлороформа, и растворяют при подогревании на водяной бане (40 ± 2) °С, периодически встряхивая. Раствор охлаждают до (20 ± 5) °С, добавляют 6—9 см³ 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/см³

Взвешивают $(125,0 \pm 0,4)$ г гидроокиси калия на весах 4-го класса точности, растворяют в 100—150 см³ дистиллированной воды в фарфоровом стакане, охлаждают до (20 ± 5) °С, фильтруют в мерную колбу вместимостью 250 см³, доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают.

6.3 Приготовление спиртового раствора фенолфталеина массовой концентрации 10 мг/см³

$(1,00 \pm 0,01)$ г фенолфталеина, взвешенного на весах 4-го класса точности, растворяют в 70 см³ этилового спирта в мерной колбе вместимостью 100 см³, добавляют 30 см³ 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/см³

$(10,0 \pm 0,4)$ г калия-натрия виннокислого (сегнетова соль), взвешенного на весах 4-го класса точности, растворяют в 40—60 см³ дистиллированной воды в мерной колбе вместимостью 100 см³, доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают.

6.6 Проверка препарата витамина А

Взвешивают $(0,100 \pm 0,002)$ г препарата на весах 2-го класса точности, растворяют в абсолютном спирте в мерной колбе вместимостью 100 см³, доводят объем раствора до метки тем же спиртом и перемешивают. Отбирают 2 см³ полученного раствора при использовании раствора массовой концентрации ретинола ацетата в масле 86,0 г/дм³, 2,5 см³ — при использовании раствора массовой концентрации ретинола ацетата в масле 68,8 г/дм³, 5 см³ — при использовании раствора массовой концентрации ретинола ацетата в масле 34,4 г/дм³, 0,3 см³ — при использовании раствора массовой концентрации ретинола пальмитата в масле 550 г/дм³ и разводят в мерной колбе вместимостью 50 см³, доводят до метки тем же спиртом, получая конечный раствор массовой концентрации ретинола ацетата или ретинола пальмитата 3 мкг/см³ (8—10 МЕ/см³).

Измеряют оптическую плотность полученного раствора на фотометре при длине волны 326 нм в кювете с толщиной слоя 1 см³.

В качестве контрольного раствора применяют абсолютный спирт.

Массовую долю витамина А (ретинола ацетата или ретинола пальмитата) в препарате m , млн⁻¹, вычисляют по формуле

$$m = \frac{0,01 D V_1 100}{m_1 E V} \quad (1)$$

где 0,01 — массовая концентрация витамина А для 1 %-ного раствора ретинола ацетата или ретинола пальмитата в абсолютном спирте, г/см³;

D — оптическая плотность анализируемого раствора;

V_1 — объем раствора второго разведения, см³;

100 — объем раствора первого разведения, взятый для приготовления раствора второго разведения, см³;

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 пальмитата в абсолютном спирте равен 975.

V — объем раствора, взятый для второго разведения, см³;

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/см³ и измеряют оптическую плотность этого раствора при длине волны 327,5 нм. В данном случае $E = 1515$.

6.7 Построение калибровочного графика

Взвешивают $(0,100 \pm 0,002)$ г препарата витамина А — ацетата или пальмитата на весах 2-го класса точности в мерной колбе вместимостью 100 см³, растворяют в хлороформе, доводят хлороформом до метки и перемешивают.

Массовую концентрацию витамина А в растворе X_1 , X_2 , МЕ/см³, вычисляют по формулам:

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

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

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, см³.

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/см³ с интервалом в 5 МЕ/см³.

Из каждого разведения отбирают пипеткой номинальной вместимостью 1,0 см³ по 0,4 см³ раствора, вносят в кювету толщиной слоя 1 см, помещают кювету в кюветодержатель фотометра или колориметра, добавляют 4 см³ 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/см³. 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 см³, добавляют 20 см³ 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 см³ этилового ректифицированного спирта и, перемешивая, вносят 5,0—7,0 см³ водного раствора массовой концентрации гидроксида калия 0,5 г/см³.

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 см³. Колбу ополаскивают 50 см³ 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 см³ и время омыления до (35±2) мин.

Неомыляемые вещества экстрагируют петролейным или диэтиловым эфиром три раза по 50 см³. После чего нижний (водный) слой отбрасывают.

6.10 Промывка

Объединенный эфирный экстракт переносят в делительную воронку вместимостью 500 см³ и отмывают от щелочи до нейтральной реакции по фенолфталеину, расходуя при этом 500—700 см³ дистиллированной воды.

Промытую эфирную вытяжку фильтруют в сухую круглодонную колбу со шлифом через слой безводного сернистого натрия (20—30 г), не допуская заполнения воронки выше уровня этого слоя. Фильтр промывают эфиром объемом не менее 15 см³.

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 см³ хлороформа, 1,5—5 млн⁻¹ — в 3 см³ 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 см³ вносят 0,4 см³ хлороформенного раствора испытуемой пробы в кювету толщиной слоя 1 см³, помещают кювету в кюветодержатель фотометра, добавляют 4,0 см³ 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 , мгн⁻¹, вычисляют по формуле

$$X = \frac{C V 0,303}{m}, \quad (4)$$

где C — активность витамина А анализируемого раствора продукта, установленная по калибровочному графику, МЕ/см³;

V — объем раствора неомыляемых веществ в хлороформе, см³;

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

m — масса навески продукта, г.

За окончательный результат измерения принимают среднее арифметическое 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 % среднего арифметического значения результатов измерений.

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

ПРИЛОЖЕНИЕ А
(Информационное)

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–Х 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–Х ст. 578 Ретинола ацетат (витамин А ацетат)
- [9] ГФ СССР–Х 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

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

Редактор *Т. П. Шашиня*
Технический редактор *В. Н. Прусакова*
Корректор *Н. И. Гавришук*
Компьютерная верстка *Э. И. Мартиновой*

Изд. лиц. № 021007 от 10.08.95. Сдано в набор 11.05.99. Подписано в печать 27.05.99. Усл. печ. л. 1,40. Уч.-изд. л. 0,85.
Тираж 387 экз. С 2903. Зак. 1206л.

ИПК Издательство стандартов, 107076, Москва, Колодезный пер., 14.
Набрано в Калужской типографии стандартов на ПЭВМ.
Калужская типография стандартов, ул. Московская, 256.
ПЛР № 040138