
ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО
ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ



НАЦИОНАЛЬНЫЙ
СТАНДАРТ
РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р
54058—
2010

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ

Метод определения каротиноидов

Издание официальное



Москва
Стандартинформ
2011

Предисловие

Цели и принципы стандартизации в Российской Федерации установлены Федеральным законом от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ «О техническом регулировании», а правила применения национальных стандартов Российской Федерации — ГОСТ Р 1.0—2004 «Стандартизация в Российской Федерации. Основные положения»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Государственным образовательным учреждением высшего профессионального образования «Московский государственный университет пищевых производств» Министерства образования и науки Российской Федерации (ГОУ ВПО «МГУПП»)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 036 «Функциональные пищевые продукты»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 30 ноября 2010 г. № 682-ст

4 В настоящем стандарте учтены нормативные положения следующих международных (региональных) стандартов и сводов правил:

- CODEX STAN 234—1999 (в действующей редакции с учетом изменений 2007 г.) Комиссии Codex Alimentarius;
- CAC/MISC 6 (в действующей редакции 2008 г.) Комиссии Codex Alimentarius;
- CAC/GL 10—1979 (в действующей редакции с учетом изменений 1983, 1991 и 2008 гг.)

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячно издаваемых информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет

© Стандартиформ, 2011

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

Содержание

1 Область применения	1
2 Нормативные ссылки	1
3 Термины и определения	2
4 Сущность метода	2
5 Средства измерений, вспомогательные материалы, посуда, реактивы	2
6 Подготовка к определению	3
7 Отбор проб	3
8 Проведение определения	3
9 Обработка и оформление результатов измерений	5
10 Контроль точности результатов измерений	6
11 Требования безопасности	6

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ

Метод определения каротиноидов

Functional food stuffs. Method for determination of carotinoids

Дата введения — 2012—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на функциональные пищевые продукты растительного и животного происхождения и устанавливает метод определения массовой концентрации или массовой доли каротиноидов, включая общие каротиноиды и их отдельные фракции (каротины, криптоксантиновые и ксантофилловые эфиры).

Диапазон измерения массовой концентрации каротиноидов составляет от 1 до 300 мг/дм³(кг) (общие каротиноиды в расчете на β -каротин), массовой доли — от 1 до 300 мг/дм³(кг) (общие каротиноиды в расчете на β -каротин), массовых долей отдельных фракций каротиноидов — от 3 % до 80 % от общего количества каротиноидов.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике

ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025—2006 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий

ГОСТ Р 8.563—2009 Государственная система обеспечения единства измерений. Методики (методы) измерений

ГОСТ Р 12.1.019—2009 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ Р 52349—2005 Продукты пищевые. Продукты пищевые функциональные. Термины и определения

ГОСТ 12.1.005—88 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

ГОСТ 12.1.007—76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.010—76 Система стандартов безопасности труда. Взрывобезопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.018—93 Система стандартов безопасности труда. Пожаровзрывобезопасность статического электричества. Общие требования

ГОСТ 1770—74 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 2603—79 Реактивы. Ацетон. Технические условия

ГОСТ 4166—76 Реактивы. Натрий серноокислый. Технические условия

ГОСТ 4174—77 Реактивы. Цинк серноокислый 7-водный. Технические условия

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

ГОСТ 5789—78 Реактивы. Толуол. Технические условия

ГОСТ 6419—78 Реактивы. Магний углекислый основной водный. Технические условия

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. 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 26809—86 Молоко и молочные продукты. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу

П р и м е ч а н и е — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодно издаваемому информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины и определения по ГОСТ Р 52349.

4 Сущность метода

Метод основан на экстракции каротиноидов из пробы или осадка, предварительно полученного путем обработки пробы растворами Карреза I и Карреза II, последующей очистке выделенного препарата петролейным эфиром и спектрофотометрическим определением массовой концентрации или массовой доли каротиноидов. Доли отдельных каротиноидов (от общего содержания каротиноидов) определяют спектрофотометрическим измерением во фракциях, полученных в ходе хроматографического разделения экстракта.

5 Средства измерений, вспомогательные материалы, посуда, реактивы

Испаритель ротационный вакуумный.

Спектрофотометр или фотометр с шириной спектральной полосы не более 10 нм и допустимой абсолютной погрешностью измерений оптической плотности не более 1 %, позволяющий проводить измерения при 450 нм.

Весы лабораторные с пределом допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания $\pm 0,01$ г.

Дозаторы автоматические калиброванные или пипетки стеклянные калиброванные с подходящим интервалом дозирования и известной точностью дозирования.

Колонка хроматографическая стеклянная длиной 25—30 см и с размером внутреннего диаметра 2 см.

Гомогенизатор лабораторный механический для твердых, пастообразных и жидких продуктов.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Ацетон по ГОСТ 2603.

Толуол по ГОСТ 5789.

Эфир петролейный (температура кипения 40 °С — 60 °С).

Окись алюминия для колоночной хроматографии, 1-й степени активности, ч. д. а.

Калий железистосинеродистый 3-водный по ГОСТ 4207.

Цинк сернокислый 7-водный по ГОСТ 4174.

Натрий сернокислый безводный по ГОСТ 4166.

Магний углекислый основной водный по ГОСТ 6419.

Центрифуга, обеспечивающая фактор разделения 2000.

Пробирки для центрифугирования вместимостью 60—100 см³.

Воронка делительная вместимостью 250 см³ по ГОСТ 25336.

Колба мерная, исполнения 2, вместимостью 100 см³ по ГОСТ 1770.

Колба круглодонная типа К вместимостью 250 см³ по ГОСТ 25336.

Колба коническая с притертой пробкой, исполнения 1, вместимостью 250 см³ по ГОСТ 25336. Стекловата.

Допускается применение других средств измерений и вспомогательного оборудования, по метрологическим и техническим характеристикам обеспечивающим необходимую точность измерения, а также реактивов и материалов, по качеству не уступающим вышеперечисленным.

6 Подготовка к определению

6.1 Приготовление раствора Карреза I

15 г калия железистосинеродистого 3-водного вносят в мерную колбу вместимостью 100 см³, добавляют 50 см³ дистиллированной воды, тщательно перемешивают до полного растворения. Объем раствора в колбе доводят дистиллированной водой до метки.

Срок хранения раствора — не более 1 мес.

6.2 Приготовление раствора Карреза II

30 г цинка сернокислого 7-водного вносят в мерную колбу вместимостью 100 см³, добавляют 50 см³ дистиллированной воды, тщательно перемешивают до полного растворения. Объем раствора в колбе доводят дистиллированной водой до метки.

Срок хранения раствора — не более 1 мес.

6.3 Приготовление элюента А

В подходящей стеклянной емкости смешивают петролейный эфир и толуол в объемном соотношении 4:1.

Срок хранения раствора — не более 1 мес.

6.4 Приготовление элюента Б

В подходящей стеклянной емкости смешивают петролейный эфир и толуол в объемном соотношении 2:1.

Срок хранения раствора — не более 1 мес.

6.5 Частичная деактивация окиси алюминия

В коническую колбу с притертой пробкой вносят 100 г активированной окиси алюминия. Добавляют 12 см³ дистиллированной воды, тщательно перемешивают путем энергичного встряхивания до получения тонкодисперсной суспензии. Колбу с деактивированной окисью алюминия плотно закрывают притертой пробкой.

Срок хранения раствора — не более 1 мес.

6.6 Подготовка хроматографической колонки

28—30 г деактивированной окиси алюминия, приготовленной по 6.5, суспендируют в 30 см³ петролейного эфира. На дно хроматографической колонки помещают кусочек стекловаты. Колонку частично заполняют петролейным эфиром. В колонку медленно вносят суспензию окиси алюминия. После короткой выдержки в колонке должен сформироваться слой окиси алюминия высотой около 8 см. Избыточный объем петролейного эфира выпускают из колонки. Конечный уровень петролейного эфира должен быть незначительно выше поверхности слоя окиси алюминия. Для защиты разделяющего слоя в колонке от образования в нем воздушных пузырьков температуры эфира и окиси алюминия не должны существенно различаться.

7 Отбор проб

Отбор и подготовка проб — по ГОСТ 26313, 26671 и 26809.

8 Проведение определения

При проведении определения принимают во внимание, что каротиноиды чувствительны к световому и тепловому воздействиям. Определение проводят в месте, защищенном от прямого солнечного или ультрафиолетового излучения.

При подготовке и проведении определения должны быть соблюдены следующие условия:

температура окружающей среды от 10 °С до 25 °С включительно, относительная влажность воздуха от 40 % до 70 % включительно.

8.1 Экстрагирование каротиноидов из проб растительного происхождения

Данный способ экстрагирования применяют для выделения каротиноидов из твердых, пюре- и пастообразных продуктов растительного происхождения без жировых и белковых ингредиентов.

При необходимости пробу измельчают с помощью подходящего устройства. 2—5 г продукта помещают в стакан гомогенизатора. Добавляют 100 см³ ацетона и 0,1 г магния углекислого, проводят гомогенизацию пробы в течение 5 мин. Пробу выдерживают для формирования осадка, надосадочную жидкость — экстракт — декантируют в делительную воронку вместимостью 250 см³. Осадок последовательно промывают тремя порциями ацетона по 25 см³. Надосадочные жидкости каждый раз удаляют с осадка и смешивают в делительной воронке с экстрактом, полученным в результате гомогенизации анализируемой пробы. Общий экстракт в делительной воронке используют для очистки органической фазы с помощью петролейного эфира по 8.3.

8.2 Экстрагирование каротиноидов из проб животного происхождения и жидких функциональных пищевых продуктов

Данный способ экстрагирования применяют для выделения каротиноидов из твердых, пюре- и пастообразных функциональных пищевых продуктов животного происхождения, содержащих жировые и белковые ингредиенты, а также из жидких функциональных пищевых продуктов (например, безалкогольных напитков, сокодержащих напитков, соков, морсов, нектаров, коктейлей и т.п.).

При необходимости пробу мелко измельчают с помощью подходящего устройства и тщательно перемешивают. 5—50 г продукта вносят в пробирку для центрифугирования вместимостью от 60 до 100 см³, добавляют дистиллированную воду до объема 50 см³, тщательно перемешивают стеклянной палочкой. К пробе добавляют по 1 см³ раствора Карреза I по 6.1 и Карреза II по 6.2, перемешивают стеклянной палочкой, выдерживают 2 мин при комнатной температуре. Содержимое пробирки центрифугируют в течение 5 мин.

При анализе жидких продуктов в пробирку для центрифугирования вносят от 5 до 50 см³ пробы продукта. При необходимости объем пробы продукта в пробирке доводят дистиллированной водой до 50 см³. К жидкой пробе добавляют по 1 см³ раствора Карреза I по 6.1 и Карреза II по 6.2, перемешивают стеклянной палочкой, выдерживают 2 мин при комнатной температуре. Содержимое пробирки центрифугируют в течение 5 мин.

После центрифугирования бесцветную надосадочную жидкость удаляют из пробирки. К осадку в пробирке добавляют 40 см³ ацетона, тщательно перемешивают содержимое стеклянной палочкой в течение 3 мин. Проводят центрифугирование экстракта в течение 5 мин, затем отделяют надосадочную жидкость и количественно переносят ее в делительную воронку вместимостью 250 см³. Осадок в пробирке последовательно промывают тремя порциями ацетона по 25 см³, каждый раз проводя центрифугирование для разделения осадка и экстракта. Фракции экстракта собирают в делительной воронке. Общий экстракт в делительной воронке используют для очистки органической фазы с помощью петролейного эфира по 8.3.

8.3 Очистка экстракта

Для проведения очистки экстракта в делительную воронку добавляют 50 см³ петролейного эфира, содержимое воронки перемешивают и выдерживают в течение короткого времени для формирования верхнего слоя органической фазы. Из воронки удаляют водную фазу экстракта. В воронку вносят 50 см³ дистиллированной воды для промывания органической фазы. Содержимое воронки осторожно перемешивают легким встряхиванием. После выдержки водную фазу удаляют из воронки.

Органическую (петролейную) фазу количественно переносят из делительной воронки в пробирку для центрифугирования. В пробирку добавляют 2 г сернокислого натрия, содержимое тщательно перемешивают стеклянной палочкой, затем проводят центрифугирование для отделения петролейной фазы от осадка. После центрифугирования петролейную фазу переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³. К осадку в пробирке для центрифугирования добавляют 30 см³ петролейного эфира, перемешивают стеклянной палочкой, повторно центрифугируют. Отделяют петролейную фракцию и добавляют ее к первой порции в мерной колбе. Объем экстракта в мерной колбе доводят до метки петролейным эфиром. Полученный экстракт используют для спектрофотометрического определения общих каротиноидов по 8.4¹⁾.

¹⁾ При спектрофотометрическом измерении при 450 нм оптическая плотность полученного экстракта не должна превышать 0,500 ед. Необходимый объем анализируемой пробы необходимо подбирать эмпирическим путем. Так, например, при анализе апельсинового сока используют 25 см³ пробы, апельсинового нектара — 50 см³, сока маракуйи — от 5 до 20 см³, нектара из маракуйи — 25 см³, мандаринового сока — 20 см³.

8.4 Спектрофотометрическое определение общих каротиноидов

Оптическую плотность экстракта, полученного по 8.3, измеряют при 450 нм в спектрофотометре в кювете из оптического стекла и длиной оптического пути 1 см. В качестве раствора сравнения используют петролейный эфир. Расчет массовой концентрации или массовой доли общих каротиноидов проводят по формуле (1) или (2).

8.5 Хроматографическое разделение фракций отдельных каротиноидов

8.5.1 Концентрирование экстракта

Экстракт, полученный по 8.3, переносят в круглодонную колбу ротационного вакуумного испарителя вместимостью 250 см³. Растворитель удаляют из экстракта при температуре 40 °С. Остаток экстрактивных веществ в колбе растворяют в нескольких кубических сантиметрах петролейного эфира, затем количественно переносят в хроматографическую колонку, подготовленную по 6.6. Для исключения потерь круглодонную колбу промывают 10 см³ петролейного эфира, затем также добавляют полученный остаточный экстракт в хроматографическую колонку¹⁾.

8.5.2 Фракционирование каротиноидов

Для хроматографического разделения экстракта и получения фракций отдельных каротиноидов используют следующие элюенты:

- для каротиновой фракции (фракция I) — петролейный эфир;
- фракции криптоксантиновых эфиров (фракция II) — элюент А (6.3);
- фракции ксантофиловых эфиров (фракция III) — элюент Б (6.4);
- фракции остаточных каротиноидов (фракция IV) — ацетон.

Скорость элюирования фракции из колонки составляет 2 капли в секунду.

Количество каротиноидов во фракциях зависит от их содержания в анализируемом продукте. При анализе продуктов растительного происхождения (фруктов, напитков на основе фруктового сырья) для получения I-й и II-й фракций требуется около 50 см³ элюента. При высоком содержании каротиноидов во фракции II требуется не более 100 см³ элюента А. Фракцию III получают при расходе от 80 до 100 см³ элюента Б. Для уменьшения общего объема элюата первые бесцветные порции раствора отбрасывают. Для обеспечения полного извлечения каждой фракции элюирование проводят до тех пор, пока элюат не станет бесцветным. Остаточные каротиноиды (фракция IV) элюируют из колонки ацетоном.

8.6 Спектрофотометрическое определение каротиноидов во фракциях

Оптическую плотность фракций отдельных каротиноидов, полученных по 8.5, измеряют при 450 нм в спектрофотометре в кювете из оптического стекла и длиной оптического пути 1 см. В качестве раствора сравнения используют петролейный эфир.

8.7 Определение добавок красителей

Общая массовая доля всех каротиноидов в полученных по 8.5 фракциях должна составлять не менее 90 % от общего содержания каротиноидов, определенного по 8.4. Если массовая доля каротиноидов во фракциях менее указанного значения, то анализируемая проба может содержать добавленные красители, например биксин. На присутствие биксина указывает фракция красно-желтого цвета, которая остается в хроматографической колонке после элюирования последней фракции каротиноидов — фракции IV. Биксин может быть элюирован из колонки смесью, состоящей из четырех объемных частей ацетона и одной объемной части раствора аммиака.

8.8 Определение добавленных каротиноидов

Настоящий метод может быть использован для определения содержания каротиноидов, например провитамина А, добавленных в функциональный пищевой продукт. Однако в определении в качестве контроля используют параллельную пробу анализируемого пищевого продукта, которая не содержит искусственный провитамин А.

9 Обработка и оформление результатов измерений

9.1 Массовую концентрацию каротиноидов C , мг/дм³, (8.4) и отдельных каротиноидов во фракциях I—IV (8.5) рассчитывают по формуле

$$C = 4,00 \cdot A \cdot F, \quad (1)$$

¹⁾ При внесении экстракта в хроматографическую колонку следует избегать нарушения поверхности оксида алюминия. Экстракт рекомендуется вносить отдельными порциями.

где 4,00 — коэффициент пересчета оптической плотности;

A — измеренное значение оптической плотности;

F — фактор разбавления (отношение объема экстракта в петролейном эфире, см³ (8.4) или объемов различных фракций к объему продукта, взятому для анализа, (8.5), см³).

9.2 Массовую долю каротиноидов, X , мг/кг, в функциональных пищевых продуктах рассчитывают по формуле

$$X = 4,00 \cdot A \cdot \frac{V}{m}, \quad (2)$$

где V — объем экстракта в петролейном эфире по 8.4, см³;

m — масса пробы продукта по 8.1, г.

9.3 В протоколе испытаний приводят:

- ссылку на настоящий метод;
- вид, происхождение и название пробы;
- способ и дату отбора пробы;
- дату поступления и испытания пробы;
- результаты измерения;
- причины отклонений в процедуре определения от установленных условий.

10 Контроль точности результатов измерений

10.1 Повторяемость

Абсолютное расхождение между результатами двух параллельных определений, выполненных для одной и той же пробы в одной лаборатории одним сотрудником, составляет $r = 0,2$ мг/дм³, при $s_r = \pm 0,086$.

10.2 Воспроизводимость

Абсолютное расхождение между результатами двух измерений, выполненных для одной и той же пробы в двух различных лабораториях, составляет $R = 0,7$ мг/дм³, при $s_R = \pm 0,237$.

10.3 Контроль стабильности результатов измерений при реализации метода в лаборатории

Контроль стабильности результатов измерений в лаборатории осуществляют в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 5725-6, используя метод контроля стабильности стандартного отклонения промежуточной прецизионности по ГОСТ Р ИСО 5725-6 (6.2.3) с применением контрольных карт Шухарта. Периодичность контроля и процедуры контроля стабильности результатов измерений должны быть предусмотрены в руководстве по качеству лаборатории в соответствии с ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025 (подраздел 4.2) и ГОСТ Р 8.563 (пункт 7.1.1).

11 Требования безопасности

При проведении определений следует соблюдать:

- требования электробезопасности в соответствии с ГОСТ Р 12.1.019;
- требования пожаровзрывобезопасности статического электричества в соответствии с ГОСТ 12.1.018;
- требования взрывобезопасности в соответствии с ГОСТ 12.1.010;
- требования безопасности при работе с чистыми веществами, установленные для работ с токсичными, едкими и легковоспламеняющимися веществами по ГОСТ 12.1.007.

Контроль за содержанием вредных веществ в воздухе рабочей зоны следует проводить в соответствии с ГОСТ 12.1.005.

К проведению определений допускаются лица, имеющие квалификацию не ниже среднего технического образования, владеющие навыками проведения определений и изучившие инструкции по эксплуатации используемой аппаратуры.

УДК 664.001.4:006.034

ОКС 67.220.20

H59

ОКСТУ 9109

Ключевые слова: продукты пищевые функциональные, каротиноиды, спектрофотометрический метод определения массовой концентрации или массовой доли каротиноидов, раствор Карреза

Редактор *М.Е. Никулина*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *М.С. Кабашова*
Компьютерная верстка *В.И. Грищенко*

Сдано в набор 01.08.2011. Подписано в печать 10.08.2011. Формат 60x84¹/₈. Гарнитура Ариал. Усл. печ. л. 1,40.
Уч.-изд. л. 0,90. Тираж 231 экз. Зак. 719.

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
www.gostinfo.ru info@gostinfo.ru
Набрано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» на ПЭВМ.
Отпечатано в филиале ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» — тип. «Московский печатник»,
117418 Москва, Нахимовский проспект, 31, к. 2.