

ГОСТ 29139—91

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

**МУКА, ХЛЕБ И ХЛЕБОБУЛОЧНЫЕ ИЗДЕЛИЯ
ПШЕНИЧНЫЕ ВИТАМИНИЗИРОВАННЫЕ**

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИТАМИНА В₂ (РИБОФЛАВИНА)

Издание официальное



Москва
Стандартинформ
2007

**МУКА, ХЛЕБ И ХЛЕБОБУЛОЧНЫЕ ИЗДЕЛИЯ
ПШЕНИЧНЫЕ ВИТАМИНИЗИРОВАННЫЕ****Метод определения витамина В₂ (рибофлавина)****ГОСТ
29139—91**Wheat vitaminized flour, bread and baked
products. Method for vitamin В₂ (riboflavin)
determinationМКС 69.070
ОКСТУ 9109, 9209

Дата введения 01.01.93

Настоящий стандарт распространяется на витаминизированные пшеничные муку, хлеб и хлебобулочные изделия, обогащаемые смесью витаминов, и устанавливает метод определения в продукте суммарного количества витамина В₂ (рибофлавина) — свободной и связанной форм.

Сущность метода заключается в освобождении связанных форм рибофлавина гидролизом, экстракционной очистке полученного гидролизата от соединений, мешающих флуорометрическому определению, переводе при облучении в щелочной среде рибофлавина в люмифлавин, извлечении его хлороформом и измерении интенсивности флуоресценции люмифлавина в сравнении со стандартным раствором с помощью флуорометра.

1. ОТБОР ПРОБ

- 1.1. Отбор проб муки — по ГОСТ 27668.
- 1.2. Отбор проб хлеба и хлебобулочных изделий — по ГОСТ 5667.
- 1.3. Отбор проб сухарей — по ГОСТ 8494.
- 1.4. Отбор проб бараночных изделий — по ГОСТ 7128.

2. АППАРАТУРА, МАТЕРИАЛЫ И РЕАКТИВЫ

Флуорометр лабораторный электронный марки ЭФ-3МА или медицинский марки ФМ-Ц-2 или других марок, обеспечивающий длины волн возбуждения в области 350—480 нм, флуоресценции — 475—650 нм.

Мельница типа ЛЗМ или аналогичного типа, обеспечивающая необходимую степень измельчения продукта.

Мясорубка бытовая по ГОСТ 4025.

Нож.

Весы лабораторные общего назначения с допуском погрешности взвешивания $\pm 0,01$ г.

Весы лабораторные общего назначения с допуском погрешности взвешивания $\pm 0,001$ г.

Баня водяная лабораторная.

Иономер.

Термостат, обеспечивающий создание и поддержание температуры 37 °С с погрешностью ± 2 °С.

Секундомер.

Светильник по ГОСТ 8607 с лампой накаливания 100 Вт по ГОСТ 2239.

Электроventильатор бытовой по ГОСТ 7402.

Полотно решетчатое типа I, № 11 по ТУ 23.2.2068.

Воронка делительная исполнения 3, вместимостью 250 см³, из химически стойкого стекла группы ХС по ГОСТ 25336.

Воронки лабораторные диаметром 35, 75 мм по ГОСТ 25336.

Палочки стеклянные по ГОСТ 21400.

Склянки из темного стекла с притертыми пробками вместимостью от 300 до 1000 см³.

Колба типа II, ТХС, исполнений 1, 2, вместимостью 250 см³ по ГОСТ 25336.

Колба коническая типа Ки, исполнений 1, 2, вместимостью 100 см³ по ГОСТ 25336.

Колбы мерные исполнения 2, вместимостью 100 и 1000 см³ по ГОСТ 1770.
 Бюретка исполнения 3, вместимостью 10 см³ по ГОСТ 29251.
 Цилиндр исполнений 2 и 4, вместимостью 100 см³ по ГОСТ 1770.
 Пробирка исполнения 2, вместимостью 20 см³ по ГОСТ 1770.
 Цилиндр исполнений 1 и 3, вместимостью 250 см³ по ГОСТ 1770.
 Пипетки исполнений 4, 5, вместимостью 1 и 2 см³ по ГОСТ 29227.
 Пипетки исполнений 6, 7, вместимостью 5 и 10 см³ по ГОСТ 29227.
 Стакан химический типов В и Н, исполнений 1, 2, вместимостью 25 см³ по ГОСТ 25336.
 Рибофлавин по ГФК ст. 585.

Кислота серная по ГОСТ 4204, х. ч. или ч. д. а., раствор концентрации 0,3 г/см³.

Кислота соляная по ГОСТ 3118, х. ч. или ч. д. а., раствор концентрации 0,1 моль/дм³.

Кислота уксусная ледяная по ГОСТ 61, х. ч. или ч. д. а.

Натрий серноокислый безводный по ГОСТ 4166, х. ч. или ч. д. а.

Натрий уксуснокислый по ГОСТ 199, х. ч. или ч. д. а., насыщенный водный раствор.

Натрий гидроокись по ГОСТ 4328, х. ч. или ч. д. а., раствор концентрации 7 моль/дм³.

Калий марганцовокислый по ГОСТ 20490, х. ч. или ч. д. а., раствор концентрации 0,03 г/см³, готовится еженедельно.

Водорода перекись по ГОСТ 177, х. ч. или ч. д. а., раствор концентрации 0,03 г/см³, готовится еженедельно.

Хлороформ по ГОСТ 20015.

Толуол по ГОСТ 5789, ч. д. а.

Амилоризин П10Х по ОСТ 64—037.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026.

3. ПОДГОТОВКА К ИСПЫТАНИЮ

3.1. Бараночные изделия и сухари измельчают на лабораторной мельнице так, чтобы весь размолотый продукт прошел при просеивании через решетчатое полотно с отверстиями диаметром 1,1 мм.

Хлебные изделия разрезают на четыре части по двум взаимно перпендикулярным направлениям. Затем берут две диаметрально противоположные четверти, которые разрезают ножом на небольшие ломтики. Последние пропускают через мясорубку или тщательно измельчают ножом.

Измельченную пробу тщательно перемешивают.

3.2. Приготовление основного стандартного раствора рибофлавина

Навеску рибофлавина массой 0,020 г помещают в мерную колбу вместимостью 1000 см³, добавляют 750 см³ дистиллированной воды и 1 см³ ледяной уксусной кислоты и слегка нагревают для лучшего растворения. После полного растворения рибофлавина раствор охлаждают до комнатной температуры и доводят объем дистиллированной водой до метки.

Приготовленный раствор переносят в склянку из темного стекла с притертой пробкой.

Концентрация основного стандартного раствора рибофлавина составит 20 мкг/см³.

Раствор хранят в холодильнике не более 1 мес.

3.3. Приготовление рабочего стандартного раствора рибофлавина

7—10 см³ основного стандартного раствора рибофлавина помещают в химический стакан и выдерживают в темном месте до приобретения раствором комнатной температуры.

Затем 5 см³ основного стандартного раствора рибофлавина переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³, доводят объем дистиллированной водой до метки и тщательно перемешивают.

Концентрация рабочего стандартного раствора рибофлавина составит 1 мкг/см³.

Раствор готовят в день проведения анализа.

4. ПРОВЕДЕНИЕ ИСПЫТАНИЯ

4.1. Рибофлавин определяют в двух параллельных навесках продукта.

4.2. Гидролиз

Навеску продукта массой 10,0 г* помещают в колбу вместимостью 250 см³ и приливают 150 см³ раствора соляной кислоты концентрации 0,1 моль/дм³.

* Масса навески должна обеспечить концентрацию рибофлавина в измеряемом растворе в диапазоне 0,04—0,25 мкг/см³, что при данных навеске и разведениях будет соответствовать содержанию рибофлавина в продукте 0,10—0,60 мг/100 г.

Гидролиз осуществляют на кипящей водяной бане в течение 40 мин, закрыв горло колбы воронкой диаметром 35 мм.

Содержимое колбы следует периодически перемешивать, особенно в первые 5 мин.

По окончании гидролиза колбу охлаждают до комнатной температуры и с помощью насыщенного водного раствора уксуснокислого натрия доводят рН гидролизата до $4,5 \pm 0,1$ (потенциометрически).

После этого к гидролизату добавляют навеску амилоризина массой 0,10 г, 2—3 капли толуола и затем колбу помещают в термостат на 14—16 ч при температуре 37 °С. После этого гидролизат охлаждают, доводят его объем до 250 см³ дистиллированной водой и фильтруют. В фильтрате определяют содержание рибофлавина.

Если имеется необходимость прервать анализ на 1—2 дня, то перед доведением объема до 250 см³ гидролизат кипятят 5 мин, охлаждают, доводят объем до 250 см³ и фильтруют.

Одновременно аналогичным образом готовят контрольный раствор на содержание рибофлавина в амилоризине, используя то же количество ферментного препарата и реактивов, но без навески исследуемой пробы.

До проведения анализа фильтрат хранят в холодильнике в плотно закрытой колбе.

4.3. Очистка гидролизата от примесей, мешающих определению

К 100 см³ фильтрата добавляют 2 см³ раствора серной кислоты концентрации 0,3 г/см³ и с помощью пипетки или бюретки по каплям раствор марганцовокислого калия концентрации 0,03 г/см³, постоянно перемешивая до получения малинового окрашивания.

Избыток марганцовокислого калия удаляют добавлением по каплям раствора перекиси водорода до обесцвечивания фильтрата.

Количество израсходованных растворов серной кислоты, марганцовокислого калия и перекиси водорода (в кубических сантиметрах) приплюсовывают к первоначально взятому на окисление объему фильтрата, чтобы определить конечный объем раствора.

Полученный раствор переносят в делительную воронку, добавляют 30—50 см³ хлороформа и встряхивают в течение 1 мин. После разделения слоев хлороформный слой (нижний) отбрасывают, а водную фазу используют для дальнейшего определения.

4.4. Фотолиз

Фотолиз проводят в пяти конических колбах с притертыми пробками.

В четыре колбы наливают по 20 см³ очищенного гидролизата, в две из которых добавляют по 2 см³ рабочего стандартного раствора рибофлавина.

В пятую колбу наливают 20 см³ контрольного раствора.

Во все пять колб добавляют по 4 см³ раствора гидроокиси натрия концентрации 7 моль/дм³, закрывают колбу пробками, перемешивают содержимое и облучают их светом двух светильников с лампами накаливания по 100 Вт каждая с расстояния 30 см в течение 40 мин.

Температура окружающего воздуха должна быть не более 25 °С. Для поддержания указанной температуры воздуха используют настольный вентилятор.

Немедленно по окончании облучения растворы во всех колбах подкисляют 4 см³ ледяной уксусной кислоты, добавляют к ним по 20 см³ хлороформа, закрывают притертыми пробками и встряхивают в течение 2 мин, избегая образования эмульсии.

Затем все колбы оставляют на 10—15 мин для расслоения водной и хлороформной фаз.

После этого пипеткой отбирают по 10—12 см³ хлороформного раствора (нижний слой), который фильтруют через бумажный фильтр с безводным сернокислым натрием в флюорометрические пробирки.

Время с момента начала фильтрации раствора люмифлавина до измерения его флюоресценции не должно превышать 30 мин.

4.5. Измерение флюоресценции хлороформного раствора

При работе на флюорометре марки ЭФ-ЗМА устанавливают светофильтры для витамина В₂.

При работе на флюорометре марки ФМ-Ц-2 устанавливают светофильтры, дающие длины волн возбуждения и флюоресценции 450 и 550 нм соответственно.

Измерение интенсивности флюоресценции растворов осуществляют по отношению к хлороформу.

При работе на флюорометрах других марок интенсивность флюоресценции люмифлавина измеряют при светофильтрах, дающих длины волн возбуждения в области 350—480 нм, флюоресценции — 475—650 нм.

5. ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

5.1. Массовую долю рибофлавина (X), мг на 100 г продукта, вычисляют по формулам:

$$X = \frac{(A - A_1) \cdot X_1 \cdot V \cdot V_1}{(A_2 - A) \cdot m \cdot V_2 \cdot V_3 \cdot 10},$$

или

$$X = \frac{(A - A_1) \cdot V_1}{(A_2 - A) \cdot 400},$$

где A — интенсивность флюоресценции испытуемого раствора без добавления стандартного раствора рибофлавина, среднее из двух параллельных определений, ед. прибора;

A_1 — интенсивность флюоресценции контрольного раствора, ед. прибора;

A_2 — интенсивность флюоресценции испытуемого раствора с добавлением стандартного раствора рибофлавина, среднее из двух параллельных определений, ед. прибора;

X_1 — массовая доля добавленного рибофлавина, мкг;

m — масса пробы продукта, используемая для испытания, г;

V — общий объем гидролизата, см³;

V_1 — объем гидролизата после окисления, см³;

V_2 — объем гидролизата, используемый для очистки от примесей, см³;

V_3 — объем гидролизата, используемый для облучения, см³;

10 — коэффициент пересчета из мкг/г в мг на 100 г продукта;

400 — коэффициент, включающий постоянные величины: $X_1 = 2$ мкг; $m = 10$ г; $V = 250$ см³, $V_2 = 100$ см³, $V_3 = 20$ см³ и коэффициент пересчета = 10.

5.2. Вычисления проводят с точностью до третьего десятичного знака с последующим округлением до второго десятичного знака.

Полученный результат должен быть в диапазоне 0,10—0,60 мг/100 г продукта. В противном случае испытание повторяют с уточненной навеской продукта (см. п. 4.2).

5.3. За окончательный результат испытания принимают среднеарифметическое значение (\bar{X}) результатов двух параллельных определений, допустимое расхождение (d) между которыми в мг/100 г не должно превышать 0,24 \bar{X} .

5.4. При контрольных определениях допустимое расхождение (D) между контрольным и первоначальным определениями в мг/100 г не должно превышать 0,38 \bar{X} (\bar{X} — среднеарифметическое значение результатов контрольного и первоначального определений).

При контрольном определении за окончательный результат испытания принимают результат первоначального определения, если расхождение между результатами контрольного и первоначального определений не превышает допустимого значения; если расхождение превышает допустимое значение, то за окончательный результат испытаний принимают результат контрольного определения.

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

1. РАЗРАБОТАН И ВНЕСЕН ВНИПО «Зернопродукт»

РАЗРАБОТЧИКИ

Г.С. Зелинский, канд. техн. наук; К.А. Чурусов, канд. техн. наук (руководитель темы);
 А.Ф. Шухинов, канд. техн. наук; А.М. Каменецкая, канд. техн. наук; Н.А. Игрянова, канд.
 техн. наук; А.И. Быстрова, Л.И. Гусева, канд. биол. наук; Е.Н. Степанова, канд. с.-х. наук

2. УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Комитета стандартизации и метрологии СССР от 29.11.91 № 1835

3. ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

4. ССЫЛОЧНЫЕ НОРМАТИВНО-ТЕХНИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ

Обозначение НТД, на который дана ссылка	Номер раздела, пункта
ГОСТ 61—75	2
ГОСТ 177—88	2
ГОСТ 199—78	2
ГОСТ 1770—74	2
ГОСТ 2239—79	2
ГОСТ 3118—77	2
ГОСТ 4025—95	2
ГОСТ 4166—76	2
ГОСТ 4204—77	2
ГОСТ 4328—77	2
ГОСТ 5667—65	1.2
ГОСТ 5789—78	2
ГОСТ 6709—72	2
ГОСТ 7128—91	1.4
ГОСТ 7402—84	2
ГОСТ 8494—96	1.3
ГОСТ 8607—82	2
ГОСТ 12026—76	2
ГОСТ 20015—88	2
ГОСТ 20490—75	2
ГОСТ 21400—75	2
ГОСТ 25336—82	2
ГОСТ 27668—88	1.1
ГОСТ 29227—91	2
ГОСТ 29251—91	2
ОСТ 64—037—87	2
ТУ 23.2.2068—89	2
ГФК ст. 585	2

5. ПЕРЕИЗДАНИЕ