



МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ
СТАНДАРТ

ГОСТ
EN 14131—
2015

ПРОДУКЦИЯ ПИЩЕВАЯ

Определение фолата методом микробиологических
испытаний

(EN 14131:2003, IDT)

Издание официальное

НИФСИТР ЦСМ при МЭ КР

**РАБОЧИЙ
ЭКЗЕМПЛЯР**

Зарегистрирован

№ 10779

27 февраля 2015 г.



Минск

Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации

Предисловие

Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации (ЕАСС) представляет собой региональное объединение национальных органов по стандартизации государств, входящих в Содружество Независимых Государств. В дальнейшем возможно вступление в ЕАСС национальных органов по стандартизации других государств.

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0—92 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2009 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, применения, обновления и отмены».

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН научно-производственным республиканским унитарным предприятием «Белорусский государственный институт стандартизации и сертификации» (БелГИСС)

2 ВНЕСЕН Госстандартом Республики Беларусь

3 ПРИНЯТ Евразийским советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 27 февраля 2015 г. № 75-П)

За принятие стандарта проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Кыргызстан	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт
Украина	UA	Минэкономразвития Украины

4 Настоящий стандарт идентичен европейскому стандарту EN 14131:2003 Foodstuffs — Determination of folate by microbiological assay (Продукция пищевая. Определение фолата методом микробиологических испытаний).

Европейский стандарт разработан техническим комитетом по стандартизации CEN/TC 275 «Анализ пищевой продукции. Горизонтальные методы» Европейского комитета по стандартизации (CEN).

Перевод с английского языка (en).

Официальные экземпляры европейского стандарта, на основе которого подготовлен настоящий межгосударственный стандарт, и европейского стандарта, на который даны ссылки, имеются в Госстандарте Республики Беларусь.

В разделе «Нормативные ссылки» и тексте стандарта ссылки на европейский стандарт актуализированы.

В стандарт внесено следующее редакционное изменение: наименование настоящего стандарта изменено относительно наименования европейского стандарта в целях увязки с существующей группой межгосударственных стандартов.

Сведения о соответствии межгосударственного стандарта ссылочному европейскому стандарту приведены в дополнительном приложении Д.А.

Степень соответствия — идентичная (IDT)

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных (государственных) стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных (государственных) органов по стандартизации.

В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация также будет опубликована в сети Интернет на сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты»

Исключительное право официального опубликования настоящего стандарта на территории указанных выше государств принадлежит национальным (государственным) органам по стандартизации этих государств.

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ПРОДУКЦИЯ ПИЩЕВАЯ
Определение фолата методом микробиологических испытанийFoodstuffs
Determination of folate by microbiological assay

Дата введения

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает микробиологический метод определения общего содержания фолата посредством турбидиметрического обнаружения роста микроорганизмов *Lactobacillus casei*, подвида *rhannosus* (ATCC 7469).

Метод применяется для определения фолатов в пищевой продукции, в том числе фолатов природного происхождения и добавленной фолиевой кислоты (птероилглутаминовой кислоты).

2 Нормативные ссылки

Для применения настоящего стандарта необходим следующий ссылочный стандарт. Для недатированных ссылок применяют последнее издание ссылочного стандарта (включая все его изменения).

EN ISO 3696:1995 Water for analytical laboratory use — Specification and test methods (Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы испытаний)

3 Сущность метода

Пробы, суспендированные в фосфатном буфере, нагревают, чтобы обеспечить экстракцию фолатов. Допускается использовать обработку протеазой и α -амилазой, чтобы продолжить ферментативное расщепление пищевой матрицы. Фолилполиглутамат природного происхождения гидролизуют γ -глутамил гидролазой (ЕС 3.4.19.9) ([1]) до фолилмоно- или фолилдиглутаматов.

Экстрагированные фолаты разбавляют основной средой, содержащей все необходимые для роста питательные вещества, кроме фолата. Проводят турбидиметрический анализ ростовой реакции *Lactobacillus casei*, подвида *rhannosus* (ATCC 7469), на экстрагированные фолаты, и сравнивают эту ростовую реакцию с ростовой реакцией на калибрующие растворы с известной концентрацией.

На усмотрение пользователей настоящего стандарта могут быть использованы полуавтоматическая система распределения жидкости и микропланшеты или аналитические пробирки для инкубации микроорганизма.

4 Реактивы**4.1 Общие положения**

Для проведения анализа, если не указано иное, используют только реактивы признанной аналитической чистоты и воду не ниже первой степени чистоты по EN ISO 3696. Воду, используемую для приготовления реактивов, должна быть получена в стеклянном бидистилляторе.

4.2 Растворители и химические вещества**4.2.1 Глицерин**, $w(\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3) = 80 \%$.

Смешивают 120 мл глицерина с 30 мл дистиллированной воды.

4.2.2 1-Октанол, $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{O}$.**4.2.3 Толуол**, C_7H_8 .**4.2.4 2-Меркаптоэтанол**, $c(\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}) = 0,1$ моль/л.

Добавляют 70 мкл 2-меркаптоэтанола в 10 мл воды.

4.2.5 Аскорбат натрия, $\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_6\text{Na}$.

Аскорбат натрия используют в качестве реактива в нескольких растворах, описанных в настоящем стандарте. Также можно использовать аскорбиновую кислоту, но в этом случае может потребоваться изменить порядок регулирования pH.

4.2.6 Соляная кислота, $c(\text{HCl}) = 1$ моль/л.

4.2.7 **Гидроксид натрия**, $w(\text{NaOH}) = 40 \%$.

Растворяют 400 г гидроксида натрия в воде и разбавляют до 1 л.

4.2.8 **Сульфат аммония**, $\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$.4.2.9 **Фосфат натрия**, одноосновный, безводный, NaH_2PO_4 .

Количества одноосновного фосфата натрия, используемые для приготовления буферов (4.3), были рассчитаны по безводному веществу. Может также использоваться моно- или дигидрированное вещество, но при этом проводят соответствующий перерасчет вещества.

4.2.10 **2-(N-Циклогексиламино)этансульфоновая кислота (CHES)**, $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{NO}_3\text{S}$.4.2.11 **N-(2-Гидроксиэтил)пиперазин-N'-(2-этансульфоновая кислота) (HEPES)**, $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$.4.2.12 **Угольный порошок**, промытый кислотой.4.2.13 **Физиологический раствор**, стерильный.

Растворяют 9 г хлорида натрия в 1000 мл воды. Разливают по 10 мл раствора в аналитические пробирки размером 20 × 150 мм. Закрывают пробирки и стерилизуют при температуре 121 °С в течение 15 мин. Охлаждают и хранят при низких температурах.

4.2.14 **Раствор основной среды, не содержащей фолиевую кислоту**, двойной концентрации.

На каждые необходимые 100 мл суспендируют рекомендуемое количество основной среды (среда Vacto Folic Acid Casei Medium или эквивалентная среда¹⁾) в 100 мл дистиллированной воды. Добавляют 0,050 г аскорбата натрия (4.2.5) и нагревают до кипения в течение 1–2 мин. Дают остыть до комнатной температуры и доводят pH до $6,1 \pm 0,1$.

4.2.15 **Стандартное вещество фолиевой кислоты**.

Фолиевая кислота может быть приобретена у различных поставщиков и может содержать до 8 % воды. Стандартная фолиевая кислота может иметь различную степень чистоты, поэтому необходимо определить концентрацию калибрующего раствора методом измерения ультрафиолетового поглощения (см. процедуру калибровки в 6.4.2).

4.3 Буферы

4.3.1 **Фосфатный буфер**, pH 5,0 ($c = 0,002$ моль/л).

Растворяют 0,24 г фосфата натрия одноосновного (4.2.9) в 900 мл воды. Доводят pH до $5,0 \pm 0,1$ гидроксидом натрия (4.2.7) и разбавляют до 1000 мл водой.

4.3.2 **Фосфатный буфер**, pH 7,0 ($c = 0,1$ моль/л).

Растворяют 12,0 г фосфата натрия одноосновного (4.2.9) в 900 мл воды. Доводят pH до $7,0 \pm 0,1$ гидроксидом натрия (4.2.7) и разбавляют до 1000 мл водой.

4.3.3 **Фосфатный буфер**, pH 5,0 ($c = 0,1$ моль/л) с 2-меркаптоэтанолом ($c = 10$ ммоль/л).

Растворяют 12,0 г фосфата натрия одноосновного (4.2.9) в 900 мл воды. Доводят pH до $5,0 \pm 0,1$, добавляют 0,70 мл 2-меркаптоэтанола (4.2.4) и разбавляют до 1000 мл водой.

4.3.4 **Фосфатный буфер**, pH 4,5 ($c = 0,1$ моль/л) с аскорбатом (1 %).

Растворяют 12,0 г фосфата натрия одноосновного (4.2.9) и 10 г аскорбата натрия (4.2.5) в 900 мл воды. Доводят pH до $4,5 \pm 0,1$ гидроксидом натрия (4.2.7) и разбавляют до 1000 мл водой. Используют свежеприготовленный раствор.

4.3.5 **Фосфатный буфер**, pH 6,1 ($c = 0,1$ моль/л) с аскорбатом (1 %).

Растворяют 12,0 г фосфата натрия одноосновного (4.2.9) и 10 г аскорбата натрия (4.2.5) в 900 мл воды. Доводят pH до $6,1 \pm 0,1$ гидроксидом натрия (4.2.7) и разбавляют до 1000 мл водой. Используют свежеприготовленный раствор.

4.3.6 **Фосфатный буфер**, pH 7,8 ($c = 0,1$ моль/л) с аскорбатом (1 %).

Растворяют 12,0 г фосфата натрия одноосновного (4.2.9) и 10 г аскорбата натрия (4.2.5) в 900 мл воды. Доводят pH до $7,8 \pm 0,1$ гидроксидом натрия (4.2.7) и разбавляют до 1000 мл водой. Используют свежеприготовленный раствор.

4.3.7 **Буфер CHES/HEPES**, pH 7,85 ($c = 0,05$ моль/л) с аскорбатом и 2-меркаптоэтанолом (4.2.4) для диализа плазмы крови крысы.

Растворяют 23,8 г HEPES (4.2.11), 20,7 г CHES (4.2.10), 40 г аскорбата натрия (4.2.5) и 1,4 мл 2-меркаптоэтанола (4.2.4) в 1900 мл воды. Доводят pH до $7,85 \pm 0,10$ гидроксидом натрия (4.2.7) и разбавляют до 2000 мл водой. Добавляют 4 г угольного порошка, промытого кислотой (4.2.12). Используют свежеприготовленный раствор.

¹⁾ Vacto Folic Acid Casei Medium — торговое название продукта, поставляемого фирмой Difco. Информация приводится для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламой указанного продукта со стороны CEN. Могут быть использованы эквивалентные продукты, если было установлено, что они дают аналогичные результаты.