ГОСТ 25011—81

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

МЯСО И МЯСНЫЕ ПРОДУКТЫ

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКА

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2010

gost.e-ecolog.ru

УДК 637.52:006.354 Группа Н19

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

МЯСО И МЯСНЫЕ ПРОДУКТЫ

Методы определения белка

ГОСТ 25011—81

Meat and meat products. Methods of protein determination

МКС 67.120.10
ОКСТУ 9209

Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 27 ноября 1981 г. № 5145 дата введения установлена

01.01.83

Ограничение срока действия снято по протоколу № 3—93 Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации (ИУС 5-6—93)

Настоящий стандарт распространяется на мясо и мясные продукты, а также консервы на мясной основе для детского питания и устанавливает фотометрический метод определения белка и метод определения содержания белков по Кьельдалю.

Настоящий стандарт полностью соответствует СТ СЭВ 2787—80.

(Измененная редакция, Изм. № 1).

1. ФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД

1.1. Сущность метода

Метод основан на минерализации пробы по Кьельдалю и фотометрическом измерении интенсивности окраски индофенолового синего, которая пропорциональна количеству аммиака в минерализате.

1.2. Методы отбора и подготовки проб

1.2.1. Отбор проб мяса — по ГОСТ 7269—79, отбор проб мясных продуктов — по ГОСТ 9792—73*. Отобранные пробы мяса и мясных продуктов дважды измельчают на бытовой или электрической мясорубке с отверстиями решетки диаметром 3 мм и тщательно перемешивают.

Отбор и подготовка проб консервов на мясной основе для детского питания — по ГОСТ 8756.0—70.

(Измененная редакция, Изм. № 1).

1.2.2. Подготовленную для анализа пробу помещают в стеклянную банку вместимостью 200—400 см^3, заполнив ее полностью, и закрывают крышкой.

Пробу хранят при температуре от 3 до 5 °С до окончания анализа.

1.3. Аппаратура, реактивы и материалы

Весы лабораторные общего назначения 1-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 24104—88**.

Спектрофотометр марок СФ-4, СФ-26 или фотоэлектроколориметр марки 56 ПМ или других аналогичных марок.

Мясорубка бытовая с отверстиями решетки диаметром не более 4 мм по ГОСТ 4025—95 или электромясорубка бытовая по ГОСТ 20469—95.

* На территории Российской Федерации дополнительно действует ГОСТ Р 51447—99.

** С 1 июля 2002 г. введен в действие ГОСТ 24104—2001 (здесь и далее).

Издание официальное **Перепечатка воспрещена**

Издание (январь 2010 г.) с Изменением № 1, утвержденным в декабре 1987 г. (ИУС 4—88).

© Издательство стандартов, 1981
© СТАНДАРТИНФОРМ, 2010

Промывалка стеклянная лабораторная.

Штатив химический.

Пробирки П 4—15—14/23 ХС или П 4—20—14/23 ХС по ГОСТ 25336—82.

Колбы Кьельдаля 1—50—14/23 ТС или 1—100—14/23 ТС, 2—50—14 ТХС или 2—100—14 ТХС по ГОСТ 25336—82.

Колбы Кн-1—100—14/23 ТС по ГОСТ 25336—82.

Пипетки 4—1—1 или 4—2—1, 4—1—5 или 4—2—5.

Колбы мерные 2—100—2, 2—250—2 по ГОСТ 1770—74.

Воронки В-56—80 ХС или В-75—110 ХС по ГОСТ 25336—82.

Стаканы В-1—600 ТС по ГОСТ 25336—82.

Стаканчики для взвешивания СВ-14/8 по ГОСТ 25336—82.

Бумага универсальная индикаторная.

Фильтры обеззоленные.

Кислота серная по ГОСТ 4204—77, х. ч., плотностью 1,84 г/см^3.

Кислота соляная по ГОСТ 3118—77, х. ч., раствор c (HCl) = 1 моль/дм^3.

Водорода перекись по ГОСТ 10929—76.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709—72.

Аммоний сернокислый по ГОСТ 3769—78, х. ч.

Известь хлорная по ГОСТ 1692—85.

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328—77, ч. д. а.

Фенол по ТУ 6—09—5303—86, ч.

Натрий нитропруссидный, ч.

Натрий серноватистокислый (тиосульфат натрия) по ГОСТ 244—76, раствор c ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$)= = 0,1 моль/дм^3.

Натрия гипохлорит.

Калий йодистый по ГОСТ 4232—74, ч. д. а.

Натрий углекислый безводный по ГОСТ 83—79, ч. д. а.

(Измененная редакция, Изм. № 1).

1.4. Подготовка к испытанию

1.4.1. Приготовление реактива 1

10 г фенола и 0,05 г нитропруссида натрия растворяют в мерной колбе вместимостью 1000 см^3 дистиллированной водой, объем колбы доводят до метки.

1.4.2. Приготовление реактива 2

5 г гидроокиси натрия растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе вместимостью 1000 см^3, после охлаждения добавляют количество исходного раствора гипохлорита натрия из расчета его содержания 0,42 г/дм^3 или 0,2 г дихлоризоцианурата натрия и доводят объем колбы дистиллированной водой до метки.

1.4.3. Приготовленные реактивы хранят в темной посуде в холодильнике не более 2 мес.

1.4.4. Приготовление исходного гипохлорита натрия

В стакане вместимостью 500 см^3 перемешивают 150 г хлорной извести с 250 см^3 дистиллированной воды; в другом стакане в 250 см^3 дистиллированной воды растворяют 105 г углекислого натрия, затем сливают оба раствора при постоянном перемешивании. Масса сначала густеет, затем разжижается. Полученную суспензию оставляют на 1—2 сут. для отстаивания, затем надосадочную жидкость сливают и отфильтровывают.

Полученный реактив имеет концентрацию активного хлора около 60—100 г/дм^3 и может храниться в склянке из темного стекла до 1 года. В полученном реактиве определяют концентрацию активного хлора. Для этого 1 см^3 прозрачного фильтрата разбавляют в конической колбе вместимостью 100 см^3 дистиллированной водой до 40—50 см^3, прибавляют 2 г калия йодистого и 10 см^3 соляной кислоты 1 моль/дм^3 (1 н.). Образовавшийся йод оттитровывают 0,1 моль/дм^3 (0,1 н.) раствором серноватистокислого натрия, приготовленного из фиксанала, до исчезновения вишневой окраски (1 см^3 0,1 моль/дм^3 (0,1 н.) раствора серноватистокислого натрия соответствует 0,00355 г хлора).

(Измененная редакция, Изм. № 1).

1.4.5. Определение количества гипохлорита натрия в исходном растворе

Перед приготовлением реактива 2 необходимо определить содержание гипохлорита натрия в исходном растворе, учитывая неустойчивость его при хранении.

По количеству израсходованного на титрование тиосульфата натрия определяют количество раствора гипохлорита натрия, необходимого для приготовления реактива 2.

Пример расчета:

Количество раствора тиосульфата натрия концентрации 0,1 моль/дм³ (0,1 н.), израсходованного на титрование 1 см³ исходного раствора гипохлорита натрия, составляет, например, 12,09 см³.

Эквивалентная масса гипохлорита натрия равна половине молекулярной массы гипохлорита натрия и составляет 74,4:2 = 37,2 г. Следовательно, количество гипохлорита натрия в исходном растворе гипохлорита натрия составляет 1,209 × 37,2 = 44,97 г.

Учитывая, что реактив 2 должен содержать 0,42 г гипохлорита натрия, из пропорции определяем:

в 1000 см³ исходного раствора — 44,97 г

X — 0,42 г

$$X = \frac{1000 \cdot 0,42}{44,97} \approx 9,4 \text{ см}^3 .$$

Следовательно, для приготовления 1 дм³ реактива 2 требуется 9,4 см³ исходного раствора гипохлорита натрия.

1.4.6. Приготовление стандартного раствора сернокислого аммония для построения градуировочной кривой

0,236 г сернокислого аммония, предварительно высушенного до постоянной массы при температуре 60 °С, вносят в мерную колбу вместимостью 500 см³, растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до метки.

Этот раствор является стандартным и содержит 0,1 мг азота в 1 см³.

1.4.7. Проведение цветной реакции

В мерные колбы вместимостью по 100 см³ вносят следующие количества стандартного раствора в см³: 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0. После доведения объемов колб дистиллированной водой до метки получают серию рабочих растворов концентрации: 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 мкг азота в 1 см³.

Для проведения цветной реакции в пробирки берут по 1 см³ рабочего раствора, добавляют 5 см³ реактива 1 и 5 см³ реактива 2, перемешивают и через 30 мин измеряют величину оптической плотности на спектрофотометре при длине волны 625 нм или на фотоэлектроколориметре с красным светофильтром в кювете с толщиной поглощающего свет слоя 1 см в отношении контрольного опыта.

Повторность проведения цветной реакции трехкратная. Для каждого определения готовят новый стандартный раствор.

1.4.8. Построение градуировочного графика

По полученным средним из трех стандартных растворов строят на миллиметровой бумаге размером 20 × 20 см градуировочный график.

На оси абсцисс откладывают величину концентрации азота (мкг/см³), на оси ординат — соответствующую ей оптическую плотность. Градуировочный график должен проходить через начало координат.

1.5. Проведение испытания

Навеску продукта рассчитывают по разности, для этого часть измельченной объединенной пробы помещают в бюксу, закрывают крышкой и взвешивают с допустимой погрешностью не более 0,0002 г. Затем из бюксы скальпелем отбирают 0,4—0,5 г продукта на листок беззольного фильтра и вместе с ним осторожно опускают в колбу Кьельдаля. Бюксу закрывают, взвешивают и рассчитывают точную массу продукта, взятого для анализа.

Такой же листок беззольного фильтра помещают в контрольную колбу Кьельдаля. Затем в обе колбы добавляют 10 см³ концентрированной серной кислоты, 1—2 г сернокислого калия и проводят минерализацию, периодически добавляя для интенсивности процесса в охлажденную пробу перекись водорода (5—7 см³ в течение всей минерализации). Допускается применение других катализаторов, обеспечивающих точность определения.

После минерализации колбы охлаждают и содержимое количественно переносят в мерные колбы вместимостью 250 см³, после охлаждения объем доводят до метки и содержимое перемешивают.

5 см³ полученного минерализата переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³ и доводят до метки дистиллированной водой, получая вторично разбавленный минерализат. Для проведения

цветной реакции 1 см³ вторично разбавленного минерализата вносят в пробирку, затем последовательно добавляют 5 см³ реактива 1 и 5 см³ реактива 2, перемешивают содержимое пробирки. Через 30 мин определяют оптическую плотность растворов на спектрофотометре при длине волны 625 нм или на фотоэлектроколориметре с применением красного светофильтра. Измерение ведется в сравнении с контрольным раствором.

Контрольный раствор готовят одновременно, используя для этой цели контрольный минерализат.

Стабильность окраски растворов сохраняется в течение одного часа.

Температура реактивов при проведении цветной реакции должна быть не ниже 20 °С.

По полученному значению оптической плотности с помощью калибровочного графика находят концентрацию азота.

(Измененная редакция, Изм. № 1).

1.6. Обработка результатов

Массовую долю белка (X), в процентах, вычисляют по формуле

$$X = \frac{C \cdot 250 \cdot 100}{m \cdot 5 \cdot 1 \cdot 10^6} \cdot 100 \cdot 6{,}25,$$

где C — концентрация азота, найденная по калибровочному графику в соответствии с полученной оптической плотностью, мкг/см³;

m — навеска пробы, г;

250 — объем минерализата после первого разведения, см³;

5 — объем разбавленного минерализата для вторичного разведения, см³;

100 — объем минерализата после вторичного разведения, см³;

1 — объем раствора, взятый для проведения цветной реакции, см³;

10^6 — множитель для перевода г в мкг;

100 — множитель для перевода в проценты;

6,25 — коэффициент пересчета на белок.

За окончательный результат принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений.

Расхождение между параллельными определениями не должно превышать 0,1 % по содержанию азота для мяса и мясопродуктов.

2. МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ МАССОВОЙ ДОЛИ БЕЛКА ПО КЬЕЛЬДАЛЮ

2.1. Сущность метода

Метод основан на минерализации пробы по Кьельдалю, отгонке аммиака в раствор серной кислоты с последующим титрованием исследуемой пробы.

2.1.1. **(Исключен, Изм. № 1).**

2.1.2. Для проведения испытаний применяют реактивы квалификации чистый для анализа (ч. д. а.) и дистиллированную воду или воду эквивалентной чистоты.

2.1.3. Испытания следует проводить в помещениях, свободных от паров аммиака.

2.2. Метод отбора и подготовки проб

2.2.1 Отбор проб проводят по ГОСТ 8756.0—70.

2.2.2 Отобранную пробу двукратно измельчают в мясорубке, перемешивают и помещают, уплотняя, в банку с герметической крышкой.

2.2.3. Измельченную пробу хранят при температуре не выше 4 °С до окончания испытания.

Срок хранения пробы для испытаний не должен превышать 24 ч.

2.3. Аппаратура, реактивы и материалы

Весы лабораторные общего назначения 1-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 24104—88.

Мясорубка бытовая с отверстиями решетки диаметром не более 4 мм по ГОСТ 4025—95 или электромясорубка бытовая по ГОСТ 20469—95.

Колбы Кьельдаля 1—50—14/23 ТС или 1—100—14/23 ТС, 2—50—14 ТХС или 2—100—14 ТХС по ГОСТ 25336—82.

Аппарат для перегонки с водяным паром (Парнаса — Вагнера) или обыкновенная установка для перегонки.

Установка электрическая или газовая для сжигания с регулируемой интенсивностью обогрева-

ния, позволяющая обогревать колбы Кьельдаля в наклонном положении, таким образом, чтобы зона нагрева находилась ниже уровня жидкости в колбе. Аппарат должен быть оснащен вытяжным устройством, позволяющим удалять испарения кислот во время обогревания.

Мешалка магнитная с регулируемым числом оборотов и штативом, а также захватом для бюретки вместимостью 50 см³.

Титратор автоматический потенциометрический или полуавтоматическая бюретка.

Бюретка 1—2—50—0,1 или 2—2—50—0,1 по ГОСТ 1770—74.

Дозаторы для жидкостей или цилиндры 1—25, 1—50, 1—100, 1—500 по ГОСТ 1770—74.

Мельница шаровая или ступка с пестиком по ГОСТ 9147—80.

Катализатор медный; готовят следующим образом: тщательно смешивают в весовом отношении 30:1 мелкорастертый безводный сульфат калия по ГОСТ 4145—74 с тонко растертым сульфатом меди по ГОСТ 4165—78. Компоненты смеси, взвешенные с погрешностью не более 0,1 г, растирают в шаровой мельнице или в ступке. Смесь хранят в герметически закрытой склянке и предохраняют от увлажнения. Допускается применение других катализаторов.

Кислота серная по ГОСТ 4204—77, 18,76 моль/дм³ (1,84 г/см³).

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328—77, 8,25 моль/дм³ (330 г/дм³).

Раствор свободный от карбонатов; готовят следующим образом: растворяют 330 г гидроокиси натрия в воде и разбавляют до объема 1 дм³.

Кислота борная по ГОСТ 9656—75, 0,65 моль/дм³ (40 г/дм³); готовят следующим образом: растворяют 40 г борной кислоты в воде и разбавляют до объема 1 дм³.

Кислота соляная по ГОСТ 3118—77 или серная по ГОСТ 4204—77 0,1 моль/дм³ — 0,05 моль/дм³ (0,1 н. — 0,1 н.).

Индикатор Таширо — смесь: готовят растворением 2 г метилового красного и 1 г метилового голубого в 1000 см³ этилового спирта по ГОСТ 5962—67* или по ГОСТ 18300—87, 16,28 моль/дм³ (96 %-ного). Раствор хранят в склянках из темного стекла в холодном темном месте (индикатор изменяет цвет при pH = 5,4).

Бумага пергаментная размерами 60 × 80 мм по ГОСТ 1341—97.

Средства, предупреждающие перегревание во время минерализации: стеклянные или карборундовые бусы или куски твердого фарфора.

Средства, предупреждающие перегревание жидкостей во время перегонки: карборундовые бусы или свежевыжженные куски пемзы.

Средства, предупреждающие пенообразование во время перегонки: парафиновое чистое масло.

Бумажки лакмусовые кислотные или универсальные индикаторы.

Сульфат аммония по ГОСТ 3769—78.

Колба Кн-1—500—29/32 или Кн-2—500—34 по ГОСТ 25336—82.

Стакан Н-1—500 ТХС по ГОСТ 25336—82.

Фильтры обеззоленные.

(Измененная редакция, Изм. № 1).

2.4. Проведение испытания

2.4.1. На пергаментной бумаге отвешивают около 2 г пробы с погрешностью не более 0,001 г. Для проб с большой массовой долей жира масса навески не должна превышать 1,5 г.

2.4.2. Навеску помещают в колбу Кьельдаля, добавляя несколько стеклянных или карборундовых бус или несколько кусочков фарфора, 15,5 г медного катализатора, взвешенного с погрешностью не более 0,1 г, и не более 25 см³ серной кислоты. Содержимое колбы осторожно перемешивают и колбу укрепляют под углом около 40° относительно вертикали на установке для сжигания. Содержимое колбы обогревают осторожно, до появления пенообразования и полного растворения пробы.

Затем обогревают интенсивно и выдерживают в состоянии кипения, вращая периодически колбу вокруг ее оси. После полного осветления содержимого колбы продолжают обогрев в течение 90 мин. Общая продолжительность минерализации должна быть не менее 120 мин. Затем содержимое колбы охлаждают до температуры около 40 °С, осторожно добавляют 50 см³ воды, перемешивают и охлаждают до комнатной температуры.

Во избежание потерь во время минерализации пробы следует избегать проникновения пены в горло колбы, испытание проводить в условиях, не удлиняющих чрезмерно его продолжительность, но гарантирующих полную минерализацию пробы.

---

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

2.4.3. Содержимое колбы Кьельдаля подвергают перегонке с водяным паром или простой перегонке, для чего монтируют соответствующую установку.

В стадии перегонки следует соблюдать плотность установки для перегонки, добавлять раствор гидроокиси натрия по стенке колбы Кьельдаля и смешивать оба слоя только после подключения колбы к установке.

В качестве приемника применяют коническую колбу вместимостью 500 см³ (при применении титратора химический стакан вместимостью 500 см³), в которую наливают 50 см³ раствора борной кислоты и 4 капли индикатора Таширо. Колбу помещают под холодильник установки для перегонки таким образом, чтобы нижний конец холодильника был полностью погружен в жидкость.

Для перегонки с водяным паром содержимое колбы Кьельдаля количественно переносят в колбу для перегонки, споласкивая колбу Кьельдаля 50 см³ воды. Затем добавляют 3 капли парафинового масла с целью уменьшения пенообразования, осторожно добавляют 100 см³ раствора гидроокиси натрия таким образом, чтобы в колбе перегонки образовались два слоя жидкости. Немедленно герметизируют аппарат и пропускают водяной пар через содержимое колбы для перегонки. С момента кипения содержимого колбы продолжают обогрев в течение 20 мин. Заканчивают перегонку после получения не менее 150 см³ дистиллята.

Для простой перегонки осторожно разбавляют содержимое колбы Кьельдаля, добавляя 300 см³ воды, перемешивают и охлаждают до комнатной температуры, добавляют несколько карборундовых бус или кусков пемзы и 3 капли парафинового масла. Затем добавляют 100 см³ раствора гидроокиси натрия таким образом, чтобы он образовал отдельный слой на дне колбы Кьельдаля, и немедленно подключают колбы к установке для перегонки. Перегонку заканчивают после получения не менее 150 см³ дистиллята.

2.4.4. После сбора не менее 150 см³ дистиллята, полученного после перегонки согласно п. 2.4.3, коническую колбу (приемник) опускают таким образом, чтобы нижний конец холодильника находился над уровнем дистиллята, споласкивают конец холодильника водой и проверяют при помощи лакмусовой бумажки или универсального индикатора изменение окраски конденсата, стекающего из холодильника. При отсутствии изменений окраски перегонку заканчивают.

2.4.5. Содержимое конической колбы (приемника) титруют раствором соляной или серной кислоты (0,1 моль/дм³ — 0,05 моль/дм³), применяя бюретку, и отмечают с погрешностью не более 0,02 см³ количество израсходованной кислоты.

2.4.6. При употреблении титратора вместо конических колб как приемника применяют химические стаканы и после окончания перегонки помещают их в титраторе, поступая согласно инструкции по обслуживанию аппарата.

2.4.7. Полученные результаты титрования используют для вычисления массовой доли общего азота и последующего пересчета на белок.

2.4.8. Из каждой пробы проводят, по крайней мере, два параллельных определения.

2.4.9. Контрольную пробу следует проводить так же, как и опытную. Вместо навески мясного продукта берут кусок пергаментной бумаги.

Контрольную пробу (с повторением) следует проводить каждый раз после приготовления свежей порции реагентов или растворов. Рекомендуется также периодическое повторение контрольной пробы при использовании реагентов, которыми уже давно пользуются.

2.4.10. При получении сомнительных результатов (слишком низких или с большими колебаниями между параллельными испытаниями) необходимо провести проверку установки для перегонки или процедуры минерализации.

Для проверки установки для перегонки в аппарат помещают, например, 10 см³ раствора сульфата аммония 0,05 моль/дм³ (0,1 н.), подщелачивают, перегоняют и титруют. Низкий результат (менее $0{,}95 \cdot 10^{-3}$ моль) может указать на неполную перегонку или неплотность аппарата.

Для проверки всего процесса с неорганическим веществом используют сульфат аммония и проводят все испытания, как указано в пп. 2.4.1—2.4.5. Низкий результат, который не может быть приписан процессу перегонки, может быть вызван потерями во время испытаний (выплескивание жидкости, улетучивание соединений азота и т. д.).

Для проверки всего процесса с учетом разложения органического вещества определяют массовую долю азота в органическом трудноразлагаемом соединении (например, в триптофане), чистом или смешанном с веществами, не содержащими азот.

Низкий результат может быть получен из-за недостаточного разложения органического вещества (например, вследствие неправильного обогрева или применения несоответствующего катализатора).

2.5. Обработка результатов

2.5.1. Массовую долю общего азота (X), в процентах, вычисляют по формуле

$$X = \frac{0{,}14 \cdot (V_1 - V_2)}{m}, \quad (1)$$

где m — масса пробы, г;

V_1 — объем точно 0,1 моль/дм^3 — 0,05 моль/дм^3 кислоты (0,1 н. — 0,1 н.), израсходованный на титрование исследуемой пробы, см^3;

V_2 — объем точно 0,1 моль/дм^3 — 0,05 моль/дм^3 кислоты (0,1 н. — 0,1 н.), израсходованный на титрование контрольной пробы, см^3.

2.5.2. Если разница между двумя параллельными определениями не превышает 0,1 % по азоту, то за результат принимают среднеарифметическое значение двух параллельных определений с точностью до 0,01 %. Если разница больше, определение повторяют.

2.5.3. При применении соляной или серной кислоты другой концентрации, в формулу (1) следует ввести соответствующий корректирующий коэффициент.

2.5.4. Массовую долю общего белка (X_1), в процентах, вычисляют по формуле

$$X_1 = 6{,}25 \cdot X, \quad (2)$$

где X — средняя массовая доля общего азота в испытуемой пробе, вычисленная по формуле (1), %, (см. п. 2.5.1).

gost.e-ecolog.ru