ГОСТ Р 51257—99
(ДИН 10325—86)

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СЫРЫ ПЛАВЛЕНЫЕ

Метод определения лимонной кислоты

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2011

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Московским государственным университетом пищевых производств

ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 335 «Методы испытаний агропромышленной продукции на безопасность»

2 ПРИНЯТ И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Госстандарта России от 12 апреля 1999 г. № 119

3 Настоящий стандарт представляет собой аутентичный текст национального стандарта ФРГ ДИН 10325—86 «Ферментативное определение лимонной кислоты в плавленом сыре» с дополнительными требованиями, отражающими потребности народного хозяйства (разделы 2, 3, 4, 5, 6 и 7)

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

5 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Апрель 2011 г.

© ИПК Издательство стандартов, 1999
© СТАНДАРТИНФОРМ, 2011

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

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СЫРЫ ПЛАВЛЕНЫЕ

Метод определения лимонной кислоты

Processed cheeses.
Method for determination of citric acid content

Дата введения 2000—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на сыры плавленые и продукты на основе плавленого сыра и устанавливает метод определения массовой доли лимонной кислоты в виде свободной кислоты или ее соли.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты:
ГОСТ 3769—78 Аммоний сернокислый. Технические условия
ГОСТ 4201—79 Натрий углекислый кислый. Технические условия
ГОСТ 4328—77 Натрия гидроокись. Технические условия
ГОСТ 4529—78 Цинк хлористый. Технические условия
ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия
ГОСТ 26809—86 Молоко и молочные продукты. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу

3 Определение, обозначения и сокращения

3.1 В настоящем стандарте применяют следующие термины с соответствующими определениями:
массовая доля лимонной кислоты: Массовая доля лимонной кислоты и ее соли (цитрата) в пересчете на безводную лимонную кислоту, определенная в соответствии с настоящим стандартом и выраженная в г/100 г.

3.2 В настоящем стандарте применяют следующие обозначения и сокращения:
НАДН — β-никотинамидадениндинуклеотид (восстановленная форма);
L-МДГ — L-малатдегидрогеназа;
L-ЛДГ — L-лактатдегидрогеназа;
ЦЛ — цитратлиаза;
Е — международная единица, определяющая количество (активность) фермента, которое служит катализатором для превращения при 25 °С 1 мкмоля вещества в минуту.

4 Сущность метода

Метод основан на экстрагировании лимонной кислоты и ее солей из пробы водой, освобождении экстракта от жира и белка, ферментативном гидролизе лимонной кислоты в присутствии ЦЛ до щавелевоуксусной кислоты с последующим декарбоксилированием ее до пировиноградной кислоты и восстановлении образовавшихся кислот под действием НАДН в присутствии ферментов L-МДГ и L-ЛДГ до L-яблочной и L-молочной кислот, фотометрическом измерении массовой доли израсходованного НАДН, эквивалентного массовой доле лимонной кислоты или ее соли.

Издание официальное

В ходе анализа протекают следующие ферментативные реакции:

$$\text{лимонная кислота} \xrightarrow{\text{ЦЛ}} \text{щавелевоуксусная кислота} + \text{уксусная кислота}, \quad (1)$$

$$\text{щавелевоуксусная кислота} \longrightarrow \text{пировиноградная кислота} + CO_2, \quad (2)$$

$$\text{щавелевоуксусная кислота} + \text{НАДН} + H^+ \xrightarrow{\text{L-МДГ}} \text{L-яблочная кислота} + \text{НАД}^+, \quad (3)$$

$$\text{пировиноградная кислота} + \text{НАДН} + H^+ \xrightarrow{\text{L-ЛДГ}} \text{L-молочная кислота} + \text{НАД}^+. \quad (4)$$

5 Реактивы

При проведении анализа используют химически чистые или чистые для анализа реактивы.

Вода, используемая для приготовления растворов ферментов, должна быть бидистиллированной.

Вода, используемая для приготовления растворов химических реагентов и подготовки проб, должна быть дистиллированной или деминерализованной.

Допускается использовать имеющиеся в продаже готовые наборы реактивов для определения лимонной кислоты при условии, что качество реактивов не ниже указанного в настоящем стандарте.

Препарат глицилглицин должен содержать не менее 90 % основного вещества.

5.1 Глицилглициновый буферный раствор активной кислотностью 7,8 pH

7,13 г глицилглицина растворяют в 70 см³ дистиллированной воды по ГОСТ 6709. Активную кислотность раствора устанавливают равной 7,8 pH приблизительно 15 см³ раствора гидроокиси натрия по 5.5, добавляют 10 см³ раствора хлорида цинка по 5.6 и доводят общий объем раствора дистиллированной водой до 100 см³. Буферный раствор устойчив при температуре 4 °С 1 мес.

5.2 Раствор НАДН

0,030 г динатриевой соли β-никотинамидадениндинуклеотида (β-НАДН-Na_2, массовая доля основного вещества не менее 98 %) и 0,060 г углекислого кислого натрия по ГОСТ 4201 растворяют в 6 см³ дистиллированной воды. Раствор устойчив при температуре 4 °С 1 мес.

5.3 Суспензия ферментов L-МДГ и L-ЛДГ

0,005 г сухого лиофилизата L-МДГ из свиного сердца активностью 6000 Е смешивают с 1 см³ раствора сернокислого аммония по ГОСТ 3769 молярной концентрации $c\ (NH_4)_2SO_4 = 3{,}2$ моль/дм³.

0,005 г сухого лиофилизата L-ЛДГ активностью 2750 Е смешивают с 1 см³ раствора сернокислого аммония по ГОСТ 3769 молярной концентрации $c\ (NH_4)_2SO_4 = 3{,}2$ моль/дм³.

Для приготовления суспензии ферментов L-МДГ и L-ЛДГ смешивают 0,4 см³ раствора сернокислого аммония по ГОСТ 3769 молярной концентрации $c\ (NH_4)_2SO_4 = 3{,}2$ моль/дм³, 0,1 см³ суспензии L-МДГ и 0,4 см³ суспензии L-ЛДГ. Суспензия ферментов устойчива при температуре 4 °С 12 мес.

5.4 Раствор ЦЛ

0,168 г сухого лиофилизата ЦЛ из Aerobacter aerogenes активностью 42 Е растворяют в 1 см³ бидистиллированной воды температурой 4 °С. Раствор устойчив при температуре 4 °С одну неделю, в замороженном состоянии при минус 20 °С — 1 мес.

5.5 Раствор гидроокиси натрия

8 г гидроокиси натрия по ГОСТ 4328 растворяют в 100 см³ дистиллированной воды.

5.6 Раствор хлорида цинка

0,080 г хлорида цинка по ГОСТ 4529 растворяют в 100 см³ дистиллированной воды.

6 Аппаратура

Обычная лабораторная аппаратура, а также указанная в 6.1—6.13.

6.1 Весы лабораторные общего назначения наибольшим пределом взвешивания 20 г и допускаемой погрешностью ±0,1 мг.

6.2 Баня ледяная или холодильник с морозильным отделением.

6.3 Измельчитель (гомогенизатор) лабораторный угловой скоростью вращения от 500 до 3000 мин$^{-1}$.

6.4 Пробирки диаметром 2,5 см и длиной 20 см.

6.5 Стакан химический номинальной вместимостью 100 см³.

6.6 Мешалка магнитная угловой скоростью вращения от 400 до 1200 мин⁻¹.

6.7 pH-метр диапазоном измерений активной кислотности от 1 до 14 pH и погрешностью измерений ±0,05 pH.

6.8 Дозаторы пипеточные объемами 100, 50 и 25 см³ и относительной погрешностью дозирования ±1 % [1] или пипетки градуированные вместимостью 2,0; 1,0; 0,5; 0,2; 0,1 и 0,02 см³ и допускаемой относительной погрешностью ±1 %.

6.9 Колба мерная номинальной вместимостью 100 см³ и допускаемой относительной погрешностью ±0,2 %.

6.10 Фильтры гофрированные бумажные диаметром 15 см.

6.11 Кюветы фотометрические из оптического стекла или пластмассы толщиной поглощающего слоя 1 см для измерений при длинах волн 334, 340 или 365 нм.

6.12 Шпатели пластиковые или палочки стеклянные оплавленные длиной от 10 до 15 см для перемешивания содержимого фотометрической кюветы.

6.13 Спектрофотометр или фотометр фотоэлектрический для измерений при длинах волн 334, 340 или 365 нм допускаемой абсолютной погрешностью измерений коэффициента пропускания ±1 %.

7 Отбор проб

Отбор проб — по ГОСТ 26809.

8 Проведение испытания

8.1 Подготовка пробы

Перед испытанием пробу измельчают и гомогенизируют на лабораторном измельчителе.

8.2 Приготовление раствора пробы

8.2.1 Навеску гомогенной пробы массой (2,0000±0,0001) г, взвешенную в химическом стакане, смешивают с 60 см³ горячей дистиллированной воды температурой от 80 до 90 °С.

8.2.2 Смесь перемешивают от 5 до 10 мин магнитной мешалкой.

8.2.3 Охлажденную смесь количественно переносят в мерную колбу и доводят объем смеси до метки дистиллированной водой.

8.2.4 После тщательного перемешивания смеси мерную колбу со смесью выдерживают 10 мин в ледяной бане или в морозильном отделении холодильника по 6.2.

8.2.5 Затем содержимое мерной колбы фильтруют через гофрированный бумажный фильтр. Мутный фильтрат используют в определении по 8.3.

8.3 Определение

Определение проводят при комнатной температуре. Максимум оптической плотности НАДН находится при длине волны 340 нм. При использовании спектрофотометра переменной длины волны измерения проводят в максимуме оптической плотности. При использовании спектрофотометра с ртутной лампой измерения проводят при длинах волн 334 или 365 нм.

Фильтрат по 8.2.5, растворы ферментов и коферментов, а также буферные растворы дозируют мерными пипетками или автоматическими дозаторами.

8.3.1 *Контрольное испытание*

8.3.1.1 В первую фотометрическую кювету последовательно вносят 1,00 см³ буферного раствора по 5.1, 0,10 см³ раствора НАДН по 5.2, 0,02 см³ суспензии ферментов L-МДГ и L-ЛДГ по 5.3 и 2,00 см³ дистиллированной воды. Содержимое кюветы перемешивают пластиковым шпателем или стеклянной палочкой и выдерживают при комнатной температуре 5 мин.

8.3.1.2 Измеряют оптическую плотность $(A_1)_к$ раствора относительно оптической плотности воздуха.

8.3.1.3 В кювету добавляют 0,02 см³ раствора ЦЛ по 5.4. Содержимое перемешивают пластиковым шпателем или стеклянной палочкой и выдерживают 10 мин при комнатной температуре.

8.3.1.4 Измеряют оптическую плотность $(A_2)_к$ раствора относительно оптической плотности воздуха.

8.3.2 *Определение лимонной кислоты*

8.3.2.1 Во вторую фотометрическую кювету последовательно вносят 1,00 см³ буферного раствора по 5.1, 0,10 см³ раствора НАДН по 5.2, 0,02 см³ суспензии ферментов L-МДГ и L-ЛДГ по 5.3, 0,10 см³ фильтрата по 8.2.5 и 1,90 см³ дистиллированной воды. Содержимое кюветы перемешивают пластиковым шпателем или стеклянной палочкой и выдерживают 5 мин при комнатной температуре.

8.3.2.2 Измеряют оптическую плотность $(A_1)_{пр}$ раствора относительно оптической плотности воздуха.

8.3.2.3 В кювету добавляют 0,02 см^3 раствора ЦЛ по 5.4. Содержимое перемешивают пластиковым шпателем или стеклянной палочкой и выдерживают 10 мин при комнатной температуре.

8.3.2.4 Измеряют оптическую плотность $(A_2)_{пр}$ раствора относительно оптической плотности воздуха.

Окончание реакции контролируют повторным измерением оптической плотности раствора $(A_2)_{пр}$ через несколько минут.

Примечание — При проведении серийных испытаний используют только одну контрольную кювету. Разность оптических плотностей растворов в кювете с пробой должна находиться в интервале от 0,1 до 0,5 (измерения при длине волны 340 нм) или в интервале от 0,1 до 0,8 (измерения при длине волны 334 нм или 365 нм). Если разность оптических плотностей превышает указанные величины, то необходимо разбавить фильтрат по 8.2.5 дистиллированной водой. Фактор разбавления учитывают при расчете массовой доли лимонной кислоты по формуле (6).

9 Выражение результатов

9.1 Разность ΔA измеренных величин оптических плотностей вычисляют по формуле

$$\Delta A = (A_1 - A_2)_{пр} - (A_1 - A_2)_к. \qquad (5)$$

9.2 Массовую долю лимонной кислоты в пробе W, г/100 г, вычисляют по формуле

$$W = \frac{M\,V_1\,V_3\,100}{\varepsilon\,d\,V_2\,m} \cdot \Delta A, \qquad (6)$$

где M — молярная масса лимонной кислоты, 192,1 г/моль (безводная форма);

V_1 — общий объем раствора в кювете, 3,14 см^3;

V_3 — объем пробы после разбавления в процессе ее подготовки к испытанию по 8.2.3, 100 см^3;

ε — молярный коэффициент поглощения НАДН, дм^3·ммоль$^{-1}$см$^{-1}$:

- при длине волны 340 нм — 6,3,
- при длине волны 365 нм — 3,4 (ртутная лампа),
- при длине волны 334 нм — 6,18 (ртутная лампа);

d — толщина поглощающего слоя в кювете, см;

V_2 — объем пробы, 0,10 см^3;

m — навеска пробы, г.

10 Отчет об испытании

В отчете об испытании должны быть указаны:

- вид пробы;
- способ отбора пробы;
- массовая доля лимонной кислоты в пробе, г/100 г;
- дата испытания.

ПРИЛОЖЕНИЕ А
(справочное)

Библиография

[1] ТУ 64—13329—81 Дозаторы пипеточные

УДК 637.2/.3/.147.2:006.354 ОКС 67.100.30 Н19 ОКСТУ 9109

Ключевые слова: молоко, молочные продукты, плавленый сыр, лимонная кислота, ферментативное определение, спектрофотометрия