ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 55482— 2013

МЯСО И МЯСНЫЕ ПРОДУКТЫ

Метод определения содержания водорастворимых витаминов

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2019

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Государственным научным учреждением «Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности имени В.М. Горбатова» Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ «ВНИИМП им В.М. Горбатова» Россельхозакадемии)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 226 «Мясо и мясная продукция»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 28 июня 2013 г. № 362-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

5 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Ноябрь 2019 г.

Правила применения настоящего стандарта установлены в статье 26 Федерального закона от 29 июня 2015 г. № 162-ФЗ «О стандартизации в Российской Федерации». Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске ежемесячного информационного указателя «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 (www.gost.ru)

© Стандартинформ, оформление, 2014, 2019

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

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

МЯСО И МЯСНЫЕ ПРОДУКТЫ

Метод определения содержания водорастворимых витаминов

Meat and meat products. Method for determination of water-soluble vitamins

Дата введения — 2014—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на мясо и мясную продукцию, в том числе субпродукты, а также специализированные и функциональные мясные продукты и устанавливает метод определения массовой доли следующих форм водорастворимых витаминов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ):

- B_1 — тиамин, тиаминмонофосфат, тиаминдифосфат, тиаминтрифосфат;
- B_2 — рибофлавин, флавинмононуклеотид, флавиндинуклеотид;
- B_3 — никотиновая кислота, никотинамид;
- B_5 — пантотеновая кислота, кофермент А;
- B_6 — пиридоксин, пиридоксамин, пиридоксаль, пиридоксальфосфат и пиридоксаминфосфат;
- B_{12} — цианкобаламин, гидроксикобаламин, метилкобаламин, 5-дезоксиаденозилкобаламин;
- С — аскорбиновая кислота;
- Н — биотин.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 12.1.001 Система стандартов безопасности труда. Ультразвук. Общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.004 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

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

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

ГОСТ 12.4.009 Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание

ГОСТ 83 Реактивы. Натрий углекислый. Технические условия

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

ГОСТ 4025 Мясорубки бытовые. Технические условия

ГОСТ 4198 Реактивы. Калий фосфорнокислый однозамещенный. Технические условия

ГОСТ 4204 Реактивы. Кислота серная. Технические условия

ГОСТ 4328 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 5823 Реактивы. Цинк уксуснокислый 2-водный. Технические условия

ГОСТ 6552 Реактивы. Кислота ортофосфорная. Технические условия

ГОСТ 6709 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 9245 Потенциометры постоянного тока измерительные. Общие технические условия

Издание официальное

ГОСТ 9792 Колбасные изделия и продукты из свинины, баранины, говядины и мяса других видов убойных животных и птиц. Правила приемки и методы отбора проб

ГОСТ 14261 Кислота соляная особой чистоты. Технические условия

ГОСТ 20264.4 Препараты ферментные. Методы определения амилолитической активности

ГОСТ 20469 Электромясорубки бытовые. Технические условия

ГОСТ 23932 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Общие технические условия

ГОСТ 25336 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 25794.1 Реактивы. Методы приготовления титрованных растворов для кислотно-основного титрования

ГОСТ 26678—85 Холодильники и морозильники бытовые электрические компрессионные параметрического ряда. Общие технические условия

ГОСТ Р 51447—99 Мясо и мясные продукты. Методы отбора проб

ГОСТ Р 52501 (ИСО 3696:1987) Вода для лабораторного анализа. Технические условия

ГОСТ Р 53228 Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

ГОСТ Р ИСО 5725-2—2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений

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

Примечание — 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 ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана недатированная ссылка, то рекомендуется использовать действующую версию этого стандарта с учетом всех внесенных в данную версию изменений. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, то рекомендуется использовать версию этого стандарта с указанным выше годом утверждения (принятия). Если после утверждения настоящего стандарта в ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение рекомендуется применять без учета данного изменения. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, рекомендуется применять в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Сущность метода

Метод основан на экстракции водорастворимых витаминов путем последовательного проведения кислотного и ферментативного гидролиза, осаждении белков и количественном определении витаминов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в ультрафиолетовой (УФ) области спектра с заданной длиной волны.

Полученные результаты в виде пиков на хроматограмме сопоставляют с пиками стандартных образцов с заведомо известными концентрациями.

4 Средства измерения, вспомогательное оборудование, материалы и реактивы

Хроматограф жидкостной, оборудованный:

- детектором многоволновым УФ, обеспечивающим измерение при длинах волн 210, 245 и 254 нм;
- насосом градиентным;
- колонкой хроматографической для ВЭЖХ длиной 150—250 мм и диаметром 2,1—4,6 мм с обращенной фазой С18 либо С16 размером частиц 3,5—5 мкм, имеющей эффективность не менее 5000 теоретических тарелок по пикам витаминов;
- блоком термостатирования колонок с поддержанием температуры 30 °С;
- программным обеспечением.

Баня ультразвуковая лабораторная с регулятором времени.

Баня водяная лабораторная, имеющая диапазон температур от 20 °С до 100 °С, с точностью поддержания температуры ± 0,5 °С.

Весы лабораторные по ГОСТ Р 53228 с пределом допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания не более ± 0,1 мг.

pH-метр со стеклянным и хлорсеребряным электродами (или комбинированным стеклянным электродом) с диапазоном измерений от 0 до 14 ед. pH по ГОСТ 9245.

Центрифуга лабораторная с центробежным ускорением 5000 g.

Холодильник по ГОСТ 26678.

Мясорубка бытовая по ГОСТ 4025 или электромясорубка бытовая по ГОСТ 20469 с отверстиями решетки диаметром от 2 до 3 мм.

Дозаторы пипеточные переменного объема дозирования 0,200—2,000 $см^3$ с относительной погрешностью дозирования ± 1 %.

Дозаторы пипеточные переменного объема дозирования 1,0—10,0 $см^3$ с относительной погрешностью дозирования ± 1 %.

Стаканы В-1—100 по ГОСТ 25336.

Пробирки центрифужные конические вместимостью 50 $см^3$ с завинчивающейся крышкой.

Фильтры мембранные, материал мембраны — полиамид, размер диаметра пор 0,45 мкм, стерильные.

Фильтр «синяя лента» обеззоленная, диаметром не менее 11 см.

Виалы вместимостью 1,8 $см^3$.

Колбы 2—100—2, 2—1000—2 по ГОСТ 1770.

Колбы конические со шлифом вместимостью 10 и 100 $см^3$ по ГОСТ 23932.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709 или вода для лабораторного анализа по ГОСТ Р 52501.

Кислота ортофосфорная по ГОСТ 6552, х. ч.

Калий фосфорнокислый, однозамещенный по ГОСТ 4198, х. ч.

Кислота соляная по ГОСТ 14261, ос. ч.

Кислота серная по ГОСТ 4204, х. ч.

Натрий углекислый по ГОСТ 83, х. ч.

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328, х. ч.

Кислота трихлоруксусная кристаллическая, х. ч.

Цинк уксуснокислый 2-водный по ГОСТ 5823, ч. д. а.

Ацетонитрил, ос. ч.

Препарат ферментативный α-амилаза из Aspergillus oryzae амилолитической активностью (АС) 2000 ед./г.

Тиамина гидрохлорид (витамин B_1) массовой долей основного вещества не менее 99,0 %.

Рибофлавин (витамин B_2) массовой долей основного вещества не менее 99,0 %.

Никотиновая кислота (витамин B_3) массовой долей основного вещества не менее 98,0 %.

Кислота пантотеновая (витамин B_5) массовой долей основного вещества не менее 99,0 %.

Пиридоксина гидрохлорид (витамин B_6) массовой долей основного вещества не менее 99,0 %.

Цианокобаламин (витамин B_{12}) массовой долей основного вещества не менее 99,0 %.

Кислота аскорбиновая (витамин С) массовой долей основного вещества не менее 99,9 %.

Биотин (витамин Н) массовой долей основного вещества не менее 99,0 %.

Допускается использование других средств измерений с метрологическими характеристиками, вспомогательного оборудования с техническими характеристиками не хуже указанных в настоящем стандарте.

Допускается использование других реактивов по качеству и чистоте не ниже вышеуказанных.

5 Отбор и подготовка проб

5.1 Отбор проб — по ГОСТ Р 51447, ГОСТ 9792.

5.2 Пробу продукта измельчают, дважды пропуская через мясорубку с диаметром решетки 2—3 мм, и тщательно перемешивают.

5.3 Подготовленную пробу помещают в стеклянную колбу с притертой пробкой.

Срок хранения подготовленной пробы в холодильнике при температуре (4 ± 2) °С — не более 2 ч.

Подготовку проб к определению проводят по 6.2.

6 Подготовка к проведению измерений

6.1 Приготовление растворов

6.1.1 Приготовление буферного раствора калия фосфорнокислого однозамещенного молярной концентрации $c(KH_2PO_4)$ = 0,025 моль/дм^3, 3,4 ед. pH (фосфатный буфер)

3,40 г калия фосфорнокислого однозамещенного растворяют в стакане в небольшом количестве дистиллированной воды, переносят в мерную колбу вместимостью 1000 см^3 и доводят объем дистиллированной водой до метки. Затем добавляют по каплям ортофосфорную кислоту и доводят значение pH до 3,4 ед. pH.

Срок хранения раствора при комнатной температуре — не более семи дней.

Раствор фильтруют, пропуская через складчатый фильтр «синяя лента» обеззоленная.

Перед использованием раствор дегазируют на ультразвуковой бане в течение 25—30 мин.

6.1.2 Приготовление основных растворов витаминов

6.1.2.1 Основной раствор витамина B_1 массовой концентрации 0,06 мг/см^3

Взвешивают (0,0060 ± 0,0001) г гидрохлорида тиамина, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3, добавляют 70—80 см^3 дистиллированной воды, тщательно перемешивают до полного растворения и доводят объем до метки дистиллированной водой.

Раствор готовят перед использованием.

6.1.2.2 Основной раствор витамина B_2 массовой концентрации 0,06 мг/см^3

Взвешивают (0,030 ± 0,001) г рибофлавина, переносят в мерную колбу вместимостью 500 см^3, добавляют 400—450 см^3 дистиллированной воды, с помощью механического дозатора добавляют 0,20 см^3 ортофосфорной кислоты, нагревают до температуры 70 °С — 80 °С на водяной бане до полного растворения витамина, охлаждают и доводят до метки дистиллированной водой.

Раствор готовят перед использованием.

6.1.2.3 Основной раствор витамина B_3 массовой концентрации 0,2 мг/см^3

Взвешивают (0,020 ± 0,001) г никотиновой кислоты, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3, добавляют 70—80 см^3 дистиллированной воды, тщательно перемешивают до полного растворения и доводят объем до метки дистиллированной водой.

Раствор готовят перед использованием.

6.1.2.4 Основной раствор витамина B_5 массовой концентрации 0,2 мг/см^3

Взвешивают (0,020 ± 0,001) г пантотеновой кислоты, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3, добавляют 70—80 см^3 дистиллированной воды, тщательно перемешивают до полного растворения и доводят объем до метки дистиллированной водой.

Раствор готовят перед использованием.

6.1.2.5 Основной раствор витамина B_6 массовой концентрации 0,06 мг/см^3

Взвешивают (0,0060 ± 0,0001) г гидрохлорида пиридоксина, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3, добавляют 70—80 см^3 дистиллированной воды, тщательно перемешивают до полного растворения и доводят объем до метки дистиллированной водой.

Раствор готовят перед использованием.

6.1.2.6 Основной раствор витамина B_{12} массовой концентрации 0,01 мг/см^3

Взвешивают (0,0010 ± 0,0001) г цианокобаламина, переносят в мерную колбу вместимостью 500 см^3, добавляют 400—450 см^3 дистиллированной воды, с помощью механического дозатора добавляют 0,20 см^3 ортофосфорной кислоты и нагревают до температуры 70 °С — 80 °С на водяной бане до полного растворения витамина, охлаждают и доводят до метки дистиллированной водой.

Раствор готовят перед использованием.

6.1.2.7 Основной раствор витамина Н массовой концентрации 0,01 мг/см^3

Взвешивают (0,0010 ± 0,0001) г витамина Н, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3, добавляют 70—80 см^3 дистиллированной воды, тщательно перемешивают до полного растворения и доводят объем до метки дистиллированной водой.

Раствор готовят перед использованием.

6.1.3 Приготовление градуировочных растворов витаминов

6.1.3.1 Градуировочный раствор смеси витаминов B_1, B_2, B_6 массовой концентрации 0,02 мг/см^3

В коническую колбу с пришлифованной пробкой вместимостью 10 см^3 с помощью механического дозатора вносят по 2 см^3 основных растворов витамина B_1 (см. 6.1.2.1), витамина B_2 (см. 6.1.2.2), витамина B_6 (см. 6.1.2.5).

Раствор готовят перед использованием.

6.1.3.2 Градуировочный раствор смеси витаминов B_3 и B_5 массовой концентрации 0,1 мг/см^3

В коническую колбу с пришлифованной пробкой вместимостью 10 см^3 с помощью механического дозатора вносят по 2 см^3 основных растворов витамина B_3 (см. 6.1.2.3) и витамина B_5 (см. 6.1.2.4).

Раствор готовят перед использованием.

6.1.3.3 Градуировочный раствор смеси витамина B_{12} и витамина Н массовой концентрации 0,005 мг/см^3

В коническую колбу с пришлифованной пробкой вместимостью 10 см^3 с помощью механического дозатора вносят по 2 см^3 основных растворов витамина B_{12} (см. 6.1.2.6) и витамина Н (см. 6.1.3.7).

Раствор готовят перед использованием.

6.1.3.4 Градуировочный раствор витамина С массовой концентрации 0,5 мг/см^3

Взвешивают (0,050 ± 0,001) г витамина С, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3, добавляют 70—80 см^3 дистиллированной воды, тщательно перемешивают до полного растворения и доводят объем до метки дистиллированной водой.

Раствор готовят перед использованием.

6.1.4 Приготовление рабочих растворов

6.1.4.1 Раствор соляной кислоты молярной концентрации c(HCl) = 0,1 моль/дм^3

В мерную колбу вместимостью 1 дм^3 добавляют 700—800 см^3 дистиллированной воды, с помощью механического дозатора приливают 8,5 см^3 концентрированной кислоты соляной (ρ = 1,188 г/см^3) и доводят объем до метки дистиллированной водой.

6.1.4.2 20%-ный раствор натрия углекислого

Взвешивают (20,00 ± 0,05) г натрия углекислого, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и растворяют дистиллированной водой, доводя объем до метки.

6.1.4.3 20%-ный раствор трихлоруксусной кислоты

Взвешивают (20,00 ± 0,05) г трихлоруксусной кислоты, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и растворяют дистиллированной водой, доводя объем до метки.

6.1.4.4 Раствор кислоты серной молярной концентрации $c(H_2SO_4)$ = 1,0 моль/дм^3 готовят по ГОСТ 25794.1.

6.1.4.5 Раствор натрия гидроокиси молярной концентрации c(NaOH) = 10,0 моль/дм^3

Взвешивают (40,00 ± 0,05) г натрия гидроокиси, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и растворяют дистиллированной водой, доводя объем до метки.

6.1.4.6 25%-ный раствор цинка уксуснокислого 2-водного

Взвешивают (25,00 ± 0,05) г цинка уксуснокислого 2-водного, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и растворяют дистиллированной водой, доводя объем до метки.

6.1.4.7 5%-ный раствор трихлоруксусной кислоты

Взвешивают (5,00 ± 0,01) г трихлоруксусной кислоты, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и растворяют дистиллированной водой, доводя объем до метки.

6.1.4.8 3%-ный раствор трихлоруксусной кислоты

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 отвешивают (3,00 ± 0,01) г трихлоруксусной кислоты и растворяют в дистиллированной воде, доводя объем до метки.

6.1.4.9 Срок хранения рабочих растворов при комнатной температуре в темном месте:

- рабочего раствора натрия гидроокиси (см. 6.1.4.5) — не более 1 мес;
- остальных растворов — не более 2 мес.

6.2 Подготовка пробы

6.2.1 Подготовка пробы для определения витамина B_1 и B_2

(5,00 ± 0,05) г продукта помещают в коническую колбу вместимостью 100 см^3, добавляют 40 см^3 соляной кислоты молярной концентрации 0,1 моль/дм^3 (см. 6.1.4.1), закрывают пробкой и тщательно перемешивают. Колбу с содержимым нагревают на водяной бане при температуре 100 °С в течение 30 мин, затем охлаждают.

После охлаждения доводят pH гидролизата до (4,5 ± 0,1) ед. pH 20%-ным раствором натрия углекислого (см. 6.1.4.2). Добавляют (0,100 ± 0,005) г ферментативного препарата α-амилазы из Aspergillus oryzae. Возможно использование ферментного препарата в форме раствора. Рекомендуется уточнять активность фермента по ГОСТ 20264.4.

Колбу с содержимым помещают на водяную баню и выдерживают 16 ч при температуре 37 °С в защищенном от света месте.

Для осаждения белков к гидролизату добавляют 3 см^3 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты (см. 6.1.4.3). Колбу с содержимым нагревают на водяной бане при температуре 100 °С в течение 15 мин.

Содержимое колбы переносят в центрифужную пробирку объемом 50 см^3, доводят раствор до метки дистиллированной водой и центрифугируют 5 мин с центробежным ускорением 5000 g.

Полученный супернатант пропускают через мембранный фильтр с размером диаметра пор 0,45 мкм в виалу из темного стекла.

Срок хранения подготовленной пробы в холодильнике при температуре (4 ± 2) °С — не более 12 ч.

6.2.2 Подготовка пробы для определения витамина B_3

(5,00 ± 0,05) г продукта помещают в коническую колбу вместимостью 100 см^3, добавляют 40 см^3 серной кислоты молярной концентрации 1,0 моль/дм^3 (см. 6.1.4.4). Колбу с содержимым нагревают на водяной бане при 100 °С в течение 90 мин, затем охлаждают.

После охлаждения доводят значение pH до 10,0—11,0 ед. pH раствором гидроокиси натрия молярной концентрации 10,0 моль/дм^3 (см. 6.1.4.5).

Для осаждения белков к гидролизату добавляют 2 см^3 25%-ного раствора цинка уксуснокислого 2-водного (см. 6.1.4.6).

Содержимое колбы переносят в центрифужную пробирку объемом 50 см^3, доводят раствор до метки дистиллированной водой и центрифугируют 5 мин с центробежным ускорением 5000 g.

Полученный супернатант пропускают через мембранный фильтр с размером диаметра пор 0,45 мкм в виалу.

Срок хранения подготовленной пробы в холодильнике при температуре (4 ± 2) °С — не более 24 ч.

6.2.3 Подготовка пробы для определения витамина B_5

(5,00 ± 0,05) г продукта помещают в коническую колбу вместимостью 100 см^3, добавляют 40 см^3 дистиллированной воды. Доводят значение pH до (4,5 ± 0,1) ед. pH, приливая по каплям ортофосфорную кислоту. Добавляют (0,100 ± 0,005) г ферментативного препарата α-амилазы из Aspergillus oryzae, возможно использование ферментного препарата в форме раствора. Рекомендуется уточнять активность фермента по ГОСТ 20264.4.

Колбу с содержимым помещают на водяную баню и выдерживают 16 ч при температуре 37 °С в защищенном от света месте.

Для осаждения белков к гидролизату добавляют 3 см^3 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты (см. 6.1.4.3). Содержимое колбы переносят в центрифужную пробирку объемом 50 см^3, доводят раствор до метки дистиллированной водой и центрифугируют 5 мин с центробежным ускорением 5000 g.

Полученный супернатант пропускают через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм в виалу.

Срок хранения подготовленной пробы в холодильнике при температуре (4 ± 2) °С — не более 4 ч.

6.2.4 Подготовка пробы для определения витамина B_6 и витамина B_{12}

(10,0 ± 0,1) г продукта помещают в коническую колбу вместимостью 100 см^3, добавляют 40 см^3 5%-ного раствора трихлоруксусной кислоты (см. 6.1.4.7), закрывают пробкой и тщательно перемешивают. Колбу с содержимым нагревают на водяной бане при температуре 100 °С в течение 30 мин, затем охлаждают.

После охлаждения доводят значение pH до (4,5 ± 0,1) ед. pH 20%-ным раствором натрия углекислого. Добавляют (0,200 ± 0,005) г ферментативного препарата α-амилазы из Aspergillus oryzae, возможно использование ферментного препарата в форме раствора. Рекомендуется уточнять активность фермента по ГОСТ 20264.4.

Колбу с содержимым помещают на водяную баню и выдерживают 16 ч при температуре 37 °С в защищенном от света месте.

Содержимое колбы переносят в центрифужную пробирку объемом 50 см^3, доводят раствор до метки дистиллированной водой и центрифугируют 5 мин с центробежным ускорением 5000 g.

Полученный супернатант пропускают через мембранный фильтр с размером диаметра пор 0,45 мкм в виалу.

Срок хранения подготовленной пробы в холодильнике при температуре (4 ± 2) °С — не более 12 ч.

6.2.5 Подготовка пробы для определения витамина С

(5,00 ± 0,05) г продукта помещают в коническую колбу вместимостью 100 см^3, добавляют 40 см^3 3%-ного раствора трихлоруксусной кислоты (см. 6.1.4.8), закрывают пробкой и перемешивают. Колбу с содержимым выдерживают на ультразвуковой бане при температуре 20 °С в течение 30 мин.

Содержимое колбы переносят в центрифужную пробирку объемом 50 см^3, доводят раствор до метки дистиллированной водой и центрифугируют 5 мин с центробежным ускорением 5000 g.

Полученный супернатант пропускают через мембранный фильтр с размером диаметра пор 0,45 мкм в виалу.

Срок хранения подготовленной пробы в холодильнике при температуре (4 ± 2) °С — не более 4 ч.

6.2.6 Подготовка пробы для определения витамина Н

(10,0 ± 0,1) г продукта помещают в коническую колбу вместимостью 100 см^3, добавляют 40 см^3 серной кислоты молярной концентрации 1,0 моль/дм^3 (см. 6.1.4.4). Колбу с содержимым нагревают на водяной бане при температуре 100 °С в течение 120 мин, затем охлаждают.

После охлаждения доводят значение pH до (4,5 ± 0,1) ед. pH 20%-ным раствором натрия углекислого (см. 6.1.4.2). Добавляют (0,200 ± 0,005) г ферментативного препарата α-амилазы из Aspergillus oryzae, возможно использование ферментного препарата в форме раствора. Рекомендуется уточнять активность фермента по ГОСТ 20264.4.

Колбу с содержимым помещают на водяную баню и выдерживают 16 ч при температуре 37 °С в защищенном от света месте.

Для осаждения белков к гидролизату добавляют 3 см^3 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты (см. 6.1.4.3). Колбу с содержимом нагревают на водяной бане при температуре 100 °С в течение 15 мин.

Содержимое колбы переносят в центрифужную пробирку объемом 50 см^3, доводят раствор до метки дистиллированной водой и центрифугируют 5 мин с центробежным ускорением 5000 g.

Полученный супернатант пропускают через мембранный фильтр с размером диаметра пор 0,45 мкм в виалу.

Срок хранения подготовленной пробы в холодильнике при температуре (4 ± 2) °С — не более 12 ч.

6.3 Градуировка хроматографа

6.3.1 Градуировку хроматографа выполняют, используя градуировочные растворы витаминов, приготовленные по 6.1.3.

6.3.2 Для каждого градуировочного раствора проводят два параллельных измерения по 7.1.

6.3.3 Каждую хроматограмму обрабатывают в соответствии с компьютерной программой, определяя время удерживания, спектральные отношения и площади пиков.

6.3.4 Из площади пиков двух параллельных измерений, рассчитанных с помощью компьютерной программы, вычисляют среднеарифметическое значение для каждой массовой концентрации каждого витамина.

7 Проведение измерений

7.1 Условия проведения хроматографического анализа подбирают в зависимости от вида применяемого жидкостного хроматографа и хроматографической колонки.

В качестве примера могут быть приведены следующие условия хроматографического определения водорастворимых витаминов, выполненные на жидкостном хроматографе с колонкой 5 мкм 4,6 × 150 мм[1)].

Подвижная фаза: буферный раствор калия фосфорнокислого однозамещенного (3,4 ед. pH), ацетонитрил, вода.

Перед введением пробы колонку кондиционируют 4 мин буферным раствором калия фосфорнокислого однозамещенного с pH 3,4 ед. pH в соотношении с водой 35 : 65.

0,02 см^3 анализируемого раствора вводят в подготовленный к работе жидкостной хроматограф и записывают хроматограмму в следующих условиях.

Градиент: 16 мин ацетонитрил от 0 % до 30 %, дистиллированная вода от 65 % до 35 %, буферный раствор калия фосфорнокислого однозамещенного (3,4 ед. pH) 35 %.

Скорость подачи элюента 1,0 см^3/мин.

Температура колонки 30 °С.

Хроматограмму записывают по следующим длинам волн:

- 210 нм — для витамина B_5, витамина B_6, витамина B_{12}, витамина Н;
- 245 нм — для витамина С;
- 254 нм — для витамина B_1, витамина B_2, витамина B_3.

7.2 Идентификацию пиков хроматограммы исследуемого раствора проводят сравнением с хроматограммой градуировочного раствора по двум параметрам: времени удерживания и спектральному отношению *R*.

[1)] В настоящем стандарте используется жидкостной хроматограф Dionex Ultimate 3000 с колонкой Acclaim PolarAdvantage II. Данная информация является рекомендуемой, приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не исключает возможность использования других средств измерений с аналогичными свойствами.

7.3 Если время удерживания и спектральные отношения пиков хроматограммы анализируемого раствора совпадают в пределах допускаемых отклонений ($\Delta R \le 0,05$, $\Delta tR \le 3$ %) с временем удерживания и спектральными отношениями соответствующих им пиков хроматограммы градуировочного раствора, результат идентификации считают положительным.

7.4 Если спектральные отношения совпадают в пределах допускаемого отклонения, а разница времени удерживания пиков хроматограммы исследуемого раствора и хроматограммы градуировочного раствора больше допускаемого отклонения, проводят хроматографический анализ соответствующего градуировочного раствора по 7.1 и сравнивают время удерживания. В случае совпадения в дальнейшем используют новую хроматограмму в качестве образца.

В случае повторного несовпадения времени удерживания используют метод добавок, для чего в анализируемый раствор вносят определенный объем растворов витаминов с массовой концентрацией, сравнимой с массовой концентрацией «сомнительных» пиков, и анализируют по 7.1.

Если на хроматограмме пробы с добавкой площади «сомнительных» пиков увеличились на величину, соответствующую величине добавки, эти пики относятся к определяемым компонентам.

Если на хроматограмме пробы с добавкой наряду с «сомнительными» пиками присутствуют пики, время удерживания и спектральные отношения которых совпадают с соответствующими параметрами добавленных компонентов, сомнительные пики не относятся к определяемым компонентам.

7.5 Если время удерживания соответствующих пиков хроматограммы анализируемого раствора и хроматограммы градуировочного раствора совпадают в пределах допускаемого отклонения, а разница спектральных отношений больше допускаемого отклонения, настоящий метод неприменим к данному образцу.

7.6 Массовая концентрация витаминов в анализируемом растворе не должна превышать предельных значений градуировочных растворов. В случае превышения анализируемый раствор, содержащий витамины, с помощью механического дозатора разбавляют в рассчитанное количество раз и проводят хроматографический анализ разбавленных растворов. Если массовая концентрация витаминов в анализируемом растворе ниже предельного значения градуировочного раствора, то необходимо увеличить массу продукта, используемого при подготовке пробы.

8 Обработка результатов измерений

Массовую долю каждого витамина в продукте X, мг/кг, рассчитывают по формуле

$$X = \frac{C_{ст} \cdot S_x \cdot V_p}{S_{ст} \cdot m \cdot 1000}, \quad (1)$$

где $C_{ст}$ — массовая концентрация витамина в градуировочном растворе, мг/см^3;

S_x — площадь пика витамина в анализируемой пробе, усл. ед. (см. 6.3.4);

$S_{ст}$ — площадь пика индивидуального витамина в градуировочном растворе, усл. ед.;

V_p — объем раствора для пробоподготовки (сумма объемов раствора для гидролиза, раствора для осаждения белков и раствора для доведения pH до необходимого значения), см^3;

m — масса анализируемой пробы, г;

1000 — коэффициент перевода массы анализируемой пробы (г в кг).

За окончательный результат определения принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений, округленное до второго десятичного знака.

9 Метрологические характеристики

Расхождение между результатами двух параллельных определений, выполненных одним оператором при анализе одной и той же пробы с использованием одних и тех же средств измерений и реактивов, не должно превышать предела повторяемости (сходимости), r, значения которого приведены в таблице 1.

Таблица 1 — Метрологические характеристики метода при доверительной вероятности $P = 0,95$

Наименование определяемого компонента	Диапазон измеряемых массовых концентраций, мг/кг	Границы относительной погрешности, δ, %	Предел повторяемости, r, мг/кг	Предел воспроизводимости, R, мг/кг
Витамин B_1	0,5—20,0	18	0,15 $x_{ср}$	0,30 $X_{ср}$

Окончание таблицы 1

Наименование определяемого компонента	Диапазон измеряемых массовых концентраций, мг/кг	Границы относительной погрешности, δ, %	Предел повторяемости, r, мг/кг	Предел воспроизводимости, R, мг/кг
Витамин B_2	0,5—20,0	35	0,3 $x_{ср}$	0,45 $X_{ср}$
Витамин B_3	5,0—100,0	20	0,15 $x_{ср}$	0,30 $X_{ср}$
Витамин B_5	5,0—100,0	20	0,3 $x_{ср}$	0,45 $X_{ср}$
Витамин B_6	0,5—20,0	25	0,2 $x_{ср}$	0,30 $X_{ср}$
Витамин B_{12}	0,01—5,0	34	0,30 $x_{ср}$	0,45 $X_{ср}$
Витамин С	10,0—500,0	23	0,15 $x_{ср}$	0,30 $X_{ср}$
Витамин Н	0,01—5,0	20	0,15 $x_{ср}$	0,30 $X_{ср}$
$x_{ср}$ — среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений, мг/кг; $X_{ср}$ — среднеарифметическое значение результатов двух отдельных определений, выполненных в разных лабораториях, мг/кг.				

Результат анализа при доверительной вероятности $P = 0,95$ представляют в виде

$$|x_1 - x_2| \pm r, \quad (2)$$

где x_1 и x_2 — результаты двух параллельных определений, мг/кг;

r — предел повторяемости, мг/кг.

Расхождение между результатами двух отдельных определений, выполненных в двух разных лабораториях, не должно превышать предела воспроизводимости, R, значения которого приведены в таблице 1.

Результат анализа при доверительной вероятности $P = 0,95$ представляют в виде

$$|X_1 - X_2| \pm R, \quad (3)$$

где X_1 и X_2 — результаты двух отдельных определений, выполненных в разных лабораториях, мг/кг;

R — предел воспроизводимости, мг/кг.

Границы относительной погрешности δ, находящиеся с доверительной вероятностью $P = 0,95$, при соблюдении условий настоящего стандарта не должны превышать значений, приведенных в таблице 1.

10 Точность метода

Точность метода была установлена при межлабораторном испытании, проведенном в соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002 (пункт 4.2).

Показатели прецизионности метода определены в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 5725-2—2002 (пункт 7.5).

11 Требования безопасности

11.1 При подготовке и проведении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007.

11.2 Помещение, в котором проводятся измерения, должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией. Работу необходимо проводить, соблюдая правила личной гигиены и противопожарной безопасности в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.004, и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

11.3 При работе с электроприборами необходимо соблюдать требования безопасности по ГОСТ 12.1.019.

11.4 При подготовке проб необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с ультразвуковой баней по ГОСТ 12.1.001.

УДК 637.5.04/.07:006.354 ОКС 67.120.10

Ключевые слова: мясо, мясные продукты, водорастворимые витамины, высокоэффективная жидкостная хроматография, отбор и подготовка проб, проведение измерений, метрологические характеристики, точность метода

Редактор *Е.В. Яковлева*
Технические редакторы *В.Н. Прусакова, И.Е. Черепкова*
Корректор *Е.Р. Ароян*
Компьютерная верстка *Д.В. Кардановской*

Сдано в набор 05.11.2019. Подписано в печать 15.11.2019. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,40. Уч.-изд. л. 1,15.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»
для комплектования Федерального информационного фонда стандартов,
117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.
gost.e-ecolog.ru stinfo.ru

gost.e-ecolog.ru