МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)
INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 33429— 2015

МЯСО И МЯСНЫЕ ПРОДУКТЫ

Определение содержания молочной кислоты и лактатов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2019

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

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

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным научным учреждением «Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности имени В.М. Горбатова» (ФГБНУ «ВНИИМП им. В.М. Горбатова»)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 27 октября 2015 г. № 81-П)

За принятие 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
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт
Украина	UA	Минэкономразвития Украины

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 13 ноября 2015 г. № 1805-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 33429—2015 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 2017 г.

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

6 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Октябрь 2019 г.

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

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

© Стандартинформ, оформление, 2018, 2019

В Российской Федерации 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

Содержание

1 Область применения . . . 1
2 Нормативные ссылки . . . 1
3 Термины и определения . . . 2
4 Сущность метода . . . 2
5 Требования безопасности . . . 2
6 Средства измерений, вспомогательное оборудование, материалы и реактивы . . . 3
7 Отбор проб . . . 3
8 Подготовка к измерению . . . 3
9 Проведение измерений . . . 4
10 Обработка результатов . . . 5
11 Метрологические характеристики . . . 6
12 Контроль точности результатов измерений . . . 6

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

МЯСО И МЯСНЫЕ ПРОДУКТЫ

Определение содержания молочной кислоты и лактатов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Meat and meat products.
Determination of lactic acid and lactate usinghigh performance liquid chromatography

Дата введения — 2017—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на мясо, включая мясо птицы, субпродукты, мясные и мясосодержащие продукты, и устанавливает метод измерения (анализа) массовой доли молочной кислоты и лактатов (лактат натрия Е325, лактат калия Е326, лактат кальция Е327) с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в ультрафиолетовой (УФ) области спектра при определенной (заданной) длине волны. Диапазон измерений массовой доли молочной кислоты и лактатов составляет от 0,1 % до 3,0 %.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

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 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 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 5717.2 Банки стеклянные для консервов. Основные параметры и размеры

ГОСТ 6552 Реактивы. Кислота ортофосфорная. Технические условия

ГОСТ 6709 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 7269 Мясо. Методы отбора образцов и органолептические методы определения свежести

ГОСТ 7702.2.0 Мясо птицы, субпродукты и полуфабрикаты птичьи. Методы отбора проб и подготовка к микробиологическим исследованиям

ГОСТ 9245 Потенциометры постоянного тока измерительные. Общие технические условия

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 20469 Электромясорубки бытовые. Технические условия

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

ГОСТ 26272 Часы электронно-механические кварцевые наручные и карманные. Общие технические требования

Издание официальное

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

ГОСТ 29227 (ИСО 835-1—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

ГОСТ OIML R 76-1 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

ГОСТ ИСО 5725-2[1)] Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений

ГОСТ ИСО 5725-6—2003[2)] 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 и классификаторов на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации (gost.e-ecolog.ru казателям национальных стандартов, издаваемым в государствах, указанных в предисловии, или на официальных сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации. Если на документ дана недатированная ссылка, то следует использовать документ, действующий на текущий момент, с учетом всех внесенных в него изменений. Если заменен ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, то следует использовать указанную версию этого документа. Если после принятия настоящего стандарта в ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение применяется без учета данного изменения. Если ссылочный документ отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **супернатант:** Жидкость, располагающаяся над твердым слоем (осадком, седиментом) после центрифугирования пробы.

3.2 **гомогенат:** Однородная (гомогенная) смесь пробы с экстрагирующим раствором, полученная после механического измельчения пробы на гомогенизаторе.

4 Сущность метода

Метод основан на экстракции молочной кислоты и лактатов из тщательно гомогенизированной пробы водным раствором трихлоруксусной кислоты, центрифугировании с осаждением белков и последующем ВЭЖХ-анализе в ультрафиолетовой (УФ) области спектра. Идентификацию молочной кислоты и лактатов осуществляют по абсолютному времени удерживания, количественное содержание определяют по площади хроматографического пика анализируемого образца, сопоставляя с пиком образца сравнения с заведомо известной концентрацией.

5 Требования безопасности

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

5.2 Помещение, в котором проводят измерения, должно быть оснащено 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.

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

[1)] В Российской Федерации действует 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».

[2)] В Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике».

6 Средства измерений, вспомогательное оборудование, материалы и реактивы

Высокоэффективный жидкостной хроматограф, укомплектованный:

- детектором УФ, обеспечивающим измерения при длине волны 210 нм, с относительной погрешностью спектрофотометрического определения не более ± 2 %;
- изократическим насосом;
- анионообменной хроматографической колонкой для ВЭЖХ длиной 50—150 мм и диаметром 2,1—4,6 мм с обращенной фазой С18 размером частиц 1,8—5,0 мкм, имеющей эффективность не менее 5000 теоретических тарелок по пику молочной кислоты;
- блоком термостатирования колонок с поддержанием температуры 30 °С с точностью ± 0,1 °С;
- записывающим устройством с компьютерным управлением и автоматической программой обработки хроматографических данных в соответствии с комплектацией хроматографа.

Весы неавтоматического действия по ГОСТ OIML R 76-1 специального (I) класса точности с пределом допускаемой абсолютной погрешности не более ± 0,001 г.

Мясорубка бытовая по ГОСТ 4025 или электромясорубка бытовая по ГОСТ 20469.

pH-метр по ГОСТ 9245 со стеклянным и хлорсеребряным электродами (или комбинированным стеклянным электродом) с диапазоном измерений от 0 до 14 ед. с пределом допускаемой абсолютной погрешности не более ± 0,01 ед.

Гомогенизатор лабораторный, с частотой вращения ротора не менее 10 000 об/мин.

Холодильник бытовой электрический по ГОСТ 26678.

Баня ультразвуковая лабораторная с регулятором времени.

Часы электронно-механические по ГОСТ 26272.

Центрифуга лабораторная с центробежным ускорением 4000 *g*.

Банки стеклянные вместимостью 250—500 $см^3$ по ГОСТ 5717.2.

Пипетки градуированные 1—2—1—10 по ГОСТ 29227 или дозаторы автоматические с переменным объемом дозирования и относительной погрешностью дозирования не более ± 1 %.

Пробирки центрифужные из полипропилена вместимостью 50 $см^3$.

Фильтр мембранный из политетрафторэтилена с диаметром пор 0,45 мкм.

Колбы мерные 2—50—2, 2—100—2, 2—1000—2 по ГОСТ 1770.

Колба коническая Кн-1—100—24/29 ТС по ГОСТ 25336.

Флаконы — виалы хроматографические из темного стекла вместимостью 2,0 $см^3$.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Калий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 4198, х. ч.

Кислота ортофосфорная по ГОСТ 6552, х. ч.

Кислота трихлоруксусная с содержанием основного вещества не менее 99,0 %.

Кислота молочная с содержанием основного вещества не менее 85,0 %.

7 Отбор проб

7.1 Отбор проб — по ГОСТ 9792, ГОСТ 7269, ГОСТ 7702.2.0.

7.2 Пробу измельчают, дважды пропуская через мясорубку с диаметром отверстий решетки 2—4 мм, и тщательно перемешивают.

7.3 Подготовленную пробу помещают в стеклянную банку вместимостью 250—500 $см^3$ и закрывают крышкой.

Допускается хранить подготовленную пробу в замороженном состоянии при температуре не выше минус 18 °С не более 7 сут.

8 Подготовка к измерению

8.1 Приготовление градуировочных растворов

Для определения молочной кислоты и лактатов готовят градуировочные растворы молочной кислоты массовой концентрации 1,7 $г/см^3$ (раствор 1), 0,85 $г/см^3$ (раствор 2), 0,34 $г/см^3$ (раствор 3), 0,17 $г/см^3$ (раствор 4), 0,085 $г/см^3$ (раствор 5).

Для приготовления раствора 1 взвешивают 2,0 г молочной 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.

Для приготовления раствора 2 градуированной пипеткой отбирают 10 см^3 раствора 1 и разбавляют 10 см^3 дистиллированной воды.

Раствор 3 готовят, отбирая градуированной пипеткой 10 см^3 раствора 1, затем переносят в мерную колбу вместимостью 50 см^3 и доводят объем до метки дистиллированной водой.

Для приготовления раствора 4 градуированной пипеткой отбирают 5 см^3 раствора 1, переносят в мерную колбу вместимостью 50 см^3 и доводят объем до метки дистиллированной водой.

Для приготовления раствора 5 градуированной пипеткой отбирают 10 см^3 раствора 4 и разбавляют 10 см^3 дистиллированной воды.

Растворы готовят перед использованием.

8.2 Приготовление растворов

8.2.1 Приготовление 2%-ного раствора трихлоруксусной кислоты

Взвешивают 2,0 г трихлоруксусной кислоты, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3, растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до метки. Раствор помещают в коническую колбу с притертой пробкой.

Готовый раствор хранят в колбах с притертыми пробками при комнатной температуре не более 1 мес.

8.2.2 Приготовление подвижной фазы хроматографической системы

В качестве подвижной фазы используют буферный раствор фосфорнокислого калия однозамещенного молярной концентрации $c(KH_2PO_4)$ = 0,1 моль/дм^3 с pH = 6,0 (фосфатный буфер).

Для приготовления фосфатного буфера взвешивают 13,6 г фосфорнокислого калия однозамещенного, переносят в мерную колбу вместимостью 1000 см^3 и доводят объем до метки дистиллированной водой, тщательно перемешивают до полного растворения. С помощью градуированной стеклянной пипетки добавляют по каплям ортофосфорную кислоту, доводя pH до 6,0 ед. pH и контролируя pH-метром. Перед использованием раствор дегазируют на ультразвуковой бане в течение 10—15 мин.

Готовый раствор хранят в колбах с притертыми пробками при комнатной температуре не более недели.

8.3 Подготовка пробы

Пробу массой 10 г взвешивают с записью результата до второго десятичного знака, помещают в центрифужную пробирку вместимостью 50 см^3. Добавляют 30 см^3 2%-ного раствора трихлоруксусной кислоты и тщательно гомогенизируют. Гомогенат ставят на ультразвуковую баню при температуре 20 °С на 15 мин. Затем центрифугируют 5 мин с центробежным ускорением 4000 *g*. Полученный супернатант пропускают через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм в хроматографическую виалу вместимостью 2 см^3.

9 Проведение измерений

9.1 Условия проведения измерений подбирают в зависимости от вида применяемого жидкостного хроматографа и хроматографической колонки.

Проводят градуировку хроматографа с помощью градуировочных растворов, далее проводят измерения анализируемой пробы.

В качестве примера могут быть приведены следующие условия хроматографического определения молочной кислоты и лактатов, выполненного на жидкостном хроматографе с ионообменной хроматографической колонкой 4,6 × 150 мм, 5 мкм:

0,02 см^3 анализируемой пробы вводят в подготовленный к работе жидкостный хроматограф. Элюирование проводят в изократических условиях в течение 15 мин.

Состав элюента: фосфатный буфер (pH = 6,0). Скорость подачи элюента — 0,8 см^3/мин.

Температура колонки — 30 °С.

Длина волны детектирования — 210 нм.

9.2 Идентификацию пиков хроматограммы анализируемой пробы проводят сравнением с хроматограммой градуировочного раствора по двум параметрам: времени удерживания и спектральному отношению *R* (отношение высот хроматографического пика на разных длинах волн).

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

9.4 Если спектральные отношения совпадают в пределах допускаемого отклонения, а разница времени удерживания пиков хроматограммы анализируемой пробы и хроматограммы градуировочного раствора больше допускаемого отклонения, проводят хроматографический анализ соответствующего градуировочного раствора по 8.1 и сравнивают время удерживания. В случае совпадения в дальнейшем в качестве образца используют новую хроматограмму.

В случае повторного несовпадения времени удерживания используют метод добавок, для чего к анализируемой пробе добавляют известные количества определяемой молочной кислоты с концентрацией, сравнимой с концентрацией «сомнительных» пиков, и анализируют по 8.1.

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 веществ, сомнительные пики не относятся к определяемым компонентам.

9.5 Если время удерживания соответствующих пиков хроматограммы исследуемого раствора и хроматограммы градуировочного раствора совпадают в пределах допускаемого отклонения, а разница спектральных отношений больше допускаемого отклонения, настоящая методика неприменима к данной пробе.

9.6 Концентрация молочной кислоты и лактатов в анализируемой пробе не должна превышать предельных значений концентраций градуировочных растворов. В случае превышения анализируемую пробу, содержащую молочную кислоту и лактаты, с помощью механического дозатора разбавляют дистиллированной водой в рассчитанное количество раз и проводят хроматографический анализ разбавленных растворов. Если массовая концентрация молочной кислоты и лактатов в анализируемой пробе ниже предельного значения градуировочного раствора, необходимо увеличить массу пробы.

10 Обработка результатов

В соответствии с данными, полученными при анализе градуировочных растворов, создают таблицу пиков с использованием программного обеспечения хроматографа. Расчеты площадей пиков и массовых долей молочной кислоты и лактатов выполняются системой обработки данных в автоматическом режиме.

Массовую долю молочной кислоты X_1, выраженную в процентах, рассчитывают по формуле

$$X_1 = \frac{C_{ст} \cdot S_x \cdot V_p}{S_{ст} \cdot m} \cdot 100, \quad (1)$$

где $C_{ст}$ — массовая концентрация молочной кислоты в градуировочном растворе, г/см^3;

S_x — площадь пика молочной кислоты и лактатов в анализируемой пробе, усл. ед.;

V_p — объем экстрагирующей смеси (2%-ный раствор трихлоруксусной кислоты, приготовленный по 8.2.1), см^3;

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

m — масса анализируемой пробы, г.

Массовую долю лактатов X_2, выраженную в процентах, рассчитывают по формуле

$$X_2 = X_1 \cdot K, \quad (2)$$

где X_1 — массовая доля молочной кислоты, %;

K — коэффициент пересчета значения массовой доли молочной кислоты на массовую долю лактатов (для лактата натрия $K = 0,80$; для лактата калия $K = 0,71$; для лактата кальция $K = 0,41$).

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

11 Метрологические характеристики

11.1 Метрологические характеристики метода при доверительной вероятности $P = 0,95$ приведены в таблице 1.

Таблица 1

Наименование показателя	Границы относительной погрешности ± δ, %	Предел повторяемости r, %	Предел воспроизводимости R, %
Молочная кислота и лактаты	15	0,12 $x_{ср}$	0,20 $X_{ср}$
$x_{ср}$ — среднеарифметическое значение результатов двух параллельных измерений, %. $X_{ср}$ — среднеарифметическое значение результатов двух измерений, выполненных в разных лабораториях, %.			

11.2 Расхождение между результатами двух параллельных измерений, 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.

Условия приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости, при доверительной вероятности $P = 0,95$, должны удовлетворять условию

$$|x_1 - x_2| \le r, \quad (3)$$

где x_1 и x_2 — результаты двух параллельных измерений, %;

r — предел повторяемости, %.

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

Условия приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости, при доверительной вероятности $P = 0,95$, должны удовлетворять условию

$$|X_1 - X_2| \le R, \quad (4)$$

где X_1 и X_2 — результаты двух определений, выполненных в разных лабораториях, %;

R — предел воспроизводимости, %.

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

12 Контроль точности результатов измерений

12.1 Процедуру контроля стабильности показателей качества результатов измерений (повторяемости, промежуточной прецизионности и погрешности) проводят в соответствии с порядком, установленным в лаборатории, по ГОСТ ИСО 5725-6.

12.2. Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости (сходимости), осуществляют в соответствии с требованиями ГОСТ ИСО 5725-2. Расхождение между результатами измерений не должно превышать предела повторяемости (r). Значения r приведены в таблице 1.

12.3. Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости, проводят с учетом требований ГОСТ ИСО 5725-2. Расхождение между результатами измерений, полученными двумя лабораториями, не должно превышать предела воспроизводимости (R). Значения R приведены в таблице 1.

УДК 637.5.04/.07:006.354 МКС 67.120.10

Ключевые слова: мясо, мясные продукты, молочная кислота, лактаты, высокоэффективная жидкостная хроматография

Редактор *Н.Е. Рагузина*
Технические редакторы *В.Н. Прусакова, И.Е. Черепкова*
Корректор *Е.М. Поляченко*
Компьютерная верстка *Г.В. Струковой*

Сдано в набор 21.10.2019. Подписано в печать 29.11.2019. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,40. Уч.-изд. л. 1,00.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

ИД «Юриспруденция», 115419, Москва, ул. Орджоникидзе, 11.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

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