ГОСТ Р 51197—98
(ИСО 4133—79)

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

МЯСО И МЯСНЫЕ ПРОДУКТЫ

Метод определения глюконо-δ-лактона

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2010

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Московской государственной академией 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 28 августа 1998 г. № 335

3 Настоящий стандарт представляет собой аутентичный текст международного стандарта ИСО 4133—79 «Мясо и мясные продукты. Определение содержания глюконо-δ-лактона» с дополнительными требованиями, отражающими потребности экономики страны (6.6, 6.8, 6.12, 7.1 и 9.1)

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

5 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Январь 2010 г.

© ИПК Издательство стандартов, 1998
© СТАНДАРТИНФОРМ, 2010

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

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

МЯСО И МЯСНЫЕ ПРОДУКТЫ

Метод определения глюконо-δ-лактона

Meat and meat products.
Method for determination of glucono-δ-lactone content

Дата введения 2000—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на мясо и мясные продукты и устанавливает метод определения глюконо-δ-лактона.

2 Нормативные ссылки

ГОСТ 9793—74 Продукты мясные. Методы определения влаги
ГОСТ Р 51447—99 (ИСО 3100-1—91) Мясо и мясные продукты. Методы отбора проб

3 Определение

Массовая доля глюконо-δ-лактона — массовая доля глюконо-δ-лактона, определенная в соответствии с настоящим стандартом и выраженная в процентах.

4 Сущность метода

Глюконо-δ-лактон экстрагируют из пробы продукта, взятой на испытание, ледяным раствором хлорной кислоты. Смесь центрифугируют, фильтруют, затем проводят гидролиз глюконо-δ-лактона, содержащегося в фильтрате, гидроксида калия с образованием глюконата.

Преобразуют глюконат в 6-фосфоглюконат в ходе реакции с аденозин-5-трифосфатом (АТФ) в присутствии глюконаткиназы (ГК):

$$\text{глюконат} + \text{АТФ} \xrightarrow{\text{ГК}} \text{6-фосфоглюконат} + \text{АДФ}.$$

Восстанавливают 6-фосфоглюконатом эквивалентное количество никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФ) в присутствии 6-фосфоглюконатдегидрогеназы (6-ФГДГ):

$$\text{6-фосфоглюконат} + \text{НАДФ}^+ \xrightarrow{\text{6-ФГДГ}} \text{НАДФН} + CO_2 + H^+ + \text{рибулозо-5-фосфат}.$$

Измеряют массовую долю образовавшейся восстановленной формы никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФН) на спектрофотометре при длине волны 365 нм.

Издание официальное

5 Реактивы

Все реактивы должны быть аналитического качества (не ниже х.ч.). Все растворы, кроме растворов неорганических соединений (5.1 и 5.2), должны храниться в закрытой посуде из темного стекла, тщательно вымытой и пропаренной или стерилизованной.

Вода, используемая для приготовления растворов ферментов, должна быть деминерализованной или бидистиллированной, полученной в стеклянном дистилляторе.

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

Примечание — Однократно дистиллированная вода может содержать ионы металлов, которые снижают активность ферментов, а деминерализованная вода может содержать микроорганизмы, увеличивающие неспецифическую фоновую ферментативную активность и искажающие результаты анализа.

Препарат НАДФ должен содержать не менее 90 % основного вещества.

Допускается использовать имеющиеся в продаже готовые наборы реактивов при условии соответствия их качества требованиям настоящего стандарта.

5.1 Раствор хлорной кислоты *c* ($HClO_4$) = 0,4 моль/дм³

17,3 см³ раствора хлорной кислоты массовой доли 70 % и плотности 1,67 г/см³ помещают в мерную колбу вместимостью 500 см³ и доводят объем раствора до метки водой.

Примечание — При использовании хлорной кислоты меньшей массовой доли проводят перерасчет объема кислоты, используемого для осаждения белков.

5.2 Раствор гидроксида калия *c* (KOH) = 2 моль/дм³

Растворяют 56,1 г гидроксида калия в воде, доводят объем раствора до 500 см³.

5.3 Буферный раствор активной кислотности 8,0 pH

Растворяют 2,64 г глицилглицина ($C_4H_8N_2O_3$) и 0,284 г хлорида магния гексагидрата ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) в 150 см³ воды. Устанавливают активную кислотность раствора 8,0 pH при 20 °С раствором гидроксида калия (5.2), используя для измерений pH-метр. Доводят объем раствора до 200 см³.

Раствор устойчив не менее 1 мес при температуре 4 °С.

5.4 Раствор НАДФ

Растворяют 50 мг динатриевой соли никотинамидадениндинуклеотидфосфорной кислоты (НАДФ-Na_2) в 5,0 см³ воды.

Раствор устойчив не менее 1 мес при температуре 4 °С.

5.5 Раствор аденозин-5-трифосфата (АТФ)

Растворяют 250 мг динатриевой соли аденозин-5-трифосфорной кислоты (АТФ-Na_2) и 250 мг гидрокарбоната натрия ($NaHCO_3$) в 5,0 см³ воды.

Раствор устойчив не менее 1 мес при температуре 4 °С.

5.6 Суспензия 6-ФГДГ

Используют поставляемую в готовом виде суспензию 6-фосфоглюконатдегидрогеназы из дрожжей, содержащую 6-ФГДГ концентрации 2,0 мг/см³ и удельной активности не менее 220 Е/см³, а также глюконаткиназу и НАДФН-оксидазу массовых долей не более 0,05 % каждого.

Суспензия устойчива не менее 6 мес при температуре 4 °С.

5.7 Суспензия ГК

Используют поставляемую в готовом виде суспензию глюконаткиназы из E.coli, содержащую ГК концентрации 1,0 мг/см³ и удельной активности не менее 26 Е/см³ и НАДФН массовой доли не более 0,05 %.

Суспензия устойчива не менее 6 мес при температуре 4 °С.

6 Средства контроля и вспомогательные устройства

Обычная лабораторная аппаратура, а также указанная в 6.1—6.11.

6.1 Мясорубка механическая лабораторная, снабженная перфорированной пластинкой с отверстиями диаметром не более 4 мм.

6.2 Миксер лабораторный.

6.3 Центрифуга лабораторная с пробирками номинальной вместимостью 50 или 100 см³.

6.4 Иономер или pH-метр диапазоном измерений 1—14 pH и допускаемой погрешностью ± 0,05 pH.

6.5 Фильтры бумажные гофрированные диаметром 15 см.

6.6 Колбы мерные вместимостью 100, 200 и 250 см^3 и допускаемой относительной погрешностью ± 0,2 %.

6.7 Дозаторы пипеточные объемами доз 25 и 100 см^3 и относительной погрешностью дозирования ± 1 %.

6.8 Пипетки градуированные вместимостью 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 и 2,5 см^3 и допускаемой относительной погрешностью ± 1 %.

6.9 Шпатели пластиковые или палочки стеклянные для перемешивания содержимого кюветы при проведении фотометрических измерений.

6.10 Спектрофотометр (фотометр) со следующими техническими характеристиками: спектральный интервал — не более 10 нм; интервал измерений оптической плотности — от 0,000 до 2,000; погрешность установки длины волны — ± 3 нм; среднее квадратическое отклонение случайной составляющей погрешности измерений — не более 0,15 %.

6.11 Кюветы фотометрические толщиной поглощающего слоя 10 мм.

6.12 Весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания 200 г и допускаемой погрешностью ± 0,001 г.

7 Порядок подготовки к проведению измерения

7.1 Отбор проб — по ГОСТ Р 51447.

7.2 Пробу массой не менее 200 г, полученную из репрезентативной выборки, хранят в условиях, предотвращающих порчу и изменение состава.

8 Порядок проведения измерений

8.1 Подготовка пробы к проведению измерений

Образец пробы гомогенизируют, дважды пропуская через мясорубку (6.1) и тщательно перемешивая.

Образец хранят не более 24 ч в заполненном доверху, герметически закрытом контейнере таким образом, чтобы предотвратить порчу или изменение состава.

8.2 Навеска для проведения анализа

Взвешивают приблизительно 50 г исследуемого образца с точностью до 10 мг и помещают навеску образца в лабораторный миксер (6.2).

8.3 Приготовление экстракта

8.3.1 К навеске образца в лабораторном миксере добавляют 100 см^3 охлажденного льдом раствора хлорной кислоты (5.1) и гомогенизируют.

8.3.2 Часть гомогенизата помещают в центрифужную пробирку и центрифугируют 10 мин при угловой скорости 3000 мин$^{-1}$, затем, осторожно отодвинув слой жира, отфильтровывают супернатант через гофрированный бумажный фильтр (6.5) в коническую колбу вместимостью 200 см^3. Первые 10 см^3 фильтрата выбрасывают.

8.3.3 50 см^3 подготовленного раствора, который может быть слегка мутным, переносят в стаканчик вместимостью 100 см^3 и доводят активную кислотность раствора до 10 pH раствором гидроксида калия (5.2).

8.3.4 Количественно переносят содержимое стаканчика в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и доводят объем раствора до метки водой.

8.3.5 Раствор охлаждают в ледяной бане 20 мин и фильтруют через гофрированный бумажный фильтр (6.5), отбросив первые 10 см^3 фильтрата.

8.3.6 25 см^3 фильтрата переносят в мерную колбу вместимостью 250 см^3 и доводят объем фильтрата до метки водой.

Примечание — Объем фильтрата может быть иным. Его выбирают так, чтобы концентрация *D*—(+)-глюконата была приблизительно 0,40 г/дм^3.

8.4 Определение

8.4.1 Для проведения ферментативной реакции берут две фотометрические кюветы (6.11), в каждую из которых пипеточным дозатором (6.5) добавляют:

- 2,50 см^3 буферного раствора (5.3);
- 0,10 см^3 раствора НАДФ (5.4);
- 0,10 см^3 раствора АТФ (5.5).

Затем в одну кювету вносят 0,20 см^3 экстракта (8.3.6), получая исследуемый раствор, а во вторую — 0,20 см^3 воды, получая контрольный раствор.

В каждую кювету вносят по 0,05 см^3 суспензии 6-ФГДГ (5.6) и тщательно перемешивают содержимое пластиковыми шпателями или стеклянными палочками (6.9).

Содержимое кювет выдерживают 5 мин при комнатной температуре, после чего измеряют оптические плотности относительно воздуха при длине волны 365 нм: A_1 — оптическая плотность исследуемого раствора, A_{1k} — оптическая плотность контрольного раствора.

8.4.2 В обе кюветы вносят по 0,01 см^3 суспензии ГК (5.7), содержимое кювет перемешивают пластиковыми шпателями или стеклянными палочками (6.9).

Растворы выдерживают от 10 до 15 мин при комнатной температуре. Затем измеряют оптические плотности, повторяя измерения каждые 2 мин до достижения постоянных значений.

Строят графики зависимости оптических плотностей растворов от времени и экстраполируют их на момент внесения фермента ГК (приложение А).

Получают экстраполированные значения оптических плотностей исследуемого (A_2) и контрольного (A_{2k}) растворов.

8.5 Выполняют два параллельных определения в двух пробах из одного и того же образца (8.1).

9 Правила обработки результатов измерений

9.1 Метод расчета

Массовую долю глюконо-δ-лактона в пробе *X*, %, вычисляют по формуле

$$X = 0{,}908 \times \Delta A \times \frac{2{,}96 \times 196{,}1}{k \times 0{,}2 \times 1000} \times \frac{100}{1000} \times \frac{100}{V} \times \frac{(100 + \frac{M \times m}{100})}{50} \times \frac{100}{m} =$$

$$= 52{,}705 \times \frac{\Delta A}{k \times V \times m} \times (100 + \frac{M \times m}{100}),$$

где $\Delta A = (A_2 - A_1) - (A_{2k} - A_{1k})$;

196,1 — молярная масса *D* — (+)-глюконовой кислоты;

M — массовая доля влаги в пробе, определенная в соответствии с ГОСТ 9793;

m — масса навески (8.2), г;

k — микромолярный коэффициент оптической плотности НАДФН (k = 3,5 см^2/мкмоль при длине волны 365 нм и k = 6,23 см^2/мкмоль при длине волны 340 нм);

V — объем фильтрата, взятый на определение (8.3.6), см^3.

За результат измерений принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений при условии выполнения 9.2.

Результат определяют с точностью 0,01 %.

9.2 Сходимость

Относительное расхождение результатов двух параллельных определений, выполненных в одной лаборатории, не должно превышать 10 % среднеарифметического значения.

10 Примечания по методике

10.1 Измерение может быть проведено также при длине волны 340 нм.

10.2 Неорганические соли (ионы фосфата, натрия, калия и аммония) могут замедлять фер-

ментативную реакцию. В таких случаях увеличивают количество фермента. Практика показывает, что при анализе мясных продуктов, содержащих фосфаты, нет необходимости увеличивать количество добавляемого фермента.

10.3 Стабильность готовых суспензий ферментов, как правило, гарантируется производителем в течение гарантийного срока хранения, указанного на этикетке.

Препараты ферментов и буферный раствор должны храниться в холодильнике. Кроме того, растворы ферментов необходимо держать на лабораторном столе в охлажденном состоянии, для чего их помещают в перфорированную металлическую емкость, охлаждаемую льдом.

11 Оформление результатов измерений

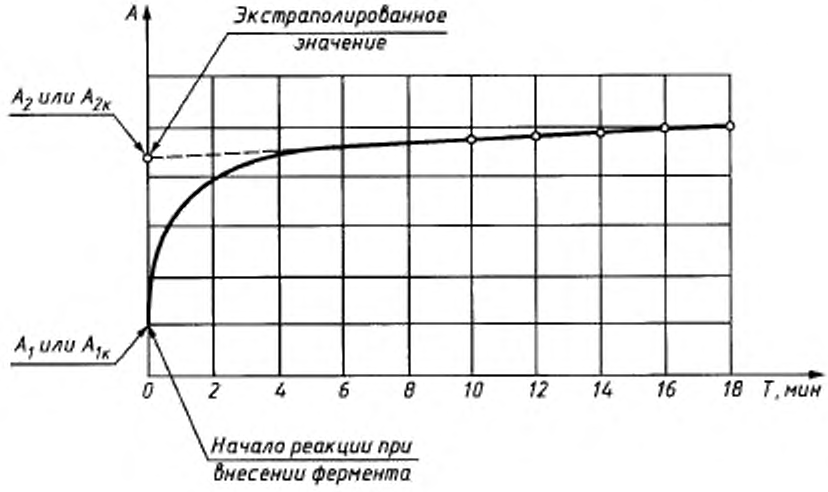
В отчете об испытании должны быть указаны:

- используемый метод;
- полученные результаты;
- любые условия проведения испытаний, не установленные данным стандартом и касающиеся подробностей, которые могут повлиять на конечный результат.

В отчете должны быть все данные, необходимые для полной идентификации пробы.

ПРИЛОЖЕНИЕ А
(справочное)

Пример построения графика зависимости оптической плотности раствора от времени



УДК 637.5.001.4:006.354 ОКС 67.120.10 Н19 ОКСТУ 9209

Ключевые слова: мясо, мясные продукты, химический анализ, определение массовой доли, органические кислоты, глюконо-δ-лактон

gost.e-ecolog.ru