ГОСТ Р 51459—99

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СЫР И СЫР ПЛАВЛЕНЫЙ

Метод определения массовой доли лимонной кислоты

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2011

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Государственным учреждением Всероссийским научно-исследовательским институтом молочной промышленности (ГУ ВНИМИ)

ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 186 «Молоко и молочные продукты»

2 ПРИНЯТ И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Госстандарта России от 22 декабря 1999 г. № 614

3 Настоящий стандарт гармонизирован с международным стандартом ИСО 2963—97 «Сыр и сыр плавленый. Определение содержания лимонной кислоты. Ферментативный метод»

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 без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СЫР И СЫР ПЛАВЛЕНЫЙ

Метод определения массовой доли лимонной кислоты

Cheese and processed cheese products.
Method for determination of mass percent of citric acid

Дата введения 2002—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на сыр и плавленый сыр и устанавливает метод определения массовой доли лимонной кислоты.

Метод определения массовой доли лимонной кислоты в сыре и сыре плавленом основан на обработке экстракта навески продукта цитрат-лиазой для превращения лимонной кислоты в уксусную и щавелевоуксусную кислоты. Полученный раствор обрабатывают малатдегидрогеназой (МДГ) и лактатдегидрогеназой (ЛДГ) в присутствии никотинамидадениндинуклеотида (НАДН) восстановленной формы, для ферментативного катализа восстановления щавелевоуксусной кислоты и продукта ее декарбоксилирования — пировиноградной кислоты, соответственно с L-яблочной и L-молочной кислот. При этом НАДН превращается в окисленную форму ($НАД^+$). Снижение концентрации НАДН в исследуемом растворе устанавливают измерением оптической плотности при длине волны 340 нм. Массовая доля лимонной кислоты при этом пропорциональна снижению концентрации НАДН.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 1770—74 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 3652—69 Кислота лимонная моногидрат и безводная. Технические условия

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 12026—76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 19881—74 Анализаторы потенциометрические для контроля pH молока и молочных продуктов. Общие технические условия

ГОСТ 24104—88* Весы лабораторные общего назначения и образцовые. Общие технические условия

ГОСТ 25336—82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 26809—86 Молоко и молочные продукты. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу

ГОСТ 29169—91 (ИСО 648—77) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной отметкой

ГОСТ 29227—91 (ИСО 835-1—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

ИСО 707—97** Молоко и молочные продукты. Методы отбора проб

* С 1 июля 2002 г. введен в действие ГОСТ 24104—2001. На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р 53228—2008.

** Действует до введения в действие ГОСТ Р, разработанного на основе соответствующего ИСО. С 11 августа 2008 г. действует ИСО 707:2008.

Издание официальное

3 Определение

В настоящем стандарте применяют следующий термин с соответствующим определением:

массовая доля лимонной кислоты: Отношение массы лимонной кислоты, определенной в соответствии с настоящим стандартом в навеске продукта, к массе навески продукта, умноженное на 100 и выраженное в процентах.

4 Аппаратура, материалы и реактивы

4.1 Анализатор потенциометрический по ГОСТ 19881.

4.2 Баня водяная с обогревом, позволяющая поддерживать температуру от 20 до 25 °С, со стойкой для удерживания кюветы спектрофотометра в процессе термостатирования.

4.3 Спектрофотометр, обеспечивающий проведение измерений на длине волны 340 нм, с шириной полосы пропускания не более 10 нм, оснащенный кюветами длиной оптического пути 1 см.

4.4 Устройство измельчающее с угловой скоростью вращения от 500 до 3000 $мин^{-1}$, позволяющее измельчать пробу без ее нагрева, потери или поглощения влаги.

4.5 Весы лабораторные по ГОСТ 24104 общего назначения 2-го класса точности.

4.6 Пластиковые мешки для размешивания смеси исследуемого образца с ферментом непосредственно в кювете спектрофотометра.

4.7 Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026 диаметром фильтра 15 см.

4.8 Воронка типа ВФ по ГОСТ 25336 диаметром 75 мм.

4.9 Пипетки градуированные по ГОСТ 29227, 2-го класса точности вместимостью 10 $см^3$.

4.10 Пипетки по ГОСТ 29169 2-го класса точности вместимостью 25, 10, 5, 2, 1, 0,1 и 0,02 $см^3$.

4.11 Колбы конические по ГОСТ 25336 вместимостью 100 $см^3$ с притертыми стеклянными пробками.

4.12 Колбы мерные по ГОСТ 1770 2-го класса точности вместимостью 100 и 1000 $см^3$.

4.13 Стаканы химические стеклянные по ГОСТ 25336 вместимостью 50 $см^3$.

4.14 Цилиндр мерный по ГОСТ 1770 вместимостью 50 $см^3$.

4.15 Кислота трихлоруксусная (CCl_3COOH) по [1].

4.16 Натрия гидроокись (NaOH) по ГОСТ 4328, ч.д.а.

4.17 Цинк хлористый ($ZnCl_2$) по ГОСТ 4529, ч.д.а.

4.18 Диглицин ($H_2NCH_2CONHCH_2CO_2H$) по [2].

4.19 Натрий углекислый кислый ($NaHCO_3$) по ГОСТ 4201, х.ч.

4.20 Соль динатриевая никотинамидадениндинуклеотида ($C_{21}H_{27}N_7O_{14}P_2Na_2$) по [3], х.ч.

4.21 Аммоний сернокислый $(NH_4)_2SO_4$ по ГОСТ 3769, ч.д.а.

4.22 Малатдегидрогеназа из сердца поросенка К.Ф.1.1.1.37 по [4].

4.23 Лактатдегидрогеназа из мышц кролика К.Ф.1.1.1.27 по [4].

4.24 Цитрат-лиаза (Лиофилизат из Aerolonter aerogenes) К.Ф.4.1.3.6 по [4].

4.25 Моногидрат лимонной кислоты ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) по ГОСТ 3652.

4.26 Вода дистиллированная по ГОСТ 6709 или вода деминерализованная, вода бидистиллированная.

Допускается применять другие средства измерений с метрологическими характеристиками и оборудование с техническими характеристиками не хуже, а также реактивы по качеству не ниже указанных.

5 Метод отбора проб

Отбор проб — по ГОСТ 26809, для экспортно-импортных операций — по ИСО 707.

6 Подготовка к определению

6.1 Приготовление растворов

6.1.1 Раствор трихлоруксусной кислоты

В мерную колбу вместимостью 1000 $см^3$ вносят 200,0 г трихлоруксусной кислоты (CCl_3COOH) по 4.15, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

6.1.2 Раствор А гидроокиси натрия концентрации 5,0 моль/$дм^3$

В мерную колбу вместимостью 1000 $см^3$ вносят 200,0 г гидроокиси натрия (NaOH) по 4.16, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

6.1.3 Раствор Б гидроокиси натрия концентрации 1,0 моль/дм^3

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 вносят 40,0 г гидроокиси натрия (NaOH) по 4.16, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

6.1.4 Раствор В гидроокиси натрия концентрации 0,1 моль/дм^3

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 вносят 4,0 г гидроокиси натрия (NaOH) по 4.16, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

6.1.5 Раствор хлористого цинка

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 вносят 0,80 г хлористого цинка ($ZnCl_2$) по 4.17, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

6.1.6 Буферный раствор с pH 7,8

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 вносят 71,3 г диглицина ($H_2NCH_2CONHCH_2CO_2H$) по 4.18, растворяют в 700 см^3 воды, доводят pH до 7,8 раствором А гидроокиси натрия (6.1.2). Приливают 100 см^3 раствора хлористого цинка (6.1.5), доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Буферный раствор хранят при температуре от 0 до 8 °С не более четырех недель.

6.1.7 Раствор натрия углекислого кислого

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 вносят 4,0 г углекислого кислого натрия по 4.19, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

6.1.8 Раствор восстановленного никотинамидадениндинуклеотида

В колбу вместимостью 50 см^3 вносят 50 мг восстановленной динатриевой соли никотинамидадениндинуклеотида ($C_{21}H_{27}N_7O_{14}P_2Na_2$), 100 мг натрия углекислого кислого (6.1.7) и растворяют в 10 см^3 воды. Раствор хранят при температуре от 0 до 8 °С не более четырех недель.

6.1.9 Раствор сернокислого аммония молярной концентрации 3,2 моль/дм^3

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 вносят 422,4 г сернокислого аммония по 4.21, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

6.1.10 Суспензия малатдегидрогеназа/лактатдегидрогеназа

В колбу вместимостью 100 см^3 вносят малатдегидрогеназу из сердца поросенка по 4.22, растворяют в растворе сульфата аммония (6.1.9) с pH 6,0 и добавляют лактатдегидрогеназу из мышц кролика по 4.23 с pH 7,0 до получения суспензии. Затем суспензию разбавляют раствором сернокислого аммония (6.1.9) так, чтобы получить раствор, содержащий 600 единиц активности МДГ и 1400 единиц активности ЛДГ в 1 см^3 раствора. Раствор хранят при температуре от 0 до 8 °С не более одного года.

6.1.11 Раствор цитрат-лиазы

Растворяют цитрат-лиазу по 4.24 в ледяной воде так, чтобы получить раствор с активностью 40 ед.фермента в 1 см^3. Раствор хранят при температуре от 0 до 8 °С не более одной недели. Раствор хранят при температуре хранения минус 20 °С не более четырех недель.

6.1.12 Стандартный раствор лимонной кислоты

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 вносят 1,600 г моногидрата лимонной кислоты ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) по 4.25, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. При использовании суспензии с другой активностью ферментов объем суспензии в схеме отбора пипеткой (8.2.1) следует пропорционально увеличивать или уменьшать.

6.1.13 Проверка качества растворов и настройки спектрофотометра

Проверку проводят при хранении растворов (6.1.1—6.1.12) более двух недель. Пипеткой отмеряют в каждую из двух мерных колб вместимостью 100 см^3 соответственно 5,0 и 10,0 см^3 стандартного раствора лимонной кислоты (6.1.12), добавляют по 10 см^3 раствора трихлоруксусной кислоты (6.1.1), доводят объем водой до метки и перемешивают. Массовую долю лимонной кислоты в обоих растворах определяют в соответствии с 8.1.3, 8.2.3.

Массовую долю моногидрата лимонной кислоты в стандартном растворе, X_1, %, вычисляют по формуле (3), используя следующие величины:

M = 210,1 г/моль (молекулярная масса моногидрата лимонной кислоты);

V_5 = 1000 см^3 (6.1.12);

V_6 = 5 см^3 и 10 см^3 по 6.1.13;

V_7 = 100 см^3 по 6.1.13.

Значение X_1 для обоих растворов должно быть (100±5) %.

Если результат измерения не находится в данных пределах, следует проверить реактивы, пипетки, спектрофотометр и принять меры для получения необходимого результата.

6.2 Подготовка проб

6.2.1 Сыр и плавленый сыр

От пробы сыра отделяют корковый (при наличии поверхностный заплесневелый) слой так, чтобы получить порцию сыра массой не менее 50 г. Отобранную пробу сыра измельчают на измель-

чающем устройстве, перемешивают до пастообразного состояния. При необходимости измельчают вторично, перемешивают.

6.2.2 Плавленый сыр, содержащий наполнители других пищевых продуктов (ветчину, фрукты, орехи, травы и т.д.)

При определении массовой доли лимонной кислоты во всем продукте подготовку пробы проводят по 6.2.1. При определении массовой доли лимонной кислоты в расчете только на сырную массу из пробы удаляют наполнители, затем подготовку пробы проводят по 6.2.1.

6.2.3 Пробу готовят непосредственно перед определением.

7 Нулевое определение

Нулевое определение проводят дважды. Фильтрат готовят в соответствии с 8.1, используя все реактивы, кроме навески продукта и использования измельчающего устройства. Измерение оптической плотности проводят в соответствии с 8.2.

8 Проведение определения

8.1 Приготовление фильтрата

8.1.1 В стакан измельчающего устройства помещают навеску продукта массой 1,0 г, добавляют 50 см^3 воды при температуре (45±5) °С и измельчают до получения однородной суспензии. Суспензию из стакана переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3, ополаскивая стакан водой несколько раз до полного ее удаления.

8.1.2 К полученной суспензии приливают 10 см^3 раствора трихлоруксусной кислоты (6.1.1), доводят объем водой до метки, перемешивают и дают смеси выстояться 30 мин. Перед фильтрованием содержимое мерной колбы не перемешивают.

8.1.3 Смесь фильтруют через фильтровальную бумагу, отбрасывая первые 2 см^3 фильтрата.

8.1.4 Пипеткой отбирают 25 см^3 фильтрата в химический стакан вместимостью 50 см^3, доводят активную кислотность до pH = 4, приливая раствор Б гидроокиси натрия (6.1.3), затем приливают раствор В гидроокиси натрия (6.1.4) и доводят активную кислотность до pH = 8, используя для контроля потенциометрический анализатор.

8.1.5 Содержимое химического стакана переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3, ополаскивая стакан водой несколько раз до полного удаления содержимого из химического стакана, доводят водой объем до метки и перемешивают.

8.1.6 Смесь фильтруют через фильтровальную бумагу, отбрасывая первые 2 см^3 фильтрата.

8.2 Проведение измерений оптической плотности

8.2.1 Измерения проводят при комнатной температуре буферного раствора и воды.

8.2.1.1 В кювету спектрофотометра пипеткой наливают растворы, объем которых должен соответствовать таблице 1.

Таблица 1

Наименование	Объем раствора, см^3	
	При измерении фильтрата и стандартного раствора	При нулевом определении
Буферный раствор (6.1.6)	1,00	1,00
Раствор НАДН (6.1.8)	0,10	0,10
Суспензия МДГ/ЛДГ (6.1.10)	0,02	0,02
Фильтрат (8.1.6) и стандартный раствор (6.1.12)	2,00	—
Фильтрат нулевого определения (7)	—	2,00

8.2.1.2 Растворы в кюветах перемешивают пластиковыми мешалками, выдерживают в водяной бане при температуре от 20 до 25 °С в течение 5 мин. Затем измеряют оптическую плотность раствора A_0 в каждой кювете относительно воздуха при длине волны 340 нм, используя спектрофотометр.

8.2.1.3 В кюветы с фильтратами приливают по 0,02 см^3 раствора цитрат-лиазы (6.1.11).

8.2.1.4 Растворы в кюветах перемешивают и выдерживают в водяной бане при температуре от 20 до 25 °С в течение 10 мин.

8.2.1.5 Измеряют оптическую плотность раствора A_{10} в каждой кювете относительно воздуха при длине волны 340 нм.

8.2.2 Вычисляют оптическую плотность фильтрата A_s и оптическую плотность растворов для нулевого определения $A_г$ по формулам:

$$A_s = A_{0s} - A_{10s}, \quad (1)$$

$$A_г = A_{0г} - A_{10г}, \quad (2)$$

где A_{0s} — оптическая плотность фильтрата, измеренная перед добавлением цитрат-лиазы;

A_{10s} — оптическая плотность фильтрата, измеренная после добавления цитрат-лиазы и выдерживания в водяной бане при температуре от 20 до 25 °С в течение 10 мин;

$A_{0г}$ — оптическая плотность растворов холостого определения, измеренная перед добавлением цитрат-лиазы;

$A_{10г}$ — оптическая плотность растворов холостого определения, измеренная после добавления цитрат-лиазы, и выдерживания в водяной бане при температуре от 20 до 25 °С в течение 10 мин.

8.2.3 Если оптическая плотность A_s или $A_г$ превышает 0,800, измерения повторяют по 8.1.5 — 8.2.2, используя более разбавленные растворы фильтратов. Если разбавление не проводят, то принимают значения $V_6 = V_7 = 2$ см^3.

9 Обработка результатов

Массовую долю лимонной кислоты X, %, вычисляют по формуле

$$X = \frac{(A_s - A_г)\,M}{k\,l\,m} \cdot \frac{V_1\,V_2\,V_5}{V_2\,V_4} \cdot \frac{V_7}{V_6} \cdot 100 = \frac{1{,}915\,(A_s - A_г)}{m} \cdot \frac{V_7}{V_6}, \quad (3)$$

где A_s — оптическая плотность фильтрата;

$A_г$ — оптическая плотность растворов нулевого определения;

M — молекулярная масса безводной лимонной кислоты, M = 192,1 г/моль;

k — коэффициент молярного поглощения НАДН на длине волны 340 нм, $k = 6{,}3 \cdot 10^6$ см^2/моль;

l — длина оптического пути кюветы, l = 1 см;

m — масса навески продукта, г;

V_1 — объем жидкости в кювете спектрофотометра, V_1 = 3,14 см^3;

V_2 — объем фильтрата в кювете спектрофотометра, V_2 = 2,00 см^3;

V_3 — объем, до которого был доведен фильтрат в процессе установления активной кислотности pH = 8,0 (8.1.5), V_3 = 100 см^3;

V_4 — объем фильтрата (8.1.3), отобранный для установления активной кислотности, V_4 = 25 см^3;

V_5 — объем суспензии (8.1.1), V_5 = 100 см^3;

V_6 — объем фильтрата (8.1.6), взятого при необходимости для разведения, см^3;

V_7 — объем, до которого при необходимости был разбавлен фильтрат (8.1.6), см^3.

Результаты измерений массовой доли лимонной кислоты выражают до второго десятичного знака. Если массовая доля лимонной кислоты менее 1 %, то результаты измерений выражают до третьего десятичного знака.

10 Метрологические характеристики

10.1 Сходимость

Относительная величина разницы между результатом любого из двух определений и среднеарифметическим значением результатов этих определений, полученных при определении одной и той же пробы одним и тем же лаборантом, пользующимся одними и теми же приборами, за короткий промежуток времени не должна превышать 5 % при вероятности P = 0,95.

10.2 Воспроизводимость

Относительная величина разницы между результатом любого из двух определений и среднеарифметическим значением результатов этих определений, полученных двумя лаборантами, работающими в разных лабораториях с одной и той же пробой, не должна превышать 8 % при вероятности P = 0,95.

10.3 Если расхождение результатов двух параллельных определений (сходимость) превышает 5 %, то повторно проводят два новых определения.

ПРИЛОЖЕНИЕ А
(справочное)

Библиография

[1] ТУ 6-09-1926—77 Трихлоруксусная кислота
[2] ТУ 6-09-07-676—76 Диглицин
[3] ТУ 10П-124—67 Соль динатриевая никотинамидадениндинуклеотида
[4] Номенклатура ферментов. Рекомендации Номенклатурного Комитета Международного Союза по Биохимии, Нью-Йорк, 1984

УДК 637.2/.3/.147.2:006.354 ОКС 67.100.30 Н19 ОКСТУ 9209

Ключевые слова: сыр и плавленый сыр, ферментативный метод, определение, массовая доля лимонной кислоты, метрологические характеристики

gost.e-ecolog.ru