

---

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

---



НАЦИОНАЛЬНЫЙ  
СТАНДАРТ  
РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р  
57477—  
2017

---

**ПИЩЕВЫЕ ПРОДУКТЫ  
ПЕРЕРАБОТКИ ЯИЦ  
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПТИЦЫ**

**Определение содержания бета-оксимасляной  
кислоты колориметрическим методом**

Издание официальное



Москва  
Стандартинформ  
2019

## Предисловие

1 РАЗРАБОТАН «Всероссийским научно-исследовательским институтом птицеперерабатывающей промышленности» — филиалом Федерального государственного бюджетного научного учреждения Федерального научного центра «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» Российской академии наук (ВНИИПП)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 116 «Продукты переработки птицы, яиц и сублимационной сушки»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 30 мая 2017 г. № 451-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](http://www.gost.ru))*

© Стандартинформ, оформление, 2017, 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

## ПИЩЕВЫЕ ПРОДУКТЫ ПЕРЕРАБОТКИ ЯИЦ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПТИЦЫ

## Определение содержания бета-оксимасляной кислоты колориметрическим методом

Foodstuffs of processed poultry eggs. Determination of beta-hydroxybutyric acid content by colorimetric method

Дата введения — 2018—07—01

**1 Область применения**

Настоящий стандарт распространяется на пищевые продукты переработки яиц сельскохозяйственной птицы (яичный меланж, желток и белок) (далее — яичные продукты) и устанавливает колориметрический ферментативный метод определения содержания бета-оксимасляной кислоты (энантиомерная форма D).

Стандарт не распространяется на сухие и жидкие яичные ферментированные желток и белок.

Уровень содержания D-бета-оксимасляной кислоты (D-3-гидрооксимасляной кислоты,  $\text{CH}_3\text{-CH(OH)-CH}_2\text{-COOH}$ ) в яичных продуктах является индикатором использования при их производстве некачественных и/или отбракованных инкубационных яиц.

**2 Нормативные ссылки**

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие 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 2493 Реактивы. Калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный. Технические условия
- ГОСТ 3118 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия
- ГОСТ 4174 Реактивы. Цинк сернокислый 7-водный. 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 6709 Вода дистиллированная. Технические условия
- ГОСТ 6816 Калий железистосинеродистый технический. Технические условия
- ГОСТ 10929 Реактивы. Водорода пероксид. Технические условия
- ГОСТ 12026 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия
- ГОСТ 24363 Реактивы. Калия гидроокись. Технические условия
- ГОСТ 25336 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 28311 Дозаторы медицинские лабораторные. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 28498 Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний

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

ГОСТ 29228 (ИСО 835-2—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 2. Пипетки градуированные без установленного времени ожидания

ГОСТ 31469 Пищевые продукты переработки яиц сельскохозяйственной птицы. Методы физико-химического анализа

ГОСТ 32152 Пищевые продукты переработки яиц сельскохозяйственной птицы. Методы определения содержания янтарной, молочной и 3D-оксимасляной кислот

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

ГОСТ Р 52943 Птицеперерабатывающая промышленность. Продукты переработки яиц сельскохозяйственной птицы пищевые. Термины и определения

ГОСТ Р 55878 Спирт этиловый технический гидролизный ректификованный. Технические условия

ГОСТ Р ИСО 5725-1 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения

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

ГОСТ Р ИСО 5725-6 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 Термины, определения и сокращения

3.1 В настоящем стандарте применены термины по ГОСТ Р 52943, а также следующий термин с соответствующим определением:

3.1.1 **U**: Международная единица, определяющая количество (активность) фермента, который служит катализатором для превращения 1 мкмоль вещества в минуту при 25 °С.

#### 3.2 Сокращения

В настоящем стандарте применены следующие сокращения:

НАД — β-никотинамидадениндинуклеотид (окисленная форма);

НАДН — β-никотинамидадениндинуклеотид (восстановленная форма, C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>N<sub>7</sub>O<sub>14</sub>P<sub>2</sub>);

ГБДГ — 3-гидроксипутиратдегидрогеназа;

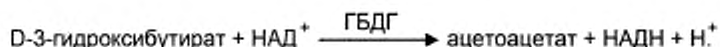
INT — хлорид йодонитротетразолия фиолетового (п-йоднитротетразолия виолет, (2-(4-йодфенил)-3-(4-нитрофенил)-5-фенил-2Н-тетразолия хлорид, C<sub>19</sub>H<sub>13</sub>ClI N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>);

ЕС — обозначение фермента по классификации Международного союза биохимии и молекулярной биологии.

### 4 Сущность метода

Метод основан на проведении двух ферментативных реакций:

а) при взаимодействии с НАД в присутствии фермента ГБДГ бета-оксимасляная кислота (D-3-гидроксibuтират-ион) превращается в ацетоацетат с одновременным образованием НАДН и иона  $H^+$ :



б) в присутствии фермента диафоразы НАДН взаимодействует с INT с образованием формазана:



Содержание D-бета-оксимасляной кислоты эквивалентно количеству образовавшегося формазана и определяется по изменению оптической плотности реакционного раствора, измеренной при длине волны 492 нм. Зависимость оптической плотности от массовой концентрации D-бета-оксимасляной кислоты в колориметрируемом растворе линейна в диапазоне от 0,1 до 4,0 мкг/см<sup>3</sup>. Определению могут мешать редуцирующие вещества пробы, взаимодействующие с INT (аскорбиновая кислота, цистеин, сульфиты).

## 5 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда, реактивы, материалы

5.1 Весы неавтоматического действия по ГОСТ OIML R 76-1 высокого класса точности и пределами допускаемой абсолютной погрешности  $\pm 0,001$  г.

5.2 Спектрофотометр, позволяющий проводить измерения оптической плотности в диапазоне от 0 до 2 Б при длине волны 492 нм.

5.3 Ионмер или pH-метр с диапазоном измерений от 1 до 14 ед. pH и допустимой погрешностью измерения 0,05 ед. pH.

5.4 Термометр жидкостный стеклянный по ГОСТ 28498 с диапазоном измерения от 10 °C до 50 °C и погрешностью  $\pm 1$  °C.

5.5 Секундомер или секундомер-часы с ценой деления 0,2 с.

5.6 Кюветы кварцевые или стеклянные фотометрические с номинальной толщиной поглощающего слоя 10 мм (допускается использовать аналогичные одноразовые пластиковые кюветы).

5.7 Гомогенизатор (блендер) погружной.

5.8 Баня водяная или жидкостный термостат, позволяющие поддерживать температуры  $(70 \pm 2)$  °C и  $(85 \pm 2)$  °C.

5.9 Микродозаторы пипеточные номинальной вместимостью 20 мм<sup>3</sup>, 50 мм<sup>3</sup> и микродозаторы переменного объема от 100 до 1000 мм<sup>3</sup> с относительной погрешностью дозирования не более  $\pm 1$  % с соответствующими наконечниками по ГОСТ 28311.

5.10 Мешалка магнитная лабораторная.

5.11 Колбы мерные 1-25-2, 1-50-2, 1-100-2, 1-250-2, 1-500-2, 1-1000-2 по ГОСТ 1770.

5.12 Стаканы В-1-25, Н-1-100 и В-1-150 по ГОСТ 25336.

5.13 Цилиндры мерные 1-25-2 и 1-50-2 по ГОСТ 1770.

5.14 Пипетки с одной отметкой 1-1-1, 1-2-2, 1-2-10 по ГОСТ 29169.

5.15 Пипетки градуированные 1-2-1-1, 1-2-1-5 и 1-2-1-10 по ГОСТ 29228.

5.16 Колбы конические Кн-1-50-14/23 и Кн-1-100-14/23 по ГОСТ 25336.

5.17 Пробирки ПЗ-5 ХС и ПЗ-10 ХС по ГОСТ 25336.

5.18 Воронки В-56-80 ХС по ГОСТ 25336.

5.19 Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.

5.20 Палочки стеклянные.

5.21 Шпатели для перемешивания растворов в фотометрических кюветах или пленка лабораторная герметизирующая.

5.22 Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

5.23 Вода бидистиллированная.

5.24 Спирт этиловый 96 %-ный технический гидролизный ректифицированный по ГОСТ Р 55878.

5.25 Спирт n-октиловый (n-октанол), массовая доля основного вещества не менее 99 %.

- 5.26 Калий железистосинеродистый 3-водный ( $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ , ферроцианид, гексацианоферрат(II) калия) по ГОСТ 6816, высший сорт.
- 5.27 Цинк сернокислый 7-водный по ГОСТ 4174, х. ч.
- 5.28 Натрия гидроокись по ГОСТ 4328, х. ч.
- 5.29 Калия гидроокись по ГОСТ 24363, х. ч.
- 5.30 Калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный по ГОСТ 2493, ч. д. а.
- 5.31 Калий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 4198, х. ч.
- 5.32 Перекись водорода по ГОСТ 10929, х. ч.
- 5.33 Кислота соляная по ГОСТ 3118, х. ч.
- 5.34 Кислота хлорная, массовая доля основного вещества не менее 60 %.
- 5.35 Кислота серная по ГОСТ 4204, х. ч.
- 5.36 Комплект реагентов для колориметрического ферментативного определения D-бета-оксимасляной кислоты, включающий:
- реагент 1 — флакон с фосфатно-триэтаноламинным буфером с pH 8,6 ед. pH,
  - реагент 2 — флакон с 35 мг сухого препарата, который должен содержать диафорузу активностью 4 U (ЕС 2.6.1.2) и 28 мг НАД;
  - реагент 3 — флакон с 2,5 см<sup>3</sup> водного раствора INT;
  - реагент 4 — флакон с 1,8 см<sup>3</sup> суспензии ГБДГ активностью 27 U (ЕС 1.1.1.30).
- 5.37 Диафораза (липоилдегидрогеназа, ЕС 1.1.1.27), лиофилизат удельной активностью не менее 5 U/мг белка (ЕС 1.1.1.27).
- 5.38 ГБДГ, суспензия в растворе сульфата аммония молярной концентрацией 3,2 моль/дм<sup>3</sup> удельной активностью не менее 15 U/см<sup>3</sup> (ЕС 6.2.1.5), в ампулах.
- 5.39 INT, массовая доля основного вещества не менее 99 %.
- 5.40 Тритон X-100 (*n*-tert-октилфениловый эфир полиэтиленгликоля).
- 5.41 Гидрат НАДН, массовая доля основного вещества не менее 90 %.
- 5.42 Триэтаноламин, массовая доля основного вещества не менее 99,5 %.
- 5.43 Мононатриевая соль D,L-бета-оксимасляной кислоты, массовая доля основного вещества не менее 98 %.
- 5.44 Допускается применение других средств измерений, вспомогательного оборудования, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам, а также реактивов и материалов по качеству не уступающих вышеуказанным. Допускается использование готовых комплектов реагентов для определения бета-оксимасляной кислоты при условии, что входящие в их состав реактивы по качеству не ниже вышеуказанным.

## 6 Отбор и подготовка проб

- 6.1 Отбор проб — по ГОСТ 32152.
- 6.2 Подготовка проб — по ГОСТ 31469.

## 7 Подготовка к проведению измерения

### 7.1 Подготовка фотометрических кювет

Кюветы должны быть сухими и чистыми. Чистку кювет проводят ополаскиванием теплой водопроводной водой, выдерживанием в разбавленной водой (1:4) соляной кислоте, ополаскиванием дистиллированной водой и в конце — 96 %-ным этиловым спиртом. После ополаскивания спиртом кювету переворачивают вверх дном и снимают стекающие капли спирта и воды фильтровальной бумагой. Сушат кюветы на воздухе и хранят в закрытой посуде. На стенках кювет не должно быть разводов, пятен и каких-либо частиц.

### 7.2 Приготовление водного раствора железосинеродистого калия массовой концентрацией 131 г/дм<sup>3</sup> (раствор Кареза I)

В мерной колбе вместимостью 500 см<sup>3</sup> взвешивают  $(75,0 \pm 0,1)$  г 3-водного железистосинеродистого калия (см. 5.26), растворяют в дистиллированной воде, доводят объем дистиллированной водой до метки и перемешивают. Раствор Кареза I хранят в плотно закрытой склянке из темного стекла не более 10 сут.



### 7.3 Приготовление водного раствора сернокислого цинка массовой концентрацией 168,5 г/дм<sup>3</sup> (раствор Кареза II)

В мерной колбе вместимостью 500 см<sup>3</sup> взвешивают 150 г сернокислого цинка 7-водного (см. 5.27), растворяют в дистиллированной воде, доводят объем дистиллированной водой до метки и перемешивают. Раствор хранят в плотно закрытой склянке из темного стекла не более 6 мес. При помутнении раствора и/или появлении осадка готовят новый раствор.

### 7.4 Подготовка растворов реактивов из комплекта реагентов для ферментативного анализа (см. 5.36)

#### 7.4.1 Подготовка реактива 1 (фосфатно-триэтаноламинный буфер с pH 8,6 ед. pH)

Реагент 1 применяют без разбавления. Срок хранения реактива 1 при температуре 4 °С — не более 12 мес. Перед проведением определения реактив 1 доводят до температуры от 20 °С до 25 °С.

#### 7.4.2 Приготовление реактива 2 (раствор смеси диафоразы и НАД)

Во флакон с 35 мг реагента 2 добавляют 2,5 см<sup>3</sup> бидистиллированной воды и перемешивают. Срок хранения реактива 2 при температуре от 2 °С до 8 °С — три месяца, а при температуре от 20 °С до 25 °С — один месяц. Перед проведением определения реактив 2 доводят до температуры от 20 °С до 25 °С.

#### 7.4.3 Приготовление реактива 3 (INT)

Во флакон с 2,5 см<sup>3</sup> реагента 3 добавляют 6 см<sup>3</sup> бидистиллированной воды. Срок хранения реактива 3 в темном месте при температуре от 2 °С до 8 °С — не более одной недели. Перед проведением определения реактив 3 доводят до температуры от 20 °С до 25 °С.

#### 7.4.4 Приготовление реактива 4 (ГБДГ)

Реагент 4 применяют без разбавления. Срок хранения реактива 4 при температуре 4 °С — не более 12 мес. Перед проведением определения реактив 4 доводят до температуры от 20 °С до 25 °С.

### 7.5 Приготовление растворов реактивов для ферментативного анализа в лабораторных условиях

#### 7.5.1 Приготовление раствора гидроокиси калия молярной концентрацией 2 моль/дм<sup>3</sup>

В мерной колбе вместимостью 500 см<sup>3</sup> растворяют 56,1 г гидроокиси калия (см. 5.29) в дистиллированной воде, доводят объем раствора водой до 500 см<sup>3</sup>. Раствор хранят в плотно закрытой полиэтиленовой посуде. Срок хранения — 4 мес.

#### 7.5.2 Приготовление фосфатно-триэтаноламинного буфера с активной кислотностью pH 8,6 ед. pH (реактив 1)

7.5.2.1 В мерной колбе вместимостью 100 см<sup>3</sup> растворяют 1,86 г гидрохлорида триэтанолamina (см. 5.42) в дистиллированной воде, доводят активную кислотность раствора до 8,6 ед. pH раствором гидроокиси калия молярной концентрацией 2 моль/дм<sup>3</sup> (см. 7.5.1), используя для измерений pH-метр. Затем добавляют 0,68 г Тритона X-100 (см. 5.40) и доводят объем раствора до 100 см<sup>3</sup> дистиллированной водой.

7.5.2.2 В стакане вместимостью 150 см<sup>3</sup> растворяют в дистиллированной воде 8,6 г двузамещенного фосфорнокислого калия (см. 5.30). В стакане вместимостью 25 см<sup>3</sup> растворяют в дистиллированной воде 0,070 г однозамещенного фосфорнокислого калия (см. 5.31). Содержимое обоих стаканов переносят в мерную колбу вместимостью 1000 см<sup>3</sup> и доводят объем раствора дистиллированной водой до 1000 см<sup>3</sup>.

7.5.2.3 Реактив 1 получают смешиванием 20 см<sup>3</sup> раствора по 7.5.2.1 и 5 см<sup>3</sup> раствора по 7.5.2.2. Реактив 1 хранят при температуре 4 °С. Срок хранения — не более 12 мес.

#### 7.5.3 Приготовление реактива 2 (раствор смеси диафоразы и НАД)

7.5.3.1 В конической колбе со шлифом вместимостью 50 см<sup>3</sup> (см. 5.16) взвешивают 0,135 г НАДН (см. 5.41), добавляют 30 см<sup>3</sup> бидистиллированной воды и перемешивают. Раствор хранят при температуре 4 °С. Срок хранения — не более одного месяца.

7.5.3.2 Лиофилизированную диафорузу (см. 5.37) растворяют в растворе НАДН (см. 7.5.3.1), массу лиофилизированной диафоразы и объем раствора НАДН выбирают так, чтобы удельная активность диа-

форазы в полученном растворе была равна  $1,6 \text{ U/cm}^3$  (реактив 2). Срок хранения полученного реактива 2 при температуре от  $2^\circ\text{C}$  до  $8^\circ\text{C}$  — два месяца.

#### 7.5.4 Приготовление реактива 3 (INT)

В стакане вместимостью  $25 \text{ cm}^3$  взвешивают  $0,150 \text{ г}$  INT (см. 5.39) и растворяют в бидистиллированной воде. Содержимое стакана переносят в мерную колбу вместимостью  $250 \text{ cm}^3$ , доводят объем бидистиллированной водой до  $250 \text{ cm}^3$ , перемешивают и колбу плотно закрывают пробкой. Реактив 3 хранят при температуре  $4^\circ\text{C}$  в темноте. Срок хранения — два месяца.

#### 7.5.5 Приготовление реактива 4 (ГБДГ)

Используют готовую суспензию ГБДГ (см. 5.38) активностью не менее  $15 \text{ U/cm}^3$ . Срок хранения в ампулах при температуре от  $2^\circ\text{C}$  до  $8^\circ\text{C}$  не более 12 мес, после вскрытия ампулы — не более 6 мес.

#### 7.6 Приготовление раствора моноватриевой соли D,L-бета-оксимасляной кислоты массовой концентрацией $0,30 \text{ г/дм}^3$

В мерной колбе вместимостью  $100 \text{ cm}^3$  взвешивают  $300 \text{ мг}$  моноватриевой соли D,L-бета-оксимасляной кислоты (см. 5.43), растворяют в бидистиллированной воде, доводят объем водой до метки и перемешивают. Полученный раствор разбавляют в 10 раз: в чистую мерную колбу вместимостью  $100 \text{ cm}^3$  вносят  $10 \text{ cm}^3$  раствора и доводят до  $100 \text{ cm}^3$  бидистиллированной водой. Учитывая, что в рацемической форме D,L-бета-оксимасляной кислоты содержание D-энантиомера составляет примерно 50 %, полученный раствор соответствует концентрации D-бета-оксимасляной кислоты примерно  $0,12 \text{ г/дм}^3$ . Используют свежеприготовленный раствор. При длительном хранении раствор делят на порции и замораживают. Размороженный раствор используют в течение 6 ч и далее отбрасывают.

#### 7.7 Проверка приготовленных растворов из наборов реагентов по 7.4 и 7.5 по раствору D,L-бета-оксимасляной кислоты

Для проверки пригодности приготовленных по 7.4 и 7.5 растворов проводят два измерения по 8.1—8.7, в которых вместо раствора пробы используют  $0,05 \text{ cm}^3$  контрольного раствора моноватриевой соли D,L-бета-оксимасляной кислоты по 7.6 (см. таблицу 1). Растворы считаются пригодными для анализа, если среднее значение измеренной массовой концентрации D-бета-оксимасляной кислоты отличается от значения массовой концентрации этой кислоты в контрольном растворе ( $0,12 \text{ г/дм}^3$ ) не более чем на 10 %.

#### 7.8 Приготовление водного раствора гидроокиси натрия молярной концентрацией $1 \text{ моль/дм}^3$

В мерной колбе вместимостью  $500 \text{ cm}^3$  растворяют  $(20,00 \pm 0,01) \text{ г}$  гидроокиси натрия (см. 5.28) в дистиллированной воде и доводят водой объем до  $500 \text{ cm}^3$ . Раствор хранят в плотно закрытой полиэтиленовой емкости. Срок хранения — не более 6 мес.

#### 7.9 Приготовление водного раствора гидроокиси натрия молярной концентрацией $0,1 \text{ моль/дм}^3$

Раствор гидроокиси натрия молярной концентрацией  $0,1 \text{ моль/дм}^3$  получают разбавлением в 10 раз раствора гидроокиси натрия молярной концентрацией  $1 \text{ моль/дм}^3$  (см. 7.8). Раствор хранят в плотно закрытой полиэтиленовой емкости. Срок хранения — не более 3 мес.

#### 7.10 Приготовление водного раствора гидроокиси калия массовой долей 30 %

В термостойком стакане вместимостью  $100 \text{ cm}^3$  растворяют в  $70 \text{ cm}^3$  бидистиллированной воды  $30 \text{ г}$  гидроокиси калия (см. 5.29). Раствор хранят в полиэтиленовой емкости. Срок хранения — 4 мес.

#### 7.11 Приготовление раствора гидроокиси калия молярной концентрацией $2 \text{ моль/дм}^3$

В мерной колбе вместимостью  $500 \text{ cm}^3$   $(56,00 \pm 0,01) \text{ г}$  гидроокиси калия (см. 5.29) растворяют дистиллированной водой и доводят объем водой до  $500 \text{ cm}^3$ . Раствор хранят в плотно закрытой полиэтиленовой емкости. Срок хранения — не более 6 мес.

#### 7.12 Приготовление раствора гидроокиси калия молярной концентрацией $1 \text{ моль/дм}^3$

Раствор готовят разбавлением в два раза дистиллированной водой раствора гидроокиси калия молярной концентрацией  $2 \text{ моль/дм}^3$  (см. 7.11).



Раствор хранят в плотно закрытой полиэтиленовой емкости. Срок хранения — не более 6 мес.

### 7.13 Приготовление разбавленной хлорной кислоты

40 см<sup>3</sup> хлорной кислоты (см. 5.34) смешивают с 60 см<sup>3</sup> бидистиллированной воды. Срок хранения — один год.

### 7.14 Приготовление раствора серной кислоты молярной концентрацией 1 моль/дм<sup>3</sup>

В термостойкий стакан вместимостью 100 см<sup>3</sup> наливают примерно 50 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и осторожно по каплям добавляют 5,5 см<sup>3</sup> концентрированной серной кислоты (см. 5.35), после перемешивания и охлаждения раствор переносят в мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> и доводят дистиллированной водой до метки. Раствор хранят при комнатной температуре не более 6 мес.

### 7.15 Подготовка проб к анализу

#### 7.15.1 Подготовка проб жидких яичных продуктов

В коническую колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> помещают 2 г гомогенизированной пробы (см. 6.2), накрывают часовым стеклом и нагревают на водяной бане (см. 5.8) при температуре  $(85 \pm 2)^\circ\text{C}$  в течение  $(45 \pm 2)$  мин для дезактивации ферментов яйца и коагуляции белка. Колбу с пробой охлаждают до температуры от  $20^\circ\text{C}$  до  $25^\circ\text{C}$  и отделяют с помощью шпателя или стеклянной палочки скоагулированный продукт от дна колбы. Добавляют 8 см<sup>3</sup> бидистиллированной воды, перемешивают содержимое на магнитной мешалке в течение 10 мин и фильтруют через складчатый фильтр из фильтровальной бумаги. Полученный слегка мутный фильтрат используют для анализа. В случае сильно мутного раствора готовят пробу по 7.15.2 или 7.15.3. Массовую концентрацию пробы в растворе  $C$ , г/см<sup>3</sup>, вычисляют по формуле

$$C = \frac{m}{V + \frac{m}{\rho} \cdot \frac{100 - W}{100}} \quad (1)$$

где  $m$  — масса навески пробы, г;

$V$  — объем добавленной воды, см<sup>3</sup> ( $V = 8 \text{ см}^3$ );

$W$  — массовая доля сухого вещества в пробе, определяемая по ГОСТ 31469, %;

$\rho$  — плотность воды, г/см<sup>3</sup> ( $\rho = 0,9983 \text{ г/см}^3$  при  $20^\circ\text{C}$ ).

#### 7.15.2 Подготовка проб жидких яичных продуктов с использованием растворов Кареза I и Кареза II

В мерной колбе вместимостью 25 см<sup>3</sup> взвешивают 5 г гомогенизированной пробы, полученной по 6.2, жидкого яичного продукта, добавляют 20 см<sup>3</sup> бидистиллированной воды и одну каплю *n*-октанола (см. 5.25), перемешивают и выдерживают на водяной кипящей бане в течение 15 мин. Охлаждают до температуры от  $20^\circ\text{C}$  до  $25^\circ\text{C}$ . Добавляют один за другим с сильным встряхиванием после каждого добавления 1 см<sup>3</sup> раствора Кареза I (см. 7.2) и 1 см<sup>3</sup> раствора Кареза II (см. 7.3). Доводят объем до метки с помощью раствора гидроокиси натрия молярной концентрацией 0,1 моль/дм<sup>3</sup> (см. 7.9), перемешивают и фильтруют через стеклянную воронку со складчатым фильтром из фильтровальной бумаги. Фильтрат используют для анализа. Массовую концентрацию пробы в полученном растворе  $C$ , г/см<sup>3</sup>, вычисляют по формуле

$$C = \frac{m}{25} \quad (2)$$

где  $m$  — масса навески пробы, г;

25 — конечный объем раствора с пробой, см<sup>3</sup>.

#### 7.15.3 Подготовка проб жидких яичных продуктов с использованием хлорной кислоты

В стакан вместимостью 100 см<sup>3</sup> помещают 20 г гомогенизированной пробы (см. 6.2), добавляют 20 см<sup>3</sup> разбавленной хлорной кислоты (см. 7.13), смесь гомогенизируют с помощью погружного гомогенизатора до однородного состояния (примерно 5 мин) и фильтруют через стеклянную воронку со складчатым фильтром из фильтровальной бумаги. Отбирают 10 см<sup>3</sup> фильтрата ( $V_1$ ) и доводят pH до

8,4 ед. pH с помощью pH-метра добавлением сначала раствора гидроокиси калия массовой долей 30 % (см. 7.10), а затем раствором гидроокиси калия молярной концентрацией 1 моль/дм<sup>3</sup> (см. 7.12). Регистрируют общий израсходованный объем растворов гидроокиси калия ( $V_3$ ). Полученный прозрачный раствор используют для анализа. Массовую концентрацию пробы в растворе  $C$ , г/см<sup>3</sup>, вычисляют по формуле

$$C = \frac{m \cdot V_1}{\left( V_2 + \frac{m}{\rho} \cdot \frac{100 - W}{100} \right) \cdot (V_1 + V_3)}, \quad (3)$$

где  $m$  — масса навески пробы, г;

$V_1$  — объем фильтрата, отобранный для анализа, см<sup>3</sup>;

$V_2$  — объем разбавленной хлорной кислоты, добавленной к пробе, см<sup>3</sup> ( $V_2 = 20$  см<sup>3</sup>);

$W$  — массовая доля сухого вещества в пробе, определяемая по ГОСТ 31469, %;

$V_3$  — общий объем растворов гидроокиси калия массовой долей 30 % и молярной концентрацией 1 моль/дм<sup>3</sup>, израсходованных на доведение pH раствора до 8,4 ед. pH, см<sup>3</sup>;

$\rho$  — плотность воды, г/см<sup>3</sup> ( $\rho = 0,9983$  г/см<sup>3</sup> при 20 °C).

#### 7.15.4 Подготовка проб сухих яичных продуктов

В мерной колбе вместимостью 50 см<sup>3</sup> взвешивают 2 г сухого яичного продукта (см. 6.2), добавляют 24 см<sup>3</sup> бидистиллированной воды, одну каплю *n*-октанола (см. 5.25), перемешивают и нагревают на кипящей водяной бане в течение 15 мин. Охлаждают до температуры от 20 °C до 25 °C, добавляют один за другим с сильным встряхиванием после каждого добавления 2 см<sup>3</sup> концентрированного раствора Кареза I (см. 7.2) и 2 см<sup>3</sup> раствора Кареза II (см. 7.3). Доводят pH раствора до 8—9 ед. pH с помощью раствора гидроокиси натрия молярной концентрацией 1 моль/дм<sup>3</sup> (см. 7.9), доводят объем до метки бидистиллированной водой, перемешивают и фильтруют через стеклянную воронку со складчатым фильтром из фильтровальной бумаги. Полученный фильтрат используют для анализа. Массовую концентрацию пробы в растворе  $C$ , г/см<sup>3</sup>, вычисляют по формуле

$$C = \frac{m}{50}, \quad (4)$$

где  $m$  — масса навески пробы, г;

50 — конечный объем раствора с пробой, см<sup>3</sup>.

#### 7.15.5 Обработка раствора пробы, содержащей редуцирующие вещества

В мерную колбу вместимостью 25 или 50 см<sup>3</sup> вносят соответственно до 20 или 40 см<sup>3</sup> раствора пробы (см. 7.15.1—7.15.4), добавляют при необходимости дистиллированную воду до получения объема раствора примерно 80 % от объема колбы, добавляют 1 см<sup>3</sup> раствора гидроокиси калия молярной концентрацией 2 моль/дм<sup>3</sup> (см. 7.11), одну каплю перекиси водорода (см. 5.32) (0,01—0,02 см<sup>3</sup>), перемешивают и выдерживают на водяной бане при температуре примерно 70 °C в течение 10 мин. После охлаждения до температуры от 20 °C до 25 °C доводят pH раствора до 8,0 ед. pH с помощью раствора серной кислоты молярной концентрацией 1 моль/дм<sup>3</sup> (см. 7.14), затем доводят водой объем раствора в колбе до метки и, при необходимости, фильтруют. Разбавление раствора пробы при такой обработке учитывают при обработке результатов анализа.

## 8 Проведение анализа

8.1 Анализ проводят при комнатной температуре от 20 °C до 25 °C. Перед началом анализа температуры реактива 1 (см. 7.4.1), бидистиллированной воды и раствора пробы должны быть от 20 °C до 25 °C.

Используют две фотометрические кюветы — одну для контрольной пробы (вместо раствора анализируемой пробы используется бидистиллированная вода), другую — для раствора анализируемой пробы (см. 7.15).

8.2 В кюветы с помощью пипеточных дозаторов вносят реактивы в порядке, указанном в таблице 1.

Таблица 1 — Схема дозирования и смешивания реактивов

Реактивы, вносимые в кюветы	Кювета с контрольным раствором	Кювета с раствором анализируемой пробы
Реактив 1 (см. 7.4.1 или 7.5.2)	0,6 см <sup>3</sup>	0,6 см <sup>3</sup>
Реактив 2 (см. 7.4.2 или 7.5.3)	0,2 см <sup>3</sup>	0,2 см <sup>3</sup>
Реактив 3 (см. 7.4.3 или 7.5.4)	0,2 см <sup>3</sup>	0,2 см <sup>3</sup>
Раствор анализируемой пробы (см. 7.15)*	—	0,1 см <sup>3</sup>
Бидистиллированная вода	2,0 см <sup>3</sup>	1,9 см <sup>3</sup>

\* В кювету можно вносить от 0,1 до 2,0 см<sup>3</sup> раствора анализируемой пробы, изменяя одновременно объем вносимой бидистиллированной воды: общий объем «раствор анализируемой пробы + бидистиллированная вода» должен быть равен 2,0 см<sup>3</sup>.

8.3 Содержимое каждой кюветы перемешивают шпателем или следующим способом: кювету накрывают герметизирующей пленкой (см. 5.21), плотно прижимают пальцем и осторожно переворачивают несколько раз.

8.4 Через 2 мин после перемешивания измеряют оптические плотности контрольного раствора ( $B'$ ) и раствора с пробой ( $A'$ ) относительно воздуха при длине волны 492 нм с записью результата до третьего десятичного знака. Повторяют измерения оптических плотностей еще через 2 мин (оптические плотности соответственно  $B$  и  $A$ ). Измерения для контрольного раствора и раствора с анализируемой пробой проводят так, чтобы задержка времени между ними была минимально возможной.

Примечание — INT и растворы, содержащие INT, чувствительны к действию света, поэтому необходимо выдерживать кюветы с растворами после добавления реактива 3 в темном месте, при выдерживании в кюветном отделении спектрофотометра крышка должна быть закрыта и луч от источника излучения спектрофотометра перекрыт непрозрачным экраном (экран перед измерением оптической плотности удаляют).

8.5 Оценивают разность оптических плотностей  $[(A-B)-(A'-B')]$ , которая не должна превышать 0,010 Б. В противном случае повторяют подготовку раствора пробы с дополнительной обработкой по 7.15.5 для удаления редуцирующих веществ.

8.6 Сразу после проведения измерений оптических плотностей по 8.4 в каждую кювету добавляют по 0,020 см<sup>3</sup> реактива 4 (см. 7.4.4 или 7.5.5) и перемешивают содержимое в соответствии с 8.3. Через 20 мин и через 30 мин с момента внесения реактива 4 (время отсчитывают точно по секундомеру) измеряют в соответствии с 8.4 оптические плотности контрольного раствора  $B_{20}$ ,  $B_{30}$  и раствора с анализируемой пробой  $A_{20}$  и  $A_{30}$ .

8.7 Результатом измерений является разность оптических плотностей  $\Delta A$ , вычисляемая по формуле

$$\Delta A = [(A_{20} - A) - 2(A_{30} - A_{20})] - [(B_{20} - B) - 2(B_{30} - B_{20})], \quad (5)$$

где  $A$  — оптическая плотность раствора с анализируемой пробой непосредственно перед добавлением реактива 4 (см. 8.4);

$A_{20}$  — оптическая плотность раствора с анализируемой пробой через 20 мин после добавления реактива 4 (см. 8.6);

$A_{30}$  — оптическая плотность раствора с анализируемой пробой через 30 мин после добавления реактива 4 (см. 8.6);

$B$ ,  $B_{20}$  и  $B_{30}$  — соответствующие оптические плотности для контрольного раствора.

Примечание — Оптические плотности раствора с анализируемой пробой и контрольного раствора после внесения реактива 4 могут меняться в зависимости от времени. Величина  $\Delta A$ , вычисляемая по формуле (5), соответствует разности оптических плотностей, экстраполированной к моменту внесения реактива 4 при условии линейной зависимости  $\Delta A$  от времени в указанном выше интервале времени. Характер этой зависимости проверяют и, при необходимости, графически определяют экстраполированное значение  $\Delta A$  согласно приложению А.

Если полученное значение  $\Delta A$  превышает 0,8 Б, то измерения по 8.2—8.6 повторяют, используя меньший объем раствора анализируемой пробы (см. 8.2) или разбавив ее бидистиллированной водой.

Если полученное значение  $\Delta A$  меньше 0,1 Б, то измерения по 8.2—8.6 повторяют, используя больший объем раствора анализируемой пробы (см. 8.2) или используя навеску большей массы при подготовке пробы (см. 7.15).

8.8 Проверка отсутствия в растворе пробы веществ, мешающих определению (неполное превращение D-бета-оксимасляной кислоты за указанное в 8.7 время): в кювету с раствором пробы после измерения оптической плотности  $A_{30}$  (см. 8.6) добавляют примерно 0,05 см<sup>3</sup> стандартного раствора моносоднатриевой соли D,L-бета-оксимасляной кислоты массовой концентрацией 0,30 г/дм<sup>3</sup> (см. 7.6) и перемешивают. Оптическая плотность полученного раствора, измеренная через 6—7 мин, должна увеличиться не менее чем на 0,2 Б.

Примечание — Контроль мешающих определению факторов можно проводить также с помощью параллельного измерения  $\Delta A$  растворов с разным объемом вносимого раствора анализируемой пробы (см. таблицу 1), например 0,1 и 0,2 см<sup>3</sup>, или с растворами, приготовленными с разной массой пробы сухих яичных продуктов (см. 7.15.4), при этом значения  $\Delta A$  должны меняться прямо пропорционально использованному объему или массе пробы. Одновременный контроль мешающих факторов, используемых наборов реактивов и процедуры измерений проводят согласно приложению Б.

## 9 Обработка результатов

Массовую долю D-бета-оксимасляной кислоты  $X$ , мг/кг, вычисляют по формуле

$$X = \frac{3,050 \cdot 104,1 \cdot 1000 \cdot \Delta A \cdot F}{19900 \cdot 1,0 \cdot V \cdot C}, \quad (6)$$

где 3,050 — общий объем колориметрируемого раствора в кювете, см<sup>3</sup>;

104,1 — молекулярная масса D-бета-оксимасляной кислоты, г/моль;

1000 — коэффициент пересчета из граммов в миллиграммы;

$A$  — измеренная разность оптических плотностей (см. 8.7);

$F$  — коэффициент разбавления раствора с анализируемой пробой;

19900 — молярный коэффициент экстинкции формазана при длине волны 492 нм, дм<sup>3</sup>·моль<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup>;

1,0 — толщина поглощающего слоя кюветы, см;

$V$  — объем раствора анализируемой пробы (7.15.1—7.15.4), вносимый в кювету для проведения ферментативной реакции (см. таблицу 1), см<sup>3</sup>;

$C$  — массовая концентрация пробы в растворе [7.15.1—7.15.4, формулы (1)—(4)], г/см<sup>3</sup>.

Содержание D-бета-оксимасляной кислоты  $X_c$ , мг/кг, в пересчете на сухое вещество, вычисляют по формуле

$$X_c = 100 \cdot \frac{X}{W_1}, \quad (7)$$

где  $W_1$  — массовая доля сухого вещества в пробе, измеренная по ГОСТ 31469, %.

Вычисления проводят до первого десятичного знака.

## 10 Оформление результатов

За окончательный результат анализа принимают среднеарифметическое значение результатов определений, выполненных в условиях повторяемости по ГОСТ Р ИСО 5725-1 для двух идентичных проб.

Результат измерений представляют в виде

$$\bar{X} \pm \delta \cdot \bar{X}/100, \quad (8)$$

где  $\bar{X}$  — среднеарифметическое значение результатов определений содержания D-бета-оксимасляной кислоты, мг/кг;

$\delta$  — границы относительной погрешности при  $P = 0,95$ , % (см. таблицу 2).

Числовое значение результата  $\bar{X}$  должно заканчиваться цифрой того же разряда, что и значение границы погрешности в абсолютных единицах, содержащих не более двух значащих цифр.

## 11 Точность метода

Метрологические характеристики метода при доверительной вероятности 0,95 приведены в таблице 2.

Таблица 2

Диапазон измерений содержания D-бета-оксимасляной кислоты в пересчете на сухое вещество, мг/кг (мг/кг)	Границы относительной погрешности $\pm \delta$ , % ( $P = 0,95$ )	Предел относительной повторяемости, $r_{отн}$ , % ( $n = 2, P = 0,95$ )	Критическая разность $CD_{отн, 0,95}$ относительная, % ( $n_1 = n_2 = 2, P = 0,95$ )
От 7 до 20 включ.	17	15	18
Св. 20 до 100 включ.	9	7,5	8,5

## 12 Контроль точности результатов анализов

12.1 Контроль стабильности анализов (повторяемость, промежуточная прецизионность и погрешность) проводят по ГОСТ Р ИСО 5725-6 (подраздел 6.2) в соответствии с порядком, установленным в Руководстве по качеству лаборатории.

12.2 Проверку приемлемости результатов анализов в условиях повторяемости (сходимости) проводят в соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725-2. Расхождение между результатами двух единичных анализов является приемлемым, если выполняется условие:

$$\frac{2 \cdot |X_1 - X_2|}{(X_1 + X_2)} \cdot 100 < r_{отн}, \quad (9)$$

где  $X_1, X_2$  — результаты единичных анализов массовой доли D-бета-оксимасляной кислоты для двух проб, выраженных в мг/кг (мг/кг) в пересчете на сухое вещество;

$r_{отн}$  — относительный предел повторяемости, % (см. таблицу 2).

12.3 Проверку приемлемости результатов анализов в условиях воспроизводимости проводят в соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725-2. Расхождение между результатами анализов, полученных в двух лабораториях, является приемлемым, если выполняется условие:

$$|\bar{X}_1 - \bar{X}_2| < CD_{отн, 0,95} \cdot 0,01 \cdot \bar{X}_{ср}, \quad (10)$$

где  $\bar{X}_1, \bar{X}_2$  — полученные в двух лабораториях среднееарифметические значения результатов анализов массовой доли D-бета-оксимасляной кислоты, мг/кг в пересчете на сухое вещество;

$\bar{X}_{ср}$  — среднееарифметическое значение окончательных результатов анализов массовой доли D-бета-оксимасляной кислоты  $\bar{X}_1$  и  $\bar{X}_2$  мг/кг (мг/кг) в пересчете на сухое вещество;

$CD_{отн, 0,95}$  — критическая разность для двух среднееарифметических значений (окончательных результатов анализов), полученных в двух разных лабораториях (см. таблицу 2), %.

12.4 В случае разногласий в оценке результатов анализов проводят повторное определение содержания D-бета-оксимасляной кислоты газохроматографическим методом по ГОСТ 32152.

## 13 Требования к условиям анализов

При выполнении анализов температура окружающего воздуха должна быть от 20 °C до 25 °C. Атмосферное давление и относительная влажность воздуха в лабораторном помещении, напряжение и частота переменного тока питающей электросети не должны выходить за предельные значения, приведенные в технических инструкциях на средства измерений и оборудование, указанные в разделе 5.

#### **14 Требования к квалификации оператора**

К выполнению измерений, обработке и оформлению результатов допускаются специалисты, имеющие высшее или среднее специальное образование и опыт работы в химической лаборатории, изучившие инструкции по эксплуатации используемого оборудования и средств измерений и прошедшие соответствующий инструктаж, освоившие методику определения содержания бета-оксимасляной кислоты в процессе обучения и получившие удовлетворительные результаты при оперативном контроле процедуры измерения.

#### **15 Требования безопасности**

15.1 При подготовке и проведении испытаний необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007. При работе с электроприборами необходимо соблюдать требования безопасности по ГОСТ 12.1.019 и инструкций по эксплуатации оборудования.

15.2 Помещение, в котором проводят измерения, должно быть снабжено приточно-вытяжной вентиляцией, должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004 и должно быть оборудовано средствами пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.



**Приложение А**  
**(обязательное)**

**Графический метод экстраполяции для определения изменения оптической плотности  $\Delta A$**

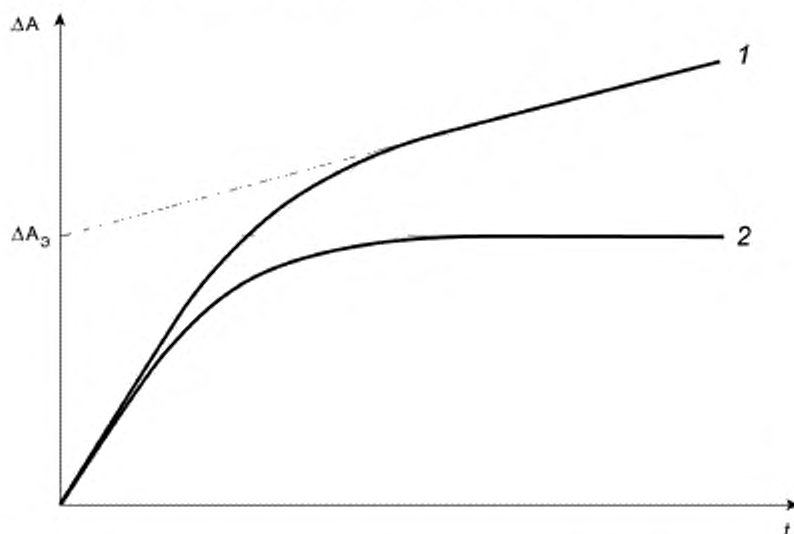
При замене наборов реактивов, используемых для ферментативной реакции, а также при значительных изменениях во времени  $\Delta A$  (через 20 и через 10 мин после добавления фермента ГБДГ) используют графический метод определения величины  $\Delta A_3$ , экстраполированной к началу ферментативной реакции: через 5—6 мин после внесения реактива 4 (см. 8.6), а затем через каждые 2 мин измеряют оптические плотности раствора с пробой А и контрольного раствора В и строят график зависимости от времени  $t$  разности оптических плотностей

$$\Delta A = (A_t - A_1) - (B_t - B_1), \quad (\text{А.1})$$

где  $A_t$  и  $B_t$  — оптические плотности раствора с пробой и контрольного раствора в момент времени  $t$  после добавления реактива 4 (фермента ГБДГ) (см. 7.4.4 или 7.5.5);

$A_1$  и  $B_1$  — соответствующие оптические плотности растворов непосредственно до добавления реактива 4.

Измерения продолжают до достижения линейной зависимости  $\Delta A$  от времени в течение не менее 4 мин. Значение  $\Delta A_3$  определяют по графику экстраполяцией линейного участка к началу реакции согласно рисунку А.1 и используют для расчета содержания D-бета-оксимасляной кислоты по формуле (6).



1 — график зависимости в случае наложения на ферментативную реакцию медленно текущей побочной реакции;

2 — график зависимости при отсутствии побочных реакций

Рисунок А.1 — Графическое определение разности оптической плотности, экстраполированной к началу ферментативной реакции

**Приложение Б**  
**(обязательное)**

**Контроль мешающих факторов и возможных потерь аналита при подготовке пробы**

При проведении контроля используют раствор D,L-бета-оксимасляной кислоты по 7.6 с массовой концентрацией D-бета-оксимасляной кислоты примерно 0,12 г/дм<sup>3</sup>. Измерения проводят в соответствии с разделом 8 в четырех кюветах: с контрольным раствором, с раствором анализируемой пробы, с раствором D,L-бета-оксимасляной кислоты (7.6) и со смешанным раствором, полученным последовательным добавлением в кювету раствора анализируемой пробы и раствора D,L-бета-оксимасляной кислоты. Используют схему дозирования, приведенную в таблице Б.1.

Таблица Б.1 — Схема дозирования и смешивания реактивов

Реактивы, вносимые в кюветы	Кювета с контрольным раствором	Кювета с раствором пробы	Кювета с раствором D,L-бета-оксимасляной кислоты	Кювета с раствором пробы и D,L-бета-оксимасляной кислоты
Реактив 1 (см. 7.4.1 или 7.5.2)	0,600 см <sup>3</sup>	0,600 см <sup>3</sup>	0,600 см <sup>3</sup>	0,600 см <sup>3</sup>
Реактив 2 (см. 7.4.2 или 7.5.3)	0,200 см <sup>3</sup>	0,200 см <sup>3</sup>	0,200 см <sup>3</sup>	0,200 см <sup>3</sup>
Реактив 3 (см. 7.4.3 или 7.5.4)	0,200 см <sup>3</sup>	0,200 см <sup>3</sup>	0,200 см <sup>3</sup>	0,200 см <sup>3</sup>
Бидистиллированная вода	2,000 см <sup>3</sup>	1,900 см <sup>3</sup>	1,900 см <sup>3</sup>	1,900 см <sup>3</sup>
Раствор анализируемой пробы (см. 7.15)	—	0,100 см <sup>3</sup>	—	0,050 см <sup>3</sup>
Раствор D,L-бета-оксимасляной кислоты (см. 7.6)	—	—	0,100 см <sup>3</sup>	0,050 см <sup>3</sup>

По формуле (5) определяют разности оптических плотностей  $\Delta A$  (см. 8.7) и вычисляют степень повторного нахождения  $Y$ , %, по формуле

$$Y = 100 \cdot \frac{2 \cdot \Delta A_{\text{ПК}} - \Delta A_{\text{П}}}{\Delta A_{\text{К}}}, \quad (\text{Б.1})$$

где  $\Delta A_{\text{ПК}}$  — разность оптических плотностей, измеренная для раствора с пробой и D,L-бета-оксимасляной кислотой;

$\Delta A_{\text{П}}$  — разность оптических плотностей, измеренная для раствора с пробой;

$\Delta A_{\text{К}}$  — разность оптических плотностей, измеренная для раствора с D,L-бета-оксимасляной кислотой.

Степень повторного нахождения должна находиться в интервале:

$$95 \% \leq Y \leq 100 \ \%.$$

**Пример — Расчет значения  $Y$ :**

при измерении получены следующие значения оптической плотности контрольного раствора:  
 $B = 0,034$ ;  $B_{20} = 0,036$ ;  $B_{30} = 0,037$ .

Измеренные значения оптической плотности растворов пробы (сухой яичный порошок), D,L-бета-оксимасляной кислоты и раствора пробы с добавкой этой кислоты приведены в таблице Б.2.

Таблица Б.2 — Измеренные значения оптической плотности

	Раствор D,L-бета-оксимасляной кислоты (К)	Раствор пробы (П)	Смешанный раствор пробы и D,L-бета-оксимасляной кислоты (ПК)
A	0,034	0,049	0,041
A <sub>20</sub>	0,798	0,063	0,428
A <sub>30</sub>	0,803	0,064	0,435

Расчет разностей оптических плотностей по формуле (5):

Смешанный раствор пробы и D,L-бета-оксимасляной кислоты:

$$\Delta A_{ПК} = [(0,428 - 0,041) - 2(0,435 - 0,428)] - [(0,036 - 0,034) - 2(0,037 - 0,036)] = 0,372.$$

С помощью аналогичного расчета для других растворов получены следующие значения разностей оптических плотностей:

$$\Delta A_{П} = 0,013; \quad \Delta A_{К} = 0,753.$$

Степень повторного нахождения:

$$Y = 100 \cdot \frac{2 \cdot \Delta A_{ПК} - \Delta A_{П}}{\Delta A_{К}} = 100 \cdot \frac{2 \cdot 0,372 - 0,013}{0,753} = 97,1.$$

УДК 637.54:006.354

ОКС 67.120.20

Ключевые слова: яичные продукты жидкие и сухие, бета-оксимасляная кислота, массовая концентрация, колориметрический ферментативный метод

---

Редактор *Н.Е. Рагузина*  
Технический редактор *В.Н. Прусакова*  
Корректор *Е.Д. Дульнева*  
Компьютерная верстка *А.Н. Золотаревой*

Сдано в набор 01.11.2019. Подписано в печать 18.11.2019. Формат 60×84<sup>1/8</sup>. Гарнитура Ариал.  
Усл. печ. л. 2,32. Уч.-изд. л. 1,68.

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.  
[www.gostinfo.ru](http://www.gostinfo.ru) [info@gostinfo.ru](mailto:info@gostinfo.ru)