

ГОСТ Р 51197—98  
(ИСО 4133—79)

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

---

# МЯСО И МЯСНЫЕ ПРОДУКТЫ

## Метод определения глюконо- $\delta$ -лактона

Издание официальное



Москва  
Стандартинформ  
2010

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 глокон- $\delta$ -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- $\delta$ -лактона

Meat and meat products.

Method for determination of glucono- $\delta$ -lactone content

Дата введения 2000—01—01

**1 Область применения**

Настоящий стандарт распространяется на мясо и мясные продукты и устанавливает метод определения глюконо- $\delta$ -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

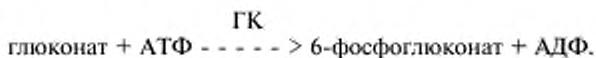
**3 Определение**

**Массовая доля глюконо- $\delta$ -лактона** — массовая доля глюконо- $\delta$ -лактона, определенная в соответствии с настоящим стандартом и выраженная в процентах.

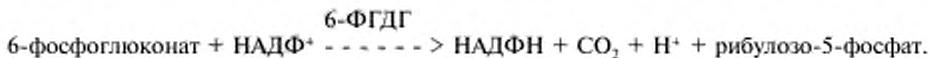
**4 Сущность метода**

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

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



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



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

## 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.

П р и м е ч а н и е — 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 с $(\text{HClO}_4) = 0,4$ моль/дм<sup>3</sup>

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

П р и м е ч а н и е — При использовании хлорной кислоты меньшей массовой доли проводят перерасчет объема кислоты, используемого для осаждения белков.

### 5.2 Раствор гидроксида калия с $(\text{KOH}) = 2$ моль/дм<sup>3</sup>

Растворяют 56,1 г гидроксида калия в воде, доводят объем раствора до 500 см<sup>3</sup>.

### 5.3 Буферный раствор активной кислотности 8,0 pH

Растворяют 2,64 г глицилглицина ( $\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_5$ ) и 0,284 г хлорида магния гексагидрата ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) в 150 см<sup>3</sup> воды. Устанавливают активную кислотность раствора 8,0 pH при 20 °C раствором гидроксида калия (5.2), используя для измерений pH-метр. Доводят объем раствора до 200 см<sup>3</sup>.

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

### 5.4 Раствор НАДФ

Растворяют 50 мг динатриевой соли никотинамидадениндинуклеотидфосфорной кислоты (НАДФ-Н<sub>2</sub>) в 5,0 см<sup>3</sup> воды.

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

### 5.5 Раствор аденоозин-5-трифосфата (АТФ)

Растворяют 250 мг динатриевой соли аденоозин-5-трифосфорной кислоты (АТФ-Н<sub>2</sub>) и 250 мг гидрокарбоната натрия (NaHCO<sub>3</sub>) в 5,0 см<sup>3</sup> воды.

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

### 5.6 Суспензия 6-ФГДГ

Используют поставляемую в готовом виде суспензию 6-фосфоглюконатдегидрогеназы из дрожжей, содержащую 6-ФГДГ концентрации 2,0 мг/см<sup>3</sup> и удельной активности не менее 220 Е/см<sup>3</sup>, а также глюконаткиназу и НАДФН-оксидазу массовых долей не более 0,05 % каждого.

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

### 5.7 Суспензия ГК

Используют поставляемую в готовом виде суспензию глюконаткиназы из *E.coli*, содержащую ГК концентрации 1,0 мг/см<sup>3</sup> и удельной активности не менее 26 Е/см<sup>3</sup> и НАДФН массовой доли не более 0,05 %.

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

## 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 см<sup>3</sup>.

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

6.5 Фильтры бумажные гофрированные диаметром 15 см.

6.6 Колбы мерные вместимостью 100, 200 и 250 см<sup>3</sup> и допускаемой относительной погрешностью  $\pm 0,2\%$ .

6.7 Дозаторы пипеточные объемами доз 25 и 100 см<sup>3</sup> и относительной погрешностью дозирования  $\pm 1\%$ .

6.8 Пипетки градуированные вместимостью 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 и 2,5 см<sup>3</sup> и допускаемой относительной погрешностью  $\pm 1\%$ .

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 —  $\pm 3$  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  $\pm 0,001$  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<sup>3</sup> 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<sup>-1</sup>, затем, осторожно отодвинув слой жира, отфильтровывают супернатант через гофрированный бумажный фильтр (6.5) в коническую колбу вместимостью 200 см<sup>3</sup>. Первые 10 см<sup>3</sup> фильтрата выбрасывают.

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

8.3.4 Количество переносят содержимое стаканчика в мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> 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<sup>3</sup> фильтрата.

8.3.6 25 см<sup>3</sup> фильтрата переносят в мерную колбу вместимостью 250 см<sup>3</sup> и доводят объем фильтрата до метки водой.

## ГОСТ Р 51197—98

П р и м е ч а н и е — Объем фильтрата может быть иным. Его выбирают так, чтобы концентрация  $D$ —(+)-глюконата была приблизительно 0,40 г/дм<sup>3</sup>.

### 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<sup>3</sup> буферного раствора (5.3);
- 0,10 см<sup>3</sup> раствора НАДФ (5.4);
- 0,10 см<sup>3</sup> раствора АТФ (5.5).

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

В каждую кювету вносят по 0,05 см<sup>3</sup> 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 волн 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<sup>3</sup> 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- $\beta$ -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<sup>2</sup>/мкмоль при длине волн 365 нм и  $k = 6,23$  см<sup>2</sup>/мкмоль при длине волн 340 нм);

$V$  — объем фильтрата, взятый на определение (8.3.6), см<sup>3</sup>.

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

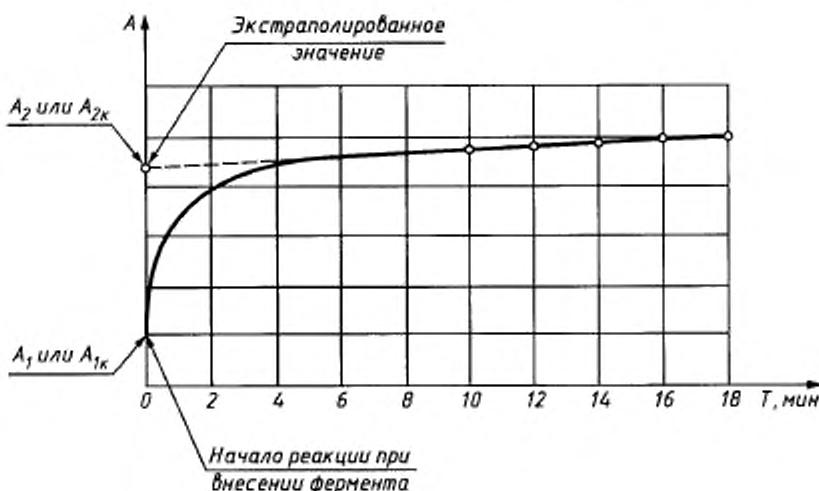
В отчете об испытании должны быть указаны:

- 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- $\delta$ -лактон

---