

СЫР И СЫР ПЛАВЛЕННЫЙ

Метод определения массовой доли лимонной кислоты

Издание официальное



Москва
Стандартинформ
2011

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 ПЛАВЛЕННЫЙ

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 никотинамидаденидинуклеотида (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 сернистый. 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.

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 см³.
- 4.10 Пипетки по ГОСТ 29169 2-го класса точности вместимостью 25, 10, 5, 2, 1, 0,1 и 0,02 см³.
- 4.11 Колбы конические по ГОСТ 25336 вместимостью 100 см³ с притертыми стеклянными пробками.
- 4.12 Колбы мерные по ГОСТ 1770 2-го класса точности вместимостью 100 и 1000 см³.
- 4.13 Стаканы химические стеклянные по ГОСТ 25336 вместимостью 50 см³.
- 4.14 Цилиндр мерный по ГОСТ 1770 вместимостью 50 см³.
- 4.15 Кислота трихлоруксусная (CCl₃COOH) по [1].
- 4.16 Натрия гидроксид (NaOH) по ГОСТ 4328, ч.д.а.
- 4.17 Цинк хлористый (ZnCl₂) по ГОСТ 4529, ч.д.а.
- 4.18 Диглицин (H₂NCH₂CONHCH₂CO₂H) по [2].
- 4.19 Натрий углекислый кислый (NaHCO₃) по ГОСТ 4201, х.ч.
- 4.20 Соль динатриевая никотинамидадениндинуклеотида (C₂₁H₂₇N₇O₁₄P₂Na₂) по [3], х.ч.
- 4.21 Аммоний сернокислый (NH₄)₂SO₄ 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 (C₆H₈O₇ · H₂O) 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 см³ вносят 200,0 г трихлоруксусной кислоты (CCl₃COOH) по 4.15, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

6.1.2 Раствор А гидроксида натрия концентрации 5,0 моль/дм³
В мерную колбу вместимостью 1000 см³ вносят 200,0 г гидроксида 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/дм³

В мерную колбу вместимостью 1000 см³ 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/дм³

В мерную колбу вместимостью 1000 см³ 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 см³ вносят 0,80 г хлористого цинка (ZnCl₂) 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 см³ вносят 71,3 г диглицина (H₂NCH₂CONHCH₂CO₂H) по 4.18, растворяют в 700 см³ воды, доводят pH до 7,8 раствором А гидроокиси натрия (6.1.2). Приливают 100 см³ 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 см³ 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 см³ вносят 50 мг восстановленной динатриевой соли никотинамидадениндинуклеотида (C₂₁H₂₇N₇O₁₄P₂Na₂), 100 мг натрия углекислого кислого (6.1.7) и растворяют в 10 см³ 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/дм³

В мерную колбу вместимостью 1000 см³ вносят 422,4 г сернокислого аммония по 4.21, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

6.1.10 Суспензия малакдегидрогеназа/лактатдегидрогеназа

В колбу вместимостью 100 см³ вносят малакдегидрогеназу 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 см³ 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 см³. 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 см³ вносят 1,600 г моногидрата лимонной кислоты (C₆H₈O₇ · H₂O) 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 настроек 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 см³ соответственно 5,0 и 10,0 см³ стандартного раствора лимонной кислоты (6.1.12), добавляют по 10 см³ 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, X₁ %, вычисляют по формуле (3), используя следующие величины:

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

V₃ = 1000 см³ (6.1.12);

V₆ = 5 см³ и 10 см³ по 6.1.13;

V₇ = 100 см³ по 6.1.13.

Значение X₁ для обоих растворов должно быть (100±5) %.

Если результат измерения не находится в данных пределах, следует проверить реактивы, пипетку, 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 Плавленный 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 см³ воды при температуре (45±5) °C и измельчают до получения однородной суспензии. Суспензию из стакана переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³, ополаскивая стакан водой несколько раз до полного ее удаления.

8.1.2 К полученной суспензии приливают 10 см³ 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 см³ фильтрата.

8.1.4 Пипеткой отбирают 25 см³ фильтрата в химический стакан вместимостью 50 см³, 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 см³, 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 см³ 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 °C 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 фильтрами приливают по 0,02 см³ 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 °C 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_r по формулам:

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

$$A_r = A_{0r} - A_{10r}, \quad (2)$$

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 °C в течение 10 мин;

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

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

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

9 Обработка результатов

Массовую долю лимонной кислоты X , %, вычисляют по формуле

$$X = \frac{(A_s - A_r) M}{k l m} \cdot \frac{V_1 V_2 V_3}{V_2 V_4} \cdot \frac{V_7}{V_6} \cdot 100 = \frac{1915 (A_s - A_r)}{m} \cdot \frac{V_7}{V_6}, \quad (3)$$

где A_s — оптическая плотность фильтрата;

A_r — оптическая плотность растворов нулевого определения;

M — молекулярная масса безводной лимонной кислоты, $M = 192,1 \text{ г/моль}$;

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

l — длина оптического пути кюветы, $l = 1 \text{ см}$;

m — масса навески продукта, г;

V_1 — объем жидкости в кювете спектрофотометра, $V_1 = 3,14 \text{ см}^3$;

V_2 — объем фильтрата в кювете спектрофотометра, $V_2 = 2,00 \text{ см}^3$;

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

V_4 — объем фильтрата (8.1.3), отобранный для установления активной кислотности, $V_4 = 25 \text{ см}^3$;

V_5 — объем суспензии (8.1.1), $V_5 = 100 \text{ см}^3$;

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