
МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)
INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ
СТАНДАРТ

ГОСТ
33808—
2016

МЯСО И МЯСНЫЕ ПРОДУКТЫ

Определение лимонной кислоты методом
высокоэффективной жидкостной хроматографии

Издание официальное



Москва
Стандартинформ
2016

Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены в ГОСТ 1.0—2015 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2015 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным научным учреждением «Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности имени В.М. Горбатова» (ФГБНУ «ВНИИМП им. В.М. Горбатова»)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 27 июля 2016 г. № 89-П)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 3 октября 2016 г. № 1300-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 33808—2016 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 2018 г.

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячном информационном указателе «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)

© Стандартиформ, 2016

В Российской Федерации 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

МЯСО И МЯСНЫЕ ПРОДУКТЫ**Определение лимонной кислоты методом высокоэффективной жидкостной хроматографии**

Meat and meat products. Determination of citric acid using high performance liquid chromatography

Дата введения — 2018—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на мясо, включая мясо птицы, субпродукты, мясные и мясосодержащие продукты, и устанавливает метод определения массовой доли лимонной кислоты и цитратов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в ультрафиолетовой (УФ) области спектра.

Диапазон измерений массовой доли лимонной кислоты и ее солей составляет от 0,1 г/100 см³ до 3,0 г/100 см³.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

ГОСТ 12.1.004—91 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.007—76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.019—79* Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ 12.4.009—83 Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание

ГОСТ OIML R 76-1—2011 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

ГОСТ 1770—74 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ ISO 3696—2013** Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы контроля

ГОСТ 4025—95 Мясорубки бытовые. Технические условия

ГОСТ 4198—75 Реактивы. Калий фосфорнокислый однозамещенный. Технические условия

* В Российской Федерации действует ГОСТ Р 12.1.019—2009 «Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты».

** В Российской Федерации действует ГОСТ Р 52501—2005 (ИСО 3696:1987) «Вода для лабораторного анализа. Технические условия».

ГОСТ ИСО 5725-2—2003* Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений

ГОСТ ИСО 5725-6—2003** Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике

ГОСТ 6552—80 Реактивы. Кислота ортофосфорная. Технические условия

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 7269—79 Мясо. Методы отбора образцов и органолептические методы определения свежести

ГОСТ 7702.2.0—95 Мясо птицы, субпродукты и полуфабрикаты птицы. Методы отбора проб и подготовка к микробиологическим исследованиям

ГОСТ 9792—73 Колбасные изделия и продукты из свинины, баранины, говядины и мяса других видов убойных животных и птиц. Правила приемки и методы отбора проб

ГОСТ 20469—95 Электромясорубки бытовые. Технические условия

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

ГОСТ 26272—98 Часы электронно-механические кварцевые наручные и карманные. Общие технические условия

ГОСТ 26678—85 Холодильники и морозильники бытовые электрические компрессионные параметрического ряда. Общие технические условия

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

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 ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **супернатант**: Жидкость, располагающаяся над твердым слоем (осадком, седиментом) после центрифугирования пробы.

3.2 **гомогенат**: Однородная (гомогенная) смесь пробы с экстрагирующим раствором, полученная после механического измельчения пробы на гомогенизаторе.

4 Сущность метода

Метод основан на экстракции лимонной кислоты и ее солей из гомогенизированной пробы раствором трихлоруксусной кислоты, центрифугировании с осаждением белков и последующем ВЭЖХ анализе в ультрафиолетовой (УФ) области спектра. Идентификацию лимонной кислоты и ее солей осуществляют по абсолютному времени удерживания, а массовую долю определяют по площади хроматографического пика анализируемого образца, сопоставляя с пиком образца сравнения заведомо известной концентрации.

5 Требования безопасности

5.1 При подготовке и проведении испытаний необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007.

* В Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 5725-2—2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений».

** В Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике».

5.2 Помещение, в котором проводятся испытания, должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией. Работу необходимо проводить, соблюдая правила личной гигиены и противопожарной безопасности в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.004, и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

5.3 При работе с электроприборами необходимо соблюдать требования безопасности по ГОСТ 12.1.019.

6 Средства измерений, вспомогательное оборудование, материалы и реактивы

Хроматограф высокоэффективный жидкостный, укомплектованный:

- детектором УФ, обеспечивающим измерения при длине волны 365 нм, с относительной погрешностью спектрофотометрического определения не более ± 2 % с пределом определения не менее $0,1 \text{ г}/100 \text{ см}^3$ по пику лимонной кислоты;
- изократическим насосом;
- хроматографической колонкой для ВЭЖХ длиной 50—150 мм и диаметром 2,1—4,6 мм с обращенной фазой С18 размером частиц 1,8—5,0 мкм, имеющей эффективность не менее 5000 теоретических тарелок по пику лимонной кислоты;
- блоком термостатирования колонок с поддержанием температуры $30 \text{ }^\circ\text{C}$ с точностью $\pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$;
- записывающим устройством с компьютерным управлением и автоматической программой обработки хроматографических данных.

Весы неавтоматического действия по ГОСТ OIML R 76-1 специального или высокого класса точности с пределом допускаемой абсолютной погрешности не более $\pm 0,001 \text{ г}$.

Мясорубка бытовая по ГОСТ 4025 или электромясорубка бытовая по ГОСТ 20469.

pH-метр со стеклянным и хлорсеребряным электродами (или комбинированным стеклянным электродом) с диапазоном измерений от 0 до 14 ед. pH с пределом допускаемой абсолютной погрешности не более $\pm 0,01$ ед. pH.

Гомогенизатор лабораторный с частотой вращения ротора не менее 10000 об/мин.

Холодильник бытовой электрический по ГОСТ 26678.

Баня ультразвуковая лабораторная с регулятором времени.

Часы электронно-механические по ГОСТ 26272.

Центрифуга лабораторная с центробежным ускорением 4000 g.

Банки стеклянные вместимостью 250—500 см³ с крышкой.

Пипетки градуированные 1-2-1-5, 1-2-1-10 по ГОСТ 29227 или дозаторы автоматические с переменным объемом дозирования 5 см³ и 10 см³ и относительной погрешностью дозирования не более ± 1 %.

Пробирки центрифужные из полипропилена вместимостью 50 см³.

Фильтр мембранный из политетрафторэтилена с диаметром пор 0,45 мкм.

Колбы мерные 2-50-2, 2-100-2, 2-1000-2 по ГОСТ 1770.

Флаконы — вials хроматографические из темного стекла вместимостью 2,0 см³.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709 или вода для лабораторного анализа по ГОСТ ISO 3696.

Калий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 4198, х. ч.

Кислота ортофосфорная по ГОСТ 6552, х. ч.

Кислота трихлоруксусная с содержанием основного вещества не менее 99,0 %.

Кислота лимонная с содержанием основного вещества не менее 99,5 %.

Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками и вспомогательного оборудования с техническими характеристиками, а также материалов и реактивов по качеству не ниже указанных в настоящем стандарте.

7 Отбор и подготовка проб

7.1 Отбор проб проводят по ГОСТ 7269, ГОСТ 7702.2.0, ГОСТ 9792.

7.2 Пробу измельчают, дважды пропуская через мясорубку с диаметром отверстий решетки 2—4 мм, и тщательно перемешивают.

7.3 Подготовленную пробу помещают в стеклянную банку вместимостью 250—500 см³, закрывают крышкой и хранят при температуре (4 ± 2) °С до окончания анализа.

Допускается хранить подготовленную пробу в замороженном состоянии при температуре не выше минус 18 °С не более 7 сут.

8 Подготовка к анализу

8.1 Приготовление растворов

8.1.1 Приготовление градуировочных растворов

Для определения лимонной кислоты и ее солей готовят градуировочные растворы лимонной кислоты массовой долей: 1,0 г/100 см³ (раствор 1); 0,5 г/100 см³ (раствор 2); 0,2 г/100 см³ (раствор 3); 0,1 г/100 см³ (раствор 4); 0,05 г/100 см³ (раствор 5).

Для приготовления раствора 1 взвешивают 1,00 г лимонной кислоты, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³, добавляют 99 см³ дистиллированной воды, тщательно перемешивают до полного растворения.

Для приготовления раствора 2 градуированной пипеткой отбирают 10 см³ раствора 1, переносят в мерную колбу вместимостью 50 см³ и разбавляют 10 см³ дистиллированной воды.

Для приготовления раствора 3 градуированной пипеткой отбирают 10 см³ раствора 1, переносят в мерную колбу вместимостью 50 см³ и доводят объем до метки дистиллированной водой.

Для приготовления раствора 4 градуированной пипеткой отбирают 5 см³ раствора 1, переносят в мерную колбу вместимостью 50 см³ и доводят объем до метки дистиллированной водой.

Для приготовления раствора 5 градуированной пипеткой отбирают 10 см³ раствора 4, переносят в мерную колбу вместимостью 50 см³ и разбавляют 10 см³ дистиллированной воды.

Растворы готовят перед использованием.

8.1.2 Приготовление 2 %-ного раствора трихлоруксусной кислоты

Взвешивают 2,0 г трихлоруксусной кислоты, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³, растворяют в дистиллированной воде, доводят объем водой до метки и перемешивают.

Раствор хранят в колбе с притертой пробкой при комнатной температуре не более 1 мес.

8.1.3 Приготовление подвижной фазы хроматографической системы

В качестве подвижной фазы используют фосфатный буферный раствор с рН = 6,0 ед. рН (фосфатный буфер).

Для приготовления фосфатного буфера взвешивают 13,6 г фосфорнокислого калия однозамещенного, растворяют в дистиллированной воде, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 1000 см³, доводят объем до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают. С помощью градуированной пипетки добавляют по каплям ортофосфорную кислоту, доводя рН до 6,0 ед. рН.

Перед использованием раствор дегазируют на ультразвуковой бане в течение 10—15 мин.

Готовый раствор хранят в колбах с притертыми пробками при комнатной температуре не более 7 сут.

8.2 Приготовление экстракта пробы

Пробу массой 10 г взвешивают с записью результата до второго десятичного знака, помещают в центрифужную пробирку вместимостью 50 см³, добавляют 30 см³ 2 %-ного раствора трихлоруксусной кислоты и гомогенизируют. Гомогенат выдерживают на ультразвуковой бане при температуре 20 °С в течение 15 мин, а затем центрифугируют 5 мин с центробежным ускорением 4000 g. Полученный супернатант пропускают через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм в хроматографическую вилу вместимостью 2 см³.

9 Проведение анализа

9.1 Условия проведения и выполнение анализа

9.1.1 Условия проведения анализа

Условия проведения анализа подбирают в зависимости от вида применяемого жидкостного хроматографа и хроматографической колонки.

Например, для жидкостного хроматографа с обращенно-фазной хроматографической колонкой С18 4,6 × 150 мм, 5 мкм применяют следующие хроматографические условия:

- элюирование проводят в изократических условиях в течение 15 мин;
- состав элюента: фосфатный буфер (pH = 6,0 ед. pH);
- скорость подачи элюента — 0,8 см³/мин;
- температура колонки — 30 °С;
- длина волны детектирования — 365 нм.

9.1.2 Выполнение анализа

0,02 см³ экстракта анализируемой пробы вводят в подготовленный к работе жидкостный хроматограф.

9.2 Идентификацию пиков хроматограммы анализируемой пробы проводят сравнением с хроматограммой градуировочного раствора по двум параметрам: времени удерживания и спектральному отношению R (отношение высот хроматографического пика на разных длинах волн — 210, 254, 280, 320, 365 нм).

9.3 Если время удерживания и спектральные отношения пиков хроматограммы анализируемой пробы совпадают в пределах допустимых отклонений ($\Delta R \leq 0,05$, $\Delta tR \leq 3\%$) с временем удерживания и спектральными отношениями соответствующих им пиков хроматограммы градуировочного раствора, результат идентификации считают положительным.

9.4 Если спектральные отношения совпадают в пределах допустимого отклонения, а разница времени удерживания пиков хроматограммы анализируемой пробы и хроматограммы градуировочного раствора больше допустимого отклонения, проводят хроматографический анализ соответствующего градуировочного раствора по 9.1 и сравнивают время удерживания. В случае совпадения в качестве образца используют новую хроматограмму.

В случае повторного несовпадения времени удерживания используют метод добавок, для чего к анализируемой пробе добавляют лимонную кислоту с массовой долей, сравнимой с массовой долей «сомнительных» пиков, и анализируют по 9.1.

Если на хроматограмме пробы с добавкой площади «сомнительных» пиков увеличились на величину, соответствующую величине добавки, то эти пики относятся к определяемым компонентам.

Если на хроматограмме пробы с добавкой наряду с «сомнительными» пиками присутствуют пики, время удерживания и спектральные отношения которых совпадают с соответствующими параметрами добавленных веществ, то сомнительные пики не относятся к определяемым компонентам.

9.5 Если время удерживания соответствующих пиков хроматограммы анализируемого раствора и хроматограммы градуировочного раствора совпадают в пределах допустимого отклонения, а разница спектральных отношений больше допустимого отклонения, настоящий метод не применим к данной пробе.

9.6 Массовая доля лимонной кислоты и ее солей в анализируемой пробе не должна превышать предельных значений массовой доли градуировочных растворов.

В случае превышения анализируемую пробу, содержащую лимонную кислоту и ее соли, с помощью автоматического дозатора разбавляют дистиллированной водой и проводят хроматографический анализ разбавленных растворов.

Если массовая концентрация лимонной кислоты и ее солей в анализируемой пробе ниже предельного значения градуировочного раствора, необходимо увеличить массу пробы, но не более чем в два раза.

10 Обработка результатов

10.1 В соответствии с данными, полученными при анализе градуировочных растворов, создают таблицу пиков с использованием программного обеспечения хроматографа. Расчеты площади пиков и массовой доли лимонной кислоты выполняются системой обработки данных в автоматическом режиме.

10.2 Массовую долю лимонной кислоты X_1 , г/100 см³, вычисляют по формуле

$$X_1 = \frac{C_{ст} \cdot S_x \cdot V_p}{S_{ст} \cdot m}, \quad (1)$$

где $C_{ст}$ — массовая доля лимонной кислоты в градуировочном растворе, г/100 см³;

S_x — площадь пика лимонной кислоты в анализируемой пробе, усл. ед.;
 V_p — объем экстрагирующего раствора, см³;
 $S_{ст}$ — площадь пика лимонной кислоты в градуировочном растворе, усл. ед.;
 m — масса анализируемой пробы, г.

10.3 Массовую долю цитратов X_2 , г/100 см³, вычисляют по формуле

$$X_2 = X_1 \cdot K, \quad (2)$$

где X_1 — массовая доля лимонной кислоты, г/100 см³;

K — коэффициент пересчета содержания лимонной кислоты на цитраты (для цитрата натрия $K = 1,343$; для цитрата калия $K = 1,594$; для цитрата кальция $K = 1,239$).

10.4 За окончательный результат принимают среднееарифметическое значение результатов двух параллельных измерений, если удовлетворяются условия повторяемости (сходимости). Числовое значение результата измерений должно оканчиваться цифрой того же разряда, что и значение абсолютной погрешности, содержащее не более двух значащих цифр.

11 Метрологические характеристики

11.1 Метрологические характеристики метода при доверительной вероятности $P = 0,95$ приведены в таблице 1.

Т а б л и ц а 1

Наименование определяемого показателя	Диапазон измерений массовой доли лимонной кислоты, %	Показатели точности		
		Границы относительной погрешности $\pm \delta$, %	Предел повторяемости (сходимости) $r_{отн}$, %	Предел воспроизводимости $R_{отн}$, %
Массовая доля лимонной кислоты и цитратов	От 0,1 до 3,0 включ.	15	12	20

11.2 Расхождение между результатами двух параллельных измерений, выполненных одним оператором при испытании одной и той же пробы с использованием одних и тех же средств измерений и реактивов, не должно превышать предела повторяемости (сходимости) $r_{отн}$, значения которого приведены в таблице 1.

$$|x_1 - x_2| \leq r_{отн}, \quad (3)$$

где x_1 и x_2 — результаты двух параллельных измерений, %;

$r_{отн}$ — предел повторяемости, %.

11.3 Расхождение между результатами двух измерений, выполненных в двух разных лабораториях, не должно превышать предела воспроизводимости $R_{отн}$, значения которого приведены в таблице 1.

$$|X_1 - X_2| \leq R_{отн}, \quad (4)$$

где X_1 и X_2 — результаты двух измерений, выполненных в разных лабораториях, %;

$R_{отн}$ — предел воспроизводимости, %.

11.4 Границы относительной погрешности результатов измерений ($\pm \delta$), находящиеся с доверительной вероятностью $P = 0,95$, при соблюдении условий настоящего стандарта, не должны превышать значений, приведенных в таблице 1.

12 Контроль точности результатов измерений

12.1 Контроль стабильности результатов измерений (повторяемости, промежуточной прецизионности и погрешности) проводят в соответствии с порядком, установленным в лаборатории, по ГОСТ ИСО 5725-6 (подраздел 6.2) с периодичностью 1 мес.

12.2 Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости (сходимости), осуществляют в соответствии с требованиями ГОСТ ИСО 5725-2. Расхождение между результатами измерений не должно превышать предела повторяемости ($r_{отн}$). Значения $r_{отн}$ приведены в таблице 1.

12.3 Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости, проводят с учетом требований ГОСТ ИСО 5725-2. Расхождение между результатами измерений, полученными двумя лабораториями, не должно превышать предела воспроизводимости ($R_{отн}$). Значения $R_{отн}$ приведены в таблице 1.

Ключевые слова: мясо, мясо птицы, субпродукты, мясные продукты, мясосодержащие продукты, лимонная кислота, высокоэффективная жидкостная хроматография, метод, определение, массовая доля

Редактор *Д.А. Мезина*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *И.А. Королева*
Компьютерная верстка *А.Н. Золотаревой*

Сдано в набор 05.10.2016. Подписано в печать 11.10.2016. Формат 80×84 $\frac{1}{8}$. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,40. Уч.-изд. л. 1,30. Тираж 36 экз. Зак. 2497.
Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Издано и отпечатано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
www.gostinfo.ru info@gostinfo.ru