ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СОКИ ФРУКТОВЫЕ И ОВОЩНЫЕ

Метод определения D-изолимонной кислоты

Издание официальное

ГОССТАНДАРТ РОССИИ
Москва

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Московской государственной академией пищевых производств, Всероссийским научно-исследовательским институтом консервной и овощесушильной промышленности

ВНЕСЕН Техническим комитетом ТК 335 «Методы испытаний агропромышленной продукции на безопасность»

2 ПРИНЯТ И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Госстандарта России от 19 января 1998 г. № 6

3 Разделы настоящего стандарта за исключением 2; 5; 6; 8,2; 9 представляют собой аутентичный текст европейского стандарта ЕН 1139—94. «Фруктовые и овощные соки. Ферментативное определение содержания D-изолимонной кислоты. Спектрофотометрическое определение никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФН)»

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

5 ПЕРЕИЗДАНИЕ

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания на территории Российской Федерации без разрешения Госстандарта России

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СОКИ ФРУКТОВЫЕ И ОВОЩНЫЕ

Метод определения D-изолимонной кислоты

Fruit and vegetable juices.
Method for determination of D-isocitric acid

Дата введения 1998—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на фруктовые и овощные соки, нектары и сокосодержащие напитки и устанавливает метод определения D-изолимонной кислоты в виде свободной кислоты или ее соли, включая эфиры и лактоны.

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 2603—79 Ацетон. Технические условия

ГОСТ 3118—77 Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 3760—79 Аммиак водный. Технические условия

ГОСТ 4108—72 Барий хлорид 2-водный. Технические условия

ГОСТ 4166—76 Натрий сернокислый. Технические условия

ГОСТ 4328—77 Натрий гидроокись. Технические условия

ГОСТ 6259—75 Глицерин. Технические условия

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 10652—73 Этилендиаминтетрауксусной кислоты динатриевая соль. Технические условия

ГОСТ 12026—76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 26313—84 Продукты переработки плодов и овощей. Правила приемки, методы отбора проб

ГОСТ 26671—85 Продукты переработки плодов и овощей, консервы мясные и мясорастительные. Подготовка проб для лабораторных анализов

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

3 Определения и сокращения

3.1 В настоящем стандарте применяют следующие термины с соответствующими определениями:

массовая концентрация D-изолимонной кислоты во фруктовых и овощных соках, нектарах и сокосодержащих напитках: Массовая концентрация D-изолимонной кислоты, определенная в соответствии с методикой, установленной настоящим стандартом, выраженная в мг/дм^3.

3.2 В настоящем стандарте применяют следующие сокращения:

ИЦДГ — изоцитратдегидрогеназа ЕС 1.1.1.42 [1];

НАДФ — никотинамидадениндинуклеотидфосфат, окисленная форма;

НАДФН — никотинамидадениндинуклеотидфосфат, восстановленная форма;

Е — стандартная единица, определяет количество (активность) фермента, которое служит катализатором при 25 °С для превращения 1 мкмоля вещества в минуту.

Издание официальное

4 Сущность метода

Метод основан на осаждении D-изолимонной кислоты в виде соли бария, перерастворении соли, ферментативном декарбоксилировании иона цитрата под действием НАДФ в присутствии ИЦДГ, фотометрическом измерении количества образовавшегося НАДФН, эквивалентного количеству D-изолимонной кислоты.

В ходе анализа протекают следующие ферментативные реакции:

$$\text{D-изоцитрат-ион}+\text{НАДФ}+\xrightarrow{\text{ИЦДГ}}\alpha\text{-кетоглутарат}+\text{НАДФН}+CO_2+H^+. \qquad (1)$$

5 Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

Спектрофотометр, позволяющий проводить исследования при длине волны 340 нм, или фотометр фотоэлектрический шириной спектральной полосы не более 10 нм и допустимой абсолютной погрешностью измерений коэффициента пропускания не более 1 %, или спектрофотометр на ртутной лампе, позволяющий проводить измерения при длинах волн 365 или 334 нм.

Кюветы из оптического стекла или полистироловые рабочей длиной 10 мм.

Иономер или pH-метр с погрешностью измерения не более 0,05 pH.

Электрод для измерения pH стеклянный.

Электрод сравнения (каломельный).

Пипетки по ГОСТ 29227 типа 3, исполнения 1, 1-го класса точности, вместимостью 1 и 10 $см^3$.

Дозаторы пипеточные объемами 1, 0,2 и 0,02 $см^3$ относительной погрешностью дозирования ±1 % [2].

Колба мерная по ГОСТ 1770, исполнения 2, вместимостью 50 $см^3$.

Центрифуга лабораторная, обеспечивающая увеличение ускорения свободного падения при центрифугировании в 3000 раз.

Стаканы для центрифугирования вместимостью 100 $см^3$.

Фильтры бумажные обеззоленные марки ФОМ по ГОСТ 12026.

Баня водяная [3].

Кислота D-изолимонная по НД [4] раствор массовой концентрации $m(C_6H_8O_7)$=500 $мг/дм^3$.

Кислота соляная по ГОСТ 3118, х. ч., раствор молярной концентрации c (HCl)=4 $моль/дм^3$.

Аммиак водный по ГОСТ 3760, ч. д. а.

Ацетон по ГОСТ 2603, ч. д. а.

Барий хлористый 2-водный по ГОСТ 4108, х. ч., раствор массовой концентрации $m(BaCl_2)=300\cdot10^3$ $мг/дм^3$.

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328, ч. д. а., раствор молярной концентрации $c(NaOH)$=4 $моль/дм^3$.

Натрий сернокислый по ГОСТ 4166, ч. д. а., раствор массовой концентрации $m(Na_2SO_4)=71\cdot10^3$ $мг/дм^3$.

Марганец (II) сернокислый [5], раствор массовой концентрации $m(MnSO_4)=12{,}5\cdot10^3$ $мг/дм^3$.

Этилендиаминтетрауксусной кислоты динатриевая соль 2-водная по ГОСТ 10652, ч. д. а.

Трис(гидроксиметил)аминометан [6], х. ч.

Глицерин по ГОСТ 6259.

НАДФ (динатриевая соль) по [4].

ИЦДГ [4].

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Допускается применять другие средства измерений с метрологическими характеристиками, вспомогательные устройства с техническими характеристиками, а также реактивы по качеству не ниже перечисленных.

6 Отбор и подготовка проб

Отбор проб — по ГОСТ 26313, подготовка их к испытанию — по ГОСТ 26671.

6.1 Выделение D-изолимонной кислоты из фруктового и овощного сока, нектаров и сокосодержащих напитков

В стакане для центрифугирования 10 см^3 исследуемого образца смешивают с 5 см^3 раствора гидроокиси натрия. Раствор выдерживают в течение 10 мин при температуре от 20 до 25 °С. После добавления 5 см^3 соляной кислоты объем раствора доводят водой до 25 см^3. Последовательно приливают 2 см^3 раствора аммиака, 3 см^3 раствора хлористого бария и 20 см^3 ацетона и хорошо перемешивают стеклянной палочкой. Раствор выдерживают в течение 10 мин, затем в течение 5 мин центрифугируют. Надосадочную жидкость осторожно декантируют, осадок в стакане для центрифугирования растворяют в 20 см^3 раствора сернокислого натрия, помешивая стеклянной палочкой. Для ускорения растворения осадка стакан помещают на кипящую водяную баню и выдерживают в течение 10 мин при неоднократном перемешивании. После охлаждения до температуры от 20 до 25 °С раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 см^3 и доводят буферным раствором до метки. Из мерной колбы раствор переносят в колбу Эрленмайера, содержащую 1 г активированного угля, выдерживают в течение 5 мин и фильтруют через складчатый бумажный фильтр. Прозрачный, бесцветный фильтрат используют для ферментативного определения D-изолимонной кислоты.

6.2 Выделение D-изолимонной кислоты из концентратов фруктовых и овощных соков, нектаров и сокосодержащих напитков

Перед выделением D-изолимонной кислоты концентрат разводят водой до содержания сухих веществ по рецептуре натурального сока, нектара или сокосодержащего напитка. Далее выделение D-изолимонной кислоты проводят по 6.1.

7 Подготовка к испытанию

7.1 Приготовление буферного раствора активной кислотностью 7,0 pH

2,42 г трис(гидроксиметил) аминометана и 35 мг динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (дигидрата) растворяют в 80 см^3 воды, значение pH раствора доводят с помощью соляной кислоты до 7,0 и объем доводят до 100 см^3. Буферный раствор устойчив при температуре 4 °С в течение 1 г.

7.2 Приготовление буферного раствора активной кислотностью 7,4 pH

2,42 г трис(гидроксиметил) аминометана и 35 мг динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (дигидрата) растворяют в 80 см^3 воды, значение pH раствора доводят с помощью соляной кислоты до 7,4, затем объем раствора доводят дистиллированной водой до 100 см^3. Буферный раствор устойчив при температуре 4 °С в течение 1 г.

7.3 Приготовление раствора НАДФ

50 мг динатриевой соли НАДФ растворяют в 5 см^3 воды. Раствор устойчив при температуре 4 °С в течение четырех недель.

7.4 Приготовление раствора ИЦДГ

10,0 мг лиофилизата ИЦДГ из свиного сердца растворяют в 1 см^3 (20 Е/см^3) глицерина. Раствор устойчив при температуре 4 °С в течение 6 мес.

8 Проведение испытания

Анализ проводят при температуре от 20 до 25 °С.

При проведении испытания количество реактивов задают в см^3, а результаты пересчитывают на 1 дм^3 пробы.

Для дозирования исследуемой пробы и растворов используют пипетки с делениями или пипеточные дозаторы.

Растворы ферментов, коферментов и буфера вносят соответствующими пипеточными дозаторами.

Ферментативное определение D-изолимонной кислоты может быть проведено также с использованием имеющихся в продаже специальных наборов реактивов.

8.1 Приготовление опытной пробы

В кювету спектрофотометра вносят 2,0 см^3 буферного раствора активной кислотностью 7,4 pH, 0,1 см^3 раствора сульфата марганца, 0,1 см^3 раствора НАДФ и 1,00 см^3 исследуемого раствора пробы, подготовленного по разделу 6. Смесь перемешивают, выдерживают в течение 3 мин и измеряют оптическую плотность раствора — $(A_1)_{\text{проба}}$ относительно воздуха.

8.2 Реакция с ферментом и количественный анализ

К подготовленному в кювете по 8.1 раствору добавляют 0,01 см^3 раствора ИЦДГ. Раствор перемешивают. Через 10 мин (окончание реакции) измеряют оптическую плотность $(A_2)_{\text{проба}}$ раствора относительно воздуха.

Через 5 мин проводят контрольное измерение. Если оптическая плотность меняется, измерения проводят каждые следующие 5 мин до тех пор, пока не будет достигнута постоянная величина ее приращения. В этом случае оптическую плотность раствора $(A_2)_{\text{проба}}$ определяют экстраполяцией на момент внесения раствора ИЦДГ.

8.3 Контрольное испытание

Контрольное испытание проводят параллельно с основным. В кювету спектрофотометра вносят 3,0 см^3 буферного раствора активной кислотностью 7,4 pH и 0,1 см^3 раствора НАДФ. Смесь перемешивают, выдерживают в течение 3 мин и измеряют оптическую плотность $(A_1)_{\text{контроль}}$ относительно воздуха.

К подготовленному в кювете раствору добавляют 0,01 см^3 раствора ИЦДГ, перемешивают и через 10 мин измеряют оптическую плотность раствора $(A_2)_{\text{контроль}}$, как в 8.2.

9 Выражение результатов

Основой данного метода является линейная зависимость между образующимся количеством НАДФН и количеством D-изолимонной кислоты.

Разность измеренных оптических плотностей ΔA вычисляют по формуле

$$\Delta A = (A_2 - A_1)_{\text{проба}} - (A_2 - A_1)_{\text{контроль}}. \qquad (2)$$

Массовую концентрацию *D*-изолимонной кислоты в пробе X, мг/дм^3, вычисляют по формуле

$$X = \frac{M V_1 F 1000}{\varepsilon l V_2 1000} \Delta A, \qquad (3)$$

где M — молярная масса D-изолимонной кислоты, M = 192,1 г/моль;

V_1 — суммарный объем раствора в кювете, см^3;

F — фактор разведения пробы в процессе выделения D-изолимонной кислоты, рассчитываемый как отношение объема разведенной пробы к объему, взятому для разведения;

ε — молярный показатель поглощения НАДФН,

при 340 нм — ε =6,3 дм^3·ммоль$^{-1}$ · см$^{-1}$,

при 365 нм — ε =3,5 дм^3·ммоль$^{-1}$ · см$^{-1}$ (ртутная лампа),

при 334 нм — ε =6,18 дм^3·ммоль$^{-1}$ · см$^{-1}$ (ртутная лампа);

l — рабочая длина кюветы, см;

V_2 — использованный для приготовления измеряемого раствора объем пробы, см^3.

Для указанных в прописи объемов растворов массовую концентрацию D-изолимонной кислоты в пробе X, мг/дм^3, вычисляют по формуле

$$X = 3083 \frac{F \Delta A}{\varepsilon}. \qquad (4)$$

При использовании имеющихся в продаже наборов реактивов численный коэффициент (3083) в формуле (4) может быть иным из-за изменения суммарного объема раствора в кювете (V_1).

При анализе концентратов соков, продуктов с высокой вязкостью и/или очень большим содержанием мякоти результаты испытаний могут быть выражены как массовая доля D-изолимонной кислоты в пробе X_1, млн$^{-1}$, по формуле

$$X_1 = \frac{X\,1000\,V}{m}, \qquad (5)$$

где V — объем разведенного концентрата сока, продукта с высокой вязкостью и/или очень большим содержанием мякоти, см^3;

m — масса концентрата сока, продукта с высокой вязкостью и/или очень большим содержанием мякоти, взятых для разведения, г.

За окончательный результат испытания принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений, округленное до целого значения.

Абсолютное расхождение между результатами двух параллельных определений, выполненных в одной лаборатории, не должно превышать более чем в 5 % случаев значения показателя сходимости d=2,5 мг/дм^3.

Абсолютное расхождение между результатами двух измерений, выполненных в двух лабораториях, не должно превышать более чем в 5 % случаев значение показателя воспроизводимости D=4,4 мг/дм^3.

10 Контроль достоверности полученных результатов

Достоверность получаемых результатов рекомендуется контролировать с помощью стандартного раствора D-изолимонной кислоты массовой концентрации не более 500 мг/дм^3, который испытывают по 8.1—8.2 без предварительного разведения.

Если массовая концентрация D-изолимонной кислоты, определенная в результате испытания составляет менее 95 % концентрации стандартного раствора, то испытание повторяют со свежеприготовленными растворами реактивов.

11 Отчет об испытании

В отчете об испытании должны быть указаны:

- обозначение настоящего стандарта;
- дата и способ отбора проб (если это возможно);
- дата доставки образца;
- дата проведения анализа;
- результаты исследования;
- обнаруженные в ходе исследования особенности;
- все рабочие условия, не установленные данным стандартом или касающиеся как необязательных, так и любых других подробностей, которые могут повлиять на конечный результат.

В отчете должны быть указаны все детали, необходимые для полной идентификации пробы.

ПРИЛОЖЕНИЕ А
(справочное)

Библиография

[1] Номенклатура ферментов. Рекомендации Международного биохимического союза по номенклатуре и классификации ферментов, а также единицам ферментов и символам кинетики ферментативных реакций. М. 1979

[2] ТУ 64-13329—81 Дозаторы пипеточные

[3] ТУ 46-22-603—75 Баня водяная лабораторная с электрическим или с огневым подогревом

[4] Boehringer Mannheim. Methoden der enzimatischen BioAnalytik und Lebensmitteleanalytik mit Test-Combinationen

[5] ТУ 6-09-01-218—84 Марганец (II) сернокислый

[6] ТУ 6-09-4292—76 Трис(гидроксиметил)аминометан

ОКС 67.080 Н59

ОКСТУ 9109

Ключевые слова: продукт питания, напиток, нектар, фруктовые и овощные соки, ферментативный анализ, определение концентрации, D-изолимонная кислота, спектрофотометрия

gost.e-ecolog.ru