ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СОКИ ФРУКТОВЫЕ И ОВОЩНЫЕ

Метод определения лимонной 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. № 7

3 Разделы настоящего стандарта, за исключением 2; 5; 6; 8,2; 9, представляют собой аутентичный текст европейского стандарта ЕН 1137—94. «Фруктовые и овощные соки. Ферментативное определение содержания лимонной кислоты (цитрата). Спектрофотометрическое определение никотинамидадениндинуклеотида (НАД)»

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 лимонной кислоты

Fruit and vegetable juices.
Method for determination of citric acid (citrate)

Дата введения 1998—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на фруктовые и овощные соки, нектары и сокосодержащие напитки и устанавливает метод определения лимонной кислоты в виде свободной кислоты или соли.

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 сернокислый. Технические условия

ГОСТ 4201—79 Натрий двууглекислый. Технические условия

ГОСТ 4328—77 Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 4529—78 Цинк хлористый. Технические условия

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. 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 лимонной кислоты во фруктовых и овощных соках, нектарах и сокосодержащих напитках: Массовая концентрация лимонной кислоты, определенная в соответствии с методикой, установленной настоящим стандартом, выраженная в мг/дм^3.

3.2. В настоящем стандарте применяют следующие сокращения:

ЦЛ — цитратлиаза ЕС 4.1.3.6 [1];

МДГ — малатдегидрогеназа ЕС 1.1.1.37 [1];

ЛДГ — лактатдегидрогеназа ЕС 1.1.1.27 [1];

НАД — никотинамидадениндинуклеотид, окисленная форма;

НАДН — никотинамидадениндинуклеодид, 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 ферментативном преобразовании иона цитрата в оксалоацетат с помощью ЦЛ, затем в пируват, восстановлении их с помощью НАДН в присутствии МДГ и ЛДГ, спектрофотометрическом измерении израсходованного НАДН, эквивалентного количеству лимонной кислоты.

В ходе анализа при активной кислотности 7,8 pH протекают следующие ферментативные реакции:

$$\text{Цитрат-ион} \xrightarrow{\text{ЦЛ}} \text{оксалоацетат} + \text{ацетат} \quad (1)$$

$$\text{Оксалоацетат} + \text{НАДН} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{МДГ}} \text{L-малат} + \text{НАД}^+ \quad (2)$$

$$\text{Пируват} + \text{НАДН} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{ЛДГ}} \text{L-лактат} - \text{НАД}^+ \quad (3)$$

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 погрешностью измерения не более 0,05 pH.

Электрод для измерения pH стеклянный.

Электрод сравнения (каломельный).

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

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

Цилиндр по ГОСТ 1770 вместимостью 100 см^3.

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328, ч. д. а., раствор концентрации c (NaOH) = 5 моль/дм^3.

Цинк хлористый по ГОСТ 4529, ч. д. а., раствор массовой концентрации m ($ZnCl_2$) = =800 мг/дм^3.

Натрий двууглекислый по ГОСТ 4201, ч. д. а.

Аммоний сернокислый по ГОСТ 3769, ч. д. а., раствор концентрации c ($(NH_3)_2SO_4$) = =3,2 моль/дм^3.

Кислота лимонная по ГОСТ 3652, раствор массовой концентрации m ($C_6H_8O_7$) = 400 мг/дм^3.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Глицилглицин по НД [3].

НАДН (динатриевая соль) по НД [3].

Суспензия МДГ/ЛДГ по НД [3].

ЦЛ по НД [3].

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

6 Отбор и подготовка проб

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

6.1 Подготовка к анализу фруктовых и овощных соков, нектаров и сокосодержащих напитков

При высоком содержании лимонной кислоты в пробе продукта ее разводят водой до массовой концентрации лимонной кислоты от 20 до 40 мг/дм^3. Полученный раствор используют при проведении анализа. Сильно окрашенные соки подвергают большему разбавлению. Мутные соки перед разведением тщательно перемешивают.

6.2 Подготовка к испытанию концентратов фруктовых и овощных соков, нектаров и сокосодержащих напитков

Концентрат разводят водой до содержания сухих веществ по рецептуре натурального сока, нектара или сокосодержащего напитка. При необходимости пробу разводят повторно в соответствии с 6.1.

7 Подготовка к испытанию

7.1 Приготовление буферного раствора активной кислотностью 7,8 pH

7,13 г глицилглицина растворяют в 70 см³ воды и доводят pH раствора до 7,8 с помощью приблизительно 13 см³ раствора гидроокиси натрия, затем приливают 10 см³ раствора хлористого цинка и объем доводят водой до 100 см³. Буферный раствор устойчив при температуре 4 °С в течение четырех недель.

7.2 Приготовление раствора НАДН

30 мг динатриевой соли НАДН и 60 мг двууглекислого натрия растворяют в 6 см³ воды. Раствор устойчив при температуре 4 °С в течение четырех недель.

7.3 Приготовление суспензии МДГ/ЛДГ

0,1 см³ суспензии МДГ, содержащей 5 мг лиофилизата МДГ в 1 см³ (6000 Е/см³), 0,5 см³ суспензии ЛДГ, содержащей 5 мг лиофилизата ЛДГ в 1 см³ (2750 Е/см³) смешивают с 0,4 см³ раствора сульфата аммония. Суспензия МДГ/ЛДГ в растворе сульфата аммония устойчива при 4 °С в течение 1 г.

7.4 Приготовление раствора ЦЛ

168 мг лиофилизата цитратлиазы растворяют в 1 см³ ледяной воды (1,25 Е/см³). Раствор устойчив при 4 °С в течение одной недели, в замороженном состоянии — четырех недель.

8 Проведение испытания

8.1 Проведение ферментативного определения лимонной кислоты

Испытание проводят при температуре от 20 до 25 °С. Допускается проведение анализа при постоянной выбранной температуре в интервале от 25 до 37 °С.

Для дозирования исследуемой пробы и растворов используют пипетки с делениями или пипеточные дозаторы. Растворы ферментов, коферментов и буфера вносят соответствующими пипеточными дозаторами.

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

8.1.1 *Приготовление пробы*

В кювету спектрофотометра (фотометра) вносят 1,00 см³ буферного раствора, pH 7,8, 0,1 см³ раствора НАДН, 0,20 см³ раствора исследуемой пробы, 1,80 см³ воды и 0,02 см³ суспензии МДГ/ЛДГ. Смесь перемешивают, выдерживают в течение 5 мин и измеряют в спектрофотометре или фотометре оптическую плотность раствора — $(A_1)_{\text{проба}}$ относительно воздуха.

При высоких значениях начальной оптической плотности (более 1,000) готовят новую пробу, используя менее концентрированный раствор НАДН. Рекомендуется также уменьшить объем раствора исследуемой пробы в кювете, компенсируя снижение общего объема в кювете увеличением объема воды.

Если массовая концентрация лимонной кислоты в растворе исследуемой пробы менее 20 мг/дм³, то вносимый пипеткой объем может быть увеличен до 2,00 см³. В этом случае следует снизить объем воды, добавляемой в кювету, для поддержания на постоянном уровне общего объема в кювете. При расчете результатов необходимо учесть измененный объем раствора исследуемой пробы в формуле (5).

8.1.2 *Реакция с ферментом и количественный анализ*

К подготовленному в кювете по 8.1.1 раствору добавляют 0,02 см³ раствора ЦЛ. Содержимое кюветы перемешивают. Через 10 мин измеряют оптическую плотность $(A_2)_{\text{проба}}$ раствора относительно воздуха. Окончание реакции проверяют путем повторного считывания показаний через 2 мин.

8.2 Контрольное испытание

В кювету вносят 1,00 см³ буферного раствора и 0,1 см³ раствора НАДН, 2,00 см³ воды и 0,02 см³ суспензии ферментов МДГ/ЛДГ, содержимое перемешивают. Через 5 мин измеряют оптическую плотность раствора $(A_1)_{\text{контроль}}$ относительно воздуха.

К подготовленному в кювете раствору добавляют 0,02 см³ раствора ЦЛ, перемешивают, выдерживают в течение 10 мин и измеряют оптическую плотность $(A_2)_{\text{контроль}}$ относительно воздуха.

9 Выражение результатов

Основой данного метода является линейная зависимость между количеством окисленного НАДН и количеством лимонной кислоты. Разность измеренных величин оптических плотностей ΔA вычисляют по формуле

$$\Delta A = (A_1 - A_2)_{\text{проба}} - (A_1 - A_2)_{\text{контроль}}. \quad (4)$$

Массовую концентрацию лимонной кислоты в пробе X, мг/дм^3, вычисляют по формуле

$$X = \frac{M \cdot V_1 \cdot F \cdot 1000}{\varepsilon \cdot l \cdot V_2 \cdot 1000} \cdot \Delta A, \quad (5)$$

где M — молярная масса лимонной кислоты (безводная форма), M = 192,1 г/моль;

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

F — фактор разведения пробы, рассчитываемый как отношение объема разведенной пробы к объему, взятому для разведения;

ε — молярный показатель поглощения НАДН,

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 в анализе объем раствора исследуемой пробы, см^3.

Если нет отклонений от объемов, указанных в 8.1.1, то

$$X = 3016 \cdot \frac{F \cdot \Delta A}{\varepsilon}. \quad (6)$$

При использовании имеющихся в продаже наборов реактивов численный коэффициент (3016) в формуле (6) 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 лимонной кислоты в пробе X_1, млн$^{-1}$, по формуле

$$X_1 = \frac{X \cdot 1000 \cdot V}{m}, \quad (7)$$

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, мг/дм^3, рассчитываемого по формуле

$$d = 0{,}095 + 0{,}000025\ \rho, \quad (8)$$

где ρ — среднеарифметическое результатов двух параллельных определений, 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, мг/дм^3, рассчитываемого по формуле

$$D = 0{,}130 + 0{,}000054\ \rho', \quad (9)$$

где ρ' — среднеарифметическое результатов двух измерений, мг/дм^3.

10 Контроль достоверности полученных результатов

Достоверность полученных результатов контролируют с помощью стандартного раствора лимонной кислоты массовой концентрации не более 400 мг/дм^3, который испытывают по 8.1—8.2 без предварительного разведения.

Если массовая концентрация лимонной кислоты, определенная в результате испытания, составляет менее 95 % концентрации стандартного раствора, то испытание следует повторить 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] Boehringer Mannheim. Methoden der enzimatischen BioAnalytik und Lebensmitteleanalytik mit Test-Combinationen

ОКС 67.080 Н59 ОКСТУ 9109

Ключевые слова: продукт питания, напиток, фруктовые и овощные соки, ферментативный анализ, определение концентрации, лимонная кислота, спектрофотометрия

gost.e-ecolog.ru