ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СОКИ ФРУКТОВЫЕ И ОВОЩНЫЕ

Метод определения D-яблочной кислоты

Издание официальное

ГОССТАНДАРТ РОССИИ
Москва

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Московским государственным университетом 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 25 сентября 2002 г. № 348-ст

3 Настоящий стандарт за исключением раздела 2 и пунктов 3.2, 5.3—5.5, 6.1, 6.5 и 6.6 представляют собой аутентичный текст национального стандарта ФРГ ДИН ЕН 12138—97 «Фруктовые и овощные соки. Ферментативное определение D-яблочной кислоты. Спектрофотометрическое определение НАД»

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

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

© ИПК Издательство стандартов, 2002
© СТАНДАРТИНФОРМ, 2008
Переиздание (по состоянию на июль 2008 г.)

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Определение, обозначения и сокращения 1
4 Сущность метода 2
5 Реактивы 2
6 Аппаратура 2
7 Проведение испытания 3
8 Выражение результатов 4
9 Точность определения 4
10 Отчет об испытании 5
Приложение А Медленнотекущие реакции 6
Приложение Б Статистические результаты кругового испытания 7
Приложение В Библиография 7

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СОКИ ФРУКТОВЫЕ И ОВОЩНЫЕ

Метод определения D-яблочной кислоты

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

Дата введения 2003—10—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на фруктовые и овощные соки, нектары и сокосодержащие напитки и устанавливает метод определения массовой концентрации D-яблочной кислоты.

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 3769—78 Аммоний сернокислый. Технические условия

ГОСТ 4328—77 Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 9262—77 Кальция гидроокись. Технические условия

ГОСТ 24104—88* Весы лабораторные общего назначения и образцовые. Общие технические условия

ГОСТ 24363—80 Калия гидроокись. Технические условия

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

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

ГОСТ Р 51652—2000 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия

3 Определение, обозначения и сокращения

3.1 В настоящем стандарте применяют следующий термин с соответствующим определением:

массовая концентрация D-яблочной кислоты во фруктовых и овощных соках, нектарах и сокосодержащих напитках: Массовая концентрация D-яблочной кислоты, определенная в соответствии с настоящим стандартом и выраженная в граммах на кубический дециметр.

3.2 В настоящем стандарте применяют следующие обозначения и сокращения:

НАД — β-никотинамидадениндинуклеотид;

НАДН — β-никотинамидадениндинуклеотид, восстановленная форма;

* С 1 июля 2002 г. введен в действие ГОСТ 24104—2001.

Издание официальное

D-МДГ — D-малатдегидрогеназа;

Е — международная единица, определяющая количество (активность) фермента, который служит катализатором для превращения 1 мкмоля вещества в минуту при 25 °С.

4 Сущность метода

Метод основан на ферментативном преобразовании [1, 2] D-яблочной кислоты в оксалоацетат под действием НАД в присутствии D-МДГ и спектрофотометрическом измерении массовой концентрации образовавшегося НАДН, эквивалентного массовой концентрации D-яблочной кислоты в пробе. Оксалоацетат в конце реакции распадается на пируват и углекислый газ.

В ходе анализа протекает следующая ферментативная реакция:

$$\text{D-яблочная кислота} + \text{НАД}^+ \xrightarrow{\text{D-МДГ}} \text{пируват} + CO_2 + \text{НАДН} + H^+ \qquad (1)$$

В связи с тем, что фермент D-МДГ не обладает абсолютной специфичностью, при испытаниях проб, содержащих наряду с D-яблочной L-винную кислоту, для связывания последней воздействуют гидроокисью кальция и этиловым спиртом.

5 Реактивы

5.1 Общие требования

При проведении анализа используют реактивы х.ч., ч.д.а. и дистиллированную воду по ГОСТ 6709.

Препараты НАД должны содержать не менее 90 % основного вещества.

Допускается использовать имеющиеся в продаже готовые наборы реактивов для определения D-яблочной кислоты и отдельные реактивы при условии, что качество реактивов не ниже указанного в настоящем стандарте.

5.2 Стандартный набор состоит из трех реактивов.

5.2.1 Реактив 1 — HEPES-буфер (4- (2-гидроксиэтил)-1-пиперазин-этансульфоновая кислота) объемом 30 $см^3$ и активной кислотностью 9,0 pH, содержащий стабилизаторы [3].

5.2.2 Раствор реактива 2 — НАД

Флакон, содержащий 0,21 г лиофильно высушенного НАД [3], растворяют в 4 $см^3$ дистиллированной воды.

5.2.3 Раствор реактива 3 — D-МДГ удельной активностью около 13 $Е/см^3$

Одну из трех содержащихся в наборе порций лиофильно высушенной D-МДГ [3] растворяют в 0,6 $см^3$ дистиллированной воды.

5.3 Кальция гидроокись по ГОСТ 9262.

5.4 Спирт этиловый по ГОСТ Р 51652 массовой долей основного вещества 96 %.

5.5 Калия гидроокись по ГОСТ 24363.

6 Аппаратура

Обычная лабораторная аппаратура, а также:

6.1 Дозаторы пипеточные объемами доз 0,02; 0,05; 0,10; 0,50; 1,0; 2,0; 5,0 и 10 $см^3$ и относительной погрешностью дозирования ±1 % [4] или пипетки градуированные по ГОСТ 29227, номинальной вместимостью 0,02; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 и 2,0 $см^3$, 2-го класса точности.

6.2 Кюветы фотометрические из оптического стекла или пластмассы толщиной поглощающего слоя 1 см для измерений при длинах волн 334, 340 или 365 нм.

6.3 Шпатели пластиковые или палочки стеклянные оплавленные длиной от 10 до 15 см для перемешивания содержимого кюветы при проведении фотометрических измерений.

6.4 Спектрофотометр или фотометр фотоэлектрический для измерений при длинах волн 334, 340 или 365 нм, допускаемой абсолютной погрешностью измерений коэффициента пропускания ±1 %.

6.5 Весы лабораторные общего назначения по ГОСТ 24104, наибольшим пределом взвешивания 20 г, 2-го класса точности.

6.6 Колбы мерные по ГОСТ 1770 номинальной вместимостью 50 $см^3$.

6.7 Фильтры мембранные диаметром пор 0,2 мкм.

7 Проведение испытания

7.1 Подготовка пробы к испытанию

7.1.1 Стандартная методика

Как правило, пробы не нуждаются в особых методиках подготовки к испытаниям. Результаты испытаний, выполненных в соответствии с настоящей методикой, выражают в миллиграммах на кубический дециметр.

Испытания концентрированных продуктов проводят после их разбавления дистиллированной водой до получения значения относительной плотности разбавленного продукта согласно рецептуре натурального сока, нектара или сокосодержащего напитка. При этом относительную плотность разбавленной пробы выражают в граммах на кубический дециметр.

Результаты испытаний концентрированного продукта могут быть также выражены в миллиграммах на килограмм. При расчете результата испытаний учитывают массу пробы концентрированного продукта и фактор разбавления.

При испытании продуктов высокой вязкости и/или с очень большим содержанием мякоти результаты выражают в миллиграммах на килограмм продукта.

Продукты с мутной взвесью перед испытанием хорошо перемешивают и осветляют путем центрифугирования.

Сильно окрашенные продукты разбавляют дистиллированной водой.

7.1.2 Модицированная методика (для проб с высокой концентрацией винной кислоты)

К 25 $см^3$ сока, нектара или сокосодержащего напитка добавляют 0,125 г сухой гидроокиси кальция и 5 $см^3$ этилового спирта. Пробу перемешивают 2 мин. Активную кислотность раствора устанавливают равной 7—8 pH, добавляя сухую гидроокись калия. Раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 $см^3$. Объем раствора доводят до метки дистиллированной водой. При проведении ферментативного определения используют прозрачную осветленную пробу. При необходимости раствор осветляют по 7.1.1.

7.2 Испытание

7.2.1 Общие требования

Испытание проводят при постоянной температуре от 20 до 25 °С. Допускается проводить испытание при постоянной температуре от 25 до 37 °С при условии получения равноценных результатов.

При использовании спектрофотометра с переменной длиной волны измерения проводят при длине волны 340 нм, при использовании спектрофотометра на ртутной лампе — при длине волны 334 или 365 нм.

Буферные растворы, растворы проб, ферментов и коферментов дозируют градуированными пипетками или автоматическими дозаторами.

Для контроля точности результатов определения используют стандартный раствор D-яблочной кислоты.

7.2.2 Контрольный раствор

В кювету спектрофотометра (фотометра) вносят 1,00 $см^3$ HEPES-буфера по 5.2.1; 0,10 $см^3$ раствора НАД по 5.2.2 и 1,80 $см^3$ дистиллированной воды, перемешивают пластиковым шпателем или стеклянной палочкой. Раствор выдерживают 6 мин и измеряют оптическую плотность относительно оптической плотности воздуха — $A_{1к}$.

7.2.3 Раствор пробы

В кювету спектрофотометра (фотометра) вносят 1,00 $см^3$ HEPES-буфера по 5.2.1; 0,10 $см^3$ раствора НАД по 5.2.2; 1,70 $см^3$ дистиллированной воды и 0,10 $см^3$ подготовленной пробы, перемешивают пластиковым шпателем или стеклянной палочкой. Раствор выдерживают 6 мин и измеряют оптическую плотность относительно оптической плотности воздуха — $A_{1пр}$.

7.2.4 Ферментативная реакция и количественное определение

В кюветы с контрольным раствором по 7.2.2 и раствором пробы по 7.2.3 вносят по 0,05 $см^3$ раствора D-МДГ по 5.2.3 и перемешивают пластиковым шпателем или стеклянной палочкой. Через 20 мин измеряют оптические плотности растворов относительно оптической плотности воздуха — $A_{2пр}$ и $A_{2к}$. Показания прибора проверяют повторным считыванием оптических плотностей через 5 мин. Если оптические плотности растворов увеличиваются с течением времени, то окончательные значения оптических плотностей определяют методом экстраполяции на момент внесения раствора D-МДГ по 5.2.3.

Примечание — При появлении побочных, так называемых «медленнотекущих», реакций расчет окончательных значений оптической плотности проводят по методике, приведенной в приложении А.

8 Выражение результатов

Разность измеренных величин оптических плотностей ΔA вычисляют по формуле

$$\Delta A = (A_2 - A_1)_{пр} - (A_2 - A_1)_к. \quad (2)$$

Массовую концентрацию D-яблочной кислоты в пробе ρ, мг/дм^3, вычисляют в соответствии с законом Ламберта—Бера по формуле

$$\rho = \frac{M V_1 F 1000}{\varepsilon \delta V_2 1000} \cdot \Delta A, \quad (3)$$

где M — молярная масса D-яблочной кислоты, г/моль (M = 134,09 г/моль);
V_1 — общий объем раствора в кювете, см^3;
F — фактор разбавления по 7.1.1 или 7.1.2;
ε — молярный коэффициент поглощения НАДН, дм^3·ммоль$^{-1}$·см$^{-1}$:
- при 340 нм — 6,3;
- при 365 нм — 3,4 (ртутная лампа);
- при 334 нм — 6,18 (ртутная лампа);

δ — толщина поглощающего слоя в кювете, см;
V_2 — объем пробы, см^3.

При отсутствии отклонений от объемов, указанных в 7.2, формула принимает вид

$$\rho = 3{,}956 \cdot \frac{F \Delta A}{\varepsilon}. \quad (4)$$

При использовании имеющихся в продаже отдельных реактивов численный коэффициент (3,956) в формуле (4) может быть иным из-за изменения общего объема раствора в кювете (V_1).

За результат испытания принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений, округленное до 0,1 мг/дм^3.

9 Точность определения

Характеристики точности метода вычислены по статистическим результатам кругового испытания (приложение Б).

9.1 Сходимость

Абсолютное расхождение между результатами двух параллельных определений, выполненных в одной лаборатории, не должно превышать более чем в 5 % случаев значения показателя сходимости r, мг/дм^3, вычисляемого по формуле

$$r = 2{,}03 + 0{,}044\ \rho_1, \quad (5)$$

где ρ_1 — среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений массовой концентрации D-яблочной кислоты, мг/дм^3.

9.2 Воспроизводимость

Абсолютное расхождение между результатами двух измерений, выполненных в двух лабораториях, не должно превышать более чем в 5 % случаев значения показателя воспроизводимости R, мг/дм^3, вычисляемого по формуле

$$R = 6{,}46 + 0{,}108\ \rho_2, \quad (6)$$

где ρ_2 — среднеарифметическое значение результатов двух измерений массовой концентрации D-яблочной кислоты, мг/дм^3.

10 Отчет об испытании

В отчете об испытании должны быть указаны:

- информация, которая необходима для идентификации пробы (вид пробы, данные изготовителя, описание пробы);
- обозначение настоящего стандарта;
- дата и способ отбора пробы (если возможно);
- дата доставки пробы;
- результаты испытания и наименования единиц измерений, в которых они приводятся;
- дата испытания;
- информация о выполнении условий сходимости метода;
- замечания об особенностях проведения испытания;
- особые условия проведения испытания, которые не учтены настоящим стандартом, но могли бы оказать влияние на результаты испытания.

ПРИЛОЖЕНИЕ А
(справочное)

Медленнотекущие реакции

Медленнотекущие реакции возникают вследствие присутствия в матрице пробы ферментов, не указанных в стандарте, а также вследствие взаимодействия побочных компонентов матрицы с реактивами, участвующими в ферментативной реакции.

При проведении запланированной ферментативной реакции оптическая плотность через 10—20 мин принимает постоянное значение, которое зависит от скорости специфичной ферментативной реакции. При появлении медленнотекущей реакции оптическая плотность раствора пробы в кювете меняется с течением времени.

В случае возникновения медленнотекущей реакции проводят повторные определения оптической плотности раствора пробы в кювете через каждые 2—5 мин. После выполнения 5—6 повторных определений и при условии достижения постоянного изменения оптической плотности за единицу времени ($\Delta A/\Delta t$ = const) фотометрические измерения прекращают.

По полученным данным строят график зависимости оптической плотности A от времени t.

Для определения окончательного значения оптической плотности, используемого при расчете массовой концентрации испытуемого вещества, экстраполируют кривую на момент внесения фермента в реакционную систему (t_0, рисунок А.1). Для получения достоверных результатов испытания пробы разность конечного (A_f) и начального (A_i) значений оптических плотностей должна быть не менее 0,040.

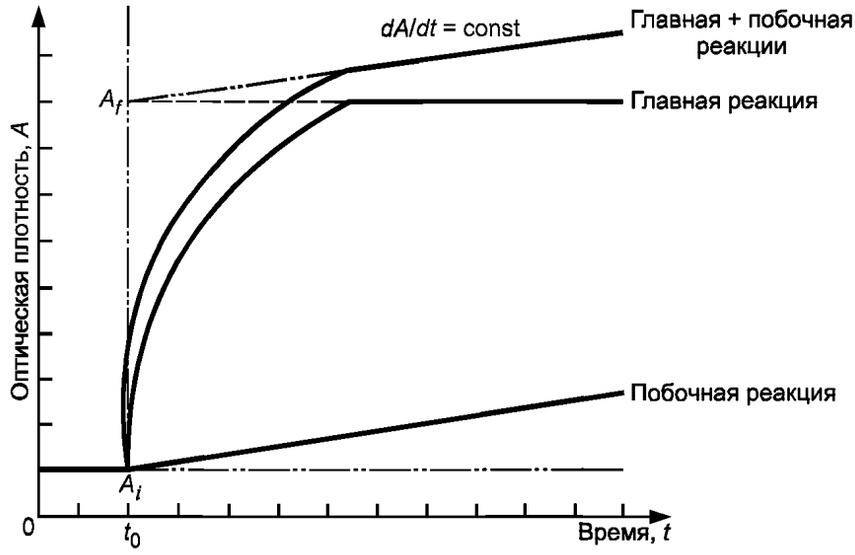

Рисунок А.1

ПРИЛОЖЕНИЕ Б
(справочное)

Статистические результаты кругового испытания

При проведении в соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725-2 круговых испытаний получены следующие характеристики точности метода, приведенные в таблице Б.1, и установлена линейная зависимость сходимости и воспроизводимости от среднеарифметического массовой концентрации D-яблочной кислоты.

Испытание проведено под руководством Международной федерации производителей фруктовых соков (г. Париж, Франция).

Год проведения кругового испытания — 1991.
Число участвовавших лабораторий — 24/18.
Количество проб — 3 (с добавкой D-яблочной кислоты).

Таблица Б.1

Величина, характеризующая круговое испытание	Значение для пробы сока		
	апельсинового	яблочного	виноградного (красного)
Число лабораторий, оставшихся после исключения тех, в которых полученные результаты были забракованы	19	24	15
Число исключенных лабораторий	5	—	3
Число принятых результатов	77	101	61
Среднеарифметическое значение (ρ_1), мг/дм^3	80,3	98,2	514,4
Среднеквадратичное отклонение результатов определений (s_r), мг/дм^3	1,62	2,64	8,75
Относительное среднеквадратичное отклонение результатов определений (RSD_r), %	2,0	2,7	1,7
Сходимость (r), мг/дм^3	4,5	7,5	24,8
Среднеквадратичное отклонение результатов измерений (s_R), мг/дм^3	4,90	6,53	21,84
Относительное среднеквадратичное отклонение результатов измерений (RSD_R), %	6,1	6,8	4,3
Воспроизводимость (R), мг/дм^3	13,7	18,5	61,9

ПРИЛОЖЕНИЕ В
(справочное)

Библиография

[1] Enzymatische Bestimmung der D-Apfelsaeure (D-Malic acid enzymatic method): Official Journal of the European Communities, L272, Volume 33, pages 106—108, published 3.10.1990
[2] Bestimmung der D-Apfelsaeure; Enzymatisch: Nr. 64, 1994. — In: Analysen/[Sammlung] Internationale Fruchtsaft — Union. — Loseblattausgabe, Stand 1996. Zug: Schweizerischer Obstverband
[3] Boehringer Mannheim. Methoden der enzymatischen BioAnalytik und Lebensmittelanalytik mit Test-Combinationen, 1995
[4] ТУ 64-13329—81 Дозаторы пипеточные

УДК 664.863.001.4:006.354 ОКС 67.160.20 Н59 ОКСТУ 9109

Ключевые слова: фруктовый сок, овощной сок, нектар, сокосодержащий напиток, D-яблочная кислота, спектрофотометрия

Редактор *Л.В. Коретникова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *Р.А. Ментова*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Подписано в печать 12.08.2008. Формат 60 × 84 $^{1}/_{8}$. Бумага офсетная. Гарнитура Таймс.
Печать офсетная. Усл.печ.л. 1,40. Уч.-изд.л. 0,75. Тираж 90 экз. Зак. 1026.

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru
Набрано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» на ПЭВМ.
Отпечатано в филиале ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» — тип. «Московский печатник», 105062 Москва, Лялин пер., 6.

gost.e-ecolog.ru