ГОСТ Р 51240—98
(ДИН 1140—94)

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СОКИ ФРУКТОВЫЕ И ОВОЩНЫЕ

Метод определения D-глюкозы и D-фруктозы

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 декабря 1998 г. № 463

3 Настоящий стандарт представляет собой аутентичный текст национального стандарта ФРГ ДИН ЕН 1140—94 «Фруктовые и овощные соки. Ферментативное определение D-глюкозы и D-фруктозы. Спектрофотометрическое определение НАДФН (никотинамидадениндинуклеотидфосфата)» с дополнительными требованиями, отражающими потребности народного хозяйства (разделы 2, 5, 7, 8 и 9 и пункт 6.1)

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-глюкозы и D-фруктозы

Fruit and vegetable juices.
Determination of D-glucose and D-fructose content

Дата введения 1999—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на фруктовые и овощные соки, нектары и сокосодержащие напитки и устанавливает метод определения массовых концентраций D-глюкозы и D-фруктозы.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты:
ГОСТ 3769—78 Аммоний сернокислый. Технические условия
ГОСТ 4201—79 Натрий углекислый кислый. Технические условия
ГОСТ 4328—77 Натрия гидроокись. Технические условия
ГОСТ 4523—77 Магний сернокислый 7-водный. Технические условия
ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

3 Определение, обозначения и сокращения

3.1 В настоящем стандарте применяют следующий термин с соответствующими определениями:

массовые концентрации D-глюкозы и D-фруктозы во фруктовых и овощных соках, нектарах и сокосодержащих напитках: Массовые концентрации D-глюкозы и D-фруктозы, определенные раздельно в соответствии с настоящим стандартом и выраженные в граммах на кубический дециметр.

3.2 В настоящем стандарте применяют следующие обозначения и сокращения.

АТФ — аденозин-5′трифосфат;
АДФ — аденозин-5′-дифосфат;
НАДФ — β-никотинамидадениндинуклеотидфосфат;
НАДФН — β-никотинамидадениндинуклеотидфосфат (восстановленная форма);
Г-6-Ф — глюкозо-6-фосфат;
Ф-6-Ф — фруктозо-6-фосфат;
ГК — гексокиназа;
Г6Ф-ДГ — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа;
ФГИ — фосфоглюкозоизомераза;
Е — международная единица, определяет количество (активность) фермента, которое служит катализатором для превращения при 25 °С 1 мкмоля вещества в минуту.

Издание официальное

4 Сущность метода и реакции

4.1 Сущность метода

Метод [1, 2] основан на фосфорилировании D-глюкозы и D-фруктозы под действием АТФ в присутствии ГК с образованием Г-6-Ф и Ф-6-Ф, преобразовании Г-6-Ф под действием НАДФ в присутствии Г6Ф-ДГ в глюконат-6-фосфат и НАДФН, фотометрическом измерении массовой концентрации образовавшегося НАДФН, эквивалентной массовой концентрации D-глюкозы; изомеризации Ф-6-Ф в Г-6-Ф в присутствии ФГИ, преобразовании Г-6-Ф под действием НАДФ в присутствии Г6Ф-ДГ в глюконат-6-фосфат и НАДФН, фотометрическом измерении массовой концентрации образовавшегося НАДФН, эквивалентной массовой концентрации D-фруктозы в пробе.

4.2 Реакции, происходящие при определении D-глюкозы:

$$\text{D-глюкоза} + \text{АТФ} \xrightarrow{\text{ГК}} \text{Г-6-Ф} + \text{АДФ}, \quad (1)$$

$$\text{Г-6-Ф} + \text{НАДФ}^+ \xrightarrow{\text{Г6Ф–ДГ}} \text{глюконат-6-фосфат} + \text{НАДФН} + \text{H}^+. \quad (2)$$

4.3 Реакции, происходящие при определении D-фруктозы:

$$\text{D-фруктоза} + \text{АТФ} \xrightarrow{\text{ГК}} \text{Ф-6-Ф} + \text{АДФ}, \quad (3)$$

$$\text{Ф-6-Ф} \xrightarrow{\text{ФГИ}} \text{Г-6-Ф}, \quad (4)$$

$$\text{Г-6-Ф} + \text{НАДФ}^+ \xrightarrow{\text{Г6Ф–ДГ}} \text{глюконат-6-фосфат} + \text{НАДФН} + \text{H}^+ \quad (5)$$

5 Реактивы

5.1 Общие требования

При проведении анализа используют химически чистые или чистые для анализа реактивы.

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

Препараты триэтаноламингидрохлорида, динатриевой соли β-никотинамидадениндинуклеотидфосфата (β-НАДФ-Na_2) и динатриевой соли аденозин-5′-трифосфата (АТФ-$Na_2H_2 \cdot 3H_2O$) должны содержать не менее 90 % основного вещества.

5.2 Буферный раствор гидрохлорида триэтаноламина активной кислотностью 7,6 pH

14,0 г триэтаноламингидрохлорида и 0,25 г сернокислого магния по ГОСТ 4523 растворяют в 80 $см^3$ дистиллированной воды по ГОСТ 6709. Активную кислотность раствора устанавливают равной 7,6 pH приблизительно 5 $см^3$ раствора гидроокиси натрия по ГОСТ 4328 молярной концентрации c (NaOH) = 5 моль/$дм^3$. Объем раствора доводят дистиллированной водой до 100,0 $см^3$. Буферный раствор устойчив при температуре 4 °С 1 мес.

5.3 Раствор НАДФ

0,06 г динатриевой соли β-никотинамидадениндинуклеотидфосфата (β-НАДФ-Na_2) растворяют в 6 $см^3$ дистиллированной воды по ГОСТ 6709. Раствор устойчив при температуре 4 °С 1 мес.

5.4 Раствор АТФ

0,3 г динатриевой соли аденозин-5′-трифосфата (АТФ-$Na_2H_2 \cdot 3H_2O$) и 0,3 г углекислого кислого натрия по ГОСТ 4201 растворяют в 6 $см^3$ дистиллированной воды по ГОСТ 6709. Раствор устойчив при температуре 4 °С 1 мес.

5.5 Суспензия ферментов ГК и Г6Ф-ДГ

Раствор гексокиназы массовой долей 0,002 г/$см^3$ и удельной активностью не менее 280 Е/$см^3$, содержащий глюкозу в качестве субстрата и АТФ, и раствор глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы массовой долей 0,001 г/$см^3$ и удельной активностью не менее 140 Е/$см^3$, содержащий глюкозы-6-фосфат в качестве субстрата, смешивают с раствором сернокислого аммония по ГОСТ 3769 молярной концентрации c ($(NH_4)_2SO_4$) = 3,2 моль/$дм^3$. Суспензия устойчива при температуре 4 °С 12 мес.

5.6 Суспензия фермента ФГИ

Раствор фосфоглюкозаизомеразы массовой концентрацией 0,002 г/см^3, удельной активностью не менее 700 Е/см^3, содержащий фруктозо-6-фосфат в качестве субстрата, суспендируют в растворе сернокислого аммония по ГОСТ 3769 молярной концентрации c ($(NH_4)_2SO_4$) = 3,2 моль/дм^3. Суспензия устойчива при температуре 4 °С 12 мес.

6 Аппаратура

Обычная лабораторная аппаратура, а также указанная в 6.1—6.4.

6.1 Дозаторы пипеточные [3] объемами доз 100, 50 и 25 см^3 и относительной погрешностью дозирования ±1 % или пипетки градуированные номинальной вместимостью 2,0; 1,0; 0,5; 0,2; 0,1 и 0,02 см^3 и допускаемой относительной погрешностью ±1 %.

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 оплавленые 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 наибольшим пределом взвешивания 20 г и допускаемой погрешностью ±0,0001 г.

7 Проведение испытания

7.1 Подготовка пробы к испытанию

Как правило, пробы не нуждаются в особых методах подготовки к испытаниям. Результаты испытаний по настоящей методике выражают в граммах на кубический дециметр.

Испытания концентрированных продуктов проводят после их разбавления дистиллированной водой до получения значения относительной плотности разбавленного продукта согласно рецептурам 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 граммах 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 испытаний выражают в граммах на килограмм продукта.

Продукты с мутной взвесью перед испытанием хорошо перемешивают.

Пробу разбавляют дистиллированной водой до получения значений массовых концентраций *D*-глюкозы и D-фруктозы в интервале от 0,1 до 1,0 г/дм^3. Допускается использование при проведении испытания окрашенной разбавленной пробы.

7.2 Определение

7.2.1 *Общие требования*

Определение проводят при постоянной температуре в интервале от 20 до 25 °С. Допускается проводить определения при постоянной температуре в интервале от 25 до 37 °С при условии получения равноценных результатов.

Абсорбционный максимум НАДФН находится при длине волны 340 нм. При использовании спектрофотометра переменной длины волны все измерения проводят при максимуме поглощения света НАДФН. При использовании спектрофотометра с ртутной лампой измерения проводят при длинах волн 334 или 365 нм.

Для дозирования буферных растворов, а также растворов проб, ферментов и коферментов используют только градуированные пипетки или автоматические дозаторы.

7.2.2 *Контрольный раствор*

В фотометрическую кювету вносят 1,00 см^3 раствора триэтаноламингидрохлорида по 5.2, 0,10 см^3 раствора НАДФ по 5.3, 0,10 см^3 раствора АТФ по 5.4 и 2,00 см^3 дистиллированной воды. Раствор перемешивают пластиковым шпателем или стеклянной палочкой, выдерживают 3 мин и измеряют оптическую плотность раствора — $(A_1)_к$ относительно оптической плотности воздуха.

7.2.3 *Раствор пробы*

В фотометрическую кювету вносят 1,00 см^3 буферного раствора триэтаноламингидрохлорида по 5.2, 0,10 см^3 раствора НАДФ по 5.3, 0,10 см^3 раствора АТФ по 5.4, 0,10 см^3 подготовленной пробы по 7.1 и 1,90 см^3 дистиллированной воды. Раствор перемешивают пластиковым шпателем или стеклянной палочкой, выдерживают 3 мин и измеряют оптическую плотность раствора — $(A_1)_{пр}$ относительно оптической плотности воздуха.

7.2.4 *Ферментативная реакция и количественное определение*

В каждую из кювет с контрольным раствором по 7.2.2 и раствором пробы по 7.2.3 вносят по 0,02 см^3 суспензии ГК и Г6Ф-ДГ по 5.5, перемешивают пластиковым шпателем или стеклянной палочкой и выдерживают от 10 до 15 мин. Затем измеряют оптические плотности растворов — $(A_2)_{пр}$ и $(A_2)_к$ относительно оптической плотности воздуха.

Окончание реакции проверяют повторным считыванием показаний спектрофотометра через 2 мин. Если ферментативная реакция не завершилась через 15 мин и оптические плотности растворов увеличиваются с течением времени, то значения $(A_2)_{пр}$ и $(A_2)_к$ определяют методом экстраполяции на момент внесения суспензии ферментов ГК и Г6Ф-ДГ по 5.5.

Далее в каждую из кювет с контрольным раствором по 7.2.2 и раствором пробы по 7.2.3 вносят по 0,02 см^3 суспензии фермента ФГИ по 5.6, перемешивают пластиковым шпателем или стеклянной палочкой, выдерживают от 10 до 15 мин и затем измеряют оптические плотности растворов — $(A_3)_{пр}$ и $(A_3)_к$ относительно оптической плотности воздуха.

Окончание реакции проверяют повторным считыванием показаний спектрофотометра через 2 мин. Если ферментативная реакция не завершилась через 15 мин и оптические плотности растворов увеличиваются с течением времени, то значения $(A_3)_{пр}$ и $(A_3)_к$ определяют методом экстраполяции на момент внесения фермента ФГИ по 5.6.

8 Выражение результатов

8.1 В ферментативных реакциях, лежащих в основе данного метода, образующийся в кювете НАДФН приводит к изменению оптических плотностей растворов ($\Delta A_{D\text{-гл}}$ и $\Delta A_{D\text{-фр}}$), а его массовые концентрации пропорциональны массовым концентрациям D-глюкозы и D-фруктозы.

$$\Delta A_{D\text{-гл}} = (A_2 - A_1)_{пр} - (A_2 - A_1)_к, \quad (6)$$

$$\Delta A_{D\text{-фр}} = (A_3 - A_2)_{пр} - (A_3 - A_2)_к. \quad (7)$$

8.2 Массовую концентрацию D-глюкозы в пробе $\rho_{(D\text{-гл})}$ и/или D-фруктозы в пробе $\rho_{D\text{-фр}}$, г/дм^3, вычисляют в соответствии с законом Ламберта-Бера по формуле

$$\rho = \frac{M V_1 F}{\varepsilon \delta V_2 1000} \cdot \Delta A, \quad (8)$$

где M — молярная масса глюкозы или фруктозы, 180,16 г/моль;

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

F — фактор разбавления по 7.1;

ε — молярный коэффициент поглощения НАДФН, дм^3·ммоль$^{-1}$·см$^{-1}$;

- при длине волны 340 нм — 6,3,
- при длине волны 365 нм — 3,4 (ртутная лампа),
- при длине волны 334 нм — 6,18 (ртутная лампа);

δ — толщина поглощающего слоя в кювете, см;

V_2 — объем пробы, см^3.

Если нет отклонений от объемов, указанных в 7.2.2 и 7.2.3, то

$$\rho_{D\text{-гл}} = 5{,}801 \cdot \frac{F \Delta A_{D\text{-гл}}}{\varepsilon}, \quad (9)$$

$$\rho_{D\text{-фр}} = 5{,}837 \cdot \frac{F \Delta A_{D\text{-фр}}}{\varepsilon}. \quad (10)$$

8.3 При использовании имеющихся в продаже наборов реактивов численные коэффициенты (5,801 и 5,837) в уравнениях (9) и (10) могут быть иными из-за изменения общего объема раствора (V_1) в кювете.

8.4 За результат испытаний принимают среднеарифметическое результатов двух параллельных определений, округленное до десятых долей.

9 Точность определения

9.1 Сходимость

Абсолютные расхождения между результатами двух параллельных определений, выполненных в одной лаборатории, не должны превышать более чем в 5 % случаев значений показателей сходимости r, г/дм^3, рассчитываемых по формулам для:

$$\text{D-глюкозы } r = 0{,}42 + 0{,}027\rho_1, \quad (11)$$

$$\text{D-фруктозы } r = 0{,}15 + 0{,}033\rho_2, \quad (12)$$

где ρ_1 — среднеарифметическое результатов двух параллельных определений массовой концентрации D-глюкозы;

ρ_2 — среднеарифметическое результатов двух параллельных определений массовой концентрации D-фруктозы.

9.2 Воспроизводимость

Абсолютные расхождения между результатами двух измерений, выполненных в двух лабораториях, не должны превышать более чем в 5 % случаев значений показателей воспроизводимости R, г/дм^3, рассчитываемых по формулам для:

$$\text{D-глюкозы } R = 1{,}00 + 0{,}042\rho_3; \quad (13)$$

$$\text{D-фруктозы } R = 1{,}05 + 0{,}045\rho_4, \quad (14)$$

где ρ_3 — среднеарифметическое результатов двух измерений массовой концентрации D-глюкозы;

ρ_4 — среднеарифметическое результатов двух измерений массовой концентрации D-фруктозы.

10 Отчет об испытании

В отчете об испытании должны быть указаны:

- информация, которая необходима для идентификации пробы (вид пробы, ее происхождение, описание);
- ссылка на настоящий стандарт;
- дата и способ отбора пробы (если возможно);
- дата доставки пробы;
- результаты испытаний и наименования единиц измерений, в которых они приводятся;
- дата испытаний;
- информация о выполнении условий воспроизводимости метода;
- замечания об особенностях проведения испытаний;
- особые условия проведения испытаний, которые не учтены настоящим стандартом, но могли бы оказать влияние на результаты испытаний.

ПРИЛОЖЕНИЕ А
(справочное)

Статистические результаты кругового испытания

Проведенное в соответствии с [4] круговое испытание дало следующие характеристики точности метода для глюкозы и фруктозы, приведенные в таблицах А.1 и А.2.

Испытание проводилось под руководством Отдела пищевой химии Института Макса фон Петтенкофера Федерального министерства здравоохранения, г. Берлин, ФРГ.

Год проведения кругового испытания — 1983.
Число участвовавших лабораторий — 22.
Количество проб — 4.

Таблица А.1 — Глюкоза

Наименование величины, характеризующей круговое испытание	Значение величины для пробы			
	A	B	C	D
Число лабораторий, оставшихся после исключения тех, в которых полученные результаты были забракованы	19	17	15	16
Число исключенных лабораторий	3	5	7	6
Число принятых результатов	105	94	80	84
Среднеарифметическое (ρ_1), г/дм^3	26,2	34,9	53,5	79,9
Среднеквадратическое отклонение результатов определений (s_r), г/дм^3	0,389	0,562	0,539	0,959
Относительное среднеквадратическое отклонение результатов определений (RSD_r), %	1,48	1,61	1,01	1,20
Показатель сходимости (r), г/дм^3	1,1	1,6	1,5	2,7
Среднеквадратическое отклонение результатов измерений (s_R), г/дм^3	0,754	1,003	1,140	1,403
Относительное среднеквадратическое отклонение результатов измерений (RSD_R), %	2,88	2,87	2,13	1,75
Показатель воспроизводимости (R), г/дм^3	2,1	2,8	3,2	3,9

Таблица А.2 — Фруктоза

Наименование величины, характеризующей круговое испытание	Значение величины для пробы			
	A	B	C	D
Число лабораторий, оставшихся после исключения тех, в которых полученные результаты были забракованы	15	16	18	17
Число исключенных лабораторий	6	5	3	4
Число принятых результатов	81	85	100	92
Среднеарифметическое (ρ_2), г/дм^3	66,5	27,7	55,6	80,6
Среднеквадратическое отклонение результатов определений (s_r), г/дм^3	0,887	0,423	0,548	1,011
Относительное среднеквадратическое отклонение результатов определений (RSD_r), %	1,33	1,53	0,99	1,25
Показатель сходимости (R), г/дм^3	2,5	1,2	1,5	2,8
Среднеквадратическое отклонение результатов измерений (s_R), г/дм^3	1,553	0,796	1,323	1,630

Окончание таблицы А.2

Наименование величины, характеризующей круговое испытание	Значение величины для пробы			
	A	B	C	D
Относительное среднеквадратическое отклонение результатов измерений (RSD_R), %	2,33	2,87	2,38	2,02
Показатель воспроизводимости (R), г/дм^3	4,3	2,2	3,7	4,6

Примечания

1 Установлена линейная зависимость для глюкозы и фруктозы между r, R и среднеарифметическими.

2 Характер проб:

- A — яблочный сок,
- B — абрикосовый нектар,
- C — нектар черной смородины,
- D — виноградный сок (красный).

ПРИЛОЖЕНИЕ Б
(справочное)

Библиография

[1] Bestimmung der Glucose und Fructose; Enzymatisch: Nr. 55, 1985. — In: Analysen/[Sammlung] Internationale Fruchtsaft—Union. — Loseblattausgabe, stand 1989. Zug: Schweizerischer Obstverband

[2] Untersuchung von Lebensmitteln: Bestimmung von Glucose und Fructose in Fruchtsaeften: L31.00-12, 1984—11. — In: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG: Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und Bedarfgegenstaenden/Bundesgesundheitsamt. Loseblattausgabe, Stand 31.12.1991, Bd. 1. — Berlin, Koeln: Beuth Verlag GmbH

[3] ТУ 64—13329—81 Дозаторы пипеточные

[4] ИСО 5725—86 Точность методов испытания. Определение повторяемости и воспроизводимости для метода стандартного испытания с помощью межлабораторных испытаний

ОКС 67.080 Н59 ОКСТУ 9109

Ключевые слова: фруктовый сок; овощной сок; нектар; сокосодержащий напиток; D-глюкоза, D-фруктоза; спектрофотометрия

gost.e-ecolog.ru