

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

---

# СОКИ ФРУКТОВЫЕ И ОВОЩНЫЕ

## Метод определения L-яблочной кислоты

Издание официальное

**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. № 462

**3 Настоящий стандарт** представляет собой аутентичный текст национального стандарта ФРГ ДИН 1138—94 «Фруктовые и овощные соки. Ферментативное определение L-яблочной кислоты. Спектрофотометрическое определение НАДФ (никотинамидадениндинуклеотида)» с дополнительными требованиями, отражающими потребности народного хозяйства (разделы 2, 5, 7, 8 и 9 и пункты 6.1 и 6.5)

**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 L-яблочной кислоты

Fruit and vegetable juices. Determination of L-malic acid 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 массовой концентрации L-яблочной кислоты в виде свободной кислоты или соли.

## 2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 3769—78 Аммоний сернокислый. Технические условия

ГОСТ 4328—77 Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

## 3 Определение, обозначения и сокращения

3.1 В настоящем стандарте применяют следующие термины с соответствующими определениями:  
**массовая концентрация L-яблочной кислоты во фруктовых и овощных соках, нектарах и сокосодержащих напитках:** Массовая концентрация L-яблочной кислоты, определенная в соответствии с настоящим стандартом и выраженная в г/дм<sup>3</sup>.

3.2 В настоящем стандарте применяют следующие обозначения и сокращения:

НАД — β-никотинамидадениндинуклеотид;

НАДН — β-никотинамидадениндинуклеотид (восстановленная форма);

ГОТ — глутаматоксалоацетаттрансаминаза;

L-МДГ — L-малатдегидрогеназа;

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

## 4 Сущность метода и реакции

Метод [1, 2] основан на ферментативном преобразовании L-яблочной кислоты в оксалоацетат под действием НАД в присутствии L-МДГ, смещении равновесия реакции путем связывания образовавшегося оксалоацетата L-глутаматом в присутствии ГОТ и спектрофотометрическом измерении массовой концентрации образовавшегося НАДН, эквивалентной массовой концентрации L-яблочной кислоты в пробе [1, 2].



## 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 L-яблочной кислоты при условии, что качество реагентов не ниже указанного в настоящем стандарте.

Препараты глицилглицина, L-глутаминовой кислоты и НАД должны содержать не менее 90 % основного вещества.

### 5.2 Глицилглициновый буферный раствор активной кислотности 10,0 рН

4,75 г глицилглицина и 0,88 г L-глутаминовой кислоты растворяют в 50 см<sup>3</sup> дистиллированной воды по ГОСТ 6709. Устанавливают активную кислотность раствора равной 10,0 рН приблизительно 4,6 см<sup>3</sup> раствора гидроокиси натрия по ГОСТ 4328 молярной концентрации  $c(\text{NaOH}) = 10 \text{ моль/дм}^3$ . Объем раствора доводят дистиллированной водой до 60 см<sup>3</sup>. Буферный раствор устойчив при температуре 4 °С 3 мес.

### 5.3 Раствор НАД

0,420 г НАД растворяют в 12 см<sup>3</sup> дистиллированной воды. Раствор устойчив при температуре 4 °С 1 мес.

### 5.4 Суспензия фермента ГОТ

Раствор глутаматоксалоацетаттрансаминазы массовой концентрации 0,002 г/см<sup>3</sup>, содержащий L-аспартат и  $\alpha$ -кетоглутарат в качестве субстрата, смешивают с раствором сернокислого аммония по ГОСТ 3769 молярной концентрации  $c((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4) = 3,2 \text{ моль/дм}^3$ . Удельная активность суспензии ГОТ составляет не менее 400 Е/см<sup>3</sup>. Суспензия устойчива при температуре 4 °С 12 мес.

### 5.5 Суспензия фермента L-МДГ

Раствор L-малатдегидрогеназы массовой концентрации 0,005 г/см<sup>3</sup> смешивают с раствором сернокислого аммония по ГОСТ 3769 молярной концентрации  $c((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4) = 3,2 \text{ моль/дм}^3$ . Удельная активность суспензии L-МДГ составляет не менее 6000 Е/см<sup>3</sup>. 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 объемами доз 100, 50 и 25 см<sup>3</sup> и относительной погрешностью дозирования  $\pm 1 \%$  [3] или пипетки градуированные номинальной вместимостью 2,0; 1,0; 0,5; 0,2; 0,1 и 0,02 см<sup>3</sup> и допускаемой относительной погрешностью  $\pm 1 \%$ .

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 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  $\pm 1 \%$ .

6.5 Весы лабораторные общего назначения наибольшим пределом взвешивания 20 г и допускаемой погрешностью  $\pm 0,0001 \text{ г}$ .

## 7 Проведение испытания

### 7.1 Подготовка пробы к испытанию

Как правило, пробы не нуждаются в особых методах подготовки к испытаниям. Результаты испытания 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.

Сильно окрашенные продукты рекомендуется разбавить в большей степени, чем указано ниже. При этом пробы с очень низкой концентрацией L-яблочной кислоты рекомендуется предварительно осветлить путем центрифугирования.

Пробу разбавляют дистиллированной водой до получения значения массовой концентрации L-яблочной кислоты в интервале от 0,02 до 0,35 г/дм<sup>3</sup>. Допускается использование при проведении испытания окрашенной разбавленной пробы.

## 7.2 Определение

### 7.2.1 Общие требования

Определения 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 НАДН находится при длине волны 340 нм. При использовании спектрофотометра переменной длины волны все измерения проводят в максимуме поглощения света НАДН. 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<sup>3</sup> буферного раствора по 5.2, 0,20 см<sup>3</sup> раствора НАД по 5.3, 1,50 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и 0,01 см<sup>3</sup> суспензии ГОТ по 5.4. Смесь перемешивают пластиковым шпателем или стеклянной палочкой, выдерживают 3 мин и измеряют оптическую плотность раствора относительно оптической плотности воздуха —  $(A_1)_к$ .

### 7.2.3 Раствор пробы

В кювету спектрофотометра (фотометра) вносят 1,00 см<sup>3</sup> буферного раствора по 5.2, 0,20 см<sup>3</sup> раствора НАД по 5.3, 1,40 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, 0,01 см<sup>3</sup> суспензии ГОТ по 5.4 и 0,1 см<sup>3</sup> подготовленной пробы. Смесь перемешивают пластиковым шпателем или стеклянной палочкой, выдерживают 3 мин и измеряют оптическую плотность раствора относительно оптической плотности воздуха —  $(A_1)_{пр}$ .

### 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 0,01 см<sup>3</sup> суспензии L-МДГ по 5.5 и перемешивают пластиковым шпателем или стеклянной палочкой. По окончании реакции (через 5—10 мин) измеряют оптические плотности растворов относительно оптической плотности воздуха —  $(A_2)_{пр}$  и  $(A_2)_к$ . Окончание реакции проверяют повторным считыванием показаний прибора через 2 мин.

## 8 Выражение результатов

8.1 В ферментативных реакциях, лежащих в основе данного метода, образующийся в кювете НАДН приводит к изменению оптической плотности раствора ( $\Delta A$ ), а его массовая концентрация пропорциональна массовой концентрации L-яблочной кислоты в пробе.

$$\Delta A = (A_2 - A_1)_{пр} - (A_2 - A_1)_к \quad (3)$$

8.2 Массовую концентрацию L-яблочной кислоты в пробе  $\rho$ , г/см<sup>3</sup>, вычисляют в соответствии с законом Ламберта-Бера по формуле

$$\rho = \frac{M V_1 F}{\epsilon \delta V_2 1000} \cdot \Delta A, \quad (4)$$

где  $M$  — молярная масса L-яблочной кислоты, 134,09 г/моль;

$V_1$  — общий объем раствора в кювете, см<sup>3</sup>;

$F$  — фактор разбавления по 7.1;

$\epsilon$  — молярный коэффициент поглощения НАДФН, дм<sup>3</sup>·ммоль<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup>:

— 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);

$\delta$  — толщина поглощающего слоя в кювете, см;

$V_2$  — объем пробы, см<sup>3</sup>.

Если нет отклонений от объемов, указанных в 7.2.3, то

$$\rho = 3,647 \cdot \frac{F \Delta A}{\varepsilon} . \quad (5)$$

8.3 При использовании имеющихся в продаже наборов реактивов численный коэффициент (3,647) в уравнении (5) может быть иным из-за изменения общего объема раствора ( $V_1$ ) в кювете.

8.4 За результат испытаний принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, округленное до сотых долей.

## 9 Точность определения

### 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  $r$ , г/дм<sup>3</sup>, рассчитываемого по формуле

$$r = 0,014 + 0,030 \rho_1, \quad (6)$$

где  $\rho_1$  — среднеарифметическое результатов двух параллельных определений.

### 9.2 Воспроизводимость

Абсолютное расхождение между результатами двух измерений, выполненных в двух лабораториях, не должно превышать более чем в 5 % случаев значения показателя воспроизводимости  $R$ , г/дм<sup>3</sup>, рассчитываемого по формуле

$$R = 0,032 + 0,070 \rho_2, \quad (7)$$

где  $\rho_2$  — среднеарифметическое результатов двух измерений.

## 10 Отчет об испытании

В отчете об испытании должны быть указаны:

- информация, которая необходима для идентификации пробы (виды 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 испытания;
- информация о выполнении условий воспроизводимости 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)

**Статистические результаты кругового испытания**

Проведенное в соответствии с [4] круговое испытание дало следующие характеристики точности метода, приведенные в таблице А.1.

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 — 24.

Количество проб — 4.

Таблица А.1

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	22	20	21	23
Число исключенных лабораторий	2	4	3	1
Число принятых результатов	110	99	104	119
Среднеарифметическое ( $\rho_1$ ), г/дм <sup>3</sup>	1,26	2,54	7,22	8,92
Среднеквадратическое отклонение результатов определений ( $s_p$ ), г/дм <sup>3</sup>	0,0232	0,0284	0,0652	0,1142
Относительное среднеквадратическое отклонение результатов определений ( $RSD_p$ ), %	3,36	1,12	0,90	1,28
Показатель сходимости ( $r$ ), г/дм <sup>3</sup>	0,06	0,08	0,18	0,32
Среднеквадратическое отклонение результатов измерений ( $s_R$ ), г/дм <sup>3</sup>	0,0486	0,0675	0,1876	0,2350
Относительное среднеквадратическое отклонение результатов измерений ( $RSD_R$ ), %	3,86	2,66	2,60	2,63
Показатель воспроизводимости ( $R$ ), г/дм <sup>3</sup>	0,14	0,19	0,52	0,66
<p><b>П р и м е ч а н и я</b></p> <p>1 Установлена линейная зависимость между <math>r</math>, <math>R</math> и среднеарифметическими.</p> <p>2 Характер проб:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- А — апельсиновый сок;</li> <li>- В — стандартный раствор;</li> <li>- С — яблочный сок;</li> <li>- D — вишневый нектар.</li> </ul>				

ПРИЛОЖЕНИЕ Б  
(справочное)

**Библиография**

- [1] Bestimmung der L-Aepfelsaeure; Enzymatisch: Nr. 21, 1985. — In: Analysen/[Sammlung] Internationale Frucht-saft-Union. — Loseblattausgabe, stand 1989. Zug: Schweizerischer Obstverband
- [2] Untersuchung von Lebensmitteln: Bestimmung von L-Aepfelsaeure (L-Malat) in Fruchtsaeften: L31.00-15, 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; L-яблочная кислота; спектрофотометрия

---