

---

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ  
(МГС)  
INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION  
(ISC)

---

М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й  
С Т А Н Д А Р Т

ГОСТ  
34410—  
2018

---

## ПРОДУКЦИЯ СОКОВАЯ

**Определение D-изолимонной кислоты  
ферментативным методом**

(EN 1139:1994, NEQ)

Издание официальное



Межгос.  
Стандарты  
2018

## Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены в ГОСТ 1.0—2015 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2015 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены».

### Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Всероссийским научно-исследовательским институтом технологии консервирования — филиалом Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН (ВНИИТеК — филиал ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН) при участии Общества с ограниченной ответственностью «Компания Стайлаб» (ООО «Компания Стайлаб»)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 30 мая 2018 г. № 109-П)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ISO 3166) 004—97	Код страны по МК (ISO 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 27 июня 2018 г. № 366-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 34410—2018 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2019 г.

5 В настоящем стандарте учтены основные нормативные положения европейского стандарта EN 1139:1994 «Соки фруктовые и овощные. Определение содержания D-изолимонной кислоты спектрометрическим методом с применением NADPH» («Method for determination of D-isocitric acid content of fruit and vegetable juices. NADPH spectrometric method», NEQ)

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет ([www.gost.ru](http://www.gost.ru))

© Стандартинформ, оформление, 2018

В Российской Федерации настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

## Содержание

1 Область применения . . . . .	1
2 Нормативные ссылки . . . . .	1
3 Термины, определения, обозначения и сокращения . . . . .	2
4 Сущность метода . . . . .	3
5 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда, реактивы и материалы . . . . .	3
6 Отбор и подготовка проб . . . . .	4
7 Условия проведения измерений . . . . .	4
8 Подготовка к проведению определений . . . . .	4
9 Порядок проведения измерений . . . . .	5
10 Обработка и оформление результатов определений . . . . .	6
11 Протокол испытаний . . . . .	8
12 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости . . . . .	8
13 Контроль качества результатов измерений в лаборатории . . . . .	9
14 Требования безопасности . . . . .	9
Приложение А (справочное) Принцип количественного определения ферментативной активности . . . . .	10
Приложение Б (справочное) Проверка правильности результатов измерений . . . . .	11
Библиография . . . . .	12

## ПРОДУКЦИЯ СОКОВАЯ

**Определение D-изолимонной кислоты ферментативным методом**

Juice products.

Determination of D-isocitric acid content by enzymatic method

Дата введения — 2019—07—01

**1 Область применения**

Настоящий стандарт распространяется на фруктовые и овощные соки, в том числе концентрированные, нектары, сокосодержащие напитки, пюре и концентрированные пюре, морсы и концентрированные морсы (далее — соковая продукция) и устанавливает метод определения (измерения) массовой концентрации D-изолимонной кислоты в виде свободной кислоты или ее соли, включая эфиры и лактоны.

Диапазон измерений массовой концентрации D-изолимонной кислоты от 0,01 до 0,5 г/дм<sup>3</sup> включительно.

**2 Нормативные ссылки**

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

ГОСТ 12.0.004—2015 Система стандартов безопасности труда. Организация обучения безопасности труда. Общие положения

ГОСТ 12.1.007—76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.019—2017\* Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ 12.4.021—75 Система стандартов безопасности труда. Системы вентиляционные. Общие требования

ГОСТ 12.4.103—83 Система стандартов безопасности труда. Одежда специальная защитная, средства индивидуальной защиты ног и рук. Классификация

ГОСТ OIML R 76-1—2011 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

ГОСТ 1770—74 (ISO 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилинды, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ ISO 2173—2013 Продукты переработки фруктов и овощей. Рефрактометрический метод определения растворимых сухих веществ

ГОСТ 2603—79 Реактивы. Ацетон. Технические условия

ГОСТ 3118—77 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

\* В Российской Федерации действует ГОСТ Р 12.1.019—2009.

ГОСТ ISO 3696—2013<sup>\*</sup> Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы контроля

ГОСТ 3760—79 Реактивы. Аммиак водный. Технические условия

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

ГОСТ 4166—76 Реактивы. Натрий сернокислый. Технические условия

ГОСТ 4328—77 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ ИСО 5725-2—2003<sup>\*\*</sup> Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений

ГОСТ ИСО 5725-6—2003<sup>\*\*\*</sup> Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике

ГОСТ 10652—73 Реактивы. Соль динатриевая этилендиамин-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты 2-водная (трилон Б). Технические условия

ГОСТ 25336—82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 26313—2014 Продукты переработки фруктов и овощей. Правила приемки и методы отбора проб

ГОСТ 26671—2014 Продукты переработки фруктов и овощей, консервы мясные и мясорастительные. Подготовка проб для лабораторных анализов

ГОСТ 28311—89 Дозаторы медицинские лабораторные. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 33276—2015 Продукция соковая. Методы определения относительной плотности

**П р и м е ч а н и е** — При использовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя за текущий год. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при использовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

### 3 Термины, определения, обозначения и сокращения

#### 3.1 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

3.1.1 **массовая концентрация D-изолимонной кислоты**: Содержание D-изолимонной кислоты и ее солей, включая эфиры и лактоны (в пересчете на D-изолимонную кислоту), определенное в соответствии с методом, установленным настоящим стандартом.

3.1.2 **стандартная единица активности фермента (Е)**: Количество фермента, которое является катализатором превращения (образования) 1 мкмоль вещества в минуту при температуре 25 °С.

#### 3.2 Обозначения и сокращения

В настоящем стандарте применены следующие обозначения и сокращения:

ИЦДГ — изоцитратдегидрогеназа, ЕС 1.1.1.42 [1];

НАД (NAD) — никотинамидаденидиндинуклеотид, окисленная форма;

НАДН (NADH) — никотинамидаденидиндинуклеотид, восстановленная форма;

CAS — уникальный числовой идентификатор химических соединений<sup>4</sup>.

\* В Российской Федерации действует ГОСТ Р 52501—2005 «Вода для лабораторного анализа. Технические условия».

<sup>\*\*</sup> В Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 5725-2—2002.

<sup>\*\*\*</sup> В Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002.

<sup>4</sup> По реестру Химической реферативной службы (Chemical Abstracts Service).

## 4 Сущность метода

Метод основан на осаждении D-изолимонной кислоты в виде соли бария, с последующим перерасторовением, и прямом ферментативном декарбоксилировании иона изо-цитата под действием НАД в присутствии фермента ИЦДГ, с последующим фотометрическим измерением количества образовавшегося НАДН, эквивалентного количеству D-изолимонной кислоты.

## 5 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда, реактивы и материалы

Весы неавтоматического действия специального (I) класса точности по ГОСТ OIML R 76-1 с пределами допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания  $\pm 0,001$  г.

Спектрофотометр, позволяющий проводить измерения при длине волны 340 нм с пределами допускаемой абсолютной погрешности измерений коэффициента пропускания не более 1 %, или спектрофотометр, оснащенный ртутной лампой, позволяющий проводить измерения при длинах волн 365 или 334 нм.

Кюветы из оптического стекла или полимерные с длиной оптического пути 10 мм для проведения фотометрических измерений в интервале длин волн от 334 до 365 нм.

Иономер или pH-метр в комплекте с комбинированным микрозлектродом для измерений в растворах объемом не менее 2 см<sup>3</sup>, с погрешностью измерений не более 0,05 ед. pH.

Дозаторы медицинские лабораторные объемом дозирования 1, 0,2 и 0,02 см<sup>3</sup>, по ГОСТ 28311.

Баня водяная лабораторная.

Центрифуга лабораторная, обеспечивающая фактор разделения не менее 1000 г, с ротором и соответствующим адаптером для пробирок.

Мешалка магнитная с угловой скоростью вращения от 400 до 1200 мин<sup>-1</sup>.

Секундомер механический или электронный.

Посуда мерная лабораторная стеклянная 2-го класса точности по ГОСТ 1770:

- цилиндры 1—100—2, 1—500—2;

- колбы мерные с пластмассовой пробкой 2а—50—2, 2а—100—2 и 2а—1000—2.

Посуда лабораторная стеклянная по ГОСТ 25336:

- воронки лабораторные;

- стаканы вместимостью В-1—100, В-1—500;

- колбы конические Кн-3—250—34.

Фильтры мембранные с размером пор 0,45 мкм, диаметром 13 или 47 мм.

Фильтры бумажные.

Шпатели пластиковые или палочки стеклянные оплавленные длиной от 2 до 5 см для перемешивания содержимого кюветы.

Пробирки центрифужные из полимерного материала вместимостью 15, 50 и 100 см<sup>3</sup> с завинчивающимися крышками.

Набор реагентов, включающий\*:

- реагент 1 — флакон, содержащий буферный раствор на основе имидазола, pH 7,1;

- реагент 2 — флакон, содержащий лиофилизат НАД и сульфат марганца;

- реагент 3 — флакон, содержащий лиофилизат ИЦДГ, активностью 5 Е;

- реагент 4 — контрольный раствор D-изолимонной кислоты.

Поливинилполипирролидон (ПВПП) низкомолекулярный или полиамид (ПА).

Аммиак водный по ГОСТ 3760, ч. д. а., раствор массовой долей 25 %.

Ацетон по ГОСТ 2603, ч. д. а.

Барий хлорид 2-водный по ГОСТ 4108, х. ч.

Гидроокись натрия по ГОСТ 4328, ч. д. а.

Кислота соляная по ГОСТ 3118, х. ч.

Натрий сернокислый по ГОСТ 4166, ч. д. а.

Трис-(гидроксиметил)-аминометан, массовой долей основного вещества не менее 98 %.

\* Например, готовые к применению наборы для определения D-изолимонной кислоты фирмы R-Biopharm AG, каталожный номер 10414433035. Данная информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не исключает возможность применения наборов других фирм или растворов, приготовленных в лаборатории из отдельных реагентов.

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

Вода для лабораторного анализа по ГОСТ ISO 3696, не ниже 2-й степени чистоты.

Уголь активированный, специально подготовленный\*.

Допускается применение других средств измерений, вспомогательного оборудования, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам, а также посуды, материалов и реагентов, по качеству не ниже вышеуказанных.

## 6 Отбор и подготовка проб

6.1 Отбор проб — по ГОСТ 26313, подготовка проб — по ГОСТ 26671.

6.2 Продукты со стабильной мутной взвесью перед разбавлением тщательно перемешивают и центрифугируют при скорости вращения  $4000 \text{ мин}^{-1}$  в течение 10 мин и фильтруют через бумажный или мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

6.3 Окрашенную соковую продукцию обесцвечивают путем добавления ПА или ПВПП. В центрифужную пробирку вместимостью 15 или 50 см<sup>3</sup> к 10 см<sup>3</sup> пробы добавляют около 0,1 г ПА или 0,1 г ПВПП, затем интенсивно встряхивают в пробирке в течение 1 мин, центрифугируют при скорости вращения  $4000 \text{ мин}^{-1}$  в течение 10 мин и фильтруют через бумажный или мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. Для определения используют прозрачный фильтрат.

6.4 Концентрированную соковую продукцию разбавляют водой до заданного значения массовой доли растворимых сухих веществ в соответствии с [2] (приложение 2). Массовую долю растворимых сухих веществ определяют по ГОСТ ISO 2173 или ГОСТ 33276.

## 7 Условия проведения измерений

При подготовке к проведению измерений и при проведении измерений соблюдают следующие условия.

- температура окружающего воздуха .....  $(20 \pm 5) ^\circ\text{C}$ ;
- атмосферное давление .....  $(97 \pm 10) \text{ кПа}$ ;
- относительная влажность ..... не более 75 %;
- напряжение в питающей сети .....  $(220 \pm 20) \text{ В}$ ;
- частота тока в питающей сети .....  $(50 \pm 1) \text{ Гц}$ .

В помещениях, предназначенных для проведения измерений, не допускается загрязненность воздуха рабочей зоны пылью, агрессивными веществами, должны отсутствовать факторы, влияющие на измерения массы и объема.

## 8 Подготовка к проведению определений

### 8.1 Подготовка растворов реагентов из готового набора

Приготовление растворов реагентов проводят в соответствии с инструкцией, прилагаемой к набору.

### 8.2 Подготовка растворов реагентов для осаждения и определения общего содержания D-изолимонной кислоты

#### 8.2.1 Приготовление раствора хлорида бария массовой концентрации 300 г/дм<sup>3</sup>

Взвешивают 30,0 г 2-водного хлорида бария в стакане вместимостью 500 см<sup>3</sup>, растворяют в небольшом количестве воды и переносят, ополаскивая стенки стакана, в мерную колбу вместимостью, 100 см<sup>3</sup>, доводят до метки водой и тщательно перемешивают.

Раствор устойчив при комнатной температуре в течение одного года.

#### 8.2.2 Приготовление раствора сернокислого натрия массовой концентрации 71 г/дм<sup>3</sup>

Взвешивают 71,0 г сернокислого натрия в стакане вместимостью 500 см<sup>3</sup>, растворяют в небольшом количестве воды и переносят, ополаскивая стенки стакана, в мерную колбу вместимостью 1000 см<sup>3</sup>, доводят до метки водой и тщательно перемешивают.

Раствор устойчив при комнатной температуре в течение одного года.

\* Например, каталожный номер 102186, Merck. Данная информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не исключает возможность применения других марок.

**8.2.3 Приготовление раствора соляной кислоты молярной концентрации 1 моль/дм<sup>3</sup>**

Мерным цилиндром вместимостью 100 см<sup>3</sup> осторожно переносят 90,0 см<sup>3</sup> концентрированной соляной кислоты в мерную колбу вместимостью 1000 см<sup>3</sup>, в которую добавлено небольшое количество воды, содержимое колбы после охлаждения доводят до метки водой, тщательно перемешивают.

Раствор устойчив при комнатной температуре в течение одного года.

**8.2.4 Приготовление буферного раствора 7,4 ед. pH**

Взвешивают 2,42 г трис-(гидроксиметил)-аминометана и 35 мг динатриевой соли этилендиаминететрауксусной кислоты, растворяют в стакане вместимостью 100 см<sup>3</sup> в 80 см<sup>3</sup> воды, доводят добавляя по каплям раствор соляной кислоты до 7,4 ед. pH, регистрируя показания pH-метра, переносят полученный раствор в мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> и доводят до метки водой, тщательно перемешивают.

Буферный раствор устойчив при температуре 4 °С в течение одного года.

**8.2.5 Приготовление раствора соляной кислоты молярной концентрации 4 моль/дм<sup>3</sup>**

Мерным цилиндром вместимостью 500 см<sup>3</sup> осторожно переносят 360,0 см<sup>3</sup> концентрированной соляной кислоты в мерную колбу вместимостью 1000 см<sup>3</sup>, в которую добавлено небольшое количество воды, содержимое колбы после охлаждения доводят до метки водой, тщательно перемешивают.

Раствор устойчив при комнатной температуре в течение одного года.

**8.2.6 Приготовление раствора гидроокиси натрия молярной концентрации 4 моль/дм<sup>3</sup>**

Взвешивают 16,0 г гидроокиси натрия в стакане вместимостью 100 см<sup>3</sup>, растворяют при постоянном перемешивании в небольшом количестве воды и переносят, ополаскивая стенки стакана в мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup>, доводят до метки водой и тщательно перемешивают.

Раствор хранят в емкости из полимерного материала при комнатной температуре не более 2 мес.

## 9 Порядок проведения измерений

**9.1 Осаждение D-изолимонной кислоты из пробы соковой продукции**

В пробирке для центрифугирования вместимостью 100 см<sup>3</sup> смешивают 10 см<sup>3</sup> пробы соковой продукции с 5 см<sup>3</sup> раствора гидроокиси натрия (см. 8.2.6) и выдерживают в течение 10 мин при комнатной температуре. Последовательно добавляют 5 см<sup>3</sup> раствора соляной кислоты (см. 8.2.5), 2 см<sup>3</sup> раствора аммиака массовой долей 25 %, 3 см<sup>3</sup> раствора хлорида бария (см. 8.2.1) и 20 см<sup>3</sup> ацетона, тщательно перемешивают стеклянной палочкой.

**Примечание** — Для соковой продукции с высокой кислотностью (грейпфрут, апельсин и т. п.) объем раствора аммиака увеличивают до 2,5 см<sup>3</sup> или предварительно нейтрализуют пробу раствором гидроокиси натрия (см. 8.2.6).

Полученный раствор выдерживают в течение 10 мин, затем центрифугируют в течение 5 мин. Супернатант осторожно декантируют, а осадок в стакане для центрифугирования растворяют в 20 см<sup>3</sup> раствора сернокислого натрия (см. 8.2.2), перемешивая содержимое центрифужной пробирки стеклянной палочкой. Для ускорения растворения осадка стакан помещают на кипящую водяную баню и выдерживают в течение 10 мин, периодически перемешивая. После охлаждения до комнатной температуры раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 см<sup>3</sup> и доводят буферным раствором (см. 8.2.4) до метки, тщательно перемешивают.

Затем переносят раствор из мерной колбы в коническую вместимостью 250 см<sup>3</sup>, в которую предварительно добавлен 1 г активированного угля, перемешивают, выдерживают в течение 5 мин при комнатной температуре и фильтруют через складчатый бумажный фильтр.

Прозрачный бесцветный фильтрат используют для ферментативного определения по 9.3.

**9.2 Приготовление раствора пробы**

Для обеспечения достоверности результатов определения количество D-изолимонной кислоты в кювете должно быть от 3 до 100 мкг для измерений при 365 нм (или от 2 до 50 мкг — для измерений при 334 и 340 нм). Для достижения этого условия фильтрат разбавляют водой в соответствии с требованиями, указанными в таблице 1 или в соответствии с инструкцией к набору реагентов.

Таблица 1

Ожидаемая массовая концентрация в пробе, г/дм <sup>3</sup> , при измерениях на длинах волн		Разбавление водой	Фактор разбавления ( <i>F</i> )
340 нм или 334 нм	365 нм		
До 0,5 включ.	До 1,0 включ.	Не разбавляется	1
Св. 0,5 » 5,0 »	Св. 1,0 » 10,0 »	1 + 9	10
» 5,0 »	» 10,0 »	1 + 99	100

Если массовая концентрация D-изолимонной кислоты в фильтрате менее 0,02 г/дм<sup>3</sup>, то ее объем, вносимый в кювету, может быть увеличен до 2,00 см<sup>3</sup>. В этом случае следует снизить на соответствующую величину объем воды, добавляемой в кювету, для поддержания на постоянном уровне общего объема инкубационной смеси в кювете.

При высоких значениях начальной оптической плотности (более 1,000) готовят новый раствор, увеличивая разбавление, как указано в таблице 1. Рекомендуется также уменьшить объем раствора фильтрата в кювете, компенсируя снижение общего объема в кювете увеличением объема воды.

При вычислении массовой концентрации D-изолимонной кислоты необходимо учесть измененный объем раствора фильтрата в формуле (2).

### 9.3 Ферментативная реакция и количественное определение D-изолимонной кислоты

Проводят два параллельных определения в условиях повторяемости в соответствии с требованиями ГОСТ ИСО 5725-1 (подраздел 3.14).

В кювету вносят реагенты 1—3 (см. раздел 5), воду и раствор пробы, приготовленной по 9.2, в соответствии с требованиями, указанными в таблице 2 или в соответствии с инструкцией к набору реагентов.

Таблица 2 — Порядок добавления реагентов для проведения измерений

Наименование растворов, дозируемых в кювету, и последовательность их дозирования	Объем, вносимый в кюветы, см <sup>3</sup>	
	Холостой раствор (контроль)	Раствор пробы
Реактив 1 + реагент 2		1,00
Раствор пробы (см. 9.2)	—	0,10
Вода для анализа	2,00	1,90
Шпателем перемешивают растворы в кюветах, через 10 мин проводят измерения оптических плотностей растворов ( $A_1$ ) относительно оптической плотности воздуха		
Реактив 3		0,05
Шпателем осторожно перемешивают содержимое кювет и через 10 мин проводят измерения оптических плотностей растворов ( $A_2$ ) относительно оптической плотности воздуха. Измерения оптических плотностей растворов ( $A_2$ ) повторяют с интервалом 2 мин до окончания реакции, что выражается в установлении постоянного значения оптической плотности раствора.		

## 10 Обработка и оформление результатов определений

10.1 Основой для вычисления является линейная зависимость между количеством окисленного НАДН и количеством D-изолимонной кислоты (см. приложение А).

Разность значений оптических плотностей  $\Delta A$  для контрольной пробы и раствора пробы вычисляют по формуле

$$\Delta A = (A_2 - A_1)_{\text{проба}} - (A_2 - A_1)_{\text{контроль}}, \quad (1)$$

где  $(A_2 - A_1)_{\text{проба}}$  — разность оптических плотностей раствора пробы, е. о. п.;

$(A_2 - A_1)_{\text{контроль}}$  — разность оптических плотностей холостого раствора, е. о. п.

Если  $(A_2 - A_1)_{\text{контроль}}$  имеет отрицательное значение, то его суммируют со значением  $(A_2 - A_1)_{\text{проба}}$ . Значение  $\Delta A$  должно составлять не менее 0,100 ед. Если значение  $\Delta A$  менее 0,100 ед., то следует повторно приготовить пробу, увеличив ее навеску или уменьшив разбавление.

Если значение  $(A_2 - A_1)_{\text{проба}}$  более 1,000 ед. (измерение при 340 или 334 нм) или более 0,500 ед. (измерение при 365 нм), то в пробе присутствует избыток D-изолимонной кислоты. В этом случае фильтрат необходимо разбавить в соответствии с требованиями 9.2.

10.2 Массовую концентрацию D-изолимонной кислоты  $C$ , г/дм<sup>3</sup>, в растворе фильтрата вычисляют в соответствии с законом Ламберта-Бера по формуле

$$C = \frac{V \cdot F \cdot M}{\epsilon \cdot d \cdot V_1 \cdot 1000} \cdot \Delta A, \quad (2)$$

где  $V$  — общий объем раствора в кювете (см. таблицу 2), см<sup>3</sup>;

$F$  — фактор разбавления (см. 9.2);

$M$  — молекулярная масса D-изолимонной кислоты,  $M = 192,1$  г/моль;

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

— при длине волны 340 нм — 6,3,

— длине волны 365 нм — 3,5 (измерение с ртутной лампой),

— длине волны 334 нм — 6,18 (измерение с ртутной лампой);

$d$  — толщина поглащающего слоя в кювете, см;

$V_1$  — объем раствора пробы, взятой для определения (см. таблицу 2), см<sup>3</sup>;

1000 — коэффициент пересчета из см<sup>3</sup> в дм<sup>3</sup>;

$\Delta A$  — разность оптических плотностей, е. о. п.

При толщине поглащающего слоя в кювете 1 см и объеме рабочего раствора пробы 0,10 см<sup>3</sup> формула для вычисления массовой концентрации  $C$ , г/дм<sup>3</sup>, преобразуется следующим образом:

$$C = \frac{3,05 \cdot F \cdot 192,1}{\epsilon \cdot 1,00 \cdot 0,10 \cdot 1000} \cdot \Delta A = \frac{5,859 \cdot F}{\epsilon} \cdot \Delta A. \quad (3)$$

При использовании готовых наборов реактивов численный коэффициент (3,05) в формуле (3) может быть иным из-за изменения суммарного объема раствора ( $V$ ) в кювете.

10.3 За окончательный результат измерения принимают среднеарифметическое значение  $\bar{C}$ , г/дм<sup>3</sup>, результатов двух параллельных измерений, относительное расхождение между которыми не превышает допускаемое расхождение

$$|C_1 - C_2| \leq r, \quad (4)$$

где  $C_1, C_2$  — результаты параллельных измерений, г/дм<sup>3</sup>;

$r$  — значение предела повторяемости, %.

При невыполнении этого условия получают результаты еще двух параллельных измерений и окончательный результат устанавливают в соответствии с ГОСТ ИСО 5725-6 (подраздел 5.2).

Абсолютное расхождение между результатами двух параллельных измерений, выполненных в условиях повторяемости по ГОСТ ИСО 5725-2, не должно превышать более чем в 5 % случаев значения показателя повторяемости  $r = 0,0025$  г/дм<sup>3</sup>.

Абсолютное расхождение между результатами двух измерений, выполненных в условиях воспроизводимости по ГОСТ ИСО 5725-2, не должно превышать более чем в 5 % случаев значения показателя воспроизводимости  $R = 0,0044$  г/дм<sup>3</sup>.

Правильность полученных результатов контролируют с помощью контрольного раствора из набора (реактив 4) согласно приложению Б.

10.4 При определении D-изолимонной кислоты в концентрированной соковой продукции, а также в соковой продукции с высокой вязкостью или очень большим содержанием мякоти результаты определения могут быть пересчитаны на массовую долю  $X$ , %, по формуле

$$X = \frac{C \cdot V \cdot 1000}{m}, \quad (5)$$

где  $C$  — массовая концентрация, вычисленная по формуле (3), г/дм<sup>3</sup>;

$V$  — объем концентрированной соковой продукции с высокой вязкостью и/или очень большим содержанием мякоти, полученный в результате разведения, дм<sup>3</sup>;

1000 — коэффициент пересчета в процентах;

$m$  — масса концентрированной соковой продукции с высокой вязкостью и/или очень большим содержанием мякоти, взятых для разведения, г.

Численное значение результата измерений должно оканчиваться цифрой того же разряда, что и значение границ абсолютной погрешности.

В случае, если массовая концентрация D-изолимонной кислоты выходит за пределы нижней границы диапазона измерений, приводят следующую запись: «Массовая концентрация D-изолимонной кислоты менее 0,01 г/дм<sup>3</sup>».

## 11 Протокол испытаний

В протоколе испытаний указывают:

- полученные результаты испытаний;
- обозначение настоящего стандарта;
- значение массовой доли растворимых сухих веществ или относительной плотности для концентрированной соковой продукции;
- все рабочие условия, не установленные настоящим стандартом или касающиеся как необязательных, так и любых других подробностей, которые могут повлиять на конечный результат;
- всю информацию, необходимую для идентификации пробы.

## 12 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости

12.1 Проверку приемлемости результатов измерений в условиях воспроизводимости проводят:

- при возникновении спорных ситуаций между двумя лабораториями;
- проверке совместности результатов измерений, полученных при сравнительных испытаниях.

12.2 Для проведения проверки приемлемости результатов измерений в условиях воспроизводимости каждая лаборатория использует контрольные пробы, оставленные на хранение.

Приемлемость результатов измерений, полученных в двух лабораториях, оценивают сравнением разности этих результатов с допускаемой (критической) разностью  $CD_{0,95}$  по формуле

$$|C_1 - C_2| \leq 0,01 CD_{0,95} \cdot \bar{\bar{C}} \text{ или } |\bar{X}_1 - \bar{X}_2| \leq 0,01 \cdot CD_{0,95} \cdot \bar{\bar{X}}, \quad (6)$$

где  $\bar{C}_1, \bar{C}_2$  ( $\bar{X}_1, \bar{X}_2$ ) — окончательные результаты измерений массовой концентрации (массовой доли) D-изолимонной кислоты, полученные в первой и второй лабораториях, г/дм<sup>3</sup> (%);

$CD_{0,95}$  — значение критической разности, %;

$\bar{\bar{C}}, \bar{\bar{X}}$  — среднеарифметическое значение окончательных результатов измерений массовой концентрации (массовой доли) D-изолимонной кислоты, полученных в первой и второй лабораториях, г/дм<sup>3</sup> (%).

Если допускаемая разность не превышена, то приемлемы оба результата измерений, проводимых двумя лабораториями, и в качестве окончательного результата используют их среднеарифметическое значение. Если допускаемая разность превышена, то выполняют процедуры в соответствии с ГОСТ ИСО 5725-6 (пункт 5.3.3).

При разногласиях руководствуются ГОСТ ИСО 5725-6 (пункт 5.3.4).

## 13 Контроль качества результатов измерений в лаборатории

Контроль качества результатов измерений в лаборатории осуществляют, используя контроль стабильности среднеквадратического (стандартного) отклонения промежуточной прецизионности. Проверку стабильности осуществляют с применением контрольных карт Шухарта. Периодичность контроля стабильности результатов выполняемых измерений регламентируются Руководством по качеству лаборатории. Рекомендуется устанавливать контролируемый период так, чтобы количество результатов контрольных измерений было от 20 до 30. При неудовлетворительных результатах контроля, например, при превышении предела действия или регулярном превышении предела предупреждения, выясняют причины этих отклонений, в том числе проводят смену реагентов, проверяют работу оператора.

## 14 Требования безопасности

Требования безопасности должны соответствовать положениям, изложенным в руководствах по эксплуатации лабораторного оборудования и инструкции к набору реагентов.

При выполнении определений соблюдают требования техники безопасности при работе с химическими реагентами по ГОСТ 12.1.007 и ГОСТ 12.4.103.

Помещение, в котором проводят измерения, должно быть оборудовано общей проточно-вытяжной вентиляцией по ГОСТ 12.4.021.

Электробезопасность при работе с электроустановками — по ГОСТ 12.1.019.

Организация обучения работающих безопасности труда — по ГОСТ 12.0.004.

К выполнению измерений, обработке и оформлению результатов измерений допускаются специалисты, имеющие опыт работы с лабораторным оборудованием и изучившие настоящий метод.

Приложение А  
(справочное)

Принцип количественного определения ферментативной активности

А.1 Принцип количественного определения ферментативной активности приведен на рисунках А.1 и А.2.

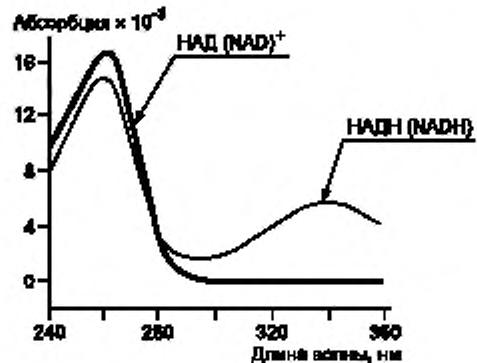


Рисунок А.1 — Различие в спектрах поглощения между окисленной и восстановленной формами никотинамидааденидинуклеотида (НАДН) в ультрафиолетовой области спектра

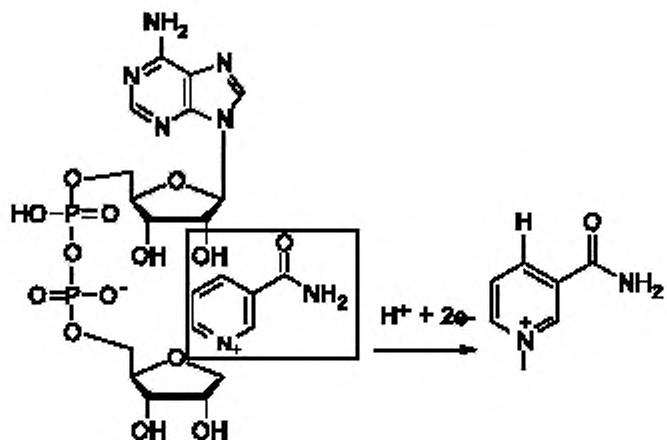


Рисунок А.2 — Реакция обратимого окисления никотинамидаденидинуклеотида

**Приложение Б**  
**(справочное)**

**Проверка правильности результатов измерений**

Б.1 Проверку правильности результатов проводят для каждой серии определений с использованием метода добавок, согласно инструкции, прилагаемой к набору.

Б.2 Для проверки используют контрольный раствор D-изолимонной кислоты (реактив 4) из набора реагентов в качестве внутреннего стандарта, как указано в таблице Б.1.

**Таблица Б.1 — Порядок добавления реагентов для проведения измерений с использованием раствора внутреннего стандарта**

Наименование растворов, дозируемых в кювету, и последовательность их дозирования	Объем, вносимый в кюветы, см <sup>3</sup>			
	Холостой раствор	Раствор пробы	Контрольный раствор	Контрольный раствор + раствор пробы
Реактив 1 + реактив 2	1,00			
Вода	2,00	1,90	1,90	1,90
Раствор пробы (см. 9.2)	—	0,10	—	0,05
Реактив 4	—	—	0,10	0,05

Шпателем перемешивают растворы в кюветах, через 3 мин проводят измерения оптических плотностей растворов ( $A_1$ ) относительно оптической плотности воздуха. Продолжают далее, как указано в разделе 9.

Б.3 Степень нахождения D-изолимонной кислоты в контрольном растворе  $W$ , %, вычисляют по формуле

$$W = \frac{\Delta A_{\text{проба+контроль}} - \Delta A_{\text{проба}}}{\Delta A_{\text{контроль}}} \cdot 100, \quad (Б.1)$$

где  $\Delta A_{\text{проба+контроль}}$  — разность оптических плотностей раствора пробы и контрольного раствора, е. о. п.;

$\Delta A_{\text{проба}}$  — разность оптических плотностей раствора пробы, е. о. п.;

$\Delta A_{\text{контроль}}$  — разность оптических плотностей контрольного раствора, е. о. п.;

100 — коэффициент пересчета в процентах.

Б.4 Массовая концентрация D-изолимонной кислоты, определенная в результате контроля, должна быть в пределах от 95 % до 105 % от концентрации контрольного раствора. В случае, если вычисленное значение  $W$  находится вне указанного диапазона, повторяют определение со свежеприготовленными растворами реагентов (буферного раствора, раствора НАДН, ИЦДГ).

## 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] Технический регламент Таможенного союза  
TP TC 023/2011 Технический регламент Таможенного союза на соковую продукцию из фруктов и овощей

---

УДК 664.863.001.4:006.354

МКС 67.080.01

Ключевые слова: продукция соковая, массовая концентрация, D-изолимонная кислота, определение, спектрофотометр, ферментативная реакция

---

## Б3 6—2018/50

Редактор *Л.В. Коротникова*  
Технический редактор *И.Е. Черелкоева*  
Корректор *М.И. Першина*  
Компьютерная верстка *А.Н. Золотаревой*

Сдано в набор 02.07.2018. Подписано в печать 12.07.2018 Формат 60×84 $\frac{1}{8}$ . Гарнитура Ариал  
Усл. печ. л. 1,86 Уч.-изд л. 1,88.  
Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

---

Создана в единичном исполнении ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» для комплектования Федерального  
информационного фонда стандартов, 123001 Москва, Гранатный пер., 4.  
[www.gostinfo.ru](http://www.gostinfo.ru) [info@gostinfo.ru](mailto:info@gostinfo.ru)