

к СТБ EN 12631-2007 Соки фруктовые и овощные. Ферментативный метод определения содержания D и L-молочной кислоты (лактата) с помощью спектрометрии с использованием NAD

В каком месте	Напечатано	Должно быть
Подраздел 5.11	4,6 мл гидроокиси натрия	4,6 мл раствора гидроокиси натрия
Подраздел 5.13	1,0 мл чистой отстоявшейся жидкости	1,0 мл прозрачной надосадочной жидкости
Подраздел 7.1. Наименование третий абзац	<b>7.1 Приготовление образца для испытания</b> Анализ с помощью данного метода основывается на объемном выражении, результаты выражают на литр образца. Анализ концентрированных образцов также может проводиться на объемном выражении после разведения до известной относительной плотности. В этом случае должна быть указана относительная плотность. Зная массу образца и принимая во внимание для анализа фактор разведения, результаты могут также выражаться на килограмм продукта. В продуктах с высокой вязкостью и/или очень высоким содержанием клеток (например, волокнистая масса) определение на основе взвешенного образца для испытаний является обычной процедурой.	<b>7.1 Приготовление образца для измерения</b> Для измерений отбирают определенный объем пробы, а результаты выражают в миллиграммах на литр образца. Измерения в концентрированных образцах проводят после их разведения до получения известного значения относительной плотности. Результаты измерений концентрированной пробы могут быть также выражены в миллиграммах на килограмм. При расчете результата измерений учитывают массу концентрированной пробы и фактор разведения. При осуществлении измерений в продуктах с высокой вязкостью и/или очень высоким содержанием мякоти (например, волокнистая масса) образец взвешивают, а содержание искомого вещества выражают в миллиграммах на килограмм продукта, зная массу навески.
четвертый абзац	0,45 мкг	0,45 мкм
Подраздел 7.2. Наименование	<b>7.2 Процедура испытания</b>	<b>7.2 Процедура измерения</b>
Пункт 7.2.1, второй абзац	Максимальная абсорбция NADH равна 340 нм. При использовании спектрофотометра с непостоянной длиной волны (6.5) измерение проводят при максимальной абсорбции. При использовании спектро-линейного фотометра с ртутной (дуговой) лампой абсорбция измеряется при длине волны 334 нм или 365 нм.	Измерение проводят при длине волны 340 нм, соответствующей абсорбционному максимуму NADH. При использовании спектрофотометра с непостоянной длиной волны (6.5) измерение проводят при длине волны, соответствующей абсорбционному максимуму. При использовании спектролинейного фотометра с ртутной (дуговой) лампой измерения проводят при длине волны, соответствующей абсорбционному максимуму 334 нм или 365 нм.
Пункт 7.2.2, третий, четвертый абзацы	отсчитывают	измеряют
Пункт 7.2.3, второй, третий, абзацы пятый абзац	отсчитывают  для раствора пустой пробы и испытания образца	измеряют  для раствора пустой пробы и контролируемого образца

(Продолжение см. с. 106)

В каком месте	Напечатано	Должно быть
Пункт 7.2.4, второй абзац третий абзац  четвертый абзац  шестой абзац	Смешивают и через 5 мин рассчитывают оптическую плотность $A_1$ . Смешивают и через 30 мин отсчитывают оптическую плотность $A_2$ .  оптическая плотность может быть отсчитана через 20 мин. Рассчитывают различия абсорбции до и после реакции ( $A_2 - A_1$ ) для испытания раствора пустой пробы и для испытания образца	Перемешивают и через 5 мин измеряют оптическую плотность $A_1$ . Перемешивают и через 30 мин измеряют оптическую плотность $A_2$ .  оптическая плотность может быть измерена через 20 мин. Рассчитывают разность значений оптических плотностей до и после реакции ( $A_2 - A_1$ ) для раствора пустой пробы и контролируемого образца
Раздел 8, формула (7), экспликация к формуле (7)  шестой абзац	$M$ – молекулярная масса молочной кислоты (90,1 г/моль); $\epsilon$ – молярный показатель поглощения NADH при:  При использовании коммерчески доступного комбинированного испытательного комплекта числовые коэффициенты 2469 и 2496 в уравнениях (8) и (9) могут быть различными.	$M$ – молярная масса молочной кислоты (90,1 г/моль); $\epsilon$ – молярный коэффициент поглощения NADH при:  При использовании других объемов растворов пробы числовые коэффициенты 2469 и 2496 в уравнениях (8) и (9) могут быть различными.
Раздел 9	межлабораторных испытаний межлабораторными испытаниями	межлабораторных измерений межлабораторными измерениями
Подраздел 9.1, первый абзац	независимых отдельных испытаний	независимых отдельных измерений
Подраздел 9.2, первый абзац	отдельными результатами испытаний, полученными одним и тем же методом на идентичном исследуемом материале, запрототипированными двумя лабораториями	отдельными результатами измерений, полученными одним и тем же методом на идентичном исследуемом материале двумя лабораториями
Раздел 10. Наименование первый, девятый, десятый абзацы  шестой, седьмой абзацы	<b>10 Протокол испытаний</b>  испытаний   испытания	<b>10 Протокол измерений</b>  измерений   измерения
Приложение В, первый абзац второй абзац	в межлабораторных испытаниях Испытание было проведено  Год проведения межлабораторного испытания	в межлабораторных измерениях Измерение было проведено  Год проведения межлабораторного измерения
Приложение С, наименование	<b>Проведение испытаний при «ползущих» реакциях</b>	<b>Проведение измерений при «ползущих» реакциях</b>

(ИУ ТНПА № 8-2014)

Соки фруктовые и овощные  
**ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ  
СОДЕРЖАНИЯ D И L-МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ  
(ЛАКТАТА) С ПОМОЩЬЮ СПЕКТРОМЕТРИИ  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ NAD**

Сокі з садавіны і агародніны  
**ФЕРМЕНТАТЫЎНЫ МЕТАД ВYZНАЧЭННЯ  
ЗМЯШЧЭННЯ D I L-МАЛОЧНАЙ КІСЛАТЫ  
(ЛАКТАТА) З ДАПАМОГАЙ СПЕКТРАМЕТРЫІ  
З ВЫКАРЫСТАННЕМ NAD**

(EN 12631:1999, IDT)

Издание официальное

БЗ 12-2007



**Ключевые слова:** соки фруктовые и овощные, энзиматическое определение, D-молочная кислота, L-молочная кислота, спектрометрический метод, NAD

---

## Предисловие

Цели, основные принципы, положения по государственному регулированию и управлению в области технического нормирования и стандартизации установлены Законом Республики Беларусь «О техническом нормировании и стандартизации».

1 ПОДГОТОВЛЕН научно-производственным республиканским унитарным предприятием «Белорусский государственный институт стандартизации и сертификации (БелГИСС)»

ВНЕСЕН Белорусским государственным концерном пищевой промышленности «Белгоспищепром»

2 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ постановлением Госстандарта Республики Беларусь от 29 декабря 2008 г. № 67

3 Настоящий стандарт идентичен европейскому стандарту EN 12631:1999 Fruit and vegetables juices. Enzymatic determination of D- and L-lactic acid (lactate) content-NAD spectrometric method (Соки фруктовые и овощные. Ферментативный метод определения содержания D- и L-молочной кислоты (лактата) с помощью спектрометрии с использованием NAD).

Европейский стандарт разработан Техническим комитетом CEN/TC 174 «Фруктовые и овощные соки – Методы анализа», секретариат которого находится в AFNOR.

Перевод с английского языка (en).

Официальные экземпляры европейского стандарта, на основе которого подготовлен настоящий государственный стандарт, и стандартов, на которые даны ссылки, имеются в Национальном фонде ТНПА.

Степень соответствия — идентичная (IDT)

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Настоящий стандарт не может быть воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Госстандарта Республики Беларусь

---

Издан на русском языке

## Содержание

1 Область применения .....	1
2 Нормативные ссылки .....	1
3 Обозначения и сокращения .....	1
4 Сущность метода .....	1
5 Реактивы .....	2
6 Оборудование .....	3
7 Методика определения .....	3
8 Вычисления .....	5
9 Точность .....	6
10 Протокол испытаний .....	6
Приложение А (справочное) Библиография .....	7
Приложение В (справочное) Статистические результаты межлабораторных испытаний .....	8
Приложение С (справочное) Проведение испытаний при «ползущих» реакциях .....	10

---

**ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

---

**Соки фруктовые и овощные**  
**ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ D- И L-МОЛОЧНОЙ**  
**КИСЛОТЫ (ЛАКТАТА) С ПОМОЩЬЮ СПЕКТРОМЕТРИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ NAD**

**Соки з садавіны і агародніны**  
**ФЕРМЕНТАТЫЎНЫ МЕТАД ВЫЗНАЧЭННЯ ЗМЯШЧЭННЯ D- І L-МАЛОЧНАЙ КІСЛАТЫ**  
**(ЛАКТАТА) З ДАПАМОГАЙ СПЕКТРАМЕТРЫІ З ВЫКАРЫСТАННЕМ NAD**

**Fruit and vegetables juices**  
**Enzymatic determination of D- and L-lactic acid (lactate) content-NAD spectrometric method**

---

Дата введения 2008-07-01

## 1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает ферментативный метод для определения общего содержания D- и L-молочной кислоты и солей лактата во фруктовых и овощных соках и подобных им продуктах.

## 2 Нормативные ссылки

Для применения настоящего стандарта необходим следующий ссылочный документ. Для датированной ссылки применяют только указанное издание ссылочного документа.

EN ISO 3696:1995 Вода для лабораторного анализа. Технические условия и методы испытаний

## 3 Обозначения и сокращения

### 3.1 Обозначения

Для целей настоящего стандарта, применяются следующие обозначения:

*c* – молярная концентрация вещества;

*ρ* – массовая концентрация;

*φ* – объемное содержание;

*g* – ускорение силы тяжести, равное 9,81 м/с<sup>2</sup>.

### 3.2 Сокращения

Для целей настоящего стандарта, применяются следующие сокращения:

GPT – глутаматпируваттрансаминаза;

L-LDH – L-лактатдегидрогеназа;

D-LDH – D-лактатдегидрогеназа;

NAD – β-никотинамидадениндинуклеотид;

NADH – β-никотинамидадениндинуклеотид, восстановленная форма;

IU – 1-я международная единица (ME) ферментативной активности, равная количеству фермента, необходимого для катализа превращения 1 мкмоль вещества за 1 мин при температуре 25 °С в стандартных условиях.

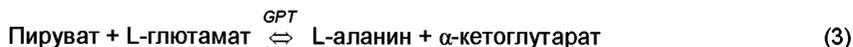
## 4 Сущность метода

L-молочная кислота (лактат) окисляется никотинамидадениндинуклеотидом (NAD) в присутствии L-лактатдегидрогеназы (L-LDH) для производства пирувата.

D-молочная кислота (лактат) окисляется тем же методом в присутствии D-лактатдегидрогеназы (D-LDH).



Равновесие реакций (1) и (2) почти полностью находится на стороне лактата. Тем не менее захват пирувата в последовательной реакции катализируется ферментом GPT в присутствии L-глутамата (уравнение 3). В этом случае равновесие может быть смещено в сторону пирувата и NADH.



Количество сформированного NADH определяют по увеличению оптической плотности при длине волны 334 нм, 340 нм или 365 нм и эквивалентно количествам D- и L-молочной кислоты, присутствующих в образце.

## 5 Реактивы

### 5.1 Общие положения

Используются только реактивы, признанной аналитической чистоты, в том числе вода по EN ISO 3696:1995 не ниже третьей категории качества.

Примечание – Возможно применение наборов реактивов, имеющих в продаже.

### 5.2 Глицилглицин

### 5.3 L-глутаминовая кислота

### 5.4 Растворы гидроокиси натрия

5.4.1 Раствор гидроокиси натрия,  $c(\text{NaOH}) = 10$  моль/л.

5.4.2 Раствор гидроокиси натрия,  $c(\text{NaOH}) = 10$  ммоль/л.

### 5.5 Никотинамидадениндинуклеотид

5.6 Глутаматпируваттрансаминаза, суспензия,  $\rho(\text{GPT}) = 10$  мг/л, удельная активность примерно 80 МЕ/мг.

5.7 L-лактатдегидрогеназа, раствор в глицероле,  $\phi(\text{L-LDH}) = 50$  %, удельная активность примерно 550 МЕ/мг.

5.8 D-лактатдегидрогеназа, суспензия в сульфате аммония,  $c(\text{D-LDH}) = 3,2$  моль/л, удельная активность примерно 300 МЕ/мг.

5.9 Стандартный раствор L-молочной кислоты,  $c(\text{L-молочная кислота}) = 1,0$  моль/л.

### 5.10 D-лактат, соль лития

### 5.11 Буферный раствор, pH = 10,0

Растворяют 4,75 г глицилглицина (5.2) и 0,88 г L-глутаминовой кислоты (5.3) в приблизительно 50 мл воды. Устанавливают до pH = 10,0 с применением приблизительно 4,6 мл гидроокиси натрия (5.4.1) и дополняют водой до 60 мл. Раствор стабилен в течение 3 мес при температуре + 4 °С.

### 5.12 Раствор никотинамидадениндинуклеотида

420 мг NAD (5.5) растворяют в 12 мл воды. Раствор стабилен в течение 4 мес при температуре + 4 °С.

### 5.13 Суспензия глутаматпируваттрансаминазы

2 мл суспензии GPT (5.6) центрифугируют в течение 10 мин приблизительно при 4000 об/мин. Отбирают и удаляют 1,0 мл чистой отстоявшейся жидкости, хорошо размешивают суспензию перед использованием. Суспензия стабильна в течение одного года при температуре + 4 °С.

#### 5.14 Раствор L-лактатдегидрогеназы

Используют неразбавленный раствор L-LDH (5.7). Раствор стабилен в течение одного года при температуре +4 °С.

#### 5.15 Суспензия D-лактатдегидрогеназы

Используют неразбавленную суспензию D-LDH (5.8). Суспензия стабильна в течение одного года при температуре +4 °С.

#### 5.16 Стандартный раствор L-молочной кислоты, $c(\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}) = 0,5$ ммоль/л.

Стандартный раствор L-молочной кислоты (5.9) разбавляют 1:2000 с помощью раствора гидроксида натрия (5.4.2). Перед использованием приготавливают свежий раствор.

#### 5.17 Стандартный раствор D-молочной кислоты, $c(\text{CH}_3\text{CHOHCOOLi}) = 0,5$ ммоль/л.

48 мг D-лактата, соли лития (5.10) растворяют в 100 мл воды. Данный раствор разбавляют водой 1:9. Перед использованием приготавливают свежий раствор.

### 6 Оборудование

Применяют следующее лабораторное оборудование:

**6.1 Пипетки для ферментного анализа**, градуированные только вдоль стержня, с длинным неградуированным наконечником.

**6.2 Пипетки**, эквивалентные 6.1 (альтернатива 6.1), например нагнетательные капиллярные пипетки.

**6.3 Кюветы**, изготовленные из кварца, стекла или пластмассы, с длиной оптического пути 1 см, которые не имеют значительной абсорбции при 334 нм, 340 нм и 365 нм.

**6.4 Спектро-линейный фотометр** с ртутной (дуговой) лампой и фильтрами для измерения при 334 нм или 365 нм.

**6.5 Спектрофотометр** с непостоянной длиной волны для измерения при 340 нм (альтернатива 6.4).

**6.6 Центрифуга**, обеспечивающая ускорение 3000g на дне центрифужной пробирки (6.8).

Примечание – Частоту вращения, требуемую для получения соответствующего ускорения центрифуги, вычисляют по формуле

$$a = 11,18 \times r \times (n/1000)^2, \quad (4)$$

где  $a$  – ускорение центрифуги;

$r$  – радиус центрифуги, измеренный от средней точки (точка пересечения осей центрифуги) до дна центрифужной пробирки в состоянии вращения, см;

$n$  – частота вращения, мин<sup>-1</sup>.

**6.7 Фильтр мембранный** с порами размером 0,45 мкм.

**6.8 Пробирки центрифужные**

### 7 Методика определения

#### 7.1 Приготовление образца для испытания

Фруктовый сок разводят так, чтобы содержание D- и L-молочной кислоты в кювете находилось между значениями 2 мкг и 35 мкг, что эквивалентно содержанию молочной кислоты от 20 до 350 миллиграмм на литр образца (раствора). Если концентрация молочной кислоты в образце (растворе) меньше 20 мг/л, объем образца, который переливают с помощью пипетки, может быть увеличен до 1,5 мл. В этом случае объем воды, которую нужно добавить, сокращают, для того чтобы получить тот же конечный объем в кювете.

Непосредственно используют (разведенный) образец, даже если он слегка окрашен.

Анализ с помощью данного метода основывается на объемном выражении, результаты выражают на литр образца. Анализ концентрированных образцов также может проводиться на объемном выражении после разведения до известной относительной плотности. В этом случае должна быть указана относительная плотность. Зная массу образца и принимая во внимание для анализа фактор разведения, результаты могут также выражаться на килограмм продукта. В продуктах с высокой вязкостью и/или очень высоким содержанием клеток (например, волокнистая масса) определение на основе взвешенного образца для испытаний является обычной процедурой.

Мутные образцы хорошо перемешивают перед разведением. Мутные образцы с низким содержанием D- и L-молочной кислоты осветляют посредством ультрафильтрации через микропористую мембрану 0,45 мкм с возможным предварительным центрифугированием.

## 7.2 Процедура испытания

### 7.2.1 Общие положения

Определение проводят при постоянной температуре в интервале между 20 °С и 25 °С. Может быть также использована постоянная температура в интервале от 25 °С до 37 °С, если она обеспечивает достижение эквивалентных результатов.

Максимальная абсорбция NADH равна 340 нм. При использовании спектрофотометра с непостоянной длиной волны (6.5) измерение проводят при максимальной абсорбции. При использовании спектро-линейного фотометра с ртутной (дуговой) лампой абсорбция измеряется при длине волны 334 нм или 365 нм.

Не используют пипетки без градуировки с единственной меткой для дозирования растворов. Растворы ферментов, коферментов и буферных растворов могут быть добавлены с помощью соответствующих автоматических пипеток. Используют только пипетки для испытания ферментов (6.1) или их эквиваленты (6.2) для дозирования раствора образца.

Включают стандартный раствор D- и L-молочной кислоты в каждый аналитический эксперимент.

### 7.2.2 Контрольная проверка раствора пустой пробы

Схемы пипеточного дозирования см. 7.2.3 и 7.2.4.

Вносят в кюветы с помощью пипетки 1,00 мл буферного раствора (5.11), 0,20 мл раствора NAD (5.12), 1,50 мл воды и 0,02 мл суспензии GPT (5.13).

Смешивают и через 5 мин отсчитывают оптическую плотность  $A_1$ .

Добавляют 0,02 мл раствора L-LDH (5.14) или 0,05 мл раствора D-LDH (5.15) (для определения L-молочной кислоты или D-молочной кислоты соответственно). Смешивают и через 20 мин отсчитывают оптическую плотность  $A_2$ .

### 7.2.3 Контрольная проверка раствора L-молочной кислоты

Вносят в кюветы с помощью пипетки 1,00 мл буферного раствора (5.11), 0,20 мл раствора NAD (5.12), 1,40 мл воды, 0,02 мл суспензии GPT (5.13) и 0,10 мл раствора образца (7.1).

Смешивают и через 5 мин отсчитывают оптическую плотность  $A_1$ .

Добавляют 0,02 мл раствора L-LDH (5.14). Смешивают и через 20 мин отсчитывают оптическую плотность  $A_2$ .

Завершение реакции проверяют измерением оптической плотности каждые 2 мин в течение 10 мин, чтобы установить момент начала увеличения значения оптической плотности на постоянную величину. При необходимости проводят экстраполяцию оптической плотности раствора в точке прибавления L-LDH (см. приложение С).

Таблица 1

В кювету вносят	Пустая проба, мл	Образец, мл
Буферный раствор (5.11)	1,00	1,00
Раствор NAD (5.12)	0,20	0,20
Суспензия GPT (5.13)	0,02	0,02
Раствор образца (7.1)	–	0,10
Вода	1,50	1,40
Перемешивают и измеряют оптическую плотность раствора $A_1$ , примерно через 5 мин, затем добавляют:		
Раствор L-LDH (5.14)	0,02	0,02
Перемешивают и после завершения реакции (примерно 20 мин) измеряют оптическую плотность $A_2$ пустой пробы и образца. Проверяют завершение реакции, измеряя оптическую плотность через 2-минутные интервалы в течение 10 мин.		

Рассчитывают разность значений оптических плотностей до и после реакции ( $A_2 - A_1$ ) для раствора пустой пробы и испытания образца.

Вычитают разность оптической плотности пустой пробы и оптической плотности образца.

$$\Delta A = \Delta A_{\text{образец}} - \Delta A_{\text{пустая проба}} \quad (5)$$

### 7.2.4 Контрольная проверка раствора D-молочной кислоты

Вносят в кюветы с помощью пипетки 1,00 мл буферного раствора (5.11), 0,20 мл раствора NAD (5.12), 1,40 мл воды, 0,02 мл GPT-суспензии (5.13) и 0,10 мл раствора образца (7.1).

Смешивают и через 5 мин рассчитывают оптическую плотность  $A_1$ .

Добавляют 0,05 мл раствора D-LDH (5.15). Смешивают и через 30 мин отсчитывают оптическую плотность  $A_2$ .

Если растворы выдержаны при температуре 37 °С, оптическая плотность может быть отсчитана через 20 мин.

Завершение реакции проверяют измерением оптической плотности каждые 2 мин в течение 10 мин, чтобы установить момент начала увеличения значения оптической плотности на постоянную величину. При необходимости проводят экстраполяцию оптической плотности раствора в точку прибавления D-LDH (см. приложение С).

Таблица 2

В кювету вносят	Пустая проба, мл	Образец, мл
Буферный раствор (5.11)	1,00	1,00
Раствор NAD (5.12)	0,20	0,20
Суспензия GPT (5.13)	0,02	0,02
Раствор образца (7.1)	–	0,10
Вода	1,50	1,40
Перемешивают и измеряют оптическую плотность раствора $A_1$ , примерно через 5 мин, затем добавляют:		
Суспензия D-LDH (5.15)	0,05	0,05
Перемешивают и после завершения реакции (примерно 30 мин) измеряют оптическую плотность $A_2$ пустой пробы и образца. Для ускорения реакции раствор может быть выдержан при температуре 37 °С. В этом случае реакция завершается через 20 мин.		
Проверяют завершение реакции, измеряя оптическую плотность через 2-минутные интервалы в течение 10 мин.		

Рассчитывают различия абсорбции до и после реакции ( $A_2 - A_1$ ) для испытания раствора пустой пробы и для испытания образца.

Вычитают разность оптической плотности пустой пробы и оптической плотности образца.

$$\Delta A = \Delta A_{\text{образец}} - \Delta A_{\text{пустая проба}} \quad (6)$$

## 8 Вычисления

Массовую концентрацию молочной кислоты, выраженную в миллиграммах на литр, рассчитывают по формуле

$$\rho = \frac{V_1 \times M \times F}{\varepsilon \times \delta \times V_2} \times \Delta A, \quad (7)$$

где  $V_1$  – суммарный объем раствора в кювете, мл;

$M$  – молекулярная масса молочной кислоты (90,1 г/моль);

$F$  – фактор разведения раствора образца;

$V_2$  – объем образца, мл;

$\delta$  – рабочая длина кюветы, см;

$\varepsilon$  – молярный показатель поглощения NADH при:

340 нм = 6,3 [л × ммоль<sup>-1</sup> × см<sup>-1</sup>];

365 нм = 3,4 [л × ммоль<sup>-1</sup> × см<sup>-1</sup>];

334 нм = 6,18 [л × ммоль<sup>-1</sup> × см<sup>-1</sup>].

## СТБ EN 12631-2007

Если объемы, данные в 7.2.3 и 7.2.4 не меняются, то массовую концентрацию L-молочной кислоты и D-молочной кислоты в миллиграммах на литр образца рассчитывают с помощью следующих формул:

– для массовой концентрации L-молочной кислоты:

$$\rho_{(\text{L-молочной кислоты})} = \frac{2,74 \times 90,1}{\varepsilon \times 1 \times 0,1} \times \Delta A = 2469 \times \frac{\Delta A}{\varepsilon}, \quad (8)$$

– для массовой концентрации D-молочной кислоты:

$$\rho_{(\text{D-молочной кислоты})} = \frac{2,77 \times 90,1}{\varepsilon \times 1 \times 0,1} \times \Delta A = 2496 \times \frac{\Delta A}{\varepsilon}. \quad (9)$$

При использовании коммерчески доступного комбинированного испытательного комплекта числовые коэффициенты 2469 и 2496 в уравнениях (8) и (9) могут быть различными.

Во время проведения расчетов следует принимать во внимание любой фактор разведения и отношение объема к массе или объему. Если концентрированный продукт был разведен до определенной концентрации, следует запротokolировать относительную плотность образца при этой концентрации.

Массовую концентрацию молочной кислоты протоколируют в миллиграммах на литр с округлением до целых чисел или на килограмм в зависимости от приготовления образца (7.1).

### 9 Точность

Результаты межлабораторных испытаний по точности метода приведены в приложении В. Значения, полученные межлабораторными испытаниями, не могут быть применены к анализу интервалов и матриц с концентрациями, иными, чем приведенные в приложении В.

#### 9.1 Повторяемость

Абсолютная разница между результатами двух независимых отдельных испытаний, полученными одним и тем же методом на идентичном исследуемом образце одним и тем же оператором с использованием одного и того же оборудования в пределах короткого промежутка времени, не должна превышать значение повторяемости  $r$  более чем в 5 % случаев.

Значения повторяемости:

$r = 11$  % для D- и L-молочной кислоты.

#### 9.2 Воспроизводимость

Абсолютная разница между двумя отдельными результатами испытаний, полученными одним и тем же методом на идентичном исследуемом материале, запротokolированными двумя лабораториями, не должна превышать значение воспроизводимости  $R$  более чем в 5 % случаев.

Значения воспроизводимости:

$R = 32$  % для D- и L-молочной кислоты.

### 10 Протокол испытаний

Протокол испытаний должен содержать следующие данные:

- вся информация, необходимая для идентификации образца (вид, происхождение, шифр);
- ссылка на настоящий стандарт;
- дата и способ отбора проб (по возможности);
- дата получения;
- дата испытания;
- результаты испытания и единицы измерений;
- соблюдение норматива контроля повторяемости результатов;
- любые особенности проведения испытаний;
- отклонения условий проведения испытаний от описанных в стандарте, которые могли повлиять на результат.

**Приложение А**  
(справочное)

**Библиография**

ISO 5725:1986 Precision of test methods – Determination of repeatability and reproducibility for a standard test method by inter-laboratory tests  
(Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Определение повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерения при межлабораторных испытаниях)

Determination of lactic acid: Enzymatic method: № 53, 1983.

In: Analyses [Collection]/International Federation of Fruit Juice Producers.

Loose-leaf edition, as of 1995. Zug: Swiss Fruit Union

(Определение молочной кислоты: Ферментный метод: № 53, 1983. В: Анализы

[Собрание]/Международная Федерация производителей фруктового сока. Издание с отрывными листами, 1995. Фруктовый Союз Швейцарии)

Determination of L-lactic acid/D – lactic acid: Enzymatic method.

In: Methods of biochemical analysis and food analysis, using single reagents. Boehringer Mannheim

(Определение L-молочной кислоты/D-молочной кислоты: Ферментный метод.

В: Методы биохимического анализа и анализа пищевых продуктов, используя одиночные реагенты)

**Приложение В**  
(справочное)

**Статистические результаты межлабораторных испытаний**

В соответствии с ISO 5725:1986 следующие параметры были определены в межлабораторных испытаниях (см. в приложении А литературу, описывающую метод). Испытание было проведено Международной федерацией производителей фруктовых соков (IFU), Париж, Франция.

Год проведения межлабораторного испытания	1991	1990 (томатный сок)
Количество лабораторий	19	21
Количество образцов	3	1

Таблица В.1 – L-молочная кислота

Образец	А	В	С	D
Количество лабораторий, оставшихся после исключения резко выделяющихся значений	17	17	18	19
Количество резко выделяющихся значений (лабораторий)	2	2	1	2
Количество принятых результатов	69	68	71	92
Среднее значение $\bar{x}$ , мг/л	182	141	268	149
Стандартное отклонение повторяемости $s_r$ , мг/л	9,24	5,10	12,80	4,52
Относительное стандартное отклонение повторяемости $RSD_r$ , %	5,1	3,6	4,8	3,0
Предел повторяемости $r$ , мг/л	26	14	36	13
Стандартное отклонение воспроизводимости $s_R$ , мг/л	18,91	18,20	36,07	12,63
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости $RCD_R$ , %	10,4	12,9	13,5	8,5
Предел воспроизводимости $R$ , мг/л	59	51	101	35

Типы образцов:

- А – апельсиновый сок;
- В – яблочный сок;
- С – вишневый нектар;
- D – томатный сок.

Таблица В.2 – D-молочная кислота

Образец	A	B	C	D
Количество лабораторий, оставшихся после исключения резко выделяющихся значений	19	19	19	21
Количество резко выделяющихся значений (лабораторий)	–	–	–	–
Количество принятых результатов	77	75	76	108
Среднее значение $\bar{x}$ , мг/л	179	136	233	91
Стандартное отклонение повторяемости $s_r$ , мг/л	6,97	4,91	7,80	4,18
Относительное стандартное отклонение повторяемости $RSD_r$ , %	3,9	3,6	3,3	4,6
Предел повторяемости $r$ , мг/л	20	14	22	12
Стандартное отклонение воспроизводимости $s_R$ , мг/л	20,02	16,58	30,50	9,50
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости $RCD_R$ , %	11,2	12,2	13,1	10,4
Предел воспроизводимости $R$ , мг/л	56	46	85	27

Типы образцов:

A – апельсиновый сок;

B – яблочный сок;

C – вишневый нектар;

D – томатный сок.

## Приложение С (справочное)

### Проведение испытаний при «ползущих» реакциях

Медленно текущие («ползущие») реакции происходят в основном из-за побочных реакций фермента, присутствия других ферментов в матрице образца или взаимодействия одного или более компонентов матрицы с реагентами ферментативной реакции.

При нормальной реакции постоянное значение оптической плотности достигается в течение определенного времени (от 10 до 20 мин в зависимости от скорости специфических ферментативных реакций). Но если оптическая плотность не стабилизируется, а неуклонно увеличивается, то такой процесс называют «ползущей» реакцией. Оптическую плотность при «ползущей» реакции дополнительно измеряют с регулярными интервалами (от 2 до 5 мин) после времени, необходимого для достижения стандартным раствором конечной оптической плотности. При увеличении оптической плотности с постоянной скоростью (т. е.  $dA/dt = \text{constant}$ ) 5 – 6 измерений экстраполируют графически либо математически к оптической плотности раствора в точке прибавления последнего фермента ( $T_0$ ). Экстраполированную разность оптических плотностей ( $A_f - A_i$ ) в этой точке используют при подсчете концентрации субстрата.

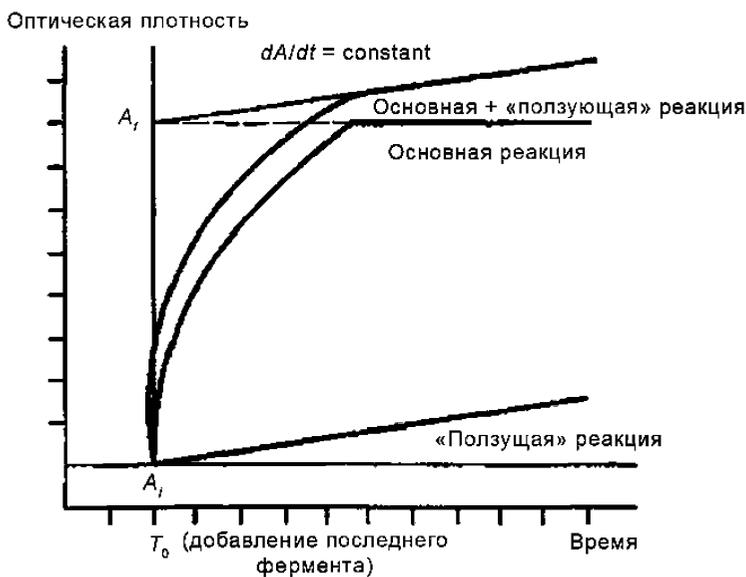


Рисунок С.1 – «Ползущая» реакция

Ответственный за выпуск *В.Л. Гуревич*

---

Сдано в набор 12.01.2008. Подписано в печать 14.02.2008. Формат бумаги 60×84/8. Бумага офсетная.  
Гарнитура Arial. Печать ризографическая. Усл. печ. л. 1,40 Уч.-изд. л. 0,57 Тираж экз. Заказ

---

Издатель и полиграфическое исполнение  
НП РУП «Белорусский государственный институт стандартизации и сертификации» (БелГИСС)  
Лицензия № 02330/0133084 от 30.04.2004.  
220113, г. Минск, ул. Мележа, 3.