

## **СОКИ ФРУКТОВЫЕ И ОВОЩНЫЕ**

### **Ферментативный метод определения содержания уксусной кислоты (ацетата) с помощью спектрофотометрии**

Издание официальное

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Всероссийским научно-исследовательским институтом консервной и овощесушильной промышленности (ВНИИКОП)

ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 93 «Продукты переработки плодов и овощей»

2 ПРИНЯТ И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Госстандарта России от 22 декабря 1999 г. № 596-ст

3 Стандарт гармонизирован с европейским стандартом EN 12632:1999 «Соки фруктовые и овощные. Ферментативное определение содержания уксусной кислоты (ацетата). НАД — спектрометрический метод»

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

5 ПЕРЕИЗДАНИЕ

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

**ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ****СОКИ ФРУКТОВЫЕ И ОВОЩНЫЕ****Ферментативный метод определения содержания уксусной кислоты (ацетата)  
с помощью спектрофотометрии**

Fruit and vegetable juices. Enzymatic method for spectrophotometric determination  
of acetic acid (acetate) content

Дата введения 2001—01—01

**1 Область применения**

Настоящий стандарт распространяется на фруктовые, овощные соки и подобные им продукты и устанавливает ферментативный метод определения общего содержания уксусной кислоты или солей уксусной кислоты (ацетатов) в расчете на уксусную кислоту в диапазоне определения массовой концентрации от 0,15 до 0,5 г/дм<sup>3</sup> или массовой доли от 0,015 до 0,05 %.

**2 Нормативные ссылки**

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты:

- ГОСТ 199—78 Натрий уксуснокислый, 3-водный. Технические условия
- ГОСТ 1770—74 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия
- ГОСТ 3769—78 Аммоний сернокислый. Технические условия
- ГОСТ 4201—79 Натрий двууглекислый кислый. Технические условия
- ГОСТ 4209—77 Магний хлористый, 6-водный. Технические условия
- ГОСТ 24104—88\* Весы лабораторные общего назначения и образцовые. Общие технические условия
- ГОСТ 24363—80 Калия гидроокись. Технические условия
- ГОСТ 25336—82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры
- ГОСТ 26313—84 Продукты переработки плодов и овощей. Правила приемки, методы отбора проб
- ГОСТ 26671—85 Продукты переработки плодов и овощей, консервы мясные и мясорастительные. Подготовка проб для лабораторных анализов
- ГОСТ 29227—91 (ИСО 835-1—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования
- ГОСТ Р 51431—99 Соки фруктовые и овощные. Метод определения относительной плотности
- ИСО 3696—87\*\* Вода для лабораторного анализа. Технические условия и методы испытаний.

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

\*\* Действует до введения в действие ГОСТ Р, разработанного на основе стандарта ИСО.

### 3 Обозначения и сокращения

#### 3.1 Обозначения

В настоящем стандарте применяют следующие обозначения:

*c* — молярная концентрация вещества;

*g* — ускорение силы тяжести.

#### 3.2 Сокращения

В настоящем стандарте применяют следующие сокращения:

АКС — Ацетил-коэнзим А-синтетаза;

КоА — Коэнзим А;

АТФ — Аденозин-5'-трифосфат;

АМФ — Аденозин-монофосфат;

ЦС — Цитрат-синтаза;

НАД — β-Никотинамидадениндинуклеотид;

НАДН — β-Никотинамидадениндинуклеотид, восстановленная форма;

МДГ — Малатдегидрогеназа;

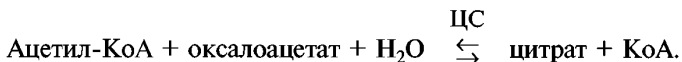
МЕ — 1-я международная единица ферментативной активности, равная количеству фермента, необходимого для катализа превращения 1 микромоля вещества за 1 мин при температуре 25 °С в стандартных условиях.

### 4 Сущность метода

Уксусная кислота (ацетат) в присутствии фермента ацетил-коэнзима А-синтетазы (АКС) с аденозин-5'-трифосфатом (АТФ) и коэнзимом А (КоА) превращается в ацетил-КоА:



Ацетил-КоА реагирует с оксалоацетатом с образованием цитрата в присутствии цитрат-синтазы (ЦС):



Оксалоацетат, необходимый для реакции (2), образуется из малата и никотинамидадениндинуклеотида (НАД) в присутствии малатдегидрогеназы (МДГ). В этой реакции НАД восстанавливается до НАДН.



В основе метода лежит образование НАДН, количество которого определяют по увеличению оптической плотности при длине волны 334 нм, 340 нм или 365 нм. Количество образовавшегося НАДН зависит от концентрации уксусной кислоты, однако зависимость нелинейная.

### 5 Средства измерений, лабораторное оборудование, реактивы и материалы

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

Весы лабораторные общего назначения по ГОСТ 24104 с наибольшим пределом взвешивания 500 г, 3-го класса точности.

Спектрофотометр, позволяющий проводить исследования при длине волны 340 нм, с допустимой абсолютной погрешностью измерений коэффициента пропускания не более 1 % или колориметр фотоэлектрический лабораторный с устройством для считывания значений оптической плотности со светофильтром длиной волны, соответствующей максимуму пропускания (340 ± 10) нм или (365 ± 10) нм, и допустимой абсолютной погрешностью измерения не более 1 %.

Кюветы из кварца, оптического стекла или полистирола рабочей длиной 10 мм.

Иономер или рН-метр с погрешностью измерения не более 0,05 рН.

Пипетки по ГОСТ 29227 типа 3, исполнения 1, 1-го класса точности, вместимостью 1 и 10 см<sup>3</sup>.

Дозаторы пипеточные вместимостью 1, 0,2 и 0,02 см<sup>3</sup>, с относительной погрешностью дозирования  $\pm 1\%$  [1].

Колба мерная по ГОСТ 1770 исполнения 2 вместимостью 100 см<sup>3</sup>.

Центрифуга лабораторная, обеспечивающая центрифужное ускорение 3000 g на дне центрифужной пробирки.

**Примечание** — Частоту вращения ротора  $n$ , мин<sup>-1</sup>, требуемую для получения соответствующего ускорения центрифуги, вычисляют по формуле

$$n = 95,5 \sqrt{Fg/r}, \quad (1)$$

где  $F$  — фактор разделения;

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

$g$  — ускорение силы тяжести 9,81 м/с<sup>2</sup>.

Фильтр мембранный с порами размером 0,45 мкм.

Пробирки по ГОСТ 1770 исполнения 1 вместимостью 10 см<sup>3</sup> с ценой деления 0,1 см<sup>3</sup>.

Триэтаноламин гидрохлорид [2].

$L$  — яблочная кислота [3].

Магний хлористый, 6-водный, по ГОСТ 4209, ч.д.а.

Калия гидроокись по ГОСТ 24363, ч.д.а., раствор  $c(\text{KOH}) = 2$  моль/дм<sup>3</sup>.

$\beta$ -Никотинамидадениндинуклеотид (около 98 %).

Кофермент А.

Аденозин-5'-трифосфат, динатриевая соль АТФ- $\text{Na}_2\text{H}_2$ .

Натрий двууглекислый кислый по ГОСТ 4201, ч.д.а.

Малатдегидрогеназа, суспензия в сернокислом аммонии  $c(\text{МДГ}) = 3,2$  моль/дм<sup>3</sup>, специфической активностью около 1200 МЕ/мг.

Цитрат-синтаза, суспензия в сульфате аммония  $c(\text{ЦС}) = 3,2$  моль/дм<sup>3</sup>, специфической активностью приблизительно 110 МЕ/мг.

Ацетил-КоА-синтетаза лиофилизированная.

Аммоний сернокислый по ГОСТ 3769, ч.д.а.

Натрий уксуснокислый, 3-водный, по ГОСТ 199, х.ч.

Вода для лабораторного анализа по ИСО 3696 не ниже третьей категории качества.

#### Примечания

1 Допускается использование других средств измерений, лабораторного оборудования и реактивов, по метрологическим и техническим характеристикам не уступающих перечисленным выше.

2 Определение может быть выполнено с использованием имеющегося в продаже набора реактивов для ферментативного определения уксусной кислоты.

## 6 Отбор и подготовка проб

6.1 Отбор проб — по ГОСТ 26313.

6.2 Подготовка проб — по ГОСТ 26671.

6.2.1 Подготовка пробы соков

Сок разбавляют так, чтобы содержание уксусной кислоты в 1 дм<sup>3</sup> пробы было от 10 до 300 мг.

Пробы мутных соков с низким содержанием уксусной кислоты осветляют фильтрацией через мембранный фильтр диаметром пор 0,45 мкм с последующим центрифугированием.

6.2.2 Подготовка пробы концентрированных продуктов

Концентрированные продукты разбавляют водой до заданного значения относительной плотности в соответствии с нормативным или техническим документом на конкретный вид продукта. Относительную плотность разбавленной пробы продукта определяют по ГОСТ Р 51431 и найденное значение указывают в протоколе испытаний. Дальнейшее разбавление полученной пробы для анализа уксусной кислоты проводят по 6.2.1.

## 7 Подготовка к проведению испытаний

### 7.1 Приготовление буферного раствора pH = 8,4

В мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> вносят 7,59 г гидрохлорида триэтанолamina, 420 мг яблочной кислоты и 210 мг хлористого магния, растворяют приблизительно в 70 см<sup>3</sup> воды. Доводят pH раствора до 8,4, добавляя около 21 см<sup>3</sup> раствора гидроксида калия, доводят объем до отметки водой. Буферный раствор устойчив в течение четырех недель при температуре 4 °С.

### 7.2 Приготовление раствора никотинамидадениндинуклеотида/коэнзима А

144 мг НАД и 30 мг КоА растворяют в 6 см<sup>3</sup> воды. Раствор устойчив в течение одной недели при температуре 4 °С.

### 7.3 Приготовление раствора аденозин-5'-трифосфата

300 мг АТФ-Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub> и 300 мг бикарбоната натрия растворяют в 6 см<sup>3</sup> воды. Раствор устойчив в течение четырех недель при температуре 4 °С.

### 7.4 Приготовление суспензии малатдегидрогеназы/цитрат-синтазы

Смешивают 0,6 см<sup>3</sup> суспензии МДГ и 0,6 см<sup>3</sup> суспензии ЦС. Суспензия устойчива в течение одного года при температуре 4 °С.

### 7.5 Приготовление суспензии ацетил-КоА-синтетазы

20 мг лиофилизата АКС растворяют в 0,5 см<sup>3</sup> раствора сернокислого аммония. Суспензия устойчива в течение двух недель при температуре 4 °С.

### 7.6 Приготовление раствора сульфата аммония концентрацией $c[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4] = 1$ моль/дм<sup>3</sup>

В мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> вносят 13,2 мг сернокислого аммония, растворяют примерно в 80 см<sup>3</sup> воды, доводят pH до 7,3, добавляя около 0,2 см<sup>3</sup> раствора гидроксида калия, доводят объем до отметки водой. Раствор устойчив в течение одного года при температуре от 20 до 25 °С.

### 7.7 Приготовление раствора ацетата, стандартный раствор, $c(\text{CH}_3\text{COO}^-) = 5$ ммоль/дм<sup>3</sup>

В мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> вносят 68 мг уксуснокислого натрия, растворяют и доводят до отметки водой. Перед использованием готовят свежий раствор.

## 8 Проведение испытаний

### 8.1 Общие положения

Испытания проводят для пробы определенного объема и результаты выражают в виде массовой концентрации уксусной кислоты. Для навески пробы, зная коэффициент разбавления пробы, результаты выражают в виде массовой доли уксусной кислоты в процентах. Для продуктов с высокой вязкостью и(или) высоким содержанием частиц мякоти (например для пульпы) испытания проводят в навеске пробы.

Испытание проводят при постоянной температуре в интервале от 20 до 25 °С.

При использовании спектрофотометра измерения проводят только при длине волны, соответствующей абсорбционному максимуму НАД — 340 нм. При использовании фотоэлектрического колориметра измерения проводят со светофильтром длиной волны, соответствующей максимуму пропускания 340 или 365 нм.

Растворы берут градуированными пипетками. Добавление растворов пробы, ферментов, коферментов и буферных растворов осуществляют соответствующими пипеточными дозаторами.

Выполняют два параллельных определения.

В каждую серию испытаний включают стандартный раствор уксусной кислоты.

Схема проведения испытаний приведена в приложении А.

### 8.2 Взятие пробы для анализа

Для испытаний берут такой объем пробы сока, чтобы содержание уксусной кислоты в кювете было между 1 и 30 мкг (примерно 0,10 см<sup>3</sup> пробы). Если концентрация уксусной кислоты меньше 10 мг/дм<sup>3</sup>, то объем пробы увеличивают до 1,5 см<sup>3</sup>. Используют пробу непосредственно после разбавления, даже если она слегка окрашена.

### 8.3 Проведение испытания раствора пробы

В кювету спектрофотометра (фотоэлектроколориметра) вносят 1,00 см<sup>3</sup> буферного раствора, 0,10 см<sup>3</sup> раствора НАД/КоА, 0,10 см<sup>3</sup> раствора АТФ, 0,10 см<sup>3</sup> раствора пробы и 1,90 см<sup>3</sup> воды. Если вносимый в кювету объем раствора пробы превышает 0,10 см<sup>3</sup> (см. 8.2), вносимый объем воды уменьшают так, чтобы суммарный объем пробы и воды составлял 2,0 см<sup>3</sup>. Смесь перемешивают,

выдерживают в течение 3 мин и измеряют оптическую плотность раствора  $(A_0)_{\text{проба}}$  относительно воздуха (приложение А).

К содержимому кюветы добавляют 0,02 см<sup>3</sup> раствора МДГ/ЦС, перемешивают, выдерживают в течение 2 мин и измеряют оптическую плотность раствора  $(A_1)_{\text{проба}}$  (приложение А).

В ту же кювету добавляют 0,01 см<sup>3</sup> суспензии АКС, перемешивают и после завершения реакции (через 10 — 15 мин) измеряют оптическую плотность раствора  $(A_2)_{\text{проба}}$  относительно воздуха (приложение А).

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 последнего фермента. В этом случае при подсчетах используют экстраполированную разность оптических плотностей (приложение Б).

#### 8.4 Проведение контрольного испытания

В кювету вносят 1,00 см<sup>3</sup> буферного раствора, 0,10 см<sup>3</sup> раствора НАД/КоА, 0,10 см<sup>3</sup> раствора АТФ и 2,00 см<sup>3</sup> воды, перемешивают, выдерживают в течение 3 мин и измеряют оптическую плотность раствора  $(A_0)_{\text{контроль}}$  относительно воздуха. В кювету добавляют 0,02 см<sup>3</sup> раствора МДГ/ЦС, перемешивают, выдерживают в течение 2 мин и измеряют оптическую плотность раствора  $(A_1)_{\text{контроль}}$  относительно воздуха.

В кювету с раствором добавляют 0,01 см<sup>3</sup> суспензии АКС, перемешивают, выдерживают в течение 10 — 15 мин и измеряют оптическую плотность  $(A_2)_{\text{контроль}}$  относительно воздуха.

## 9 Обработка и оформление результатов

Рассчитывают разность значений оптических плотностей, измеренных в контрольном испытании  $(A_1 - A_0)_{\text{контроль}}$ ,  $(A_2 - A_0)_{\text{контроль}}$  и в испытании раствора пробы  $(A_1 - A_0)_{\text{проба}}$ ,  $(A_2 - A_0)_{\text{проба}}$ .

В связи с тем, что зависимость между разностью оптических плотностей и концентрацией уксусной кислоты нелинейная, разность оптических плотностей, приходящуюся на уксусную кислоту ( $\Delta A$ ), вычисляют по формуле

$$\Delta A = [(A_2 - A_0)_{\text{проба}} - \frac{(A_1 - A_0)_{\text{проба}}^2}{(A_2 - A_0)_{\text{проба}}}] - [(A_2 - A_0)_{\text{контроль}} - \frac{(A_1 - A_0)_{\text{контроль}}^2}{(A_2 - A_0)_{\text{контроль}}}] \quad (2)$$

Массовую концентрацию уксусной кислоты  $x$ , г/дм<sup>3</sup>, вычисляют по формуле

$$x = \frac{V_1 M K}{\varepsilon l V_2} \cdot \Delta A \cdot 10^{-3}, \quad (3)$$

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

$M$  — молярная масса уксусной кислоты,  $M = 60,05$  г/моль;

$K$  — фактор разведения пробы образца, равный отношению объема разведенной пробы к объему пробы, взятому для разведения;

$\varepsilon$  — молярный показатель поглощения НАДН, 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,

при длине волны 334 нм — 6,18;

$l$  — рабочая длина кюветы, см;

$V_2$  — объем раствора пробы, взятый в кювету на анализ, см<sup>3</sup>.

Если соблюдены рекомендуемые объемы дозируемых в кювету растворов, то массовую концентрацию уксусной кислоты  $x$ , г/дм<sup>3</sup>, вычисляют по формуле

$$x = \frac{3,23 \cdot 60,05}{\varepsilon \cdot l \cdot 0,1} \cdot \Delta A = 1,940 \cdot \frac{\Delta A}{\varepsilon}. \quad (4)$$

Вычисления проводят до второго десятичного знака. Результат округляют до первого десятичного знака.

Массовую долю уксусной кислоты  $x_1$ , %, вычисляют по формуле

$$x_1 = \frac{V V_1 M}{m \epsilon l V_2} \cdot \Delta A \cdot 10^{-4}, \quad (5)$$

где  $V$  — объем, до которого разбавлена навеска пробы, см<sup>3</sup>;

$m$  — масса навески пробы продукта, взятой для испытания, г.

Вычисления проводят до третьего десятичного знака. Результат вычислений округляют до второго десятичного знака.

За окончательный результат испытания принимают среднеарифметическое результатов двух параллельных определений при условии выполнения условий сходимости.

Относительное расхождение между результатами двух определений, полученными при анализе одной и той же пробы продукта одним лаборантом на одном и том же оборудовании за возможно минимальный интервал времени не должно превышать норматива оперативного контроля сходимости 7 % ( $P = 0,95$ ).

Относительное расхождение между результатами двух определений, полученными при анализе одной и той же пробы продукта в двух различных лабораториях, не должно превышать норматива оперативного контроля воспроизводимости 19 % ( $P = 0,95$ ).

Пределы относительной погрешности определения массовой концентрации или массовой доли уксусной кислоты при соблюдении условий, регламентируемых настоящим стандартом, не превышают  $\pm 9,5$  % ( $P = 0,95$ ).

В протоколе испытаний указывают:

- информацию, необходимую для идентификации исследуемого продукта (вид, происхождение, шифр);
- ссылку на настоящий стандарт;
- дату и способ отбора проб (по возможности);
- дату получения пробы для испытаний;
- дату проведения испытаний;
- результат испытаний с указанием погрешности и единицы измерений;
- соблюдение нормативов контроля сходимости результатов;
- особенности проведения испытаний (разведение концентрированного продукта, относительная плотность разведенной пробы и пр.);
- отклонения условий проведения испытаний от описанных в стандарте, которые могли повлиять на результат.



ПРИЛОЖЕНИЕ А  
(справочное)

Схема проведения испытаний

Наименование растворов	Объем вносимых растворов, см <sup>3</sup>	
	Контрольное испытание	Испытание пробы
В кювету вносят: буферный раствор	1,00	1,00
раствор НАД/КоА	0,10	0,10
раствор АТФ	0,10	0,10
раствор пробы	—	0,10
воду	2,00	1,90
Перемешивают и измеряют оптическую плотность $A_0$ растворов через 3 мин, затем добавляют:		
раствор МДГ/ЦС	0,02	0,02
Перемешивают и измеряют оптическую плотность $A_1$ растворов через 2 мин. Начинают проводить реакцию, добавляя:		
Суспензию АКС	0,01	0,01
Перемешивают и после окончания реакции (через 15 мин) измеряют оптическую плотность $A_2$ контрольного раствора и раствора пробы. Если реакция не завершилась через 15 мин, продолжают измерять оптическую плотность в течение 10 мин через каждые 2 мин, пока увеличение оптической плотности не станет постоянным.		

ПРИЛОЖЕНИЕ Б  
(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 реактивами 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.  $dA/dt$  — величина постоянная) 5 — 6 измерений экстраполируют графически, либо математически к оптической плотности раствора в точке прибавления последнего фермента ( $T_0$ ). Экстраполированную разность оптических плотностей ( $A_{\text{конец}} - A_{\text{начало}}$ ) в этой точке используют при подсчете концентрации субстрата.

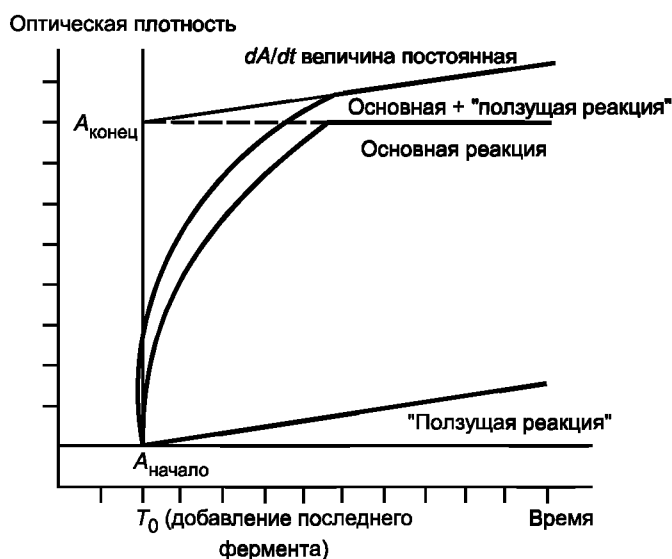


Рисунок Б.1 — «Ползущая» реакция

ПРИЛОЖЕНИЕ В  
(справочное)

**Библиография**

- [1] ТУ 64-13329—81 Дозаторы пипеточные
- [2] ТУ 6-09-3930—75 Триэтаноламин гидрохлорид
- [3] ТУ 6-09-10-1692—84 *L*-яблочная кислота

---

ОКС 67.160.20

Н59

ОКСТУ 9109

Ключевые слова: фруктовые и овощные соки, определение содержания, уксусная кислота, ацетаты, ферментативные методы, спектрофотометрический анализ, проведение испытаний

---