

---

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

---



НАЦИОНАЛЬНЫЙ  
СТАНДАРТ  
РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р  
53139—  
2008

---

# СОКИ И СОКОВАЯ ПРОДУКЦИЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ

## Определение аскорбиновой кислоты ферментативным методом

Издание официальное

БЗ 11—2008/410



Москва  
Стандартинформ  
2009

## Предисловие

Цели и принципы стандартизации в Российской Федерации установлены Федеральным законом от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ «О техническом регулировании», а правила применения национальных стандартов Российской Федерации — ГОСТ Р 1.0—2004 «Стандартизация в Российской Федерации. Основные положения»

### Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Государственным образовательным учреждением высшего профессионального образования «Московский государственный университет пищевых производств» Министерства образования и науки Российской Федерации (ГОУ ВПО МГУПП)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 93 «Продукты переработки фруктов, овощей и грибов» и Государственным образовательным учреждением высшего профессионального образования «Московский государственный университет пищевых производств» Министерства образования и науки Российской Федерации (ГОУ ВПО МГУПП)

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 18 декабря 2008 г. № 568-ст

4 В настоящем стандарте учтены основные нормативные положения следующих международных (региональных) стандартов:

- CODEX-STAN 247—2005 «Единый стандарт на фруктовые соки и нектары» (CODEX-STAN 247—2005 «Codex general standard for fruit juices and nectars») в части требований к обеспечению качества, подлинности, необходимого состава и методов оценки показателей соков и нектаров;

- ИФУ № 5:2000 «Рекомендации к анализу витамина С» Сборник методов физико-химического анализа соков Международной федерации производителей фруктовых соков [IFU Recommendation No. 5, 2000 «Recommendations for Vitamin C Analysis», (International Federation of Fruit Juice Producers)]

### 5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячно издаваемых информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячно издаваемом 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*

© Стандартиформ, 2009

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 Обозначения и сокращения . . . . .	2
4 Сущность метода . . . . .	2
5 Отбор проб . . . . .	2
6 Проведение определения . . . . .	2
6.1 Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы . . . . .	2
6.2 Приготовление растворов реактивов . . . . .	3
6.3 Подготовка пробы . . . . .	4
6.4 Условия определения . . . . .	5
6.5 Ферментативное определение . . . . .	5
7 Обработка результатов измерений . . . . .	6
8 Дополнительные указания . . . . .	7
9 Метрологические характеристики метода . . . . .	10
Приложение А (справочное) Информация о медленно текущих реакциях . . . . .	11
Приложение Б (справочное) Метрологические характеристики метода . . . . .	12
Библиография . . . . .	13

**СОКИ И СОКОВАЯ ПРОДУКЦИЯ.  
ИДЕНТИФИКАЦИЯ****Определение аскорбиновой кислоты ферментативным методом**

Juices and juice products. Identification. Determination of ascorbic acid by enzymatic method

Дата введения — 2010—01—01

**1 Область применения**

Настоящий стандарт распространяется на соки и соковую продукцию, включая соки и соковую продукцию для детского питания, в т. ч. фруктовые и овощные соки, нектары, морсы и сокосодержащие напитки, фруктовые и овощные пюре, а также на концентрированные фруктовые и овощные соки, концентрированные морсы, концентрированные фруктовые и овощные пюре и устанавливает метод ферментативного определения массовой концентрации аскорбиновой кислоты (витамина С) в виде кислоты или ее соли. Диапазон определения массовой концентрации аскорбиновой кислоты составляет от 0,0003 до 0,2 г/дм<sup>3</sup> включительно.

**2 Нормативные ссылки**

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

- ГОСТ 245—76 Реактивы. Натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный. Технические условия
- ГОСТ 841—64 Реактивы. Кислота метафосфорная. Технические условия
- ГОСТ 1625—89 Формалин технический. Технические условия
- ГОСТ 1770—74 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия
- ГОСТ 3652—69 Реактивы. Кислота лимонная моногидрат и безводная. Технические условия
- ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия
- ГОСТ 12026—76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия
- ГОСТ 24104—2001 Весы лабораторные. Общие технические требования
- ГОСТ 24363—80 Реактивы. 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 28498—90 Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний
- ГОСТ 29227—91 (ИСО 835-2—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

**Примечание** — При пользовании 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 ежегодно издаваемому информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании 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 Обозначения и сокращения

В настоящем стандарте применены следующие сокращения и обозначения:

МТТ — бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия,

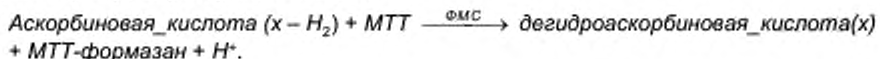
ФМС — переносчик электронов — феназинметосульфат,

МТТ — формазан — комплекс МТТ и формазана,

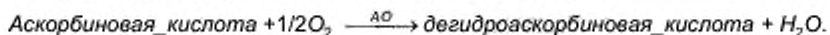
АО — аскорбатоксидаза.

### 4 Сущность метода

Аскорбиновая кислота (витамин С) и другие редуцирующие вещества ( $x - H_2$ ) восстанавливают бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия (МТТ) в присутствии переносчика электронов феназинметосульфата (ФМС) при pH 3,5 до комплекса МТТ-формазана. В кювете с пробой измеряют сумму редуцирующих веществ:



Для обеспечения специфичного определения аскорбиновой кислоты в контрольной кювете проводят окисление аналита аскорбатоксидазой (АО) в присутствии кислорода воздуха. Образующаяся дегидроаскорбиновая кислота не взаимодействует с МТТ и ФМС:



Количество образовавшегося комплекса МТТ-формазан, эквивалентное количеству аскорбиновой кислоты в исходной пробе, определяют спектрофотометрическим измерением оптической плотности исследуемого раствора пробы при длине волны 578 нм.

### 5 Отбор проб

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

### 6 Проведение определения

#### 6.1 Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

Гидроокись калия по ГОСТ 24363, ч. д. а., раствор молярной концентрации  $c(\text{KOH}) = 10 \text{ моль/дм}^3$ .  
Поливинилпирролидон (код пищевой добавки Е1202) с содержанием основного вещества не менее 95 % по [1].

Фосфорнокислый однозамещенный 2-водный натрий,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  по ГОСТ 245, ч. д. а.

Лимонная кислота моногидрат,  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , по ГОСТ 3652, ч. д. а.

Аскорбиновая кислота,  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ , по [2], [3], х. ч.

Формалин по ГОСТ 1625, раствор с объемной долей 5 %.

3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолий бромид (МТТ) с содержанием основного вещества не менее 95 % по [1].

Феназинметосульфат (феназин/ФМС) с содержанием основного вещества не менее 95 % по [1].

Аскорбатоксидаза (сухой лиофилизат/АО), Е 1.10.3.3 с содержанием основного вещества не менее 95 % по [1].

Метафосфорная кислота,  $(\text{HPO}_3)_n$ , по ГОСТ 841, раствор массовой концентрации 15 г/дм<sup>3</sup>.

Дистиллированная вода по ГОСТ 6709.

Спектрофотометр, позволяющий проводить измерения при длине волны 578 нм, или фотометр фотоэлектрический с шириной спектральной полосы не более 10 нм и допустимой абсолютной погреш-

ностью измерений не более  $\pm 1\%$ , или спектрофотометр на ртутной лампе, позволяющий проводить измерения при 578 нм.

Кюветы из оптического стекла или полимерных материалов с длиной оптического пути 1 см.

Держатель для кювет.

Иономер или pH-метр с погрешностью измерения не более  $\pm 0,05$  pH.

Пипетки номинальной вместимостью 0,01, 0,02, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 5 и 10 см<sup>3</sup> с относительной погрешностью дозирования  $\pm 1\%$  по ГОСТ 29227 1-го класса точности или дозаторы пипеточные с аналогичными или изменяемыми объемами доз с относительной погрешностью дозирования не более  $\pm 1\%$  [4] или импортные с аналогичными характеристиками.

Колбы мерные по ГОСТ 1770 вместимостью 100, 250 и 1000 см<sup>3</sup>.

Стаканы по ГОСТ 25336 вместимостью 20 и 200 см<sup>3</sup>.

Цилиндры по ГОСТ 1770 вместимостью 50 и 100 см<sup>3</sup>.

Лабораторная воронка по ГОСТ 25336 диаметром 5 см.

Часы лабораторные.

Электроплитка.

Термометр жидкостный стеклянный по ГОСТ 28498 для диапазона температур от 0 °С до 100 °С с пределом допускаемой погрешности не более  $\pm 1$  °С.

Весы лабораторные по ГОСТ 24104 с пределом допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания не более  $\pm 0,1$  мг.

Шпатели пластиковые или палочки стеклянные оплавленные длиной от 8 до 10 см диаметром 2—3 мм для перемешивания содержимого кювет при проведении ферментативного определения.

Бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026.

Водяной или воздушный термостат, обеспечивающий поддержание заданной температуры ферментативной реакции в диапазоне 30 °С—40 °С и контроль температуры с погрешностью не более 0,5 °С.

Допускается применять другие средства измерений с метрологическими характеристиками, вспомогательные устройства с техническими характеристиками, а также реактивы, в том числе готовые наборы реактивов, по качеству не ниже перечисленных в настоящем разделе.

## 6.2 Приготовление растворов реактивов<sup>1)</sup>

**6.2.1 Фосфатно-цитратный буферный раствор (натрий фосфорнокислый однозамещенный молярной концентрации 0,2 моль/дм<sup>3</sup>, раствор моногидрата лимонной кислоты молярной концентрации 0,1 моль/дм<sup>3</sup>, pH 3,6)**

Растворяют 35,6 г натрия фосфорнокислого однозамещенного в мерной колбе вместимостью 1000 см<sup>3</sup> в 500 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, полученной непосредственно перед приготовлением раствора реактива. После полного растворения реактива объем раствора в колбе доводят до метки дистиллированной водой.

Растворяют 21,0 г лимонной кислоты моногидрата в мерной колбе вместимостью 1000 см<sup>3</sup> в 500 см<sup>3</sup> свежей дистиллированной воды. После полного растворения реактива объем раствора в колбе доводят до метки дистиллированной водой.

Для приготовления фосфатно-цитратного буферного раствора с pH 3,6 смешивают 31,6 частей раствора натрия фосфорнокислого однозамещенного молярной концентрации 0,2 моль/дм<sup>3</sup> и 68,4 частей раствора моногидрата лимонной кислоты молярной концентрации 0,1 моль/дм<sup>3</sup>.

Фосфатно-цитратный буферный раствор годен для применения в течение 1 мес при условии хранения при температуре 4 °С. Перед использованием необходимо контролировать pH и температуру фосфатно-цитратного буферного раствора, значения которых должны составлять соответственно 3,6 и 20 °С—25 °С. Контроль температуры осуществляют термометром. При отклонении от требуемого значения pH фосфатно-цитратный буферный раствор готовят заново.

### 6.2.2 Рабочий раствор МТТ массовой концентрации 5 мг/см<sup>3</sup>

Растворяют 200 мг МТТ в 40 см<sup>3</sup> фосфатно-цитратного буферного раствора с pH 3,6 (см. 6.2.1). Объем рабочего раствора МТТ достаточен для проведения примерно 20 отдельных определений аскорбиновой кислоты (см. 6.4).

<sup>1)</sup> Допускается использование готового набора реактивов для ферментативного определения аскорбиновой кислоты производства «Roche Diagnostics/R-Biopharm AG» (номер набора 10 409 677 035) согласно схеме дозирования и смешивания реактивов, прилагаемой к набору. Указанный набор реактивов является рекомендуемым для применения. Эта информация дана для сведения пользователей настоящего стандарта и не означает, что стандарт устанавливает обязательное применение этого набора реактивов.

Рабочий раствор МТТ годен для применения в течение 1 мес при условии хранения при температуре 4 °С (без доступа света!). Перед использованием необходимо контролировать pH и температуру рабочего раствора МТТ, значения которых должны составлять соответственно 3,6 и 20 °С—25 °С. Контроль температуры осуществляют термометром. При отклонении от требуемого значения pH рабочий раствор МТТ готовят заново.

#### 6.2.3 Рабочий раствор ФМС массовой концентрации 0,6 мг/см<sup>3</sup>

Растворяют 30 мг ФМС в 50 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, полученной непосредственно перед приготовлением раствора реактива и нагретой на электроплитке до 40 °С—50 °С. Рабочий раствор ФМС годен для применения в течение 12 мес при условии хранения при температуре 4 °С. Незначительно красное окрашивание, которое может появиться при хранении рабочего раствора ФМС, не влияет на результаты ферментативного определения аскорбиновой кислоты.

#### 6.2.4 Рабочий раствор АО (1700 U/см<sup>3</sup>)<sup>1)</sup>

Навеску сухого лиофилизата, соответствующую активности фермента 1700 U, растворяют в 1,0 см<sup>3</sup> фосфатно-цитратного буферного раствора с pH 3,6 (см. 6.2.1). Раствор готовят непосредственно перед использованием.

#### 6.2.5 Раствор гидроксида калия молярной концентрации с (KOH) = 10 моль/дм<sup>3</sup>

Растворяют 14,03 г гидроксида калия в мерной колбе вместимостью 250 см<sup>3</sup> в 150 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, полученной непосредственно перед приготовлением раствора реактива. После полного растворения реактива объем раствора в колбе доводят до метки.

#### 6.2.6 Раствор формалина с объемной долей 5 %

В химический стакан на 20 см<sup>3</sup> вносят 3 см<sup>3</sup> раствора формалина с объемной долей формальдегида 35 %. Добавляют 4 см<sup>3</sup> дистиллированной воды. Раствор перемешивают стеклянной палочкой и используют для подготовки пробы согласно 6.3.3.

#### 6.2.7 Раствор метафосфорной кислоты массовой концентрации (HPO<sub>4</sub>)<sub>n</sub> = 15 г/дм<sup>3</sup>

Растворяют 15 г метафосфорной кислоты массовой долей 33,5 % в мерной колбе вместимостью 1000 см<sup>3</sup> в 500 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, полученной непосредственно перед приготовлением раствора реактива. После полного растворения реактива объем раствора в колбе доводят до метки.

### 6.3 Подготовка пробы

Концентрированные соки и пюре перед определением восстанавливают согласно нормативным документам свежей дистиллированной водой до содержания растворимых сухих веществ согласно нормативным документам для соответствующего вида продукции.

#### 6.3.1 Прозрачные или мутные слабоокрашенные пробы

С помощью раствора гидроксида калия (10 моль/дм<sup>3</sup>) проводят корректировку pH пробы до значения 3,5—4,0. В зависимости от количества аскорбиновой кислоты пробу разбавляют дистиллированной водой или раствором метафосфорной кислоты (15 г/дм<sup>3</sup>) согласно таблице 1.

Таблица 1

Массовая концентрация аскорбиновой кислоты в пробе <sup>1)</sup> , г/дм <sup>3</sup>	Разбавление	Фактор разбавления F
< 0,20	—	1
0,20—2,0	1 + 9	10
2,0—20,0	1 + 99	100
> 20	1 + 999	1000

<sup>1)</sup> Для оценки количества аскорбиновой кислоты используют документы, содержащие сведения о составе соков и соковой продукции [5].

Пробу, содержащую мутную взвесь, после разбавления фильтруют через бумажный складчатый фильтр. Для определения аскорбиновой кислоты используют визуально прозрачный слабоокрашенный фильтрат в количестве 0,100 см<sup>3</sup>.

<sup>1)</sup> Допускается использовать в определении готовые препараты аскорбатоксидазы. Аскорбатоксидаза, иммобилизованная на пластиковом шпатель на целлюлозной подложке (рабочая активностью фермента 17 U), входит в состав готового набора реактивов для определения аскорбиновой кислоты производства «Roche Diagnostics/R-Biopharm AG» (номер набора 10 409 677 035). Пример схемы ферментативного определения с использованием готового набора реактивов приведен в таблице 3. Указанный набор реактивов является рекомендуемым для применения. Эта информация дана для сведения пользователей настоящего стандарта и не означает, что стандарт устанавливает обязательное применение этого набора реактивов.



### 6.3.2 Прозрачные или мутные сильноокрашенные пробы

С помощью раствора гидроокиси калия молярной концентрации 10 моль/дм<sup>3</sup> проводят корректировку pH пробы до значения 3,5—4,0. В зависимости от количества аскорбиновой кислоты пробу разбавляют дистиллированной водой или раствором метафосфорной кислоты массовой концентрации 15 г/дм<sup>3</sup> согласно таблице 1.

Для удаления природных красящих пигментов к 10 см<sup>3</sup> пробы добавляют 100 мг поливинилпирролидона. Пробу перемешивают в течение 1 мин, затем фильтруют через бумажный складчатый фильтр.

Для определения аскорбиновой кислоты используют визуально прозрачный слабоокрашенный фильтрат в количестве 0,100 см<sup>3</sup>.

### 6.3.3 Подготовка проб, содержащих в повышенных количествах диоксид серы

К 10 см<sup>3</sup> пробы добавляют одну каплю разбавленного раствора формалина объемной долей 5 %. Пробу перемешивают и выдерживают 5 мин при комнатной температуре. Значение pH пробы при необходимости корректируют раствором гидроокиси калия (10 моль/дм<sup>3</sup>) и разбавляют согласно таблице 1. Мутные пробы дополнительно фильтруют (см. 6.3.1, 6.3.2). Сильноокрашенные пробы обрабатывают поливинилпирролидоном согласно 6.3.2.

В определении по 4.5 используют от 0,200 до 0,500 см<sup>3</sup> фильтрата.

### 6.4 Условия определения

Длина волны при фотометрическом измерении составляет 578 нм. Для измерения используют стеклянную кювету<sup>1)</sup> с толщиной оптического слоя 1 см, равной ширине грани. Ферментативное определение проводят при температуре 37 °С. Общий объем инкубационной смеси в кювете составляет 2,70 см<sup>3</sup>.

Измерение оптической плотности инкубационной смеси проводят против воздуха (без кюветы в световом пути прибора). Проба в инкубационной смеси в кювете должна содержать от 0,5 до 20 мкг аскорбиновой кислоты в 0,1—1,6 см<sup>3</sup> пробы.

### 6.5 Ферментативное определение

Ферментативное определение аскорбиновой кислоты в пробе проводят по схеме дозирования и смешивания реактивов, приведенной в таблице 2. Если в определении используют иммобилизованную АО и готовые наборы реактивов, дозирование и смешивание реактивов проводят по схеме таблицы 3.

Т а б л и ц а 2 — Схема дозирования и смешивания реактивов для ферментативного определения аскорбиновой кислоты

Дозирование в кювету	Контрольная проба	Проба
Рабочий раствор МТТ <sup>1)</sup> (см. 6.2.2)	1,000 см <sup>3</sup>	1,000 см <sup>3</sup>
Дистиллированная вода	1,490 см <sup>3</sup>	1,500 см <sup>3</sup>
Проба <sup>2)</sup> (см. 6.3)	0,100 см <sup>3</sup>	0,100 см <sup>3</sup>
Рабочий раствор АО (см. 6.2.4)	0,01 см <sup>3</sup>	—
Перемешивают. Помещают контрольную кювету и кювету с пробой в термостат при температуре 37 °С. В течение 6 мин <sup>3)</sup> интенсивно перемешивают содержимое кюветы с контрольной пробой пластиковой или стеклянной палочкой с целью насыщения инкубационной смеси воздухом (необходимое условие полного окисления аскорбиновой кислоты в контрольной пробе!). После выдержки в контрольной кювете и в кювете с пробой измеряют значение оптической плотности $A_1$ . Продолжают реакцию добавлением:		
Рабочий раствор ФМС <sup>4)</sup> (см. 6.2.3)	0,100 см <sup>3</sup>	0,100 см <sup>3</sup>
Перемешивают. Инкубируют (в темноте!) при температуре 37 °С в течение 15 мин, после чего немедленно измеряют значение оптической плотности $A_2$ в кювете с контрольной пробой и в кювете с пробой.		
<sup>1)</sup> Температура раствора должна составлять 37 °С. <sup>2)</sup> Перед дозированием в кювету пипетку или наконечник дозатора следует ополоснуть фильтратом пробы (см. 6.3). <sup>3)</sup> При определении аскорбиновой кислоты в пробах, содержащих повышенные количества диоксида серы, время выдержки кюветы с контрольной пробой увеличивают до 10 мин. <sup>4)</sup> После внесения рабочего раствора ФМС кюветы изолируют от доступа света.		

<sup>1)</sup> Вместо кювет из оптического стекла допускается использование одноразовых кювет из полимерных материалов.



Т а б л и ц а 3 — Схема дозирования и смешивания реактивов для ферментативного определения аскорбиновой кислоты при использовании иммобилизованной АО

Дозирование в кювету	Контрольная проба	Проба
Рабочий раствор МТТ (см. 6.2.2)	1,000 см <sup>3</sup>	1,000 см <sup>3</sup>
Дистиллированная вода	1,500 см <sup>3</sup>	1,500 см <sup>3</sup>
Проба (см. 6.3)	0,100 см <sup>3</sup>	0,100 см <sup>3</sup>
Иммобилизованная АО	Один шпатель	—
Перемешивают. Помещают контрольную кювету и кювету с пробой в термостат при температуре 37 °С. В течение 6 мин интенсивно перемешивают содержимое кюветы с контрольной пробой шпателем с иммобилизованной АО с целью насыщения инкубационной смеси воздухом (необходимое условие полного окисления аскорбиновой кислоты в контрольной пробе!). После выдержки в контрольной кювете и в кювете с пробой измеряют значение оптической плотности $A_1$ . Продолжают реакцию добавлением.		
Рабочий раствор ФМС (см. 6.2.3)	0,100 см <sup>3</sup>	0,100 см <sup>3</sup>
Перемешивают. Инкубируют (в темноте!) при температуре 37 °С в течение 15 мин, после чего немедленно измеряют значение оптической плотности $A_2$ в кювете с контрольной пробой и в кювете с пробой.		

## 7 Обработка результатов измерений

Значение разницы между конечным и начальным значениями оптической плотности контроля и пробы рассчитывают по формуле

$$\Delta A = (A_2 - A_1)_{\text{проб}} - (A_2 - A_1)_{\text{контр}} \quad (1)$$

Значение разницы оптических плотностей  $\Delta A$  должно составлять не менее 0,100.

Искомую массовую концентрацию аскорбиновой кислоты в исходной пробе, г/дм<sup>3</sup>, рассчитывают по общей формуле

$$c = \frac{V \cdot MW}{\varepsilon \cdot d \cdot v \cdot 1000} \cdot \Delta A, \quad (2)$$

где  $V$  — общий объем инкубационной смеси, см<sup>3</sup>;

$v$  — объем пробы, см<sup>3</sup>;

$MW$  — молекулярный вес аскорбиновой кислоты или аскорбата (176,13 и 175,12 г/моль соответственно);

$d$  — длина оптического пути кюветы, см;

$\varepsilon$  — молярный коэффициент оптической плотности формазана (при измерении и длине волны 578 нм составляет 16,9 дм<sup>3</sup>/ммоль · см).

Подставляя в формулу (2) необходимые значения для аскорбиновой кислоты, получают модифицированную формулу (3) для расчета массовой концентрации аскорбиновой кислоты (в г/дм<sup>3</sup>) в пробе:

$$c = \frac{270 \cdot 176,13}{16,9 \cdot 1 \cdot 0,100 \cdot 1000} \cdot \Delta A = 0,2814 \cdot \Delta A. \quad (3)$$

Если перед ферментативным определением проба подвергалась разбавлению, то результат, полученный по формуле (3), умножают на коэффициент разбавления  $F$ .

В случае концентрированных соков или пюре результат определения выражают в г/100 г продукта. Расчет осуществляют с учетом навески, взятой для получения восстановленного продукта (см. 6.3), по формуле

$$c = \frac{c}{m} \cdot 100, \quad (4)$$

где  $c$  — массовая концентрация аскорбиновой кислоты в исследованной пробе, рассчитанная по формуле (2), г/дм<sup>3</sup>;

$m$  — навеска концентрированного сока или пюре, взятая для получения восстановленного продукта (см. 6.3), г.

## 8 Дополнительные указания

### 8.1 Факторы, влияющие на определение

Если общая разница оптических плотностей  $\Delta A$  менее 0,100, то необходимо повторно провести определение, используя большую навеску или увеличенный объем пробы, дозируемой в инкубационную смесь (до 1,490 см<sup>3</sup> по схеме дозирования таблицы 2 или до 1,500 см<sup>3</sup> по схеме дозирования таблицы 3). В этом случае объем воды, добавляемой в кювету, должен быть уменьшен на соответствующее значение для сохранения общего объема инкубационной смеси (2,70 см<sup>3</sup>) в кювете с неизменными контролем и пробой. Увеличенный объем пробы необходимо принимать во внимание при расчете конечного результата согласно формуле (3).

### 8.2 Специфичность определения

Метод специфичен для определения общей аскорбиновой кислоты, включающей D- и L-изомеры.

В анализе коммерческих препаратов аскорбиновой кислоты (например, витаминов) в свежеприготовленных растворах можно ожидать, что степень повторного нахождения искомого вещества составит 94 %—100 %. На качество результатов определения степени повторного нахождения влияет срок хранения коммерческого препарата аскорбиновой кислоты и растворитель, используемый для получения растворов. Рекомендуется использовать раствор метафосфорной кислоты (см. 4.1) с доведением pH пробы до 3,5—4,0.

На стабильность аскорбиновой кислоты в водных растворах сильно влияет присутствие ионов металлов, например железа и меди, а также наличие в пробе кислорода. В этом случае ожидаемая степень повторного нахождения будет составлять менее 100 %, что обуславливается частичной потерей аскорбиновой кислоты.

С помощью настоящего ферментативного метода нельзя определить L-аскорбилпальмитат, так как в ходе щелочного гидролиза происходит спонтанное разрушение свободной аскорбиновой кислоты.

### 8.3 Причины возможных ошибок при проведении определения

Сахароза, содержащаяся в соках и соковой продукции, не мешает определению, если ее концентрация в кювете не превышает 30 мг.

Определению аскорбиновой кислоты мешает D-сорбит (при концентрации более 20 мг в кювете), который ингибирует аскорбатоксидазу, а также этанол в высоких концентрациях, превышающих 100 мг/кювета. Влияние большинства мешающих факторов на результат определения исключается путем увеличения длительности инкубации контрольной пробы с аскорбатоксидазой до 10 мин.

Диоксид серы в высоких концентрациях, превышающих 50 мкг/кювета, взаимодействует с МТТ и ФМС и вызывает тем самым медленно текущую реакцию. В этом случае пробу подвергают предварительной обработке согласно 6.3.3.

Ионы металлов в концентрациях более 100 мкг/кювета могут понизить pH системы и, тем самым, ингибировать действие аскорбатоксидазы.

Нитрит, который может содержаться в некоторых овощных соках, не мешает определению. Однако его присутствие в системе может привести к спонтанному распаду аскорбиновой кислоты.

Ионы оксалата в концентрациях от 30 мкг/кювета способны оказывать значительное ингибирующее действие на аскорбатоксидазу. Высокую концентрацию оксалата устраняют путем добавления ионов кальция до концентрации 30 мкг/кювета и выше, а также созданием в системе слабокислой среды (pH 5—6).

### 8.4 Выявление и устранение мешающих факторов при проведении анализа.

#### Контроль ферментативного определения

##### 8.4.1 Общие указания

Если разница оптических плотностей  $\Delta A$  менее 0,100, следует провести повторную подготовку пробы к определению, увеличив ее навеску или уменьшив разбавление. Значение pH пробы в любом определении должно находиться в интервале от 3,5 до 4,0.

##### 8.4.2 Операции с контрольной пробой

Содержимое кюветы с контрольной пробой интенсивно перемешивают стеклянной или пластиковой палочкой (или шпателем с иммобилизованной АО<sup>2</sup>) в течение предварительной реакции.

После внесения рабочего раствора ФМС реакция проявляет повышенную чувствительность к свету, поэтому инкубирование при температуре 37 °С необходимо проводить в полной темноте. Для чего кюветы, находящиеся, например, в держателе, помещенном в водяной или воздушный термостат, накрывают плотной светонепроницаемой тканью. Попадание света приводит к возникновению нежелательной медленно текущей реакции.

В случае медленно текущей реакции, вызванной попаданием света, значение оптической плотности  $A_2$  системы определяют в соответствии с рекомендациями 6.4.5. Так как кюветы с пробой и контрольной пробой содержат одинаковый объем инкубационной смеси, медленно текущие реакции в них идентичны. От экстраполяции в этом случае можно отказаться. Однако необходимо принимать во внимание, что оптическую плотность  $A_2$  в кювете с контрольной пробой и в кювете с пробой необходимо измерять непосредственно одну за другой.

Если разница оптических плотностей ( $A_2 - A_1$ ) контрольной пробы менее 0,020, то следует соблюдать следующие правила: рабочий раствор МТТ должен храниться в темноте; при использовании рабочего раствора МТТ его нельзя подвергать прямому облучению солнечным или электрическим светом; содержимое кюветы с контрольной пробой необходимо интенсивно перемешивать стеклянной или пластиковой палочкой (или шпатель с иммобилизованной АО) с целью насыщения инкубационной смеси воздухом; после внесения в инкубационную смесь рабочего раствора ФМС кюветы с контрольной пробой и пробой защищают от солнечного или электрического света.

#### 8.4.3 Стабильность аскорбиновой кислоты

Водные растворы аскорбиновой кислоты нестабильны. При анализе твердых проб рекомендуется проводить выделение аскорбиновой кислоты раствором метафосфорной кислоты концентрации 15 г/дм<sup>3</sup>. После экстрагирования рН вытяжки корректируют раствором гидроксида калия (10 моль/дм<sup>3</sup>) до 3,5—4,0.

Для стабилизации аскорбиновой кислоты не рекомендуется применять растворы оксалатов, так как их ионы ингибируют аскорбатоксидазу.

Разбавление пробы дистиллированной водой или метафосфорной кислотой проводят непосредственно перед определением. В этом случае нет необходимости в проведении корректировки рН до 3,5—4,0.

#### 8.4.4 Медленно текущие реакции

Из практики применения метода следует, что оптическая плотность инкубационной смеси может увеличиваться даже после окончания ферментативной реакции (возникает медленно текущая реакция). В этом случае расчет значения конечной оптической плотности проводят экстраполированием на момент внесения в инкубационную смесь рабочего раствора ФМС (см. 6.2.3).

Экстраполяцию проводят графическим способом или согласно следующей схеме: по истечении 15 мин после добавления в кюветы рабочего раствора ФМС (см. 6.2.3) проводят измерение оптической плотности ( $A_2$ ), измерения повторяют каждые две минуты до тех пор, пока приращение  $\Delta A/\Delta t$  не будет принимать постоянные значения. Измерения останавливают и действительное значение конечной оптической плотности инкубационной смеси на момент внесения рабочего раствора ФМС (см. приложение А) рассчитывают по формуле

$$A_2(t_0) = A_2(t_{15}) - \frac{15 \cdot \Delta A/\Delta t}{2} \quad (5)$$

Затем по формуле (1) рассчитывают значение разницы между значениями конечной и начальной оптической плотности контроля и пробы.

### 8.5 Контроль ферментативного определения

Контроль определения осуществляют при необходимости проверки качества реактивов, оценки уровня квалификации персонала лаборатории, осуществляющего анализ аскорбиновой кислоты, а также для выявления и устранения случайных и систематических ошибок определения.

#### 8.5.1 Приготовление стандартного раствора аскорбиновой кислоты

Берут навеску в 200 мг аскорбиновой кислоты и количественно переносят ее в мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup>. Объем раствора в колбе доводят до метки метафосфорной кислотой (15 г/дм<sup>3</sup>), затем тщательно перемешивают. Переносят 10 см<sup>3</sup> приготовленного раствора в другую мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup>, затем доводят объем раствора до метки метафосфорной кислотой (15 г/дм<sup>3</sup>). Содержимое колбы тщательно перемешивают.

Стандартный раствор аскорбиновой кислоты стабилен в течение суток при температуре 20 °С, в течение трех дней при температуре 4 °С и в течение одной недели при минус 20 °С. В схемах дозирования и определения (таблицы 2, 3 и 4) допускается использовать в качестве внешнего стандарта только свежеприготовленный стандартный раствор аскорбиновой кислоты.

### 8.5.2 Применение стандартного раствора аскорбиновой кислоты в качестве внутреннего стандарта

Ферментативное определение с применением стандартного раствора аскорбиновой кислоты (см. 6.5.1) в качестве внутреннего стандарта проводят по следующей схеме дозирования (см. таблицу 4):

По формуле (1) рассчитывают разницу значений оптических плотностей для кювет «Проба + стандарт (внутренний)», «Стандарт (внешний)» и «Проба». Степень повторного нахождения (ПН, %) для аскорбиновой кислоты, содержащейся в стандартном растворе (см. 6.5.1), рассчитывают по формуле

$$ПН = \frac{2 \cdot \Delta A_{\text{проба+стандарт}} - \Delta A_{\text{проба}}}{\Delta A_{\text{стандарт}}} \cdot 100. \quad (6)$$

Ферментативное определение проведено без ошибок, если степень повторного нахождения аскорбиновой кислоты находится в интервале от 95 % до 100 %.

Т а б л и ц а 4 — Схема дозирования и смешивания реактивов для ферментативного определения с использованием раствора аскорбиновой кислоты в качестве внешнего и внутреннего стандарта (8.5.2)

Дозируют в кювету	Контрольная проба	Проба	Стандарт (контроль)	Стандарт (внешний)	Контроль + стандарт (внутренний)	Проба + стандарт (внутренний)
Рабочий раствор МТТ (см. 6.2.2)	1,000 см <sup>3</sup>	1,000 см <sup>3</sup>	1,000 см <sup>3</sup>	1,000 см <sup>3</sup>	1,000 см <sup>3</sup>	1,000 см <sup>3</sup>
Дистиллированная вода	1,490 <sup>1)</sup> см <sup>3</sup> (1,500 <sup>2)</sup> см <sup>3</sup>	1,490 <sup>1)</sup> см <sup>3</sup> (1,500 <sup>2)</sup> см <sup>3</sup>	1,490 <sup>1)</sup> см <sup>3</sup> (1,500 <sup>2)</sup> см <sup>3</sup>	1,490 <sup>1)</sup> см <sup>3</sup> (1,500 <sup>2)</sup> см <sup>3</sup>	1,490 <sup>1)</sup> см <sup>3</sup> (1,500 <sup>2)</sup> см <sup>3</sup>	1,490 <sup>1)</sup> см <sup>3</sup> (1,500 <sup>2)</sup> см <sup>3</sup>
Проба (см. 6.3)	0,100 см <sup>3</sup>	0,100 см <sup>3</sup>	—	—	0,050 см <sup>3</sup>	0,050 см <sup>3</sup>
Стандартный раствор аскорбиновой кислоты (см. 6.5.1)	—	—	0,100 см <sup>3</sup>	0,100 см <sup>3</sup>	0,050 см <sup>3</sup>	0,050 см <sup>3</sup>
Рабочий раствор АО (см. 6.2.4) или иммобилизованная АО	0,010 <sup>1)</sup> см <sup>3</sup> (один шпатель <sup>2)</sup> )	—	0,010 <sup>1)</sup> см <sup>3</sup> (один шпатель <sup>2)</sup> )	—	0,010 <sup>1)</sup> см <sup>3</sup> (один шпатель <sup>2)</sup> )	—
Перемешивают. Помещают кюветы в термостат при 37 °С. В течение 6 мин интенсивно перемешивают содержимое контрольных кювет с целью насыщения инкубационной смеси воздухом (необходимое условие полного окисления аскорбиновой кислоты!). После выдержки измеряют значение начальной оптической плотности А1. Продолжают реакцию добавлением.						
Рабочий раствор ФМС (см. 6.2.3)	0,100 см <sup>3</sup>	0,100 см <sup>3</sup>	0,100 см <sup>3</sup>	0,100 см <sup>3</sup>	0,100 см <sup>3</sup>	0,100 см <sup>3</sup>
Перемешивают. Инкубируют (в темноте!) при температуре 37 °С в течение 15 мин, после чего немедленно измеряют значение конечной оптической плотности А2.						
<sup>1)</sup> При использовании рабочего раствора АО (см. 6.2.4).						
<sup>2)</sup> При использовании иммобилизованного препарата АО (например, шпателя с иммобилизованной АО).						

### 8.6 Граница чувствительности метода

Граница чувствительности метода составляет 0,30 мг/дм<sup>3</sup> при  $\Delta A = 0,015$  (при 578 нм) и максимальном объеме пробы  $v$  в 1,490 (или 1,600) см<sup>3</sup>.

### 8.7 Линейность определения

Линейность определения сохраняется в интервале от 0,5 мкг аскорбиновой кислоты в кювете (0,3 мг аскорбиновой кислоты/дм<sup>3</sup> пробы; объем пробы —  $v = 1,600$  см<sup>3</sup>) до 20 мкг аскорбиновой кислоты в кювете (0,2 г аскорбиновой кислоты/дм<sup>3</sup> пробы; объем пробы  $v = 0,100$  см<sup>3</sup>).

## 9 Метрологические характеристики метода

В параллельном определении возможны различия между значениями оптических плотностей, которые будут составлять от 0,005 до 0,010. Это соответствует объему пробы  $v = 0,100 \text{ см}^3$  и концентрации аскорбиновой кислоты от 1,5 до 3 мг/дм<sup>3</sup>. При использовании в определении навески пробы в 1 г/100 см<sup>3</sup> ( $= 10 \text{ г/дм}^3$ ) ожидаемые различия между параллельными определениями составят 0,015—0,030 г/100 г. Метрологические характеристики метода приведены в приложении Б.

Приложение А  
(справочное)

Информация о медленно текущих реакциях

Ферментативные реакции в большинстве случаев являются реакциями нулевого порядка. Основная реакция характеризуется высокой скоростью. Для побочной — медленно текущей реакции — характерны низкие скорости. С практической точки зрения начало основной реакции связано с началом побочной реакции нулевого порядка. Характерным признаком медленно текущей реакции является постоянное количественное изменение оптической плотности с течением времени. Для получения достоверных результатов значение имеет только основная реакция. Концентрацию искомого вещества (субстрата в основной реакции) рассчитывают на основе количественной разницы между значением оптической плотности суммарной реакции (основная + медленно текущая реакции) и значением оптической плотности медленно текущей реакции.

Медленно текущая реакция начинается в отправной точке суммарной реакции (рисунок А.1). В этот момент времени в инкубационной смеси отсутствуют продукты ферментативной реакции, в том числе продукты медленно текущей реакции, которые могли бы привести к изменению оптической плотности системы. Для количественного определения общей разницы оптических плотностей значение конечной оптической плотности инкубационной смеси экстраполируют на момент начала основной реакции — внесение фермента или добавление рабочего реактива (рабочего раствора ФМС в ферментативном определении аскорбиновой кислоты). Контроль медленно текущей реакции позволяет получить только один количественный результат — значение оптической плотности в начальной точке суммарной реакции (основная + побочная реакции). Присутствие в инкубационной смеси медленно текущей реакции регистрируют с момента завершения основной реакции.

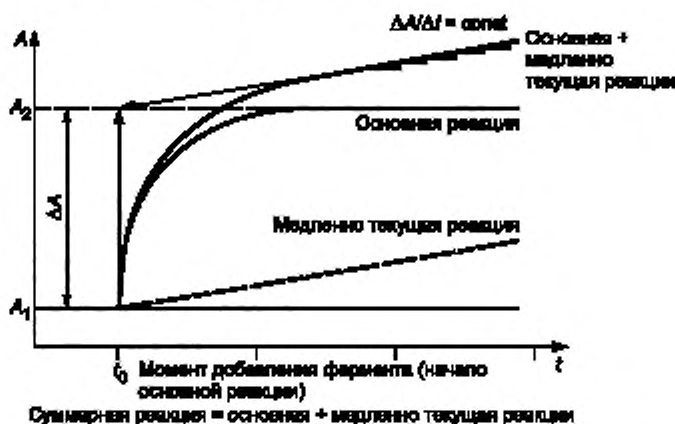


Рисунок А.1 — Графическое определение конечной оптической плотности инкубационной смеси, в которой присутствует медленно текущая реакция



**Приложение Б**  
**(справочное)**

**Метрологические характеристики метода**

Метрологические характеристики метода, полученные в трех лабораториях, приведены в таблицах Б.1 и Б.2.

Таблица Б.1

Показатель	В одной серии определений (количество измерений в серии $n = 15$ )		
	Лаборатория 1	Лаборатория 2	Лаборатория 3
Среднеарифметическое значение $(\bar{x})$ , г/дм <sup>3</sup>	0,059	0,192	0,380
Среднеквадратичное отклонение повторяемости результатов определения $(s_r)$ , г/дм <sup>3</sup>	0,00142	0,00346	0,00456
Коэффициент вариации, %	2,4	1,8	1,2

Таблица Б.2

Показатель	В повторных сериях определений (общее количество измерений $n = 15$ )		
	Лаборатория 1	Лаборатория 2	Лаборатория 3
Среднеарифметическое значение $(\bar{x})$ , г/дм <sup>3</sup>	0,059	0,192	0,380
Среднеквадратичное отклонение повторяемости результатов определения $(s_r)$ , г/дм <sup>3</sup>	0,00224	0,00422	0,0076
Коэффициент вариации, %	3,8	2,2	2,0

## Библиография

- [1] База данных сети Интернет R-Biopharm AG. Food and Feed Analysis. Enzymatic BioAnalysis. — <http://www.r-biopharm.com>. — 2008
- [2] ФС 42-2668—95 Кислота аскорбиновая (витамин С)
- [3] ГФ СССР X, ст. 6 Кислота аскорбиновая (витамин С)
- [4] ТУ 64-13329—81 Дозаторы пипеточные
- [5] Свод правил для оценки качества фруктовых и овощных соков Ассоциации промышленности соков и нектаров из фруктов и овощей Европейского союза (издание на русском языке). — М.: Нововита. — 2004

Ключевые слова: соки фруктовые и овощные, пюре фруктовые и овощные, концентрированные соки фруктовые и овощные, концентрированные пюре фруктовые и овощные, морсы, концентрированные морсы, нектары, сокосодержащие напитки, соковая продукция, определение, измерение, аскорбиновая кислота, ферментативный метод определения, идентификация, соки и соковая продукция для детского питания

---

Редактор *Л.В. Коретникова*  
Технический редактор *Н.С. Гришанова*  
Корректор *В.И. Варенцова*  
Компьютерная верстка *В.И. Грищенко*

Сдано в набор 20.08.2009. Подписано в печать 06.10.2009. Формат 60x84<sup>1/8</sup>. Бумага офсетная. Гарнитура Ариал.  
Печать офсетная. Усл. печ. л. 2,32. Уч.-изд. л. 1,50. Тираж 383 экз. Зак. 691.

---

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.  
[www.gostinfo.ru](http://www.gostinfo.ru) [info@gostinfo.ru](mailto:info@gostinfo.ru)

Набрано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» на ПЭВМ  
Отпечатано в филиале ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» — тип. «Московский печатник», 105062 Москва, Лялин пер., 6