ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ



НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ΓΟCT P 52391— 2005

ПРОДУКЦИЯ ВИНОДЕЛЬЧЕСКАЯ

Метод определения массовой концентрации лимонной кислоты

Издание официальное



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 PA3PA5OTAH Государственным учреждением «Всероссийский научно-исследовательский институт пивоваренной. безалкогольной и винодельческой промышленности» (ГУ ВНИИ ПБ и ВП)
- 2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 91 «Пиво-безалкогольная и винодельческая продукция»
- 3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 9 ноября 2005 г. № 281-ст
- 4 Настоящий стандарт гармонизирован с Регламентом ЕЭС 2676/90 Комиссии от 17 сентября 1990 г. (официальный вестник Европейских Сообществ от 03.10.90), устанавливающим методы анализа, действующие в Сообществе, в области производства вина, приложение, глава 17 «Лимонная кислота»
 - 5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ
 - 6 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Февраль 2007 г.

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 национального органа Российской Федерации по стандартизации в сети Интернет

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

[©] СТАНДАРТИНФОРМ, 2007

[©] СТАНДАРТИНФОРМ, 2008

Содержание

1	Область применения	1
2	Нормативные ссылки	1
	Требования безопасности	
4	Средства измерений, вспомогательное оборудование, реактивы и материалы	2
5	Отбор проб	3
6	Подготовка к выполнению измерений	3
	6.1 Условия выполнения измерений	3
	6.2 Подготовка и отбор кювет	3
	6.3 Приготовление рабочих растворов	
	6.4 Подготовка приборов	4
7	Выполнение измерений	4
	7.1 Подготовка пробы	4
	7.2 Измерение оптической плотности	5
8	Обработка результатов измерений	5
9	Контроль точности результатов	ĉ
	9.1 Контроль повторяемости (сходимости)	ć
	9.2 Контроль воспроизводимости	
	9.3 Контроль погрешности	Ĉ
Бі	иблиография	

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ПРОДУКЦИЯ ВИНОДЕЛЬЧЕСКАЯ

Метод определения массовой концентрации лимонной кислоты

Wine production. Method for determination of citric acid mass concentration

Дата введения — 2006—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на винодельческую продукцию и устанавливает метод определения массовой концентрации лимонной кислоты в диапазоне от 3 до 2000 мг/дм³.

Метод основан на спектрофотометрическом/фотометрическом определении количества окисленного в ходе ферментативных реакций никотинамид-адениндинуклеотида (НАД+), эквивалентного массовой концентрации лимонной кислоты.

Оптическую плотность измеряют в кювете номинальной толщиной 10 мм при длине волны λ = 340 нм (максимум поглощения NADH) либо 334 или 365 нм — при использовании фотометра с прерывистым спектром.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике

ГОСТ Р 51144—98 Продукты винодельческой промышленности. Правила приемки и методы отбора проб

ГОСТ Р 51653—2000 Алкогольная продукция и сырье для ее производства. Метод определения объемной доли этилового спирта

ГОСТ 12.1.004—91 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.2.007.0—75 Система стандартов безопасности труда. Изделия электротехнические. Общие требования безопасности

ГОСТ 12.4.009—83 Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание

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

ГОСТ 908—2004 Кислота лимонная моногидрат пищевая. 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 углекислый кислый. Технические условия

ГОСТ 4328—77 Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 4517—87 Реактивы. Методы приготовления вспомогательных реактивов и растворов, применяемых при анализе

ГОСТ 4529—78 Цинк хлористый. Технические условия

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 12026—76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 17299—78 Спирт этиловый технический. Технические условия

FOCT P 52391—2005

ГОСТ 24104—2001 Весы лабораторные. Общие технические требования

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

ГОСТ 28498—90 Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний

ГОСТ 29169—91 (ИСО 648—77) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной отметкой

ГОСТ 29227—91 (ИСО 835-1—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

Примечень и него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Требования безопасности

- 3.1 Требования электробезопасности при работе с приборами по ГОСТ 12.2.007.0.
- 3.2 Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.
- 3.3 При выполнении анализов необходимо выполнять требования безопасности при работе с химическими реактивами согласно ГОСТ 12.4.103.

4 Средства измерений, вспомогательное оборудование, реактивы и материалы

Спектрофотометр марки СФ-2000, позволяющий проводить измерения при длине волны 340 нм, шириной полосы пропускания не более 5 нм; основная погрешность измерения коэффициента светопропускания не более \pm 0,1 %; кварцевые или стеклянные кюветы номинальной толщиной 10 мм по [1]. При отсутствии спектрофотометра можно пользоваться фотометром с прерывистым спектром, позволяющим проводить измерения при длине волны 334 нм или 365 нм.

Весы лабораторные по ГОСТ 24104 с пределом допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания не более $\pm\,0.05$ мг.

pH-метр с диапазоном измерения pH от 1 до 10; погрешность измерения — не более \pm 0,05 ед. pH.

Секундомер с диапазоном измерения от 60 с до 30 мин; погрешность измерения — не более $\pm\,0,5$ мин.

Пипетки по ГОСТ 29169 вместимостью 1, 2, 5, 10 и 25 см³, 1-го или 2-го класса.

Пипетки по ГОСТ 29227 вместимостью от 0,5 до 2 см³, 1-го или 2-го класса.

Микропипетки вместимостью 5—50, 100—1000 мкл.

Колбы мерные по ГОСТ 1770 вместимостью 100, 500 см³, 1-го или 2-го класса.

Термометр жидкостный стеклянный по ГОСТ 28498 с диапазоном измерения от 10 $^{\circ}$ С до 50 $^{\circ}$ С, цена деления 1 $^{\circ}$ С.

Гигрометр психрометрический по [2].

Колба коническая по ГОСТ 25336 вместимостью 50 см³.

Воронка химическая по ГОСТ 25336.

Стаканы химические по ГОСТ 25336 вместимостью 10 и 25 см³.

Цилиндры по ГОСТ 1770 вместимостью 50, 100, 250 см³.

Палочка стеклянная или пластмассовая.

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328, х.ч.

Кислота лимонная пищевая по ГОСТ 908, экстра.

Глицилглицин.

Цинк хлористый по ГОСТ 4529, х.ч.

Никотинамид-аденин-динуклеотид.

Малат-дегидрогеназа (МДГГ), раствор массовой концентрацией 5 мг/см 3 , активность 136 U (ЕС 1.1.1.37).

Лактат-дегидрогеназа (ЛДГГ), раствор массовой концентрацией 5 мг/см³, активность 280 U (EC 1.1.1.27).

Цитрат-лиаза (ЦЛ), раствор массовой концентрацией 5 мг/см³, активность 12 U (ЕС 4.1.3.6).

Аммоний сернокислый по ГОСТ 3769, х.ч.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Вода бидистиллированная по ГОСТ 4517.

Натрий углекислый кислый по ГОСТ 4201, х.ч.

Поливинилполипирролидон.

Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.

Спирт этиловый технический по ГОСТ 17299.

Допускается применение средств измерений, вспомогательного оборудования с аналогичными метрологическими и техническими характеристиками, а также реактивов по качеству не хуже вышеуказанных.

5 Отбор проб

Отбор проб — по ГОСТ Р 51144.

6 Подготовка к выполнению измерений

6.1 Условия выполнения измерений

При выполнении измерений необходимо соблюдать следующие условия:

- температура окружающей среды, °С от 20 до 30
- относительная влажность воздуха, %, не более . . . 90;

6.2 Подготовка и отбор кювет

Кюветы, предназначенные для определения, моют 10 %-ным раствором соляной кислоты; затем трижды промывают дистиллированной водой и один раз этиловым спиртом. Не допускают применение растворов щелочей, концентрированных кислот и механическую чистку кювет с помощью абразивных средств. Затем кюветы высушивают на фильтровальной бумаге под стеклянным стаканом при комнатной температуре.

Выполняют три параллельных измерения оптической плотности на спектрофотометре/фотометре при длине волны 340 нм (334 нм или 365 нм). Для выполнения измерения используют только те кюветы, для которых выполняется условие $\Delta_{\kappa_i} \leq 0,005$.

Для выполнения измерений на однокюветных спектрофотометрах/фотометрах используют одну и ту же кювету.

6.3 Приготовление рабочих растворов

6.3.1~ Приготовление раствора хлористого цинка (ZnCl $_2$) массовой концентрацией 80~ мг/100~ см 3

В мерную колбу вместимостью 100 см³ переносят 80 мг хлористого цинка, добавляют 10 см³ бидистиллированной воды, перемешивают до полного растворения. Затем объем доводят до метки бидистиллированной водой.

6.3.2 Приготовление раствора натрия гидроокиси молярной концентрацией с (NaOH) = 5 моль/дм 3

В мерную колбу вместимостью 500 см³ наливают 200—250 см³ бидистиллированной воды. Затем постепенно, не допуская разогрева свыше 50 °C, вносят 100 г натрия гидроокиси. Закрывают колбу пробкой и перемешивают круговыми движениями до полного растворения щелочи. Раствор охлаждают до температуры 20 °C—25 °C, доводят до метки бидистиллированной водой и тщательно перемешивают. Приготовленный раствор хранят 3 мес при комнатной температуре.

6.3.3 Приготовление раствора сернокислого аммония молярной концентрацией c [(NH), SO₄] = 3,2 моль/дм³

В мерную колбу вместимостью 100 см³ переносят 42,28 г сернокислого аммония, добавляют 60 см³ бидистиллированной воды и перемешивают круговыми вращениями. Затем объем доводят до метки бидистиллированной водой. Приготовленный раствор хранят 3 мес при комнатной температуре.

6.3.4 Приготовление буферного раствора c pH = 7,8

В мерную колбу вместимостью 500 см³ переносят 7,13 г глицилглицина, добавляют 70 см³ бидистиллированной воды и перемешивают. Затем добавляют 13 см³ раствора натрия гидроокиси молярной концентрацией 5 моль/дм³, приготовленного по 6.3.2, 10 см³ раствора хлористого цинка, приготовленного по 6.3.1, и доводят объем до метки бидистиллированной водой. Приготовленный раствор хранят при температуре 4 °C не более четырех недель. Еженедельно проверяют значение pH.

6.3.5 Приготовление раствора восстановленного никотинамид-аденин-динуклеотида молярной концентрацией c (NADH) = $6 \cdot 10^{-3}$ моль/дм³

В стакан вместимостью 25 см³ вносят 30 мг NADH, растворяют в 6 см³ бидистиллированной воды. Затем добавляют 60 мг углекислого кислого натрия и перемешивают.

6.3.6 Приготовление раствора малат-дегидрогеназы/лактат-дегидрогеназы (МДГГ/ЛДГГ)

В стакан вместимостью 10 см³ вносят микропипеткой 1 см³ раствора МДГГ массовой концентрацией 5 мг/см³, 0,4 см³ раствора сернокислого аммония молярной концентрацией 3,2 моль/дм³ (приготовленного по 6.3.3), 0,5 см³ раствора ЛДГГ массовой концентрацией ферментного препарата 5 мг/см³ и перемешивают.

Приготовленный раствор хранят не более четырех недель при температуре -20 °C.

6.3.7 Приготовление раствора цитрат-лиазы молярной концентрацией с (ЦЛ) = 5 мг/см³

В стакан вместимостью 10 см³ вносят 168 мг ЦЛ. Затем добавляют 1 см³ ледяной бидистиллированной воды и перемешивают.

Приготовленный раствор хранят не более четырех недель при температуре -20 °C.

6.3.8 Приготовление суспензии поливинилполипирролидона (ПВПП)

В стакан вместимостью 25 см³ переносят 0,2 г ПВПП, добавляют 10—15 см³ дистиллированной воды и перемешивают. Затем отстаивают в течение 15 мин и фильтруют через складчатый фильтр. Осадок, оставшийся на фильтре, используют для обесцвечивания красных вин.

П р и м е ч а н и е — Вместо приготовления рабочих растворов по 6.3.1—6.3.7 допускается использование готовых импортных растворов по качеству не хуже предусмотренных по 6.3.1—6.3.7.

6.4 Подготовка приборов

Подготовку спектрофотометра/фотометра и рН-метра к измерениям осуществляют в соответствии с Руководствами по эксплуатации этих приборов.

Нулевое показание по шкале оптической плотности устанавливают по воздуху.

7 Выполнение измерения

7.1 Подготовка пробы

7.1.1 Удаление двуокиси углерода, содержащейся в вине и винном коктейле

Избыток двуокиси углерода удаляют в соответствии с ГОСТ Р 51653.

7.1.2 Обесцвечивание красного вина

При анализе интенсивно окрашенных красных вин проводят обесцвечивание пробы. К 10 см³ вина, помещенного в коническую колбу вместимостью 50 см³, добавляют ПВПП, приготовленный по 6.3.8, смесь перемешивают в течение 2—3 мин, а затем фильтруют через складчатый бумажный фильтр. Для измерения используют прозрачный или слегка окрашенный фильтрат.

7.1.3 Разбавление пробы

В зависимости от проведенной оценки значения массовой концентрации лимонной кислоты пробу разбавляют дистиллированной водой в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1

Диапазон измерений массовой концентрации лимонной кислоты, мг/дм ³	Коэффициент разбавления К
От 3 до 240 включ.	1
Св. 240 » 850 »	4
» 850 » 1250 »	5
» 1250 » 2000 »	10

7.2 Измерение оптической плотности

В кюветы с помощью пипетки и микропипетки дозируют растворы реактивов и пробу в количествах и в порядке, указанном в таблице 2.

Таблица 2

	Объем, см ³		
Наименование растворов	Контрольный раствор ($A_{ m IK}$)	Испытуемый раствор ($A_{1\Pi P}$)	
Буферный раствор по 6.3.4	1,00	1,00	
Раствор NADH по 6.3.5	0,10	0,10	
Проба	<u> </u>	0,20	
Бидистиллированная вода	2,00	1,80	
Раствор МДГГ/ЛДГГ по 6.3.6	0,02	0,02	

Растворы в кювете осторожно перемешивают стеклянной или пластмассовой палочкой и выдерживают в течение $(5,0\pm0,5)$ мин.

Проводят измерение оптической плотности относительно воздуха контрольного (A_{1K}) и испытуемого (A_{1RP}) растворов с записью результата измерения до третьего знака после запятой.

Затем в растворы добавляют по 0,02 см³ раствора цитрат-лиазы, приготовленного по 6.3.7, перемешивают и выдерживают в течение (5,0±0,5) мин. Повторно проводят измерение оптической плотности относительно воздуха контрольного ($A_{\rm 2K}$) и испытуемого ($A_{\rm 2HP}$) растворов с записью результата измерения до третьего десятичного знака.

8 Обработка результатов измерений

8.1 Массовую концентрацию лимонной кислоты C, мг/дм³, вычисляют по формуле

$$C = \alpha \cdot \Delta A \cdot K,\tag{1}$$

где α = 488 мг/дм³ для измерений при λ = 334 нм;

 $\alpha = 479 \text{ мг/дм}^3$ для измерений при $\lambda = 340 \text{ нм}$;

 α = 887 мг/дм³ для измерений при λ = 365 нм;

 ΔA — разность оптических плотностей, вычисленная по формуле (2);

K— коэффициент разбавления по 7.1.3.

8.2 Разность значений оптических плотностей вычисляют по формуле

$$\Delta A = (A_{1\Pi P} - A_{2\Pi P}) - (A_{1K} - A_{2K}),$$
 (2)

где $A_{1\Pi P}$ и $A_{2\Pi P}$ — значения оптической плотности испытуемого раствора до и после реакции с цитрат-лиазой по 7.2;

 $A_{
m IK}$ и $A_{
m 2K}$ — значения оптической плотности контрольного раствора до и после реакции с цитрат-лиазой по 7.2.

П р и м е ч а н и е — Если $(A_{1\mathrm{K}}-A_{2\mathrm{K}})$ имеет отрицательное значение, то его суммируют с $(A_{1\mathrm{\Pi P}}-A_{2\mathrm{\Pi P}})$. Определенная по формуле (2) разность значений оптических плотностей ΔA , как правило, составляет не менее 0,100 и не более 0,800. В противном случае изменяют коэффициент разбавления по 7.1.3.

Вычисления проводят до первого десятичного знака.

За результат анализа принимают среднеарифметическое значение двух результатов параллельных определений, округленное до целого числа, абсолютное расхождение между которыми не превышает предела повторяемости (сходимости) *r*.

Значения предела повторяемости (сходимости) *r* приведены в таблице 4. Результаты измерений считают приемлемыми при условии

$$|X_1 - X_2| \le r,\tag{3}$$

где X_1, X_2 — массовая концентрация лимонной кислоты в двух параллельных определениях.

FOCT P 52391—2005

Если условие (3) не выполняется, то проводят повторные измерения и проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости (сходимости) в соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725-6 (5.2.2).

9 Контроль точности результатов

9.1 Контроль повторяемости (сходимости)

При контроле повторяемости (сходимости) абсолютное значение разности двух результатов параллельных определений, полученных в условиях повторяемости (на одной и той же пробе, в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования, в пределах короткого промежутка времени), не должно превышать абсолютного предела повторяемости (сходимости) r, т. е. с вероятностью P = 0.95 должно выполняться условие (3).

9.2 Контроль воспроизводимости

При контроле воспроизводимости абсолютное значение разности двух результатов анализа одной и той же пробы, полученных в условиях воспроизводимости (в двух лабораториях, разными операторами, с использованием различного оборудования), не должно превышать предела воспроизводимости R. Значения R приведены в таблице 4. Результаты измерений считают приемлемыми при условии

$$|X_1 - X_2| \leq R. \tag{4}$$

9.3 Контроль погрешности

При проведении контроля погрешности метода используют стандартный раствор лимонной кислоты лабораторного приготовления. Схема дозирования представлена в таблице 3.

Таблица 3

	Объем, см ³				
Наименование раств ора	Контрольный раствор	Испытуемый раствор	Стандартный раствор	Стандартный раствор + испытуемый раствор	
Буферный раствор по 6.3.4	1,00	1,00	1,00	1,00	
Раствор NADH по 6.3.5	0,10	0,10	0,10	0,10	
Проба	_	0,20	_	0,10	
Стандартный раствор		_	0,20	0,10	
Бидистиллированная вода	2,00	1,80	1,80	1,80	
Раствор МДГГ/ЛДГГ по 6.3.6	0,02	0,02	0,02	0,02	

Растворы в кюветах осторожно перемешивают стеклянной или пластмассовой палочкой и выдерживают в течение $(5,0\pm0,5)$ мин. Проводят измерение оптической плотности A_1 (для контрольного, испытуемого, стандартного и стандартного + испытуемого растворов). Далее процедуру анализа продолжают в соответствии с 7.2.

Разность значений оптических плотностей вычисляют по формуле (2) и формулам

$$\Delta A_{\text{пр} + \text{станд}} = (A_{1\Pi P} + C_{1\Pi P} + C_{1\Pi P} + C_{1\Pi P} + C_{1\Pi P}) - (A_{1K} - A_{2K}),$$
 (5)

$$\Delta A_{\text{станл}} = (A_{1\text{станл}} - A_{2\text{станл}}) - (A_{1\text{K}} - A_{2\text{K}}). \tag{6}$$

Вычисляют степень повторного нахождения стандарта, %, по формуле

$$\Pi H = \frac{2\Delta A_{\text{пр+станд}} - \Delta A}{\Delta A_{\text{maxive}}} 100. \tag{7}$$

Степень повторного нахождения должна находиться в интервале:

95 %
$$\leq \Pi H \leq 100$$
 %.

Диапазоны измерения массовых концентрацией лимонной кислоты и значения показателей точности метода измерений при P = 0,95 приведены в таблице 4.

Таблица 4

Диапазон измерений массовых концентраций лимонной кислоты, мг/дм ³	Предел повторяемости (сходимости) r , мг/дм 3	Предел воспроизводимости R , мг/дм 3	Границы относительной погрешности ± δ, %
От 3 до 400 включ.	14	39	5
Св. 400 » 2000 »	32	65	4,5

ГОСТ Р 52391—2005

Библиография

[1] АЗОТ «ОКБ Спектр», Россия

Спектрофотометр СФ-2000

[2] TY 25-11.1654—84

Гигрометр психрометрический ВИТ-2

УДК 663.5.001.4:006.354

OKC 67.160.10

H79

ОКСТУ 9109

Ключевые слова: винодельческая продукция, лимонная кислота, ферментативные реакции, спектрофотометрический метод, фотометрический метод, требования безопасности, выполнение измерений, обработка результатов, контроль точности результатов

Редактор Р.Г. Говердовская Технический редактор В.Н. Прусакова Корректор В.И. Варенцова Компьютерная верстка В.И. Грищенко

Подписано в печать 10.06.2008. Формат 60х84¹/₈. Бумага офсетная. Гарнитура Ариал. Печать офсетная. Усл. печ. л. 1,40. Уч.-изд. л. 0,85. Тираж 49 экз. Зак. 722.