



**ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

---

**Молоко сухое, сухие молочные смеси для мороженого и плавленый сыр**

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЛАКТОЗЫ**

**Часть 2**

**Ферментативный метод с использованием галактозы в качестве  
составной части лактозы**

**СТ РК ИСО 5765-2-2009**

*ISO 5765-2:2002 Dried milk, dried ice-mixes and processed cheese – determination of galactose content – enzymatic method utilizing the galactose moiety of the lactose (IDT)*

**Издание официальное**

**Комитет по техническому регулированию и метрологии  
Министерства индустрии и торговли Республики Казахстан  
(Госстандарт)**

**Астана**

## Предисловие

**1 ПОДГОТОВЛЕН И ВНЕСЕН** Республиканским государственным предприятием «Казахстанский институт стандартизации и сертификации», техническим комитетом по стандартизации № 44 «Технолог» (товарищество с ограниченной ответственностью «Эксперт - Консалтинг»)

**2 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ** Приказом Председателя Комитета по техническому регулированию и метрологии Министерства индустрии и торговли Республики Казахстан от 17 августа 2009 года № 418-од

**3** Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 5765-2:2002 Dried milk, dried ice-mixes and processed cheese – determination of galactose content – enzymatic method utilizing the glucose moiety of the lactose (Молоко сухое, сухие молочные смеси для мороженого и плавленый сыр. Определение содержания лактозы. Часть 1. Ферментативный метод с использованием глюкозы в качестве составной части лактозы), с дополнительными требованиями, которые по тексту выделены курсивом

**4** В настоящем стандарте реализованы нормы Закона Республики Казахстан «О техническом регулировании»

**5 СРОК ПЕРВОЙ ПРОВЕРКИ  
ПЕРИОДИЧНОСТЬ ПРОВЕРКИ**

**2014 год  
5 лет**

**6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ**

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

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Комитета по техническому регулированию и метрологии Министерства индустрии и торговли Республики Казахстан

**Содержание**

Введение	IV
1 Область применения	1
2 Нормативные ссылки	1
3 Сущность метода	2
4 Реактивы	3
5 Приборы	4
6 Отбор образцов	5
7 Порядок проведения контроля	5
8 Обработка результатов контроля	9
9 Точность	10
10 Оформление результатов контроля	11
Приложение А (обязательное) Правила практического лабораторного опыта (ПЛО) для выполнения ферментативного метода	12
Библиография	16

## Введение

В настоящем стандарте описывается ферментативный метод для определения лактозы с использованием галактозы в качестве составной части лактозы.

Определение выбора применения метода, описанного в настоящем стандарте или *СТ РК ИСО 5765-1*, зависит от количества глюкозы или галактозы, представленного в образце для анализа. Если содержание глюкозы в образце значительно выше, чем содержание лактозы, то рекомендуется применять метод, описанный в *СТ РК ИСО 5765-1*. Наоборот, для образцов со значительным содержанием галактозы, чем содержание лактозы, рекомендуется использовать метод, описанный в настоящем стандарте.

Для образцов с низким содержанием глюкозы и галактозы метод может применяться без предпочтительности. Для образцов с высоким содержанием глюкозы и галактозы точность определения лактозы снижается для обоих методов.

В термообработанном молоке и молочных продуктах пропорция лактозы может превращаться в лактулозу. Лактулоза не может определяться с помощью метода, описанного в настоящем стандарте. Если, несмотря на это, использовался метод, описанный в *СТ РК ИСО 5765-1*, лактулоза будет определяться как лактоза. Кроме этого, в интенсивно термообработанном молоке (стерилизованное молоко) и молочных продуктах пропорция лактозы может быть связана с протеинами вследствие реакции по Мэйлларду. В таких случаях связанная лактоза не может определяться методом, описанным в *СТ РК ИСО 5765-1*.

Только, когда применяются строго правила практического опыта (GLP) для ферментативного метода, тогда будут получены достоверные результаты. Правила практического опыта (GLP) установлены в Приложении А.

---

**ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

---

**Молоко сухое, сухие молочные смеси для мороженого и плавленый сыр****ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЛАКТОЗЫ****Часть 2****Ферментативный метод с использованием галактозы в качестве  
составной части лактозы**

---

**Дата введения 2010-07-01****1 Область применения**

Настоящий стандарт устанавливает ферментативный метод определения содержания лактозы с использованием галактозы во всех типах сухого молока, молочных смесях для мороженого в сухой форме в процентах других углеводов и восстанавливающих веществах, и сыре плавленом.

**2 Нормативные ссылки**

Для применения настоящего стандарта необходимы следующие ссылочные нормативные документы:

*СТ РК ИСО 5765-1-2009 Молоко сухое, сухие молочные смеси для мороженого и плавленый сыр. Определение содержания лактозы. Часть 1. Ферментативный метод с использованием глюкозы в качестве составной части лактозы.*

*ГОСТ 1770-74 (СТ СЭВ 1247-78, СТ СЭВ 4021-83, СТ СЭВ 4977-85) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия.*

*ГОСТ 3622-68 Молоко и молочные продукты. Отбор проб и подготовка их к испытанию.*

*ГОСТ ИСО 5725-1-2003 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения.*

*ГОСТ ИСО 5725-2-2003 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерения.*

*ГОСТ ИСО 5725-3-2003 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 3. Промежуточные показатели прецизионности стандартного метода измерения.*

---

**Издание официальное**

*ГОСТ ИСО 5725-4-2003 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 4. Основные методы определения правильности стандартного метода измерений.*

*ГОСТ ИСО 5725-5-2003 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 5. Альтернативные методы определения прецизионности стандартного метода измерений.*

*ГОСТ ИСО 5725-6-2003 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике.*

*ГОСТ 12026-76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия.*

*ГОСТ 24104-2001 Весы лабораторные. Общие технические требования.*

*ГОСТ 26809-86 Молоко и молочные продукты. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу.*

*ПРИМЕЧАНИЕ При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов по ежегодно издаваемому информационному указателю «Нормативные документы по стандартизации» по состоянию на текущий год и соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный документ заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться замененным (измененным) документом. Если ссылочный документ отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.*

### **3 Сущность метода**

3.1 Раствор или суспензия рабочей части образца депротенируется для получения чистого экстракта.

3.2 Очищенный экстракт рабочей части образца вступает в реакцию со следующими ферментами или биохимическими веществами:

а)  $\beta$ -галактозидаза, для расщепления лактозы на глюкозу и галактозу;

б)  $\beta$ -галактозидаза дегидрогеназа в процентном соотношении никотинамид-аденин-динуклеотидфосфат ( $\text{НАД}^+$ ), для катализования окисления галактозы в галактоновую кислоту,  $\text{НАД}^+$  сводится к  $\text{НАДФГ}$ .

3.3 Количество  $\text{НАДФГ}$  определяется из оптической плотности испытательного раствора при 340 нм.

3.4 Содержание лактозы, которое пропорционально количеству  $\text{НАДФГ}$ , вычисляется, если исправление делается для представления галактозы в испытательном образце в начале проведения анализов.

## 4 Реактивы

4.1 Применяют только реактивы аналитической степени чистоты, если не указан иной способ действий. Вода, применяемая для приготовления ферментных растворов, должна быть дважды продистиллирована. Вода, применяемая для других целей, должна быть продистиллирована, или быть равноценной степени чистоты.

Необходимо обратить внимание на срок годности реактивов, представленных производителем.

Если ферментная суспензия применяется с другими, кроме установленных деятельностью, объем суспензии по 7.6.1 должен увеличиваться или снижаться пропорционально.

ПРИМЕЧАНИЕ. Реактивы, описанные в 4.5 и 4.7-4.9, могут быть получены в больших количествах как испытательная комбинация, например, испытательный комплект Борингера.\*

### 4.2 Раствор гексаоферрата(II) калия, $K_4[Fe(CN)_6]$

Растворить 3,6 г тригидрат гексаоферрата(II) калия в воде. Развести с  $100 \text{ см}^3$  воды и помешать.

### 4.3 Раствор гептагидрата сульфата цинка, $ZnSO_4$

Разбавить 7,2 г гептагидрата сульфата цинка в воде. Развести с  $100 \text{ см}^3$  воды и помешать.

### 4.4 Раствор гидроксида натрия, $c(NaOH) = 0,1$ моль/л

Разбавить 4,0 г гидроксида натрия в воде. Развести с  $1000 \text{ см}^3$  воды и помешать.

### 4.5 Цитратный буферный раствор, $pH 6,6 \pm 0,1$

Разбавить 2,8 г дигидрат трисодиум цитрата ( $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$ ), 0,042 г моногидрат лимонной кислоты ( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ ) и 0,625 г гептагидрат сульфата магния ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) в  $40 \text{ см}^3$  воды.

Установить pH до  $6,6 \pm 0,1$  при температуре  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  с серной кислотой ( $2 \text{ моль/дм}^3$ ) или раствором гидроксида натрия ( $0,1 \text{ моль/дм}^3$ ). Разбавить в  $50 \text{ см}^3$  воды и смешать.

Данный раствор может держаться 3 месяца, если его хранить в холодильнике при температуре от  $0 \text{ }^\circ\text{C}$  до  $5 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### 4.6 Буферный раствор триэтаноламина (ТЭА), $pH 7,6 \pm 0,1$

Разбавить 16,6 г дигидрофосфат калия в  $80 \text{ см}^3$  воды. Установить pH до  $8,6 \pm 0,1$  при температуре  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  с помощью раствора гидроксида натрия ( $1 \text{ моль/л}$ ). Разбавить в  $100 \text{ см}^3$  воды и смешать.

### 4.7 Буферный раствор $NAДФ^+ / ATФ / TЭА$

\* Испытательный комплект Борингера служит примером соответствующей продукции, доступной в больших количествах.

Разбавить 25 г двуназриевой соли никотинамидадениндинуклеотида [ $C_{21}H_{27}N_7O_{17}P_3$ , приблизительно 98 % анализа] в  $5 \text{ см}^3$  буферного раствора цитрата (4.5).

Данный раствор может держаться 3 недели, если его хранить в холодильнике при температуре от  $0 \text{ }^\circ\text{C}$  и  $5 \text{ }^\circ\text{C}$ .

4.8 Суспензия  $\beta$ -галактозидаза (из кишечной палочки), суспензия в  $3,2 \text{ моль/дм}^3$  раствора сульфата аммония, рН приблизительно равен  $6 \pm 0,1$ .

Действие суспензии  $\beta$ -галактозидаза должно быть, по крайней мере,  $60 \text{ единицы/см}^3$  (лактоза как субстрат при температуре  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Суспензия может держаться около 12 месяцев, если его хранить в холодильнике при температуре от  $0 \text{ }^\circ\text{C}$  до  $5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Сосуд, содержащий суспензию, должен храниться в дробленом льду.

ПРИМЕЧАНИЕ Суспензия  $\beta$ -галактозидаза, которая содержит не более чем 0,001 % каждого из  $\beta$ -фруктозидаза,  $\alpha$ -галактозидаза, дегидрогеназа глюкозы,  $\alpha$ -галактозидаза и НАДФ-оксидаза, вычисляемых в показателях удельной активности  $\beta$ -галактозидаза, установлена подходящей.

4.9 Суспензия  $\beta$ -галактозидаза дегидрогеназа (из синегнойной флуоресценции - *Pseudomonas fluorescens*), суспензия в  $3,2 \text{ моль/дм}^3$  раствора сульфата аммония, рН приблизительно равен  $6 \pm 0,1$ .

Действие суспензии  $\beta$ -галактозидаза дегидрогеназа должно быть, по крайней мере,  $8 \text{ единиц/см}^3$ .

Суспензия может держаться, по меньшей мере, 6 месяцев, если хранить в холодильнике при температуре от  $0 \text{ }^\circ\text{C}$  до  $5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Сосуд, содержащий суспензию, должен храниться в дробленом льду.

ПРИМЕЧАНИЕ Суспензия  $\beta$ -галактозидаза дегидрогеназа, которая содержит не более чем 0,01 % каждого из алкогольдегидрогеназа и  $\beta$ -галактозидаза, не более чем 0,1 % НАДФ-оксидаза и ферменты, взаимодействующие с глюкозой, и не более чем 0,5 % лактатадегидрогеназа найдены подходящими.

4.10 Стандартный раствор лактозы,  $c(C_{12}H_{22}O_{11}H_2O) = 0,8 \text{ мг/см}^3$ .

Перед применением высушить моногидрат лактозы в устойчивую массу в сушильном шкафу при температуре  $87 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Развести 400 мг сухой моногидрат лактозы в воде. Разводить в  $500 \text{ см}^3$  воды и помешать. Раствор можно держать 2 дня, если хранить его в холодильнике при температуре от  $0 \text{ }^\circ\text{C}$  до  $5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Подогреть раствор до  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  сразу до применения.

## 5 Приборы

5.1 Аналитические весы, со способностью взвешивания с точностью до  $\pm 1 \text{ мг}$  с возможностью считывания до  $0,1 \text{ мг}$  по *ГОСТ 24104*.



5.2 Стекланный лабораторный стакан, ёмкостью 50 см<sup>3</sup> и 250 см<sup>3</sup> по ГОСТ 1770

5.3 Мерные пипетки 5 см<sup>3</sup> и 10 см<sup>3</sup>, градуированные на 0,1 деления.

5.4 Пипетки, со способностью подачи 10 см<sup>3</sup>, 5 см<sup>3</sup>, 1 см<sup>3</sup> и 0,05 см<sup>3</sup>.

5.5 Мерная колба с одной меткой, ёмкостью 100 см<sup>3</sup>.

5.6 Фильтровальная бумага, среднего качества, диаметр около 15 см по ГОСТ 12026.

5.7 Фильтр-воронка, диаметр около 7 см.

5.8 Спектрометр, применимый для измерений при 340 нм, оборудованный секциями из оптической длины пути в 1 см.

5.9 Пластические лопатки, используемые для помешивания состава отбразца/фермента в секциях спектрометра.

5.10 Стекланный штабик, диаметром приблизительно 6 мм и длиной 150 мм, для вымачивания образца.

5.11 Водяная баня, способная поддерживать температуры от 20 °С до 25 °С, с держателем, применяемым для поддержки секции спектрометра (5.8) (дополнительное; см. 7.6).

ПРИМЕЧАНИЕ Инкубация секций в водяной бане необходима, только если комнатная температура ниже 20 °С.

5.12 Смесительный прибор, применяемый для приготовления суспензий части рабочего образца плавленного сыра.

5.13 Сушильный шкаф, термостатически контролируемый, способный сохранять температуру (87 ± 2) °С.

5.14 Устройство для толчения, способное перемалывать сыр и легко очищаться.

5.15 Часы с ценой деления в одну минуту.

## 6 Отбор образцов

Отбор образцов по ГОСТ 3622, ГОСТ 26809, рекомендуемый метод отбора образца представлен в [1].

Важно, чтобы лаборатория получила образец, который не был поврежден или изменен во время транспортировки или хранения.

## 7 Порядок проведения контроля

7.1 Испытания для проверки процедуры

7.1.1 Испытания проводят при выполнении одного или более нижеприведенных условий:

а) если используют новую партию буферного раствора НАД<sup>+</sup>/буферного раствора цитрата по 4.7, суспензию β-галактозидаза или суспензию β-галактозидаза дегидрогеназа по 4.9;

б) если буферный раствор НАД<sup>+</sup>/буферный раствор цитрата по 4.7 и/или суспензия β-галактозидаза по 4.8 или суспензия β-галактозидаза дегидрогеназа по 4.8 хранились в холодильнике более чем 2 недели, не употребляясь;

г) если обстоятельства оправдывают выполнение такого испытания.

7.1.2 Пипеткой, объемом 5,0 см<sup>3</sup> и 10,0 см<sup>3</sup>, со стандартным раствором лактозы по 4.10 поместить в две 100 см<sup>3</sup> мерные колбы по 5.5. Добавить 50 см<sup>3</sup> воды в каждую колбу. Продолжать действия, как установлено в подпунктах 7.5 и 7.6.

7.1.3 Вычислить содержание моногидрата лактозы в стандартном растворе лактозы (4.10) в соответствии с формулой 3 по 8.1, применяя следующие значения:

$V_3$  - значение стандартного раствора лактозы по 4.10,  $V_3 = 500$  см<sup>3</sup>;

$V_4$  - значение стандартного раствора лактозы, применяемого по 7.1.2,  $V_4 = 5$  см<sup>3</sup> и 10 см<sup>3</sup>;

$V_5$  - общее значение разбавленного стандартного раствора по 7.1.2,  $V_5 = 100$  см<sup>3</sup>.

7.1.4 Принимая во внимание чистоту моногидрата лактозы, восстановление, полученное для обоих разбавлений, должно быть в пределах  $(100 \pm 2)$  %.

Если восстановление не будет в этих пределах, то необходимо проверить реактивы, действующие методы, точность пипеток и состояние спектрометра. Предпринять действия, необходимые для получения соответствующих результатов. Повторить испытания для проверки процедуры до получения удовлетворительных результатов испытания.

## 7.2 Приготовление испытательного образца

### 7.2.1 Сухое молоко и сухие молочные смеси

Переместить испытательный образец в контейнер, предусмотренный воздухонепроницаемой крышкой, размером вдвое больше образца. Закрыть контейнер. Помешать образец взбалтыванием и переворачиванием контейнера.

### 7.2.2 Плавленный сыр

Необходимо снять корку, запачканный и заплесневелый слой сыра с испытываемого образца сыра. Перемолоть испытываемый образец с использованием перемалывающего устройства по 5.14. Помешать перетолченную массу и, если возможно, перемолоть его второй раз. Снова основательно помешать.

Если задержка неизбежна, поместить испытательный образец в контейнер, предусмотренный воздухонепроницаемой крышкой, размером вдвое больше образца для получения анализов. Закрыть контейнер. Принять меры предосторожности для обеспечения соответственного сохранения

испытательного образца и для предупреждения конденсации влажности на внутренней поверхности контейнера.

После перемалывания, взбалтывания и взвешивания или после вынужденной задержки, поместить полученный испытательный образец в 250 см<sup>3</sup> стеклянный лабораторный стакан (5.2). Добавить небольшое количество воды и получить полную суспензию микстуры с помощью смесительного аппарата по 5.12.

### 7.3 Рабочая часть образца

Взвесить с точностью до 1 мг, 1 г или более (смотреть ниже) испытательный образец по 7.2.1 или испытательный образец суспензии по 7.2.2 в стеклянном лабораторном стакане по 5.2. Развести или разбавить часть рабочего образца в 20 см<sup>3</sup> воды, предварительно подогретой при температуре от 40 °С до 50 °С, применяя стеклянный штабик по 5.10 или смесительный аппарат по 5.12. Поместить содержимое стеклянного лабораторного стакана количественно в мерную колбу объемом 100 см<sup>3</sup> по 5.5. Разбавить с 60 см<sup>3</sup> воды и помешать.

После определения массы рабочей части испытательного образца необходимо установить:

- рабочая часть образца должна быть представителем полного испытательного образца;

- содержание лактозы в секциях спектрометра должно быть от 5 до 100 мг;

- оптическая плотность ( $A_2$ ) раствора в секциях спектрометра, для глюкозы в испытательном образце по 8.1, должна быть от 0,1 до 0,4;

- если массовая доля лактозы в образце менее чем 0,2 %, то более чем 1 г части рабочего образца может востребоваться. В таком случае, объем жирности, протеина и других веществ, установленный в 7.5.1, может иметь значительное влияние на объем раствора (см.  $V_3$  в 8.1).

### 7.4 Контрольное испытание для реактивов

Выполнить контрольное испытание два раза. Далее необходимо продолжать, как установлено в 7.5 и 7.6, применяя все реактивы, но опуская рабочую часть образца.

### 7.5 Депротенирование

7.5.1 Добавить в следующем порядке в испытательный раствор или суспензию по 7.3 в мерную колбу объемом 100 см<sup>3</sup> с одной меткой:

- 5,0 см<sup>3</sup> раствора гексаоферрата(II) калия по 4.2,

- 5,0 см<sup>3</sup> раствора гептагидрата сульфата цинка по 4.3,

- 10,0 см<sup>3</sup> раствора гидроксида натрия, после тщательного помешивания после каждого добавления.

Разбавить со 100 см<sup>3</sup> воды и помешать.

Дать полученной смеси простоять 30 минут. Не перемешивать повторно содержимое колбы до момента фильтрации.

7.5.2 Профильтровать верхний слой жидкости через фильтровальную бумагу (5.6), сбрасывая первую часть фильтрата.

## 7.6 Определение

### 7.6.1 Схема процедуры

Осуществить определение в соответствии со схемой, приведенной в Таблице 1, заботясь о подаче НАДФ<sup>+</sup>/буферного раствора цитрата по 4.5, буферного раствора фосфата по 4.6 и воды комнатной температуры от 20 °С до 25 °С до применения.

**Таблица 1 – Схема определения**

	Образец или стандартное испытание для		Контрольное испытание реактивов для	
	лактозы и глюкозы	глюкозы	лактозы и глюкозы	глюкозы
1	2	3	4	5
Пипетка в секциях спектрометра: Буферный раствор цитрата (4.5) Суспензия β-галактозидаза (4.8) Вода Образец или стандартный фильтрат (7.5.2) Контрольный фильтрат реактива	0,20 см <sup>3</sup> 0,05 см <sup>3</sup>  1,00 см <sup>3</sup> -	0,20 см <sup>3</sup> - 0,05 см <sup>3</sup> 1,00 см <sup>3</sup> -	0,20 см <sup>3</sup> 0,05 см <sup>3</sup>  - 1,00 см <sup>3</sup>	0,20 см <sup>3</sup> - 0,05 см <sup>3</sup> - 1,00 см <sup>3</sup>
Смешать содержимое спектрометрических секций, применяя пластические лопатки (5.9), и инкубировать 15 минут при температуре 20 °С, применяя паровую ванну (5.11) по требованию. Затем добавить в секции спектрометра с применением пипетки (5.4):				
Буферный раствор фосфата (4.6) Вода	1,00 см <sup>3</sup> 1,00 см <sup>3</sup>	1,00 см <sup>3</sup> 1,00 см <sup>3</sup>	1,00 см <sup>3</sup> 1,00 см <sup>3</sup>	1,00 см <sup>3</sup> 1,00 см <sup>3</sup>
Смешать содержимое спектрометрических секций; после 2 минут помешивания, измерить оптическую плотность, $A_0$ , раствора в каждой секции против воздуха при длине волны 340 нм. Затем добавить нижеприведенное в секции спектрометра с применением пипетки (5.4):				
Суспензия β-галактозидаза дегидрогеназа (4.9)	0,05 см <sup>3</sup>	0,05 см <sup>3</sup>	0,05 см <sup>3</sup>	0,05 см <sup>3</sup>
Смешать содержимое спектрометрических секций и инкубировать 15 минут при температуре 20 °С, применяя паровую ванну (5.11) по требованию. Измерить оптическую плотность, $A_{15}$ , раствора в каждой секции против воздуха. После дополнительных 5 минут, измерить оптическую плотность каждого раствора снова. Если реакция не останавливается, продолжить измерения каждого раствора с интервалом в 5 минут до тех пор, пока повышение оптической плотности не станет устойчивым свыше последующих интервалов в 5 минут.				

## 7.6.2 Расчет оптической плотности

7.6.2.1 Если нет повышения в оптической плотности, проявляемой после 15 минут инкубации, вычисляют оптическую плотность,  $A$ , содержание каждого элемента при расчете (см 8.1) с применением формулы (1):

$$A = A_t - A_0, \quad (1)$$

где,  $A_0$  - численное значение оптической плотности, измеренное перед добавлением суспензии НК/G6P-DH;

$A_t$  - численное значение оптической плотности, измеренное после инкубации через 15 минут.

7.6.2.2 Если реакция не прекращается после 15 минут, вычисляют оптическую плотность,  $A$ , каждого содержащего элемента при расчете по 8.1 с применением формулы (2):

$$A = (A_t - A_0) - \frac{t}{5}(A_t - A_{t-5}), \quad (2)$$

где,  $A_0$  - численное значение оптической плотности, измеренное перед добавлением суспензии НК/G6P-DH;

$A_t$  - численное значение оптической плотности, измеренное после инкубации на период  $t$ , минуты;

$A_{(t-5)}$  - численное значение оптической плотности, измеренное после инкубации на период  $(t - 5)$  минут.

7.6.3 Если оптическая плотность  $A$  превышает 0,500, повторить процедуру, предусмотренную в 7.6.1 и 7.6.2, применяя соответствующее водное разбавление фильтрата по 7.5.2.

## 8 Обработка результатов контроля

### 8.1 Расчет

Содержание лактозы,  $w_L$ , рассчитывается по формуле (3):

$$w_L = \frac{[(A_1 - A_3) - (A_2 - A_4)] \times M_r}{K \times l} \times \frac{V_1 \times V_3 \times V_5}{V_2 \times V_4} \times \frac{100}{m}, \quad (3)$$

где,  $w_L$  - содержание лактозы, выраженное как процентное отношение по массе;

$A_1$  - численное значение оптической плотности (вычисленное в 7.6.2) образца или стандартного испытания для лактозы и галактозы;

$A_2$  - численное значение оптической плотности (вычисленное в 7.6.2) образца или стандартного испытания для галактозы;

$A_3$  - численное значение оптической плотности (вычисленное в 7.6.2) реактивного контрольного испытания для лактозы и галактозы;

$A_4$  - численное значение оптической плотности (вычисленное в 7.6.2) реактивного контрольного испытания для галактозы;

$M_r$  - относительная молекулярная масса лактозы; для безводной лактозы,  $M_r = 342,30$ , и для моногидрата лактозы,  $M_r = 360,31$ ;

$K$  - молярный коэффициент поглощения НАДФ при 340 нм (т.е.  $K = 6,3 \times 10^6$  см<sup>2</sup>/моль);

$l$  - численное значение теоретической протяженности длины секции спектрометра, в сантиметрах (1 см);

$V_1$  - общий объем жидкости в секции спектрометра по 7.6.1, (3.30 см<sup>3</sup>);

$V_2$  - объем фильтрата по 7.5.2 или его разбавления по 7.6.3, прибавленного в секцию спектрометра (1,00 см<sup>3</sup>), см<sup>3</sup>;

$V_3$  - объем раствора, приготовленного по 7.5.1 (100 см<sup>3</sup>);

$V_4$  - объем фильтрата по 7.5.2, представленный для раствора по 7.6.3, см<sup>3</sup>;

$V_5$  - объем, в котором испытательный раствор разбавлен по 7.6.3, см<sup>3</sup>;

$m$  - масса рабочей части образца по 7.3, г.

Если отрицательная величина устанавливается для  $(A_2 - A_4)$ , необходимо ее учитывать.

ПРИМЕЧАНИЕ Если масса испытательного образца больше, чем 1 г, то  $V_3$  можно вычислить по формуле (4):

$$V_3 = 100 - P, \quad (4)$$

где  $P$  - объем осадка, см<sup>3</sup>

$P$  может вычисляться из приближенного состава испытательного образца с применением следующей формулы:  $P = 1,1 \times (\text{граммы жира}) + 0,73 \times (\text{граммы протеина}) + 0,65 \times (\text{граммы крахмала}) + 0,55 (\text{граммы нерастворимой золы})$ .

## 8.2 Выражение результатов

Результаты выражают по трем значительным подсчетам.

## 9 Точность

### 9.1 Межлабораторное испытание

Детали межлабораторного испытания на прецизионность метода должны быть опубликованы в соответствии с [2].

Значения для повторяемости и воспроизводимости, выведенные из данного испытания, определены в соответствии с *ГОСТ ИСО 5725-1*, *ГОСТ 5725-2*, *ГОСТ ИСО 5725-3*, *ГОСТ ИСО 5725-4*, *ГОСТ 5725-5*, *ГОСТ ИСО 5725-6*. Показания пределов не могут применяться к диапазонам концентрации и матрицам, за исключением приведенных.

## 9.2 Повторяемость

Абсолютное различие между двумя независимыми единичными результатами испытания, полученное с использованием такого же метода на идентичном испытательном материале в такой же лаборатории таким же оператором на таком же применяемом оборудовании в пределах короткого интервала времени, не более 5 %, в случае если будет больше чем:

- для сухого молока и сухих молочных смесей для мороженого: 3 % среднего арифметического значения результата испытания;
- для плавленого сыра: 6 % среднего арифметического значения результата испытания.

## 9.3 Воспроизводимость

Абсолютное различие между двумя независимыми единичными результатами испытания, полученное с использованием такого же метода на идентичном испытательном материале в разных лабораториях различными операторами на разных оборудовании, не более 5 %, в случае если будет больше чем:

- для сухого молока и сухих молочных смесей для мороженого: 6 % среднего арифметического значения результата испытания;
- для плавленого сыра: 14 % среднего арифметического значения результата испытания.

## 10 Оформление результатов контроля

Протокол испытания должен содержать:

- а) всю информацию необходимую для окончательной идентификации образца;
- б) применяемый метод отбора образцов, если известен;
- в) применяемый метод испытания, со ссылкой на настоящий стандарт;
- г) все операционные детали, не указанные в настоящем стандарте, или рассмотренные в качестве необязательного, вместе с деталями случая, которые могут влиять на результат испытания;
- д) результаты испытания или, если проверена повторяемость, то результаты нескольких испытаний.

**Приложение А**  
(обязательное)

**Правила практического лабораторного опыта (ПЛО)**  
**для выполнения ферментативного метода**

**А.1 Введение**

Правила практического лабораторного опыта для ферментативного метода малоизвестны, чем для химического анализа.

Рекомендовано для получения результата с достаточной точностью.

**А.2 Реактивы**

А.2.1 Использовать только ферменты установленного типа (удельная активность, концентрация, загрязнения с ферментной активностью, растворитель).

А.2.2 Использовать только коферменты установленного типа (степень чистоты, соль или кислотная форма, загрязнения).

А.2.3 Все реактивы, кроме ферментов и коферментов, должны быть аналитической степени чистоты.

А.2.4 Вода для приготовления ферментного раствора и другие реактивы должны быть дважды продистиллированы.

А.2.5 Вода для приготовления раствора образцов должна быть дважды продистиллирована или деионизирована.

А.2.6 Хранить реактивы и ферментные суспензии/растворы в соответствии с инструкциями (обычно при температуре от 2 °С до 8 °С).

А.2.7 Не замораживать ферментные суспензии.

А.2.8 Если срок хранения реактивов истек, то необходимо выбросить реактивы или проверить на действенность данных реактивов стандартным раствором с переменным количеством вещества, определяемым при анализе. Полученные оптические плотности должны быть пропорциональны по отношению к концентрациям.

А.2.9 Буферные растворы, взятые из холодильника, должны быть подогреты до температуры от 18 °С до 23 °С до добавления испытуемой смеси.

**А.3 Фотометрические и спектрометрические секции**

А.3.1 Использовать стеклянные или пластмассовые секции с оптической длиной 1 см.

**ПРИМЕЧАНИЕ** У пластмассовых секций есть следующие преимущества над стеклянными секциями:

- они являются дешевыми (доступными);
- большое число анализов может быть отслежено;



- внутри одной партии пластмассовые секции сходятся очень хорошо, касательно оптической плотности.

А.3.2 Когда новая партия секции вводится в эксплуатацию, то необходимо проверить оптическую длину пути секций, сравнивая с контрольными секциями (например, кварцевые секции), как изложено ниже.

Наполнить контрольную секцию и пластмассовые секции водой и измерить оптическую плотность ( $A_1$ ) каждой секции против воздуха. Наполнить секции, после промывания, раствором НАДГ (приблизительно  $0,15 \text{ мг/см}^3$ ) и снова измерить оптическую плотность ( $A_2$ ) против воздуха.

Для контрольной секции и пластмассовых секций вычислить  $(A_2 - A_1)$ . Разница  $(A_2 - A_1)$  между двумя видами секций не должна сильно отличаться. Если разница  $(A_2 - A_1)$  превышает 0,5 % измерения чистой оптической плотности для контрольной секции, то необходимо вычислить среднюю разницу в процентном соотношении и принять это во внимание для протяженности пути,  $l$ , при расчете по 8.1.

А.3.3 Всегда использовать чистые и неисцарапанные секции. Высушить или очищать оптическую поверхность секции только мягкой тканью.

А.3.4 Не делать измерения оптической плотности испытательной секции образца по исходной исполнительской секции, так как никакая информация не будет получена о порядке величины оптической плотности самого контрольного испытания. Измерить оптическую плотность образца и секции для контрольного испытания против воздуха и вычислить разницу.

А.3.5 Не измерять оптическую плотность образца и секции для контрольного испытания в пустой секции (из-за рассеивания света).

А.3.6 Помешать содержимое секции пластмассовыми лопатками или герметизацией секции парафином и мягким вращением.

А.3.7 Устранить пузырьки воздуха со стенок секции с использованием лопатки. Избегать царапаний оптической поверхности секции.

А.3.8 Всегда применять установленные секции для измерения выборочного испытания и контрольного испытания.

А.3.9 Всегда помещать секции в определенном положении и ориентации в держатель секции.

#### **А.4 Фотометры и спектрометры**

А.4.1 Использовать спектрометр (ширина спектра меньше или равна 10 нм), предоставляемый фильтр подавления помех (ширина спектра меньше или равна 10 нм) или фотометр спектральной линии, оснащенной ртутной лампой. Измерения, выполненные с применением спектрометра или фильтрового фотометра, должны осуществляться при максимуме поглощающей способности НАДГ и НАДФ, т.е. при 340 нм; они выполняются с применением фотометра спектральной линии с ртутной лампой и должны осуществляться при 365 нм или 334 нм.

ПРИМЕЧАНИЕ Молярный коэффициент поглощения НАДГ и НАДФ, определенный при 334 нм, 340 нм и 365 нм, должен быть, как изложен ниже:

- НАДГ и НАДФ при 334 нм (Гг):  $6,18 \times 10^6 \text{ см}^2 / \text{моль}$  ;
- НАДГ и НАДФ при 340 нм:  $6,3 \times 10^6 \text{ см}^2 / \text{моль}$  ;
- НАДФ при 365 нм (Гг):  $3,5 \times 10^6 \text{ см}^2 / \text{моль}$  ;
- НАДГ при 365 нм (Гг):  $3,4 \times 10^6 \text{ см}^2 / \text{моль}$  .

А.4.2 Линейное соотношение вплоть до оптической плотности 2,0 должно быть между оптической плотностью и концентрацией НАДГ и НАДФ. Проверить это по нижеприведенным пунктам.

а) 2,0 см<sup>3</sup> пипетки с дистиллированной водой добавить в секцию. Измерить оптическую плотность  $A_0$  против воздуха.

б) 0,10 см<sup>3</sup> пипетки с раствором НАДГ (0,5 мг/см<sup>3</sup>) добавить в секцию и помешать. Измерить оптическую плотность  $A_1$ .

Вычислить приведенную оптическую плотность,  $A_m$ , применяя формулу А.1:

$$A_{r1} = (A_1 - A_0) \times 2,1/3,5, \quad (\text{А.1})$$

где  $A_1$  - численное значение оптической плотности, полученное с помощью определения раствором НАДГ (б);

$A_0$  - численное значение оптической плотности, полученное с помощью определения водой (а).

в) Повторить процедуру 14 раз по пункту б).

После каждой пары измерения, вычислить приведенную оптическую плотность,  $A_m$ , применяя формулу А.2:

$$A_m = (A_n - A_0) \times \frac{V}{3,5}, \quad (\text{А.2})$$

где  $A_n$  - численное значение оптической плотности, полученное при измерении  $n$ ;

$V$  - объем содержания секции при измерении  $n$ .

г) Для каждого измерения составить план объема раствора НАДГ, представленный в секции в сравнении с соответствующей приведенной оптической плотностью. Прямая линия должна быть получена соединением полученных точек пересечения.

## А.5 Автоматические пипетки и другие пипетки-дозаторы

А.5.1 Использовать автоматические пипетки и другие пипетки-дозаторы в соответствии с инструкцией производителя.

А.5.2 Использовать соответствующие наконечники для каждой пипетки.

А.5.3 Проверить периодически спецификации для объема и повторяемости автоматических пипеток и других пипеток-дозаторов (например, ежемесячно) по нижеприведенным пунктам:

- а) взвесить стеклянный лабораторный стакан, наполненный водой по времени  $t$ ;
- б) распределить одну меру воды в стакан и взвесить точно по  $t + 1$  минута после первого взвешивания;
- в) повторить девять раз процедуру распределения соответственно пункту б);
- г) взвесить, без распределения, стакан в моментах  $t + 11$  минут,  $t + 12$  минут,  $t + 13$  минут,  $t + 14$  минут и  $t + 15$  минут; вычислить из этих данных взвешиваний потерю от испарения за минуту;
- д) вычислить объем и повторяемость пипетки или пипетки дозатора, принимая во внимание потерю воды при испарении.

А.5.4 На значение некоторых автоматических пипеток может воздействовать теплообмен от ладони руки во время продолжительного применения.

Проверить данное явление процедурой, описанной в А.5.3, и избегать применения таких пипеток.

А.5.5 Перед применением промыть наконечники пипеток несколько раз установленным раствором/суспензией. Для каждого раствора необходимо применить новый наконечник пипетки.

А.5.6 Распределить водный, буферный, ферментный, коферментный и выборочный раствор - вставляя наконечник как можно ниже - в различные уголки секции.

ПРИМЕЧАНИЕ Малое количество ферментного раствора/суспензии ( $10 \text{ см}^3$  и  $50 \text{ см}^3$ ) может распределяться лопаткой, доставляться в секции и смешиваться лопаткой.

А.5.7 Удалить загрязнения.

## А.6 Дополнительная информация

А.6.1 Проверить возможные влияния и грубые ошибки при определении оптической плотности двух растворов с помощью различных концентраций определяемого при анализе вещества.

А.6.2 Применить эталон для проверки ферментативных реакций. Данный эталон должен рассматриваться как рабочий эталон.

ПРИМЕЧАНИЕ Подтвержденные ссылочные материалы могут быть получены из организации, например, как Национальный Институт стандартов и технологии (ранее Национальное бюро стандартов) или Европейское сообщество по бюро рассылки.

А.6.3 Выполнить испытание восстановления при наличии раствора образца. Количество добавляемого определяемого при анализе вещества должно быть приблизительно таким же, как уже текущие в растворе образца.

Количество жидкости, оставшееся на лопатке, может быть рассмотрено как незначительное.

### Библиография

[1] ИСО 707:2008 Молоко и молочные продукты – Руководство по отбору проб

[2] Межлабораторные общие исследования, вторая серия. Бюллетень Международной Федерации Производителей Молока, 285, 1993, приложение А, приложение В и приложение С

---

**УДК 637.143.2:663.674:637.358:637.345:547.455.623:006.354(574)**

**МКС 67.100**

**Ключевые слова:** молоко сухое, мороженое, плавленый сыр, содержание лактозы, ферментативный метод, галактоза, рабочая часть образца, реактивы, приборы

---

Басуға \_\_\_\_\_ ж. қол қойылды Пішімі 60x84 1/16  
Қағазы офсеттік. Қаріп түрі «KZ Times New Roman»,  
«Times New Roman»  
Шартты баспа табағы 1,86. Таралымы \_\_\_\_\_ дана. Тапсырыс \_\_\_\_\_

---

«Қазақстан стандарттау және сертификаттау институты»  
республикалық мемлекеттік кәсіпорны  
010000, Астана қаласы Орынбор көшесі, 11 үй,  
«Эталон орталығы» ғимараты  
Тел.: 8 (7172) 240074