ГОСТ Р 51258—99
(ДИН 10326—86)

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

МОЛОКО И МОЛОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ

Метод определения сахарозы и глюкозы

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2009

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Московским государственным университетом пищевых производств

ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 335 «Методы испытаний агропромышленной продукции на безопасность»

2 ПРИНЯТ И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Госстандарта России от 12 апреля 1999 г. № 120

3 Настоящий стандарт представляет собой аутентичный текст национального стандарта ФРГ ДИН 10326—86 «Ферментативное определение сахарозы и глюкозы в молочных продуктах и мороженом» с дополнительными требованиями, отражающими потребности народного хозяйства (разделы 2, 3, 4, 5, 6 и 7)

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

5 ИЗДАНИЕ (август 2009 г.) с Поправкой (8—2009).

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания на территории Российской Федерации без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

МОЛОКО И МОЛОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ

Метод определения сахарозы и глюкозы

Milk and milk products.
Method for determination of sucrose and glucose content

Дата введения 2000—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на молоко, молочный напиток, молочные продукты, сладкий плавленый сыр и устанавливает метод определения массовых долей сахарозы и глюкозы в молоке и молочных продуктах.

(Поправка).

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 3652—69 Реактивы. Кислота лимонная моногидрат и безводная. Технические условия

ГОСТ 3769—78 Реактивы. Аммоний сернокислый. Технические условия

ГОСТ 4174—77 Реактивы. Цинк сернокислый 7-водный. Технические условия

ГОСТ 4328—77 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 4523—77 Реактивы. Магний сернокислый 7-водный. Технические условия

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 26809—86 Молоко и молочные продукты. Правила приемки, методы отбора и подготовки проб к анализу

3 Определения, обозначения и сокращения

3.1 В настоящем стандарте применяют следующий термин с соответствующим определением:

массовые доли сахарозы и глюкозы: Массовые доли сахарозы и глюкозы в молоке и молочных продуктах, определенные раздельно в соответствии с настоящим стандартом и выраженные в г/100 г.

3.2 В настоящем стандарте применяют следующие обозначения и сокращения:

ФР — β-фруктозидаза;
АТФ — аденозин-5′-трифосфат;
АДФ — аденозин-5′-дифосфат;
ГК — гексокиназа;
Г-6-Ф — глюкозо-6-фосфорная кислота;
Г6Ф-ДГ — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа;
НАДФ — β-никотинамидадениндинуклеотидфосфат;
НАДФН — β-никотинамидадениндинуклеотид (восстановленная форма);
ГЛ-6-Ф — глюконат-6-фосфорная кислота;

Е — международная единица, определяющая количество (активность) фермента, которое служит катализатором для превращения при 25 °С 1 мкмоля вещества в минуту.

Издание официальное

4 Сущность метода и реакции

4.1 Сущность метода

Метод определения глюкозы основан на фосфорилировании глюкозы, содержащейся в освобожденном от жира и белка водном экстракте пробы молока или молочных продуктов, под действием АТФ в присутствии фермента ГК, окислении образовавшейся Г-6-Ф под действием НАДФ в присутствии фермента Г6Ф-ДГ и фотометрическом измерении массовой доли образовавшегося НАДФН, эквивалентной массовой доле глюкозы в пробе (свободная глюкоза).

Метод определения сахарозы основан на гидролизе сахарозы, содержащейся в освобожденном от жира и белка водном экстракте пробы молока или молочных продуктов, в присутствии фермента ФР до глюкозы и фруктозы, фосфорилировании и окислении имеющейся в пробе глюкозы (общая глюкоза — свободная глюкоза плюс образовавшаяся при гидролизе сахарозы) под действием АТФ в присутствии фермента ГК, окислении образовавшейся Г-6-Ф под действием НАДФ в присутствии фермента Г6Ф-ДГ, фотометрическом измерении массовой доли образовавшегося НАДФН, эквивалентной массовой доле глюкозы, и расчете содержания сахарозы по разности оптических плотностей данного раствора и раствора, используемого при определении свободной глюкозы.

4.2 Реакции

В фотометрической кювете протекают следующие ферментативные реакции:

$$\text{сахароза} + H_2O \xrightarrow{\text{ФР}} \text{глюкоза} + \text{фруктоза}; \quad (1)$$

$$\text{глюкоза} + \text{АТФ} \xrightarrow{\text{ГК}} \text{Г-6-Ф} + \text{АДФ}; \quad (2)$$

$$\text{Г-6-Ф} + \text{НАДФ}^+ \xrightarrow{\text{Г6Ф-ДГ}} \text{ГЛ-6-Ф} + \text{НАДФН} + H^+. \quad (3)$$

5 Реактивы

При проведении анализа используют химически чистые или чистые для анализа реактивы.

Вода, используемая для приготовления растворов ферментов, должна быть бидистиллированной.

Вода, используемая для приготовления растворов химических реагентов и подготовки проб, должна быть дистиллированной по ГОСТ 6709 или деминерализованной.

Допускается использование имеющихся в продаже готовых наборов реактивов для определения сахарозы и глюкозы при условии соответствия их качества требованиям настоящего стандарта.

Препараты динатриевой соли β-никотинамидадениндинуклеотидфосфата (β-НАДФ-Na_2) и динатриевой соли аденозин-5′-трифосфата (АТФ-$Na_2H_2\times3H_2O$) должны содержать не менее 90 % основного вещества.

5.1 Раствор сернокислого цинка

30 г сернокислого цинка по ГОСТ 4174 ($ZnSO_4\times7H_2O$) растворяют в 100 см^3 дистиллированной воды по ГОСТ 6709. Раствор хранят при комнатной температуре 12 мес.

5.2 Раствор гексациано-(II)-феррата калия

15 г гексациано-(II)-феррата ($K_4[Fe(CH)_6\times3H_2O$) калия растворяют в 100 см^3 дистиллированной воды. Раствор хранят при температуре 4 °С 1 мес.

5.3 Раствор гидроокиси натрия

8 г гидроокиси натрия по ГОСТ 4328 растворяют в 100 см^3 дистиллированной воды. Раствор хранят при комнатной температуре 12 мес.

5.4 Цитратный буферный раствор

4,55 г тринатрийцитрата дигидрата ($C_6H_5O_7Na_3\times2H_2O$) и 3,45 г моногидрата лимонной кислоты по ГОСТ 3652 ($C_6H_8O_7\times H_2O$) растворяют в 70 см^3 дистиллированной воды. Активную кислотность раствора устанавливают равной 4,6 pH раствором гидроокиси натрия по 5.3. Объем раствора доводят дистиллированной водой до 100 см^3. Буферный раствор устойчив при температуре 4 °С 12 мес.

5.5 Раствор ФР

Сухой лиофилизат β-фруктозидазы из дрожжей массой 0,005 г и активностью 1500 Е растворяют в 2 см^3 бидистиллированной воды. Конечная удельная активность раствора соответствует 750 Е/см^3. Раствор устойчив при температуре 4 °С одну неделю.

5.6 Буферный раствор триэтаноламина активной кислотностью 7,6 pH

14,0 г триэтаноламинагидрохлорида и 0,25 г сернокислого магния по ГОСТ 4523 ($MgSO_4 \times 7H_2O$) растворяют в 70 см³ дистиллированной воды. Активную кислотность раствора устанавливают равной 7,6 pH раствором гидроокиси натрия по 5.3. Объем раствора доводят дистиллированной водой до 100,0 см³. Буферный раствор устойчив при температуре 4 °С 1 мес.

5.7 Раствор НАДФ

0,06 г динатриевой соли β-никотинамидадениндинуклеотидфосфата (β-НАДФ-Na_2) растворяют в 6 см³ дистиллированной воды. Раствор устойчив при температуре 4 °С 1 мес.

5.8 Раствор АТФ

0,3 г динатриевой соли аденозин-5′-трифосфата (АТФ-$Na_2H_2 \times 3H_2O$) и 0,3 г гидрокарбоната натрия ($NaHCO_3$) растворяют в 6 см³ дистиллированной воды. Раствор устойчив при температуре 4 °С 1 мес.

5.9 Суспензия фермента ГК

Сухой лиофилизат ГК из дрожжей массой 0,002 г и активностью 280 Е смешивают с 1 см³ раствора сернокислого аммония по ГОСТ 3769 молярной концентрации c ($(NH_4)_2SO_4$) = 3,2 моль/дм³. Суспензия устойчива при температуре 4 °С 12 мес.

5.10 Суспензия фермента Г6Ф-ДГ

Сухой лиофилизат Г6Ф-ДГ массой 0,001 г и активностью 140 Е суспендируют в 1 см³ раствора сернокислого аммония по ГОСТ 3769 молярной концентрации c ($(NH_4)_2SO_4$) = 3,2 моль/дм³. Суспензия устойчива при температуре 4 °С 12 мес.

6 Аппаратура

Обычная лабораторная аппаратура, а также указанная в 6.1—6.12.

6.1 Весы лабораторные общего назначения наибольшим пределом взвешивания 20 г и допускаемой погрешностью ±0,1 мг.

6.2 Баня ледяная или холодильник с морозильным отделением.

6.3 Измельчитель лабораторный (гомогенизатор) угловой скоростью вращения от 3000 до 5000 мин⁻¹.

6.4 Пробирки диаметром 2,5 см и длиной 20 см.

6.5 Стакан химический номинальной вместимостью 100 см³.

6.6 Мешалка магнитная угловой скоростью вращения от 400 до 1200 мин⁻¹.

6.7 pH-метр диапазоном измерений активной кислотности от 1 до 14 pH и погрешностью измерений ±0,05 pH.

6.8 Дозаторы пипеточные объемами доз 100, 50 и 25 см³ относительной погрешностью дозирования ±1 % [1] или пипетки градуированные номинальной вместимостью 2,0; 1,0; 0,5; 0,2; 0,1 и 0,02 см³ и допускаемой относительной погрешностью ±1 %.

6.9 Колба мерная номинальной вместимостью 100 см³ и допускаемой относительной погрешностью ±0,2 %.

6.10 Фильтры гофрированные бумажные диаметром 15 см.

6.11 Кюветы фотометрические из оптического стекла или пластмассы толщиной поглощающего слоя 1 см для измерений при длинах волн 334, 340 или 365 нм.

6.12 Шпатели пластиковые или палочки стеклянные оплавленные длиной от 10 до 15 см для перемешивания содержимого кюветы при проведении фотометрических измерений.

6.13 Спектрофотометр или фотометр фотоэлектрический для измерений при длинах волн 334, 340 или 365 нм допускаемой абсолютной погрешностью измерений коэффициента пропускания ±1 %.

6.14 Смеситель лабораторный.

6.15 Баня водяная [2].

Допускается использовать другие средства измерений с метрологическими характеристиками и лабораторное оборудование с техническими характеристиками, не уступающими перечисленным выше.

7 Отбор проб

Отбор проб — по ГОСТ 26809.

8 Проведение испытания

8.1 Подготовка пробы

8.1.1 *Молоко сгущенное с сахаром*

После вскрытия упаковки молоко тщательно перемешивают шпателем. При перемешивании необходимо снимать и объединять с основной массой молока жир, который осел на стенках упаковки. Молоко количественно переливают в другую герметичную емкость. Для растворения комочков молока емкость энергично встряхивают и, при необходимости, выдерживают на водяной бане температурой от 30 до 40 °С до полного растворения комочков.

Затем емкость охлаждают до комнатной температуры. Содержимое еще раз тщательно перемешивают до получения гомогенной массы.

При работе со сгущенным молоком, упакованным в тубы, после переноса молока в емкость для гомогенизации, тубу вскрывают, снимают с ее стенок остатки молока и переносят их в емкость.

8.1.2 *Продукты молочные смешанные (комбинированные)*

Пробу в упаковке нагревают до комнатной температуры и многократно встряхивают. Упаковку вскрывают, а ее содержимое количественно переносят в подходящую герметичную емкость. Пробу перемешивают смесителем.

8.1.3 *Сыр и продукты на основе плавленого сыра*

Пробу нагревают до комнатной температуры. Измельчают и гомогенизируют измельчителем. В процессе измельчения и гомогенизации температура пробы не должна превышать 60 °С.

8.1.4 *Мороженое*

Пробу размягчают в холодильнике, затем быстро нагревают до комнатной температуры. Размягченную пробу тщательно перемешивают стеклянной палочкой до получения гомогенной массы.

Если проба упакована в достаточно прочную закрытую емкость (например, пластиковый стакан), то после нагрева до комнатной температуры емкость многократно (до 30 раз) встряхивают.

8.1.5 *Другие молочные продукты*

Продукты готовят к испытанию в зависимости от их вида в соответствии с приведенными выше примерами.

8.2 Приготовление раствора пробы

8.2.1 Из подготовленных по 8.1.1—8.1.5 проб продукта в химический стакан или колбу Эрленмейера загружают следующие массы продуктов:

- 2,0000 г пробы по 8.1.1 или 8.1.5, содержащей примерно 30 г/100 г сахарозы и до 1 г/100 г глюкозы;
- 4,0000 г пробы по 8.1.2 или 8.1.5, содержащей примерно 4 г/100 г сахарозы и до 0,2 г/100 г глюкозы;
- 5,0000 г пробы по 8.1.3 или 8.1.5, содержащей примерно 0,5 г/100 г глюкозы;
- 2,0000 г пробы по 8.1.4 или 8.1.5, содержащей примерно 13 г/100 г сахарозы и до 0,5 г/100 г глюкозы.

В стакан (колбу) приливают 50 $см^3$ дистиллированной воды. Смесь нагревают на водяной бане до температуры 40 °С и перемешивают магнитной мешалкой.

8.2.2 После удаления магнитов в химический стакан (колбу) последовательно добавляют 2,0 $см^3$ раствора гексацианo-(II)-феррата калия и 2,0 $см^3$ раствора сернокислого цинка. После добавления каждого раствора смесь энергично встряхивают от 5 до 10 с. Допускается вместо встряхивания перемешивать пробу магнитной мешалкой.

8.2.3 В смесь добавляют приблизительно 2,0 $см^3$ гидроокиси натрия, обеспечивая активную кислотность раствора от 7,0 до 7,5 pH.

8.2.4 Содержимое химического стакана (колбы) дистиллированной водой количественно переносят в мерную колбу. Объем смеси в мерной колбе доводят дистиллированной водой до метки, затем перемешивают.

8.2.5 Мерную колбу помещают в холодильник и выдерживают 15 мин при температуре от 1 до 10 °С.

8.2.6 После охлаждения содержимое мерной колбы фильтруют в пробирку через гофрированный бумажный фильтр. Для получения прозрачного фильтрата допускается повторное фильтрование раствора.

Слабая мутная взвесь обычно не мешает определению. Прозрачный фильтрат (объем V_3) используют при проведении определений по 8.3.

При большой концентрации исследуемых компонентов допускается разбавлять фильтрат дистиллированной водой. Фактор разбавления (F) — отношение объемов разбавленной и неразбавленной пробы — учитывают при расчете результатов определений по 9.1.

8.3 Определения

8.3.1 Испытания раствора пробы проводят при комнатной температуре. Измерения оптической плотности раствора проводят на спектрофотометре (фотометре) при длине волны 340 нм, а при применении спектрофотометра с ртутной лампой — при длинах волн 334 или 365 нм.

8.3.2 Растворы пробы, ферментов, коферментов, а также буферные растворы дозируют в кювету спектрофотометра (фотометра) пипеточным дозатором или градуированной пипеткой. При дозировании пробы необходимо избегать попадания капель пробы на стенки кюветы.

8.3.3 Определения содержаний глюкозы и сахарозы проводят в три этапа. Дозируемые в кювету спектрофотометра (фотометра) компоненты, последовательность их дозирования и объемы доз для различных этапов испытаний указаны в таблицах 1—3.

Таблица 1 — Первый этап испытаний

В кубических сантиметрах

Наименование компонентов, дозируемых в кювету, и последовательность их дозирования	Объем компонентов, дозируемых в кювету			
	Определение глюкозы		Определение сахарозы	
	Контроль	Проба	Контроль	Проба
Цитратный буфер	—	—	0,20	0,20
ФР	—	—	0,02	0,02
Раствор пробы	—	0,10	—	0,10

При определении сахарозы содержимое кюветы, полученное в результате выполнения первого этапа, тщательно перемешивают стеклянной палочкой или шпателем и оставляют на 15 мин при комнатной температуре. Далее выполняют второй этап испытаний.

Таблица 2 — Второй этап испытаний

В кубических сантиметрах

Наименование компонентов, дозируемых в кювету, и последовательность их дозирования	Объем компонентов, дозируемых в кювету			
	Определение глюкозы		Определение сахарозы	
	Контроль	Проба	Контроль	Проба
Буферный раствор по 5.6	1,00	1,00	1,00	1,00
Раствор НАДФ	0,10	0,10	0,10	0,10
Раствор АТФ	0,10	0,10	0,10	0,10
Вода дистиллированная	2,32	2,22	2,10	2,00

Содержимое кювет, полученное в результате выполнения второго этапа, перемешивают стеклянной палочкой или шпателем и оставляют на 3 мин при комнатной температуре. Затем измеряют оптические плотности (A_1) растворов относительно оптической плотности воздуха. Далее выполняют третий этап испытаний.

Таблица 3 — Третий этап испытаний

В кубических сантиметрах

Наименование компонентов, дозируемых в кювету, и последовательность их дозирования	Объем компонентов, дозируемых в кювету			
	Определение глюкозы		Определение сахарозы	
	Контроль	Проба	Контроль	Проба
Суспензия ГК	0,01	0,01	0,01	0,01
Суспензия ГбФ-ДГ	0,01	0,01	0,01	0,01

Содержимое кювет, полученное в результате выполнения третьего этапа, перемешивают стеклянной палочкой или шпателем и оставляют на 15 мин при комнатной температуре. Затем измеряют оптические плотности (A_2) растворов относительно оптической плотности воздуха.

Измерения оптических плотностей (A_2) повторяют через каждые 2 мин до окончания реакции, что выражается в установлении постоянного значения оптической плотности раствора. Повторные измерения необходимы при работе с ферментными препаратами длительного хранения.

При проведении серийных испытаний для всей серии продуктов используют только одну контрольную пробу.

8.3.4 Рассчитывают разность оптических плотностей $(A_2—A_1)_{пр}$. Она должна находиться в интервале от 0,1 до 0,5 (измерения при длине волны 365 нм) или от 0,1 до 0,8 (измерения при длинах волн 334 и 340 нм). При большей разности оптических плотностей раствор пробы по 8.2.6 разбавляют дистиллированной водой. При меньшей разности оптических плотностей (менее 0,1) объем пробы, дозируемый в кювету, увеличивают. Однако объем пробы не должен превышать 2,0 см^3. Для сохранения постоянным общего объема смеси в кювете при увеличении объема пробы уменьшают объем дистиллированной воды, добавляемой в кювету.

9 Правила обработки и оформления результатов испытаний

9.1 Расчет разностей оптических плотностей:

$$\Delta A_{гл} = (A_2—A_1)_{пр/гл} — (A_2—A_1)_{к/гл}, \quad (4)$$

$$\Delta A_{общ.сах} = (A_2—A_1)_{пр/сах} — (A_2—A_1)_{к/сах}. \quad (5)$$

Изменение оптической плотности, вызванное гидролизом сахарозы, рассчитывают по формуле

$$\Delta A_{сах} = \Delta A_{общ.сах} — \Delta A_{гл}. \quad (6)$$

9.2 Массовую долю W сахарозы в пробе, г/100 г, рассчитывают по формуле

$$W = \frac{MV_1V_3F}{\varepsilon d V_2 m 10} \cdot \Delta A_{сах}, \quad (7)$$

где M — молярная масса сахарозы, 342,3 г/моль;
V_1 — общий объем раствора в кювете, 3,54 см^3;
V_2 — объем раствора пробы по 8.2.6, 100 см^3;
F — фактор разбавления пробы (при проведении определения без разбавления $F = 1$);
ε — молярный коэффициент поглощения НАДФ, дм$^3 \cdot$ ммоль$^{-1} \cdot$ см$^{-1}$:
- при длине волны 340 нм — 6,3,
- при длине волны 365 нм — 3,4 (ртутная лампа),
- при длине волны 334 нм — 6,18 (ртутная лампа);

d — толщина поглощающего слоя в кювете, см;
V_2 — объем пробы (0,10 см^3);
m — навеска пробы, г.

9.3 Массовую долю W_1 глюкозы в пробе, г/100 г, рассчитывают по формуле

$$W_1 = \frac{M_1V_1V_3F}{\varepsilon d V_2 m 10} \cdot \Delta A_{гл}, \quad (8)$$

где M_1 — молярная масса глюкозы, 180,16 г/моль.

За результат испытаний принимают среднеарифметическое результатов двух параллельных определений сахарозы (глюкозы), округленное до 0,01 г/100 г.

9.4 Точность определений

Абсолютное расхождение результатов двух параллельных определений, выполненных в одной лаборатории, не должно превышать более чем в 5 % случаев значение показателя сходимости (r), а абсолютное расхождение результатов двух измерений, выполненных в двух лабораториях, не должно превышать более чем в 5 % случаев значения показателя воспроизводимости (R), приведенных в таблице 4.

Таблица 4

В г/100 г

Массовая доля	Показатель сходимости r	Показатель воспроизводимости R
САХАРОЗА		
От 1 до 5	0,13	0,08
15	0,40	0,28
ГЛЮКОЗА		
От 0,1 до 0,5	0,06	0,06

10 Отчет об испытании

В отчете об испытании должны быть указаны:
- вид пробы;
- способ отбора пробы;
- массовая доля сахарозы в пробе, г/100 г;
- массовая доля глюкозы в пробе, г/100 г;
- дата испытания.

ПРИЛОЖЕНИЕ А
(справочное)

Библиография

[1] ТУ 64—13329—81 Дозаторы пипеточные
[2] ТУ 46—22—603—75 Баня водяная лабораторная с электрическим или огневым подогревом

УДК 637.11.001.4:006.354 ОКС 67.100.10 Н19 ОКСТУ 9109

Ключевые слова: молоко; молочные продукты; мороженое; сахароза; глюкоза; ферментативное определение; спектрофотометрия

Поправка к ГОСТ Р 51258—99 (ДИН 10326—86) Молоко и молочные продукты. Метод определения сахарозы и глюкозы

В каком месте	Напечатано	Должно быть
Раздел 1	Настоящий стандарт распространяется на молоко и молочные продукты, устанавливает	Настоящий стандарт распространяется на молоко, молочный напиток, молочные продукты, сладкий плавленый сыр и устанавливает

(ИУС № 8 2009 г.)

gost.e-ecolog.ru