МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ ГОСТ 31086-2002

МОЛОКО И МОЛОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ

Метод определения лактозы и галактозы

МАЛАКО І МАЛОЧНЫЯ ПРАДУКТЫ

Метад вызначэння лактозы і галактозы

Издание официальное

БЗ 6-2002



Межгосударственный совет по стандартизации, метрологии и сертификации

Минск

gost.e-ecolog.ru

ЕВРАЗИЙСКИЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ
И СЕРТИФИКАЦИИ (ЕАСС)

EURO-ASIAN COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY
AND CERTIFICATION (EASC)



МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ

СТАНДАРТ

ГОСТ 31086-2002

МАЛАКО І МАЛОЧНЫЯ ПРАДУКТЫ

Метад вызначэння лактозы і галактозы

МОЛОКО И МОЛОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ

Метод определения лактозы и галактозы

Издание официальное

Минск
Госстандарт Республики Беларусь
2003

Предисловие

Евразийский Совет по стандартизации, метрологии и сертификации (ЕАСС) представляет собой региональное объединение национальных органов по стандартизации государств, входящих в Содружество Независимых Государств. В дальнейшем возможно вступление в ЕАСС национальных органов по стандартизации других государств.

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0-92 "Межгосударственная система стандартизации. Основные положения" и ГОСТ 1.2-97 "Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила, рекомендации по межгосударственной стандартизации. Порядок разработки, принятия, обновления и отмены".

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Межгосударственным техническим комитетом по стандартизации МТК 335 «Методы испытаний агропромышленной продукции на безопасность»

ВНЕСЕН Госстандартом России

2 ПРИНЯТ Евразийским Советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол № 22 от 6 ноября 2002 г.)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004-97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004-97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Армения	AM	Армгосстандарт
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Кыргызстан	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдовастандарт
Российская Федерация	RU	Госстандарт России
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Украина	UA	Госпотребстандарт Украины

3 Настоящий стандарт идентичен ГОСТ Р 51259-99 «Молоко и молочные продукты. Метод определения лактозы и галактозы», который представляет собой аутентичный текст национального стандарта Германии ДИН 10344:1982 «Молоко и молочные продукты. Ферментативное определение лактозы и галактозы» (DIN 10344:1982 «Bestimmung des Lactose- und Galactosegehalts von Milch undMilchprodukten; Enzymatisches Verfahren») и содержит дополнительные требования, отражающие потребности народного хозяйства (разделы 2 – 7)

4 ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ постановлением Госстандарта Республики Беларусь от 28 апреля 2003 г. № 22 непосредственно в качестве государственного стандарта Республики Беларусь с 1 ноября 2003 г.

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных (государственных) стандартов, издаваемых в этих государствах.

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

М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й С Т А Н Д А Р Т

МОЛОКО И МОЛОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ

Метод определения лактозы и галактозы

Milk and milk products.
Method for determination of lactose and galactose content

Дата введения 2003-11-01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на молоко и молочные продукты и устанавливает метод определения массовых долей лактозы и галактозы в присутствии других сахаров.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты:
ГОСТ 2493—75 Реактивы. Калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный. Технические условия
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 4204—77 Реактивы. Кислота серная. 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 лактозы и галактозы в молоке и молочных продуктах: Массовые доли лактозы и галактозы, определенные раздельно в соответствии с настоящим стандартом и выраженные в г/100 г.
3.2 В настоящем стандарте применяют следующие обозначения и сокращения:
НАД — β-никотинамидадениндинуклеотид;
НАДН — β-никотинамидадениндинуклеотид (восстановленная форма);
ГЗ — β-галактозидаза;
ГДГ — β-галактозодегидрогеназа;
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

Метод определения галактозы основан на окислении галактозы, содержащейся в освобожденном от жира и белка водном экстракте пробы молока или молочных продуктов, под действием НАД в присутствии фермента ГДГ и фотометрическом измерении массовой доли образовавшегося НАДН, эквивалентной массовой доле галактозы в пробе (свободная галактоза).

Метод определения лактозы основан на гидролизе лактозы, содержащейся в освобожденном от жира и белка водном экстракте пробы молока или молочных продуктов, в присутствии ГЗ до глюкозы и галактозы, окислении имеющейся в пробе галактозы (свободная галактоза плюс образовавшаяся при гидролизе лактозы) под действием НАД в присутствии фермента ГДГ и фотометрическом измерении массовой доли образовавшегося НАДН, эквивалентного массовой доле галактозы, и расчете массовой доли лактозы по разности оптических плотностей данного раствора и раствора, используемого при определении свободной галактозы.

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 использовать имеющиеся в продаже готовые наборы реактивов для определения лактозы и галактозы при условии соответствия их качества требованиям настоящего стандарта.

5.1 Раствор сернокислого цинка

30 г сернокислого цинка по ГОСТ 4174 ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) растворяют в 100 см³ дистиллированной воды. Раствор хранят при комнатной температуре 12 мес.

5.2 Раствор гексациано-(II)-феррата калия

15 г гексациано-(II)-феррата калия ($K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$) растворяют в 100 см³ дистиллированной воды. Раствор хранят при температуре 4 °С 1 мес.

5.3 Гидроокись натрия по ГОСТ 4328, раствор молярной концентрации $c(NaOH) = 0{,}25$моль/дм³.

5.4 Цитратный буферный раствор

2,8 г тринатрийцитрата дигидрата ($C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$), 0,625 г сернокислого магния по ГОСТ 4523 ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) и 0,042 г моногидрата лимонной кислоты по ГОСТ 3652 ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) растворяют в 40 см³ дистиллированной воды. Активную кислотность раствора доводят до 6,6 pH несколькими каплями раствора серной кислоты по ГОСТ 4204 молярной концентрации $c(H_2SO_4) =$ = 2 моль/дм³ или раствора гидроокиси натрия по ГОСТ 4328 молярной концентрации $c(NaOH) =$ = 0,1 моль/дм³. Объем раствора доводят дистиллированной водой до 50 см³. Буферный раствор устойчив при температуре 4 °С 3 мес.

5.5 Буферный раствор дифосфата калия

8,3 г дифосфата калия по ГОСТ 2493 ($K_4P_2O_7$) растворяют в 40 см³ дистиллированной воды. Активную кислотность раствора доводят до 8,6 pH раствором серной кислоты по ГОСТ 4204 молярной концентрации $c(H_2SO_4) = 2$моль/дм³. Объем раствора доводят дистиллированной водой до 50 см³. Буферный раствор устойчив при температуре 4 °С 2 мес.

5.6 Раствор НАД

0,035 г НАД растворяют в 7 см³ цитратного буфера по 5.4. Раствор устойчив при температуре 4 °С три недели.

5.7 Суспензия фермента ГЗ

Сухой лиофилизат β-галактозидазы из E. coli массой 0,005 г и активностью 150 Е суспендируют в 1 см³ раствора аммония сернокислого по ГОСТ 3769 молярной концентрации $c((NH_4)_2SO_4) =$ = 2,2 моль/дм³. Суспензия устойчива при температуре 4 °С 12 мес.

5.8 Суспензия фермента ГДГ

Сухой лиофилизат β-галактозодегидрогеназы из Pseudomonas fluorescens массой 0,005 г и активностью 25 Е смешивают с 1 см³ раствора аммония сернокислого по ГОСТ 3769 молярной концентрации $c((NH_4)_2SO_4) = 2{,}2$ моль/дм³. Суспензия устойчива при температуре 4 °С 12 мес.

6 Аппаратура

Обычная лабораторная аппаратура, а также указанная в 6.1—6.7.

6.1 Весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания 20 г и допускаемой погрешностью ±0,0001 г.

6.2 Дозаторы пипеточные объемами доз 100, 50 и 25 см³ и 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 %.

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

6.4 Фильтры гофрированные бумажные диаметром 15 см по ГОСТ 12026.

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

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

6.7 Спектрофотометр или фотометр фотоэлектрический, позволяющий проводить измерения при длинах волн 334, 340 или 365 нм, допускаемой абсолютной погрешностью измерений коэффициента пропускания ±1 %.

6.8 Бумага индикаторная универсальная для интервала измерений активной кислотности от 1 до 10 pH.

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 Перед испытанием пробу хорошо перемешивают.

8.2 Пробу продукта массой 1,0000 г количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³.

Пастообразные пробы предварительно разбавляют небольшим количеством дистиллированной воды и затем количественно переносят в мерную колбу.

В колбу добавляют 50 см³ дистиллированной воды. Содержимое колбы хорошо перемешивают.

Масса пробы зависит от массовой концентрации лактозы по 9.1. Навеску пробы подбирают таким образом, чтобы массовая концентрация лактозы в фильтрате по 8.4 составляла от 0,05 до 1,00 г/дм³.

8.3 В колбу последовательно добавляют 1 см³ раствора сернокислого цинка и 1 см³ раствора гексациано-(II)-феррата калия. После добавления каждого реагента содержимое колбы энергично перемешивают. Затем нейтрализуют раствор в колбе, добавляя раствор гидроокиси натрия молярной концентрации $c(NaOH) = 0,25$ моль/дм³. Контроль активной кислотности осуществляют индикаторной бумагой. Доводят объем раствора в колбе до метки дистиллированной водой и выдерживают колбу 15 мин при комнатной температуре.

8.4 Содержимое колбы фильтруют через сухой гофрированный бумажный фильтр. При необходимости для получения прозрачного фильтрата проводят повторное фильтрование.

Для получения прозрачных фильтратов допускается использовать для осаждения белков и жиров меньшие количества сернокислого цинка и гексациано-(II)-феррата калия по 8.3.

8.5 Контрольное определение и определение галактозы и лактозы

8.5.1 *Контрольное определение*

8.5.1.1 В первую кювету спектрофотометра (фотометра) последовательно дозируют 0,20 см³ раствора НАД в цитратном буфере, 0,02 см³ суспензии фермента ГЗ, 1,00 см³ буферного раствора дифосфата калия и 2,00 см³ дистиллированной воды. Содержимое кюветы перемешивают пластиковым шпателем или стеклянной палочкой и оставляют при комнатной температуре на 15 мин.

8.5.1.2 Измеряют оптическую плотность — $A_{1к}$ раствора относительно оптической плотности воздуха.

8.5.1.3 В кювету добавляют 0,02 см³ суспензии ГДГ. Содержимое кюветы перемешивают пластиковым шпателем или стеклянной палочкой и оставляют на 30 мин при комнатной температуре.

8.5.1.4 Измеряют оптическую плотность — $A_{2к}$ раствора относительно оптической плотности воздуха.

8.5.2 *Определение свободной галактозы*

Определение можно не проводить, если свободная галактоза отсутствует в пробе.

8.5.2.1 Во вторую кювету спектрофотометра (фотометра) последовательно дозируют 0,20 см³ раствора НАД в цитратном буфере, 0,1 см³ прозрачного фильтрата по 8.4, 1,00 см³ буферного раствора дифосфата калия и 1,90 см³ дистиллированной воды. Содержимое кюветы перемешивают пластиковым шпателем или стеклянной палочкой и оставляют при комнатной температуре на 15 мин.

8.5.2.2 Измеряют оптическую плотность — $A_{1г}$ раствора относительно оптической плотности воздуха.

8.5.2.3 В кювету добавляют 0,02 см³ суспензии ГДГ. Содержимое кюветы перемешивают пластиковым шпателем или стеклянной палочкой и оставляют на 30 мин при комнатной температуре.

8.5.2.4 Измеряют оптическую плотность — $A_{2г}$ раствора относительно оптической плотности воздуха.

8.5.3 *Определение лактозы*

8.5.3.1 В третью кювету спектрофотометра (фотометра) последовательно дозируют 0,20 см³ раствора НАД в цитратном буфере, 0,1 см³ прозрачного фильтрата по 8.4 и 0,02 см³ суспензии ГЗ. Содержимое кюветы перемешивают, осторожно встряхивая, и оставляют при комнатной температуре на 15 мин. Затем в кювету последовательно добавляют 1,00 см³ буферного раствора дифосфата калия и 1,90 см³ дистиллированной воды. Содержимое кюветы перемешивают пластиковым шпателем или стеклянной палочкой и оставляют при комнатной температуре на 2 мин.

8.5.3.2 Измеряют оптическую плотность — $A_{1л\text{-}г}$ раствора относительно оптической плотности воздуха.

8.5.3.3 В кювету добавляют 0,02 см³ суспензии ГДГ. Содержимое кюветы перемешивают пластиковым шпателем или стеклянной палочкой и оставляют на 15 мин при комнатной температуре.

8.5.3.4 Измеряют оптическую плотность — $A_{2л\text{-}г}$ раствора относительно оптической плотности воздуха.

8.6 Измерения оптической плотности растворов по 8.5.2.4 и 8.5.3.4 повторяют через каждые 2 мин до окончания реакции, что выражается в установлении постоянной оптической плотности раствора. Подобные измерения необходимо проводить при использовании ферментных препаратов с длительным сроком хранения.

9 Выражение результатов

9.1 После измерений оптических плотностей растворов рассчитывают изменения оптических плотностей растворов, которые вызваны окислением свободной галактозы $\Delta A_г$ и окислением свободной галактозы и галактозы, образовавшейся при гидролизе лактозы, $\Delta A_{л\text{-}г}$

$$\Delta A_г = (A_{2г} - A_{1г}) - (A_{2к} - A_{1к}); \quad (1)$$

$$\Delta A_{л\text{-}г} = (A_{2л\text{-}г} - A_{1л\text{-}г}) - (A_{2к} - A_{1к}). \quad (2)$$

Изменение оптической плотности раствора $\Delta A_л$, вызванное гидролизом лактозы, рассчитывают по формуле

$$\Delta A_л = \Delta A_{л\text{-}г} - \Delta A_г. \quad (3)$$

9.2 Массовую долю $W_л$ лактозы в пробе, г/100 г, рассчитывают по формуле

$$W_л = \frac{M_л V_1 V_3 10^{-4}}{\varepsilon d V_2 m} \cdot \Delta A_л, \quad (4)$$

где $M_л$ — молярная масса лактозы (безводная форма), 342,30 г/моль; молярная масса моногидрата лактозы, 360,31 г/моль (массовую долю моногидрата лактозы в пробе рассчитывают умножением массовой доли безводной лактозы на коэффициент 1,0588);

V_1 — общий объем раствора в кювете, 3,24 см^3;
V_3 — объем, полученный при разбавлении пробы в процессе ее подготовки к испытанию по 8.3, 100 см^3;
ε — молярный коэффициент поглощения НАДН, дм^3 · ммоль$^{-1}$ · 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 $W_г$ галактозы в пробе, г/100 г, рассчитывают по формуле

$$W_г = \frac{M_г V_1 V_3 10^{-4}}{\varepsilon d V_2 m} \cdot \Delta A_г, \quad (5)$$

где $M_г$ — молярная масса галактозы, 180,16 г/моль.

За результаты испытаний принимают среднеарифметическое результатов двух параллельных определений, округленные до 0,1 г/100 г для лактозы и до 0,05 г/100 г для галактозы.

9.4 Сходимость

Абсолютное расхождение между результатами двух параллельных определений, выполненных в одной лаборатории, не должно превышать более чем в 5 % случаев 0,1 г/100 г для лактозы или 0,05 г/100 г для галактозы.

10 Отчет об испытании

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

ПРИЛОЖЕНИЕ А
(справочное)

Библиография

[1] ТУ 64—13329-81 Дозаторы пипеточные

УДК 637.1.044(083.74) МКС 67.100.10 Н19 ОКСТУ 9109

Ключевые слова: молоко; молочные продукты; лактоза; галактоза; ферментативное определение; спектрофотометрия

Текст печатается по изданию:
ГОСТ Р 51259-99 – М.: ИПК Издательство стандартов, 2000

Ответственный за выпуск *И.А. Воробей*

Сдано в набор 25.07.2003 Подписано в печать 28.07.2003 Усл. печ.л. 0,93 Уч.-изд. л. 0,50

Тираж экз. Заказ

Издатель и полиграфическое исполнение:
НПРУП "Белорусский государственный институт стандартизации и сертификации (БелГИСС)"
Лицензия ЛВ № 231 от 04.03.2003, лицензия ЛП № 408 от 25.07.2000

БелГИСС, 220113, г. Минск, ул. Мележа, 3

gost.e-ecolog.ru