ГОСТ Р 51196—98
(ИСО 8069—86)

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

МОЛОКО СУХОЕ

Метод определения молочной кислоты и лактатов

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2009

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Московской государственной академией 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 28 августа 1998 г. № 334

3 Настоящий стандарт представляет собой аутентичный текст международного стандарта ИСО 8069—86 «Сухое молоко. Определение содержания молочной кислоты и лактатов. Ферментативный метод» с дополнительными требованиями, отражающими потребности экономики страны (2, 3 и 7.1)

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

5 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Июль 2009 г.

© ИПК Издательство стандартов, 1998
© СТАНДАРТИНФОРМ, 2009

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

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

МОЛОКО СУХОЕ

Метод определения молочной кислоты и лактатов

Dried milk.
Method for determination of lactic acid and lactates

Дата введения 2000—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на сухое молоко всех видов и устанавливает метод определения молочной кислоты и ее солей — лактатов.

2 Нормативные ссылки

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

3 Определение

Массовая доля молочной кислоты и лактатов в сухом молоке, определенная в соответствии с настоящим стандартом и выраженная в граммах молочной кислоты на 100 г сухого обезжиренного вещества.

4 Сущность метода

Восстанавливают пробу сухого молока в теплой воде, осаждают жиры и белки и фильтруют пробу. Полученный фильтрат обрабатывают ферментами и биохимическими реагентами, добавляемыми одновременно, но действующими последовательно:

- L-лактатдегидрогеназа (L-ЛДГ) и D-лактатдегидрогеназа (D-ЛДГ) в присутствии никотинамидадениндинуклеотида (НАД) окисляют лактат до пирувата, восстанавливая НАД до НАДН:

$$\text{L-лактат/D-лактат} + \text{НАД}^+ \xrightarrow[\text{L-ЛДГ}]{\text{D-ЛДГ}} \text{НАДН} + \text{пируват} + \text{H}^+;$$

- глутаматпируваттрансфераза (ГПТ) в присутствии L-глутамата преобразует пируват в L-аланин и L-глутамат в альфа-кетоглутарат:

$$\text{пируват} + \text{L-глутамат} \xrightarrow{\text{ГПТ}} \text{L-аланин} + \text{2-оксоглутарат}.$$

Измеряют массовую долю образовавшегося НАДН, эквивалентную массовой доле молочной кислоты и лактатов в пробе, на спектрофотометре при длине волны 340 нм.

5 Реактивы

Все реактивы должны быть аналитического качества (не ниже х.ч.). Вода, используемая для приготовления растворов ферментов, должна быть бидистиллированной. Вода для приготовления растворов других реактивов и проб должна быть дистиллированной.

Препарат НАД должен содержать не менее 90 % основного вещества.

Издание официальное

5.1 Раствор гексацианоферрата (II) калия

Растворяют 35,9 г гексацианоферрата (II) калия $K_4[Fe(CN_6)] \times 3H_2O$ в воде и доводят объем раствора до 1 дм³. Раствор перемешивают.

5.2 Раствор сульфата цинка

Растворяют 71,8 г сульфата цинка гептагидрата ($ZnSO_4 7H_2O$) в воде и доводят объем раствора до 1 дм³. Раствор перемешивают.

5.3 Раствор гидроксида натрия c (NaOH) = 0,1 моль/дм³

Растворяют 4,00 г гидроксида натрия (NaOH) в воде и доводят объем раствора до 1 дм³. Раствор перемешивают.

5.4 Буферный раствор активной кислотности 10,0 pH

Растворяют 7,92 г глицилглицина ($C_4H_8N_2O_3$) и 1,47 г L-глутаминовой кислоты ($C_5H_9NO_4$) в 80 см³ воды. Устанавливают активную кислотность раствора (10,0±0,1) pH при 20 °С раствором гидроксида натрия c (NaOH) = 10 моль/дм³ и доводят объем раствора водой до 100 см³. Раствор перемешивают.

Раствор устойчив 3 мес при температуре от 0 до 5 °С.

5.5 Раствор НАД

Растворяют 350 мг НАД ($C_{22}H_{27}N_7O_{14}P_2$) в 10 см³ воды.

Раствор устойчив 1 мес при температуре от 0 до 5 °С.

Во время использования сосуд с раствором должен быть погружен в емкость с колотым льдом.

5.6 Раствор L-ЛДГ

Растворяют 10 мг L-ЛДГ из мускульных тканей свиньи в 1 см³ раствора глицерина массовой доли 50 % (активная кислотность приблизительно 7 pH).

Удельная активность раствора L-ЛДГ должна быть не менее 5500 Е/см³ при 25 °С. Раствор устойчив 12 мес при температуре от 0 до 5 °С.

Во время использования сосуд с раствором должен быть погружен в емкость с колотым льдом.

5.7 Суспензия D-ЛДГ

Смешивают 5 мг D-ЛДГ из Lactobacillus leichmannii с 1 см³ раствора сульфата аммония c ($(NH_4)_2SO_4$) = 3,2 моль/дм³ (активная кислотность приблизительно 6 pH).

Удельная активность суспензии D-ЛДГ должна быть не менее 1500 Е/см³ при 25 °С. Суспензия устойчива 12 мес при температуре от 0 до 5 °С. Во время использования сосуд с суспензией должен быть погружен в емкость с колотым льдом.

5.8 Суспензия ГПТ

Суспензию ГПТ из сердца свиньи концентрации 20 мг/см³ удельной активности 1600 Е/см³ при 25 °С в растворе сульфата аммония c ($(NH_4)_2SO_4$) = 3,2 моль/дм³ готовят центрифугированием 2 см³ суспензии концентрации 10 мг/см³ в течение 10 мин (при факторе разделения центрифуги 4000 g). Отбирают 1 см³ надосадочной жидкости и отбрасывают, а оставшуюся суспензию используют для анализа.

Готовая суспензия устойчива при температуре от 0 до 5 °С 12 мес. На время работы сосуд с суспензией помещают в емкость со льдом.

5.9 Раствор L-лактата лития

Растворяют 50 мг L-лактата лития ($C_3H_5O_3Li$) в воде и доводят объем раствора до 500 см³. Раствор перемешивают.

5.10 Раствор D-лактата лития

Растворяют 50 мг D-лактата лития ($C_3H_5O_3Li$) в воде и доводят объем раствора до 500 см³. Раствор перемешивают.

6 Средства контроля и вспомогательные устройства

Обычная лабораторная аппаратура, в том числе указанная в 6.1—6.11.

6.1 Весы лабораторные общего назначения наибольшим пределом взвешивания 200 г и допускаемой погрешностью ±0,001 г.

6.2 Стаканчик стеклянный для взвешивания или бюкса вместимостью 50 см³.

6.3 Цилиндр градуированный вместимостью 50 см³ и допускаемой относительной погрешностью ±2 %.

6.4 Колбы мерные вместимостью 100 см³ и допускаемой относительной погрешностью ±0,2 %.

6.5 Дозаторы пипеточные объемами доз 0,02; 0,05; 0,2; 1 и 2 см^3 и относительной погрешностью дозирования ±1 %.

6.6 Пипетки градуированные вместимостью 2, 5 и 10 см^3 и допускаемой относительной погрешностью ±1 %.

6.7 Воронка стеклянная для фильтрования диаметром 7 см.

6.8 Фильтры бумажные гофрированные диаметром 15 см, свободные от молочной кислоты и лактатов.

6.9 Палочка стеклянная.

6.10 Палочки пластиковые или иные для перемешивания содержимого кюветы при проведении фотометрических измерений.

6.11 Спектрофотометр (фотометр) со следующими техническими характеристиками: длина волны 340 нм; спектральный интервал — не более 10 нм; интервал измерений оптической плотности — от 0,000 до 2,000; погрешность установки длины волны — ±3 нм; среднее квадратическое отклонение случайной составляющей погрешности измерений — не более 0,15 %.

Кюветы фотометрические толщиной поглощающего слоя 1 см.

7 Порядок подготовки к проведению измерений

7.1 Отбор проб — по ГОСТ 26809.

7.2 Пробу хранят в условиях, предотвращающих порчу и изменение состава.

8 Порядок проведения измерений

При проведении измерений следует избегать загрязнений, в том числе связанных с поглощением влаги или конденсацией ее на стенках сосудов.

8.1 Проверка активности реактивов

При приготовлении новой порции реактивов (5.5—5.8) и хранении готовых реактивов без использования более двух недель или изменении условий хранения проверяют активность реактивов.

8.1.1 Для проверки активности реактивов в две мерные колбы (6.4) вместимостью 100 см^3 вносят по 10 см^3 L-лактата лития (5.9), в две другие мерные колбы (6.4) вместимостью 100 см^3 вносят по 10 см^3 D-лактата лития (5.10). Определяют концентрации L-молочной кислоты и ее лактатов, а также концентрацию D-молочной кислоты и ее лактатов (8.5.2—8.6).

8.1.2 Концентрации D-лактата лития, $X_{\text{D-лактата}}$, и L-лактата лития, $X_{\text{L-лактата}}$, мг/дм^3, вычисляют по формулам:

$$X_{\text{D-лактата}} = 346 \times \Delta A;$$

$$X_{\text{L-лактата}} = 341 \times \Delta A,$$

где ΔA — разность оптических плотностей, рассчитанная по 8.6.4.

8.1.3 Принимая во внимание чистоту реактивов, определенная концентрация лактата лития при проверке активности реактивов должна составлять (100±5) % концентрации приготовленных растворов.

Если определяемое значение не попадает в этот интервал, проверяют реактивы, технику измерения, точность пипеток и дозаторов, а также исправность спектрофотометра. После этого тестирование повторяют до получения удовлетворительных результатов.

8.2 Подготовка пробы

Пробу продукта помещают в контейнер вместимостью, в два раза превышающей объем пробы, с герметично закрывающейся крышкой, тщательно перемешивают, энергично встряхивая и переворачивая контейнер.

В процессе подготовки пробы необходимо исключить ее контакт с атмосферой, чтобы уменьшить абсорбцию влаги.

8.3 Масса навески

В стеклянном стаканчике (6.2) взвешивают 1,000 г пробы.

8.4 Подготовка контрольной пробы

Контрольное испытание проводят, как описано в 8.5—8.6, используя те же реактивы, но без пробы продукта. Для испытания пробы продукта (8.6) берут 1,0 см^3 фильтрата (8.5.3).

8.5 Приготовление раствора пробы и удаление белка

8.5.1 Навеску сухого молока (8.3) растворяют при помешивании стеклянной палочкой (6.9) в 20 см³ воды температурой от 40 до 50 °С, количественно переносят в мерную колбу (6.4) вместимостью 100 см³ и охлаждают до комнатной температуры (20 °С).

8.5.2 К раствору в колбе (8.5.1) последовательно добавляют 5,0 см³ раствора гексацианоферрата (II) калия (5.1), 5,0 см³ раствора сульфата цинка (5.2), 10 см³ раствора гидроксида натрия (5.3), тщательно перемешивая содержимое колбы после добавления каждого компонента и доводят объем раствора водой до 100 см³. Снова тщательно перемешивают раствор и выдерживают 30 мин при комнатной температуре.

8.5.3 Содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр (6.8), отбрасывая первую порцию фильтрата.

8.6 Определение

8.6.1 В спектрофотометрическую кювету (6.11) пипеточным дозатором (6.5) вносят:

- 1,0 см³ фильтрата (8.5.3);
- 1,0 см³ буферного раствора (5.4);
- 0,20 см³ раствора НАД (5.5);
- 0,02 см³ суспензии ГПТ (5.8).

Содержимое кюветы перемешивают палочкой (6.10).

8.6.2 Кювету выдерживают 5 мин, затем измеряют оптическую плотность раствора относительно воды при длине волны 340 нм.

В кювету добавляют 0,02 см³ раствора L-ЛДГ (5.6) и 0,05 см³ раствора D-ЛДГ (5.7). Раствор перемешивают палочкой (6.10).

Примечание — Раздельное определение L- и D-молочных кислот и их лактатов в пробе можно осуществить добавлением или L-ЛДГ или D-ЛДГ.

8.6.3 Раствор (8.6.2) выдерживают при комнатной температуре 45 мин и измеряют оптическую плотность. Раствор выдерживают еще 15 мин и снова измеряют оптическую плотность (измерения после 60 мин реакции).

Примечание — Если требуется определить содержание только L-молочной кислоты и ее лактатов, измерения производят соответственно через 30 и 45 мин.

8.6.4 Рассчитывают разность измеренных значений оптических плотностей по формуле

$$\Delta A = [(A_{п60} - A_{п0}) - 4(A_{п60} - A_{п45})] - [(A_{к60} - A_{к0}) - 4(A_{к60} - A_{к45})],$$

где $A_{п60}$ — оптическая плотность пробы через 60 мин (8.6.3);
$A_{п0}$ — оптическая плотность пробы через 5 мин (8.6.2);
$A_{п45}$ — оптическая плотность пробы через 45 мин (8.6.3);
$A_{к60}$ — оптическая плотность контрольной пробы через 60 мин (8.6.3);
$A_{к0}$ — оптическая плотность контрольной пробы через 5 мин (8.6.2);
$A_{к45}$ — оптическая плотность контрольной пробы через 45 мин (8.6.3).

Примечания

1 В некоторых случаях может иметь место медленно текущая побочная реакция. Изменение оптической плотности, вызванное этой реакцией, исключают экстраполяцией оптической плотности на нулевой момент времени.

2 Если оптическую плотность измеряют через 30 и 45 мин, формула имеет вид

$$\Delta A = [(A_{п45} - A_{п0}) - 3(A_{п45} - A_{п30})] - [(A_{к45} - A_{к0}) - 3(A_{к45} - A_{к30})],$$

где $A_{п30}$ — оптическая плотность пробы через 30 мин (8.6.3);
$A_{к30}$ — оптическая плотность контрольной пробы через 30 мин (8.6.3).

8.6.5 Если разность оптических плотностей, рассчитанная в соответствии с 8.6.4, превышает 0,500, определение повторяют (8.6.1—8.6.4), разводя дистиллированной водой растворы пробы продукта (8.5.3) и контрольной пробы (8.4).

9 Правила обработки результатов измерений

9.1 Метод расчета

Массовую долю молочной кислоты и лактатов X в сухом молоке, выраженную в г молочной кислоты на 100 г сухого обезжиренного вещества, вычисляют по формуле

$$X = \frac{\Delta A \times M}{\varepsilon \times l \times m} \times \frac{V_1 \times V_4 \times V_5}{V_2 \times V_3} \times \frac{100}{W_{\text{осв}}} \times 10^2;$$

где A — разность оптических плотностей (8.6.4);

M — молярная масса молочной кислоты, M = 90,1 г/моль;

V_1 — объем раствора в кювете (8.6.2), см^3
(для определения D- и L-молочных кислот V_1 = 2,29 см^3,
для определения L-молочной кислоты V_1 = 2,24 см^3,
для определения D-молочной кислоты V_1 = 2,27 см^3);

V_4 — объем подготовленного к анализу раствора (8.5.2), см^3 (V_4 = 100 см^3);

V_5 — объем разведенного фильтрата (8.6.5), см^3 (если испытание проводилось без разведения фильтрата, то V_5 = 1,0 см^3);

ε — коэффициент оптической плотности НАДН, дм^{3}ммоль$^{-1}$см$^{-1}$, равный:
при длине волны 340 нм — 6,3,
при длине волны 365 нм — 3,5,
при длине волны 334 нм — 6,18;

l — толщина поглощающего слоя в кювете, см;

m — масса навески сухого молока, г (8.3);

V_2 — объем фильтрата (8.5.3) в спектрофотометрической кювете (8.6.4), см^3;

V_3 — объем фильтрата (8.5.3), взятый для разведения (8.6.5), см^3 (если испытание проводилось без разведения фильтрата, то V_3 = 1 см^3);

$W_{\text{осв}}$ — массовая доля сухого обезжиренного вещества в пробе продукта, %.

Результат определяют с точностью 0,001 % (г/100 г).

9.2 Точность

Примечание — Сходимость и воспроизводимость были рассчитаны по результатам межлабораторных испытаний.

9.2.1 *Сходимость*

Абсолютное расхождение результатов двух параллельных определений, выполненных в одной лаборатории, не должно превышать r = 0,010 г/100 г, если среднее арифметическое результатов не превышает 0,060 г/100 г включительно.

Относительное расхождение результатов двух параллельных определений, выполненных в одной лаборатории, не должно превышать 15 % среднего арифметического значения, если оно превышает 0,060 г/100 г.

9.2.2 *Воспроизводимость*

Абсолютное расхождение результатов двух измерений, выполненных в двух лабораториях, не должно превышать R = 0,015 г/100 г, если среднее арифметическое результатов не превышает 0,100 г/100 г включительно.

Относительное расхождение результатов двух измерений, выполненных в двух лабораториях, не должно превышать 20 % среднего арифметического значения, если оно превышает 0,100 г/100 г.

10 Оформление результатов измерений

В отчете об испытании должны быть указаны:

- используемый метод;
- полученные результаты;
- любые условия проведения испытаний, не установленные данным стандартом и касающиеся подробностей, которые могут повлиять на конечный результат.

В отчете должны быть все данные, необходимые для полной идентификации пробы.

УДК 637.143.001.4:006.354 ОКС 67.100.10 Н19 ОКСТУ 9209

Ключевые слова: сельскохозяйственные продукты, молочные продукты, молоко, сухое молоко, химический анализ, определение массовой доли, молочная кислота, лактаты

gost.e-ecolog.ru