ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫНЫҢ МЕМЛЕКЕТТІК СТАНДАРТЫ

Балмұздаққа арналған құрғақ сүт, құрғақ сүт қоспалары және балқытылған сыр

СҮТ ҚАНТЫНЫҢ ҚҰРАМЫН АНЫҚТАУ
1-бөлім
Глюкоза сүт қантының құрауыш бөлігі ретінде пайдаланылатын ферментативті әдіс

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

ҚР СТ ИСО 5765-1-2009

ISO 5765-1:2002 Dried milk, dried ice-mixes and processed cheese – determination of galactose content – enzymatic method utilizing the glucose moiety of the lactose, (IDT)

Ресми басылым

Қазақстан Республикасы Индустрия және сауда министрлігі
Техникалық реттеу және метрология комитеті
(Мемстандарт)

Астана

gost.e-ecolog.ru

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫНЫҢ МЕМЛЕКЕТТІК СТАНДАРТЫ

Балмұздаққа арналған құрғақ сүт, құрғақ сүт қоспалары және балқытылған сыр

СҮТ ҚАНТЫНЫҢ ҚҰРАМЫН АНЫҚТАУ
1-бөлім
Глюкоза сүт қантының құрауыш бөлігі ретінде пайдаланылатын ферментативті әдіс

ҚР СТ ИСО 5765-1-2009

ISO 5765-1:2002 Dried milk, dried ice-mixes and processed cheese – determination of galactose content – enzymatic method utilizing the glucose moiety of the lactose, (IDT)

Ресми басылым

Қазақстан Республикасы Индустрия және сауда министрлігі
Техникалық реттеу және метрология комитеті
(Мемстандарт)

Астана

Алғысөз

1 «Қазақстан стандарттау және сертификаттау институты» республикалық мемлекеттік кәсіпорны және «Технолог» № 44 стандарттау бойынша техникалық комитеті («Эксперт-Консалтинг» жауапкершілігі шектеулі серіктестігі) **ӘЗІРЛЕП ЕНГІЗДІ**

2 Қазақстан Республикасы Индустрия және сауда министрлігінің Техникалық реттеу және метрология комитеті Төрағасының 2009 жылғы 17 тамыздағы № 418-од бұйрығымен **БЕКІТІЛІП ҚОЛДАНЫСҚА ЕНГІЗІЛДІ**

3 Осы стандарт мәтінде қосымша талаптары көлбеу сызықпен берілген ISO 5765-1:2002 Dried milk, dried ice-mixes and processed cheese – determination of galactose content – enzymatic method utilizing the glucose moiety of the lactose (ИСО 5765-1:2002 Балмұздаққа арналған құрғақ сүт, құрғақ сүт қоспалары және балқытылған сыр. Сүт қантының құрамын анықтау. 1-бөлім. Сүт қантының құрауыш бөлігі ретінде глюкоза пайдаланылатын ферментативті әдіс) халықаралық стандартымен бірдей

4 Осы стандартта «Техникалық реттеу туралы» Қазақстан Республикасы Заңының нормалары жүзеге асырылды

5 БІРІНШІ ТЕКСЕРУ МЕРЗІМІ **2014 жыл**
ТЕКСЕРУ КЕЗЕҢДІЛІГІ **5 жыл**

6 АЛҒАШ РЕТ ЕНГІЗІЛДІ

Осы стандартқа енгізілетін өзгерістер туралы ақпарат «Стандарттау бойынша нормативтік құжаттар» сілтемесінде, ал өзгерістер мәтіні – ай сайынғы «Мемлекеттік стандарттар» ақпараттық сілтемесінде жарияланады. Осы стандартты қайта қараған немесе ауыстырған (жойған) жағдайда, тиісті ақпарат «Мемлекеттік стандарттар» ақпараттық сілтемесінде жарияланатын болады

Осы стандарт Қазақстан Республикасы Индустрия және сауда министрлігінің Техникалық реттеу және метрология комитетінің рұқсатынсыз ресми басылым ретінде толықтай немесе бөлшектеліп басылып шығарыла, көбейтіле және таратыла алмайды

Мазмұны

	Кіріспе	IV
1	Қолданылу саласы	1
2	Нормативтік сілтемелер	1
3	Әдістің маңызы	2
4	Реактивтер	3
5	Аспаптар	4
6	Үлгілерді іріктеу	5
7	Бақылау жүргізу тәртібі	5
8	Нәтижелерді өңдеу	9
9	Дәлдік	10
10	Бақылау нәтижелерін рәсімдеу	11
А қосымшасы (міндетті). Ферментативті әдісті орындауға арналған практикалық зертхана тәжірибесінің (ПЗТ) ережелері		12
Библиография		16

Кіріспе

Осы стандартта галактозаны анықтау үшін сүт қантының құрауыш бөлігі ретінде глюкоза пайдаланылатын ферментативті әдіс сипатталады.

Осы стандартта немесе *ҚР СТ ИСО 5765-2* сипатталған әдістің қолданылуын таңдауды анықтау талдау үшін ұсынылатын үлгідегі глюкоза мен галактозаның мөлшеріне байланысты. Егер үлгідегі глюкозаның құрамы сүт қантының құрамына қарағанда аса жоғары болса, онда *ҚР СТ ИСО 5765-2* сипатталған әдісті қолдану ұсынылады. Керісінше, сүт қантының құрамына қарағанда, галактозаның құрамы елеулі болатын үлгілер үшін осы стандартта сипатталатын әдісті пайдалану ұсынылады.

Глюкоза мен галактоза құрамы төмен болатын үлгілер үшін, әдіс артық көрінбей қолданыла алады. Глюкоза мен галактоза құрамы жоғары болатын үлгілер үшін, сүт қантының құрамын анықтау дәлдігі екі әдіс үшін де төмендетіледі.

Жылумен өңделетін сүт және сүт өнімдерінде сүт қантының үйлесімділігі лактулозаға айналуы мүмкін. Лактулоза осы стандартта сипатталған әдіс арқылы анықтала алмайды. Егер, осыған қарамастан, *ҚР СТ ИСО 5765-2* сипатталған әдіс пайдаланылса, лактулоза сүт қанты сияқты анықталатын болады. Бұдан басқа, жылумен қарқынды өңделетін сүт (стерилденген сүт) және сүт өнімдеріндегі сүт қантының үйлесімділігі Мэйллард бойынша реакция салдарынан протеиндермен байланысты болуы мүмкін. Мұндай жағдайларда байланысқан сүт қанты ҚР СТ ИСО 5765-2 сипатталған әдіспен анықтала алмайды.

Ферментативті әдіс үшін практикалық тәжірибе ережелері (GLP) қатаң қолданылатын жағдайда ғана дұрыс нәтиже алынатын болады. Практикалық тәжірибе ережелері (GLP) А қосымшасында белгіленген.

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫНЫҢ МЕМЛЕКЕТТІК СТАНДАРТЫ

Балмұздаққа арналған құрғақ сүт, құрғақ сүт қоспалары және балқытылған сыр

СҮТ ҚАНТЫНЫҢ ҚҰРАМЫН АНЫҚТАУ
1-бөлім
Сүт қантының құрауыш бөлігі ретінде глюкоза пайдаланылатын ферментативті әдіс

Енгізілген күні 2010-07-01

1 Қолданылу саласы

Осы стандарт басқа көміртектер мен тотықсыздандырғыш заттарда пайызбен берілетін құрғақ формадағы балмұздаққа арналған құрғақ сүт, сүт қоспаларының барлық типтеріндегі және балқытылған сырда сүт қантының құрамын анықтау үшін, сүт қантының құрауыш бөлігі ретінде глюкоза пайдаланылатын ферментативті әдісті белгілейді.

2 Нормативтік сілтемелер

Осы стандартты қолдану үшін, мынадай сілтемелік нормативтік құжаттар қажет:

ҚР СТ ИСО 5765-2-2009 Балмұздаққа арналған құрғақ сүт, сүт қоспалары және балқытылған сыр. Сүт қантының құрамын анықтау. 2-бөлім. Сүт қантының құрауыш бөлігі ретінде глюкоза пайдаланылатын ферментативті әдіс.

ГОСТ 1770-74 (СТ СЭВ 1247-78, СТ СЭВ 4021-83, СТ СЭВ 4977-85) Зертханалық өлшейтін шыны ыдыс. Цилиндрлер, өлшектер, құтылар, сынауықтар. Жалпы техникалық шарттар.

ГОСТ 3622-68 Сүт және сүт өнімдері. Сынамаларды іріктеу және оларды сынаққа дайындау.

ГОСТ 12026-76 Зертханалық сүзгі қағаз. Техникалық шарттар.

ГОСТ 24104-2001 Зертханалық таразылар. Жалпы техникалық талаптар.

ГОСТ 26809-86 Сүт және сүт өнімдері. Сынамаларды талдауға дайындау және іріктеу әдістері, қабылдау ережелері.

ГОСТ 28498-90 Сұйықтықты шыны термометрлер. Жалпы техникалық талаптар. Сынақ әдістері.

Ресми басылым

ГОСТ ИСО 5725-1-2003 Өлшеу әдістері мен нәтижелерінің дәлдігі (дұрыстық және дәлме-дәлдік). 1-бөлім. Негізгі ережелер мен анықтамалар.

ГОСТ ИСО 5725-2-2003 Өлшеу әдістері мен нәтижелерінің дәлдігі (дұрыстық және дәлме-дәлдік). 2-бөлім. Стандарттық өлшеу әдісінің қайталанғыштығы мен өндірімділігін анықтаудың негізгі әдісі.

ГОСТ ИСО 5725-3-2003 Өлшеу әдістері мен нәтижелерінің дәлдігі (дұрыстық және дәлме-дәлдік). 3-бөлім. Стандарттық өлшеу әдісінің аралық дәлме-дәлдік көрсеткіштері.

ГОСТ ИСО 5725-4-2003 Өлшеу әдістері мен нәтижелерінің дәлдігі (дұрыстық және дәлме-дәлдік). 4-бөлім. Стандарттық өлшеу әдісінің дұрыстығын анықтаудың негізгі әдістері.

ГОСТ ИСО 5725-5-2003 Өлшеу әдістері мен нәтижелерінің дәлдігі (дұрыстық және дәлме-дәлдік). 5-бөлім. Стандарттық өлшеу әдісінің дәлме-дәлдігін анықтаудың балама әдістері.

ГОСТ ИСО 5725-6-2003 Өлшеу әдістері мен нәтижелерінің дәлдігі (дұрыстық және дәлме-дәлдік). 6-бөлім. Дәлдік мәндерін практикада пайдалану.

ЕСКЕРТПЕ Осы стандартты пайдаланған кезде, жыл сайын шығатын «Стандарттау бойынша нормативтік құжаттар» атты ақпараттық сілтеме бойынша стандарттар мен жіктегіштердің қолданысын ағымдағы жылғы жай-күйі және ағымдағы жылы жарияланған ай сайын шығарылатын тиісті ақпараттық сілтемелер бойынша тексерген жөн. Егер сілтемелік құжат ауыстырылса (өзгертілсе), онда осы стандартты пайдаланған кезде, ауыстырылған (өзгертілген) құжатты басшылыққа алған дұрыс. Егер сілтемелік құжат ауыстырылмай жойылса, онда сілтеме берілетін ереже осы сілтемеге қатыссыз бөлімде қолданылады.

3 Әдістің маңызы

3.1 Үлгінің жұмыстық бөлігінің жүзгіні немесе ерітіндісі таза сығынды алу үшін протеинсізденеді.

3.2 Үлгінің жұмыстық бөлігінің тазартылған сығындысы мынадай ферменттермен немесе биохимиялық заттармен реакцияға түседі:

а) сүт қантын глюкоза мен галактозаға ыдыратуға арналған ß-галактозидаза;

б) никотинамид-аденин-динуклеотидфосфат ($НАД^+$) пайыздық қатынасындағы дегидрогеназ ß-галактозидазасы галактозаны галактон қышқылына өршіткілеу үшін, $НАД^+$ НАДФГ келтіріледі.

3.3 НАДФГ мөлшері 340 нм кезінде сынақ ерітіндісінің оптикалық тығыздығынан анықталады.

3.4 НАДФГ мөлшеріне пропорционал сүт қантының құрамы, егер түзету талдау жүргізуді бастар алдында глюкозаны сынақ үлгісінде көрсету үшін жасалатын болса, есептеледі.

4 Реактивтер

4.1 Талдамалық тазалық дәрежесіндегі реактивтерді ғана қолдану керек. Ферментті ерітінділерді әзірлеу үшін қолданылатын су екі рет тазартылуға тиіс. Өзге мақсаттар үшін қолданылатын су тазартылған немесе тең бағалы тазалық дәрежесінде болуы керек.

Өндіруші ұсынатын реактивтердің жарамдылық мерзіміне назар аудару қажет.

Егер ферментті жүзгін белгіленген қолданыстан басқалармен қолданылса, жүзгін көлемі (7.6.1) пропорционал артуға немесе төмендетілуге тиіс.

ЕСКЕРТПЕ 4.5, 4.7-4.9 сипатталған реактивтер сынақ амалы ретінде көп мөлшерде алынуы мүмкін, мысалы, Боринтердің сынақ жиынтығы.*

4.2 Калий гексаноферрат (II) ерітіндісі, $K_4[Fe(CN)_6]$

3,6 г калий гексаноферрат тригидратын (II) суда еріту керек. 100 $см^3$ сумен езіп араластырады.

4.3 Мырыш гептагидрат сульфаты ерітіндісі, $ZnSO_4$

7,2 г мырыш гептагидрат сульфатын суда сұйылту керек. 100 $см^3$ сумен езіп араластырады.

4.4 Натрий гидроксиді ерітіндісі, $c(NaOH) = 0,1$ моль/$дм^3$

4,0 г натрий гидроксиді ерітіндісін суда сұйылту қажет. 1000 $см^3$ сумен езіп араластырады.

4.5 Цитратты араша ерітінді, pH 6,6 ± 0,1

2,8 г цитрат дигидрат трисодиумын ($C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$), 0,042 г лимон қышқылы моногидратын ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) және 0,625 г магний сульфаты гептагидратын ($MgSO \cdot 7H_2O_4$) 40 $см^3$ суда сұйылту керек.

pH 6,6 ± 0,1 дейін 20 °С температурада күкірт қышқылымен (2 моль/$дм^3$) немесе натрий гидроксиді ерітіндісімен (0,1 моль/ $дм^3$) белгілеу керек. 50 $см^3$ суда сұйылтып араластырады.

Аталған ерітінді егер оны 0 °С бастап 5 °С дейінгі температурада тоңазытқышта сақтаса, 3 ай сақталуы мүмкін.

4.6 Триэтаноламиннің араша ерітіндісі (ТЭА), pH 7,6 ± 0,1

16,6 г калий дигидрофосфатын 80 $см^3$ суда сұйылту керек. pH 8,6 ± 0,1 дейін 20 °С температурада натрий гидроксиді ерітіндісі арқылы (1 моль/$дм^3$) белгілеу керек. 100 $см^3$ суда сұйылтып араластырады.

4.7 НАДФ$^+$/АТФ/ТЭА араша ерітіндісі

---

* Боринтердің сынақ жиынтығы көп мөлшерде қол жеткізілетін тиісті өнім үлгісі ретінде қолданылады. Осы ақпарат осы стандартты пайдаланушыларға қолайлы болуы үшін қарастырылған.

65 г қос натрийлі никотинамидадениндинуклеотид тұзын [$C_{21}H_{27}N_7O_{17}P_3$, шамамен талдаудың 98 %-ы] 5 см^3 цитрат араша ерітіндісінде сұйылтады (4.4).

Осы ерітінді, егер оны 0 ˚С бастап 5 ˚С дейінгі температурада тоңазытқышта сақтаса, 3 апта сақталуы мүмкін.

4.8 *β*-галактозидаз жүзгіні (ішек таяқшасының), 3,2 моль/дм^3 аммоний сульфаты ерітіндісіндегі жүзгін, pH шамамен 6 ± 0,1 тең.

β-галактозидаз жүзгінінің қолданысы, кем дегенде, 60 бірлік/см^3 (сүт қанты 25 ˚С температурада субстрат сияқты) болуға тиіс. Жүзгін, егер оны 0 ˚С бастап 5 ˚С дейінгі температурада тоңазытқышта сақтаса, 12 ай сақталуы мүмкін. Ішінде жүзгін болатын ыдыс ұсақталған мұзда сақталуы керек.

ЕСКЕРТПЕ Әрқайсысы тиісінше белгіленген *β*-галактозидазаның меншікті белсенділік көрсеткіштерінде есептелетін *β*-фруктозидаздың, α-галактозидазаның, глюкоза дегидрогеназының, α-галактозидаза мен НАДГ-оксидазаның 0,001 %-ынан артық болмайтын *β*-галактозидаз жүзгіні.

4.9 Дегидрогеназ ß-галактозидаз жүзгіні (синегнойдты флуоресценциясында - Pseudomonas fluorescence), 3,2 моль/ дм^3 аммоний сульфаты ерітіндісіндегі жүзгін, pH шамамен 6 ± 0,1 тең.

Дегидрогеназ ß-галактозидаз жүзгінінің әрекеті, кем дегенде, 8 өлшем бірлігі/см^3 болуы керек.

Жүзгін, кем дегенде, егер оны 0 ˚С бастап 5 ˚С дейінгі температурада тоңазытқышта сақтаса, 6 ай сақталуы мүмкін. Егер жүзгін қолданылатын болса, оның ыдысы ұсақталған мұзда сақталуға тиіс.

ЕСКЕРТПЕ Дегидрогеназ ß-галактозидазының жүзгінінде әрбір алкогольдегидрогеназ ß-галактозидаздың 0,01 %-дан артық болмайтын, 0,1 %-дан артық болмайтын НАДГ-оксидаз және глюкозамен өзара әрекеттесетін ферменттер және тиісінше белгіленген 0,5 %-дан артық болмайтын лактатадегидрогеназ болады.

4.10 Сүт қантының стандарттық ерітіндісі, $c(C_{12}H_{22}O_{11}H_2O)$ = 0,8 мг/ см^3.

Қолданар алдында, сүт қантының моногидратын 87 ˚С температурада кептіру шкафында орнықты массасына дейін құрғатады.

400 мг сүт қантының құрғақ моногидратын суда сұйылтады. 500 см^3 суда ерітіп араластырады. Ерітіндіні, егер ол 0 ˚С бастап 5 ˚С дейінгі температурада тоңазытқышта сақталса, 2 күн ұстауға болады. Қолданар алдында ерітіндіні бірден 20 ˚С дейін қыздыру керек.

5 Аспаптар

5.1 *ГОСТ 24104* бойынша 0,1 дейін есептеу мүмкіндігі болатын ±1 мг дейінгі дәлдікпен таразыға тартуға қабілетті талдамалық таразылар.

5.2 *ГОСТ 1770* бойынша сыйымдылығы 50 $см^3$ и 250 $см^3$ зертханалық шыны стакан.

5.3 Көлемі 5 $см^3$ және 10 $см^3$, 0,1 бөлуге өлшемделген өлшеу тамшуырлары.

5.4 Көлемі 10 $см^3$, 5 $см^3$, 1 $см^3$ және 0,05 $см^3$ тамшуырлар.

5.5 Бір таңбалы, сыйымдылығы 100 $см^3$ өлшеу құтысы.

5.6 Диаметрі шамамен 15 см сапасы орташа сүзгі қағаз *ГОСТ 12026* бойынша.

5.7 Диаметрі шамамен 7 см сүзгі-құйғыш.

5.8 340 нм кезінде өлшеу үшін қолданылатын, оптикалық жол ұзындығы 1 см бөліктермен жабдықталған спектрометр.

5.9 Спектрометр бөліктерінде үлгі/фермент құрамын араластыру үшін пайдаланылатын пластмасса қалақтар.

5.10 Диаметрі шамамен 6 мм және ұзындығы 150 мм, үлгіні сулауға арналған шыны штапик.

5.11 Спектрометр бөлігін (5.8) (7.6 қосымша қараңыз) ұстау үшін қолданылатын ұстағышы болатын, 20 °С бастап 25 °С дейінгі температурада сақтауға қабілетті су моншасы.

ЕСКЕРТПЕ Егер бөлме температурасы 20 °С төмен болса ғана су моншасында бөлікті инкубациялау қажет.

5.12 Балқытылған сыр үлгісінің жұмыстық бөлігінің жүзгінін әзірлеу үшін қолданылатын араластырғыш аспап.

5.13 87 °С ± 2 °С температураны сақтауға қабілетті, термостатикалық бақыланатын кептіру шкафы.

5.14 Сырды сындыруға қабілетті және оңай тазартылатын, езуге арналған құрылғы.

5.15 Сағаттар.

5.16 Термометр *ГОСТ 28498* бойынша.

6 Үлгілерді іріктеу

Үлгілерді іріктеу –*ГОСТ 3622, ГОСТ 26809* бойынша.

Зертхананың тасымалдау немесе сақтау кезінде бүлінбеген немесе өзгермеген үлгі алуы маңызды.

7 Бақылау жүргізу тәртібі

7.1 Процедураны тексеруге арналған сынақтар

7.1.1 Егер төменде берілетін бір немесе одан көп шартты қолданса, сүт қантының қалпына келгенін тексеру үшін мынадай сынақты орындау керек:

а) егер НАД$^+$ араша ерітіндісі/цитрат араша ерітіндісінің (4.7) жаңа топтамасын, *β*-галактозидаз жүзгінін немесе дегидрогеназ ß-галактозидаз жүзгінін (4.9) қолданса;

б) егер НАД$^+$ араша ерітіндісі/цитрат араша ерітіндісін (4.7) және/немесе *β*-галактозидаз жүзгінін (4.8) қолданса немесе егер дегидрогеназ ß-галактозидаз жүзгіні (4.9) қолданылмай, тоңазытқышта 2 аптадан артық сақталса;

в) егер талдамалық әрекетсіздік кезеңінен кейін талдамалық жұмыс жаңартылса;

г) егер жағдай осындай сынақтың орындалуын ақтаса.

7.1.2 Сүт қантының 5,0 см^3 және 10,0 см^3 (4.10) 100 см^3 екі өлшеу құтысына (5.5) тамшуырмен салу керек. Әр құтыға 50 см^3 су қосу қажет. Әрекетті 7.5 және 7.6 тармақшаларында белгіленгендей етіп жалғастыру керек.

7.1.3 Сүт қантының стандарттық ерітіндісі құрамының сүт қанты моногидратын (4.10) мынадай мәндерді қолдана отырып, 3-формулаға (8.1 қараңыз) сәйкес есептеу керек:

V_3 - стандарттық сүт қанты ерітіндісінің мәні (4.10), V_3 = 500 см^3;

V_4 - V_4 = 5 см^3 және 10 см^3 қолданылатын стандарттық сүт қанты ерітіндісінің мәні (7.1.2);

V_5 - сұйытылған стандарттық ерітіндінің жалпы мәні (7.1.2), V_5 = 100 см^3.

7.1.4 Сүт қанты моногидратының тазалығын назарға ала отырып, екі сұйылту үшін алынатын қалпына келтіру 100 % ± 2 % болуы керек.

Егер қалпына келтіру осы шектерде болмаса, онда реактивтерді, қолданылатын әдістерді, тамшуыр дәлдігін және спектрометр жай-күйін тексеру қажет. Тиісті нәтижелер алу үшін қажетті әрекеттер қолдану қажет. Қанағаттанарлық сынақ нәтижелерін алғанға дейін, процедураны тексеруге арналған сынақты қайталау керек.

7.2 Сынақ үлгісін әзірлеу

7.2.1 Құрғақ сүт және құрғақ сүт қоспалары

Сынақ үлгісін өлшемі үлгіден екі есе үлкен ауа өткізбейтін қақпақ қарастырылған сынақ үлгісіне орналастырады. Жүксауытты шайқай және айналдыра отырып, үлгіні араластыру керек.

7.2.2 Балқытылған сыр

Әдетте тұтынатын сырдың алдын ала сыналатын үлгісіне кепілдік беру үшін, сырдың қабығын, бүлінген және өңез қабатын алып тастау керек. Үгіткіш құрылғыны пайдаланып, сынақ үлгісін үгіту керек (5.14). Езілген массаны араластыру және егер мүмкін болса, оны екінші рет үгіту керек. Қайта мұқият араластыру қажет. Егер сынақ үлгісі үгітілмесе, онда оны қарқынмен шайқап араластыру қажет.

Егер кідірту мүмкін болмаса, сынақ үлгісін талдау жүргізу үшін алынған үлгіден екі есе көп өлшемдегі ауа өткізбейтін қақпағы болатын жүксауытқа орналастырады. Жүксауытты жабу керек. Сынақ үлгісінің тиісінше сақталуын және жүксауыттың ішкі бетіндегі ылғал шығының алдын алу үшін, сақтық шараларын қабылдау керек.

Алынған сынақ үлгісін көлемі 250 $см^3$ зертханалық шыны стаканға салады (5.2). Шамалы су мөлшерін қосады және араластырғыш аппарат арқылы микстураның толық жүзгінін алады (5.12).

7.3 Үлгінің жұмыстық бөлігі

Зертханалық шыны стаканда 1 г сынақ үлгісін (7.2.1) немесе сынақ үлгісінің жүзгінін (7.2.2) ±1 мг дейінгі дәлдікпен таразыға тарту керек (5.2). Шыны штабик (5.10) немесе араластырғыш аппаратты (5.12) тиісті түрде қолдана отырып, 40 °С бастап 50 °С дейінгі температурада алдын ала қыздырылған 20 $см^3$ суда үлгінің жұмыстық бөлігін езу немесе сұйылту керек. Зертханалық шыны стакан ішіндегісін 100 $см^3$ өлшеу құтысына салу керек (5.5). 60 $см^3$ сумен сұйылтып араластырады.

Сынақ үлгісінің жұмыстық бөлігінің массасын анықтағаннан кейін, мынаны белгілеу қажет:

- үлгінің жұмыстық бөлігі толық сынақ үлгісінің өкілеті болуы үшін;
- спектрометр бөліктеріндегі сүт қантының құрамы 5 мг бастап 100 мг дейін болуға тиіс;
- сынақ үлгісіндегі глюкоза үшін (8.1 қарау керек), спектрометр бөліктеріндегі ерітіндінің оптикалық тығыздығы (A_2) 0,1 бастап 0,4 дейінгі шектерде болуға тиіс;
- егер үлгідегі сүт қантының массалық үлесі 0,2 %-дан аз болса, онда 1 г жұмыстық үлгіге қарағанда артық тұтынуы мүмкін. Мұндай жағдайда, 7.5.1 белгіленген майлылық, протеин және басқа заттардың көлемінің ерітінді көлеміне елеулі әсері болуы мүмкін (8.1 тармақшасында V_3 қарау керек).

7.4 Реактивтерге арналған бақылау сынағы

Бақылау сынағын екі рет орындау керек. Одан әрі барлық реактивтерді қолдана отырып, бірақ үлгінің жұмыстық бөлігін түсірмей, 7.5 және 7.6 тармақшаларда белгіленгендей жалғастыру қажет.

7.5 Протеинсіздеу

7.5.1 Сынақ ерітіндісіне немесе жүзгінге көлемі 100 $см^3$ бір таңбалы өлшеу құтысына мынадай ретпен қосу керек (7.3):

- калий гексаферратының (II) 5,0 $см^3$ ерітіндісі (4.2),
- мырыш сульфаты гептагидратының 5,0 $см^3$ ерітіндісі (4.3),
- әрбір қосудан кейін мұқият араластырғаннан кейін натрий гидроксидінің 10,0 $см^3$ ерітіндісі.

100 $см^3$ сумен сұйылтып араластыру керек.

Алынған қоспаны 30 минут қойып қою қажет. Сүзгілеу сәтіне дейін құтының ішіндегісін қайта араластырмау керек.

7.5.2 Сұйықтықтың жоғарғы қабатын сүзіндінің бірінші бөлігін тастай отырып, сүзгіш қағаз (5.6) арқылы сүзу керек.

7.6 Анықтау

7.6.1 Қолдануға дейін НАДФ$^+$/цитрат араша ерітіндісін (4.5.), фосфат араша ерітіндісін (4.6) және бөлме температурасындағы (20 °С бастап 25 °С дейін) су берілуін қамтамасыз ете отырып, 1-кестеге сәйкес анықтауды жүзеге асыру керек.

1-кесте – Анықтау сызбанұсқасы

	Үлгі немесе стандарттық сынақ		**Реактивтерді бақылау сынағы**	
	сүт қанты немесе глюкоза	**глюкоза**	**сүт қанты немесе глюкоза**	**глюкоза**
1	**2**	**3**	**4**	**5**
Спектрометр бөліктеріндегі тамшуыр:				
Цитраттың араша ерітіндісі (4.5)	0,20 см^3	0,20 см^3	0,20 см^3	0,20 см^3
β-галактозидаз жүзгіні (4.8)	0,05 см^3	-	0,05 см^3	-
Су		0,05 см^3		0,05 см^3
Үлгі немесе стандарттық сүзінді (7.5.2)	1,00 см^3	1,00 см^3	-	-
Реактивтің бақылау сүзіндісі	-	-	1,00 см^3	1,00 см^3
Пластмасса қалақшаларды қолдана отырып, спектрометрлік бөліктер ішіндегісін араластыру керек (5.9) және талап бойынша бу моншасын (5.11) қолдана отырып, 20 °С температурада 15 минут көлемінде инкубациялау қажет.				
Содан соң тамшуырды қолданып, спектрометр бөлігіне қосу керек (5.4):				
Фосфаттың араша ерітіндісі (4.6)	1,00 см^3	1,00 см^3	1,00 см^3	1,00 см^3
Су	1,00 см^3	1,00 см^3	1,00 см^3	1,00 см^3
Спектрометрлік бөліктер ішіндегісін араластыру керек; 2 минут араластырғаннан кейін, 340 нм толқын ұзындығында ауаға қарсы әрбір бөлікте ерітіндінің оптикалық тығыздығын A_0 өлшеу керек.				
Содан соң тамшуырды қолданып, спектрометрдің төменде көрсетілген бөліктеріне қосу керек (5.4):				
Дегидрогеназ ß-галактозидаз жүзгіні (4.9)	0,05 см^3	0,05 см^3	0,05 см^3	0,05 см^3
Спектрометрлік бөліктер ішіндегісін араластыру керек (5.9) және талап бойынша бу моншасын (5.11) қолдана отырып, 20 °С температурада 15 минут көлемінде инкубациялау қажет. Ауаға қарсы әрбір бөлікте ерітіндінің оптикалық тығыздығын A_{15} өлшеу қажет. Қосымша 5 минуттан кейін, әр ерітіндінің оптикалық тығыздығын қайта өлшеу керек. Егер реакция тоқтатылмайтын болса, оптикалық тығыздықтың артуы 5 минутта кезекті аралықтардан жоғары орнықты болмағанша, әр ерітіндіні 5 минут аралығында өлшеуді жалғастыру қажет.				

7.6.2 Оптикалық тығыздықты есептеу

7.6.2.1 15 минут инкубациядан кейін пайда болатын оптикалық тығыздықтың артуы болмаса, (1) формуласын қолданып есептеу кезінде (8.1 қараңыз) әрбір элементте болатын оптикалық тығыздықты, А, есептейді:

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

мұндағы, A_0 - HK/G6P-DH жүзгінін қосар алдында өлшенген оптикалық тығыздықтың сандық мәні;

A_t - 15 минут кезеңде инкубациялаудан кейін өлшенген оптикалық тығыздықтың сандық мәні.

7.6.2.2 Егер реакция 15 минуттан кейін тоқтатылмаса, (2) формуласын қолданып есептеген кезде (8.1 қарау керек), әрбір секцияда болатын оптикалық тығыздықты, А, есептеу керек:

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

мұндағы A_0 - HK/G6P-DH жүзгінін қосар алдында өлшенген оптикалық тығыздықтың сандық мәні;

A_t - t минут кезеңінде инкубациялаудан кейін өлшенген оптикалық тығыздықтың сандық мәні.

$A_{(t-5)}$ - (t - 5) минут кезеңінде инкубациялаудан кейін өлшенген оптикалық тығыздықтың сандық мәні.

7.6.3 Егер оптикалық тығыздық A 0,500 аспаса, сүзіндіні тиісінше сумен сұйылтуды қолдана отырып, 7.6.1 және 7.6.2 тармақшаларында қарастырылған процедураны қайталау керек (7.5.2).

8 Нәтижелерді өңдеу

8.1 Есептеу

Сүт қантының құрамы, w_L, (3) формула бойынша есептеледі:

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

мұндағы w_L - массасы бойынша пайыздық қатынас ретінде өрнектелген сүт қанты құрамының массалық үлесі;

A_1 - сүт қанты мен глюкозаға арналған үлгі немесе стандарттық сынақтың оптикалық тығыздығының сандық мәні (7.6.2 тармақшасында есептелінген);

A_2 - глюкозаға арналған үлгі немесе стандарттық сынақтың оптикалық тығыздығының сандық мәні (7.6.2 тармақшасында есептелінген);

A_3 - сүт қанты мен глюкозаға арналған реактивті бақылау сынағының оптикалық тығыздығының сандық мәні (7.6.2 тармақшасында есептелінген);

A_4 - глюкозаға арналған реактивті бақылау сынағының оптикалық тығыздығының сандық мәні (7.6.2 тармақшасында есептелінген);

M_r - сүт қантының салыстырмалы молекулярлық массасы; сусыз сүт қантына арналған, M_r = 342,30, және сүт қантының моногидратына арналған, M_r = 360,31;

K - 340 шм (яғни, $K = 6{,}3 \times 10^6$ см^2/моль) кезіндегі НАДФ молярлық сіңіру коэффициенті;

l - спектрометр бөлігінің теориялық ұзындығы бойының сандық мәні, см (1 см);

V_1 - спектрометр бөлігіндегі сұйықтықтың жалпы көлемі (7.6.1), см^3 (3,30 см^3);

V_2 - спектрометр бөлігіне қосылған сүзінді (7.5.2) немесе оны сұйылту (7.6.3) көлемі, см^3 (1,00 см^3);

V_3 - 7.5.1тармағы бойынша дайындалған ерітінді көлемі, см^3 (100 см^3);

V_4 - ерітінді (7.6.3) үшін ұсынылған сүзінді (7.5.2) көлемі, см^3;

V_5 - сынақ ерітіндісі сұйылтылған көлем (7.6.3), см^3;

m - үлгінің жұмыстық бөлігінің массасы (7.3), г;

Егер теріс шама $(A_2 - A_4)$ үшін белгіленетін болса, оны ескеру қажет.

ЕСКЕРТПЕ Егер сынақ үлгісінің массасы 1 г көп болса, онда V_3 мынадай формула бойынша есептелуі мүмкін:

$$V_3 = 100 - P,$$

мұндағы P – тұнба көлемі, см^3.

P мынадай формула қолданылатын сынақ үлгісінің жуық құрамынан есептелуі мүмкін: P = 1,1 × (май грамы) + 0,73 × (протеин грамы) + 0,65 × (крахмал грамы) + 0,55 (ерімейтін күл грамы).

8.2 Нәтижелерді өрнектеу

Нәтижелерді белгілі үш есептеу бойынша өрнектейді.

9Дәлдік

9.1 Зертханааралық сынақ

Әдістің дәлме-дәлдігіне жасалатын зертханааралық сынақ бөлшектері жариялануға тиіс ([1] қараңыз).

Аталған сынақ үшін шығарылатын қайталанушылық және өндірімділік мәндері *ГОСТ ИСО 5725-1, ГОСТ 5725-2, ГОСТ ИСО 5725-3, ГОСТ ИСО 5725-4, ГОСТ 5725-5, ГОСТ ИСО 5725-6* сәйкес анықталады. Алынатын мәндер ұсынылатындарды қоспағанда, концентрация мен матрица аралығымен сәйкес болмауы мүмкін.

9.2 Қайталанғыштық

Сол зертханада сол жабдықты пайдаланатын сол оператордың қысқа уақыт аралығында бірдей сынақ материалдарында сол әдіс арқылы алынған тәуелсіз екі бөлек сынақ нәтижелері арасындағы абсолют айырма, егер мыналардан көп болатын жағдайда, 5 %-дан артық емес:

- балмұздаққа арналған құрғақ сүт және құрғақ сүт қоспалары үшін: сынақ нәтижесінің орташа арифметикалық мәнінің 3 %-ы;
- балқытылған сыр үшін: сынақ нәтижесінің орташа арифметикалық мәнінің 6 %-ы.

9.3 Өндірімділік

Түрлі зертханада түрлі жабдықты пайдаланатын түрлі оператордың бірдей сынақ материалдарында сол әдіс арқылы алынған тәуелсіз екі бөлек сынақ нәтижелері арасындағы абсолют айырма, егер мыналардан көп болатын жағдайда, 5 %-дан артық емес:

- балмұздаққа арналған құрғақ сүт және құрғақ сүт қоспалары үшін: сынақ нәтижесінің орташа арифметикалық мәнінің 6 %-ы;
- балқытылған сыр үшін: сынақ нәтижесінің орташа арифметикалық мәнінің 6 %-ы.

10 Бақылау нәтижелерін рәсімдеу

Сынақ хаттамасында мыналар анықталуға тиіс:

а) үлгіні толық бірегейлеу үшін қажетті барлық ақпарат;

б) сынамаларды іріктеудің пайдаланылатын әдісі;

в) осы стандартқа жасалатын сілтемемен бірге пайдаланылатын сынақ әдісі;

г) осы стандартта анықталмаған немесе сынақ нәтижелеріне әсер етуі мүмкін кез келген соқтығыс бөлшектерімен бірге міндетті емес ретінде қарастырылатын барлық жұмыс бөлшектері;

д) сынақ нәтижелері немесе, егер қайталанғыштық тексерілген болса, онда бірнеше сынақ нәтижелері.

А қосымшасы
(міндетті)

Ферментативті әдісті орындауға арналған практикалық зертхана тәжірибесінің (ПЗТ) ережелері

А.1 Кіріспе

Ферментативті әдіске арналған практикалық зертханалық тәжірибе ережесі химиялық талдауға қарағанда шамалы белгілі.

Дәлдігі жеткілікті нәтижелер алу үшін ұсынылады.

А.2 Реактивтер

А.2.1 Белгіленген типтегі ферменттерді ғана пайдалану керек (меншікті белсенділік, концентрация, ферментті белсенді болатын ластану, еріткіш).

А.2.2 Белгіленген типтегі коферменттерді ғана пайдалану керек (тазалық дәрежесі, тұз немесе қышқылды форма, ластанулар).

А.2.3 Ферменттер мен коферменттерден басқа реактивтер талдамалық дәрежеде болуға тиіс.

А.2.4 Ферментті ерітіндіні дайындауға арналған су және басқа реактивтер екі рет тазартылған болуға тиіс.

А.2.5 Үлгілердің ерітіндісін дайындауға арналған су екі рет тазартылған немесе ионсызданған болуы керек.

А.2.6 Реактивтер мен ферментті жүзгін/ерітінділерді нұсқаулықтарға сәйкес сақтау керек (2 °С бастап 8 °С дейінгі температурада).

А.2.7 Ферментті қойыртпақтарды қатырмау керек.

А.2.8 Егер реактивтерді сақтау мерзімі өтіп кетсе, талдау кезінде анықталатын заттың ауыспалы мөлшері болатын стандартты ерітіндімен тексеріп, аталған реактивтердің қолданылуын тексеру немесе реактивтерді тастау қажет. Алынатын оптикалық тығыздықтар концентрацияларға қатынасы бойынша үйлесімді болуға тиіс.

А.2.9 Тоңазытқыштан алынатын араша ерітінділер сыналатын қоспа қосылғанша, бөлме температурасына дейін қыздырылуға тиіс.

А.3 Фотометрлік және спектрометрлік бөліктер

А.3.1 Оптикалық ұзындығы 1 см шыны немесе пластмасса бөліктерді пайдалану керек.

ЕСКЕРТПЕ Пластмасса бөліктердің шыны бөліктерден мынадай артықшылығы болуға тиіс:

- олар арзан болып табылады (қол жететін);
- талдаулардың көп саны қадағалануға тиіс;
- пластмасса бөліктер бір топтаманың ішінде оптикалық тығыздыққа қатысты өте жақсы үйлеседі.

А.3.2 Жаңа топтама пайдалануға енгізілетін кезде, бөлік жолдарының оптикалық тығыздығын төменде баяндалғандай, бақылау бөліктерімен салыстыра отырып тексеру қажет (мысалы, кварцты бөліктер).

Бақылау бөлігін және пластмасса бөліктерді сумен толтырып, әр бөліктің ауаға қарсы оптикалық тығыздығын (A_1) өлшеу керек. Бөліктерді НАДГ (шамамен 0,15 мг/ см^3) ерітіндісімен шайғаннан кейін толтырып, ауаға қарсы оптикалық тығыздығын (A_2) тағы өлшеу керек.

Бақылау бөліктері мен пластмасса бөліктер үшін $(A_2 - A_1)$ есептеу қажет. Бөліктердің екі түрі арасындағы айырма $(A_2 - A_1)$ қатты ерекшеленуге тиіс. Егер айырма $(A_2 - A_1)$ прецизиондық бөлік үшін оптикалық тығыздықты өлшеудің 0,5 %-ынан асатын болса, онда орташа айырманы пайыздық қатынаста есептеу керек және осыны есептеген кезде жол ұзындығы, l, үшін назарға алу керек (8.1 қарау керек).

А.3.3 Әрқашан таза әрі сызылмаған бөліктерді пайдалану қажет. Бөліктің оптикалық бетін жұмсақ матамен ғана құрғату немесе тазарту керек.

А.3.4 Бақылау сынағының өзінен оптикалық тығыздық шамасының реті туралы ақпарат алынбайтындықтан, бастапқы атқару бөлігі бойынша үлгінің сынау бөлігінің оптикалық тығыздығын өлшемеу керек. Үлгінің және ауаға қарсы бақылау сынағына арналған бөліктің оптикалық тығыздығын өлшеп, айырмасын есептеу керек.

А.3.5 Үлгінің және бос бөліктегі бақылау сынағына арналған бөліктің оптикалық тығыздығын өлшемеу керек (жарықтың сейілуінен).

А.3.6 Бөліктің ішіндегісін пластмасса қалақтармен араластыру керек немесе балауыз және жеңіл айналдырып бөлікті қымтау керек.

А.3.7 Қалақты пайдаланып, бөлік қабырғаларынан ауа көбіктерін кетіру керек. Бөліктің оптикалық бетінің сызылуына жол бермеу керек.

А.3.8 Таңдап сынау және бақылау сынағын өлшеу үшін, әрқашан белгіленген бөліктерді қолдану қажет.

А.3.9 Қашанда бөлікті белгілі бір орынға және бөлік ұстағыш бағытына орналастыру керек.

А.4 Фотометрлер мен спектрометрлер

А.4.1 Спектрометр (спектр ені 10 нм аз немесе тең), бөгеуілдерді басу үшін ұсынылатын сүзгі (спектр ені 10 нм аз немесе тең) немесе сынап шамымен жабдықталған спектральды сызықтағы фотометр пайдаланылады. Спектрометр немесе сүзгілі фотометр қолданылып орындалған өлшеулер НАДГ және НАДФ қабілетін сіңіретін максимум кезінде жүзеге асырылуға тиіс, яғни 340 нм кезінде; олар сынап шамымен жабдықталған спектральды сызықтағы фотометр қолданылып орындалуға және 365 нм немесе 334 нм кезінде жүзеге асырылуға тиіс.

ЕСКЕРТПЕ 334 нм, 340 нм және 365 нм кезінде анықталған НАДГ және НАДФ молярлық сіңіру коэффициенті мынадай болуы керек:

- 334 нм (Гг) кезіндегі НАДГ және НАДФ: $6{,}18 \times 10^6$ $см^2 / моль$;

- 340 нм кезіндегі НАДГ және НАДФ: $6{,}3 \times 10^6$ $см^2 / моль$;

- 365 нм (Гг) кезіндегі НАДФ: $3{,}5 \times 10^6$ $см^2 / моль$;

- 365 нм (Гг) кезіндегі НАДГ: $3{,}4 \times 10^6$ $см^2 / моль$.

А.4.2 2,0 оптикалық тығыздыққа дейінгі сызықтық қатынас НАДГ және НАДФ оптикалық тығыздығы мен концентрациясы арасында болуға тиіс. Мұны төменде берілген тармақтар бойынша тексеру қажет.

а) 2,0 $см^3$ тамшуырларды тазартылған сумен бөлікке қосу керек. Ауаға қарсы оптикалық тығыздықты A_0 өлшеу керек.

б) 0,10 $см^3$ тамшуырларды НАДГ (0,5 мг/ $см^3$) ерітіндісімен бірге бөлікке қосып араластырады. Оптикалық тығыздықты A_1 өлшейді.

Мынадай формуланы қолдана отырып (А.1), берілген оптикалық тығыздықты, A_{rn}, есептеу қажет:

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

мұндағы A_1 - НАДГ (б) ерітіндісімен анықтау арқылы алынатын оптикалық тығыздықтың сандық мәні;

A_0 - суды (а) анықтау арқылы алынатын оптикалық тығыздықтың сандық мәні.

в) процедураны б) тармағында 14 рет қайталау қажет.

Әрбір өлшеу жұбынан кейін, (А.2) формуласын қолдана отырып, берілген оптикалық тығыздықты, A_{rn}, есептеу керек:

$$A_{rn} = (A_n - A_0) \times \frac{V}{3{,}5}, \qquad (А.2)$$

мұндағы A_n - өлшеу n кезінде алынған оптикалық тығыздықтың сандық мәні;

V - өлшеу n кезіндегі бөлік құрамының көлемі.

г) Әрбір өлшеу үшін, берілген тиісті оптикалық тығыздықпен салыстырғанда ұсынылатын НАДГ ерітіндісі көлемінің жоспарын құру қажет. Түзу сызық алынған қиысу нүктелерін қосып алынуы керек.

А.5 Автоматты тамшуырлар және басқа тамшуыр-мөлшерлегіштер

А.5.1 Автоматты тамшуырлар мен басқа тамшуыр-мөлшерлегіштерді өндіруші нұсқаулығына сәйкес пайдалану керек.

А.5.2 Әр тамшуыр үшін тиісті ұштықтар пайдаланылуға тиіс.

А.5.3 Төменде берілген тармақтар бойынша автоматты тамшуырлар мен басқа тамшуыр-мөлшерлегіштердің көлемі мен қайталанғыштығы үшін кезеңдік ерекшеліктерді тексеру керек (мысалы, ай сайын):

а) уақыт t бойынша толтырылған зертханалық шыны стаканды таразыға тарту керек;

б) судың бір өлшемін стаканға бөліп, алғашқы таразыға тартқаннан кейін t + 1 минут бойы таразыға дәл тарту керек;

в) бөлу процедурасын б) тармағына сәйкес тоғыз рет қайталау қажет;

г) t + 11 минут, t + 12 минут, t + 13 минут, t + 14 минут және t + 15 минут сәтінде стаканды бөлмей таразыға тарту керек; осы өлшеулерден бір минутта буланудан болатын кемуді есептеу керек;

д) булану кезінде судың кемуін назарға ала отырып, тамшуыр немесе мөлшерлегіш тамшуырының көлемі мен қайталанғыштығын есептеу керек.

А.5.4 Кейбір автоматты тамшуырлар мәніне жалғастырып қолдану уақытындағы қолдың алақанынан болатын жылу алмасу әсер етуі мүмкін.

Осы құбылысты А.5.3 сипатталған процедурамен тексеріп, осындай тамшуырлардың қолданылуын болдырмау қажет.

А.5.5 Қолданар алдында тамшуыр ұштықтарын белгіленген ерітінді/жүзгінмен бірнеше рет шаю қажет. Әрбір ерітінді үшін тамшуырдың жаңа ұштығын қолдану қажет.

А.5.6 Ұштықты бөліктің түрлі бұрыштарына мүмкіндігінше төмен қоя отырып, сулы, араша, ферментті, коферментті ерітіндіні бөлу керек.

ЕСКЕРТПЕ: Ферментті ерітінді/жүзгіннің аздаған мөлшері (10 $см^3$ және 50 $см^3$) қалақпен бөліне, бөлікке жеткізіле және қалақшамен араластырыла алады.

А.5.7 Ластануды жою керек.

А.6 Қосымша ақпарат

А.6.1 Заттарды талдау кезінде анықталатын түрлі концентрациялар арқылы екі ерітіндінің оптикалық тығыздығын анықтаған кезде, ықтимал әсерлер мен өрескел қателерді тексеру керек.

А.6.2 Ферментативті реакцияларды тексеру үшін эталонды қолдану керек. Аталған эталон жұмыстық эталон ретінде қарастырылуға тиіс.

А.6.3 Үлгі ерітіндісі болған кезде, қалпына келтіру сынағын орындау керек. Затты талдау кезінде анықталатын қоспа мөлшері үлгінің ағымдағы ерітіндісіне жуық болуы керек.

Қалақшада қалатын сұйықтық мөлшері шамалы болып қарастырылуға тиіс.

Библиография

[1] Зертханааралық жалпы зерттеулер, екінші серия. Халықаралық сүт өндірушілер федерациясының бюллетені, 285, 1993, А қосымшасы, В қосымшасы және С қосымшасы.

ӘОЖ 637.143.2:663.674:637.358:637.345:547.455.623:006.354(574)
МСЖ 67.100

Түйінді сөздер: құрғақ сүт, балмұздақ, балқытылған сыр, сүт қантының құрамы, ферментативті әдіс, глюкоза, үлгінің жұмыстық бөлігі, реактивтер, аспаптар

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

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

СТ РК ИСО 5765-1-2009

ISO 5765-1:2002 Dried milk, dried ice-mixes and processed cheese – determination of galactose content – enzymatic method utilizing the glucose 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 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 5765-1:2002 Dried milk, dried ice-mixes and processed cheese – determination of galactose content – enzymatic method utilizing the glucose moiety of the lactose (ИСО 5765-1:2002 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 **2014 год**
ПЕРИОДИЧНОСТЬ ПРОВЕРКИ **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	9
9	Точность	10
10	Оформление результатов	11
Приложение А (обязательное). Правила практического лабораторного опыта (ПЛО) для выполнения ферментативного метода		12
Библиография		16

Введение

Настоящий стандарт описывает ферментативный метод для определения галактозы с использованием глюкозы в качестве составной части лактозы.

Определение выбора применения метода, описанного в настоящем стандарте или *СТ РК ИСО 5765-2,* 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 5765-2*. 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 5765-2*, 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 5765-2.

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 1
Ферментативный метод с использованием глюкозы в качестве составной части лактозы

Дата введения 2010-07-01

1 Область применения

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

2 Нормативные ссылки

Для применения настоящего стандарта необходимы следующие ссылочные нормативные документы:

СТ РК ИСО 5765-2-2009 Молоко сухое, сухие молочные смеси для мороженного и плавленый сыр. Определение содержания лактозы. Часть 2. Ферментативный метод с использованием галактозы 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 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.

ГОСТ 28498-90 Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытания.

Издание официальное

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.

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.

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 депротеинируется для получения чистого экстракта.

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

а) ß-галактозидаза, для расщепления лактозы на глюкозу и галактозу;

б) ß-галактозидаза дегидрогеназа в процентном соотношении никотинамид-аденин-динуклеотидфосфат ($НАД^+$), для катализирования окисления галактозы в галактоновую кислоту, $НАД^+$ сводится к НАДФГ.

3.3 Количество НАДФГ определяется из оптической плотности испытательного раствора при 340 нм.

3.4 Содержание лактозы, которое пропорционально количеству НАДФГ, вычисляется, если исправление делается для представления глюкозы в испытательном образце в начале проведения анализов.

4 Реактивы

4.1 Применять только реактивы аналитической степени чистоты. Вода, применяемая для приготовления ферментных растворов, должна быть дважды продистиллирована. Вода, применяемая для других целей, должна быть продистиллирована или должна быть равноценной степени чистоты.

Необходимо обратить внимание на срок годности реактивов, представленных производителем.

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

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

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

Растворить 3,6 г тригидрат гексацианоферрата(II) калия в воде. Развести с 100 $см^3$ воды и помешать.

4.3 Раствор гептагидрата сульфата цинка, $ZnSO_4$

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

4.4 Раствор гидроксида натрия, $c(NaOH) = 0,1$ моль/$дм^3$

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

4.5 Цитратный буферный раствор, pH 6,6 ± 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 ($MgSO \cdot 7H_2O_4$) в 40 $см^3$ воды.

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

Данный раствор может держаться 3 месяца, если его хранить в холодильнике при температуре от 0 °C до 5 °C.

4.6 Буферный раствор триэтаноламина (ТЭА), pH 7,6 ± 0,1

Разбавить 16,6 г дигидрофосфат калия в 80 $см^3$ воды. Установить pH до 8,6 ± 0,1 при температуре 20 °C с помощью раствора гидроксида натрия (1 моль/ $дм^3$). Разбавить в 100 $см^3$ воды и смешать.

4.7 Буферный раствор НАДФ$^+$/АТФ/ТЭА

---

* Испытательный комплект Борингера служит примером соответствующей продукции, доступной в больших количествах. Данная информация предусмотрена для удобства пользователей настоящего стандарта.

Разбавить 65 г двунатриевой соли никотинамидадениндинуклеотида [$C_{21}H_{27}N_7O_{17}P_3$, приблизительно 98 % анализа] в 5 $см^3$ буферного раствора цитрата (4.4).

Данный раствор может держаться 3 недели, если его хранить в холодильнике при температуре от 0 °С до 5°С.

4.8 Суспензия β-галактозидаза (из кишечной палочки), суспензия в 3,2 моль/$дм^3$ раствора сульфата аммония, pH приблизительно равен 6 ± 0,1.

Действие суспензии β-галактозидаза должна быть, по крайней мере, 60 единиц/$см^3$ (лактоза как субстрат при температуре 25 °С). Суспензия может держаться около 12 месяцев, если его хранить в холодильнике при температуре от 0 °С до 5 °С. При применении суспензии, сосуд, содержащий её, должен храниться в дробленом льду.

ПРИМЕЧАНИЕ Суспензия β-галактозидаза, которая содержит не более чем 0,001 % каждой из β-фруктозидазы, α-галактозидазы, дегидрогеназы глюкозы, α-галактозидазы и НАДГ-оксидазы, вычисляемых в показателях удельной активности β-галактозидазы, установлена подходящей.

4.9 Суспензия ß-галактозидаза дегидрогеназа (из синегнойной флуоресценции - Pseudomonas fluorescence), суспензия в 3,2 моль/$дм^3$ раствора сульфата аммония, pH приблизительно равен 6 ± 0,1.

Действие суспензии ß-галактозидаза дегидрогеназа должно быть, по крайней мере, 8 единиц измерения/$см^3$.

Суспензия может держаться, по меньшей мере, 6 месяцев, если хранить в холодильнике при температуре от 0 °С до 5 °С. Если применяется суспензия, сосуд, содержащий суспензию, должен храниться в дробленом льду.

ПРИМЕЧАНИЕ Суспензия ß-галактозидаза дегидрогеназа, которая содержит не более чем 0,01 % каждой из алкогольдегидрогеназы и ß-галактозидазы, не более чем 0,1 % НАДГ-оксидазы, и ферменты, взаимодействующие с глюкозой, и не более чем 0,5 % лактатадегидрогеназы установлены подходящими.

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

Перед применением высушить моногидрат лактозы в устойчивую массу в сушильном шкафу при температуре 87 °С.

Развести 400 мг сухой моногидрат лактозы в воде. Развести в 500 $см^3$ воды и помешать. Раствор можно держать 2 дня, если хранить его в холодильнике при температуре от 0 °С до 5 °С. Подогреть раствор до 20 °С сразу перед применением.

5 Приборы

5.1 Аналитические весы, со способностью взвешивания с точностью до ±1 мг с возможностью считывания до 0,1 мг по *ГОСТ 24104*.

5.2 Стеклянный лабораторный стакан, ёмкостью 50 $см^3$ и 250 $см^3$ по *ГОСТ 1770.*

5.3 Мерные пипетки обемом 5 $см^3$ и 10 $см^3$, градуированные на 0,1 деления.

5.4 Пипетки объемом 10 $см^3$, 5 $см^3$, 1 $см^3$ и 0,05 $см^3$.

5.5 Мерная колба с одной меткой, ёмкостью 100 $см^3$.

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

5.10 Стеклянный штапик, диаметром приблизительно 6 мм и длиной 150 мм, для вымачивания образца.

5.11 Водяная баня, способная поддерживать температуру от 20 °С до 25 °С, с держателем, применяемым для поддержки секции спектрометра (5.8) (дополнительно 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 плавленого сыра.

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

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

5.15 Часы.

5.16 Термометр по *ГОСТ 28498.*

6 Отбор образцов

Отбор образцов – по *ГОСТ 3622, ГОСТ 26809.*

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 Выполнить следующее испытание для проверки восстановления лактозы возможно, если применить одно или более нижеприведенных условий:

а) если применить новую партию буферного раствора $НАД^+$/буферного раствора цитрата (4.7), суспензию β-галактозидаза или суспензию ß-галактозидаза дегидрогеназа (4.9);

б) если буферный раствор $НАД^+$/буферный раствор цитрата (4.7) и/или суспензия β-галактозидаза (4.8) или если суспензия ß-галактозидаза дегидрогеназа (4.9) хранились в холодильнике более чем 2 недели, не употребляясь;

в) если возобновить аналитическую работу после периода аналитической бездейственности;

г) если обстоятельства оправдывают выполнение такого испытания.

7.1.2 Пипеткой 5,0 $см^3$ и 10,0 $см^3$ со стандартным раствором лактозы (4.10) поместить в две 100 $см^3$ мерные колбы (5.5). Добавить 50 $см^3$ воды в каждую колбу. Продолжать действия, как установлено в подпунктах 7.5 и 7.6.

7.1.3 Вычислить моногидрат лактозы содержания стандартного раствора лактозы (4.10) в соответствии с формулой 3 (см. 8.1), применяя следующие значения:

V_3 - значение стандартного раствора лактозы (4.10), V_3 = 500 $см^3$;

V_4 - значение стандартного раствора лактозы, применяемого (7.1.2), V_4 = 5 $см^3$ и 10 $см^3$;

V_5 - общее значение разбавленного стандартного раствора (7.1.2), V_5 = 100 $см^3$.

7.1.4 Принимая во внимание чистоту моногидрата лактозы, восстановление, полученное для обоих разбавлений, должно быть 100 % ± 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 Плавленый сыр

Снять корку, запачканный и заплесневелый слой сыра, чтобы гарантировать представительный испытательный образец сыра, который обычно потребляется. Перемолоть испытательный образец с использованием перемалывающего устройства (5.14). Помешать перетолченную массу и, если возможно, перемолоть его второй раз. Снова основательно помешать. Если

испытательный образец не может быть растолчен, то помешать его интенсивным взбалтыванием и перемешиванием.

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.

Поместить полученный испытательный образец в стеклянный лабораторный стакан объемом 250 $см^3$ (5.2). Добавить небольшое количество воды и получить полную суспензию микстуры с помощью смесительного аппарата (5.12).

7.3 Рабочая часть образца

Взвесить с точностью до ±1 мг, 1 г испытательного образца (7.2.1) или испытательного образца суспензии (7.2.2) в стеклянном лабораторном стакане (5.2). Развести или разбавить часть рабочего образца в 20 $см^3$ воды, предварительно подогретого при температуре от 40 °С до 50 °С, применяя соответствующим образом стеклянный штабик (5.10) или смесительный аппарат (5.12). Поместить содержимое стеклянного лабораторного стакана в 100 $см^3$ мерную колбу (5.5). Разбавить с 60 $см^3$ 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 (смотреть 8.1), должна быть в переделах от 0,1 до 0,4;
- если массовая доля лактозы в образце менее чем 0,2 %, то более чем 1 г рабочего образца может востребоваться. В таком случае, объем жирности, протеина и других веществ, установленных в 7.5.1, может иметь значительное влияние на объем раствора (смотреть V_3 в подпункте 8.1).

7.4 Контрольное испытание для реактивов

Выполнить контрольное испытание два раза. Далее необходимо продолжать, как установлено в подпунктах 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 (7.3) в мерную колбу объемом 100 $см^3$ с одной меткой:

- 5,0 $см^3$ раствора гексаноферрата(II) калия (4.2),
- 5,0 $см^3$ раствора гептагидрата сульфата цинка (4.3),

- 10,0 см^3 раствора гидроксида натрия, после тщательного помешивания после каждого добавления.

Разбавить со 100 см^3 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 Осуществить определение в соответствии с Таблицей 1, обеспечивая подачу НАДФ$^+$/буферного раствора циртата (4.5.), буферного раствора фосфата (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)	0,20 см^3	0,20 см^3	0,20 см^3	0,20 см^3
Суспензия β-галактозидаза (4.8)	0,05 см^3	-	0,05 см^3	-
Вода		0,05 см^3		0,05 см^3
Образец или стандартный фильтрат (7.5.2)	1,00 см^3	1,00 см^3	-	-
Контрольный фильтрат реактива	-	-	1,00 см^3	1,00 см^3
Смешать содержимое спектрометрических секций, применяя пластмассовые лопатки (5.9), и инкубировать в течение 15 минут при температуре 20 °С, применяя паровую баню (5.11) по требованию. Затем добавить в секции спектрометра с применением пипетки (5.4):				
Буферный раствор фосфата (4.6)	1,00 см^3	1,00 см^3	1,00 см^3	1,00 см^3
Вода	1,00 см^3	1,00 см^3	1,00 см^3	1,00 см^3
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 ß-галактозидаза дегидрогеназа (4.9)	0,05 см^3	0,05 см^3	0,05 см^3	0,05 см^3
Смешать содержимое спектрометрических секций и инкубировать 15 мин при температуре 20 °С, применяя паровую баню (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, А, в каждом содержащем элементе 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 HK/G6P-DH;

A_t - численное значение оптической плотности, измеренное после инкубации на период 15 минут.

7.6.2.2 Если реакция не прекращается после 15 минут, вычислить оптическую плотность, А, каждой содержащей секции при расчете (смотреть 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 HK/G6P-DH;

A_t - численное значение оптической плотности, измеренное после инкубации на период t минут.

$A_{(t-5)}$- 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 подпунктах 7.6.1 и 7.6.2, применяя соответствующее водное разбавление фильтрата (7.5.2).

8 Обработка результатов

8.1 Расчет

Содержание лактозы, w_L вычисляется 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 - массовая доля содержания лактозы, выраженная как процентное отношение по массе;

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

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

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

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

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 шм (т.е. $K = 6{,}3 \times 10^6$ см^2/моль);

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

V_1 - общий объем жидкости в секции спектрометра (7.6.1), см^3 (3,30 см^3);

V_2 - объем фильтрата (7.5.2) или его разбавления (7.6.3), прибавленного в секцию спектрометра, см^3 (1,00 см^3);

V_3 - объем раствора, приготовленного по пункту 7.5.1, см^3 (100 см^3);

V_4 - объем фильтрата (7.5.2), представленный для раствора (7.6.3), см^3;

V_5 - объем, в котором испытательный раствор разбавлен (7.6.3), см^3;

m - масса рабочей части образца (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:

$$V_3 = 100 - P,$$

где P – объем осадка, см^3.

P может вычисляться из приближенного состава испытательного образца с применением следующей формулы: P = 1,1 × (граммы жира) + 0,73 × (граммы протеина) + 0,65 × (граммы крахмала) + 0,55 (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 (см. [1]).

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*. Полученные значения не могут соответствовать с интервалом концентрации и матрицами за исключением тех представленных.

9.2 Повторяемость

Абсолютное различие между двумя независимыми единичными результатами испытания, полученными 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, полученными с использованием такого же метода на идентичном испытательном материале в разных лабораториях различными операторами на разных оборудованиях, 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

Протокол испытания должен содержать:

а) всю информацию, необходимую для окончательной идентификации образца;

б) применяемый метод отбора образцов, если известен;

в) применяемый метод испытания, ссылаемый на настоящий стандарт;

г) все операционные детали, не соответствующие настоящему стандарту, 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 того чтобы получить результаты 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.

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 (при температуре от 2 °С до 8 °С).

А.2.7 Не замораживать ферментные суспензии.

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

А.2.9 Буферные растворы, взятые из холодильника, должны быть подогреты до комнатной температуры 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 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 прецизионной секции, то необходимо вычислить среднюю разницу в процентном соотношении и принять это во внимание для протяженности пути, l, при расчете (смотреть 8.1).

А.3.3 Всегда использовать чистые и неисцарапанные секции. Сушить 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): $6{,}18\times10^{6}\ см^{2}/моль$;
- НАДГ и НАДФ при 340 нм: $6{,}3\times10^{6}\ см^{2}/моль$;
- НАДФ при 365 нм (Гг): $3{,}5\times10^{6}\ см^{2}/моль$;
- НАДГ при 365 нм (Гг): $3{,}4\times10^{6}\ см^{2}/моль$.

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^3 пипетки с дистиллированной водой добавить в секцию. Измерить оптическую плотность A_0 против воздуха.

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

Вычислить приведенную оптическую плотность, A_{rn}, применяя следующую формулу (А.1):

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

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 в пункте б).

После каждой пары измерения, вычислить приведенную оптическую плотность, A_{rn}, применяя формулу (А.2):

$$A_{rn} = (A_n - A_0)\times\frac{V}{3{,}5}, \qquad (А.2)$$

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 мин 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 растворы, вставляя наконечник как можно ниже в различные уголки секции.

ПРИМЕЧАНИЕ Малое количество ферментного раствора/суспензии (10 $см^3$ и 50 $см^3$) 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.

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] 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, глюкоза, рабочая часть образца, реактивы, приборы

Басуға _____ж. қол қойылды Пішімі 60х84 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

gost.e-ecolog.ru