ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

СТБ ISO 5765-1-2011

МОЛОКО СУХОЕ, СМЕСИ ДЛЯ МОРОЖЕНОГО СУХИЕ И СЫР ПЛАВЛЕНЫЙ

Определение содержания лактозы

Часть 1

Ферментный метод с использованием глюкозы в качестве составной части лактозы

МАЛАКО СУХОЕ, СУМЕСІ ДЛЯ МАРОЖАНАГА СУХІЯ І СЫР ПЛАЎЛЕНЫ

Вызначэнне змяшчэння лактозы

Частка 1

Ферментны метад з выкарыстаннем глюкозы ў якасці састаўной часткі лактозы

(ISO 5765-1:2002, IDT)

Издание официальное

БЗ 8-2010



Госстандарт
Минск

gost.e-ecolog.ru

УДК 637.143.047:577.15(083.74)(476) МКС **67.100.10**; 67.100.30; **67.100.40** КП 03 IDT

Ключевые слова: определение содержания лактозы, глюкоза, молоко сухое, сыр плавленый, сухие смеси для мороженого, ферментный метод

ОКП РБ 15.51.20; 15.51.40

Предисловие

Цели, основные принципы, положения по государственному регулированию и управлению в области технического нормирования и стандартизации установлены Законом Республики Беларусь «О техническом нормировании и стандартизации».

1 ПОДГОТОВЛЕН научно-производственным республиканским дочерним унитарным предприятием «Институт мясо-молочной промышленности» Республиканского унитарного предприятия «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по продовольствию» (РУП «Институт мясо-молочной промышленности»)

ВНЕСЕН Госстандартом Республики Беларусь

2 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ постановлением Госстандарта Республики Беларусь от 10 июня 2011 г. № 30

3 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 5765-1:2002 (E) Dried milk, dried ice-mixes and processed cheese – Determination of lactos (Молоко сухое, смеси для мороженого сухие и сыр плавленый. Определение содержания лактозы. Часть 1. Ферментный метод с использованием глюкозы в качестве составной части лактозы).

Международный стандарт разработан техническим комитетом по стандартизации ISO/TC 34 по пищевым продуктам, подкомитетом SC 5 по молоку и молочным продуктам и Международной молочной федерацией (IDF) в сотрудничестве с Ассоциацией аналитических сообществ (AOAC International).

Перевод с английского языка (en).

Официальные экземпляры международного стандарта, на основе которого подготовлен настоящий государственный стандарт, и международных стандартов, на которые даны ссылки, имеются в Национальном фонде ТНПА.

В тексте стандарта ссылки на международные стандарты актуализированы.

Степень соответствия – идентичная (IDT)

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

© Госстандарт, 2011

Настоящий стандарт не может быть воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Госстандарта Республики Беларусь

Издан на русском языке

Содержание

Введение IV
1 Область применения 1
2 Термины и определения 1
3 Принцип 1
4 Реактивы 2
5 Оборудование 3
6 Отбор проб 3
7 Исследования 4
8 Расчет и выражение результатов 6
9 Прецизионность 7
10 Протокол испытаний 7
Приложение А (обязательное) Правила надлежащей лабораторной практики (НЛП) для проведения ферментного анализа 8
Библиография 11

Введение

В настоящем стандарте описан ферментный метод определения лактозы с использованием глюкозы в качестве составной части лактозы. Настоящий стандарт является дополнением к ISO 5765-2, который рассматривает галактозу как составную часть лактозы.

Выбор между методами, описанными в ISO 5765-1 и ISO 5765-2, зависит от содержания глюкозы или галактозы в исследуемой пробе. Если содержание глюкозы в исследуемой пробе значительно выше, чем содержание лактозы, рекомендуют использовать метод, описанный в ISO 5765-2. Для исследуемой пробы со значительно более высоким содержанием галактозы, чем лактозы, рекомендуется использовать метод, описанный в настоящем стандарте.

Для исследуемой пробы с низким содержанием и глюкозы, и галактозы без предпочтения может использоваться любой метод. Для исследуемой пробы с высоким содержанием и глюкозы, и галактозы для обоих методов точность определения лактозы значительно ниже.

В молоке и молочных продуктах, подвергнутых тепловой обработке, часть лактозы может перейти в лактулозу. Лактулоза не определяется методом, описанным в настоящем стандарте. Однако при использовании метода ISO 5765-2 содержание лактулозы будет частично определено как содержание лактозы. Кроме того, в молоке, подвергнутом интенсивной тепловой обработке (например, стерилизованное молоко), или молочных продуктах часть лактозы может оказаться связанной с белком в результате реакции Майяра. В таких случаях связанная лактоза не может быть определена ни одним из методов, описанных в ISO 5765-1 и ISO 5765-2.

Только при строгом соблюдении правил надлежащей лабораторной практики (НЛП) для ферментного анализа могут быть получены достоверные результаты. Правила НЛП указаны в приложении А.

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

МОЛОКО СУХОЕ, СМЕСИ ДЛЯ МОРОЖЕНОГО СУХИЕ И СЫР ПЛАВЛЕНЫЙ
Определение содержания лактозы
Часть 1
Ферментный метод с использованием глюкозы в качестве составной части лактозы

МАЛАКО СУХОЕ, СУМЕСІ ДЛЯ МАРОЖАНАГА СУХІЯ І СЫР ПЛАЎЛЕНЫ
Вызначэнне змяшчэння лактозы
Частка 1
Ферментны метад з выкарыстаннем глюкозы ў якасці састаўной часткі лактозы

Dry milk, dry mixes for ice cream and cheese
Determination of lactose content
Part 1
Enzymatic method utilizinq the qlucose moiety of the lactose

Дата введения 2012-01-01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает ферментный метод определения содержания лактозы во всех видах сухого молока, в сухих смесях для мороженого в присутствии других углеводов и восстанавливающих веществ, а также в сыре плавленом.

2 Термины и определения

В настоящем стандарте применяют следующий термин с соответствующим определением:

2.1 содержание лактозы (Lactose content): Массовая доля веществ, определенных в соответствии с методом, установленным настоящим стандартом.

Примечание – Содержание лактозы выражают в процентах от массы.

3 Принцип

3.1 Раствор или суспензию исследуемой пробы высвобождают от белка для получения чистого экстракта.

3.2 Очищенный экстракт исследуемой пробы вступает в реакцию со следующими ферментами и биохимическими реактивами:

a) β-галактозидазой – для расщепления лактозы на глюкозу и галактозу;

b) гексокиназой и аденозинтрифосфорной кислотой (АТФ) – для фосфорилирования глюкозы (как в исходной пробе, так и в пробе, подверженной воздействию β-галактозидазы) до глюкозы-6-фосфата (Г6Ф);

c) глюкоза-6-фосфат дегидрогеназой (Г6Ф-ДГ) при наличии никотинамидадениндинуклеотидфосфата ($НАДФ^+$) – с целью катализации окисления Г6Ф до 6-фосфоглюконата, восстановления $НАДФ^+$ до НАДФН.

3.3 Количество НАДФН определяют посредством поглощения исследуемого раствора при длине волны 340 нм.

3.4 Вычисляют содержание лактозы, которое пропорционально количеству НАДФН, при условии, что в начале анализа сделана поправка на присутствие глюкозы в начальной исследуемой пробе.

Издание официальное

4 Реактивы

При проведении анализа используют реактивы признанного аналитического качества, если иное не указано. Вода, используемая для приготовления ферментных растворов, должна иметь степень очистки, обеспечиваемую двойной дистилляцией. Вода, используемая для других целей, должна быть дистиллированной или должна иметь эквивалентную степень очистки.

Необходимо обращать внимание на дату изготовления и срок годности реактивов, указанные изготовителем.

Если используется ферментная суспензия с активностью, отличной от указанной, то объем суспензии, приведенный в (7.6.1), должен быть пропорционально увеличен или уменьшен.

Примечание – Реактивы, описанные в 4.3 и 4.5 – 4.7 включительно, можно приобрести на рынке в виде наборов для анализа, например тест-набор, изготовленный фирмой Boehringer test kit [1)].

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

3,6 г гексацианоферрата (II) калия тригидрата растворяют в воде. Доводят объем водой до 100 мл и перемешивают.

4.2 Раствор сульфата цинка, $ZnSO_4$

7,2 г гептагидрата сульфата цинка растворяют в воде. Доводят объем водой до 100 мл и перемешивают.

4.3 Раствор гидроокиси натрия, *c* (NaOH) = 0,1 моль/л

4,0 г гидроокиси натрия растворяют в воде. Доводят объем водой до 1 000 мл и перемешивают.

4.4 Цитратный буферный раствор, pH (6,6 ± 0,1)

2,8 г тринатриевого цитрата дигидрата ($C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$), 0,042 г моногидрата лимонной кислоты ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) и 0,625 г сульфата магния гептагидрата ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) растворяют в 40 мл воды.

Доводят pH раствора до (6,6 ± 0,1) при температуре 20 °C серной кислотой (2 моль/л) или раствором гидроокиси натрия (0,1 моль/л). Объем раствора доводят водой до 50 мл и перемешивают.

Раствор можно хранить в холодильнике при температуре от 0 °C до плюс 5 °C в течение 3 мес.

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

14,0 г триэтаноламина гидрохлорида ($C_6H_{15}NO_3 \cdot HCl$) и 0,25 г сульфата магния гептагидрата ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) растворяют в 80 мл воды. Доводят pH раствора до (7,6 ± 0,1) при температуре 20 °C 5 мл раствора гидроокиси натрия (5 моль/л). Объем раствора доводят до 100 мл и перемешивают.

Раствор можно хранить в холодильнике при температуре от 0 °C до плюс 5 °C в течение 8 нед.

4.6 Буферный раствор НАДФ$^+$/АТФ/ ТЭА

65 мг соли – никотинамидадениндинуклеотидфосфата натрия двузамещенного [$C_{21}H_{26}N_7O_{17}P_3Na_2$ (чистотой от 98 % до 99 %)] и 170 мг соли аденозин 5'-трифосфата натрия двузамещенного [$C_{10}H_{14}N_5O_{13}P_3Na_2$ (чистотой от 99 % до 100 %)] растворяют в 30 мл буферного раствора триэтаноламина (4.5).

Раствор можно хранить в холодильнике при температуре от 0 °C до плюс 5 °C в течение 2 нед.

4.7 Суспензия β-галактозидазы (*из Escherichia coli*) – суспензия в растворе сульфата аммония 3,2 моль/л, pH примерно равно 6.

Активность суспензии β-галактозидазы (EC 3.2.1.23) [5] должна быть не менее 60 единиц/мл (субстрат – лактоза при температуре 25 °C). Суспензию можно хранить в холодильнике при температуре от 0 °C до плюс 5 °C в течение 12 мес. Во время использования колба с суспензией должна быть погружена в колотый лед.

Примечание – Установлено, что суспензия β-галактозидазы, которая содержит не более 0,001 % β-фруктозидазы, α-галактозидазы, дегидрогеназы глюкозы, α-глюкозидазы и НАДФ-оксидазы, рассчитанная исходя из удельной активности β-галактозидазы, считается пригодной для использования.

[1)] Набор для анализа Boehringer test kit является примером коммерчески доступного продукта. Данная информация приводится для удобства пользователей настоящего стандарта и не означает поддержку этого продукта со стороны ISO или IDF.

4.8 Суспензия ГК/Г6Ф-ДГ (*из дрожжей*) – суспензия в растворе сульфата аммония 3,2 моль/л, pH примерно равно 6.

Активность суспензии гексакиназы (ЕС 2.7.1.1) [5] должна составлять не менее 280 единиц/мл при температуре 25 °С. Активность суспензии глюкозы-6-фосфат дегидрогеназы (ЕС 1.1.1.49) [5] должна быть не менее 140 единиц/мл при температуре 25 °С.

Суспензию можно хранить в течение 1 года в холодильнике при температуре от 0 °С до плюс 5 °С. Во время использования колба с суспензией должна быть погружена в колотый лед.

Примечание – Установлено, что суспензия ГК/Г6Ф-ДГ, которая содержит не более 0,01 % 6-фосфоглюконат дегидрогеназы и фосфоглюкомутазы, не более 0,002 % фосфоглюкоизомеразы и не более 0,02 % глутатион редуктазы, рассчитанная исходя из удельной активности ГК/Г6Ф-ДГ, считается пригодной для использования.

4.9 Стандартный раствор лактозы, *c* ($C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$) = 0,8 мг/мл.

Перед использованием моногидрат лактозы высушивают до постоянной массы в сушильном шкафу (5.13) при температуре 87 °С.

Растворяют 400 мг сухого моногидрата лактозы в воде. Доводят водой до 500 мл и перемешивают. Раствор можно хранить в холодильнике при температуре от 0 °С до плюс 5 °С в течение 2 дн. Непосредственно перед использованием раствор нагревают до температуры 20 °С.

5 Оборудование

Используют стандартное лабораторное оборудование и дополнительно следующее:

5.1 Аналитические весы с пределом взвешивания до 1 мг и ценой деления 0,1 мг.

5.2 Стеклянные химические стаканы номинальной вместимостью 50 и 250 мл.

5.3 Градуированные пипетки номинальной вместимостью 5 и 10 мл, с ценой деления 0,1 мл.

5.4 Пипетки номинальной вместимостью 10; 5; 1; 0,2 и 0,05 мл.

5.5 Мерные колбы с одной отметкой, номинальной вместимостью 100 мл.

5.6 Фильтровальная бумага средней плотности, диаметром 15 см.

5.7 Фильтровальные воронки диаметром 7 см.

5.8 Спектрометр, позволяющий производить измерения при длине волны 340 нм, оснащенный кюветами с длиной оптического пути 1 см.

5.9 Пластмассовые лопатки, пригодные для перемешивания смеси пробы/фермента в кюветах спектрометра.

5.10 Стеклянные палочки диаметром 6 мм и длиной 150 мм для смешивания пробы.

5.11 Водяная баня, в которой можно поддерживать температуру от 20 °С до 25 °С, со штативом для размещения кювет спектрометра (5.8) (при необходимости см. 7.6).

Примечание – Выдерживать кюветы на водяной бане необходимо, только если температура в помещении ниже плюс 20 °С.

5.12 Лабораторный блендер для приготовления суспензий исследуемых проб плавленого сыра (например, Ultra Turrax [2]).

5.13 Сушильный шкаф с термостатическим управлением, в котором можно поддерживать температуру (87 ± 2) °С.

5.14 Устройство для измельчения или натирания сыра, легко поддающееся очистке.

6 Отбор проб

Отбор проб не является частью метода, описанного настоящим стандартом. Рекомендуемый метод отбора проб приведен в ISO 707.

Важно, чтобы полученная лабораторией проба была полностью достоверна, чтобы она не претерпела повреждений или изменений в процессе транспортирования или хранения.

[2] Ultra Turrax – это один из примеров приемлемого, коммерчески доступного продукта. Данная информация приводится для удобства пользователей настоящим стандартом и не означает поддержку этого продукта со стороны ISO или IDF.

7 Исследования

7.1 Тест для проверки метода

7.1.1 Следующий тест для проверки восстановления лактозы выполняют в случае, когда имеется хотя бы одно из следующих условий:

a) при использовании новой партии буферного раствора НАДФ$^+$/АТФ/ТЭА (4.6), новой партии суспензии β-галактозидазы (4.7) или новой партии суспензии ГК/Г6Ф-ДГ (4.8);

b) если буферный раствор НАДФ$^+$/АТФ/ТЭА (4.6), и/или суспензию β-галактозидазы (4.7), и/или суспензию ГК/Г6Ф-ДГ(4.8) хранили в холодильнике более 2 нед до использования;

c) если был перерыв в проведении анализов;

d) если проведение теста требуют обстоятельства.

7.1.2 При помощи пипетки в две мерные колбы номинальной вместимостью 100 мл (5.5) вносят стандартный раствор лактозы (4.9): в одну колбу – 5,0 мл, в другую колбу – 10,0 мл. В каждую колбу добавляют примерно по 50 мл воды. Далее действуют согласно 7.5 и 7.6.

7.1.3 Вычисляют содержание моногидрата лактозы в стандартном растворе лактозы (4.9) согласно формуле (3) (см. 8.1), используя следующие значения:

V_3 – объем стандартного раствора лактозы (4.9), V_3 = 500 мл;

V_4 – объем использованного стандартного раствора лактозы (7.1.2), V_4 = 5 мл и 10 мл соответственно;

V_5 – общий объем разведенного стандартного раствора лактозы (7.1.2), V_5 = 100 мл.

7.1.4 Принимая во внимание чистоту моногидрата лактозы, восстановление для обоих разведений (7.1.2) должно находиться в диапазоне (100 ± 2) %.

Если восстановление не соответствует указанному диапазону, необходимо проверить реактивы, технику выполнения анализа, точность пипеток и состояние настройки спектрометра. Принимают все необходимые меры для получения соответствующих результатов. Тест для проверки метода повторяют до тех пор, пока не будут получены удовлетворительные результаты.

7.2 Подготовка исследуемой пробы

7.2.1 Сухое молоко и сухие смеси для мороженого

Исследуемую пробу помещают в контейнер с герметично закрывающейся крышкой, вместимость которого в два раза больше объема пробы. Контейнер немедленно закрывают. Пробу тщательно перемешивают, многократно встряхивая и переворачивая контейнер.

7.2.2 Плавленый сыр

Удаляют затвердевший, загрязненный или заплесневелый слой сыра, чтобы получить достоверную исследуемую пробу сыра в том виде, в котором его обычно употребляют в пищу. Исследуемую пробу измельчают или натирают при помощи соответствующего устройства для измельчения или натирания (5.14). Быстро перемешивают измельченную или натертую массу и, если это возможно, измельчают или протирают повторно. Снова тщательно перемешивают. Если исследуемую пробу нельзя измельчить или натереть, ее тщательно перемешивают интенсивным встряхиванием и размешиванием.

Если задержка неизбежна, исследуемую пробу до начала проведения анализа переносят в контейнер с герметичной крышкой, вместимость которого вдвое превышает объем пробы. Контейнер немедленно закрывают. Принимаются все необходимые меры предосторожности для обеспечения надлежащей сохранности исследуемой пробы и для предотвращения конденсации влаги на внутренней поверхности контейнера.

После измельчения, натирания или встряхивания и размешивания или после вынужденной задержки полученную исследуемую пробу быстро переносят в химический стакан вместимостью 250 мл (5.2). Добавляют такой же объем воды и при помощи лабораторного блендера (5.12) тщательно эмульгируют смесь.

7.3 Исследуемая проба

В химическом стакане (5.2) взвешивают 1 г или большее количество (см. ниже) исследуемой пробы (7.2.1) или суспензии исследуемой пробы (7.2.2) с точностью до 1 мг. Исследуемую пробу при помощи стеклянной палочки (5.10) или лабораторного блендера (5.12) смешивают с 20 мл воды, предварительно нагретой до температуры от 40 °С до 50 °С. Содержимое химического стакана переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл (5.5). Доводят водой примерно до 60 мл и перемешивают.

При определении массы исследуемой пробы учитывают следующие факты:

– исследуемая проба должна быть достоверна относительно всего исследуемого продукта;

– рекомендуется, чтобы содержание лактозы в кювете спектрометра было в пределах от 5 до 100 мкг;

– значение поглощения A_2 раствора в кювете спектрометра для глюкозы в исследуемой пробе (см. 8.1) должно находиться в пределах от 0,1 до 0,4;

– если содержание лактозы в пробе меньше 0,2 %, будет необходима исследуемая проба массой более чем 1 г. В таком случае объем жира, белка и других веществ, осажденных согласно 7.5.1, может оказывать значительное влияние на объем раствора (см. V_3 в 8.1).

7.4 Контрольное испытание реактива

Контрольное испытание проводят дважды. Действуют в соответствии с 7.5 и 7.6, используя все реактивы без исследуемой пробы.

7.5 Удаление белка

7.5.1 В мерную колбу вместимостью 100 мл с исследуемым раствором или исследуемой суспензией (7.3) добавляют в следующей последовательности:

– 5,0 мл раствора гексацианоферрата (II) калия (4.1);

– 5,0 мл раствора сульфата цинка (4.2); и

– 10,0 мл раствора гидроокиси натрия (4.3).

Все тщательно перемешивают после каждого внесения реактива. Доводят объем водой до метки 100 мл и тщательно перемешивают. Полученной смеси дают отстояться в течение 30 мин.

Содержимое колбы не перемешивают до начала фильтрования.

7.5.2 Отстоявшуюся жидкость фильтруют через фильтровальную бумагу (5.6), первую фракцию фильтрата сливают и не используют.

7.6 Определение

7.6.1 Схема процедуры

Определение выполняют, руководствуясь схемой, приведенной в таблице 1, следя за тем, чтобы буферный раствор цитрата (4.4), буферный раствор НАДФ$^+$/АТФ/ТЭА (4.6) и вода были доведены до комнатной температуры (от 20 °С до 25 °С) непосредственно перед использованием.

Таблица 1 – Схема определения

	Исследуемая проба или стандартный тест для		Контрольное испытание реактивов с	
	лактозы и глюкозы	глюкозы	лактозою и глюкозою	глюкозою
Вносят с помощью пипетки в кюветы спектрометра, мл:				
– цитратный буферный раствор (4.4)	0,20	0,20	0,20	0,20
– суспензию β-галактозидазы (4.7)	0,05	–	0,05	–
– воду	–	0,05	–	0,05
– пробу или стандартный фильтрат (7.5.2)	1,00	1,00	–	–
– контрольный фильтрат реактива (7.5.2)	–	–	1,00	1,00
Перемешивают содержимое кювет спектрометра с помощью пластмассовых лопаток (5.9) и выдерживают в течение 15 мин при температуре выше 20 °С, используя водяную баню при необходимости (5.11). После этого в кюветы спектрометра с помощью пипетки (5.4) добавляют следующие реактивы, мл:				
– буферный раствор НАДФ$^+$/АТФ/ ТЭА (4.6)	1,00	1,00	1,00	1,00
– воду	1,00	1,00	1,00	1,00
Перемешивают содержимое кювет спектрометра; через 2 мин после перемешивания измеряют поглощение A_0 раствора в каждой кювете относительно воздуха при длине волны 340 нм. Затем с помощью пипетки (5.4) в кюветы спектрометра добавляют следующие реактивы, мл:				
– суспензию ГК/Г6Ф-ДГ (4.8)	0,05	0,05	0,05	0,05
Перемешивают содержимое кювет спектрометра и выдерживают в течение 15 мин при температуре выше температуры 20 °С, используя водяную баню при необходимости (5.11). Измеряют поглощение A_{15} раствора в каждой кювете относительно воздуха. По истечении еще 5 мин снова измеряют поглощение каждого из растворов. Если реакция не прекратилась, продолжают измерять значения поглощения каждого из растворов через каждые 5 мин, пока поглощение не останется постоянным.				

7.6.2 Расчет поглощения

7.6.2.1 Если после выдерживания в течение 15 мин не произошло увеличение численного значения поглощения, рассчитывают поглощение A для растворов в каждой кювете, по которым ведется расчет (см. 8.1) при помощи следующей формулы:

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

где A_0 – численное значение поглощения, измеренное до внесения суспензии ГК/Г6Ф-ДГ;
A_t – численное значение поглощения, измеренное после выдерживания в течение 15 мин.

7.6.2.2 Если после выдерживания в течение 15 мин реакция не прекратилась, рассчитывают поглощение A для растворов в каждой кювете, по которым ведется расчет (см. 8.1) при помощи следующей формулы:

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

где A_0 – численное значение поглощения, измеренное до внесения суспензии ГК/Г6Ф-ДГ;
A_t – численное значение поглощения, измеренное после выдерживания в течение t мин;
$A_{(t-5)}$ – численное значение поглощения, измеренное после выдерживания в течение $t - 5$ мин.

7.6.3 Проверка

Если численное значение поглощения A превышает 0,500, процедуру повторяют в соответствии с 7.6.1 и 7.6.2, разбавив фильтрат (7.5.2) водой.

8 Расчет и выражение результатов

8.1 Расчет

Содержание лактозы W_L рассчитывают по формуле

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

где W_L – массовая доля лактозы, %;
A_1 – численное значение поглощения (рассчитанное согласно 7.6.2) пробы или стандартного испытания для лактозы и глюкозы;
A_2 – численное значение поглощения (рассчитанное согласно 7.6.2) пробы или стандартного испытания для глюкозы;
A_3 – численное значение поглощения (рассчитанное согласно 7.6.2) контрольного испытания реактива с лактозою и глюкозою;
A_4 – численное значение поглощения (рассчитанное согласно 7.6.2) контрольного испытания реактива с глюкозою;
M_r – относительная молекулярная масса лактозы:
– для безводной лактозы M_r = 342,30;
– для моногидрата лактозы M_r = 360,31;
K – молярный коэффициент поглощения НАДФН при длине волны 340 нм (т. е. $K = 6{,}3 \times 10^6$ см^2/моль);
l – численное значение теоретической длины оптического пути кюветы спектрометра (1 см), см;
V_1 – общий объем жидкости в кювете спектрометра согласно 7.6.1 (3,30 мл), мл;
V_2 – объем фильтрата (7.5.2) или его разведения (7.6.3), добавленного в кювету спектрометра (1,0 мл), мл;
V_3 – объем раствора, приготовленного согласно 7.5.1 (100 мл), мл;
V_4 – объем фильтрата соответствующий (7.5.2), взятого для разбавления (7.6.3) при необходимости, мл;
V_5 – объем, до которого был разведен контрольный раствор (7.6.3) при необходимости, мл;
m – масса исследуемой пробы (7.3), г.

Если значение $A_2 - A_4$ получилось отрицательным, его учитывают.

Примечание – Если масса исследуемой пробы больше 1 г, V_3 можно рассчитать по формуле

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

где P – объем осадка, мл. P может быть вычислен из приблизительного состава исследуемой пробы при помощи следующей формулы:

$$P = 1{,}1 \times (\text{жир, г}) + 0{,}73 \times (\text{белок, г}) + 0{,}65 \times (\text{крахмал, г}) + 0{,}55 \times (\text{нерастворимая зола, г}).$$

8.2 Выражение результатов

Результаты округляют с точностью до третьего знака после запятой.

9 Прецизионность

9.1 Межлабораторное испытание

Информация о межлабораторном испытании для определения точности метода опубликована в [6].

Значения пределов повторяемости и воспроизводимости, полученные в результате межлабораторного испытания, определяют в соответствии с [3]. Полученные значения не могут быть применены к другим диапазонам концентраций и веществ, кроме приведенных в настоящем стандарте.

Примечание – В [4] содержится конкретное руководство для проведения межлабораторных испытаний по методам анализа молочных продуктов, который основан на основе ISO 5725.

9.2 Повторяемость

Абсолютное расхождение между результатами двух независимых испытаний, полученных в результате использования одного и того же метода на идентичной исследуемой пробе в одной и той же лаборатории одним и тем же лаборантом, используя одно и то же оборудование, в течение короткого промежутка времени, будет не более чем в 5 % случаях превышать:

– 3 % среднеарифметического значения результатов исследований – для сухого молока и сухих смесей для мороженого;

– 6 % среднеарифметического значения результатов исследований – для плавленого сыра.

9.3 Воспроизводимость

Абсолютное расхождение между результатами двух независимых испытаний, полученных в результате использования одного метода на идентичной исследуемой пробе в разных лабораториях разными лаборантами на различном оборудовании, будет не более чем в 5 % случаях превышать:

– 6 % среднеарифметического значения результатов исследований – для сухого молока и сухих смесей для мороженого;

– 14 % среднеарифметического значения результатов исследований – для плавленого сыра.

10 Протокол испытаний

Протокол испытаний должен содержать:

a) всю информацию, необходимую для полной идентификации пробы;

b) метод отбора проб, который использовали, если он известен;

c) используемый метод испытания вместе со ссылкой на настоящий стандарт;

d) все подробности проведения испытания, не указанные в настоящем стандарте или указанные как необязательные, вместе со сведениями обо всех случаях, которые могли повлиять на результат (ы) испытания;

e) полученный (ые) результат (ы) испытания или, если была проверена повторяемость, полученный окончательный результат.

Приложение А
(обязательное)

Правила надлежащей лабораторной практики (НЛП) для проведения ферментного анализа

А.1 Введение

Правила надлежащей лабораторной практики (НЛП) для проведения ферментного анализа часто менее известны, чем правила относительно других химических анализов.

Рекомендуется обращать большее внимание на эти правила, чтобы получать результаты с удовлетворительной прецизионностью и повторяемостью.

Таким образом, перед началом испытания необходимо внимательно ознакомиться с правилами НЛП, приведенными ниже.

А.2 Реактивы

А.2.1 Используют только ферменты с указанными характеристиками (определенная активность, концентрация, контаминанты ферментной активности, растворители).

А.2.2 Используют только коферменты с указанными характеристиками (степень чистоты, в форме соли или кислоты, контаминанты).

А.2.3 Все реактивы, кроме ферментов и коферментов, должны быть химически чистыми.

А.2.4 Вода, используемая для приготовления растворов ферментов, должна пройти двойное дистиллирование.

А.2.5 Вода для приготовления исследуемой пробы и других реактивов должна пройти двойное дистиллирование или быть деионизированной.

А.2.6 Реактивы и суспензии/растворы ферментов хранят согласно инструкции (обычно при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С).

А.2.7 Суспензии ферментов не замораживают.

А.2.8 Если истек срок годности реактива, его утилизируют или проверяют эффективность этого реактива, испытывая стандартными растворами с различным количеством анализируемого вещества. Полученные значения поглощения должны быть пропорциональны концентрациям.

А.2.9 Буферные растворы, хранящиеся в холодильнике, необходимо нагреть до комнатной температуры прежде, чем добавить к исследуемой смеси.

А.3 Фотометрические и спектрометрические кюветы

А.3.1 Используют стеклянные или пластмассовые кюветы с длиной оптического пути, равной 1 см.

Примечание – Пластмассовые кюветы имеют следующие преимущества перед стеклянными кюветами:
– они дешевые (доступнее);
– можно выполнить большее количество испытаний;
– в пределах одной партии пластмассовые кюветы имеют схожие показатели поглощения.

А.3.2 Каждый раз при использовании новой партии кювет перепроверяют длину оптического пути относительно прецизионной кюветы (например, кварцевой кюветы) следующим образом.

Прецизионную и пластмассовые кюветы наполняют водой и измеряют поглощение A_1 каждой кюветы относительно воздуха. После промывания кюветы наполняют раствором НАДН (примерно 0,15 мг/мл) и снова измеряют поглощение A_2 относительно воздуха.

Вычисляют $A_2 - A_1$ для прецизионной кюветы и для пластмассовой кюветы. Значения разницы $A_2 - A_1$ у двух типов кювет не должны значительно отличаться. Если значения разницы $A_2 - A_1$ превышают 0,5 % от измеренного чистого поглощения для прецизионной кюветы, вычисляют среднюю разницу в процентах, которую затем учитывают при расчете длины оптического пути, l (см. 8.1).

А.3.3 Всегда используют только чистые и без царапин кюветы. Оптические боковые поверхности кювет вытирают или чистят только с использованием мягкой ткани.

А.3.4 Не измеряют поглощение кюветы с исследуемой пробой относительно кюветы с контрольной пробой, так как в этом случае не будет получено никакой информации о порядке значения поглощения непосредственно контрольного испытания. Измеряют поглощения как кюветы с исследуемой пробой, так и кюветы с контрольной пробой относительно воздуха и вычисляют величину разницы.

А.3.5 Не измеряют поглощение кюветы с пробой или кюветы с контрольной пробой относительно пустой кюветы (из-за рассеивания света).

А.3.6 Содержимое кювет перемешивают с помощью пластмассовой лопатки или запечатывают кюветы парафином и слегка взбалтывают.

А.3.7 Пузырьки со стенок кювет удаляют лопаткой. Избегают царапин на оптической боковой поверхности кювет.

А.3.8 Всегда используют один тип кювет для проведения испытания исследуемой пробы и контрольного анализа.

А.3.9 Кюветы всегда устанавливают в одном положении и в одном направлении в держателе кювет. Для этого помечают одну из оптических боковых поверхностей кюветы.

А.4 Фотометры и спектрометры

А.4.1 Используют спектрометр (рабочий диапазон ≤ 10 нм), оснащенный интерференционным фильтром (полоса пропускания ≤ 10 нм), или фотометр спектральной линии, оснащенный ртутной лампой. Измерения, выполняемые с использованием спектрометра или фильтровального фотометра, должны проводить при максимальном поглощении НАДН или НАДФН, при длине волны 340 нм; а измерения, выполняемые с использованием фотометра спектральной линии, оснащенного ртутной лампой, должны проводить при длине волны 365 или 334 нм.

Примечание – Коэффициенты молярного поглощения НАДН и НАДФН, измеренные при длине волны 334, 340 и 365 нм, являются следующими:

– НАДН и НАДФН при 334 нм (Hg) – $6{,}18 \times 10^6$ см^2/моль;
– НАДН и НАДФН при 340 нм – $6{,}3 \times 10^6$ см^2/моль;
– НАДФН при 365 нм (Hg) – $3{,}5 \times 10^6$ см^2/моль;
– НАДН при 365 нм (Hg) – $3{,}4 \times 10^6$ см^2/моль.

А.4.2 В диапазоне численного значения поглощения, которое не превышает 2,0, должна существовать линейная зависимость между поглощением и концентрацией НАДН или НАДФН. Это проверяют следующим образом:

a) 2,00 мл дистиллированной воды с помощью пипетки вносят в кювету. Измеряют поглощение A_0 относительно воздуха;

b) 0,10 мл раствора НАДН (0,5 мг/мл) с помощью пипетки вносят в кювету и перемешивают. Измеряют поглощение A_1.

Вычисляют уменьшенное поглощение A_{r1}, используя следующую формулу:

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

где A_1 – численное значение поглощения, полученное в результате измерения на растворе НАДН, перечисление b);
A_0 – численное значение поглощения, полученное в результате измерения на воде, перечисление a).

c) Процедуру, указанную в перечислении b), повторяют 14 раз.

После каждой пары измерений вычисляют пониженное поглощение A_m, используя следующую формулу:

$$A_m = (A_n - A_0) \times \frac{V}{3{,}5}, \qquad (A.2)$$

где A_n – численное значение поглощения, полученное в результате измерения n;
V – объем содержимого кюветы при измерении n.

d) Для каждого измерения строят график зависимости объема раствора НАДН, находящегося в кювете, относительно аналогичного пониженного поглощения. Соединив полученные точки пересечения, получают прямую.

А.5 Автоматические пипетки и другие дозаторы

А.5.1 Автоматические пипетки и другие дозаторы используют в соответствии с инструкциями изготовителей.

А.5.2 Для каждой пипетки используют соответствующие наконечники.

А.5.3 Периодически (например, ежемесячно) проверяют объем и повторяемость автоматических пипеток и других дозаторов на соответствие спецификации следующим образом:

a) взвешивают химический стакан с водой в момент времени *t*;

b) с помощью пипетки или дозатора в химический стакан добавляют одну порцию воды и взвешивают точно в момент времени *t* + 1 мин после первого взвешивания;

c) процедуру добавления с помощью пипетки или дозатора повторяют 9 раз согласно перечислению b);

d) взвешивают химический стакан в моменты времени *t* + 11 мин, *t* + 12 мин, *t* + 13 мин, *t* + 14 мин и *t* + 15 мин без добавления из пипетки или дозатора; по результатам взвешиваний рассчитывают потери при испарении за минуту;

e) вычисляют объем и повторяемость пипетки или дозатора с учетом потерь воды в процессе испарения.

А.5.4 На объем некоторых автоматических пипеток во время длительного использования может повлиять передача тепла от ладони.

В соответствии с процедурой, указанной в А.5.3, проверяют, имеет ли место это явление, и избегают использования таких пипеток.

А.5.5 Непосредственно перед использованием пипетки наконечник промывают несколько раз раствором/суспензией, которые будут использоваться. Для каждого раствора пробы используют новый наконечник пипетки.

А.5.6 Воду, буферный раствор, фермент, кофермент и раствор пробы вносят пипеткой (опуская наконечник как можно ниже) в разные углы кюветы.

Примечание – Небольшие количества раствора/суспензии фермента (от 10 до 50 мкл) можно вносить пипеткой на лопатку, помещенную в кювету, и перемешать лопаткой все содержимое кюветы.

А.5.7 Необходимо избегать загрязнения.

А.6 Дополнительная информация

А.6.1 Наличие возможных посторонних воздействий и грубых ошибок перепроверяют, определяя поглощения двух растворов с различной концентрацией анализируемого вещества. Полученные значения поглощения должны быть пропорциональны концентрации анализируемого вещества.

А.6.2 Используют стандартный раствор для проверки ферментной реакции. Этот стандартный раствор должен рассматриваться как рабочий стандартный раствор.

Примечание – Эталонные материалы, имеющие сертифицированную степень чистоты, могут быть получены от таких организаций, как Национальный институт стандартов и технологии (бывшее Национальное бюро стандартов) или Бюро стандартов европейского сообщества (BCR).

А.6.3 При наличии раствора пробы выполняют тест на восстановление. Количество добавленного исследуемого вещества должно быть примерно таким же, как количество, присутствующее в растворе пробы.

А.6.4 Для каждой кюветы используют свою пластмассовую лопатку или используют каждую лопатку только один раз.

Количеством жидкости, оставшейся на лопатке, можно пренебречь.

Библиография

[1] ISO 707 — Milk and milk products – Guidance on sampling
(Молоко и молочные продукты. Руководство по отбору проб

[2] ISO 5725-1 — Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 1: General principles and definitions
(Точность (достоверность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Общие принципы и определения)

[3] ISO 5725-2 — Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method
(Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерения)

[4] IDF 135B:1991 — Milk and milk products – Precision characteristics of analytical methods – Outline of collaborative study procedure
(Молоко и молочные продукты. Характеристики точности аналитических методов. Основные принципы процедуры совместного исследования)

[5] Comite de Nomenclature de l'Union Internationale de Biochimie, Recommandations en matiere de Nomenclatures des Enzymes
(Комитет по номенклатуре Международного биохимического союза. Рекомендации по номенклатуре ферментов. Академическое издание, Нью-Йорк, 1984)

[6] Межлабораторные совместные испытания, вторая серия. Бюллетень Международной молочной федерации, 285, 1993, приложение A, приложение C и приложение B

Ответственный за выпуск *В. Л. Гуревич*

Сдано в набор 22.06.2011. Подписано в печать 29.07.2011. Формат бумаги 60×84/8. Бумага офсетная.
Гарнитура Arial. Печать ризографическая. Усл. печ. л. 1,86 Уч.- изд. л. 0,91 Тираж экз. Заказ

Издатель и полиграфическое исполнение:
Научно-производственное республиканское унитарное предприятие
«Белорусский государственный институт стандартизации и сертификации» (БелГИСС)
ЛИ № 02330/0552843 от 08.04.2009.
ул. Мележа, 3, комн. 406, 220113, Минск.

gost.e-ecolog.ru