ГОСТ Р 51259—99
(ДИН 10344—82)

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

# МОЛОКО И МОЛОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ

## Метод определения лактозы и галактозы

Издание официальное

БЗ 10—98/961

ГОССТАНДАРТ РОССИИ
Москва

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Московским государственным университетом пищевых производств

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

2 ПРИНЯТ И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Госстандарта России от 12 апреля 1999 г. № 121

3 Настоящий стандарт представляет собой аутентичный текст национального стандарта ФРГ ДИН 10344—82 «Молоко и молочные продукты. Ферментативное определение лактозы и галактозы» с дополнительными требованиями, отражающими потребности народного хозяйства (разделы 2, 3, 4, 5, 6 и 7)

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

© ИПК Издательство стандартов, 1999

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

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

# МОЛОКО И МОЛОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ

## Метод определения лактозы и галактозы

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

Дата введения 2000—01—01

## 1 Область применения

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

## 2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты:
ГОСТ 2493—75 Калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный. Технические условия
ГОСТ 3652—69 Кислота лимонная моногидрат и безводная. Технические условия
ГОСТ 3769—78 Аммоний сернокислый. Технические условия
ГОСТ 4174—77 Цинк сернокислый семиводный. Технические условия
ГОСТ 4204—77 Кислота серная. Технические условия
ГОСТ 4328—77 Натрия гидроокись. Технические условия
ГОСТ 4523—77 Магний сернокислый 7-водный. Технические условия
ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия
ГОСТ 26809—86 Молоко и молочные продукты. Правила приемки, методы отбора и подготовки проб к анализу

## 3 Определения, обозначения и сокращения

3.1 В настоящем стандарте применяют следующий термин с соответствующим определением:

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

3.2 В настоящем стандарте применяют следующие обозначения и сокращения:
НАД — β-никотинамидадениндинуклеотид;
НАДН — β-никотинамидадениндинуклеотид (восстановленная форма);
ГЗ — β-галактозидаза;
ГДГ — β-галактозодегидрогеназа;
Е — международная единица, определяющая количество (активность) фермента, которое служит катализатором для превращения при 25 °С 1 мкмоля вещества в минуту.

Издание официальное

## 4 Сущность метода

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

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

## 5 Реактивы

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

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

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

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

5.1 Раствор сернокислого цинка

30 г сернокислого цинка по ГОСТ 4174 ($ZnSO_4 \times 7H_2O$) растворяют в 100 см$^3$ дистиллированной воды. Раствор хранят при комнатной температуре 12 мес.

5.2 Раствор гексацианo-(II)-феррата калия

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

5.3 Гидроокись натрия по ГОСТ 4328, раствор молярной концентрации $c$(NaOH) = =0,25 моль/дм$^3$.

5.4 Цитратный буферный раствор

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

5.5 Буферный раствор дифосфата калия

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

5.6 Раствор НАД

0,035 г НАД растворяют в 7 см$^3$ цитратного буфера по 5.4. Раствор устойчив при температуре 4 °С три недели.

5.7 Суспензия фермента ГЗ

Сухой лиофилизат β-галактозидазы из E. coli массой 0,005 г и активностью 150 Е суспендируют в 1 см$^3$ раствора аммония сернокислого по ГОСТ 3769 молярной концентрации $c$ ($(NH_4)_2SO_4$) = =2,2 моль/дм$^3$. Суспензия устойчива при температуре 4 °С 12 мес.

5.8 Суспензия фермента ГДГ

Сухой лиофилизат β-галактозодегидрогеназы из Pseudomonas fluorescens массой 0,005 г и активностью 25 Е смешивают с 1 см$^3$ раствора аммония сернокислого по ГОСТ 3769 молярной концентрации $c$ ($(NH_4)_2SO_4$) = 2,2 моль/дм$^3$. Суспензия устойчива при температуре 4 °С 12 мес.

## 6 Аппаратура

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

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

6.2 Дозаторы пипеточные объемами доз 100, 50 и 25 $см^3$ и относительной погрешностью дозирования ±1 % [1] или пипетки градуированные номинальной вместимостью 2,0; 1,0; 0,5; 0,2; 0,1 и 0,02 $см^3$ и допускаемой относительной погрешностью ±1 %.

6.3 Колба мерная номинальной вместимостью 100 $см^3$ и допускаемой относительной погрешностью ±0,2 %.

6.4 Фильтры гофрированные бумажные диаметром 15 см по ГОСТ 12026.

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

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

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

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

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

## 7 Отбор проб

Отбор проб — по ГОСТ 26809.

## 8 Проведение испытания

8.1 Перед испытанием пробу хорошо перемешивают.

8.2 Пробу продукта массой 1,0000 г количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$.

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

В колбу добавляют 50 $см^3$ дистиллированной воды. Содержимое колбы хорошо перемешивают.

Масса пробы зависит от массовой концентрации лактозы по 9.1. Навеску пробы подбирают таким образом, чтобы массовая концентрация лактозы в фильтрате по 8.4 составляла от 0,05 до 1,00 $г/дм^3$.

8.3 В колбу последовательно добавляют 1 $см^3$ раствора сернокислого цинка и 1 $см^3$ раствора гексациано-(II)-феррата калия. После добавления каждого реагента содержимое колбы энергично перемешивают. Затем нейтрализуют раствор в колбе, добавляя раствор гидроокиси натрия молярной концентрации $c(NaOH)$ = 0,25 $моль/дм^3$. Контроль активной кислотности осуществляют индикаторной бумагой. Доводят объем раствора в колбе до метки дистиллированной водой и выдерживают колбу 15 мин при комнатной температуре.

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

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

8.5 Контрольное определение и определение галактозы и лактозы

8.5.1 *Контрольное определение*

8.5.1.1 В первую кювету спектрофотометра (фотометра) последовательно дозируют 0,20 $см^3$ раствора НАД в цитратном буфере, 0,02 $см^3$ суспензии фермента ГЗ, 1,00 $см^3$ буферного раствора дифосфата калия и 2,00 $см^3$ дистиллированной воды. Содержимое кюветы перемешивают пластиковым шпателем или стеклянной палочкой и оставляют при комнатной температуре на 15 мин.

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

8.5.1.3 В кювету добавляют 0,02 см$^3$ суспензии ГДГ. Содержимое кюветы перемешивают пластиковым шпателем или стеклянной палочкой и оставляют на 30 мин при комнатной температуре.

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

8.5.2 *Определение свободной галактозы*

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

8.5.2.1 Во вторую кювету спектрофотометра (фотометра) последовательно дозируют 0,20 см$^3$ раствора НАД в цитратном буфере, 0,1 см$^3$ прозрачного фильтрата по 8.4, 1,00 см$^3$ буферного раствора дифосфата калия и 1,90 см$^3$ дистиллированной воды. Содержимое кюветы перемешивают пластиковым шпателем или стеклянной палочкой и оставляют при комнатной температуре на 15 мин.

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

8.5.2.3 В кювету добавляют 0,02 см$^3$ суспензии ГДГ. Содержимое кюветы перемешивают пластиковым шпателем или стеклянной палочкой и оставляют на 30 мин при комнатной температуре.

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

8.5.3 *Определение лактозы*

8.5.3.1 В третью кювету спектрофотометра (фотометра) последовательно дозируют 0,20 см$^3$ раствора НАД в цитратном буфере, 0,1 см$^3$ прозрачного фильтрата по 8.4 и 0,02 см$^3$ суспензии ГЗ. Содержимое кюветы перемешивают, осторожно встряхивая, и оставляют при комнатной температуре на 15 мин. Затем в кювету последовательно добавляют 1,00 см$^3$ буферного раствора дифосфата калия и 1,90 см$^3$ дистиллированной воды. Содержимое кюветы перемешивают пластиковым шпателем или стеклянной палочкой и оставляют при комнатной температуре на 2 мин.

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

8.5.3.3 В кювету добавляют 0,02 см$^3$ суспензии ГДГ. Содержимое кюветы перемешивают пластиковым шпателем или стеклянной палочкой и оставляют на 15 мин при комнатной температуре.

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

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

## 9 Выражение результатов

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

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

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

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

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

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

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

где $M_л$ — молярная масса лактозы (безводная форма), 342,30 г/моль; молярная масса моногид-

рата лактозы, 360,31 г/моль (массовую долю моногидрата лактозы в пробе рассчитывают умножением массовой доли безводной лактозы на коэффициент 1,0588);

$V_1$ — общий объем раствора в кювете, 3,24 см$^3$;

$V_3$ — объем, полученный при разбавлении пробы в процессе ее подготовки к испытанию по 8.3, 100 см$^3$;

$\varepsilon$ — молярный коэффициент поглощения НАДН, дм$^3$ · ммоль$^{-1}$ · см$^{-1}$:

- при длине волны 340 нм — 6,3,
- при длине волны 365 нм — 3,4 (ртутная лампа),
- при длине волны 334 нм — 6,18 (ртутная лампа);

$d$ — толщина поглощающего слоя в кювете, см;

$V_2$ — объем пробы, 0,10 см$^3$;

$m$ — навеска пробы, г.

9.3 Массовую долю $W_г$ галактозы в пробе, г/100 г, рассчитывают по формуле

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

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

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

9.4 Сходимость

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

## 10 Отчет об испытании

В отчете об испытании должны быть указаны:

- вид пробы;
- способ отбора пробы;
- массовая доля лактозы в пробе, г/100 г;
- массовая доля галактозы в пробе, г/100 г;
- дата испытания.

## ПРИЛОЖЕНИЕ А
(справочное)

## БИБЛИОГРАФИЯ

[1] ТУ 64—13329-81 Дозаторы пипеточные

УДК 637.11.001.4:006.354 ОКС 67.080 Н19 ОКСТУ 9109

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

Редактор *Т.П. Шашина*
Технический редактор *Л.А. Кузнецова*
Корректор *В.И. Кануркина*
Компьютерная верстка *С.В. Рябовой*

Изд. лиц. № 021007 от 10.08.95. Сдано в набор 19.04.99. Подписано в печать 17.05.99. Усл.печ.л. 0,93. Уч.-изд.л. 0,67.
Тираж 487 экз. С 2843. Зак. 415.

ИПК Издательство стандартов, 107076, Москва, Колодезный пер., 14.
Набрано в Издательстве на ПЭВМ
иал ИПК Издательство стандартов — тип. "Московский печатник", Москва, Лялин пер., 6
Плр № 080102

gost.e-ecolog.ru