

---

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

---



НАЦИОНАЛЬНЫЙ  
СТАНДАРТ  
РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р  
51196—  
2010  
(ИСО 8069:2005)

---

## МОЛОКО СУХОЕ

### Определение содержания молочной кислоты и лактатов

ИСО 8069:2005  
Dried milk — Determination of content of lactic acid and lactates  
(MOD)

Издание официальное



Москва  
Стандартинформ  
2011

## Предисловие

Цели и принципы стандартизации в Российской Федерации установлены Федеральным законом от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ «О техническом регулировании», а правила применения национальных стандартов Российской Федерации — ГОСТ Р 1.0—2004 «Стандартизация в Российской Федерации. Основные положения»

### Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН ОАО «Всероссийский научно-исследовательский институт сертификации» и Государственным образовательным учреждением высшего профессионального образования «Московский государственный университет пищевых производств» на основе собственного аутентичного перевода на русский язык стандарта, указанного в пункте 4

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

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 30 ноября 2010 г. № 688-ст

4 Настоящий стандарт является модифицированным по отношению к международному стандарту ИСО 8069:2005 «Молоко сухое. Определение содержания молочной кислоты и лактатов» (ISO 8069:2005 «Dried milk — Determination of content of lactic acid and lactates») путем изменения отдельных слов, ссылок, которые выделены в тексте курсивом

5 ВЗАМЕН ГОСТ Р 51196—98 (ИСО 8069—86)

*Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячно издаваемых информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет*

© Стандартиформ. 2011

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

## Содержание

|  |    |
|--|----|
| 1 Область применения . . . . .   | 1  |
| 2 Нормативные ссылки . . . . .   | 1  |
| 3 Термины и определения . . . . .  | 1  |
| 4 Сущность метода . . . . .  | 1  |
| 5 Реактивы . . . . .   | 2  |
| 6 Оборудование и вспомогательные материалы . . . . .   | 3  |
| 7 Отбор проб и приготовление . . . . .   | 3  |
| 8 Порядок проведения испытания . . . . .   | 4  |
| 9 Правила обработки результатов . . . . .  | 6  |
| 10 Прецизионность . . . . .  | 6  |
| Приложение А (рекомендуемое) Правила надлежащей лабораторной практики (GLP) для выполнения ферментативного анализа пищевых продуктов . . . . . | 8  |
| Библиография . . . . .   | 11 |



НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

МОЛОКО СУХОЕ

Определение содержания молочной кислоты и лактатов

Dried milk. Determination of content of lactic acid and lactates

Дата введения — 2012—01—01

## 1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает ферментативный метод селективного определения в сухом молоке содержания D- и L-изомеров молочной кислоты и ее солей лактатов.

## 2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ Р ИСО 5725-1—2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения (ИСО 5725-1:1994, IDT)

ГОСТ Р ИСО 5725-2—2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений (ИСО 5725-2:1994, IDT)

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

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодно издаваемому информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

## 3 Термины и определения

В настоящем стандарте применен следующий термин с соответствующим определением:

3.1 **содержание L- и D-молочной кислоты и L- и D-лактатов:** Массовая доля молочной кислоты и лактатов, определенная в соответствии с настоящим стандартом и выраженная в миллиграммах молочной кислоты на 100 г сухих обезжиренных веществ.

## 4 Сущность метода

Навеску пробы сухого молока растворяют в теплой воде, далее фильтруют. В полученный фильтрат вносят следующие биохимические реактивы — ферменты [1], коферменты и активаторы, кото-

рые добавляют одновременно, но в указанной последовательности для проведения следующих реакций:

а) для окисления L- и D-молочной кислоты, L- и D-лактата в присутствии никотинамидадениндинуклеотида (НАД<sup>+</sup>) до пирувата и преобразования НАД<sup>+</sup> в восстановленную форму НАДН — L-лактатдегидрогеназу (L-ЛДГ) и D-лактатдегидрогеназу (D-ЛДГ);

б) для преобразования в присутствии L-глутамата пирувата в L-аланин и L-глутамата в α-кетоглутарат — глутамат-пируват-трансаминазу (ГПТ).

Количество образовавшегося НАДН, которое пропорционально содержанию L- и D-молочной кислоты и L- и D-лактатов, определяют спектрофотометрически измерением оптической плотности инкубационной смеси при длине волны 340 нм.

## 5 Реактивы

Используют реактивы только установленной аналитической степени чистоты. Вода, используемая для приготовления растворов ферментов, должна быть бидистиллированной, полученной на стеклянном оборудовании, а вода, используемая для других целей, должна быть дистиллированной.

### 5.1 Раствор калия гексацианоферрата(II), $c(K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O) = 35,9 \text{ г/дм}^3$

Растворяют в воде 35,9 г тригидрата калия гексацианоферрата(II). Разбавляют водой до 1000 см<sup>3</sup> и перемешивают.

### 5.2 Раствор цинка сульфата, $c(ZnSO_4 \cdot 7H_2O) = 71,8 \text{ г/дм}^3$

Растворяют в воде 71,8 г гептагидрата сульфата цинка. Разбавляют водой до 1000 см<sup>3</sup> и перемешивают.

### 5.3 Растворы натрия гидроксида

#### 5.3.1 Раствор I натрия гидроксида, $c(NaOH) = 10 \text{ моль/дм}^3$

Растворяют в воде 400 г натрия гидроксида. Разбавляют водой до 1000 см<sup>3</sup> и перемешивают.

#### 5.3.2 Раствор II натрия гидроксида, $c(NaOH) = 0,1 \text{ моль/дм}^3$

Растворяют 4,0 г натрия гидроксида в воде. Разбавляют водой до 1000 см<sup>3</sup> и перемешивают.

### 5.4 Раствор глицерина ( $C_3H_8O_3$ ), с объемной долей глицерина 50 %

### 5.5 Раствор аммония сульфата, $c[(NH_4)_2SO_4] = 3,2 \text{ моль/дм}^3$

Растворяют 422,84 г аммония сульфата в воде. Разбавляют водой до 1000 см<sup>3</sup> и перемешивают.

### 5.6 Буферный раствор, pH 10

Растворяют 7,92 г глицилглицина ( $C_4H_8N_2O_3$ ) и 1,47 г L-глутаминовой кислоты ( $C_5H_9NO_4$ ) в 80 см<sup>3</sup> воды. Устанавливают pH ( $10,0 \pm 0,1$ ) при 20 °C раствором I гидроксида натрия (см. 5.3.1) и при постоянном перемешивании доводят объем раствора водой до 100 см<sup>3</sup>.

Раствор хранят не более 3 мес при температуре от 0 °C до 5 °C.

### 5.7 Раствор никотинамид-аденин-динуклеотида (НАД)

Растворяют 350 мг никотинамид-аденин-динуклеотида ( $C_{21}H_{27}N_7O_{14}P_2$ ) в 10 см<sup>3</sup> воды.

Полученный раствор хранят в течение 1 мес при температуре от 0 °C до 5 °C. Во время использования сосуд с раствором должен быть погружен в емкость с дробленным льдом.

### 5.8 L-лактатдегидрогеназа (L-ЛДГ), из суспензии мышцы свиньи

10 мг суспензии L-лактатдегидрогеназы растворяют в 1 см<sup>3</sup> раствора глицерина (5.4). pH полученной суспензии должен быть около 7. Если удельная активность L-ЛДГ менее 5500 ед./см<sup>3</sup>, проводят повторное приготовление раствора фермента согласно вышеприведенным указаниям.

Раствор L-ЛДГ стабилизируют в течение 12 мес при хранении при температуре от 0 °C до 5 °C.

Во время использования раствора L-ЛДГ согласно разделу 8 емкость с ферментом охлаждают и выдерживают в ледяной бане.

### 5.9 D (D-ЛДГ) (из культуральной жидкости *Lactobacillus leichmannii*)

5 мг суспензии D-ЛДГ растворяют в 1 см<sup>3</sup> раствора сульфата аммония (см. 5.5) pH полученной суспензии должен быть около 6. Удельная активность D-ЛДГ должна быть не менее 1500 ед./см<sup>3</sup> при 25 °C.

Если это не так, готовят другую суспензию D-ЛДГ.

Суспензия D-ЛДГ стабильна в течение 12 мес при хранении при температуре от 0 °C до 5 °C.

Во время использования раствора L-ЛДГ согласно разделу 8 емкость с ферментом охлаждают и выдерживают в ледяной бане.

### 5.10 Глутамат-пируват-трансаминаза (ГПТ), из свиного сердца

20 мг суспензии ГПТ растворяют в 1,0 см<sup>3</sup> раствора сульфата аммония (см. 5.5). pH полученной суспензии должен быть около 7. Удельная активность суспензии глутамат-пируват-трансаминазы должна быть не менее 1600 ед./см<sup>3</sup> при 25 °С. Если это не так, готовят другую суспензию ГПТ.

Добавляют 1,0 см<sup>3</sup> раствора сульфата аммония (см. 5.5) к 1 см<sup>3</sup> суспензии с 20 мг ГПТ и перемешивают. Центрифугируют полученные 2,0 см<sup>3</sup> суспензии, содержащей 10 мг ГПТ/см<sup>3</sup> при радиальном ускорении 4000 g в течение 10 мин. Переносят 1,0 см<sup>3</sup> прозрачной надосадочной жидкости, удаляют оставшиеся раствор и осадок.

Суспензия D-ЛДГ стабильна в течение 12 мес при хранении в холодильнике при температуре от 0 °С до 5 °С.

Во время использования раствора L-ЛДГ согласно разделу 8 емкость с ферментом охлаждают и выдерживают в ледяной бане.

### 5.11 Раствор L-лактата лития

50 мг L-лактата лития (C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>O<sub>3</sub>Li) растворяют в воде. Разбавляют водой до 500 см<sup>3</sup> и перемешивают.

### 5.12 Раствор D-лактата лития

50 мг D-лактата лития (C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>O<sub>3</sub>Li) растворяют в воде. Разбавляют водой до 500 см<sup>3</sup> и перемешивают.

## 6 Оборудование и вспомогательные материалы

Используют обычное лабораторное оборудование и, в частности, перечисленное ниже.

6.1 Аналитические весы, имеющие точность взвешивания 1 мг, с ценой деления 0,1 мг.

6.2 Стекланный химический стакан вместимостью 50 см<sup>3</sup>.

6.3 Мерный цилиндр вместимостью 50 см<sup>3</sup>.

6.4 Мерные колбы с одной меткой вместимостью 10 см<sup>3</sup>.

6.5 Пипетки вместимостью 0,02; 0,05; 0,2; 1,0 и 2,0 см<sup>3</sup>.

6.6 Градуированные пипетки вместимостью 5 и 10 см<sup>3</sup>, с делениями 0,1 см<sup>3</sup>.

6.7 Стекланный фильтр диаметром около 7 см.

6.8 Фильтровальная бумага со средним размером пор, диаметром около 15 см, не содержащая молочной кислоты и лактатов.

6.9 Стекланная палочка.

6.10 Пластиковые шпатели, пригодные для перемешивания смеси проба-фермент в спектрометрической кювете.

6.11 Спектрофотометр или фотометр с шириной спектральной полосы пропускания не более 10 нм, относительной погрешностью измерений  $\pm 1\%$  в интервале оптических плотностей от 0,000 до 2,000, пригодный для проведения измерений при 340 нм.

6.12 Кюветы для фотометрических измерений с длиной оптического пути (шириной грани) 1 см из кварцевого стекла или полимерных материалов (полистирола или полиметакрилата), пригодные для измерения оптической плотности при 340 нм.

6.13 Допускается использование других средств измерений с метрологическими характеристиками, материалов и лабораторного оборудования с техническими характеристиками, не уступающими перечисленным выше.

## 7 Отбор проб и приготовление

7.1 В лабораторию необходимо доставить представительную пробу. Проба не должна быть повреждена или модифицирована при транспортировании или хранении.

Отбор проб не является частью метода, устанавливаемого в настоящем стандарте.

Отбор проб — по ГОСТ Р 26809 и для экспортно-импортных операций — по [2].

Пробу хранят в условиях, в которых не допускается ее повреждение или изменение состава.

Пробу для испытаний переносят в емкость, имеющую вместимость примерно вдвое большую, чем объем пробы, и снабженную герметичной крышкой. Емкость незамедлительно закрывают. Пробу тщательно перемешивают путем многократного встряхивания и переворачивания емкости.

В процессе приготовления следует избегать воздействия атмосферного воздуха на пробу для испытаний, чтобы минимизировать поглощение воды.

## 7.2 Навеска

Взвешивают 1,0 г пробы для испытаний с точностью 1 мг в стеклянном химическом стакане вместимостью 50 см<sup>3</sup>.

## 7.3 Контрольное определение

Контрольное определение проводят, как это указано в 7.4 и 8.2, используя все реактивы, но без порции пробы.

## 7.4 Приготовление раствора и депротеинизация

7.4.1 Навеску пробы (см. 7.2) при перемешивании стеклянной палочкой (см. 6.9) или другими подходящими средствами растворяют в 20 см<sup>3</sup> воды, предварительно нагретой до температуры от 40 °С до 50 °С.

Содержимое химического стакана количественно переносят в мерную колбу с одной меткой на 100 см<sup>3</sup> (см. 6.4), ополаскивая стакан водой. Содержимое колбы охлаждают примерно до 20 °С.

7.4.2 К раствору (см. 7.4.1) добавляют в следующей последовательности — 5,0 см<sup>3</sup> раствора калия гексацианоферрата (II) (см. 5.1), 5,0 см<sup>3</sup> раствора сульфата цинка (см. 5.2) и 10,0 см<sup>3</sup> раствора II гидроксида натрия (см. 5.3.2), интенсивно перемешивая после каждого добавления. Разбавляют водой до метки 100 см<sup>3</sup>. Тщательно перемешивают и дают смеси отстояться при комнатной температуре в течение 30 мин.

7.4.3 Фильтруют через фильтровальную бумагу (см. 6.8), первую порцию фильтрата удаляют.

Вместо фильтрации можно использовать центрифугирование.

# 8 Порядок проведения испытания

**ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ!** Следует избегать загрязнения, особенно продуктами испарения тела.

## 8.1 Проверка качества реактивов

8.1.1 Проверку качества реактивов по нижеприведенной процедуре проводят:

- во всех случаях при приготовлении новой партии реактивов (включая 5.6—5.10);
- после хранения реактивов в холодильнике без использования в течение более двух недель;
- в случае повторного использования после истечения периода аналитической неактивности;
- в любых случаях, когда этого требуют иные условия применения и/или хранения реактивов.

8.1.2 Отбирают пипеткой 10 см<sup>3</sup> раствора L-лактата лития (см. 5.11) в каждую из двух мерных колб с одной меткой на 100 см<sup>3</sup> (см. 6.4). Отбирают пипеткой 10 см<sup>3</sup> раствора D-лактата лития (см. 5.12) в каждую из двух других мерных колб с одной меткой на 100 см<sup>3</sup> (см. 6.4).

Определяют содержание L-молочной кислоты и L-лактатов и D-молочной кислоты и D-лактатов в растворах в двух парах колб на 100 см<sup>3</sup>, как это указано в 7.4.2, 7.4.3 и 8.2.

8.1.3 Концентрацию лактатов лития  $w_L$ ;  $w_D$ , мг/дм<sup>3</sup>, рассчитывают по одной из следующих формул:

а) для раствора L-лактата:

$$w_L = 341 \cdot A; \quad (1)$$

б) для раствора D-лактата:

$$w_D = 346 \cdot A, \quad (2)$$

где  $A$  — значение оптической плотности при 340 нм, рассчитанное в соответствии с 8.2.1 и 8.2.2;

341 — значение фактора, учитывающего молекулярную массу L-лактата лития ( $M_r = 96,1$ ) и конечный объем ( $V_f = 2,24$  см<sup>3</sup>) в 9.1 при расчете концентрации L-лактата;

346 — значение фактора, учитывающего молекулярную массу D-лактата лития ( $M_r = 96,1$ ) и конечный объем ( $V_f = 2,27$  см<sup>3</sup>) в 9.1 при расчете концентрации D-лактата.

8.1.4 Принимая во внимание чистоту L- и D-лактата лития, используемых для приготовления растворов, степень повторного нахождения ( $ПН$ ) L- или D-лактата лития в любой из колб (см. 8.1.2) должна быть в диапазоне  $(100 \pm 5) \%$ . Если  $ПН$  не находится в данном диапазоне, осуществляют проверку реактивов, метода выполнения работы, точности пипеток и параметров спектрофотометра. Для проверки реактивов и оборудования могут быть использованы методы текущей проверки, применяемые в биохимии.



мическом анализе пищевых продуктов и опубликованные в специальной литературе [3]. Принимают требуемые меры для получения надлежащих результатов. Данную проверку качества реактивов повторяют, пока не будут получены удовлетворительные результаты.

**Примечание** — Степень повторного нахождения (ПН) — доля измеренного количества.

## 8.2 Определение

8.2.1 Необходимые количества компонентов инкубационной смеси вносят, используя соответствующую пипетку (см. 6.5), в кювету (см. 6.12) спектрофотометра (см. 6.11) в соответствии с таблицей 1.

Т а б л и ц а 1 — Аналитическая схема ферментативного определения L- и D-молочных кислот (L- и D-лактатов)

| Реактивы, дозируемые в кювету, см <sup>3</sup> | Обозначение кювет |                             |                             |       |
|--|-------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------|
|  | Контрольная проба | Стандарт D-лактата<br>лития | Стандарт L-лактата<br>лития | Проба |
| Дистиллированная вода                          | 1,000             | —                           | —                           | —     |
| Стандарт (см. 8.1.2)                           | —                 | 1,000                       | 1,000                       | —     |
| Проба (см. 7.4.3)                              | —                 | —                           | —                           | 1,000 |
| Буферный раствор, pH 10 (см. 5.6)              | 1,000             | 1,000                       | 1,000                       | 1,000 |
| Раствор НАД <sup>+</sup> (см. 5.7)             | 0,200             | 0,200                       | 0,200                       | 0,200 |
| ГПТ (см. 5.10)                                 | 0,020             | 0,020                       | 0,020                       | 0,020 |
| L-ЛДГ (см. 5.8)                                | 0,020             | —                           | 0,020                       | 0,020 |
| D-ЛДГ (см. 5.9)                                | 0,050             | 0,050                       | —                           | 0,050 |

Содержимое всех кювет перемешивают при помощи пластикового шпателя (см. 6.10) или закрывают кювету и переворачивают несколько раз. После перемешивания кюветы выдерживают 5 мин при комнатной температуре перед тем, как измерить оптическую плотность ( $A_{60}$  и  $A_{45}$ ) инкубационной смеси во всех кюветах относительно воды при длине волны 340 нм.

Через 45 мин измеряют повторно оптическую плотность инкубационной смеси во всех кюветах ( $A_{60}$  и  $A_{45}$ ) относительно воды при длине волны 340 нм.

Следующее измерение проводят через 60 мин. Измеряют оптическую плотность инкубационной смеси во всех кюветах ( $A_{60}$  и  $A_{45}$ ) относительно воды при длине волны 340 нм.

L- или D-молочную кислоту и L-/D-лактаты можно определять отдельно путем добавления либо L-ЛДГ (см. 5.8), либо D-ЛДГ (см. 4.9).

В случае измерений только L-молочной кислоты и L-лактатов оптическую плотность измеряют через 30 и 45 мин после перемешивания соответственно.

8.2.2 Фактическое значение оптической плотности  $A$ , которое будет использовано в вычислениях по 9.1, рассчитывают по формуле

$$A = [(A_{60} - A_{45}) - 4(A_{60} - A_{45})] - [(A_{60} - A_{45}) - 4(A_{60} - A_{45})], \quad (3)$$

где  $A_{60}$  — оптическая плотность пробы через 60 мин по 8.2.1;

$A_{45}$  — оптическая плотность пробы по 8.2.1;

$A_{45}$  — оптическая плотность пробы через 45 мин по 8.2.1;

$A_{60}$  — оптическая плотность контрольной пробы через 60 мин по 8.2.1;

$A_{45}$  — оптическая плотность контрольной пробы по 8.2.1;

$A_{45}$  — оптическая плотность контрольной пробы через 45 мин по 8.2.1.

Иногда может иметь место медленно текущая побочная реакция. Влияние на оптическую плотность, оказываемое данной побочной реакцией, может быть устранено путем экстраполяции к оптической плотности при нулевом времени. Дополнительная информация о медленно текущих побочных реакциях и устранении их влияния на результаты основных ферментативных реакций — см. [3].

В случае определения только L-молочной кислоты и L-лактатов (см. 8.2.1) оптическую плотность измеряют через 30 и 45 мин соответственно по формуле

$$A = [(A_{s45} - A_{s30}) - 3(A_{s45} - A_{s30})] - [(A_{b45} - A_{b30}) - 3(A_{b45} - A_{b30})], \quad (4)$$

где  $A_{s30}$  — оптическая плотность пробы через 30 мин по 8.2.1;

$A_{b30}$  — оптическая плотность контрольной пробы через 30 мин по 8.2.1.

8.2.3 Если увеличение оптической плотности, рассчитанное согласно 8.2.2, превышает 0,500 единиц, определение повторяют согласно 8.2.1—8.2.3, используя пробу с подходящей степенью разбавления (см. 7.4.3).

## 9 Правила обработки результатов

### 9.1 Расчет

Суммарное содержание L- и D-молочной кислоты или L- и D-лактатов,  $w_L$ , мг/100 г, рассчитывают по формуле

$$w_L = \frac{A \cdot M_r}{k \cdot l \cdot m} \cdot \frac{V_1}{V_2 \cdot V_3} \cdot \frac{100}{w_s} \cdot 10^5, \quad (5)$$

где  $A$  — оптическая плотность при 340 нм, рассчитанная в соответствии с 8.2.2;

$M_r$  — относительная молекулярная масса L- и D-молочной кислоты ( $M_r = 90,1$ );

$k$  — коэффициент оптической плотности (экстинкции) НАДН при 340 нм, равный  $6,3 \times 10^5$  см<sup>2</sup>/моль;

$l$  — длина оптического пути кюветы для фотометрических измерений ( $l = 1$  см), см;

$m$  — навеска пробы (см. 7.3), г;

$V_1$  — общий объем инкубационной смеси в кювете (см. 8.2.1), см<sup>3</sup>:

- при определении L- и D-молочной кислоты и L- и D-лактатов  $V_1 = 2,29$  см<sup>3</sup>,
- при определении только L-молочной кислоты и L-лактата  $V_1 = 2,24$  см<sup>3</sup>,
- при определении только D-молочной кислоты и D-лактата  $V_1 = 2,27$  см<sup>3</sup>;

$V_2$  — объем пробы, см<sup>3</sup>;

$V_3$  — объем пробы (см. 7.4.3), взятый для разбавления (см. 8.2.3), если это необходимо, см<sup>3</sup>;

$V_4$  — объем раствора, полученного по 7.4.2 (т. е.  $V_4 = 100$  см<sup>3</sup>), см<sup>3</sup>;

$V_5$  — объем, до которого проба была разбавлена (см. 8.2.3), при необходимости, см<sup>3</sup>;

$w_s$  — содержание сухих обезжиренных веществ в пробе, выраженное в виде массовой доли, %.

П р и м е ч а н и е — Определение массовой доли жира не является частью метода, установленного в настоящем стандарте. Рекомендуемый метод определения жира в сухом молоке — по [4].

### 9.2 Выражение результатов

Результаты испытаний выражают в целых числах.

## 10 Прецизионность

Прецизионность метода и результатов измерений рассчитывают по ГОСТ Р ИСО 5725-1 и ГОСТ Р ИСО 5725-2.

Подробная информация о результатах межлабораторного испытания, касающихся точности используемого метода, опубликована в [5]. Значения, полученные в ходе данного межлабораторного испытания, могут не применяться к диапазонам концентраций и матрицам, отличным от тех, которые приведены в настоящем стандарте.

### 10.1 Сходимость (повторяемость)

Абсолютная разница между двумя независимыми отдельными результатами испытаний, полученными с использованием одного и того же метода применительно к идентичному испытываемому материалу в той же лаборатории, одним и тем же оператором с использованием одного и того же оборудования в течение короткого периода времени, должна не более чем в 5 % случаев превышать:

а) для среднеарифметического значения содержания L- или D-молочной кислоты и L- или D-лактатов  $\leq 60$  мг на 100 г сухих обезжиренных веществ:  $r = 10$  мг/100 г;

б) для среднеарифметического значения содержания L- или D-молочной кислоты и L- или D-лактатов  $> 60$  мг на 100 г сухих обезжиренных веществ:  $r = 15$  % (относительных) от среднеарифметического значения.

#### 10.2 Воспроизводимость

Абсолютная разница между двумя независимыми отдельными результатами испытаний, полученными с использованием одного и того же метода применительно к идентичному испытываемому материалу в различных лабораториях, различными операторами с использованием различного оборудования, должна не более чем в 5 % случаев превышать:

а) для среднеарифметического значения содержания L- или D-молочной кислоты и L- или D-лактатов  $\leq 100$  мг на 100 г сухих обезжиренных веществ:  $R = 15$  мг/100 г;

б) для среднеарифметического значения содержания L- или D-молочной кислоты и L- или D-лактатов  $> 100$  мг на 100 г сухих обезжиренных веществ:  $R = 20$  % (относительных) от среднеарифметического значения.

**Правила надлежащей лабораторной практики (GLP) для выполнения ферментативного анализа пищевых продуктов****А.1 Введение**

Рекомендуемые правила GLP для выполнения ферментативного анализа менее известны, чем правила выполнения других химических анализов. Для получения результатов, имеющих удовлетворительную достоверность и точность, необходимо принять во внимание приведенные ниже правила GLP.

**А.2 Реактивы**

А.2.1 Следует использовать ферменты только установленного качества (удельной активности, специфичности действия, концентрации, отсутствие загрязнителей с ферментативной активностью, растворители).

А.2.2 Следует использовать коферменты только установленного качества (степени чистоты, кислотной или солевой формы, отсутствие загрязнителей).

А.2.3 Все реактивы, помимо ферментов и коферментов, должны быть аналитической степени чистоты.

А.2.4 Вода для приготовления растворов ферментов и других реактивов должна быть бидистиллированной, полученной в стеклянном оборудовании.

А.2.5 Вода для приготовления растворов пробы должна быть дистиллированной, полученной в стеклянном оборудовании или деионизированной.

А.2.6 Реактивы и суспензии/растворы ферментов следует хранить в соответствии с инструкциями (обычно при температуре от 2 °С до 8 °С).

А.2.7 Не следует замораживать суспензии ферментов.

А.2.8 По истечении срока хранения качество реактивов проверяют путем исследования стандартных растворов с различным количеством анализируемого вещества. Изменения полученных значений оптической плотности должны быть пропорциональны изменениям концентраций анализируемых веществ.

А.2.9 Температура буферных растворов, взятых из холодильника, перед добавлением в анализируемую пробу должна быть доведена до комнатной.

**А.3 Фотометрические и спектрофотометрические кюветы**

А.3.1 Используют стеклянные или пластиковые кюветы с длиной оптического пути 1 см.

П р и м е ч а н и е — Пластиковые кюветы имеют следующие преимущества по сравнению со стеклянными:

- а) ниже стоимость (одноразовое применение);
- б) возможно проведение большего числа анализов;
- в) в рамках одной партии пластиковые кюветы удовлетворительно подходят с точки зрения измерений оптической плотности.

А.3.2 В тех случаях, когда используется новая партия кювет, необходимо проверить их длину оптического пути по сравнению с длиной прецизионных кювет (например, кварцевой кюветы) следующим образом.

Прецизионную кювету и пластиковые кюветы наполняют дистиллированной водой и измеряют оптическую плотность ( $A_1$ ) воды в каждой кювете по сравнению с водой, находящейся в прецизионной кювете. После ополаскивания кюветы заполняют раствором НАДН (приблизительно 0,15 мг/см<sup>3</sup>) и повторно измеряют оптическую плотность ( $A_2$ ) по сравнению с водой, находящейся в прецизионной кювете. Рассчитывают  $A_2 - A_1$  для прецизионной кюветы и пластиковых кювет. Если разница ( $A_2 - A_1$ ) между двумя видами кювет превышает 0,5 % значения измерения фактической оптической плотности для прецизионной кюветы, рассчитывают средний процент разницы и учитывают его для длины оптического пути  $l$  в уравнении (5). Для текущей проверки кювет может быть использована методика, опубликованная в [3].

А.3.3 Всегда используют кюветы чистые и без царапин. Просушивают или очищают оптические стороны кюветы, используя только мягкую ткань.

А.3.4 Не рекомендуется измерять оптическую плотность кювет с пробой для испытаний по сравнению с плотностью кюветы для контрольного определения, так как не будет получено никакой информации относительно оптической плотности самого контрольного определения. Оптическую плотность пробы и контрольного определения измеряют относительно воды и рассчитывают разницу.

А.3.5 Не следует измерять оптическую плотность пробы или контрольного определения относительно пустой кюветы (из-за диффузии света).

А.3.6 Перемешивают содержимое кюветы при помощи пластикового шпателя или плотно закрывают кювету и совершают легкие круговые движения.

А.3.7 Удаляют пузырьки воздуха со стенок кювет посредством пластикового шпателя. Следует избегать нанесения царапин на оптическую сторону кюветы.

А.3.8 Всегда используют один и тот же тип кювет для измерения оптической плотности пробы и контрольного определения.

А.3.9 Стекланные или кварцевые кюветы всегда помещают в одинаковое положение в держателе кювет. Для этих целей помещают одну оптическую сторону кюветы. На грани пластиковых кювет, предназначенной для измерения оптической плотности, нанесена специальная метка.

#### А.4 Фотометры и спектрофотометры

А.4.1 Используют спектрофотометр (ширина спектральной полосы пропускания  $\leq 10$  нм) с монохроматором, фотометр, снабженный фильтрами (ширина спектральной полосы пропускания фильтров  $\leq 10$  нм), или спектральный фотометр, снабженный ртутной лампой. Измерения, проводимые с использованием спектрофотометра или фотометра, осуществляют при длине волны, соответствующей максимальной оптической плотности НАДН и НАДФН, т. е. при 340 нм. Измерения, проводимые с использованием спектрального фотометра с ртутной лампой, осуществляют при 365 или 334 нм.

Примечание — Коэффициенты оптической плотности (экстинкции) НАДН и НАДФН, измеренные при 334, 340 и 365 нм, являются следующими:

- а) НАДН и НАДФН при 334 нм (Hg):  $6,18 \times 10^5$  см<sup>2</sup>/моль;
- б) НАДН и НАДФН при 340 нм (Hg):  $6,3 \times 10^5$  см<sup>2</sup>/моль;
- с) НАДФН при 365 нм (Hg):  $3,5 \times 10^5$  см<sup>2</sup>/моль;
- е) НАДН при 365 нм (Hg):  $3,4 \times 10^5$  см<sup>2</sup>/моль.

А.4.2 Технические характеристики спектрофотометра, фотометра или спектрального фотометра должны обеспечивать линейную зависимость между значениями оптической плотности (вплоть до 2,000 ед.) и концентрацией НАДН или НАДФН. Линейную зависимость проверяют следующим образом:

- а) отбирают пипеткой 2,000 см<sup>3</sup> дистиллированной воды в кювету и измеряют оптическую плотность  $A_0$  относительно воды;
- б) отбирают пипеткой 0,100 см<sup>3</sup> раствора НАДН (0,5 мг/см<sup>3</sup>) в кювету; перемешивают содержимое кюветы и измеряют оптическую плотность  $A_1$ .

Рассчитывают сниженную оптическую плотность  $A_{11}$  по формуле

$$A_{11} = (A_1 - A_0) \cdot 2,1/3,5.$$

Повторяют процедуру проверки линейной зависимости 14 раз, как это описано выше.

После каждой пары измерений рассчитывают сниженную оптическую плотность  $A_m$  по формуле

$$A_m = (A_n - A_0) \cdot V/3,5,$$

где  $A_n$  — оптическая плотность при измерении  $n$ ;

$V$  — объем содержимого кюветы при измерении  $n$ , см<sup>3</sup>.

Для каждого измерения строят график значений объема раствора НАДН в кювете с соответствующими значениями сниженной оптической плотности. Значение корреляции измерений должно быть более 0,99. Для текущей проверки спектрофотометра, фотометра или спектрального фотометра может быть использована методика, опубликованная в [3].

#### А.5 Автоматические пипетки и другие дозирующие устройства

А.5.1 Используют автоматические пипетки и другие дозирующие устройства в соответствии с инструкциями производителя.

А.5.2 Используют надлежащие наконечники для каждой пипетки.

А.5.3 Необходимо периодически (например, ежемесячно) проверять технические параметры, касающиеся объема и повторяемости автоматических пипеток и других дозирующих устройств, как это указано ниже.

Взвешивают стеклянный химический стакан с дистиллированной водой при значении времени  $t$ . Отбирают пипеткой или дозирующим устройством один объем воды в стакан и точно взвешивают при  $(t + 1)$  мин после первого взвешивания. Повторяют процедуру отбора объема воды пипеткой или дозирующим устройством девять раз. Взвешивают стакан, без отбора объема воды пипеткой или дозирующим устройством, в моменты  $(t + 11)$ ,  $(t + 12)$ ,  $(t + 13)$ ,  $(t + 14)$  и  $(t + 15)$  мин. Рассчитывают из этих взвешиваний потери на испарение за минуту. Рассчитывают объем и повторяемость дозирования воды пипеткой или дозирующим устройством, принимая во внимание потерю воды при испарении.

А.5.4 Передача тепла от ладони руки во время продолжительного использования может повлиять на объем дозируемой пробы при использовании некоторых автоматических пипеток.

Необходимо проверить это явление путем процедуры, описанной в А.5.3, и избегать использования таких пипеток.

А.5.5 Непосредственно перед использованием следует ополоснуть наконечник пипетки несколько раз раствором/суспензией, которая будет использована для отбора и дозирования. Для каждого раствора пробы следует использовать новый наконечник.

А.5.6 Отбирают пипеткой растворы пробы, буфера, фермента и кофермента, опуская наконечник как можно ниже, в различные углы кюветы.

Малые количества растворов/суспензии фермента (10—50 мкл) можно отбирать и наносить пипеткой на поверхность пластикового шпателя, затем вносить в кювету и перемешивать с ее содержимым.

А.5.7 Следует избегать загрязнения.

Для текущей поверки пипеток, автоматических пипеток и других дозирующих приборов может быть использована методика, опубликованная в [5].

#### **А.6 Другая полезная информация**

А.6.1 Следует проверить наличие возможных помех и суммарных погрешностей путем определения оптической плотности двух растворов с различными концентрациями анализируемого вещества. Полученные значения оптической плотности должны быть пропорциональны концентрации анализируемого вещества.

А.6.2 Следует использовать стандартные вещества как для проверки ферментативной реакции (реакций), так и для проверки качества работы лабораторного персонала. Этот стандарт необходимо рассматривать как рабочий.

**П р и м е ч а н и е** — Стандартные вещества, имеющие сертифицированную чистоту, можно получить от организаций, таких как Национальный институт стандартов и технологии (NIST) или Бюро эталонов Европейского сообщества.

А.6.3 Следует проводить определение степени повторного нахождения стандартного вещества, используемого в качестве внутреннего стандарта в растворе пробы. Количество добавляемого в пробу стандартного вещества должно быть примерно таким же, что уже присутствует в растворе пробы. Степень повторного нахождения стандартного вещества, как правило, должна составлять  $(100 \pm 5) \%$ .

А.6.4 Используют один пластиковый шпатель на кювету или используют каждый шпатель только один раз.

**П р и м е ч а н и е** — Количество жидкости, оставшееся на поверхности шпателя, можно рассматривать как несущественное.

**Библиография**

- [1] Номенклатура ферментов//Под редакцией А.Е. Браунштейна. — М.: ВИНТИ, 1979, 320 с.
- [2] ИСО 707:2007 Молоко и молочные продукты. Руководство по отбору проб
- [3] Колеснов А.Ю. Биохимические системы в оценке качества продуктов питания. — М.: Пищевая промышленность, 2000, 416 с.
- [4] ИСО 1736:2008 Молоко сухое и сухие молочные продукты. Определение содержания жира. Гравиметрический метод (Контрольный метод)
- [5] Leenheer J. и Jans J.A. Бюллетень МФМП, № 207, 1986, с. 122—132

УДК 637.11.001:006.354

ОКС 67.100.10

Н19

ОКСТУ 9209

Ключевые слова: пищевые продукты, сухое молоко, химический анализ, ферментативный анализ, определение содержания, D-молочная кислота, L-молочная кислота, L-лактаты, D-лактаты, ферментативный метод

Редактор Л.В. Коретникова  
Технический редактор В.Н. Прусакова  
Корректор М.В. Бучная  
Компьютерная верстка В.И. Грищенко

Сдано в набор 23.06.2011. Подписано в печать 25.07.2011. Формат 60х84<sup>1/8</sup>. Бумага офсетная. Гарнитура Ариал.  
Печать офсетная. Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 0,90. Тираж 281 экз. Зак. 659.

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.  
[www.gostinfo.ru](http://www.gostinfo.ru) [info@gostinfo.ru](mailto:info@gostinfo.ru)

Набрано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» на ПЭВМ.

Отпечатано в филиале ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» — тип. «Московский печатник», 105062 Москва, Лялин пер., 6.