

МОЛОКО

Метод определения лактулозы

Издание официальное

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 25 сентября 2002 г. № 347-ст

3 Настоящий стандарт за исключением разделов 2, 6, 7 и пунктов 3.2, 5.1—5.10, 5 и 6, 8.8.1—8.8.3 представляет собой аутентичный текст национального стандарта ФРГ ДИН 10461—90 «Молоко. Определение лактулозы»

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

© ИПК Издательство стандартов, 2002

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

Содержание

1 Область применения	1
2 Нормативные ссылки	1
3 Определение, обозначения и сокращения	1
4 Сущность метода	2
5 Реактивы	3
6 Аппаратура	4
7 Отбор проб	4
8 Проведение испытания	5
9 Выражение результатов	6
10 Отчет об испытании	7
Приложение А Массовые концентрации лактулозы в молоке	7
Приложение Б Библиография	8

МОЛОКО

Метод определения лактулозы

Milk. Method for determination of lactulose content

Дата введения 2003—10—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на молоко и устанавливает метод определения лактулозы. Стандарт применяется для идентификации пастеризованного, стерилизованного молока, молока, полученного ультравысокотемпературной (УВТ) обработкой.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты:

- ГОСТ 245—76 Натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный. Технические условия
ГОСТ 1770—74 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия
ГОСТ 3652—69 Кислота лимонная моногидрат и безводная. Технические условия
ГОСТ 3769—78 Аммоний сернокислый. Технические условия
ГОСТ 4172—76 Натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный. Технические условия
ГОСТ 4174—77 Цинк сернокислый 7-водный. Технические условия
ГОСТ 4201—79 Натрий углекислый кислый. Технические условия
ГОСТ 4207—75 Калий железистосинеродистый 3-водный. 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 10929—76 Водорода пероксид. Технические условия
ГОСТ 12026—76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия
ГОСТ 24104—88* Весы лабораторные общего назначения и образцовые. Общие технические условия
ГОСТ 25336—82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры
ГОСТ 26809—86 Молоко и молочные продукты. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу
ГОСТ 29227—91 (ИСО 835-1—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования.

3 Определение, обозначения и сокращения

3.1 В настоящем стандарте применяют следующий термин с соответствующим определением: **массовая доля лактулозы в молоке**: Массовая доля лактулозы, определенная в соответствии с настоящим стандартом и выраженная в граммах на 100 г пробы.

* С 1 июля 2002 г. введен в действие ГОСТ 24104—2001.

3.2 В настоящем стандарте применяют следующие обозначения и сокращения:

НАДФ — β-никотинамидадениндинуклеотидфосфат;

НАДФН — β-никотинамидадениндинуклеотидфосфат, восстановленная форма;

ГЗ — β-галактозидаза;

ГОД — глюкозооксидаза;

АТФ — аденозин-5'-трифосфат;

АДФ — аденозин-5'-дифосфат;

Г-6-Ф — глюкозо-6-фосфат;

Ф-6-Ф — фруктозо-6-фосфат;

ГК — гексокиназа;

Г6Ф-ДГ — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа;

ФГИ — фосфоглюкозоизомераза;

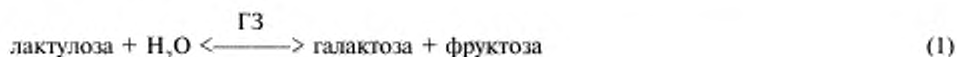
КАТ — каталаза;

Е — международная единица, определяющая количество (активность) фермента, который служит катализатором для превращения 1 мкмоль вещества в минуту при 25 °С.

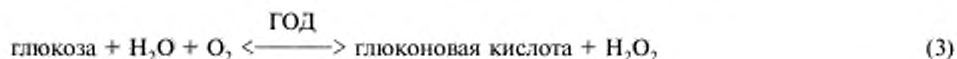
4 Сущность метода

4.1 Сущность метода

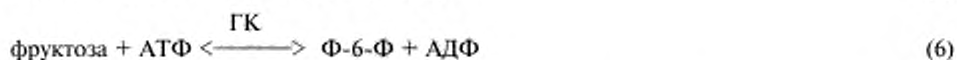
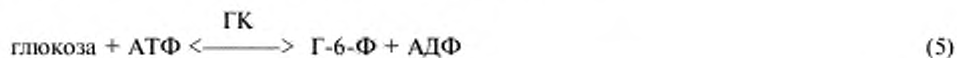
Метод основан на гидролизе лактулозы и лактозы [1], содержащихся в освобожденном от жира и белка водном экстракте пробы молока, в присутствии ГЗ с образованием моносахаров — галактозы, глюкозы и фруктозы; преобразовании фруктозы под действием НАДФ в присутствии ГК, ФГИ и Г6Ф-ДГ и фотометрическом измерении массовой доли образовавшегося НАДФН, эквивалентного массовой доле фруктозы, и расчете содержания лактулозы по разности оптических плотностей раствора пробы, в которой лактулоза подвергнута гидролизу, и раствора пробы, используемого при определении свободной фруктозы.



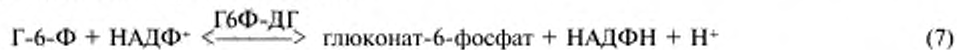
В связи с тем, что в молоке содержится значительно больше лактозы чем лактулозы (массовые концентрации лактулозы в молоке приведены в приложении А), избыток глюкозы, образующейся при гидролизе лактозы, окисляют кислородом воздуха в присутствии ГОД и КАТ.



Неокисленную глюкозу, а также фруктозу, образовавшуюся в ходе гидролиза лактулозы, подвергают фосфорилированию под действием АТФ в присутствии ГК.



Образовавшийся Г-6-Ф под действием НАДФ в присутствии Г6Ф-ДГ окисляют до глюконат-6-фосфата. Количество восстановленной формы НАДФН измеряют по величине оптической плотности при длинах волн 334, 340 или 365 нм.



Образовавшийся в ходе реакции (6) Ф-6-Ф после добавления ФГИ изомеризуется (8) в Г-6-Ф, который окисляется в ходе реакции (7). Массовую долю НАДФН, эквивалентную массовой доле фруктозы, измеряют по величине оптической плотности при длинах волн 334, 340 или 365 нм.



Для предотвращения влияния свободной фруктозы, которая может находиться в исследуемой пробе, при проведении контрольного определения не проводят гидролиз лактулозы с помощью ГЗ. Массовую долю лактулозы рассчитывают по разности оптических плотностей раствора пробы и контрольного раствора.

5 Реактивы

При проведении анализа используют реактивы х.ч. или ч.д.а.

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 лактулозы при условии соответствия их качества требованиям настоящего стандарта.

5.1 Раствор сернокислого цинка

30 г сернокислого цинка по ГОСТ 4174 ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) растворяют в 100 см³ дистиллированной воды.

5.2 Раствор гексациано-(II)-феррата калия

15 г гексациано-(II)-феррата калия ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) по ГОСТ 4207 растворяют в 100 см³ дистиллированной воды.

5.3 Буферный раствор А активной кислотностью 7,5 рН

4,80 г гидрофосфата натрия (Na_2HPO_4) по ГОСТ 4172, 0,86 г дигидрофосфата натрия ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) по ГОСТ 245 и 0,10 г сернокислого магния по ГОСТ 4523 растворяют в 80 см³ дистиллированной воды. Значение активной кислотности раствора доводят до 7,5 рН, добавляя раствор гидроксида натрия по ГОСТ 4328 молярной концентрации $c(\text{NaOH}) = 1$ моль/дм³. Объем раствора доводят дистиллированной водой до 100 см³. Приготовленного количества буферного раствора А достаточно для 15 определений.

5.4 Буферный раствор Б активной кислотностью 7,6 рН

14,0 г триэтаноламингидрохлорида [1] и 0,25 г сернокислого магния по ГОСТ 4523 растворяют в 80 см³ дистиллированной воды. Активную кислотность раствора доводят до рН 7,6 добавляя раствор гидроксида натрия по ГОСТ 4328 молярной концентрации $c(\text{NaOH}) = 1$ моль/дм³. Объем раствора доводят дистиллированной водой до 100,0 см³. Приготовленного количества раствора достаточно для 60 определений.

5.5 Буферный раствор В

40 см³ буферного раствора Б по 5.4 разбавляют дистиллированной водой до 100 см³. Приготовленного количества раствора В достаточно для 50 определений.

5.6 Натрий углекислый кислый, NaHCO_3 по ГОСТ 4201.

5.7 Раствор пероксида водорода по ГОСТ 10929 массовой долей 30 %.

5.8 Октанол-1 [2].

5.9 Гидроокись натрия по ГОСТ 4328, растворы молярных концентраций $c(\text{NaOH}) = 0,33$ моль/дм³ и $c(\text{NaOH}) = 1$ моль/дм³.

5.10 Суспензия ГЗ

Сухой лиофилизат ГЗ (ЕС 3.2.1.23) из *E.coli* [3] массой 0,005 г и активностью 150 Е суспендируют в 1 см³ раствора сернокислого аммония по ГОСТ 3769 молярной концентрации $c((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4) = 3,2$ моль/дм³ (температура ферментативного гидролиза лактозы в качестве субстрата — 25 °С). Допускается использовать препарат ГЗ с более высокой активностью — 1500 Е (температура ферментативного гидролиза 2-нитрофенил-β-D-галактозида в качестве субстрата — 37 °С). Суспензия устойчива при температуре 4 °С не менее 12 мес.

5.11 Препарат ГОД

Сухой лиофилизат ГОД (ЕС 1.1.3.4) [3] из *Aspergillus niger* второй степени очистки удельной активностью 200 Е/мг (температура ферментативного окисления глюкозы в качестве субстрата —

25 °С) или удельной активностью 230 Е/мг (температура ферментативного окисления глюкозы в качестве субстрата — 37 °С). Сухой препарат ГОД устойчив при температуре 4 °С не менее 12 мес.

5.12 Окислительный раствор

0,020 г сухого препарата ГОД по 5.11 растворяют в 1 см³ бидистиллированной воды. Раствор готовят непосредственно перед применением.

5.13 Суспензия КАТ

0,020 г сухого лиофилизата КАТ (ЕС 1.11.1.6) [3] из говяжьей печени активностью 1300 Е суспендируют в 1 см³ бидистиллированной воды (температура ферментативного окисления пероксида водорода в качестве субстрата — 25 °С). Суспензия КАТ устойчива при температуре 4 °С не менее 12 мес.

5.14 Суспензия ГК и Г6Ф-ДГ

0,002 г сухого лиофилизата ГК (ЕС 2.7.1.1) [3] из дрожжей активностью не менее 280 Е (температура ферментативного преобразования глюкозы в качестве субстрата в присутствии АТФ — 25 °С) и 0,001 г сухого лиофилизата Г6Ф-ДГ (ЕС 1.1.1.49) [3] из дрожжей [1] активностью не менее 140 Е (Г-6-Ф в качестве субстрата) суспендируют в 1 см³ раствора сернистой кислоты молярной концентрации $c((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4) = 3,2$ моль/дм³. Суспензия устойчива при температуре 4 °С не менее 12 мес.

5.15 Суспензия ФГИ

0,002 г сухого лиофилизата ФГИ (ЕС 5.3.1.9) [3] из дрожжей активностью не менее 700 Е (температура ферментативной изомеризации Ф-6-Ф в качестве субстрата — 25 °С) суспендируют в 1 см³ раствора сернистой кислоты молярной концентрации $c((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4) = 3,2$ моль/дм³. Суспензия устойчива при температуре 4 °С не более 12 мес.

5.16 Раствор АТФ

0,05 г динатриевой соли аденозин-5'-трифосфата (АТФ- $\text{Na}_2\text{H}_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$) [1] и 0,05 г гидрокарбоната натрия по ГОСТ 4201 растворяют в 1 см³ дистиллированной воды. Раствор устойчив при температуре 4 °С не более трех недель.

5.17 Раствор НАДФ

0,01 г динатриевой соли β-никотинамидадениндинуклеотидфосфата (β-НАДФ- Na_2) [1] растворяют в 1 см³ дистиллированной воды. Раствор устойчив при температуре 4 °С не более трех недель.

6 Аппаратура

Обычная лабораторная аппаратура, а также:

6.1 Весы лабораторные общего назначения наибольшим пределом взвешивания 20 г, 2-го класса точности по ГОСТ 24104.

6.2 Дозаторы пипеточные объемами доз 0,02; 0,05; 0,10; 0,50; 1,0; 2,0; 5,0 и 10 см³ и относительной погрешностью дозирования ±1 % [4] и пипетки градуированные номинальной вместимостью 2 и 10 см³ по ГОСТ 29227.

6.3 Колбы мерные номинальной вместимостью 10, 20 и 100 см³, 2-го класса точности по ГОСТ 1770.

6.4 Фильтры гофрированные бумажные диаметром 7 и 12,5 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 для 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 Колба коническая со шлифом номинальной вместимостью 50 см³ по ГОСТ 25336.

6.9 Воронка стеклянная диаметром 5,5 см по ГОСТ 25336.

6.10 Термостат водяной, позволяющий поддерживать температуру (40±2) °С.

7 Отбор проб

Отбор проб — по ГОСТ 26809.

8 Проведение испытания

8.1 Перед испытанием пробу хорошо перемешивают.

8.2 Приготовление разбавленного раствора пробы

Пробу молока массой 50,00 г количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³ и доводят объем молока дистиллированной водой до метки. Содержимое колбы хорошо перемешивают.

8.3 Осветление разбавленного раствора пробы

10,0 см³ разбавленного раствора пробы по 8.2 количественно переносят в коническую колбу со шлифом вместимостью 50 см³ или в мерную колбу вместимостью 20 см³.

К раствору медленно добавляют 1,75 см³ раствора сернокислого цинка по 5.1 и 1,75 см³ раствора гексациано-(II)-феррата калия по 5.2. После добавления каждого реагента содержимое колбы энергично перемешивают.

К содержимому колбы добавляют 6,5 см³ буферного раствора А по 5.3 и перемешивают. После выдержки в течение 20 мин содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр диаметром 12,5 см³.

8.4 Гидролиз лактулозы и лактозы

5,0 см³ фильтрата по 8.3 количественно переносят в мерную колбу вместимостью 10 см³. В колбу добавляют 0,05 см³ суспензии ГЗ по 5.10, закрывают и выдерживают при 40 °С в течение 10 ч.

8.5 Окисление глюкозы

В раствор 8.4 добавляют 2,0 см³ буферного раствора В по 5.5; 0,1 см³ окислительного раствора по 5.12; 1 каплю октанола-1 (пеносгаситель); 0,5 см³ раствора гидроксида натрия по 5.9 молярной концентрации $c(\text{NaOH}) = 0,33 \text{ моль/дм}^3$ (для нейтрализации образующейся глюконовой кислоты); 0,05 см³ раствора пероксида водорода по 5.7 и 0,1 см³ суспензии КАТ по 5.13. Содержимое колбы перемешивают и выдерживают при 40 °С в течение 3 ч.

8.6 Фильтрация раствора

Объем раствора в колбе по 8.5 доводят до метки дистиллированной водой. Содержимое перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр диаметром 7 см.

8.7 Контрольный раствор

В качестве контрольного служит разбавленный раствор пробы по 8.2, который обрабатывают согласно 8.3—8.6, не используя суспензию ГЗ для гидролиза лактулозы и лактозы.

8.8 Определение

8.8.1 Испытание раствора пробы проводят при комнатной температуре. Измерения оптической плотности раствора проводят на спектрофотометре (фотометре) при длине волны 340 нм, а при применении спектрофотометра с ртутной лампой — при длинах волн 334 или 365 нм.

8.8.2 Растворы пробы, ферментов, коферментов, а также буферные растворы дозируют в кювету спектрофотометра (фотометра) пипеточным дозатором или градуированной пипеткой. При дозировании пробы необходимо избегать попадания капель пробы на стенки кюветы.

8.8.3 Определение содержания лактулозы проводят в три этапа. Дозируемые в кювету спектрофотометра (фотометра) компоненты, последовательность их дозирования и объемы доз для первого этапа испытания указана в таблице 1.

Таблица 1 — Первый этап испытания

В кубических сантиметрах

Компонент, дозируемый в кювету, и последовательность дозирования	Объем компонента, дозируемого в кювету	
	контроль	проба
Буферный раствор Б по 5.4	1,00	1,00
Раствор АТФ по 5.16	0,10	0,10
Раствор НАДФ по 5.17	0,10	0,10
Фильтрат	1,00 по 8.6	1,00 по 8.7
Дистиллированная вода	1,00	1,00

Содержимое кювет перемешивают шпателем или стеклянной палочкой, выдерживают при комнатной температуре 3 мин и затем измеряют оптические плотности контрольного раствора $A_{1к}$ и раствора пробы $A_{1пр}$ на спектрофотометре или фотометре.

8.8.4 Второй этап испытания

Иницируют ферментативную реакцию, добавляя в каждую кювету по 0,02 см³ суспензии ГК и Г6Ф-ДГ по 5.14.

Содержимое кювет перемешивают шпателем или стеклянной палочкой, выдерживают при комнатной температуре в течение 10 мин для завершения реакции и затем измеряют оптические плотности контрольного раствора $A_{2к}$ и раствора пробы $A_{2пр}$ на спектрофотометре или фотометре.

8.8.5 Третий этап испытания

Иницируют изомеризацию фруктозы в глюкозу, добавляя в каждую кювету по 0,02 см³ суспензии ФГИ по 5.15.

Содержимое кювет перемешивают шпателем или стеклянной палочкой, выдерживают при комнатной температуре в течение 10—15 мин для завершения реакции и затем измеряют оптические плотности контрольного раствора $A_{3к}$ и раствора пробы $A_{3пр}$ на спектрофотометре или фотометре.

Примечание — Если рассчитанные разности оптических плотностей раствора пробы и контрольного раствора более 1,3, объем используемого в определении фильтрата по 8.6 (проба) и 8.7 (контроль) уменьшают. Для сохранения постоянным общего объема реакционной смеси в кювете (3,24 см³) увеличивают объем добавляемой дистиллированной воды.

9 Выражение результатов

9.1 Расчет

Вычисляют разности оптических плотностей для образца пробы $\Delta A_{пр}$ и контрольного $\Delta A_{к}$ по формулам

$$\Delta A_{пр} = A_{3пр} - A_{2пр} \quad (9)$$

$$\Delta A_{к} = A_{3к} - A_{2к} \quad (10)$$

Изменение оптической плотности, вызванное гидролизом лактулозы $\Delta A_{лакт}$, вычисляют по формуле

$$\Delta A_{лакт} = \Delta A_{пр} - \Delta A_{к} \quad (11)$$

Массовую долю W лактулозы в пробе, г/100 г, вычисляют по формуле

$$W = \frac{M V_1 4 \cdot 1000}{\varepsilon d V_2 100 m 1000} \cdot \Delta A_{лакт}, \quad (12)$$

где M — молярная масса лактулозы, г/моль (342,30 г/моль);

V_1 — общий объем раствора в кювете, см³ (3,24 см³);

ε — молярный коэффициент поглощения НАДФН, дм³·ммоль⁻¹·см⁻¹;

- при 340 нм — 6,3,

- при 365 нм — 3,4 (ртутная лампа),

- при 334 нм — 6,18 (ртутная лампа);

d — толщина поглощающего слоя в кювете, см;

V_2 — объем пробы, см³ (1,00 см³ по 8.6);

m — навеска пробы по 8.2, г.

За результат испытания принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений, округленное 0,1 г/100 г.

9.2 Точность испытания

Показатели точности установлены при испытании проб молока, подвергнутого УВТ-обработке, массовой долей лактулозы 0,028 г/100 г пробы и при испытании проб стерилизованного молока массовой долей лактулозы 0,105 г/100 г пробы.

9.2.1 Сходимость

Абсолютное расхождение между результатами двух параллельных определений, выполненных в одной лаборатории, не должно превышать более чем в 5 % случаев показатели сходимости г, г/100 г:

- 0,001 — для молока УВТ-обработки,

- 0,003 — для стерилизованного молока.

Среднеквадратичное отклонение результатов определений (s), г/100 г, составляет:

- 0,00035 — для молока УВТ-обработки,
- 0,00106 — для стерилизованного молока.

9.2.2 Воспроизводимость

Абсолютное расхождение между результатами двух измерений, выполненных в двух лабораториях, не должно превышать более чем в 5 % случаев показатель воспроизводимости R , г/100 г:

- 0,003 — для молока УВТ-обработки,
- 0,008 — для стерилизованного молока.

Среднеквадратичное отклонение результатов измерений (s_R), г/100 г, составляет:

- 0,00106 — для молока УВТ-обработки,
- 0,00283 — для стерилизованного молока.

10 Отчет об испытании

В отчете об испытании должны быть указаны:

- вид пробы;
- способ отбора пробы,
- массовая доля лактулозы в граммах на 100 г пробы;
- дата испытания.

ПРИЛОЖЕНИЕ А (справочное)

Массовые концентрации лактулозы в молоке [5], [6]

Таблица А.1

Вид молока	Массовая концентрация, мг/100 см ³
Сырое или пастеризованное молоко	0
Молоко после УВТ-обработки	5—71,5
Стерилизованное молоко	Более 71,5

ПРИЛОЖЕНИЕ Б
(справочное)

Библиография

- [1] Boehringer Mannheim. Methoden der enzymatischen BioAnalytik und Lebensmitteleanalytik mit Test-Combinationen, 1995
- [2] ТУ 6-093506—78 Октанол-1
- [3] Номенклатура ферментов. Рекомендации Международного биохимического союза по номенклатуре и классификации ферментов, а также единицам ферментов и символам кинетики ферментативных реакций. М. 1979
- [4] ТУ 64-13329—81 Дозаторы пипеточные
- [5] G.R. Andrews "Distinguishing pasteurized, UHT and sterilized milks by their lactulose content", Journal of the Society of Dairy Technology. — Vol. 37. — No. 3. — pp. 92—95, 1984
- [6] H. Geier, H. Klostermeyer "Formation of lactulose during heat treatment of milk", Milchwissenschaft. — Band 38, Nr. 8, S. 475—477, 1983

УДК 637.1.074:543.854.7:006.354

ОКС 67.100.10

Н19

ОКСТУ 9209

Ключевые слова: молоко, лактулоза, ферментативное определение, спектрофотометрия

Редактор *Т.И. Шашина*
Технический редактор *И.С. Гришанова*
Корректор *В.И. Капуркина*
Компьютерная верстка *Е.Н. Мартыановой*

Изд. лиц. № 02354 от 14.07.2000. Слано в набор 08.10.2002. Подписано в печать 28.10.2002. Усл. печ. л. 1,40.
Уч.-изд. л. 0,97. Тираж 394 экз. С 7926. Зак. 952.

ИПК Издательство стандартов, 107076 Москва, Колодезный пер., 14.

<http://www.standards.ru> e-mail: info@standards.ru

Набрано в Издательстве на ПЭВМ

Филиал ИПК Издательство стандартов — тип. «Московский печатник», 105062 Москва, Лялин пер., 6.
Плр № 080102