

---

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

---



НАЦИОНАЛЬНЫЙ  
СТАНДАРТ  
РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р  
51196—  
2010  
(ISO 8069:2005)

---

## МОЛОКО СУХОЕ

### Определение содержания молочной кислоты и лактатов

ISO 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*

© Стандартинформ, 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

## 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

**П р и м е ч а н и е** — 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 реагенты — ферменты [1], коферменты и активаторы, кото-

# ГОСТ Р 51196—2010

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 никотинамиадениндинуклеотида (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  $\alpha$ -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), с ( $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ ) = 35,9 г/дм<sup>3</sup>

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, с ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) = 71,8 г/дм<sup>3</sup>

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, с (NaOH) = 10 моль/дм<sup>3</sup>

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

#### 5.3.2 Раствор II натрия гидроксида, с (NaOH) = 0,1 моль/дм<sup>3</sup>

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, с $[(NH_4)_2SO_4]$ = 3,2 моль/дм<sup>3</sup>

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 дробленым 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 ферmenta согласно вышеприведенным указаниям.

Раствор L-ЛДГ стабилен 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, приготовляют 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). рН 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, приготовляют 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 г 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 ( $C_3H_5O_3Li$ ) растворяют в воде. Разбавляют водой до 500 см<sup>3</sup> и перемешивают.

### 5.12 Раствор D-лактата лития

50 мг D-лактата лития ( $C_3H_5O_3Li$ ) 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 Стеклянный 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 Стеклянный 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 Стеклянная 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 реагенты, 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 реагентов

8.1.1 Проверку качества реагентов по нижеприведенной процедуре проводят:

- во всех случаях при приготовлении новой партии реагентов (включая 5.6—5.10);
- после хранения реагентов 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 реагентов.

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 ( $V_1 = 2,24$  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 ( $V_1 = 2,27$  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 ( $\Pi H$ ) L- или D-лактата лития в любой из колб (см. 8.1.2) должна быть в диапазоне (100 ± 5) %. Если  $\Pi H$  не находится в данном диапазоне, осуществляют проверку реагентов, метода выполнения работы, точности пипеток и параметров спектрофотометра. Для проверки реагентов и оборудования могут быть использованы методы текущей проверки, применяемые в биохи-

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

**П р и м е ч а н и е** — Степень повторного нахождения ( $\Pi_H$ ) — 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 пробы	Стандарт D-лактата лития	Стандарт L-лактата 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 ( $A_{b0}$  и  $A_{s0}$ ) инкубационной смеси во всех кюветах относительно воды при длине волны 340 нм.

Через 45 мин измеряют повторно оптическую плотность инкубационной смеси во всех кюветах ( $A_{b45}$  и  $A_{s45}$ ) относительно воды при длине волны 340 нм.

Следующее измерение проводят через 60 мин. Измеряют оптическую плотность инкубационной смеси во всех кюветах ( $A_{b60}$  и  $A_{s60}$ ) 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

$$A = [(A_{s60} - A_{s0}) - 4(A_{s60} - A_{s45})] - [(A_{b60} - A_{b0}) - 4(A_{b60} - A_{b45})], \quad (3)$$

где  $A_{s60}$  — оптическая плотность пробы через 60 мин по 8.2.1;

$A_{s0}$  — оптическая плотность пробы по 8.2.1;

$A_{s45}$  — оптическая плотность пробы через 45 мин по 8.2.1;

$A_{b60}$  — оптическая плотность контрольной пробы через 60 мин по 8.2.1;

$A_{b0}$  — оптическая плотность контрольной пробы по 8.2.1;

$A_{b45}$  — 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

$$A = [(A_{s45} - A_{s0}) - 3(A_{s45} - A_{s30})] - [(A_{b45} - A_{b0}) - 3(A_{b45} - A_{b30})], \quad (4)$$

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

$$w_L = \frac{A \cdot M_r}{k \cdot l \cdot m} \cdot \frac{V_1 \cdot V_4 \cdot V_5}{V_2 \cdot V_3} \cdot \frac{100}{w_s} \cdot 10^5, \quad (5)$$

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  $6,3 \times 10^6 \text{ см}^2/\text{моль}$ ;

$l$  — длина оптического пути кюветы для фотометрических измерений ( $l = 1 \text{ см}$ ), 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  $V_1 = 2,29 \text{ см}^3$ ,

- при определении только L-молочной кислоты и L-лактата  $V_1 = 2,24 \text{ см}^3$ ,

- при определении только D-молочной кислоты и D-лактата  $V_1 = 2,27 \text{ см}^3$ ;

$V_2$  — 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.  $V_4 = 100 \text{ см}^3$ ), см<sup>3</sup>;

$V_5$  — объем, до которого пробы 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 испытуемому 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 ≤ 60 мг на 100 г сухих обезжиренных веществ:  $r = 10 \text{ мг}/100 \text{ г}$ ;

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 испытуемому 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:  $R = 15 \text{ мг}/100 \text{ г}$ ;
- 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.

**Приложение А  
(рекомендуемое)**

**Правила надлежащей лабораторной практики (GLP) для выполнения  
ферментативного анализа пищевых продуктов**

**A.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.

**A.2 Реактивы**

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

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

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

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

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

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

A.2.7 Не следует замораживать суспензии ферментов.

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

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

**A.3 Фотометрические и спектрофотометрические кюветы**

A.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:

- a) ниже стоимость (одноразовое применение);
- b) возможно проведение большего числа анализов;

с) в рамках одной партии пластиковые кюветы удовлетворительно подходят с точки зрения измерений оптической плотности.

A.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 поверки кювет может быть использована методика, опубликованная в [3].

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

A.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.

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

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

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

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

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

#### **A.4 Фотометры и спектрофотометры**

**A.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.

**П р и м е ч а н и е** — Коэффициенты оптической плотности (экстинкции) НАДН и НАДФН, измеренные при 334, 340 и 365 нм, являются следующими:

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

**A.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  $A_{r1}$  по формуле

$$A_{r1} = (A_1 - A_0) \cdot 2,1/3,5.$$

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 поверки спектрофотометра, фотометра или спектрального фотометра может быть использована методика, опубликованная в [3].

#### **A.5 Автоматические пипетки и другие дозирующие устройства**

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

**A.5.2** Используют надлежащие наконечники для каждой пипетки.

**A.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.

**A.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.

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

## **ГОСТ Р 51196—2010**

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

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

A.5.7 Следует избегать загрязнения.

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

### **A.6 Другая полезная информация**

A.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.

A.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.

A.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  $(100 \pm 5)\%$ .

A.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.: ВИНИТИ, 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

# ГОСТ Р 51196—2010

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. Коротникова*  
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 60x84<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.