

---

---

**Молоко. Определение содержания  
лактозы. Ферментный метод с  
использованием разницы pH**

*Milk — Determination of lactose content — Enzymatic method using  
difference in pH*

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

ISO 26462:2010

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d0c8aef6-09c5-4622-96ee-037d6fc243da/iso-26462-2010>

Ответственность за подготовку русской версии несёт GOST R  
(Российская Федерация) в соответствии со статьёй 18.1 Устава



Ссылочные номера  
ISO 26462:2010(R)  
IDF 214:2010(R)

**Отказ от ответственности при работе в PDF**

Настоящий файл PDF может содержать интегрированные шрифты. В соответствии с условиями лицензирования, принятыми фирмой Adobe, этот файл можно распечатать или вывести на экран, но его нельзя изменить, пока не будет получена лицензия на загрузку интегрированных шрифтов в компьютер, на котором ведется редактирование. В случае загрузки настоящего файла заинтересованные стороны принимают на себя ответственность за соблюдение лицензионных условий фирмы Adobe. Ни Центральный секретариат ISO, ни IDF не несут никакой ответственности в этом отношении.

Adobe торговый знак фирмы Adobe Systems Incorporated.

Подробности, относящиеся к программным продуктам, использованным для создания настоящего файла PDF, можно найти в рубрике General info файла; параметры создания PDF были оптимизированы для печати. Были приняты во внимание все меры предосторожности с тем, чтобы обеспечить пригодность настоящего файла для использования комитетами-членами ISO и национальными комитетами IDF. В редких случаях возникновения проблемы, связанной со сказанным выше, просьба проинформировать Центральный секретариат по адресу, приведенному ниже.

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

ISO 26462:2010

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d0c8aef6-09c5-4622-96ee-037d6fc243da/iso-26462-2010>



**ДОКУМЕНТ ЗАЩИЩЕН АВТОРСКИМ ПРАВОМ**

© ISO и IDF 2010

Все права сохраняются. Если не указано иное, никакую часть настоящей публикации нельзя копировать или использовать в какой-либо форме или каким-либо электронным или механическим способом, включая фотокопии и микрофильмы, без предварительного письменного согласия ISO или IDF по соответствующему адресу, указанному ниже.

ISO copyright office  
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20  
Tel. + 41 22 749 01 11  
Fax + 41 22 749 09 47  
E-mail [copyright@iso.org](mailto:copyright@iso.org)  
Web [www.iso.org](http://www.iso.org)

International Dairy Federation  
Diamant Building • Boulevard Auguste Reyers 80 • B-1030 Brussels  
Tel. + 32 2 733 98 88  
Fax + 32 2 733 04 13  
E-mail [info@fil-idf.org](mailto:info@fil-idf.org)  
Web [www.fil-idf.org](http://www.fil-idf.org)

Опубликовано в Швейцарии

## Содержание

Страница

Предисловие .....	iv
Предисловие .....	v
1 Область применения .....	1
2 Термины и определения .....	1
3 Сущность метода .....	1
4 Реактивы .....	1
5 Оборудование .....	3
6 Отбор проб .....	3
7 Приготовление пробы для испытания .....	3
8 Процедура .....	4
8.1 Общее .....	4
8.2 Холостое определение .....	4
8.3 Калибровка .....	4
8.4 Проверка калибровки .....	5
8.5 Определение .....	5
8.6 Проверка стабильности .....	6
8.7 Процедура очистки .....	6
9 Уход за электродами .....	6
9.1 Регенерация .....	6
9.2 Сильная регенерация .....	6
10 Вычисление и выражение результатов .....	6
10.1 Вычисление .....	6
10.2 Выражение результатов .....	7
11 Прецизионность .....	7
11.1 Межлабораторное испытание .....	7
11.2 Повторяемость .....	7
11.3 Воспроизводимость .....	7
12 Протокол испытания .....	7
Приложение А (информативное) Основная диаграмма дифференциального рН-метра .....	8
Приложение В (информативное) Совместное испытание .....	9
Приложение С (информативное) Сравнение методов рН и высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) .....	10
Библиография .....	11

## Предисловие

**Международная организация по стандартизации (ISO)** является всемирной федерацией национальных организаций по стандартизации (комитетов-членов ISO). Разработка международных стандартов обычно осуществляется техническими комитетами ISO. Каждый комитет-член, заинтересованный в деятельности, для которой был создан технический комитет, имеет право быть представленным в этом комитете. Международные правительственные и неправительственные организации, имеющие связи с ISO, также принимают участие в работах. Что касается стандартизации в области электротехники, ISO работает в тесном сотрудничестве с Международной электротехнической комиссией (IEC).

Проекты международных стандартов разрабатываются по правилам, указанным в Директивах ISO/IEC, Часть 2.

Главная задача технических комитетов состоит в разработке международных стандартов. Проекты международных стандартов, принятые техническими комитетами, рассылаются комитетам-членам на голосование. Их опубликование в качестве международных стандартов требует одобрения, по меньшей мере, 75 % комитетов-членов, принимающих участие в голосовании.

Обращается внимание на возможность того, что некоторые элементы данного международного стандарта могут быть объектом патентных прав. ISO не несет ответственности за идентификацию какого-либо или всех таких патентных прав.

ISO 26462|IDF 214 был разработан Техническим комитетом ISO/TC 34, *Пищевые продукты*, Подкомитетом SC 5, *Молоко и молочные продукты*, и Международной молочной федерацией (IDF). Он публикуется совместно ISO и IDF.

[ISO 26462:2010](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d0c8aef6-09c5-4622-96ee-037d6fc243da/iso-26462-2010)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d0c8aef6-09c5-4622-96ee-037d6fc243da/iso-26462-2010>

## Предисловие

**Международная молочная федерация (IDF)** является некоммерческой организацией, представляющей мировой молочный сектор. Членами IDF являются национальные комитеты в каждой стране-члене, а также региональные молочные ассоциации, подписавшие официальное соглашение о сотрудничестве с IDF. Все члены IDF имеют право быть представленными в постоянных комитетах IDF, выполняющих техническую работу. IDF сотрудничает с ISO в разработке стандартных методов анализа и отбора проб молока и молочных продуктов.

Главной задачей постоянных комитетов является разработка международных стандартов. Проекты международных стандартов, принятые рабочими группами и постоянными комитетами рассылаются национальным комитетам на голосование. Их опубликование в качестве международных стандартов требует одобрения не менее 50% национальных комитетов, принимающих участие в голосовании.

Следует иметь в виду, что некоторые элементы настоящего международного стандарта могут быть объектом патентных прав. IDF не несет ответственности за идентификацию какого-либо одного или всех таких патентных прав.

ISO 26462 | IDF 214 был подготовлен Международной молочной федерацией (IDF) и Техническим комитетом ISO/TC 34 *Пищевые продукты*, Подкомитетом SC 5 *Молоко и молочные продукты*. Этот стандарт публикуется совместно IDF и ISO.

Вся работа была проделана Совместной инициативной группой ISO-IDF по *Ферментному определению лактозы* Постоянного комитета по *Методам анализа состава* под руководством разработчика проекта P. Trossat (Франция).

[ISO 26462:2010](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d0c8aef6-09c5-4622-96ee-037d6fc243da/iso-26462-2010)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d0c8aef6-09c5-4622-96ee-037d6fc243da/iso-26462-2010>



# Молоко. Определение содержания лактозы. Ферментный метод с использованием разницы рН

## 1 Область применения

Настоящий международный стандарт устанавливает ферментный метод для определения содержания лактозы в молоке и восстановленном молоке путем измерения разницы рН (дифференциальное измерение рН).

## 2 Термины и определения

Применительно к этому международному стандарту используются следующие термины и определения.

### 2.1

**содержание лактозы в молоке**

**lactose content in milk**

величина концентрации вещества в соединениях, определенная методом, установленным в этом международном стандарте

**ПРИМЕЧАНИЕ** Содержание лактозы в молоке выражают в миллимолях на литр. Преобразование результата в другие единицы см. в Таблице 1.

### 2.2

**единица активности ферментов**

**unit of enzyme activity**

**международная единица**

**international unit**

**стандартная единица**

**standard unit**

**U**

количество фермента, которое катализирует превращение одного микромоля субстрата в минуту в стандартных условиях

## 3 Сущность метода

$\beta$ -Галакто시다зу добавляют, чтобы расщепить лактозу на глюкозу и галактозу. При рН 7,8 глюкоза фосфорилируется глюкокиназой, тем самым выделяя протоны, которые вызывают изменение рН. Изменение рН меняется в зависимости от содержания лактозы в пробе и измеряется путем использования дифференциального анализатора рН.

## 4 Реактивы

Если нет других указаний, для анализа используют реактивы только признанной аналитической чистоты и дистиллированную или деминерализованную воду или воду эквивалентной чистоты.

#### 4.1 Буферный раствор, pH 7,8

Растворяют 0,242 г трис(гидроксиметил)метиламина (трис), 0,787 г динатриевой соли аденозина 5'-трифосфата (АТФ), 0,304 г фосфата тринатрия ( $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ), 0,009 г гидроксида натрия (NaOH), 0,203 г гексагидрата хлорида магния ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), 2 г октилфеноксиполиэтоксилэтанола [например, Тритон X100<sup>1)</sup>], 0,820 г хлорида калия (KCl) и 0,010 г 2-бromo-2-нитропропан-1,3-диола [например, Бронопол<sup>1)</sup>] в колбе вместимостью 100 мл, содержащей 50 мл воды, при непрерывном помешивании. При необходимости регулируют окончательный pH до  $7,8 \pm 0,1$ . Помещают в 100-мл мерную колбу с одной меткой (5.4), добавляют до метки воду и перемешивают.

Буферный раствор можно хранить в течение 2 месяцев при 4 °C.

#### 4.2 Растворы ферментов

##### 4.2.1 Раствор фермента глюкокиназы

Растворяют 2,57 мг лиофилизированной глюкокиназы-1 (ГК1; 1 мг = 350 U; класс фермента ФК 2.7.1.2) в 3 мл глицерина с объемной долей 50 %. Полученная активность раствора глюкокиназы составляет 290 U/мл  $\pm$  30 U/мл (см. 2.2).

Раствор фермента глюкокиназы можно хранить 6 месяцев при 4 °C.

##### 4.2.2 Раствор фермента $\beta$ -галактосидазы

Растворяют концентрированный экстракт  $\beta$ -галактосидазы (ФК 3.2.1.23), очищенный от загрязняющих ферментов глицерином, с объемной долей 50 %. Полученная активность раствора  $\beta$ -галактосидазы составляет 1 500 U/мл  $\pm$  200 U/мл.

Раствор фермента  $\beta$ -галактосидазы можно хранить 6 месяцев при 4 °C.

#### 4.3 Стандартный раствор лактозы (150 ммоль/л)

Перед использованием определяют содержание воды в порошковом моногидрате лактозы методом титрования Карла Фишера, чтобы сделать поправку для количества моногидрата лактозы, используемого для стандартного раствора лактозы. Поправка должна быть основана на определенном процентном содержании воды, для того чтобы приготовить стандартный раствор лактозы, содержащий 5,404 г моногидрата лактозы на 100 мл.

Растворяют 5,404 г порошка моногидрата лактозы, 0,745 г хлорида калия (KCl) и 0,01 г 2-бromo-2-нитропропан-1,3-диола [например, Бронопол<sup>1)</sup>] в буферном растворе при pH 7,8 (4.1) в мерной колбе вместимостью 100 мл с одной меткой (5.4). Добавляют до метки воду и перемешивают.

Стандартный раствор лактозы можно хранить 6 месяцев при 4 °C.

#### 4.4 Очищающий раствор

Растворяют 1,742 г моногидрогенфосфата калия ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), 1,361 г дигидрогенфосфата калия ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 7,455 г хлорида калия (KCl), 1,00 г азидата натрия ( $\text{NaN}_3$ ), 2 г октилфеноксиполиэтоксилэтанола, 2 г додецилэфира полиоксиэтиленгликоля [например, Бридж 35<sup>1)</sup>] и 3 г лаурилового мальтозида [например, LM<sup>1)</sup>] в мерной колбе вместимостью 1000 мл с одной меткой (5.4). Добавляют до метки воду и перемешивают.

Очищающий раствор можно хранить год при комнатной температуре.

---

1) Пример подходящего продукта, имеющегося в продаже. Эта информация дается для удобства пользователей настоящего документа и не является рекомендацией указанного продукта со стороны ISO или IDF.



#### 4.5 Регенерирующий раствор

В качестве регенерирующего раствора используют раствор соляной кислоты концентрацией 0,1 моль/л.

Регенерирующий раствор можно хранить в течение года при комнатной температуре.

#### 4.6 Крепкий регенерирующий раствор

**ВОЗМОЖНАЯ ОПАСНОСТЬ** — Использование фторида натрия (NaF), одного или в комбинации с HCl, может вызвать проблемы со здоровьем, обусловленные его вдыханием и/или воздействием на кожу. Настоящий международный стандарт не претендует на рассмотрение всех проблем безопасности, связанных с его использованием, если таковые имеются. Пользователь сам должен устанавливать соответствующие правила безопасности и защиты здоровья и обеспечивать соответствие всем национальным регламентам.

Растворяют 30 г азотной кислоты ( $\text{HNO}_3$ ) с массовой долей  $w(\text{HNO}_3) \approx 69\%$ , 30 г соляной кислоты (HCl) с массовой долей  $w(\text{HCl}) \approx 37\%$ , 30 г фторида натрия (NaF) и 1 г октилфеноксиполиэтоксиэтанола в 1 000-мл мерной колбе с одной меткой (5.6). Добавляют воду до метки и перемешивают.

Крепкий регенерирующий раствор можно хранить в течение 1 года в некорродирующем материале при комнатной температуре.

### 5 Оборудование

Обычное лабораторное оборудование и, в частности, следующее.

**5.1 Аналитические весы**, обеспечивающие взвешивание с точностью до 1 мг.

**5.2 Микропипетки**, вместимостью 20 мкл, ISO 7550<sup>[5]</sup>, с регулируемым объемом дозы.

**5.3 Водяная баня**, обеспечивающая поддержание температуры  $38\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ .

**5.4 Мерные колбы с одной меткой**, вместимостью 100 мл и 1 000 мл, ISO 1042<sup>[2]</sup> класс А.

**5.5 Дифференциальный pH-метр**, показанный схематически на Рисунке А.1.

Дифференциальный pH-метр состоит из перистальтических насосов для циркуляции жидкостей, смесительной камеры, двух стеклянных капиллярных проточных электродов (E1 и E2) и электронной системы для измерения.

**5.6 Мерные колбы с одной меткой**, вместимостью 1 000 мл, из материала, обеспечивающего хранение крепкого регенерирующего раствора с высокой коррозионностью (4.6).

### 6 Отбор проб

Отбор проб не является частью метода, установленного в настоящем международном стандарте. Рекомендованный метод отбора проб дан в ISO 707 | IDF 50<sup>[1]</sup>.

Важно, чтобы лаборатория получила действительно представительную пробу, которая не была повреждена или изменена во время транспортировки или хранения.

### 7 Приготовление пробы для испытания

Пробу для испытания нагревают до  $38\text{ °C}$  в водяной бане (5.3) при перемешивании её. Перед изготовлением испытательного образца пробу охлаждают до  $20\text{ °C}$ .

## 8 Процедура

### 8.1 Общие положения

Поскольку различные типы имеющихся дифференциальных рН-метров (5.5) различаются по конструкции и обслуживанию, оператор должен тщательно следовать инструкциям изготовителя при установке, калибровке и эксплуатации прибора. После включения прибора дают возможность рабочему режиму стабилизироваться.

Если время между двумя последовательными измерениями составляет 5 мин или больше, обновляют буферный раствор (4.1) в смесительной камере прибора.

### 8.2 Холостое определение

С помощью микропипетки (5.2) добавляют 20 мкл раствора фермента глюкокиназы (4.2.1) в смесительную камеру дифференциального рН-метра (5.5).

Разбавляют раствор фермента (4.1) до полного объема 1 200 мкл и перемешивают.

Заполняют проточные электроды E1 и E2 (см. Рисунок А.1) рН-метра (5.5) полученной смесью буферного раствора и глюкокиназы. Измеряют дифференциальный рН смещения,  $D_1$ , между двумя электродами. Разность между электродами должна быть  $0 \text{ мрН} \pm 150 \text{ мрН}$ , где мрН есть милли-рН единица.

Используя другую микропипетку, добавляют 20 мкл раствора фермента  $\beta$ -галактосидазы (4.2.2) к смеси буферного раствора и глюкокиназы в смесительной камере и перемешивают. Наполняют только E2 смесью буферного раствора, глюкокиназы и  $\beta$ -галактосидазы. Снова измеряют смещение дифференциального рН,  $D_2$ , между двумя электродами.

Вычисляют численное значение разности рН для холостого раствора,  $\Delta D_0$ , используя Уравнение (1):

$$\Delta D_0 = D_2 - D_1 \quad (1)$$

где

$D_1$  численное значение дифференциального рН между электродами, заполненными смесью буферного раствора и глюкокиназы;

$D_2$  численное значение рН между электродом E1, заполненным смесью буферного раствора и глюкокиназы, и электродом E2, заполненным смесью буферного раствора, глюкокиназы и  $\beta$ -галактосидазы.

Разность,  $\Delta D_0$ , должна быть в диапазоне от  $-20 \text{ мрН}$  единиц до  $4 \text{ мрН}$  единиц, а разность между двумя последовательными дифференциальными измерениями  $\leq 1,0 \text{ мрН}$  единицы.

Если эти результаты не получены, проверяют буферный раствор и повторяют вышеописанную процедуру. Если результаты все еще не удовлетворяют требованию(ям), очищают электроды (см. 8.7) и снова повторяют холостое определение, установленное в первых четырех абзацах этого подраздела.

### 8.3 Калибровка

#### 8.3.1 Разность рН в калибровочном растворе

Добавляют одной микропипеткой (5.2) 20 мкл стандартного раствора лактозы (4.3), а другой 20 мкл раствора фермента глюкокиназы (4.2.1) в смесительную камеру дифференциального рН-метра (5.5). Разбавляют буферным раствором (4.1) до полного объема 1 200 мкл. Заполняют электроды E1 и E2 полученной смесью буферного раствора, стандартного раствора лактозы и глюкокиназы. Измеряют