



МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
СТАНДАРТ

ГОСТ  
ISO 22160—  
2015

## МОЛОКО И МОЛОЧНЫЕ НАПИТКИ

Определение активности щелочной фосфатазы.  
Метод с применением фотоактивной ферментной системы (EPAS)

(ISO 22160:2007, IDT)



Издание официальное

Зарегистрирован

№ 10843

27 февраля 2015 г.



## Предисловие

Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации (ЕАСС) представляет собой региональное объединение национальных органов по стандартизации государств, входящих в Содружество Независимых Государств. В дальнейшем возможно вступление в ЕАСС национальных органов по стандартизации других государств.

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0-92 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2-2009 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Порядок разработки, принятия, применения, обновления и отмены».

### Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН научно-производственным республиканским унитарным предприятием «Белорусский государственный институт стандартизации и сертификации» (БелГИСС)

2 ВНЕСЕН Госстандартом Республики Беларусь

3 ПРИНЯТ Евразийским советом по стандартизации, метрологии и сертификации по переписке (протокол 75-П от 27 февраля 2015 г.)

За принятие стандарта проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ISO 3166) 004—97	Код страны по МК (ISO 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Армения	AM	Минэкономки Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Кыргызстан	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Российская Федерация	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт
Украина	UA	Минэкономразвития Украины

4 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 22160:2007 Milk and milk-based drinks — Determination of alkaline phosphatase activity — Enzymatic photo-activated system (EPAS) method (Молоко и молочные напитки. Определение действия щелочной фосфатазы. Метод с применением энзиматических фотоактивированных систем).

Международный стандарт разработан подкомитетом SC 5 «Молоко и молочные продукты» технического комитета по стандартизации ISO/TC 34 «Пищевые продукты» Международной организации по стандартизации (ISO) и Международной молочной федерацией (IDF) совместно с Международной ассоциацией химиков-аналитиков (AOAC International).

Перевод с английского языка (en).

Официальные экземпляры международного стандарта, на основе которого подготовлен настоящий межгосударственный стандарт, и международного стандарта, на который дана ссылка, имеются в национальном органе по стандартизации указанных выше государств.

Степень соответствия — идентичная (IDT)

### 5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных (государственных) стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных (государственных) органов по стандартизации.*

*В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация также будет опубликована в сети Интернет на сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты»*

Исключительное право официального опубликования настоящего стандарта на территории указанных выше государств принадлежит национальным (государственным) органам по стандартизации этих государств.

---

**М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й      С Т А Н Д А Р Т**

---

**МОЛОКО И МОЛОЧНЫЕ НАПИТКИ**  
**Определение активности щелочной фосфатазы.**  
**Метод с применением фотоактивной ферментной системы (EPAS)**

Milk and milk-based drinks  
Determination of alkaline phosphatase activity.  
Enzymatic photo-activated system (EPAS) method

---

Дата введения

-

### 1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения активности щелочной фосфатазы в пастеризованном цельном молоке, частично обезжиренном молоке, обезжиренном молоке, сливках и ароматизированном молоке с применением хемилюминесцентного (EPAS) метода.

Метод применяется для молока и молочных напитков из коровьего молока, молока овец, буйволиц и коз.

Метод применяется для жидких проб, в которых после их подготовки (разбавления) активность щелочной фосфатазы составляет меньше 7000 миллиединиц на литр.

Примечание — Было проведено успешное совместное исследование с цельным коровьим молоком, молоком овец, буйволиц и коз, а также обезжиренным коровьим молоком (<0,5 % жирности), 20%-ными сливками и 2%-ным молочно-шоколадным напитком).

### 2 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

2.1 **активность щелочной фосфатазы; ALP** (alkaline phosphatase activity): Активность щелочной фосфатазы, содержащейся в продукте, определяемая в порядке, установленном в настоящем стандарте.

Примечание — Активность щелочной фосфатазы выражается в миллиединицах активности фермента на литр (мЕд/л) ([4], [5]).

2.2 **единица активности щелочной фосфатазы** (unit of alkaline phosphatase activity): Количество фермента щелочной фосфатазы, которое катализирует преобразование 1 мкмоль стабильного ароматического субстрата за минуту.

### 3 Сущность метода

Активность щелочной фосфатазы измеряют посредством фотоактивации гидролизованного продукта с последующим инструментальным измерением фотоактивации. В присутствии щелочной фосфатазы стабильный ароматический субстрат диоксетан-фосфата гидролизуют при температуре  $(35 \pm 1)$  °С для получения фотоактивированного (хемилюминесцентного) продукта. Фотоактивацию продукта усиливают с помощью макромолекулярного повышающего компонента. Реакцию гидролиза останавливают после определенного времени инкубации (3 мин). Количество образовавшегося хемилюминесцентного продукта измеряют и преобразуют в ферментные единицы с помощью люминометра. Градуировка люминометра основана на использовании таблеток с известной ферментной активностью.

## 4 Реактивы

В ходе анализа используют реактивы только признанной аналитической чистоты, если не установлены другие требования, и дистиллированную, деминерализованную воду или воду эквивалентной чистоты.

**4.1 Субстрат нехемиллюминесцентного эфира диоксетана** [0,2 моль/л 3-(2'-спироадамantan)-4-метокси-4-(3''-фосфат фенил-1,2 диоксетана динатриевой соли в DEAE-буфере с 1 % флуорозина) имеется в продаже [например, жидкий реагент Charm AP®<sup>1)</sup>].

Рекомендуется хранить субстрат при температуре 0 °С – 7 °С. При хранении в пластиковых пробирках янтарного цвета и при температуре 4 °С субстрат остается стабильным в течение 6 мес. При хранении при температуре 30 °С субстрат сохраняет стабильность только в течение 24 ч.

При испытаниях используемый субстрат хранят при температуре 0 °С – 7 °С или во льду.

### 4.2 Останавливающий раствор

Останавливающий раствор готовят, смешивая одинаковое количество 0,15 моль/л 2-амино-2-метил-1-пропанола и 0,02 % бензалкония хлорида с pH 10,7. До использования останавливающий раствор должен находиться при комнатной температуре 18 °С – 24 °С. Для проверки стабильности раствора, использованного при градуировке, если не используют термозонд, фиксируют и поддерживают температуру в пределах 0,5 °С.

**Примечание** — Останавливающий раствор используют для остановки ферментного гидролиза субстрата эфира диоксетана (4.1).

Имеющийся в продаже останавливающий раствор имеет срок годности 1 год при хранении при температуре 4 °С или 2 мес при хранении при комнатной температуре. При ежедневном использовании его рекомендуется хранить при комнатной температуре.

**4.3 Рабочие градуировочные средства**, например градуировочные таблетки (сухое пастеризованное молоко с измеренным содержанием фосфатазы в виде таблеток для регидратации в молоке) с активностью фосфатазы  $875 \pm 26$  мЕд/л. Таблетки регидратируют в трех различных объемах напитка на основе молока, не содержащего активной фосфатазы, или в отрицательной пробе для испытания (7.2) для создания стандартной градуировочной кривой.

Имеющиеся в продаже градуировочные таблетки хранят при температуре 4 °С в течение 2 лет.

#### 4.3.1 Градуировочные средства для жидких неокрашенных молочных продуктов

В каждой из трех пробирок (5.9) вместимостью 50 мл с отметками  $A_1$ ,  $B_1$  и  $C_1$  соответственно растворяют одну градуировочную таблетку в 100 мкл дистиллированной воды.

В пробирку  $A_1$  добавляют 20 мл, в пробирку  $B_1$  — 5 мл, в пробирку  $C_1$  — 2,5 мл жидкого молочного продукта белого цвета (не содержащего активной фосфатазы) или отрицательную пробу для испытания (7.2). Получают градуировочные стандарты  $A_1$ ,  $B_1$  и  $C_1$  с активностью фосфатазы  $A_1 = 44$  мЕд/л,  $B_1 = 175$  мЕд/л и  $C_1 = 350$  мЕд/л соответственно. Пробирки закрывают колпачками и энергично встряхивают их содержимое. Для регидратации содержимого пробирки выдерживают ее в холодильнике в течение 10 мин. Тщательно перемешивают перед применением.

#### 4.3.2 Градуировочные средства для сливок и ароматизированного молока

В каждой из трех пробирок (5.9) вместимостью 50 мл с отметками  $A_2$ ,  $B_2$  и  $C_2$  соответственно растворяют по одной градуировочной таблетке в 100 мкл дистиллированной воды.

В пробирку  $A_2$  добавляют 10 мл, в пробирку  $B_2$  — 5 мл, в пробирку  $C_2$  — 2,5 мл сливок или ароматизированного молока (не содержащих активной фосфатазы) или отрицательную пробу для испытания (7.2). Получают градуировочные стандарты  $A_2$ ,  $B_2$  и  $C_2$  с активностью фосфатазы  $A_2 = 88$  мЕд/л,  $B_2 = 175$  мЕд/л и  $C_2 = 350$  мЕд/л соответственно. Пробирки закрывают колпачками и энергично встряхивают их содержимое. Для регидратации содержимого пробирки выдерживают ее в холодильнике в течение 10 мин. Тщательно перемешивают перед применением.

<sup>1)</sup> Реактивы, указанные в разделе 4, и оборудование, указанное в 5.1, доступны у I Charm Sciences Inc., 659 Andover St., Lawrence, MA 01843, USA (США). Они являются примерами подходящих продуктов, доступных в продаже. Эта информация приводится для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламой указанных продуктов со стороны ISO или IDF. Могут быть использованы эквивалентные продукты, если они обеспечивают получение аналогичных результатов.