ГОСТ 25179—90

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

МОЛОКО

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКА

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2009

gost.e-ecolog.ru

УДК 637.11.001.4:006.354 Группа Н19

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

МОЛОКО

Методы определения белка

ГОСТ 25179—90

Milk. Methods for determination of protein

МКС 67.100.10
ОКСТУ 9209

Дата введения 01.01.91

Настоящий стандарт распространяется на непастеризованное молоко с кислотностью не выше 20 °Т и устанавливает следующие методы измерения массовой доли белка: колориметрический, рефрактометрический и формольного титрования.

1. МЕТОДЫ ОТБОРА ПРОБ

Отбор проб и подготовка их к испытаниям — по ГОСТ 13928. Консервирование проб не допускается.

2. КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД

Колориметрический метод основан на способности белков молока при pH ниже изоэлектрической точки связывать кислый краситель, образуя с ним нерастворимый осадок, после удаления которого измеряют оптическую плотность исходного раствора красителя относительно полученного раствора, которая уменьшается пропорционально массовой доле белка.

2.1. Аппаратура, материалы и реактивы

Весы лабораторные 4-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 24104*.

Центрифуга для измерения массовой доли жира молока по нормативно-технической документации.

Колориметр фотоэлектрический лабораторный со светофильтром для выделения спектральной области 590 нм с кюветами рабочей длины 10 мм или спектрофотометр с выделяемой длиной волны 590 нм.

Анализатор потенциометрический с диапазоном измерения 2—3 ед. pH с ценой деления 0,05 ед. pH.

Термометр ртутный стеклянный с диапазоном измерения 0—100 °С, с ценой деления 0,5 или 1,0 °С, с пределом допустимой погрешности ±1 °С по ГОСТ 28498.

Пробки резиновые конусные № 16 или 19 по нормативно-технической документации.

Штатив для пробирок.

Фильтры бумажные.

Пробирки П1, П2, П4—25 по ГОСТ 25336.

Воронки В или ВФ по ГОСТ 25336.

Пипетки 1—2—1, 2—2—1, 4—2—1, 5—2—1, 2—2—20 по ГОСТ 29169.

Колбы 1—2—50, 1—2—200, 1—2—500, 1—2—2000, 2—2—50, 2—2—200, 2—2—500, 2—2—2000 по ГОСТ 1770.

* С 1 июля 2002 г. действует ГОСТ 24104—2001.

Издание официальное Перепечатка воспрещена

© Издательство стандартов, 1990
© СТАНДАРТИНФОРМ, 2009

Бутыль темного стекла вместимостью 2000 см³ по нормативно-технической документации.

Краситель «Амидо черный 10 Б» (1-амино-2,7-бис (*п*-нитрофенилазо)-8-оксинафталин-3,6-дисульфокислоты динатриевая соль) по ТУ 6—09—05—557, ч. д. а.

Кислота лимонная по ГОСТ 3652, х. ч. или ч. д. а.

Натрий ортофосфат двузамещенный, 12-водный по ГОСТ 4172, х. ч. или ч. д. а. или натрий отофосфат двухзамещенный, х. ч. или ч. д. а.

Кислота серная по ГОСТ 4204, х. ч. или ч. д. а.

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328, х. ч. или ч. д. а.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками и оборудования с техническими характеристиками не хуже, а также реактивов по качеству не ниже вышеуказанных.

2.2. Подготовка к измерениям

2.2.1. *Приготовление буферного раствора*

Взвешивают 31,70 г лимонной кислоты и 8,40 г ортофосфата натрия. Результат взвешивания записывают с округлением до 2-го десятичного знака. Реактивы помещают в колбу вместимостью 500 см³ и добавляют в нее 400 см³ воды. Колбу нагревают до температуры выше 70 °С. Затем содержимое колбы перемешивают до полного растворения веществ и охлаждают до температуры (20±2) °С.

2.2.2. *Приготовление раствора красителя*

Навеску 4,60 г красителя, взвешенного с отсчетом до 0,01 г, помещают в колбу вместимостью 500 см³ и добавляют в нее 200 см³ воды. Колбу нагревают до температуры не выше 70 °С и затем перемешивают содержимое ее до растворения красителя.

Раствор отфильтровывают через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 2000 см³. Фильтр промывают водой до удаления следов красителя.

В эту же колбу переносят буферный раствор, приготовленный по п. 2.2.1.

Содержимое колбы охлаждают до температуры (20±2) °С. Колбу доливают водой до метки, закрывают резиновой пробкой и перемешивают ее содержимое путем переворачивания колбы не менее шести раз.

Раствор должен иметь (2,3±0,1) ед. pH. Если pH раствора не соответствует данному значению, исправляют его добавлением концентрированной серной кислоты или гидроокиси натрия. Раствор, разбавленный в 50 раз, должен иметь оптическую плотность (0,82±0,02) на длине волны 590 нм в кювете с рабочей длиной 10 мм. Если оптическая плотность раствора не соответствует данному значению, то исправляют ее добавлением буферного раствора или раствора красителя.

Раствор следует использовать только после 12 ч выдержки.

Раствор должны хранить в холодильнике в бутыли из темного стекла не более 4 мес, еженедельно проверяя и исправляя значения pH и оптической плотности.

2.3. Проведение измерений

2.3.1. В стеклянную пробирку помещают пипеткой 1 см³ молока, приливают 20 см³ раствора красителя и, закрыв пробирку резиновой пробкой, перемешивают ее содержимое, переворачивая пробирку от 2 до 10 раз.

Следует избегать встряхивания, так как при этом образуется трудноразрушимая пена.

2.3.2. Помещают пробирку в центрифугу и центрифугируют при частоте вращения 25 $с^{-1}$ (1500 об/мин) в течение 10 мин или при частоте вращения 16 $с^{-1}$ (1000 об/мин) — в течение 20 мин.

2.3.3. Отбирают пипеткой 1 см³ надосадочной жидкости, помещают в мерную колбу вместимостью 50 см³, доливают колбу до метки водой и содержимое перемешивают. Аналогичным способом разбавляют рабочий раствор красителя в 50 раз.

2.3.4. Измеряют на фотоэлектроколориметре или спектрофотометре оптическую плотность разбавленного раствора красителя по отношению к разбавленному содержимому мерной колбы.

2.3.5. После каждых 24 наблюдений кювету промывают буферным раствором, приготовленным по п. 2.2.1.

2.4. Обработка результатов

2.4.1. Массовую долю белка X, %, вычисляют по формуле

$$X = 7{,}78\ D - 1{,}34,$$

где D — измеренная оптическая плотность, ед. оптич. плотности;

7,78 — эмпирический коэффициент, %/ед. оптич. плотности;

1,34 — эмпирический коэффициент, %.

2.4.2. Предел допустимой погрешности результата измерений в диапазоне массовой доли белка 2,5—4,0 % составляет ±0,1 % массовой доли белка при доверительной вероятности 0,80 и расхождении между двумя параллельными измерениями не более 0,013 единиц оптической плотности или не более 0,1 % массовой доли белка.

За окончательный результат измерения принимают среднеарифметическое значение результатов вычислений двух параллельных наблюдений, округляя результат до второго десятичного знака.

При расхождении между результатами измерений, полученными в разных лабораториях более чем на 0,1 % массовой доли белка, измерение проводят по ГОСТ 23327.

3. РЕФРАКТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД

Рефрактометрический метод основан на измерении показателей преломления молока и безбелковой молочной сыворотки, полученной из того же образца молока, разность между которыми прямо пропорциональна массовой доле белка в молоке.

3.1. Аппаратура, материалы и реактивы

Комплект для измерения массовой доли белка, состоящий из:

рефрактометра со шкалой массовой доли белка в диапазоне 0—15 %, ценой деления 0,1 %;

водяной бани закрытого типа для флаконов.

Центрифуга для измерения массовой доли жира в молоке по нормативно-технической документации.

Электроплитка номинальной мощностью 1000 Вт по ГОСТ 14919.

Колбы 1—1000—2, 2—1000—2 по ГОСТ 1770.

Пипетки 1—2—1, 2—2—1, 2—2—5, 4—2—1, 5—2—1 по ГОСТ 29169.

Флаконы из стеклянной трубки для лекарственных средств, типа ФО, вместимостью 10 см³ по ТУ 64—2—10.

Пробки резиновые по нормативно-технической документации.

Кальций хлористый 2-водный по ТУ 6—09—5077.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками и оборудования с техническими характеристиками не хуже, а также реактивов по качеству не ниже вышеуказанных.

3.2. Подготовка к измерениям

Навеску 40,0 г хлористого кальция помещают в колбу вместимостью 1000 см³, приливают к ней 500 см³ воды и перемешивают до полного растворения соли. Содержимое колбы нагревают до температуры (20±2) °С и доводят водой до метки.

3.3. Проведение измерений

3.3.1. Наливают в 3 флакона по 5 см³ молока, добавляют по 6 капель раствора хлорида кальция. Флаконы закрывают пробками и содержимое их перемешивают путем переворачивания флаконов.

Помещают флаконы в водяную баню, наливая в баню воду так, чтобы ее уровень достигал половины высоты флаконов. Баню закрывают, помещают на электроплитку, доводят воду в бане до кипения и кипятят не менее 10 мин. Не открывая бани, сливают горячую воду через отверстия в крышке, наливают в баню холодную воду и выдерживают в ней не менее 2 мин.

Открывают баню, извлекают флаконы и разрушают белковый сгусток путем энергичного встряхивания флаконов.

Флаконы помещают в центрифугу и центрифугируют не менее 10 мин. Образовавшуюся прозрачную сыворотку отбирают пипеткой и наносят на измерительную призму рефрактометра 1—2 капли. Закрывают измерительную призму осветительной.

Наблюдая в окуляр рефрактометра, специальным корректором убирают окрашенность границы света и тени. Для улучшения резкости границы измерение проводят через 1 мин после нанесения сыворотки на призму, так как за это время из пробы удаляется воздух и лучше смачивается поверхность осветительной призмы.

3.3.2. Проводят по шкале «Белок» не менее 3 наблюдений. Удаляют сыворотку с призмы рефрактометра, промывают ее водой и вытирают фильтровальной бумагой.

3.3.3. Помещают на измерительную призму 2 капли исследуемого молока и проводят по шкале «Белок» не менее 5 наблюдений, так как резкость границы света и тени у молока хуже, чем у сыворотки.

3.3.4. Вычисляют среднеарифметические результаты наблюдений для сыворотки и молока.

3.4. Обработка результатов

3.4.1. Массовую долю белка в молоке X_1, %, вычисляют по формуле

$$X_1 = X_2 - X_3,$$

где X_2 — среднеарифметическое значение результатов наблюдения по шкале «Белок» для молока, %;

X_3 — среднеарифметическое значение результатов наблюдения по шкале «Белок» для сыворотки, %.

3.4.2. Предел допустимой погрешности результата измерений составляет ±0,1 % массовой доли белка при доверительной вероятности 0,80 и расхождении между двумя параллельными определениями не более 0,1 % массовой доли белка.

За окончательный результат измерения принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных вычислений массовой доли белка, округляя результат до второго десятичного знака.

При расхождении между результатами измерений, полученными в разных лабораториях более чем на 0,1 % массовой доли белка, измерение проводят по ГОСТ 23327.

4. МЕТОД ФОРМОЛЬНОГО ТИТРОВАНИЯ

Метод применяют при условии согласия с поставщиком.

Метод формольного титрования основан на нейтрализации карбоксильных групп моноаминодикарбоновых кислот белков раствором гидроксида натрия, количество которого, затраченное на нейтрализацию, пропорционально массовой доле белка в молоке.

4.1. Аппаратура, материалы и реактивы

Анализатор потенциометрический с диапазоном измерения от 4 до 10 ед. pH с ценой деления 0,05 ед. pH.

Блок автоматического титрования, аппаратурно совместимый с потенциометрическим титратором и имеющий дозатор раствора (бюретку) вместимостью не менее 5 $см^3$ с ценой деления не более 0,05 $см^3$.

Секундомер механический типа СОПир 3-го класса.

Колбы 1—1000—2, 2—1000—2 по ГОСТ 1770.

Пипетки 2—2—5, 2—2—20 по ГОСТ 29169.

Воронки ВК по ГОСТ 25336.

Стаканы В-1—50, В-2—50 по ГОСТ 25336.

Натрия гидроокись, стандарт-титр по ТУ 6—09—2540, раствор с молярной концентрацией 0,1 моль/$дм^3$.

Формальдегид, водный раствор с массовой долей формальдегида 30 % по ГФ СССР, № 619.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками и оборудования с техническими характеристиками не хуже, а также реактивов по качеству не ниже вышеуказанных.

4.2. Подготовка к измерениям

4.2.1. *Подготовка приборов*

Подключают блок автоматического титрования к анализатору согласно инструкции, прилагаемой к блоку. Затем подключают блок и анализатор к сети и прогревают их в течение 10 мин.

Заполняют дозатор блока автоматического титрования раствором гидроокиси натрия.

Согласно инструкции, прилагаемой к потенциометрическому анализатору, настраивают последний на такой диапазон измерения pH, который включал бы в себя pH=9.

Согласно инструкции, прилагаемой к блоку автоматического титрования, настраивают его на точку эквивалентности, равную 9 единицам pH, подачу раствора по каплям начиная с pH=4 и 30-секундную выдержку после достижения точки эквивалентности.

4.2.2. *Определение поправки к результатам измерения массовой доли белка методом формольного титрования*

Для определения поправки к результатам измерения массовой доли белка методом формольного титрования проводят одновременное измерение массовой доли белка в одном и том же образце молока методом формольного титрования и по ГОСТ 23327.

Измерения проводят на средней пробе молока, полученной путем смешивания равных по массе образцов молока, полученных от разных хозяйств. При этом средняя проба должна быть образована не менее чем от 75 % всех хозяйств — сдатчиков молока.

Измерения как по ГОСТ 23327, так и методом формольного титрования проводят в шести повторностях.

Поправку X_4, %, вычисляют по формуле

$$X_4 = X_5 - X_6,$$

где X_5 — среднеарифметическое значение массовой доли белка, полученное по ГОСТ 23327, %;

X_6 — среднеарифметическое значение массовой доли белка, полученное формольным титрованием, %.

Определение поправки проводят не реже одного раза в декаду.

4.3. Проведение измерений

4.3.1. В стакан помещают 20 см^3 молока и стержень магнитной мешалки. Стакан устанавливают на магнитную мешалку, включают двигатель мешалки и погружают электроды потенциометрического анализатора в молоко. Включают кнопку «Пуск» блока автоматического титрования, а спустя 2—3 с, кнопку «Выдержка». Раствор гидроксида натрия при этом начинает поступать из дозатора блока в стакан с молоком, нейтрализуя последнее. По достижении точки эквивалентности (pH=9) и истечении времени выдержки (30 с) процесс нейтрализации автоматически прекращается, а на панели блока автоматического титрования зажигается сигнал «Конец». После этого отключают кнопки «Пуск» и «Выдержка», определяют количество раствора щелочи, затраченной на нейтрализацию молока, до внесения формальдегида, и вносят в стакан 5 см^3 формальдегида.

По истечении 2—2,5 мин вновь включают кнопки «Пуск» и «Выдержка». По окончании процесса определяют общее количество раствора, затраченного на нейтрализацию.

4.3.2. Параллельно проводят контрольный опыт по нейтрализации смеси 20 см^3 воды и 5 см^3 раствора формальдегида.

4.4. Обработка результатов

4.4.1. Массовую долю белка X_7, %, вычисляют по формуле

$$X_7 = (V_2 - V_1 - V_0)\ 0{,}96 + X_4;$$

где V_2 — общее количество раствора, израсходованное на нейтрализацию, см^3;

V_1 — количество раствора, израсходованное на нейтрализацию до внесения формальдегида, см^3;

V_0 — количество раствора, израсходованное на контрольный опыт, см^3;

0,96 — эмпирический коэффициент, %/см^3;

X_4 — поправка к результату измерения массовой доли белка, %.

4.4.2. Предел допустимой погрешности результата измерений в диапазоне массовой доли белка 2,2—4,0 % составляет ±0,15 % массовой доли белка при доверительной вероятности 0,80 и расхождении между двумя параллельными измерениями не более 0,2 % массовой доли белка.

За окончательный результат измерения принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных вычислений, округляя результат до второго десятичного знака.

При расхождении между двумя результатами измерений, полученными в разных лабораториях более чем на 0,15 % массовой доли белка, измерение проводят по ГОСТ 23327.

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

1. РАЗРАБОТАН И ВНЕСЕН Всесоюзным научно-исследовательским и конструкторским институтом молочной промышленности

РАЗРАБОТЧИКИ

О. А. Гераймович, канд. техн. наук; **Е. А. Фитисов,** канд. сельхоз. наук; **Л. В. Андреевская**

2. УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Государственного комитета СССР по управлению качеством продукции и стандартам от 01.02.90 № 136

3. ВЗАМЕН ГОСТ 25179—82

4. ССЫЛОЧНЫЕ НОРМАТИВНО-ТЕХНИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ

Обозначение НТД, на который дана ссылка	Номер пункта	Обозначение НТД, на который дана ссылка	Номер пункта
ГОСТ 1770—74	2.1, 3.1, 4.1	ГОСТ 24104—88	3.1, 4.1
ГОСТ 3652—69	2.1	ГОСТ 25336—82	2.1, 4.1
ГОСТ 4172—76	2.1	ГОСТ 28498—90	2.1
ГОСТ 4204—77	2.1	ГОСТ 29169—91	2.1, 3.1, 4.1
ГОСТ 4328—77	2.1	ТУ 6—09—05—557—76	2.1
ГОСТ 6709—72	2.1, 3.1, 4.1	ТУ 6—09—2540—72	4.1
ГОСТ 13928—84	1	ТУ 6—09—5077—83	3.1
ГОСТ 14919—83	3.1	ТУ 64—2—10—87	3.1
ГОСТ 23327—98	2.4.2, 3.4.2, 4.4.2	ГФ № 619	4.1

5. Ограничение срока действия снято по протоколу № 5—94 Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации (ИУС 11-12—94)

6. ПЕРЕИЗДАНИЕ. Август 2009 г.

gost.e-ecolog.ru