ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р ИСО 20541— 2011

МОЛОКО И МОЛОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ

Определение содержания нитратов Метод с применением ферментативного восстановления и молекулярно-абсорбционной спектрометрии после реакции Грисса

ISO 20541:2008
Milk and milk products — Determination of nitrate content — Method by enzymatic reduction and molecular-absorption spectrometry after Griess reaction (IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2013

gost.e-ecolog.ru

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» (ОАО «ВНИИС») на основе аутентичного перевода на русский язык международного 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 12 декабря 2011 г. № 775-ст

4 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ИСО 20541:2008 «Молоко и молочные продукты. Определение содержания нитратов. Метод с применением ферментативного восстановления и молекулярно-абсорбционной спектрометрии после реакции Грисса» (ISO 20541:2008 «Milk and milk products — Determination of nitrate content — Method by enzymatic reduction and molecular-absorption spectrometry after Griess reaction»).

При применении настоящего стандарта рекомендуется использовать вместо ссылочных международных стандартов соответствующие национальные стандарты Российской Федерации и межгосударственные стандарты, сведения о которых приведены в дополнительном приложении ДА

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

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, 2013

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 . . . 2
5 Реактивы . . . 2
6 Оборудование . . . 3
7 Отбор проб . . . 4
8 Подготовка пробы для испытания . . . 4
8.1 Порошковое молоко, порошковая сыворотка и концентраты молочного белка . . . 4
8.2 Казеины и казеинаты . . . 4
8.3 Сыр . . . 4
8.4 Сывороточный сыр . . . 5
9 Процедура . . . 5
9.1 Приготовление испытательного образца . . . 5
9.2 Удаление жира и белка . . . 5
9.3 Холостое испытание с использованием реактивов . . . 6
9.4 Определение . . . 6
9.5 Калибровка . . . 7
10 Вычисление и выражение результатов . . . 7
10.1 Содержание нитрита (матричный холостой раствор) . . . 7
10.2 Общее содержание нитрита/нитрата . . . 8
10.3 Содержание нитрата . . . 8
11 Прецизионность . . . 8
11.1 Межлабораторные испытания . . . 8
11.2 Повторяемость . . . 8
11.3 Воспроизводимость . . . 9
12 Протокол испытания . . . 9
Приложение А (справочное) Межлабораторные испытания . . . 10
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов ссылочным национальным стандартам Российской Федерации (и действующим в этом качестве межгосударственным стандартам) . . . 13
Библиография . . . 14

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

МОЛОКО И МОЛОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ

Определение содержания нитратов. Метод с применением ферментативного восстановления и молекулярно-абсорбционной спектрометрии после реакции Грисса

Milk and milk products.
Determination of nitrate content.
Method by enzymatic reduction and molecular-absorption spectrometry after Griess reaction

Дата введения — 2013—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает спектрометрический метод определения содержания нитратов в молоке и молочных продуктах после реакции Грисса с предшествующим ферментативным восстановлением. Метод применяется для цельного, частично снятого, снятого и сухого молока, твердых, полутвердых и мягких сыров, плавленого и сывороточного сыра, казеинов, казеинатов, сухой сыворотки и концентратов молочного белка.

Этот метод можно использовать при содержании нитратов более 0,2 мг/дм^3.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ — Использование этого метода в соответствии с настоящим стандартом может включать в себя опасные материалы, оборудование и процедуры.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ИСО 565 Сита контрольные. Проволочная ткань, перфорированные пластины и листы, изготовленные гальваническим методом. Номинальные размеры отверстий (ISO 565 Test sieves — Metal wire cloth, perforated metal plate and electroformed sheet — Nominal sizes of openings)

ИСО 648 Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной меткой (ISO 648 Laboratory glassware — Single-volume pipettes)

ИСО 835 Посуда лабораторная стеклянная. Мерные градуированные пипетки (ISO 835 Laboratory glassware — Graduated pipettes)

ИСО 1042 Посуда лабораторная стеклянная. Мерные колбы с одной меткой (ISO 1042 Laboratory glassware — One-mark volumetric flasks)

ИСО 3696 Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы испытания (ISO 3696 Water for analytical laboratory use — Specification and test methods)

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применяют следующие термины с соответствующими определениями.

3.1 **содержание нитритов** (nitrite content): Массовая доля нитритных соединений, определенная методом, установленным в настоящем стандарте.

3.2 **содержание нитратов** (nitrate content): Массовая доля нитратных соединений, определенная методом, установленным в настоящем стандарте.

Примечание — Содержание нитратов выражается как массовая доля в миллиграммах ионов нитрата (NO_3) на килограмм продукта.

Издание официальное

4 Сущность метода

Испытательный образец диспергируют в теплой воде. Жир и белки удаляют или посредством осаждения с использованием реактивов Карреза, или посредством центробежного ультрафильтрования с использованием конических мембран (см. примечания 1 и 2). Нитрат восстанавливают до нитрита в части фильтрата посредством нитратредуктазы. При добавлении сульфаниламида и *N*-(1-нафтил)этилендиамида дихлорида проявляется красно-фиолетовый азокраситель в частях как невосстановленного фильтрата (для нитрита), так и восстановленного раствора (для нитрата), оптическую плотность измеряют при длине волны 540 нм (или Hg 546 нм).

Содержание нитрита в пробе и общее содержание нитрита после восстановления нитрата вычисляют, сравнивая измеренные оптические плотности с оптическими плотностями серии калибровочных растворов нитрита натрия. Содержание нитрата определяют по разности между этими двумя содержаниями.

Примечания

1 Две альтернативные процедуры для удаления жира и белка описаны в 9.2.1 и 9.2.2.

2 Для сухой сыворотки, концентрата сывороточного белка и аналогичных продуктов предпочтительнее использовать ультрафильтрование вместо осаждения Карреза, так как последнее часто приводит к помутнению и в результате к плохой прецизионности.

3 Низкий уровень эндогенного нитрита не протоколируют, но учитывают в матричном холостом растворе.

5 Реактивы

Если не установлено иначе, используют только реактивы признанной аналитической чистоты без нитратов и нитритов и воду, соответствующую классу 3 по ИСО 3696, как минимум, также без нитратов и нитритов. Для растворов фермента или кофермента используют свежеприготовленную воду двойной дистилляции или эквивалентной чистоты.

5.1 Раствор гидроксида натрия, c (NaOH) = 1 моль/см^3.

5.2 Раствор хлорида натрия, c (NaCl) = 0,9 г/100 см^3.

5.3 Соляная кислота, ρ 20(HCl) = 1,19 г/см^3.

5.4 Раствор соляной кислоты, c (HCl) = 2 моль/дм^3

Тщательно добавляют 160 см^3 соляной кислоты (5.3) приблизительно к 700 см^3 воды в мерной колбе вместимостью 1000 см^3 с одной меткой (6.4) при регулярном вращении. Охлаждают содержимое до комнатной температуры. Разбавляют до метки водой и тщательно перемешивают.

5.5 Реактивы Карреза

5.5.1 Реактив Карреза I: Раствор гексацианоферрата (II) калия, c ($K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$) = 150 г/дм^3. Растворяют 15,0 г тригидрата гексацианоферрата (II) калия в воде в мерной колбе вместимостью 100 см^3 с одной меткой (6.4). Разбавляют до метки водой и перемешивают.

5.5.2 Реактив Карреза II: Раствор сульфата цинка, c ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) = 300 г/дм^3. Растворяют 30,0 г гептагидрата сульфата цинка в воде в мерной колбе вместимостью 100 см^3 с одной меткой (6.4). Разбавляют до метки водой и перемешивают.

5.6 Стандартные растворы

5.6.1 Исходный раствор нитрита натрия ($NaNO_2$)

Взвешивают (75,0 ± 0,1) мг предварительно высушенного (при 102 °С в течение 2 ч) нитрита натрия в мерную колбу вместимостью 100 см^3 с одной меткой. Растворяют в воде и перемешивают, доводят до метки водой. Полученный исходный раствор содержит 500 мг нитрита на литр.

Приготовляют калибровочные растворы, разбавляя исходный раствор водой, чтобы получить несколько растворов с различными концентрациями нитрита от 0,05 до 5,0 мг/дм^3.

При хранении при комнатной температуре исходный раствор нитрита натрия остается устойчивым один день.

5.6.2 Исходный раствор нитрата калия (KNO_3)

Взвешивают (81,5 ± 0,1) мг предварительно высушенного (при 102 °С в течение 2 ч) нитрата калия в мерную колбу вместимостью 100 см^3 с одной меткой. Растворяют в воде и перемешивают, доводят до метки водой. Полученный исходный раствор содержит 500 мг нитрата на литр.

Приготовляют калибровочные растворы, разбавляя исходный раствор водой, чтобы получить несколько растворов с различными концентрациями нитрата от 0,05 до 5,0 мг/дм^3.

При хранении при 4 °С исходный раствор нитрата калия остается устойчивым одну неделю.

5.7 Буферный раствор фосфата калия, pH = 7,5

Взвешивают (57,6 ± 0,1) мг гидрофосфата дикалия ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$) в мерную колбу вместимостью 100 см³ с одной меткой. Растворяют в воде и перемешивают, доводят до метки водой.

Взвешивают (17,0 ± 0,1) мг дигидрофосфата калия (KH_2PO_4) в мерную колбу вместимостью 50 см³ с одной меткой. Растворяют в воде и перемешивают, доводят до метки водой.

С помощью устройства для измерения pH (6.18) регулируют pH раствора гидрофосфата дикалия до pH 7,5 путем добавления раствора дигидрофосфата калия.

При хранении при 4 °С буферный раствор фосфата калия остается устойчивым две недели.

5.8 Раствор NADPH/FAD

Взвешивают (5,6 ± 0,1) мг 3-никотинамидадениндинуклеотид-фосфата (восстановленного), соль тетранатрия (β-NADPH-Na_4, с массовой долей не менее 98 %), и (80,0 ± 0,1) мг флавинадениндинуклеотида, соль динатрия (FAD-Na_2, с массовой долей не менее 88 %) в мерную колбу вместимостью 25 см³ с одной меткой.

Растворяют их в буферном растворе фосфата калия (5.7). Разбавляют до метки буферным раствором (5.7) и перемешивают.

Раствор NADPH/FAD приготовляют непосредственно перед использованием.

5.9 Раствор нитратредуктазы (NR)

Взвешивают 65 мг нитратредуктазы (NR) из Aspergillus niger (EC 1.6.6.2, лиофизат, содержащий приблизительно 0,4 ед/мг) в пробирку вместимостью 10 см³. Добавляют 5 см³ воды и перемешивают. При хранении при 4 °С раствор нитратредуктазы остается устойчивым две недели.

5.10 Цветные реактивы

5.10.1 Раствор цветного реактива I: Сульфаниламид ($NH_2C_6H_4SO_2NH_2$)

Взвешивают 400 мг сульфаниламида в мерную колбу вместимостью 50 см³ с одной меткой (6.4).

Растворяют в растворе соляной кислоты, при необходимости нагревая в водяной бане.

Раствор охлаждают до комнатной температуры. Разбавляют до метки раствором соляной кислоты (5.4) и перемешивают. Полученный таким образом раствор реактива при необходимости фильтруют.

При хранении при 4 °С раствор цветного реактива I остается устойчивым четыре недели.

5.10.2 Раствор цветного реактива II: *N*-(1-Нафтил)этилендиамин дигидрохлорид ($C_{10}H_7NHCH_2CH_2NH_2 \cdot 2HCl$)

Взвешивают 50 мг *N*-(1-нафтил)этилендиамин дихлорида в мерную колбу вместимостью 50 см³ с одной меткой (6.4). Растворяют в подходящем количестве воды.

Разбавляют водой до метки 50 см³ и перемешивают. Полученный раствор при необходимости фильтруют.

При хранении при 4 °С раствор цветного реактива II остается устойчивым четыре недели.

5.11 Комплекты реактивов также имеются в продаже. При использовании таких комплектов необходимо строго следовать требованиям настоящего стандарта (в частности, в случае 5.8).

6 Оборудование

Всю стеклянную посуду тщательно очищают и промывают водой для гарантии отсутствия нитратов и нитритов.

Обычное лабораторное оборудование, в частности, следующее:

6.1 Аналитические весы, обеспечивающие взвешивание с точностью до 0,1 мг.

6.2 Контейнер для пробы с герметической крышкой.

6.3 Конические колбы вместимостью 100, 500 и 1000 см³ с притертыми стеклянными пробками.

6.4 Мерные колбы с номинальной вместимостью 25, 50, 100 и 1000 см³ в соответствии с ИСО 1042, класс А.

6.5 Пипетки вместимостью 1, 2, 5 и 10 см³ в соответствии с ИСО 648, класс А, или ИСО 835. При необходимости допускается использовать бюретки вместо пипеток.

6.6 Градуированные пипетки для частичной подачи, используемые в ферментных тестах.

6.7 Градуированные цилиндры вместимостью 20 и 50 см³.

6.8 Стаканы вместимостью 20 и 50 см³.

6.9 Центрифуга с охлаждающим устройством, обеспечивающая центрифугирование чашек (6.10) и конических мембран (6.21) с центробежным ускорением 3000*g*.

6.10 Чашки центрифуги диаметром 15 мм.

6.11 Мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм для использования со шприцем.

6.12 Стеклянная воронка подходящего диаметра.

6.13 Спектрометр для измерения оптической плотности при длине волны 540 нм или фотометр для измерения спектральных линий с ртутной лампой и фильтром для измерения оптической плотности при длине волны 546 нм.

6.14 Оптические кюветы полумикронного типа (одноразовые или стеклянные кюветы), длиной оптического пути 1 см.

6.15 Мельница для измельчения испытуемого образца, если необходимо. Для избежания потери влаги устройство не должно создавать нежелательный нагрев.

6.16 Лабораторное сито из плетеной проволочной ткани, диаметром 200 мм, с отверстиями номинального размера 500 мкм и приемный лоток в соответствии с ИСО 565.

6.17 Магнитная мешалка.

6.18 Устройство для измерения pH, состоящее из pH-метра и стеклянных/контрольных электродов, обеспечивающее измерение при 20 °С.

6.19 Водяная баня с встряхивающим приспособлением, поддерживающая температуру (70,0 ± 0,5) °С.

6.20 Нагревательная плита.

6.21 Конические мембраны, MWCO 5000 D, вместимостью 4 $см^3$, для центробежного ультрафильтрования раствора пробы.

7 Отбор проб

Отбор проб не является частью метода, установленного в настоящем стандарте. Рекомендованный метод отбора проб приведен в ИСО 707.

Важно, чтобы лаборатория получила действительно представительную пробу без повреждений или изменений во время транспортирования или хранения.

Лабораторную пробу хранят таким образом, чтобы предотвратить любые повреждения и изменения.

8 Подготовка пробы для испытания

8.1 Порошковое молоко, порошковая сыворотка и концентраты молочного белка

Пробу для испытания переносят в контейнер для проб (6.2), вместимость которого в два раза больше объема этой пробы. Контейнер сразу же закрывают. Пробу тщательно перемешивают многократным встряхиванием и переворачиванием контейнера.

8.2 Казеины и казеинаты

8.2.1 После переноса всей пробы для испытания в контейнер для проб (6.2) подходящей вместимости ее при необходимости тщательно перемешивают многократным встряхиванием и переворачиванием контейнера.

8.2.2 Переносят 50 г пробы для испытания в лабораторное сито (6.16). Если порция 50 г полностью или почти полностью проходит через сито, тогда через него пропускают всю перемешанную пробу для испытания (см. 8.2.1). Если испытуемая проба не проходит полностью через сито, используют мельницу (6.15), чтобы обеспечить прохождение.

Всю просеянную пробу для испытания сразу же переносят в контейнер для проб (6.2). Тщательно перемешивают в закрытом контейнере. Во время этих операций следует принимать меры предосторожности, чтобы избежать изменений влагосодержания продукта.

После того как проба для испытания готова, как можно быстрее переходят к приготовлению испытательного образца (см. 9.1).

8.3 Сыр

8.3.1 Перед анализом удаляют корку или плесневую поверхность с пробы для испытания, чтобы проба была типичной для сыра, который употребляют в пищу.

8.3.2 Пробу для испытания измельчают посредством подходящего устройства (6.15). Измельченную массу быстро перемешивают и, если возможно, измельчают второй раз и снова тщательно перемешивают. Мельницу очищают после измельчения каждой пробы. Если испытуемая проба не может быть измельчена, ее тщательно перемешивают путем интенсивного встряхивания и круговых движений.

8.3.3 По возможности сразу же после измельчения пробу переносят в контейнер (6.2) для предстоящего анализа, который желательно проводить без задержки. Если задержка неизбежна, следует принять все меры предосторожности для правильного сохранения пробы, не допуская конденсации влаги на внутренней поверхности контейнера.

8.3.4 Не следует использовать измельченный сыр, на котором заметен рост плесени или признаки порчи.

8.4 Сывороточный сыр

Пробу для испытания приготовляют по 8.3.2.

9 Процедура

9.1 Приготовление испытательного образца

9.1.1 Молоко

Отвешивают с точностью до 0,1 мг приблизительно от 10 до 15 г испытуемой пробы. Переносят навеску количественно в коническую колбу вместимостью 100 см^3 (6.3). Добавляют постепенно 50 см^3 кипящей воды. Встряхивают смесь в водяной бане (6.19), поддерживаемой при 70 °С, в течение 15 мин.

9.1.2 Сухое молоко, сухая сыворотка, казеины, казеинаты и концентраты молочного белка

Отвешивают с точностью до 0,1 мг приблизительно от 2,0 до 2,5 г испытуемой пробы. Переносят навеску количественно в коническую колбу вместимостью 100 см^3 (6.3). Добавляют постепенно 50 см^3 кипящей воды. Встряхивают смесь в водяной бане (6.19), поддерживаемой при 70 °С, в течение 15 мин.

9.1.3 Сыр, плавленый сыр и сывороточный сыр

Отвешивают с точностью до 0,1 мг приблизительно 3 г испытуемой пробы (см. 8.3 или 8.4). Навеску тщательно перемешивают с 15 см^3 воды, например, с помощью стеклянной палочки, чтобы получить смесь без комков. Переносят смесь количественно в коническую колбу вместимостью 100 см^3 (6.3). Добавляют постепенно 30 см^3 воды при 70 °С. Встряхивают смесь в водяной бане (6.19), поддерживаемой при 70 °С, в течение 15 мин.

9.2 Удаление жира и белка

9.2.1 Осаждение с использованием реактивов Карреза и фильтрование

Приготовленный испытательный образец (см. 9.1.1, 9.1.2 или 9.1.3) охлаждают до комнатной температуры. Добавляют последовательно 5 см^3 реактива Карреза I (5.5.1) и затем 5 см^3 реактива Карреза II (5.5.2) при интенсивном перемешивании вращением или с помощью магнитной мешалки во время и после каждого добавления. Регулируют значение pH до 8,0 ± 0,1, используя раствор гидроксида натрия (5.1).

Переносят суспензию количественно в мерную колбу вместимостью 100 см^3 с одной меткой (6.4). Разбавляют до метки водой и тщательно перемешивают. Помещают аликвоту в центрифужную чашку (6.10) и устанавливают чашку в центрифугу (6.9). Центрифугируют при центробежной скорости 3000*g* при 20 °С в течение 15 мин.

Промывают мембранный фильтр (6.11) 5 см^3 раствора хлорида натрия (5.2) и затем 5 см^3 воды. Фильтруют прозрачную надосадочную жидкость, полученную центрифугированием, через очищенный мембранный фильтр (6.11). Отбрасывают первые несколько миллилитров и используют оставшийся фильтрат для анализа (см. 9.4).

Важно получить прозрачный фильтрат в течение установленного времени. Если он не получается (например, когда анализируют хорошо созревшие сыры), увеличивают объем каждого реактива, используемого для осаждения (5.5.1 и 5.5.2), и уменьшают соответственно объем горячей воды, используемой по 9.1.

9.2.2 Центробежное ультрафильтрование

Вместо осаждения жира и белка посредством реактивов Карреза I и II (см. 9.2.1) можно использовать ультрафильтрование испытательного образца посредством конических мембран в центрифуге, чтобы получить прозрачный фильтрат для анализа (см. 9.4).

Испытательный образец охлаждают до комнатной температуры (см. 9.1.1, 9.1.2 или 9.1.3). Регулируют значение pH до 8,0 ± 0,1. Суспензию переносят количественно в мерную колбу вместимостью 100 см^3 с одной меткой (6.4). Разбавляют до метки водой и тщательно перемешивают.

Промывают коническую мембрану (6.21) 4 см^3 раствора хлорида натрия (5.2) и затем 4 см^3 воды.

Переносят аликвоту на очищенную коническую мембрану и помещают мембрану в центрифугу (6.9). Центрифугируют при центробежном ускорении 3000 *g* при 20 °С в течение 20 мин.

Примечания

1 Конические мембраны для использования в центрифуге коммерчески доступны, например весьма подходящим продуктом является концентратор размером 4 мм Vivaspin[1)] с полиэфирсульфоновой мембраной и отсечкой по молекулярной массе 5000 Да.

2 Нет необходимости фильтровать всю суспензию через коническую мембрану. Можно использовать для предварительного фильтрования 5-мкм мембранные фильтры (6.11), чтобы избежать закупоривания мембраны и ускорить процесс фильтрования.

9.3 Холостое испытание с использованием реактивов

Параллельно с проведением определения (см. 9.4) проводят холостое испытание с использованием реактивов. Раствор реактивов для холостого испытания готовят по 9.1 и 9.2, но заменяя испытательный образец в 9.1 равным объемом воды.

9.4 Определение

Используя спектрометр (6.13) при длине волны 540 нм или Hg 546 нм и полумикронные оптические кюветы (6.14), проводят определение содержания при температуре от 20 °С до 25 °С.

Перед переносом раствора пробы или холостого раствора реактива промывают пипетку раствором пробы или холостым раствором реактива соответственно.

Для отбора растворов реактивов можно использовать поршневые пипетки. Для отбора пробы и холостых растворов реактивов используется тип градуированных пипеток, применяемых в испытаниях ферментов (6.6).

Для определения нитратов и нитритов (общие нитриты) выполняют процедуру согласно таблице 1.

Таблица 1 — Процедура для определения нитратов и нитритов (общие нитриты)

Процедура	Холостой раствор реактива, см^3	Раствор испытательного образца, см^3
Пипеткой вводят в оптическую кювету: раствор испытательного образца (см. 9.2.1 или 9.2.2)	—	0,500
холостой раствор реактива (см. 9.3)	0,500	—
раствор NADPH/FAD (5.8)	0,250	0,250
раствор нитратредуктазы (5.9)	0,020	0,020
Перемешивают, например, шпателем или посредством круговых движений после герметического закрывания кюветы[a], инкубируют 30 мин при комнатной температуре, затем добавляют:		
раствор цветного реактива I (5.10.1)	0,250	0,250
раствор цветного реактива II (5.10.2)	0,250	0,250

[a] Для герметического закрывания оптической кюветы можно использовать, например, Parafilm[2)].

Примечание — Перемешивают, например, шпателем или посредством круговых движений после герметического закрывания кюветы. Оставляют кювету в темноте при комнатной температуре на 15 мин.

Считывают оптическую плотность $A_{(NO_3+NO_2)a}$ и $A_{(NO_3+NO_2)b}$ относительно воздуха (без прохождения эталонного пучка через кювету) или относительно воды. Если значение оптической плотности не превышает 1,7, разбавляют раствор пробы и учитывают коэффициент разбавления при вычислении результата.

[1)] Vivaspin® — название подходящего продукта, имеющегося в продаже. Эта информация приведена только для удобства пользователя настоящего стандарта.

[2)] Parafilm® — название подходящего продукта, имеющегося в продаже. Эта информация приведена только для удобства пользователя настоящего стандарта.

Для определения нитритов выполняют процедуру согласно таблице 2.

Таблица 2 — Процедура для определения нитритов (матричный холостой раствор, см. раздел 4, примечание 3)

Процедура	Холостой раствор реактива, $см^3$	Раствор испытательного образца, $см^3$
Пипеткой вводят в оптическую кювету: раствор испытательного образца (см. 9.2.1 или 9.2.2)	—	0,5
холостой раствор реактива (см. 9.3)	0,500	—
воду	0,270	0,270
Перемешивают, например, шпателем или посредством круговых движений после герметического закрывания кюветы[a], инкубируют 30 мин, затем добавляют:		
раствор цветного реактива I (5.10.1)	0,250	0,250
раствор цветного реактива II (5.10.2)	0,250	0,250

[a] Для герметического закрывания оптической кюветы можно использовать, например, Parafilm[1)].

Примечание — Перемешивают, например, шпателем или посредством круговых движений после герметического закрывания кюветы. Оставляют кювету в темноте при комнатной температуре на 15 мин.

Считывают оптическую плотность $A_{(ni+na)s}$ и $A_{(ni+na)bl}$ относительно воздуха (без прохождения эталонного пучка через кювету) или относительно воды. Если значение оптической плотности не превышает 1,7, разбавляют раствор пробы и учитывают коэффициент разбавления при вычислении результата.

Определение можно также проводить в обычных макрокюветах. В этом случае объемы пробы, холостого раствора с реактивом и реактивов должны быть соответственно отрегулированы.

9.5 Калибровка

Калибровочные графики строят, используя калибровочные растворы, приготовленные по 5.6.1 и 5.6.2, нанося каждую оптическую плотность, полученную по 9.4, соответственно концентрации нитрита или нитрата, в миллиграммах на литр.

10 Вычисление и выражение результатов

10.1 Содержание нитрита (матричный холостой раствор)

См. раздел 4, примечание 3.

10.1.1 Вычисление

Используя калибровочный график, построенный на основе растворов, приготовленных по 5.6.1, считывают или определяют по разности оптических плотностей $\Delta A_{ni} = A_{nis} - A_{nibl}$ (см. таблицу 2) соответствующую концентрацию нитрита в растворе пробы, c_{ni}.

Содержание нитрита (матричный холостой раствор) в пробе w_{ni}, мг/кг, вычисляют по формуле

$$w_{ni} = c_{ni} \cdot V \cdot \frac{d}{m}, \quad (1)$$

где c_{ni} — концентрация, считанная с калибровочного графика, соответствующая измеренной оптической плотности раствора испытательного образца, $мг/дм^3$ (см. 9.5);

V — объем испытательного раствора, $см^3$ (см 9.2.1 или 9.2.2) (в этом случае $V = 100$ $см^3$);

d — коэффициент разбавления (если разбавления не было, то $d = 1$);

m — масса испытуемого образца, г (см. 9.1).

10.1.2 Выражение результатов

Результат испытания выражают до одного десятичного знака.

[1)] Parafilm® — название подходящего продукта, имеющегося в продаже. Эта информация приведена только для удобства пользователя настоящего стандарта.

10.2 Общее содержание нитрита/нитрата

10.2.1 Вычисление

Используя калибровочный график, построенный на основе растворов, приготовленных по 5.6.2, считывают или определяют по разности оптических плотностей $\Delta A_{ni+na} = A_{(ni+na)s} - A_{(ni+na)bl}$ (см. таблицу 1) соответствующую концентрацию нитрита и нитрата (общий нитрит) в растворе пробы, c_{ni+na}.

Суммарное содержание нитрита и нитрата (общий нитрит) в пробе w_{ni+na}, мг/кг, вычисляют по формуле

$$w_{ni+na} = c_{ni+na} \cdot V \frac{d}{m}, \qquad (2)$$

где c_{ni+na} — концентрация, считанная с калибровочного графика, соответствующая измеренной оптической плотности раствора испытуемого образца, мг/дм³ (см. 9.5);

m, V и d определяются как в 10.1.1.

10.2.2 Выражение результатов

Результат испытания выражают до одного десятичного знака.

10.3 Содержание нитрата

10.3.1 Вычисление

Содержание нитрата в пробе w_{na}, мг/кг, вычисляют по формуле

$$w_{na} = 1{,}35(w_{ni+na} - w_{ni}), \qquad (3)$$

где 1,35 — отношение молекулярных масс ионов нитрата и нитрита.

10.3.2 Выражение результатов

Результат выражают до ближайшего целого числа.

10.3.3 Восстановительная способность

В каждой серии измерений проверяют восстановительную способность, сравнивая результаты, полученные с использованием стандартных растворов нитрата (см. 5.6.2), с соответствующими стандартными растворами нитрита (5.6.1), учитывая отношение молекулярных масс.

Восстановительная способность должна быть не менее 95 %.

11 Прецизионность

11.1 Межлабораторные испытания

Значения, выведенные из межлабораторных испытаний, не могут применяться для интервалов концентраций и матриц, которые не использовались в этих испытаниях.

Значения повторяемости и воспроизводимости были выведены из результатов межлабораторных испытаний, которые проводились согласно ИСО 5725-2.

Пределы повторяемости и воспроизводимости для нитрата были выведены из немецкого исследования, проводившегося в 1998 г., и международного исследования, проводившегося в 2004 г., согласно ИСО 5725-2. Полученные результаты приведены в приложении А. Для нитрита числовые значения не определялись.

11.2 Повторяемость

Абсолютная разность между двумя независимыми результатами отдельных испытаний, полученными одним и тем же методом на идентичном испытываемом материале в одной и той же лаборатории одним и тем же оператором при использовании одного и того же оборудования в короткий промежуток времени, может не более чем в 5 % случаев превышать следующее:

- для сухой сыворотки, концентратов белка молочной сыворотки и аналогичных продуктов с использованием осаждения реактивами Карреза и фильтрования при содержании от 40 до 160 мг/кг — 30 мг/кг;
- для других продуктов с использованием осаждения реактивами Карреза/фильтрования — $(4{,}00 + 0{,}07 w_{na})$ мг/кг;
- для всех продуктов с использованием центробежного ультрафильтрования — $(6{,}0 + 0{,}1 w_{na})$ мг/кг.

11.3 Воспроизводимость

Абсолютная разность между двумя независимыми результатами отдельных испытаний, полученными с использованием одного и того же метода на идентичном испытываемом материале в различных лабораториях различными операторами, использующими различное оборудование, может не более чем в 5 % случаев превышать следующее:

- для сухой сыворотки, концентратов белка молочной сыворотки и аналогичных продуктов с использованием осаждения реактивами Карреза и фильтрования при содержании от 40 до 160 мг/кг — 41 мг/кг;
- для других продуктов с использованием осаждения реактивами Карреза/фильтрования — $(6,0 + 0,2w_{па})$ мг/кг;
- для всех продуктов с использованием центробежного ультрафильтрования — $(10,0 + 0,1w_{па})$ мг/кг.

12 Протокол испытания

Протокол испытания должен включать в себя, как минимум, следующую информацию:

a) всю информацию, требуемую для полной идентификации пробы;

b) используемый метод отбора проб, если он известен;

c) используемый метод со ссылкой на настоящий стандарт;

d) все рабочие детали, не установленные в настоящем стандарте или рассматриваемые как факультативные, которые могли повлиять на результат(ы);

e) полученный(е) результат(ы) испытания или, если проверялась повторяемость, окончательные зарегистрированные результаты, которые были получены.

Приложение А
(справочное)

Межлабораторные испытания

А.1 Международное исследование

Пределы повторяемости и воспроизводимости для нитрата выведены из немецкого исследования, проведенного в 1998 г. (см. А.2), и международного исследования, проведенного в 2004 г.

Для международного исследования в 2004 г. использовались следующие испытуемые пробы:

1) плавленый сыр, обозначение пробы RM 63;
2) концентрат белка молочной сыворотки, обозначение пробы 1/12;
3) сухое цельное молоко, обозначение пробы 2/7;
4) плавленый сыр, обозначение пробы 3/13;
5) сухая сыворотка, обозначение пробы 4/11;
6) сухая сыворотка, обозначение пробы 5/15;
7) плавленый сыр, обозначение пробы 6/10;
8) лиофилизированный сыр, обозначение пробы 8/14;
9) сухое снятое молоко, обозначение пробы 9/16.

Результаты, полученные в международном исследовании, были подвергнуты статистическому анализу согласно ИСО 5725-2, чтобы получить данные по прецизионности, приведенные в таблицах А.1—А.3.

Для нитрита числовые данные не определялись.

Таблица А.1 — Результаты использования осаждения реактивами Карреза и ультрафильтрования

Наименование показателя	Испытуемая проба								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Среднее значение, мг/кг	49,9	39,1	9,3	7,0	60,1	159,4	19,1	1,6	4,2
Стандартное отклонение повторяемости s_r, мг/кг	3,4	10,3	2,9	1,6	13,0	9,1	2,9	1,8	2,5
Стандартное отклонение воспроизводимости, s_R, мг/кг	5,9	11,7	3,9	2,7	13,5	13,0	4,2	2,0	3,1
Коэффициент вариации повторяемости $CV(r)$, %	6,9	26,4	31,3	23,5	21,7	5,7	15,2	115	59,1
Коэффициент вариации воспроизводимости $CV(R)$, %	11,8	30,0	42,3	38,4	22,4	8,2	21,8	125	73,4
Повторяемость r, мг/кг	9,6	28,9	8,2	4,6	36,5	25,5	8,2	5,2	7,0
Воспроизводимость R, мг/кг	16,4	32,8	11,0	7,5	37,7	36,5	11,7	5,6	8,6
Повторяемость относительно среднего значения r_{rel}, %	19,2	74	88	66	61	16,0	43	325	167
Воспроизводимость относительно среднего значения R_{rel}, %	32,9	84	118	107	63	22,9	61	350	205
Предсказанный коэффициент вариации Хорвитца $CV(R)$, %	8,9	9,2	11,4	11,8	8,6	7,4	10,2	14,1	12,7
Значение HorRat (коэффициент Хорвитца)	1,3	3,3	3,7	3,3	4,4	1,1	2,1	8,9	5,8
Количество рассмотренных наборов данных	17	15	15	17	15	15	17	12	13
Количество нерассмотренных наборов данных	5	3	5	5	7	7	5	9	6

Таблица А.2 — Результаты использования осаждения реактивами Карреза и только фильтрования

Наименование показателя	Испытуемая проба								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Среднее значение, мг/кг	49,1	38,3	8,6	7,1	58,6	160,1	19,2	1,3	3,2
Стандартное отклонение повторяемости s_r, мг/кг	2,7	12,5	3,2	1,3	16,4	9,8	1,7	1,8	1,9
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мг/кг	6,0	14,3	3,5	2,6	16,2	15,2	3,4	1,6	2,5
Коэффициент вариации повторяемости $CV(r)$, %	5,6	32,7	36,7	18,8	28,1	6,1	8,9	139	55
Коэффициент вариации воспроизводимости $CV(R)$, %	12,2	37	40	36	28	9,4	18	128	79
Повторяемость r, мг/кг	8,1	35,1	8,8	3,7	47	26,9	4,8	5,0	4,9
Воспроизводимость R, мг/кг	16,8	39,9	9,7	7,2	45	42,4	9,5	4,6	7,0
Повторяемость относительно среднего значения r_{rel}, %	16,5	92	102	52	79	16,8	25	385	153
Воспроизводимость относительно среднего значения R_{rel}, %	34,2	104	113	101	78	26,5	49	353	219
Предсказанный коэффициент вариации Хорвитца $CV(R)$, %	8,9	9,2	11,4	11,8	8,6	7,4	10,2	14,1	12,7
Значение HorRat (коэффициент Хорвитца)	1,4	4,0	3,3	3,1	3,3	1,3	1,8	9,1	6,6
Количество рассмотренных наборов данных	12	10	10	12	10	10	12	8	8
Количество нерассмотренных наборов данных	5	3	5	5	7	7	5	9	6

Таблица А.3 — Результаты использования только ультрафильтрования

Наименование показателя	Испытуемая проба								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Среднее значение, мг/кг	51,6	40,6	10,9	6,9	63,2	155,7	20,7	2,0	5,3
Стандартное отклонение повторяемости s_r, мг/кг	0,9	3,9	2,4	2,3	4,9	7,8	4,3	1,6	3,2
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мг/кг	4,6	5,2	4,7	3,0	6,6	8,2	4,5	2,5	3,8
Коэффициент вариации повторяемости $CV(r)$, %	1,8	9,5	22,3	33,2	7,7	5,0	20,6	81,1	59,4
Коэффициент вариации воспроизводимости $CV(R)$, %	8,9	12,9	43,3	42,9	10,4	5,3	21,9	125	71,5
Повторяемость r, мг/кг	2,6	10,8	6,8	6,5	13,7	21,8	12,0	4,5	8,8
Воспроизводимость R, мг/кг	12,9	14,6	13,2	8,3	18,5	23,1	12,7	6,9	10,6
Повторяемость относительно среднего значения r_{rel}, %	5,0	26,6	62	94	22	14,0	58	225	166
Воспроизводимость относительно среднего значения R_{rel}, %	25,0	36,0	121	120	29	14,8	61	345	200
Предсказанный коэффициент вариации Хорвитца $CV(R)$, %	8,9	9,2	11,4	11,8	8,6	7,4	10,2	14,1	12,7

Окончание таблицы А.3

Наименование показателя	Испытуемая проба								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Значение HorRat (коэффициент Хорвитца)	1,0	1,4	3,8	2,8	1,2	0,7	2,1	8,9	5,6
Количество рассмотренных наборов данных	5	5	5	5	5	5	5	4	5
Количество нерассмотренных наборов данных	0	0	0	0	0	0	0	1	0

А.2 Результаты немецкого исследования

Метод, используемый в немецком исследовании в 1998 г., был описан в DIN 10476:2001 и German Official Method L 02.00-29:2002. Этот метод идентичен методу, описанному в настоящем стандарте, но в нем с осаждением реактивами Карреза используется только фильтрование.

В исследовании были использованы следующие пробы:

1) плавленый сыр, обозначение пробы DE 1;
2) сухое снятое молоко, обозначение пробы DE 2;
3) сухая сыворотка, обозначение пробы DE 3 (35/15);
4) лиофилизированный сыр, обозначение пробы DE 4.

Таблица А.4 — Результаты исследования с использованием DIN 10476

Наименование показателя	Испытуемая проба			
	1	2	3	4
Среднее значение, мг/кг	18,2	8,9	148	85,8
Стандартное отклонение повторяемости s_r, мг/кг	1,0	1,2	3,9	3,8
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мг/кг	3,2	3,4	13,7	8,2
Коэффициент вариации повторяемости $CV(r)$, %	5,5	13,5	2,6	4,4
Коэффициент вариации воспроизводимости $CV(R)$, %	17,6	38,2	9,3	9,6
Повторяемость r, мг/кг	2,7	3,4	11,0	10,7
Воспроизводимость R, мг/кг	9,0	9,5	38,4	23,0
Повторяемость относительно среднего значения r_{rel}, %	15,0	38,2	7,4	12,5
Воспроизводимость относительно среднего значения R_{rel}, %	49,5	107	25,9	26,8
Предсказанный коэффициент вариации Хорвитца $CV(R)$, %	10,3	11,5	7,5	8,2
Значение HorRat (коэффициент Хорвитца)	1,7	3,3	1,2	1,2
Количество рассмотренных наборов данных	11	14	13	13
Количество нерассмотренных наборов данных	2	1	2	2

Приложение ДА
(справочное)

Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов ссылочным национальным стандартам Российской Федерации (и действующим в этом качестве межгосударственным стандартам)

Таблица ДА.1

Обозначение ссылочного международного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование соответствующего национального стандарта
ИСО 565	—	*
ИСО 648	—	*
ИСО 835	—	*
ИСО 1042	—	*
ИСО 3696	—	*

* Соответствующий национальный стандарт отсутствует. До его утверждения рекомендуется использовать перевод на русский язык данного международного стандарта. Перевод данного международного стандарта находится в Федеральном информационном фонде технических регламентов и стандартов.

Библиография

[1] ИСО 707|IDF 50 Молоко и молочные продукты. Руководство по отбору проб

[2] ИСО 5725-2 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерения

[3] VON BEUTLER, H.O., WURST, B., FISCHER, S. Eine neue Methode zur enzymatischen Bestimmung von Nitrat in Lebensmitteln [A new method for the enzymatic determination of nitrate in foodstuffs]. Deut. Lebensm. Rundsch. 1986, 82, p. 283—289

[4] ARNETH, W., HEROLD, B. Nitrat/Nitrit-Bestimmung in Wurstwaren nach enzymatischer Reduktion [Nitrate/nitrite determination in sausage products after enzymatic reduction]. Fleischwirtschaft, 1988, 68, p. 761—764

[5] BÄCKMAN, C., CARL, M. Bull. Int. Dairy Fed. (in press)

[6] DIN 10476:2001 Определение содержания нитратов и нитритов в молочных продуктах. Ферментный метод (цветовой тест)

[7] EN 12014-3 Пищевые продукты. Определение содержания нитрата и/или нитрита. Часть 3. Спектрометрическое определение содержания нитратов и нитритов в мясных продуктах после ферментативного восстановления нитрата до нитрита

УДК 637.11.001:006.354 ОКС 67.100.01 Н19 ОКСТУ 9209

Ключевые слова: молоко, молочные продукты, определение нитратов, отбор проб, ферментативное восстановление, молекулярно-абсорбционная спектрометрия, реакция Грисса

Редактор *Л.В. Коретникова*
Технический редактор *Н.С. Гришанова*
Корректор *В.И. Варенцова*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Сдано в набор 04.12.2012. Подписано в печать 23.01.2013. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,32. Уч.-изд. л. 1,70. Тираж 210 экз. Зак. 73.

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru
Набрано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» на ПЭВМ.
Отпечатано в филиале ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» — тип. «Московский печатник», 105062 Москва, Лялин пер., 6.

gost.e-ecolog.ru