ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

СТБ ISO 8968-1-2008

МОЛОКО

Определение содержания азота
Часть 1. Метод Кьельдаля

МАЛАКО

Вызначэнне змяшчэння азоту
Частка 1. Метад Кьельдаля

(ISO 8968-1:2001, IDT)

Издание официальное

БЗ 9-2008

Госстандарт
Минск

gost.e-ecolog.ru

УДК 637.1.074:543.272.3(083.74)(476) МКС 67.100.10 КП 03 IDT
Ключевые слова: молоко, испытуемая проба, метод Кьельдаля

Предисловие

Цели, основные принципы, положения по государственному регулированию и управлению в области технического нормирования и стандартизации установлены Законом Республики Беларусь «О техническом нормировании и стандартизации».

1 ПОДГОТОВЛЕН республиканским унитарным предприятием «Белорусский государственный институт метрологии» (БелГИМ)

ВНЕСЕН Госстандартом Республики Беларусь

2 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ постановлением Госстандарта Республики Беларусь от 30 декабря 2008 г. № 66

3 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 8968-1:2001 Milk – Determination of nitrogen content – Part 1. Kjeldahl method (Молоко. Определение содержания азота. Часть 1. Метод Кьельдаля).

Международный стандарт разработан техническим комитетом по стандартизации ISO/TC 34 «Пищевые продукты», подкомитетом SC 5 «Молоко и молочные продукты» Международной организации по стандартизации (ISO) и Международной молочной организацией (IDF) совместно с Американской организацией химиков-аналитиков (AOAC INTERNATIONAL).

Перевод с английского языка (en).

В стандарт внесены редакционные изменения, выделенные в тексте курсивом.

Официальные экземпляры международного стандарта, на основе которого подготовлен настоящий государственный стандарт, и международных стандартов, на которые даны ссылки, имеются в Национальном фонде ТНПА.

В разделе «Нормативные ссылки» и в тексте стандарта ссылочный международный стандарт актуализирован.

Сведения о соответствии государственного стандарта ссылочному международному стандарту приведены в дополнительном приложении Д.А.

Степень соответствия – идентичная (IDT)

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

© Госстандарт, 2009

Настоящий стандарт не может быть воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Госстандарта Республики Беларусь

Издан на русском языке

Содержание

Введение IV
1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Термины и определения 1
4 Сущность метода 1
5 Реактивы 1
6 Оборудование 2
7 Отбор проб 3
8 Подготовка испытуемой пробы 3
9 Методика 3
9.1 Испытуемая проба и ее обработка 3
9.2 Определение 4
9.3 Контрольное определение 5
9.4 Анализы процесса восстановления 5
10 Расчет и представление результата 6
10.1 Расчет содержания азота 6
10.2 Расчет содержания белка 7
11 Прецизионность 7
11.1 Межлабораторный анализ 7
11.2 Повторяемость 7
11.3 Воспроизводимость 7
12 Протокол анализа 7
Приложение А (справочное) Модифицированный метод для анализа других молочных продуктов при отсутствии стандарта на данный метод для таких продуктов 8
Библиография 10
Приложение Д.А (справочное) Сведения о соответствии государственного стандарта ссылочному международному стандарту 11

Введение

Международный стандарт ISO 8968 состоит из следующих частей под общим наименованием «Молоко. Определение содержания азота»:

Часть 1. Метод Кьельдаля.

Часть 2. Блочно-септический метод (макрометод).

Часть 3. Метод дигерирования в блоке (полумикроэкспресс метод).

Часть 4. Определение содержания безбелкового азота.

Часть 5. Определение содержания белкового азота.

Приложение А данной части ISO 8968 является справочным.

Предупреждение. При выполнении работ в соответствии с настоящим стандартом могут быть использованы вредные вещества и материалы, а также могут применяться оборудование и процессы, представляющие опасность. Настоящий стандарт не предусматривает рассмотрение всех проблем безопасности, связанных с его применением. Ответственность за соблюдение техники безопасности и охраны здоровья, а также установление соответствующих ограничений по применению настоящего стандарта несет пользователь.

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

МОЛОКО
Определение содержания азота
Часть 1. Метод Кьельдаля

МАЛАКО
Вызначэнне змяшчэння азоту
Частка 1. Метад Кьельдаля

Milk
Determination of nitrogen content
Part 1. Kjeldahl method

Дата введения 2009-07-01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает порядок определения содержания азота в цельном и обезжиренном молоке по методу Кьельдаля.

2 Нормативные ссылки

Для применения настоящего стандарта необходим следующий ссылочный документ. Для недатированных ссылок применяют последнее издание ссылочного документа (включая все его изменения).

ISO 385:2005* Посуда лабораторная стеклянная. Бюретки

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применяют следующий термин с соответствующим определением:

3.1 содержание азота: Массовая доля азота, определенная методом, установленным в настоящем стандарте.

Примечание – Содержание азота выражено в процентах по отношению к массе.

4 Сущность метода

Испытуемая проба минерализуется смесью концентрированной серной кислоты и сульфата калия, в качестве катализатора используется сульфат меди (II), при этом органический азот превращается в сульфат аммония. Сульфат калия применяется для повышения точки кипения серной кислоты и обеспечения более сильного окисления смеси при минерализации. Избыток гидроокиси натрия добавляется к охлажденному продукту для выделения аммония. Выделенный аммоний поглощается раствором борной кислоты, затем титруется соляной кислотой. Содержание азота рассчитывается по количеству полученного аммония.

5 Реактивы

Следует применять реактивы только признанной аналитической квалификации, дистиллированную или деминерализованную воду или воду эквивалентной чистоты.

Примечание – Допускается применение таблеток катализатора, идентичных по содержанию сульфата калия и сульфата меди, по качеству не ниже указанных.

* Действует взамен ISO 385-1:1984.

Издание официальное

5.1 Сульфат калия (K_2SO_4), не содержащий азота.

5.2 Раствор сульфата меди (II) $c(CuSO_4)$ = 5,0 г на 100 мл[1]

Растворяют 5,0 г сульфата меди (II) 5-водного ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) в 100 мл воды в колбе с одной меткой. Доливают до метки водой и перемешивают.

5.3 Серная кислота (H_2SO_4) с массовой долей (95 – 98) %, не содержащая азота (ρ_{20} = 1,84 г/мл приблизительно).

5.4 Раствор гидроокиси натрия (NaOH), не содержащий азота, содержащий 50 г гидроокиси натрия на 100 г раствора.

5.5 Раствор индикатора

0,1 г метилового красного растворяют в 95 %-ном (объемная доля) этаноле. Разбавляют до 50 мл этанолом. 0,5 г бромкрезолового зеленого растворяют в 95 %-ном (объемная доля) этаноле. Разбавляют до 250 мл этанолом. Смешивают 1 часть метилового красного и 5 частей бромкрезолового зеленого.

5.6 Раствор борной кислоты $c(H_3BO_3)$ = 40,0 г/л[2]

40,0 г борной кислоты растворяют в 1 л горячей воды, используя мерную колбу с одной меткой вместимостью 1000 мл. Охлаждают колбу до 20 °С. Доливают содержимое колбы водой до метки, добавляют 3 мл[3] раствора индикатора (5.5) и перемешивают. Хранить раствор, который должен быть светло-оранжевого цвета, в боросиликатной стеклянной бутыли. Во время хранения следует беречь раствор от света и источников паров аммония.

При использовании титрования с электронной фиксацией pH в конечной точке индикатор к борной кислоте можно не добавлять. Изменение цвета можно использовать для проверки правильности процедуры титрования.

5.7 Стандартный раствор соляной кислоты, c(HCl) = (0,1 ± 0,0005) моль/л.

Рекомендуется использовать стандартный раствор для выполнения вышеизложенных требований.

Примечание – Часто систематическая ошибка (которой можно избежать), возникающая при разбавлении аналитиком концентрированной кислоты и определении концентрации раствора, может ухудшить воспроизводимость метода. Аналитик не должен применять для титрования раствор с концентрацией более 0,1 моль/л, так как при этом уменьшится общий объем, использованный на титрование пробы, и неопределенность показаний бюретки составит больший процент от объема. Такой же результат и дополнительные источники ошибок возникают, если соляную кислоту заменяют на другую (например, серную). Не рекомендуется производить такие замены.

5.8 Сульфат аммония [$(NH_4)_2SO_4$], минимальное содержание 99,9 % (массовая доля) в пересчете на сухой продукт.

Непосредственно перед применением следует сушить сульфат аммония при температуре (102 ± 2) °С не менее 2 ч. Охладить до комнатной температуры в эксикаторе.

5.9 Триптофан ($C_{11}H_{12}N_2O_2$) или гидрохлорид лизина ($C_6H_{15}ClN_2O_2$), минимальное содержание 99 % (массовая доля).

Перед применением не следует сушить эти реактивы в сушильном шкафу.

5.10 Сахароза с содержанием азота не более 0,002 % (массовая доля).

Перед применением не следует сушить сахарозу в сушильном шкафу.

6 Оборудование

Примечание – Допускается применение другого оборудования с аналогичными метрологическими и техническими характеристиками.

6.1 Водяная баня, поддерживающая температуру (38 ± 2) °С.

6.2 Колбы Кьельдаля вместимостью 500 мл или 800 мл.

6.3 Аналитические весы, точность взвешивания до 0,1 мг.

6.4 Материал, облегчающий кипение, например пористый материал, твердые кусочки фарфора или амфотерный оксид алюминия (например, карборунд) высокой очистки в гранулах, гладкий, размер ячейки 10.

[1] 1 мл = 1 $см^3$.

[2] 1 л = 1 $дм^3$.

Не использовать материалы повторно.

Примечание – Иногда применяют стеклянные шарики диаметром 5 мм, но они не могут обеспечить такое эффективное кипение, как гранулы оксида алюминия. Со стеклянными шариками может появится больше проблем вспенивания во время процесса минерализации.

6.5 Бюретка или автоматическая пипетка с возможностью подачи порции 1,0 мл раствора сульфата меди (5.2).

6.6 Цилиндры мерные градуированные вместимостью 50 мл, 100 мл и 500 мл.

6.7 Аппарат для минерализации с системой отвода газов, удерживающий колбы Кьельдаля (6.2) с наклоном (приблизительно 45°), снабженный электрическим обогревом или газовыми горелками, которые обеспечивают нагрев колб до уровня, не превышающего их содержимое.

Источник тепла должен поддерживать максимально установленный нагрев во время минерализации. Предварительно следует нагреть источник тепла для регулирования. При использовании газового нагревателя период предварительного нагрева должен быть 10 мин, для электрического нагревателя – 30 мин. Для каждого из нагревателей следует определить режим нагрева, чтобы привести 250 мл воды, содержащей 5 – 10 материалов, облегчающих кипение, с начальной температурой 25 °С к точке кипения за 5 – 6 мин. Этот максимальный режим нагревателя необходимо использовать во время минерализации.

6.8 Аппарат для перегонки, изготовленный из боросиликатного стекла или другого соответствующего материала, к которому может быть прикреплена колба Кьельдаля (6.2), состоящий из эффективной насадки, предохраняющей от переброса перегоняемой жидкости, соединенной с эффективным конденсатором с прямыми входной и выходной трубками, присоединенными к его нижнему концу.

Соединительные трубки и пробки должны быть плотно подогнаны и предпочтительно изготовлены из неопрена.

6.9 Колбы конические вместимостью 200 мл, 500 мл, 1000 мл.

6.10 Бюретка вместимостью 50 мл, градуированная через каждые 0,01 мл, соответствующая требованиям ISO 385, класс А.

Может применяться автоматическая бюретка, если она удовлетворяет аналогичным требованиям.

6.11 Автоматический титратор, оснащенный pH-метром

pH-метр должен быть тщательно откалиброван в диапазоне от 4 pH до 7 pH по методике калибровки.

Примечание – Допускается применять оборудование со встроенным pH-метром.

7 Отбор проб

Отбор проб не описан в настоящем стандарте. Рекомендации по методу отбора даны в ISO 707.

Важно, чтобы лаборатория получила пробу, которая действительно является представительной и не была повреждена и не претерпела изменений во время транспортировки или хранения.

8 Подготовка испытуемой пробы

Нагревают испытуемую пробу до температуры 38 °С на водяной бане (6.1). Осторожно перемешивают пробу, тщательно переворачивая емкость с пробой, не вызывая вспенивания или взбивания. Быстро охлаждают испытуемую пробу перед взвешиванием (9.1).

Примечание – Рекомендации по размеру пробы при использовании данного метода в применении к другим молочным продуктам (кроме молока) – см. приложение А.

9 Методика

9.1 Испытуемая проба и ее обработка

В чистую и сухую колбу Кьельдаля (6.2) помещают от 5 до 10 вспомогательных материалов, облегчающих кипение (6.4), добавляют 15,0 г сульфата калия (5.1), 1,0 мл раствора сульфата меди (II) (5.2), приблизительно (5 ± 0,1) мл подготовленной испытуемой пробы (раздел 8), взвешенной с точностью до 0,1 мг, и 25 мл серной кислоты (5.3). Серную кислоту используют для того, чтобы смыть раствор сульфата меди (II), сульфата калия или испытуемую пробу, оставшуюся на горловине колбы.

Если случайный продукт остался на горловине, следует промыть его небольшим количеством воды. Осторожно перемешивают содержимое колбы Кьельдаля.

Примечание – Рекомендации по размеру пробы при использовании данного метода в применении к другим молочным продуктам (кроме молока) – см. приложение А.

9.2 Определение

9.2.1 Минерализация

Подключают систему отвода газов аппарата для минерализации (6.7) перед началом минерализации. Нагревают колбу Кьельдаля и ее содержимое (9.1) на аппарате для минерализации, используя нагреватель, установленный достаточно низко, так, чтобы обуглившийся минерализат не поднимал пену до горловины колбы Кьельдаля. Продолжают минерализацию при нагревании до появления белых хлопьев в колбе приблизительно 20 мин. Увеличивают нагрев наполовину максимально установленного, определенного в 6.7, и продолжают нагревание 15 мин. Увеличивают нагрев до максимума, определенного в 6.7. После того как минерализат станет чистым (светло-голубовато-зеленого цвета), продолжают нагревание в течение от 1 до 1,5 ч при максимально установленном режиме нагрева. Общее время минерализации должно быть 1,8 – 2,25 ч.

Чтобы определить необходимое время кипения, требуемое для условий анализа в определенной лаборатории, используя индивидуальную установку приборов, необходимо выбрать для анализа молока образцы с высоким содержанием белка, жира и определить содержание белка, используя различное время кипения (от 1 до 1,5 ч) после очистки. Результат при определении среднего значения белка увеличивается с увеличением времени кипения, становится постоянным и затем уменьшается, если время кипения продолжается. Необходимо выбрать такое время кипения, чтобы получить максимальное значение содержания белка.

Минерализат в конце минерализации должен быть чистым. Охлаждают минерализат до комнатной температуры в открытой колбе в отдельном вытяжном шкафу приблизительно 25 мин. Если колба остается остывать на горячих нагревателях, понадобится больше времени, чтобы достичь комнатной температуры. Охлажденный минерализат должен быть жидким или жидким с небольшими кристаллами на дне колбы в конце охлаждения в течение 25 мин. Не следует оставлять неразбавленный минерализат в колбах на ночь. Неразбавленный минерализат может кристаллизоваться за это время, и будет очень трудно перевести закристаллизованный минерализат обратно в раствор.

Примечание – Повышенная кристаллизация после 25 мин является результатом чрезмерной потери кислоты во время минерализации и может выразиться в заниженных значениях результатов анализа.

Чрезмерная потеря кислоты вызвана повышенным отсасыванием газов или слишком длительным временем минерализации, вызванным неточным установлением режима максимального нагрева.

Добавляют 300 мл воды в колбы Кьельдаля вместимостью 500 мл или 400 мл воды в колбы Кьельдаля вместимостью 800 мл. Для промывания горловины колбы используют воду. Содержимое тщательно перемешивают, чтобы все кристаллы растворились. Добавляют 5 – 10 материалов, облегчающих кипение (6.4). Охлаждают смесь до комнатной температуры перед перегонкой. Растворенный минерализат можно закрыть и оставить для перегонки.

9.2.2 Перегонка

Включают охлаждающую воду в аппарате для перегонки (6.8). Добавляют 75 мл гидроокиси натрия (5.4) к разбавленному минерализату (9.2.1), осторожно приливая раствор на наклонную поверхность горловины колбы Кьельдаля для формирования слоя на дне баллона колбы. Должна быть четкая граница между двумя растворами. Для уменьшения потери аммония немедленно после прибавления раствора гидроокиси натрия в колбу Кьельдаля быстро подсоединяют ее к перегонному аппарату (6.8). Наконечник трубки выхода конденсата погружают в 50 мл раствора борной кислоты (5.6), содержащегося в конической колбе (6.9). Энергично вращают колбу Кьельдаля, чтобы перемешать ее содержимое до исчезновения разделенных слоев раствора в колбе. Устанавливают колбу на нагреватель. Включают нагреватель до установленной точки, пока не закипит смесь. Продолжают перегонку до тех пор, пока не начнется неравномерное кипение (бурление), и затем немедленно отсоединяют колбу Кьельдаля и выключают нагреватель. Выключают охлаждающую воду. Промывают внутри и снаружи наконечник трубки выхода конденсата водой, сливая ее (воду) в коническую колбу, и смешивают с конденсатом.

Степень перегонки должна быть такова, чтобы собрать приблизительно 150 мл дистиллята перед началом неравномерного кипения (бурления). Общий объем содержимого конической колбы должен

составлять приблизительно 200 мл. Если объем собранного дистиллята меньше 150 мл, вероятно, что к растворенному минерализату воды было добавлено меньше чем 300 мл. Эффективность конденсации должна быть такова, чтобы температура содержимого конической колбы не превышала 35 °С во время перегонки при применении колориметрической конечной точки титрования.

9.2.3 Титрование

Содержимое конической колбы (9.2.2) титрируют раствором соляной кислоты (5.7), используя бюретку (6.10). Конечная точка фиксируется при первом появлении розового цвета содержимого. Отметить показания бюретки к ближайшему делению 0,05 мл. С помощью освещенной пластины магнитной мешалки зафиксировать конечную точку.

Другой метод титрования: содержимое конической колбы (9.2.2) титрируют раствором соляной кислоты (5.7), используя надлежащим образом откалиброванный титратор, обеспеченный pH-метром (6.11). Значение pH достигает 4,6 в конечной точке титрования, что соответствует началу крутого излома на кривой титрования (точка перегиба). На автоматическом титраторе отмечают показания количества раствора, пошедшего на титрование.

Примечания

1 Первое появление розового цвета наблюдается между pH 4,6 и 4,3 для системы индикации и 4 %-ного раствора борной кислоты, установленного в этом методе. На практике величина pH в зависимости от добавленного 0,1 моль/л HCl меняется очень быстро. Требуется около 0,05 мл 0,1 моль/л HCl, чтобы изменить pH на 0,3 единицы в области от 4,6 до 4,3 в такой системе.

2 Статистика внутри- и межлабораторного выполнения данного метода была определена с использованием титратора цветовой фиксации конечной точки. Сравнивая окончательные результаты анализа, включая холостые анализы, полученные с конечной точкой pH 4,6 на таком же титраторе цветовой фиксации конечной точки, показали, что статистически нет значительной разницы между ними.

9.3 Контрольное определение

Контрольное определение проводят с применением стандартного раствора соляной кислоты (5.7) и бюретки (6.10) или автоматического титратора с pH-метром (6.11), которые использовались для анализа проб. Выполняют контрольное определение в соответствии с процедурами, описанными в 9.1 – 9.2.3, испытуемую пробу заменяют на 5 мл воды и около 0,85 г сахарозы (5.10).

Необходимо вести запись контрольных определений. Если изменились значения, полученные при контрольных определениях, необходимо установить причину.

Примечание 1 – При проведении контрольного определения для поглощения серной кислоты во время минерализации вместо испытуемой пробы в качестве органического вещества необходимо наличие сахарозы. Если количество остаточной освобожденной серной кислоты в конце минерализации слишком мало, количество восстановленного азота методами по 9.4.2 и 9.4.3 будет низким. Если количества освобожденной кислоты в конце минерализации достаточно, чтобы вернуть весь азот, но температура и время в процессе минерализации были недостаточными, чтобы освободить весь азот из пробы, количество азота, освобожденного по 9.4.2, будет приемлемым, а количество азота, освобожденного по 9.4.3, будет недостаточным.

Количество титранта, используемое в контрольном определении, должно быть всегда больше нуля.

Контрольные определения внутри одной лаборатории должны быть совмещены во времени. Обычно значения, полученные при выполнении контрольных определений, равны или ниже 0,2 мл.

Примечание 2 – Иногда холостая проба уже имеет розовый цвет перед началом титрования. Обычно в таких случаях конические колбы не достаточно чистые или вода из влажного воздуха, которая конденсируется на внешней стороне конденсатора, стекла вниз в колбу для сбора, что и привело к загрязнению.

9.4 Анализы процесса восстановления

9.4.1 Точность метода должна проверяться регулярно следующими методами анализа процесса восстановления, который выполнен в соответствии с 9.1 – 9.2.3.

9.4.2 Проверяют, что азот не потерян, используя испытательную пробу, состоящую из 0,12 г сульфата аммония (5.8) и 0,85 г сахарозы (5.10).

Примечание – Проверка процесса восстановления сульфата аммония не дает информации о том, способствуют ли условия минерализации освобождению азота, который входит в структуру белка.

Процент восстановленного азота должен быть между 99,0 % и 100,0 % для всех методов. Если восстановлено менее 99 % азота, то либо концентрация титранта выше чем установленное значение, либо произошли потери азота при минерализации или перегонке. Можно использовать смесь сульфата

аммония и небольшого количества серной кислоты (количество остаточного продукта, остающегося в конце минерализации) в колбе Кьельдаля. Разбавляют ее стандартным объемом воды, добавляют стандартное количество гидроокиси натрия и дистиллята. Если количество восстановленного азота остается небольшим, потеря азота обусловлена аппаратом перегонки, а не процессом минерализации. Возможно, причина заключается в наличии протекающих труб в традиционной системе или в том, что наконечники конденсаторов не были погружены в борную кислоту в начале процесса перегонки. Аппаратура должна пройти эту проверку перед тем, как анализируется процесс восстановления по методике 9.4.3.

Если восстановление азота превышает 100 %, потери азота невозможно увидеть. В таком случае возможными причинами являются:

a) сульфат аммония загрязнен;

b) фактическая концентрация титранта ниже его установленного значения;

c) калибровка бюретки для титранта неверная;

d) температура титранта значительно выше температуры калибровки бюретки или

e) скорость вытекания титранта из бюретки превышает максимальную скорость, при которой калибровка бюретки достоверна.

9.4.3 Проверяют эффективность процедуры минерализации, используя 0,16 г гидрохлорида лизина или 0,18 г триптофана (5.9) вместе с 0,67 г сахарозы (5.10).

Массовая доля восстановленного азота должна быть не менее 98 %. Если массовая доля восстановленного азота составила менее 98 %, после того как массовая доля при восстановлении азота с применением сульфата аммония составила от 99 % до 100 %, это означает, что температура минерализации была низкая или время минерализации недостаточное (следуя методике по 9.2.1, первому абзацу и примечанию) или материал пробы не полностью минерализовался (имеется обугленное вещество) на внутренней стороне колбы Кьельдаля. Окончательная оценка выполнения лучше всего может быть сделана по программе профессионального тестирования, когда внутри- и межлабораторные статистические параметры рассчитываются на основе анализа испытательных проб молока.

9.4.4 Более низкие результаты в любом из анализов процесса восстановления (или выше чем 100,0 % в 9.4.2) показывают недостатки в методе и/или неточную концентрацию раствора соляной кислоты (5.7).

10 Расчет и представление результатов

10.1 Расчет содержания азота

10.1.1 Рассчитывают содержание азота в испытуемой пробе w_N, используя следующую формулу:

$$w_N = \frac{1{,}4007(V_s - V_b)M_r}{m},$$

где w_N – массовая доля азота в пробе, %;

V_s – объем соляной кислоты (5.7), используемой в определении (9.2.3), мл, с точностью до 0,05 мл;

V_b – объем соляной кислоты (5.7), используемой в контрольном определении (9.3), мл, с точностью до 0,05 мл;

M_r – молярность соляной кислоты (5.7), выраженная до четвертого знака;

m – масса испытуемой порции (9.1), г, с точностью до 0,1 мг;

1,4007 – *коэффициент пересчета для выражения содержания азота в массе пробы, %.*

10.1.2 Полученный результат выражают с точностью до четвертого знака, если это необходимо для дальнейших расчетов. В случае окончательного результата его выражают для полученного азота с точностью до третьего знака, для содержания белка – до второго знака. Полученные результаты не должны округляться до окончательного использования результата анализа.

Примечание – Иногда значения должны использоваться для дальнейших расчетов. Одним из примеров является использование значений индивидуального испытания, полученных при анализе многих материалов проб для расчета статистик выполнения метода для внутри- и межлабораторной дисперсии. Другой пример – если значения используются как стандартные при калибровке приборов (например, инфракрасный анализатор молока), когда значения многих проб будут использованы при выполнении расчетов простой или сложной регрессии. В таких случаях полученные результаты не должны округляться до того, как они будут использованы в дальнейших расчетах.

10.2 Расчет содержания белка

10.2.1 Рассчитывают содержание белка в испытуемом образце w_p, используя следующую формулу:

$$w_p = w_N \times 6{,}38,$$

где w_p – массовая доля белка в пробе, %;
w_N – массовая доля азота в пробе, %;
6,38 – коэффициент для выражения содержание белка по содержанию азота.

10.2.2 Выражают полученные результаты содержания уровня белка до трех десятичных знаков, если требуются дальнейшие расчеты. В случае получения окончательных результатов (10.1) выразить их до двух десятичных знаков.

11 Прецизионность

11.1 Межлабораторный анализ

Значения пределов повторяемости и воспроизводимости были установлены по результатам межлабораторных испытаний, выполненных в соответствии с ISO 5725[1]. Подробности методики межлабораторных испытаний приведены в документах [5], [6]. Значения, установленные в результате таких испытаний, могут быть непригодны для областей концентрации и матриц, отличных от данных.

11.2 Повторяемость

Абсолютная разность между двумя независимыми единичными результатами, полученными с использованием одного метода на идентичных образцах в одной лаборатории одним оператором с использованием одного оборудования за короткий промежуток времени, должна быть не более (за исключением 5 % случаев) 0,006 % от содержания азота (0,038 % от уровня содержания белка).

11.2 Воспроизводимость

Абсолютная разность между двумя независимыми единичными результатами, полученными с использованием одного метода на идентичных образцах в различных лабораториях разными операторами с использованием различного оборудования, должна быть не более (за исключением 5 % случаев) 0,0077 % от содержания азота (0,049 % от уровня содержания белка).

12 Протокол анализа

Протокол должен содержать:
– всю информацию, необходимую для полной идентификации образца;
– применяемый метод отбора проб, если он известен;
– используемый метод анализа, со ссылкой на настоящий стандарт;
– все подробности выполнения, не описанные в настоящем стандарте, или выборочные, вместе с любыми второстепенными деталями, которые могут влиять на результаты;
– полученные результат (ы) анализа;
– если повторяемость была проверена, окончательно полученный результат;
– если восстановление было проверено, окончательно полученный результат.

[1] ISO 5725:1986 (в настоящее время отменен) ранее использовался для получения данных по прецизионности.

Приложение А
(справочное)

Модифицированный метод для анализа других молочных продуктов при отсутствии стандарта на данный метод для таких продуктов

А.1 Общие требования

Метод, описанный в настоящем стандарте, был оптимизирован, и его выполнение оценено для анализа коровьего молока. Если не существует отдельного стандарта, лаборатория для определения содержания азота в молочных продуктах может по желанию использовать такой же метод, но немного модифицированный. Тем не менее надо отметить, что метод и его выполнение в таких целях не были валидированы.

А.2 Метод

Взвешивают с точностью до 0,1 мг требуемую массу испытуемой пробы, взятой из соответственно подготовленного испытуемого образца как описано ниже. Для определения содержания азота используют метод, описанный в 9.1 – 9.4.

Количество серной кислоты (5.3) и раствора гидроксида натрия (5.4), применяемое при минерализации и перегонке, не должно изменяться. Изменение соотношения кислоты и других компонентов путем увеличения количества кислоты уменьшает унифицированную точку кипения смеси в процессе минерализации, что не рекомендуется делать.

При работе с реактивами, определенными в настоящем стандарте, используется приблизительный размер испытуемой пробы. Приблизительный размер испытуемой пробы для испытуемого образца может быть оценен следующим образом. Оптимальное количество белка для испытуемого образца из расчета на колбу Кьельдаля (6.2) должно быть от 0,15 до 0,30 г. Таким образом, если средний испытуемый образец сыра содержит 24 % белка, масса испытуемой пробы должна быть от 0,625 г до 1,25 г. Принятие решения по количеству массы пробы, наименьшей или наибольшей из этого интервала, зависит от того, как много кислоты будет поглощено во время минерализации остальными компонентами образца (например, жиром и углеводами).

По данному методу к испытуемой пробе в колбу Кьельдаля добавляют 25 мл (приблизительно 46 г) серной кислоты. В конце минерализации около 15 г серной кислоты должно оставаться в колбе для удерживания азота.

Надо отметить, что серная кислота расходуется испытуемой пробой и также теряется из-за улетучивания во время минерализации. Потери при улетучивании могут быть равны количеству, поглощаемому органическим веществом в испытуемой пробе. Окончательное количество оставшейся кислоты будет зависеть от обоих этих процессов. Чрезмерная потеря кислоты во время улетучивания (по причине чрезмерного поглощения паров во время минерализации или потому, что горловины колб были слишком горячими) может привести к тому, что количество оставшейся кислоты в конце минерализации слишком мало, хотя размер испытуемой пробы был точным.

Также небольшое количество оставшейся кислоты может быть результатом кристаллизации минерализата после охлаждения в течение 25 мин и низкого восстановления азота.

Рассмотрим анализ сложного продукта, например сливки с содержанием жира 40 %. В данном случае содержание белка или азота в образце низкое, а содержание жира высокое. Предположим, среднее содержание жира в образце сливок 40 %, белка – 1,9 % и лактозы – 2,9 %. Для того чтобы содержание белка в колбе Кьельдаля (6.2) составило 0,15 г, необходимо использовать испытуемую пробу весом 7,89 г. Данная испытуемая проба должна содержать 3,16 г жира, который поглощает 56,9 г (примерно 30,9 мл) серной кислоты в процессе минерализации без учета потерь серной кислоты при улетучивании (предполагается, что в процессе минерализации 1 г жира будет поглощать 18 г серной кислоты). В этом примере количество испытуемой пробы должно быть уменьшено, чтобы соответствующее количество серной кислоты осталось в конце минерализации. Если испытуемые образцы подобны сливкам, то должен применяться титрант, который имеет низкую концентрацию (например, 0,01 моль/л). В таких случаях количество испытуемой пробы необходимо уменьшить, чтобы соответствующее количество серной кислоты осталось в конце минерализации.

Количество сахарозы, требуемое в контрольном опыте или для восстановления продуктов, отличных от коровьего молока, может быть определено следующим образом.

Во-первых, требуется оценить приблизительное содержание жира, белка и углеводов для типа испытуемого образца и приблизительную массу испытуемой пробы, используемой в процессе минерализации.

Во-вторых, во время минерализации 1 г жира будет поглощать около 18 г серной кислоты, 1 г белка будет поглощать около 9 г серной кислоты и 1 г углеводов будет поглощать около 7 г серной кислоты.

Основываясь на вышеизложенном, можно рассчитать количество кислоты, поглощаемое испытываемой пробой, и количество сахарозы, требуемое для поглощения того же количества кислоты во время минерализации. Рассчитанное количество сахарозы должно быть использовано в контрольном опыте и в процессе восстановления сульфата аммония.

При использовании метода восстановления азота аминокислот (9.4.3) необходимо уменьшить количество сахарозы в соответствии с количеством серной кислоты, которая будет поглощена (в расчете на белок) гидрохлоридом лизина или триптофаном. Принято, что восстановление азота в процессе минерализации на применяемом оборудовании равнозначно для испытуемых проб, отличных от молока, без проведения экспериментов по восстановлению азота, при которых воспроизводятся условия, позволяющие получить такое же количество серной кислоты в конце минерализации.

Библиография

[1] Международный стандарт ISO 707:1997 — Milk and milk products – Guidance on sampling (Молоко и молочные продукты. Руководство по отбору проб)

[2] Международный стандарт ISO 5725:1986 — Precision of test methods – Determination of repeatability and reproducibility for a standard test methods by inter-laboratory tests (Прецизионность методов измерений. Определение повторяемости и воспроизводимости для стандартного метода измерения в межлабораторных измерениях)

[3] Международный стандарт ISO 5725-1:1994 — Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 1: General principles and definitions (Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Общие принципы и определения)

[4] Международный стандарт ISO 5725-2:1994 — Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method (Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерения)

[5] Barbano, D. M., Clark, J. L., Dunham, C. E. and Fleming, J. R. Kjeldahl method for determination of total nitrogen content of milk: Collaborative study. J.Assoc. Off. Anal. Chem., 73, 1990, pp. 849 – 859
Барбано, Д. М., Кларк, Дж. Л., Дюнхэм, К. И., Флеминг, Дж. Р. Метод Кьельдаля для определения содержания общего азота в молоке. Совместное исследование. Ассоциация Аналитической Химии, 73, 1990, с. 849 – 859

[6] Lynch, J. M., Barbano, D. M., and Fleming, J. R. Performance evaluation of direct forced-air total solids and Kjeldahl total nitrogen methods: 1990 through 1995. J.Assoc. Off. Anal. Chem. Int., 80, 1997, pp.1038 – 1043
Линч, Дж. М., Барбано, Д. М., Флеминг, Дж. Р. Оценивание методов определения сухого остатка прямой воздушной сушкой и общего азота по Кьельдалю: 1990 – 1995. Ассоциация Аналитической Химии, 80, 1997, с. 1038 – 1043

Приложение Д.А
(справочное)

Сведения о соответствии государственного стандарта ссылочному международному стандарту

Таблица Д.А.1 – Сведения о соответствии государственного стандарта ссылочному международному стандарту другого года издания

Обозначение и наименование ссылочного международного стандарта	Обозначение и наименование международного стандарта другого года издания	Степень соответствия	Обозначение и наименование государственного стандарта
ISO 385:2005 Посуда лабораторная стеклянная. Бюретки	ISO 385-1:1984 Посуда лабораторная стеклянная. Бюретки. Часть 1. Общие требования	IDT	ГОСТ 29251-91 (ИСО 385-1-84) Посуда лабораторная стеклянная. Бюретки. Часть 1. Общие требования (ISO 385-1:1984, IDT)

Ответственный за выпуск *В.Л. Гуревич*

Сдано в набор 08.01.2009. Подписано в печать 04.02.2009. Формат бумаги 60×84/8. Бумага офсетная.
Гарнитура Arial. Печать ризографическая. Усл. печ. л. 1,51 Уч.- изд. л. 0,90 Тираж экз. Заказ

Издатель и полиграфическое исполнение:
Научно-производственное республиканское предприятие
«Белорусский государственный институт стандартизации и сертификации (БелГИСС)»
ЛИ № 02330/0133084 от 30.04.2004.
ул. Мележа, 3, 220113, г. Минск.

gost.e-ecolog.ru