ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

СТБ ISO/TS 17837-2013

ПРОДУКТЫ СЫРНЫЕ ПЛАВЛЕНЫЕ

Определение содержания азота и расчет содержания общего белка. Метод Кьельдаля

ПРАДУКТЫ СЫРНЫЯ ПЛАЎЛЕНЫЯ

Вызначэнне змяшчэння азоту і разлік змяшчэння агульнага бялку. Метад Кьельдаля

(ISO/TS 17837:2008, IDT)
(IDF/RM 25:2008, IDT)

Издание официальное

Госстандарт
Минск

gost.e-ecolog.ru

УДК 637.358.045:543.632.45.06(083.74)(476) МКС 67.100.01 КП 03 IDT

Ключевые слова: продукты сырные плавленные, содержание азота, содержание общего белка, 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 29 марта 2013 г. № 18

3 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO/TS 17837|IDF/RM 25:2008 Processed cheese products – Determination of nitrogen content and crude protein calculation – Kjeldahl method (Продукты сырные плавленые. Определение содержания азота и расчет содержания общего белка. Метод Кьельдаля).

Международный стандарт разработан подкомитетом SC 5 «Молоко и молочные продукты» технического комитета ISO/TC 34 «Продукты пищевые сельскохозяйственные» Международной организации по стандартизации (ISO) и Международной молочной организацией (IDF).

Перевод с английского (en).

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

В разделе «Нормативные ссылки» и тексте стандарта ссылки на международные стандарты актуализированы.

Степень соответствия – идентичная (IDT).

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

© Госстандарт, 2013

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

Издан на русском языке

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 испытуемой пробы 4
9 Методика 4
9.1 Традиционный метод 4
9.2 Метод дигерирования в блоке 6
9.3 Контрольное определение 7
9.4 Анализы процесса восстановления 8
10 Расчет и обработка результатов 9
10.1 Расчет 9
10.2 Обработка результатов 9
11 Прецизионность 9
11.1 Межлабораторное испытание 9
12 Протокол испытаний 10
Приложение А (справочное) Межлабораторное испытание 11
Библиография 12

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ПРОДУКТЫ СЫРНЫЕ ПЛАВЛЕНЫЕ
Определение содержания азота и расчет содержания общего белка. Метод Кьельдаля

ПРАДУКТЫ СЫРНЫЯ ПЛАЎЛЕНЫЯ
Вызначэнне змяшчэння азоту і разлік змяшчэння агульнага бялку. Метад Кьельдаля

Processed cheese products
Determination of nitrogen content and crude protein calculation
Kjeldahl method

Дата введения 2013-11-01

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ – Лицам, применяющим настоящий стандарт, следует ознакомиться с правилами лабораторной эксплуатации. 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.

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает контрольный метод содержания азота и расчет содержания общего белка методом Кьельдаля в продуктах сырных, плавленных как традиционным, так и методом дигерирования в блоке.

Примечание – Неточные результаты содержания общего белка могут быть получены, если в указанных продуктах сырных плавленых присутствуют источники азота немолочного происхождения.

2 Нормативные ссылки

Для применения настоящего стандарта необходимы следующие ссылочные документы. Для датированных ссылок применяют только указанное издание ссылочного документа. Для недатированных ссылок применяют последнее издание ссылочного документа (включая все его изменения).

ISO 385:2005 Посуда лабораторная стеклянная. Бюретки

ISO 1042:1998 Посуда лабораторная стеклянная. Колбы мерные с одной меткой

ISO 4788:2005 Посуда лабораторная стеклянная. Цилиндры градуированные мерные

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применяют следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 содержание азота (nitrogen content): Массовая доля азота, определенная методом, изложенным в настоящем стандарте.

Примечание – Содержание азота выражено в процентах.

3.2 содержание общего белка (crude protein content): Массовая доля общего белка, полученная в соответствии с настоящим стандартом.

Примечание – Содержание общего белка выражено в процентах.

Издание официальное

4 Сущность метода

Испытуемую пробу минерализуют смесью концентрированной серной кислоты и сульфата калия. В качестве катализатора используют сульфат меди (II), при этом органический азот превращается в сульфат аммония. Сульфат калия применяют для повышения точки кипения серной кислоты и обеспечения более сильного окисления смеси при минерализации. Избыток гидроокиси натрия добавляют к охлажденному продукту для выделения аммония. Выделенный аммоний в процессе паровой дистилляции собирают в избыток раствора борной кислоты, затем титруют стандартным раствором соляной кислоты. Содержание азота рассчитывают по количеству полученного аммония, а содержание общего белка на основании полученного содержания азота.

5 Реактивы

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

5.1 Сульфат калия (K_2SO_4), не содержащий азота.

5.2 Раствор сульфата меди (II), 5-водный, ρ ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) = 5,0 г/100 мл.

Растворяют 5,0 г сульфата меди (II) 5-водного в воде, используя мерную колбу с одной меткой вместимостью 100 мл (6.8). Доводят до метки водой и перемешивают.

5.3 Серная кислота (H_2SO_4) с массовой долей 95 % – 98 %, не содержащая азота [$\rho_{20}(H_2SO_4) \approx 1{,}84$ г/мл].

5.4 Водный раствор гидроокиси натрия, не содержащий азота, содержащий 50 г гидроокиси натрия (NaOH) на 100 г раствора (массовая доля гидроокиси натрия, w_{NaOH} = 50 %).

В случае закупоривания проточной системы в автоматической дистилляционной установке используют раствор, равный w_{NaOH} = 40 %.

5.5 Раствор индикатора.

5.5.1 Растворяют 0,1 г метилового красного в 95%-ном (объемная доля) этаноле, используя мерную колбу с одной меткой вместимостью 50 мл (6.8). Доводят до метки 50 мл 95%-ным (объемная доля) этанолом и перемешивают.

5.5.2 Растворяют 0,5 г бромкрезолового зеленого в 95%-ном (объемная доля) этаноле, используя мерную колбу с одной меткой вместимостью 250 мл (6.8). Доводят до метки 95%-ным (объемная доля) этанолом и перемешивают.

5.5.3 Смешивают 1 часть метилового красного (5.5.1) и 5 частей бромкрезолового зеленого (5.5.2) или объединяют и смешивают оба раствора.

5.6 Раствор борной кислоты, ρ(H_3BO_3) = 40,0 г/л.

Растворяют 40,0 г борной кислоты (H_3BO_3) в 1 л горячей воды, используя мерную колбу с одной меткой вместимостью 1000 мл (6.8). Охлаждают колбу до 20 °С. Доливают содержимое колбы водой до метки, добавляют 3 мл раствора индикатора (5.5.3) и перемешивают.

Хранят раствор, который должен быть светло-оранжевого цвета, в бутылях из боросиликатного стекла. Во время хранения следует беречь раствор от света и источников паров аммония.

Примечание – При использовании титрования с электронной фиксацией pH в конечной точке индикатор (5.5.3) к борной кислоте можно не добавлять. С другой стороны, 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 соляной кислоты известного производителя.

Использование стандартного раствора соляной кислоты позволяет избежать систематической погрешности, возникающей при разбавлении концентрированного раствора соляной кислоты и дальнейшем определении концентрации кислоты и ухудшающей воспроизводимость метода. Использование стандартного раствора соляной кислоты для титрования позволяет избежать применения раствора кислоты с концентрацией, превышающей (0,1 ± 0,0005) моль/л, в результате чего уменьшается общий объем использованной на титрование пробы. В связи с этим неопределенность показаний бюретки составит больший процент от объема, что негативно скажется на воспроизводимости и повторяемости метода. Такой же результат и дополнительные источники ошибок возникают, если соляную кислоту заменяют на другую (например, серную). Такие замены производить не рекомендуется.

5.8 Сульфат аммония [$(NH_4)_2SO_4$] с минимальным содержанием 99,9 % (массовая доля) в сухом веществе.

Перед применением сульфат аммония высушивают при температуре (102 ± 2) °С не менее 2 ч. Охлаждают до комнатной температуры в эксикаторе.

5.9 Триптофан ($C_{11}H_{12}N_2O_2$) или **гидрохлорид лизина** ($C_6H_{14}N_2O_2 \cdot HCl$), с минимальным содержанием 99 % (массовая доля). Если реактивы хранились в эксикаторе, то нет необходимости сушить эти реактивы в сушильном шкафу перед применением.

5.10 Сахароза ($C_{12}H_{22}O_{11}$) с содержанием азота не более 0,002 % (массовая доля). Перед применением сахарозу в сушильном шкафу не высушивают.

6 Оборудование

Применяют нижеперечисленное лабораторное оборудование:

6.1 Колбы Кьельдаля вместимостью 500 мл или 800 мл.

6.2 Аналитические весы с точностью взвешивания до 0,1 мг.

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

6.4 Цилиндры мерные градуированные вместимостью 50 мл, 100 мл и 500 мл, соответствующие требованиям ISO 4788, класс А.

6.5 Колбы конические вместимостью 500 мл, градуированные через каждые 200 мл.

6.6 Бюретка вместимостью 50 мл, градуированная через каждые 0,1 мл, соответствующая требованиям ISO 385, класс А. Может применяться автоматическая бюретка, если она удовлетворяет аналогичным требованиям.

6.7 Измельчитель (гомогенизатор)

6.8 Мерные колбы с одной меткой вместимостью 50 мл, 100 мл, 250 мл и 1000 мл, соответствующие требованиям ISO 1042, класс А.

6.9 Материал, облегчающий кипение, например пористый материал, твердые кусочки фарфора или амфотерный оксид алюминия (например, карборунд) высокой очистки, в гранулах, гладкий, размером 10 меш. 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 появиться проблема вспенивания во время процесса минерализации.

6.10 Аппарат для дигерирования с системой отвода газов, удерживающий колбы Кьельдаля (6.1) в наклонном положении (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.

6.11 Дистилляционная установка, (традиционный метод), изготовленная из боросиликатного стекла или другого соответствующего материала, к которой может крепиться колба Кьельдаля (6.1) состоящая из насадки, предохраняющей от переброса дистиллируемой жидкости, соединенной с конденсатором прямыми входной и выходной трубками, присоединенными к ее нижнему концу. Соединительные трубки и пробки должны быть плотно подогнаны и предпочтительно изготовлены из неопрена.

Примечание – Вышеупомянутая дистилляционная установка может быть заменена на комплект аппарата Парнаса-Вагнера (см. [4]) или иное подходящее оборудование.

6.12 Блок для дигерирования – блок из алюминиевого сплава или аналогичного материала, оснащенный регулируемым терморегулятором и устройством для измерения температуры в блоке.

6.13 Пробирки для дигерирования вместимостью 250 мл, подходящие для использования в блоке для дигерирования (6.12).

6.14 Выпускной коллектор, подходящий для использования с пробирками для дигерирования (6.13).

6.15 Центробежный прибор для поглощения газов, или насос для фильтрования, или аспиратор, изготовленные из кислотоскойкого материала, использующие центральное водоснабжение.

6.16 Дистилляционный блок (метод дигерирования в блоке), подходящий для ручной или полуавтоматической паровой дистилляции, в который можно вставлять пробирки для дигерирования (6.13) и конические колбы (6.5).

6.17 Автоматический титратор, оснащенный pH-метром.

pH-метр должен быть откалиброван в диапазоне от 4 до 7 pH с помощью обычной лабораторной методики калибровки.

6.18 Шпатель или иное подходящее устройство для переноса образцов.

6.19 Фильтровальная бумага, не содержащая азота, имеющая размеры и пористость, которая подходит для удержания испытуемой пробы сыра.

6.20 Водяная баня, поддерживающая температуру от 38 °C до 40 °C.

7 Отбор проб

Представительная проба должна быть отправлена в лабораторию. Необходимо следить за тем, чтобы проба не повреждалась или видоизменялась во время транспортирования или хранения.

Отбор проб не описан в настоящем стандарте. Рекомендации по методу отбора даны в ISO 707|IDF 50 [1].

8 Подготовка испытуемой пробы

Удаляют корку, слизь или заплесневелый поверхностный слой сыра таким образом, чтобы получить такую представительную испытуемую пробу сыра, которая обычно употребляется в пищу.

Измельчают (6.7) представительную испытуемую пробу, полученную вышеуказанным способом. Быстро перемешивают всю массу и желательно измельчают массу повторно. Анализируют испытуемую пробу сразу после измельчения.

Используя шпатель (6.18), взвешивают 1 г измельченного сыра на предварительно сложенной, просмоленной фильтровальной бумаге (6.19). Вкладывают испытуемую пробу в фильтровальную бумагу и опускают на дно колбы Кьельдаля (6.1) или пробирки для дигерирования (6.13), как указано в 9.1.1 или 9.2.1.

9 Методика

9.1 Традиционный метод

9.1.1 Испытуемая проба и ее предварительная обработка

В чистую и сухую колбу Кьельдаля (6.1) помещают от 5 до 10 материалов, облегчающих кипение (6.9), 15,0 г сульфата калия (5.1), 1,0 мл раствора сульфата меди (II) (5.2). Затем добавляют подготовленную испытуемую пробу (в соответствии с разделом 8) и 25 мл серной кислоты (5.3), серную кислоту используют для того, чтобы смыть раствор сульфата меди (II), сульфата калия или испытуемую пробу, оставшиеся в горловине колбы. Осторожно перемешивают содержимое колбы Кьельдаля.

9.1.2 Определение

9.1.2.1 Минерализация

Подключают систему отвода газов аппарата для минерализации (6.10) перед началом минерализации. Нагревают колбу Кьельдаля и ее содержимое (9.1.1) на аппарате для минерализации, используя нагреватель, установленный достаточно низко, так, чтобы пена в обуглившейся минерализируемой пробе не поднималась до горловины колбы Кьельдаля. Продолжают минерализацию при нагревании до появления белых хлопьев в колбе приблизительно 20 мин. Увеличивают нагрев наполовину максимально установленного, определенного в 6.10, и продолжают нагревание 15 мин. Увеличивают нагрев до максимума, определенного в 6.10. После того как минерализируемая проба станет прозрачной (светло-голубовато-зеленого цвета), продолжают нагревание в течение от 1 до 1,5 ч при максимально установленном режиме нагрева. В случае, если жидкость не закипает, температура нагрева может быть слишком низкой. Общее время минерализации должно быть 1,8 – 2,25 ч. В случае, если обугливающиеся остатки минерализируемой пробы все равно остались на поверхности горловины, их смывают несколькими миллилитрами воды.

Чтобы определить необходимое время кипения, требуемое для условий анализа в определенной лаборатории, используя индивидуальную установку приборов, необходимо выбрать для анализа образцы молока 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 кипение продолжается. Необходимо выбрать такое время кипения, чтобы получить максимальное значение содержания белка.

Минерализируемая проба в конце минерализации должна быть прозрачной и свободной от неразложившегося материала. Охлаждают минерализированую пробу 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. Охлажденная минерализованная проба должна быть жидкой или жидкой с небольшим количеством мелких кристаллов на дне колбы в конце охлаждения в течение 25 мин. Повышенная кристаллизация после 25 мин является результатом чрезмерной потери кислоты во время минерализации и может выразиться в заниженных значениях результатов анализа.

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

С целью уменьшения потери кислоты необходимо снизить скорость удаления газов. Нерастворенную минерализированную пробу не следует оставлять в колбе на ночь, поскольку она может кристаллизироваться за этот промежуток времени, что затруднит перевод закристаллизированой минерализированной пробы обратно в растворенный вид.

Добавляют 300 мл воды в колбы Кьельдаля вместимостью 500 мл или 400 мл воды в колбы Кьельдаля вместимостью 800 мл. Воду также используют для промывания горловины колбы. Содержимое тщательно перемешивают, чтобы все кристаллы растворились. Добавляют 5 – 10 материалов, облегчающих кипение (6.9). Охлаждают смесь до комнатной температуры перед дистилляцией. Разбавленные минерализированные пробы можно закрыть и оставить для дистилляции.

9.1.2.2 Дистилляция

Включают воду для охлаждения в конденсаторе дистилляционной утановки (6.11). Добавляют 75 мл раствора гидроокиси натрия (5.4) к разбавленной минерализированной пробе (9.1.2.1), осторожно наливая раствор на наклонную поверхность горловины колбы Кьельдаля для формирования слоя на дне колбы. Должна быть четкая граница между двумя растворами. Для уменьшения потери аммония сразу же после добавления раствора гидроокиси натрия в колбу Кьельдаля ее быстро подсоединяют к дистилляционной установке (6.11). Наконечник трубки выхода конденсата погружают в 50 мл раствора борной кислоты (5.6), содержащегося в конической колбе (6.5).

Энергично вращают колбу Кьельдаля, чтобы перемешать ее содержимое до исчезновения разделенных слоев раствора в колбе. Устанавливают колбу на нагреватель.

Включают нагреватель парогенератора на уровень, достаточный для кипения смеси в колбе Кьельдаля. Продолжают дистилляцию до тех пор, пока не начнется неравномерное кипение (бурление), затем немедленно отсоединяют колбу Кьельдаля и выключают нагреватель. Выключают воду для охлаждения в конденсаторе. Промывают внутри и снаружи наконечник трубки выхода конденсата водой, сливая ее (воду) в коническую колбу, и смешивают с конденсатом.

Степень дистилляции 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 растворенной минерализированной пробе было добавлено воды меньше чем 300 мл. Эффективность конденсации должна быть такова, чтобы температура содержимого конической колбы не превышала 35 °С во время дистилляции при применении колориметрического метода определения конечной точки титрования.

9.1.2.3 Титрование

Содержимое конической колбы (9.1.2.2) титруют раствором соляной кислоты (5.7), используя бюретку (6.6). Конечная точка фиксируется при первых признаках окрашивания содержимого в розовый цвет. Снимают показания бюретки к ближайшему делению с точностью до 0,05 мл. Магнитная мешалка с подсветкой помогает точно зафиксировать конечную точку.

Альтернативным способом титрования содержимого конической колбы (9.1.2.2) раствором соляной кислоты (5.7) является использование точно откалиброванного титратора, оснащенного pH-метром (6.17). Значение pH достигает 4,6 в конечной точке титрования, что соответствует началу крутого излома на кривой титрования (точка перегиба). С автоматического титратора считывают количество раствора, пошедшего на титрование.

Примечание 1 – Первые признаки окрашивания содержимого в розовый цвет наблюдаются между pH 4,6 и 4,3 для системы индикации (5.5) и раствора борной кислоты (5.6), установленного в этом методе. На практике величина pH в зависимости от добавленной соляной кислоты (5.7) меняется очень быстро в этом диапазоне pH. Требуется около 0,05 мл 0,1 моль/л соляной кислоты, чтобы изменить pH на 0,3 единицы в диапазоне от 4,6 до 4,3 pH в такой системе.

Примечание 2 – Статистика внутри- и межлабораторного выполнения данного метода была определена с использованием титратора, определяющего конечную точку титрования колориметрическим методом. Сравнение окончательных результатов анализа, включая контрольные определения, полученные с конечной точкой pH 4,6 на таком же титраторе, определяющем конечную точку титрования колориметрическим методом, показало, что статистически значимое различие между ними отсутствует.

9.2 Метод дигерирования в блоке

9.2.1 Испытуемая проба и ее обработка

В чистую и сухую пробирку для дигерирования (6.13) добавляют 12,0 г сульфата калия (5.1), 1,0 мл раствора сульфата меди (II) (5.2), подготовленную испытуемую пробу (раздел 8) и 20 мл серной кислоты (5.3), которую используют также для смывания остатков сульфата меди (II), сульфата калия или испытуемой пробы, оставшихся на горловине пробирки для дигерирования. Осторожно перемешивают содержимое пробирки.

При превышении содержания кислоты более чем на 20 мл в блоке для дигерирования во время минерализации возникают проблемы избыточного вспенивания и нестабильных результатов. При использовании метода дигерирования в блоке содержание в достаточном количестве остатка серной кислоты в пробирке требует большего времени анализа, чем при использовании традиционного метода. Чрезмерные потери кислоты по причине переизбытка вспенивания более характерны для метода дигерирования в блоке, чем для традиционного метода.

9.2.2 Определение

9.2.2.1 Минерализация

Устанавливают в блоке для дигерирования (6.12) температуру на низкое значение (между 180 °C и 230 °C) для контроля вспенивания. Перемещают пробирку в блок для дигерирования и размещают выпускной коллектор (6.14), присоединенный к центробежному прибору для поглощения газов или иному аналогичному прибору (6.15) на горловине пробирки. Скорость подачи пробы центробежного прибора для поглощения газов или иного аналогичного прибора должна быть достаточна для удаления газов. Весь комплекс оборудования для минерализации необходимо держать внутри вытяжного шкафа.

Минерализируют испытуемую пробу 30 мин, пока не появится белый газ. Затем устанавливают температуру между 410 °C и 430 °C в блоке для дигерирования. Породолжают минерализацию до тех пор, пока минерализуемая проба не станет прозрачной.

Возможно, для контроля вспенивания понадобится увеличивать температуру постепенно на протяжении 20 мин. Следят за тем, чтобы уровень пены не превышал 40 – 50 мм под поверхностью выпускного коллектора, зафиксированного на верхней части пробирки для дигерирования.

После того как минерализированная проба станет прозрачной (со светлым голубовато-зеленым оттенком), продолжают минерализацию при температуре 410 °C – 430 °C не менее 1 ч. За это время серная кислота должна вскипеть. В случае, если при кипячении не было явных пузырьков на поверхности горячей жидкости по периметру сосуда, это означает, что температура слишком низкая. Суммарное время минерализации займет от 1,75 до 2,5 ч.

Чтобы определить необходимое время кипения, требуемое для условий анализа в определенной лаборатории, используя индивидуальную установку приборов, необходимо выбрать для анализа образцы с высоким содержанием белка и молочного 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 кипение продолжается. Необходимо выбрать такое время кипения, чтобы получить максимальное значение содержания белка.

Минерализируемая проба в конце минерализации должна быть прозрачной и свободной от неразложившегося материала. Отсоединяют пробирку таким образом, чтобы выпускной коллектор остался на месте.

Охлаждают минерализованную пробу до комнатной температуры в открытой колбе в отдельном вытяжном шкафу приблизительно 25 мин. Охлажденная минерализованная проба должна быть жидкой или жидкой с небольшим количеством мелких кристаллов на дне колбы. Повышенная кристаллизация после 25 мин является результатом чрезмерной потери кислоты во время минерализации и может выразиться в заниженных значениях результатов анализа.

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

С целью уменьшения потери кислоты необходимо снизить скорость удаления газов. Нерастворенную минерализированную пробу не следует оставлять в колбе на ночь, поскольку она может кристаллизироваться за этот промежуток времени, что затруднит перевод закристаллизированной минерализированной пробы обратно в растворенный вид.

После охлаждения пробирки для минерализации (приблизительно 25 мин) до комнатной температуры, снимают выпускной коллектор и осторожно добавляют 85 мл воды в каждую пробирку. Смешивают с помощью центрифуги таким образом, чтобы все образовавшиеся кристаллы растворились. Дают содержимому пробирки остыть до комнатной температуры.

9.2.2.2 Дистилляция

Включают воду для охлаждения в конденсаторе дистилляционной установки. К дистилляционной установке присоединяют пробирку для дигерирования с разбавленной минерализируемой пробой (6.16). Наконечник трубки выхода конденсата погружают в 50 мл раствора борной кислоты (5.6), содержащегося в конической колбе (6.5). Настраивают дистилляционную установку для подачи 55 мл раствора гидроокиси натрия (5.4).

При использовании раствора гидроокиси натрия с 40%-ной массовой долей (5.4), настраивают дозированный объем до 65 мл. В случае, когда количество автоматической подачи раствора гидроокиси натрия существенно отличается по причине частичного закупоривания подачи через трубку дозатора гидроокиси натрия, возникают значительные колебания между отдельными результатами.

Дистилляционную установку используют в соответствии с инструкцией производителя и дистиллируют аммоний, выделенный путем добавления раствора гидроокиси натрия, собирая дистиллят в раствор борной кислоты. Продолжают процесс дистилляции до тех пор, пока не будет собрано не менее 150 мл дистиллята.

Коническую колбу снимают с дистилляционной установки и тщательно сливают остатки дистиллята из наконечника для перегонки в коническую колбу. Промывают наконечник изнутри и снаружи, а используемую воду добавляют в коническую колбу. Следует проводить промывание водой между пробами. Эффективность конденсации должна быть такова, чтобы температура содержимого конической колбы не превышала 35 °С во время дистилляции при применении колориметрического метода определения конечной точки титрования.

9.2.2.3 Титрование

Содержимое конической колбы (9.2.2.2) титруют раствором соляной кислоты (5.7), используя бюретку (6.6). Конечная точка фиксируется при первых признаках окрашивания содержимого в розовый цвет. Снимают показания бюретки к ближайшему делению с точностью до 0,05 мл. Магнитная мешалка с подсветкой помогает точно зафиксировать конечную точку.

Альтернативным способом титрования содержимого конической колбы (9.2.2.2) раствором соляной кислоты (5.7) является применение точно откалиброванного автоматического титратора, оснащенного pH-метром (6.17). Значение pH достигает 4,6 в конечной точке титрования, что соответствует началу крутого излома на кривой титрования (точка перегиба). На автоматическом титраторе отмечают количество раствора, пошедшего на титрование.

Примечание 1 – Первые признаки окрашивания содержимого в розовый цвет наблюдаются между pH 4,6 и 4,3 для системы индикации (5.5) и раствора борной кислоты (5.6), установленного в этом методе. На практике величина pH в зависимости от добавленной соляной кислоты (5.7) меняется очень быстро в этом диапазоне pH. Требуется около 0,05 мл 0,1 моль/л соляной кислоты, чтобы изменить pH на 0,3 единицы в диапазоне от 4,6 до 4,3 pH в такой системе.

Примечание 2 – Статистика внутри- и межлабораторного выполнения данного метода была определена с использованием титрования с цветовой фиксации конечной точки. Сравнивая окончательные результаты анализа, включая контрольные определения, полученные с конечной точкой pH 4,6 при таком же титровании с цветовой фиксации конечной точки, показали, что статистически значимое различие между ними отсутствует.

9.3 Контрольное определение

Контрольное определение всегда проводят с применением стандартного раствора соляной кислоты (5.7) и бюретки (6.6) или автоматического титратора с pH-метром (6.17), которые использовались для анализа проб. Выполняют контрольное определение в соответствии с процедурами, описанными в 9.1 или 9.2, 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 удержать 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.

Примечание 2 – Количество титранта, используемого в контрольном определении, должно быть всегда больше 0,00 мл. Контрольные определения внутри одной лаборатории должны быть постоянными, независимо от времени определения. Иногда контрольная 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.

Обычно значения, полученные при выполнении контрольных определений, равны или ниже 0,2 мл.

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 и 9.2.

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

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

Процент извлечения азота должен быть более 99 % (массовая доля) для всех методов. Если извлечено менее 99 % азота, то либо концентрация титранта выше, чем установленное значение, либо произошли потери азота при минерализации или дистилляции.

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 проводят ее дистилляцию. Если количество восстановленного азота остается небольшим, потеря азота обусловлена дистилляционной установкой, 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 дистилляции. Аппаратура должна пройти эту проверку перед тем, как анализируется процесс восстановления по методике 9.4.3.

Если извлечение 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.

Примечание – Несмотря на то, что процент максимального теоретического извлечения не может достигать 100 %, на практике извлечение, превышающее установленный максимум, может возникать по причине неопределенности измерений.

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 извлеченного азота должна быть не менее 98 %.

Если массовая доля извлеченного азота составила менее 98 %, после того как массовая доля при извлечении азота с применением сульфата аммония составила от 99 % до 100 %, это означает, что температура минерализации была низкая, или время минерализации недостаточное, 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 испытуемых проб молока.

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

10 Расчет и обработка результатов

10.1 Расчет

10.1.1 Содержание азота

Рассчитывают содержание азота в испытуемой пробе w_N, %, с точностью до четырех десятичных знаков по формуле

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

где c_t – концентрация вещества в растворе соляной кислоты (5.7), моль/л, выраженная с точностью до четырех десятичных знаков;

V – объем раствора соляной кислоты (5.7), используемого в контрольном определении (9.3), мл, с точностью до 0,05 мл;

m – масса испытуемой пробы (9.1), г, выраженная с точностью до 1 мг;

V_s – объем раствора соляной кислоты (5.7), используемого в определении (9.2.2.3), мл, с точностью до 0,05 мл.

10.1.2 Содержание общего белка

Рассчитывают содержание общего белка в испытуемом образце w_p, % по массе, по формуле

$$w_p = 6{,}38 w_N, \quad (2)$$

где 6,38 – общепринятый коэффициент для выражения содержания общего белка по содержанию азота.

10.2 Обработка результатов

Результаты не округляют до тех пор, пока не будет получено последнее значение по результатам испытаний.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ – Это особенно важно, когда значения должны быть применены для дальнейших расчетов (например, 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.

10.2.1 Содержание азота

Полученный результат выражают с точностью до четвертого знака, если это необходимо для дальнейших расчетов. В иных случаях полученный результат выражают с точностью до третьего знака.

10.2.2 Содержание общего белка

Полученный результат выражают с точностью до третьего знака, если это необходимо для дальнейших расчетов. В иных случаях полученный результат выражают с точностью до второго знака.

11 Прецизионность

11.1 Межлабораторное испытание

Межлабораторное испытание проводилось в соответствии с ISO 5725-1 [2] и ISO 5725-2 [3]. Значения пределов сходимости и воспроизводимости различных сыров, включая плавленые сыры (подвергшиеся переработке), были опубликованы (см. [5]).

Суммарные результаты для плавленых сыров, включенные в испытания, рассмотрены в приложении А.

Примечание – Совместные испытания не занимаются вопросами, связанными с выявлением широкого диапазона общего белка в некоторых серийно выпускаемых плавленых сырах.

Рассмотренные в приложении А значения, полученные по итогам испытания, могут быть не применимы для областей концентрации и матриц, отличных от данных.

Максимальные расхождения между двумя повторными определениями не должны превышать 0,4 % массовой доли содержания общего белка.

12 Протокол испытаний

Протокол должен содержать следующую информацию:

a) всю информацию, необходимую для полной идентификации образца;

b) применяемый метод отбора проб, если он известен;

c) используемый метод анализа со ссылкой на настоящий стандарт;

d) все подробности выполнения, не описанные в настоящем стандарте или рассматриваемые как необязательные, вместе с любыми второстепенными деталями, которые могут влиять на результаты;

e) полученный результат (ы) анализа. Если повторяемость или восстановление подвергалось проверке, последний зарегистрированный из полученных результатов.

Приложение А
(справочное)

Межлабораторное испытание

Для межлабораторного анализа были подвергнуты испытаниям 18 видов сыров с различной массовой долей общего белка (от 18,4 % до 36,01 %) в 15 лабораториях. В восьми лабораториях испытание проводилось с использованием аппарата Кьельдаля, определенного в настоящем стандарте, а также с использованием семи блоков для дигерирования и установок для дистилляции с водяным паром (см. [5]).

Таблица А.1 – Обобщение результатов межлабораторного испытания, выраженных в процентном соотношении содержания общего белка ($6{,}38w_N$) в продуктах сырных плавленых, определенных с помощью метода Кьельдаля, исключая выбросы (см. [5])

Сыр	Номер лаборатории	Номер испытания	Среднее значение, %	Стандартное отклонение от сходимости s_r	Стандартное отклонение от воспроизводимости s_R	Коэффициент изменчивости сходимости CV(r), %	Коэффициент изменчивости воспроизводимости CV(R), %	Предел сходимости r (=2,8s_r)	Предел воспроизводимости R (=2,8s_R)
Плавленный из цельного молока	14	28	18,41	0,065	0,103	0,354	0,561	0,182	0,289
Плавленый с низким содержанием жира	15	30	19,57	0,068	0,111	0,348	0,570	0,191	0,312
Плавленый обезжиренный, производитель № 3	14	28	22,69	0,084	0,094	0,369	0,415	0,235	0,263
Плавленый обезжиренный, производитель № 2	13	26	22,76	0,047	0,080	0,207	0,351	0,132	0,223
Плавленый обезжиренный, производитель № 1	14	28	23,94	0,129	0,153	0,537	0,638	0,360	0,428

Библиография

[1] ISO 707:2008|IDF 50:2008 Milk and milk products – Guidance on sampling
(Молоко и молочные продукты. Руководство по отбору проб)

[2] 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)

[3] ISO 5725-2:1994 Accurancy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 2: Basic method for 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)

[4] PARNAS, J.K., WAGNER, R. Über die Ausführung von Bestimmungen kleiner Stickstoffmengen nach Kjeldahl [On the determination of low nitrogen quantities after Kjeldahl]. *Biochem. Z.* 1921, 125 pp. 253 – 256
(Парнас, Дж. К., Вагнер, Р. Определения малых количеств азота методом Кьельдаля)

[5] LYNCH, J.M, BARBANO, D.M., FLEMING, J.R. Determination of the total nitrogen content of hard, semihard, and processed cheese by the Kjeldahl method: Collaborative study. *J. AOAC Int.* 2002, 85, pp. 445 – 455
(Линч, Дж. М, Барбано, Д. М., Флеминг, Дж. Р. Определение общего содержания азота в твердом, полутвердом и плавленом сыре методом Кьельдаля: совместные исследования)

Ответственный за выпуск *Т. В. Варивончик*

Сдано в набор 23.04.2013. Подписано в печать 28.05.2013. Формат бумаги 60×84/8. Бумага офсетная.
Гарнитура Arial. Печать ризографическая. Усл. печ. л. 1,86. Уч.- изд. л. 1,02. Тираж 7 экз. Заказ 490

Издатель и полиграфическое исполнение:
Научно-производственное республиканское унитарное предприятие
«Белорусский государственный институт стандартизации и сертификации» (БелГИСС)
ЛИ № 02330/0552843 от 08.04.2009.
ул. Мележа, 3, комн. 406, 220113, Минск.

gost.e-ecolog.ru