МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 33600— 2015

МОЛОКО И МОЛОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ

Методика определения лактоферрина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2016

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

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

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным научным учреждением «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности» (ФГБНУ «ВНИМИ»)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии (Росстандарт)

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 12 ноября 2015 г. № 82-П)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 30 ноября 2015 г. № 2086-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 33600—2015 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2016 г.

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячном 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, 2016

В Российской Федерации 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

МКС 67.100.10

Поправка к ГОСТ 33600—2015 Молоко и молочные продукты. Методика определения лактоферрина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

В каком месте	Напечатано	Должно быть		
Предисловие. Таблица согласования	—	Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан

(ИУС № 7 2019 г.)

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

МОЛОКО И МОЛОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ
Методика определения лактоферрина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Milk and dairy products. Method for determination of the lactoferrin by high performance liquid chromatography

Дата введения — 2016—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на молоко и молочные продукты (молоко сырое, молоко питьевое, сливки сырые, сливки питьевые, кисломолочные продукты, творог, сыры, сухие молочные продукты) и устанавливает методику определения лактоферрина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Диапазон измерений массовой концентрации (массовой доли) лактоферрина от 0,01 до 10,00 мг/см^3 (мг/г) включительно.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

ГОСТ 12.1.004—91 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.005—88 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

ГОСТ 12.1.007—76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.019—79* Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ 12.4.009—83 Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание

ГОСТ 12.4.021—75 Система стандартов безопасности труда. Системы вентиляционные. Общие требования

ГОСТ 1770—74 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 3118—77 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 25336—82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 25794.1—83 Реактивы. Методы приготовления титрованных растворов для кислотно-основного титрования

ГОСТ 26809.1—2014 Молоко и молочная продукция. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу. Часть 1. Молоко, молочные, молочные составные и молокосодержащие продукты

ГОСТ 27752—88 Часы электронно-механические кварцевые настольные, настенные и часы-будильники. Общие технические условия

ГОСТ ИСО 5725-6—2003** Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике

ГОСТ OIML R 76-1—2011 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы не-

* На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р 12.1.019–2009.

** На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 5725-6–2002.

Издание официальное

автоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Сущность метода

Метод основан на удалении из пробы жира и казеиновой фракции белка и определении в полученном фильтрате содержания лактоферрина высокоэффективной жидкостной хроматографией по обращенно-фазовому механизму при помощи спектрометрического детектора при длине волны 205 нм.

4 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда и реактивы

Хроматограф, включающий следующие элементы:

- колонку С18 с размером пор 300 Å длиной 250 мм, внутренним диаметром 4,6 мм;
- устройство петлевое для ввода пробы рабочим объемом петли 0,020 $см^3$;
- спектрофотометрический детектор с переменной длиной волны, позволяющий проводить измерения оптической плотности при длине волны 205 нм, снабженный проточной кварцевой кюветой объемом 1 $см^3$;
- программное обеспечение для статистической обработки полученных результатов измерений.

Микрошприц для ВЭЖХ вместимостью 0,1 $см^3$.

Весы неавтоматического действия по ГОСТ OIML R 76-1 или весы по нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт, с пределом допускаемой абсолютной погрешности ± 0,001 г.

Анализатор потенциометрический диапазоном измерения от 1 до 12 ед. pH с погрешностью ± 0,02 ед. pH.

Центрифуга лабораторная со скоростью вращения не менее 5000 $мин^{-1}$.

Дозаторы пипеточные переменного объема дозирования в диапазоне 0,020—5,000 $см^3$ с относительной погрешностью дозирования ± 1 %.

Часы 2-го класса точности по ГОСТ 27752.

Баня ультразвуковая с рабочей частотой не менее 20 Гц и объемом не менее 1 $дм^3$.

Колбы 1-25-2, 1-100-2, 1-1000-2 по ГОСТ 1770.

Пробирки П-1-10-0,1 ХС по ГОСТ 1770.

Цилиндры 1-50-2, 1-100-2 по ГОСТ 1770.

Колба К-1-1000-29/32 по ГОСТ 25336.

Стаканы В-1-25, В-1-150 по ГОСТ 25336.

Фильтры мембранные с диаметром пор не более 0,5 мкм.

Ацетонитрил для жидкостной хроматографии, с содержанием основного вещества не менее 99,98 %.

Кислота соляная по ГОСТ 3118, х. ч. раствор молярной концентрации 1 моль/$дм^3$.

Кислота трифторуксусная (ТФУ), с содержанием основного вещества не менее 99,0 %.

Лактоферрин, с содержанием основного вещества не менее 99,9 %.

Вода бидистиллированная.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Допускается применение других средств измерения, вспомогательного оборудования, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам и обеспечивающим необходимую точность измерения, а также реактивов и материалов по качеству не хуже вышеуказанных.

5 Отбор проб и подготовка их к анализу

Отбор проб и подготовка их к анализу — по ГОСТ 26809.1 и другим нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт.

В случае если определение не может быть проведено сразу после отбора проб, их хранят в холодильнике при температуре (4 ± 2) °С не более 48 ч.

6 Подготовка к проведению измерений

6.1 Приготовление раствора соляной кислоты молярной концентрации c (HCl) = 1 моль/дм^3

Раствор готовят в соответствии с требованиями ГОСТ 25794.1 (раздел 2).

Срок хранения раствора при температуре (20 ± 5) °С — не более 1 мес.

6.2 Подготовка пробы исследуемого продукта

6.2.1 Пробы жидких продуктов массой (20,000 ± 0,001) г помещают в центрифужную пробирку и центрифугируют при скорости вращения 5000 мин$^{-1}$ в течение (15—30) мин. При этом она разделяется на два слоя: верхний – жировой и нижний — белковый.

Для осаждения казеина полученную белковую фракцию переливают в мерный цилиндр вместимостью 50 см^3, помещают в него электроды pH-метра и по каплям добавляют раствор HCl молярной концентрацией 1 моль/дм^3 до pH 4,6 ед. pH. Переливают полученный раствор в градуированные центрифужные пробирки и центрифугируют 15 мин при скорости вращения 5000 мин$^{-1}$, фиксируют конечный объем раствора.

Проводят два параллельных определения.

6.2.2 Пробы пастообразных, сухих продуктов массой (5,000 ± 0,001) г растворяют в 50 см^3 дистиллированной воды, помещают туда электроды и по каплям добавляют раствор HCl молярной концентрации 1 моль/дм^3 до pH 4,6 ед. pH. После достижения указанного значения раствор переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и доводят до метки дистиллированной водой. Дают отстояться в течение 30 мин. Затем фильтруют через складчатый фильтр. В случае недостаточного осаждения казеина проводят центрифугирование фильтрата: переливают полученный фильтрат в центрифужные пробирки и центрифугируют 5 мин при скорости вращения 5000 мин$^{-1}$.

Полученный экстракт используют для измерений.

6.3 Приготовление подвижной фазы для жидкостной хроматографии (элюенты А, В)

Для приготовления элюента А к ацетонитрилу добавляют 0,1 % ТФУ по объему.

Для приготовления элюента В к бидистиллированной воде добавляют 0,1 % ТФУ по объему.

Полученные элюенты рекомендуется профильтровать через мембранный фильтр. Перед использованием подвижную фазу дегазируют в круглодонной колбе под вакуумом на ультразвуковой бане.

Срок хранения элюента А в плотно укупоренной темной посуде при температуре (4 ± 2) °С — не более 3 мес.

Элюент В используется свежеприготовленным.

6.4 Приготовление раствора лактоферрина массовой концентрации 1 мг/см^3

Взвешивают (0,025 ± 0,001) г лактоферрина, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 см^3, доводят до метки бидистиллированной водой и аккуратно перемешивают.

Срок хранения раствора при температуре (4 ± 2) °С — не более 1 мес.

6.5 Приготовление раствора лактоферрина массовой концентрации 0,5 мг/см^3

В стакан вместимостью 25 см^3 отмеряют 1 см^3 раствора лактоферрина массовой концентрации 1 мг/см^3, приливают 1 см^3 бидистиллированной воды и аккуратно перемешивают.

6.6 Приготовление раствора лактоферрина массовой концентрации 0,25 мг/см^3

В стакан вместимостью 25 см^3 отмеряют 1 см^3 раствора лактоферрина массовой концентрации 0,5 мг/см^3, приливают 1 см^3 бидистиллированной воды и аккуратно перемешивают.

6.7 Приготовление раствора лактоферрина массовой концентрации 0,1 мг/см^3

В стакан вместимостью 25 см^3 отмеряют 0,1 см^3 раствора лактоферрина массовой концентрации 1 мг/см^3, приливают 0,9 см^3 бидистиллированной воды и аккуратно перемешивают.

6.8 Построение градуировочной зависимости

Построение градуировочной зависимости и проверку приемлемости градуировки проводят в соответствии с руководством пользователя программного обеспечения, прилагаемого к хроматографу, с использованием растворов лактоферрина по 6.4—6.7.

Градуировку проводят при изменении условий хроматографического анализа, при несоответствии результатов метрологическим требованиям.

Проверку градуировки проводят непосредственно после выполнения градуировки, а в дальнейшем — периодически, перед каждой серией измерений.

6.9 Подготовка хроматографа к работе

Подготовку хроматографа к работе проводят в соответствии с прилагаемой к хроматографу инструкцией.

6.9.1 Условия хроматографирования

Градиентный режим разделения:

подвижная фаза: элюент А — элюент В.

Элюент А: с 35 % до 60 % за 30 мин,
с 60 % до 90 % за 5 мин,
с 90 % до 35 % за 5 мин;

- длина волны детектора — 205 нм;
- чувствительность детектора — 0,08 единицы оптической плотности по шкале (ориентировочное значение);
- скорость потока подвижной фазы — 1,2 см^3/мин;
- температура (20 ± 2) °С.

7 Условия проведения измерений

При выполнении измерений в лаборатории необходимо соблюдать следующие условия:

- температура окружающего воздуха . . . . . от 20 °С до 25 °С;
- относительная влажность воздуха . . . . . от 40 % до 80 %;
- атмосферное давление . . . . . от 84 до 106 кПа;
- напряжение в электросети . . . . . (220 ± 10) В;
- частота тока в электросети . . . . . от 49 до 51 Гц.

8 Проведение измерений

После выхода системы в режим равновесия в хроматограф вводят 20 мкл экстракта (6.2) и детектируют с помощью спектрофотометрического детектора при длине волны 205 нм. Приблизительное время удерживания лактоферрина 18—20 мин.

9 Обработка результатов измерений

9.1 Массовую концентрацию лактоферрина X, мг/см^3, в жидких продуктах определяют по градуировочному графику.

9.2 Массовую долю лактоферрина X_1, мг/г, в пастообразных и сухих продуктах определяют по формуле

$$X_1 = \frac{C \cdot V}{m}, \quad (1)$$

где C — массовая концентрация лактоферрина, определенная по градуировочному графику, мг/см^3;

V — объем раствора, полученный после разведения пробы продукта, см^3;

m — масса пробы продукта, г.

9.3 За окончательный результат измерений принимают среднеарифметическое значение результатов двух последовательных определений, выполненных в условиях повторяемости, округленное до второго десятичного знака.

10 Контроль точности результатов измерений

10.1 Метрологические характеристики метода

Приписанные характеристики погрешности и ее составляющих метода определения лактоферрина в молоке и молочных продуктах при P = 0,95 приведены в таблице 1.

Таблица 1

Диапазон определения лактоферрина, мг/см^3 (мг/г)	Предел повторяемости $r_{отн}$, %	Предел воспроизводимости $R_{отн}$, %	Границы, относительной погрешности ± δ, %
0,01 – 10,00	20	28	20

10.2 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости

Проверку приемлемости результатов определения лактоферрина в молоке и молочных продуктах, полученных в условиях повторяемости (два последовательных определения, n = 2), проводят с учетом требований ГОСТ ИСО 5725-6 (пункт 5.2.2).

Результаты измерений считаются приемлемыми при условии

$$|X_1 - X_2| \le r_{отн} \cdot 0{,}01 \cdot X_{ср}, \quad (2)$$

где X_1, X_2 — значения результатов двух последовательных измерений массовой концентрации (массовой доли) лактоферрина в молоке и молочных продуктах, полученных в условиях повторяемости, мг/см^3 (мг/г);

$X_{ср}$ — среднеарифметическое значение двух последовательных измерений массовой концентрации (массовой доли) лактоферрина в молоке и молочных продуктах, мг/см^3 (мг/г);

$r_{отн.}$ — предел повторяемости (сходимости), значение которого приведено в таблице 1, %.

Если данное условие не выполняется, то проводят повторные измерения и проверку приемлемости результатов измерений в условиях повторяемости в соответствии с требованиями ГОСТ ИСО 5725-6 (пункт 5.2.2).

10.3 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости

Проверку приемлемости результатов определения массовой концентрации (массовой доли) лактоферрина в молоке и молочных продуктах, полученных в условиях воспроизводимости (в двух лабораториях, m = 2), проводят с учетом требований ГОСТ ИСО 5725-6 (пункт 5.3.2.1).

Результаты измерений, выполненные в условиях воспроизводимости, считаются приемлемыми при условии

$$|X'_1 - X'_2| \le R_{отн} \cdot 0{,}01 \cdot X_{ср}, \quad (3)$$

где X'_1, X'_2 — значения двух результатов определения массовой концентрации (массовой доли) лактоферрина в молоке и молочных продуктах, полученных в двух лабораториях в условиях

воспроизводимости, мг/см^3 (мг/г);

$X_{ср}$ — среднеарифметическое значение результатов определения массовой концентрации (массовой доли) лактоферрина в молоке и молочных продуктах, выполненных в условиях воспроизводимости, мг/см^3 (мг/г);

$R_{отн.}$ — предел воспроизводимости, значение которого приведено в таблице 1, %.

Если данное условие не выполняется, то выполняют процедуры в соответствии с требованиями ГОСТ ИСО 5725-6 (пункт 5.3.3).

11 Оформление результатов

Результат определения массовой концентрации (массовой доли) лактоферрина в молоке и молочных продуктах представляют в документах, предусматривающих его использование, в виде

$$X_{ср} \pm \delta \cdot 0{,}01 \cdot X_{ср}, \text{ при } P = 0{,}95, \quad (4)$$

где $X_{ср}$ — среднеарифметическое значение результатов двух последовательных определений, мг/см^3 (мг/г);

δ — границы относительной погрешности измерений, % (таблица 1).

12 Требования, обеспечивающие безопасность

При выполнении работ необходимо соблюдать следующие требования:

- помещение лаборатории должно быть оборудовано общей приточно-вытяжной вентиляцией в соответствии с ГОСТ 12.4.021. Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать норм, установленных ГОСТ 12.1.005;
- требования техники безопасности при работе с химическими реактивами — в соответствии с ГОСТ 12.1.007;
- требования техники безопасности при работе с электроустановками — в соответствии с ГОСТ 12.1.019.

Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности в соответствии с ГОСТ 12.1.004 и быть оснащено средствами пожаротушения в соответствии с ГОСТ 12.4.009.

13 Требования к оператору

Выполнение измерений может проводить специалист, имеющий специальное образование, освоивший метод и уложившийся в норматив контроля точности при выполнении процедур контроля точности.

Приложение А
(справочное)

Пример хроматограммы определения массовой концентрации лактоферрина в молочном продукте

А.1 Пример хроматограммы определения массовой концентрации лактоферрина в молоке приведен на рисунке А.1.

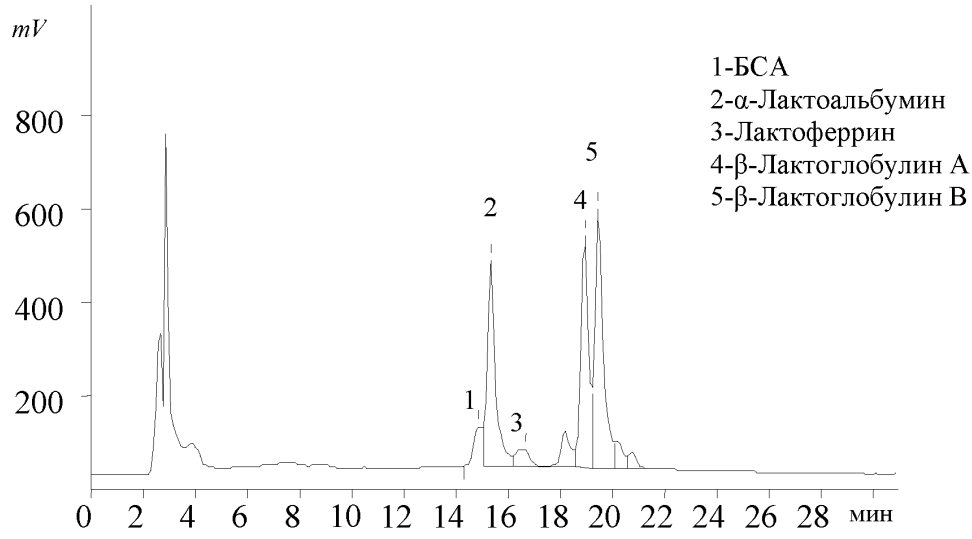

Рисунок А.1

УДК 637.147.2:543.06:006.354 МКС 67.100.10

Ключевые слова: молоко, молочная продукция, определение лактоферрина, метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, отбор проб, обработка результатов измерений, оформление результатов

Редактор *З.Ю. Белякова*
Корректор *П.М. Смирнов*
Компьютерная верстка *А.В. Балвановича*

Подписано в печать 15.02.2016. Формат 60x84 1/8.
Усл. печ. л. 1,40. Тираж 56 экз. Зак. 123.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»

123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru