

ГОСТ 25179-90

Группа Н19

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

МОЛОКО

Методы определения белка

Milk. Methods for determination of protein

МКС 67.100.10

ОКСТУ 9209

Дата введения 1991-01-01

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

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

РАЗРАБОТЧИКИ

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

2. УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Государственного комитета СССР по управлению качеством продукции и стандартам от 01.02.90 N 136

3. ВЗАМЕН [ГОСТ 25179-82](#)

4. ССЫЛОЧНЫЕ НОРМАТИВНО-ТЕХНИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ

| Обозначение НТД, на который дана ссылка | Номер пункта |
|---|---------------------|
| ГОСТ 1770-74 | 2.1, 3.1, 4.1 |
| ГОСТ 3652-69 | 2.1 |
| ГОСТ 4172-76 | 2.1 |
| ГОСТ 4204-77 | 2.1 |
| ГОСТ 4328-77 | 2.1 |
| ГОСТ 6709-72 | 2.1, 3.1, 4.1 |
| ГОСТ 13928-84 | 1 |
| ГОСТ 14919-83 | 3.1 |
| ГОСТ 23327-98 | 2.4.2, 3.4.2, 4.4.2 |
| ГОСТ 24104-88 | 3.1, 4.1 |
| ГОСТ 25336-82 | 2.1, 4.1 |
| ГОСТ 28498-90 | 2.1 |
| ГОСТ 29169-91 | 2.1, 3.1, 4.1 |

| | |
|-------------------|-----|
| ТУ 6-09-05-557-76 | 2.1 |
| ТУ 6-09-2540-72 | 4.1 |
| ТУ 6-09-5077-83 | 3.1 |
| ТУ 64-2-10-87 | 3.1 |
| ГФ N 619 | 4.1 |

5. Ограничение срока действия снято по протоколу N 5-94 Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации (ИУС 11-12-94)

6. ПЕРЕИЗДАНИЕ. Август 2009 г.

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

1. МЕТОДЫ ОТБОРА ПРОБ

Отбор проб и подготовка их к испытаниям - по [ГОСТ 13928](#). Консервирование проб не допускается.

2. КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД

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

2.1. Аппаратура, материалы и реактивы

Весы лабораторные 4-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г по [ГОСТ 24104*](#).

* С 1 июля 2002 г. действует [ГОСТ 24104-2001](#)¹.

¹ На территории Российской Федерации документ не действует. Действует [ГОСТ Р 53228-2008](#). - Примечание изготовителя базы данных.

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

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

Анализатор потенциометрический с диапазоном измерения 2-3 ед. рН с ценой деления 0,05 ед. рН.

Термометр ртутный стеклянный с диапазоном измерения 0-100 °С, с ценой деления 0,5 или 1,0 °С, с пределом допустимой погрешности ±1 °С по [ГОСТ 28498](#).

Пробки резиновые конусные N 16 или 19 по нормативно-технической документации.

Штатив для пробирок.

Фильтры бумажные.

Пробирки П1, П2, П4-25 по [ГОСТ 25336](#).

Воронки В или ВФ по [ГОСТ 25336](#).

Пипетки 1-2-1, 2-2-1, 4-2-1, 5-2-1, 2-2-20 по [ГОСТ 29169](#).

Колбы 1-2-50, 1-2-200, 1-2-500, 1-2-2000, 2-2-50, 2-2-200, 2-2-500, 2-2-2000 по [ГОСТ 1770](#).

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

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

* Документ в информационных продуктах не содержится. За информацией о документе Вы можете обратиться в [Службу поддержки пользователей](#). - Примечание изготовителя базы данных.

2.2. Подготовка к измерениям

2.2.1. Приготовление буферного раствора

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

2.2.2. Приготовление раствора красителя

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

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

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

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

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

Раствор следует использовать только после 12 ч выдержки.

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

2.3. Проведение измерений

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

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

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

2.3.3. Отбирают пипеткой 1 см^3 надосадочной жидкости, помещают в мерную колбу вместимостью 50 см^3 , доливают колбу до метки водой и содержимое перемешивают. Аналогичным способом разбавляют рабочий раствор красителя в 50 раз.

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

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

2.4. Обработка результатов

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

$$X = 7,78D - 1,34,$$

где D - измеренная оптическая плотность, ед. оптической плотности;

7,78 - эмпирический коэффициент, %/ед. оптической плотности;

1,34 - эмпирический коэффициент, %.

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

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

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

3. РЕФРАКТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД

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

3.1. Аппаратура, материалы и реактивы

Комплект для измерения массовой доли белка, состоящий из:
рефрактометра со шкалой массовой доли белка в диапазоне 0-15%, ценой деления 0,1%;

водяной бани закрытого типа для флаконов.

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

Электроплитка номинальной мощностью 1000 Вт по [ГОСТ 14919](#).

Колбы 1-1000-2, 2-1000-2 по [ГОСТ 1770](#).

Пипетки 1-2-1, 2-2-1, 2-2-5, 4-2-1, 5-2-1 по [ГОСТ 29169](#).

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

Пробки резиновые по нормативно-технической документации.

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

Вода дистиллированная по [ГОСТ 6709](#).

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

3.2. Подготовка к измерениям

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

3.3. Проведение измерений

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

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

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

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

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

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

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

3.3.4. Вычисляют среднеарифметические результаты наблюдений для сыворотки и молока.

3.4. Обработка результатов

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

$$X_1 = X_2 - X_3,$$

где X_2 - среднеарифметическое значение результатов наблюдения по шкале "Белок" для молока, %;

X_3 - среднеарифметическое значение результатов наблюдения по шкале "Белок" для сыворотки, %.

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

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

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

4. МЕТОД ФОРМОЛЬНОГО ТИТРОВАНИЯ

Метод применяют при условии согласия с поставщиком.

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

4.1. Аппаратура, материалы и реактивы

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

Блок автоматического титрования, аппаратно совместимый с потенциометрическим титратором и имеющий дозатор раствора (бюретку) вместимостью не менее 5 см³ с ценой деления не более 0,05 см³.

Секундомер механический типа СОПир 3-го класса.

Колбы 1-1000-2, 2-1000-2 по [ГОСТ 1770](#).

Пипетки 2-2-5, 2-2-20 по [ГОСТ 29169](#).

Воронки ВК по [ГОСТ 25336](#).

Стаканы В-1-50, В-2-50 по [ГОСТ 25336](#).

Натрия гидроокись, стандарт-титр по ТУ 6-09-2540, раствор с молярной концентрацией 0,1 моль/дм³.

Формальдегид, водный раствор с массовой долей формальдегида 30% по ГФ СССР, N 619.

Вода дистиллированная по [ГОСТ 6709](#).

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

4.2. Подготовка к измерениям

4.2.1. Подготовка приборов

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

Заполняют дозатор блока автоматического титрования раствором гидроокиси натрия.

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

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

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

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

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

Измерения как по [ГОСТ 23327](#), так и методом формольного титрования проводят в шести повторностях.

Поправку X_4 , %, вычисляют по формуле

$$X_4 = X_5 - X_6,$$

где X_5 - среднеарифметическое значение массовой доли белка, полученное по [ГОСТ 23327](#), %;

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

Определение поправки проводят не реже одного раза в декаду.

4.3. Проведение измерений

4.3.1. В стакан помещают 20 см³ молока и стержень магнитной мешалки. Стакан устанавливают на магнитную мешалку, включают двигатель мешалки и погружают электроды потенциометрического анализатора в молоко. Включают кнопку "Пуск" блока автоматического титрования, а спустя 2-3 с, кнопку "Выдержка". Раствор гидроксида натрия при этом начинает поступать из дозатора блока в стакан с молоком, нейтрализуя последнее. По достижении точки эквивалентности (рН=9) и истечении времени выдержки (30 с) процесс нейтрализации автоматически прекращается, а на панели блока автоматического титрования зажигается сигнал "Конец". После этого отключают кнопки "Пуск" и "Выдержка", определяют количество раствора щелочи, затраченной на нейтрализацию молока, до внесения формальдегида, и вносят в стакан 5 см³ формальдегида.

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

4.3.2. Параллельно проводят контрольный опыт по нейтрализации смеси 20 см³ воды и 5 см³ раствора формальдегида.

4.4. Обработка результатов

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

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

где V_2 - общее количество раствора, израсходованное на нейтрализацию, см³;

V_1 - количество раствора, израсходованное на нейтрализацию до внесения формальдегида, см³;

V_0 - количество раствора, израсходованное на контрольный опыт, см³;

0,96 - эмпирический коэффициент, %/см³;

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

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

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

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

Электронный текст документа

подготовлен АО "Кодекс" и сверен по:

официальное издание

Молоко и молочные продукты.

Общие методы анализа: Сб. ГОСТов. -

М.: Стандартинформ, 2009