

---

---

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

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

ISO 20541:2008

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d65d714b-2836-4647-beaa-066b54e6323e/iso-20541-2008>

Ответственность за подготовку русской версии несёт GOST R  
(Российская Федерация) в соответствии со статьёй 18.1 Устава ISO



Ссылочные номера  
ISO 20541:2008(R)  
IDF 197:2008(R)

**Отказ от ответственности при работе в PDF**

Настоящий файл PDF может содержать интегрированные шрифты. В соответствии с условиями лицензирования, принятыми фирмой Adobe, этот файл можно распечатать или вывести на экран, но его нельзя изменить, пока не будет получена лицензия на загрузку интегрированных шрифтов в компьютер, на котором ведется редактирование. В случае загрузки настоящего файла заинтересованные стороны принимают на себя ответственность за соблюдение лицензионных условий фирмы Adobe. Центральный секретариат ISO не несет никакой ответственности в этом отношении.

Adobe торговый знак фирмы Adobe Systems Incorporated.

Подробности, относящиеся к программным продуктам, использованным для создания настоящего файла PDF, можно найти в рубрике General info файла; параметры создания PDF были оптимизированы для печати. Были приняты во внимание все меры предосторожности с тем, чтобы обеспечить пригодность настоящего файла для использования комитетами-членами ISO. В редких случаях возникновения проблемы, связанной со сказанным выше, просьба проинформировать Центральный секретариат по адресу, приведенному ниже

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

ISO 20541:2008

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d65d714b-2836-4647-beaa-066b54e6323e/iso-20541-2008>



**ДОКУМЕНТ ЗАЩИЩЕН АВТОРСКИМ ПРАВОМ**

© ISO и IDF 2008

Все права сохраняются. Если не указано иное, никакую часть настоящей публикации нельзя копировать или использовать в какой-либо форме или каким-либо электронным или механическим способом, включая фотокопии и микрофильмы, без предварительного письменного согласия ISO или IDF по соответствующему адресу, указанному ниже.

ISO copyright office  
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20  
Tel. + 41 22 749 01 11  
Fax + 41 22 749 09 47  
E-mail [copyright@iso.org](mailto:copyright@iso.org)  
Web [www.iso.org](http://www.iso.org)

International Dairy Federation  
Diamant Building • Boulevard Auguste Reyers 80 • B-1030 Brussels  
Tel. + 32 2 733 98 88  
Fax + 32 2 733 04 13  
E-mail [info@fil-idf.org](mailto:info@fil-idf.org)  
Web [www.fil-idf.org](http://www.fil-idf.org)

Опубликовано в Швейцарии

## Содержание

Страница

Предисловие .....	iv
Предисловие .....	v
1 Область применения .....	1
2 Нормативные ссылки .....	1
3 Термины и определения .....	1
4 Сущность метода .....	2
5 Реактивы .....	2
6 Оборудование .....	4
7 Отбор проб .....	5
8 Подготовка пробы для испытания .....	6
8.1 Порошковое молоко, порошковая сыворотка и концентраты молочного белка .....	6
8.2 Казеины и казеинаты .....	6
8.3 Сыр .....	6
8.4 Сывороточный сыр .....	6
9 Процедура .....	6
9.1 Приготовление испытательного образца .....	6
9.2 Удаление жира и белка .....	7
9.3 Холостое испытание с использованием реактивов .....	8
9.4 Определение .....	8
9.5 Калибровка .....	10
10 Вычисление и выражение результатов .....	10
10.1 Содержание нитрита (матричный холостой раствор) (см. Раздел 4, Примечание 3) .....	10
10.2 Общее содержание нитрита/нитрата .....	11
10.3 Содержание нитрата .....	11
11 Прецизионность .....	12
11.1 Межлабораторные испытания .....	12
11.2 Повторяемость .....	12
11.3 Воспроизводимость .....	12
12 Протокол испытания .....	13
Приложение А (информативное) Межлабораторные испытания .....	14
Библиография .....	17

## Предисловие

**Международная организация по стандартизации (ISO)** является всемирной федерацией национальных организаций по стандартизации (комитетов-членов ISO). Разработка международных стандартов обычно осуществляется техническими комитетами ISO. Каждый комитет-член, заинтересованный в деятельности, для которой был создан технический комитет, имеет право быть представленным в этом комитете. Международные правительственные и неправительственные организации, имеющие связи с ISO, также принимают участие в работах. Что касается стандартизации в области электротехники, ISO работает в тесном сотрудничестве с Международной электротехнической комиссией (IEC).

Проекты международных стандартов разрабатываются по правилам, указанным в Директивах ISO/IEC, Часть 2.

Главная задача технических комитетов состоит в разработке международных стандартов. Проекты международных стандартов, принятые техническими комитетами, рассылаются комитетам-членам на голосование. Их опубликование в качестве международных стандартов требует одобрения, по меньшей мере, 75 % комитетов-членов, принимающих участие в голосовании.

Обращается внимание на возможность патентования некоторых элементов данного международного стандарта. ISO не несет ответственности за идентификацию какого-либо или всех таких патентных прав.

ISO 20541|IDF 197 был подготовлен Техническим комитетом ISO/TC 34, *Пищевые продукты*, Подкомитетом SC 5, *Молоко и молочные продукты*, и Международной молочной федерацией (IDF). Он публикуется совместно ISO и IDF.

[ISO 20541:2008](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d65d714b-2836-4647-beaa-066b54e6323e/iso-20541-2008)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d65d714b-2836-4647-beaa-066b54e6323e/iso-20541-2008>

## Предисловие

**Международная молочная федерация (IDF)** является некоммерческой организацией, представляющей мировой молочный сектор. Членами IDF являются национальные комитеты в каждой стране-члене, а также региональные молочные ассоциации, подписавшие официальное соглашение о сотрудничестве с IDF. Все члены IDF имеют право быть представленными в постоянных комитетах IDF, выполняющих техническую работу. IDF сотрудничает с ISO в разработке стандартных методов анализа и отбора проб молока и молочных продуктов.

Проекты международных стандартов, принятые рабочими группами и постоянными комитетами, рассылаются национальным комитетам на голосование. Для их публикации в качестве международных стандартов требуется одобрение не менее 50 % национальных комитетов, принимающих участие в голосовании.

Следует иметь в виду, что некоторые элементы настоящего международного стандарта могут быть объектом патентных прав. IDF не может нести ответственность за идентификацию какого-либо одного или всех патентных прав.

Международный стандарт ISO 20541 | IDF 197 был подготовлен Международной молочной федерацией (IDF) и Техническим комитетом ISO/TC 34, *Пищевые продукты*, Подкомитетом SC 5, *Молоко и молочные продукты*. Этот стандарт публикуется совместно ISO и IDF

Вся работа была проделана объединенной рабочей группой ISO-IDF *Второстепенные соединения* Постоянного комитета *Второстепенные компоненты и определение физических свойств* при поддержке руководителей этого проекта г-на М. Carl (DE) и г-жи С. Väckman (FL).

[ISO 20541:2008](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d65d714b-2836-4647-beaa-066b54e6323e/iso-20541-2008)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d65d714b-2836-4647-beaa-066b54e6323e/iso-20541-2008>



# Молоко и молочные продукты. Определение содержания нитратов. Метод с применением ферментативного восстановления и молекулярно-абсорбционной спектроскопии после реакции Грисса

**ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ** — Использование этого международного стандарта может включать опасные материалы, операции и оборудование. Настоящий стандарт не претендует на рассмотрение всех проблем безопасности, связанных с его использованием. Пользователь сам должен устанавливать соответствующие меры по безопасности и защите здоровья и обеспечивать соответствие национальным регламентам.

## 1 Область применения

Настоящий международный стандарт устанавливает метод для определения содержания нитратов в молоке и молочных продуктах методом молекулярно-абсорбционной спектроскопии после реакции Грисса (с предшествующим ферментативным восстановлением).

Метод, в частности, применяется для цельного, частично снятого, снятого и сухого молока, твердых, полутвердых и мягких сыров, плавленого и сывороточного сыра, казеинов, казеинатов, сухой сыворотки и концентратов молочного белка.

Этот метод можно использовать при содержаниях, соответствующих измеренной концентрации в растворе пробы (без учета холостого раствора) более 0,2 мг/л.

## 2 Нормативные ссылки

Следующие ссылочные нормативные документы являются обязательными при применении данного документа. Для жестких ссылок применяется только цитированное издание документа. Для плавающих ссылок необходимо использовать самое последнее издание нормативного ссылочного документа (включая любые изменения).

ISO 565, *Сита контрольные. Проволочная ткань, перфорированные пластины и листы, изготовленные гальваническим методом. Номинальные размеры отверстий*

ISO 648, *Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной меткой*

ISO 835, *Посуда лабораторная стеклянная. Мерные градуированные пипетки*

ISO 1042, *Посуда лабораторная стеклянная. Мерные колбы с одной меткой*

ISO 3696, *Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы испытания*

## 3 Термины и определения

Применительно к настоящему документу используются следующие термины и определения.

**3.1**  
**содержание нитритов**  
**nitrite content**  
массовая доля нитритных соединений, определенная методом, установленным в настоящем международном стандарте

**3.2**  
**содержание нитратов**  
**nitrate content**  
массовая доля нитратных соединений, определенная методом, установленным в настоящем международном стандарте

ПРИМЕЧАНИЕ Содержание нитратов выражается как массовая доля в миллиграммах ионов нитрата ( $\text{NO}_3^-$ ) на килограмм продукта.

## 4 Сущность метода

Испытательный образец диспергируют в теплой воде. Жир и белки удаляют или посредством осаждения с использованием реактивов Карреза или посредством центробежного ультрафильтрации с использованием конических мембран (см. Примечания 1 и 2). Нитрат восстанавливают до нитрита в части филтраты посредством нитратредуктазы. При добавлении сульфаниламида и *N*-(1-нафтил)этилендиамида дихлорида проявляется красно-фиолетовый азокраситель в частях как невосстановленного филтраты (для нитрита), так и восстановленного раствора (для нитрата), и оптическую плотность измеряют при длине волны 540 нм (или Hg 546 нм). Содержание нитрита в пробе и общее содержание нитрита после восстановления нитрата вычисляют, сравнивая измеренные оптические плотности с оптическими плотностями серии калибровочных растворов нитрита натрия. Содержание нитрата определяют по разности между этими двумя содержаниями.

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

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

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

## 5 Реактивы

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

**5.1** Раствор гидроксида натрия,  $c(\text{NaOH}) = 1$  моль/л.

**5.2** Раствор хлорида натрия,  $c(\text{NaCl}) = 0,9$  г/100 мл.

**5.3** Соляная кислота,  $\rho_{20}(\text{HCl}) = 1,19$  г/мл.

**5.4** Раствор соляной кислоты,  $c(\text{HCl}) = 2$  моль/л.

Тщательно добавляют 160 мл соляной кислоты (5.3) приблизительно к 700 мл воды в мерной колбе вместимостью 1 000 мл с одной меткой (6.4) при регулярном вращении. Охлаждают содержимое до комнатной температуры. Разбавляют до метки водой и тщательно перемешивают.

## 5.5 Реактивы Карреза, указанные ниже:

### 5.5.1 Реактив Карреза I: Раствор гексацианоферрата(II) калия, $c(\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}) = 150 \text{ г/л}$ .

Растворяют 15,0 г тригидрата гексацианоферрата(II) калия в воде в мерной колбе вместимостью 100 мл с одной меткой (6.4). Разбавляют до метки водой и перемешивают.

### 5.5.2 Реактив Карреза II: Раствор сульфата цинка, $c(\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}) = 300 \text{ г/л}$ .

Растворяют 30,0 г гептагидрата сульфата цинка в воде в мерной колбе вместимостью 100 мл с одной меткой (6.4). Разбавляют до метки водой и перемешивают.

## 5.6 Стандартные растворы, указанные ниже:

### 5.6.1 Исходный раствор нитрита натрия ( $\text{NaNO}_2$ ).

Отвешивают точно ( $75,0 \pm 0,1$ ) мг предварительно высушенного (при  $102^\circ\text{C}$  в течение 2 ч) нитрита натрия в мерную колбу вместимостью 100 мл с одной меткой. Растворяют в подходящем количестве воды. Разбавляют до метки водой и перемешивают. Полученный исходный раствор содержит 500 мг нитрита на литр.

Приготавливают калибровочные растворы, разбавляя исходный раствор водой, чтобы получить несколько растворов с различными концентрациями нитрита в диапазоне от 0,05 мг/л до 5,0 мг/л.

При хранении при комнатной температуре исходный раствор нитрита натрия остается устойчивым 1 день.

### 5.6.2 Исходный раствор нитрата калия ( $\text{KNO}_3$ ).

Отвешивают точно ( $81,5 \pm 0,1$ ) мг предварительно высушенного (при  $102^\circ\text{C}$  в течение 2 ч) нитрата калия в мерную колбу вместимостью 100 мл с одной меткой. Растворяют в подходящем количестве воды. Разбавляют до метки водой и перемешивают. Полученный исходный раствор содержит 500 мг нитрата на литр.

Приготавливают калибровочные растворы, разбавляя исходный раствор водой, чтобы получить несколько растворов с различными концентрациями нитрата в диапазоне от 0,05 мг/л до 5,0 мг/л.

При хранении при  $4^\circ\text{C}$  исходный раствор нитрата калия остается устойчивым 1 неделю.

## 5.7 Буферный раствор фосфата калия, $\text{pH} = 7,5$ .

Точно отвешивают ( $57,6 \pm 0,1$ ) мг гидрофосфата дикалия ( $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) в мерную колбу вместимостью 100 мл с одной меткой. Растворяют его в подходящем количестве воды. Разбавляют до метки водой и перемешивают.

Точно отвешивают ( $17,0 \pm 0,1$ ) мг дигидрофосфата калия ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) в мерную колбу вместимостью 50 мл с одной меткой. Растворяют его в подходящем количестве воды. Разбавляют до метки водой и перемешивают.

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

При хранении при  $4^\circ\text{C}$  буферный раствор фосфата калия остается устойчивым 2 недели.

## 5.8 Раствор NADPH/FAD.

Отвешивают точно ( $5,6 \pm 0,1$ ) мг 3-никотинамидадениндинуклеотидфосфата (восстановленного), соль тетранатрия ( $\beta\text{-NADPH-Na}_4$ , с массовой долей не менее 98 %), и ( $80,0 \pm 0,1$ ) мг

флавинадениндинуклеотида, соль динатрия (FAD-Na<sub>2</sub>, с массовой долей не менее 88 %), в мерную колбу вместимостью 25 мл с одной меткой.

Растворяют их в подходящем количестве буферного раствора фосфата калия (5.7). Разбавляют до метки буферным раствором (5.7) и перемешивают.

Раствор NADPH/FAD готовят непосредственно перед использованием.

### **5.9 Раствор нитратредуктазы (NR).**

Отвешивают 65 мг нитратредуктазы (NR) из *Aspergillus niger* (ЕС 1.6.6.2, лиофизат, содержащий приблизительно 0,4 Ед/мг) в пробирку вместимостью 10 мл. Добавляют 5 мл воды и перемешивают.

При хранении при 4 °С раствор нитратредуктазы остается устойчивым 2 недели.

### **5.10 Цветные реактивы, указанные ниже:**

#### **5.10.1 Раствор цветного реактива I: Сульфаниламид (NH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>).**

Отвешивают 400 мг сульфаниламида в мерную колбу вместимостью 50 мл с одной меткой (6.4). Растворяют в растворе соляной кислоты, при необходимости нагревая в водяной бане.

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

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

#### **5.10.2 Раствор цветного реактива II: N-(1-Нафтил)этилендиамин дигидрохлорид (C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>·2HCl).**

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

Разбавляют водой до метки 50 мл и перемешивают. Полученный таким образом раствор при необходимости фильтруют.

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

**5.11** Комплекты реактивов также имеются в продаже. При использовании таких комплектов строго следуйте указаниям этого международного стандарта (в частности, в случае 5.8).

## **6 Оборудование**

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

Обычное лабораторное оборудование, в частности следующее:

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

**6.2 Контейнер для пробы** с герметической крышкой.

**6.3 Конические колбы** вместимостью 100 мл, 500 мл и 1 000 мл с притертыми стеклянными пробками.

**6.4 Мерные колбы** с номинальной вместимостью 25 мл, 50 мл, 100 мл и 1 000 мл, соответствующие требованиям ISO 1042, класс А.

- 6.5 Пипетки**, обеспечивающие подачу 1 мл, 2 мл, 5 мл и 10 мл соответственно, удовлетворяющие требованиям ISO 648, класс А, или ISO 835. В соответствующих случаях можно использовать бюретки вместо пипеток.
- 6.6 Градуированные пипетки** для частичной подачи, используемые в ферментных тестах.
- 6.7 Градуированные цилиндры** вместимостью 20 мл и 50 мл.
- 6.8 Стаканы** вместимостью 20 мл и 50 мл.
- 6.9 Центрифуга** с охлаждающим устройством, обеспечивающая центрифугирование чашек (6.10) и конических мембран (6.21) с центробежным ускорением 3 000  $g$ .
- 6.10 Чашки центрифуги** диаметром 15 мм.
- 6.11 Мембранный фильтр** с размером пор 0,45 мкм для использования со шприцем.
- 6.12 Стеклоаная воронка** подходящего диаметра.
- 6.13 Спектрометр**, подходящий для измерения оптической плотности при длине волны 540 нм, или **фотометр для измерения спектральных линий** с ртутной лампой и фильтром, подходящий для измерения оптической плотности при длине волны 546 нм.
- 6.14 Оптические кюветы** полумикронного типа (одноразовые или стеклянные кюветы), с длиной оптического пути 1 см.
- 6.15 Мельница**, подходящая для измельчения испытуемого образца, если необходимо. Для избежания потери влаги устройство не должно создавать нежелательный нагрев.
- 6.16 Лабораторное сито** из плетеной проволоочной ткани, диаметром 200 мм, с отверстиями номинального размера 500 мкм и приемный лоток, соответствующие требованиям ISO 565.
- 6.17 Магнитная мешалка**.
- 6.18 Устройство для измерения pH**, состоящее из pH-метра и стеклянных/контрольных электродов, обеспечивающее измерение при 20 °C.
- 6.19 Водяная баня** с встряхивающим приспособлением, поддерживающая температуру (70 ± 0,5) °C.
- 6.20 Нагревательная плита**.
- 6.21 Конические мембраны**, MWCO 5 000 D, вместимостью 4 мл, для центробежного ультрафильтрации раствора пробы.

## 7 Отбор проб

Отбор проб не является частью метода, установленного в этом международном стандарте. Рекомендованный метод отбора проб дан в ISO 707|IDF 50.

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

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