
**Молоко и сухое молоко. Определение
содержания йодида. Метод с
применением жидкостной
хроматографии высокого разрешения**

*Milk and dried milk — Determination of iodide content — Method using
high performance liquid chromatography*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.itech.ai)

ISO 14378:2009

<https://standards.itech.ai/catalog/standards/sist/d65a4f0d-6e85-4e0c-83c9-8eb7ea5c9a10/iso-14378-2009>

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



Ссылочные номера
ISO 14378:2009(R)
IDF 167:2009(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 смотреть на экране, но его нельзя изменить, пока не будет получена лицензия на интегрированные шрифты и они не будут установлены на компьютере, 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, использованные 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 14378:2009

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d65a4f0d-6e85-4e0c-83c9-8eb7ea5c9a10/iso-14378-2009>



ДОКУМЕНТ ОХРАНЯЕТСЯ АВТОРСКИМ ПРАВОМ

© ISO и IDF 2009

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 и IDF, которое должно быть получено после запроса о разрешении, направленного по адресу, приведенному 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
Web 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
Web www.fil-idf.org

Опубликовано в Швейцарии

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 ISO, заинтересованный в деятельности, для которой был создан технический комитет, имеет право быть представленным в этом комитете. Международные организации, правительственные и неправительственные, имеющие связи с ISO, также принимают участие в работах. ISO непосредственно сотрудничает с Международной электротехнической комиссией (IEC) по всем вопросам электротехнической стандартизации.

Международные стандарты разрабатываются в соответствии с правилами, приведенными в Директивах ISO/IEC, Часть 2.

Основная задача технических комитетов состоит в подготовке международных стандартов. Проекты международных стандартов, одобренные 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.

Следует иметь в виду, что некоторые элементы настоящего документа могут быть объектом патентных прав. ISO не должен нести ответственность за идентификацию какого-либо одного или всех патентных прав.

ISO 14378|IDF 167 разработан Техническим комитетом ISO/TC 34, *Пищевые продукты*, Подкомитетом SC 5, *Молоко и молочные продукты*, и Международной федерацией молочной промышленности (IDF). Этот стандарт должен быть опубликован совместно ISO и IDF.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d65a4f0d-6e85-4e0c-83c9-8eb7ea5c9a10/iso-14378-2009-idf-167-2009>
Настоящее второе издание ISO 14378|IDF 167 отменяет и заменяет первое издание (ISO 14378:2000), которое было подвергнуто незначительному пересмотру.

Предисловие

Международная федерация по молочному животноводству (IDF) является некоммерческой организацией, представляющей всемирное молочное животноводство. Членами IDF являются Национальные комитеты каждой страны-члена, а также региональные ассоциации по молочному животноводству, которые имеют подписанное официальное соглашение о совместной деятельности с IDF. Каждый член IDF имеет право быть представленным в Постоянных комитетах IDF, осуществляющих техническую работу. IDF сотрудничает с ISO по вопросам разработки стандартных методов анализа и отбора проб молока и молочных продуктов.

Основная задача Постоянных комитетов состоит в подготовке международных стандартов. Проекты международных стандартов, принятые Рабочими группами и Постоянными комитетами, рассылаются Национальным комитетам для голосования. Их опубликование в качестве международных стандартов требует одобрения не менее 50 % Национальных комитетов IDF, принимающих участие в голосовании.

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

ISO 14378|IDF 167 подготовлен Международной федерацией молочной промышленности (IDF) и Техническим комитетом ISO/TC 34, *Пищевые продукты*, Подкомитетом SC 5, *Молоко и молочные продукты*. Этот стандарт должен быть опубликован совместно IDF и ISO.

Вся работа была проведена под руководством совместной ISO-IDF Группы экспертов (E15 — *Тяжелые металлы и другие элементы*), которая в настоящее время входит в состав совместной ISO-IDF Рабочей группы по *Микросоединениям* Постоянного комитета по *Микроэлементам и определению физических свойств*.

Настоящее издание ISO 14378|IDF 167 отменяет и заменяет IDF 167:1994, которое было подвергнуто незначительному пересмотру.

Молоко и сухое молоко. Определение содержания йодида. Метод с применением жидкостной хроматографии высокого разрешения

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ — Применение настоящего международного стандарта может включать использование опасных материалов, операций и оборудования. Лица, использующие этот стандарт, должны быть ознакомлены с обычной лабораторной практикой. В этом стандарте не ставится цель решить все проблемы безопасности, связанные с его применением. Пользователь этого стандарта сам несет ответственность за обеспечение охраны здоровья и техники безопасности, а также определение применимости регламентных ограничений до его использования.

1 Область применения

В настоящем международном стандарте устанавливается метод с применением жидкостной хроматографии высокого разрешения (HPLC) для определения содержания йодида в пастеризованном цельном молоке и сухом обезжиренном молоке от 0,03 мкг/г до 1 мкг/г и 0,3 мкг/г до 10,0 мкг/г соответственно.

ПРИМЕЧАНИЕ 1 Метод был совместно исследован на пробах жидкого цельного и сухого обезжиренного молока. Нет оснований полагать, что данный метод не применим к обезжиренному или частично обезжиренному молоку, а также к сухому цельному молоку.

ПРИМЕЧАНИЕ 2 Этим методом измеряют содержание свободного (ионного) йодида. Однако содержание общего йодида в свежем молоке и в сухом молоке высокого качества, в котором не происходило развития микроорганизмов, может включать от 5 % до 10 % (массовая доля) органически связанного йодида. В молоке, подвергнутом микробиологической порче, может содержаться больше органически связанного йодида.

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

3 Термины и определения

Применительно к этому документу используются следующие термины и определения.

3.1

содержание йодида в пастеризованном цельном молоке

содержание йодида в сухом обезжиренном молоке

iodide content of pasteurized whole milk

iodide content of dried skimmed milk

массовая доля веществ, определенная по методике, установленной в данном международном стандарте

ПРИМЕЧАНИЕ Обычно содержание йодида выражают в микрограммах на грамм.

4 Принцип

Пробу для анализа разбавляют водой. Нерастворимые и высокомолекулярные вещества удаляются при фильтровании через отделяющую мембрану 25 000 D. Йодид-ионы отделяются с помощью обращенно-фазовой ионопарной жидкостной хроматографии высокого разрешения HPLC с электрохимическим детектором и серебрянным рабочим электродом с потенциалом от 0 мВ до 50 мВ. Содержание йодида рассчитывают с помощью калибровочного графика.

5 Реактивы

Используют только реактивы признанного аналитического качества или, если так определено, специального сорта HPLC.

5.1 Вода, соответствующая ISO 3696, класс 2.

5.2 Стандартные растворы йодида.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ — Защищают водные растворы йодида от света, поскольку они не устойчивы при воздействии излучения видимой части спектра.

5.2.1 Основной раствор йодида, соответствующий 100 мг йодида на литр.

Растворяют 130,8 мг йодида калия (KI) в воде в мерной колбе с одной меткой вместимостью 1 000 мл (6.2). Разбавляют до метки водой и перемешивают.

Основной раствор йодида можно использовать в течение 1 месяца при условии, что он хранится в темноте при комнатной температуре.

5.2.2 Рабочий стандартный раствор йодида, соответствующий 20 мкг, 50 мкг, 150 мкг и 250 мкг йодида на литр соответственно.

Переносят с помощью пипетки 20 мкл, 50 мкл, 150 мкл и 250 мкл основного раствора йодида (5.2.1) в четыре отдельные мерные колбы с одной меткой вместимостью 100 мл (6.2). Разбавляют каждый раствор до метки водой и перемешивают.

Рабочие стандартные растворы йодида можно использовать в течение 1 недели при условии, что они хранятся в темноте при комнатной температуре.

5.3 Ацетонитрил (CH₃CN), сорта HPLC.

5.4 Раствор хлорида гексадецилтриметиламмония [CH₃(CH₂)₁₅N(CH₃)₃Cl], 25 % (по массе) раствор в воде, для ионопарной хроматографии.

5.5 Элюент для HPLC: смесь гидрофосфата натрия и хлорида гексадецилтриметиламмония в смеси ацетонитрила и воды (68 + 32 частей по объему), pH = 6,8.

Растворяют 1,42 г гидрофосфата натрия (Na₂HPO₄) примерно в 600 мл воды в мерной колбе с одной меткой вместимостью 1 000 мл (6.2). Добавляют 1,3 мл раствора хлорида гексадецилтриметиламмония (5.4) и хорошо перемешивают. Затем добавляют 320 мл ацетонитрила (5.3) и снова перемешивают. Доводят pH до 6,8 с помощью концентрированной ортофосфорной кислоты (H₃PO₄). Разбавляют до метки водой и хорошо перемешивают.

Осветляют раствор, фильтруя его сначала через мембранный фильтр с размером пор 1,2 мкм, а затем через мембранный фильтр с размером пор 0,5 мкм. Для перемешивания взбалтывают раствор с образованием завихрения и сразу же дегазируют с помощью вакуума или обработки ультразвуком в течение 2 мин перед первоначальным использованием. Для незначительной корректировки времени удерживания йодида можно модифицировать элюент путем добавления небольших количеств воды

или ацетонитрила. Элюент можно использовать в течение 1 года при условии, что он хранится в плотно закрытой емкости.

5.6 *n*-Пентанол.

6 Аппаратура

Обычная лабораторная аппаратура и, в частности, следующая.

6.1 Аналитические весы, с точностью взвешивания до 0,01 г, с возможностью считывания до трех десятичных знаков.

6.2 Мерные колбы с одной меткой, вместимостью 100 мл и 1 000 мл, ISO 1042^[3] класс А.

6.3 Микропипетки, калиброванные на вытекание вместимостью 20 мкл, 50 мкл, 150 мкл и 250 мкл соответственно, ISO 8655-2^[6].

6.4 Градуированная пипетка, вместимостью 2 мл, с ценой деления 0,1 мл, ISO 835^[2] класс А или класс AS.

6.5 Мерный цилиндр, вместимостью 500 мл, ISO 4788^[4] класс А.

6.6 pH-метр, с комбинированным стеклянным электродом.

6.7 Мембранные фильтры, с размером пор 1,2 мкм и 0,5 мкм, полиамид-6-6, или эквивалентный, с фильтровальным оборудованием для осветления элюента для HPLC.

6.8 Центрифуга, способная удерживать центрифужные пробирки вместимостью 50 мл и создавать радиальное ускорение 1 000g.

6.9 Центрифужные пробирки, вместимостью 50 мл, внутренним диаметром 27 мм, конические, изготовленные из одноразового пластика, с навинчивающимися крышками.

6.10 Опоры для конической мембраны, для удерживания мембранного фильтровального конуса (6.11) в центрифужных пробирках (6.9) [Amicon CS1A¹], или эквивалентные].

6.11 Мембранные фильтровальные конусы, с отделением от 25 000 D до 30 000 D [Amicon Centriflo CF-25¹], или эквивалентные].

Готовят новые мембранные фильтровальные конусы перед использованием следующим образом. Вымачивают в смеси этанола и воды (2 + 8 частей по объему) в течение 1 ч. Вынимают конус и дают возможность стечь жидкости. Устанавливают его в опоре для конической мембраны (6.10) и помещают в центрифужную пробирку вместимостью 50 мл. Центрифугируют конус при радиальном ускорении от 900g до 1 000g в течение 5 – 10 мин.

Переворачивают новый мембранный фильтровальный конус, чтобы слить оставшийся растворитель. Помещают подготовленные конусы в опоры, установленные в чистые промаркированные центрифужные пробирки (6.9) для анализа пробы. После каждого использования сразу же вымачивают конусы в горячей воде, хорошо промывают струей горячей воды и хранят их в смеси этанола и воды (1 + 5 частей по объему). Удаляют растворитель перед следующим использованием конусов, как описано выше для новых конусов.

В противном случае, можно использовать фильтровальные блоки Millipore Ultrafre-PF¹⁾ (UFP1, отделение 10 000 D). Эти одноразовые фильтры не требуют какой-либо предварительной обработки и фильтрование можно проводить под слабым давлением или в вакууме; центрифугирования не требуется.

6.12 Оборудование для HPLC, состоящее из следующего.

6.12.1 Насос, обеспечивающий объемную скорость потока 2 мл/мин.

6.12.2 Дозатор, ручной или автоматический, с объемом впрыска от 50 мкл до 200 мкл.

6.12.3 Аналитическая колонка, Partisphere C-18¹⁾, 5 мкм, внутренний диаметр 4,7 мм, длина 110 мм, или эквивалентная.

6.12.4 Защитная колонка (необязательно), картридж Spheri-5 C-18¹⁾, внутренний диаметр 3,2 мм, длина 15 мм, или эквивалентная.

6.12.5 Электрохимический детектор, используемый в режиме постоянного или импульсного тока, с серебряным рабочим электродом с потенциалом от 0 мВ до + 50 мВ.

6.12.6 Ленточный самописец или **интегратор**, способный измерять площадь пиков, предпочтительно используют электронный интегратор, имеющий функцию так называемого "отрицательного пика" [пригоден Spectra Physics¹⁾].

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

7 Отбор проб

Отбор проб не включен в метод, установленный в этом международном стандарте. Рекомендуемый метод отбора проб приводится в ISO 707|IDF 50^[1].

В лабораторию следует поставлять представительную пробу. Её не следует подвергать порче или изменению во время транспортировки или хранения.

8 Подготовка пробы для испытания

8.1 Общие положения

Избегают бактериологического загрязнения во время подготовки пробы.

8.2 Молоко

Доводят пробу для испытания до температуры $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ и тщательно перемешивают. Если не образуется однородной эмульсии жира, медленно нагревают пробу до $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ и осторожно перемешивают путем переворачивания. Затем охлаждают пробу до $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

8.3 Сухое молоко

Переносят пробу в контейнер с герметичной крышкой, вместимость которого примерно в два раза превышает объем пробы. Сразу же закрывают контейнер и тщательно перемешивают пробу путем многократного встряхивания и переворачивания контейнера.

1) Приведен пример пригодного продукта, имеющегося в продаже. Эта информация дается для удобства пользователей данного международного стандарта и не означает поддержки этого продукта со стороны ISO или IDF. Могут использоваться эквивалентные продукты при условии, что они дают сравнимые результаты.

9 Методика

9.1 Проба для анализа

9.1.1 Молоко

Взвешивают с точностью до $0,1 \text{ г}$ $45 \text{ г} \pm 5 \text{ г}$ пробы для испытания в мерную колбу вместимостью 100 мл с одной меткой (6.2). Доводят до метки водой и хорошо перемешивают.

9.1.2 Сухое молоко

Взвешивают с точностью до $0,01 \text{ г}$ $4,2 \text{ г} \pm 0,2 \text{ г}$ пробы для испытания в мерную колбу вместимостью 100 мл с одной меткой (6.2). Добавляют от 70 мл до 80 мл воды и энергично встряхивают от 5 мин до 10 мин до полного растворения пробы. Добавляют 1 каплю *n*-пентанола (5.6) для уменьшения пенообразования и перемешивают. Доводят до метки водой и хорошо перемешивают.

9.2 Очистка

Заполняют два мембранных конуса на расстояние до 5 мм от вершины разбавленной пробой для анализа (9.1.1 или 9.1.2) и центрифугируют при радиальном ускорении от $900g$ до $1\ 000g$ в течение 15 – 20 мин. Полученные прозрачные фильтраты (т.е. два испытуемых раствора для каждой пробы) можно непосредственно вводить в систему HPLC.

ПРИМЕЧАНИЕ В качестве альтернативной процедуры очистки см. 6.11, последний абзац.

9.3 Определение с помощью HPLC

9.3.1 Оптимизация режима HPLC

Промывают новую колонку HPLC, подавая насосом через неё смесь ацетонитрила (5.3) и воды (5.1) (1 + 1 частей по объему), а потом 30 мл элюента для HPLC (5.5). Затем рециркулируют элюент со скоростью 2 мл/мин в течение, по меньшей мере, 1 ч.

Включают электрохимический детектор (6.12.5) (потенциал от 0 мВ до + 50 мВ; выходной сигнал от 10 нА до 20 нА полной шкалы). Непрерывно рециркулируют элюент для HPLC (5.5) до получения постоянной нулевой линии.

Многokратно вводят 50 мкл стандартного рабочего раствора йодида с концентрацией йодида 250 мкг/л (5.2.2) до тех пор, пока время удерживания и высота пика не станут постоянными; т.е. абсолютное расхождение между высотами пиков двух последовательных вводов будет не более 3 %. Время удерживания йодидов должно составлять от 4 мин до 8 мин; если нет, регулируют состав элюента (5.5). Регулируют прикладываемый потенциал электрода в пределах от 0 мВ до + 50 мВ для оптимизации формы и высота пика (см. Рисунок 1).

Определяют объем ввода для стандартного рабочего раствора йодида концентрацией 250 мг/л (5.2.2), который дает высоту пика примерно 80 % полной шкалы. Впоследствии используют этот объем ввода для всех испытуемых и стандартных растворов.

Элюент для HPLC (5.5) может рециркулироваться между анализами пробы или при вводе только стандартных растворов. Однако элюент не рециркулируют при вводе испытуемых растворов. В повседневной практике рециркулируют элюент со скоростью 0,2 мл/мин для сохранения готовности системы. При длительных интервалах между использованием промывают систему HPLC смесью ацетонитрила (5.3) и воды (5.1) (1 + 1 частей по объему) и повторно приводят в равновесие с помощью элюента HPLC (5.5) перед следующим использованием.

9.3.2 Измерение

Вводят четыре рабочих стандартных раствора йодида (5.2.2). Выжидают 5 мин после элюирования йодида перед следующим вводом. Измеряют высоты или площади пиков йодида для рабочих стандартных растворов йодида.

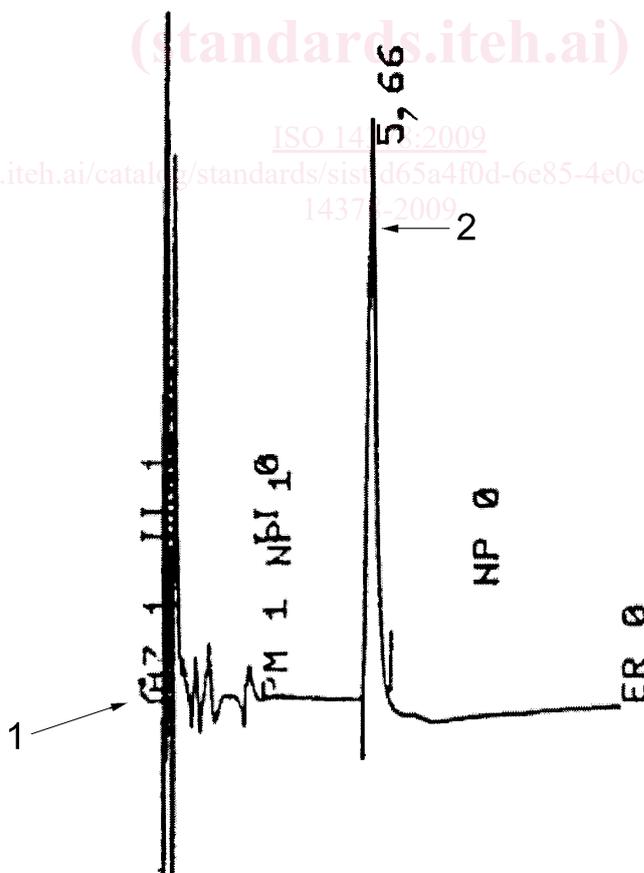
Вводят пробы для анализа (дубликаты, полученные в 9.2). Выжидают 5 мин после элюирования йодида перед следующим вводом. Измеряют высоты или площади пиков йодида.

После 6 - 8 вводов испытуемых растворов снова вводят стандартный рабочий раствор йодида концентрацией 150 мкг/л (5.2.2). Высота или площадь пиков йодида должна отличаться не более чем на 5 % от полученного ранее значения.

В зависимости от режима очистки, качества растворителей для HPLC и поведения электрода на нисходящей стороне пика йодида на хроматограмме может наблюдаться отрицательный спад ниже нулевой линии. Следует настроить интегратор таким образом, чтобы отрицательная часть пика (ниже исходной нулевой линии) не включалась в измерение высоты или площади пика.

9.4 Построение калибровочного графика

Для четырех стандартных рабочих растворов йодида применяют линейный анализ методом наименьших квадратов для определения зависимости концентраций от полученных сигналов (высот или площадей пиков). Не включают нулевую точку (0,0) в расчет. Коэффициент корреляции должен быть $\geq 0,99$.



а) Стандарт йодида (102 мкг/л)

Рисунок 1 (продолжение следует)