ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА В МОЛОКЕ:
ВОПРОСЫ, ТРЕБУЮЩИЕ РЕШЕНИЯ

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

Ольга Валентиновна Лепилкина, д-р техн. наук, главный научный сотрудник
E-mail: ov.lepilkina@fncps.ru
Анастасия Игоревна Григорьева, младший научный сотрудник
Александра Юрьевна Гусева, техник 1 категории
Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия – филиал Федерального научного центра пищевых систем им. В. М. Горбатова, г. Углич

Метод формольного титрования является давно известным и до сих пор применяемым методом определения массовой доли белка в молоке. Но реалии современности требуют его актуализации с учетом изменившегося приборного обеспечения и в соответствии с современными подходами к расчету метрологических характеристик. Одним из проблемных моментов методики, представленной в ГОСТ 25179-2014, является необходимость проведения сложной процедуры установления поправки к результатам измерения, которой часто пренебрегают производственные лаборатории молокоперерабатывающих предприятий. Целью работы было уточнение формулы пересчета результатов формольного титрования в массовую долю белка, не предусматривающую изменяющейся поправки. В результате математической обработки 413 результатов измерений предложено два варианта формул: $Y = 0{,}5X$ и $Y = 0{,}48X + 0{,}10$, где Y – массовая доля белка (%), X – объем гидроокиси натрия, затраченный на титрование после внесения в молоко формальдегида (см^3). Обе формулы обеспечивают получение результатов, близких к результатам, получаемым методом Кьельдаля: коэффициент корреляции более 0,99. Адаптация метода формольного титрования к современным моделям автоматических потенциометрических анализаторов в сочетании с использованием предлагаемых формул пересчета упростит процедуру и повысит точность получаемых результатов.

Ключевые слова: белок, молоко, формольное титрование, метрологические характеристики, массовая доля белка

Для цитирования: Лепилкина, О. В. Определение белка в молоке: вопросы, требующие решения / О. В. Лепилкина, А. И. Григорьева, А. Ю. Гусева // Молочная промышленность. 2024. № 2. С. 25–31. https://www.doi.org/10.21603/1019-8946-2024-2-8

ВВЕДЕНИЕ

Метод формольного титрования является давно известным методом определения массовой доли белка в молоке и до сих пор применяется при проведении производственного контроля на предприятиях молочной промышленности[1] [1]. ГОСТ 25179-2014 «Молоко и молочные продукты. Методы определения массовой доли белка», где в пункте 5 представлен этот метод, входит в перечень стандартов, содержащих методики измерений, необходимые для оценки (подтверждения) соответствия продукции требованиям технического регламента Таможенного союза 033/2013 «О безопасности молока и молочной продукции».

Но на сегодняшний день существуют проблемы практического применения метода формольного титрования, которые были обозначены в ранее опубликованной нами статье [2]. Возникшие проблемы связаны с устаревшей редакцией методики измерений, предусматривающей потенциометрическое титрование молока до точки эквивалентности до и после внесения формальдегида, которая не актуализировалась на протяжении более 30 лет. За это время существенно изменились приборная база и конструктивные особенности потенциометрических анализаторов, подходы к расчету метрологических характеристик и в целом требования к разработке методик измерений.

Поэтому многие предприятия не применяют методику, основанную на потенциометрическом титровании, представленную в ГОСТ 25179-2014, предпочитая ручное титрование с индикатором, несмотря на то, что эта методика не стандартизована. При этом зачастую из-за сложности игнорируется процедура определения поправки к результатам измерения, и для пересчета объема гидроокиси натрия, затраченного на титрование, в массовую долю белка используется только постоянный коэффициент 0,96[2], – см. ГОСТ 25179-2014, п. 5.5.1, формула (2).

[1]Меркулова, Н. Г. Производственный контроль в молочной промышленности. Практическое руководство / Н. Г. Меркулова, М. Ю. Меркулов, И. Ю. Меркулов. – СПб.: Профессия, 2010. – С. 202–203.

[2]Коэффициент 0,96 используется для объема пробы молока 20 см^3. Для объема пробы молока 10 см^3 значение коэффициента должно быть в два раза больше: 1,92, а для объема пробы молока 40 см^3 – в два раза меньше: 0,48.

Источник изображения: Freepik.com

шиванием равных по массе образцов молока, полученных от разных хозяйств (не менее чем от 75 % всех хозяйств-сдатчиков молока).

Возникает вопрос: зачем проводить эту сложную процедуру для определения поправки, которую затем следует прибавлять к результату, полученному после умножения на постоянный коэффициент 0,96, если можно сразу рассчитать коэффициент пересчета делением результата, полученного методом Кьельдаля, на результат, полученный формольным титрованием, и пользоваться этим коэффициентом до следующей проверки соответствия двух методов?

Учитывая вариабельность состава молока, в том числе белковую, в различных регионах по сезонам года, на наш взгляд, производственным лабораториям молокоперерабатывающих предприятий нужно периодически устанавливать значения коэффициента пересчета для молока своей сырьевой зоны. Это позволяет более точно определить массовую долю белка в молоке методом формольного титрования.

Вместе с тем в условиях современного производства, когда приоритет отдается экспресс-методам оценки состава, нами уже сделан выбор в пользу быстроты в ущерб точности. Это относится, например, к результатам, получаемым на ультразвуковых анализаторах молока, в которых происходит пересчет параметров ультразвуковых колебаний в молоке в количественные значения компонентов его состава (жира, белка, СОМО, лактозы и др.) с помощью формул и коэффициентов, введенных в программу прибора. Это не дает полного совпадения с результатами, полученными арбитражными методами, но достаточно, чтобы сделать первичную оценку состава молока. Аналогичная ситуация будет, если в методе формольного титрования для определения массовой доли белка в молоке использовать постоянный коэффициент пересчета, приняв некоторую долю условности в получаемых результатах. Для получения более точных результатов измерения необходима их периодическая сверка с результатами, получаемыми арбитражными методами. Это относится как к ультразвуковым анализаторам, показания которых надо корректировать, так и к методу формольного титрования. Очевидно, что для отдельно взятого предприятия, стабильно работающего с постоянной сырьевой базой, проводить часто такие сверки нет необходимости.

Процедура определения поправки предусматривает параллельное определение массовой доли белка в молоке арбитражным методом Кьельдаля по ГОСТ 23327-98 «Молоко и молочные продукты. Метод измерения общего азота по Кьельдалю и определение массовой доли белка» и методом формольного титрования с последующим вычислением разности между результатами. Эту процедуру, в соответствии с требованием ГОСТ 25179-2014, п. 5.3.2, необходимо проводить не реже одного раза в 10 дней. Измерения двумя методами нужно делать в шести повторностях в средней пробе молока, полученной сме-

Источник изображения: Freepik.com

Следует отметить, что постоянный коэффициент пересчета результатов формольного титрования в массовую долю белка изначально был рекомендован отечественными исследователями, а зарубежными исследователями иной подход вообще не рассматривался. Так, Л. Карунина и М. Шилович[3] предложили при объеме пробы коровьего молока 10 см^3 использовать коэффициент пересчета 1,94 (для объема пробы 20 см^3 – это 0,97), А. Дуденков – коэффициент 0,959[3]. Американские исследователи [3] по результатам измерений 650 образцов молока от 142 коров установили среднее значение коэффициента пересчета 1,77 для проб молока объемом 10 см^3, для проб молока объемом 20 см^3 – 0,885, отметив, что на величину коэффициента пересчета на общий белок оказывали влияние стадия лактации и сезон года. Египетские исследователи [4] для козьего молока применяли коэффициент пересчета, равный 2,505, для 20 см^3 – 1,253. Пакистанские ученые [5] установили для буйволиного молока коэффициент 1,9, для 20 см^3 – 0,95; для коровьего – 1,7, для 20 см^3 – это 0,85.

Исходя из вышеизложенного, мы считаем необходимым проведение пересмотра ГОСТ 25179-2014 «Молоко и молочные продукты. Методы определения массовой доли белка» в части п. 5 «Метод формольного титрования» с учетом особенностей современной приборной базы и изменившихся подходов к обработке получаемых результатов измерения. В том числе для упрощения процедуры обработки результатов считаем целесообразным отказаться от использования поправки к результату измерения массовой доли белка в пользу постоянного коэффициента пересчета.

Целью настоящей работы было уточнение формулы пересчета результатов формольного титрования в массовую долю белка в молоке, не предусматривающую изменяющейся поправки.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проведены на 81 образце сырого коровьего молока, полученного из сырьевых зон Ярославской и Московской областей Российской Федерации, в период ноябрь 2021 г. – ноябрь 2023 г. Повторность измерений на каждом образце молока – не менее 5. Всего было проведено 413 измерений.

Измерения проводили на автоматическом потенциометрическом анализаторе АТП-02. Объем пробы молока 40 см^3. Увеличение объема пробы молока в два раза по сравнению с регламентируемой в ГОСТ 25179-2014, п. 5.4.1 (20 см^3) обусловлен тем, что объема пробы молока 20 см^3, помещаемой в стакан вместимостью 50 см^3, недостаточно, чтобы погрузить в нее должным образом электроды потенциометра с учетом объема, занимаемого якорем магнитной мешалки (глубина погружения должна быть не менее 16 мм). Это должно быть учтено при пересмотре ГОСТ 25179-2014.

Потенциометрическое титрование молока до и после добавления формальдегида проводили до заданного значения pH = 9. Влияние используемых реактивов исключали путем проведения контрольного опыта с использованием вместо молока дистиллированной воды. Параллельно измеряли массовую долю общего белка в молоке методом Кьельдаля по ГОСТ 23327-98.

Для пересчета результатов формольного титрования (X) в массовую долю белка в молоке (Y) рассматривали два варианта формул:
Первый вариант – использование формулы вида $Y = K X$, которая предусматривает установление постоянного коэффициента пересчета (K) объема гидроокиси натрия, затраченного на титрование молока после добавления формальдегида, в массовую долю белка путем математической обработки данных методами описательной статистики.

[3]Инихов, Г. С. Методы анализа молока и молочных продуктов / Г. С. Инихов, Н. П. Брио. – М.: Пищевая промышленность, 1971. – С. 304.

Значения коэффициента пересчета в каждом эксперименте вычисляли делением массовой доли белка, определенной методом Кьельдаля, на объем гидроокиси натрия, затраченного на титрование молока до значения pH = 9 в методе формольного титрования после добавления формальдегида (далее – объем гидроокиси натрия).

Второй вариант был основан на установлении корреляционной зависимости между объемом гидроокиси натрия и массовой долей белка в молоке, определенной методом Кьельдаля. Этот подход предусматривал получение регрессионной модели.

Математическую обработку результатов измерений проводили с использованием инструментов «описательная статистика», «корреляция» и «двухвыборочный F-тест для дисперсии» программы Microsoft Exel 2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Установление постоянного коэффициента пересчета. На рисунке 1 представлено изменение значения коэффициента пересчета по месяцам (средние по 5–10 повторностям) за двухлетний период наблюдений с ноября 2021 г. по ноябрь 2023 г.

Полученные результаты не позволяют выявить закономерность сезонного изменения величины коэффициента пересчета, что, очевидно, связано со стойловым содержанием животных. Следовательно, сезонный фактор при установлении постоянного коэффициента пересчета может быть исключен.

В таблице 1 представлены результаты статистического анализа значений коэффициента пересчета.

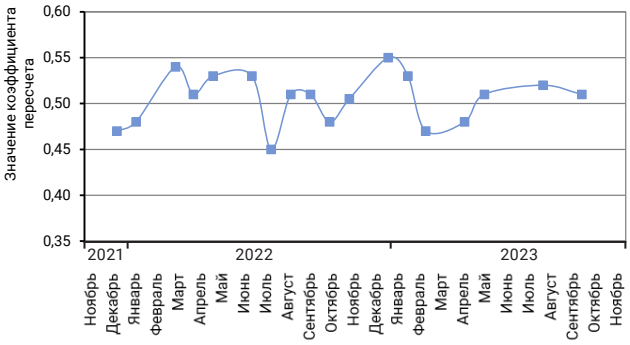

Рисунок 1. Изменение коэффициента пересчета результатов формольного титрования в массовую долю белка в течение двух лет по месяцам

Таблица 1
Результаты статистического анализа величины коэффициента пересчета

Среднее	0,501646489
Стандартная ошибка	0,001834883
Медиана	0,5
Мода	0,48
Стандартное отклонение	0,037289226
Дисперсия выборки	0,001390486
Эксцесс	-0,65403066
Асимметричность	0,468908153
Интервал	0,17
Минимум	0,43
Максимум	0,6
Сумма	207,18
Счет	413
Уровень надежности (95,0 %)	0,0036069

Величина среднего арифметического значения коэффициента равна 0,5. Она совпадает с медианой, что говорит о нормальном распределении данных. Стандартное отклонение, характеризующее степень отклонения данных от среднего значения, равно 0,037. Это значит, что случайная составляющая полной погрешности находится на уровне 7 %, что можно считать удовлетворительным уровнем.

Как было отмечено выше, производственные лаборатории молокоперерабатывающих предприятий, используя метод формольного титрования, зачастую игнорируют поправку, предусмотрен-

Источник изображения: Freepik.com

ную в формуле (2) п. 5.5.1 ГОСТ ГОСТ 25179-2014, используя только коэффициент 0,96 (для пробы молока объемом 40 см^3 он должен быть 0,48).

Для того, чтобы оценить, какой коэффициент пересчета в методе формольного титрования (0,5 или 0,48) дает результаты по массовой доле белка более близкие к результатам, полученным методом Кьельдаля, был проведен двухвыборочный F-тест для дисперсий. Результаты представлены в таблицах 2 и 3. Он показывает, что по средним значениям результаты пересчета с использованием К = 0,5 практически совпадают с результатами, полученными методом Кьельдаля (табл. 2). Использование К = 0,48 дает заниженные результаты (табл. 3).

Таблица 2
Двухвыборочный F-тест для дисперсий значений массовой доли белка в молоке, определенных методом Кьельдаля и методом формольного титрования с использованием коэффициента пересчета К = 0,5

Параметры математической статистики	Метод Кьельдаля	Формольное титрование, К = 0,5
Среднее	3,411646778	3,414582339
Дисперсия	0,084460679	0,073961727
Наблюдения	419	419
df	418	418
F	1,141951143	–
P(F<=f) одностороннее	0,087611253	–
F критическое одностороннее	1,17478836	–

Таблица 3
Двухвыборочный F-тест для дисперсий значений массовой доли белка в молоке, определенных методом Кьельдаля и методом формольного титрования с использованием коэффициента пересчета К = 0,48

Параметры математической статистики	Метод Кьельдаля	Формольное титрование, К = 0,48
Среднее	3,411646778	3,276085919
Дисперсия	0,084460679	0,06809517
Наблюдения	419	419
df	418	418
F	1,240332893	–
P (F <= f) одностороннее	0,013964255	–
F критическое одностороннее	1,17478836	–

По критерию Фишера дисперсия результатов, полученных формольным титрованием с использованием коэффициента пересчета 0,5 не отличается от дисперсии результатов, полученных методом Кьельдаля (табл. 2.), т. к. F = 1,142 не превышает критического значения $F_{кр}$ = 1,175. То есть в данном случае принимается нулевая гипотеза.

В случае использования при формольном титровании коэффициента 0,48 нулевая гипотеза отвергается, т. к. F > $F_{кр}$. Следовательно, между дисперсиями существует статистически значимое различие.

Таким образом, результаты статистической обработки данных позволяют сделать выбор в пользу коэффициента пересчета К = 0,5, а уравнение для расчета массовой доли белка будет выглядеть:

$$Y = 0{,}5X, \qquad (1)$$

где Y – массовая доля белка, %; X – объем гидроокиси натрия, пошедший на титрование 40 см^3 молока после добавления формальдегида, см^3.

Установление корреляционной связи между результатами измерений белка методами Кьельдаля и формольного титрования. 80 образцов молока, в которых были проведены измерения массовой доли белка методом Кьельдаля, были разделены на 11 групп по диапазонам, включающим результаты, дающие после округления до первого знака после запятой значения массовой доли белка 3,0; 3,1; 3,2; 3,3; 3,4; 3,5; 3,6; 3,7; 3,8; 3,9; 4,0. В каждой группе были рассчитаны соответствующие указанным значениям массовой доли белка средние значения объема гидроокиси натрия в методе формольного титрования (по 5–10 повторностям). По полученным результатам построена зависимость, представленная на рисунке 2.

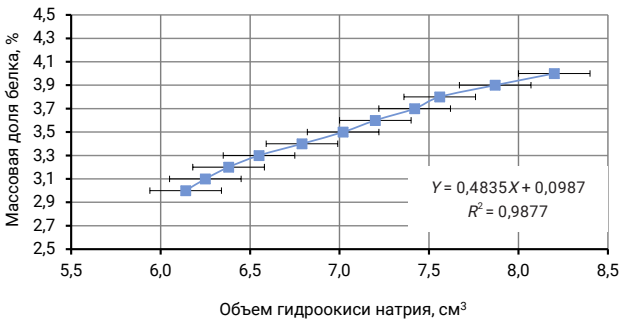

Рисунок 2. Соответствие объема гидроокиси натрия, затраченного на формольное титрование, и массовой доли белка, определенной методом Кьельдаля

На основании полученной регрессионной модели для практического использования может быть предложена следующая формула для пересчета объема гидроокиси натрия в массовую долю белка:

$$Y = 0{,}48\,X + 0{,}10, \qquad (2)$$

где Y – массовая доля белка, %; X – объем гидроокиси натрия, пошедший на титрование 40 см^3 молока после добавления формальдегида, см^3.

Для оценки различий в результатах расчета массовой доли белка по формулам (1) и (2) проведено их сравнение с результатами определения массовой доли белка, полученными методом Кьельдаля (табл. 4).

Между данными, полученными двумя способами пересчета – по формуле (1) и по формуле (2) – и результатами измерений массовой доли белка в молоке методом Кьельдаля, существует тесная корреляционная связь (R более 0,99). В соответствии с полученными результатами обе формулы могут использоваться в методике определения белка методом формольного титрования. Выбор остается за специалистами, которые будут пересматривать редакцию ГОСТ 25179-2014. Альтернативными вариантами могут быть прилагаемая к стандарту таблица с заранее рассчитанными данными или номограмма.

Таблица 4
Массовая доля белка в молоке, %, определенная методами Кьельдаля и формольного титрования с использованием формул (1) и (2)

Метод Кьельдаля	Метод формольного титрования	
	$Y = 0{,}5X$	$Y = 0{,}48X + 0{,}10$
2,97	3,07	3,05
3,08	3,13	3,10
3,22	3,19	3,16
3,31	3,32	3,29
3,38	3,40	3,36
3,48	3,51	3,47
3,63	3,63	3,58
3,67	3,70	3,65
3,75	3,82	3,77
3,87	3,94	3,88
4,10	4,14	4,07
Коэффициент корреляции с результатами, полученными методом Кьельдаля	0,994512	0,994069

Источник изображения: Freepik.com

Еще один момент, подтверждающий необходимость пересмотра ГОСТ 25179-2014 – это его не соответствующие современной действительности метрологические характеристики: предел повторяемости 0,22 %, предел воспроизводимости 0,28 %, границы абсолютной погрешности ± 0,20 %. Указанные погрешности были рассчитаны по старым методикам. В соответствии с современным подходом к расчету метрологических характеристик[4], абсолютная погрешность не может быть меньше предела повторяемости.

ВЫВОДЫ

Подтверждена необходимость актуализации ГОСТ 25179-2014 «Молоко и молочные продукты. Методы определения массовой доли белка» в части п. 5 «Метод формольного титрования» с учетом современного состояния приборной базы и изменившихся подходов к расчету метрологических характеристик.

Предложены две формулы для пересчета результатов формольного титрования в массовую долю белка в молоке (для объема пробы молока 40 см^3), исключающие процедуру определения поправки: с использованием постоянного коэффициента К = 0,5 и в виде уравнения линейной регрессии $Y = 0{,}48X + 0{,}10$. Обе формулы обеспечивают получение результатов, близких к результатам, получаемым арбитражным методом Кьельдаля: коэффициенты корреляции более 0,99.

Совершенствование методики измерений массовой доли белка в молоке методом формольного титрования , представленной в ГОСТ 25179-2014, с использованием современных моделей автоматических потенциометрических анализаторов упростит процедуру измерения и повысит точность за счет исключения индикаторных ошибок и ошибок лаборанта. ■

PROTEIN DETERMINATION IN MILK: URGENT ISSUES

Olga V. Lepilkina, Anastasia I. Grigorieva, Alexandra Yu. Guseva
All-Russian Scientific Research Institute of Butter- and Cheesemaking – Branch of V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems, Uglich

ORIGINAL ARTICLE

Formol titration is a familiar method for determining the mass fraction of protein in milk. However, it needs to be adapted to new instruments and modern metrology. The current methodology presented in State Standard GOST 25179-2014 requires a complex procedure to establish the alteration, which is often neglected by commercial laboratories and milk producers. This research clarified the formula for converting formol titration data into protein mass fraction without having to perform a variable correction. By processing 413 measurement results, the authors came up with two formulas: $Y = 0.5X$ and Y $0.48X + 0.10$, where У is the mass fraction of protein (%) and X is the volume of sodium hydroxide spent on titration after adding formaldehyde to milk (cm^3). Both formulas provided results close to those obtained by the Kjeldahl method, the correlation coefficient being ≥ 0.99. The conversion formulas made it possible to adapt the formol titration method to modern automatic potentiometric analyzers, thus optimizing the procedure and increasing its accuracy.

Keywords: protein in milk, formol titration method, conversion factor, metrological characteristics

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Тепел, А.** Химия и физика молока / А. Тепел. – Пер. с нем. под ред. С.А. Фильчаковой. – СПб.: Профессия, 2012. – С. 321.
2. **Лепилкина, О. В.** О проблемах определения белка в молоке методом формольного титрования / О. В. Лепилкина, А. Ю. Гусева // Молочная промышленность. 2022. № 4. С. 20–22. https://doi.org/10.31515/1019-8946-2022-04-20-22; https://elibrary.ru/ovxmyt
3. **Castillo, L. S.** Comparison of Orange G Dye, Formol Titration, and Kjeldahl Methods for Milk Protein Determinations / L. S. Castillo, G. W. Trimberger, C. R. Henderson [et al.] // Journal of Dairy Science. 1962. Vol. 45. № 9. P. 1079–1082. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(62)89562-9
4. **Gomaa, M.** New method for determination of protein content of goats milk and compared with different methods / M. Gomaa, M. E. Abdel-Aziz, E. H. Hafez, I. Salama Samar // Journal of Food and Dairy Sciences. 2014. Vol. 59, № 5 (2). P. 95–101. https://doi.org/10.21608/jfds.2014.52745
5. **Shagufta, F.** Determination of chemical composition of milk marketed in Quetta, Pakistan / F. Shagufta, S. Ashif, K. Muzaffar [et al.] // International Journal of Advanced Research in Biological Sciences. 2016. Vol. 3. № 5. P. 98–103

[4]Расчет метрологических характеристик методик измерения в настоящее время проводится в соответствии с требованиями:
- ГОСТ Р ИСО 5725-(1-6)-2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения»;
- ГОСТ Р 8.563-2009 «ГСИ. Методики (методы) измерений»;
- РМГ 61-2010 «ГСИ. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки».