МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ ISO 11053— 2015

Растительные жиры и масла

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКВИВАЛЕНТОВ КАКАО-МАСЛА В МОЛОЧНОМ ШОКОЛАДЕ

(ISO 11053:2009, IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2016

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0–2015 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2–2015 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Республиканским унитарным предприятием «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по продовольствию» на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии стандарта, указанного в пункте 5

2 ВНЕСЕН Государственным комитетом по стандартизации Республики Беларусь

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации по переписке (протокол от 27 февраля 2015 г. № 75-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
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт
Украина	UA	Минэкономразвития Украины

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 7 июня 2016 г. № 551-ст межгосударственный стандарт ГОСТ ISO 11053–2015 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2017 г.

5 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 11053:2009 «Растительные жиры и масла. Определение эквивалентов какао-масла в молочном шоколаде» (Vegetable fats and oils. Determination of cocoa butter equivalents in milk chocolate», IDT).

Официальные экземпляры международного стандарта, на основе которого подготовлен настоящий межгосударственный стандарт, и международных стандартов, на которые даны ссылки, находятся в Федеральном агентстве по техничекому регулированию и метрологии.

6 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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

Растительные жиры и масла

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКВИВАЛЕНТОВ КАКАО-МАСЛА В МОЛОЧНОМ ШОКОЛАДЕ

Vegetable fats and oils.
Determination of cocoa butter equivalents in milk chocolate

Дата введения — 2017—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод обнаружения и количественного определения эквивалентов какао-масла (ЭКМ) и молочного жира (МЖ) в молочном шоколаде посредством анализа профиля триацилглицеридов (ТАГ) с использованием капиллярной газожидкостной хроматографии высокого разрешения и последующей обработки данных на основе анализа регрессии простых и частных наименьших квадратов. Предел обнаружения примесей ЭКМ составляет 0,5 г ЭКМ/100 г молочного шоколада и определены количественно при уровне 5 % массовой доли добавки ЭКМ к молочному шоколаду с прогнозируемой погрешностью 0,7 г ЭКМ/100 г молочного шоколада.

2 Термины и определения

В настоящем стандарте применяют следующие термины с соответствующим определением:

2.1 **содержание молочного жира в молочном шоколаде** (milk fat content of milk chocolate): Массовая доля молочного жира в молочном шоколаде, определенная методом, установленным в настоящем стандарте.

Примечание — Массовая доля выражена в граммах на 100 г молочного шоколада.

2.2 **эквиваленты какао-масла** (cocoa butter equivalents): Растительные жиры и масла, отличные от какао-масла, обнаруживаемые в молочном шоколаде методом, описанным в настоящем стандарте.

Примечание — Результат выражен качественно, т. е. ЭКМ присутствуют/ ЭКМ не присутствуют (ДА/НЕТ).

2.3 **содержание эквивалентов какао-масла в молочном шоколаде** (cocoa butter equivalents content of milk chocolate): Массовая доля веществ, определенная методом, установленным в настоящем стандарте.

Примечание — Массовая доля выражена в граммах на 100 г молочного шоколада.

3 Сущность метода

Анализируемые образцы, т. е. жиры, полученные из молочного шоколада методом быстрого экстрагирования, разделяют посредством газожидкостной хроматографии высокого разрешения на фракции триацилглицеридов в соответствии с их молекулярной массой и степенью ненасыщенности. Отдельные фракции ТАГ, т. е. 1-пальмитоил-2-стеароил-3-бутироилглицерид (PSB), 1,3-дипальмитоил-2-олеоилглицерид (POP), 1-пальмитоил-2-олеоил-3-стеароилглицерид (POS), 1-пальмитоил-2,3-диолеилглицерид (POO), 1,3-дистеароил-2-олеоилглицерид (SOS) и 1-стеароил-2,3-диолеоилглицерид (SOO) используют чтобы:

Издание официальное

a) вычислить содержание молочного жира в жире, выделенном из шоколада (г/ 100 г жира, выделенного из шоколада);

b) определить присутствие/отсутствие ЭКМ в жире, выделенном из шоколада, используя модель простой линейной регрессии на основе трех ТАГ: POP, POS и SOS с поправкой на вклад ТАГ, обусловленный вкладом молочного жира, и установить, является ли образец чистым какао-маслом;

c) определить количество примеси ЭКМ в жире, выделенном из шоколада (г/100 г шоколада), используя модель регрессии частных наименьших квадратов (ЧНК) с шестью входными переменными, т. е. с пятью ТАГ: POP, POS, POO, SOS, SOO, нормированными к 100 %, и определенным содержанием молочного жира в жире, выделенном из шоколада.

Чтобы обеспечить правильное этикетирование молочного шоколада, результаты, полученные для жира, выделенного из шоколада, преобразуют в граммы молочного жира на 100 г шоколада и граммы ЭКМ на 100 г шоколада, для чего требуется точное определение общего содержания жира в шоколаде методом Сокслета (на основе [5]). Если метод обнаружения подтверждает отсутствие ЭКМ в жире, выделенном из шоколада, то нет необходимости в количественном определении общего содержания жира.

4 Реактивы, растворы и стандарты

Используются только реактивы признанного аналитического класса.

Предупреждение — **Необходимо уделять внимание пунктам, которые описывают процедуры обращения с опасными веществами. Должны соблюдаться технические и организационные меры безопасности, а также меры личной безопасности.**

4.1 Стандартный образец какао-масла (IRMM-801)[1)] (см. [6]) для калибровки и проверки пригодности системы.

4.2 Чистый молочный жир для проверки пригодности системы.

4.3 1-Пальмитоил-2-стеароил-3-бутироилглицерид (PSB)[2)].

4.3.1 Общие положения калибровки

Для калибровки растворяют 40 мг PSB в мерной колбе вместимостью 50 см^3 (5.9) в изооктане, получая исходный раствор ρ = 0,8 мг/ см^3. Тщательно перемешивают до полного растворения.

Из исходного раствора PSB готовят серию из пяти калибровочных растворов в пределах матрицы (IRMM-801), взвешивая на аналитических весах (5.1) IRMM-801 (4.1) в мерные колбы вместимостью 25 см^3 (5.9) и добавляя соответствующие объемы исходного раствора PSB, как представлено в таблице 1. Доводят до метки изооктаном.

Таблица 1 — Массы IRMM-801 и объемы исходного раствора PSB для приготовления серии калибровочных растворов PSB

Калибровочный раствор	Масса IRMM-801 (4.1), помещенная в мерную колбу вместимостью 25 см^3, мг	Объем, взятый из исходного раствора PSB и добавленный в мерную колбу вместимостью 25 см^3, см^3	Концентрация PSB в калибровочном растворе ρ_{PSB}, мг/ см^3	Окончательная концентрация IRMM-PSB в растворе $\rho_{IRMM\text{-}PSB}$, мг/ см^3
1	250	4	0,128	10
2	250	3	0,096	10
3	250	2	0,064	10
4	250	1	0,032	10
5	250	0,5	0,016	10

4.3.2 Использование метода холодного ввода пробы в колонку (OCI)

Отбирают по 1 см^3 каждого калибровочного раствора и доводят до 5 см^3 изооктаном, чтобы получить окончательную концентрацию IRMM-PSB ($\rho_{IRMM\text{-}PSB}$) около 2 мг/ см^3 в каждом растворе и концентрации PSB (ρ_{PSB}) в диапазоне от 0,0256 мг/ см^3 (калибровочный раствор 1) до 0,0032 мг/ см^3 (калибровочный раствор 5).

1) Доступно для приобретения в Институте стандартных образцов и измерений (gost.e-ecolog.ru), Бельгия. Эта информация дается для удобства пользователей настоящего стандарта и не является поддержкой этого продукта.

2) Доступно для приобретения в Лародане (gost.e-ecolog.ru Швеция. Эта информация дается для удобства пользователей настоящего стандарта и не является поддержкой этого продукта. Можно использовать аналогичные продукты, если есть данные, что они дают такие же результаты.

4.3.3 Использование метода ввода пробы в колонку с делением потока

Отбирают по 1 см^3 каждого калибровочного раствора и доводят до 2 см^3 изооктаном, чтобы получить окончательную концентрацию IRMM-PSB ($C_{IRMM-PSB}$) около 5 мг/ см^3 в каждом растворе и концентрации PSB (c_{PSB}) в диапазоне от 0,064 мг/ см^3 (калибровочный раствор 1) до 0,008 мг/ см^3 (калибровочный раствор 5).

Примечание — Окончательные концентрации PSB вычисляют, используя фактическую массу в исходном стандартном растворе.

4.4 α-Холестан[3], ρ = 100 мг/ см^3, используемый как внутренний стандарт.

Растворяют ~ 50 мг α-холестана в 50 см^3 изоктана.

- При использовании метода холодного ввода в колонку: разбавить 1:250 (ρ = 0,004 мг/ см^3).

- При использовании метода ввода пробы в колонку с делением потока (например, отношение деления потока 1:10): разбавить 1:100 (ρ = 0,01 мг/ см^3).

4.5 Растворитель жира, не содержащий хлор (например, диэтиловый эфир, петролейный эфир, н-гексан, н-гептан, изооктан).

4.6 Соляная кислота, ρ (HCl) = 4 моль/дм^3.

5 Аппаратура и оборудование

5.1 Аналитические весы с ценой деления 0,1 мг.

5.2 Сушильный шкаф. Может использоваться сухой нагревательный блок.

5.3 Фильтровальная бумага, диаметр 15 см [например, S&S 589/1[4]].

5.4 Блендер для пищевой продукции, кухонный блендер с расположением двигателя выше принимающего контейнера для предотвращения плавления образцов.

5.5 Ротационный испаритель

Могут использоваться альтернативные методы упаривания.

5.6 Испарительный блок, с подачей азота.

5.7 Эксикатор, герметический сосуд, содержащий осушающие вещества, используемый для хранения гигроскопичных материалов.

5.8 Экстрактор Сокслета, со стандартными конусными соединениями, вместимостью сифона 100 см^3 (экстракционная гильза 33 мм × 88 мм), колбой Эрленмейера вместимостью 250 см^3 и регулируемым нагревательным кожухом (или аналогичным).

5.9 Мерные колбы, вместимостью 10, 20, 50 и 100 см^3 (или другой вместимости, если необходимо) [1] класс А.

5.10 Пипетки, вместимостью от 1 до 10 см^3 (или другой вместимости, если необходимо), [2] класс А или [3].

5.11 Микрошприц, с максимальным объемом 10 мм^3, ценой деления 0,1 мм^3 или автоматический дозатор.

5.12 Газовый хроматограф (ГХ), оборудованный системой холодного ввода пробы в колонку или системой ввода пробы в колонку с делением потока и пламенно-ионизационным детектором (ПИД).

Примечание 1 — Могут использоваться альтернативные системы ввода (например, инжектор с программируемой температурой (ТПИ) или инжектор с подвижной иглой) при условии, что получаемые результаты идентичны указанным в 10.2.

Разделение и измерение количества оказываются удовлетворительными, если соблюдаются следующие условия:

- кварцевая хроматографическая колонка: CB-TAP длина 25 м, внутренний диаметр 0,25 мм, толщина термостабильной среднеполярной фенилметилполисилоксановой пленки 0,10 мкм;

- температурная программа для холодного ввода в колонку: начальная температура – 100 °С, время выдержки не менее 2 мин; скорость нагрева до 270 °С – 30 °С/мин; время выдержки 1 мин; скорость нагрева до 340 °С – 2,5 °С/мин; время выдержки 7 мин;

- температурная программа для ввода с делением потока: начальная температура – 200 °С, время выдержки не менее 1 мин; скорость нагрева до 270 °С – 14 °С/мин; время выдержки 1 мин; скорость нагрева до 340 °С – 2,5 °С/мин; время выдержки 10 мин;

[3] Можно получить в Sigma-Aldrich (http://www.sigmaaldrich.com/), Бельгия. Информация дается для удобства пользователей настоящего стандарта и не является поддержкой этого продукта.

[4] Черная бумажная лента S&S 589/1 является примером подходящего продукта, имеющегося в продаже. Информация дается для удобства пользователей настоящего стандарта и не является поддержкой этого продукта. Можно использовать аналогичные продукты, если есть данные, что они дают такие же результаты.

- детектор (ПИД): температура 360 °С

- газ-носитель для метода холодного ввода пробы в колонку: H_2 (чистота ≥ 99,999 %) с постоянной скоростью потока 3,5 см^3/мин (другим подходящим газом-носителем является гелий)

- газ-носитель для метода ввода пробы в колонку с делением потока: H_2 (чистота ≥ 99,999 %) с постоянной скоростью потока 25 см^3/мин (другим подходящим газом-носителем является гелий)

Примечание 2 — Колонки и альтернативные условия эксперимента, используемые в международном совместном исследовании (см. [7]), приведены в таблице А.1. Рабочие условия можно изменять для получения оптимального разделения.

5.13 Хроматографическая система сбора и обработки данных

6 Отбор проб

Отбор проб не является частью метода, установленного в настоящем стандарте. Рекомендуемый метод отбора приведен в [4][5)]. В лабораторию направляется репрезентативная проба. Она не должна быть повреждена или изменена в ходе транспортировки и хранения.

7 Приготовление образцов

7.1 Подготовка стандартного образца какао-масла для калибровки и проверки пригодности системы

Перед вскрытием ампулы и использованием IRMM-801 (4.1) ампулу нагревают в сушильном шкафу (5.2) до плавления содержимого. После получения прозрачного раствора перемешивают содержимое путем многократного переворачивания ампулы в течение не менее 20 с. Затем ампулу вскрывают и переносят содержимое в чистую виалу, которую плотно закрывают и хранят в прохладном месте для последующего использования.

7.2 Подготовка чистого молочного жира для проверки пригодности системы

Если нет чистого молочного жира, его можно получить из пробы масла, расплавляя и перенося слой жира через складчатую фильтровальную бумагу (5.3) при 50 °С в сушильном шкафу (5.2).

7.3 Приготовление образца шоколада

7.3.1 Общие положения

Охлаждают около 200 г шоколада до затвердевания и натирают на мелкие гранулы при помощи блендера для пищевой продукции (5.4). Тщательно перемешивают и хранят в плотно закрытой емкости в холодильнике.

7.3.2 Быстрая экстракция жира

Жир выделяют из 5 г тертого шоколада (7.3.1) путем экстрагирования, применяя от двух до трех порций по 10 см^3 подходящего растворителя жира (4.5). Центрифугируют и декантируют. Объединяют экстракты, выпаривают (5.5) большую часть растворителя жира и, наконец, сушат в потоке азота (5.6).

Жир, выделенный из шоколада, полученный быстрой экстракцией, используется для окончательного анализа ТАГ методом газожидкостной хроматографии высокого разрешения. Для обнаружения ЭКМ точное содержание общего жира в шоколаде не требуется. Если ЭКМ не обнаружены, то их количественное определение относительно установленного предела 5 % нецелесообразно.

Если ЭКМ обнаружены, то определение их количества должно быть выполнено с использованием того же профиля ТАГ, который использовался для обнаружения ЭКМ. В этом случае определяют точное содержание общего жира в шоколаде по процедуре 7.3.3. Можно использовать альтернативные процедуры экстракции, если они дают такие же результаты.

7.3.3 Определение содержания общего жира

Проводят экстракцию и определяют общее содержание жира в образце молочного шоколада (приготовленного по 7.3.2) методом Сокслета (на основе официального метода [5]).

Навеску (5.1) шоколада массой от 4 г до 5 г помещают в лабораторный стакан вместимостью от 300 см^3 до 500 см^3. Медленно при помешивании добавляют 45 см^3 кипящей воды для получения однородной суспензии. Добавляют 55 см^3 HCl (4.6) и немного обезжиренных центров кипения или другого средства против бурления и перемешивают. Накрывают часовым стеклом, медленно доводят раствор до кипения и кипятят в течение 15 мин. Промывают часовое стекло 100 см^3 воды. Фильтруют раствор через складчатую фильтровальную бумагу (5.3) или аналогичную, промывая стакан водой три раза. Продолжают промывку до тех пор, пока последняя порция фильтрата не будет содержать ионы хлора.

[5)] На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 5555—2010 «Животные и растительные жиры и масла. Отбор проб».

Переносят фильтр с образцом в обезжиренную экстракционную гильзу и сушат в течение 2 ч в небольшом лабораторном стакане при 100 °С. Стакан закрывают тампоном из стекловаты. Проводят подготовку колбы Эрленмейера: вносят немного центров кипения в колбу вместимостью 250 $см^3$ и сушат в течение 1 ч при 100 °С.

Охлаждают колбу до комнатной температуры в эксикаторе (5.7), затем ее взвешивают (5.1). Помещают экстракционную гильзу, содержащую высушенный образец, в аппарат Сокслета (5.8), закрепив ее при помощи спиральных или стеклянных держателей. Промывают лабораторный стакан, в котором проводился гидролиз, сушильный стакан и часовое стекло тремя порциями петролейного эфира по 50 $см^3$ и добавляют смыв в колбу с экстракционной гильзой. Гидролизованный образец подвергают экстракции в течение 4 ч, регулируя нагрев так, чтобы проводилось более 30 экстракционных циклов. Извлекают колбу и выпаривают растворитель.

Сушат колбу при 102 °С до постоянной массы (1,5 ч). Охлаждают колбу в эксикаторе (5.7) до комнатной температуры, затем взвешивают ее. Постоянная масса достигается, когда последующие периоды сушки по 1 ч последовательно показывают потерю влаги менее 0,05 %. Расхождения между параллельными определениями жира должны быть в пределах 0,1 %.

Массовая доля общего жира в шоколаде, $w_{fat,\ choc}$, выраженная в процентах, рассчитывается по формуле:

$$w_{fat\ choc} = \frac{m_{fat} \times 100}{m} \quad (1)$$

где m — масса взятого шоколада, г;

m_{fat} — масса общего жира, полученного из шоколада экстракцией по Сокслету по [5]), г;

Можно использовать альтернативные методы экстракции (например, ускоренная экстракция растворителем, использование сверхкритической экстракции углекислым газом или экстракции с использованием СВЧ-диапазона), при условии что они дают такие же результаты. Жир, выделенный из шоколада, полученный экстракцией по Сокслету, не следует использовать для анализа триацилглицеридов посредством газожидкостной хроматографии высокого разрешения, поскольку в некоторых случаях могут наблюдаться изменения в полученном профиле триацилглицеридов.

Вычисления проводят с точностью до второго знака после запятой.

8 Проведение определения

8.1 Построение калибровочной кривой для определения содержания PSB

Готовят пять калибровочных растворов, содержащих различные концентрации PSB (4.3), но всегда одну и ту же концентрацию α-холестана (4.4), а именно:

Для метода холодного ввода в колонку (OCI):

- Калибровочный раствор 1 (Окончательные концентрации $\rho_{PSB\ 1}$ = 0,0128 мг/ $см^3$, $\rho_{\alpha\text{-cholestane 1}}$ = = 0,002 мг/ $см^3$):

Переносят 1 $см^3$ калибровочного раствора 1 ($\rho_{PSB\ 1}$ = 0,0256 мг/ $см^3$; 4.3) в пробирку и добавляют 1 $см^3$ раствора α-холестана (ρ = 0,004 мг/ $см^3$; 4.4).

- Калибровочный раствор 2 (Окончательные концентрации $\rho_{PSB\ 2}$ = 0,0096 мг/ $см^3$, $\rho_{\alpha\text{-cholestane 2}}$ = = 0,002 мг/ $см^3$):

Переносят 1 $см^3$ калибровочного раствора 2 ($c_{PSB\ 2}$ = 0,0192 мг/ $см^3$; 4.3) в пробирку и добавляют 1 $см^3$ раствора α-холестана (с = 0,004 мг/ $см^3$; 4.4).

- Калибровочный раствор 3 (Окончательные концентрации $\rho_{PSB\ 3}$ = 0,0064 мг/ $см^3$, $\rho_{\alpha\text{-cholestane 3}}$ = = 0,002 мг/ $см^3$):

Переносят 1 $см^3$ калибровочного раствора 3 ($\rho_{PSB\ 3}$ = 0,0128 мг/ $см^3$; 4.3) в пробирку и добавляют 1 $см^3$ раствора α-холестана ρ =0,004 мг/ $см^3$; 4.4).

- Калибровочный раствор 4 (Окончательные концентрации $\rho_{PSB\ 4}$ = 0,0032 мг/ $см^3$, $\rho_{\alpha\text{-cholestane 4}}$ = = 0,002 мг/ $см^3$):

Переносят 1 $см^3$ калибровочного раствора 4 ($\rho_{PSB\ 4}$ = 0,0064 мг/ $см^3$; 4.3) в пробирку и добавляют 1 $см^3$ раствора α-холестана (ρ = 0,004 мг/ $см^3$; 4.4).

- Калибровочный раствор 5 (Окончательные концентрации $\rho_{PSB\ 5}$ = 0,0016 мг/ $см^3$, $\rho_{\alpha\text{-cholestane 5}}$ = = 0,002 мг/ $см^3$):

Переносят 1 $см^3$ калибровочного раствора 4 ($\rho_{PSB\ 5}$ = 0,0032 мг/ $см^3$; 4.3) в пробирку и добавляют 1 $см^3$ раствора α-холестана (ρ = 0,004 мг/ $см^3$; 4.4).

Инжектируют 0,5 мм^3 каждого калибровочного раствора в газовый хроматограф методом холодного ввода в колонку.

Для метода ввода в колонку с делением потока:

- Калибровочный раствор 1 (Окончательные концентрации $\rho_{PSB\ 1}$ = 0,032 мг/ см^3, $\rho_{\alpha\text{-cholestane}\ 1}$ = = 0,005 мг/ см^3):

Переносят 1 см^3 калибровочного раствора 1 ($\rho_{PSB\ 1}$ = 0,064 мг/ см^3; 4.3) в пробирку и добавляют 1 см^3 раствора α-холестана (ρ = 0,01 мг/ см^3; 4.4).

- Калибровочный раствор 2 (Окончательные концентрации $\rho_{PSB\ 2}$ = 0,024 мг/ см^3, $\rho_{\alpha\text{-cholestane}\ 2}$ = = 0,005 мг/ см^3):

Переносят 1 см^3 калибровочного раствора 2 ($\rho_{PSB\ 2}$ = 0,048 мг/ см^3; 4.3) в пробирку и добавляют 1 см^3 раствора α-холестана (ρ = 0,01 мг/ см^3; 4.4).

- Калибровочный раствор 3 (Окончательные концентрации $\rho_{PSB\ 3}$ = 0,016 мг/ см^3, $\rho_{\alpha\text{-cholestane}\ 3}$ = = 0,005 мг/ см^3):

Переносят 1 см^3 калибровочного раствора 3 ($\rho_{PSB\ 3}$ = 0,032 мг/ см^3; 4.3) в пробирку и добавляют 1 см^3 раствора α-холестана (ρ = 0,01 мг/ см^3; 4.4).

- Калибровочный раствор 4 (Окончательные концентрации $\rho_{PSB\ 4}$ = 0,008 мг/ см^3, $\rho_{\alpha\text{-cholestane}\ 4}$ = = 0,005 мг/ см^3):

Переносят 1 см^3 калибровочного раствора 4 ($\rho_{PSB\ 4}$ = 0,016 мг/ см^3; 4.3) в пробирку и добавляют 1 см^3 раствора α-холестана (ρ = 0,01 мг/ см^3; 4.4).

- Калибровочный раствор 5 (Окончательные концентрации $\rho_{PSB\ 5}$ = 0,004 мг/ см^3, $\rho_{\alpha\text{-cholestane}\ 5}$ = = 0,005 мг/ см^3):

Переносят 1 см^3 калибровочного раствора 4 ($\rho_{PSB\ 5}$ = 0,008 мг/ см^3; 4.3) в пробирку и добавляют 1 см^3 раствора α-холестана (ρ = 0,01 мг/ см^3; 4.4).

Инжектируют 1 мм^3 окончательного испытательного раствора в газовый хроматограф методом ввода в колонку с делением потока.

Можно использовать альтернативные количества образцов и инжекторы, при условии, что применяемая система обнаружения дает линейную характеристику и соответствует критериям пригодности системы (10.2).

8.2 Разделение отдельных триацилглицеридов стандартного образца какао-масла методом газовой хроматографии высокого разрешения.

Стандартный образец какао-масла IRMM-801 (4.1) следует нагревать в сушильном шкафу (5.2) до полного плавления. Пипетки или аналогичное оборудование, используемые для переноса образца в процессе взвешивания, нагревают примерно до температуры 55 °С в сушильном шкафу (5.2), чтобы избежать частичного фракционирования жиров.

Для метода холодного ввода в колонку (OCI): Навеску (5.1) массой около 0,1 г IRMM-801 (4.1) помещают в мерную колбу вместимостью 10 см^3 (5.9) и разбавляют до метки изооктаном (4.5). Пипеткой (5.10) емкостью 1 см^3 вводят полученный раствор в другую мерную колбу емкостью 50 см^3 (5.9) и разбавляют до метки таким же растворителем (ρ =0,2 мг/ см^3). Инжектируют 0,5 мм^3 окончательного испытательного раствора в газовый хроматограф методом холодного ввода в колонку.

Для метода ввода с делением потока: Навеску (5.1) массой около 0,1 г IRMM-801 (4.1) помещают в мерную колбу вместимостью 10 см^3 (5.9) и разбавляют до метки изооктаном (4.5). Пипеткой (5.10) емкостью 1 см^3 вводят полученный раствор в другую мерную колбу емкостью 10 см^3 (5.9) и разбавляют до метки таким же растворителем (ρ =1 мг/ см^3). Инжектируют 1 мм^3 окончательного испытательного раствора в газовый хроматограф методом ввода с делением потока.

Могут использоваться альтернативные растворители жира, навески образцов и инжекторы, при условии, что применяемая система обнаружения дает линейную характеристику и соответствует критериям пригодности системы (10.2).

8.3 Разделение отдельных триацилглицеридов чистого молочного жира методом газовой хроматографии высокого разрешения

Для метода холодного ввода в колонку (OCI): Навеску (5.1) массой около 0,1 г МЖ (4.2) помещают в мерную колбу вместимостью 50 см^3 (5.9) и разбавляют до метки изооктаном (4.5) (ρ = 1 мг/ см^3). Переносят 1 см^3 этого раствора в пробирку и добавляют 1 см^3 раствора α-холестана (4.4) (в полученном растворе ρ = 0,5 мг/ см^3). Инжектируют 0,5 мм^3 окончательного испытательного раствора в газовый хроматограф методом холодного ввода в колонку.

Для метода ввода с делением потока: Навеску (5.1) массой около 0,25 г МЖ (4.2) помещают в мерную колбу вместимостью 50 см^3 (5.9) и разбавляют до метки изооктаном (4.5) (ρ = 5 мг/ см^3).

Переносят 1 см^3 этого раствора в пробирку и добавляют 1 см^3 раствора α-холестана (4.4) (в полученном растворе ρ = 2,5 мг/ см^3). Инжектируют 1 мм^3 окончательного испытательного раствора в газовый хроматограф методом ввода с делением потока.

Могут использоваться альтернативные растворители жира, навески образцов и инжекторы, при условии, что применяемая система обнаружения дает линейную характеристику и соответствует критериям пригодности системы (10.2).

8.4 Разделение отдельных триацилглицеридов жира, выделенного из шоколада, методом газовой хроматографии высокого разрешения

Анализируемый образец [жир, выделенный из молочного шоколада методом быстрой экстракции жира (7.3.2)] нагревают в сушильном шкафу (5.2) до полного расплавления. Если жидкий образец содержит осадок, образец фильтруют в шкафу, чтобы получить прозрачный фильтрат. Пипетки (или аналогичное оборудование), используемые для переноса образца во время операции взвешивания, следует нагреть в сушильном шкафу до температуры примерно 55 °С для того, чтобы избежать расщепления жира при переносе образцов.

Для метода холодного ввода в колонку (OCI): Взвешивают на аналитических весах (5.1) примерно 0,1 г жира, выделенного из шоколада, (полученного по 7.3.2) в мерную колбу вместимостью 100 см^3 (5.9) и разбавляют до метки изооктаном (4.5) (ρ = 1 мг/ см^3). Переносят 1 см^3 этого раствора в пробирку и добавляют 1 см^3 раствора α-холестана (4.4) (в полученном растворе ρ = 0,5 мг/ см^3). Инжектируют 0,5 мм^3 окончательного испытательного раствора в газовый хроматограф методом холодного ввода в колонку.

Для метода ввода с делением потока: Взвешивают на аналитических весах (5.1) примерно 0,1 г жира, выделенного из шоколада, (полученного по 7.3.2) в мерную колбу вместимостью 100 см^3 (5.9) и разбавляют до метки изооктаном (4.5) (ρ = 5 мг/ см^3). Переносят 1 см^3 этого раствора в пробирку и добавляют 1 см^3 раствора α-холестана (4.4) (в полученном растворе ρ = 2,5 мг/ см^3). Инжектируют 1 мм^3 окончательного испытательного раствора в газовый хроматограф методом ввода с делением потока.

Можно использовать альтернативные растворители жира, навески образцов и инжекторы, при условии, что применяемая система обнаружения дает линейную характеристику и соответствует критериям пригодности системы (10.2).

8.5 Идентификация

Идентификацию 1-пальмитоил-2-стеароил-3-бутироилглицерида (PSB) и α-холестана проводят путем сравнения времени удерживания этих соединений с временем удерживания в стандартных образцах. Идентификацию пяти основных фракций ТАГ: 1,3- дипальмитоил-2-олеоилглицерида (POP), 1-пальмитоил-2-олеоил-3-стеароилглицерида (POS), 1-пальмитоил-2,3-диолеоилглицерида (POO), 1,3-дистеароил-2-олеоилглицерида (SOS) и 1-стеароил-2,3-диолеоилглицерида (SOO) проводят путем сравнения их времен удерживания при анализе испытательного образца и IRMM-801 (8.2).

ТАГ выходят в порядке увеличения атомов углерода и увеличения ненасыщенности (числа двойных связей) для одного и того же числа атомов углерода. Порядок элюирования триацилглицеридов IRMM-801 (8.2) приведен на рисунке В.1 (приложение В). Порядок элюирования триацилглицеридов молочного жира средней чистоты (8.3) приведен на рисунке В.2.

9 Обработка результатов

9.1 Количественное определение PSB и молочного жира в жире, выделенном из шоколада, и шоколаде

9.1.1.Определение коэффициента чувствительности для PSB

Определяют коэффициент чувствительности для PSB путем инжекции пяти калибровочных растворов (8.1), используя условия эксперимента, идентичные условиям при анализе образца. Для каждого калибровочного раствора *i* вычисляют коэффициент чувствительности для PSB, $F_{PSB;i}$, по формуле:

$$F_{PSB;i} = \frac{\rho_{PSB;i} \times A_{\text{cholestane};i}}{\rho_{\text{cholestane};i} \times A_{PSB;i}} \qquad (2)$$

где $A_{PSB;I}$ — площадь лика PSB в калибровочном растворе *i* (8.1);

$A_{\text{cholestane};i}$ — площадь пика внутреннего стандарта α-холестана в калибровочном растворе *i* (8.1);

$\rho_{PSB;i}$ — концентрация PSB в калибровочном растворе *i* (8.1), мг/ см^3;

$\rho_{cholestane;i}$ — концентрация внутреннего стандарта α-холестана в калибровочном растворе *i* (8.1), мг/ см^3;

Вычисляют средний коэффициент чувствительности для PSB, $\overline{F}_{PSB}$ полученный на основе пяти калибровочных растворов и используют его для дальнейших расчетов.

9.1.2 Количественное определение PSB в жире, выделенном из шоколада

Массовая доля PSB в жире, выделенном из образца шоколада, $w_{PSB;choc\ fat}$, выраженная в процентах, определяется по формуле:

$$w_{PSB;choc\ fat} = \frac{A_{PSB} \times \rho_{cholestane} \times \overline{F}_{PSB} \times 100}{A_{cholestane} \times \rho_{sample}} \quad (3)$$

где A_{PSB} — площадь пика PSB в анализируемом образце (8.4);

$A_{cholestane}$ — площадь пика внутреннего стандарта α-холестана в анализируемом образце (8.4);

$\overline{F}_{PSB}$ — средний фактор отклика для PSB (9.1.1);

$\rho_{cholestane}$ — концентрация внутреннего стандарта α-холестана в анализируемом образце (8.4), мг/ см^3;

ρ_{sample} — концентрация анализируемого образца (8.4), мг/ см^3;

Вычисления проводят с точностью до второго знака после запятой.

9.1.3 Количественное определение молочного жира в жире, выделенном из шоколада

Массовая доля молочного жира в жире, выделенном из шоколада, $w_{MF;choc\ fat}$, выраженная в процентах, определяется по формуле:

$$w_{MF;\ choc\ fat} = 0{,}19 + 44{,}04 \times w_{PSB,\ choc\ fat}, \quad (4)$$

где $w_{PSB,\ choc\ fat}$ — массовая доля PSB в жире, выделенном из шоколада, % [см. формулу (3)].

Примечание — Калибровочная функция была установлена на основе использования данных из широко исследованных баз данных, содержащих информацию по профилю триацилглицеридов для более 900 смесей, приготовленных весовым методом: (какао-масло — молочный жир), (какао-масло — эквиваленты какао-масла — молочный жир) с известным содержанием молочного жира, путем моделирования состава действительных жиров (см. ссылку [8]).

Вычисления проводят с точностью до второго знака после запятой.

9.1.4 Количественное определение молочного жира в шоколаде

Массовая доля молочного жира в шоколаде, $w_{MF;choc}$, выраженная в процентах, определяется по формуле:

$$w_{MF;choc} = \frac{W_{fat;\ choc} \times W_{MF;\ choc\ fat}}{100} \quad (5)$$

где $w_{fat;\ choc}$ — массовая доля общего жира в шоколаде, % [см. формулу (1)];

$w_{MF;\ choc\ fat}$ — массовая доля молочного жира в жире, выделенном из шоколада, % [см. формулу (4)].

9.2 Обнаружение ЭКМ в жире, выделенном из шоколада

9.2.1 Определение коэффициента чувствительности для POP, POS, SOS

Определяют коэффициент чувствительности детектора F_i для каждого триацилглицерида i, т. е. POP, POS и SOS соответственно, в IRMM-801, путем инжекции раствора IRMM-801 (8.2) с использованием условий эксперимента, идентичных условиям, применяемым при анализе образца. Вычисляют F_i по формуле:

$$P_{i;\ ref} = \frac{A_{i;\ ref}}{\sum A_{all\ TAGs;\ ref}} \times 100, \quad (6)$$

$$F_i = \frac{W_{i;\ ref}}{P_{i;\ ref}}, \quad (7)$$

где $A_{i;\ ref}$ — площадь пика каждого ТАГ i, т. е. POP, POS и SOS соответственно, в IRMM-801 (8.2);

$\Sigma A_{all\ TAGs;\ ref}$ — сумма площадей пиков, отнесенных ко всем ТАГ в IRMM-801 (8.2);

$P_{i.\ ref}$ — процентная доля каждого ТАГ i, т. е. POP, POS и SOS соответственно, в IRMM-801 (8.2) [см. формулу (6)];

$w_{i,\ ref}$ — массовая доля каждого ТАГ i, т. е. POP, POS и SOS соответственно, в IRMM-801 (8.2), %, как дано в сертификате (POP = 16,00 %, POS = 39,40 %, SOS = 27,90 %) (см. ссылку [6]).

Вычисления проводят с точностью до второго знака после запятой.

9.2.2 Вычисление массовых долей POP, POS и SOS в жире, выделенном из шоколада. Вычисляют по формуле:

$$W_{i;total} \triangleq \frac{F_i A_i}{\sum A_{\text{all TAGs}}} \times 100, \tag{8}$$

где A_i — площадь пика, соответствующая каждому ТАГ i, т.е. POP, POS и SOS соответственно, в анализируемом образце (8.4);

$\Sigma A_{\text{all TAGs}}$ — сумма площадей пиков, отнесенных ко всем ТАГ в анализируемом образце (8.4);

F_i — коэффициент чувствительности для ТАГ i, т.е. POP, POS и SOS соответственно [см. формулу (7)].

Вычисления проводят с точностью до второго знака после запятой.

9.2.3 Поправка для вклада молочного жира

Вычисляют вклад массовой доли каждого ТАГ i, т. е. POP, POS и SOS соответственно, характерного для молочного жира, $w_{i;\ MF}$ по формуле:

$$W_{i;MF} \triangleq \frac{W_{MF;\ choc} \times \varpi_{i;refMF}}{100}, \tag{9}$$

где $\varpi_{i;refMF}$ — средняя массовая доля каждого триацилглицерида *i* в молочном жире, т. е. POP = 3,99 %, POS = 2,19 %, SOS = 0,45 % (значения получены из базы данных (см. ссылку [9]), %;

$w_{MF,\ choc}$ — массовая доля молочного жира в исследуемом образце [см. формулу (4)], %;

Вычитают полученные массовые доли трех триацилглицеридов, присутствующих также в молочном жире [уравнение (9)] из массовых долей трех триацилглицеридов, полученных для анализируемого образца [уравнение (8)].

$$w_{i,\ corr} = w_{i;total} - w_{i;MF}, \tag{10}$$

Нормализуют полученные процентные массовые доли трех триацилглицеридов [формула (10)] до 100 % [формула (11)]:

$$w_{POP,\ corr} + w_{POS:\ corr} + w_{SOS;\ corr} = 100, \tag{11}$$

Вычисления проводят с точностью до второго знака после запятой.

9.2.4 Решение, является ли жир, выделенный из шоколада, чистым какао-маслом

Присутствие эквивалентов какао-масла в какао-масле определяют методом анализа линейной регрессии, применяемого для относительных массовых долей трех составляющих триацилглицеридов, т. е. POP, POS и SOS. Изменчивость состава триацилглицеридов в какао-масле определяют по (12) с использованием нормированных массовых долей триацилглицеридов: POP, POS и SOS, т. е. $w_{POP} + w_{POS} + w_{SOS} = 100$ (см. ссылки [10], [11]).

$$w_{POP} = 43{,}73 - 0{,}73 w_{SOS}, \tag{12}$$

($s_{residual} = 0{,}125$),

где $s_{residual}$ является остаточным стандартным отклонением.

Суть метода в том, что для чистых образцов какао-масла w_{POS} практически остается постоянной для широкого диапазона w_{POP} и w_{SOS}, что приводит к линейной зависимости [«КМ-линии», представленной формулой (12)] между w_{POP} и w_{SOS}. Эквиваленты какао-масла и другие жировые примеси обуславливают отклонение результатов анализа ТАГ от «КМ-линии» в той степени, что их значение w_{POS} отличается от значения w_{POS} какао-масла. Формула (12) была получена с использованием стандартизованной базы данных о профиле ТАГ для 74 оцененных истинных образцов какао-масла (см. ссылку [10]). IRMM-801 (4.1) был использован, чтобы стандартизировать применяемую аналитическую методологию для определения профиля ТАГ для образцов какао-масла. Для 99 % всех анализов чистое какао-масло соответствует уравнению:

$$w_{POP} < 44{,}03 - 0{,}73 w_{SOS}, \tag{13}$$

Более высокое значение w_{POS}, определенное по формуле (13), означает, что образец не является чистым маслом какао. В случае молочного шоколада используются процентные массовые доли ТАГ с

поправкой на процентные массовые доли POP, POS и SOS, присутствующих также в молочном жире [по формуле (10)]. После нормализации до 100 % массовых долей ТАГ, полученных с поправкой на молочный жир [формула (11)], можно применять такие же правила, как для какао-масла или темного шоколада [формула (13)], чтобы обнаружить, присутствуют ли какие-либо эквиваленты какао-масла в жире молочного шоколада.

$$w_{POP;\,corr} < 44{,}03 - 0{,}73 w_{SOS;\,corr}, \tag{14}$$

Более высокое значение $w_{POS;\,corr}$, определенное по формуле (14), означает, что образец не является чистым какао-маслом.

Примечание — Преимущество данного детально разработанного метода состоит в том, что при использовании IRMM-801 (4.1) для калибровки отдельные испытательные лаборатории могут использовать для верификации чистоты какао-масла математическое выражение, не сталкиваясь с проблемой создания «КМ-линии» как предпосылки. Калибровка посредством IRMM-801 (4.1) автоматически связывает результаты, полученные в лаборатории, с базой данных ТАГ для какао-масла и разработанным правилом для принятия решения [по формуле (13)].

9.3 Количественное определение ЭКМ в жире, выделенном из шоколада, и шоколаде

9.3.1 Определение коэффициентов чувствительности для POP, POS, POO, SOS и SOO

Определяют коэффициенты чувствительности детектора F_j для каждого ТАГ$_j$, т. е. POP, POS, POO, SOS и SOO, в IRMM-801, путем ввода раствора IRMM-801 (8.2), используя условия эксперимента, идентичные условиям для анализируемого образца. Вычисляют F_j по формуле:

$$P_{j;ref} = \frac{A_{j,\,ref}}{\sum A_{j;\,ref}} \times 100, \tag{15}$$

$$F_j = \frac{w_{j;\,ref}}{P_{j;\,ref}}, \tag{16}$$

где $A_{j;ref}$ — площадь пика каждого ТАГ j, т. е. POP, POS, POO, SOS и SOO соответственно, в IRMM-801 (8.2);

$\Sigma A_{j;ref}$ — сумма площадей пиков, отнесенных ко всем ТАГ j, т. е. POP, POS, POO, SOS и SOO, в IRMM-801 (8.2);

$P_{j;ref}$ — массовая доля каждого ТАГ j, т. е. POP, POS, POO, SOS и SOO, в IRMM-801 (8.2), %;

$w_{j;ref}$ — массовая доля каждого ТАГ j, т. е. POP, POS, POO, SOS и SOO, в IRMM-801 (8.2), как дано в сертификате (POP = 18,14 %, POS = 44,68 %, POO = 2,26 %, SOS = 31,63 % и SOS = 3,29 %, т. е. нормирование до 100 %) (см. ссылку [6]).

Вычисления проводят с точностью до второго знака после запятой.

9.3.2 Вычисление массовых долей POP, POS, POO, SOS и SOO в жире, выделенном из шоколада

Вычисляют массовую долю каждого ТАГ j, т. е. POP, POS, POO, SOS и SOO соответственно, в анализируемом образце, $w_{j;choc\ fat}$, по формуле:

$$w_{j;\,choc\ fat} = \frac{F_j A_j}{\sum F_j A_j} \times 100, \tag{17}$$

где F_j — коэффициент чувствительности для каждого ТАГ j, т. е. POP, POS, POO, SOS и SOO соответственно [см. уравнение (16)];

A_j — площадь пика, соответствующая каждому ТАГ j, т. е. POP, POS, POO, SOS и SOO соответственно, в анализируемом образце (8.4).

Вычисления проводят с точностью до второго знака после запятой.

9.3.3 Количественное определение ЭКМ в жире, выделенном из шоколада

Массовую долю эквивалентов какао-масла в жире, выделенном из шоколада, $w_{CBE;\,choc\ fat}$, выраженную в процентах, вычисляют по формуле (18), которое было выведено методом анализа регрессии частных наименьших квадратов для относительных долей пяти основных ТАГ, т. е. $w_{POP;\,choc\ fat}$, $w_{POS;\,choc\ fat}$, $w_{POO;\,choc\ fat}$, $w_{SOS;\,choc\ fat}$ и $w_{SOO.\,choc\ fat}$, определенных по формуле (17), и для содержания молочного жира в молочном шоколаде, т.е $w_{MF,\,choc\ fat}$, определенного по формуле (4).

$$w_{CBE,\,choc\ fat} = -4{,}24 - 0{,}23\, w_{MF;\,choc\ fat} + 1{,}52\, w_{POP,\,choc\ fat} - 1{,}47\, w_{POS;\,choc\ fat} +$$

$$+ 1{,}09\ w_{POO;\ choc\ fat} + 1{,}29\ w_{SOS,\ choc\ fat} + 0{,}26\ w_{SOO;\ choc\ fat}, \quad (18)$$

Вычисления проводят с точностью до первого знака после запятой.

Примечание — Модель количественного определения была создана на основе использования данных из широко исследованных баз данных, содержащих информацию по профилю ТАГ для более 700 смесей, приготовленных весовым методом КМ — ЭКМ — МЖ, изменяющихся по типу и количеству КМ, ЭКМ и МЖ (см. ссылку [8]).

9.3.4 Количественное определение ЭКМ в шоколаде

Массовую долю эквивалентов какао-масла в шоколаде вычисляют по формуле (19):

$$w_{CBE;\ choc} = \frac{w_{fat;\ choc} \times w_{CBE;\ chocfat}}{100}, \quad (19)$$

где $w_{fat;\ choc}$ — массовая доля общего жира в шоколаде, % [по формуле (1)];

$w_{CBE;\ choc\ fat}$ — массовая доля эквивалентов какао-масла в жире, выделенном из шоколада, % [по формуле (18)].

Вычисления проводят с точностью до первого знака после запятой.

10 Требования к проведению испытаний

10.1 Общие положения

Проведение хроматографического анализа зависит среди других факторов, от оборудования, типа, срока службы и поставщика колонки, средств инжектирования раствора, размера образца и от детектора. Можно использовать колонки различной длины и различных марок, и инжекционные объемы можно варьировать, если система соответствует требованиям 10.2.

10.2 Пригодность хроматографической системы

10.2.1 Разрешение

- Хроматографическая система должна обеспечивать разделение критических пар POS/POO и SOS/SOO с хроматографическим разрешением не менее 1,0. Это требование может быть проверено использованием IRMM-801 (8.2), как показано на рисунке В.1.

- Хроматографическая система должна обеспечивать отделение PSB от соседних пиков в пределах CN38 группы. Это требование может быть проверено использованием образца чистого молочного жира (8.3), как показано на рисунках В.2 и В.3.

- Хроматографическая система должна обеспечивать полное отделение пика внутреннего стандарта α-холестана от выходящих рядом на хроматограмме пиков. Это требование может быть проверено использованием образца молочного жира (8.3) с α-холестаном в качестве внутреннего стандарта, как показано на рисунке В.4.

В противном случае хроматографические условия (например, размер образца, температура колонки, поток газа-носителя и др.) оптимизируют для наибольшего разрешения.

10.2.2 Определение коэффициентов чувствительности детектора

- Для проверки допущения, что факторы отклика пламенно-ионизационного детектора для ТАГ не отличаются от единицы более чем на 20 %, следует провести анализ IRMM-801 (8.2), применяя стандартные хроматографические условия. Опыт показал, что для правильно функционирующей хроматографической системы факторы отклика для пяти триацилглицеридов (POP, POS, POO, SOS, SOO) находятся в диапазоне от 0,80 до 1,20. Для проверки стабильности системы анализ следует повторить несколько раз (не менее трех параллельных анализов). Значения факторов отклика детектора, полученные на отдельных калибровочных растворах, не должны отличаться от среднего значения более чем на 5 %.

- Для проверки стабильности системы разделения должна быть построена калибровочная кривая для PSB с α-холестаном в качестве внутреннего стандарта (не менее двух параллельных инжекций каждого калибровочного раствора). Вычисляют средний фактор отклика детектора для PSB. Значения факторов отклика, полученные на отдельных калибровочных растворах, не должны отличаться от среднего значения более чем на 5 %.

В противном случае хроматографические условия оптимизируют, например, размер образца, температура колонки, поток газа-носителя и др.

11 Прецизионность

11.1 Межлабораторные испытания

Детали совместного испытания данного метода приведены в таблице А.1. Значения, полученные в данном межлабораторном испытании, не могут применяться к диапазонам концентраций и матрицам, кроме тех, которые установлены здесь.

11.2 Повторяемость

Абсолютная разность между результатами двух независимых отдельных испытаний, полученными с использованием одного и того же метода на идентичном материале в одной и той же лаборатории одним и тем же оператором, использующим то же самое оборудование, в короткий интервал времени, не должна превышать значение для молочного шоколада 0,3 г/ 100 г более чем в 5 % случаев. (при доверительной вероятности P = 0,95).

Значения для предела повторяемости, r, полученные при валидации, приведены в таблице А.3.

11.3 Воспроизводимость

Абсолютная разность между результатами двух отдельных испытаний, полученных с использованием одного и того же метода на идентичном материале в различных лабораториях различными операторами, использующими различное оборудование, не должна превышать значение для молочного шоколада 0,6 г/ 100 г более чем в 5 % случаев. (при доверительной вероятности P = 0,95).

Значения для предела воспроизводимости R, полученные при валидации, приведены в таблице А.3.

12 Протокол испытания

Протокол испытания должен содержать как минимум следующую информацию:

a) всю информацию, необходимую для полной идентификации образца;

b) используемый метод отбора проб, если известно;

c) используемый метод испытания со ссылкой на этот стандарт;

d) все рабочие детали, не установленные в этом стандарте или рассматриваемые как необязательные, вместе с деталями всех моментов, которые могли повлиять на результат(ы) испытания;

e) полученные результаты испытания и, если была определена повторяемость, последний цитируемый результат, который был получен.

Приложение А
(справочное)

Результаты межлабораторных испытаний

Метод был валидирован в 2006 в Европейском межлабораторном испытании с 12 участниками (см. [7]). Детали метода, применяемые отдельными лабораториями, приведены в таблице А.1. Шесть специально изготовленных образцов шоколада и семь образцов шоколадного жира, различающихся по составу и количеству эквивалентов какао-масла, были проанализированы в данном исследовании (таблица А.2). Данные прецизионности приведены в таблице А.3.

Таблица А.1 — Условия хроматографического разделения, применяемые для анализа ТАГ в жирах, выделенных из шоколада

Код лаборатории	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Газ-носитель												
тип	He	He	He	H_2	H_2	H_2	H_2	He	H_2	H_2	H_2	H_2
постоянное давление, кПа	100	180	-	-	-	-	150	135	130	140	-	-
постоянный поток, $см^3$/мин	-	-	2,2	2	2	1,5	-	-	-	-	3,5	2
Характеристики колонки												
стационарная фаза	Ulti-metal	CB-TAP	CB-TAP	CB-TAP	CB-TAP	CB-TAP	CB-TAP	CB-TAP	RT x65 TG	CB-TAP	CB-TAP	CB-TAP
длина, м	25	25	25	25	25	25	25	25	30	25	25	25
внутренний диаметр, мм	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
толщина пленки, мкм	0,05	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Температурный режим												
термостат колонок												
начальная температура, °С	200	200	100	200	200	200	100	200	200	200	100	200
время удерживания, мин	2	1	0,5	1	0	1	2	1	2	1	2	1
скорость нагрева 1,°С/мин	20	14	40	14	20	24	30	14	15	30	30	14
температура, °С	320	270	280	270	270	270	270	270	360	270	270	270
время удерживания, мин	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0
скорость нагрева 2, °С/мин	1	2,5	2,5	2,5	5	2,5	3	2	1	2,5	3,5	2,5
температура, °С	360	340	340	340	340	340	340	340	370	355	340	340
время удерживания, мин	10	30	17	10	15	13	10	30	0	2	7	10
скорость нагрева 3, °С/мин	-	10	-	-	25	-	-	-	-	-	-	-
конечная температура, °С	-	350	-	-	200	-	-	-	-	-	-	-
время удерживания, мин	-	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
температура инжектора, °С	65 до 370	360	температура в термостате	365	370	350		340	380	140 до 340	температура в термостате	360
температура детектора, °С	370	360	360	365	360	370	350	360	380	350	360	360
Режим инжекции												
ручной (М)/автоматический (А)	М	А	-	А	А	А	М	А	А	А	А	А

Код лаборатории	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
деление потока/на колонку/PTV	PTV	деление	OCI	деление	деление	деление	OCI	деление	деление	PTV	OCI	деление
если деление [отношение деления]	-	1:20	-	1:10	1:10	1:10	-	1:7	-	-	-	1:10

Таблица А.2 — Состав образцов, применяемых в межлабораторных испытаниях для проверки данного метода

Образец	Образцы шоколада [a]	Тип эквивалентов какао-масла (ЭКМ)	Содержание какао-масла (КМ), %	Содержание эквивалентов какао-масла, %	Содержание молочного жира (МЖ), %
1	Молочный шоколад, FCMP, нет ЭКМ	-	29,67	0,00	неизвестно
2	Молочный шоколад, FCMP, низкий уровень добавления ЭКМ	50 % PMF + 50 % SOS высокой жирности	29,22	0,45	неизвестно
3	Молочный шоколад, SKMP + MF, нет ЭКМ	-	25,70	0,00	неизвестно
4	Молочный шоколад, SKMP + MF, низкий уровень добавления ЭКМ	50 % PMF + 50 % SOS высокой жирности	23,67	2,03	неизвестно
5	Молочный шоколад, крошка + MF + FCMP + SKMP + WP, установленный законом уровень добавления ЭКМ	50 % PMF + 50 % SOS высокой жирности	14,60	5,11	неизвестно
6	Белый шоколад, установленный законом уровень добавления ЭКМ	50 % PMF + 50 % SOS высокой жирности	23,50	3,95	неизвестно
7	Западноафриканское КМ, нет ЭКМ	-	100,00	0,00	0,00
8	Западноафриканское КМ + смесь 310 образцов МЖ, нет ЭКМ	-	85,01	0,00	14,99
9	Западноафриканское КМ + смесь 310 образцов МЖ, низкий уровень добавления ЭКМ	70 % PMF + 30 % SOS высокой жирности	83,03	2,00	14,98
10	Западноафриканское КМ + смесь 310 образцов МЖ, установленный законом уровень добавления ЭКМ	70 % PMF + 30 % SOS высокой жирности	68,95	16,03	15,02
11	Западноафриканское КМ + смесь 310 образцов МЖ, установленный законом уровень добавления ЭКМ	70 % PMF + 30 % SOS высокой жирности	64,99	19,98	15,04
12	Западноафриканское КМ + смесь 310 образцов МЖ, установленный законом уровень добавления ЭКМ	100 % мягкого PMF	64,94	20,08	14,99
13	Западноафриканское КМ + смесь 310 образцов МЖ, установленный законом уровень добавления ЭКМ	70 % PMF + 30 % SOS высокой жирности	56,91	28,04	15,05

[a] Образцы были приготовлены в испытательных шоколадотделочных машинах массой 40 кг. FCMP — сухое цельное молоко; SKMP — сухое обезжиренное молоко; WP — сухая сыворотка; PMF — промежуточная фракция пальмового масла, MF — молочный жир

Таблица А.3 — Данные прецизионности для образцов шоколада (образцы 5 и 6) и для образцов жира, выделенного из шоколада (образцы с 10 до 13)

Образец	5	6	10	11	12	13
количество лабораторий	12	12	12	12	12	12
количество выбросов	0	1	0	0	0	0
количество допущенных лабораторий	12	11	12	12	12	12
Среднее значение, г ЭКМ/ 100 г шоколада	5,20	4,08	4,62	5,81	5,35	8,23
Истинное значение, г ЭКМ/ 100 г шоколада	5,11	3,95	4,81	5,99	6,02	8,41
Предел повторяемости, r [$r = 2,8 \cdot s_r$], г/100 г	0,276	0,150	0,261	0,188	0,186	0,231
Стандартное отклонение повторяемости, s_r, г/100 г	0,098	0,054	0,093	0,067	0,067	0,082
Коэффициент вариации повторяемости, CV (r), %	1,893	1,315	2,020	1,153	1,244	1,001
Предел воспроизводимости, R [$R = 2,8 \cdot s_R$], г/100 г	0,590	0,534	0,497	0,463	0,527	0,518
Стандартное отклонение воспроизводимости, s_R, г/100 г	0,211	0,191	0,177	0,165	0,188	0,185
Коэффициент вариации воспроизводимости, CV (R), %	4,053	4,678	3,843	2,847	3,518	2,248
Примечание — Образцы шоколада с 1 по 4 и образцы жира, выделенного из шоколада, с 7 по 9, представленные образцами с низким добавлением ЭКМ, применяемые для проверки метода обнаружения. Эффективность метода обнаружения (процент правильно классифицированных образцов) была 100 %.						

Приложение В
(справочное)

Примеры хроматограмм

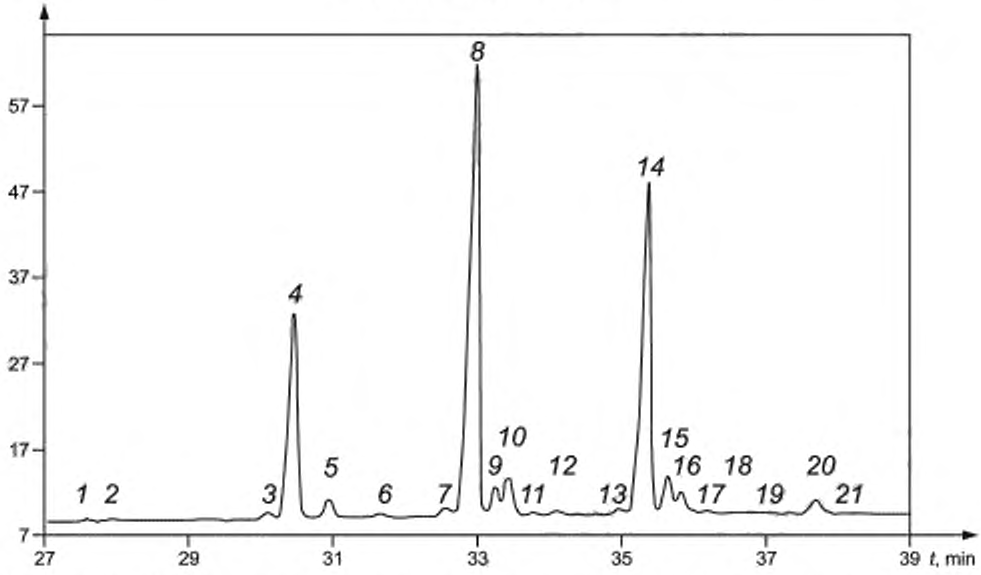

Рисунок В.1 — Профиль триацилглицеридов сертифицированного стандартного материала какао-масла

Идентификация пиков: 1 — PPP; 2 — MOP; 3 — PPS; 4 — POP; 5 — PLP; 6 — не идентифицирован; 7 — PSS; 8 — POS; 9 — POO; 10 — PLS; 11 — PLO; 12 — не идентифицирован; 13 — SSS; 14 — SOS; 15 — SOO; 16 — SLS + OOO; 17 — SLO; 18 — не идентифицирован; 19 — не идентифицирован; 20 — SOA; 21 — AOO.

Экспериментальные условия

Газохроматографическая колонка: Кварцевая капиллярная колонка 25 м × 0,25 мм с покрытием Chrompack TAP 0,1 мкм.

Температура термостата колонки: Удерживание при 100 °С не менее 2 мин;
30 °С/мин до 270 °С, удерживание в течение 1 мин;
2,5 °С/мин до 340 °С, удерживание в течение 7 мин;
Ввод пробы: холодный в колонку.
Детектор (ПИД): 360 °С.
Газ-носитель: H_2 с постоянной скоростью 3,5 $см^3$/мин.

Обозначение
t — время удерживания

PPP	- трипалмитин		не идентифицирован
MOP	- 1-миристоил-2-олеоил-3-палмитоил-глицерид	SSS	- тристеарин
PPS	- 1,2-дипалмитоил-3стеароилглицерид	SOS	- 1,3-дистеароил-2-олеоилглицерид
POP	- 1,3-дипалмитоил-2-олеоилглицерид	SOO	-1-стеароил-2,3-диолеоилглицерид
PLP	- 1,3-дипалмитоил-2-линолеоил-глицерид	SLS	-1,3-дистеароил-2-линолеоил-глицерид
	не идентифицирован	OOO	- триолеин
PSS	- 1-палмитоил-2,3-дистеароилглицерид	SLO	- 1-стеароил-2-линолеил-3-олеоилглицерид
POS	- 1-пальмитоил-2-олеоил-3-стеароил-глицерид		не идентифицирован
POO	- 1-палмитоил-2,3-диолеоилглицерид		не идентифицирован
PLS	- 1-палмитоил-2-линолеоил-3-стеароилглицерид	SOA	- 1-стеароил-2-олеоил-3-арахидоил-глицерид
PLO	- 1-палмитоил-2-линолеоил-3-олеоил-глицерид	AOO	- 1-арахидоил-2,3-диолеилглицерид

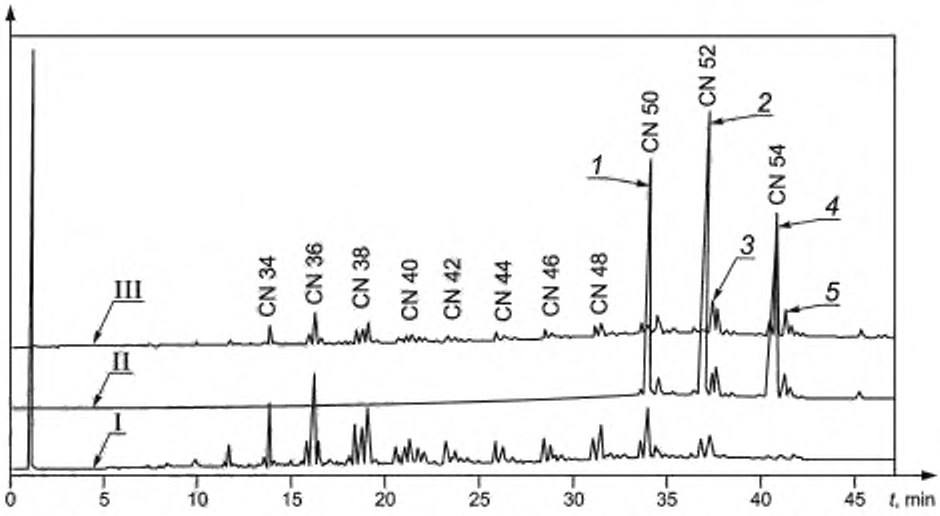

Рисунок В.2 — Профиль триацилглицеридов для чистого молочного жира, чистого какао-масла и их смеси

Идентификация пиков: 1 — POP; 2 — POS; 3 — POO; 4 — SOS; 5 — SOO; I, II, III, CN 34 до CN 54

Обозначение
t — время удерживания

POP	- 1,3-дипалмитоил-2-олеоилглицерид
POS	- 1-пальмитоил-2-олеоил-3-стеароил-глицерид
POO	- 1-палмитоил-2,3-диолеоилглицерид
SOS	- 1,3-дистеароил-2-олеоилглицерид
SOO	-1-стеароил-2,3-диолеоилглицерид
I	массовая доля молочного жира 100 %
II	массовая доля какао-масла 100 %
III	массовая доля какао-масла 85 % + массовая доля молочного жира 15 %
CN 34 до CN 54	группы пиков соответственно числу атомов углерода

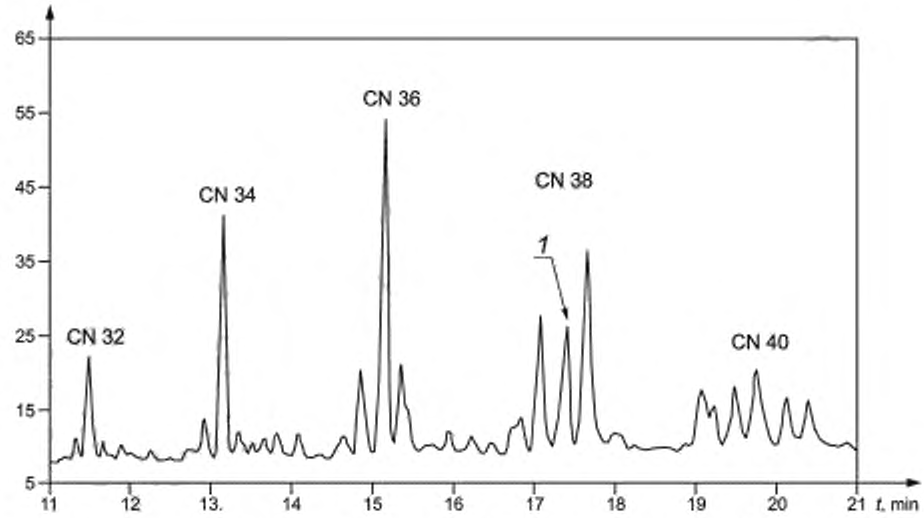

Рисунок В.3 — Профиль триацилглицеридов для чистого молочного жира: окно хроматограммы для той части, где элюируется PSB

Идентификация пиков: 1, PSB; CN 32 до CN 40
Обозначение
t — время удерживания

PSB - 1-палмитоил-2-стеароил-3-бутироилглицерид

CN 32 до CN 40 группы пиков соответственно числу атомов углерода

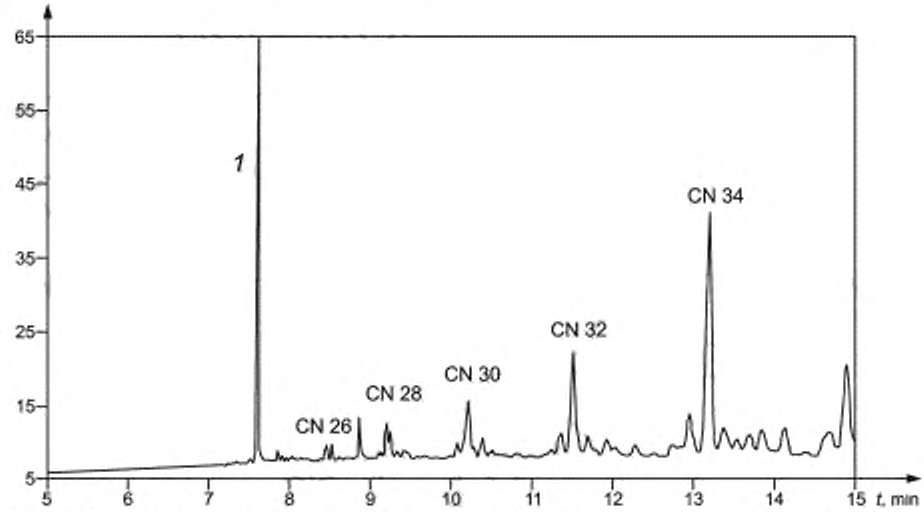

Рисунок В.4 — Профиль триацилглицеридов для чистого молочного жира с добавкой α-холестана: окно хроматограммы для той части, где элюируется α-холестан

Идентификация пиков: 1, α-холестан; CN 26 до CN 34
Обозначение
t — время удерживания

1 - α-холестан

CN 26 до CN 34 группы пиков соответственно числу атомов углерода

Приложение ДА
(справочное)

Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов межгосударственным стандартам

Таблица ДА.1

Обозначение и наименование международного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование межгосударственного стандарта
ISO 648:2008	—	*
ISO 1042:1998	—	*
ISO 5555:2001	—	*, 1)
ISO 8655-2:2002	—	*

*Соответствующий межгосударственный стандарт отсутствует. До его утверждения рекомендуется использовать перевод на русский язык данного международного стандарта. Перевод данного международного стандарта находится в Федеральном информационном фонде технических регламентов и стандартов.

1) *На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 5555—2010 «Животные и растительные жиры и масла. Отбор проб»*

Библиография

[1] ISO 1042 Laboratory glassware; One-mark volumetric flasks (Посуда лабораторная стеклянная. Мерные колбы с одной меткой)

[2] ISO 648 Laboratory glassware -- Single-volume pipettes (Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной меткой)

[3] ISO 8655-2 Piston-operated volumetric apparatus -- Part 2: Piston pipettes (Устройства мерные, приводимые в действие поршнем. Часть 2: Пипетки, приводимые в действие поршнем)

[4] ISO 5555 *Animal and vegetable fats and oils — Sampling (Жиры и масла животные и растительные. Отбор проб)*

[5] AOAC Official Method 963.15, *Fat in cacao products*

[6] KOEBER, R., BUCHGRABER, M., ULBERTH, F., BACAROLO, R-, BERNREUTHER, A., SCHIMMEL, H., ANKLAM, E. and PAUWELS, J. *The certification of the content of five triglycerides in cocoa butter,* European Commission, Geel, 2003. (Report EUR 20781 EN.) *(Сертификация содержания пяти триацилглицеридов в какао-масле)*

[7] BUCHGRABER, M., ANDRONI, S. *Validation of an analytical approach to determine cocoa butter equivalents in milk chocolate — report on the final collaborative trial.* European Commission, Geel, 2006, 162 p. (Report EUR 22553 EN.) Available (2009-03-20) at: gost.e-ecolog.ru EUR22553EN_CT_MC.pdf (*Валидация аналитического метода определения эквивалентов какао-масла в молочном шоколаде — отчет итогового межлабораторного испытания*)

[8] BUCHGRABER, M., ANDRONI, S., ANKLAM, E. *Quantification of milk fat in chocolate fats by triacylgliceride analysis using gas-liquid chromatography. J. Agric. Food Chem. 2007, 55, pp. 3275—3283 (Количественное определение молочного жира в жирах шоколада посредством анализа триацилглицеридов методом газожидкостной хроматографии)*

[9] BUCHGRABER, M., ANDRONI, S., ANKLAM, E. Determination of cocoa butter equivalents in milk chocolate by *triacylgliceride profiling. J. Agric. Food Chem. 2007, 55, pp. 3284—3291 (Определение эквивалентов какао-масла в молочном шоколаде с использованием триацилглицеридного профиля)*

[10] BUCHGRABER M., SENALDI, C., ULBERTH, F., ANKLAM, E. *Detection and quantification of cocoa butter equivalents in cocoa butter and plain chocolate by gas liquid chromatography of triacylglicerides, J. AOAC Int. 2004, 87, pp. 1153-1163 (Определение наличия и количественное определение эквивалентов какао-масла в какао-масле и шоколаде путем разделения триацилглицеридов газожидкостной хроматографией)*

[11] BUCHGRABER M., ULBERTH, F., ANKLAM, E. *Method validation for detection and quantification of cocoa butter equivalents in cocoa butter and plain chocolate. J. AOAC Internat, 87, 2004, pp. 1164—1172 (Валидация метода определения наличия и количественного определения эквивалентов какао-масла в какао-масле и шоколаде)*

УДК 665.355.97(083.74)(476) МКС 67.190; 67.200.10 IDT

Ключевые слова: жиры растительные, жиры животные, масла растительные, масла животные, эквиваленты какао-масла, молочный шоколад, метод газожидкостной хроматографии высокого разрешения

Редактор Т.С. *Ложникова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *В.И. Варенцова*
Компьютерная верстка *Е.О. Асташина*

Сдано в набор 03.06.2016. Подписано в печать 22.06.2016. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,79. Уч.-изд. л. 2,50. Тираж 47 экз. Зак. 1530.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Издано и отпечатано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4
www.gostinfo.ru info@gostinfo.ru

gost.e-ecolog.ru