МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 34456— 2018

МОЛОКО И ПРОДУКЦИЯ МОЛОЧНАЯ

Определение состава стеринов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2018

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены в 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 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным автономным научным учреждением «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности» (ФГАНУ «ВНИМИ»)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 30 августа 2018 г. № 111-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
Россия	RU	Росстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 4 сентября 2018 г. № 561-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 34456—2018 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2019 г.

5 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 (*gost.e-ecolog.ru

© Стандартинформ, оформление, 2018

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

МОЛОКО И ПРОДУКЦИЯ МОЛОЧНАЯ

Определение состава стеринов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Milk and dairy products. Determination of sterols by high-performance liquid chromatography

Дата введения — 2019—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на молоко и молочную продукцию и устанавливает метод определения состава стеринов с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 12.1.004—91 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.005—88 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

ГОСТ 12.1.007—76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.019—79 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты*

ГОСТ 12.4.009—83 Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание

ГОСТ 12.4.021—75 Система стандартов безопасности труда. Системы вентиляционные. Общие требования

ГОСТ OIML R 76-1—2011 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

ГОСТ ISO 707—2013 Молоко и молочные продукты. Руководство по отбору проб**

ГОСТ 1770—74 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ ИСО 5725-1—2003 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения ***

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 13928—84 Молоко и сливки заготовляемые. Правила приемки, методы отбора проб и подготовка их к анализу

ГОСТ 24363—80 Реактивы. Калия гидроокись. Технические условия

---

* В Российской Федерации действует ГОСТ Р 12.1.019—2009 «Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты».

** В Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 707—2010 «Молоко и молочные продукты. Руководство по отбору проб».

*** В Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 5725-1—2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения».

Издание официальное

ГОСТ 25336—82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 26809.1—2014 Молоко и молочная продукция. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу. Часть 1. Молоко, молочные, молочные составные и молокосодержащие продукты

ГОСТ 26809.2—2014 Молоко и молочная продукция. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу. Часть 2. Масло из коровьего молока, спреды, сыры и сырные продукты, плавленые сыры и плавленые сырные продукты

ГОСТ 27752—88 Часы электронно-механические кварцевые настольные, настенные и часы-будильники. Общие технические условия

ГОСТ 28498—90 Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний

ГОСТ 29227—91 (ИСО 835-1—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины с соответствующими определениями:

3.1 **стерины (стеролы):** Высокомолекулярные полициклические природные спирты, относящиеся к группе стероидов, в основе структуры которых лежит насыщенный тетрациклический углеводород стеран.

3.2 **фитостерины (фитостеролы, растительные стерины/стеролы):** Высокомолекулярные полициклические природные спирты, относящиеся к группе стероидов, в основе структуры которых лежит насыщенный тетрациклический углеводород стеран, естественным образом присутствующие только в растениях (β-ситостерин, брассикастерин, кампестерин, стигмастерин).

3.3 **абсолютное время удерживания:** Отрезок времени, проходящий с момента ввода вещества в колонку хроматографа до появления максимума пика вещества на хроматограмме.

4 Сущность метода

Метод основан на проведении реакции омыления жировой фракции посредством метанольного раствора гидроокиси калия с последующей экстракцией смесью диэтилового эфира и гексана, разделением методом обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии и сравнением полученных хроматограмм стеринов со временем удерживания стандартных веществ.

5 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда и реактивы

Хроматограф жидкостной, включающий следующие элементы:

- инжектор;
- термостат с программированием температуры, обеспечивающий нагрев колонки до температуры (30 ± 2) °С;
- колонку хроматографическую с фазой С18 и типоразмером 4,6 х 250 мм, 5 мкм;
- детектор спектрофотометрический;
- программное обеспечение для обработки данных.

Весы по ГОСТ OIML R 76-1 с пределами допускаемой абсолютной погрешности не более ± 1 мг.

Микрошприц вместимостью 0,020 $см^3$.

Термометр жидкостный (не ртутный) диапазоном измерения от 0 °С до 100 °С, ценой деления шкалы 1 °С по ГОСТ 28498.

Часы 2-го класса точности по ГОСТ 27752.

Баня водяная термостатируемая.

Испаритель ротационный, с водяной баней, обеспечивающей поддержание температуры от 30 °С до 100 °С с погрешностью ± 2 °С.

Колба мерная 1-100-2 по ГОСТ 1770.

Пипетки 1-1-1-1, 1-1-1-5 по ГОСТ 29227.

Цилиндры 1(3)-100-2, 1(3)-250-2 по ГОСТ 1770.

Воронка делительная ВД-1-250 ХС по ГОСТ 25336.

Колба Кн-1-250-29/32 ТС по ГОСТ 25336.

Стаканы В-1-150, В-1-250 ТС по ГОСТ 25336.

Холодильник ХШ-1-400-29/32 ХС по ГОСТ 25336.

Бумага лакмусовая голубая.

Ацетонитрил, х.ч. для хроматографии.

Калия гидроокись по ГОСТ 24363, х.ч., раствор в метаноле молярной концентрации 2,0 моль/дм^3.

н-гексан, х.ч. для хроматографии.

Метанол, х.ч.

Холестерин, содержание основного вещества не менее 95,0 %.

β-ситостерин, содержание основного вещества не менее 95,0 %.

Брассикастерин, содержанием основного вещества не менее 95,0 %.

Кампестерин, содержанием основного вещества не менее 96,0 %.

Стигмастерин, содержанием основного вещества не менее 95,0 %.

Эфир диэтиловый, х.ч.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Допускается применение других средств измерений, вспомогательного оборудования, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам и обеспечивающих необходимую точность измерения, а также реактивов и материалов по качеству не ниже вышеуказанных.

6 Отбор проб

Отбор и подготовка проб — по ГОСТ 13928, ГОСТ 26809.1, ГОСТ 26809.2, ГОСТ ISO 707.

7 Подготовка к проведению измерений

7.1 Приготовление растворов

7.1.1 Приготовление раствора калия гидроокиси в метаноле молярной концентрации 2,0 моль/дм^3

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают (11,200 ± 0,001) г калия гидроокиси, добавляют небольшое количество метанола и аккуратно перемешивают. Объем раствора доводят метанолом до метки.

Срок хранения раствора при комнатной температуре — не более 1 мес.

7.1.2 Приготовление раствора холестерина в метаноле

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают (0,005 ± 0,001) г холестерина, добавляют небольшое количество метанола и аккуратно перемешивают. Объем раствора доводят метанолом до метки.

Срок хранения раствора при комнатной температуре — не более 1 мес.

7.1.3 Приготовление раствора β-ситостерина

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают (0,005 ± 0,001) г β-ситостерина, добавляют небольшое количество метанола и аккуратно перемешивают. Объем раствора доводят метанолом до метки.

Срок хранения раствора при комнатной температуре — не более 1 мес.

7.1.4 Приготовление раствора брассикастерина

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают (0,005 ± 0,001) г брассикастерина, добавляют небольшое количество метанола и аккуратно перемешивают. Объем раствора доводят метанолом до метки.

Срок хранения раствора при комнатной температуре — не более 1 мес.

7.1.5 Приготовление раствора кампестерина

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают (0,005 ± 0,001) г кампестерина, добавляют небольшое количество метанола и аккуратно перемешивают. Объем раствора доводят метанолом до метки.

Срок хранения раствора при комнатной температуре — не более 1 мес.

7.1.6 Приготовление раствора стигмастерина

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают (0,005 ± 0,001) г стигмастерина, добавляют небольшое количество метанола и аккуратно перемешивают. Объем раствора доводят метанолом до метки.

Срок хранения раствора при комнатной температуре — не более 1 мес.

7.1.7 Приготовление рабочего раствора смеси стеринов

В мерную колбу вместимостью 10 см^3 помещают по 1 см^3 растворов стеринов по 7.1.2 — 7.1.6, добавляют небольшое количество метанола и аккуратно перемешивают. Объем раствора доводят метанолом до метки.

Срок хранения смеси стеринов при температуре (4 ± 2) °С — не более 1 мес.

7.2 Подготовка хроматографа

Подготовку хроматографа к работе проводят в соответствии с прилагаемой к хроматографу инструкцией.

Условия хроматографирования.

Изократическое элюирование смесью подвижной фазы ацетонитрил/вода (95/5) (*V/V*) при скорости потока 1 см^3/мин, температура колонки 30 °С. Объем вводимой пробы 0,020 см^3. Детектирование осуществляется при помощи спектрофотометрического детектора при длине волны 205 нм.

7.3 Подготовка пробы исследуемого продукта

Выделение стеринов из испытуемого продукта проводят методом омыления с последующей экстракцией.

7.3.1 Подготовка пробы молока и молочной продукции с массовой долей жира менее 40 %

7.3.1.1 В круглодонную колбу вместимостью 250 см^3 помещают (20,000 ± 0,001) г пробы продукта и добавляют 100 см^3 раствора гидроокиси калия в метаноле молярной концентрации 2,0 моль/дм^3.

7.3.1.2 К колбе подсоединяют обратный холодильник, кипятят на водяной бане в течение 30 мин и охлаждают.

7.3.1.3 Первое экстрагирование. После охлаждения раствор переливают в делительную воронку (№ 1) вместимостью 250 см^3, добавляют 50,0 см^3 смеси гексана и диэтилового эфира 1:1 (V/V). Раствор перемешивают, интенсивно встряхивая. После разделения смеси нижний слой сливают в стакан вместимостью 150 см^3. Верхний слой помещают в чистую делительную воронку (№ 2) вместимостью 250 см^3.

7.3.1.4 Второе экстрагирование. Отобранный по 7.3.1.3 нижний слой помещают в делительную воронку (№ 1), добавляют к нему 50 см^3 смеси гексана и диэтилового эфира 1:1 (V/V). Раствор перемешивают, интенсивно встряхивая. После разделения смеси нижний слой сливают в стакан вместимостью 150 см^3. Верхний слой помещают в делительную воронку (№ 2) с ранее отделенным верхним слоем, полученным после 1-го экстрагирования.

7.3.1.5 Третье экстрагирование. Отделившийся после 2-го экстрагирования нижний слой помещают в делительную воронку (№ 1), добавляют к нему 50 см^3 смеси гексана и диэтилового эфира 1:1

(V/V). Раствор перемешивают, интенсивно встряхивая. После разделения смеси нижний слой выливают (утилизируют). Верхний слой помещают в делительную воронку (№ 2) с раствором, полученным после 1-го и 2-го экстрагирований.

7.3.1.6 Полученный раствор промывают дистиллированной водой порциями по 50 $см^3$, сливая нижний слой, до нейтральной реакции, определяемой с помощью лакмусовой бумаги.

Промытый экстракт переливают в круглодонную колбу вместимостью 250 $см^3$. Колбу подсоединяют к ротационному испарителю и упаривают экстракт досуха.

К полученному остатку добавляют 1 $см^3$ метанола и аккуратно перемешивают. Полученный раствор используют для измерений.

7.3.2 Подготовка пробы молочной продукции с массовой долей жира более 40 %

7.3.2.1 В круглодонную колбу вместимостью 250 $см^3$ помещают (5,000 ± 0,001) г пробы продукта и добавляют 50 $см^3$ гидроокиси калия молярной концентрации 2,0 моль/$дм^3$.

7.3.2.2 Далее проводят процедуры по 7.3.1.2 — 7.3.1.6.

8 Условия проведения измерений

При выполнении измерений в лаборатории необходимо соблюдать следующие условия:

температура окружающего воздуха.....(20 ± 5) °С;

относительная влажность воздуха..... (55 ± 25) %;

атмосферное давление.....(96 ± 10) кПа.

9 Проведение измерений

Пробу анализируют два раза в условиях повторяемости в соответствии с требованиями ГОСТ ИСО 5725-1 (подраздел 3.14).

Перед проведением серии анализов проводят разделение стандартов холестерина и фитостеринов с фиксацией времени удерживания каждого стерина.

Затем проводят хроматографический анализ смеси стеринов.

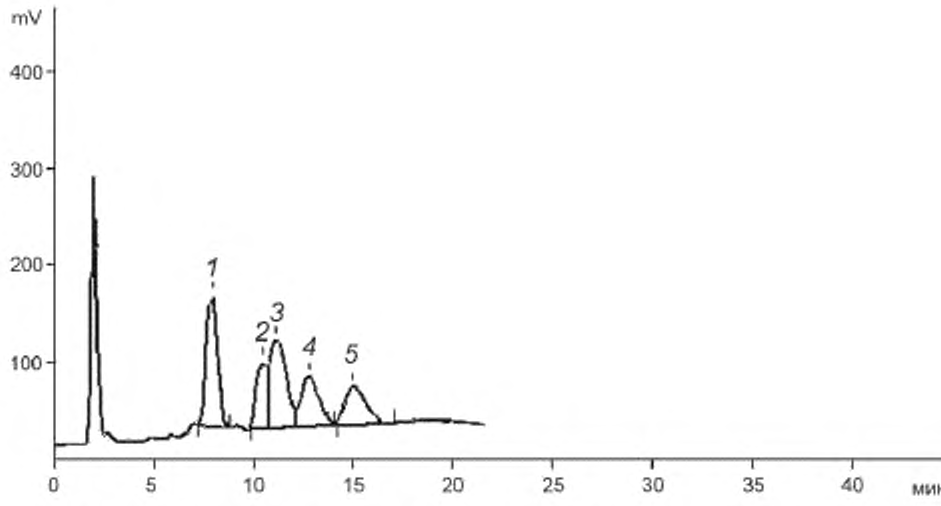
После этого проводят разделение анализируемой пробы.

10 Обработка результатов измерений

Идентификацию фитостеринов осуществляют по значению абсолютного времени удерживания. На хроматограмме данное значение отображается как расстояние от точки ввода пробы до выхода максимума пика вещества. Присутствие на хроматограмме пика с временем удерживания, характерным для фитостерина(ов), подтверждает наличие жиров растительного происхождения в анализируемой пробе продукта (рисунок 1).

Фитостерины считают обнаруженными, если время удерживания стерина на хроматограмме отличается от времени рабочего раствора на хроматограмме не более чем на 1 %.

Не учитывают пики фитостеринов с соотношением сигнал/шум не более 3.



1 — холестерин; *2* — брассикастерин; *3* — кампестерин; *4* — стигмастерин; *5* — β-ситостерин

Рисунок 1 — Хроматограмма смеси стандартов стеринов

11 Оформление результатов

Результат определения состава стеринов представляют в документах в виде наличия или отсутствия каждого стерина в отдельности, на основании чего делают заключение о фальсификации (нефальсификации) жировой фазы пробы продукта растительными маслами или жирами на растительной основе.

12 Требования, обеспечивающие безопасность

12.1 При выполнении работ необходимо соблюдать следующие требования:

- помещение лаборатории должно быть оборудовано общей приточно-вытяжной вентиляцией в соответствии с ГОСТ 12.4.021. Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать норм, установленных требованиями ГОСТ 12.1.005;
- требования техники безопасности при работе с химическими реактивами в соответствии с ГОСТ 12.1.007;
- требования техники безопасности при работе с электроустановками в соответствии с ГОСТ 12.1.019.

Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004 и быть оснащено средствами пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

13 Требования к оператору

Выполнение измерений может проводить специалист, имеющий специальное образование и освоивший метод в соответствии с требованиями настоящего стандарта.

УДК 637.147.2:543.06:006.354 МКС 67.100.01

Ключевые слова: молоко, продукция молочная, стерины, метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, холестерин, фитостерины, β-ситостерин, брассикастерин, кампестерин, стигмастерин, термины и определения, сущность метода, отбор проб, подготовка к проведению измерений, проведение измерений, обработка результатов измерений, требования безопасности

БЗ 10—2018/11

Редактор *Л.В. Коретникова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *М.И. Першина*
Компьютерная верстка *А.Н. Золотаревой*

Сдано в набор 06.09.2018 Подписано в печать 13.09.2018. Формат 60×84 $^{1}/_{8}$. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,40. Уч.-изд. л. 1,24.
Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» для комплектования Федерального информационного фонда стандартов, 117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru