МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)
INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 34900— 2022

ЖИРЫ И МАСЛА ЖИВОТНЫЕ И РАСТИТЕЛЬНЫЕ

Определение содержания 2-монохлорпропандиола и эфиров жирных кислот 2-монохлорпропандиола, 3-монохлорпропандиола и эфиров жирных кислот 3-монохлорпропандиола и глицидиловых эфиров жирных кислот с применением ферментативного гидролиза

Издание официальное

Москва
Российский институт стандартизации
2022

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

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

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Некоммерческой организацией «Ассоциация производителей и потребителей масложировой продукции»

2 ВНЕСЕН Межгосударственным техническим комитетом по стандартизации МТК 238 «Масла растительные и продукты их переработки»

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 30 сентября 2022 г. № 154-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	ЗАО «Национальный орган по стандартизации и метрологии» 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 7 ноября 2022 г. № 1245-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 34900—2022 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 декабря 2022 г.

5 В настоящем стандарте учтены положения стандарта Американского общества химиков-жировиков AOCS «Определение эфиров жирных кислот 2-/3-МХПД и глицидиловых эфиров в пищевых маслах с применением ферментативного гидролиза» (AOCS Official Method Cd 29d-19 «2-/3-MCPD Fatty Acid Esters and Glycidyl Fatty Acid Esters in Edible Oils and Fats by Enzymatic Hydrolysis»)

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации.

В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты»

© Оформление. ФГБУ «РСТ», 2022



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

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Сущность метода 2
4 Требования безопасности и условия выполнения измерений 2
5 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда, материалы и реактивы 3
6 Подготовка к проведению измерений 5
7 Порядок определения содержания 2-МХПД и эфиров жирных кислот 2-МХПД, 3-МХПД и эфиров жирных кислот 3-МХПД и ГЭ жирных кислот 8
8 Расчеты 9
9 Метрологические характеристики 11
10 Оформление результатов измерений 11
Приложение А (справочное) Метод определения активности липазы 12
Приложение Б (обязательное) Схема подготовки образца 15
Приложение В (обязательное) Хроматограмма фенилборных производных 16
Приложение Г (справочное) Точность метода 17

МКС 67.200.10

Поправка к ГОСТ 34900—2022 Жиры и масла животные и растительные. Определение содержания 2-монохлорпропандиола и эфиров жирных кислот 2-монохлорпропандиола, 3-монохлорпропандиола и эфиров жирных кислот 3-монохлорпропандиола и глицидиловых эфиров жирных кислот с применением ферментативного гидролиза

В каком месте	Напечатано	Должно быть
Пункт 5.1, первое перечисление	- весы неавтоматического действия по ГОСТ OIML R 76-1 с максимальной нагрузкой не более 200 г и пределом допускаемой погрешности ±0,01 мг;	- весы неавтоматического действия специального (I) класса точности по ГОСТ OIML R 76-1 с действительной ценой деления не более 0,01 мг; - весы неавтоматического действия высокого (II) класса точности по ГОСТ OIML R 76-1 с действительной ценой деления не более 0,001 мг;
Подраздел А.2, третий абзац	Весы лабораторные по ГОСТ OIML R 76-1 с пределом допускаемой абсолютной погрешности не более ±0,01 г.	Весы неавтоматического действия специального (I) или высокого (II) класса точности по ГОСТ OIML R 76-1 с действительной ценой деления не более 0,001 г.

(ИУС № 12 2023 г.)

Поправка к ГОСТ 34900—2022 Жиры и масла животные и растительные. Определение содержания 2-монохлорпропандиола и эфиров жирных кислот 2-монохлорпропандиола, 3-монохлорпропандиола и эфиров жирных кислот 3-монохлорпропандиола и глицидиловых эфиров жирных кислот с применением ферментативного гидролиза

В каком месте	Напечатано	Должно быть		
Предисловие. Таблица согласования	—	Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан

(ИУС № 6 2024 г.)

М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й С Т А Н Д А Р Т

ЖИРЫ И МАСЛА ЖИВОТНЫЕ И РАСТИТЕЛЬНЫЕ

Определение содержания 2-монохлорпропандиола и эфиров жирных кислот 2-монохлорпропандиола, 3-монохлорпропандиола и эфиров жирных кислот 3-монохлорпропандиола и глицидиловых эфиров жирных кислот с применением ферментативного гидролиза

Animal and vegetable fats and oils. 2-monochloropropanediol and 2-monochloropropanediol fatty acid esters, 3-monochloropropanediol and 3-monochloropropanediol fatty acid esters and fatty acids glycidyl esters content determination via enzymatic hydrolysis

Дата введения — 2022—12—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения содержания 2-хлор-1,3-пропандиола (2-МХПД) и эфиров жирных кислот 2-МХПД, в пересчете на 2-МХПД, 3-хлор-1,2-пропандиола (3-МХПД) и эфиров жирных кислот 3-МХПД, в пересчете на 3-МХПД и глицидиловых эфиров (ГЭ) жирных кислот, в пересчете на глицидол в животных и растительных жирах и маслах, а также в жирах специального назначения, в том числе кулинарных, кондитерских, хлебопекарных жирах, заменителях молочного жира, эквивалентах, улучшителях и заменителях масла какао.

Метод не применим для животных и растительных масел и жиров, жиров рыб и морских млекопитающих, содержащих ДГК (докозагексаеновую кислоту) и ЭПК (эйкозапентаеновую кислоту).

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

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

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

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

ГОСТ 12.2.085 Арматура трубопроводная. Клапаны предохранительные. Выбор и расчет пропускной способности

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

ГОСТ 2603 Реактивы. Ацетон. Технические условия

ГОСТ 3118 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 3652 Реактивы. Кислота лимонная моногидрат и безводная. Технические условия

ГОСТ 4171 Реактивы. Натрия сульфат 10-водный. Технические условия

ГОСТ 4172 Реактивы. Натрий фосфорно-кислый двузамещенный 12-водный. Технические условия

ГОСТ 4204 Реактивы. Кислота серная. Технические условия

ГОСТ 4220 Реактивы. Калий двухромовокислый. Технические условия

ГОСТ 4328 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

Издание официальное

ГОСТ 4919.2—2016 Реактивы и особо чистые вещества. Методы приготовления буферных растворов

ГОСТ 5789 Реактивы. Толуол. Технические условия

ГОСТ 5962 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия

ГОСТ 6259 Реактивы. Глицерин. Технические условия

ГОСТ 6709 Вода дистиллированная. Технические условия[1)]

ГОСТ 9293 Азот газообразный и жидкий. Технические условия

ГОСТ 10779 Спирт поливиниловый. Технические условия

ГОСТ 11773 Реактивы. Натрий фосфорно-кислый двузамещенный. Технические условия

ГОСТ 12026 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 14919 Электроплиты, электроплитки и жарочные электрошкафы бытовые. Общие технические условия

ГОСТ 17299 Спирт этиловый технический. Технические условия

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

ГОСТ 25794.1—83 Реактивы. Методы приготовления титрованных растворов для кислотно-основного титрования

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

ГОСТ 29169 (ИСО 648—77) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной отметкой

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

ГОСТ 29251 (ИСО 385-1—84) Посуда лабораторная стеклянная. Бюретки. Часть 1. Общие требования

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

ГОСТ ISO 3696 Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы контроля[2)]

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов и классификаторов на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации (gost.e-ecolog.ru по указателям национальных стандартов, издаваемым в государствах, указанных в предисловии, или на официальных сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации. Если на документ дана недатированная ссылка, то следует использовать документ, действующий на текущий момент, с учетом всех внесенных в него изменений. Если заменен ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, то следует использовать указанную версию этого документа. Если после принятия настоящего стандарта в ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение применяется без учета данного изменения. Если ссылочный документ отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Сущность метода

Сложноэфирные соединения гидролизуются липазой до соответствующих анализируемых веществ. Глицидол бромируется до 3-бром-1,2-пропандиола (3-МБПД). Затем анализируемые вещества в свободной форме дериватизируют фенилборной кислотой (ФБК) и подвергают газовому хромато-масс-спектрометрическому (ГХ-МС) анализу.

4 Требования безопасности и условия выполнения измерений

4.1 Применяемые в работе реактивы относятся к веществам 1-го и 2-го классов опасности по ГОСТ 12.1.007, при работе с ними следует соблюдать требования безопасности, установленные для работ с токсичными, едкими и легковоспламеняющимися веществами по ГОСТ 12.1.005.

[1)] В Российской Федерации действует ГОСТ Р 58144—2018 «Вода дистиллированная. Технические условия».

[2)] В Российской Федерации действует ГОСТ Р 52501—2005 (ИСО 3696:1987)«Вода для лабораторного анализа. Технические условия».

4.2 Помещения, в которых проводят анализ и подготовку образцов, должны быть оборудованы приточно-вытяжной вентиляцией.

4.3 Приготовление и дозирование градуировочных изотопно-меченых внутренних стандартов, добавление их к анализируемому образцу, подготовку образца к анализу проводят в вытяжном шкафу.

4.4 Образцы, подготовленные к анализу, растворы градуировочных и внутренних стандартов следует хранить в виалах, закрытых винтовыми или запрессованными крышками с комбинированными прокладками (силикон/тефлон).

4.5 При выполнении измерений с использованием хромато-масс-спектрометра следует соблюдать правила по электробезопасности по ГОСТ 12.1.019 и правила безопасной эксплуатации сосудов, работающих под давлением, по ГОСТ 12.2.085.

4.6 К выполнению измерений допускаются специалисты, имеющие высшее специальное образование, прошедшие соответствующий инструктаж, владеющие техникой хромато-масс-спектрометрического анализа и изучившие инструкции по эксплуатации используемых приборов.

4.7 При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

- температура окружающего воздуха . . . . . от 15 °С до 25 °С;
- относительная влажность воздуха . . . . . от 20 % до 80 %.

5 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда, материалы и реактивы

5.1 Для определения используют следующие средства измерений, вспомогательное оборудование, материалы и посуду:

- весы неавтоматического действия по ГОСТ OIML R 76-1 с максимальной нагрузкой не более 200 г и пределом допускаемой погрешности ±0,01 мг;
- колбы 1(2)—5—1(2), 1(2)—10—1(2), 2(2а, 4, 4а)—100(1000)—1(2) по ГОСТ 1770;
- колбы Кн-1—100(250)—14/23 ТС, Кн-2—100(250)—18 ТХС по ГОСТ 25336;
- пипетки 1(2)—2—0,5, 1(2)—2—1 по ГОСТ 29169;
- пипетки градуированные 1(2)—1(2)—1—0,5, 1(2)—1(2)—1—1, 1(2)—1(2)—1—5 по ГОСТ 29227;
- дозаторы одноканальные переменной вместимости 0,0025—0,01; 0,02—0,1; 0,2—1,0; 0,5—5,0 $см^3$ с допустимой относительной погрешностью дозирования не более ±1 %;
- микродозаторы с переменным объемом от 0,02 до 0,2 $см^3$ с относительной погрешностью в диапазоне дозируемого объема ±0,8 %;
- микродозаторы с переменным объемом от 0,1 до 1 $см^3$ с относительной погрешностью в диапазоне дозируемого объема ±2,5 %;
- микрошприцы вместимостью 0,0005; 0,0015; 0,01; 0,02; 0,05; 0,1 $см^3$;
- пробирки стеклянные вместимостью 10 $см^3$ с винтовыми крышками для использования в смесителе и центрифуге;
- пипетку Пастера вместимостью 1 $см^3$;
- виалу (флакон) для газового хроматографа (ГХ), закрывающуюся винтовыми или запрессованными крышками с комбинированными прокладками (силикон/тефлон);
- электроплитку по ГОСТ 14919; электроплиту, электроплитку или электронагреватель, позволяющие поддерживать температуру до 500 °С с допустимой погрешностью ±25 °С;
- баню водяную или шкаф сушильный электрический вентилируемый, обеспечивающие поддержание температуры в диапазоне от 60 °С до 80 °С;
- вихревой смеситель;
- мешалку магнитную;
- смеситель вертикально-поршневой высокоскоростной, виброцентрифугу высокоскоростную с движением по эксцентрической орбитали или виброцентрифугу высокоскоростную горизонтально-возвратно-поступательную.

Примечание — Вертикально-поршневой высокоскоростной смеситель должен обеспечить встряхивание вертикально установленной пробирки при 200 об/мин с амплитудой взмаха примерно 4 см. Высокоскоростная виброцентрифуга с движением по эксцентрической орбитали должна встряхивать вертикально установленные пробирки при 1800 об/мин. Горизонтально-возвратно-поступательная высокоскоростная виброцентрифуга должна обеспечивать встряхивание пробирки, установленной под углом 60° от горизонтальной оси при 250—400 об/мин с амплитудой взмаха примерно 2—3 см;

- центрифугу со скоростью вращения 3000—3500 об/мин;
- испаритель лабораторный (с азотом) и нагревательной системой, обеспечивающей поддержание температуры 40 °С;
- фильтр мембранный для шприца из политетрафторэтилена (ПТФЭ) или других материалов, устойчивых к гидрофобным растворителям, диаметром до 25 мм и размером пор 0,2 мкм;
- pH-метр;
- газовый хроматограф с масс-спектрометром (ГХ-МС), позволяющий проводить измерения в диапазоне масс от 50 до 900 атомных единиц массы (а.е.м.), и устройством обработки данных: с квадрупольным масс-анализатором, способным к ионизации электронным ударом в режиме положительных ионов, и контролю заданных ионов (SIM);
- колонку кварцевую капиллярную[1)], длиной 30 м, внутренним диаметром 0,25 мм и толщиной неподвижной фазы 0,25 мкм.

5.2 Для определения используют следующие реактивы:
- азот газообразный по ГОСТ 9293, марки ос.ч.;
- бромид натрия, ч.д.а;
- кислоту лимонную по ГОСТ 3652;
- натрий фосфорно-кислый двузамещенный 12-водный по ГОСТ 4172, ч.д.а;
- липазу, позволяющую проводить гидролиз моно-, ди-, триацилглициридов[2)] (например, липазы из Candida cylindracea);
- спирт поливиниловый по ГОСТ 10779, марок 16/1,18/11, 20/1, 1-го сорта;
- фенилборную кислоту (ФБК) (CAS № 98-80-6, содержание основного вещества не менее 97 %);
- ацетон по ГОСТ 2603, ч.д.а.;
- спирт этиловый по ГОСТ 17299, марки А, по ГОСТ 5962 не ниже «высшей очистки»;
- калий двухромовокислый по ГОСТ 4220;
- изооктан (2,2,4-триметилпентан) с содержанием основного вещества не менее 99,5 %;
- н-гексан с содержанием основного вещества не менее 96,0 %;
- сульфат натрия по ГОСТ 4171, ч.д.а.;
- кислоту серную по ГОСТ 4204, х.ч.;
- эфир диэтиловый, ч.д.а.;
- фенолфталеин, спиртовой раствор массовой долей 1 %;
- толуол по ГОСТ 5789, ч.д.а.
- воду дистиллированную по ГОСТ 6709 или воду для лабораторного анализа по ГОСТ ISO 3696 первой степени очистки.

5.3 Для определения используют стандарты:
- 3-монохлорпропан-1,2-диол (3-МХПД) (CAS № 96-24-2, содержание основного вещества не менее 95 %);
- 2-монохлорпропан-1,3-диол (2-МХПД) (CAS № 497-04-1, содержание основного вещества не менее 95 %);
- 3-монобромпропан-1,2-диол (3-МБПД) (CAS № 4704-77-2, содержание основного вещества не менее 95 %);
- пентадейтерированный 3-монохлорпропан-1,2-диол (3-МХПД-d_5) (CAS № 342611-01-2, содержание основного вещества не менее 95 %);
- пентадейтерированный 2-монохлорпропан-1,3-диол (2-МХПД-d_5) (CAS № 1216764-05-4, содержание основного вещества не менее 95 %);

[1)] Например, газохроматографические колонки с 5 %-ным фенилметилполисилоксаном — VF-5ms и DB-5ms (Agilent Technologies), с 50 %-ным фенилметилполисилоксаном VF-17ms (Agilent Technologies). Данная информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не исключает возможности использования других типов с аналогичными характеристиками.

Дополнительно может быть установлена предколонка длиной от 2 до 12 метров.

[2)] Липазы из Candida cylindracea или Candida rugosa доступны в виде химических реагентов или пищевых добавок, таких как липаза AYS Amano, липаза H или липаза S от FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation (Ричмонд, Вирджиния, США; Токио, Япония), или липаза AY Amano 30G от Amano Enzyme Inc. (Элджин, Иллинойс, США; Нагоя, Япония). Данная информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не исключает возможности использования других типов с аналогичными характеристиками.

- пентадейтерированный 3-монобромпропан-1,2-диол (3-МБПД-d_5) (CAS № 1246820-48-3, содержание основного вещества не менее 95 %).

5.4 Допускается применение других средств измерений, вспомогательного оборудования, посуды и материалов, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам и обеспечивающих необходимую точность измерения. При проведении анализа используют реактивы указанной чистоты или чистые для анализа, также допускается использовать реактивы аналогичной или более высокой квалификации по качеству.

6 Подготовка к проведению измерений

6.1 Подготовка лабораторной посуды и материалов

6.1.1 Мойку и сушку посуды проводят в помещении, оборудованном приточно-вытяжной вентиляцией. Для сушки лабораторной посуды и подготовки реактивов следует использовать отдельные сушильные шкафы.

6.1.2 Стеклянную лабораторную посуду очищают хромовой смесью с последующей последовательной промывкой водопроводной, а затем дистиллированной водой, затем сушат в сушильном шкафу при температуре от 105 °С до 110 °С.

6.1.3 Высушенную посуду ополаскивают органическими растворителями: толуолом (однократно), ацетоном (дважды). Затем проводят окончательную сушку посуды в сушильном шкафу при температуре от 105 °С до 110 °С.

Процедуру промывки органическими растворителями проводят в вытяжном шкафу. Рекомендуется на стадиях промывки использовать ультразвуковую баню.

6.2 Приготовление реактивов

6.2.1 Приготовление раствора лимонной кислоты молярной концентрации $c(C_6H_8O_7 \cdot H_2O)$ = = 1,0 моль/дм^3

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 вносят 21,014 г лимонной кислоты, растворяют в дистиллированной воде. Доводят объем до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают. Раствор лимонной кислоты хранят в закрытой емкости не более двух месяцев.

6.2.2 Приготовление раствора фосфорнокислого двузамещенного натрия молярной концентрации $c(Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O)$ = 1,0 моль/дм^3

Примечание — Предварительную подготовку фосфорнокислого двузамещенного натрия проводят по ГОСТ 4919.2—2016 (пункт 11 таблицы 1).

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 вносят 178,000 г $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ [подготовленного реактива состава (а) по ГОСТ 4919.2—2016 (пункт 11 таблицы 1)] или 141,960 г Na_2HPO_4 [подготовленного реактива состава (б) по ГОСТ 4919.2—2016 (пункт 11 таблицы 1)], тщательно перемешивают, растворяют в дистиллированной воде, доводят объем раствора дистиллированной водой до метки и вновь тщательно перемешивают. Раствор фосфорнокислого двузамещенного натрия хранят в закрытой емкости не более двух месяцев.

6.2.3 Приготовление раствора бромида натрия с массовой долей приблизительно 30 %

Растворяют 30 г бромида натрия в 80 см^3 дистиллированной воды, доводят pH до 5,0—5,5 при помощи раствора лимонной кислоты молярной концентрации c ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) = 1,0 моль/дм^3 (6.2.1) и раствора фосфорнокислого двузамещенного натрия молярной концентрации c ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) = = 1,0 моль/дм^3 (6.2.2). Добавляют дистиллированную воду до метки 100 см^3. Данный раствор хранят в закрытой стеклянной колбе при комнатной температуре не более шести месяцев.

Примечание — Значение pH в диапазоне pH 5,0—5,5 позволяет свести к минимуму нежелательные взаимные преобразования между определяемыми веществами.

6.2.4 Приготовление раствора липазы из Candida cylindracea (90 ед/см^3)

Растворяют 3600 единиц липазы из Candida cylindracea в 40 см^3 раствора бромида натрия (6.2.3). Перемешивают смесь при помощи магнитной мешалки в течение 1—5 мин, избегая пенообразования. Раствор готовят ежедневно перед использованием и хранят при комнатной температуре. Раствор нельзя хранить в холодильнике.

Методы определения активности липазы приведены в приложении А.

Примечания

1 Для анализа масел и жиров, содержащих жирные кислоты со средней длиной цепи и/или длинноцепочечные жирные кислоты, количество липазы необходимо увеличить до 7200 единиц (раствор липазы из Candida cylindracea в бромиде натрия — 180 ед/см^3).

2 Допускается использовать избыточное количество липазы для обеспечения полного гидролиза.

6.2.5 Приготовление раствора фенилборной кислоты (ФБК) с массовой долей приблизительно 2,5 %

Растворяют 0,25 г ФБК в 10 см^3 смеси дистиллированной воды/ацетона (1/19, об/об). Данный раствор хранят в герметичной стеклянной посуде [например, виалах, закрытых винтовыми или запрессованными крышками с комбинированными прокладками (силикон/тефлон)], в холодильнике не более трех месяцев.

6.3 Приготовление растворов стандартов

Растворы градуировочных и внутренних стандартов готовят ежедневно перед использованием для сведения к минимуму нежелательных взаимных преобразований определяемых веществ.

Растворы стандартов хранят каждый отдельно в герметичной стеклянной посуде [например, виалах, закрытых винтовыми или запрессованными крышками с комбинированными прокладками (силикон/тефлон)], в морозильной камере не более шести месяцев.

Примечание — Концентрацию растворов стандартов рассчитывают с учетом содержания основного вещества, для растворов внутренних стандартов также учитывают изотопный фактор.

6.3.1 Приготовление раствора 3-МХПД, 300 мкг/см^3

В мерную колбу вместимостью 10 см^3 взвешивают (3,07 ± 0,01) мг 3-МХПД, заполняют до метки этиловым спиртом.

6.3.2 Приготовление раствора 2-МХПД, 300 мкг/см^3

В мерную колбу вместимостью 10 см^3 взвешивают (3,07 ± 0,01) мг 2-МХПД, заполняют до метки этиловым спиртом.

6.3.3 Приготовление раствора 3-МБПД, 300 мкг/см^3

В мерную колбу вместимостью 10 см^3 взвешивают (3,07 ± 0,01) мг 3-МБПД, заполняют до метки этиловым спиртом.

6.3.4 Приготовление раствора внутреннего стандарта 3-МХПД-d_5, 200 мкг/см^3

В мерную колбу вместимостью 5 см^3 взвешивают (1,03 ± 0,01) мг 3-МХПД-d_5, заполняют до метки этиловым спиртом.

6.3.5 Приготовление раствора внутреннего стандарта 2-МХПД-d_5, 200 мкг/см^3

В мерную колбу вместимостью 5 см^3 взвешивают (1,03 ± 0,01) мг 2-МХПД-d_5, заполняют до метки этиловым спиртом.

6.3.6 Приготовление раствора внутреннего стандарта 3-МБПД-d_5, 200 мкг/см^3

В мерную колбу вместимостью 5 см^3 взвешивают (1,03 ± 0,01) мг 3-МБПД-d_5, заполняют до метки этиловым спиртом.

6.3.7 Приготовление градуировочной смеси I, 15 мкг/см^3

В мерную колбу вместимостью 10 см^3 вносят по 0,5 см^3 каждого раствора 3-МХПД, 2-МХПД и 3-МБПД (6.3.1—6.3.3) и заполняют до метки раствором бромида натрия (6.2.3).

6.3.8 Приготовление градуировочной смеси II, 1,5 мкг/см^3

В мерную колбу вместимостью 10 см^3 вносят 1 см^3 градуировочной смеси I (15 мкг/см^3) (6.3.7) и заполняют до метки раствором бромида натрия (6.2.3).

6.3.9 Приготовление смеси внутренних стандартов, 2,0 мкг/см^3

В мерную колбу вместимостью 10 см^3 вносят по 0,1 см^3 каждого раствора внутреннего стандарта 3-МХПД-d_5, 2-МХПД-d_5 и 3-МБПД-d_5 (6.3.4—6.3.6) и заполняют до метки раствором бромида натрия (6.2.3).

6.4 Подготовка образца

6.4.1 В стеклянную пробирку с винтовой крышкой вносят 100—110 мг масла или жира, добавляют 0,5 см^3 изооктана и с помощью вихревого смесителя перемешивают в течение 10 с. Если образец имеет высокую температуру плавления после добавления изооктана пробирку закрывают винтовой крышкой и нагревают пробирку до температуры 60 °С для полного растворения образца.

Примечания

1 Для растительных масел и жиров с температурой плавления более 60 °С пробирки в течение короткого времени нагревают до температуры 80 °С для полного растворения. Температура вспышки изооктана минус 9 °С.

2 Для улучшения растворимости добавляют 1 $см^3$ изооктана.

6.4.2 Ферментный гидролиз эфиров жирных кислот 2-МХПД, эфиров жирных кислот 3-МХПД и ГЭ жирных кислот

В пробирку с винтовой крышкой с образцом (6.4.1) вносят 3 $см^3$ раствора бромида натрия, содержащего липазу Candida cylindracea (6.2.4), закрывают винтовой крышкой и встряхивают пробирку на высокоскоростном смесителе при комнатной температуре (25 ± 2) °С в течение 30 мин.

Примечание — Встряхивание с использованием виброцентрифуги для гидролиза можно проводить при температуре от 25 °С до 40 °С.

6.4.3 Пробирку центрифугируют при 3000 об/мин в течение 2 мин, затем нагревают ее на водяной бане при температуре 80 °С в течение 10 мин. После нагревания пробирку охлаждают до комнатной температуры на воздухе или водой.

6.4.4 Затем в пробирку добавляют 0,05 $см^3$ смеси внутренних стандартов (2,0 мкг/$см^3$) (6.3.9) и перемешивают с помощью вихревого смесителя в течение 10 с (схема приготовления образца в соответствии с приложением Б, пробирка а).

Примечание — После стадий гидролиза и бромирования определяемые вещества в свободной форме переходят в водный слой. Для масел и жиров, содержащих жирные кислоты с короткой или средней цепью (молочный жир, кокосовое масло), следует проводить промывку диэтиловым эфиром для удаления жирных кислот с короткой и средней цепью из водного слоя. После добавления смеси внутренних стандартов в пробирку вносят 3 $см^3$ диэтилового эфира и перемешивают содержимое с помощью вихревого смесителя в течение 10 с. Затем центрифугируют при 3000 об/мин в течение 2 мин и удаляют верхний слой при помощи пипетки Пастера.

6.4.5 Добавляют в пробирку 3 $см^3$ н-гексана, закрывают винтовой крышкой и перемешивают содержимое с помощью вихревого смесителя в течение 10 с. Затем центрифугируют при 3000 об/мин в течение 2 мин (схема приготовления образца в соответствии с приложением Б, пробирка б).

6.4.6 Переносят водный (нижний) слой, содержащий исследуемые вещества в свободной форме, в новую пробирку при помощи пипетки Пастера (схема приготовления образца в соответствии с приложением Б, пробирка в). Вносят 3 $см^3$ н-гексана к водному слою в новой пробирке и перемешивают содержимое с помощью вихревого смесителя в течение 10 с (схема приготовления образца в соответствии с приложением Б, пробирка г). Если нет четкого разделения верхнего и водного слоев, центрифугируют пробирку при 3000 об/мин в течение 2 мин. Удаляют верхний и средний (межфазная граница) слои при помощи пипетки Пастера (схема приготовления образца в соответствии с приложением Б, пробирка д).

Примечание — При введении конца пипетки Пастера в водный слой необходимо нажать на грушу для предотвращения попадания в пипетку верхнего и среднего слоев, содержащих продукты разложения липазы и образца. Отбирают только водный слой (насколько это возможно) и переносят его в новую пробирку. В качестве альтернативы, вместо переноса водного слоя в новую пробирку, верхний и средний слои можно извлечь из пробирки при помощи пипетки Пастера. В любом случае необходимо соблюдать осторожность для сведения к минимуму потери водного слоя.

6.4.7 Вносят 0,1 $см^3$ раствора ФБК (6.2.5) к оставшейся водной фазе, содержащей исследуемые вещества в свободной форме, перемешивают содержимое с помощью вихревого смесителя в течение 10 с (схема приготовления образца в соответствии с приложением Б, пробирка д). Вносят 3 $см^3$ н-гексана и закрывают винтовой крышкой. Встряхивают пробирку на высокоскоростном смесителе при комнатной температуре в течение 10 мин для проведения дериватизации при помощи ФБК (схема приготовления образца в соответствии с приложением Б, пробирка е). После дериватизации фенилборные производные определяемых веществ распределятся в верхнем слое. Если в верхнем слое происходит гелеобразование или образование пузырьков, необходимо перемешать содержимое с помощью вихревого смесителя в течение 10 с и центрифугировать при 3000—3500 об/мин в течение от 1 до 10 мин (схема приготовления образца в соответствии с приложением Б, пробирка ж).

6.4.8 Переносят верхний слой, содержащий фенилборные производные определяемых веществ при помощи пипетки Пастера в новую пробирку, содержащую небольшое количество сульфата натрия (схема приготовления образца в соответствии с приложением Б, пробирка и). Концентрируют объем пробы до 0,3—0,5 $см^3$ в потоке азота при 40 °С, не допуская бурного кипения и брызг. Перемешивают

содержимое вихревым смесителем в течение 10 с, отстаивают в течение 10—15 мин, при необходимости содержимое пробирки фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,2 мкм, помещают фильтрат в виалу для ГХ с микровставкой для последующего анализа ГХ-МС.

Примечания

1 Необходимо с осторожностью переносить только верхний слой, не допуская захвата водного слоя вместе с верхним. Растворитель из верхнего слоя удаляют в новую пробирку, содержащую сульфат натрия в качестве дегидратирующего агента. Нет необходимости переносить весь верхний слой, рискуя загрязнить образец водной фазой. Если сульфат натрия становится комковатым, необходимо добавить больше сульфата натрия в пробирку.

2 Необходимо избегать удаления всего растворителя, содержащего фенилборные производные, поскольку это может значительно снизить чувствительность ГХ-МС. Если весь растворитель был удален, необходимо добавить 0,3 $см^3$ н-гексана к остатку, растворив его при встряхивании в течение 10—15 с.

6.5 Приготовление градуировочных растворов

6.5.1 Вносят микропипеткой 0,0005; 0,02; 0,05 и 0,1 $см^3$ градуировочной смеси II (1,5 мкг/$см^3$) (6.3.8) и 0,02, 0,035, 0,05 и 0,08 $см^3$ градуировочной смеси I (15 мкг/$см^3$) (6.3.7) в отдельные пробирки. Перемешивают содержимое каждой пробирки с помощью вихревого смесителя в течение 10 с.

6.5.2 Вносят микропипеткой 0,05 $см^3$ смеси внутренних стандартов (2,0 мкг/$см^3$) (6.3.9) и 3 $см^3$ раствора бромида натрия (6.2.3) в каждую из пробирок. Перемешивают содержимое каждой пробирки с помощью вихревого смесителя в течение 10 с.

6.5.3 Дериватизацию и подготовку образцов калибровочных смесей для ГХ-МС проводят в соответствии с 6.4.7 и 6.4.8.

7 Порядок определения содержания 2-МХПД и эфиров жирных кислот 2-МХПД, 3-МХПД и эфиров жирных кислот 3-МХПД и ГЭ жирных кислот

7.1 Параметры хроматографических измерений

7.1.1 Хромато-масс-спектрометр включают в соответствии с руководством (инструкцией) по эксплуатации и устанавливают параметры, рекомендуемые изготовителем капиллярных колонок.

7.1.2 Например, для кварцевых капиллярных колонок длиной 30 м, диаметром 0,25 мм, с неподвижной полярной фазой толщиной не более 0,25 мкм устанавливают следующие параметры:

а) газовый хроматограф:

1) газ-носитель: гелий, постоянный поток 1,2 $см^3$/мин;
2) объем пробы: 0,001—0,0015 $см^3$;
3) режим ввода пробы: без деления потока, время продувки: 1,5 мин;
4) температура инжектора: 250 °С;
5) промывочный раствор для шприца: ацетон и н-гексан.

Примечание — Шприц промывают сначала ацетоном для удаления гидрофильных веществ, затем н-гексаном для удаления гидрофобных веществ;

6) программирование температуры термостата ГХ (общее время 32 мин):
   - начальная температура — 60 °С;
   - изотермический режим — 1 мин;
   - программируемый нагрев — до температуры 150 °С со скоростью 10 °С/мин;
   - программируемый нагрев — до температуры 180 °С со скоростью 3 °С/мин;
   - программируемый нагрев — до температуры 300 °С со скоростью 30 °С/мин;
   - изотермический режим — 8 мин;

б) масс-спектрометр:

1) метод ионизации: электронный удар, положительный режим;
2) температура интерфейса: 280 °С;
3) температура ионного источника: 230 °С;
4) время сканирования: 0,05—0,10 с;
5) контроль ионов (хроматограмма фенилборных производных в соответствии с приложением В):

- фенилборная производная 3-МХПД-d_5: масса/заряд 150 (количественный ион); масса/заряд 201 (качественный ион);
- фенилборная производная 3-МХПД: масса/заряд 147 (количественный ион); масса/заряд 196 (качественный ион);
- фенилборная производная 2-МХПД-d_5: масса/заряд 201 (количественный ион); масса/заряд 203 (качественный ион);
- фенилборная производная 2-МБПД: масса/заряд 196 (количественный ион); масса/заряд 198 (качественный ион);
- фенилборная производная 3-МБПД-d_5: масса/заряд 150 (количественный ион); масса/заряд 245 (качественный ион);
- фенилборная производная 3-МБПД: масса/заряд 147 (количественный ион); масса/заряд 240 (качественный ион);

6) временной диапазон выхода определяемых веществ: от 3 до 20 мин.

8 Расчеты

8.1 Определение содержания 3-МХПД и эфиров жирных кислот 3-МХПД в пересчете на 3-МХПД

8.1.1 Строят калибровочную кривую путем нанесения отношения значения площадей пиков фенилборной производной 3-МХПД (масса/заряд 147) к значениям площадей пиков фенилборной производной 3-МХПД-d_5 (масса/заряд 150) по оси *Y* в зависимости от отношения концентрации 3-МХПД (выраженного как эквивалент свободного 3-МХПД) к концентрации 3-МХПД-d_5 (выраженного как эквивалент свободного 3-МХПД-d_5) по оси *X*. Линейную регрессию *Y* рассчитывают по формуле

$$Y = a \cdot X + b, \tag{1}$$

где *a* — тангенс угла наклона калибровочной кривой;

b — точка пересечения калибровочной кривой с осью *Y*.

8.1.2 Содержание 3-МХПД и эфиров жирных кислот 3-МХПД в пересчете на 3-МХПД $C_{3\text{-МХПД}}$, мг/кг, вычисляют по формуле

$$C_{3\text{-МХПД}} = \left(\frac{A_{147}}{A_{150}} - b\right) \cdot \frac{IS}{a \cdot W}, \tag{2}$$

где A_{147} — площадь пика, соответствующая фенилборной производной 3-МХПД (масса/заряд 147);

A_{150} — площадь пика, соответствующая фенилборной производной 3-МХПД-d_5 (масса/заряд 150);

IS — количество внутреннего стандарта 3-МХПД-d_5, добавленного к исследуемому образцу, мкг;

W — масса исследуемого образца, г.

8.2 Определение содержания 2-МХПД и эфиров жирных кислот 2-МХПД в пересчете на 2-МХПД

8.2.1 Строят калибровочную кривую аналогично 8.1.1.

8.2.2 Содержание 2-МХПД и эфиров жирных кислот 2-МХПД в пересчете на 2-МХПД $C_{2\text{-МХПД}}$, мг/кг, вычисляют по формуле

$$C_{2\text{-МХПД}} = \left(\frac{A_{196}}{A_{201}} - b\right) \cdot \frac{IS}{a \cdot W}, \tag{3}$$

где A_{196} — площадь пика, соответствующая фенилборной производной 2-МХПД (масса/заряд 196);

A_{201} — площадь пика, соответствующая фенилборной производной 2-МХПД-d_5 (масса/заряд 201);

IS — количество внутреннего стандарта 2-МХПД-d_5, добавленного к исследуемому образцу, мкг.

8.2.3 Определение содержания 2-МХПД и эфиров жирных кислот 2-МХПД в пересчете на 2-МХПД, при отсутствии 2-МХПД-d_5

8.2.3.1 Строят калибровочную кривую, используя 3-МХПД-d_5 (масса/заряд 150) в качестве внутреннего стандарта. Содержание 2-МХПД и эфиров жирных кислот 2-МХПД в пересчете на 2-МХПД $C_{2\text{-МХПД}}$, мг/кг, вычисляют по формуле

$$C_{2\text{-МХПД}} = \left(\frac{A_{196}}{A_{150}} - b\right) \cdot \frac{IS}{a \cdot W}, \quad (4)$$

где A_{150} — площадь пика, соответствующая фенилборной производной 3-МХПД-d_5 (масса/заряд 150);

IS — количество внутреннего стандарта 3-МХПД-d_5, добавленного к исследуемому образцу, мкг.

Примечание — Для фенилборной производной 3-МХПД-d_5 можно использовать площадь пика с массой/заряд 201 вместо площади пика с массой/заряд 150.

8.2.3.2 Строят калибровочную кривую, используя 3-МХПД-d_5 (масса/заряд 201) в качестве внутреннего стандарта, и определяют тангенс наклона калибровочной кривой, который является коэффициентом восприимчивости (SR).

Затем вычисляют калибровочный коэффициент F по формуле

$$F = \frac{SR}{FE}, \quad (5)$$

где FE — эффективность фрагментации, отношение площади пика ионного фрагмента (A_{150}) к площади пика молекулярного иона (A_{201}) фенилборной производной 3-МХПД-d_5;

SR — коэффициент восприимчивости [тангенс угла наклона калибровочной кривой для 2-МХПД (масса/заряд 196)].

Калибровочный коэффициент *(F)* должен быть постоянным и независимым от марки хромато-масс-спектрометра.

Содержание 2-МХПД и эфиров жирных кислот 2-МХПД в пересчете на 2-МХПД $C_{2\text{-МХПД}}$, мг/кг, вычисляют по формуле

$$C_{2\text{-МХПД}} = \left(\frac{A_{196}}{A_{150} \cdot F}\right) \cdot \frac{IS}{W}. \quad (6)$$

8.3 Определение содержания ГЭ жирных кислот в пересчете на глицидол

8.3.1 Строят калибровочную кривую аналогично 8.1.1.

Содержание 3-МБПД $C_{3\text{-МБПД}}$, мг/кг, вычисляют по формуле

$$C_{3\text{-МБПД}} = \left(\frac{A_{147}}{A_{150}} - b\right) \cdot \frac{IS}{a \cdot W}, \quad (7)$$

где A_{147} — площадь пика, соответствующая фенилборной производной 3-МБПД (масса/заряд 147);

A_{150} — площадь пика, соответствующая фенилборной производной 3-МБПД-d_5 (масса/заряд 150);

IS — количество внутреннего стандарта 3-МБПД-d_5, добавленного к исследуемому образцу, мкг.

Содержание ГЭ жирных кислот в пересчете на глицидол $C_{ГЭ}$, мг/кг, вычисляют по формуле

$$C_{ГЭ} = C_{3\text{-МБПД}} \cdot \left(\frac{M_{глиц}}{M_{3\text{-МБПД}}}\right), \quad (8)$$

где $M_{глиц}$ — молекулярный вес глицидола (74,08);

$M_{3\text{-МБПД}}$ — молекулярный вес 3-МБПД (154,99).

9 Метрологические характеристики

Информация о межлабораторных испытаниях точности метода приведена в приложении Г.

9.1 Приемлемость результатов измерений, полученных в условиях повторяемости

Расхождение между результатами двух определений, выполненных одним методом, на одном и том же анализируемом образце, в одной лаборатории, одним оператором, с использованием одного оборудования, за короткий промежуток времени, не должно превышать предел повторяемости *r*, при доверительной вероятности *P* = 0,95. Значение предела повторяемости приведено в таблице 1.

9.2 Приемлемость результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости

Расхождение между результатами двух определений, выполненных одним методом, на одном и том же анализируемом образце, в разных лабораториях, разными операторами, с использованием разного оборудования, не должно превышать предел воспроизводимости *R*, при доверительной вероятности *P* = 0,95. Значение предела воспроизводимости приведено в таблице 1.

9.3 Показатели точности и прецизионности

Показатели точности и прецизионности измерений контролируемых показателей при *P* = 0,95 приведены в таблице 1.

Таблица 1 — Показатели точности и прецизионности измерений контролируемых показателей

Наименование показателя	Границы погрешности ±Δ (отн.), %	Предел повторяемости *r* (отн.), %	Предел *R* (отн.), %
Содержание 3-МХПД и эфиров жирных кислот 3-МХПД в пересчете на 3-МХПД	17	12	25
Содержание 2-МХПД и эфиров жирных кислот 2-МХПД в пересчете на 2-МХПД	15	10	25
Содержание ГЭ жирных кислот в пересчете на глицидол	13	9	20

10 Оформление результатов измерений

Вычисления проводят до третьего десятичного знака и округляют до второго.

Приложение А
(справочное)

Метод определения активности липазы

А.1 Сущность метода

Единицы активности липазы определяются титрованием жирных кислот, образующихся при гидролизе оливкового масла.

Одна единица липазы — это количество фермента, вырабатывающего 1 ммоль жирной кислоты в минуту при температуре 37 °С и pH 7,0.

А.2 Средства измерений, вспомогательное оборудование и реактивы

Баня водяная с терморегулятором, обеспечивающим поддержание температуры от 5 °С до 100 °С с точностью ±0,5 °С.

Блендер лабораторный или бытовой, гомогенизатор лабораторный, вихревой смеситель со скоростью вращения ножей до 16 000 об/мин.

Весы лабораторные по ГОСТ OIML R 76-1 с пределом допускаемой абсолютной погрешности не более ±0,01 г.

Мешалка механическая или электромагнитная.

Плитка электрическая с регулятором мощности нагрева по ГОСТ 14919.

Термометр жидкостный стеклянный по ГОСТ 28498 с диапазоном измерения от 0 °С до 100 °С, ценой деления 1 °С.

Холодильник электрический бытовой.

Колба Кн-1(2)–250 ТС по ГОСТ 25336.

Стакан В-1–100(150) ТХС по ГОСТ 25336.

Пипетка 1(2)–1(2)–1–5(10,25) по ГОСТ 29227.

Бюретка 1–1(2,3)–1(2)–25(50) по ГОСТ 29251.

Цилиндр 1(3)–50(100)–1(2) по ГОСТ 1770.

Колбы 2(2а, 4, 4а)–100(1000)–1(2) по ГОСТ 1770.

Холодильник ХПТ-1 ХС по ГОСТ 25336.

Каплеуловитель КО-100 ХС по ГОСТ 25336.

Воронки В-36–80 ХС по ГОСТ 25336.

Секундомер.

Спирт поливиниловый по ГОСТ 10779, марки 16/1,18/11, 20/1, 1-й сорт.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709 или вода для лабораторного анализа по ГОСТ ISO 3696 первой степени очистки.

Глицерин по ГОСТ 6259, ч.д.а. или х.ч.

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328, ч.д.а. или х.ч.

Натрия гидроокись, стандарт-титр.

Кислота соляная по ГОСТ 3118, ч.д.а. или х.ч.

Кислота соляная, стандарт-титр.

Фенолфталеин.

Натрий фосфорнокислый двузамещенный, ч или ч.д.а. по ГОСТ 11773.

Спирт этиловый по ГОСТ 17299, марки А, по ГОСТ 5962 не ниже «высшей очистки».

Ацетон по ГОСТ 2603, ч.д.а.

Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.

Масло оливковое рафинированное дезодорированное по нормативным документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт.

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

А.3 Подготовка к определению

А.3.1 Приготовление раствора эмульгатора

В мерную колбу вместимостью 1000 $см^3$ помещают (20 ± 0,5) г поливинилового спирта, приливают около 800 $см^3$ дистиллированной воды и нагревают на водяной бане при температуре от 75 °С до 80 °С в течение 60 мин, перемешивая. Раствор охлаждают до комнатной температуры, при необходимости фильтруют, доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают.

А.3.2 Приготовление субстрата

В емкость блендера помещают 300 см^3 раствора эмульгатора (А.3.1) (три части по объему) и 100 см^3 оливкового масла (одна часть по объему). Емкость блендера помещают в водяную баню с температурой от 8 °С до 10 °С так, чтобы содержимое емкости было полностью закрыто водой, и перемешивают в блендере со скоростью 12 000—16 000 об/мин в течение 10 мин. Затем полученный субстрат выдерживают в холодильнике при температуре от 8 °С до 10 °С в течение 60 мин. Перед использованием субстрата необходимо убедиться в отсутствии расслоения эмульсии субстрата.

А.3.3 Приготовление раствора фенолфталеина

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 1,0 г фенолфталеина, приливают 70 см^3 этилового спирта и перемешивают до растворения. Объем раствора доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают. Раствор хранят в холодильнике не более шести месяцев.

А.3.4 Приготовление раствора гидроокиси натрия молярной концентрации *c* (NaOH) = 0,05 моль/дм^3

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 вносят (500 ± 1) см^3 раствора гидроокиси натрия молярной концентрации *c*(NaOH) = 1 моль/дм^3, приготовленной по ГОСТ 25794.1—83 (подраздел 2.2) или из стандарт-титра гидроокиси натрия согласно инструкции, прилагаемой к стандарт-титру.

Доводят объем до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

Раствор гидроокиси натрия хранят в закрытой емкости в холодильнике не более двух месяцев.

А.3.5 Приготовление раствора соляной кислоты молярной концентрации *c* (HCl) = 0,05 моль/дм^3

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 вносят (500 ± 1) см^3 раствора соляной кислоты молярной концентрации *c*(HCl) = 0,1 моль/дм^3, приготовленной по ГОСТ 25794.1—83 (подраздел 2.1) или из стандарт-титра соляной кислоты согласно инструкции, прилагаемой к стандарт-титру.

Доводят объем до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают. Раствор соляной кислоты хранят в закрытой емкости, не более шести месяцев.

А.3.6 Приготовление буферного раствора

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 вносят 0,019 г лимонной кислоты и 0,014 г фосфорнокислого двузамещенного натрия, добавляют 60 см^3 дистиллированной воды, перемешивают и доводят до метки дистиллированной водой.

А.3.7 Приготовление смеси этилового спирта с ацетоном

Смесь спирта с ацетоном готовят по объему из одной части этилового эфира и одной части ацетона.

А.4 Выполнение определения

При основном определении в коническую колбу вместимостью 50 см^3 вносят 5 см^3 раствора субстрата (А.3.2) и 4 см^3 буферного раствора (А.3.6), встряхивают и выдерживают на водяной бане при температуре (37 ± 0,5) °С в течение 10 мин. Затем добавляют 1 см^3 раствора липазы (6.2.4), сразу встряхивают и выдерживают при температуре (37 ± 0,5) °С в течение 20 мин для гидролиза субстрата. Добавляют 10 см^3 смеси этанола (95 %) и ацетона (1:1 по объему), встряхивают. Затем добавляют 10 см^3 раствора гидроокиси натрия молярной концентрации *c*(NaOH) = = 0,05 моль/дм^3 и 10 см^3 смеси этилового спирта и ацетона (А.3.7), встряхивают. К полученному раствору добавляют две-три капли раствора индикатора фенолфталеина (А.3.3) и при постоянном перемешивании быстро титруют раствором соляной кислоты молярной концентрации *c*(HCl) = 0,05 моль/дм^3 до исчезновения розовой окраски, устойчивой в течение 30 с.

Параллельно с основным определением выполняют контрольное определение следующим образом. В коническую колбу вместимостью 50 см^3 вносят 5 см^3 раствора субстрата (А.3.2) и 4 см^3 буферного раствора (А.3.6), встряхивают и выдерживают на водяной бане при температуре (37 ± 0,5) °С в течение 10 мин. Затем добавляют 10 см^3 смеси этанола (95 %) и ацетона (1:1 по объему), 1 см^3 раствора липазы (6.2.4), сразу встряхивают. Добавляют 10 см^3 раствора гидроокиси натрия молярной концентрации *c*(NaOH) = 0,05 моль/дм^3, две-три капли раствора индикатора фенолфталеина (А.3.3) и при постоянном перемешивании быстро титруют раствором соляной кислоты молярной концентрации *c*(HCl) = 0,05 моль/дм^3 до исчезновения розовой окраски, устойчивой в течение 30 с.

А.5 Обработка результатов

А.5.1 Активность липазы $A_Л$, единиц/г, вычисляют по формуле

$$A_Л = \frac{50 \cdot (a - b)}{20 \cdot M}, \qquad (А.1)$$

где *a* — объем раствора соляной кислоты, использованный при контрольном определении, см^3;

b — объем раствора соляной кислоты, использованный при основном определении, см^3;

M — количество липазы в 1 см^3 раствора (6.2.4), г.

20 — время гидролиза раствора субстрата, мин.

А.5.2 За результат определения принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений.

Вычисление выполняют с точностью до второго десятичного знака с последующим округлением до первого десятичного знака.

Приложение Б
(обязательное)

Схема подготовки образца

Б.1 Схема подготовки образца приведена на рисунке Б.1.

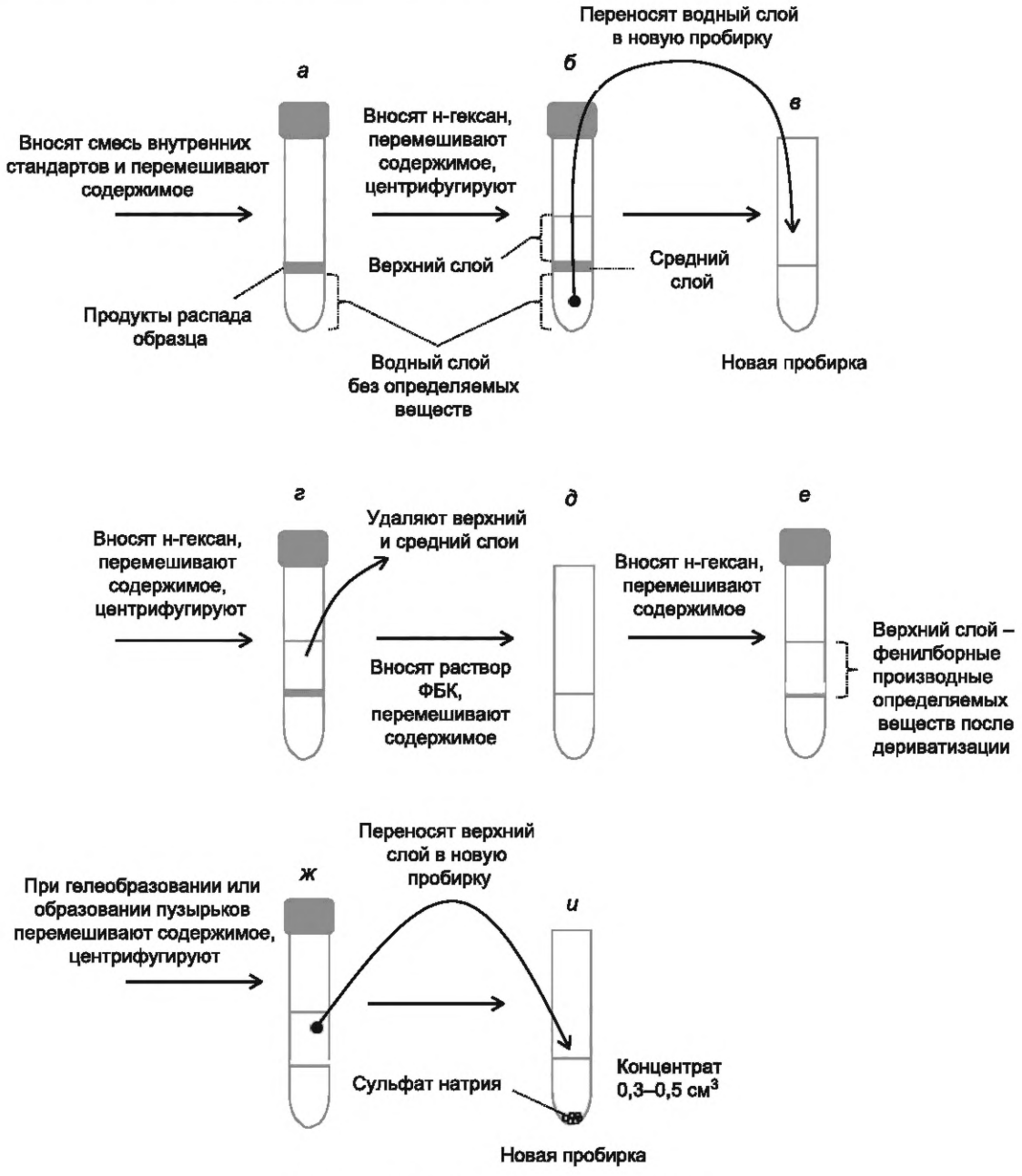

Рисунок Б.1 — Схема подготовки образца

Приложение В
(обязательное)

Хроматограмма фенилборных производных

В.1 ГХ-МС хроматограмма фенилборных производных приведена на рисунке В.1.

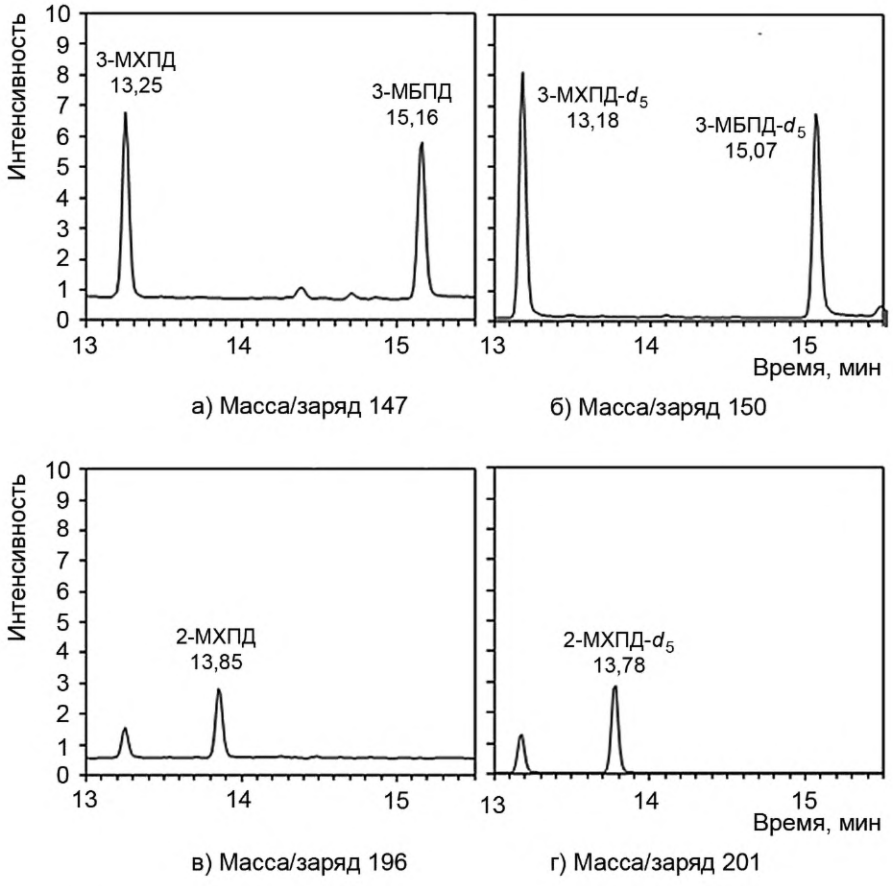

Рисунок В.1 — ГХ-МС хроматограмма фенилборных производных

Приложение Г
(справочное)

Точность метода

Г.1 В совместном исследовании Японского общества химиков-жировиков (JOCS) в 2014—2015 годах, проведенном 13 лабораториями, в двух повторностях были проанализированы пальмовый олеин, пальмовый стеарин, рапсовое масло и масло рисовых отрубей, содержащих более 0,6 мг/кг 3-МХПД и эфиров жирных кислот 3-МХПД в пересчете на 3-МХПД, 2-МХПД и эфиров жирных кислот 2-МХПД в пересчете на 2-МХПД и ГЭ жирных кислот в пересчете на глицидол. Статистические показатели, полученные по результатам совместного исследования 13 лабораторий, приведены в таблицах Г.1—Г.3.

Таблица Г.1

Лаборатория	Номер параллельного определения	Рапсовое масло (высокое содержание определяемых веществ)			Пальмовый стеарин		
		3-МХПД	2-МХПД	ГЭ	3-МХПД	2-МХПД	ГЭ
1	1	3,28	3,94	5,11	3,28	1,82	2,13
	2	3,46	4,01	5,10	3,23	1,87	2,19
2	1	3,28	3,77	4,99	3,31	1,83	2,13
	2	3,43	3,84	5,07	3,42	1,80	2,11
3	1	1,89*	3,07	4,75	1,34	1,35*	1,81
	2	2,52*	3,35	4,65	2,00	1,59*	1,78
4	1	3,96	4,04	5,05	3,04	1,91	2,18
	2	3,78	4,05	5,39	2,91	1,88	2,21
5	1	3,56	4,10	4,70	3,04	1,88	2,00
	2	3,57	4,28	4,77	3,35	1,97	1,87
6	1	3,42	3,85	5,34	2,70	1,80	2,04
	2	3,50	4,02	5,63	2,63	1,78	2,20
7	1	3,63	4,09	5,29	3,64	2,08	2,29
	2	3,80	3,99	5,39	3,93	2,10	2,36
8	1	3,51	3,77	4,94	3,15	1,74	1,95
	2	3,51	3,73	4,92	3,18	1,74	1,95
9	1	3,55	3,91	4,99	3,25	1,80	2,06
	2	3,50	3,90	4,90	3,24	1,85	2,03
10	1	3,54*	3,69	4,79	3,36	2,38*	2,90*
	2	3,02*	3,59	5,30	2,45	1,64*	2,12*
11	1	3,53	3,77	4,89	3,06	1,70	1,85
	2	3,53	3,90	4,65	3,18	1,69	1,83
12	1	3,14	3,54	4,99	3,73	1,69	2,04
	2	3,26	3,66	5,43	3,41	1,75	2,20

Окончание таблицы Г.1

Лаборатория	Номер параллельного определения	Рапсовое масло (высокое содержание определяемых веществ)			Пальмовый стеарин		
		3-МХПД	2-МХПД	ГЭ	3-МХПД	2-МХПД	ГЭ
13	1	3,12	4,78	5,01	2,54	2,18	2,05
	2	3,13	4,74	4,84	2,87	2,24	2,05
Количество лабораторий, оставшихся после исключения резко отклоняющихся значений		11	13	13	13	11	12
Среднее значение		3,48	3,90	5,03	3,05	1,87	2,06
Повторяемость, %							
Стандартное отклонение (SD_r)		0,08	0,09	0,17	0,26	0,03	0,06
Относительное стандартное отклонение (RSD_r)		2,31	2,32	3,44	8,38	1,77	2,77
Воспроизводимость, %							
Стандартное отклонение (SD_R)		0,22	0,36	0,27	0,55	0,16	0,16
Относительное стандартное отклонение (RSD_R)		6,35	9,31	5,28	18,03	8,55	7,65
Коэффициент Хорвица		0,48	0,71	0,42	1,33	0,59	0,53
* Данные отклоняющихся значений определены при помощи критерия Кохрена, критерий Диксона не выявил отклоняющиеся данные.							

Таблица Г.2

Лаборатория	Номер параллельного определения	Пальмовый олеин			Рапсовое масло (высокое содержание определяемых веществ)		
		3-МХПД	2-МХПД	ГЭ	3-МХПД	2-МХПД	ГЭ
1	1	2,92	1,80	2,25	3,17	3,76	5,05
	2	3,04	1,82	2,31	3,00	3,67	4,85
2	1	3,12	1,79	2,33	3,41	3,71	4,99
	2	2,97	1,66	2,30	3,47	3,71	5,05
3	1	1,91*	1,44*	1,99	2,34	3,13	4,92
	2	3,34*	1,79*	1,86	2,19	3,27	4,78
4	1	3,46	1,90	2,58	3,52	3,95	5,13
	2	3,46	1,81	2,49	3,57	3,98	5,31
5	1	3,30	1,94	2,04	3,59	4,29	4,64
	2	3,24	1,93	2,07	3,56	4,18	4,68

Окончание таблицы Г.2

Лаборатория	Номер параллельного определения	Пальмовый олеин			Рапсовое масло (высокое содержание определяемых веществ)		
		3-МХПД	2-МХПД	ГЭ	3-МХПД	2-МХПД	ГЭ
6	1	2,90	1,70	2,24	3,31	3,96	4,97
	2	3,28	1,84	2,35	3,36	3,89	5,12
7	1	3,53	1,96	2,45	3,70	4,00	5,32
	2	3,37	1,97	2,40	3,87	4,10	5,39
8	1	3,04	1,64	2,12	3,46	3,73	5,06
	2	3,16	1,68	2,22	3,47	3,79	5,06
9	1	3,17	1,75	2,25	3,45	3,87	4,89
	2	3,19	1,75	2,21	3,58	3,80	4,96
10	1	3,21*	1,76*	1,91*	3,51	3,72	4,82
	2	2,39*	1,28*	1,58*	3,57	3,76	4,41
11	1	3,25	1,66	2,21	3,55	3,76	4,71
	2	3,33	1,70	2,24	3,40	3,74	4,60
12	1	3,27	1,38	2,29	3,44	3,46	5,64
	2	3,45	1,46	2,29	3,45	3,22	5,62
13	1	2,98	2,20	2,29	3,14	4,60	4,95
	2	2,98	2,27	2,27	2,83	4,44	4,89
Среднее значение		3,20	1,80	2,25	3,34	3,83	4,99
Повторяемость, %							
Стандартное отклонение (SD_r)		0,11	0,05	0,05	0,09	0,08	0,11
Относительное стандартное отклонение (RSD_r)		3,42	2,93	2,21	2,79	2,01	2,20
Воспроизводимость, %							
Стандартное отклонение (SD_R)		0,19	0,21	0,16	0,39	0,35	0,30
Относительное стандартное отклонение (RSD_R)		6,03	11,66	7,18	11,68	9,02	5,98
Коэффициент Хорвица		0,45	0,80	0,51	0,88	0,69	0,48
* Данные отклоняющихся значений определены при помощи критерия Кохрена, Критерий Диксона не выявил отклоняющиеся данные.							

Таблица Г.3

Лаборатория	Номер параллельного определения	Рапсовое масло (низкое содержание определяемых веществ)			Масло из рисовых отрубей		
		3-МХПД	2-МХПД	ГЭ	3-МХПД	2-МХПД	ГЭ
1	1	0,57	0,67	0,90	1,36	1,42	3,69
	2	0,56	0,68	0,91	1,34	1,44	3,86
2	1	0,58	0,57	0,89	1,38	1,38	3,85
	2	0,56	0,57	0,91	1,32	1,32	3,88
3	1	0,24*	0,46*	0,77	0,82*	1,22	3,50
	2	0,94*	0,70*	0,75	1,80*	1,36	3,54
4	1	0,63	0,65	1,01	1,29	1,36	3,86
	2	0,61	0,66	0,97	1,42	1,44	3,98
5	1	0,58	0,66	0,83	1,36	1,52	3,53
	2	0,55	0,58	0,78	1,34	1,56	3,29
6	1	0,56	0,67	0,74*	1,36	1,37	3,71
	2	0,55	0,68	0,91*	1,32	1,36	3,83
7	1	0,83	0,75	0,93	1,40	1,27	3,45
	2	0,84	0,73	0,96	1,58	1,36	3,70
8	1	0,62	0,61	0,84	1,36	1,32	3,83
	2	0,62	0,59	0,83	1,36	1,29	3,59
9	1	0,59	0,59	0,83	1,33	1,30	3,73
	2	0,58	0,57	0,83	1,35	1,31	3,69
10	1	0,60*	0,57	0,81*	1,40	1,25	3,34
	2	1,48*	0,61	0,95*	1,38	1,27	3,42
11	1	0,56	0,56	0,85	1,36	1,27	3,69
	2	0,54	0,57	0,85	1,35	1,30	3,51
12	1	0,76	0,56	0,89	1,61	1,24	3,56
	2	0,81	0,51	0,86	1,77	1,36	3,86
13	1	0,45	0,62	0,86	1,23	1,62	3,76
	2	0,46	0,63	0,85	1,22	1,58	3,77
Количество лабораторий, оставшихся после исключения резко отклоняющихся значений		11	12	11	12	13	13
Среднее значение		0,61	0,62	0,87	1,38	1,37	3,67
Повторяемость, %							
Стандартное отклонение (SD_r)		0,02	0,02	0,02	0,06	0,05	0,12
Относительное стандартное отклонение (RSD_r)		2,62	3,41	1,89	4,23	3,41	3,23

Окончание таблицы Г.3

Лаборатория	Номер параллельного определения	Рапсовое масло (низкое содержание определяемых веществ)			Масло из рисовых отрубей		
		3-МХПД	2-МХПД	ГЭ	3-МХПД	2-МХПД	ГЭ
Воспроизводимость, %							
Стандартное отклонение (SD_R)		0,11	0,06	0,07	0,12	0,11	0,18
Относительное стандартное отклонение (RSD_R)		18,03	9,73	7,49	8,74	7,93	5,02
Коэффициент Хорвица		1,05	0,57	0,46	0,57	0,52	0,38
* Данные отклоняющихся значений определены при помощи критерия Кохрена, критерий Диксона не выявил отклоняющиеся данные.							

УДК 66.094.941:006.354 МКС 67.200.10

Ключевые слова: жиры животные, масла растительные, сложные эфиры жирных кислот, глицидиловые эфиры, ферментативный гидролиз

Редактор *Л.В. Коретникова*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *И.А. Королева*
Компьютерная верстка *А.Н. Золотаревой*

Сдано в набор 08.11.2022. Подписано в печать 16.11.2022. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 3,26. Уч.-изд. л. 2,77.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

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

МКС 67.200.10

Поправка к ГОСТ 34900—2022 Жиры и масла животные и растительные. Определение содержания 2-монохлорпропандиола и эфиров жирных кислот 2-монохлорпропандиола, 3-монохлорпропандиола и эфиров жирных кислот 3-монохлорпропандиола и глицидиловых эфиров жирных кислот с применением ферментативного гидролиза

В каком месте	Напечатано	Должно быть
Пункт 5.1, первое перечисление	- весы неавтоматического действия по ГОСТ OIML R 76-1 с максимальной нагрузкой не более 200 г и пределом допускаемой погрешности ±0,01 мг;	- весы неавтоматического действия специального (I) класса точности по ГОСТ OIML R 76-1 с действительной ценой деления не более 0,01 мг; - весы неавтоматического действия высокого (II) класса точности по ГОСТ OIML R 76-1 с действительной ценой деления не более 0,001 мг;
Подраздел А.2, третий абзац	Весы лабораторные по ГОСТ OIML R 76-1 с пределом допускаемой абсолютной погрешности не более ±0,01 г.	Весы неавтоматического действия специального (I) или высокого (II) класса точности по ГОСТ OIML R 76-1 с действительной ценой деления не более 0,001 г.

(ИУС № 12 2023 г.)

Поправка к ГОСТ 34900—2022 Жиры и масла животные и растительные. Определение содержания 2-монохлорпропандиола и эфиров жирных кислот 2-монохлорпропандиола, 3-монохлорпропандиола и эфиров жирных кислот 3-монохлорпропандиола и глицидиловых эфиров жирных кислот с применением ферментативного гидролиза

В каком месте	Напечатано	Должно быть		
Предисловие. Таблица согласования	—	Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан

(ИУС № 6 2024 г.)

gost.e-ecolog.ru