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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ
СТАНДАРТ

**ГОСТ
ISO 9936—
2024**

ЖИРЫ И МАСЛА ЖИВОТНЫЕ И РАСТИТЕЛЬНЫЕ

Определение содержания токоферолов и токотриенолов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

(ISO 9936:2016, IDT)

Издание официальное

**Москва
Российский институт стандартизации
2024**

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 ПОДГОТОВЛЕН Федеральным государственным бюджетным научным учреждением «Всероссийский научно-исследовательский институт жиров» (ВНИИЖиров) на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии стандарта, указанного в пункте 5

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 31 июля 2024 г. № 175-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
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Узбекистан	UZ	Узбекское агентство по техническому регулированию

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 1 августа 2024 г. № 1013-ст межгосударственный стандарт ГОСТ ISO 9936—2024 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 апреля 2025 г.

5 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 9936:2016 «Жиры и масла животные и растительные. Определение содержания токоферолов и токотриенолов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии» («Animal and vegetable fats and oils — Determination of tocopherol and tocotrienol contents by high-performance liquid chromatography», IDT).

Международный стандарт разработан Подкомитетом SC 11 «Жиры и масла животные и растительные» Технического комитета ISO/TC 34 «Пищевые продукты» Международной организации по стандартизации (ISO).

При применении настоящего стандарта рекомендуется использовать вместо ссылочных международных стандартов соответствующие им межгосударственные стандарты, сведения о которых приведены в дополнительном приложении ДА

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

7 Некоторые элементы настоящего стандарта могут быть объектом патентных прав. Международная организация по стандартизации (ISO) не несет ответственность за идентификацию каких-либо или всех патентных прав

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»

© ISO, 2016
© Оформление. ФГБУ «Институт стандартизации», 2024

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 Термин и определение 1
4 Сущность метода 1
5 Реактивы 2
6 Оборудование 2
7 Отбор проб 3
8 Приготовление пробы для испытания 3
9 Проведение испытания 3
10 Обработка результатов 5
11 Точность 6
12 Протокол испытания 6
Приложение А (справочное) Примеры хроматограмм 7
Приложение В (справочное) Омыление 9
Приложение С (справочное) Результаты межлабораторных испытаний 10
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов межгосударственным стандартам 15
Библиография 16

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 токоферолов и токотриенолов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Animal and vegetable fats and oils. Determination of tocopherol and tocotrienol contents by high-performance liquid chromatography

Дата введения — 2025—04—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения содержания свободных α-, β-, γ- и δ-токоферолов и токотриенолов (совместно называемые токолами) в животных и растительных жирах и маслах (далее — жиры) с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Для продуктов, содержащих сложные эфиры токоферола или токотриенола, необходимо проводить предварительное омыление.

Молоко и молочные продукты (или жиры, выделенные из молока и молочных продуктов) не относятся к области применения настоящего стандарта

Примечание — Пригодный метод, включающий процедуру холодного омыления, приведен в приложении В в качестве справочного.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использована нормативная ссылка на следующий стандарт [для датированной ссылки применяют только указанное издание ссылочного стандарта, для недатированной — последнее издание (включая все изменения)]:

ISO 661, Animal and vegetable fats and oils — Preparation of test sample (Жиры и масла животные и растительные. Приготовление пробы для испытания)

3 Термин и определение

В настоящем стандарте применен следующий термин с соответствующим определением:

3.1 **содержание токолов** (tocol content): Массовая доля индивидуальных токолов, определяемая методом, установленным настоящим стандартом.

Примечание — Содержание выражают в миллиграммах на килограмм с округлением результата до целого числа.

4 Сущность метода

Испытуемую пробу растворяют в н-гептане, и индивидуальные токолы разделяют с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Содержание каждого токола рассчитывают с использованием калибровочных коэффициентов, определяемых по калибровочным растворам.

Издание официальное

5 Реактивы

Следует использовать только реактивы квалификации «для ВЭЖХ» или эквивалентной чистоты.

5.1 Стандарты α-, β-, γ- и δ-токоферолов и токотриенолов

Если стандарты токоферолов недоступны, для идентификации α-, β-, γ- и δ-токоферолов можно использовать смесь масла зародышей пшеницы и соевого масла.

Если стандарты токотриенолов недоступны, для идентификации α- и γ-токотриенолов можно использовать пальмовое масло. Полученные хроматограммы могут способствовать идентификации пиков на хроматограммах испытуемых проб, в этом случае следует использовать калибровочные коэффициенты для соответствующих токоферолов.

Примечание — Стандарты α-, β-, γ- и δ-токоферола и токотриенола могут быть получены от Merck[1)]; α-токоферол может быть получен от различных поставщиков. Стандарты токотриенола доступны от Sigma Aldrich[2)]. Чистота некоторых коммерчески доступных стандартов токоферола может варьироваться от 85 % до 100 %. Таким образом, важно определить концентрацию приготовленных калибровочных растворов методом УФ-спектрометрии (9.1.1).

5.2 Тетрагидрофуран, отфильтрованный через нейлоновый фильтр для ВЭЖХ (0,45 мкм).

5.3 н-Гептан, отфильтрованный через нейлоновый фильтр для ВЭЖХ (0,45 мкм).

5.4 Подвижная фаза ВЭЖХ.

Следует использовать любую подходящую смесь растворителей, которая, как подтвердилось, обеспечивает хроматографическое разрешение пиков не хуже, чем данные, которые приведены в таблице 2 (относительное время удерживания токоферолов и токотриенолов) и в приложении А (хроматограммы смеси растительных масел), (см. таблицу С.3).

Хорошее разделение γ-токоферола и β-токотриенола может быть достигнуто при использовании смеси 5 % (по объему) метил-трет-бутилового эфира +95 % (по объему) н-гептана и диоловой колонки.

Подходящую подвижную фазу, 3,85 % (объемная доля) раствора тетрагидрофурана в н-гептане готовят следующим образом. Используя мерный цилиндр вместимостью 1000 см^3 (6.5), наливают 1000 см^3 н-гептана (5.3) в 2-литровую склянку. Добавляют дважды по 20 см^3 тетрагидрофурана (5.2) с помощью мерной пипетки на 20 см^3 (6.6). Гомогенизируют подвижную фазу с помощью ультразвуковой ванны (6.8) в течение 15 мин.

5.5 Метанол.

6 Оборудование

Используется стандартное лабораторное оборудование, в частности, следующее.

6.1 Система ВЭЖХ, состоящая из насоса высокого давления, устройства для ввода пробы, термостата колонки, настроенного на 25 °С (опционально), детектора флуоресценции с установленной длиной волны возбуждения 295 нм и длиной волны испускания 330 нм, а также регистрирующего интегратора.

Если флуоресцентный детектор недоступен, можно использовать ультрафиолетовый (УФ) детектор, но это не рекомендуется. Однако, если используется УФ-детектор, длина волны должна быть установлена на 292 нм.

[1)] Набор Merck Tocopherol 613424 доступен от Calbiochem (gost.e-ecolog.ru). Он содержит по одному флакону, по 50 мг каждый DL-α-токоферола, D-β-токоферола, D-γ-токоферола и D-δ-токоферола с чистотой 95 % по данным ВЭЖХ (для каждого компонента). Набор Merck Tocotrienol 613432 также доступен от Calbiochem. Он содержит по одному флакону по 50 мг каждый α-токотриенола, β-токотриенола, γ-токотриенола и δ-токотриенола с чистотой 95 % по данным ВЭЖХ (75 % для γ-токотриенола). Эта информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не означает одобрения названных продуктов со стороны ISO. Могут быть использованы эквивалентные продукты, если они обеспечивают одинаковые результаты.

[2)] Токотриенолы доступны от Sigma Aldrich (gost.e-ecolog.ru) и от Chromadex (gost.e-ecolog.ru) с чистотой от 65 % до 98 %. Эта информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не означает одобрения названных продуктов со стороны ISO. Могут быть использованы эквивалентные продукты, если они обеспечивают одинаковые результаты.

6.2 Аналитическая колонка ВЭЖХ, возможны два типа колонки:

- 250 мм × 4 мм, заполненные микрочастицами диола со средним размером частиц около 5 мкм, или

- 250 мм × 4,6 мм, заполненные микрочастицами диоксида кремния со средним размером частиц около 5 мкм.

Примечания

1 Подходящим коммерчески доступным наполнителем диоловой колонки с диоксидом кремния является 5 мкм LiChrospher 100 Diol; подходящими материалами для наполнения колонки с диоксидом кремния, доступными в продаже, являются LiChrosob SI 60 с размером частиц 5 мкм и Kromasil 100[3)]. Если в пробе ожидается наличие β-токотриенола, предпочтительнее использовать диоловую колонку с диоксидом кремния, так как при использовании колонки с диоксидом кремния γ-токоферол и β-токотриенол элюируются совместно.

2 Длина и диаметр колонки могут варьироваться в зависимости от используемого метода ВЭЖХ.

3 Оба типа колонок были использованы для оценки точности (приложение С).

6.3 УФ-спектрометр, пригодный для абсолютного измерения абсорбции при точно определенных длинах волн, с кюветой с длиной оптического пути 10 мм.

6.4 Испаритель ротационный.

6.5 Цилиндр мерный вместимостью 1000 $см^3$.

6.6 Пипетки мерные вместимостью 5; 10; 20 $см^3$.

6.7 Колбы мерные вместимостью 50; 25 $см^3$.

6.8 Баня ультразвуковая.

7 Отбор проб

В лабораторию следует направлять представительную пробу. Важно, чтобы проба не была повреждена или изменена во время транспортирования или хранения.

Отбор проб не является частью метода, установленного настоящим стандартом. Рекомендуемый метод отбора проб приведен в ISO 5555.

8 Приготовление пробы для испытания

В случае жидких лабораторных проб пробу для испытания готовят путем гомогенизации, как описано в ISO 661, за исключением случаев, когда следует избегать фильтрации.

В случае твердых проб представительную часть (т. е. не менее 10 % лабораторной пробы по массе) переносят в стеклянный стакан и тщательно гомогенизируют путем расплавления при осторожном перемешивании на водяной бане при температуре не выше 40 °С.

Приготовление проб для испытания следует проводить, насколько это практически возможно, при слабом освещении и во всех случаях вдали от прямого солнечного света.

9 Проведение испытания

ВАЖНО — Обычно окисление токолов во время анализа может привести к заниженным результатам. Скорость окисления увеличивается в присутствии щелочей или под влиянием тепла или света, и следует принимать меры для защиты от этих воздействий.

9.1 Приготовление калибровочных растворов

9.1.1 Исходные калибровочные растворы

Готовят исходный раствор каждого токола, взвешивая (10 ± 1) мг стандарта (5.1) в мерной колбе вместимостью 50 $см^3$ (6.7) и разбавляя до метки н-гептаном (5.3).

Пипеткой (6.6) переносят 5 $см^3$ этого раствора в круглодонную колбу из темного стекла и отгоняют весь н-гептан на ротационном испарителе (6.4) под вакуумом при температуре не выше 40 °С. Сразу же после удаления всего растворителя сбрасывают вакуум азотом и отсоединяют колбу от испарителя. Пипеткой (6.6) приливают в колбу 10 $см^3$ метанола (5.5) и взбалтывают до растворения остатка. Измеряют

[3)] Эти типы колонок являются примерами подходящих продуктов, имеющихся в продаже. Эта информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не означает продвижения этих продуктов.

максимальное поглощение этого раствора в диапазоне длин волн от 270 до 310 нм (см. соответствующую длину волны в таблице 1), используя УФ-спектрометр (6.3), в кювете с длиной оптического пути 10 мм. Измеренная абсорбция должна быть между 0,2 и 0,8. Рассчитывают концентрацию (в микрограммах на кубический сантиметр), разделив значение абсорбции на соответствующий коэффициент, указанный в таблице 1.

Таблица 1 — Коэффициенты-делители

Длина волны, нм	Токоферол	Коэффициенты
292	α-токоферол	0,0076
296	β-токоферол	0,0089
298	γ-токоферол	0,0091
298	δ-токоферол	0,0087
Примечание — Приведенные коэффициенты получены из значений E (1 %/1 см) токоферолов. Например, значение E (1 %/1 см) α-токоферола составляет 76 при 292 нм (в метаноле); поэтому раствор α-токоферола (1 мкг/см^3) будет иметь поглощение 0,0076 при 292 нм.		

9.1.2 Стандартный раствор

Готовят подходящий стандартный раствор в соответствии с чувствительностью используемого флуоресцентного детектора.

В качестве примера приведено приготовление рабочего раствора следующим способом: смешивают соответствующие объемы, например 1 см^3, исходных калибровочных растворов (см. 9.1.1) для получения смешанного стандартного раствора токола и разбавляют н-гептаном, чтобы получить раствор с концентрацией каждого стандарта от 1 до 5 мкг/см^3.

Стандартный раствор следует готовить каждый рабочий день.

Все растворы защищают от света и хранят при температуре от 0 °C до 4 °C.

Исходные стандартные растворы могут храниться в холодильнике в посуде из темного стекла до одной недели. Колбы можно обернуть алюминиевой фольгой.

Примечание — Если используется УФ-детектор, может потребоваться более концентрированный раствор.

9.2 Оптимизация рабочих параметров

9.2.1 Если колонка (6.2) новая или история ее использования неизвестна, или если по какой-либо другой причине ее необходимо подготовить, то колонку промывают и кондиционируют в течение 10 минут метанолом, потом дихлорметаном, а затем н-гептаном при скорости потока около 1 см^3/мин.

Прокачивают подвижную фазу ВЭЖХ (5.4) через колонку со скоростью потока 1 см^3/мин в течение не менее 30 мин.

ВАЖНО — Метанол и дихлорметан опасны для человека и окружающей среды. Следует обращаться с ними осторожно.

9.2.2 В колонку вводят 10 или 20 мкл (в зависимости от чувствительности детектора) стандартного раствора (см. 9.1.2) и при необходимости регулируют содержание тетрагидрофурана в подвижной фазе и скорость потока для достижения следующих условий:

a) время удерживания α-токоферола от 8 до 12 минут;

b) коэффициент разрешения, RF, для разделения β- и γ-токоферолов не менее 1,0; то есть почти базовое разделение, где RF рассчитывают по формуле

$$RF = \frac{d_r(\mathrm{I}) - d_r(\mathrm{II})}{0{,}5 \cdot \left[b(\mathrm{I}) + b(\mathrm{II}) \right]}, \quad (1)$$

где d_r(I) — расстояние удерживания γ-токоферола;

d_r(II) — расстояние удерживания β-токоферола;

b(I) — ширина основания пика γ-токоферола;

b(II) — ширина основания пика β-токоферола.

9.2.3 Выбирают оптимальные настройки для системы обнаружения и интеграции. Вводят 10 или 20 мкл стандартного раствора (см. 9.1.2). Повторяют введение, чтобы убедиться, что получены воспроизводимые хроматограммы.

9.3 Приготовление испытуемого раствора

В зависимости от концентрации токола (см. 9.1.2) взвешивают с точностью до 1 мг (0,25 ± 0,1) г пробы для испытания (см. раздел 8) в мерную колбу с одной меткой вместимостью 25 см^3. Добавляют некоторое количество н-гептана (5.3), взбалтывая растворяют навеску и разбавляют до метки тем же растворителем. Отфильтровывают раствор через нейлоновый фильтр для ВЭЖХ 0,45 мкм, если раствор непрозрачен.

Важно, чтобы испытуемые растворы были защищены от света перед анализом и проанализированы в день приготовления.

Примечание — Возможно, потребуется приготовить более концентрированный раствор или дополнительно разбавить раствор перед хроматографированием.

9.4 Измерение

9.4.1 В колонку вводят 10 или 20 мкл стандартного раствора (см. 9.1.2) (в зависимости от чувствительности детектора) и записывают площади пиков.

9.4.2 Вводят 10 или 20 мкл (в соответствии с чувствительностью детектора) испытуемого раствора (см. 9.3) в колонку и определяют присутствующие токолы по калибровочным хроматограммам. Записывают площади пиков. Повторяют введение испытуемого раствора и измерение. За результат принимают среднее значение двух измерений.

Вводят еще 10 или 20 мкл (в зависимости от чувствительности детектора) стандартного раствора (см. 9.1.2) и записывают площади пиков.

Относительные значения времени удерживания, приведенные в таблице 2, считаются типичными.

Таблица 2 — Пример относительного времени удерживания токоферолов и токотриенолов

Колонка с диоксидом кремния (α-токоферол как вещество сравнения)		Диоловая колонка (α-токоферол как вещество сравнения)	
α-токоферол = 1,00	α-токотриенол = 1,19	α-токоферол = 1,00	α-токотриенол = 1,24
β-токоферол = 1,34	β-токотриенол = 1,63	β-токоферол = 1,59	β-токотриенол = 2,03
γ-токоферол = 1,63	γ-токотриенол = 2,00	γ-токоферол = 1,74	γ-токотриенол = 2,22
δ-токоферол = 2,24	δ-токотриенол = 2,79	δ-токоферол = 2,46	δ-токотриенол = 3,19

10 Обработка результатов

Содержание α-токоферола w в пробе, выраженное в миллиграммах на килограмм (мг/кг), рассчитывают по формуле

$$w = \frac{\rho \cdot \overline{A}_t \cdot V}{\overline{A}_s \cdot m}, \quad (2)$$

где ρ — концентрация α-токоферола в стандартном растворе (9.1.2), мкг/см^3;

$\overline{A}_s$ — среднее значение площадей пиков, полученных для стандарта α-токоферола;

$\overline{A}_t$ — среднее значение площадей пиков, полученных для α-токоферола в испытуемой пробе;

m — масса пробы (9.3), г;

V — объем приготовленного испытуемого раствора, равный 25 см^3.

Рассчитывают содержание остальных токолов в испытуемой пробе таким же образом, используя данные, полученные для соответствующего стандарта.

Если единственным доступным стандартом является α-токоферол, соотносят все токоферолы с этим стандартом, но четко указывают это при представлении результатов. Если используется УФ-детектирование, также соотносят все токоферолы со стандартом α-токоферола, но корректируют площади пиков по α-токоферолу, используя коэффициенты, приведенные в 9.1.1.

Примечание — Интенсивность флуоресценции токотриенолов такая же, как и у соответствующих токоферолов, и УФ-поглощение аналогично.

Содержание выражают в миллиграммах на килограмм с округлением результата до целого числа.

11 Точность

11.1 Межлабораторные испытания

Подробная информация о межлабораторных испытаниях точности метода приведена в приложении С. Значения, полученные в результате этих испытаний, могут быть неприменимы к диапазонам концентраций и матрицам, отличающимся от приведенных.

11.2 Повторяемость

Абсолютное расхождение между двумя независимыми единичными результатами испытаний, полученными с использованием одного и того же метода на идентичном испытуемом материале в одной и той же лаборатории одним и тем же оператором с использованием одного и того же оборудования в короткий промежуток времени не должно более чем в 5 % случаев превышать значения *r*, приведенные в таблице 3.

11.3 Воспроизводимость

Абсолютное расхождение между двумя отдельными результатами испытаний, полученными одним и тем же методом на идентичном испытуемом материале в разных лабораториях разными операторами на различном оборудовании не должно более чем в 5 % случаев превышать значения *R*, приведенные в таблице 3.

Таблица 3 — Предел повторяемости *r* и предел воспроизводимости *R*

Содержание токоферола, мг/кг	Диапазон концентрации, мг/кг	*r*, мг/кг	*R*, мг/кг
T_1 = среднее значение содержания индивидуального токоферола	От 0 до 2220	$0{,}0825T_1$	$0{,}2094T_1$
T_2 = среднее значение содержания индивидуального токотриенола	От 10 до 210	$0{,}0900T_2$	$0{,}2552T_2$
T_3 = среднее значение общего содержания (токоферолы + токотриенолы)	От 200 до 3250	$0{,}0718T_3$	$0{,}2557T_3$

12 Протокол испытания

Протокол испытаний должен содержать следующее:

a) всю информацию, необходимую для полной идентификации пробы;

b) используемый метод отбора проб, если он известен;

c) используемый метод испытаний со ссылкой на настоящий стандарт;

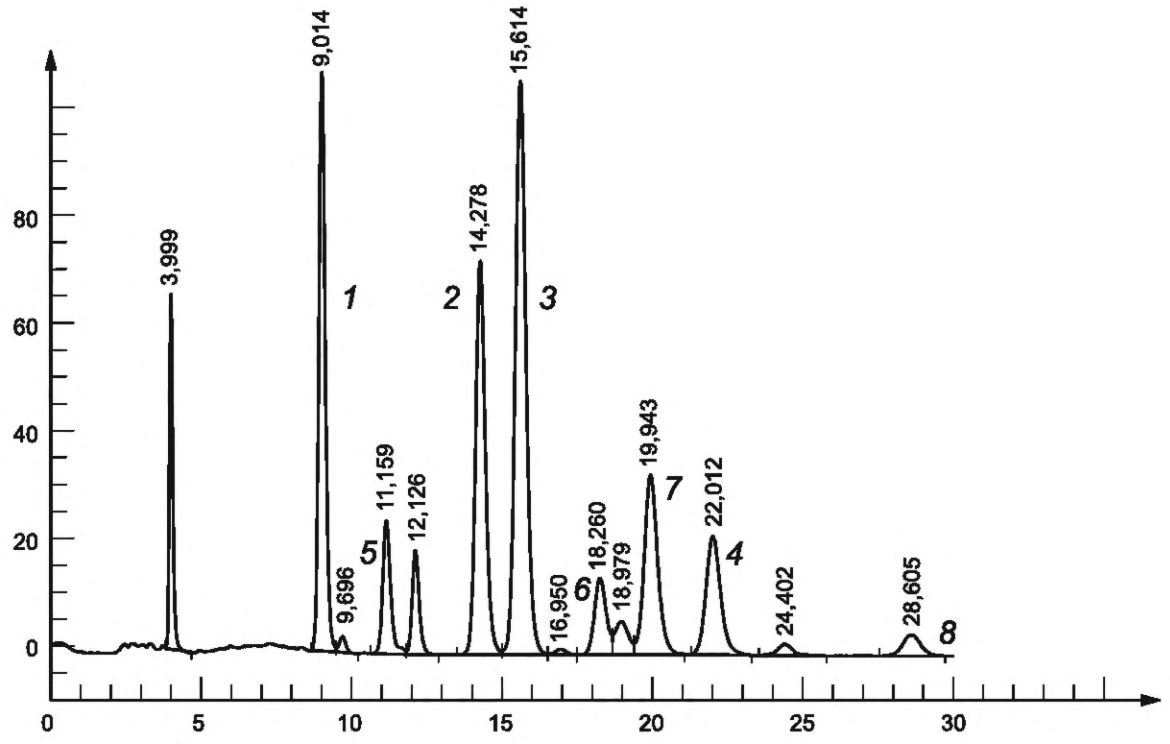
d) все подробности процедуры, не указанные в настоящем стандарте или рассматриваемые как необязательные, а также данные о любых инцидентах, которые могли повлиять на результат(ы) испытания;

e) полученные результаты испытаний;

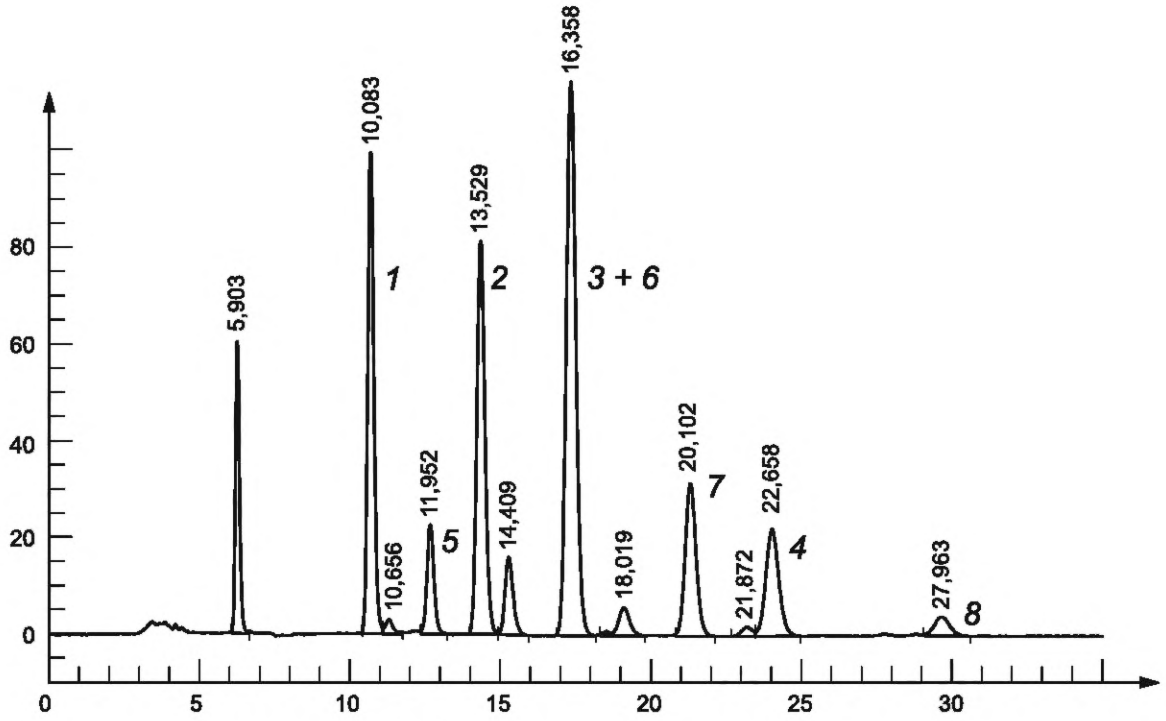
f) окончательный результат, если соблюдены условия повторяемости.

Приложение А
(справочное)

Примеры хроматограмм



а) Диоловая колонка



b) Колонка с диоксидом кремния

Идентификация пиков:
1 — α-токоферол;
2 — β-токоферол;
3 — γ-токоферол;
4 — δ-токоферол;
5 — α-токотриенол;
6 — β-токотриенол;
7 — γ-токотриенол;
8 — δ-токотриенол

Условия:
Подвижная фаза: 3,85 % (объемная доля) ТГФ (тетрагидрофуран) в н-гептане.
Скорость потока: 1 $см^3$/мин.
Детектор: флуоресцентный

Примечание — На хроматограммах, показанных выше, на оси *x* указано время в минутах, на оси *y* — количество.

Рисунок А.1 — Смесь растительных масел (соевое, виноградных косточек, зародышей пшеницы, пальмовое) с добавлением α-токоферола ацетата

Приложение В
(справочное)

Омыление

В.1 Общие положения

При анализе переработанных продуктов, содержащих добавленные эфиры токоферола или токотриенола, перед хроматографированием следует провести процедуру холодного омыления. Целесообразно одновременно анализировать пробы, содержащие известные количества сложных эфиров.

В.2 Реактивы

Следует использовать реактивы только аналитической степени чистоты.

В.2.1 Этанол, w = 94 г/100 г—96 г/100 г.

В.2.2 Этанол абсолютный, $w \geq 99{,}7$ г/100 г.

В.2.3 Пирогаллол.

В.2.4 Гидроокись калия, водный раствор, w = 60 г/100 г.

В.2.5 Диэтиловый эфир, свободный от перекисей, содержащий 0,1 % пирогаллола.

В.2.6 Соляная кислота, c(HCl) = 0,01 моль/л.

В.2.7 Сульфат натрия безводный.

В.2.8 Вода, отвечающая требованиям 3-го класса по ISO 3696.

В.3 Процедура

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ — Особое внимание следует уделять температуре и времени омыления, в противном случае возможна недостаточная степень восстановления токолов из сложных эфиров.

Точно взвешивают около 2 г хорошо перемешанной пробы в плоскодонной колбе вместимостью 100 см^3 и тщательно диспергируют расплавленную пробу примерно в 8 см^3 этанола (В.2.1) путем осторожного перемешивания. Добавляют 100 мг пирогаллола (В.2.3) и перемешивают до растворения.

Продувают колбу азотом, добавляют 4 см^3 раствора гидроокиси калия (В.2.4), повторно продувают колбу азотом и закрывают стеклянной пробкой. Помещают колбу на водяную баню с температурой 26 °С и энергично встряхивают в течение 10 мин или до завершения омыления. Все операции выполняют при отсутствии прямых солнечных лучей, используя посуду из темного стекла или закрывая ее алюминиевой фольгой.

В колбу добавляют 50 см^3 воды (В.2.8) и количественно переносят содержимое в делительную воронку вместимостью 250 см^3. Колбу промывают 50 см^3 диэтилового эфира (В.2.5) и переносят промывную жидкость в воронку. Энергично встряхивают делительную воронку в течение 1 мин, время от времени сбрасывая давление. Дают слоям разделиться и сливают нижний водный слой. Водный слой экстрагируют еще четыре раза порциями по 30 см^3 диэтилового эфира и объединяют эфирные экстракты.

Объединенные экстракты диэтилового эфира промывают 50 см^3 воды (осторожно встряхивая, чтобы избежать образования эмульсии), а затем 30 см^3 разбавленной соляной кислоты (В.2.6). Добавляют около 3 г безводного сульфата натрия (В.2.7) при осторожном перемешивании для поглощения воды. Фильтруют эфирные экстракты через бумагу для разделения фаз и собирают фильтрат в круглодонную колбу из темного стекла для ротационного испарителя. Отгоняют эфир при пониженном давлении при температуре не выше 40 °С. Если в колбе остается жидкий остаток, добавляют этанол (В.2.2) и выпаривают досуха.

Стенки колбы обмывают н-гептаном (5.3), содержимое количественно переносят в мерную колбу с одной меткой вместимостью 50 см^3 и доводят до метки н-гептаном. Выполняют соответствующее разведение приготовленного испытуемого раствора (как описано в 9.3) и переходят к 9.4.

Приложение С
(справочное)

Результаты межлабораторных испытаний

Точность метода установлена международными межлабораторными испытаниями, организованными в 2003 г. Институтом исследований липидов Федерального научного центра питания и пищевых продуктов (Мюнстер, Германия) и проведенных в соответствии с ISO 5725-1 и ISO 5725-2. В этом испытании участвовали 12 лабораторий из четырех стран (одна из Венгрии, одна из Канады, четыре из Франции, шесть из Германии), и были исследованы пробы восьми различных типов жира (см. таблицу С.1). Статистическая сводка результатов приведена в таблице С.2.

Различные типы подвижных фаз для ВЭЖХ, используемые участниками этого испытания, перечислены в таблице С.3. В то время как шесть участников использовали колонку с силикагелем, шесть участников также использовали диоловую колонку. Следовательно, статистические результаты, приведенные в таблице В.2, действительны для обоих типов колонок.

Таблица С.1 — Описание проб

Проба A	Масло из зародышей пшеницы
Проба B	50 % масла из зародышей пшеницы + 50 % кукурузного масла
Проба C	25 % масла из зародышей пшеницы + 75 % кукурузного масла
Проба D	25 % масла из зародышей пшеницы + 75 % соевого масла
Проба E	10 % масла из зародышей пшеницы + 90 % пальмового масла
Проба F	25 % масла из зародышей пшеницы + 75 % пальмового масла
Проба G	Пальмовое масло
Проба H	Оливковое масло первого отжима

Таблица С.2 — Статистические данные

α-Токоферол	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**
Количество участвующих лабораторий	12	12	12	12	12	12	12	12
Количество лабораторий, оставшихся после исключения выбросов	12	12	12	12	12	12	11	11
Количество результатов испытаний во всех лабораториях	24,0	24,0	24,0	24,0	24,0	24,0	22,0	22,0
Среднее значение, мг/кг	2214,5	1284,8	813,7	662,8	311,5	625,0	106,5	193,1
Стандартное отклонение повторяемости s_r, мг/кг	68,3	34,9	24,3	18,4	10,4	25,4	5,0	7,8
Относительное стандартное отклонение повторяемости, %	3,1	2,7	3,0	2,8	3,3	4,1	4,7	4,0
Предел повторяемости r, мг/кг	191,3	97,7	68,1	51,5	29,1	71,1	13,9	21, 7
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мг/кг	173,1	87,9	56,4	48,5	20,9	38,1	7,1	11,4
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости, %	7,8	6,8	6,9	7,3	6,7	6,1	6,6	5,9
Предел воспроизводимости R, мг/кг	484,7	246,1	157,8	135,9	58,4	106,6	19,7	31,8

Продолжение таблицы С.2

β-Токоферол	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**
Количество участвующих лабораторий	12	12	12	12	12	12	7	9
Количество лабораторий, оставшихся после исключения выбросов	12	12	12	12	12	12	7	9
Количество результатов испытаний во всех лабораториях	24,0	24,0	24,0	24,0	24,0	24,0	14,0	18,0
Среднее значение, мг/кг	841,4	417,8	212,5	214,5	79,1	202,6	0,7	2,2
Стандартное отклонение повторяемости s_r, мг/кг	22,6	6,8	5,1	6,1	2,8	7,6	0,0	0,3
Относительное стандартное отклонение повторяемости, %	2,7	1,6	2,4	2,8	3,5	3,7	0,0	15,0
Предел повторяемости r, мг/кг	63,4	19,0	14,3	17,1	7,8	21,2	0,0	0,9
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мг/кг	108,3	55,7	24,7	26,3	10,2	25,9	1,1	0,7
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости, %	12,9	13,3	11,6	12,3	12,9	12,8	155,8	29,8
Предел воспроизводимости R, мг/кг	303,1	156,0	69,1	73,8	28,7	72,4	3,1	1,9
γ-Токоферол	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**
Количество участвующих лабораторий	10	12	12	12		8		12
Количество лабораторий, оставшихся после исключения выбросов	6	11	7	9		8		12
Количество результатов испытаний во всех лабораториях	12,0	22,0	14,0	18,0		16,0		24,0
Среднее значение, мг/кг	19,5	403,8	546,6	325,4		3,6		13,8
Стандартное отклонение повторяемости s_r, мг/кг	1,4	7,5	11,7	10,5		0,4		1,1
Относительное стандартное отклонение повторяемости, %	7,3	1,9	2,1	3,2		9,8		8,1
Предел повторяемости r, мг/кг	4,0	21,0	32,7	29,4		1,0		3,1
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мг/кг	2,4	62,9	12,3	19,2		2,2		4,2
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости, %	12,5	15,6	2,3	5,9		59,7		30,2
Предел воспроизводимости R, мг/кг	6,8	176,0	34,5	53,8		6,1		11,6
δ-Токоферол	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**
Количество участвующих лабораторий		12	12	12				
Количество лабораторий, оставшихся после исключения выбросов		10	12	12				

Продолжение таблицы С.2

δ-Токоферол	A	B	C	D	E	F	G	H
Количество результатов испытаний во всех лабораториях		20,0	24,0	24,0				
Среднее значение, мг/кг		13,0	20,0	71,0				
Стандартное отклонение повторяемости s_r, мг/кг		0,6	1,7	2,5				
Относительное стандартное отклонение повторяемости, %		4,9	8,5	3,5				
Предел повторяемости r, мг/кг		1,8	4,7	6,9				
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мг/кг		2,7	3,9	8,3				
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости, %		20,8	19,3	11,6				
Предел воспроизводимости R, мг/кг		7,6	10,8	23,1				
α-Токотриенол	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**
Количество участвующих лабораторий	9	9	8	7	9	9	9	
Количество лабораторий, оставшихся после исключения выбросов	7	7	7	7	8	8	8	
Количество результатов испытаний во всех лабораториях	14,0	14,0	14,0	14,0	16,0	16,0	16,0	
Среднее значение, мг/кг	42,0	25,1	18,1	10,1	149,7	138,1	162,5	
Стандартное отклонение повторяемости s_r, мг/кг	1,1	1,2	0,8	0,9	5,3	7,4	5,0	
Относительное стандартное отклонение повторяемости, %	2,5	4,9	4,7	8,8	3,6	5,4	3,1	
Предел повторяемости r, мг/кг	3,0	3,4	2,4	2,5	14,9	20,8	14,0	
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мг/кг	24,7	12,0	6,3	6,7	12,6	26,3	11,0	
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости, %	58,7	47,8	34,6	66,2	8,4	19,1	6,7	
Предел воспроизводимости R, мг/кг	69,0	33,6	17,6	18,7	35,3	73,7	30,7	
β-Токотриенол	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**
Количество участвующих лабораторий	7	7	7	7	9	9	8	
Количество лабораторий, оставшихся после исключения выбросов	6	7	6	6	8	9	7	
Количество результатов испытаний во всех лабораториях	12,0	14,0	12,0	12,0	16,0	18,0	14,0	
Среднее значение, мг/кг	113,5	63,7	34,3	28,6	23,9	37,7	15,8	
Стандартное отклонение повторяемости s_r, мг/кг	3,0	2,5	0,9	1,0	2,0	2,0	2,1	

Продолжение таблицы С.2

β-Токотриенол	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**
Относительное стандартное отклонение повторяемости, %	2,6	4,0	2,5	3,3	8,2	7,6	13,4	
Предел повторяемости r, мг/кг	8,3	7,1	2,4	2,7	5,5	8,2	5,9	
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мг/кг	54,8	34,3	26,0	20,4	8,3	14,1	3,7	
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости, %	48,3	53,8	75,9	71,4	34,6	37,3	23,7	
Предел воспроизводимости R, мг/кг	153,6	96,1	72,8	57,1	23,2	39,4	10,5	
γ-Токотриенол	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**
Количество участвующих лабораторий			8		9	9	9	
Количество лабораторий, оставшихся после исключения выбросов			7		6	6	6	
Количество результатов испытаний во всех лабораториях			14,0		12,0	12,0	12,0	
Среднее значение, мг/кг			3,6		185,3	152,1	205,2	
Стандартное отклонение повторяемости s_r, мг/кг			0,7		3,4	4,9	6,3	
Относительное стандартное отклонение повторяемости, %			19,4		1,9	3,2	3,1	
Предел повторяемости r, мг/кг			2,0		9,6	13,6	17,6	
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мг/кг			1,9		8,1	6,9	8,5	
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости, %			53,0		4,4	4,5	4,2	
Предел воспроизводимости R, мг/кг			5,4		22,8	19,3	23,9	
δ-Токотриенол	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**
Количество участвующих лабораторий					10	9	9	
Количество лабораторий, оставшихся после исключения выбросов					9	8	9	
Количество результатов испытаний во всех лабораториях					18,0	16,0	18,0	
Среднее значение, мг/кг					40,8	35,3	47,7	
Стандартное отклонение повторяемости s_r, мг/кг					2,1	1,6	1,4	
Относительное стандартное отклонение повторяемости, %					5,0	4,6	2,9	
Предел повторяемости r, мг/кг					5,8	4,6	3,9	

Окончание таблицы С.2

δ-Токотриенол	A	B	C	D	E	F	G	H
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мг/кг					4,4	4,1	6,6	
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости, %					10,8	11,7	13,8	
Предел воспроизводимости R, мг/кг					12,4	11,6	18,4	
Общее содержание	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**
Количество участвующих лабораторий	12	12	12	12	12	12	12	12
Количество лабораторий, оставшихся после исключения выбросов	9	9	9	8	8	8	6	11
Количество результатов испытаний во всех лабораториях	18,0	18,0	18,0	16,0	16,0	16,0	12,0	22,0
Среднее значение, мг/кг	3248,8	2209,4	1708,7	1290,4	813,7	1192,1	522,5	210,6
Стандартное отклонение повторяемости s_r, мг/кг	91,1	47,4	33,6	39,8	22,4	32,5	14,8	8,8
Относительное стандартное отклонение повторяемости, %	2,8	2,1	2,0	3,1	2,7	2,7	2,8	4,2
Предел повторяемости r, мг/кг	255,1	132,6	94,0	111,3	62,7	90,9	41,5	24,6
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мг/кг	292,3	217,5	161,2	62,3	98,2	85,2	17,1	14,9
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости, %	9,0	9,8	9,4	4,8	12,0	7,1	3,3	7,1
Предел воспроизводимости R, мг/кг	818,4	609,1	451,3	174,4	274,8	238,5	47,8	41,6
Примечание — Средние концентрации, пределы повторяемости и воспроизводимости выражены в мг/кг.								

Таблица С.3 — Примеры подвижных фаз для ВЭЖХ, использованных в межлабораторных испытаниях 2003 г.

Элюентные смеси	Число участников, использовавших данный элюент
3,85 % (объемная доля) тетрагидрофурана в н-гептане	2
Тетрагидрофуран/н-гептан (1:99)	1
Тетрагидрофуран/н-гептан (2:98)	1
Метил-трет-бутиловый эфир/н-гексан (4:96)	1
5 % метил-трет-бутилового эфира в н-гексане	1
6 % метил-трет-бутилового эфира в изогексане	1
Метил-трет-бутиловый эфир/н-гептан (5:95)	1
Метил-трет-бутиловый эфир/изооктан (4:96)	1
2,8 % диоксана в н-гексане	1
Диоксин/изооктан (3:97)	1
Изопропанол/н-гептан (0,5:99,5)	1

Приложение ДА
(справочное)

Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов межгосударственным стандартам

Таблица ДА.1

Обозначение ссылочного международного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование соответствующего межгосударственного стандарта
ISO 661	IDT	ГОСТ ISO 661—2016 «Жиры и масла животные и растительные. Приготовление пробы для испытания»

Примечание — В настоящей таблице использовано следующее условное обозначение степени соответствия стандарта:

- IDT — идентичный стандарт.

Библиография

[1] ISO 3696 Water for analytical laboratory use — Specification and test methods
(Вода для лабораторного анализа. Технические условия и методы испытаний)

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

[3] ISO 5725-1 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 1: General principles and definitions
[Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Общие принципы и определения]

[4] ISO 5725-2 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method
[Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерения]

УДК 543.062:006.354 МКС 67.200.10 IDT

Ключевые слова: животные жиры, растительные масла, токоферолы, токотриенолы, высокоэффективная жидкостная хроматография

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

Сдано в набор 05.08.2024. Подписано в печать 09.08.2024. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,32. Уч.-изд. л. 1,90.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении в ФГБУ «Институт стандартизации» 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