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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ ISO 29841— 2024

ЖИРЫ И МАСЛА РАСТИТЕЛЬНЫЕ

Определение содержания продуктов распада хлорофиллов *a* и *a'* (феофитинов *a, a'* и пирофеофитина)

(ISO 29841:2009+Amd.1:2016, 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 Некоммерческой организацией «Ассоциация производителей и потребителей масложировой продукции» 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 октября 2024 г. № 178-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
Россия	RU	Росстандарт
Узбекистан	UZ	Узбекское агентство по техническому регулированию

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 20 ноября 2024 г. № 1718-ст межгосударственный стандарт ГОСТ ISO 29841—2024 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 мая 2025 г.

5 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 29841:2009 «Жиры и масла растительные. Определение содержания продуктов распада хлорофиллов *a* и *a'* (феофитинов *a*, *a'* и пирофеофитинов)» [«Vegetable fats and oils — Determination of the degradation products of chlorophylls *a* and *a'* (pheophytins *a*, *a'* and pyropheophytins)», IDT], включая изменение Amd.1:2016.

Изменение к указанному международному стандарту, принятое после его официальной публикации, внесено в текст настоящего стандарта и выделено двойной вертикальной линией, расположенной на полях напротив соответствующего текста, а обозначение и год принятия изменения приведены в скобках после соответствующего текста.

Международный стандарт разработан Подкомитетом SC 11 «Животные и растительные жиры и масла» 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, 2009
© 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

Введение

В ходе систематического пересмотра ISO 29841:2009 в 2014 году было предложено дать более подробное разъяснение по миниатюрным колонкам с силикагелем собственного изготовления в примечании к 6.6. Также необходимо заменить размер колб в 6.2, так как объем на 10 $см^3$ является недостаточным и проба может быть потеряна при размещении в ротационном испарителе. Дополнительно было решено изменить наименование подраздела 9.2, указав что рассчитывается именно относительное содержание аналитов. (Amd.1:2016)

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 РАСТИТЕЛЬНЫЕ

Определение содержания продуктов распада хлорофиллов *a* и *a′* (феофитинов *a*, *a′* и пирофеофитина)

Vegetable fats and oils. Determination of the degradation products of chlorophylls *a* and *a′* (pheophytins *a*, *a′* and pyropheophytin)

Дата введения — 2025—05—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения продуктов распада хлорофиллов — феофитинов *a*, *a′* и пирофеофитина *a*. Метод применим только к растительным жирам и маслам.

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 **пирофеофитин *a* (содержание в продуктах распада хлорофилла)** [pyropheophytin a (content in chlorophyll degradation products)]: Масса пирофеофитина *a*, поделенная на сумму масс феофитинов *a*, *a′* и пирофеофитина *a*.

4 Сущность метода

Отделение пигментов (хлорофиллов, феофитинов *a* и *a′*, пирофеофитина *a*) от основной части липидов (триглицеридов) выполняют с помощью миниатюрной колоночной хроматографии на колонке с силикагелем. Элюат анализируют с помощью ВЭЖХ, используя силикагель RP18, а контроль разделенных компонентов проводят при длине волны 410 нм с помощью фотометрического детектора.

Для анализа некоторых растительных масел (например, рапсового) требуется более высокая чувствительность, которую можно достичь при использовании флуоресцентной детекции с длиной волны возбуждения 430 нм и длиной волны эмиссии 670 нм.

Возможно также прямое определение методом ВЭЖХ с флуоресцентной детекцией, описание приведено в приложении С.

Издание официальное

5 Реактивы

Предупреждение — Следует уделить особое внимание правилам обращения с опасными веществами. Необходимо соблюдать технические, организационные и личные меры безопасности.

При проведении анализа, если не указано иное, необходимо использовать только реактивы признанной аналитической чистоты.

5.1 Хлорофилл *a*.

Примечание — Из-за отсутствия эталонных образцов феофитинов и пирофеофитина для получения данных продуктов распада используется хлорофилл *a*. Феофитины получают из раствора хлорофилла *a* за счет подкисления, а пирофеофитин — дополнительным нагреванием (> 100 °С) (См. [4]).

5.2 Ацетон.

5.3 Метанол.

5.4 Диэтиловый эфир.

5.5 Петролейный эфир, диапазон температур кипения от 40 °С до 60 °С.

5.6 н-Гептан или, в случае его отсутствия, н-гексан.

Предупреждение — Из-за токсичности н-гексана рекомендуется использовать н-гептан при его наличии.

5.7 Смесь растворителей петролейного эфира и диэтилового эфира, объемные доли: $\varphi_{C_7H_7BrMg}$ = = 90 см^3/100 см^3; $\varphi_{(CH_3CH_2)_2O}$ = 10 см^3/100 см^3.

6 Оборудование

Используют стандартное лабораторное оборудование, в том числе перечисленное ниже.

6.1 Прибор ВЭЖХ

6.1.1 Система ВЭЖХ, состоящая из насоса, устройства для ввода пробы (петлевой дозатор объемом 20 мкл) или автоматического пробоотборника, фотометрического детектора для измерений при длине волны 410 нм или флуоресцентного детектора (с длиной волны возбуждения, λ_{ex} = 430 нм и длиной волны эмиссии λ_{em} = 670 нм), а также системы расчета результатов.

6.1.2 Колонка ВЭЖХ длиной 250 мм, внутренним диаметром 4,0 или 4,6 мм, заполненная частицами типа RP18 с обращенной фазой, размером 5 мкм.

следующие условия являются наиболее подходящими:

неподвижная фаза: partisil ODS 3, 5 мкм, 250 × 4,6 мм[1)];

подвижная фаза: вода, метанол и ацетон (6.1.3);

скорость потока: 1,0 см^3/мин.

6.1.3 Подвижная фаза, смесь воды, метанола и ацетона, объемные доли: φ_{H_2O} = 4 см^3/100 см^3; φ_{CH_3OH} = 36 см^3/100 см^3; $\varphi_{CH_3COCH_3}$ = 60 см^3/100 см^3. Все растворители должны быть класса ВЭЖХ.

6.2 Конусообразная колба вместимостью 25 см^3 или 50 см^3. (Amd.1:2016)

6.3 Лабораторные стаканы различной вместимости.

6.4 Ротационный испаритель с водяной баней.

6.5 Виалы, предназначенные для автоматического отбора проб, подходящей вместимости.

6.6 Картридж с силикагелем, 500 мг/6 см^3 или 1000 мг/6 см^3, 55 мкм, 7 нм или картридж с диолом, 3 см^3.

[1)] Пример коммерчески доступной обращенной фазы С18 с загрузкой углерода массовой долей 10,5 %, с блокированным покрытием для деактивации силанолов, чтобы минимизировать потребности в агентах ионного подавления или ионного сопряжения. Эта информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не связана с поддержкой данного оборудования.

Примечание — Для разделения можно также использовать миниатюрные колонки с силикагелем собственного изготовления. Для этого берется Силикагель 60 для колоночной хроматографии (от 0,063 до 0,100 мм), очищенный до содержания влаги w = 5 % (массовая доля). Активация силикагеля происходит за счет нагревания в течение ночи при температуре (160 ± 5) °С. После нагревания силикагель помещают в эксикатор, чтобы охладить его, затем силикагель переносят в колбу с пробкой. Необходимо добавить 5 % воды и встряхивать до тех пор, пока не появятся комочки и порошок не станет свободно плавать (1 ч в автоматическом встряхивателе). Перед использованием хранить кондиционированный силикагель в течение ночи 1[2)]. (Amd.1:2016)

7 Пробы

7.1 Отбор проб

Отбор проб не является частью метода, установленного в настоящем стандарте. Рекомендуемый метод отбора проб приведен в ISO 5555 [1].

В лабораторию следует направлять представительную пробу. Она не должна быть повреждена или изменена во время транспортирования или хранения.

7.2 Приготовление пробы для испытания

Готовят пробу для испытания в соответствии с ISO 661.

Важно — Пробы хранят в стеклянной таре в холодном и защищенном от света месте. После очистки тестовые растворы следует сразу проанализировать, чтобы избежать распада и окисления. Следует избегать контакта анализируемых проб с пластиковыми изделиями.

8 Проведение испытания

8.1 Взвешивают 300 мг пробы для испытания (7.2) в небольшом лабораторном стакане (6.3), растворяют в 1 см^3 н-гептана или н-гексана (5.6) и выливают раствор на картридж с силикагелем (колонку с силикагелем) (6.6). Ополаскивают лабораторный стакан два раза по 1 см^3 петролейного эфира (5.5), также выливая промывочную жидкость на картридж (колонку).

8.2 Как только растворитель стечет в верхнюю часть картриджа (колонки), элюируют неполярные вещества дважды по 5 см^3 смеси растворителей петролейного/диэтилового эфиров (5.7).

8.3 Элюируют фракцию феофитина два раза 5 см^3 ацетона (5.2) и собирают полученную фракцию в коническую колбу (6.2), защищенную от воздействия света.

8.4 Выпаривают растворитель досуха на ротационном испарителе (6.4) при температуре не выше 20 °С. Остаток растворяют в 200 мкл ацетона. Сразу вводят этот раствор в установку ВЭЖХ (6.1).

Важно — Феофитины очень неустойчивы и под воздействием света быстро окисляются.

8.5 Стандартные хроматограммы, полученные при использовании колонки с характеристиками, указанными в 6.1.2, приведены на рисунках А.1 и А.2.

9 Результаты определения

9.1 Идентификация пиков

На хроматограмме могут наблюдаться пики пигментов хлорофилла *a*, хлорофилла *b*, соответствующих феофитинов и пирофеофитина. Следует ориентироваться на типичные хроматограммы, представленные на рисунках А.1 и А.2, поскольку другие пигменты не доступны в качестве стандартных образцов из-за их нестабильности. Для идентификации феофитинов *a*, *a'* и пирофеофитина *a* см. рисунки А.1 и А.2.

[2)] Strata Si-1 (картридж с силикагелем) и Supelclean LC-Diol SPE Tubes — Supelco 57016 (картридж с диолом) являются примерами подходящих коммерчески доступных товаров. Эта информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не связана с поддержкой данного оборудования. (Amd.1:2016)

9.2 Расчет относительного содержания пирофеофитина *a* (Amd.1:2016)

Рассчитывают по площадям пиков относительные доли аналитов в растворе пробы. При применении настоящего метода принимается, что коэффициенты отклика всех пигментов равны. Массовую долю пирофеофитина *a* w_{PPPa}, %, рассчитывают на основе соотношения площадей пиков следующим образом:

$$w_{PPPa} = \frac{A_{PPPa} \cdot 100}{\left(A_{PPPa} + \sum A_{PP}\right)}, \quad (1)$$

где A_{PPPa} — площадь пика пирофеофитина *a*;

$\sum A_{PP}$ — сумма площадей пиков феофитинов *a* и *a'*.

Значения результатов указывают с точностью до первого десятичного знака.

10 Точность

10.1 Межлабораторные испытания

Результаты межлабораторных испытаний по определению точности метода приведены в приложении В. Значения, полученные на основании этих межлабораторных испытаний, не могут применяться к диапазонам и матрицам, отличным от приведенных в настоящем стандарте.

10.2 Повторяемость

Абсолютное расхождение между результатами двух независимых единичных испытаний, полученными при использовании одного и того же метода, на идентичном испытуемом материале, в одной лаборатории, одним оператором, на одном и том же оборудовании, в пределах короткого промежутка времени, не должно более чем в 5 % случаев превышать значение предела повторяемости *r*, приведенное в таблице В.1.

10.3 Воспроизводимость

Абсолютное расхождение между результатами двух единичных испытаний, полученными при использовании одного и того же метода, на идентичном испытуемом материале, в разных лабораториях, разными операторами, на различном оборудовании, не должно более чем в 5 % случаев превышать значение предела воспроизводимости *R*, приведенное в таблице В.1.

11 Протокол испытания

Протокол испытания должен включать:

a) всю информацию, необходимую для полной идентификации пробы;

b) используемый метод отбора проб, если он известен;

c) используемый метод испытания вместе со ссылкой на настоящий стандарт;

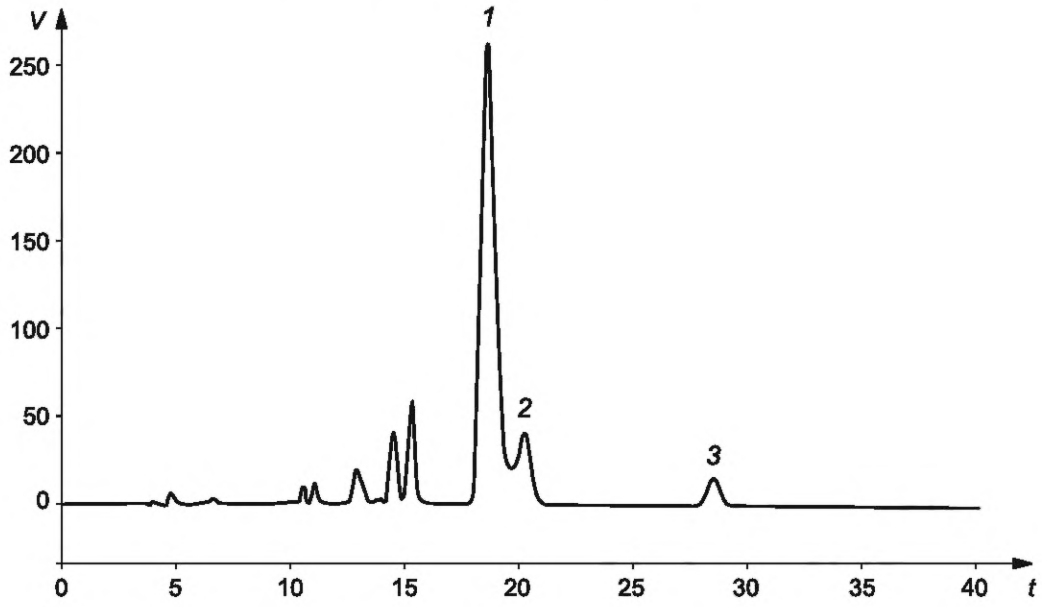
d) все подробности, не указанные в настоящем стандарте или рассматриваемые как необязательные, а также данные о любых инцидентах, которые могли повлиять на результат(ы) испытания;

e) полученный результат испытания;

f) окончательный результат, если соблюдены условия повторяемости.

Приложение А
(справочное)

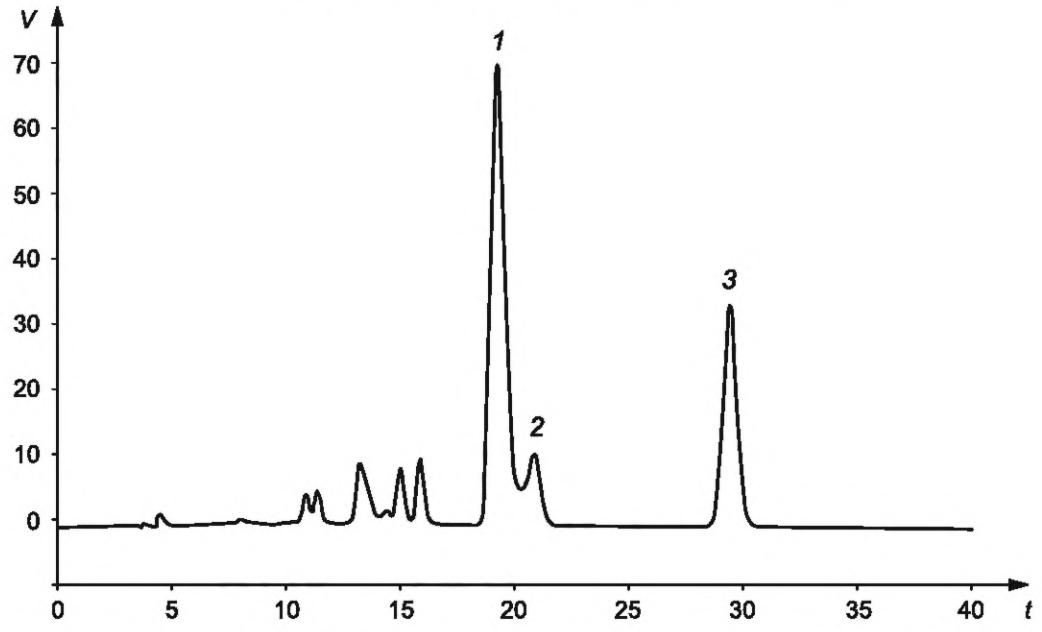
Пример стандартной хроматограммы



1 — феофитин *a*; *2* — феофитин *a'*; *3* — пирофеофитин;

t — время элюирования, мин; *V* — разность потенциалов, вольт

Рисунок А.1 — Хроматограмма ВЭЖХ оливкового масла первого холодного отжима с массовой долей пирофеофитина 5 % в продуктах распада хлорофилла



1 — феофитин *a*; *2* — феофитин *a'*; *3* — пирофеофитин;

t — время элюирования, мин; *V* — разность потенциалов, вольт

Рисунок А.2 — Хроматограмма ВЭЖХ оливкового масла первого холодного отжима с массовой долей пирофеофитина 30 % в продуктах распада хлорофилла

Приложение В
(справочное)

Результаты межлабораторных испытаний

Точность метода является результатом межлабораторного испытания, организованного Объединенным комитетом по анализу жиров, масел, жировых продуктов, сопутствующих продуктов и сырья (DIN/DGF), в котором приняли участие 16 лабораторий из Франции, Германии и Италии. Испытание было проведено в 2005 году на пяти образцах, и точность данных была рассчитана в соответствии с ISO 5725-1 [2] и ISO 5725-2 [3].

Таблица В.1 — Обзор статистических результатов оливкового масла

Образец	A	B	C	D	E
Количество участвующих лабораторий N	16	16	16	16	16
Количество лабораторий, оставшихся после исключения выбросов n	12	12	14	15	15
Количество результатов единичных испытаний во всех лабораториях для каждой пробы $\sum_{i=1}^{n} n_{w,i}$	24	24	28	30	30
Среднее значение $\bar{w}_{PPPa}$, %	28,86	34,01	5,63	6,26	84,75
Стандартное отклонение повторяемости s_r, %	0,53	0,61	0,59	0,36	1,09
Коэффициент вариации повторяемости CV(r), %	1,8	1,8	10,4	5,8	1,3
Предел повторяемости r ($2{,}8s_r$), %	1,48	1,71	1,65	1,01	3,05
Среднее квадратическое отклонение воспроизводимости s_R, %	1,78	2,08	0,79	1,29	3,06
Коэффициент вариации воспроизводимости CV(R), %	6,2	6,1	14,1	20,7	3,6
Предел воспроизводимости R ($2{,}8s_R$), %	4,98	5,82	2,21	3,61	8,56

Приложение С
(справочное)

Прямой метод ВЭЖХ с флуоресцентной детекцией

С.1 Сущность метода

Данное приложение описывает альтернативный метод. Масла подвергают ВЭЖХ без какой-либо предварительной обработки.

С.2 Растворители для ВЭЖХ

С.2.1 Вода для ВЭЖХ.
С.2.2 Метанол для ВЭЖХ.
С.2.3 Ацетон для ВЭЖХ.

С.3 Оборудование

С.3.1 Система бинарной ВЭЖХ, состоящая из насоса, устройства для ввода пробы (петлевого дозатора объемом 20 мкл) или автоматического пробоотборника, флуоресцентного детектора (λ_{ex} = 430 нм и λ_{em} = 670 нм) и системы интеграции.

С.3.2 Колонка ВЭЖХ длиной 250 мм, внутренним диаметром 4,0 или 4,6 мм, заполненная частицами типа RP18 с обращенной фазой, размером 5 мкм.

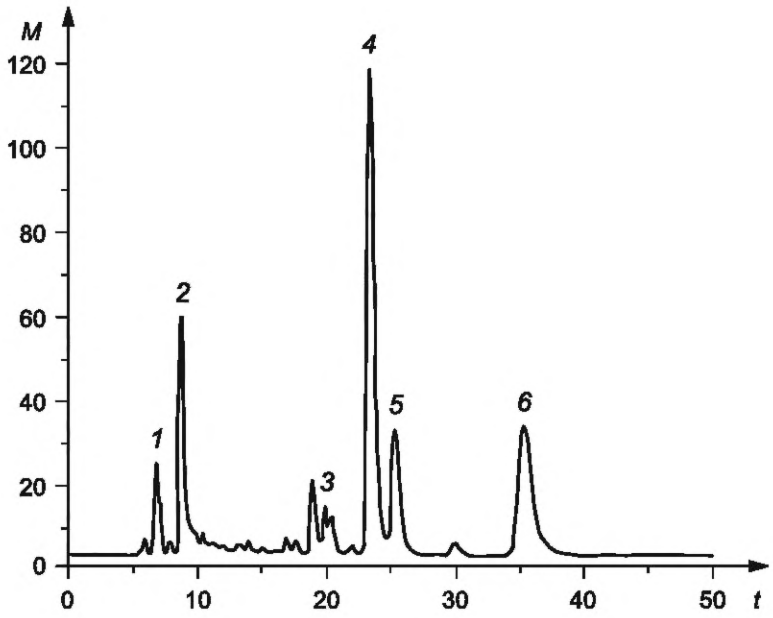
С.4 Проведение испытания

С.4.1 Переносят масла в виалу для ВЭЖХ из темного стекла.

С.4.2 Вводят лабораторную пробу в аппарат для ВЭЖХ (раздел С.3). Было установлено, что условия, перечисленные в таблице С.1, являются подходящими и позволяют получить типичную хроматограмму, как показано на рисунке С.1.

Таблица С.1 — Программа элюирования со скоростью 1,0 $см^3$/мин

Время, мин	Растворитель А Объемные доли: φ_{H_2O} = 4 %; φ_{CH_3OH} = 76 %; $\varphi_{CH_3COCH_3}$ = 20 %	Растворитель В Объемные доли: φ_{H_2O} = 4 %; φ_{CH_3OH} = 36 %; $\varphi_{CH_3COCH_3}$ = 60 %
0	100 %	0 %
7	0 %	100 %
50	0 %	100 %
50,1	100 %	0 %
60	100 %	0 %



1 — феофорбид; *2* — метилфеофорбид; *3* — феофитин *b*; *4* — феофитин *a*; *5* — феофитин *a'*; *6* — пирофеофитин; *M* — флуоресцентное детектирование, люкс; *t* — время элюирования, мин

Рисунок С.1 — Хроматограмма ВЭЖХ рапсового масла с пирофеофитином

Приложение ДА
(справочное)

Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов межгосударственым 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 5555 Animal and vegetable fats and oils — Sampling
(Жиры и масла животные и растительные. Отбор проб)

[2] 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]

[3] 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]

[4] AITZETMÜLLER K. Chlorophyll-Abbauprodukte in pflanzlichen Ölen [Chlorophyll degradation products in vegetable oils]. Fat Sci. Technol. 1989, 91, pp. 99-105; AITZETMÜLLER K. Analysis of chlorophyll degradation products in fats and oilseeds. In: Actes du congrès international «Chevreul» pour l'étude des corps gras [Proceedings of the Chevreul International Congress], Angers, 1989-06-06/10, p. 177-84. Association française pour l'Étude des Corps gras, Neuilly sur Seine

УДК 665.3:006.354 МКС 67.200.10 IDT

Ключевые слова: жиры растительные, масла растительные, продукты распада хлорофиллов, феофитины *a*, *a'*, пирофеофитин *a*

Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *И.А. Королева*
Компьютерная верстка *А.Н. Золотаревой*

Сдано в набор 22.11.2024. Подписано в печать 26.11.2024. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,49.

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