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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ ISO 18363-4— 2024

ЖИРЫ И МАСЛА ЖИВОТНЫЕ И РАСТИТЕЛЬНЫЕ

Определение содержания сложных эфиров монохлорпропандиолов (МХПД) и глицидола с применением ГХ/МС

Часть 4

Метод с использованием быстрой щелочной переэтерификации и измерение содержания 2-МХПД, 3-МХПД и глицидола с применением ГХ/МС/МС

(ISO 18363-4:2021, IDT)

Издание официальное

Москва
Российский институт стандартизации
2025

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 16 декабря 2024 г. № 66-2024)

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 13 февраля 2025 г. № 63-ст межгосударственный стандарт ГОСТ ISO 18363-4—2024 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 апреля 2025 г.

5 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 18363-4:2021 «Жиры и масла животные и растительные. Определение содержания сложных эфиров монохлорпропандиолов (МХПД) и глицидола с применением ГХ/МС. Часть 4. Метод с использованием быстрой щелочной переэтерификации и измерение содержания 2-МХПД, 3-МХПД и глицидола с применением ГХ/МС/МС» [«Animal and vegetable fats and oils — Determination of fatty-acid-bound chloropropanediols (MCPDs) and glycidol by GC/MS. Part 4: Method using fast alkaline transesterification and measurement for 2-MCPD, 3-MCPD and glycidol by GC-MS/MS», IDT].

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 ответственности 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, 2021
© Оформление. ФГБУ «Институт стандартизации», 2025



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 Термины и определения 1
4 Сущность метода 2
5 Реактивы 2
6 Оборудование 5
7 Проба и хранение 5
8 Проведение испытания 5
9 Обработка результатов 7
10 Примечания 11
11 Точность 12
Приложение А (обязательное) Вспомогательные таблицы 14
Приложение В (справочное) Статистические результаты совместного исследования, проведенного ISO 16
Приложение С (справочное) Хроматограммы 18
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов межгосударственным стандартам 20
Библиография 21

Введение

ISO 18363 представляет собой серию международных стандартов, которые могут быть использованы для определения содержания сложных эфиров монохлорпропандиола (МХПД) и глицидола. Во введении приведено описание методов, указанных в различных частях серии, чтобы аналитик мог решить, какие методы подходят для применения. Подробное описание каждого метода содержится в области применения соответствующего метода.

ISO 18363-1 представляет собой дифференциальный метод, эквивалентный стандарту DGF standard C-VI 18 (10) [9] и идентичный официальному методу Official Method Cd 29c-13 [6]. Метод основан на быстром щелочном каталитическом выделении 3-МХПД и глицидола из производных сложных эфиров. Затем глицидол преобразуется в индуцированный 3-МХПД. Этот метод состоит из двух частей. Первая часть (А) позволяет определить сумму сложных эфиров 3-МХПД и глицидола, вторая часть (В) определяет только сложные эфиры 3-МХПД. Оба определения основаны на выделении целевых аналитов — 3-МХПД и глицидола — из формы сложных эфиров с применением алкоголиза в щелочной среде, проводимого при комнатной температуре. В части А для прекращения реакции и последующего преобразования глицидола в индуцированный 3-МХПД используется подкисленный раствор хлорида натрия. Таким образом, 3-МХПД и глицидол становятся неразличимыми в части А. В части В при добавлении подкисленного раствора соли, не содержащей хлоридов, достигается не только остановка реакции, но и предотвращение преобразования глицидола в индуцированный МХПД. Таким образом, часть В позволяет определить действительное содержание 3-МХПД. Наконец, содержание глицидола в образце пропорционально разности обоих определений (А—В) и может быть вычислено после определения коэффициента преобразования глицидола в 3-МХПД. ISO 18363-1 применим для быстрого определения сложных эфиров 3-МХПД и глицидола в рафинированных и нерафинированных растительных маслах и жирах. ISO 18363-1 может применяться к животным жирам, а также к отработанным маслам и жирам для жарки, но перед анализом данных образцов необходимо провести валидационное исследование. Любые свободные аналиты, содержащиеся в образце, будут включены в результаты, так как данный стандарт не позволяет различать свободные и связанные соединения. Однако на момент публикации этого стандарта исследования не показали каких-либо доказательств содержания свободного аналита в том же количестве, что и содержание эстерифицированного аналита в рафинированных растительных маслах и жирах. В принципе, ISO 18363-1 может быть изменен таким образом, чтобы стало возможным определение 2-МХПД, но перед анализом данного соединения необходимо провести валидационное исследование.

ISO 18363-2 представляет собой официальный метод AOCS Official Method Cd 29b-13 [5]. Метод основан на медленном щелочном высвобождении МХПД и глицидола из производных сложных эфиров. Затем глицидол преобразуется в 3-монобромпропандиол (3-МБПД). ISO 18363-2 подразумевает подготовку двух образцов, которые отличаются использованием внутренних стандартов. Оба образца используются для определения сложных эфиров 2-МХПД и 3-МХПД. В части А определяется предварительный результат для сложного эфира глицидола. Поскольку 3-МХПД, присутствующий в образце, при подготовке образца в незначительной степени преобразуется в индуцированный глицидол, часть В служит для количественного определения доли индуцированного глицидола, который затем вычитают из предварительного количества глицидола, полученного в части А. Используя меченные изотопами свободные МХПД-изомеры в пробе А и меченные изотопами сложные эфиры 2-МХПД и 3-МХПД в части В, можно контролировать эффективность расщепления сложного эфира. Оба определения, А и В, основаны на выделении целевых аналитов 2-МХПД, 3-МХПД и глицидола из формы сложного эфира посредством медленного щелочного алкоголиза на холоде. При подготовке обоих образцов реакцию останавливают добавлением подкисленного концентрированного раствора бромида натрия для преобразования нестабильного и летучего глицидола в 3-монобромпропандиол (3-МБПД), который демонстрирует сопоставимые с 3-МХПД стабильность и хроматографические характеристики. Кроме того, большой избыток ионов бромида предотвращает нежелательное образование 3-МХПД из глицидола в случае образцов, содержащих определенное природное количество хлорида. ISO 18363-2 применим для определения сложных эфиров 3-МХПД, 2-МХПД и глицидола в рафинированных и нерафинированных растительных маслах и жирах. ISO 18363-2 может применяться к животным жирам, а также к отработанным маслам и жирам для жарки, но перед анализом этих образцов необходимо провести валидационное исследование. Любые свободные аналиты, содержащиеся в образце, будут включены в результаты, но данный стандарт не позволяет различать свободные и связанные соединения. Однако на момент публикации этого стандарта исследования не показали каких-либо доказательств содержа-

ния свободного аналита в том же количестве, что и содержание эстерифицированного соединения в растительных маслах и жирах.

ISO 18363-3 представляет собой официальный метод AOCS Official Method Cd 29a-13 [4]. Метод основан на преобразовании сложных глицидиловых эфиров в сложные эфиры 3-МБПД и медленном катализируемом кислой средой высвобождении МХПД и МБПД из производных сложных эфиров. Метод ISO 18363-3 основан на подготовке одного образца, в котором сложные глицидиловые эфиры преобразуются в моноэфиры МБПД, а затем свободные аналиты 2-МХПД, 3-МХПД и 3-МБПД высвобождаются медленным алкоголизом в кислой среде. 3-МБПД представляет собой истинное содержание связанного глицидола. ISO 18363-3 может применяться для определения сложных эфиров 3-МХПД, 2-МХПД и глицидола в рафинированных и нерафинированных растительных маслах и жирах. ISO 18363-3 может применяться к животным жирам, а также к отработанным маслам и жирам для жарки, но перед анализом таких образцов необходимо провести валидационное исследование. Данный метод подходит для анализа связанных (эстерифицированных) аналитов, но при необходимости этот метод может быть также выполнен без первоначального преобразования глицидиловых эфиров. В таком случае результаты будут включать как свободные, так и связанные формы 2-МХПД и 3-МХПД, а количество свободных аналитов может быть рассчитано как разность между двумя результатами, полученными в обоих определениях. Однако на момент публикации этого стандарта исследования не показали каких-либо доказательств того, что содержание свободного аналита в растительных маслах и жирах столь же высоко, как и содержание определяемого эстерифицированного аналита.

Настоящий стандарт устанавливает ускоренный метод, основанный на быстром щелочном расщеплении сложных эфиров МХПД и глицидиловых эфиров. Выделившийся глицидол затем преобразуется в 3-МБПД. pH быстрого щелочного расщепления обычно способствует частичному преобразованию выделившегося МХПД в глицидол в процессе расщепления сложных эфиров, что приводит к завышению содержания сложного эфира глицидола в пробе. Посредством добавления двух разных меченных изотопами внутренних стандартов сложных эфиров 3-МХПД и глицидола, можно определить количество меченого глицидола, полученного в результате разложения высвобожденного внутреннего стандарта. Эту информацию можно использовать для корректировки результата определения глицидола, индуцированного глицидиловым эфиром, завышенного за счет глицидола, индуцированного 3-МХПД. Те же два внутренних стандарта используют для количественного определения связанных МХПД и глицидола, что требует приготовления одного образца для количественного определения сложных эфиров 2-МХПД, 3-МХПД и глицидола. По аналогии с ISO 18363-1, ISO 18363-2 и ISO 18363-3 выделенные МХПД и 3-МБПД перед анализом методом ГХ-МС/МС дериватизируют с фенилборной кислотой. В отличие от других частей ISO 18363, данный стандарт требует оборудования ГХ-МС/МС для однозначного обнаружения каждого из (меченных изотопами) МБПД, необходимых для правильного количественного определения глицидола, индуцированного глицидиловым эфиром. Данный стандарт применим для определения сложных эфиров 3-МХПД, 2-МХПД и глицидола в рафинированных и нерафинированных растительных маслах и жирах. Он также применим к животным жирам и отработанным жирам и маслам для жарки, но перед анализом этих образцов требуется валидационное исследование. Любые свободные аналиты в образце включаются в результаты, но стандарт не позволяет проводить различие между свободными и связанными аналитами. Однако на момент публикации данного стандарта исследования не выявили никаких доказательств того, что содержание свободных аналитов в растительных маслах и жирах столь же высоко, как содержание эстерифицированных аналитов.

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 сложных эфиров монохлорпропандиолов (МХПД) и глицидола с применением ГХ/МС

Часть 4

Метод с использованием быстрой щелочной переэтерификации и измерение содержания 2-МХПД, 3-МХПД и глицидола с применением ГХ/МС/МС

Animal and vegetable fats and oils. Determination of fatty-acid-bound chloropropanediols (MCPDs) and glycidol by GC/MS. Part 4. Method using fast alkaline transesterification and measurement for 2-MCPD, 3-MCPD and glycidol by GC-MS/MS

Дата введения — 2025—04—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает быстрый метод одновременного определения сложных эфиров 2-МХПД (связанных 2-МХПД), сложных эфиров 3-МХПД (связанных 3-МХПД) и глицидиловых эфиров (связанного глицидола) в одном анализе, основанном на расщеплении сложных эфиров, катализируемом щелочной средой, и дериватизации расщепленных (свободных) анализируемых веществ (далее — аналиты) фенилборной кислотой (ФБК) перед проведением анализа методом газовой хроматографии — масс-спектрометрии/масс-спектрометрии (ГХ-МС/МС). Завышенная оценка глицидиловых эфиров корректируется добавлением изотопно-меченого сложного эфира 3-МХПД, что позволяет количественно определить глицидол, индуцированный 3-МХПД, в процессе анализа.

Настоящий стандарт применим к твердым и жидким жирам и маслам. Он также применим к животным жирам и использованным фритюрным жирам и маслам для жарки, но эти матрицы не были включены в валидацию. Для всех трех аналитов предел количественного определения (LOQ) составляет 0,1 мг/кг, а предел обнаружения (LOD) составляет 0,03 мг/кг.

Молоко и молочные продукты (или жиры из молока и молочных продуктов), детское питание, эмульгаторы, свободные жирные кислоты и другие матрицы на основе жиров и масел исключены из области применения настоящего стандарта.

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 к нему)]:

ISO 3696, Water for analytical laboratory use — Specification and test methods (Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы испытаний)

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями.

Издание официальное

ISO и IEC поддерживают терминологические базы данных для использования в стандартизации по следующим адресам:

- платформа онлайн-просмотра ISO: доступна по адресу gost.e-ecolog.ru ;
- Электропедия IEC: доступна по адресу gost.e-ecolog.ru .

3.1 **связанный 2-МХПД** (bound 2-MCPD): Количество 2-МХПД, полученное после расщепления его эстерифицированных (связанных) форм путем переэтерификации, катализируемой щелочью, в соответствии с эталонным методом.

Примечание — Содержание 2-МХПД вычисляют и выражают как массовую долю в миллиграммах на килограмм (мг/кг).

3.2 **связанный 3-МХПД** (bound 3-MCPD): Количество 3-МХПД, полученное после расщепления его эстерифицированных (связанных) форм путем переэтерификации, катализируемой щелочью в соответствии с эталонным методом.

Примечание — Содержание 3-МХПД вычисляют и выражают как массовую долю в миллиграммах на килограмм (мг/кг).

3.3 **связанный глицидол** (bound glycidol): Количество глицидола, полученное после расщепления его эстерифицированных (связанных) форм путем переэтерификации, катализируемой щелочью в соответствии с эталонным методом.

Примечание — Содержание глицидола вычисляют и выражают как массовую долю в миллиграммах на килограмм (мг/кг).

4 Сущность метода

Пробу масла или жира растворяют в толуоле и *трет*-бутил-метиловом эфире и добавляют внутренние стандарты (диэфир 3-МХПД-$^{13}C_3$ и пентадейтерированный глицидиловый эфир). Затем пробу охлаждают до 10 °С и проводят щелочную переэтерификацию посредством добавления раствора метоксида натрия в метаноле. После 12 мин выдерживания при 10 °С смесь подкисляют кислым раствором бромида натрия для превращения высвобожденного глицидола в 3-МБПД. Метиловые эфиры жирных кислот, образовавшиеся в ходе переэтерификации, удаляют двойной экстракцией органического слоя. Наконец, очищенную пробу, содержащую расщепленные (свободные) аналиты, дериватизируют фенилборной кислотой перед проведением ГХ-МС/МС анализа.

Количественное определение сложных эфиров 2-МХПД и 3-МХПД основано на соотношении сигналов 2-МХПД/3-МХПД-$^{13}C_3$ и 3-МХПД/3-МХПД-$^{13}C_3$, соответственно. Количественное определение сложного эфира глицидола основано на соотношении сигналов 3-МБПД/3-МБПД-d5. Количество 3-МБПД-$^{13}C_3$, образовавшееся после реакции переэтерификации, указывает на количество высвобожденного 3-МХПД-$^{13}C_3$, который разложился до глицидола в условиях щелочной переэтерификации. Поскольку разницы в скоростях разложения между 3-МХПД и 3-МХПД-$^{13}C_3$ не наблюдается, последний используется для коррекции завышенной оценки глицидилового эфира, вызванной глицидолом, индуцированным разложением 3-МХПД. В условиях анализа 2-МХПД считается стабильным и таким образом не оказывает заметного влияния на возможную завышенную оценку глицидола [7], [8].

Данный метод позволяет одновременно количественно определить все три аналита в одном анализе.

5 Реактивы

5.1 Общие положения

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ — Следует обратить внимание на правила, регламентирующие порядок обращения с опасными веществами. Необходимо соблюдать технические, организационные и личные меры безопасности.

При проведении анализа следует использовать реактивы аналитической степени чистоты, если не указано иное. Вода должна соответствовать требованиям класса 3 ISO 3696.

5.2 Стандартные и контрольные вещества

5.2.1 1,2-Дипальмитоил-3-хлорпропандиол (PP-3-МХПД), чистота ≥ 95 %.

Примечание — 1,2-Дипальмитоил-3-хлорпропандиол можно заменить 1,2-диолеил-3-хлорпропандиолом или другими диэфирами жирных кислот и 3-МХПД с аналогичной длиной цепи (предпочтительно от C_{16} до C_{18}, поскольку они наиболее часто встречаются в большинстве жиров или масел).

5.2.2 1,3-Дистеароил-2-хлорпропандиол (SS-2-МХПД), чистота ≥95 %.

Примечание — По аналогии с рекомендациями, приведенными для PP-3-МХПД, 1,3-дистеароил-2-хлорпропандиол можно заменить другими диэфирами жирных кислот и 2-МХПД с аналогичной длиной цепи (предпочтительно от С16 до С18, поскольку они наиболее часто встречаются в большинстве жиров или масел).

5.2.3 Меченный углеродом С-13 (PP-3-МХПД-$^{13}C_3$), чистота ≥95 %.

Примечание — Рекомендации, применяемые к 1,2-дипальмитоил-3-хлорпропандиолу, также действительны в отношении его меченного углеродом-13 аналога, см. примечание к 5.2.1.

5.2.4 Глицидилстеарат (Gly-S), чистота ≥98 %.

Примечание — Глицидилстеарат можно заменить глицидилолеатом или другими сложными эфирами жирных кислот и глицидола с аналогичной длиной цепи (предпочтительно от С16 до С18, поскольку они наиболее часто встречаются в большинстве жиров или масел).

5.2.5 Пентадейтерированный глицидилстеарат (Gly-S-d5), чистота ≥98 %.

Примечание — Рекомендации, применяемые к глицидилстеарату, справедливы и для его пентадейтерированного аналога, см. примечание к 5.2.4.

5.3 Стандартные растворы

5.3.1 Общие положения

Все стандартные растворы приготовлены с применением толуола (5.4.4). Все стандарты приготовлены с использованием сложных эфиров контрольных веществ (5.2). Концентрации приведены как эквивалентные концентрации свободного компонента и должны быть скорректированы с учетом чистоты контрольных веществ (5.2). Пример пересчета концентрации сложного эфира на концентрацию эквивалентного свободного вещества см. в 10.2.

5.3.2 Исходные растворы

Примечание — Исходные растворы стабильны в течение минимум 12 месяцев при хранении при температуре минус 18 °С. Использование ультразвуковой ванны поможет обеспечить полное растворение всех стандартов.

5.3.2.1 Градуировочный исходный раствор (3-МХПД: 52,7 мкг/мл, глицидол: 52,2 мкг/мл, 2-МХПД: 48,1 мкг/мл). Взвешивают 14,0 мг PP-3-МХПД (5.2.1), 12,0 мг Gly-S (5.2.4) и 14,0 мг SS-2-МХПД (5.2.2) в мерной колбе вместимостью 50 мл. Доводят до метки, убедившись, что стандарты полностью растворились в растворителе.

5.3.2.2 Добавочный исходный раствор (3-МХПД: 52,7 мкг/мл, глицидол: 52,2 мкг/мл, 2-МХПД: 34,4 мкг/мл). Берут навеску 14,0 мг PP-3-МХПД (5.2.1), 12,0 мг Gly-S (5.2.4) и 10,0 мг SS-2-МХПД (5.2.2) в мерную колбу вместимостью 50 мл. Доводят до метки, убедившись, что стандарты полностью растворились в растворителе.

5.3.2.3 Исходный раствор PP-3-МХПД-$^{13}C_3$ (3-МХПД-$^{13}C_3$: 38,5 мкг/мл). Берут навеску 20 мг PP-3-МХПД-$^{13}C_3$ (5.2.3) в мерную колбу вместимостью 100 мл. Доводят до метки, убедившись, что стандарт полностью растворен в растворителе.

5.3.2.4 Исходный раствор Gly-S-d5 (глицидол-d5: 45,8 мкг/мл). Берут навеску 10 мг Gly-S-d5 (5.2.5) в мерную колбу вместимостью 50 мл. Доводят до метки, убедившись, что стандарт полностью растворен в растворителе.

5.3.3 Рабочие растворы

Рекомендуется готовить свежие градуировочные рабочие растворы в день проведения анализа.

Концентрации всех исходных и стандартных растворов необходимо корректировать с учетом чистоты используемых стандартов.

Примечание — Добавочный раствор (5.3.3.4) и раствор внутреннего стандарта (5.3.3.5) можно хранить в холодильнике не менее трех месяцев.

5.3.3.1 Градуировочный рабочий раствор I (3-МХПД: 7,9 мкг/мл, глицидол: 7,8 мкг/мл, 2-МХПД: 7,2 мкг/мл). Пипеткой переносят 300 мкл исходного раствора (5.3.2.1) в виалу для ГХ вместимостью 2,5 мл, содержащую 1700 мкл толуола (5.4.4) и гомогенизируют с помощью вихревой мешалки.

5.3.3.2 Градуировочный рабочий раствор II (3-МХПД: 3,2 мкг/мл, глицидол: 3,1 мкг/мл, 2-МХПД: 2,9 мкг/мл). Пипеткой переносят 120 мкл исходного раствора (5.3.2.1) в виалу для ГХ вместимостью 2,5 мл, содержащую 1880 мкл толуола (5.4.4) и гомогенизируют с помощью вихревой мешалки.

5.3.3.3 Градуировочный рабочий раствор III (3-МХПД: 0,16 мкг/мл, глицидол: 0,16 мкг/мл, 2-МХПД: 0,14 мкг/мл). Пипеткой переносят 40 мкл градуировочного рабочего раствора I (5.3.3.1) в виалу для ГХ вместимостью 2,5 мл, содержащую 1960 мкл толуола (5.4.4) и гомогенизируют с помощью вихревой мешалки.

5.3.3.4 Добавочный раствор (3-МХПД: 1,05 мкг/мл, глицидол: 1,04 мкг/мл, 2-МХПД: 0,69 мкг/мл). Пипеткой переносят 5,0 мл добавочного исходного раствора (5.3.2.2) в мерную колбу вместимостью 250 мл и доводят до метки растворителем.

5.3.3.5 Раствор внутреннего стандарта (3-МХПД-$^{13}C_3$: 1,54 мкг/мл, глицидол-d5: 0,92 мкг/мл). Пипеткой переносят 5,0 мл Gly-S-d5 (5.3.2.4) и 10,0 мл РР-3-МХПД-$^{13}C_3$ (5.3.2.3) в мерную колбу вместимостью 250 мл и доводят до метки растворителем.

5.4 Другие реактивы

5.4.1 Метанол, аналитической степени чистоты.

5.4.2 Изооктан, аналитической степени чистоты.

5.4.3 Ацетон, аналитической степени чистоты.

5.4.4 Толуол, аналитической степени чистоты.

5.4.5 *Трет*-бутил-метиловый эфир, аналитической степени чистоты.

5.4.6 Вода, ультрачистая.

5.4.7 Серная кислота (чистота ≥95 %).

5.4.8 Фенилборная кислота (чистота ≥97 %).

5.4.9 Бромид натрия (чистота ≥99,5 %).

5.4.10 Раствор метоксида натрия в метаноле (массовая доля 25 %).

5.4.11 Растительное масло холодного отжима без термической обработки (контрольное масло, см. 9.4).

5.5 Растворы реактивов

5.5.1 Водный раствор серной кислоты (25 %). Переносят 25 мл серной кислоты (5.4.7) в мерную колбу вместимостью 100 мл, содержащую 50 мл воды (5.4.6). Доводят до метки водой (5.4.6) и гомогенизируют.

5.5.2 Кислый водный раствор бромида натрия (бромид натрия 600 мг/мл, объемная доля серной кислоты 0,9 %). Растворяют 600 г бромида натрия (5.4.9) в 700 мл воды (5.4.6). Переносят раствор бромида натрия в мерную колбу вместимостью 1000 мл, содержащую 36 мл раствора серной кислоты (5.5.1). Доводят до метки водой (5.4.6) и гомогенизируют.

5.5.3 Раствор метоксида натрия (0,35М). Переносят 20 мл метоксида натрия (массовая доля 25 %) (5.4.10) в мерную колбу вместимостью 250 мл, доводят до метки метанолом (5.4.1) и гомогенизируют.

Примечание — Раствор метоксида натрия (0,35М) можно хранить в холодильнике в течение не менее трех месяцев.

5.5.4 Раствор фенилборной кислоты (насыщенный). Берут навеску 12,0 г фенилборной кислоты (5.4.8) и добавляют 100 мл смеси воды (5.4.6) с ацетоном (5.4.3) с объемной долей воды 5 %. Энергично встряхивают.

Примечание — Фенилборная кислота полностью не растворяется в смеси растворителей. На этапе дериватизации используют только надосадочный слой (см. 8.1.11). Этот раствор можно хранить при комнатной температуре в течение не менее трех месяцев.

6 Оборудование

6.1 Вихревая мешалка.

6.2 Охлаждаемый лоток для проб, с поддерживаемой температурой (10 ± 0,5) °С.

6.3 Подогреваемый лоток для проб, с возможностью перемешивания, с поддерживаемой температурой (80 ± 4,0) °С.

6.4 Ультразвуковая ванна.

6.5 Система ГХ-МС/МС, с инжектором с делением/без деления потока и опцией обратной продувки.

6.6 ГХ-колонка из плавленого кварца, неподвижная фаза: 5 % дифенила — 95 % диметилполисилоксана или аналогичной полярности, длиной 20 м, внутренним диаметром 0,18 мм, толщиной пленки 0,18 мкм. Предколонка: неподвижная фаза: 5 % дифенила — 95 % диметилполисилоксана или аналогичной полярности, длиной 2 м, внутренним диаметром 0,53 мм, толщиной пленки 0,10 мкм.

Предколонку периодически заменяют для сохранения хорошей формы пика и чувствительности.

6.7 Микродозатор, позволяющий дозировать объем от 1,0 до 1000 мкл.

Использование микродозатора рекомендуется для последовательного добавления точных количеств растворов внутренних стандартов или разведения стандартов для градуировки.

7 Проба и хранение

7.1 Отбор проб

Отбор проб не является предметом данного метода. Рекомендуемый метод отбора проб приведен в ISO 5555.

7.2 Подготовка пробы для испытания

Жидкие пробы используют без дополнительной обработки. Твердые или непрозрачные жиры осторожно расплавляют при температуре приблизительно 60 °С в сушильном шкафу или на водяной бане. Для высокоплавких жиров температуру увеличивают постепенно, с шагом 10 °С, пока не начнется процесс плавления. Пробы с большим содержанием воды перед отбором проб необходимо высушить (например, безводным Na_2SO_4).

Жиры и масла с температурами плавления свыше 60 °С часто затвердевают в процессе выдерживания при температуре 10 °С в присутствии реакционной среды (см. 8.1.4). Это влияет на полноту расщепления сложного эфира, поскольку скорость реакции существенно снижается. Для поддержания реакции важно, чтобы высокоплавкие жиры образовывали эмульсию в виде молочного раствора. Полностью затвердевшие пробы обычно показывают низкую интенсивность сигнала и невоспроизводимые результаты. Сигналы внутреннего стандарта являются эффективными маркерами для обнаружения проб, которые с трудом подвергаются реакции расщепления. Если сигналы внутреннего стандарта пробы составляют менее 50 % от средних сигналов внутреннего стандарта проб для определения степени извлечения, необходимо заново готовить пробы с меньшим содержанием жира или масла.

7.3 Условия хранения

На концентрации глицидиловых эфиров влияют условия хранения, тогда как на концентрации эфиров МХПД — не влияют. Подтверждено, что комнатная температура (22 °С) обеспечивает наилучшую стабильность как для глицидиловых эфиров, так и для сложных эфиров МХПД и, таким образом, пробы следует хранить именно в таких условиях. Пробы нельзя хранить в холодильнике (при температуре 4 °С), поскольку там со временем может произойти разложение глицидиловых эфиров.

8 Проведение испытания

8.1 Подготовка пробы для испытания

Примечание — Процедура приведена для одной пробы. График подготовки параллельных проб серии из 20 проб для этапов 8.1.5 и 8.1.6 приведен в таблице А.2.

8.1.1 Берут навеску от 100 до 120 мг пробы масла или жира (с точностью до 0,01 мг) в виале для ГХ вместимостью 2,5 мл. Для жиров и масел с температурами плавления свыше 60 °С берут навеску не более 100 мг жира, чтобы предотвратить застывание реакционной смеси в ходе переэтерификации (см. 10.1).

8.1.2 Ко всем пробам добавляют 100 мкл толуола (5.4.4) и 200 мкл *трет*-бутил-метилового эфира (5.4.5), а затем 100 мкл рабочего раствора внутреннего стандарта (5.3.3.5).

Этапы 8.1.3—8.1.9 должны выполняться без перерывов, чтобы обеспечить правильное количественное определение.

8.1.3 Перемешивают все пробы с помощью нагреваемой мешалки (80 °С, 250 об/мин) в течение 120 с или пока весь жир не расплавится и не растворится.

8.1.4 Гомогенизируют в течение 10 с с помощью вихревой мешалки и помещают виалы в охлаждаемый лоток для проб (10 °С). Оставляют их охлаждаться в течение точно 240 с.

8.1.5 Начинают переэтерификацию, добавляя 200 мкл раствора метоксида натрия (5.5.3). Гомогенизируют в течение 10 с после добавления раствора метоксида натрия (5.5.3), используя вихревую мешалку, и помещают пробу обратно на охлаждаемый лоток.

8.1.6 Спустя точно 12 мин останавливают реакцию, добавляя 700 мкл кислого водного раствора бромида натрия (5.5.2). Гомогенизируют в течение 10 с с помощью вихревой мешалки и оставляют стабилизироваться при комнатной температуре в течение не менее 5 мин для полного преобразования всего глицидола в 3-МБПД.

8.1.7 Добавляют во все пробы по 300 мкл изооктана (5.4.2) и гомогенизируют с помощью вихревой мешалки в течение 10 с.

8.1.8 Все пробы перемешивают с помощью нагреваемой мешалки (80 °С, 400 об/мин) в течение (270 ± 10) с или до полного растворения и гомогенизации (частично) затвердевшего или желатинированного верхнего слоя (см. 7.2).

8.1.9 Дают пробам остыть в течение 3 мин перед отделением органического слоя, следя за тем, чтобы не удалить часть водного слоя, и отбрасывают экстракт.

8.1.10 Добавляют 600 мкл свежего изооктана (5.4.2) и гомогенизируют с помощью вихревой мешалки в течение 10 с с последующим отделением органического слоя, следя за тем, чтобы не удалить часть водного слоя. Экстракт отбрасывают.

8.1.11 Добавляют 100 мкл раствора фенилборной кислоты (5.5.4) и гомогенизируют с помощью вихревой мешалки в течение 10 с.

8.1.12 Добавляют 600 мкл свежего изооктана (5.4.2) и гомогенизируют с помощью вихревой мешалки в течение 10 с, чтобы извлечь производные и проанализировать методом ГХ-МС/МС, путем введения 2,0 мкл органической фазы.

8.2 Построение градуировочной кривой

8.2.1 В 10 виалах для ГХ вместимостью 2,5 мл взвешивают по 100—120 мг контрольного масла (5.4.11). Добавляют толуол (5.4.4), *трет*-бутил-метиловый эфир (5.4.5), раствор внутреннего стандарта (5.3.3.5) и соответствующий градуировочный раствор (5.3.3.1—5.3.3.3), как показано в таблице А.1.

8.2.2 Обрабатывают градуировочные пробы согласно процедуре, использованной для испытуемых проб, начиная с растворения пробы (см. 8.1.3).

Все соотношения растворителя и реактивов должны быть одинаковыми для всех градуировочных проб и неизвестных проб, как описано в 8.1.

8.3 Параметры газовой хроматографии и масс-спектрометрии

8.3.1 Вводимый объем: 2,0 мкл.

8.3.2 Режим ввода: без деления потока, время без деления равно 2,0 мин.

8.3.3 Температура при вводе пробы: 350 °С.

8.3.4 Газ-носитель: гелий, скорость потока: 1,7 мл/мин, постоянный поток продувки септы: 5,0 мл/мин, разделенный поток равен 100 мл/мин.

8.3.5 Время начала обратной продувки: 6,0 мин. Параметры начала обратной продувки следует определять заново после каждого изменения, касающегося аналитической колонки или предколонки.

8.3.6 Температурная программа термостата ГХ: 70 °С (изотермический режим в течение 1 мин), от 70 °С до 120 °С со скоростью 15 °С/мин (изотермический режим в течение 0,5 мин), от 120 °С до 350 °С со скоростью 40 °С/мин (изотермический режим в течение 2,5 мин).

8.3.7 Тандемный масс-спектрометрический детектор с ионизацией электронным ударом (EI), мониторинг выбранных реакций (SRM), температура линии передачи: 315 °C, температура ионного источника: 290 °C.

8.3.8 Пример времени удерживания ± поправка: 3-МХПД (6,70 ± 0,3) мин, 2-МХПД (6,80 ± 0,3) мин и 3-МБПД (7,00 ± 0,3) мин. Фактические значения времени удерживания могут отличаться для разных колонок.

Параметры для массовых переходов MC/MC приведены в таблице 1. Примеры хроматограмм представлены в приложении С.

Таблица 1 — Обзор настроек тандемного масс-спектрометрического детектора для массовых переходов каждой пары ионов

Название компонента	Родительский (исходный) ион Q1, масса/заряд (m/z)	Ячейка соударений Q2, eV[a]	Дочерний ион Q3, масса/заряд (m/z)	Цель массового перехода
3-МХПД	196	8	147	Количественное определение 3-МХПД
3-МХПД	198	8	147	Количественное определение 3-МХПД
3-МХПД-$^{13}C_3$	199	8	149	Количественное определение. Внутренний стандарт 3-МХПД/2-МХПД
3-МХПД-$^{13}C_3$	201	8	149	Количественное определение. Внутренний стандарт 3-МХПД/2-МХПД
2-МХПД	196	14	104	Количественное определение 2-МХПД
2-МХПД	198	14	104	Количественное определение 2-МХПД
3-МБПД	240	8	147	Количественное определение глицидола
3-МБПД	242	8	147	Количественное определение глицидола
3-МБПД-13C3[b]	243	8	149	Количественное определение. Завышенная оценка глицидола из 3-МХПД
3-МБПД-d5	245	8	150	Количественное определение. Внутренний стандарт глицидола
3-МБПД-d5	247	8	150	Количественное определение. Внутренний стандарт глицидола

[a] Параметры eV в ячейке соударений могут отличаться для разных типов тандемных масс-спектрометров, систем от разных производителей, или для того и другого вместе, и требуют оптимизации для каждой отдельной системы.

[b] Квалификационный массовый переход для 3-МБПД-$^{13}C_3$ невозможен за счет эффекта интерференции природного изотопа ^{13}C 3-МБПД (m/z 242), который извлекается совместно с ним в описанных условиях.

9 Обработка результатов

9.1 Общие положения

Обработка результатов должна происходить в определенном порядке, так чтобы можно было количественно определить и скорректировать завышение результата определения глицидола. 3-МХПД

является источником образования глицидола *in vitro* в процессе реакции переэтерификации (см. 8.1.5), причем количество образовавшегося глицидола прямо пропорционально концентрации сложного эфира [8] 3-МХПД. Поэтому сначала определяют количественно сложные эфиры 2-МХПД и 3-МХПД по формулам, приведенным в 9.2.

В 9.3 представлены расчеты для глицидиловых эфиров. Вначале определяют общее количество глицидола. Поскольку 3-МХПД-$^{13}C_3$ присутствует в известном количестве, он служит модельным соединением для имитации разложения 3-МХПД в процессе переэтерификации. Поскольку как меченый, так и немеченый 3-МХПД преобразуются в свой глицидоловый аналог с одинаковой скоростью и независимо от концентрации 3-МХПД, количество глицидол-$^{13}C_3$ (см. 9.3.3) служит одноточечной градуировкой для вычисления количества глицидола, индуцированного эфирами 3-МХПД (см. 9.3.4) [8]. Преобразование 3-МХПД в глицидол не зависит от матрицы. Следовательно, все формулы, описанные в 9.2 и 9.3, следует применять ко всем пробам без исключения, включая пробы с добавкой для определения степени извлечения.

9.2 Количественное определение сложных эфиров 2-МХПД и 3-МХПД

9.2.1 Строят градуировочную кривую, откладывая по оси *x* отношение количества стандарта (в пересчете на свободный эквивалент х-МХПД) к количеству внутреннего стандарта (в пересчете на свободный эквивалент 3-МХПД-$^{13}C_3$), а по оси *y* — отношение площадей соответствующих пиков. Для количественного определения используются ионы с отношением m/z 104 (2-МХПД) или m/z 147 (3-МХПД) и 149 (3-МХПД-$^{13}C_3$). Линию регрессии рассчитывают по формуле

$$y = ax + b, \tag{1}$$

где *y* — измеренное отношение сигналов 2-/3-МХПД и 3-МХПД-$^{13}C_3$;

x — теоретическое отношение 2-/3-МХПД, мкг, к 3-МХПД-$^{13}C_3$, мкг, в градуировочной пробе;

a — наклон градуировочной кривой;

b — отрезок, отсекаемый градуировочной кривой на оси *y*.

Следует убедиться, что линейность хорошая (R^2 > 0,99) и отрезок на оси *y* предпочтительно < |0,01|, для достижения необходимой точности для проб при очень низкой концентрации сложных эфиров 2-/3-МХПД. См. 10.4.

9.2.2 Концентрацию эфиров 2-МХПД и 3-МХПД в испытуемой пробе, мг/кг, рассчитывают по формуле

$$w_{\text{uncorrected}} = \frac{\left(\frac{A_{\text{analyte}}}{A_{\text{IS}}}\right) - b}{a} \cdot m_{\text{IS}} \cdot \frac{1000}{m_{\text{sample}}}, \tag{2}$$

где $w_{\text{uncorrected}}$ — нескорректированная концентрация сложных эфиров 2-/3-МХПД в испытуемой пробе в пересчете на свободный 2-/3-МХПД, мг/кг масла;

A_{analyte} — площадь пика немеченого аналита (2-МХПД, m/z 104 или 3-МХПД, m/z 147);

m_{IS} — масса 3-МХПД-$^{13}C_3$, добавленного в испытуемую пробу, мкг;

A_{IS} — площадь пика производного 3-МХПД-$^{13}C_3$ (m/z 149);

a — наклон градуировочной кривой;

b — отрезок, отсекаемый градуировочной кривой на оси *y*;

m_{sample} — масса пробы, мг.

9.2.3 Степень извлечения сложных эфиров 2-/3-МХПД в контрольных пробах масла с добавкой, %, рассчитывают по формуле

$$R = \frac{w_{\text{spiked blank oil}}}{w_{\text{theoretical}}} \cdot 100, \tag{3}$$

где *R* — степень извлечения для сложных эфиров 2-/3-МХПД в серии испытуемых проб, %;

$w_{spiked\ blank\ oil}$ — усредненная нескорректированная концентрация сложных эфиров 2-/3-МХПД, полученная по 9.2.2 для контрольных проб масла с добавкой;

$w_{theoretical}$ — расчетная теоретическая концентрация сложных эфиров 2-/3-МХПД в контрольных пробах масла с добавкой, мг/кг, вычисленная исходя из массы пробы и концентрации добавочного раствора (5.3.3.4).

9.2.4 Конечный результат для сложных эфиров 2-/3-МХПД в испытуемой пробе, мг/кг, рассчитывают по формуле

$$w_{final} = w_{uncorrected} \cdot \frac{100}{R}, \quad (4)$$

где w_{final} — конечная скорректированная концентрация сложных эфиров 2-/3-МХПД в испытуемой пробе в пересчете на свободный 2-/3-МХПД, мг/кг масла;

$w_{uncorrected}$ — нескорректированная концентрация сложных эфиров 2-/3-МХПД в испытуемой пробе, полученная по 9.2.2, в пересчете на свободный 2-/3-МХПД, мг/кг масла;

R — рассчитанная степень извлечения, полученная по 9.2.3, %.

9.3 Количественное определение глицидиловых эфиров

9.3.1 Строят градуировочную кривую, откладывая по оси *x* отношение количества стандарта (в пересчете на эквивалент глицидола) к количеству внутреннего стандарта (в пересчете на эквивалент дейтерированного глицидола), а по оси *y* — отношение площадей соответствующих пиков. Для количественного определения используются ионы с отношением m/z 147 (3-МБПД) и m/z 150 (3-МБПД-d5). Рассчитывают линию регрессии по формуле

$$y = ax + b, \quad (5)$$

где y — измеренное отношение сигналов 3-МБПД и 3-МБПД-d5;

x — теоретическое отношение 3-МБПД, мкг, и 3-МБПД-d5, мкг, в градуировочной пробе;

a — наклон градуировочной кривой;

b — отрезок, отсекаемый градуировочной кривой на оси *y*.

Следует убедиться, что линейность хорошая (R^2 > 0,99) и отрезок на оси *y* предпочтительно < |0,01|, для достижения необходимой точности для проб при очень низкой концентрации глицидиловых эфиров. См. 10.4.

9.3.2 Общую концентрацию глицидола в испытуемой пробе, мг/кг, рассчитывают по формуле

$$w_{uncorrected} = \frac{\left(\frac{A_{analyte}}{A_{IS}}\right) - b}{a} \cdot m_{IS} \cdot \frac{1000}{m_{sample}}, \quad (6)$$

где $w_{uncorrected}$ — общая концентрация глицидола в испытуемой пробе в пересчете на свободный глицидол, мг/кг масла;

$A_{analyte}$ — площадь пика производного 3-МБПД (m/z 147);

m_{IS} — масса глицидола-d5, добавленного в испытуемую пробу, мкг;

A_{IS} — площадь пика производного 3-МБПД-d5 (m/z 150);

a — наклон градуировочной кривой;

b — отрезок, отсекаемый градуировочной кривой на оси *y*.

m_{sample} — масса пробы, мг.

9.3.3 Количество глицидола-$^{13}C_3$, образовавшегося в результате щелочной переэтерификации, мг/кг, рассчитывают по формуле (7), см. 10.3:

$$w_{gly^{13}C_3} = \left(\frac{A_{analyte}}{A_{IS}}\right) \cdot m_{IS} \cdot \frac{1000}{m_{sample}}, \quad (7)$$

где $w_{gly\ ^{13}C_3}$ — концентрация глицидола-$^{13}C_3$ в испытуемой пробе в пересчете на свободный глицидол-$^{13}C_3$, мг/кг масла;

$A_{analyte}$ — площадь пика производного 3-МБПД-$^{13}C_3$ (m/z 149);

m_{IS} — масса глицидола-d5, добавленного к испытуемой пробе, мкг;

A_{IS} — площадь пика производного 3-МБПД-d5 (m/z 150);

m_{sample} — масса пробы, мг.

9.3.4 Концентрацию глицидола, индуцированного 3-МХПД в результате щелочной переэтерификации, мг/кг, рассчитывают по формуле

$$w_{glyMCPD} = \left(\frac{R_{3\text{-}MCPDe}}{w_{3\text{-}MCPD\text{-}^{13}C_3}} \right) \cdot w_{gly\ ^{13}C_3}, \quad (8)$$

где $w_{glyMCPD}$ — концентрация глицидола, индуцированного 3-МХПД, в испытуемой пробе в пересчете на свободный глицидол, мг/кг масла;

$R_{3\text{-}MCPDe}$ — концентрация сложных эфиров 3-МХПД в испытуемой пробе (см. 9.2.4);

$w_{3MCPD\ ^{13}C_3}$ — концентрация 3-МХПД-$^{13}C_3$, добавленного в испытуемую пробу, мг/кг масла;

$w_{gly\ ^{13}C_3}$ — концентрация глицидола-$^{13}C_3$ в пробе, мг/кг масла, (см. 9.3.3).

9.3.5 Концентрацию глицидола, индуцированного глицидиловыми эфирами, в испытуемой пробе, мг/кг, рассчитывают по формуле

$$w_{GE} = w_{uncorrected} - w_{glyMCPD}, \quad (9)$$

где w_{GE} — концентрация глицидола, индуцированного глицидиловыми эфирами, в испытуемой пробе в пересчете на свободный глицидол, мг/кг масла;

$w_{uncorrected}$ — нескорректированная концентрация глицидола в испытуемой пробе (см. 9.3.2);

$w_{glyMCPD}$ — концентрация глицидола, индуцированного 3-МХПД, в испытуемой пробе, мг/кг масла (см. 9.3.4).

9.3.6 Вычисляют степень извлечения глицидола, индуцированного глицидиловыми эфирами, %, по формуле

$$R = \frac{w_{spiked\ blank\ oil}}{w_{theoretical}} \cdot 100, \quad (10)$$

где R — степень извлечения глицидиловых эфиров в серии испытуемых проб, %;

$w_{spiked\ blank\ oil}$ — усредненный результат по 9.3.5 для контрольных проб масла с добавкой;

$w_{theoretical}$ — расчетная теоретическая концентрация глицидиловых эфиров в контрольных пробах масла с добавкой, вычисленная в зависимости от массы пробы и концентрации добавочного раствора (5.3.3.4), мг/кг.

9.3.7 Определяют конечный результат для глицидиловых эфиров в испытуемой пробе, мг/кг, по формуле

$$w_{final} = w \cdot \frac{100}{R}, \quad (11)$$

где w_{final} — конечная скорректированная концентрация сложного эфира глицидола в испытуемой пробе в пересчете на свободный глицидол, мг/кг масла;

w — концентрация глицидилового эфира в испытуемой пробе в пересчете на свободный глицидол, мг/кг масла, полученная по 9.3.5;

R — рассчитанная степень извлечения, %, полученная по 9.3.6.

9.4 Контроль качества

Валидация метода должна быть проведена в соответствии с международными методическими рекомендациями по валидации аналитических методов.

Факторы степени извлечения (см. 9.2.3 и 9.3.6) определяют не реже одного раза в сутки, двумя параллельными определениями, с помощью контрольной пробы термически необработанного растительного масла с добавочным раствором (5.3.3.4).

Для определения степени извлечения заменяют 100 мкл толуола на этапе 8.1.2 добавочным раствором (5.3.3.4) в объеме 100 мкл. Остальная процедура идентична процедуре с испытуемыми пробами.

Примеры подходящих термически необработанных растительных масел включают оливковое масло первого отжима и сырое рапсовое масло. Масла первого отжима и сырые растительные масла не содержат соединений глицидола или 2-/3-МХПД в обнаруживаемых количествах.

Следует избегать введения добавок в большие количества контрольных проб жиров или масел, которые предполагается использовать в течение длительного периода времени. Некоторые контрольные масла содержат следовые количества неизвестных компонентов, которые могут вступить в реакцию с глицидиловыми эфирами, приводя к созданию нестабильных и снижающихся со временем концентраций. Поэтому настоятельно рекомендуется готовить свежие растворы с добавками непосредственно перед анализом, как описано в 8.1.

Для контроля специфичности и правильности метода ежедневно анализируют контрольный образец и заполняют карту контроля качества для всех аналитов по соответствующим данным.

10 Примечания

10.1 Для некоторых матриц сырого масла или жира органический слой может частично затвердевать или желатинироваться [7]. Это не повлияет на количественное определение компонентов, если этап 8.1.8 выполнен корректно. Если пробы с температурами плавления свыше 60 °С проявляют признаки затвердевания во время переэтерификации или на этапе 8.1.8 и площадь пиков внутренних стандартов составляет менее 50 % от типичных площадей пиков внутренних стандартов для проб с добавкой, используемых для определения степени извлечения (см. 7.2), то подготовку проб требуется повторить с меньшей массой проб (менее 100 мг). Матрицы с таким особым поведением не использовались для валидации данного метода.

10.2 Все используемые растворы внутренних стандартов готовят с помощью сложных эфиров контрольных соединений. Для всех расчетов в 9.2 и 9.3 используют эквивалентную концентрацию свободного соединения. Концентрации, перечисленные для стандартных растворов в 5.3, также выражают как эквивалентные концентрации свободного соединения. Эти концентрации свободных эквивалентов 2-/3-МХПД и глицидола в мкг/мл основаны на массе сложных эфиров компонентов, перечисленных в 5.2. В качестве стандартов можно использовать сложные эфиры других компонентов, но при этом соответствующим образом скорректировать массу сложного эфира соединения, чтобы получить аналогичные концентрации свободного эквивалента. Формула (12) может быть использована для расчета требуемой массы сложного эфира стандарта, чтобы получить раствор желаемой концентрации свободного эквивалента в мкг/мл.

$$m_{std} = \frac{m_{mol}}{m_{free\ eq}} \cdot w_{std\ sol} \cdot \frac{V_{std\ sol}}{1000}, \quad (12)$$

где m_{std} — масса взвешенного стандарта, мг;

m_{mol} — молярная масса использованного стандарта МХПД или глицидилового эфира, г/моль;

$m_{free\ eq}$ — молярная масса свободного эквивалентного компонента; МХПД (110,539 г/моль) или глицидола (74,079 г/моль);

$w_{std\ sol}$ — желаемая концентрация свободного эквивалента в стандартном растворе, мг/л;

$V_{std\ sol}$ — желаемый объем стандартного раствора.

10.3 Применяя условия переэтерификации, описанные в разделе 8 данного метода, преобразование 3-МХПД в глицидол ожидается от 5 % до 10 % для типичного контрольного масла. Такая скорость конверсии является стабильной в воспроизводимых условиях, но в значительной степени зависит от

концентрации $NaOCH_3$, температуры и времени реакции. Таким образом, скорость конверсии для проб для определения степени извлечения может служить дополнительной проверкой стабильности метода и контролем возможного разложения реактивов или погрешностей подготовки. Отклонение от этой скорости конверсии является типичным результатом отклонения температуры переэтерификации (неэффективное охлаждение) или концентрации $NaOCH_3$ в соответствии с процедурой, описанной в 8.1, или ошибками расчетов концентраций внутреннего стандарта.

Пример — Для определения степени извлечения, при концентрации 3-МХПД-$^{13}C_3$, равной 1,5 мг/кг в пробе, ожидаемая концентрация глицидола-$^{13}C_3$ составит от 0,08 до 0,15 мг/кг, по расчетам в 9.3.4.

Кроме того, в описанных условиях преобразование 2-МХПД в глицидол будет менее 1 %. Таким образом, поправка не учитывает глицидол, индуцированный 2-МХПД, поскольку этим можно пренебречь в отношении завышения содержания глицидилового эфира.

10.4 Значения наклона градуировочной кривой следует ожидать в пределах от 0,80 до 1,00 и от 0,95 до 1,05 для 2-МХПД и 3-МХПД, соответственно. Можно ожидать, что для 3-МБПД наклон градуировочной кривой будет находиться между 1,00 и 1,25. Градуировочные кривые не требуется строить ежедневно и их можно применять в течение нескольких недель, при использовании специальных инструментов, до тех пор, пока стандарты степени извлечения и пробы контроля качества используют для проверки достоверности градуировочной кривой.

Для получения представительных градуировочных кривых крайне важно, чтобы градуировочные пробы и неизвестные пробы обрабатывались одинаково. Любые отклонения условий переэтерификации, такие как соотношение пробы и растворителя и типы растворителя будут давать разные наклоны. Наклоны, таким образом, можно использовать как еще одну точку контроля качества метода, для мониторинга его эффективности.

Другими возможными причинами отклонений наклона являются проблемы приготовления исходных градуировочных растворов или ошибочный расчет теоретических соотношений между целевым аналитом и внутренним стандартом.

10.5 Обслуживание инжектора (6.5) оказалось критически важным для гарантии точности метода, особенно для количественного определения глицидиловых эфиров. Если инжектор регулярно не очищать изопропанолом и не менять вкладыш, результаты по глицидиловым эфирам будут включать возрастающую положительную систематическую погрешность. Рекомендуемый интервал для обслуживания инжектора — один или два раза в неделю, в зависимости от количества анализируемых проб. Более того, настоятельно рекомендуется корпус инжектора тщательно очищать не реже одного раза в полгода метанолом, изопропанолом и гексаном [7].

10.6 В обычных условиях можно ожидать значения степени извлечения от 80 % до 120 %. Значения, выходящие за границы этого диапазона, часто указывают на ухудшение качества добавочного раствора (5.3.3.4) или раствора внутреннего стандарта (5.3.3.5). Другие причины зачастую возникают из-за непоследовательности в ходе подготовки проб, например различий в условиях переэтерификации градуировочной и испытуемой серий.

11 Точность

11.1 Общие положения

Этот метод был оценен в международном совместном исследовании, организованном ISO и AOCS, проведенном с февраля по май 2020 г. в соответствии с ISO 5725-5. Анализ выбросов был проведен в соответствии с критерием Кохрана (внутрилабораторная дисперсия) и критерием Граббса (межлабораторная дисперсия). Исследование включило восемь различных масел и жиров растительного происхождения (см. таблицы В.1—В.3).

11.2 Повторяемость

Расхождение между двумя независимыми единичными результатами испытаний, полученными одним и тем же методом на идентичном испытуемом материале в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, использующим одно и то же оборудование в один и тот же день, не превысит 12 % RSD (2-МХПД), 9 % (3-МХПД) или 11 % (глицидол).

11.3 Воспроизводимость в интервале нескольких дней

Расхождение между двумя независимыми единичными результатами испытаний, полученными одним и тем же методом на идентичном испытуемом материале в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, использующим одно и то же оборудование в течение короткого промежутка времени (например, пять дней), не должно превышать 27 % (2-МХПД), 15 % (3-МХПД) или 38 % (глицидол).

Приложение А
(обязательное)

Вспомогательные таблицы

Таблица А.1 — Схема построения градуировочной кривой для SS-2-МХПД, PP-3-МХПД и Gly-S

	Градуировочный раствор (ГР) (5.3.3.1—5.3.3.3)	Толуол (5.4.4)	tBME (5.4.5)	2-МХПД, мкг	3-МХПД, мкг	Gly, мкг	Раствор внутреннего стандарта (5.3.3.5)	3-МХПД-$^{13}C_3$, мкг	Gly-d5, мкг
ГР 1	—	100 мкл	200 мкл	0,000	0,000	0,000	100 мкл	0,154	0,092
ГР 2	ГР III (5.3.3.3) 20 мкл	80 мкл	200 мкл	0,003	0,003	0,003	100 мкл	0,154	0,092
ГР 3	ГР III (5.3.3.3) 50 мкл	50 мкл	200 мкл	0,007	0,008	0,008	100 мкл	0,154	0,092
ГР 4	ГР III (5.3.3.3) 100 мкл	—	200 мкл	0,014	0,016	0,016	100 мкл	0,154	0,092
ГР 5	ГР II (5.3.3.2) 20 мкл	80 мкл	200 мкл	0,057	0,063	0,063	100 мкл	0,154	0,092
ГР 6	ГР II (5.3.3.2) 70 мкл	30 мкл	200 мкл	0,202	0,221	0,219	100 мкл	0,154	0,092
ГР 7	ГР II (5.3.3.2) 100 мкл	—	200 мкл	0,289	0,316	0,313	100 мкл	0,154	0,092
ГР 8	ГР I (5.3.3.1) 60 мкл	40 мкл	200 мкл	0,433	0,474	0,470	100 мкл	0,154	0,092
ГР 9	ГР I (5.3.3.1) 75 мкл	25 мкл	200 мкл	0,541	0,593	0,587	100 мкл	0,154	0,092
ГР 10	ГР I (5.3.3.1) 100 мкл	—	200 мкл	0,722	0,790	0,783	100 мкл	0,154	0,092

Примечание 1 — Все пробы приготовлены с использованием от 100 до 110 мг контрольного масла (5.4.11).

Примечание 2 — Для градуировочных проб чистый толуол, добавленный на этапе 8.1.2, заменяют градуировочным раствором I, II или III согласно этой таблице. Если количество градуировочного раствора не равно 100 мкл, разница дополняется чистым толуолом в соответствии с этой таблицей.

Таблица А.2 — Временная схема параллельного расщепления эфиров для серии из 20 проб для этапов 8.1.5 и 8.1.6

Проба	Добавление метоксида натрия (8.1.5), мин	Добавление подкисленного раствора NaBr (8.1.6), мин
1	00:00	12:00
2	00:30	12:30
3	01:00	13:00

Окончание таблицы А.2

Проба	Добавление метоксида натрия (8.1.5), мин	Добавление подкисленного раствора NaBr (8.1.6), мин
4	01:30	13:30
5	02:00	14:00
6	02:30	14:30
7	03:00	15:00
8	03:30	15:30
9	04:00	16:00
10	04:30	16:30
11	05:00	17:00
12	05:30	17:30
13	06:00	18:00
14	06:30	18:30
15	07:00	19:00
16	07:30	19:30
17	08:00	20:00
18	08:30	20:30
19	09:00	21:00
20	09:30	21:30
Временной интервал между пробами является чисто ориентировочным и может регулироваться на усмотрение пользователя, при условии, что для каждой отдельной пробы должно строго соблюдаться общее время реакции 12:00 мин.		

Приложение В
(справочное)

Статистические результаты совместного исследования, проведенного ISO

Таблица В.1 — Статистические результаты для сложного эфира 3-МХПД в мг/кг (в пересчете на свободный 3-МХПД)

Сложный эфир 3-МХПД		S4 Соевое масло	S5 Пальмовое масло	S6 Рапсовое масло	S7 Кокосовое масло	S8 Пальмовый стеарин, Dfr	S9 Пальмовый олеин, Dfr	S10 Кукурузное масло	S11 Рафинированное подсолнечное масло
Описание	Обозначение								
Количество лабораторий, оставшихся после исключения выбросов	p	17	17	17	16	15	15	16	17
Общее среднее	M	0,458	1,376	0,271	0,352	0,352	1,420	0,242	0,137
Стандартное отклонение повторяемости	s_r	0,013	0,075	0,013	0,021	0,031	0,042	0,009	0,010
Относительное стандартное отклонение	$C_{V,r}$ (s_r/M, %)	3 %	5 %	5 %	6 %	9 %	3 %	4 %	7 %
Предел повторяемости	r	0,036	0,208	0,036	0,059	0,085	0,117	0,026	0,027
Стандартное отклонение воспроизводимости	S_R	0,035	0,108	0,031	0,033	0,044	0,137	0,031	0,021
Относительное стандартное отклонение	$C_{V,R}$ (S_R/M, %)	8 %	8 %	11 %	9 %	13 %	10 %	13 %	15 %
Предел воспроизводимости	R	0,098	0,300	0,086	0,091	0,123	0,378	0,086	0,058
Коэффициент Хорвитца (HorRat)		0,4	0,5	0,6	0,7	0,5	0,7	0,6	0,7
Обозначение Dfr = двойного фракционирования									

Таблица В.2 — Статистические результаты для сложного эфира 2-МХПД в мг/кг (в пересчете на свободный 2-МХПД)

Сложный эфир 2-МХПД		S4 Соевое масло	S5 Пальмовое масло	S6 Рапсовое масло	S7 Кокосовое масло	S8 Пальмовый стеарин, Dfr	S9 Пальмовый олеин, Dfr	S10 Кукурузное масло	S11 Рафинированное подсолнечное масло
Описание	Обозначение								
Количество лабораторий, оставшихся после исключения выбросов	p	17	16	17	16	15	15	17	17
Общее среднее	M	0,240	0,711	0,135	0,149	0,255	0,765	0,116	0,084
Стандартное отклонение повторяемости	s_r	0,013	0,029	0,009	0,015	0,031	0,024	0,013	0,009
Относительное стандартное отклонение	$C_{V,r}$ (s_r/M, %)	6 %	4 %	6 %	10 %	12 %	3 %	11 %	11 %

Окончание таблицы В.2

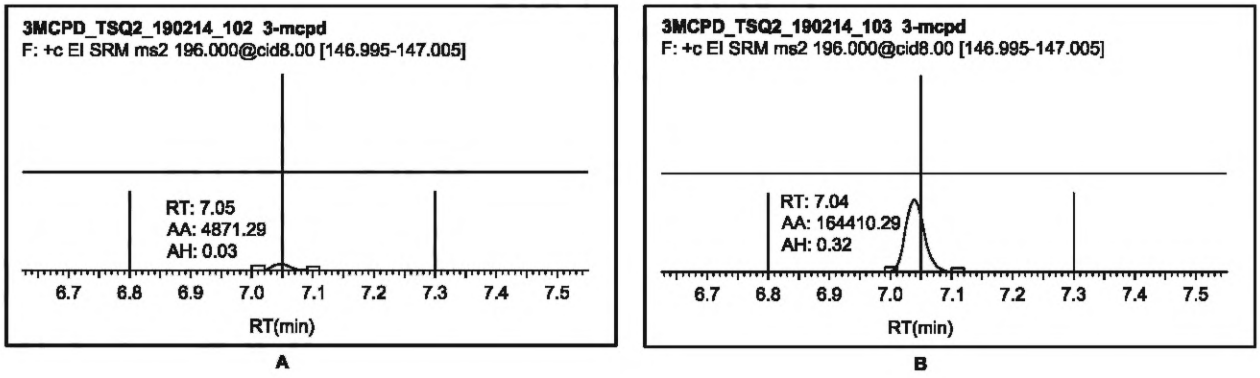
Сложный эфир 2-МХПД		S4 Соевое масло	S5 Пальмовое масло	S6 Рапсовое масло	S7 Кокосовое масло	S8 Пальмовый стеарин, Dfr	S9 Пальмовый олеин, Dfr	S10 Кукурузное масло	S11 Рафинированное подсолнечное масло
Описание	Обозначение								
Предел повторяемости	r	0,037	0,081	0,024	0,042	0,086	0,067	0,036	0,024
Стандартное отклонение воспроизводимости	S_R	0,040	0,052	0,030	0,035	0,051	0,073	0,031	0,029
Относительное стандартное отклонение	$C_{V,R}$ (S_R/M, %)	17 %	7 %	22 %	23 %	20 %	10 %	27 %	34 %
Предел воспроизводимости	R	0,110	0,144	0,084	0,097	0,140	0,202	0,086	0,080
Коэффициент Хорвитца (HorRat)		0,8	0,4	1,0	1,1	1,0	0,6	1,2	1,5
Обозначение Dfr = двойного фракционирования									

Таблица В.3 — Статистические результаты для глицидилового эфира в мг/кг (в пересчете на свободный глицидол)

Глицидиловый эфир		S4 Соевое масло	S5 Пальмовое масло	S6 Рапсовое масло	S7 Кокосовое масло	S8 Пальмовый стеарин, Dfr	S9 Пальмовый олеин, Dfr	S10 Кукурузное масло	S11 Рафинированное подсолнечное масло
Описание	Обозначение								
Количество лабораторий, оставшихся после исключения выбросов	p	14	14	15	16	15	14	15	16
Общее среднее	M	0,224	0,253	0,108	0,133	0,877	0,365	0,361	0,214
Стандартное отклонение повторяемости	s_r	0,007	0,012	0,007	0,009	0,038	0,040	0,013	0,013
Относительное стандартное отклонение	$C_{V,r}$ (s_r/M, %)	3 %	5 %	7 %	7 %	4 %	11 %	4 %	6 %
Предел повторяемости	r	0,018	0,032	0,020	0,025	0,104	0,110	0,037	0,035
Стандартное отклонение воспроизводимости	S_R	0,046	0,065	0,056	0,050	0,170	0,086	0,068	0,035
Относительное стандартное отклонение	$C_{V,R}$ (S_R/M, %)	20 %	26 %	52 %	38 %	19 %	24 %	19 %	16 %
Предел воспроизводимости	R	0,127	0,180	0,154	0,138	0,471	0,239	0,188	0,096
Коэффициент Хорвитца (HorRat)		1,0	1,3	2,3	1,7	1,2	1,3	1,0	0,8
Обозначение Dfr = двойного фракционирования									

Приложение С
(справочное)

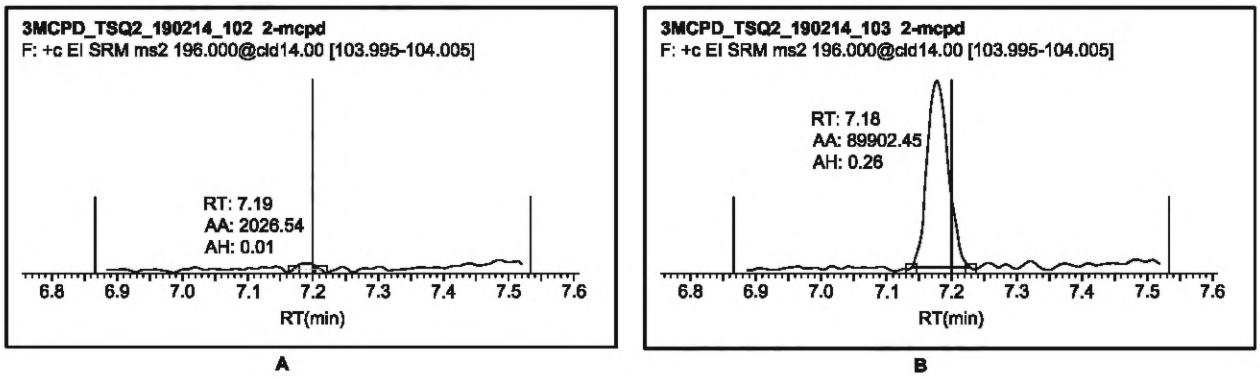
Хроматограммы



Обозначение

Хроматограмма	Время удерживания	Состав
A: градуировочная проба 1		Контрольная проба
B: градуировочная проба 2	7,04	Эквивалентно 30 мкг/кг 3-МХПД в масле

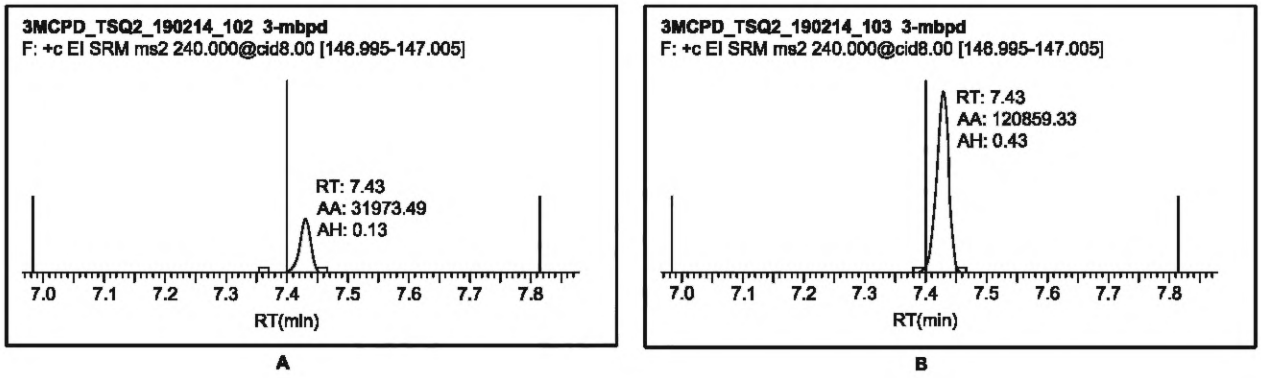
Рисунок С.1 — Градуировочные хроматограммы 3-МХПД



Обозначение

Хроматограмма	Время удерживания	Состав
A: градуировочная проба 1		Контрольная проба
B: градуировочная проба 2	7,18	Эквивалентно 30 мкг/кг 2-МХПД в масле

Рисунок С.2 — Градуировочные хроматограммы 2-МХПД



Обозначение

Хроматограмма	Время удерживания	Состав
A: градуировочная проба 1		Контрольная проба
B: градуировочная проба 2	7,43	Эквивалентно 30 мкг/кг глицидола в масле

Рисунок С.3 — Градуировочные хроматограммы 3-МБПД

Приборы и колонка, использованные для приведенных в качестве примера хроматограмм[1)]:

Газовый хроматограф:	Thermo Scientific Trace 1310 + дозатор SSL-Backflush
Масс-спектрометр:	Thermo Scientific TSQ 8000 Evo
Программное обеспечение для хроматографии:	Tracefinder CDS
Хроматографическая колонка:	Restek Rxi-5 Sil MS (длина 20 м × внутренний диаметр 0,18 мм × толщина пленки 0,18 мкм) с предколонкой: (длина 2 м × внутренний диаметр 0,53 мм × толщина пленки 0,10 мкм)

Остальные параметры приборов описаны в 8.3.

[1)] Приборы и колонка являются примерами подходящей имеющейся в продаже продукции от поставщиков. Эта информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является поддержкой данной продукции со стороны ISO.

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 3696	IDT	ГОСТ ISO 3696—2013 «Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы контроля»
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 5725-5 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 5: Alternative methods for the determination of the precision of a standard measurement method
[Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 5. Альтернативные методы определения прецизионности стандартного метода измерений]

[3] ISO 18363 (все части) Animal and vegetable fats and oils — Determination of fatty-acid-bound chloropropanediols (MCPDs) and glycidol by GC/MS
[Жиры и масла животные и растительные. Определение сложных эфиров хлопропандиолов (МХПД) и глицидола методом ГХ/МС]

[4] AOCS Official Method Cd 29a-13, 2- and 3-MCPD Fatty Acid Esters and Glycidol Fatty Acid Esters in Edible Oils and Fats by Acid Transesterification and GC/MS

[5] AOCS Official Method Cd 29b-13, 2- and 3-MCPD Fatty Acid Esters and Glycidol Fatty Acid Esters in Edible Oils and Fats by Alkaline Transesterification and GC/MS

[6] AOCS Official Method Cd 29c-13, 2- and 3-MCPD Fatty Acid Esters and Glycidol Fatty Acid Esters in Edible Oils and Fats by GC/MS (Difference Method)

[7] ZWAGERMAN R., OVERMAN P. Optimized Analysis of MCPD- and Glycidyl Esters in Edible Oils and Fats Using Fast Alkaline Transesterification and 13C-Correction for Glycidol Overestimation: Validation Including Interlaboratory Comparison, Eur. J. Lipid. Sci. Technol, 2019, 121, 1800395

[8] ZWAGERMAN R., OVERMAN P. A Novel Method For The Automatic Sample Preparation And Analysis of 3-MCPD, 2-MCPD, and glycidylesters In Edible Oils And Fats. Eur. J. Lipid. Sci. Technol. 2016, 118, pp. 997—1006

[9] Deutsche Gesellschaft fur Fettwissenschaft (DGF). DGF Standard Method C-VI 18 (10) Fatty-acid bound 3-chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) and 2,3-epoxipropane-1-ol (glycidol). Determination in oils and fats by GC-MS (Differential measurement). Deutsche Einheitsmethoden zur Untersuchung von Fetten, Fettprodukten, Tensiden und verwandten Stoffen, 2011b

УДК 543.062:006.354 МКС 67.200.10 IDT

Ключевые слова: жиры животные, масла растительные, монохлорпропандиол, сложные эфиры жирных кислот, глицидол, газовая хроматография, масс-спектрометрия

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

Сдано в набор 14.02.2025. Подписано в печать 26.02.2025. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 3,26. Уч.-изд. л. 2,71.

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