ГОСТ Р 51471—99

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ЖИР МОЛОЧНЫЙ

Метод обнаружения растительных жиров газожидкостной хроматографией стеринов

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2011

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Государственным учреждением Всероссийским научно-исследовательским институтом молочной промышленности (ГУ ВНИМИ)

ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 186 «Молоко и молочные продукты»

2 ПРИНЯТ И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Госстандарта России от 22 декабря 1999 г. № 626-ст

3 Настоящий стандарт гармонизирован с международным стандартом ИСО 3594—76 «Молочный жир. Обнаружение растительных жиров газожидкостной хроматографией стеринов (арбитражный метод)»

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

5 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Апрель 2011 г.

© ИПК Издательство стандартов, 1999
© СТАНДАРТИНФОРМ, 2011

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

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ЖИР МОЛОЧНЫЙ

Метод обнаружения растительных жиров газожидкостной хроматографией стеринов

Milk fat. Detection method of vegetable fat by gas-liquid chromatography of sterols

Дата введения 2001—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на молочный жир, выделенный из молока и молочных продуктов, и устанавливает метод обнаружения растительных жиров и масел методом газожидкостной хроматографии стеринов.

Метод основан на процедуре осаждения стеринов в виде дигитонидов, растворения их в смеси формамида с диметилформамидом с последующей экстракцией стеринов пентаном. Окончательное разделение стеринов производят методом газожидкостной хроматографии.

2 Нормативные ссылки

Внастоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 1770—74 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 4165—78 Медь (II) сернокислая 5-водная. Технические условия

ГОСТ 4166—76 Натрий сернокислый. Технические условия

ГОСТ 4328—77 Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 5583—78 (ИСО 2046—73) Кислород газообразный технический и медицинский. Технические условия

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 9293—74 (ИСО 2435—73) Азот газообразный и жидкий. Технические условия

ГОСТ 12026—76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 14022—88 Водород фтористый безводный. Технические условия

ГОСТ 20289—74 Диметилформамид. Технические условия

ГОСТ 24104—88* Весы лабораторные общего назначения и образцовые. Общие технические условия

ГОСТ 24363—80 Калия гидроокись. Технические условия

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

ГОСТ 26809—86 Молоко и молочные продукты. Правила приемки, методы отбора и подготовки проб к анализу

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

ГОСТ 29251—91 (ИСО 385-1—84) Посуда лабораторная стеклянная. Бюретки. Часть 1. Общие требования

ГОСТ Р 51652—2000 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия

ИСО 707—97** Молоко и молочные продукты. Методы отбора проб

* С 1 июля 2002 г. введен в действие ГОСТ 24104—2001. На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р 53228—2008.

** Действует до введения в действие ГОСТ Р, разработанного на основе соответствующего ИСО. С 11 августа 2008 г. действует ИСО 707:2008.

Издание официальное

3 Аппаратура, материалы и реактивы

3.1 Колонка газохроматографическая стеклянная U-образная или спиральная длиной от 100 до 200 см, внутренним диаметром (3 ± 1) мм. Твердый носитель: кальцинированный диатомитовый, очищенный кислотой и покрытый кремневодородом. Жидкая фаза: смола каучуковая метилсиликоновая, стабильная при температуре от 300 °С. Ячейки размером 80/100 меш (175—150 мкм) или 100/120 меш (150—125 мкм). Массовая доля метилсиликоновой каучуковой смолы на носителе от 2 до 4 %.

3.2 Хроматограф газовый, оснащенный пламенно-ионизационным детектором и записывающим устройством.

3.3 Микрошприц вместимостью $5 \cdot 10^{-3}$ или $10 \cdot 10^{-3}$ см³.

3.4 Воронка фильтрующая ВФ по ГОСТ 25336 диаметром фильтра 90 мм.

3.5 Азот газообразный по ГОСТ 9293, особой чистоты.

3.6 Водород по ГОСТ 14022.

3.7 Кислород газообразный технический по ГОСТ 5583, первый сорт.

3.8 Формамид по нормативной документации.

3.9 Диметилформамид по ГОСТ 20289.

3.10 н-Пентан ч.д.а. (для хроматографии).

3.11 Натрий сернокислый по ГОСТ 4166, х.ч.

3.12 Калия гидроокись по ГОСТ 24363, х.ч.

3.13 Масло рапсовое по ГОСТ 8988—77.

3.14 Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ Р 51652, высшей очистки.

3.15 Эфир диэтиловый по [1].

3.16 Дигитонин, спиртовой раствор массовой концентрации 10 г/дм³.

3.17 Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

3.18 Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.

3.19 Пробирки стеклянные по ГОСТ 25336, вместимостью 25 см³.

3.20 Раствор для контроля чувствительности при обнаружении стеринов молочного жира — раствор, состоящий из 1 мг свежеприготовленных стеринов молочного жира и 1 см³ н-пентана.

3.21 Раствор для проверки эффективности разделения стеринов — раствор, состоящий из 0,9 мг стеринов рапсового масла, 0,1 мг стеринов молочного жира и 1 см³ н-пентана. Используют свежеприготовленные стерины из рапсового масла и молочного жира соответственно 6.1.

3.22 Раствор для повседневного контроля — раствор, состоящий из 1 мг стеринов свежеприготовленных из соевого масла и 1 см³ н-пентана 6.1.

3.23 Медь (II) сернокислая 5-водная по ГОСТ 4165, раствор массовой концентрации 70 г/дм³ х.ч.

Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками и оборудование с техническими характеристиками не хуже, а также реактивов по качеству не ниже вышеуказанных.

4 Отбор проб

Отбор проб — по ГОСТ 26809, для экспортно-импортных операций — по ИСО 707.

5 Подготовка к анализу

5.1 Подготовка пробы

Для обнаружения растительных жиров и масел в молочном жире, выделенном из молока, сливок, сыра, концентрированного молока, сгущенного молока, мороженого, сухого молока, отбирают пробу, которая должна обеспечить выделение из нее не менее 30 г молочного жира.

5.1.1 Масло сливочное

Пробу продукта массой 50 г расплавляют при температуре не более 50 °С до расслоения на жир и воду. При температуре не более 40 °С пробу фильтруют через сухую фильтровальную бумагу (3.18) так, чтобы вода не попадала на фильтр.

5.1.2 Молоко и сливки

Пробу продукта помещают в центрифугу для получения сливок массовой долей жира 40 %. Сливки взбивают до получения масла. Отбирают пробу масла и продолжают подготовку по 5.1.1.

5.1.3 Сметана

Пробу продукта взбивают до получения масла и продолжают подготовку по 5.1.1.

5.1.4 Сыр

Пробу продукта измельчают в растворе с безводным сульфатом натрия до получения зернистой массы.

5.1.5 Концентрированное молоко, сгущенное молоко и мороженое

В пробу продукта добавляют 100 см³ кипяченой воды, нагревают смесь на водяной бане до температуры 75 °С. Добавляют 15 см³ раствора сульфата меди (II) и продолжают нагревать смесь до получения сгустка. Фильтруют сгусток через фильтровальную бумагу, промывают его теплой водой до обесцвечивания фильтрата. Осторожно сливают осадок, перемешивают его с безводным сульфатом натрия до получения зернистой массы.

5.1.6 Сухое молоко

Пробу восстанавливают в дистиллированной воде до получения густой массы и оставляют на 15 мин до набухания белков. Добавляют безводный сульфат натрия. Размельчают с помощью миксера до тех пор, пока не образуется зернистая масса.

5.1.7 Из пробы продукта, подготовленной по 5.1.1 — 5.1.6, пентаном экстрагируют молочный жир. Пентан удаляют выпариванием на водяной бане до получения прозрачного молочного жира.

5.1.8 Приготовление стеринов

Навеску молочного жира по 5.1.7 массой (15 ± 0,1) г вносят в коническую колбу вместимостью 500 см³, добавляют 10 см³ гидроокиси калия по 3.12 и 20 см³ этилового спирта по 3.14.

Присоединяют к колбе воздушный конденсатор. Нагревают смесь на водяной бане в течение 30 мин при непрерывном вращении колбы до получения прозрачного раствора.

Добавляют 60 см³ воды, затем 180 см³ этилового спирта. Нагревают смесь до 40 °С. Добавляют 30 см³ спиртового раствора дигитонина (3.16), перемешивают и охлаждают в холодильнике при температуре 5 °С в течение 12 ч.

Дигитонин стерина выделяют из полученного раствора, пропуская его через фильтрующее устройство: фильтровальную бумагу и фильтрующую воронку диаметром фильтра 90 мм.

Промывают фильтрат водой температурой 5 °С до прекращения пенообразования, после чего промывают фильтрат, используя от 25 до 50 см³ этилового спирта. Затем промывают фильтрат, используя от 25 до 50 см³ диэтилового эфира (3.15).

Фильтровальную бумагу и полученный осадок высушивают при температуре (102 ± 2) °С в течение 10 — 15 мин. Сухой остаток на фильтре является дигитонином стерина.

Дигитонин стерина отделяют от фильтра и переносят его в стеклянную бюксу.

5.1.9 Установка чувствительности хроматографа

Дозатором вводят в колонку от $3 \cdot 10^{-3}$ до $5 \cdot 10^{-3}$ см³ раствора для контроля чувствительности (3.20). При этом на хроматограмме должен появиться один пик, соответствующий холестерину (см. рисунок 1). Устанавливают скорость диаграммы, чувствительность детектора и коэффициент усиления записывающего устройства так, чтобы высота пика хроматограммы холестерина была не менее 50 % верхнего предела регистрации записывающего устройства.

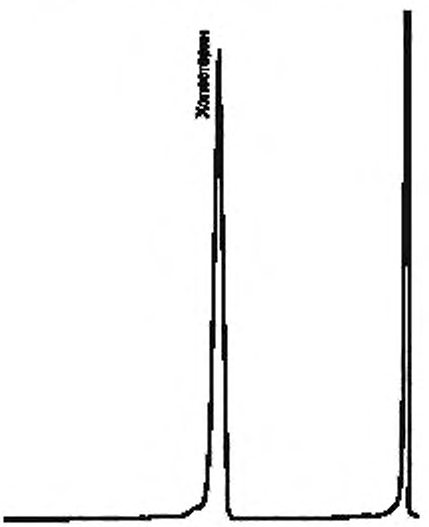

Рисунок 1 — Газожидкостная хроматограмма стерина молочного жира

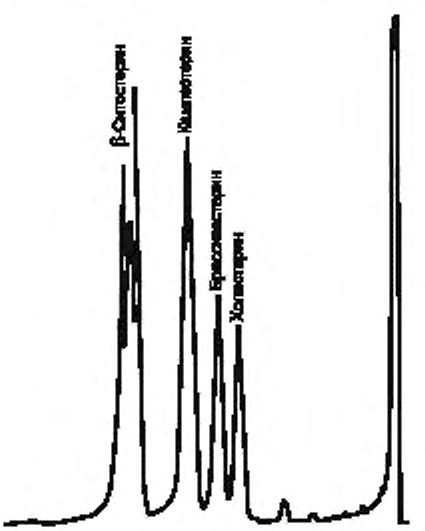

Рисунок 2 — Газожидкостная хроматограмма стеринов молочного жира и рапсового масла

5.1.10 Определение эффективности разделения стеринов

Дозатором вводят в колонку от $3 \cdot 10^{-3}$ до $5 \cdot 10^{-3}$ см^3 раствора для проверки эффективности разделения (3.21). На хроматограмме должны появиться пики холестерина, брассикастерина, кампестерина и β-ситостерина (см. рисунок 2).

Измеряют на хроматограмме расстояния, пропорциональные времени удерживания (расстояния от момента введения раствора в колонку до наивысших точек пиков): d_{ch} — для холестерина, d_b — для брассикастерина, d_c — для кампестерина, d_s — для β-ситостерина. Измеряют ширину оснований пиков и расстояния между вершинами пиков (измерение ширины оснований проводят между пересечениями основной линии с касательными к точкам перегиба с передней и задней сторон вершин), w_{ch} — для холестерина и w_b — для брассикастерина.

Определяют коэффициент разделения по формуле

$$PR = 2(d_b - d_{ch})/(w_b + w_{ch}). \quad (1)$$

Коэффициент разделения должен быть не менее 1,0. При коэффициенте разделения 1,5 достигается почти полное разделение. Полное разделение имеет место при коэффициенте более 1,5.

Для измерения ширины основания пика проводят прямые, касательные к точкам перегиба хроматограммы с каждой стороны пика, до пересечения их с основной линией. Ширина основания равняется отрезку на основной линии, концами которого являются точки пересечения касательных с основной линией.

Подсчитывают значение PR по формуле (1).

5.1.11 Проведение повседневного контроля

Вводят в колонку от $3 \cdot 10^{-3}$ до $5 \cdot 10^{-3}$ см^3 раствора для повседневного контроля (3.22). На хроматограмме должны появиться пики кампестерина, стигмастерина и β-ситостерина (см. рисунок 3). Измеряют расстояние между вершинами пиков d_c — для кампестерина, d_{st} — для стигмастерина и d_s — для β-ситостерина.

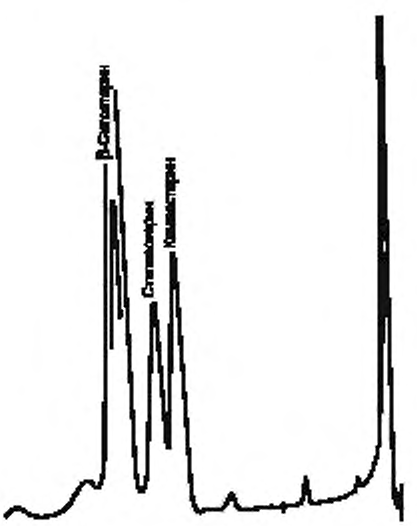

Рисунок 3 — Газожидкостная хроматограмма стеринов соевого масла

Значение относительного времени удержания должно соответствовать:

Холестерин	1,00 (около 15 мин)
Брассикастерин	1,13—1,15
Кампестерин	1,32—1,34
Стигмастерин	1,44—1,46
β-ситостерин	1,66—1,68

Измерения по 5.1.10 и 5.1.11 повторяют дважды.

6 Проведение анализа

6.1 Вносят (10 ± 1) мг дигитонина стерина в пробирку и добавляют 0,5 см^3 смеси формамида и диметилформамида. При необходимости раствор осторожно подогревают. Добавляют 2,5 см^3 н-пентана (3.10) в охлажденный раствор, закрывают пробирку пробкой и перемешивают интенсивным вращением. Оставляют в покое до расслоения и используют для анализа верхний слой, содержащий свободные стерины. Расчетное значение массовой концентрации стеринов в верхнем слое раствора 1 мг/см^3.

6.2 Температуру колонки устанавливают от 220 до 250 °С, а систему дозирования дополнительно нагревают на (30 ± 10) °С выше температуры колонки.

6.3 Скорость подачи азота устанавливают от 30 до 60 см^3/мин.

6.4 Новые колонки для стабилизации выдерживают при условиях 6.2 — 6.3 и при отключенном детекторе в течение 16 — 24 ч.

6.5 Подключают детектор, зажигают пламя и регулируют скорость подачи водорода и кислорода (или воздуха) так, чтобы высота пика хроматограммы холестерина была не менее 50 % верхнего предела регистрации записывающего устройства.

6.6 Включают записывающее устройство, подбирают скорость записи и устанавливают перо самописца на нулевую отметку. Подачу водорода, кислорода и включение записывающего устройства производят в соответствии с инструкцией к прибору.

6.7 Вводят в колонку от $3 \cdot 10^{-3}$ до $5 \cdot 10^{-3}$ см^3 раствора по 6.1 и записывают хроматограмму. Для более точного определения последовательно проводят запись четырех хроматограмм. Первую и третью хроматограмму записывают для раствора контроля чувствительности (3.20); вторую и четвертую — для раствора, приготовленного по 6.1. Объемы растворов должны быть одинаковыми.

7 Обработка результатов

Если на хроматограмме наблюдают пики с временем удерживания, характерным для β-ситостеринов, и их высота составляет более чем 2 % верхнего предела измерений установленного по 3.20, то это подтверждает наличие β-ситостеринов в анализируемой пробе.

Присутствие на хроматограмме пика β-ситостерина или других фитостеринов подтверждает наличие в пробе продукта растительных масел или жиров.

8 Метрологические характеристики

Наименьший предел измерений метода — не менее 0,5 % массовой доли β-ситостерина в молочном жире.

ПРИЛОЖЕНИЕ А
(справочное)

Библиография

[1] ГФ X Эфир диэтиловый для наркоза

УДК 637.2/.3/.147.2:006.354 ОКС 67.100.01 Н19 ОКСТУ 9209

Ключевые слова: молочный жир, стерины, растительный жир, растительное масло, газожидкостная хроматография стеринов, обработка результатов