«СОГЛАСОВАНО»
Заместитель директора
БелГИМ
В.Н. ЮЛЬКО
«5» 06 2000 г.

«УТВЕРЖДАЮ»
Главный Государственный
Санитарный врач
Республики Беларусь
В.П. Филонов
«14» июня 2000 г.

МЕТОДИКА

ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ И ХОЛЕСТЕРИНА В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ И СЫВОРОТКЕ КРОВИ

МВИ. МН 1364-2000

МИНСК
1999

gost.e-ecolog.ru

1. Область применения

Методика предназначена для определения жирнокислотного состава (миристиновой, пальмитиновой, пальмитолеиновой, стеариновой, олеиновой, линолевой, линоленовой, арахидоновой кислот) и общего холестерина в продуктах питания, их смесях (рационах) и сыворотке крови.

Метод определения жирных кислот основан на выделении липидов продуктов питания и сыворотки крови экстракцией органическими растворителями, метанолизе липидов с получением метиловых эфиров жирных кислот, газохроматографическом разделении последних и количественном определении методом внутреннего стандарта с использованием градуировочного графика, выражающего зависимость отношений площадей пиков метиловых эфиров жирных кислот к внутреннему стандарту от концентрации соответствующих жирных кислот

Метод определения общего холестерина основан на выделении липидов продуктов питания и сыворотки крови экстракцией органическими растворителями, омылении эфиров холестерина в составе липидов в щелочной среде, экстракции холестерина органическим растворителем и его газохроматографическом анализе методом внутреннего стандарта с использованием градуировочного графика, выражающего зависимость отношения площадей пиков холестерина к внутреннему стандарту от концентрации холестерина. [1]

Нижний предел измерения для жирных кислот и холестерина составляет $1 \bullet 10^{-4}$г/100 г пробы (0,1 мг%)[2].

Интервал определяемых концентраций:

-для каждой индивидуальной жирной кислоты – $1 \cdot 10^{-4}$- 80 г/100 г пробы (0,1-80000 мг %), в линейном диапазоне $1 \cdot 10^{-4}$- 25 г/100 г (0,1-25000 мг%); При содержании жирных кислот более 25 г/100 г (2500 мг%) проводится соответствующее разбавление анализируемых проб.

-для холестерина – $1 \cdot 10^{-4}$ –2,4 г/100 г пробы (0,1-2400 мг%) в этом же линейном диапазоне ($1 \cdot 10^{-4}$- 2,4 г/100 г пробы).

Время определения составляет 7-8 часов, включая подготовку проб.

---

[1] Достоинством метода внутреннего стандарта является то, что при его использовании нет необходимости вводить точные количества пробы и знать коэффициент чувствительности детектора по отношению к разным эфирам жирных кислот, так как любое изменение в величине вводимой пробы или чувствительности детектора не оказывает влияния на величину используемого при расчетах соотношения площадей пиков определяемого метилового эфира кислоты и метилового эфира кислоты, взятого в качестве внутреннего стандарта.

2. Нормы погрешности измерений

При доверительной вероятности p=0,95 относительная суммарная погрешность измерения, границы неисключенных систематических погрешностей, доверительные границы случайной погрешности МВИ в диапазоне определяемых концентраций $1 \bullet 10^{-4}$-80г/100г для жирных кислот и $1 \bullet 10^{-4}$ – 2,4г/100г для холестерина приведены в табл.1.

Таблица 1

Анализируемое вещество Пищевой продукт	Доверительные границы случайной погрешности	Границы суммы неисключенных систематических погрешностей, %	Относительная суммарная погрешность результата измерения, %
Холестерин			
Пищевые рационы	14,5	21,56	26,9
Жиры животные	10,2	21,78	25,1
Мясные продукты	8,99	21,56	24,5
Сыворотка крови	4,76	22,21	22,8
Миристиновая кислота			
Сыворотка крови	18,8	22,77	30,2
Пищевые рационы	13,1	22,11	26,8
Мясные продукты	19,8	22,11	30,3
Жир	15,2	22,33	27,8
Хлебные и крупяные продукты	15,4	22,77	24,9
Пальмитолеиновая кислота			
Сыворотка крови	17,0	22,0	28,6
Пищевые рационы	19,5	21,38	29,4
Мясные продукты	15,2	21,39	27,15
Жир	13,9	21,56	26,8
Хлебные и крупяные продукты	17,4	22,06	24,9
Линоленовая кислота			
Сыворотка крови	21,6	22,0	31,2
Пищевые рационы	22,08	22,33	32,4
Мясные продукты	18,0	21,45	28,6
Жир	16,45	21,56	27,9
Хлебные и крупяные продукты	18,0	22,11	29,2
Арахидоновая кислота			
Сыворотка крови	23,65	22,99	34,2
Пищевые рационы	19,8	22,33	30,4
Мясные продукты	20,8	22,33	31,0
Жир	16,45	22,55	29,4
Хлебные и крупяные продукты	-	22,99	-

[2] миллиграмм-процент (мг%) – понятие, используемое в медико-биологических исследованиях при обозначении концентрации определяемых веществ в биосубстратах и составляет количество мг на 100 г пробы

Пальмитиновая кислота			
Сыворотка крови	16,45	21,34	24,7
Пищевые рационы	11,3	20,68	24,6
Мясные продукты	15,9	20,68	26,8
Жир	14,1	20,9	25,3
Хлебные и крупяные продукты	13,6	21,37	26,3
Стеариновая кислота			
Сыворотка крови	13,1	21,12	25,8
Пищевые рационы	13,4	20,35	26,2
Мясные продукты	18,2	20,46	32,0
Жир	15,7	20,57	26,6
Хлебные и крупяные продукты	18,8	21,12	28,8
Олеиновая кислота			
Сыворотка крови	15,4	21,67	27,4
Пищевые рационы	12,3	21,01	26,1
Мясные продукты	13,4	21,01	25,8
Жир	11,6	21,23	25,2
Хлебные и крупяные продукты	14,4	21,78	27,0
Линолевая кислота			
Сыворотка крови	18,9	20,68	28,5
Пищевые рационы	13,4	19,91	24,8
Мясные продукты	15,9	19,91	26,1
Жир	14,9	20,13	25,0
Хлебные и крупяные продукты	12,3	20,0	25,0

3. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы, материалы.

3.1. Средства измерений:

Газовый хроматограф типа "Цвет 500М" с пламенно ионизационным детектором 5Е1.550.168-01ТО

Весы аналитические ВЛР-200, II класса — по ГОСТ 24104-80Е

Микрошприц типа МШ-10 — по ТУ 2-833-106

Колба мерная 2-25-2 — по ГОСТ 1770-74Е

2-100-2

2-200-2

Колба круглодонная вместимостью 100 $см^3$ — по ГОСТ 23932-90Е

Пробирки вместимостью 5 $см^3$, п-2-5-14/23 — по ГОСТ 1770-74Е

15 $см^3$, п-2-15-14/23 — по ГОСТ 1770-74Е

Пипетки вместимостью 0,1 $см^3$, 8-2-0,1 — по ГОСТ 20292-74

0,2 $см^3$,8-2-0,2 — по ГОСТ 20292-74

1,0 $см^3$, 3-2-1 — по ГОСТ 20292-74

5,0 $см^3$, 3-2-5	по ГОСТ20292-74
10,0 $см^3$, 3-2-10	по ГОСТ 20292-74
Цилиндры мерные 100,0 $см^3$	по ГОСТ 1770-74Е

3.2. Вспомогательные устройства

Колонка капиллярная кварцевая HP FFAP	
30 м х 0,53 мм, толщина слоя жидкой фазы 1,0 мкм	фирма Хьюлетт-Паккард
Испаритель ротационный ИР-М	по ТУ 255-11-917-74
Насос водоструйный стеклянный	по ГОСТ 25396-82Е
Шкаф сушильный ШСС-80	
с диапазоном температур от +50 до +200°С	ТУ 92-00243346-01-92
Точность поддержания температуры	± 4° С
Ступка фарфоровая	по ГОСТ 3147-80
Бумага фильтровальная с размером пор 0,5 мкм	по ГОСТ12069

Могут быть использованы другие средства измерения и вспомогательные устройства, по точности не уступающие рекомендуемым в методике

3.3. Реактивы и материалы

Гелий высокой чистоты	ТУ 51-940-80
Водород технический	по ГОСТ 3028-80
Воздух сжатый	по ГОСТ 17433-80
α-холестан	фирма Sigma, 99,0% чистоты
Холестеринпальмитат	фирма Sigma, 98,0% чистоты
Метиловые эфиры жирных кислот:	
Миристиновой	фирма Merck, 98,0% чистоты
Пальмитиновой	фирма Merck, 98,0% чистоты
Пальмитолеиновой	фирма Merck, 98,0% чистоты
Стеариновой	фирма Merck, 98,0% чистоты
Олеиновой	фирма Merck, 98,0% чистоты
Линолевой	фирма Merck, 98,0% чистоты
Линоленовой	фирма Merck, 98,0% чистоты
Арахидоновой	фирма Merck, 98,0% чистоты
Пентадекановой (внутренний стандарт)	фирма Sigma, 99,0% чистоты
Маргариновой (внутренний стандарт)	фирма Sigma, 99,0% чистоты
Триолеин (триглицерид олеиновой кислоты)	фирма Sigma, 99,0% чистоты
Этиловый спирт, ректификат	по ГОСТ 5962-67

Хлороформ, чда	по ГОСТ 20015-88
Метиловый спирт (содержащий не более 0,5% воды)	по ГОСТ6995-77
Натрий металлический	по ТУ 6-09-356-7
Гексан, хч	по ТУ 6-09-06-657-86
Вода дистилированная	по ГОСТ 6709-72
Калия гидроксид, ч	по ГОСТ 9285-78

4. Метод измерения

Для определения состава жирных кислот и содержания холестерина в продуктах питания и сыворотке крови используется метод газо-жидкостной хроматографии, основанной на детектировании метиловых эфиров жирных кислот и холестерина пламенно-ионизационным детектором.

5. Требования безопасности

Анализ по данной методике должен выполняться согласно инструкции «Основные правила безопасной работы в химических лабораториях». -М.:Химия, 1979 г.

6. Требования к квалификации оператора

К выполнению измерений могут быть допущены лица, имеющие высшее или среднее специальное образование, изучившие требования безопасности и настоящую методику, прошедшие подготовку для работы в качестве оператора газового хроматографа.

7. Условия выполнения измерений

При выполнении измерений в лаборатории согласно ГОСТ 15150-69 должны быть соблюдены следующие условия:

-температура воздуха 20±5°С;

-атмосферное давление 84,0-106,7 кПа (630-800 мм рт.ст.);

-влажность воздуха не более 80% при температуре 25°С;

-напряжение питающей сети 220±22 В;

-частота переменного тока -50±1 Гц.

8. Подготовка к выполнению измерений

8.1. Перед выполнением измерений должны быть проведены следующие работы: подготовка измерительной аппаратуры, приготовление растворов, установление градуировочной характеристики, отбор и подготовка проб к анализу

8.2. Подготовка измерительной аппаратуры

Включают хроматограф согласно инструкции по эксплуатации. Устанавливают рабочие режимы для термостата, колонок, испарителя и детектора (см. п.8.6). Проводят стабилизацию работы хроматографа на рабочих режимах в течение 20-30 мин. Условием стабильности является дрейф нулевого сигнала не превышающий 1-2% от шкалы регистрации сигнала при чувствительности, соответствующий минимально определяемой концентрации.

8.3. Приготовление растворов

8.3.1. Приготовление раствора гидроксида калия в этиловом спирте (~ 5,7 н)

В стеклянном стакане на 100 $см^3$ взвешивают 16,0 г гидроксида калия с точностью до первого десятичного знака. В стакан добавляют мерным цилиндром 50 $см^3$ этилового спирта и перемешивают содержимое до полного растворения реактива. Затем раствор переносят в стеклянную склянку или бутылку на 70-100 $см^3$ с пришлифованной пробкой. Реактив может храниться в течение 3 дней.

8.3.2. Приготовление метанольного раствора метилата натрия (~1 н)

Металлический натрий хранят в сосуде под слоем керосина. Не вынимая весь металлический натрий, отрезают скальпелем пластинку натрия примерно 1,2 г, быстро переносят ее пинцетом в бюкс с гексаном и отмывают от керосина. После этого натрий помещают в другой бюкс с чистым гексаном, под слоем которого разрезают скальпелем на 4-6 частей. Разрезанный на части натрий помещают пинцетом в предварительно взвешенный стаканчик на 50 $см^3$ и быстро взвешивают (1,1-1,2 г) с точностью до второго десятичного знака. Затем в стаканчик с натрием добавляют небольшими порциями (по 3 - 5 $см^3$) метанол (общее количество метанола 13-15 $см^3$) до полного растворения металла. Полученный раствор фильтруют через воронку с бумажным фильтром в мерную колбу на 25 $см^3$. Фильтрат доводят метанолом до метки. Раствор хранят в колбочке или бутылке с притертой пробкой в холодильнике. Время хранения реактива – в течение 6 месяцев при сохранении прозрачности.

Примечание: Все работы с метиловым спиртом должны выполняться в вытяжном шкафу.

8.3.3. Приготовление основных стандартных растворов метиловых эфиров жирных кислот

Готовят основной стандартный раствор №1 смеси метиловых эфиров миристиновой, пальмитолеиновой, линоленовой и арахидоновой кислот концентрацией 100 мкг/см^3 в пересчете на свободные кислоты. Для этого на часовом стекле взвешивают с точностью до ±0,0001 г 21,2 мг метилового эфира миристиновой, 21,1 мг пальмитолеиновой, 21,0 мг линоленовой, 20,9 мг арахидоновой кислот. Эфиры переносят через стеклянную воронку в мерную колбу на 200 см^3, смывая порциямн гексана. Колбу встряхивают до полного растворения вещества и доводят раствор гексаном до метки.

Готовят основной стандартный раствор №2 смеси метиловых эфиров пальмитиновой, стеариновой, олеиновой, линолевой кислот концентрацией 1000 мкг/см^3 в пересчете на свободные кислоты взвешиванием на часовом стекле с точностью до ±0,0001 г 105,5 мг метилового эфира пальмитиновой кислоты и по 105,0 мг метиловых эфиров остальных кислот. Эфиры переносят через стеклянную воронку в мерную колбу на 100 см^3, смывая порциями гексана. Колбу встряхивают до полного растворения веществ и доводят раствор гексаном до метки. Растворы №1 и №2 хранят в морозильнике холодильника в течение месяца.

8.3.4. Приготовление стандартных растворов внутренних стандартов – метиловых эфиров пентадекановой и маргариновой кислот

Готовят стандартный раствор внутренних стандартов – смеси метиловых эфиров пентадекановой и маргариновой кислот с концентрацией соответственно 50,0 мкг/см^3 (метилпентадеканат) и 500,0 мкг/см^3 (метилмаргаринат). Для этого на часовом стекле взвешивают с точностью до ±0,0001 г 10,0 мг метилового эфира пентадекановой кислоты и 100,0 мг метилового эфира маргариновой кислоты и с помощью гексана как и в п. 8.3.3. переносят в одну мерную колбу на 200 см^3, колбу встряхивают до полного растворения веществ и доводят объем раствора гесаном до метки. Раствор хранится в морозильнике холодильника (-15°С) в течение месяца.

8.3.5. Приготовление градуировочных растворов метиловых эфиров жирных кислот

Градуировочные растворы жирных кислот готовят по схеме, представленной в табл.2.

Таблица 2

№ градуировочного раствора	Концентрация жирных кислот в градуировочном растворе, мкг/см^3	Аликвотная часть основного градуировочного раствора смеси метиловых эфиров жирных кислот концентрации 100 мкг/см^3 (миристиновая, пальмитолеиновая, линоленовая. арахидоновая) (раствор А) и 1000 мкг/см^3 (пальмитиновая, стеариновая, олеинова,линолевая) (раствор Б), см^3	Аликвотная часть стандартного раствора смеси внутренних стандартов – метилового эфира пентадекановой (концентрация 100 мкг/см^3) и маргариновой кислот (концентрация 1000 мкг/см^3)	Конечный объем гексанового раствора, см^3
	Градуировочный график №1 миристиновой, пальмитолеиновой, линоленовой, арахидоновой			
1А	5,0	1,25	12,5	25,0
2А	10,0	2,5	12,5	25,0
3А	20,0	5,0	12,5	25,0
4А	30,0	7,5	12,5	25.0
5А	40,0	10,0	12,5	25,0
6А	50,0	12,5	12,5	25,0
	Градуировочный график №2 пальмитиновой, стеариновой, олеиновой, линолевой			
1Б	50,0	1,25	12,5	25,0
2Б	100,0	2,5	12,5	25,0
3Б	200,0	5,0	12,5	25,0
4Б	300,0	7,5	12,5	25,0
5Б	400,0	10,0	12,5	25,0
6Б	500,0	12,5	12,5	25,0

Аликвотные части основных стандартных растворов жирных кислот и раствора внутренних стандартов (п.8.3.4) переносят в мерные колбы вместимостью 25 см^3 и доводят гексаном до метки. Растворы хранятся в морозильнике холодильника (-15°С) в течение 2 недель.

8.3.6. Приготовление стандартного раствора внутреннего стандарта α-холестана

Готовят стандартный раствор внутреннего стандарта α-холестана в гексане концентрацией 50,0 мкг/см^3. На часовом стекле взвешивают с точностью до ±0,0001 г 12,5 мг α-холестана, небольшими порциями гексана (5-10 см^3) количественно переносят смыванием через воронку в мерную колбу на 250 см^3. Раствор встряхивают до полного растворения α-холестана и доводят до метки гексаном. Раствор хранится в холодильнике в склянке с притертой пробкой в течение года.

8.3.7. Приготовление основного стандартного раствора холестеринпальмитата

Готовят основной стандартный раствор холестеринпальмитата концентрацией 100 мкг/см^3 в пересчете на холестерин. На часовом стекле взвешивают с точностью до ±0,0001 г 32,3 мг холестеринпальмитата и переносят смыванием небольшими порциями гексана через воронку в мерную колбу на 200 см^3. Раствор встряхивают до полного растворения холестеринпальмитата и доводят объем раствора гексаном до метки. Раствор хранят в морозильнике холодильника (-15°С) в течение месяца.

8.3.8. Приготовление градуировочных растворов холестеринпальмитата

Готовят градуировочные растворы холестеринпальмитата концентрацией 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 100,0; 150,0 мкг/см^3 в пересчете на свободный холестерин Для этого отбирают аликвотные части основного стандартного раствора холестеринпальмитата – 0,2 см^3; 0,4 см^3; 1,0 см^3; 2,0 см^3; 4,0 см^3, 6,0 см^3 и каждую аликвоту помещают в круглодонные колбы на 100 см^3, упаривают на ротационном испарителе при 40°С досуха и остаток растворяют в 2,0 см^3 стандартного раствора внутреннего стандарта α-холестана, отбираемого пипеткой на 2 см^3. Растворы могут храниться в пробирках с пришлифованными пробками в морозильнике холодильника (-15°С) в течение 2 недель.

8.3.9. Омыление стандартных растворов холестеринпальмитата

Для построения градуировочной зависимости необходимо провести омыление (гидролитическое расщепление) эфиров холестерина в градуировочных растворах до свободного холестерина, который может быть определен газохроматографически. Для этого к растворам, полученным по п.8.3.8 в круглодонных колбочках на 100 см^3 поочередно добавляют пипеткой по 5,0 см^3 спиртового раствора гидроксида калия (п.8.3.1), энергично встряхивают в течение 1-2 мин, затем в колбочки добавляют по 5 см^3 дистиллированной воды и снова энергично встряхивают еще 1-2 мин. Смесь переносят через стеклянные воронки в пробирки вместимостью 15 см^3 и оставляют до разделения слоев. Для анализа используется верхний гексановый слой.

8.4. Установление времени удерживания метиловых эфиров жирных кислот и холестерина

Для определения времени удерживания метиловых эфиров жирных кислот 5 мкл одного из градуировочных стандартных растворов А и Б, приготовленных по п.8.3.5 хроматографируют не менее 3 раз. Вычисляют среднее арифметическое из величин времен удерживания эфира каждой кислоты, фиксируют и используют для идентификации метиловых эфиров жирных кислот в пробах.

Для определения времени удерживания холестерина 5 мкл верхнего гексанового слоя одного из градуировочных растворов холестерина, полученных по п.8.3.9 хроматографируют не менее 3 раз. Вычисляют среднее арифметическое из величин времен удерживания холестерина, фиксируют и используют для идентификации холестерина анализируемых проб.

При анализе жирных кислот и холестерина в продуктах питания допустимое расхождение времен удерживания определяемых компонентов при хроматографировании 2 параллельных проб не должно отличаться более чем на 2 % от ранее установленных величин. Если времена удерживания метиловых эфиров жирных кислот и холестерина отличаются от зафиксированных проверяют правильность установки температурных режимов программирования колонки и давления газа-носителя.

Условия хроматографирования:

Объем вводимой пробы	5 мкл
Давление газа-носителя водорода на входе в колонку	80 кРа
Температура колонки	Программирование от 150 до 240°С со скоростью 10°/мин
Температура испарителя	280°С
Температура детектора	290°С
Расход водорода через детектор	30 $см^3$/мин
Расход воздуха	300 $см^3$ /мин

8.5. Установление градуировочной характеристики метиловых эфиров жирных кислот и холестерина.

Построения градуировочного гафика №1

Хроматографируют градуировочные растворы А (п.8.3.5), начиная с самой низкой концентрации (п.8.4). По полученным хроматограммам измеряют площади пиков,

соответствующих метиловым эфирам миристиновой, пальмитолеиновой, линоленовой, арахидоновой и пентадекановой кислот. Вычисляют отношения площадей пиков метиловых эфиров миристиновой, линоленовой и арахидоновой кислот к площади пика внутреннего стандарта метилового эфира пентадекановой кислоты. Строят градуировочный график, выражающий зависимость этих отношений (численные значения которых откладывают по оси Y) от концентрации соответствующих градуировочных растворов (п.8.3.5) (численные значения откладывают по оси X).

Построение гадуировочного графика №2

Хроматографируют градуировочные растворы Б (п.8.3.5), начиная с самой низкой концентрации (п.8.4). По полученным хроматограммам измеряют площади пиков, соответствующих метиловым эфирам пальмитиновой, стеариновой, олеиновой, линолевой и маргариновой кислот. Вычисляют отношения площадей пиков метиловых эфиров пальмитиновой, стеариновой, олеиновой и линолевой кислот к площади пика внутреннего стандарта метилового эфира маргариновой кислоты. Строят градуировочный график, выражающий зависимость этих отношений (численные значения которых откладывают по оси Y) от концентрации жирных кислот соответствующих градуировочных растворов (п.8.3.5) (численные значения откладывают по оси X).

Построение градуировочного графика №3

Хроматографируют градуировочные растворы холестерина (п.8.3.9), начиная с самой низкой концентрации (п.8.4), измеряют площади пиков, соответствующих холестерину и α-холестану. Вычисляют отношения площадей пиков холестерина к площади пика внутреннего стандарта α-холестана. Строят градуировочный график, выражающий зависимость этих отношений (численные значения которых откладывают по оси Y) от концентрации холестерина соответствующих градуировочных растворов (п.8.3.8) (численные значения откладывают по оси X).

При построении градуировочных графиков используют не менее 3 серий градуировочных растворов и каждый раствор хроматографируют не менее 2 раз и вычисляют среднее арифметическое определяемых соотношений. Результаты отношений площадей пиков анализируемых компонентов к площади пиков внутренних стандартов при двух параллельных хроматографированиях не должны отличаться более чем на 7%.

Для построения градуировочных графиков используют средние арифметические значения отношения площадей пиков, вычисленных по всем сериям градуировочных растворов.

В области анализа используемых градуировочных растворов графики имеют линейный характер. Графики проходят через начало координат, либо имеют смещение по оси Y на ±7% от диапазона измерения по этой шкале.

8.5.1. Контроль градуировочного графика

Контроль градуировочного графика осуществляется по градуировочным растворам метиловых эфиров жирных кислот и холестеринпальмитата. Для контроля должны применяться растворы с концентрацией определяемых компонентов, входящей в диапазон измерений, но не повторяющие по значениям концентрации, по которым рассчитывали параметры градуировочной прямой. Допустимые расхождения между заданными и установленными по графику значениями концентраций, используемых для контроля градуировочных растворов не должны превышать 17,3% для метиловых эфиров жирных кислот ии16,5% для холестеринпальмитата. В противном случае график подлежит повторной перепроверке и, при необходимости, новому расчету параметров градуировочной прямой. График подлежит обязательной проверке при замене партии реактивов и посуды, после ремонта оборудования, но не реже одного раза в месяц.

8.5.2. Оперативный контроль градуировочного графика

Для оперативного контроля градуировочного графика перед началом измерений используется 1-2 градуировочных раствора из диапазона измерений жирных кислот и холестерина. Полученные при хроматографировании значения Y не должны отклоняться от градуировочной прямой более чем на величину доверительной границы случайной составляющей погрешности градуировочного графика, которая составляет для метиловых эфиров жирных кислот E=11,6%, для холестерина E=9,0%.

8.6. Подготовка анализируемых проб

8.6.1. Отбор проб проводится согласно НД на продукт, регламентирующий анализ показателей качества. Крови должно быть отобрано не менее 10 $см^3$.

8.6.2. Определения содержания жира

При анализе рационов продукты, входящие в рацион смешивают, пропускают через мясорубку и тщательно перемешивают до получения однородной массы.

При анализе хлебных, мясных продуктов, овощей, фруктов пробы пропускают через мясорубку и тщательно перемешивают.

При анализе твердых продуктов (например, крупяных изделий) проводят их измельчение на кофемолке.

Навеску продукта или рациона 5-10 г (при содержании жира 1,0% и менее - 10 г; 1-20% - 5 г; более 20% - 2 г)[1] или 2,0 г сыворотки крови взвешивают с точностью до 0,01 г и растирают в фарфоровой ступке с безводным сернокислым натрием (20-50 г) до получения рассыпчатой гомогенной массы (при анализе сухих измельченных продуктов – муки, сухого молока и и др. операция растирания с сернокислым натрием исключается).

Смесь количественно переносят 30-50 $см^3$ экстрагента (смеси хлороформ-этанол 2:1) в коническую колбу вместимостью 300 $см^3$ и экстрагируют вышеупомянутой смесью в течение 15-20 мин на аппарате для встряхивания.

Экстракт отфильтровывают с использованием стеклянной воронки с бумажным фильтром во взвешенную с точностью до ±0,0001 г круглодонную колбу на 100 $см^3$ и растворитель отгоняют досуха на ротационном испарителе при 40°С. Затем пробу, оставшуюся в конической колбе повторно экстрагируют 30-50 $см^3$ экстракционной смеси растворителей также 15-20 мин на аппарате для встряхивания. Экстракт снова отфильтровывают с использованием той же стеклянной воронки в ту же круглодонную колбу на 100 $см^3$ и снова упаривают на ротационном испарителе досуха. Таким образом операцию экстракции повторяют 3-5 раз. При анализе продуктов, содержащих до 10% жира общий объем экстрагента составляет 90 $см^3$ (3х30 $см^3$), содержащих 10-50 % жира – 150 $см^3$ (3х50 $см^3$), более 50% жира – 250 $см^3$ (5х50 $см^3$).

После упаривания всего экстракта остаток в колбе сушат в сушильном шкафу при 102±2°С не менее часа до постоянного веса. Колбу охлаждают до комнатной температуры и взвешивают с точностью до 0,0001 г.

Массовую долю жира (Х) в % вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(M_1 - M_2) \times 100}{M}, \text{ где} \qquad (1)$$

M_1 – масса колбы с жиром, г;

M_2 – масса колбы, г;

М – масса навески используемого продукта, г.

Вычисления проводят до первого десятичного знака.

За окончательный результат анализа принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных измерений. Допустимое расхождение между двумя параллельными измерениями не должно превышать ± 3,0%. Общая навеска жира, выделенная из каждой пробы должна быть не менее 8 – 10 мг. В противном случае проводят экстракцию

---

[1] При анализе рационов находят по справочным данным процентное содержание жира в каждом, входящем в рацион продукте, зная его массу вычисляют общую массу жира в рационе и по общей массе рациона находят в нем примерное содержание жира.

дополнительного количества пробы или заново повторяют операцию извлечения жира из соответственно увеличенной навески пробы.

9. Выполнение измерений

9.1. Выполнение измерения содержания жирных кислот

Навеску жира не менее 8-10 мг, полученного по п.8.6.2 с помощью тонкого шпателя взвешивают на часовом стекле с точностью до ±0,0001 г и количественно переносят в стеклянный стаканчик на 50 $см^3$, используя 5-10 мл (точный объем) гексана. Отбирают аликвотную часть мерной пипеткой, чтобы содержание в ней жира составляло 4-5 мг, и помещают в пробирку с пришлифованной пробкой на 5 $см^3$. Раствор упаривают на ротационном испарителе при 40°С досуха. Сухой остаток растворяют в 2 $см^3$ гексанового раствора внутренних стандартов метиловых эфиров пентадекановой и маргариновой кислот (п.8.3.4), туда же добавляют 0,1 $см^3$ метанольного раствора метилата натрия (п.8.3.2) и встряхивают в течение 2 мин. Непосредственно перед анализом в пробирку добавляют 0,5 $см^3$ дистиллированной воды, встряхивают 30 с и оставляют до расслоения фаз. 5 мкл верхнего гексанового слоя хроматографируют не менее 2 раз. Искомые компоненты идентифицируют по временам удерживания метиловых эфиров жирных кислот, рассчитывают отношения площадей пиков метиловых эфиров миристиновой, пальмитолеиновой, линоленовой и арахидоновой кислот к площади пика внутреннего стандарта метилового эфира пентадекановой кислоты и по градуировочному графику №1 находят концентрацию соответствующей кислоты в растворе пробы. Рассчитывают отношение площадей пиков метиловых эфиров пальмитиновой, стеариновой, олеиновой и линолевой кислот к площади пика внутреннего стандарта метилового эфира маргариновой кислоты и по градуировочному графику №2 находят концентрацию соответствующей кислоты в растворе пробы.[1]

Навеску пробы масла (животного жира) 4-5 мг (две параллельные пробы) взвешивают с точностью до ±0,0001 г в пробирке на 5 $см^3$. Пробу растворяют в 2 $см^3$ гексанового раствора внутренних стандартов и далее поступают как описано выше при анализе жира из других пищевых продуктов.

---

[1] Все операции по обработке проб проводятся в течение одного дня. В случае необходимости гексановые экстракты проб отделяют и хранят в пробирках с пришлифованными пробками при –15°С в течение 2 недель или в холодильнике в течение суток.

9.2. Выполнение измерения содержания общего холестерина

Из гексанового раствора жира, полученного по п.9.1 отбирают пипеткой аликвотную часть, чтобы содержание в ней жира составляло не менее 4-5 мг, помещают в пробирку с пришлифованной пробкой на 15 $см^3$ и упаривают на роторном испарителе досуха.

Сухой остаток растворяют в 2 $см^3$ стандартного раствора α-холестана (п.8.3.6), добавляют 5 $см^3$ этанольного раствора гидроксида калия (п.8.3.1) и энергично встряхивают в течение 1-2 мин. Затем в пробирку добавляют 5 $см^3$ дистиллированной воды и снова энергично встряхивают 1-2 мин. После разделения фаз 5 мкл верхнего гексанового слоя хроматографируют не менее 2 раз. Холестерин и α-холестан идентифицируют по временам удерживания, проводят расчет площадей их пиков, рассчитывают отношение площади пика холестерина к площади пика внутреннего стандарта α-холестана и по градуировочному графику №3 находят концентрацию холестерина в растворе пробы.

Навеску пробы животного жира 4-5 мг (две параллельные пробы) взвешивают с точностью до ±0,0001 г в пробирке на 15 $см^3$. Пробу растворяют в 2 $см^3$ гексанового стандартного раствора α-холестана и далее поступают как описано выше при анализе холестерина в жире из других пищевых продуктов.

10. Обработка результатов измерений

10.1. Расчет содержания жирных кислот и общего холестерина

Содержание каждой кислоты или холестерина в пробе в г на 100 г продукта или в мг% рассчитывают по формуле:

$$P = \frac{C_{iX} \times V \times D \times V_1}{1000 \times m \times V_2} \quad \text{г/100 г} \quad (2) \qquad P = \frac{C_{iX} \times V \times D \times V_1}{m \times V_2} \quad \text{мг\%}, \quad (3)$$

где

C_{iX} – концентрация i-той жирной кислоты или холестерина, найденная по градуировочному графику, мкг/$см^3$;

V- общий объем гексанового раствора пробы жира, $см^3$; (п.9.1)

V_1 –объем добавляемого гексанового раствора внутреннего стандарта, $см^3$, (п.9 1, 9.2.)

V_2 – аликвотная часть гексанового раствора жира, взятая для анализа, $см^3$;

m – масса навески жира, взятого для анализа, мг;

D – содержание жира в анализируемой пробе, %;

1000 – коэффициент для перевода результатов анализа в г/100 г.

За результат анализа принимают среднее арифметическое определений массовой доли i-той кислоты или холестерина, найденных в двух параллельных пробах.

Гарантированный результат анализа представляют в следующем виде:

$$P = \overline{P} \pm \Delta \text{, где} \quad \overline{P} = \frac{P_1 + P_2}{2} \qquad (4)$$

P_1- содержание жирных кислот или холестерина в первой пробе;

P_2 – содержание холестерина или жирной кислоты во второй пробе;

$\overline{P}$ - среднее содержание холестерина или жирной кислоты, найденное по результатам 2 параллельных проб;

Δ - суммарная погрешность методики

Допустимые расхождения между результатами параллельных определений холестерина и жирных кислот не должно превышать:

Для кислот:	%				
	Пищевые рационы	Жиры	Мясные продукты	Хлебные и крупяные продукты	Сыворотка крови
Миристиновой	19,9	37,1	30,2	23,5	28,5
Пальмитолеиновой	29,6	36,0	23,3	26,6	26,0
Линоленовой	32,1	33,4	27,4	27,4	33,0
Арахидоновой	29,9	41,8	31,9	-	36,0
Пальмитиновой	17,2	25,5	24,1	20,8	24,9
Стеариновой	20,5	27,4	28,0	28,5	19,9
Олеиновой	18,6	19,1	20,5	22,2	23,5
Линолевой	20,2	25,12	24,1	18,8	28,5
Холестерина	22,2	15,5	13,85	-	7,2

Пределы возможных значений систематической составляющей погрешности измерений при установленных методикой измерений влияющих факторов составляет:

Для кислот:	%				
	Пищевые рационы	Жиры	Мясные продукты	Хлебные и крупяные продукты	Сыворотка крови
Миристиновой	22,1	22,33	22,11	22,77	22,77
Пальмитолеиновой	21,4	21,56	21,4	22,06	22,0
Линоленовой	22,3	21,56	21,45	22,11	22,0
Арахидоновой	22,3	22,55	22,33	22,99	22,99
Пальмитиновой	20,7	20,9	20,68	21,37	21,34
Стеариновой	20,35	20,57	20,46	21,12	21,12
Олеиновой	21,0	21,23	21,01	21,78	21,67
Линолевой	19,9	20,13	19,91	20,0	20,67
Холестерина	21,6	21,78	21,56	-	22,2

Допустимые расхождения между результатами измерений, выполненных в двух разных лабораториях при доверительной вероятности P=0,95 не должна превышать случайных величин по отношению к среднему арифметическому значению (в %):

Кислоты:	%				
	Пищевые рационы	Сыворотка крови	Мясные продукты	Жиры	Хлебные и крупяные продукты
Миристиновая	53,6	60,4	60,6	55,6	49,8
Пальмитолеиновая	58,8	57,2	55,0	53,6	49,8
Линоленовая	64,8	62,4	57,2	55,8	58,4
Арахидоновая	60,8	68,4	62,0	58,8	-
Пальмитиновая	49,2	55,4	53,6	50,6	52,6
Стеариновая	52,4	51,6	64,0	53,2	57,6
Олеиновая	52,2	54,8	51,6	50,4	54,0
Линолевая	49,6	57,0	52,2	50,0	50,0
Холестерин	53,8	45,6	49,0	50,2	-

11. Оформление результатов испытаний

Результаты измерений оформляются по форме, установленной действующей в лаборатории системой регистрации данных.

Результаты должны включать следующую информацию:

-наименование (шифр) пробы;

-дату проведения измерений;

-результаты измерений, включая все необходимые данные и промежуточные расчеты;

-данные о построении или контроле градуировочного графика;

-результаты параллельных определений;

-окончательный результат измерений;

-значение приписанной или рассчитанной погрешности измерения или ее составляющих;

-фамилию оператора.

12. Контроль погрешности методики выполнения измерений

Контроль погрешности МВИ осуществляется с целью оперативной информации о качестве измерений рабочих проб и для принятия оперативных мер, предупреждающих ухудшение точности результатов.

В процессе внутреннего оперативного контроля определяются показатели сходимости, воспроизводимости и точности.

12.1. Средства контроля погрешности методики выполнения измерений

В качестве средств контроля в процессе определения показателей качества результатов анализа применяются:

-рабочие пробы – для определения показателей сходимости и воспроизводимости;

-рабочие пробы с добавкой – при определении показателей точности.

Результаты контроля воспроизводимости и точности фиксируются в соответствии с установленной системой регистрации контроля правильности выполнения измерений, результаты контроля сходимости выполняются для каждого анализа и фиксируются в рабочих журналах исполнителей.

12.2. Порядок проведения контроля сходимости

Контроль сходимости результатов измерений проводится при получении каждого результата измерения, предусматривающего проведение параллельных определений.

Контроль сходимости заключается в сравнении расхождений результатов параллельных определений, полученных при анализе рабочей пробы, с нормативом сходимости – d.

Норматив сходимости d рассчитывается по формуле:

$d = Q(p,n)S_{xi}$, где (5)

d – норматив сходимости;

$Q(p,n)$ – коэффициент, определяемый по статистическим таблицам, исходя из заданной доверительной вероятности P и числа параллельных определений при анализе рабочей пробы в соответствии с методикой. Для $n=2$ и $P=0,95$ $Q(p,n)=2,77$;

S_{xi} – СКО результата единичного определения.

Сходимость результатов параллельных определений рассчитывается по формуле:

$d_k = X_{i\max} - X_{i\min}$, где (6)

d_k –фактическая сходимость параллельных определений;

$X_{i\,max}$ –максимальный результат из «n» параллельных измерений;

$X_{i\,min}$ -минимальный результат из «n» параллельных измерений;

Если $d_k \le d$, то сходимость результатов параллельных определений признается удовлетворительной, и по ним может быть рассчитан результат измерений при рабочих измерениях или контрольном измерении.

Если $d_k > d$, то рабочая или контрольная проба подлежит повторному измерению. При повторном превышении указанного норматива необходимо выяснить причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и устранить их.

12.3. Порядок проведения контроля воспроизводимости

Контроль воспроизводимости результатов измерений проводится не реже 2-3 раз в месяц с использованием рабочих проб. Контроль воспроизводимости обязателен при смене партии реактивов, посуды, после ремонта оборудования, существенных изменений условий

выполнения измерений.

Контроль воспроизводимости проводится путем сравнения результата контрольной процедуры D_k, равного расхождению двух результатов измерений – первичного и повторного – содержания холестерина или жирных кислот в одной и той же рабочей пробе с нормативом воспроизводимости D.

Первичный и повторный результат измерений должен быть получен в разных условиях, например, двумя операторами в один день или одним оператором в два последующих дня и т.д.

D_k рассчитывается по формуле:

$D_k = \overline{X}_1 - \overline{X}_2$, где (7)

$\overline{X}_1$ - первичный результат измерения рабочей пробы;

$\overline{X}_2$ - повторный результат измерения рабочей пробы.

Величины $\overline{X}_1$ и $\overline{X}_2$ должны быть получены с соблюдением условий сходимости.

Норматив воспроизводимости D рассчитывается по формуле:

$D = Q(p,m)S_{\overline{X}}$, (8) где D –норматив воспроизводимости;

$Q(p,m)$ – коэффициент, определяемый по статистическим таблицам, исходя из заданной доверительной вероятности P и числа повторных измерений рабочей пробы m. Для $m=2$ и $P=0,95$ $Q(p,m)=2,77$;

$S_{\overline{X}}$ – СКО результата измерений при двух параллельных определениях.

Если $D_k \le D$, то воспроизводимость контрольных измерений признается удовлетворительной. В этом случае воспроизводимость результатов измерений рабочих проб, полученных в условиях, соответствующих требованиям МВИ, признается удовлетворительной.

В случае превышения норматива воспроизводимости, когда $D_k > D$, контроль повторяют. При повторном превышении указанного норматива должны быть выяснены и устранены причины, приводящие к неудовлетворительным результатам контроля воспроизводимости.

12.4. Порядок проведения контроля точности

Контроль точности результатов измерений осуществляется с использованием метода добавок. Образцами для контроля точности являются рабочие пробы и эти же пробы с добавкой холестеринпальмитата или триолеина.

К пробе с добавкой предъявляются следующие требования:

-добавка должна вводиться в пробу на самой ранней стадии измерений (стадии взятия

навески пробы) в целях проведения пробы с добавкой через все последующие стадии пробоподготовки и анализа;

Примечание: в целях уменьшения погрешности за счет неоднородности распределения вводимой добавки целесообразно рассчитанное количество добавки вносить непосредственно в подготовленную навеску пробы продукта;

-количество вводимой добавки должно составлять 50-150% от установленного содержания определяемого ингредиента в пробе;

-проба с введенной добавкой не должна выходить за верхнюю границу определяемых содержаний определяемого ингредиента согласно МВИ.

В качестве добавки используются растворы холестеринпальмитата или триолеина в гексане необходимой концентрации. Расчет необходимой концентрации производится исходя из того, что в навеску должно вносится около 5-10 $см^3$ раствора для получения пробы с добавкой в диапазоне 50-150% ранее установленного содержания холестерина или олеиновой кислоты в пробе.

После внесения добавки проба встряхивается в течение 3-5 мин, затем выдерживается 5-10 мин., основная масса растворителя (гексан)удаляется на ротационном испарителе, после чего проба анализируется в соответствии с МВИ.

Контроль точности проводится по результатам измерений пробы до введения добавки ($X_{пр.}$) и после введения добавки ($X_{пр.доб.}$) концентрацией $C_{доб.}$ в исходную пробу. Разница ($K_к$) между найденной ($X_{доб.}=X_{пр.доб.}-X_{пр.}$) и введенной $C_{доб.}$ концентрацией добавки не должна превышать по абсолютной величине значения норматива точности K.

Значения $K_к$ и K рассчитываются по формулам:

$K_к=|X_{пр.доб.}-X_{пр.}-C_{доб.}|$, где (9)

$K_к$ – рассчитанный параметр точности;

$X_{пр.доб.}$ –содержание холестерина или олеиновой кислоты в пробе с добавкой;

$X_{пр.}$ –содержание холестерина или олеиновой кислоты в исходной пробе;

$C_{доб.}$ –концентрация введенной добавки.

K=1,41Δ – для доверительной вероятности P=0,95;

K=1,19Δ –для доверительной вероятности P=0,90, где Δ – погрешность МВИ.

В том случае, когда погрешности определения холестерина или олеиновой кислоты в исходной пробе и пробе с добавкой различаются более чем на 30%, для расчета норматива точности используется следующая формула:

$$K = 0{,}84\sqrt{(\Delta X_{пр})^2 + (\Delta X_{пр.доб})^2}$$ - для доверительной вероятности P=0,90; (10)

$$K = \sqrt{(\Delta X_{пр.})^2 + (\Delta X_{пр\ доб.})^2}$$ - для доверительной вероятности P=0,95, где (11)

K –норматив точности;

$\Delta X_{пр}$ –погрешность определения содержания определяемого ингредиента в исходной пробе;

$\Delta X_{пр.доб}$ –погрешность определения содержания определяемого ингредиента в пробе с добавкой.

Если для расчета используются относительные значения погрешностей $\Delta_{отн}$, $\Delta X_{пр.отн.}$, $\Delta X_{пр.доб.отн.}$, то относительное значение $K_{к\,отн}$ рассчитывается по формуле:

$$K_{\underset{отн}{к}} = \frac{K_к}{C_{доб}}, \quad \text{где} \qquad (12)$$

$K_к$ –абсолютное значение $K_к$; $C_{доб}$ –значение добавки введенной в исходную пробу.

Точность контрольных измерений, а также точность результатов измерений рабочих проб, выполненных в условиях соблюдения требований МВИ, признается удовлетворительной, если $|K_к| \le K$.

Если $|K_к| > K$, то точность контрольных измерений признается неудовлетворительной и процедура контроля повторяется с использованием другой рабочей пробы. При повторном получении неудовлетворительных результатов контроля точности, выясняют и устраняют причины, приводящие к неудовлетворительному контролю.

Методика разработана в лаборатории физико-химических исследований Республиканского научно-практического центра по экспертной оценке качества и безопасности продуктов питания МЗ РБ.

Разработчики:

Ст. научн. сотр, к.х.н. *Перцовский А.Л.*

Мл. научн. сотр. *Венгер О.Н.*

Приложение

Таблица 1.

Величина нормативов сходимости МВИ

Кислота / продукт	d, %				
	Пищевой рацион	Сыворотка крови	Мясные продукты	Жиры	Хлебные и крупяные продукты
Миристиновая	19,9	28,5	30,2	37,1	23,5
Пальмитолеиновая	29,64	26,0	23,3	36,0	26,6
Линоленовая	32,1	33,0	27,4	33,4	27,4
Арахидоновая	29,9	36,0	31,9	41,8	-
Пальмитиновая	17,2	24,9	24,1	25,5	20,8
Стеариновая	20,5	19,9	28,0	27,4	28,5
Олеиновая	18,6	23,5	20,5	19,1	22,2
Линолевая	20,2	28,5	24,1	25,12	18,8
Холестерин	22,2	7,2	13,85	15,5	-

Взяты максимальные величины S_{Xi} для кислот растительных и животных жиров.

Таблица 2.

Величина нормативов воспроизводимости МВИ

Кислота / продукт	D, %				
	Пищевой рацион	Сыворотка крови	Мясные продукты	Жиры	Хлебные и крупяные продукты
Миристиновая	14,1	20,2	21,3	26,32	16,6
Пальмитолеиновая	21,0	18,2	16,3	25,48	18,8
Линоленовая	22,77	23,3	19,4	23,5	19,4
Арахидоновая	21,3	25,5	22,4	29,6	-
Пальмитиновая	12,2	17,7	17,2	18,0	14,7
Стеариновая	14,4	14,1	19,7	19,4	20,2
Олеиновая	13,3	16,6	14,4	13,6	15,5
Линолевая	14,4	20,4	17,2	17,7	13,3
Холестерин	15,8	5,5	10,0	10,9	-

Взяты максимальные величины S_X для кислот растительных и животных жиров

Таблица 3

Величина нормативов точности МВИ

Вещество / продукт	K, %				
	Пищевой рацион	Сыворотка крови	Мясные продукты	Жиры	Хлебные и крупяные продукты
Миристиновая	37,8	42,6	42,7	39,2	35,1
Пальмитолеиновая	41,5	40,3	38,3	37,8	35,1
Линоленовая	45,7	44,0	40,3	39,3	41,2
Арахидоновая	42,9	48,2	43,7	41,5	-
Пальмитиновая	34,7	39,0	37,8	35,7	37,1
Стеариновая	36,9	36,4	45,1	37,5	40,1
Олеиновая	36,8	38,6	36,4	35,5	38,1
Линолевая	35,0	40,2	36,8	35,3	35,3
Холестерин	37,9	32,15	34,5	35,4	-

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель директора
ВНИИМ

В.П. Лобко
2000 г.

ЭКСПЕРТНОЕ МЕТРОЛОГИЧЕСКОЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

на методику
газохроматографического определения жирных кислот и холестерина
в продуктах питания и сыворотке крови,
разработанную РНПЦ по экспертной оценке качества и безопасности
продуктов питания

В результате проведения метрологической экспертизы установлено:

1 Представленная методика предназначена для газохроматографического определения жирных кислот и холестерина в продуктах питания и сыворотке крови.

2 Методика соответствует требованиям ГОСТ 8.010-90.

3 Методика может быть использована для газохроматографического определения жирных кислот и холестерина в продуктах питания и сыворотке крови.

Начальник отдела испытаний пищевой
и сельскохозяйственной продукции Г.В. Артеменко

gost.e-ecolog.ru