ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

**СТБ ISO 23275-2-2009**

# Жиры и масла животные и растительные
# ЭКВИВАЛЕНТЫ КАКАО-МАСЛА В КАКАО-МАСЛЕ И ШОКОЛАДЕ

**Часть 2**

**Количественное определение эквивалентов какао-масла**

# Тлушчы жывёльныя і раслінныя, маслы жывёльныя і алей
# ЭКВІВАЛЕНТЫ КАКАВА-МАСЛА Ў КАКАВА-МАСЛЕ І ШАКАЛАДЗЕ

**Частка 2**

**Колькаснае вызначэнне эквівалентаў какава-масла**

**(ISO 23275-2:2006, IDT)**

**Издание официальное**

БЗ 4-2009

**Госстандарт**
**Минск**

gost.e-ecolog.ru

УДК 663.918.543.61(083.74)(476) МКС 67.190; **67.200.10** КП 02 IDT

**Ключевые слова:** жиры растительные, жиры животные, масла растительные, масла животные, какао-масло, эквиваленты какао-масла, шоколад, триацилглицериды, метод газовой хроматографии

ОКП РБ 15.84.12.000

## Предисловие

Цели, основные принципы, положения по государственному регулированию и управлению в области технического нормирования и стандартизации установлены Законом Республики Беларусь «О техническом нормировании и стандартизации».

1 ПОДГОТОВЛЕН республиканским унитарным предприятием «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по продовольствию»

ВНЕСЕН Белорусским государственным концерном пищевой промышленности «Белгоспищепром»

2 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ постановлением Госстандарта Республики Беларусь от 24 апреля 2009 г. № 19

3 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 23275-2:2006 Animal and vegetable fats and oils – Cocoa butter equivalents in cocoa butter and plain chocolate – Part 2: Quantification of cocoa butter equivalents (Жиры и масла животные и растительные. Эквиваленты какао-масла в какао-масле и шоколаде. Часть 2. Количественное определение эквивалентов какао-масла)

Международный стандарт разработан подкомитетом SC 11 «Животные и растительные жиры и масла» технического комитета ISO/TC 34 «Пищевые продукты» Международной организации по стандартизации (ISO).

Перевод с английского языка (en).

Официальный экземпляр международного стандарта, на основе которого подготовлен настоящий государственный стандарт, имеется в Национальном фонде ТНПА.

Степень соответствия – идентичная (IDT)

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

© Госстандарт, 2009

Настоящий стандарт не может быть воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Госстандарта Республики Беларусь

Издан на русском языке

## Содержание

Введение ..... IV
1 Область применения ..... 1
2 Термины и определения ..... 1
3 Сущность метода ..... 1
4 Реактивы и материалы ..... 2
5 Оборудование ..... 2
6 Отбор образцов ..... 2
7 Приготовление анализируемой пробы ..... 3
7.1 Приготовление сертифицированного стандартного материала какао-масла для калибровки и проверки пригодности системы ..... 3
7.2 Приготовление образца шоколада ..... 3
8 Методика определения ..... 3
8.1 Экстрагирование жиров ..... 3
8.2 Разделение триацилглицеридов методом газовой хроматографии высокого разрешения ..... 3
8.3 Идентификация ..... 4
9 Вычисления ..... 4
9.1 Определение факторов отклика ..... 4
9.2 Вычисление процентного содержания триацилглицеридов ..... 4
9.3 Вычисление содержания эквивалентов какао-масла в какао-масле ..... 5
9.4 Вычисление содержания эквивалентов какао-масла в шоколаде ..... 5
10 Процедурные требования ..... 5
10.1 Общие положения ..... 5
10.2 Пригодность хроматографической системы ..... 5
11 Прецизионность ..... 6
11.1 Межлабораторные испытания ..... 6
11.2 Повторяемость ..... 6
11.3 Воспроизводимость ..... 6
12 Протокол испытаний ..... 6
Приложение А (справочное) Результаты межлабораторных испытаний ..... 7
Библиография ..... 12

## Введение

«Эквиваленты какао-масла» – это общий термин для жиров, используемых для замены какао-масла в шоколаде. Они очень близко напоминают какао-масло по своему химическому составу и физическим свойствам, в результате чего их количественное определение (в некоторых случаях и качественное определение) является очень сложным. Эквиваленты какао-масла по определению должны быть жирами с низким содержанием лауриновой кислоты, с высоким содержанием симметричных мононенасыщенных триацилглицеридов типа 1,3-дипалмитоил-2-олеоилглицерида, 1-палмитоил-2-олеоил-3-стеароилглицерида и 1,3-дистеароил-2-олеоилглицерида, способными смешиваться с какао-маслом и получаемыми только путем очистки и фракционирования.

В соответствии с [1] в Европейском союзе по отдельности или в смесях могут использоваться следующие растительные жиры, полученные из приведенных ниже растений:

– масло мадуки длиннолистной (иллипе), борнейский жир или жир тенгкаванг (вид рода *Shorea*);
– пальмовое масло *(Elaeis guineensis, Elaeis olifera)*;
– сал (шорея кистевая) *(Shorea robusta)*;
– масло плодов масляного дерева (ши) *(Butyrospermum parkii)*;
– масло кокум *(Garcinia indica)*;
– масло косточек манго *(Mangifera indica).*

В ISO 23275-1 приведен метод качественного определения этих жиров (исключение делается только для образцов чистого иллипе) в какао-масле и шоколаде. В настоящем стандарте приведен метод, позволяющий провести надежное количественное определение этих жиров при концентрации 5 %, соответствующей законодательно установленному пределу, утвержденному в [1].

Для более удобного пользования серией стандартов ISO 23275 был разработан набор инструментальных средств под названием CoCal-1. CoCal-1 состоит из валидированных методов качественного и количественного определения эквивалентов какао-масла в шоколаде, сертифицированного стандартного материала какао-масла (IRMM-801) для калибровки аналитических инструментов и электронной оценочной таблицы в Microsoft Excel© для вычисления окончательного результата. При проведении качественного и количественного определения эквивалентов какао-масла требуется откалибровать газохроматографическую систему с использованием IRMM-801, разделить триацилглицериды анализируемого образца и применить электронную оценочную таблицу для последующей обработки данных.

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

# Жиры и масла животные и растительные ЭКВИВАЛЕНТЫ КАКАО-МАСЛА В КАКАО-МАСЛЕ И ШОКОЛАДЕ Часть 2 Количественное определение эквивалентов какао-масла

# Тлушчы жывёльныя і раслінныя, маслы жывёльныя і алей ЭКВІВАЛЕНТЫ КАКАВА-МАСЛА Ў КАКАВА-МАСЛЕ І ШАКАЛАДЗЕ Частка 2 Колькаснае вызначэнне эквівалентаў какава-масла

# Animal and vegetable fats and oils Cocoa butter equivalents in cocoa butter and plain chocolate Part 2 Quantification of cocoa butter equivalents

**Дата введения 2009-10-01**

## 1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод количественного определения эквивалентов какао-масла (ЭКМ) в какао-масле (КМ) и шоколаде путем разделения триацилглицеридов капиллярной газожидкостной хроматографией высокого разрешения с последующей оценкой данных при помощи регрессионного анализа методом частных наименьших квадратов.

Примечание – Наличие ЭКМ в КМ и шоколаде ниже уровня 0,6 % (при допущении, что содержание жиров в шоколаде составляет 30 %) может быть определено по методу, приведенному в ISO 23275-1. Различие методов состоит в количестве триацилглицеридов, используемых для обработки данных и в математической оценке данных. Наличие ЭКМ устанавливается при помощи линейного регрессионного анализа, применяемого к соотношениям трех основных триацилглицеридов анализируемого жира. Количественное содержание ЭКМ оценивается при помощи регрессионного анализа методом частных наименьших квадратов, применяемого к соотношениям пяти основных триацилглицеридов.

## 2 Термины и определения

В настоящем стандарте применяют следующие термины с соответствующими определениями:

**2.1 эквиваленты какао-масла** (cocoa butter equivalents): Жиры, определяемые в какао-масле и шоколаде в соответствии с методом, описанным в настоящем стандарте.

**2.2 содержание эквивалентов какао-масла в какао-масле** (cocoa butter equivalents content of cocoa butter): Массовая доля веществ в какао-масле, определяемых по методу, установленному в настоящем стандарте.

Примечание – Выражается в г/100 г какао-масла.

**2.3 содержание эквивалентов какао-масла в шоколаде** (cocoa butter equivalents content of chocolate): Массовая доля веществ в шоколаде, определяемых по методу, установленному в настоящем стандарте.

Примечание – Выражается в г/100 г шоколада.

## 3 Сущность метода

Какао-масло или жир, выделенные из шоколада, разделяются при помощи газовой хроматографии высокого разрешения на триацилглицериды в соответствии с их молекулярной массой и степенью ненасыщенности. Количественное содержание ЭКМ оценивается при помощи регрессионного анализа методом частных наименьших квадратов, применяемого к отдельным триацилглицеридам анализируемого жира.

Издание официальное

## 4 Реактивы и материалы

Используются только реактивы признанного аналитического класса, если не указано иное.

**Предупреждение – Необходимо уделять внимание пунктам, которые описывают процедуры обращения с опасными веществами. Должны соблюдаться технические и организационные меры безопасности, а также меры личной безопасности.**

**4.1** Сертифицированный стандартный материал какао-масла (CCM) IRMM-801 [2] для калибровки и проверки пригодности системы.

**4.2** Растворитель жиров, не содержащий хлора (например, диэтиловый эфир, н-гептан, изооктан).

**4.3** Соляная кислота с концентрацией 8 моль/л.

**4.4** Гофрированный бумажный фильтр [1] с диаметром 15 см.

## 5 Оборудование

**5.1** Аналитические весы с ценой деления 0,1 мг.

**5.2** Сушильный шкаф, способный поддерживать температуру 55 °С. Может использоваться сухой нагревательный блок.

**5.3** Пищевой измельчитель [2] (т. е. кухонный блендер с расположением двигателя выше принимающего контейнера для предотвращения плавления образцов).

**5.4** Мерные колбы с емкостью 20 мл.

**5.5** Пипетки с емкостью 1 мл.

**5.6** Микрошприц с максимальным объемом 10 мкл, ценой деления 0,1 мкл или автоматический пробоотборник.

**5.7** Газовый хроматограф (ГХ), оборудованный системой холодного ввода на колонку и пламенно-ионизационным детектором (ПИД).

Могут использоваться альтернативные системы ввода (например, инжектор с делением потока, температурно-программируемый испаритель (ТПИ) или инжектор с подвижной иглой) при условии, что получаемые результаты идентичны указанным в 10.2.

Удовлетворительные разделение и количественное определение достигаются при соблюдении следующих экспериментальных условий:

– кварцевая хроматографическая колонка: длина от 25 до 30 м, внутренний диаметр 0,25 мм, толщина пленки термостабильного 50%-ного фенилметилполисилоксана от 0,1 до 0,15 мкм;

– температурная программа: начальная температура – 100 °С, скорость нагрева до 340 °С (конечная температура) – 30 °С/мин;

– газ-носитель: гелий или водород (чистота ≥ 99,999 %).

Примечание – Подходящие колонки и альтернативные экспериментальные условия, использованные в международном совместном исследовании, приведены в приложении А. Рабочие условия могут быть изменены для получения оптимального разделения триацилглицеридов какао-масла.

**5.8 Хроматографическая система сбора и обработки данных**

**5.9** Аппарат Сокслета со стандартными конусными соединениями и емкостью сифона примерно 100 мл (экстракционная гильза 33 × 88 мм), колбой Эрленмейера на 250 мл и температурно-регулируемым кожухом.

## 6 Отбор образцов

Репрезентативная проба направляется в лабораторию. Она не должна быть повреждена или изменена в ходе транспортировки и хранения.

Отбор образцов не является частью метода, описанного в настоящем стандарте. Рекомендуемый метод отбора образцов приведен в [3].

---

[1] Средний бумажный фильтр S&S 589 – пример подходящего, имеющегося в продаже продукта.

[2] Philips HR2833 – пример подходящего, имеющегося в продаже оборудования. Данная информация приведена для удобства пользователей и не подразумевает одобрения этого продукта со стороны ISO.

## 7 Приготовление анализируемой пробы

### 7.1 Приготовление сертифицированного стандартного материала какао-масла для калибровки и проверки пригодности системы

До вскрытия и использования ССМ какао-масла (4.1) ампулу нагревают в сушильном шкафу (5.2) до плавления содержимого. После получения прозрачного раствора перемешивают содержимое путем переворачивания ампулы в течение не менее 20 с. Затем ампулу вскрывают и переносят содержимое в чистую виалу, которую плотно закрывают и хранят в холодильнике для последующего использования.

### 7.2 Приготовление образца шоколада

Охлаждают около 200 г шоколада до затвердевания и натирают на мелкие гранулы при помощи механического устройства (5.3). Тщательно перемешивают и хранят в плотно закрытой емкости в холодильнике.

## 8 Методика определения

### 8.1 Экстрагирование жиров

**8.1.1** Выделяют жир и определяют его содержание в образце шоколада (приготовленного по 7.2) путем экстрагирования при помощи аппарата Сокслета [4], как указано ниже.

В мензурку вместимостью от 300 до 500 мл взвешивают от 4 до 5 г шоколада. Медленно при помешивании прибавляют 45 мл кипящей воды для получения гомогенной суспензии. Добавляют 55 мл HCl (4.3) и обезжиренные центры кипения, затем перемешивают. Накрывают часовым стеклом, медленно доводят раствор до кипения и кипятят в течение 15 мин. Часовое стекло промывают 100 мл воды. Фильтруют раствор через бумажный фильтр средней плотности (4.4) или аналогичный, три раза промывают мензурку водой. Продолжают промывку до тех пор, пока последняя порция фильтрата не будет содержать ионы хлора. Помещают фильтр с образцом в обезжиренную экстракционную гильзу и сушат в течение 2 ч в маленькой мензурке при температуре 100 °C. Мензурку закрывают стекловатой.

В колбу Эрленмейера на 250 мл помещают несколько обезжиренных центров кипения и сушат в течение 1 ч при температуре 100 °C. Охлаждают колбу до комнатной температуры в эксикаторе, затем взвешивают ее. Помещают экстракционную гильзу с высушенным образцом в аппарат Сокслета (5.9), закрепив ее при помощи спиральных или стеклянных держателей. Промывают мензурки, использованные для гидролиза и сушки, а также часовое стекло тремя порциями растворителя по 50 мл, добавляют смыв в экстракционную гильзу. Гидролизованный образец подвергают экстракции в течение 4 ч, корректируя температуру таким образом, чтобы проводилось более 30 экстракционных циклов. Снимают колбу и выпаривают растворитель. Сушат колбу при температуре 102 °C до постоянной массы (1,5 ч). Охлаждают колбу в эксикаторе до комнатной температуры, затем взвешивают ее. Массу считают постоянной, если в последовательных периодах сушки ее потеря составляет менее 0,05 %. Расхождения между параллельными определениями жира должны быть в пределах 0,1 %.

Общее содержание жира в шоколаде $c_{fat}$, выраженное в г/100 г, вычисляется по следующей формуле:

$$c_{fat} = \frac{m_{fat} \times 100}{m},$$

где $m_{fat}$ – общее количество жира, полученное при экстракции, г;

$m$ – масса анализируемой порции шоколада, г.

Могут использоваться альтернативные процедуры экстрагирования (например, ускоренное экстрагирование растворителем, сверхкритическим углекислым газом или микроволновая экстракция) при условии, что получаются идентичные результаты.

Содержание жира указывают до двух десятичных знаков.

### 8.2 Разделение триацилглицеридов методом газовой хроматографии высокого разрешения

Анализируемые образцы [какао-масло; жир, экстрагированный из шоколада; ССМ какао-масла (4.1)] подогревают в сушильном шкафу (5.2) до полного плавления. Если расплавленный образец содержит осадок, то образец фильтруют внутри шкафа для получения чистого фильтрата. Пипетки или аналогичное оборудование, используемые для переноса образца в процессе взвешивания,

нагревают примерно до температуры 55 °С в сушильном шкафу (5.2), чтобы избежать частичного фракционирования жиров.

Взвешивают около 0,2 г анализируемого образца, помещают в мерную колбу на 20 мл (5.4), доводят до отметки подходящим растворителем для жиров (4.2). 1 мл полученного раствора переносят пипеткой (5.5) в другую мерную колбу на 20 мл и доводят до метки тем же растворителем.

Инжектируют от 0,5 до 1,0 мкл конечного анализируемого раствора (концентрация анализируемого образца 0,5 мг/мл) в хроматографическую систему высокого разрешения, используя систему холодного ввода на колонку.

Могут использоваться альтернативные значения объема и концентрации пробы, а также инжекторы при условии, что система детектирования дает линейную зависимость и выполняются требования пригодности системы (10.2).

### 8.3 Идентификация

Идентификация пяти основных триацилглицеридов [1,3-дипалмитоил-2-олеоилглицерид (POP), 1-палмитоил-2-олеоил-3-стеароилглицерид (POS), 1-пальмитоил-2,3-диолеоилглицерид (POO), 1,3-дистеароил-2-олеоилглицерид (SOS) и 1-стеароил-2,3-диолеоилглицерид (SOO)] анализируемого образца осуществляется путем сравнения их времен удерживания со временами удерживания триацилглицеридов ССМ какао-масла (4.1). В целом триацилглицериды выходят в порядке увеличения количества атомов углерода и увеличения числа двойных связей при одинаковом числе атомов углерода. Порядок выхода триацилглицеридов какао-масла приведен на рисунке А.1 (приложение А).

## 9 Вычисления

### 9.1 Определение факторов отклика

Определяют факторы отклика триацилглицеридов POP, POS, POO, SOS и SOO инжекцией раствора ССМ какао-масла при экспериментальных условиях, идентичных тем, которые используются при анализе образцов. Вычисляют процентное содержание каждого из пяти триацилглицеридов по следующим формулам:

$$P_{ref,\,i} = \frac{A_{ref,\,i}}{\sum A_{ref,\,i}} \times 100\,\%, \tag{1}$$

$$F_i = \frac{w_{ref,\,i}}{P_{ref,\,i}}, \tag{2}$$

где $P_{ref,\,i}$ – процент $i$-го триацилглицерида в ССМ какао-масла (по площадям пиков);
$A_{ref,\,i}$ – площадь пика $i$-го триацилглицерида в ССМ какао-масла;
$\Sigma A_{ref,\,i}$ – сумма площадей пиков POP, POS, POO, SOS и SOO в ССМ какао-масла;
$F_i$ – фактор отклика $i$-го триацилглицерида в ССМ какао-масла;
$w_{ref,\,i}$ – значение массовой доли $i$-го триацилглицерида в ССМ какао-масла, %, указанное в сертификате [2].

Результаты указывают до двух десятичных знаков.

### 9.2 Вычисление процентного содержания триацилглицеридов

Вычисляют процентное содержание триацилглицеридов POP, POS и SOS в тестируемом образце по формуле

$$w_{test,\,i} = \frac{F_i \times A_{test,\,i}}{\sum (F_i \times A_{test,\,i})} \times 100\,\%, \tag{3}$$

где $w_{test,\,i}$ – массовая доля $i$-го триацилглицерида в тестируемом образце, %;
$A_{test,\,i}$ – площадь пика соответствующего $i$-го триацилглицерида в тестируемом образце;
$F_i$ – фактор отклика $i$-го триацилглицерида, определенный по 9.1.

Результаты указывают до двух десятичных знаков.

### 9.3 Вычисление содержания эквивалентов какао-масла в какао-масле

Содержание ЭКМ в какао-масле $c_{CBE,CB}$, выраженное в г/100 г, рассчитывают с использованием регрессионного анализа методом частных наименьших квадратов [формула (4) по нормализированному содержанию пяти основных триацилглицеридов, т. е. содержание POP + содержание POS + содержание POO + содержание SOS + содержание SOO = 100 %, определенному по формуле (3)]:

$$c_{CBE,CB} = 37{,}439 + 1{,}175 \times POP - 1{,}939 \times POS - 0{,}121 \times POO + 0{,}982 \times SOS - 0{,}097 \times SOO. \quad (4)$$

Результаты указывают до двух десятичных знаков, г/100 г.

Формула (4) была выведена с использованием калибровочного набора из 798 смесей КМ/ЭКМ, содержащих 10, 15 и 20 % ЭКМ. Обязательное использование ССМ какао-масла для калибровочных целей и проверки пригодности системы обеспечивает высокую сопоставимость результатов между отдельными испытательными лабораториями и стандартизирует разработанный метод [5].

В 99 % случаев при использовании имеющихся в продаже жиров для формирования смеси ошибка определения не превышает ±2,60 % относительно какао-масла.

### 9.4 Вычисление содержания эквивалентов какао-масла в шоколаде

Содержание ЭКМ в шоколаде $c_{ECB,choc}$, выраженное в г/100 г, рассчитывают по формуле (5):

$$c_{ECB,choc} = \frac{c_{fat} \times c_{ECB,CB}}{100}, \quad (5)$$

где $c_{fat}$ – общее содержание жира в шоколаде, г/100 г, определенное по 8.1;

$c_{CBE,CB}$ – содержание ЭКМ в какао-масле, г/100 г, определенное по 9.3.

Результаты указывают до двух десятичных знаков.

В 99 % случаев при использовании имеющихся в продаже жиров для формирования смеси ошибка определения не превышает ±0,78 % относительно шоколада (при допущении, что содержание жиров в шоколаде составляет 30 %).

## 10 Процедурные требования

### 10.1 Общие положения

Процедура хроматографического анализа, помимо других факторов, зависит от оборудования, типа, степени износа, производителя колонки, способа введения анализируемого раствора, объема инжектируемой пробы и детектора. Могут использоваться колонки различной длины и производителей, а также варьироваться объемы инжектируемых проб, если выполняются требования пригодности системы (10.2).

### 10.2 Пригодность хроматографической системы

Для проверки пригодности хроматографической системы должен использоваться ССМ какао-масла (4.1).

**a) Разрешение**

Хроматографическая система должна быть способной разделять критические пары POS/POO и SOS/SOO с разрешением не менее 1,0. В противном случае условия хроматографирования (например, объем инжектируемой пробы, температура колонки, скорость потока газа-носителя) должны быть оптимизированы.

**b) Определение факторов отклика детектора**

Для проверки предположения, что факторы отклика пламенно-ионизационного детектора для триацилглицеридов незначительно отличаются от единицы, необходимо проанализировать ССМ какао-масла, применяя стандартные условия хроматографирования. Опыт показывает, что для нормально функционирующей системы факторы отклика пяти основных триацилглицеридов (POP, POS, POO, SOS, SOO) варьируют в диапазоне 0,80 – 1,20.

## 11 Прецизионность

### 11.1 Межлабораторные испытания

Результаты межлабораторных испытаний относительно прецизионности метода приведены в приложении А. Значения, полученные в ходе проведенных межлабораторных испытаний, не могут быть применимы к диапазонам концентраций и матрицам, отличным от указанных.

### 11.2 Повторяемость

Абсолютная разность между результатами двух независимых единичных испытаний, полученных при использовании одного метода и идентичного анализируемого материала в одной и той же лаборатории тем же оператором на одном и том же оборудовании в течение короткого промежутка времени, не более чем в 5 % случаев (при доверительной вероятности $P = 0,95$) будет больше чем 0,721 г/100 г относительно какао-масла и 0,216 г/100 г относительно шоколада (при допущении, что содержание жиров в шоколаде составляет 30 %).

Значения предела повторяемости $r$, полученные в ходе валидационных исследований, приведены в таблицах А.2 – А.4 (приложение А).

### 11.3 Воспроизводимость

Абсолютная разность между результатами двух независимых единичных испытаний, полученных при использовании одного метода и идентичного анализируемого материала в разных лабораториях разными операторами с использованием различного оборудования, не более чем в 5 % случаев будет больше чем 1,719 г/100 г относительно какао-масла и 0,516 г/100 г относительно шоколада (при допущении, что содержание жиров в шоколаде составляет 30 %).

Значения предела воспроизводимости $R$, полученные в ходе валидационных исследований, приведены в таблицах А.2 – А.4 (приложение А).

## 12 Протокол испытаний

В протоколе испытаний должны содержаться:

a) вся информация, необходимая для полной идентификации образца;

b) метод отбора образцов, если известен;

c) использованный метод тестирования со ссылкой на настоящий стандарт;

d) все подробности работы, не указанные в настоящем стандарте или считающиеся дополнительными, вместе с подробностями любых инцидентов, которые могут повлиять на результаты испытаний;

e) полученные результаты испытаний или конечный полученный результат, если проверялась повторяемость.

## Приложение А
(справочное)

## Результаты межлабораторных испытаний

Метод был валидирован в 2002 году в ходе европейских межлабораторных испытаний, в которых принимало участие 13 лабораторий [6], [7]. Метод был валидирован для уровней ЭКМ около 5 % ЭКМ в шоколаде, т. е. примеси 15, 25 и 30 г ЭКМ/100 г какао-масла, что соответствует 4,5, 7,5 и 9,0 г ЭКМ/100 г шоколада (при допущении, что содержание жиров в шоколаде составляет 30 %).

В таблице А.1 приведены приемлемые газохроматографические условия [3)]. Пример профиля триацилглицеридов ЭКМ какао-масла приведен на рисунке А.1. Данные прецизионности приведены в таблицах А.2 – А.4.

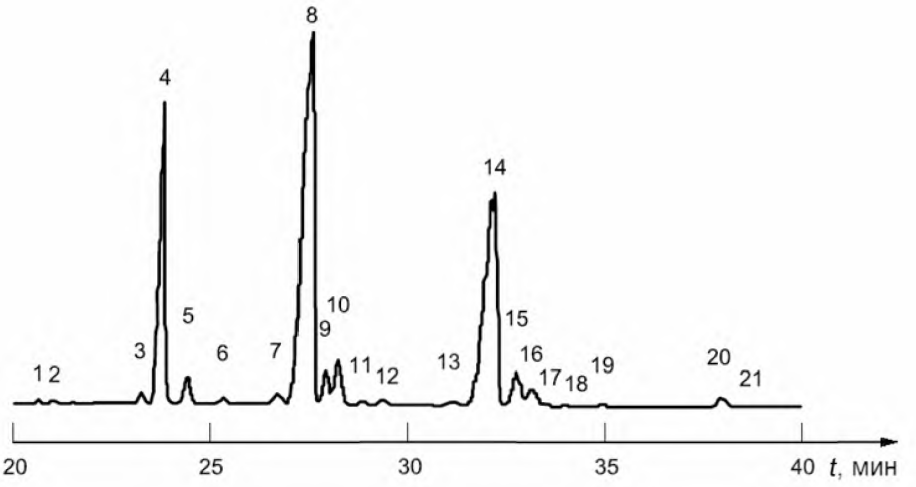
**Таблица А.1 – Приемлемые газохроматографические условия, используемые для анализа триацилглицеридов какао-масла, эквивалентов какао-масла, смесей какао-масла/эквивалентов какао-масла и шоколада**

| Возможный метод | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|---|---|---|---|
| Характеристики колонки: | | | | | |
| – неподвижная фаза | DB-17HT | RTx-65TG | CB-TAP | RTx-65TG | CB-TAP |
| – длина, м | 30 | 30 | 25 | 30 | 25 |
| – внутренний диаметр, мм | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 |
| – толщина пленки, мкм | 0,15 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Температурный режим (термостат): | | | | | |
| – начальная температура, °С/время поддержания, мин | 80/2 | 340/1 | 280/0 | 100/0,5 | 340/0 |
| – программируемая скорость 1, °С/мин | 50 | 1 | 10 | 50 | 1 |
| – температура 1, °С/время поддержания, мин | 300/0 | – | 320/0 | 330/2 | – |
| – программируемая скорость 2, °С/мин | 30 | – | 2 | 1 | – |
| – температура 2, °С/время поддержания, мин | – | – | – | – | – |
| – программируемая скорость 3, °С/мин | – | – | – | – | – |
| – конечная температура, °С/время поддержания, мин | 350/30 | 360/3 | 360/6 | 350/5 | 360/10 |
| – температура инжектора, °С | Термостат | 390 | 370 | Термостат | 360 |
| – температура детектора, °С | 360 | 370 | 370 | 355 | 360 |
| Режим введения | На колонку | С делением потока | С делением потока | На колонку | С делением потока |
| Газ-носитель: | | | | | |
| – тип | $H_2$ | $H_2$ | $H_2$ | He | He |
| – давление, кПа | – | 120 | 100 | – | 150 |
| – скорость потока, мл/мин | 0,8 | – | – | 0,8 | – |
| Проба: | | | | | |
| – концентрация, мг/мл | 0,3 | 50 | 12,5 | 0,3 | – |
| – вводимый объем, мкл | 0,5 | 0,1 | 0,6 | 0,5 | 1 |

[3)] Эти типы колонок являются примерами подходящих, коммерчески доступных продуктов. Данная информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не подразумевает поддержки этих продуктов со стороны ISO.

**Окончание таблицы А.1**

| Возможный метод | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Характеристики колонки:<br>– неподвижная фаза<br>– длина, м<br>– внутренний диаметр, мм<br>– толщина пленки, мкм | RTx-65TG<br>30<br>0,25<br>0,1 | CB-TAP<br>25<br>0,25<br>0,1 | DB-17HT<br>30<br>0,25<br>0,15 | CB-TAP<br>25<br>0,25<br>0,1 | CB-TAP<br>25<br>0,25<br>0,1 | CB-TAP<br>25<br>0,25<br>0,1 |
| Температурный режим (термостат):<br>– начальная температура, °С/время поддержания, мин<br>– программируемая скорость 1, °С/мин<br>– температура 1, °С/время поддержания, мин<br>– программируемая скорость 2, °С/мин<br>– температура 2, °С/время поддержания, мин<br>– программируемая скорость 3, °С/мин<br>– конечная температура, °С/время поддержания, мин<br>– температура инжектора, °С<br>– температура детектора, °С | <br>200/0<br>15<br>360/0<br>1<br>–<br>–<br>370/0<br>390<br>390 | <br>100/0,1<br>70<br>–<br>–<br>–<br>–<br>350/21<br>Термо-стат<br>360 | <br>50/2<br>50<br>300/1<br>10<br>340/2<br>0,5<br>345/26<br>50<br>360 | <br>200/2<br>20<br>320/0<br>1<br>–<br>–<br>360/10<br>65-220-370<br>370 | <br>100/1<br>30<br>300/2<br>30<br>–<br>–<br>340/35<br>100<br>360 | <br>200/2<br>12<br>–<br>–<br>–<br>–<br>350/10<br>–<br>360 |
| Режим введения | С делением потока | На колонку | На колонку | На колонку | На колонку | На колонку (горячий) |
| Газ-носитель:<br>– тип<br>– давление, кПа<br>– скорость потока, мл/мин | $H_2$<br>150<br>– | $H_2$<br>–<br>1 | $H_2$<br>120<br>– | He<br>90<br>– | $H_2$<br>150<br>– | $H_2$<br>–<br>2,4 |
| Проба:<br>– концентрация, мг/мл<br>– вводимый объем, мкл | 10<br>0,5 | 15<br>0,5 | 0,5<br>0,5 | 1 – 2<br>0,1 | 0,5<br>0,4 | 0,65<br>0,3 |




Идентификация пиков: 1, PPP; 2, MOP; 3, PPS; 4, POP; 5, PLP; 6, не идентифицирован; 7, PSS; 8, POS; 9, POO; 10, PLS; 11, PLO; 12, не идентифицирован; 13, SSS; 14, SOS; 15, SOO; 16, SLS + OOO; 17, SLO; 18, не идентифицирован; 19, не идентифицирован; 20, SOA; 21, AOO.

Экспериментальные условия

| | |
|---|---|
| Газохроматографическая колонка: | 25 м × 0,25 мм кварцевая капиллярная колонка, 0,1 мкм Chrompack TAP. |
| Температура термостата колонки: | 100 °C поддерживается в течение 1 мин; 30 °C/мин до 340 °C, поддерживается в течение 35 мин. |
| Ввод пробы: | холодный на колонку. |
| Детектор (ПИД): | 360 °C. |
| Газ-носитель: | $H_2$, 1,6 бар. |
| Вводимое количество: | 0,5 мкл раствора концентрацией 0,5 мг/мл. |

Сокращения

PPP – трипалмитин.
MOP – 1-маргароил-2-олеоил-3-палмитоилглицерид.
PPS – 1,2-дипалмитоил-3-стеароилглицерид.
POP – 1,3-дипалмитоил-2-олеоилглицерид.
PLP – 1,3-дипалмитоил-2-линолеоилглицерид.
PSS – 1-палмитоил-2,3-дистеароилглицерид.
POS – 1-палмитоил-2-олеоил-3-стеароилглицерид.
POO – 1-палмитоил-2,3-диолеоилглицерид.
PLS – 1-палмитоил-2-линолеоил-3-стеароилглицерид.
PLO – 1-палмитоил-2-линолеоил-3-олеоилглицерид.
SSS – тристеарин.
SOS – 1,3-дистеароил-2-олеоилглицерид.
SOO – 1-стеароил-2,3-диолеоилглицерид.
SLS – 1,3-дистеароил-2-линолеоилглицерид.
OOO – триолеин.
SLO – 1-стеароил-2-линолеоил-3-олеоилглицерид.
SOA – 1-стеароил-2-олеоил-3-арахидоилглицерид.
AOO – 1-арахидоил-2,3-диолеоилглицерид.

**Рисунок А.1 – Профиль триацилглицеридов сертифицированного стандартного материала какао-масла**

**Таблица А.2 – Данные прецизионности для образцов шоколада и смесей какао-масла/эквивалентов какао-масла, приготовленных с использованием какао-масла из Гренады и эквивалентов какао-масла вида – средняя фракция пальмового масла/(ши + иллипе) (массовые доли 35 и 65 %)**

| Образец | Образец шоколада | Низкий уровень | Средний уровень | Высокий уровень |
|---|---|---|---|---|
| Количество лабораторий | 13 | 13 | 13 | 13 |
| Количество выбросов | 1 | 1 | 0 | 0 |
| Количество приемлемых результатов | 12 | 12 | 13 | 13 |
| Среднее значение, г ЭКМ/100 г КМ | 13,992 | 15,142 | 24,798 | 29,563 |
| Истинное значение, г ЭКМ/100 г КМ | – | 14,790 | 24,920 | 30,010 |
| Смещение, г ЭКМ/100 г КМ | – | –0,352 | 0,122 | 0,447 |
| Стандартное отклонение повторяемости $s_r$, г/100 г | 0,258 | 0,167 | 0,181 | 0,222 |
| Относительное стандартное отклонение повторяемости, % | 1,84 | 1,11 | 0,73 | 0,75 |
| Предел повторяемости $r$ [= 2,83 × $s_r$,], г/100 г | 0,721 | 0,469 | 0,506 | 0,623 |
| Стандартное отклонение воспроизводимости $s_R$, г/100 г | 0,614 | 0,357 | 0,410 | 0,541 |
| Относительное стандартное отклонение воспроизводимости, % | 4,39 | 2,36 | 1,65 | 1,83 |
| Предел воспроизводимости $R$ [= 2,83 × $s_R$], г/100 г | 1,719 | 1,000 | 1,148 | 1,514 |

**Таблица А.3 – Данные прецизионности для смесей какао-масла/эквивалентов какао-масла, приготовленных с использованием какао-масла из Ганы и эквивалентов какао-масла вида – средняя фракция пальмового масла/ши (массовые доли 50 и 50 %)**

| Образец | Низкий уровень | Средний уровень | Высокий уровень |
|---|---|---|---|
| Количество лабораторий | 13 | 13 | 13 |
| Количество выбросов | 2 | 1 | 0 |
| Количество приемлемых результатов | 11 | 12 | 13 |
| Среднее значение, г ЭКМ/100 г КМ | 16,627 | 25,871 | 30,686 |
| Истинное значение, г ЭКМ/100 г КМ | 15,070 | 24,900 | 30,010 |
| Смещение, г ЭКМ/100 г КМ | –1,557 | –0,971 | –0,676 |
| Стандартное отклонение повторяемости $s_r$, г/100 г | 0,214 | 0,258 | 0,158 |
| Относительное стандартное отклонение повторяемости, % | 1,29 | 1,00 | 0,51 |
| Предел повторяемости $r$ [= 2,83 × $s_r$,], г/100 г | 0,599 | 0,722 | 0,442 |
| Стандартное отклонение воспроизводимости $s_R$, г/100 г | 0,229 | 0,427 | 0,452 |
| Относительное стандартное отклонение воспроизводимости, % | 1,37 | 1,65 | 1,47 |
| Предел воспроизводимости $R$ [= 2,83 × $s_R$], г/100 г | 0,640 | 1,196 | 1,265 |

**Таблица А.4 – Данные прецизионности для смесей какао-масла/эквивалентов какао-масла, приготовленных с использованием какао-масла из Кот-д'Ивуар и эквивалентов какао-масла вида – средняя фракция пальмового масла/сал/манго (массовые доли 50, 25 и 25 %)**

| Образец | Низкий уровень | Средний уровень | Высокий уровень |
|---|---|---|---|
| Количество лабораторий | 13 | 13 | 13 |
| Количество выбросов | 0 | 1 | 0 |
| Количество приемлемых результатов | 13 | 12 | 13 |
| Среднее значение, г ЭКМ/100 г КМ | 15,655 | 24,170 | 28,535 |
| Истинное значение, г ЭКМ/100 г КМ | 14,970 | 24,970 | 29,960 |
| Смещение, г ЭКМ/100 г КМ | –0,685 | 0,800 | 1,425 |
| Стандартное отклонение повторяемости $s_r$, г/100 г | 0,223 | 0,189 | 0,222 |
| Относительное стандартное отклонение повторяемости, % | 1,43 | 0,78 | 0,78 |
| Предел повторяемости $r$ [= 2,83 × $s_r$,], г/100 г | 0,625 | 0,530 | 0,621 |
| Стандартное отклонение воспроизводимости $s_R$, г/100 г | 0,309 | 0,356 | 0,406 |
| Относительное стандартное отклонение воспроизводимости, % | 1,98 | 1,47 | 1,42 |
| Предел воспроизводимости $R$ [= 2,83 × $s_R$], г/100 г | 0,866 | 0,997 | 1,138 |

## Библиография

[1] Directive 2000/36/EC of the European Parliament and of the Council of 23 June 2000 relating to cocoa and chocolate products intended for human consumption. Official Journal, L 197, 03/08/2003, 19-25
(Директива Европейского парламента и совета ЕС 2000/36 от 23 июня 2000 г., касающаяся продуктов из какао и шоколада, предназначенных для потребления в пищу)

[2] KOEBER, R., BUCHGRABER, M., ULBERTH, F., BACAROLO, R-, BERNREUTHER, A., SCHIMMEL, H., ANKLAM, E. and Pauwels, J. *The certification of the content of five triglycerides in cocoa butter,* 2003, EUR 20781 EN, ISBN 92-894-6036-9
(Сертификация содержания пяти триацилглицеридов в какао-масле)

[3] ISO 5555:2001 Animal and vegetable fats and oils – Sampling
(Жиры и масла животные и растительные. Отбор проб)

[4] Official Methods of Analysis of AOAC International, AOAC Official Method 963.15: *Fat in Cacao Products,* 1995
(Жир в какао-продуктах)

[5] BUCHGRABER, M., SENALDI, Ch., ULBERTH, F. and ANKLAM, E. *Detection and quantification of cocoa butter equivalents in cocoa butter and plain chocolate by gas liquid chromatography of triacylglycerols.* J. AOAC Internat, 87, 2004, pp. 1153-1163
(Определение наличия и количественное определение эквивалентов какао-масла в какао-масле и шоколаде путем разделения триацилглицеридов газожидкостной хроматографией)

[6] BUCHGRABER, M, ULBERTH, F. and ANKLAM, E. Method validation for detection and quantification of cocoa butter equivalents in cocoa butter and plain chocolate. J. AOAC Internat, 87, 2004, pp. 1164-1172
(Валидация метода определения наличия и количественного определения эквивалентов какао-масла в какао-масле и шоколаде)

[7] BUCHGRABER, and ANKLAM, E. *Validation of a method for the detection of cocoa butter equivalents in cocoa butter and plain chocolate,* 2003, EUR 20685 EN, ISBN 92-894-5510-1
(Валидация метода определения наличия эквивалентов какао-масла в какао-масле и шоколаде)

Ответственный за выпуск *В. Л. Гуревич*

Сдано в набор 07.05.2009. Подписано в печать 19.06.2009. Формат бумаги 60×84/8. Бумага офсетная.
Гарнитура Arial. Печать ризографическая. Усл. печ. л. 1,97 Уч.- изд. л. 0,90 Тираж экз. Заказ

Издатель и полиграфическое исполнение:
Научно-производственное республиканское унитарное предприятие
«Белорусский государственный институт стандартизации и сертификации» (БелГИСС)
ЛИ № 02330/0549409 от 08.04.2009.
ул. Мележа, 3, 220113, Минск.

gost.e-ecolog.ru