ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

СТБ ГОСТ Р 51471-2008

ЖИР МОЛОЧНЫЙ

Метод обнаружения растительных жиров газожидкостной хроматографией стеринов

ТЛУШЧ МАЛОЧНЫ

Метад выяўлення раслінных тлушчаў газавадкаснай храматаграфіяй стэрынаў

(ГОСТ Р 51471-99, IDT)

Издание официальное

БЗ 5-2008



Госстандарт
Минск

gost.e-ecolog.ru

УДК 637.2.074:543.544.32(083.74)(476) МКС 67.100.01 КП 03 IDT

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

ОКП РБ 15.51.30.301 – 15.51.30.304; 15.51.30.501

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 научно-производственным республиканским дочерним унитарным предприятием «Институт мясо-молочной промышленности» Республиканского унитарного предприятия «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по продовольствию» (РУП «Иститут мясо-молочной промышленности»)

ВНЕСЕН Госстандартом Республики Беларусь

2 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ постановлением Госстандарта Республики Беларусь от 12 сентября 2008 г. № 46

3 Настоящий стандарт идентичен национальному стандарту Российской Федерации ГОСТ Р 51471-99 «Жир молочный. Метод обнаружения растительных жиров газожидкостной хроматографией стеринов».

Национальный стандарт Российской Федерации разработан Всероссийским научно-исследовательским институтом молочной промышленности (ГУ ВНИМИ).

Редакционные изменения выделены в тексте стандарта светлым курсивом.

Официальные экземпляры национального стандарта Российской Федерации, на основе которого подготовлен настоящий государственный стандарт, и стандартов, на которые даны ссылки, имеются в Национальном фонде ТНПА.

Степень соответствия – идентичная (IDT)

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

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

Издан на русском языке

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Аппаратура, материалы и реактивы 2
4 Отбор проб 2
5 Подготовка к анализу 3
6 Проведение анализа 5
7 Обработка результатов 6
8 Метрологические характеристики 6
Приложение А (справочное) Библиография 7

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ЖИР МОЛОЧНЫЙ
Метод обнаружения растительных жиров газожидкостной хроматографией стеринов

ТЛУШЧ МАЛОЧНЫ
Метад выяўлення раслінных тлушчаў газавадкаснай храматаграфіяй стэрынаў

Milk fat
Detection method of vegetable fat
by gas – liquid chromatography of sterols

Дата введения 2009-03-01

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

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 1770-74 (ИСО 1042-83, ИСО 4788-80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

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

ГОСТ 4166-76 Реактивы. Натрий сернокислый. Технические условия

ГОСТ 4328-77 Реактивы. 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 Реактивы. Диметилформамид. Технические условия

ГОСТ 24104-2001 Весы лабораторные. Общие технические требования

ГОСТ 24363-80 Реактивы. 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

Издание официальное

ГОСТ Р 51652-2000* Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия
ИСО 707-97 Молоко и молочные продукты. Руководство по отбору проб

Примечание – При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие технических нормативных правовых актов в области технического нормирования и стандартизации (далее – ТНПА) по каталогу, составленному по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим информационным указателям, опубликованным в текущем году.
Если ссылочные ТНПА заменены (изменены), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться замененными (измененными) ТНПА. Если ссылочные ТНПА отменены без замены, то положение, в котором дана ссылка на них, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

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 $10 \cdot 10^{-3}$ $см^3$.

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 *ТНПА*.

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.

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 $г/дм^3$.

3.17 Вода дистиллированная – по ГОСТ 6709.

3.18 Бумага фильтровальная – по ГОСТ 12026.

3.19 Пробирки стеклянные – по ГОСТ 25336, вместимостью 25 $см^3$.

3.20 Раствор для контроля чувствительности при обнаружении стеринов молочного жира – раствор, состоящий из 1 мг свежеприготовленных стеринов молочного жира и 1 $см^3$ 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 $см^3$ н-пентана. Используют стерины свежеприготовленные 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 $см^3$ н-Пентана по 6.1.

3.23 Медь (II) сернокислая 5-водная – по ГОСТ 4165, раствор массовой концентрации 70 $г/дм^3$ х. ч.

Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками и оборудования 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.

---

* На территории Республики Беларусь действует СТБ 1334-2003.

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 $см^3$ кипяченой воды, нагревают смесь на водяной бане до температуры 75 °С. Добавляют 15 $см^3$ 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 $см^3$, добавляют 10 $см^3$ гидроокиси калия по 3.12 и 20 $см^3$ 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 $см^3$ воды, затем 180 $см^3$ этилового спирта. Нагревают смесь до 40 °С. Добавляют 30 $см^3$ 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 $см^3$ этилового спирта. Затем промывают фильтрат, используя от 25 до 50 $см^3$ 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 $5 \cdot 10^{-3}$ $см^3$ 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.

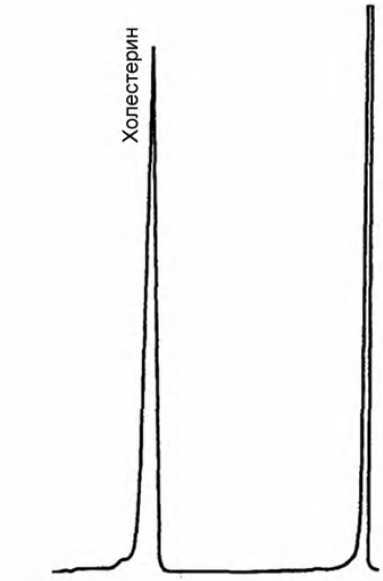


Рисунок 1 – Газожидкостная хроматограмма стерина молочного жира

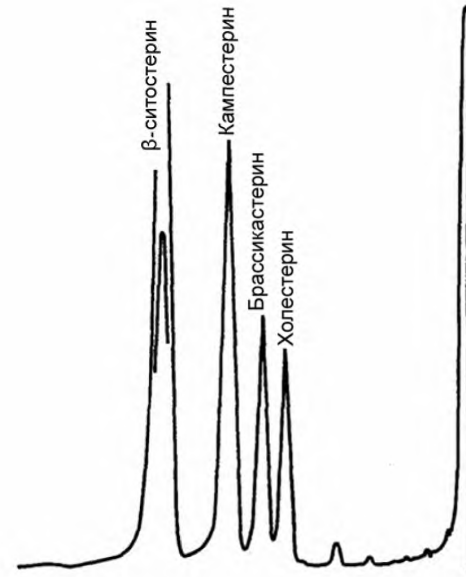


Рисунок 2 – Газожидкостная хроматограмма стеринов молочного жира и рапсового масла

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.

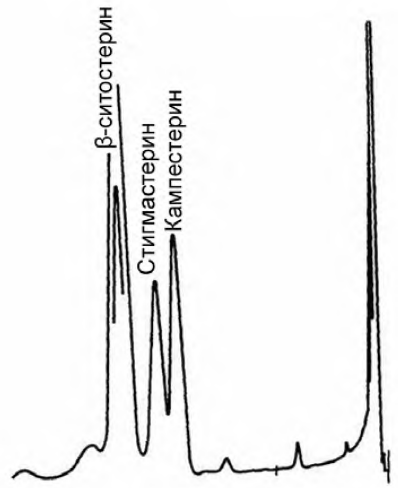


Рисунок 3 – Газожидкостная хроматограмма стеринов соевого масла

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 °С 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

Ответственный за выпуск *В.Л. Гуревич*

Сдано в набор 17.09.2008. Подписано в печать 14.10.2008. Формат бумаги 60×84/8. Бумага офсетная.
Гарнитура Arial. Печать ризографическая. Усл. печ. л. 1,27 Уч.- изд. л. 0,49 Тираж экз. Заказ

Издатель и полиграфическое исполнение
НП РУП «Белорусский государственный институт стандартизации и сертификации» (БелГИСС)
Лицензия № 02330/0133084 от 30.04.2004.
220113, г. Минск, ул. Мележа, 3.

gost.e-ecolog.ru