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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 33490— 2015

МОЛОКО И МОЛОЧНАЯ ПРОДУКЦИЯ

Обнаружение растительных масел и жиров на растительной основе методом газожидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2016

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0—92 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2009 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, применения, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Государственным бюджетным учреждением Ярославской области «Ярославский государственный институт качества сырья и пищевых продуктов» (ГБУ ЯО «ЯГИКСПП»)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии (Росстандарт)

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 12 ноября 2015 г. № 82-П)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 01 декабря 2015 г. № 2092-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 33490—2015 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2016 г.

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет

© Стандартинформ, 2016

В Российской Федерации настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

МКС 67.100.10

Поправка к ГОСТ 33490—2015 Молоко и молочная продукция. Обнаружение растительных масел и жиров на растительной основе методом газожидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием

В каком месте	Напечатано	Должно быть		
Предисловие. Таблица согласования	—	Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан

(ИУС № 7 2019 г.)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

МОЛОКО И МОЛОЧНАЯ ПРОДУКЦИЯ

Обнаружение растительных масел и жиров на растительной основе методом газожидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием

Milk and milk products.
Detection of vegetable fat by gas chromatography with mass spectrometric detection

Дата введения — 2016—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на молоко и молочную продукцию и устанавливает качественный метод обнаружения в их составе растительных масел и жиров на растительной основе методом газожидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

ГОСТ 12.1.004—91 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.005—88 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно—гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

ГОСТ 12.1.007—76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.010—76 Система стандартов безопасности труда. Взрывобезопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.018—93 Система стандартов безопасности труда. Пожаровзрывобезопасность статического электричества. Общие требования

ГОСТ 12.1.019—79[1] Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ 12.4.009—83 Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание

ГОСТ 12.4.021—75 Система стандартов безопасности труда. Системы вентиляционные. Общие требования

ГОСТ OIML R 76-1—2011 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть1. Метрологические и технические требования. Испытания.

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 сернокислая 5-водная. Технические условия

ГОСТ 4166—76 Реактивы. Натрий сернокислый. Технические условия

ГОСТ 4204—77 Реактивы. Кислота серная. Технические условия

ГОСТ 4220—75 Реактивы. Калий двухромовокислый. Технические условия

ГОСТ 4328—77 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ ИСО 5725—6—2003[2]*Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике

ГОСТ 5962—2013 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

[1] В Российской Федерации действует ГОСТ Р 12.1.019—2009 «Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты».

[2] В Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике».

Издание официальное

ГОСТ 9147—80 Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия

ГОСТ 12026—76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 13928—84 Молоко и сливки заготовляемые. Правила приемки, методы отбора проб и подготовка их к анализу

ГОСТ 14919—83 Электроплиты, электроплитки и жарочные электрошкафы бытовые. Общие технические условия

ГОСТ 20010—93 Перчатки резиновые технические. Технические условия

ГОСТ 24363—80 Реактивы. Калия гидроокись. Технические условия

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

ГОСТ 26809.1—2014 Молоко и молочная продукция. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу. Часть 1. Молоко, молочные, молочные составные и молокосодержащие продукты

ГОСТ 26809.2—2014 Молоко и молочная продукция. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу. Часть 2. Масло из коровьего молока, спреды, сыры и сырные продукты, плавленые сыры и плавленые сырные продукты

ГОСТ 27752—88 Часы электронно-механические кварцевые настольные, настенные и часы-будильники. Общие технические условия

ГОСТ 28165—89 Приборы и аппараты лабораторные из стекла. Аквадистилляторы. Испарители. Установки ректификационные. Общие технические требования

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

ГОСТ 29169—91 Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной отметкой

Примечание – При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины и определения в соответствии с [1], а также термины:

3.1 **газожидкостная хроматография**: Метод разделения и анализа смеси веществ, основанный на их различных температурах кипения и взаимодействии с неподвижной жидкой фазой в потоке газа-носителя

3.2 **масс-спектрометрия**: Метод, основанный на разделении ионизированных атомов, молекул и радикалов в газовой фазе, характеризующихся разным отношением массы частицы к ее заряду (m/z), и регистрации спектра образовавшихся ионов.

4 Сущность метода

Метод основан на предварительном гидролизе стероидов, содержащихся в жировой фазе молока и молочных продуктов, в стерины, хроматографическом их разделении газовой хроматографией и сравнении полученных масс-спектров стеринов со спектрами и временем удерживания стандартных веществ.

5 Отбор проб

Отбор и подготовка проб к анализу — по ГОСТ 13928, ГОСТ 26809.1, ГОСТ 26809.2.

Перед анализами отобранные пробы молока и молочных продуктов, за исключением молочных консервов и молочных продуктов в запаянных или закатанных банках, хранят при температуре (4 ± 2) °С, пробы мороженого — при температуре не выше 2°С.

6 Условия проведения анализа

При выполнении анализа в лаборатории следует соблюдать следующие условия:
температура окружающего воздуха . . . . . (20 ± 5) °С;
относительная влажность воздуха . . . . . (55 ± 25) %;
атмосферное давление . . . . . .(95 ± 10) кПа.

7 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда, реактивы и материалы

Хроматограф газовый, оснащенный масс-спектрометрическим детектором, позволяющим проводить измерения в диапазоне масс от 15 до 500 а. е. м. в режиме ионизации электронным ударом при энергии электронов 70 эВ, масс-спектральном разрешении не менее 1 а. е. м. по всей шкале масс, и программным обеспечением для сбора и обработки данных.

Колонка капиллярная с неполярной неподвижной фазой и верхней температурной границей рабочего диапазона не менее 320 °С. Длина и диаметр газохроматографической колонки, толщина слоя неподвижной фазы должны обеспечивать приемлемое хроматографическое разрешение и число теоретических тарелок для полного разделения стеринов.

Термометр ртутный стеклянный лабораторный типа Б по ГОСТ 28498, с диапазоном измерения температуры от 0 °С до 100 °С, с ценой деления шкалы 1 °С.

Весы по ГОСТ OIML R 76-1, обеспечивающие точность взвешивания с пределом допускаемой абсолютной погрешности ± 0,0005 г.

Микрошприц вместимостью 10 мм^3 с погрешностью дозирования не более 5 %.

Шкаф сушильный лабораторный любого типа по ГОСТ 14919, поддерживающий температуру до 200 °С с погрешностью ± 5 °С.

Печь муфельная, обеспечивающая нагрев в диапазоне температур от 300 °С до 800 °С.

Баня водяная с регулируемым обогревом с погрешностью поддержания температуры ± 2 °С.

Центрифуга лабораторная с ротором для центрифужных пробирок вместимостью 15 и 50 см^3, обеспечивающая фактор центрифугирования не менее 5000 *g*.

Электроплитка бытовая по ГОСТ 14919 с закрытой спиралью и регулятором нагревания.

Устройство перемешивающее лабораторное.

Испаритель роторный по ГОСТ 28165.

Воронки делительные ВД—3—250ХС по ГОСТ 25336 с фторопластовым краном.

Колба коническая Кн—1—100—29/32 ТС, Кн—1—250—29/32 ТС по ГОСТ 25336.

Колбы круглодонные К—1—50—29/32, К—1—100—29/32, К—1—250—29/32 по ГОСТ 25336.

Колбы мерные с притертыми пробками 2—5—2, 2—100—2, 2—1000—2 по ГОСТ 1770.

Цилиндры 2—25, 2—50 по ГОСТ 1770.

Стаканы В—1—50, В—1—100, В—1—1000 по ГОСТ 25336.

Воронки В—56—80, В—75—110 по ГОСТ 25336.

Пипетки 1—2—2—1, 1—2—2—10 по ГОСТ 29227.

Холодильник ХШ—1—300—19/26ХС по ГОСТ 25336.

Ступка 5 по ГОСТ 9147.

Пестик 1 по ГОСТ 9147.

Эксикатор 2—190 по ГОСТ 25336.

Груша резиновая медицинская.

Палочки стеклянные оплавленные по ГОСТ 21400.

Щипцы металлические тигельные.

Терка мелкая металлическая.

Пробирки центрифужные вместимостью 15 и 50 см^3.

Емкости стеклянные (виалы) для жидких проб вместимостью 2 см^3, снабженные крышками с силиконовой и тефлоновой мембраной.

Бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026.

Бумага индикаторная универсальная для определения pH.

Натрия сульфат по ГОСТ 4166, безводный.

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328, х.ч.

Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962.

Медь (II) сернокислая 5-водная по ГОСТ 4165, х. ч.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Кислота серная по ГОСТ 4204, х.ч.

Калий двухромовокислый по ГОСТ 4220, х.ч.

Калия гидроокись по ГОСТ 24363, ч.д.а.

Метанол с массовой долей основного вещества не менее 99,8%.

Тетрагидрофуран с массовой долей основного вещества не менее 99,5 %.

Гелий газообразный марки А (объемная доля гелия не менее 99,995 %).

Холестерин с массовой долей основного вещества не менее 99,0% (CAS № 80-99-9).

Смесь фитостеринов — брассикастерин (CAS № 474-67-9), кампестерин (CAS № 474-62-4), стигмастерин (CAS № 83-48-7), β-ситостерин (CAS № 83-46-5) — в хлороформе суммарной массовой концентрации 25 мг/ $см^3$.

Допускается применение других средств измерения и вспомогательного оборудования, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам и обеспечивающих необходимую точность измерения, а также реактивов и материалов по качеству не хуже вышеуказанных.

8 Подготовка к проведению анализа

8.1 Подготовка посуды

Стеклянную химическую посуду, используемую в процессе анализа, ополаскивают водопроводной водой, заливают хромовой смесью до 1/4—1/3 вместимости сосуда и осторожно смачивают внутренние его стенки. После этого хромовую смесь выливают обратно в емкость для хранения. Посуду оставляют на несколько минут, затем тщательно отмывают сначала водопроводной, а затем дистиллированной водой и сушат в сушильном шкафу при температуре 105 °С.

8.2 Подготовка реактивов и материалов, приготовление растворов

8.2.1 Натрий сернокислый безводный прокаливают в муфельной печи 4 ч при температуре 400 °С и охлаждают в эксикаторе.

Срок хранения натрия сернокислого безводного в эксикаторе при комнатной температуре — не более 3 мес.

8.2.2 Осадительный реактив

В химическом стакане вместимостью 500 $см^3$ взвешивают (70,0 ± 0,1) г сернокислой меди и растворяют в небольшом объеме дистиллированной воды, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 1000 $см^3$ и доводят объем раствора дистиллированной водой до метки.

Срок хранения осадительного реактива в склянке из темного стекла при комнатной температуре — не более 3 мес.

8.2.3 Раствор гидроксида калия в метаноле молярной концентрации 2 моль/$дм^3$

В мерной колбе вместимостью 100 $см^3$ взвешивают (11,21 ± 0,01) г предварительно измельченного гидроксида калия и доводят объем раствора до метки метанолом, интенсивно перемешивают до полного растворения гидроксида калия и дают остыть до комнатной температуры.

Срок хранения раствора в плотно закрытой склянке при температуре (4 ± 2) °С — не более 3 мес.

8.2.4 Стандартный раствор холестерина массовой концентрации 5 мг/$см^3$

В химическом стакане вместимостью 100 $см^3$ взвешивают (0,50 ± 0,01) г холестерина, вносят около 50 $см^3$ *н*—гексана, аккуратно перемешивают, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ и доводят объем раствора *н*—гексаном до метки.

Срок хранения раствора в плотно закрытой склянке при температуре (4 ± 2) °С — не более 6 мес.

8.2.5 Раствор смеси фитостеринов суммарной концентрации 5 мг/$см^3$

В мерную колбу вместимостью 5 $см^3$ вносят 1 $см^3$ раствора смеси фитостеринов, доводят объем раствора до метки *н*—гексаном и перемешивают.

Срок хранения раствора в плотно закрытой склянке при температуре (4 ± 2) °С — не более 6 мес.

8.2.6 Рабочий раствор смеси холестерина и фитостеринов массовой концентрации холестерина 2,5 мг/ $см^3$ и фитостеринов (суммарно) 2,5 мг/$см^3$

В стеклянную виалу вместимостью 2 $см^3$ вносят 0,5 $см^3$ раствора смеси фитостеринов, приготовленного по 8.2.5, и 0,5 $см^3$ раствора холестерина, приготовленного по 8.2.4, и тщательно перемешивают.

Раствор готовят непосредственно перед проведением анализа.

8.3 Подготовка хромато-масс-спектрометра

Хромато-масс-спектрометр для анализа в режиме ионизации пробы электронным ударом готовят в соответствии с инструкцией по эксплуатации и устанавливают режим для анализа.

Примерный вид режима приведен ниже:

а) режим хроматографирования:

инжектируемый объем анализируемой пробы − 1 мм^3;

деление потока — 1 : 1;

температура испарителя − 310 °С;

время задержки включения детектора — 28 мин;

тип колонки — HP—5MS;

газ-носитель — гелий;

скорость потока гелия через колонку − 1 см^3/мин;

программирование температуры термостата:

-начальная температура колонки — 115 °С, время анализа при этой температуре − 1 мин;

- скорость нагрева колонки от 9 °С/мин до 260 °С, от 3 °С/мин до 290 °С;

б) режим масс—спектрометра:

энергия ионизации − 70 эВ;

температура ионного источника − 230 °С;

температура квадруполя — 150 °С;

температура ГХ/МС интерфейса — 290 °С;

диапазон сканирования масс ионов: 35−450 а.е.м.

При соблюдении вышеуказанных условий продолжительность анализа составляет 45 мин.

8.4 Градуировка хроматографа

Градуировка хроматографа заключается в определении времени удерживания анализируемых стеринов (приложение А) и выполняется путем анализа рабочего раствора смеси холестерина и фитостеринов по 8.2.6 в условиях, приведенных в 8.3. Масс-спектрометрический анализ проводят в режиме селективного ионного мониторинга (SIM) характеристических ионов стеринов. Значения масс характеристических ионов приведены в таблице 1.

Таблица 1 − Значения масс характеристических ионов холестерина и фитостеринов

Наименование	Характеристические ионы, а.е.м.	
	целевой	подтверждающие
Холестерин	386	275; 301
Брассикастерин	398	255; 300
Кампестерин	400	43; 81
Стигмастерин	412	55; 83
β-ситостерин	414	329; 145

При наличии плохо разделенных хроматографических пиков стеринов корректируют режим хроматографирования.

Критерии приемлемости результатов анализа и проверки работоспособности хроматографической системы заключаются в следующем:

Хроматографическая система считается работоспособной, если выполняются следующеие условия:

- разрешение между пиками стеринов на хроматограмме рабочего раствора не менее 1,5;
- асимметрия пиков на хроматограмме рабочего раствора не более 1,5;
- число теоретических тарелок по пику холестерина не менее 500000;
- СКО по площади пика холестерина по шести параллельным измерениям рабочего раствора не более 5 %, а по времени удерживания — не более 1%.

Результат анализа рабочего раствора является приемлемым при условии, что соотношение сигнал/шум для пика холестерина не менее 150.

Пики фитостеринов с интенсивностью сигнала менее 2 % от высоты пика холестерина или с соотношением сигнал/шум менее 3 во внимание не принимают.

8.5 Подготовка проб

8.5.1 Метод с предварительным выделением жира

8.5.1.1 Жир молочный, масло сливочное и топленое, пасты масляные

Пробу продукта массой (40—50) г расплавляют в химическом стакане вместимостью 100 см^3 в сушильном шкафу при температуре (45 ± 2) °С для расслоения на жировую и водную фазу. Затем жировую фазу фильтруют через сухую фильтровальную бумагу так, чтобы водная фаза не попадала на фильтр. Если отфильтрованный жир будет прозрачным, то продолжают подготовку пробы по

8.5.1.9. При наличии в отфильтрованном жире мути его фильтруют повторно.

8.5.1.2 Сырое молоко и сырые сливки, питьевое молоко и питьевые сливки

1 вариант. В коническую колбу вместимостью 500 см^3 помещают 400 см^3 пробы продукта. Пробу нагревают на водяной бане до температуры (75 ± 2) °С, добавляют 15 см^3 осадительного реактива по 8.2.2 и продолжают нагревать до получения сгустка, который фильтруют через фильтровальную бумагу, промывают его теплой водой. Осадок переносят в фарфоровую ступку, перемешивают его с достаточным количеством безводного сульфата натрия до получения зернистой массы.

2 вариант. Пробу продукта помещают в химический стакан вместимостью 1000 см^3 и оставляют до скисания. Затем снимают верхний жировой слой, помещают в фарфоровую ступку и тщательно перемешивают с безводным сернокислым натрием, взятым в количестве, достаточном для образования зернистой массы.

8.5.1.3 Концентрированное молоко, сгущенное молоко и мороженое

В конической колбе вместимостью 250 см^3 взвешивают (100,0 ± 1,0) г продукта.

Мороженое предварительно освобождают от глазури и других отделяемых компонентов. В пробу продукта добавляют 100 см^3 дистиллированной воды, нагревают смесь на водяной бане до температуры (75 ± 2) °С, добавляют 15 см^3 осадительного реактива и продолжают нагревать до получения сгустка, который фильтруют через фильтровальную бумагу, промывают его теплой водой до обесцвечивания фильтрата. Осадок переносят в фарфоровую ступку, перемешивают его с безводным сернокислым натрием, взятым в количестве, достаточном для образования зернистой массы.

8.5.1.4 Сметана и продукты на ее основе

100 г пробы продукта тщательно перемешивают в фарфоровой ступке с безводным сульфатом натрия, взятым в количестве, достаточном для образования зернистой массы.

8.5.1.5 Сухие молочные продукты

В фарфоровой ступке взвешивают (300,0 ± 1,0) г пробы продукта и добавляют 300 см^3 дистиллированной воды. Смесь тщательно перемешивают стеклянной палочкой до однородной консистенции и оставляют на 60 мин до набухания белков и перемешивают в фарфоровой ступке с безводным сульфатом натрия, взятым в количестве, достаточном для образования зернистой массы.

8.5.1.6 Творог и творожные продукты

100 г пробы продукта перемешивают в фарфоровой ступке с безводным сульфатом натрия, взятым в количестве, достаточном для образования зернистой консистенции.

8.5.1.7 Сыр

100 г пробы продукта измельчают при помощи терки, помещают в фарфоровую ступку и растирают с безводным сульфатом натрия, взятым в количестве, достаточном для образования зернистой консистенции.

8.5.1.8 Выделение жира

Пробу продукта, полученную по 8.5.1.2—8.5.1.7, переносят в колбу на 250 см^3 и добавляют 100—150 см^3 *н*—гексана, встряхивая на перемешивающем устройстве или вручную и экстрагируют жир. Растворитель полностью удаляют на роторном испарителе при температуре 40 °С.

В случае если дальнейший анализ пробы не может быть проведен сразу, то жир, выделенный по 8.5.1.8, хранят в холодильнике при температуре (4 ± 2) °С не более 3 мес.

8.5.1.9 Получение свободных стеринов

(1,0 ± 0,1) г жира, выделенного по 8.5.1.8, вносят в коническую колбу вместимостью 150 см^3, добавляют 0,3 г гидроокиси натрия, 30 см^3 этилового спирта и проводят гидролиз: кипятят с обратным холодильником на электроплитке в течение 60 мин. Содержимое колбы после омыления должно представлять собой однородный прозрачный раствор, который охлаждают в вытяжном шкафу при комнатной температуре до 40 °С. В колбу добавляют 30 см^3 дистиллированной воды. Содержимое колбы помещают в делительную воронку вместимостью 250 см^3, добавляют 15 см^3 *н*—гексана и экстрагируют неомыляемые вещества, осторожно встряхивая в течение одной минуты. Для лучшего разделения слоев добавляют 2—4 см^3 этилового спирта. После расслоения фаз верхний гексановый слой сливают в коническую колбу, а нижний слой дважды подвергают повторной экстракции с новыми порциями по 15 см^3 *н*—гексана. Гексановые экстракты помещают в делительную воронку. Экстракцию неомыляемых веществ проводят по возможности быстро, предохраняя пробу от попадания на нее прямого солнечного света. Объединенный *н*—гексановый слой промывают в делительной воронке несколькими порциями по 20 см^3 дистиллированной воды до нейтральной реакции промывных вод по универсальной индикаторной бумаге. Отмытую *н*—гексановую фракцию пропускают через бумажный фильтр с безводным сульфатом натрия, переносят в колбу для упаривания, концентрируют на роторном испарителе при температуре (40 ± 5) °С до получения раствора объемом 1,5—2,0 см^3 и переносят в виалу. Концентрированный раствор анализируют с помощью газожидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

8.5.2 Ускоренный метод выделения жира

В соответствии с таблицей 2 в коническую колбу вместимостью 150 см³ вносят анализируемую пробу продукта, добавляют 0,5 г гидроокиси натрия, 30 см³ этилового спирта и проводят гидролиз: кипятят на водяной бане с обратным холодильником на электроплитке 60 мин. Содержимое колбы охлаждают до температуры 40 °С и добавляют 30 см³ дистиллированной воды. Содержимое колбы помещают в делительную воронку вместимостью 250 см³, добавляют 15 см³ *н*—гексана и экстрагируют неомыляемые вещества, осторожно встряхивая в течение одной минуты. Для лучшего разделения слоев добавляют 2—4 см³ этилового спирта.

Таблица 2 — Рекомендуемая масса анализируемой пробы продукта

В граммах

Наименование продукта	Анализируема проба
Молоко, кисломолочные продукты (за исключением сметаны)	25,0 ± 0,1
Сливки	10,0 ± 0,1
Сметана	5,0 ± 0,1
Творог и творожные продукты	10,0 ± 0,1
Сыр	3,0 ± 0,1
Мороженое	10,0 ± 0,1
Масло сливочное и топленое, пасты масляные, молочный жир	1,0 ± 0,1
Сухие молочные продукты	5,0 ± 0,1
Примечание — Мороженое предварительно освобождают от глазури и других отделяемых компонентов. Сыр измельчают при помощи терки.	

После расслоения фаз верхний *н*-гексановый слой сливают в коническую колбу, а с нижним слоем дважды повторяют экстракцию с новыми порциями *н*-гексана по 15 см³ каждая. Экстракцию неомыляемых веществ проводят по возможности быстро, предохраняя пробу от попадания на нее прямого солнечного света. Объединенный *н*-гексановый слой промывают в делительной воронке несколькими порциями по 20 см³ дистиллированной воды до нейтральной реакции промывных вод по универсальной индикаторной бумаге. Отмытую *н*-гексановую фракцию пропускают через бумажный фильтр с безводным сульфатом натрия, переносят в колбу для упаривания, концентрируют раствор на роторном испарителе при температуре (40 ± 5) °С до объема 1,5—2,0 см³ и переносят в виалу. Концентрированный раствор анализируют с помощью газожидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

8.5.3 Метод без предварительного выделения жира

Применяют при разногласиях в оценке качества анализируемой продукции.

В центрифужную пробирку вместимостью 50 см³ помещают (25,0 ± 1,0) г молока или молочного продукта, добавляют 25 см³ тетрагидрофурана, закрывают крышкой, интенсивно встряхивают и центрифугируют в течение 5—10 мин на центрифуге с частотой оборотов ротора, соответствующей фактору центрифугирования не менее 5000 *g*.

Верхний слой в зависимости от его объема переносят в центрифужную пробирку вместимостью 15 или 50 см³ и добавляют дистиллированную воду в соотношении 1:2, закрывают крышкой, интенсивно встряхивают и центрифугируют в течение 5—10 мин на центрифуге с частотой оборотов ротора, соответствующей фактору центрифугирования не менее 5000 *g*.

(5,00 ± 0,01) см³ пробы очищенного раствора молочного жира переносят в центрифужную пробирку вместимостью 50 см³ для щелочного гидролиза.

В центрифужную пробирку с пробой раствора молочного жира добавляют такое же количество по объему раствора гидроксида калия в метаноле, приготовленного по 8.2.3, интенсивно перемешивают в течение минуты, добавляют 10 см³ *н*-гексана, интенсивно перемешивают в течение одной минуты и центрифугируют в течение 10 мин на центрифуге с частотой оборотов ротора, соответствующей фактору центрифугирования не менее 5000 *g*.

Верхний *н*-гексановый слой декантируют в делительную воронку и промывают несколькими порциями по 10 см³ дистиллированной воды до нейтральной реакции промывных вод по универсальной индикаторной бумаге. Отмытую *н*-гексановую фракцию пропускают через бумажный фильтр с безводным сульфатом натрия, переносят в колбу для упаривания, концентрируют раствор на роторном испарителе при температуре (40 ± 5) °С до объема 1,5—2,0 см³ и переносят в виалу. Полученный концентрированный раствор анализируют с помощью газожидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

9 Проведение анализа

Для оценки фона (чистоты аналитической системы) каждый раз перед началом работы инжектируют в прибор 1 мм^3 чистого растворителя (*н*-гексан) и записывают масс-хроматограмму, на которой не должно присутствовать посторонних пиков.

Отбирают 1 мм^3 анализируемой пробы продукта, подготовленной в соответствии с 8.5, вводят в испаритель газового хроматографа и выполняют хроматографическое разделение в условиях, приведенных в 8.3. Масс-спектрометрический анализ проводят в режиме селективного ионного мониторинга (SIM) характеристических ионов стеринов в соответствии с таблицей 1 по 8.4. Записывают хроматограммы и идентифицируют индивидуальные стерины по масс-спектру и совпадению времен удерживания.

Пробу продукта анализируют не менее двух раз.

10 Обработка результатов анализа

После проведения анализа с помощью системы обработки данных фиксируют на масс-хроматограммах пики в области времен удерживания, соответствующих выходу холестерина и фитостеринов.

Фитостерины считают обнаруженными при выполнении ряда условий:

- интенсивность отклика сигнала в единицах шума для пика не менее 3 и по интенсивности сигнала холестерина не менее 2 %;
- время удерживания стерина на хроматограмме отличается от времени удерживания рабочего раствора на хроматограмме не более чем на 1%;
- расхождение между соотношениями интенсивности отклика сигнала ионов в спектре соответствующего стерина в анализируемой пробе и в спектре того же стерина в рабочем растворе смеси, приготовленной по 8.2.6, не превышает 10 %.

Не учитывают пики фитостеринов с интенсивностью отклика сигнала не более 2 % от высоты пика холестерина или с соотношением сигнал/шум не более 3.

Наличие β—ситостерина или других фитостеринов в жировой фазе анализируемой пробы продукта свидетельствует о присутствии в ней растительных масел или жиров на растительной основе (см. приложение Б).

11 Оформление результатов анализа

Результат обнаружения растительных масел и жиров на растительной основе представляют в документах в виде наличия или отсутствия каждого стерина в отдельности, на основании чего делают заключение о фальсификации или нефальсификации жировой фазы пробы продукта растительными маслами или жирами на растительной основе.

12 Контроль качества анализа

Контроль качества результатов анализа обеспечивают путем проверки работоспособности хроматографической системы, оценки ее чистоты, выполнения критериев приемлемости результатов анализа и условий в соответствии с 8.4 и разделом 9.

13 Требования, обеспечивающие безопасность

13.1 Условия безопасного проведения работ

При выполнении работ следует соблюдать следующие требования:

- помещение, в котором проводят анализ, должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией в соответствии с ГОСТ 12.4.021. Работу с реактивами необходимо проводить в вытяжном шкафу. Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать норм, установленных требованиями ГОСТ 12.1.005;
- требования электробезопасности в соответствии с ГОСТ 12.1.019 и инструкцией по эксплуатации приборов;
- требования взрывобезопасности в соответствии с ГОСТ 12.1.010;
- помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожаробезопасности в

соответствии с ГОСТ 12.1.004, ГОСТ 12.1.018 и быть оснащено средствами пожаротушения в соответствии с требованиями ГОСТ 12.4.009;

- при работе с концентрированными кислотами и щелочами необходимо использовать спецодежду, защитные очки и резиновые перчатки. При выполнении анализов следует соблюдать требования безопасности при работе с химическими реактивами согласно ГОСТ 12.1.007.

13.2 Требования к квалификации оператора

К выполнению работ допускаются лица, имеющие квалификацию инженер, техник или лаборант, владеющие знаниями в области газовой хроматографии и масс-спектрометрии, навыками проведения анализа и изучившие инструкцию по эксплуатации используемой аппаратуры.

Приложение А
(справочное)

Хроматограмма рабочего раствора смеси холестерина и фитостеринов

А.1 Хроматограмма рабочего раствора смеси холестерина и фитостеринов приведена на рисунке А.1.

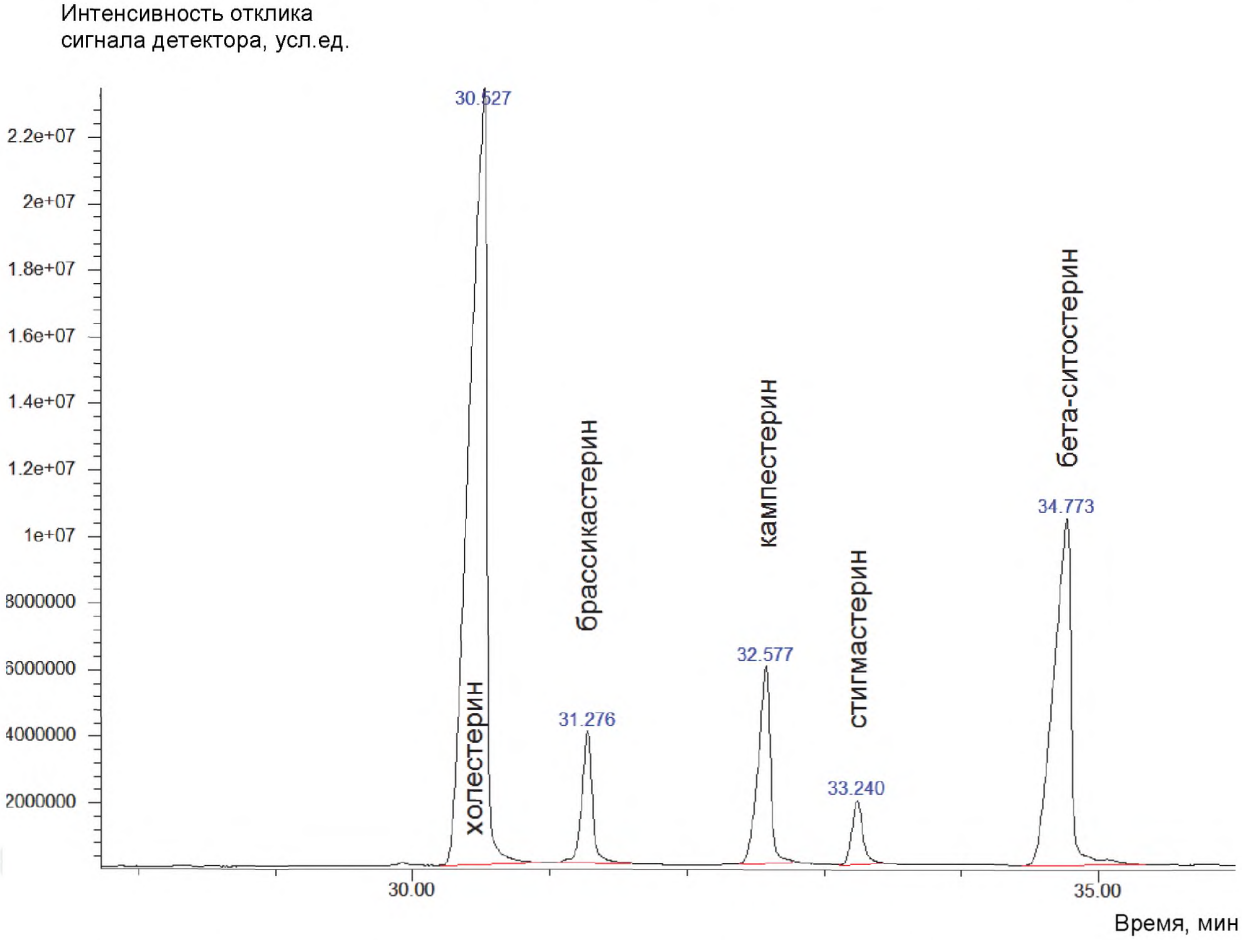

Рисунок А.1 — Хроматограмма, полученная при разделении рабочего раствора смеси холестерина и фитостеринов по 8.2.5, на колонке HP-5MS (с нанесенной неполярной жидкой фазой — 5% фенил и 95 % диметилсилоксан, длиной 30 м, внутренним диаметром 0,25 мм, толщиной нанесения жидкой фазы 0,25 мкм) в условиях, приведенных в 8.3

Приложение Б
(справочное)

Хроматограммы стериновой фракции жировой фазы пробы продукта, не фальсифицированного и фальсифицированного растительными маслами или жирами на растительной основе

Б.1 Хроматограмма стериновой фракции жировой фазы пробы продукта, не фальсифицированного растительными маслами или жирами на растительной основе, приведена на рисунке Б.1

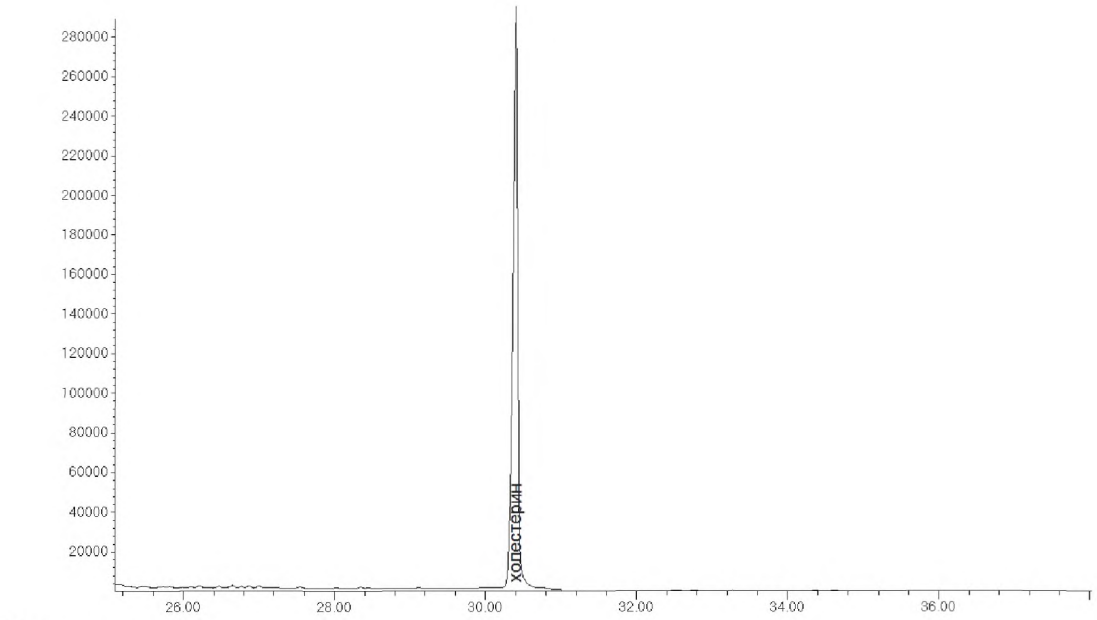

Рисунок Б.1 — Хроматограмма стериновой фракции жировой фазы пробы продукта, не фальсифицированного растительными маслами или жирами на растительной основе

Б.2 Хроматограмма стериновой фракции жировой фазы пробы продукта, фальсифицированного растительными маслами или жирами на растительной основе, приведена на рисунке Б.2.

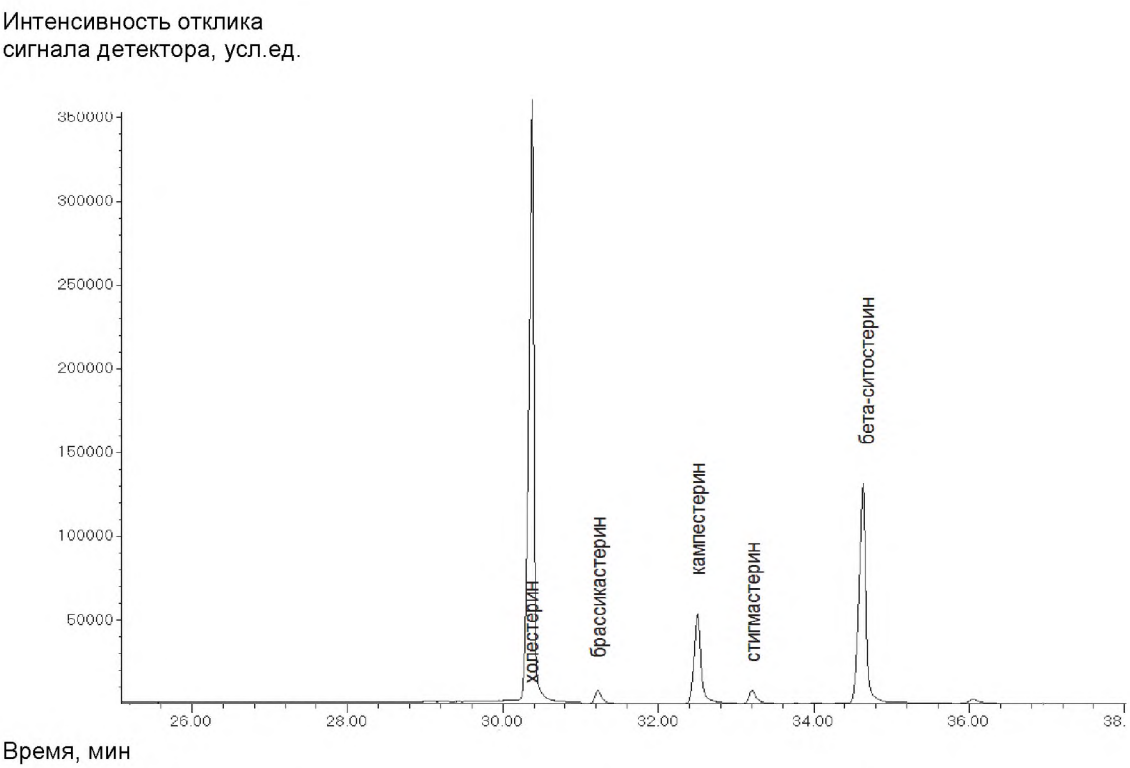

Рисунок Б.2 — Хроматограмма стериновой фракции жировой фазы пробы продукта, фальсифицированного растительными маслами или жирами на растительной основе

Библиография

[1] Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 033/2013 «О безопасности молока и молочной продукции», принятый Решением Совета Евразийской Экономической комиссии № 67 от 9 октября 2013 г.

УДК 637.147.2:543:06:006.354 МКС 67.100.10

Ключевые слова: молоко, продукты молочные, жир молочный, обнаружение растительных масел и жиров на растительной основе, газо-жидкостная хроматография, масс-спектрометрическое детектирование, стерины, омыление, хромато-масс-спектрометр

Редактор *М.Е. Никулина*

Корректор *Л.С. Лысенко*

Компьютерная верстка *Е.К. Кузиной*

Подписано в печать 08.02.2016. Формат 60x84 1/8.
Усл. печ. л. 1,86. Тираж 46 экз. Зак. 212.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»

123995 Москва, Гранатный пер., 4.

gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru