

---

---

**Жиры и масла животные и  
растительные. Определение  
содержания токоферолов и  
токотриенолов высокоэффективной  
жидкостной хроматографией**

iTeh STA *Animal and vegetable fats and oils — Determination of tocopherol and  
tocotrienol contents by high-performance liquid chromatography*  
(standards.iteh.ai)

ISO 9936:2006

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/df21bd77-11b6-4d99-bf94-45242f72dc97/iso-9936-2006>

Ответственность за подготовку русской версии несёт GOST R  
(Российская Федерация) в соответствии со статьёй 18.1 Устава ISO



Ссылочный номер  
ISO 9936:2006(R)

**Отказ от ответственности при работе в PDF**

Настоящий файл PDF может содержать интегрированные шрифты. В соответствии с условиями лицензирования, принятыми фирмой Adobe, этот файл можно распечатать или смотреть на экране, но его нельзя изменить, пока не будет получена лицензия на интегрированные шрифты и они не будут установлены на компьютере, на котором ведется редактирование. В случае загрузки настоящего файла заинтересованные стороны принимают на себя ответственность за соблюдение лицензионных условий фирмы Adobe. Центральный секретариат ISO не несет никакой ответственности в этом отношении.

Adobe - торговый знак фирмы Adobe Systems Incorporated.

Подробности, относящиеся к программным продуктам, использованные для создания настоящего файла PDF, можно найти в рубрике General Info файла; параметры создания PDF были оптимизированы для печати. Были приняты во внимание все меры предосторожности с тем, чтобы обеспечить пригодность настоящего файла для использования комитетами-членами ISO. В редких случаях возникновения проблемы, связанной со сказанным выше, просьба проинформировать Центральный секретариат по адресу, приведенному ниже..

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

ISO 9936:2006

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/df21bd77-11b6-4d99-bf94-45242f72dc97/iso-9936-2006>



**ДОКУМЕНТ ЗАЩИЩЕН АВТОРСКИМ ПРАВОМ**

© ISO 2006

Все права сохраняются. Если не указано иное, никакую часть настоящей публикации нельзя копировать или использовать в какой-либо форме или каким-либо электронным или механическим способом, включая фотокопии и микрофильмы, без предварительного письменного согласия ISO по адресу ниже или членом ISO в стране регистрации пребывания.

ISO copyright office  
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20  
Tel. + 41 22 749 01 11  
Fax + 41 22 749 09 47  
E-mail [copyright@iso.org](mailto:copyright@iso.org)  
Web [www.iso.org](http://www.iso.org)

Опубликовано в Швейцарии

## Содержание

Страница

Предисловие .....	iv
1 Область применения .....	1
2 Нормативные ссылки .....	1
3 Термины и определения .....	1
4 Принцип .....	1
5 Реактивы .....	2
6 Аппаратура .....	2
7 Отбор проб .....	3
8 Подготовка пробы для испытания .....	3
9 Методика .....	4
9.1 Приготовление калибровочных растворов .....	4
9.2 Оптимизация рабочих параметров .....	5
9.3 Приготовление испытуемого раствора .....	5
9.4 Определение .....	5
10 Выражение результатов .....	6
11 Прецизионность .....	7
11.1 Межлабораторное испытание .....	7
11.2 Повторяемость .....	7
11.3 Воспроизводимость .....	7
12 Протокол испытания .....	7
Приложение А (информативное) Примеры хроматограмм .....	8
Приложение В (информативное) Омыление .....	10
Приложение С (информативное) Результаты межлабораторных испытаний .....	12
Библиография .....	19

## Предисловие

ISO (Международная организация по стандартизации) является всемирной федерацией национальных организаций по стандартизации (комитетов-членов ISO). Разработка международных стандартов обычно осуществляется техническими комитетами ISO. Каждый комитет-член ISO, заинтересованный в деятельности, для которой был создан технический комитет, имеет право быть представленным в этом комитете. Международные организации, правительственные и неправительственные, имеющие связи с ISO, также принимают участие в работах. ISO непосредственно сотрудничает с Международной электротехнической комиссией (IEC) по всем вопросам электротехнической стандартизации.

Международные стандарты разрабатываются в соответствии с правилами, приведенными в Директивах ISO/IEC, Часть 2.

Основная задача технических комитетов состоит в подготовке международных стандартов. Проекты международных стандартов, одобренные техническими комитетами, рассылаются комитетам-членам на голосование. Их опубликование в качестве международных стандартов требует одобрения, по меньшей мере, 75 % комитетов-членов, принимающих участие в голосовании.

Следует иметь в виду, что некоторые элементы настоящего документа могут быть объектом патентных прав. ISO не должен нести ответственность за идентификацию какого-либо одного или всех патентных прав.

ISO 9936 подготовлен Техническим комитетом ISO/TC 34, *Пищевые продукты*, Подкомитетом SC 11, *Животные и растительные жиры и масла*.

Настоящее второе издание отменяет и заменяет первое издание (ISO 9936:1997), которое было подвергнуто техническому пересмотру.

ISO 9936:2006

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/df21bd77-11b6-4d99-bf94-45242f72dc97/iso-9936-2006>

# Жиры и масла животные и растительные. Определение содержания токоферолов и токотриенолов высокоэффективной жидкостной хроматографией

## 1 Область применения

Настоящий международный стандарт устанавливает метод определения содержания свободных  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, и  $\delta$ -токоферолов и токотриенолов (называемых в совокупности токолами) в животных и растительных жирах и маслах (называемых в дальнейшем жирами) с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC).

Для продуктов, содержащих эфиры токоферолов и токотриенолов, необходимо проводить предварительное омыление.

ПРИМЕЧАНИЕ Подходящий метод, включающий процедуру холодного омыления, описан в Приложении В только для информации.

## 2 Нормативные ссылки

Следующие ссылочные нормативные документы являются обязательными при применении данного документа. Для жестких ссылок применяется только цитированное издание документа. Для плавающих ссылок необходимо использовать самое последнее издание нормативного ссылочного документа (включая любые изменения).

ISO 661, Жиры и масла животные и растительные. Подготовка пробы для испытания

## 3 Термины и определения

Применительно к настоящему документу используются следующие термины и определения.

### 3.1

#### **содержание токолов tocol content**

массовая доля отдельных токолов, определенных по методу, установленному в этом международном стандарте

ПРИМЕЧАНИЕ Указанное содержание выражается в миллиграммах на килограмм в виде целого числа.

## 4 Принцип

Растворяют пробу для анализа в *n*-гептане и разделяют отдельные токолы с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Рассчитывают содержание каждого токола с помощью калибровочных коэффициентов, определенных по калибровочным растворам.

## 5 Реактивы

Используют реактивы только класса чистоты HPLC или эквивалентного.

### 5.1 Стандарты $\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ - и $\delta$ -токоферолов и токотриенолов.

При отсутствии стандартов токоферолов можно использовать смесь масел из зародышей пшеницы и сои для идентификации  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - и  $\delta$ -токоферолов.

При отсутствии стандартов токотриенолов можно использовать пальмовое масло для идентификации  $\alpha$ - и  $\gamma$ -токотриенолов. Полученные хроматограммы могут быть использованы для идентификации пиков на хроматограммах пробы для испытания, в этом случае следует использовать калибровочные коэффициенты для соответствующих токоферолов.

**ПРИМЕЧАНИЕ** Стандарты  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - и  $\delta$ -токоферолов и токотриенолов можно получить в фирме Merck<sup>1)</sup>;  $\alpha$ -токоферол может быть получен от различных поставщиков. Было установлено, что чистота некоторых имеющихся в продаже стандартов токоферолов может изменяться от 85 % до 100 %. Поэтому важно определять концентрацию приготовленных калибровочных растворов с помощью УФ- спектрометрии (см. 9.1.1).

**5.2 Тетрагидрофуран**, фильтрованный через нейлоновый HPLC фильтр (0,45 мкм).

**5.3 *n*-Гептан**, фильтрованный через нейлоновый HPLC фильтр (0,45 мкм).

**5.4 Подвижная фаза для HPLC:** следует использовать любую подходящую смесь растворителей (см. Таблицу С.3), которая продемонстрировала такую же степень хроматографического разделения пиков, какая показана в Таблице 2 (относительное время удерживания токоферолов и токотриенолов) и в Приложении А (хроматограммы смеси растительных масел).

Приготовление подходящей подвижной фазы, 3,85 % (объемная доля) раствора тетрагидрофурана в *n*-гептане, указано ниже. С помощью градуированного цилиндра вместимостью 1 000 мл (6.5) переносят 1 000 мл *n*-гептана (5.3) в склянку вместимостью 2 л. Дважды добавляют по 20 мл тетрагидрофурана (5.2), используя мерную пипетку вместимостью 20 мл (6.6). Гомогенизируют подвижную фазу на ультразвуковой ванне (6.8) в течение 15 мин.

**5.5 Метанол**

## 6 Аппаратура

Используют обычную лабораторную аппаратуру и, в частности, следующую.

**6.1 HPLC-система**, состоящая из насоса высокого давления, устройства ввода пробы, термостата колонки, отрегулированного на температуру 25 °С (необязательно), флуоресцентного детектора с длиной волны возбуждения, установленной на 295 нм, и длиной волны излучения на 330 нм, а также записывающего интегратора.

При отсутствии флуоресцентного детектора допускается, но не рекомендуется использовать ультрафиолетовый (UV) детектор. Однако при использовании UV-детектора следует установить длину волны на 292 нм.

---

1) Набор токоферолов фирмы Merck 613424 имеется в Calbiochem ([www.calbiochem.com](http://www.calbiochem.com)). Он содержит по одной 50 мг-ампуле DL- $\alpha$ -токоферола, D- $\beta$ -токоферола, D- $\gamma$ -токоферола и D- $\delta$ -токоферола чистотой 95 % по HPLC (для каждого компонента). Набор токотриенолов фирмы Merck 613432 имеется также в Calbiochem. Он содержит по одной 50 мг-ампуле  $\alpha$ -токотриенола,  $\beta$ - токотриенола,  $\gamma$ - токотриенола и  $\delta$ - токотриенола чистотой 95 % по HPLC (75 % для  $\gamma$ - токотриенола).

Эта информация дается для удобства пользователей данного международного стандарта и не означает одобрения этих продуктов со стороны ISO.

## 6.2 Аналитическая колонка для HPLC, допускается два типа:

- 250 мм × 4 мм, заполненная микрочастицами **диола** со средним размером частиц приблизительно 5 мкм, или
- 250 мм × 4,6 мм, заполненная микрочастицами **диоксида кремния** со средним размером частиц приблизительно 5 мкм.

ПРИМЕЧАНИЕ 1 Подходящим имеющимся в продаже наполнителем для колонки с диол-диоксидом кремния является 5 мкм LiChrospher 100 Diol; подходящими имеющимися в продаже наполнителями для колонки с диоксидом кремния являются 5 мкм LiChrosob SI 60 и Kromasil 100<sup>2)</sup>. Если ожидается присутствие β-токоτριенола в пробе, то предпочтительнее колонка с диол-диоксидом кремния, так как γ-токоферол и β-токоτριенол совместно элюируются при использовании колонки с диоксидом кремния.

ПРИМЕЧАНИЕ 2 Длина и диаметр колонки могут изменяться в зависимости от используемой методики HPLC.

**6.3 UV-спектрометр**, приспособленный для абсолютного измерения оптической плотности при точно заданной длине волны в кювете с длиной оптического пути 10 мм.

**6.4 Роторный испаритель.**

**6.5 Градуированный цилиндр**, вместимостью 1 000 мл.

**6.6 Мерные пипетки**, вместимостью 5 мл, 10 мл и 20 мл.

**6.7 Мерные колбы**, вместимостью 50 мл и 25 мл.

**6.8 Ультразвуковая ванна.**

## 7 Отбор проб

В лабораторию следует поставлять представительную пробу. Она не должна подвергаться порче или изменению во время транспортировки или хранения.

Отбор проб не включен в метод, установленный в этом международном стандарте. Рекомендуемый метод отбора проб приводится в ISO 5555.

## 8 Подготовка пробы для испытания

В случае жидких лабораторных проб готовят пробу для испытания путем гомогенизации, как описано в ISO 661, за исключением того, что следует избегать фильтрования.

В случае твердых проб переносят представительную часть (т.е. не менее 10 % по массе лабораторной пробы) в стеклянный химический стакан и тщательно гомогенизируют, растапливая ее при осторожном перемешивании на водяной бане при температуре не выше 40 °C.

Подготовку проб для испытания следует проводить, насколько это возможно, в приглушенном свете и ни в коем случае не при прямом солнечном свете.

---

2) Эти типы колонок – примеры соответствующих изделий, которые имеются в продаже.

Эта информация дается для удобства пользователей данного международного стандарта и не означает одобрения этих продуктов со стороны ISO.

## 9 Методика

**ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ** — Обычно окисление токолов в процессе анализа приводит к заниженным результатам. Скорость окисления увеличивается в присутствии щелочей или под действием тепла или света, поэтому следует применять меры, предохраняющие от таких воздействий.

### 9.1 Приготовление калибровочных растворов

#### 9.1.1 Основные калибровочные растворы

Готовят основной раствор каждого токола, взвешивая  $10 \text{ мг} \pm 1 \text{ мг}$  стандарта (5.1) в мерную колбу вместимостью 50 мл и разбавляя до метки *n*-гептаном (5.3).

Отбирают пипеткой 5 мл этого раствора в круглодонную колбу из янтарного стекла и удаляют весь *n*-гептан на ротормном испарителе (6.4) под вакуумом при температуре не выше 40 °С. Как только весь растворитель будет удален, восстанавливают атмосферное давление с помощью азота и отсоединяют колбу от испарителя. Вносят пипеткой в колбу 10 мл метанола (5.5) и перемешивают с образованием завихрения до растворения остатка. Измеряют максимальную оптическую плотность этого раствора в диапазоне длин волн от 270 нм до 310 нм (см. соответствующую длину волны в Таблице 1), используя UV-спектрометр (6.3) в кювете с длиной оптического пути 10 мм. Измеренная оптическая плотность должна находиться в диапазоне от 0,2 до 0,8. Рассчитывают концентрацию (в микрограммах на миллилитр) путем деления значения оптической плотности на соответствующий коэффициент деления, приведенный в Таблице 1.

Таблица 1 — Коэффициенты деления

Длина волны нм	Токоферол	Коэффициент деления
292	$\alpha$ -токоферол	0,007 6
296	$\beta$ - токоферол	0,008 9
298	$\gamma$ - токоферол	0,009 1
298	$\delta$ - токоферол	0,008 7

ПРИМЕЧАНИЕ Приведенные коэффициенты получены из значений  $E$  (1%/1 см) для токоферолов. Например, значение  $E$  (1%/1 см)  $\alpha$ - токоферола равняется 76 при 292 нм (в метаноле); следовательно раствор  $\alpha$ -токоферола концентрацией 1 мкг/мл будет иметь оптическую плотность 0,007 6 при 292 нм.

#### 9.1.2 Стандартный раствор

Подходящий стандартный раствор следует готовить в соответствии с чувствительностью используемого флуоресцентного детектора.

В качестве примера приводится следующая процедура приготовления рабочего раствора: смешивают соответствующие объемы, например, по 1 мл, основных калибровочных растворов (9.1.1) для получения смешанного стандартного раствора токолов и разбавляют *n*-гептаном для получения раствора, содержащего от 1 мкг до 5 мкг каждого стандарта на миллилитр.

Каждый рабочий день должен готовиться свежий стандартный раствор.

Защищают все растворы от света и хранят при температуре от 0 °С до 4 °С.

Основные стандартные растворы могут удовлетворительно сохраняться в посуде из янтарного стекла в течение 1 недели при охлаждении. Колбы можно заворачивать в алюминиевую фольгу.

ПРИМЕЧАНИЕ При использовании UV-детектора может потребоваться раствор большей концентрации.



## 9.2 Оптимизация рабочих параметров

**9.2.1** Если используется новая колонка (6.2) или колонка с неизвестной предысторией, или есть какая-либо другая причина для ее кондиционирования, промывают и выдерживают колонку в течение приблизительно 10 мин в метаноле, затем дихлорметане и затем в *n*-гептане при скорости потока приблизительно 1 мл/мин.

Прокачивают через колонку подвижную фазу для HPLC (5.4) со скоростью потока 1 мл/мин в течение, по меньшей мере, 30 мин.

**ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ — Метанол и дихлорметан опасны для человека и окружающей среды. Следует обращаться с ними с осторожностью.**

**9.2.2** Вводят в колонку 10 мкл или 20 мкл (в зависимости от чувствительности детектора) стандартного раствора (9.1.2) и, при необходимости, регулируют содержание тетрагидрофурана в подвижной фазе и скорость потока до достижения следующих условий:

- a) время удерживания  $\alpha$ -токоферола от 8 мин до 12 мин;
- b) фактор разрешения RF для разделения  $\beta$ - и  $\gamma$ -токоферолов не менее 1,0; т.е. разделение почти на уровне базовой линии, где RF рассчитывают по следующей формуле:

$$RF = \frac{d_r(I) - d_r(II)}{0,5 \cdot [b(I) + b(II)]}$$

где

$d_r(I)$  расстояние удерживания  $\gamma$ -токоферола;

$d_r(II)$  расстояние удерживания  $\beta$ -токоферола;

$b(I)$  ширина пика  $\gamma$ -токоферола в основании;

$b(II)$  ширина пика  $\beta$ -токоферола в основании.

**9.2.3** Выбирают оптимальные установочные параметры для системы обнаружения и интеграции. Вводят 10 мкл или 20 мкл стандартного раствора (9.1.2). Повторяют ввод и проверяют, что получились воспроизводимые хроматограммы.

## 9.3 Приготовление испытуемого раствора

В зависимости от концентрации токолов (9.1.2) взвешивают с точностью до 1 мг  $0,25 \text{ г} \pm 0,1 \text{ г}$  пробы для испытания (Раздел 8) в мерной колбе с одной меткой вместимостью 25 мл. Добавляют некоторое количество *n*-гептана (5.3), перемешивая содержимое с образованием завихрения до растворения пробы для анализа, и разбавляют до метки тем же растворителем. Если раствор не прозрачный, фильтруют его через HPLC нейлоновый фильтр 0,45 мкм.

Важно, чтобы испытуемые растворы были защищены от света до проведения анализа, а сам анализ проводился в день их приготовления.

**ПРИМЕЧАНИЕ** Может возникнуть необходимость приготовить более концентрированный раствор или разбавить раствор до проведения хроматографии.

## 9.4 Определение

**9.4.1** Вводят в колонку 10 мкл или 20 мкл (в зависимости от чувствительности детектора) стандартного раствора (9.1.2) и регистрируют площади пиков.

9.4.2 Вводят в колонку 10 мкл или 20 мкл (в зависимости от чувствительности детектора) испытуемого раствора (9.3) и идентифицируют присутствующие токолы путем сравнения с хроматограммами калибровочных растворов. Регистрируют площади пиков. Повторяют ввод испытуемого раствора и измерение. За результат одного определения принимают среднее значение двух измерений.

Вводят в колонку еще раз 10 мкл или 20 мкл (в зависимости от чувствительности детектора) стандартного раствора (9.1.2) и регистрируют площади пиков.

Установлено, что значения относительного времени удерживания, представленные в Таблице 2, являются типичными.

**Таблица 2 — Пример значений относительного времени удерживания токоферолов и токотриенолов**

Колонка с диоксидом кремния (α-токоферол в качестве эталонного вещества)		Колонка с диолом (α-токоферол в качестве эталонного вещества)	
α-токоферол = 1,00	α-токотриенол = 1,19	α- токоферол = 1,00	α- токотриенол = 1,24
β- токоферол = 1,34	β- токотриенол = 1,63	β- токоферол = 1,59	β- токотриенол = 2,03
γ- токоферол = 1,63	γ- токотриенол = 2,00	γ- токоферол = 1,74	γ- токотриенол = 2,22
δ- токоферол = 2,24	δ- токотриенол = 2,79	δ- токоферол = 2,46	δ- токотриенол = 3,19

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

## 10 Выражение результатов

Содержание α-токоферола,  $w$ , в пробе, выраженное в миллиграммах на килограмм (мг/кг), рассчитывают по формуле:

$$w = \frac{\rho \times \bar{A}_t \times V}{\bar{A}_s \times m}$$

ISO 9936:2006  
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/df21bd77-11b6-4d99-bf94-45242f72dc97/iso-9936-2006>

где

- $\rho$  концентрация α-токоферола в стандартном растворе (9.1.2), в микрограммах на миллилитр;
- $\bar{A}_s$  среднее значение площади пика, полученное для стандарта α-токоферола;
- $\bar{A}_t$  среднее значение площади пика, полученное для α-токоферола в пробе для испытания;
- $m$  масса пробы для испытания (9.3), в граммах;
- $V$  объем приготовленного испытуемого раствора (= 25 мл).

Рассчитывают содержание оставшихся токолов в пробе для испытания таким же способом, используя данные, полученные при анализе соответствующих стандартов.

При наличии в качестве стандарта только одного α-токоферола, расчет содержания остальных токоферолов ведут по этому стандарту, но четко указывают этот факт в протоколе испытания. При использовании UV-детектора расчет содержания остальных токоферолов также ведут по стандарту α-токоферола, но нормализуют площади пиков по α-токоферолу, используя коэффициенты деления, приведенные в 9.1.1.

**ПРИМЕЧАНИЕ** Интенсивность флуоресценции токотриенолов такая же, как и соответствующих токоферолов, а значения оптической плотности в UV-диапазоне близки между собой.

Содержание выражают в миллиграммах на килограмм в виде целого числа.

## 11 Прецизионность

### 11.1 Межлабораторное испытание

Подробности межлабораторного испытания по определению прецизионности метода суммируются в Приложении С. Значения, полученные в результате этого межлабораторного испытания, не могут быть применены к диапазонам концентрации и матрицам, отличным от указанных здесь.

### 11.2 Повторяемость

Абсолютное расхождение между результатами двух независимых единичных испытаний, полученными при использовании одного и того же метода на идентичном испытуемом материале в одной лаборатории одним оператором на одном и том же оборудовании в пределах короткого промежутка времени, будет не более чем в 5 % случаев превышать значение  $r$ , приведенное в Таблице 3.

### 11.3 Воспроизводимость

Абсолютное расхождение между результатами двух единичных испытаний, полученными при использовании одного и того же метода на идентичном испытуемом материале в разных лабораториях разными операторами на различном оборудовании, будет не более чем в 5 % случаев превышать значение  $R$ , приведенное в Таблице 3.

Таблица 3 — Предел повторяемости ( $r$ ) и предел воспроизводимости ( $R$ )

Содержание токолов мг/кг	Диапазон концентрации мг/кг	$r$ мг/кг	$R$ мг/кг
$T_1$ = среднее значение содержания отдельного токоферола	0 - 2 220	0,082 5 $T_1$	0,209 4 $T_1$
$T_2$ = среднее значение содержания отдельного токотриенола	10 - 210	0,090 0 $T_2$	0,255 2 $T_2$
$T_3$ = среднее значение общего содержания (токоферолы + токотриенолы)	200 - 3 250	0,071 8 $T_3$	0,255 7 $T_3$

## 12 Протокол испытания

Протокол испытания должен включать:

- всю информацию, необходимую для полной идентификации пробы;
- используемый метод отбора проб, если известен;
- используемый метод испытания вместе со ссылкой на данный международный стандарт;
- все подробности, не указанные в настоящем международном стандарте, или рассматриваемые как необязательные, вместе с подробностями всех побочных обстоятельств, которые могут повлиять на результат(ы) испытания;
- полученный(е) результат(ы);
- в случае проверки повторяемости, конечный полученный результат.