
**Жиры и масла растительные.
Определение содержания
фосфолипидов в лецитинах методом
жидкостной хроматографии высокого
разрешения (HPLC) с использованием
детектора рассеянного света**

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.itech.ai)

*Vegetable fats and oils — Determination of phospholipids content in
lecithins by HPLC using a light-scattering detector*

ISO 11701:2009

<https://standards.itech.ai/catalog/standards/sist/3e1ac1f1-eef9-4807-9144-5493346466de/iso-11701-2009>

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



Ссылочный номер
ISO 11701:2009(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 вывести на экран, но его нельзя изменить, пока не будет получена лицензия на загрузку интегрированных шрифтов в компьютер, 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, использованным 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 11701:2009

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3e1ac1f1-eef9-4807-9144-5493346466de/iso-11701-2009>



ДОКУМЕНТ ЗАЩИЩЕН АВТОРСКИМ ПРАВОМ

© ISO 2009

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 соответствующему адресу, указанному ниже, или комитета-члена ISO в стране заявителя.

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
Web 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	3
10 Расчет и выражение результатов	5
11 Прецизионность метода	5
12 Протокол испытания	6
Приложение А (информативное) HPLC хроматограмма	7
Приложение В (информативное) Результаты межлабораторного испытания	8
Библиография	11

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3e1ac1f1-eef9-4807-9144-5493346466de/iso-11701-2009>

Предисловие

Международная организация по стандартизации (ISO) 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 11701 разработан Техническим комитетом ISO/TC 34, *Пищевые продукты*, Подкомитетом SC 11, *Жиры и масла животные и растительные*.

[ISO 11701:2009](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3e1ac1f1-eef9-4807-9144-5493346466de/iso-11701-2009)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3e1ac1f1-eef9-4807-9144-5493346466de/iso-11701-2009>

Жиры и масла растительные. Определение содержания фосфолипидов в лецитинах методом жидкостной хроматографии высокого разрешения (HPLC) с использованием детектора рассеянного света

1 Область применения

Настоящий международный стандарт устанавливает метод количественного определения содержания фосфолипидов методом жидкостной хроматографии высокого разрешения (HPLC) с использованием диоловой колонки и детектора рассеянного света.

Данный метод применим к неочищенным маслосодержащим лецитинам, не содержащим масла лецитинам и лецитиновым фракциям из растительных жиров и масел.

Метод не применим к животным и жвачным лецитинам, а также к ферментативно гидролизованным лецитинам, поскольку разделение пиков лизофосфатидилэтаноламина (LPE), лизофосфатидилинозитола (LPI) и лизофосфатидной кислоты (LPA) неудовлетворительно.

(standards.iteh.ai)

2 Нормативные ссылки

ISO 11701:2009

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. Приготовление пробы для испытания*

3 Термины и определения

Применительно к этому документу используются следующие термины и определения.

3.1

содержание отдельного фосфолипида content of an individual phospholipid

массовая доля *N*-ацилфосфатидилэтаноламина (*N*-acyl-PE) или фосфатидилхолина (PC) или фосфатидилэтаноламина (PE) или фосфатидилинозитола (PI) или фосфатидной кислоты (PA) или лизофосфатидилхолина (LPC), определенная в соответствии с методом, установленным в данном международном стандарте

ПРИМЕЧАНИЕ Это содержание выражают в граммах на 100 г, что численно равно массовой доле в процентах.

4 Принцип

Отдельные фосфолипиды разделяют с помощью HPLC, используя диоловую колонку и детектор рассеянного света. Для количественного определения используют сертифицированную эталонную смесь.

5 Реактивы

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ — Необходимо учитывать местные регламенты, в которых указываются правила обращения с опасными веществами. Необходимо соблюдать меры по охране здоровья и технике безопасности.

При анализе, если не оговорено иначе, используют только реактивы признанного аналитического качества.

5.1 Вода, качества HPLC.

5.2 *n*-Гексан, качества HPLC.

5.3 2-Пропанол, качества HPLC.

5.4 Уксусная кислота, w_{\min} , 99,8 % массовая доля.

5.5 Триэтиламин.

5.6 Смесь растворителей: Смесь 80 мл *n*-гексана (5.2) и 20 мл 2-пропанола (5.3) (объемная доля $\varphi = 80$ мл/100 мл для *n*-гексана и $\varphi = 20$ мл/100 мл для 2-пропанола) используют для растворения стандартов и пробы.

5.7 Эталонное вещество (внешний стандарт) ILPS-LE01¹⁾, эталон смеси соевых фосфолипидов — это сертифицированная эталонная смесь с заданным содержанием *N*-ацил-PE, PA, PE, PC, PI и LPC.

5.8 Подвижная фаза для HPLC.

5.8.1 Элюент А. Смешивают 814,2 мл *n*-гексана (5.2), 170,0 мл 2-пропанола (5.3), 15 мл уксусной кислоты (5.4) и 0,8 мл триэтиламина (5.5) (объемная доля $\varphi = 81,42$ мл/100 мл для *n*-гексана, $\varphi = 17,00$ мл/100 мл для 2-пропанола, $\varphi = 1,50$ мл/100 мл для уксусной кислоты и $\varphi = 0,08$ мл/100 мл для триэтиламина).

Для получения воспроизводимого состава элюента рекомендуется взвешивать растворители с учетом их плотности. Для объема партии 2,5 л: 1 341,4 г *n*-гексана, 331,5 г 2-пропанола, 39,4 г уксусной кислоты и 1,45 г (2,0 мл) триэтиламина.

5.8.2 Элюент В. Смешивают 844,2 мл 2-пропанола (5.3), 140 мл воды (5.1), 15,0 мл уксусной кислоты (5.4) и 0,8 мл триэтиламина (5.5) (объемная доля $\varphi = 84,42$ мл/100мл для 2-пропанола, $\varphi = 14,00$ мл/100 мл для воды, $\varphi = 1,50$ мл/100 мл для уксусной кислоты и $\varphi = 0,08$ мл/100 мл для триэтиламина).

Для получения воспроизводимого состава элюента рекомендуется взвешивать растворители с учетом их плотности. Для объема партии of 2,5 л: 1 646,2 г 2-пропанола, 350,0 г воды, 39,4 г уксусной кислоты и 1,45 г (2,0 мл) триэтиламина.

6 Аппаратура

6.1 Аналитические весы, с возможностью считывания до 0,000 1 г.

6.2 Основное оборудование для HPLC с градиентной системой и детектором рассеянного света.

6.3 Термостат колонки для HPLC, регулируемый до 55 °С.

1) ILPS-LE01 — торговая марка продукта, поставляемого Международным обществом по лецитинам и фосфолипидам. Эта информация дается для удобства пользователей данного международного стандарта и не означает поддержки этого продукта со стороны ISO. Могут использоваться эквивалентные продукты при условии, что они дают сравнимые результаты.

6.4 Аппарат для дегазации или аналогичное оборудование для дегазации элюента.

6.5 Колонка для HPLC (250 мм × 4,0 мм) с предколонкой (20 мм × 4,0 мм), заполненная сферическими микрочастицами (5 мкм) диоксида кремния с диоловой связью, например, LiChrospher 100 diol (5 мкм)²⁾. Срок службы и история колонки, заполнение колонки наполнителем и температура могут оказывать влияние на разделение.

6.6 Мерные колбы с одной меткой, вместимостью 50 мл, 100 мл и 2 500 мл, ISO 1042^[1] класс А.

6.7 Микрошприц, вместимостью 25 мкл, отградуированный в микролитрах.

6.8 Фильтр для фильтрования растворов внешнего стандарта и пробы для испытания, например, Millex HV³⁾.

6.9 Система интеграции.

7 Отбор проб

В лабораторию следует поставлять представительную пробу. Её не следует подвергать 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^[2].

8 Подготовка пробы для испытания

См. ISO 661.

Для размягчения пробы нагревают её максимум до 60 °С (необходимо избегать перегрева) и затем гомогенизируют путем энергичного перемешивания.

9 Методика

9.1 Приготовление стандартных эталонных растворов и проб для анализа

9.1.1 Стандартные эталонные растворы R₁, R₂, и R₃

Готовят три различных стандартных эталонных раствора. Для этого точно взвешивают в три разные мерные колбы с одной меткой вместимостью 100 мл примерно 550 мг, 850 мг и 1 150 мг сертифицированной эталонной смеси (5.7), растворяют в смеси растворителей (5.6) и доводят до метки тем же самым растворителем.

Фильтруют (6.8) стандартные эталонные растворы перед вводом в HPLC.

2) LiChrospher 100 diol торговая марка продукта, поставляемого Merck. Эта информация дается для удобства пользователей данного международного стандарта и не означает поддержки этого продукта со стороны ISO. Могут использоваться эквивалентные продукты при условии, что они дают сравнимые результаты.

3) Пример подходящего продукта, имеющегося в продаже. Эта информация дается для удобства пользователей данного международного стандарта и не означает поддержки этого продукта со стороны ISO.

9.1.2 Растворы пробы для испытания и пробы для анализа

Взвешивают с точностью до 0,001 г 425 мг пробы в случае неочищенного лецитина или 255 мг пробы в случае обезжиренного или фракционированного лецитина в отдельные мерные колбы с одной меткой вместимостью 50 мл, растворяют в смеси растворителей (5.6) и доводят до метки тем же самым растворителем.

Фильтруют (6.8) растворы пробы для испытания перед отбором из них проб для анализа S_{1a} и S_{1b} .

9.2 Анализ HPLC

Регулируют рабочий режим оборудования, используя пробы для испытания и эталонные пробы, чтобы получить разделение, соответствующее хроматограмме на Рисунке А.1. Оптимизируют профиль разделения в зависимости от типа колонки и градиента. Рекомендуются следующие условия (см. Таблицу 1):

- Температура термостата: 55 °C
- Чувствительность детектора: 5 - 6
- Температура детектора: 50 °C
- Давление детектора: 0,20 МПа (2,0 бар)
- Скорость потока: 1,0 мл/мин
- Скорость потока для промывки колонки: 2,0 мл/мин

Таблица 1 — Программирование градиента для HPLC

Время мин	Элюент А %	Элюент В %	Скорость потока мл/мин
0,0	95	5	1,0
5,0	80	20	1,0
8,5	60	40	1,0
15,0	0	100	1,0
17,5	0	100	1,0
17,6	95	5	1,0
21,0	95	5	1,0
22,0	95	5	2,0
27,0	95	5	2,0
29,0	95	5	1,0

9.3 Калибровка

Используют объемы ввода по 20 мкл для расчета кривых линейной регрессии и определения пробы для испытания. Для получения калибровочного графика строят график зависимости площади пиков от концентрации.

ПРИМЕЧАНИЕ Детекторы рассеянного света не обладают линейностью на всем протяжении диапазона (S-образные калибровочные кривые). Концентрации стандартных эталонных растворов должны выбираться в линейном диапазоне.

Для количественного определения фосфолипидов рекомендуется следующая последовательность анализа: R₁, R₂, R₃ (по одному вводу для каждого раствора), S_{1a}, S_{1b} (пробы для анализа, отобранные из пробы для испытания, по два ввода для каждой пробы для анализа), R₁, R₂, R₃ (по одному вводу для каждого раствора).

9.4 Определение

Вводят 20 мкл раствора пробы для испытания в оборудование для HPLC и регистрируют площади пиков. Идентифицируют пики, сравнивая время удерживания вещества на хроматограммах стандартных эталонных растворов и проб для анализа (см. Рисунок А.1).

10 Расчет и выражение результатов

Используют калибровочный график для расчета содержания отдельных фосфолипидов (см. 9.3). Необходимо иметь три калибровочные точки с меньшей и три калибровочные точки с большей концентрацией по сравнению с пробой. Растворы R₁, R₂, and R₃ (9.1.1) разбавляют в зависимости от пробы для получения шести калибровочных точек.

Массовая доля, w_i , в граммах на 100 г пробы для испытания, отдельного фосфолипида определяется по формуле:

$$w_i = \frac{m_{pi}}{m} \times 100$$

где

m_{pi} масса, в миллиграммах, отдельного фосфолипида, определенная по калибровочному графику;

m масса, в миллиграммах, пробы для испытания (9.1.2).

Выражают результат с точностью до первого десятичного знака.

11 Прецизионность метода

11.1 Межлабораторное испытание

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

11.2 Повторяемость

Предел повторяемости, r , — это значение менее или равное абсолютному расхождению между двумя окончательными значениями, каждое из которых представляет серию результатов испытания, полученных в условиях повторяемости, с вероятностью 95 %.

Условия повторяемости — это условия, при которых результаты испытания получены при использовании одного и того же метода, на идентичном испытуемом материале, в одной лаборатории, одним оператором, на одном и том же оборудовании и реактивах, в пределах короткого промежутка времени.

11.3 Воспроизводимость

Предел воспроизводимости, R , это значение менее или равное абсолютному расхождению между двумя окончательными значениями, каждое из которых представляет серию результатов испытания, полученных в условиях воспроизводимости, с вероятностью 95 %.

Условия воспроизводимости – это условия, при которых результаты испытания получены при использовании одного и того же метода, на идентичном испытуемом материале, в разных лабораториях, разными операторами, на различном оборудовании и реактивах, в пределах короткого промежутка времени.

12 Протокол испытания

Протокол испытания должен содержать, по меньшей мере, следующую информацию:

- a) всю информацию, необходимую для полной идентификации пробы;
- b) используемый метод отбора проб, если известен;
- c) используемый метод испытания вместе со ссылкой на данный международный стандарт;
- d) 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;
- e) полученный(ые) результат(ы) испытания или, в случае проверки повторяемости, конечный полученный результат.

ISO 11701:2009

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3e1ac1f1-eef9-4807-9144-5493346466de/iso-11701-2009>