

МЕЖДУНАРОДНЫЙ СТАНДАРТ

ISO 11702

Первое издание
2009-12-15

Жиры и масла животные и растительные. Ферментативное определение общего содержания стеролов

Animal and vegetable fats and oils — Enzymatic determination of total sterols content

ISO 11702:2009

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a0a1352f-d235-4460-b35f-f7081670d3c3/iso-11702-2009>

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



Ссылочный номер
ISO 11702:2009(R)

© ISO 2009

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 11702:2009

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a0a1352f-d235-4460-b35f-f7081670d3c3/iso-11702-2009>



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

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 11702 разработан Техническим комитетом ISO/TC 34, *Пищевые продукты*, Подкомитетом SC 11, *Жиры и масла животные и растительные*.

[ISO 11702:2009](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a0a1352f-d235-4460-b35f-f7081670d3c3/iso-11702-2009)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a0a1352f-d235-4460-b35f-f7081670d3c3/iso-11702-2009>

Жиры и масла животные и растительные. Ферментативное определение общего содержания стеролов

1 Область применения

Настоящий международный стандарт устанавливает метод количественного определения общего содержания стеролов путем испытания на ферментативное окрашивание. Метод применим к свободным и этерифицированным стеролам в животных и растительных жирах и маслах, жирных пищевых продуктах и связанных с ними продуктах. Определение применимо к количествам пробы, содержащим от 1 г до 2 г жира.

Данный метод не применим к жирам и маслам, окрашенным в темный цвет, например, к нерафинированному пальмовому маслу. Фермент не является специфичным для холестерина, он также окисляет и другие 3-гидроксистеролы. Метод не был испытан на продуктах, обогащенных высоким содержанием стеролов.

ПРИМЕЧАНИЕ Метод технически эквивалентен методу IUPAC 2.404^[8] и стандартному методу DGF F-III 2 (91)^[7].

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).

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a0a1352f-d235-4460-b35f-f7081670d3c3/iso-](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a0a1352f-d235-4460-b35f-f7081670d3c3/iso-661)
ISO 661, Жиры и масла животные и растительные. Приготовление пробы для испытания

ISO 3696, Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы испытания

3 Термины и определения

Применительно к этому документу используются следующие термины и определения.

3.1

total sterols content

общее содержание стеролов

w_{sterols}

массовая доля стеролов, определенная в соответствии с методом, установленным в данном международном стандарте

ПРИМЕЧАНИЕ 1 В случае растительных жиров и масел содержание стеролов выражают в виде β -ситостерина; в случае животных жиров – в виде холестерина.

ПРИМЕЧАНИЕ 2 Общее содержание стеролов выражают в миллиграммах на 100 г жира.

4 Принцип

Пробу для испытания омыляют и стеролы определяют в неомыляемом веществе ферментативным методом. Они окисляются холестеролоксидазой в холестенон. Эквимольное количество полученного в результате пероксида водорода окисляет в присутствии каталазы метанол в формальдегид. В присутствии ионов аммония он образует с ацетилацетоном краситель лутидин желтого цвета

(3,5-диацетил-1,4-дигидролутидин). Последний определяют спектрофотометрически в видимой области спектра на длине волны 405 нм. Концентрация красителя эквивалентна количеству стеролов.

ПРИМЕЧАНИЕ Холестеролоксидаза окисляет холестерин и другие стеролы с гидроксильной группой в 3 β -положении. Поэтому также определяют и фитостеролы, такие как стигмастерин и ситостерин.

5 Реактивы

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

Если не оговорено иначе, используют только реактивы признанного аналитического качества.

- 5.1 **Вода**, соответствующая требованиям ISO 3696, класса 3 или выше.
- 5.2 **Изопропанол**.
- 5.3 **Ацетон**.
- 5.4 **Ацетилацетон**.
- 5.5 **Суспензия холестеролоксидазы**¹⁾ (EC 1.1.3.6) из *Nocardia erythropolis*, 15 ед./мл.
- 5.6 **Суспензия каталазы** (пероксид водорода-оксидоредуктаза)¹⁾ (EC 1.11.1.6) из бычьей печени.
- 5.7 **Соляная кислота**, $c(\text{HCl}) = 8$ моль/л.
- 5.8 **Метанольный раствор гидроксида калия**, $c(\text{KOH}) = 0,5$ моль/л.

Растворяют 2,8 г гидроксида калия в небольшом количестве горячего метанола, охлаждают и разбавляют метанолом до 100 мл.

- 5.9 **Буферный раствор фосфата аммония**, отрегулированный до pH 7.
- 5.10 **Раствор 1**.

Добавляют 19,1 мл ацетона (5.3) и 230 000 ед. каталазы (5.6) к 50 мл буферного раствора (5.9) в мерной колбе вместимостью 100 мл с одной меткой (6.4) и доводят до метки водой (5.1).

- 5.11 **Раствор 2**.

Добавляют 0,26 мл ацетилацетона (5.4) и 1,10 мл ацетона (5.3) к 25 мл воды (5.1) в мерной колбе вместимостью 50 мл с одной меткой (6.4) и доводят до метки водой.

- 5.12 **Раствор 3**.

Перед использованием смешивают 3 объема раствора 1 (5.10) с 2 объемами раствора 2 (5.11).

ПРИМЕЧАНИЕ Раствор 3 может храниться в склянках из желтого стекла в течение 3 месяцев при 4 °C при условии, что он был приготовлен в стерильных условиях.

6 Аппаратура

- 6.1 **Пробирки**, диаметром 18 мм.

1) Пригодный готовый набор для колориметрического определения холестерина в пищевых продуктах и других материалах имеется в распоряжении R-Biopharm. 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.

- 6.2 **Фильтровальная воронка.**
- 6.3 **Гофрированный фильтр**, пригодный для фильтровальной воронки (6.2).
- 6.4 **Мерные колбы с одной меткой**, вместимостью 25 мл, 50 мл и 100 мл, ISO 1042^[2] класс А.
- 6.5 **Пипетки для отбора ферментов**, вместимостью от 0,02 мл, ISO 7550^[6], до 1 мл, ISO 648^[1] класс А.
- 6.6 **Пипетка**, вместимостью 5 мл, ISO 648^[1] класс А.
- 6.7 **Круглодонная колба**, со стандартным шлифом, вместимостью 50 мл.
- 6.8 **Пробирки с притертыми пробками.**
- 6.9 **Спектрофотометр**, отрегулированный на длину волны 405 нм.
- 6.10 **Стеклокюветы**, с оптической длиной пути 1 см, пригодные для спектрофотометра (6.9).
- 6.11 **Водяная баня**, с термостатическим контролем температуры от 37 °С до 40 °С.
- 6.12 **Холодильник**, способный поддерживать температуру 4 °С.
- 6.13 **Стеклодробь.**
- 6.14 **Обратный холодильник**, со стандартным шлифом.

7 Отбор проб

В лабораторию следует поставлять представительную пробу. Ее 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^[3].

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a0a1352f-d235-4460-b35f-f7081670d3c3/iso-11702-2009>

8 Подготовка пробы для испытания

Готовят пробу для испытания в соответствии с ISO 661. Специальная обработка пробы для испытания (фильтрация, плавление и т.д.) должна быть указана в протоколе испытания.

9 Методика

9.1 Омыление

9.1.1 Взвешивают с точностью до 0,001 г от 1 г до 2 г пробы в круглодонную колбу вместимостью 50 мл (6.7). Концентрация стерола в испытуемом растворе должна составлять от 0,02 г/л до 0,4 г/л. Это требование должно учитываться на стадиях взвешивания и разбавления. В случае насыщенных жиров взвешенное количество должно быть уменьшено, так как иначе свободные жирные кислоты, образованные после омыления и подкисления, не будут полностью удалены при фильтровании и будут влиять на результат определения. Убеждаются в том, что в любой момент времени полученный раствор остается прозрачным.

9.1.2 Добавляют 10 мл метанольного раствора гидроксида калия (5.8) и немного стеклянной дроби (6.13). Нагревают смесь и после закипания перегоняют с обратным холодильником в течение 25 мин.

9.1.3 Количественно переносят всё ещё теплый мыльный раствор в мерную колбу с одной меткой вместимостью 25 мл (6.4) и промывают круглодонную колбу несколькими миллилитрами изопропанола (5.2).

9.1.4 Отбирают пипеткой (6.5) 1 мл соляной кислоты (5.7) в мерную колбу с одной меткой вместимостью 25 мл, доводят до метки изопропанолом (5.2) и энергично встряхивают. Убеждаются в том, что в любой момент времени полученный раствор остается прозрачным.

9.1.5 Помещают колбу со смесью (9.1.4) в холодильник (6.12) и выдерживают её при 4 °С в течение 20 мин.

9.1.6 Затем фильтруют, как можно быстрее, (мутный) раствор через гофрированный фильтр (6.3) и сразу же используют фильтрат для ферментативного определения.

9.2 Ферментативное определение содержания стеролов

9.2.1 Отбирают пипеткой (6.6) 5 мл раствора 3 (5.12) в пробирку (6.1) и добавляют 0,4 мл фильтрата (9.1.6). Тщательно перемешивают.

9.2.2 Переносят 2,5 мл этой смеси в пробирку с пробкой (6.8) и добавляют с помощью пипетки (6.5) 0,02 мл суспензии холестеролоксидазы (5.5). Тщательно перемешивают.

9.2.3 Переносят оставшийся раствор из 9.2.1 в другую пробирку с пробкой (6.8) для использования в качестве раствора контрольного опыта.

9.2.4 Закрывают пробирки, содержащие пробу и раствор контрольного опыта соответственно, пробками и инкубируют их на водяной бане в течение 60 мин при температуре от 37 °С до 40 °С.

9.2.5 После охлаждения до комнатной температуры сразу же последовательно измеряют в спектрофотометре при длине волны 405 нм, в одной и той же кювете экстинкции раствора пробы и раствора контрольного опыта относительно воды (5.1).

10 Результат определения

Общую массовую концентрацию стеролов, ρ , в граммах на литр, в фильтрате пробы, выраженную в случае животных жиров в виде холестерина и в случае растительных жиров и масел в виде β -ситостерина, рассчитывают по Формуле (1):

$$\rho = \frac{V_1 M}{\varepsilon l V_2 \times 1000} \Delta A \quad (1)$$

где <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a0a1352f-d235-4460-b35f-f7081670d3c3/iso-11702-2009>

V_1 объем, в миллилитрах, разбавленного фильтрата (5,4 мл, см. 9.2.1);

M масса молекулы холестерина ($M_{\text{chol}} = 386,64$ г/моль) или β -ситостерина ($M_{\beta\text{-sito}} = 414,69$ г/моль);

ε коэффициент поглощения [экстинкции] лутидина при 405 нм ($7,4$ л ммоль⁻¹ см⁻¹);

l оптическая длина пути, в сантиметрах, стеклянной кюветы (1 см);

V_2 объем, в миллилитрах, неразбавленного фильтрата (0,4 мл, см. 9.2.1);

ΔA разность между оптической плотностью раствора контрольного опыта и оптической плотностью раствора пробы для анализа, с учетом коэффициента разбавления 1,008 (2,52/2,50):

$$\Delta A = 1,008 (A_1 - A_0)$$

где

A_1 оптическая плотность раствора пробы для анализа при 405 нм,

A_0 оптическая плотность раствора контрольного опыта при 405 нм.

Общую массовую концентрацию стеролов, ρ , в граммах на литр, в фильтрате пробы затем рассчитывают, используя либо Формулу (2) в случае животных жиров и масел:

$$\rho_{\text{chol}} = \frac{5,400 \times 386,64 \times 1,008}{7,4 \times 1,00 \times 0,400 \times 1000} \Delta A = 0,711 \Delta A \quad (2)$$

либо Формулу (3) в случае растительных жиров и масел:

$$\rho_{\beta\text{-sito}} = \frac{5,400 \times 414,69 \times 1,008}{7,4 \times 1,00 \times 0,400 \times 1000} \Delta A = 0,763 \Delta A \quad (3)$$

Учитывая разбавление (25 мл в 9.1.4), общее содержание стеролов, w_{sterols} , в пробе, в миллиграммах на 100 г, затем рассчитывают, используя Формулу (4):

$$w_{\text{sterols}} = \frac{25 \times 100 \times 1000 \rho}{1000 m} \quad (4)$$

где m — масса, в граммах, пробы для анализа (9.1.1).

Общую массовую долю стеролов (либо в пересчете на холестерин, либо в пересчете на β -ситостерин) приводят в виде целого числа.

11 Прецизионность метода

11.1 Межлабораторное испытание

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

11.2 Предел повторяемости

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 Предел воспроизводимости

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.

Приложение А (информативное)

Результаты межлабораторного испытания

Международное совместное испытание в 16 лабораториях было проведено на трех пробах.

Испытание было организовано комитетом-членом Германии [(DIN) совместно с Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft (DGF)] и полученные результаты были подвергнуты статистическому анализу в соответствии с ISO 5725-1^[4] и ISO 5725-2^[5], в результате чего были получены параметры прецизионности, приведенные в Таблице А.1.

Таблица А.1 — Сводные статистические результаты

Параметр	Проба			
	Оливковое масло	Рафинированное кукурузное масло	Рафинированное соевое масло	
Количество участвующих лабораторий, N	16	16	16	16
Количество лабораторий, оставшихся после исключения выбросов, n	16	15	15	15
Количество результатов отдельных испытаний во всех лабораториях для каждой пробы, z	32	30	30	30
Среднее значение, m, мг/100 г	138,7	693,4	242,7	242,1
Среднее квадратическое отклонение повторяемости, s_r , мг/100 г	4,6	12,0	4,7	8,2
Коэффициент вариации повторяемости, $C_{V,r}$, %	3,3	1,7	1,9	3,4
Предел повторяемости, r (= $s_r \times 2,8$), мг/100 г	12,9	33,7	13,3	23,1
Среднее квадратическое отклонение воспроизводимости, s_R , мг/100 г	21,0	105,9	25,9	43,0
Коэффициент вариации воспроизводимости, $C_{V,R}$, %	15,1	15,3	10,7	17,8
Предел воспроизводимости, R (= $s_R \times 2,8$), мг/100 г	59,5	299,7	73,2	121,7