

---

---

**Определение содержания и состава  
стеринов. Метод газовой  
хроматографии.**

Часть 1.

**Животные и растительные жиры и  
масла**

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

*Determination of individual and total sterols contents — Gas  
chromatographic method —*

*Part 1: Animal and vegetable fats and oils*

ISO 12228-1:2014

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/80e55fc8-9130-41d8-9958-0f079a8974b9/iso-12228-1-2014>

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



Ссылочный номер  
ISO 12228-1:2014(R)

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

ISO 12228-1:2014

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/80e55fc8-9130-41d8-9958-0f079a8974b9/iso-12228-1-2014>



**ДОКУМЕНТ ЗАЩИЩЕН АВТОРСКИМ ПРАВОМ**

© ISO 2014

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](mailto:copyright@iso.org)  
Web [www.iso.org](http://www.iso.org)

Опубликовано в Швейцарии

## Содержание

Страница

Предисловие.....	iv
<b>1 Область применения.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Нормативные ссылки.....</b>	<b>1</b>
<b>3 Термины и определения.....</b>	<b>1</b>
<b>4 Принцип.....</b>	<b>1</b>
<b>5 Реактивы.....</b>	<b>2</b>
<b>6 Аппаратура.....</b>	<b>3</b>
<b>7 Проба.....</b>	<b>3</b>
7.1 Отбор проб.....	3
7.2 Приготовление пробы для испытания.....	4
<b>8 Методика.....</b>	<b>4</b>
8.1 Приготовление колонки с оксидом алюминия.....	4
8.2 Проба для анализа.....	4
8.3 Экстракция неомыляемого вещества.....	4
8.4 Тонкослойная хроматография.....	4
8.5 Разделение стеринов.....	5
8.6 Приготовление триметилсилиловых эфиров стеринов.....	5
8.7 Газовая хроматография.....	5
<b>9 Выражение результатов.....</b>	<b>5</b>
9.1 Идентификация стеринов.....	5
9.2 Состав стеринов.....	6
9.3 Определение общего содержания стеринов.....	6
<b>10 Прецизионность.....</b>	<b>7</b>
10.1 Межлабораторное испытание.....	7
10.2 Предел повторяемости, $r$ .....	7
10.3 Предел воспроизводимости, $R$ .....	7
<b>11 Протокол испытания.....</b>	<b>7</b>
<b>Приложение А (информативное) Рисунки.....</b>	<b>8</b>
<b>Приложение В (информативное) Межлабораторное испытание.....</b>	<b>15</b>
<b>Библиография.....</b>	<b>23</b>

## Предисловие

Международная организация по стандартизации (ISO) всемирная федерация национальных органов по стандартизации (комитеты-члены ISO). Работа по подготовке международных стандартов обычно ведется через технические комитеты ISO. Каждый комитет-член ISO, проявляющий интерес к тематике, по которой учрежден технический комитет, имеет право быть представленным в этом комитете. Международные организации, государственные и негосударственные, имеющие связи с ISO, также принимают участие в работе. ISO тесно сотрудничает с Международной электротехнической комиссией (IEC) по всем вопросам стандартизации в области электротехники.

Процедуры, используемые для разработки данного документа, и процедуры, предусмотренные для его дальнейшего ведения, описаны в Части 1 Директив ISO/IEC. В частности, следует отметить различные критерии утверждения, требуемые для различных типов документов ISO. Проект данного документа был разработан в соответствии с редакционными правилами Части 2 Директив ISO/IEC (см. [www.iso.org/directives](http://www.iso.org/directives)).

Необходимо обратить внимание на возможность того, что ряд элементов данного документа могут быть предметом патентных прав. Международная организация ISO не должна нести ответственность за идентификацию таких прав, частично или полностью. Сведения о патентных правах, идентифицированных при разработке документа, будут указаны во Введении и/или в перечне полученных ISO объявлений о патентном праве (см. [www.iso.org/patents](http://www.iso.org/patents)).

Любое торговое название, использованное в данном документе, является информацией, предоставляемой для удобства пользователей, а не свидетельством в пользу того или иного товара или той или иной компании.

ISO 12228-1:2014

Для пояснения значений конкретных терминов и выражений ISO, относящихся к оценке соответствия, а также информация о соблюдении Международной организацией ISO принципов ВТО по техническим барьерам в торговле (ТБТ), см. следующий унифицированный локатор ресурса (URL): [Foreword — Supplementary information](#).

Технический комитет, несущий ответственность за данный документ, ISO/TC 34, *Пищевые продукты*, Подкомитет SC 11, *Животные и растительные жиры и масла*.

Настоящее первое издание ISO 12228-1 вместе с ISO 12228-2 отменяет и заменяет ISO 12228:1999, которое подверглось техническому пересмотру.

ISO 12228 состоит из следующих частей под общим названием *Определение содержания и состава стеринов. Метод газовой хроматографии*:

- *Часть 1. Животные и растительные жиры и масла*
- *Часть 2. Оливковое масло и жмыховое оливковое масло*

# Определение содержания и состава стеринов. Метод газовой хроматографии.

## Часть 1.

## Животные и растительные жиры и масла

### 1 Область применения

Настоящая часть ISO 12228 устанавливает методику газохроматографического определения содержания и состава стеринов в животных и растительных жирах и маслах. Однако определение содержания и состава стеринов в оливковом масле и жмыховом оливковом масле должно выполняться по методике, указанной в ISO 12228-2.

### 2 Нормативные ссылки

Следующие ссылочные нормативные документы, частично или полностью, являются обязательными при применении данного документа. Для датированных ссылок применяется только цитированное издание документа. Для недатированных ссылок необходимо использовать самое последнее издание нормативного ссылочного документа (включая любые изменения).

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

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

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/80e55fc8-9130-41d8-9958-0f079a8974b9/iso-12228-1-2014>

### 3 Термины и определения

Применительно к настоящему документу используются следующие термины и определения.

#### 3.1

##### **состав стеринов**

##### **composition of sterols**

состав отдельных стеринов в пробе, начиная с холестерина и заканчивая  $\Delta 7$ -авенастерином (см. Таблицу 1) в условиях, установленных в настоящей части ISO 12228

ПРИМЕЧАНИЕ 1 к статье: Состав выражают в процентах от площадей всех пиков, нормализованных к 100 %.

#### 3.2

##### **общее содержание стеринов**

##### **total sterol content**

массовая доля суммы всех отдельных стеринов, определенных в соответствии с методом, установленным в настоящей части ISO 12228, начиная с холестерина и заканчивая  $\Delta 7$ -авенастерином (см. Таблицу 1), деленная на массу пробы для анализа

ПРИМЕЧАНИЕ 1 к статье: Содержание выражают в миллиграммах на килограмм.

### 4 Принцип

Омыляют пробу для анализа при кипячении с обратным холодильником в этанольном растворе гидроксида калия. Выделяют неомыляемое вещество путем твердофазной экстракции на колонке с

оксидом алюминия. Колонку с оксидом алюминия используют для удерживания анионов жирных кислот; стеринны проходят через колонку. Разделяют фракцию стериннов из неомыляемого вещества с помощью тонкослойной хроматографии. Определяют качественный и количественный состав фракции стериннов с помощью газовой хроматографии, используя холестанол или бетулин в качестве внутреннего стандарта.

## 5 Реактивы

**ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ** — Необходимо принимать во внимание инструкции, которые устанавливают правила обращения с опасными веществами. Необходимо соблюдать технические, организационные и персональные меры безопасности.

Используют только реактивы признанной аналитической чистоты, если не оговорено иначе, и воду, соответствующую классу чистоты 3 согласно ISO 3696<sup>[1]</sup>.

**5.1 Гидроксид калия (KOH)**, этанольный раствор, молярная концентрация  $c(\text{KOH})$  приблизительно 0,5 моль/л.

Растворяют 3 г гидроксида калия в 5 мл воды и разбавляют до 100 мл этанолом (5.3). Раствор должен быть бесцветным или иметь желтоватую окраску.

**5.2 Раствор внутреннего стандарта**, холестанол (5 $\alpha$ -холестан-3 $\beta$ -ол) или бетулин, объемная доля 1,0 мг/мл, раствор в этаноле (см. примечание в 5.10).

**ПРИМЕЧАНИЕ** В случае гидрогенизированных масел, которые могут содержать холестанол, рекомендуется использовать бетулин (пик 17 в Таблице 1).

**5.3 Этанол**, минимальная объемная доля  $\varphi = 95 \%$ .

**5.4 Оксид алюминия**, нейтральный, размер частиц от 0,063 мм до 0,200 мм, класс активности I (содержание воды = 0 %).

**5.5 Диэтиловый эфир**, свежеперегнанный, не содержащий пероксидов и остатка.

**ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ** — Диэтиловый эфир легко воспламеняется и может образовывать взрывчатые пероксиды. Пределы взрываемости на воздухе от 1,7 % до 48 % (объемная доля). Необходимо соблюдать меры предосторожности при его использовании. Хранят вдали от источников тепла и солнечного света.

**5.6 Пластинки с силикагелем для тонкослойной хроматографии (TLC)**, имеющиеся в продаже, размеры 20 см × 20 см, толщина слоя 0,25 мм.

**5.7 Проявляющий растворитель**, гексан/диэтиловый эфир.

Объемная доля каждого из растворителей составляет 50 мл/100мл.

**5.8 Стандартный раствор для тонкослойной хроматографии (TLC)**, объемная доля 1,0 мг/мл для холестерина/холестанола в ацетоне или 5,0 мг/мл для бетулина в ацетоне.

**ПРИМЕЧАНИЕ 1** В тонкослойной хроматографии холестерин и холестанол имеют одно и то же значение  $R_f$  (0,35), в то время как значение  $R_f$  для бетулина составляет 0,30 (см. Рисунок A.1).

**ПРИМЕЧАНИЕ 2** В случае гидрогенизированных масел, которые могут содержать холестанол, рекомендуется использовать бетулин (пик 17 в Таблице 1).

**5.9 Реактив для опрыскивания**, метанол.

**5.10 Реактив для силилирования**, приготовленный путем добавления 50 мкл 1-метилимидазола к 1 мл N-метил N-(триметилсилил)гептафторбутирамида (MSHFBA).

**ПРИМЕЧАНИЕ** Готовые к использованию растворы имеются в продаже. Другие реактивы для силилирования, например, бис-триметилсилилтрифторацетамид с 1% триметилхлорсиланом, также пригодны и могут использоваться в том случае, если в качестве внутреннего стандарта применяется холестанол. Однако необходимо соблюдать специальные меры предосторожности для бетулина, гарантирующие, что обе его гидроксильные группы подверглись силилированию. Если этого не происходит, то бетулин может показать два пика на хроматограмме.

## 6 Аппаратура

Обычное лабораторное оборудование и, в частности, следующее.

- 6.1 Круглодонные колбы**, вместимостью 25 мл и 50 мл, с пришлифованным горлом.
- 6.2 Обратный холодильник**, со стеклянным шлифом, пригнанным к колбе (6.1).
- 6.3 Стеклянная колонка**, снабженная политетрафторэтиленовой пробкой (PTFE) и фильтром из пористого стекла, вместимостью 100 мл, длиной 25 см и внутренним диаметром 1,5 см.
- 6.4 Роторный испаритель**, соединенный с вакуумным насосом и водяной баней, отрегулированной на температуру 40 °С.
- 6.5 Проявительная камера**, изготовленная из стекла, с пришлифованной стеклянной крышкой, пригодная для проявления пластинок размерами 20 см × 20 см.
- 6.6 Микрошприц**, для подачи 100 мкл.
- 6.7 Сушильный шкаф**, поддерживающий температуру 105 °С ± 3 °С.
- 6.8 Эксикатор**, содержащий эффективный осушитель, для хранения пластинок.
- 6.9 Реакционные пробирки**, вместимостью от 0,3 мл до (1,0 – 1,5) мл, с навинчивающимися крышками и уплотнительными прокладками, облицованными PTFE, для приготовления производных стерина.
- 6.10 Газовый хроматограф**, для капиллярных колонок, с инжектором с делением потока, пламенно-ионизационным детектором и соответствующим записывающим устройством.
- 6.11 Капиллярная колонка**, изготовленная из плавленного диоксида кремния или стекла, длиной от 25 м до 60 м, внутренним диаметром от 0,2 мм до 0,25 мм, с неподвижной фазой SE-54 (или эквивалентной неполярной фазой с диапазоном температур не менее 280 – 300 °С) и толщиной пленки приблизительно 0,1 мкм.
- ПРИМЕЧАНИЕ** Наилучшую степень разделения пиков получают при толщине пленки 0,1 мкм.
- 6.12 Микрошприц для газовой хроматографии**, для впрыска объемов 1 мкл.
- 6.13 Аналитические весы**, способные взвешивать с точностью до 0,001 г и отображать показание 0,000 1 г.

## 7 Проба

### 7.1 Отбор проб

Отбор проб не является частью метода, рассматриваемого в данной части ISO 12228. Рекомендуемый метод отбора проб приводится в стандарте ISO 5555<sup>[1]</sup>.

Важно, чтобы лаборатория получила пробу, которая является представительной и не была повреждена или изменена при транспортировке или хранении.

## 7.2 Приготовление пробы для испытания

Готовят пробу для испытания в соответствии с ISO 661.

## 8 Методика

### 8.1 Приготовление колонки с оксидом алюминия

Готовят суспензию 10 г оксида алюминия (5.4) в 20 мл этанола (5.3) и переливают ее в стеклянную колонку (6.3). Оставляют для осаждения оксида алюминия и дают растворителю проходить через колонку до тех пор, пока его уровень не достигнет верхнего уровня слоя оксида алюминия.

### 8.2 Проба для анализа

Взвешивают с точностью до 1 мг приблизительно 250 мг пробы для испытания в колбе вместимостью 25 мл (6.1) и продолжают методику в соответствии с 8.3.

Для жиров и масел с низким содержанием стероидов (например, менее 2 000 мг на килограмм) или по другим причинам продолжают методику, используя трехкратное количество пробы для испытания. Соответственно корректируют реактивы и аппаратуру.

### 8.3 Экстракция неомыляемого вещества

Добавляют точно 1,00 мл раствора внутреннего стандарта (5.2) к пробе для анализа (8.2). Добавляют 5 мл этанольного раствора гидроксида калия (5.1) и несколько гранул, препятствующих пульсирующему кипению. Присоединяют обратный холодильник (6.2) к колбе и выдерживают содержимое при умеренном кипении в течение 15 мин. Прекращают кипение. Сразу же разбавляют содержимое колбы, пока оно все еще горячее, 5 мл этанола (5.3) и взбалтывают или встряхивают для гомогенизации.

Отмеряют пипеткой 5 мл этого раствора на подготовленную колонку с оксидом алюминия (8.1). Собирают элюат в круглодонную колбу вместимостью 50 мл (6.1) и дают растворителю проходить через колонку до тех пор, пока его уровень не достигнет верхнего уровня слоя оксида алюминия. Элюируют неомыляемое вещество сначала 5 мл этанола (5.3), а затем 30 мл диэтилового эфира (5.5) со скоростью потока приблизительно 2 мл/мин. Удаляют растворители из колбы с помощью роторного испарителя (6.4).

**ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ** — Использование колонки с оксидом алюминия является определяющим условием для этой методики. Нельзя использовать силикагель или другие колонки либо заменять эту процедуру на экстракцию растворителем.

### 8.4 Тонкослойная хроматография

Растворяют неомыляемое вещество, полученное в 8.3, в небольшом количестве (приблизительно 0,5 мл) диэтилового эфира (5.5). С помощью микрошприца (6.6) наносят этот раствор в виде линии на расстоянии 2 см от нижнего края пластинки TLC (5.6). Оставляют зазор по меньшей мере 3 см от каждого бокового края пластинки. Наносят пятно стандартного раствора TLC (5.8) объемом 5 мкл на расстоянии 1,5 см от края. Заполняют проявительную камеру (6.5) приблизительно 100 мл проявляющего растворителя (5.7). Помещают пластинку в камеру и проявляют ее до тех пор, пока растворитель не достигнет верхнего края. Вынимают пластинку из камеры и оставляют ее в вытяжном шкафу для испарения растворителя.

**ПРИМЕЧАНИЕ** Количественный перенос вещества (8.3) на пластинку TLC необязателен на этой стадии. Для нанесения полос можно использовать автоматическое оборудование. Насыщения камеры не требуется.



## 8.5 Разделение стеринов

Опрыскивают пластинки метанолом (5.9) до тех пор, пока зоны стеринов (и бетулина) не станут белыми на полупрозрачном (темном) фоне. Холестанол является составной частью зоны Δ5-стеринов (см. Рисунок А.1). Отмечают зоны, расположенные на 2 мм выше стандартного пятна и на 4 мм ниже видимых зон (см. Рисунок А.1). Полностью соскабливают эту часть слоя с помощью шпателя и количественно собирают силикагель в небольшом стакане.

**ПРИМЕЧАНИЕ 1** В качестве необходимой меры предосторожности используют более широкую границу нижнего края видимых зон (4 мм против 2 мм для верхнего края), чтобы избежать потери бетулина на этой стадии. Подсолнечное масло может показывать три зоны (Δ5-стерины, Δ7-стерины и бетулин).

**ПРИМЕЧАНИЕ 2** Бетулин, если он используется в качестве внутреннего стандарта, проявляется немного ниже зоны стеринов (см. Рисунок А.1).

Добавляют 0,5 мл этанола к собранному силикагелю. Три раза экстрагируют силикагель в стакане порциями по 5 мл диэтилового эфира (5.5) и фильтруют в колбу (6.1). Отгоняют объединенный эфирный экстракт приблизительно до 1 мл с помощью роторного испарителя (6.4) и переносят оставшийся раствор в реакционную пробирку (6.9). Продувают растворитель в реакционной пробирке потоком азота.

## 8.6 Приготовление триметилсилиловых эфиров стеринов

Добавляют 100 мкл реактива для силилирования (5.10) в реакционную пробирку (6.9), содержащую выделенные стерины. Укупоривают и нагревают пробирку в течение 15 мин в сушильном шкафу, отрегулированном на температуру  $(105 \pm 3) ^\circ\text{C}$ . Оставляют реакционную пробирку для охлаждения до комнатной температуры и впрыскивают раствор непосредственно в газовый хроматограф (6.10).

## 8.7 Газовая хроматография

Оптимизируют температурную программу и скорость потока газа-носителя таким образом, чтобы получить хроматограммы, аналогичные хроматограммам, представленным на Рисунках А.2 – А.7. Контролируют разделение с помощью фракций силилированных стеринов, полученных из известных масел, как показано на Рисунках А.2 – А.7.

**ПРИМЕЧАНИЕ 1** Были проверены и признаны эффективными следующие параметры (см. хроматограммы в Приложении А): колонка для газовой хроматографии (GC): SE-54, длина 50 м, внутренний диаметр 0,25 мм, толщина пленки 0,10 мкм; газ-носитель —  $\text{H}_2$ , скорость потока газа-носителя 36 см/с, отношение деления потока 1:20, температура детектора/инжектора  $320 ^\circ\text{C}$ , температурная программа от  $245 ^\circ\text{C}$  до  $265 ^\circ\text{C}$  при скорости  $5 ^\circ\text{C}/\text{мин}$ , изотермический режим при температуре  $265 ^\circ\text{C}$  в течение 40 мин; объем впрыска 1 мкл. Можно использовать капиллярные колонки эквивалентного качества.

**ПРИМЕЧАНИЕ 2** Контрольный раствор, содержащий холестерин, кампестерин, стигмастерин и ситостерин, можно использовать для проверки времени удерживания. Проводят контрольный опыт для проверки возможного загрязнения (например, холестерином) от растворителей, стеклянных стенок фильтра, отпечатков пальцев и т.д.

## 9 Выражение результатов

### 9.1 Идентификация стеринов

Для идентификации стеринов, присутствующих в пробе для испытания, определяют относительное время удерживания (RRT) путем деления времени удерживания (RT) рассматриваемого стерина на RT холестерина и/или бетулина. В Таблице 1 даются значения RRT различных стеринов по отношению к холестерину ( $\text{RRT}_\text{C}$ ) и бетулину ( $\text{RRT}_\text{B}$ ) при использовании неподвижной фазы SE-54.

**ПРИМЕЧАНИЕ** Значения RRT в Таблице 1 (определенные в условиях, установленных в Примечании 1 к 8.7) указываются только в качестве помощи для идентификации конкретных стеринов и для иллюстрации последовательности элюирования (см. также Рисунок А.1). Фактическое значение RRT может незначительно отклоняться от значения RRT, приведенного в Таблице 1, так как это значение зависит от условий эксперимента (типа и длины колонки для газожидкостной хроматографии, температурной программы и качества неподвижной фазы).

## 9.2 Состав стеринов

Рассчитывают массовую долю,  $w_i$ , отдельного стерина,  $i$ , в г/100 г (процент), по Формуле (1):

$$w_i = \frac{A_i}{\sum A} \cdot 100 \quad (1)$$

где

$A_i$  — площадь пика стерина  $i$ ;

$\sum A$  — сумма площадей пиков всех стеринов (пики 1, 3 – 16 или 1 – 16, если используют бетулин).

**Таблица 1 — Идентификация газохроматографических пиков отдельных стеринов и бетулина согласно значению RRT (неподвижная фаза SE-54)**

№ пика	Общее наименование стеринов	Систематическое наименование стеринов	RRT <sub>C</sub>	RRT <sub>B</sub>
1	Холестерин	Холест-5-ен-3β-ол	1,00	0,44
2	Холестанол	5α-Холестан-3β-ол	1,02	0,45
3	Брассикастерин	[24S]-24-Метилхолеста-5,22-диен-3β-ол	1,09	0,48
4	24-Метилхолестерин	24-Метилхолеста-5,24-диен-3β-ол	1,21	0,53
5	Кампестерин	[24R]-24-Метилхолест-5-ен-3β-ол	1,23	0,54
6	Кампестанол	[24R]-24-Метилхолестан-3β-ол	1,25	0,55
7	Стигмастерин	[24S]-24-Этилхолеста-5,22-диен-3β-ол	1,31	0,57
8	Δ7-Кампестерин	[24R]-24-Метилхолест-7-ен-3β-ол	1,38	0,59
9	Δ5,23-Стигмастадиенол	[24R,S]-24-Этилхолеста -5,23-диен-3β-ол	1,40	0,60
10	Клеростерин	[24S]-24-Этилхолеста-5,25-диен-3β-ол	1,42	0,62
11	Ситостерин	[24R]-24-Этилхолест-5-ен-3β-ол	1,47	0,64
12	Ситостанол	[24R]-24-Этилхолестан-3β-ол	1,50	0,65
13	Δ5-Авенастерин	[24Z]-24(28)-Этилиденхолест-5-ен-3β-ол	1,52	0,66
14	Δ5,24-Стигмастадиенол	[24R,S]-24-Этилхолеста-5,24-диен-3β-ол	1,59	0,69
15	Δ7-Стигмастенол	[24R,S]-24-Этилхолест-7-ен-3β-ол	1,65	0,72
16	Δ7-Авенастерин	[24Z]-24(28)-Этилиденхолест-7-ен-3β-ол	1,70	0,74
X	(Эритродиол)		2,03	0,88
Y	(Уваол)		2,17	0,95
17	Бетулин	Луп-20[29]-ен-3β,28-диол	2,30	1,00

RRT<sub>C</sub>: — относительное время удерживания на основе холестерина = 1,00  
RRT<sub>B</sub>: — относительное время удерживания на основе бетулина = 1,00

ПРИМЕЧАНИЕ Ситостерин может совместно элюироваться с α-спинастерином и Δ7,22,25-стигмастатриенолом. [24R]-24-Этилхолеста-7,25(27)-диен-3β-ол присутствует в стеринах подсолнечного и тыквенного масел и может совместно элюироваться с пиком 14 (Δ5,24-стигмастадиенол).

## 9.3 Определение общего содержания стеринов

Применительно к настоящему методу предполагают, что коэффициенты отклика всех стеринов и бетулина равны.

ПРИМЕЧАНИЕ В результате проведения нескольких испытаний силилированных стеринов и силилированного бетулина в равных количествах был получен одинаковый отклик при использовании пламенно-ионизационного детектора в этих условиях.

Рассчитывают общее содержание стерина,  $w$ , в миллиграммах на килограмм жира, по Формуле (2):

$$w = \frac{\sum(A) \cdot m_{IS} \cdot 1000}{A_{IS} \cdot m} \quad (2)$$

где

$m_{IS}$  масса внутреннего стандарта (холестанола), в миллиграммах;

$\sum(A)$  сумма площадей пиков всех стерина (пики 1, 3 – 16 или 1 – 16, если используют бетулин);

$A_{IS}$  площадь пика внутреннего стандарта;

$m$  масса пробы для анализа, в граммах.

Для расчета общего содержания стерина учитывают все пики стерина, начиная с холестерина и заканчивая  $\Delta^7$ -авенастерином (пик 16), но без учета эритродиола и уваола (пики X и Y).

## 10 Прецизионность

### 10.1 Межлабораторное испытание

Подробности межлабораторного испытания по определению прецизионности метода суммируются в Приложении В. Значения, полученные в ходе этих межлабораторных испытаний, не могут быть применимы к диапазонам концентраций и матрицам, кроме указанных.

### 10.2 Предел повторяемости, $r$

Предел повторяемости ( $r$ ) — это значение менее или равное значению, при котором абсолютное расхождение между результатами двух испытаний, полученными в условиях повторяемости, может ожидаться с вероятностью 95 %.

Условия повторяемости — условия, при которых независимые результаты испытаний получены при использовании одного и того же метода, на идентичном испытуемом материале, в одной лаборатории, одним и тем же оператором, на одном и том же оборудовании, в короткий промежуток времени.

### 10.3 Предел воспроизводимости, $R$

Предел воспроизводимости ( $R$ ) — это значение менее или равное значению, при котором абсолютное расхождение между результатами двух испытаний, полученными в условиях воспроизводимости, может ожидаться с вероятностью 95 %.

Условия воспроизводимости — условия, при которых независимые результаты испытаний получены при использовании одного и того же метода, на идентичном испытуемом материале, в разных лабораториях, разными операторами, на разном оборудовании, в короткий промежуток времени.

## 11 Протокол испытания

Протокол испытания должен устанавливать:

- а) всю информацию, необходимую для полной идентификации пробы;
- б) применяемый метод отбора проб, если известен;
- в) применяемый метод испытания со ссылкой на данную часть ISO 12228 (т.е. ISO 12228-1);
- г) все рабочие подробности, не указанные в данном международном стандарте, или считающиеся необязательными, а также подробности о любых инцидентах, которые могут повлиять на результат(ы);
- д) полученный результат(ы) испытания и, если проверялась повторяемость, окончательный полученный и объявленный результат.