
**Жиры и масла животные и
растительные. Газовая хроматография
метиловых эфиров жирных кислот.**

Часть 2.

**Получение метиловых эфиров жирных
кислот**

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

*Animal and vegetable fats and oils — Gas chromatography of fatty acid
methyl esters —*

Part 2: Preparation of methyl esters of fatty acids

ISO 12966-2:2011

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8400e288-91f7-40a7-98b3-8039b895b645/iso-12966-2-2011>

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



Ссылочный номер
ISO 12966-2:2011(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 установку интегрированных шрифтов в 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 Adobe Systems Incorporated.

Подробности, относящиеся к программным продуктам, использованным для создания настоящего файла PDF, можно найти в рубрике General Info файла; параметры создания PDF 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, просим информировать Центральный секретариат по адресу, приведенному ниже.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 12966-2:2011](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8400e288-91f7-40a7-98b3-8039b895b645/iso-12966-2-2011)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8400e288-91f7-40a7-98b3-8039b895b645/iso-12966-2-2011>



ДОКУМЕНТ ЗАЩИЩЕН АВТОРСКИМ ПРАВОМ

© ISO 2011

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
Web www.iso.org

Опубликовано в Швейцарии

Содержание

Страница

Предисловие.....	iv
Введение	v
1 Область применения	1
2 Нормативные ссылки	1
3 Реакции.....	1
4 Методология.....	2
4.1 Подготовка пробы для анализа.....	2
4.2 Экспресс-метод.....	2
4.3 Общий метод	4
4.4 Переметилирование с помощью катализатора трифторида бора (BF ₃).....	6
4.5 Переметилирование глицеридов с кислым катализатором	9
Приложение А (информативное) Метод тонкослойной хроматографии для определения завершения образования производных.....	11
Библиография.....	15

iteh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 12966-2:2011

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8400e288-91f7-40a7-98b3-8039b895b645/iso-12966-2-2011>

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, заинтересованный в деятельности, для которой был создан технический комитет, имеет право быть представленным в этом комитете. Международные правительственные и неправительственные организации, имеющие связи с ISO, также принимают участие в работах. Что касается стандартизации в области электротехники, то ISO работает в тесном сотрудничестве с Международной электротехнической комиссией (IEC).

Проекты международных стандартов разрабатываются в соответствии с правилами Директив ISO/IEC, Часть 2.

Основной задачей технических комитетов является подготовка международных стандартов. Проекты международных стандартов, принятые техническими комитетами, рассылаются комитетам-членам на голосование. Их опубликование в качестве международных стандартов требует одобрения не менее 75% комитетов-членов, принимающих участие в голосовании.

Следует иметь в виду, что некоторые элементы настоящего международного стандарта могут быть объектом патентных прав. Международная организация по стандартизации не может нести ответственность за идентификацию какого-либо одного или всех патентных прав.

ISO 12966-2 был подготовлен Техническим комитетом ISO/TC 34, *Пищевые продукты*, Подкомитетом SC 11, *Животные и растительные жиры и масла*.

Настоящее первое издание ISO 12966-2 отменяет и заменяет ISO 5509:2000 после технического пересмотра.

ISO 12966 состоит из следующих частей под общим заголовком *Жиры и масла животные и растительные. Газовая хроматография метиловых эфиров жирных кислот*:

- <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8400e288-91f7-40a7-98b3-12966-2-2011>
Часть 2. Получение метиловых эфиров жирных кислот
- Часть 3. Получение метиловых эфиров с помощью гидроксида триметилсульфония (TMSH)

Следующие части находятся в стадии разработки:

- Часть 4. Определение цис-, транс-, насыщенных, моно- и полинасыщенных жирных кислот в растительных жирах и маслах и в жирах и маслах нежвачных животных

Планируется разработка следующей части:

- Часть 1. Руководство по газовой хроматографии

Введение

Общие положения

В состав жиров и масел (т.е. жидкие и твердые липиды) входят преимущественно сложные эфиры жирных кислот и глицерина (триацилглицерины, ТАГ = TAG), с небольшим количеством стероидных эфиров жирных кислот и алифатических спиртов с длинной цепочкой. Ввиду высокой молекулярной массы ТАГ и, следовательно, их низкой летучести, триацилглицерины сложно анализировать напрямую методом газовой хроматографии (ГХ), особенно если требуется подробный анализ ненасыщенных жирных кислот. Сами жирные кислоты плохо разделяются хроматографически (за исключением жирных кислот с короткой цепочкой, например, масляная (бутановая) кислота и валериановая (пентановая) кислоты). Поэтому наилучшим способом является получение перед хроматографическим анализом сложных эфиров жирных кислот, обычно метиловых эфиров (МЭЖК = FAME).

Анализ масел и жиров подробно рассмотрен в ссылке [9].

Получение МЭЖК является критической стадией в анализе жирных кислот. Неколичественное превращение жирных кислот в МЭЖК, изменение структуры жирных кислот (например, изменения в присутствующих позиционных и геометрических изомерах) и образование мешающих соединений, которые не являются МЭЖК, могут повлиять на количественное определение состава жирных кислот.

Межмолекулярная переэтерификация является одним из механизмов, который может быть применен для образования МЭЖК из сложных эфиров жирных кислот в жирах (т.е. триацилглицерина). Методы межмолекулярной переэтерификации с щелочным или кислотным катализатором можно использовать для получения МЭЖК в среде метанола; этот метод можно назвать *переметилированием*. Переметилдирование является обратимым процессом, и метанол требуется в большом избытке, чтобы поддерживать равновесие, смещенное в сторону преимущественного образования МЭЖК. Присутствие воды может помешать завершению реакции, поэтому необходимо свести это присутствие к минимуму. Методики с щелочным катализатором не дают МЭЖК из жирных кислот в свободном состоянии за счет образования мыла.

Этерификация является механизмом, использующим кислотный катализатор, который можно применять для получения МЭЖК из жирных кислот. Жирные кислоты могут естественным образом присутствовать в пробе анализируемого жира. Получение МЭЖК с помощью этого механизма обычно называют *метилованием*. И здесь избыток метанола и отсутствие воды являются неизменным условием количественного образования МЭЖК.

В настоящей части ISO 12966 представлено руководство по приготовлению метиловых эфиров жирных кислот. В руководстве установлен ряд методов по приготовлению метиловых эфиров жирных кислот. Среди них:

- a) “быстрый” метод переметилирования в щелочных условиях;
- b) “общий” метод переметилирования/метилования в последовательных щелочных и кислотных условиях;
- c) метод переметилирования/метилования трифторидом бора (BF₃).

Метод “быстрого” переметилирования в условиях применения щелочного катализатора

Этот метод применяется для повседневного анализа пищевых жиров и масел, содержащих жирные кислоты вниз до масляной кислоты (C4:0), и/или для определения масляной или капроновой (гексановой) кислоты (C6:0) методом газовой хроматографии с использованием внутреннего стандарта.

Щелочные катализаторы переэтерифицируют нейтральные липиды в присутствии безводного метанола (переметилирование) гораздо быстрее, чем кислотные катализаторы. Недостаток таких методик с щелочными катализаторами заключается в том, что невозможно этерифицировать свободные жирные кислоты, а присутствие воды может помешать полному переметилированию (гидролиз МЭЖК до свободных жирных кислот). Наиболее часто используемыми реактивами являются гидроксиды калия или натрия и метилат натрия в присутствии безводного метанола.

“Общий” метод переметилирования/метиличования в последовательных щелочных и кислотных условиях

Этот метод предусматривает последовательное применение щелочных и кислотных катализаторов и применяется ко всем маслам и жирам, включая дистиллятные и кислые масла, однако, не рекомендуется для лауриновых масел. Метилвые эфиры жирных кислот с короткой цепочкой легко теряются в процессе конденсации с обратным холодильником. Для масел на основе лауриновой кислоты рекомендуется метод “быстрого” переметиличования.

В процессе метилирования вещества, содержащие следующие конфигурации, могут разложиться полностью или частично:

- a) кетонные, эпоксидные, гидроксильные, гидроэпоксидные группы;
- b) циклопропильные и циклопропенильные группы;
- c) ацетиленовые жирные кислоты.

Переметиличование/метиличование трифторидом бора (BF₃)

Ввиду токсичности BF₃ этот метод рекомендуется использовать только в крайних случаях.

Метод, использующий BF₃, применяется к большинству масел, жиров и их производных (жирные кислоты, мыла), за исключением молочных жиров и жиров, содержащих жирные кислоты со специфическими группами.

В процессе метилирования вещества, содержащие следующие конфигурации, могут полностью или частично разложиться:

- a) кетонные, эпоксидные, гидроксильные, гидроэпоксидные группы;
- b) циклопропильные и циклопропенильные группы;
- c) ацетиленовые жирные кислоты.

Если жиры содержат такие вещества в очень незначительных количествах (например, хлопковое масло), этот метод применять можно, в противном случае рекомендуется применять “быстрый” или “общий” метод переметиличования/метиличования.

Для ГХ, оптимальное восстановление метиловых эфиров из реакционной смеси получают, применяя изооктан (2,2,4-триметилпентан). В то же время, только порядка 75 % метилового эфира капроновой кислоты восстанавливается из присутствующего.

Трифторид бора является сильной кислотой Льюиса (Lewis) в форме комплекса с координационными связями с метанолом, и в условиях нагревания с обратным холодильником он может быстро метилировать жирные кислоты. Именно трифторид бора в метаноле переметиличует сложные эфиры жирных кислот (например, триглицерид), но скорость реакции медленнее, чем метилирование жирных кислот. Раствор трифторида бора в метаноле имеется в продаже, что повышает привлекательность этого кислого катализатора, однако имеются потенциальные недостатки, связанные с применением этого реактива.

- a) Сообщается, что при высоких концентрациях трифторида бора (50 % по массе) из ненасыщенных жирных кислот получают мешающие метоксильные соединения.
- b) Реактив ограничен сроком годности при температуре окружающей среды и его следует хранить в холодильнике.
- c) Старый реактив может давать мешающие соединения и поэтому рекомендуется, испытывать каждую новую закупленную партию перед применением и периодически во время его срока службы.
- d) Раствор трифторид бора в метаноле является кислым реактивом и поэтому может давать производные жирных кислот, содержащих подвижные группы, которые могут способствовать появлению паразитных пиков на хроматограммах МЭЖК.

Дополнительная информация

Много внимания уделяется получению и анализу сложных эфиров жирных кислот с короткой цепочкой методом газовой хроматографии, главным образом, ввиду их присутствия в молочных жирах. Жирные кислоты с короткой цепочкой в свободном состоянии или этерифицированные глицерином можно преобразовать в метиловые эфиры полностью любым из реактивов, описанных в предшествующих абзацах, но количественного восстановления из реакционной среды можно не достичь, если не принять специальных мер предосторожности. Потери могут произойти на нескольких этапах любой методики. Сложные эфиры жирных кислот с короткой цепочкой (особенно метиловые) летучи и могут быть потеряны избирательно при нагревании этерификационной среды с обратным холодильником, они лучше растворимы в воде, чем сложные эфиры с длинной цепочкой и могут быть потеряны на этапе водной экстракции или могут выкипеть при перегонке вместе с экстрагирующим растворителем. Избирательные потери могут также произойти, если необходимо удалить неомыляемые примеси посредством сублимации или очистки с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ = TLC). Наилучшими методами этерификации для жирных кислот с короткой цепочкой являются методы, в которых исключены нагревание реактивов и этапы, включающие водную экстракцию и удаление растворителя.

ISO 12966-2:2011

Контроль реакционных сред, содержащих основные и кислотные катализаторы этерификации непосредственно на колонках ГХ, сокращает их срок годности. Верхние несколько сантиметров набивных колонок можно периодически пополнять, тогда как отрезки деактивированной трубки или "предколонки" перед капиллярными колонками защищают их. Это небольшая плата за скорость, простоту и точность таких методов.

Кроме того, в данной части ISO 12966 приводится простой метод ТСХ для проверки эффективности переметилирования/метилования. Этот метод можно также использовать для проверки родового состава масла или жира до осуществления переметилирования/метилования.

Жиры и масла животные и растительные. Газовая хроматография метиловых эфиров жирных кислот.

Часть 2.

Получение метиловых эфиров жирных кислот

1 Область применения

Настоящая часть ISO 12966 устанавливает методы получения метиловых эфиров жирных кислот.

Сюда входят методы получения метиловых эфиров жирных кислот из растительных и животных жиров и масел, жирных кислот и мыла. Чтобы охватить различные требования, установлено четыре метода метилирования, а именно:

- a) “быстрый” метод (экспресс-метод) переметилирования в щелочных условиях;
- b) “общий” метод переметилирования/метилования в последовательных щелочных и кислотных условиях;
- c) метод переметилирования/метилования трифторидом бора (BF_3);
- d) альтернативный метод с использованием переметилирования глицеридов с кислотным катализатором.

Метиловые эфиры, полученные таким образом, используются в различных методах анализа, в которых требуются такие производные, например, газо-жидкостная хроматография (ГЖХ = GLC), тонкослойная хроматография (ТСХ = TLC), и инфракрасная спектрометрия (ИК-спектрометрия = IR).

2 Нормативные ссылки

Следующие документы являются обязательными при использовании данного стандарта. Для датированных документов, допускаются к использованию только указанное издание. Для недатированных документов — последнее издание указанного документа (включая любые поправки).

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

3 Реакции

Определение состава жирных кислот в маслах и жирах является одним из фундаментальных анализов в области жиров и масел и подробно рассматривается в Ссылке [9]. С этой целью жирные кислоты в составе липидов обычно преобразуют в метиловые эфиры с последующим анализом методом ГХ.

“Быстрый” метод (4.2) не дает производных свободных жирных кислот (СЖК = СЖК), содержащихся в масле, в виде метиловых эфиров (МЭЖК). Если присутствуют свободные жирные кислоты, обычно принимают, что они имеют такое же распределение жирных кислот, как триглицериды. Обычно это справедливо для сырых (неочищенных) масел, и в меньшей степени для фракционированных или рафинированных масел. За исключением некоторых масел, полученных прессованием на холоде

(холодный отжим), как правило, масла с массовой долей свободных жирных кислот <0,5 % вероятно являются рафинированными; масла, указанные выше, можно считать сырыми. Допустимая концентрация СЖК в масле зависит от конкретного анализируемого масла а также от предполагаемого использования полученных данных МЭЖК. Присутствие СЖК в масле может стать причиной появления дополнительных пиков на конечной хроматограмме и сделать проблематичной идентификацию синтезированных МЭЖК методом “быстрого” переметилирования.

“Общий” метод (4.3) дает производные как СЖК, так и сложных эфиров глицерина в МЭЖК (см. 4.3.1).

Аналитик, исходя из свойств анализируемого масла, самостоятельно решает, какой метод, “быстрый” или “общий” лучше подходит. Несмотря на это, как правило, применение “быстрого” метода рекомендуется только, если содержание СЖК $\leq 0,5$ % по массе. “Общий” метод (4.3) предлагается использовать для масел с содержанием СЖК $>0,5$ % по массе. В другом варианте, если необходимо преобразовать частично гидролизованный жир в МЭЖК, можно использовать метод переметилирования с кислотным катализатором, установленный в 4.5.

Ввиду токсичности BF_3 , рекомендуется использовать метод с применением BF_3 (4.4) только в крайнем случае.

4 Методология

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ — Установленный метод включает применение потенциально опасных реактивов. Необходимо предпринять обычные меры предосторожности для защиты глаз и защиты от опасности получения химических ожогов. Раствор гидроксида калия в метаноле является ядовитым.

4.1 Подготовка пробы для анализа

Проба для анализа должна быть жидкой, сухой и чистой. Поступают в соответствии с ISO 661, но нагревают пробу до температуры, слегка превышающей температуру плавления.

4.2 Экспресс-метод

4.2.1 Применимость

Данный экспресс-метод переметилирования, в условиях щелочного катализатора, применяется как повседневный анализ к пищевым жирам и маслам, содержащим жирные кислоты до масляной кислоты (С4:0) и/или для определения масляной или капроновой кислоты (С6:0) методом газовой хроматографии с использованием внутреннего стандарта.

ПРИМЕЧАНИЕ 1 Данным методом невозможно преобразовать СЖК в МЭЖК. Аналитику следует отметить, что присутствие свободных жирных кислот в конечном растворе влияет на качество последующей газовой хроматографии.

ПРИМЕЧАНИЕ 2 Согласно документу COI/T.20/Doc. No. 24:2001^[8], аналогичный метод можно применять непосредственно к пробам следующих категорий масел:

- a) оливковое масло первого прессования, кислотность менее 3,3 %;
- b) рафинированное оливковое масло;
- c) оливковое масло (смесь оливкового масла первого прессования с рафинированным);
- d) рафинированное оливковое из жмыхов;
- e) оливковое из жмыхов (смесь оливкового масла первого прессования с рафинированным оливковым маслом из жмыхов).

4.2.2 Сущность метода

Метилловые эфиры образуются при переметилировании с раствором гидроксида калия в метаноле. Свободные жирные кислоты данным методом не этерифицируются.

4.2.3 Реактивы

Используют реактивы только признанной аналитической чистоты, если нет иных указаний.

Реактивы не должны давать пиков, которые мешают определить метиловые эфиры жирных кислот в процессе ГХ. Всякую новую партию реактива или растворителя следует проверить, используя его для приготовления метилового эфира чистой олеиновой кислоты. Если появляются дополнительные, неожиданные пики при итоговом газохроматографическом анализе, то реактив следует забраковать.

4.2.3.1 Метанол, содержащий не более, чем 0,5 % воды по массе.

4.2.3.2 Вода, соответствующая ISO 3696^[3], класс 3.

4.2.3.3 Гидросульфат натрия, безводный.

4.2.3.4 Изооктан (2,2,4-триметилпентан), для хроматографического анализа.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ — Изооктан является легко-воспламеняемым и представляет опасность возникновения пожара. Предельная взрывоопасная объемная концентрация в воздухе составляет от 1,1 % до 6,0 %. Он токсичен для вдыхания и проглатывания. Необходимо пользоваться хорошо вентилируемым вытяжным шкафом при работе с этим растворителем.

4.2.3.5 Гидроксид калия, раствор в метаноле, концентрация $c \approx 2$ моль/л.

Растворяют при незначительном нагревании 13,1 г гидроксида калия (массовая доля $w = 85$ г/100 г) в 100 мл абсолютного метанола.

4.2.3.6 Исходный раствор внутреннего стандарта, Только для определения масляной и/или капроновой кислоты.

Взвешивают 250 мг (с точностью 0,1 мг) метиловый эфир валериановой кислоты (метилпентаноат) и помещают в мерную колбу с одной меткой 50 мл (4.2.4.4). Для растворения пробы используют изооктан и доводят до метки тем же растворителем.

4.2.3.7 Контрольный раствор внутреннего стандарта, только для определения масляной и/или капроновой кислоты.

Добавляют (4.2.4.2) 10 мл исходного раствора в мерную колбу вместимостью 100 мл (4.2.4.4) и доводят до метки изооктаном. Рассчитывают концентрацию полученного раствора.

4.2.3.8 Раствор хлорида натрия. Растворяют 40 г хлорида натрия в 100 мл воды.

4.2.4 Аппаратура

Обычное лабораторное оборудование и, в частности, следующее.

4.2.4.1 Пробирки с завинчивающейся крышкой, 10 мл, с крышкой, оснащенной ПТФЭ-соединением.

4.2.4.2 Пипетки, вместимостью 0,1 мл, 2 мл и 10 мл, ISO 8655-2^[6].

4.2.4.3 Стеклянные пробирки для проб, 3 мл.

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

4.2.5 Проведение испытания

В пробирку с завинчивающейся крышкой вместимостью 10 мл (4.2.4.1), берут навеску приблизительно 0,1 г пробы (4.1). Если жирные кислоты требуется определить количественно методом ГХ, используя внутренний стандарт(ы), важно точно взвесить пробу для анализа; т.е. с точностью до 0,1 мг. Затем результаты выражают в процентах по массе жирных кислот в жире или масле. Эти результаты не обязательно согласуются с результатами, полученными с помощью внутренней нормализацией.