

# МЕЖДУНАРОДНЫЙ СТАНДАРТ

# ISO 12966-1

Первое издание  
2014-12-01

---

---

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

Часть 1.

### Руководящие указания по современной газовой хроматографии метиловых эфиров жирных кислот

[https://standards.itech.ai/catalog/standards/sist/e9bad044-cf91-44ac-bdca-3a40d0a38324/iso-](https://standards.itech.ai/catalog/standards/sist/e9bad044-cf91-44ac-bdca-3a40d0a38324/iso-12966-1-2014)

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

*Part 1: Guidelines on modern gas chromatography of fatty acid methyl esters*

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



Ссылочный номер  
ISO 12966-1:2014(R)

© ISO 2014

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

ISO 12966-1:2014

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e9bad044-cf91-44ac-bdca-3a40d0a38324/iso-12966-1-2014>



**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 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
Введение .....	v
1 Область применения.....	1
2 Нормативные ссылки .....	1
3 Принцип .....	2
4 Получение метиловых эфиров жирных кислот (FAME).....	2
5 Колонки .....	3
6 Газожидкостная хроматография эфиров FAME .....	5
7 Оценка хроматограмм.....	5
7.1 Площадь пика и площадь в процентах .....	5
7.2 Оценка с помощью внутреннего стандарта или поправочных коэффициентов .....	5
8 Протокол испытания.....	5
Библиография.....	6

ITeH STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

ISO 12966-1:2014

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e9bad044-cf91-44ac-bdca-3a40d0a38324/iso-12966-1-2014>

## 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 12966-1:2014

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 12966-1 вместе с ISO 12966-4 отменяет и заменяет ISO 5508:1990 и ISO 15304:2002, которые подверглись техническому пересмотру.

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

- *Часть 1. Руководящие указания по современной газовой хроматографии метиловых эфиров жирных кислот*
- *Часть 2. Получение метиловых эфиров жирных кислот*
- *Часть 3. Получение метиловых эфиров с применением гидроксида триметилсульфония (TMSH)*
- *Часть 4. Метод капиллярной газовой хроматографии*

## Введение

Настоящая часть ISO 12966 входит в серию из четырех международных стандартов, рассматривающих получение и определение метиловых эфиров жирных кислот с помощью газовой хроматографии в животных и растительных жирах и маслах. Все части ISO 12966 применимы к нерафинированным, рафинированным, частично или полностью гидрогенизированным жирам, маслам и жирным кислотам, полученным из источников животного и растительного происхождения.

Все части ISO 12966 не применимы к анализу жиров и масел, полученных от жвачных животных молочной породы, (включая молоко и молочные продукты или жир, полученный из молока и молочных продуктов), или к анализу продуктов с добавками конъюгированной (сопряженной) линолевой кислоты (CLA). К тому же данный стандарт не предназначен для применения к полимеризованным и окисленным жирам и маслам.

Настоящая часть ISO 12966 представляет собой руководящие указания по современной газовой хроматографии метиловых эфиров жирных кислот, в то время как ISO 12966-2 и ISO 12966-3 рассматривают получение метиловых эфиров жирных кислот различными методами. В ISO 12966-4 приводятся условия анализа метиловых эфиров жирных кислот с помощью капиллярной газовой хроматографии.

Эта серия международных стандартов заменяет следующие международные стандарты:

- ISO 5508:1990 заменен на ISO 12966-1 и ISO 12966-4
- ISO 15304:2002 заменен на ISO 12966-1 и ISO 12966-4
- ISO 5509:2000 заменен на ISO 12966-2 и ISO 12966-3

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e9bad044-cf91-44ac-bdca-3a40d0a38324/iso-12966-1-2014>



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

## Часть 1.

# Руководящие указания по современной газовой хроматографии метиловых эфиров жирных кислот

## 1 Область применения

Настоящая часть ISO 12966 дает обзор по газохроматографическому определению свободных и связанных жирных кислот в растительных и животных жирах и маслах после их превращения в метиловые эфиры жирных кислот.

Определение качественного и количественного состава жирных кислот газожижкостной хроматографией (GLC) широко применяется в анализе липидов. Она используется для исследования жиров и масел или жирных пищевых продуктов после экстракции масла из анализируемого вещества. Связанные жирные кислоты триацилглицеринов (TAG) и, в зависимости от метода этерификации, свободные жирные кислоты (FFA) и другие липиды превращают в метиловые эфиры жирных кислот (FAME), которые определяют капиллярной газовой хроматографией. В зависимости от количества различных жирных кислот (теоретически может присутствовать более 50 различных жирных кислот) для разделения можно использовать капиллярные колонки длиной от 10 м до 100 м.

Газожижкостная хроматография метиловых эфиров жирных кислот применяется ко всем натуральным и синтетическим смесям три-, ди- и моноацилглицеринов, к эфирам жирных кислот, свободным жирным кислотам, мылам и другим соединениям жирного ряда. В соответствии с этой серией стандартов можно определить метиловые эфиры жирных кислот от C4 до C26, включая метиловые эфиры насыщенных жирных кислот, метиловые эфиры *цис*- и *транс*-мононенасыщенных жирных кислот и метиловые эфиры *цис*- и *транс*-полиненасыщенных жирных кислот.

Для определения жирных кислот с короткой цепью часто используют изопропиловый и бутиловый эфиры, чтобы избежать интерференции от пика растворителя и снизить расхождения в откликах детектора.

## 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 12966-2, *Жиры и масла животные и растительные. Газовая хроматография метиловых эфиров жирных кислот. Часть 2. Получение метиловых эфиров жирных кислот*

ISO 12966-3, *Жиры и масла животные и растительные. Газовая хроматография метиловых эфиров жирных кислот. Часть 3. Получение метиловых эфиров с применением гидроксида триметилсульфония (TMSH)*

ISO 12966-4:-<sup>1)</sup>, *Жиры и масла животные и растительные. Газовая хроматография метиловых эфиров жирных кислот. Часть 4. Метод капиллярной газовой хроматографии*

1) В стадии подготовки. Будет опубликован.

### 3 Принцип

Газожидкостная хроматография (GLC) используется для качественного и количественного анализа метиловых эфиров жирных кислот (FAME). Эфиры FAME получают в соответствии с требованиями ISO 12966-2 или ISO 12966-3, а затем растворенные эфиры впрыскивают в инжектор и испаряют. Разделение эфиров FAME происходит в аналитических колонках различной полярности и длины. Для обнаружения FAME используют пламенно-ионизационный детектор (FID).

В газовой хроматографии эфиров FAME с применением детектора FID следует использовать водород в качестве газа-носителя (подвижная фаза). В случае применения масс-селективного детектора (MSD) должен использоваться гелий. При использовании водорода разделение может быть достигнуто в более короткий промежуток времени и с более отчетливыми пиками. Неподвижная фаза представляет собой микроскопический слой тонкой жидкой пленки на инертной твердой поверхности, изготовленной из стали, стекла или плавленого кварца.

Анализируемые летучие соединения взаимодействуют при прохождении через капилляр с покрытием неподвижной фазой, нанесенным на внутреннюю поверхность колонки. В результате разного взаимодействия различных соединений они выходят из колонки или элюируются в разное время, которое называют временем удерживания соединения при заданном наборе параметров анализа. Сравнение времен удерживания используют для идентификации различных соединений.

**ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ** — При использовании масс-селективного детектора для получения количественных результатов необходимо принимать специальные меры предосторожности из-за различий в характере фрагментации отдельных эфиров FAME. К тому же в случае масс-спектрометрии используют другие производные, отличные от FAME, которые обсуждаются в этой части ISO 12966, например, эфиры пиколиновой кислоты, диметилноксазолидины и другие.

### 4 Получение метиловых эфиров жирных кислот (FAME)

Получение метиловых эфиров жирных кислот должно выполняться в соответствии с методами, указанными в ISO 12966-2 и ISO 12966-3. Обзор этих методов приводится в Таблице 1.

Таблица 1 — Обзор различных методов этерификации

Метод	Принцип	GC-Инжектор	Примечание	—
ISO 12966-2, Подраздел 4.2	Экспресс-метод переметилирования в условиях щелочного катализа с KOH FFA не превращаются в FAME Опасность образования мыла	Непосредственно в колонку С делителем потока/ Без делителя потока	Применим к жирам и маслам, содержащим жирные кислоты до масляной кислоты (C4:0) Перезтерификация при комнатной температуре, нет необходимости испарять растворитель	Также для триглицеридов (MCT) со средней цепью и жирных кислот с короткой цепью, образование артефактов незначительно. Внутренний стандарт для определения масляной или капроновой кислоты Потери FAME с короткой цепью часто происходят при разделении с помощью солевого раствора/растворителя.
ISO 12966-2, Подраздел 4.3	Общий метод переметилирования/метирирования, проводимый в условиях последовательного щелочного и кислотного катализа (NaOCH <sub>3</sub> ) FFA превращаются в FAME	Непосредственно в колонку С делителем потока/ Без делителя потока	Применим к жирам и маслам Не рекомендуется для лауриновых масел	Потери FAME с короткой цепью часто происходят при кипячении с обратным холодильником и разделении с помощью солевого раствора/растворителя.

Таблица 1 (продолжение)

Метод	Принцип	GC-Инжектор	Примечание	—
ISO 12966-2, Подраздел 4.4	Переметилирование / метилирование с помощью трифторида бора (BF <sub>3</sub> ) Реактив очень токсичен. Используют только в закрытых ампулах и вытяжном шкафу Возможно образование артефактов	Непосредственно в колонку С делителем потока/ Без делителя потока	Должен использоваться имеющийся в продаже 14 % метанольный раствор BF <sub>3</sub> , который не готовится самостоятельно из-за токсичности. Раствор имеет ограниченный срок годности (старение)	Применим к жирам рыб. Не применим к соединениям с вторичными кислородными группами.
ISO 12966-2, Подраздел 4.5	Метанольный раствор серной или соляной кислоты Возможно образование артефактов Испарение необходимо, но не для жирных эпоксикислот	Непосредственно в колонку С делителем потока/ Без делителя потока	Реактив должен быть приготовлен; этерификация при кипении в запаянной ампуле в течение 3ч	Также для проб с высоким содержанием свободных жирных кислот
ISO 12966-3	Гидроксид триметилсульфония (TMSH) Возмущающие пики побочных продуктов реакции располагаются на хроматограмме рядом с сигналами FAME с короткой цепью	Возможен только впрыск с делителем потока	Пригоден готовый к использованию TMSH-раствор	Очень быстрый метод для эфиров C <sub>4</sub> – C <sub>26</sub> . Этерификация свободных жирных кислот — примерно 80 %, образование небольших количеств <i>транс</i> -FA.

## 5 Колонки

Во время публикации данной части ISO 12966 для разделения эфиров FAME использовали открытые капиллярные колонки (WCOT), в которых тонкая пленка неподвижной фазы нанесена непосредственно на ее внутреннюю поверхность, так как они имеют ряд преимуществ над насадочными колонками. Их применение приводит к очень хорошему разделению с более высоким разрешением, сокращению времени анализа, меньшему размеру пробы и более высокой чувствительности. Все это достигается возможностью использования очень длинных колонок с большим числом теоретических тарелок.

Емкость по пробе возрастает с диаметром колонки, колонки малого диаметра имеют более высокую эффективность и позволяют достигать лучшего разрешения. Поэтому для разделения сложных проб используют колонки малого диаметра и малой емкости по пробе. Общеизвестны колонки с внутренним диаметром (ID) от 0,1 мм (быстрые GC колонки) до 0,53 мм (широкая колонка), толщиной пленки от 0,1 мкм до 0,3 мкм. Диаметр колонки должен соответствовать типу системы ввода пробы: колонки с внутренним диаметром 0,20 мм, 0,25 мм или 0,32 мм подходят для систем впрыска с делителем потока или без него; диаметром 0,32 мм — для систем впрыска без делителя потока и непосредственно в колонку и диаметром 0,53 мм — для систем прямого впрыска. Удерживание и емкость по пробе возрастают с увеличением толщины пленки, в то же самое время эффективность колонки снижается. Толщина пленки обратно пропорциональна числу теоретических тарелок, но прямо пропорциональна продолжительности анализа. Это также означает, что большая толщина пленки приводит к большему удерживанию, что требует более высокой температуры термостата в изотермических условиях.

Длина колонок составляет от 10 м до 100 м в зависимости от требуемого разрешения и проблем, связанных с разделением. В случае коротких колонок ограниченная, но быстрая информация может быть получена при контроле процесса и т.д. Различные типы капиллярных колонок с неполярной, полярной и высокополярной неподвижными фазами используются для разделения эфиров FAME. Порядок элюирования для колонок с различной полярностью представлен в ISO 12966-4 (см. Приложение В и Приложение С).

Колонки из плавленного кварца, покрытые высокополярными неподвижными фазами цианоалкилполисилоксана, используются для анализа проб со сложными смесями геометрических

изомеров и изомеров положения полиненасыщенных жирных кислот (PUFA). Основное преимущество этих высокополярных фаз по сравнению с неполярными фазами состоит в их способности к высокому разрешению ненасыщенных FAME, особенно для разделения *цис*- и *транс*-изомеров FA. Однако полярность неподвижной фазы этой колонки демонстрирует меньшую термостабильность по сравнению с другими неподвижными фазами.

Длина колонки является существенным фактором для разделения эфиров FAME, особенно в том случае, как было упомянуто в этом разделе, когда требуется разделение изомеров. Колонка большей длины будет обеспечивать лучшее разрешение по сравнению с более короткой колонкой, тем не менее на практике существуют некоторые ограничения на увеличение длины колонки. Удвоение длины колонки (например, от 30 м до 60 м) будет увеличивать разрешение на множитель  $\sqrt{2} = 1,41$ , что составляет только 40 %. В то же самое время будет возрастать продолжительность анализа, а также напор. Более короткие колонки представляют собой компромисс между скоростью и разрешением. Однако в некоторых случаях для разделения геометрических изомеров и изомеров положения эфиров FAME требуется колонка длиной 100 м. Рекомендуется использование колонок длиной 100 м, внутренним диаметром 0,20 мм или 0,25 мм и толщиной пленки 0,20 мкм с высокополярной бисцианопропиловой (SP-2560) или высокозамещенной цианопропиловой (CP-Sil 88) неподвижными фазами, так как эффективность разделения этих колонок достаточна для разделения большинства C18:1 *транс*- и *цис*-изомеров. Некоторые из колонок длиной от 50 м до 60 м также могут обеспечивать такое разделение, главным образом, для растительных масел. Другие типы колонок с различными цианопропилфенилсилоксанами (BPX70, DB-23, HP-23, Rtx-2330, SP-2330, SP2380, SLB-IL111 и т.д.) также могут использоваться, но возможны изменения в порядке элюирования. Для определения *цис*-, *транс*- изомеров и ненасыщенных FAME в растительных маслах или жирах нежвачных животных рекомендуется метод Американского общества химиков масложировой промышленности (AOCS) Ce 1h-05 (2009) с использованием капиллярных колонок длиной 100 м и неподвижной фазы SP-2560 или CP-Sil 88. Для определения эфиров FAME в жирах морских млекопитающих и других маслах, содержащих полиненасыщенные жирные кислоты (PUFA) с длинной цепью, рекомендуется метод Американского общества химиков масложировой промышленности (AOCS) Ce 1i-07 (2009) с использованием высокополярной капиллярной колонки Supelcowax 10 с полиэтиленгликолевой фазой; и для определения омега-3 FAME с длинной цепью рекомендуется метод Ce 1b-89 (2009) с использованием капиллярной колонки Omegawax<sup>2)</sup>.

Неподвижная фаза всех этих колонок представляет собой тонкую пленку на внутренней поверхности капиллярной трубки, которая изготовлена из специального кварцевого стекла, покрытого полиимидом для стабилизации (плавленый кварц). Также приемлемы капиллярные колонки, изготовленные из стали, которые более прочные, или стекла.

**ПРИМЕЧАНИЕ 1** Использование насадочных колонок уже не соответствует современному уровню развития техники, но они могут применяться в специальных случаях.

Тип неподвижной фазы важен с точки зрения селективности колонки, разрешения и разделения. Чем больше полярность неподвижной фазы, тем больше удерживается ненасыщенных жирных кислот.

Поведение *транс*-жирных кислот при элюировании соответствует промежуточному состоянию между поведением насыщенных и *цис*-ненасыщенных жирных кислот. На неполярных колонках ненасыщенные жирные кислоты элюируются прежде соответствующих насыщенных жирных кислот.

**ПРИМЕЧАНИЕ 2** Порядок элюирования также зависит от температуры колонки. Картина элюирования некоторых эфиров FAME часто меняется при использовании различных температурных программ для термостата.

Если анализируемые жиры и масла содержат полимеризованные и/или окисленные жирные кислоты, то не все из них превращаются в эфиры FAME. Полимеризованные FAME являются не летучими при рекомендуемых условиях анализа и будут распадаться в инжекторе. Это может привести к непредвиденным потерям FAME при последующих анализах.

<sup>2)</sup> Колонки Supelcowax 10 и Omegawax — торговые марки изделий от различных поставщиков. Эта информация дается для удобства пользователей данного международного стандарта и не означает одобрения этих изделий со стороны ISO. Можно использовать эквивалентные изделия, если было доказано, что их применение приводит к таким же результатам.