

2017

Živočišné a rostlinné tuky a oleje - Plynová chromatografie methylesterů mastných kyselin - Část 2: Příprava methylesterů mastných kyselin

ČSN
EN ISO 12966-2

58 8767

idt ISO 12966-2:2017

Animal and vegetable fats and oils - Gas chromatography of fatty acid methyl esters - Part 2: Preparation of methyl esters of fatty acids

Corps gras d'origines animale et végétale - Chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques d'acides gras - Partie 2: Préparation des esters méthyliques d'acides gras

Tierische und pflanzliche Fette und Öle - Gaschromatographie von Fettsäuremethylestern - Teil 2: Herstellung von Fettsäuremethylestern

Tato norma je českou verzí evropské normy EN ISO 12966-2:2017. Překlad byl zajištěn Úřadem pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví. Má stejný status jako oficiální verze.

This standard is the Czech version of the European Standard EN ISO 12966-2:2017. It was translated by the Czech Office for Standards, Metrology and Testing. It has the same status as the official version.

Nahrazení předchozích norem

Touto normou se nahrazuje ČSN EN ISO 12966-2 (58 8767) z dubna 2015.

Národní předmluva

Změny proti předchozí normě

Hlavní změny proti předchozímu vydání normy jsou uvedeny v předmluvě.

Informace o citovaných dokumentech

ISO 661 zavedena v ČSN EN ISO 661 (58 8753) Živočišné a rostlinné tuky a oleje - Příprava zkušebního vzorku

Související ČSN

ČSN EN ISO 835 (70 4120) Laboratorní sklo - Dělené pipety

ČSN ISO 1042 (70 4105) Laboratorní sklo - Odměrné baňky s jednou ryskou

ČSN ISO 3696 (68 4051) Jakost vody pro analytické účely. Specifikace a zkušební metody

ČSN EN ISO 8655-2 (70 4255) Pístové titrační přístroje - Část 2: Pístové pipety

Vypracování normy

Zpracovatel: Kateřina Šléglová, IČ 76130509

Technická normalizační komise: TNK 151 Potraviny

Pracovník Úřadu pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví: Ing. Radmila Foretová

EVROPSKÁ NORMA
EUROPEAN STANDARD
NORME EUROPÉENNE
EUROPÄISCHE NORM

EN ISO 12966-2

Duben 2017

ICS 67.200.10

Živočišné a rostlinné tuky a oleje -
Plynová chromatografie methylesterů mastných kyselin -
Část 2: Příprava methylesterů mastných kyselin

Animal and vegetable fats and oils -
Gas chromatography of fatty acid methyl esters -
Part 2: Preparation of methyl esters of fatty acids
(ISO 12966-2:2017)

Corps gras d'origines animale et végétale -
Chromatographie en phase gazeuse des esters
méthyliques d'acides gras -
Partie 2: Préparation des esters méthyliques
d'acides gras
(ISO 12966-2:2017)

Tierische und pflanzliche Fette und Öle -
Gaschromatographie von
Fettsäuremethylestern -
Teil 2: Herstellung von Fettsäuremethylestern
(ISO 12966-2:2017)

Tato evropská norma byla schválena CEN dne 2017-04-03.

Členové CEN jsou povinni splnit vnitřní předpisy CEN/CENELEC, v nichž jsou stanoveny podmínky, za kterých se této evropské normě bez jakýchkoliv modifikací uděluje status národní normy. Aktualizované seznamy a bibliografické citace týkající se těchto národních norem lze obdržet na vyžádání v Řídicím centru CEN-CENELEC nebo u kteréhokoliv člena CEN.

Tato evropská norma existuje ve třech oficiálních verzích (anglické, francouzské, německé). Verze v každém jiném jazyce přeložená členem CEN do jeho vlastního jazyka, za kterou zodpovídá a kterou notifikuje Řídicímu centru CEN-CENELEC, má stejný status jako oficiální verze.



Evropský výbor pro normalizaci
European Committee for Standardization
Comité Européen de Normalisation
Europäisches Komitee für Normung

Řídící centrum CEN-CENELEC: Avenue Marnix 17, B-1000 Brusel

© 2017 CEN Veškerá práva pro využití v jakékoli formě a jakýmikoli prostředky

Ref.

č. EN ISO 12966-2:2017 E

jsou celosvětově vyhrazena národním členům CEN.

Členy CEN jsou národní normalizační orgány Belgie, Bulharska, Bývalé jugoslávské republiky Makedonie, České republiky, Dánska, Estonska, Finska, Francie, Chorvatska, Irska, Islandu, Itálie, Kypru, Litvy, Lotyšska, Lucemburska, Maďarska, Malty, Německa, Nizozemska, Norska, Polska, Portugalska, Rakouska, Rumunska, Řecka, Slovenska, Slovinska, Spojeného království, Srbska, Španělska, Švédsko, Švýcarsko a Turecko.

Evropská předmluva

Tento dokument (EN ISO 12966-2:2017) vypracovala technická komise ISO/TC 34 *Potravinářské výrobky ve spolupráci s technickou komisí CEN/TC 307 Olejnatá semena, rostlinné a živočišné tuky a oleje a jejich vedlejší produkty - Metody odběru vzorků a analýzy*, jejíž sekretariát zajišťuje AFNOR.

Této evropské normě je nutno nejpozději do října 2017 udělit status národní normy, a to buď vydáním identického textu, nebo schválením k přímému používání, a národní normy, které jsou s ní v rozporu, je nutno zrušit nejpozději do října 2017.

Upozorňuje se na možnost, že některé prvky tohoto dokumentu mohou být předmětem patentových práv. CEN [a/nebo CENELEC] nelze činit odpovědným za identifikaci jakéhokoliv nebo všech patentových práv.

Tento dokument nahrazuje EN ISO 12966-2:2011.

Podle vnitřních předpisů CEN-CENELEC jsou tuto evropskou normu povinný zavést národní normalizační organizace následujících zemí: Belgie, Bulharska, Bývalé jugoslávské republiky Makedonie, České republiky, Dánska, Estonska, Finska, Francie, Chorvatska, Irska, Islandu, Itálie, Kypru, Litvy, Lotyšska, Lucemburska, Maďarska, Malty, Německa, Nizozemska, Norska, Polska, Portugalska, Rakouska, Rumunska, Řecka, Slovenska, Slovinska, Spojeného království, Srbska, Španělska, Švédsko, Švýcarsko a Turecko.

Oznámení o schválení

Text ISO 12966-2:2017 byl schválen CEN jako EN ISO 12966-2:2017 bez jakýchkoliv modifikací.

[Předmluva](#)

[Úvod](#)

[1..... Předmět normy](#)

[2..... Citované dokumenty](#)

[3..... Termíny a definice](#)

[4..... Reakce](#)

[5..... Metodologie](#)

[5.1..... Příprava zkušební vzorku](#)

[5.2..... Rychlá metoda](#)

[5.2.1... Použitelnost](#)

[5.2.2... Princip](#)

[5.2.3... Chemikálie](#)

[5.2.4... Přístroje](#)

[5.2.5... Postup](#)

[5.3..... Obecná metoda](#)

[5.3.1... Použitelnost](#)

[5.3.2... Princip](#)

[5.3.3... Chemikálie](#)

[5.3.4... Přístroje a materiály](#)

[5.3.5... Postup](#)

[5.4..... Transmethylace s použitím katalyzátoru fluorid boritý \(BF₃\)](#)

[5.4.1... Princip](#)

[5.4.2... Použitelnost](#)

[5.4.3... Chemikálie](#)

[5.4.4... Přístroje](#)

[5.4.5... Postup](#)

5.5..... Transmethylace glyceridů kyselou katalýzou

5.5.1... Princip

5.5.2... Chemikálie

5.5.3... Přístroje

5.5.4... Příprava zkušebního vzorku

5.5.5... Postup

Příloha A (informativní) Metoda tenkovrstvé chromatografie pro zkoušení úplnosti derivatizace

Bibliografie

Předmluva

ISO (Mezinárodní organizace pro normalizaci) je celosvětová federace národních normalizačních orgánů (členů ISO). Mezinárodní normy obvykle vypracovávají technické komise ISO. Každý člen ISO, který se zajímá o předmět, pro který byla vytvořena technická komise, má právo být v této technické komisi zastoupen. Práce se zúčastňují také vládní i nevládní mezinárodní organizace, s nimiž ISO navázala pracovní styk. ISO úzce spolupracuje s Mezinárodní elektrotechnickou komisí (IEC) ve všech záležitostech normalizace v elektrotechnice.

Postupy použité při tvorbě tohoto dokumentu a postupy určené pro jeho další udržování jsou popsány ve směrnících ISO/IEC, část 1. Zejména se má věnovat pozornost rozdílným schvalovacím kritériím potřebným pro různé druhy dokumentů ISO. Tento dokument byl vypracován v souladu s redakčními pravidly uvedenými ve směrnících ISO/IEC, část 2 (viz www.iso.org/directives).

Upozorňuje se na možnost, že některé prvky tohoto dokumentu mohou být předmětem patentových práv. ISO nelze činit odpovědnou za identifikaci jakéhokoliv nebo všech patentových práv. Podrobnosti o jakýchkoliv patentových právech identifikovaných během přípravy tohoto dokumentu budou uvedeny v úvodu a/nebo v seznamu patentových prohlášení obdržných ISO (viz www.iso.org/patents).

Jakýkoliv obchodní název použitý v tomto dokumentu se uvádí jako informace pro usnadnění práce uživatelů a neznamená schválení.

Vysvětlení významu specifických termínů a výrazů ISO, které se vztahují k posuzování shody, jakož i informace o tom, jak ISO dodržuje principy WTO týkající se technických překážek obchodu (TBT), jsou uvedeny na tomto odkazu URL: [Foreword – Supplementary information](#).

Tento dokument vypracovala komise ISO/TC 34 *Potravinářské výrobky*, subkomise SC 11 *Živočišné a rostlinné tuky a oleje*.

Toto druhé vydání zrušuje a nahrazuje první vydání (ISO 12966-2:2011) a je jeho revizí menšího rozsahu.

Změny oproti předchozímu vydání jsou následující:

- výrobky z mléka a mléčných tuků jsou vyňaty z předmětu normy.

Seznam všech částí řady ISO 12966 naleznete na webových stránkách ISO.

Úvod

Obecně

Oleje a tuky (tj. kapalné a pevné lipidy) jsou složeny převážně z esterů mastných kyselin a glycerolu (triacylglyceroly, TAG) s menším množstvím esterů mastných kyselin sterolů a alifatických alkoholů s dlouhým řetězcem. Vzhledem k vysoké molekulové hmotnosti TAG a jejich následně nízké těkavosti jsou obtížně stanovitelné přímo plynovou chromatografií (GC), a to zejména, pokud je požadována podrobná analýza nenasycených mastných kyselin. Mastné kyseliny se špatně chromatograficky stanovují (s výjimkou mastných kyselin s krátkými řetězci, např. kyselina butanová a pentanová). V praxi je proto lepší před GC vytvořit estery mastných kyselin, obvykle methylestery (FAME).

Analýza olejů a tuků byla rozsáhle přezkoumána v odkaze [9].

Vytvoření FAME je rozhodující fází v analýze mastných kyselin. Nekvantitativní převedení mastných kyselin na FAME, změna struktury mastných kyselin (např. poziční a geometrické změny přítomných isomerů) a tvorba nemethylesterových (non-FAME) artefaktů mastných kyselin, to vše může ovlivnit kvantitativní stanovení složení mastných kyselin.

Transesterifikace je jedním z mechanismů, který může být použit pro vytvoření FAME z esterů mastných kyselin v tucích (např. triacylglycerolu). Pro tvorbu FAME může být použit postup bazicky nebo kyselě katalyzované transesterifikace v methanolovém médiu; postup může být označen jako *transmethylace*. Transmethylace je vratný proces a pro udržení rovnovážného stavu je vyžadován velký přebytek methanolu, což podporuje tvorbu FAME. Voda může zabránit dokončení reakce, a proto by její přítomnost měla být minimalizována. Bazicky katalyzované postupy netvoří FAME z volných mastných kyselin, vzhledem k tvorbě solí mastných kyselin.

Esterifikace je mechanismus kyselé katalýzy, který může být použit pro tvorbu FAME z mastných kyselin. Je možné, že ve vzorku zkoumaného tuku jsou přirozeně přítomné mastné kyseliny. Tvorba FAME tímto mechanismem je běžně označována jako *methylace*. A i zde je nezbytným předpokladem pro kvantitativní tvorbu FAME přebytek methanolu a nepřítomnost vody.

Tato norma poskytuje pokyny pro přípravu methylesterů mastných kyselin. Jako podpora těchto pokynů jsou specifikovány různé postupy přípravy methylesterů mastných kyselin. Tyto postupy zahrnují:

- a) „rychlou“ transmethylaci za bazických podmínek;
- b) „obecnou“ transmethylaci/methylaci za postupných bazických a kyselých podmínek;
- c) transmethylaci/methylaci fluoridem boritým (BF₃).

„Rychlá“ metoda transmethylace za podmínek bazické katalýzy

Tato metoda je použitelná pro běžnou analýzu jedlých tuků a olejů, obsahujících mastné kyseliny až po kyselinu butanovou (C4:0) a/nebo pro stanovení kyseliny butanové nebo kyseliny hexanové (C6:0) pomocí GC s použitím vnitřního standardu.

Bazické katalyzátory transesterifikují neutrální lipidy v přítomnosti bezvodého methanolu (transmethylace) rychleji než kyselé katalyzátory. Nevýhodou tohoto postupu bazické katalýzy je, že volné mastné kyseliny nejsou esterifikovány a přítomnost vody může zabránit dokončení transmethylace (hydrolyza FAME na volné mastné kyseliny). Nejběžněji používané chemikálie jsou

hydroxid draselný, hydroxid sodný a methoxid sodný (methanolát sodný) v přítomnosti bezvodého methanolu.

„Obecná“ transmethylace/methylace za postupných bazických a kyselých podmínek

Tato metoda za postupných bazických a kyselých podmínek je použitelná pro všechny oleje a tuky, včetně destilovaných a kyselých tuků, ale nedoporučuje se pro laurové oleje. Methylestery mastných kyselin s krátkými řetězci se snadněji ztratí během chlazení pod zpětným chladičem. Pro oleje kyseliny laurové se doporučuje metoda „rychlé“ transmethylace.

Během methylace mohou být sloučeniny obsahující následující uspořádání zcela nebo částečně rozloženy:

- a) keto, epoxy, hydroxylové nebo hydroperoxidové skupiny;
- b) cyklopropylové a cyklopropenylové skupiny;
- c) acetylenické mastné kyseliny.

Transmethylace/methylace fluoridem boritým (BF₃)

Vzhledem k toxicitě BF₃ se doporučuje tuto metodu používat pouze v *krajním případě*.

Metoda s použitím BF₃ je použitelná pro většinu olejů, tuků a derivátů (mastných kyselin, solí mastných kyselin) s výjimkou mléčného tuku a tuků obsahujících mastné kyseliny se specifickými skupinami.

Během methylace mohou být sloučeniny obsahující následující uspořádání zcela nebo částečně rozloženy:

- a) keto, epoxy, hydroxylové nebo hydroperoxidové skupiny;
- b) cyklopropylové a cyklopropenylové skupiny;
- c) acetylenické mastné kyseliny.

Pokud tuková hmota obsahuje takovéto substance pouze ve velmi malém množství (např. bavlníkový olej), může být použita tato metoda, jinak by měla být použita metoda „rychlé“ nebo „obecné“ transmethylace/methylace.

U GC je optimální výtěžnost methylesterů z reakční směsi dosažena za použití izooktanu (2,2,4-trimethylpentan). Avšak výtěžek methyl kaproátu je pouze asi 75 %.

Fluorid boritý je silná Lewisova kyselina a ve formě jejího koordinačního komplexu s methanolem, pod zpětným chladičem, může rychle methylovat mastné kyseliny. Methanolický fluorid boritý provede transmethylaci esterů mastných kyselin (např. triglyceridů), ale reakční rychlost je menší než u methylace mastných kyselin. Methanolický roztok fluoridu boritého je komerčně dostupný, což zvyšuje atraktivitu tohoto kyselého katalyzátoru, ale s použitím tohoto činidla jsou spojeny potenciální nevýhody.

- a) Uvádí se, že vysoké koncentrace fluoridu boritého (50% hmotnostní podíl) produkují methoxy artefakty z nenasycených mastných kyselin.
- b) Činidlo má omezenou skladovatelnost za běžné teploty a mělo by být uchováváno v chladničce.
- c) Staré činidlo může vytvářet artefakty a z toho důvodu se doporučuje každou novou zakoupenou šarži vyzkoušet před použitím a pravidelně během její použitelnosti.
- d) Methanolický fluorid boritý je kyselé činidlo, a proto může vytvářet deriváty mastných kyselin obsahující labilní skupiny, které mohou vést k falešným píkům na chromatogramu FAME.

Dodatečné informace

Přípravě a analýze esterů mastných kyselin s krátkým řetězcem pomocí GC byla věnována velká pozornost, především z důvodu jejich výskytu v mléčném tuku. Mastné kyseliny s krátkým řetězcem, volné nebo vázané esterickou vazbou na glycerol, mohou být zcela převedeny na methylestery kterýmkoli z činidel popsáním v předchozích odstavcích, ale kvantitativní výtěžnost z reakčního média nemusí být dosažena, pokud nejsou přijata speciální opatření. Ke ztrátám může dojít v několika fázích jakéhokoli postupu. Estery mastných kyselin s krátkým řetězcem (zejména methylestery) jsou těkavé a mohou se selektivně ztrácet při průchodu esterifikačního média zpětným chladičem, jsou více rozpustné ve vodě než estery s delšími řetězci a mohou se ztratit během kroku extrakce vodné fáze nebo mohou být oddestilovány při odpařování extrakčního rozpouštědla.

Selektivní ztráty se mohou také objevit, pokud musí být odstraněny nezmýdelnitelné nečistoty pomocí sublimace nebo přečištěním pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC). Nejlepší esterifikační postupy pro mastné kyseliny s krátkým řetězcem jsou ty, při kterých nedojde k zahřátí činidla a ve kterých nejsou fáze zahrnující extrakci vodné fáze a odstranění rozpouštědla.

Nástřik reakční směsi obsahující katalyzátory pro kyselou i alkalickou esterifikaci přímo na GC kolonu zkracuje její životnost. U náplňové kolony můžeme pravidelně naplňovat prvních pár centimetrů na jejím začátku, zatímco kapilární kolona je chráněna délkou deaktivované křemenné kapiláry bez nanesené stacionární fáze vytvářející tzv. bezretenční zónu umístěnou před samotnou analytickou kapilární kolonou. Vzhledem k rychlosti, jednoduchosti a přesnosti těchto postupů se jedná o přijatelnou hodnotu, kterou bychom zaplatili za prodloužení životnosti GC kolon.

Dále tato norma poskytuje jednoduchý TLC postup pro kontrolu účinnosti transmethylace/methylace. Tento postup může být také použit pro kontrolu druhového složení oleje nebo tuku před provedením transmethylace/methylace.

1 Předmět normy

Tato norma specifikuje metodu přípravy methylesterů mastných kyselin.

Zahrnuje metody pro přípravu methylesterů mastných kyselin z živočišných a rostlinných tuků a olejů, mastných kyselin a solí mastných kyselin. Za účelem pokrytí různých požadavků jsou specifikovány čtyři metody methylace a to:

- a) „rychlý“ postup transmethylace za bazických podmínek;
- b) „obecný“ postup transmethylace/methylace za postupných bazických a kyselých podmínek;
- c) postup transmethylace/methylace fluoridu boritého (BF_3);
- d) alternativní postup transmethylace glyceridů pomocí kyselé katalýzy.

Takto připravené methylestery se použijí v různých analytických postupech, vyžadujících takovéto deriváty, např. plynovo-kapalinová chromatografie (GLC), tenkovrstvá chromatografie (TLC) a infračervená spektrometrie (IR).

Mléko a mléčné výrobky (nebo tuk pocházející z mléka a mléčných výrobků) jsou vyňaty z předmětu této normy.

Konec náhledu - text dále pokračuje v placené verzi ČSN.