

# ČESKÁ TECHNICKÁ NORMA

ICS 67.200.10 **Duben 2015**

## **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 12966-2:2011

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 12966-2:2011. 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 12966-2:2011. 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) ze září 2011.

Národní předmluva

Změny proti předchozí normě

Proti předchozí normě dochází ke změně způsobu převzetí EN ISO 12966-2:2011 do soustavy norem ČSN. Zatímco ČSN EN ISO 12966-2 ze září 2011 převzala EN ISO 12966-2:2011 schválením k přímému používání jako ČSN, tato norma ji přejímá překladem.

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

Pracovník Úřadu pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví: Ing. Kateřina Hanzlová

## **EVROPSKÁ NORMA EN ISO 12966-2**

### **EUROPEAN STANDARD**

### **NORME EUROPÉENNE**

### **EUROPÄISCHE NORM** Únor 2011

ICS 67.200.10 Nahrazuje EN ISO 5509:2000

## **Živočišné a rostlinné tuky a oleje - Plynová chromatografie methylesterů mastných kyselin - Část 2: Příprava methylesterů mastných kyselin (ISO 12966-2:2011)**

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)

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 12966-2:2011)

Tierische und pflanzliche Fette und Öle – Gaschromatographie von  
Fettsäuremethylestern –  
Teil 2: Herstellung von Fettsäuremethylestern  
(ISO 12966-2:2011)

Tato evropská norma byla schválena CEN dne 2011-02-14.

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**

**Řídicí centrum: Avenue Marnix 17, B-1000 Brusel**

jsou celosvětově vyhrazena národním členům CEN.

Členy CEN jsou národní normalizační orgány Belgie, Bulharska, České republiky, Dánska, Estonska, Finska, Francie, Chorvatska, Irska, Islandu, Itálie, Kypru, Litvy, Lotyšska, Lucemburska, Maďarska, Malty, Německa, Nizozemska, Norska, Polska, Portugalska, Rakouska, Rumunsko, Řecko, Slovensko, Slovinsko, Spojeného království, Španělska, Švédska a Švýcarska.

## Předmluva

Tento dokument (EN ISO 12966-2:2011) 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 srpna 2011 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 srpna 2011.

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 5509:2000.

Podle vnitřních předpisů CEN/CENELEC jsou tuto evropskou normu povinny zavést národní normalizační organizace následujících zemí: Belgie, Bulharsko, Česká republika, Dánsko, Estonsko, Finsko, Francie, Chorvatsko, Irsko, Island, Itálie, Kypr, Litva, Lotyšsko, Lucembursko, Maďarsko, Malta, Německo, Nizozemsko, Norsko, Polsko, Portugalsko, Rakousko, Rumunsko, Řecko, Slovensko, Slovinsko, Spojené království, Španělsko, Švédsko a Švýcarsko.

## Oznámení o schválení

Text ISO 12966-2:2011 byl schválen CEN jako EN ISO 12966-2:2011 bez jakýchkoliv modifikací.

## Obsah

Strana

Úvod 6

**1** Předmět normy 8

**2** Citované dokumenty 8

**3** Reakce 8

**4** Metodika 8

**Příloha A** (informativní) Metoda tenkovrstvé chromatografie pro zkoušení úplnosti derivatizace 16

Bibliografie 19

## Úvod

### Obecně

Oleje a tuky (tj. kapalné a pevné lipidy) jsou složeny převážně z esterů mastných kyselin glycerolu (triacylglyceroly, TAGs), s menším množstvím esterů mastných kyselin sterolů a alifatických alkoholů s dlouhým řetězcem. Vzhledem k vysoké molekulové hmotnosti TAGs a jejich následné nízké těkavosti, jsou obtížně stanovitelné přímo plynovou chromatografií (GC), a to zejména pokud je požadována podrobná analýza nenasycených mastných kyselin. Mastné kyseliny samy o sobě špatně chromatografují (s výjimkou mastných kyselin s krátkými řetězci, např. kyselina butanová nebo 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 kyselé katalyzované transesterifikace v methanolickém 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 FAMEs 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 část ISO 12966 poskytuje návody na přípravu methylesterů mastných kyselin. Jako podpora těchto návodů 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 bortrifluoridem ( $\text{BF}_3$ ).

„Rychlá“ metoda transmethylace za podmínek bazické katalýzy

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

Kyselé katalyzátory transesterifikují neutrální lipidy v přítomnosti bezvodého methanolu

(transmethylace) rychleji než kyselé katalyzátory. Nevýhodou tohoto postupu bazické katalýzy je, že mastné kyseliny nejsou esterifikovány a přítomnost vody může zabránit dokončení transmethylace (hydrolyza FAME na volné mastné kyseliny).

Nejběžněji používané chemikálie jsou hydroxid draselný a 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 struktury zcela nebo částečně rozloženy:

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

Transmethylace/methylace bortrifluoridem ( $\text{BF}_3$ )

Vzhledem k toxicitě  $\text{BF}_3$  se doporučuje tuto metodu používat pouze v *krajním případě*.

Metoda s použitím  $\text{BF}_3$  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 struktury 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 následovat 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%.

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

- a) Uvádí se, že vysoké koncentrace bortrifluoridu (50 % hmotnostní podíl) produkuje methoxy

artefakty z nenasycených mastných kyselin.

- b) Činidlo má omezenou skladovatelnost za běžné teploty a mělo by být uchováváno zchladené.
- c) Staré činidlo může vytvářet artefakty a z toho důvodu se doporučuje každou novou zakoupenou šarži před použitím vyzkoušet a následně vyzkoušet periodicky během jeho použitelnosti.
- d) Methanolický bortrifluorid 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 esterifikované na glycerol, mohou být zcela převedeny na methylestery, kterýmkoli z činidel popsaným 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.

Vstřikování média obsahujícího bazické a kyselé katalyzátory přímo do GC kolony zkracuje jejich pracovní životnost. Několik horních centimetrů plněných kolon se může pravidelně doplňovat, zatímco délky deaktivovaných potrubí nebo „zadržovací otvory“ před kapilárními kolonami je chrání. Je to pouze malá cena za rychlost, jednoduchost a přesnost těchto postupů.

Dále tato část ISO 12966 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 část ISO 12966 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 bortrifluoridem ( $\text{BF}_3$ );
- d) alternativní postup transmethylace glyceridů pomocí kyselé katalýzy.

Takto připravené methylestery se použijí v různých analytických postupech, vyžadujících takovéto deriváty, např. rozdělovací plynová chromatografie (GLC), chromatografie na tenké vrstvě (TLC) a infračervená spektrometrie (IR).

Konec náhledu - text dále pokračuje v placené verzi ČSN.