
ХАРЧОВІ ТЕХНОЛОГІЇ

FOOD TECHNOLOGY

УДК 664:665:542.543

DOI <https://doi.org/10.32851/tnv-tech.2022.1.9>

НАУКОВО-ПРАКТИЧНІ АСПЕКТИ РОЗРОБКИ ЕКСПРЕС-МЕТОДУ ВИЗНАЧЕННЯ ЦИС- ТА ТРАНС-ІЗОМЕРІВ

Левчук І.В. – доктор технічних наук, старший науковий співробітник,
начальник науково-методичної лабораторії хроматографічних досліджень
ДП «УКРМЕТРТЕСТСТАНДАРТ»
ORCID ID: 0000-0002-9337-8816

Голубець О.В. – кандидат сільсько-господарських наук,
старший науковий співробітник науково-методичної лабораторії
хроматографічних досліджень
ДП «УКРМЕТРТЕСТСТАНДАРТ»
ORCID ID: 0000-0002-6840-4955

Тимченко В.К. – кандидат технічних наук, доцент,
професор кафедри технології жирів та продуктів бродіння
Національного технічного університету «Харківський політехнічний інститут»
ORCID ID: 0000-0001-5141-3807

Арутюнян Т.В. – кандидат технічних наук,
доцент кафедри технології жирів та продуктів бродіння
Національного технічного університету «Харківський політехнічний інститут»
ORCID ID: 0000-0001-8593-4985

У статті представлено дослідження метилових ефірів цис- та транс-ізомерів жирних кислот найпоширенішим методом контролю якості в олійножировій галузі – методом газоріднинної хроматографії з використанням аналітичних колонок провідних виробників (Agilent Technologies, Supelco, Phenomenex).

Встановлена результативність хроматографічного методу аналізу жирних кислот з використанням колонок HP-88, SP-2380, Zebron-FAME за умови відсутності даних щодо складу нерухомої фази, яка залежить від геометричних параметрів колонок та якості пробопідготовки.

Оптимальні умови розділення метилових ефірів жирних кислот, в тому числі й їх ізомерів, підтверджено за допомогою калібрування колонки стандартною сумішшю метилових ефірів жирних кислот.

Представлено дані досліджень роздільної здатності аналітичних колонок з використанням зразка суміші метилових ефірів жирних кислот 37 Component FAME Mix т.м. Supelco США (кат. № 47885-U) та дослідним шляхом встановлено кращу роздільну здатність критичної пари C18:3-C20:1 піків, яких з часом експлуатації колонки зливаються.

Встановлено шляхом підбору потоку газу носія та градієнту температури термостату колонок Zebtron-FAME мінімальний час аналізу метилових ефірів жирних кислот до 36,2 хв., що значно скорочує тривалість дослідження методом газорідинної хроматографії, який є референсним.

Виявлено, що з часом використання метилату натрія на хроматограмі метилових ефірів жирних кислот з'являються піки ацилгліцеринів, які суттєво впливають на роздільну здатність хроматографічних колонок і негативно впливають на кінцевий результат. Експериментально визначено, що термін придатності метилату натрія, який забезпечує високу якість хроматографічного аналізу, складає один місяць.

Ключові слова: цис- та транс-ізомери жирних кислот газорідинна хроматографія, роздільна здатність, умови пробопідготовки, термін аналізу, референсний метод.

Levchuk I.V., Holubets O.V., Tymchenko V.K., Arutiunian T.V. Scientific and practical aspects of developing the express method for determination of cyst and trans isomers

The article presents the study of methyl esters of cis- and trans-isomers of fatty acids by the most common method of quality control in the oil and fat industry – gas-liquid chromatography using analytical columns from leading manufacturers (Agilent Technologies, Supelco, Phenomenex).

The effectiveness of the chromatographic method of fatty acid analysis using columns HP-88, SP-2380, Zebtron-FAME in the absence of data on the composition of the stationary phase, which depends on the geometric parameters of the columns and the quality of sample preparation.

Optimal separation conditions for fatty acid methyl esters, including their isomers, were confirmed by column calibration with a standard mixture of fatty acid methyl esters.

Data from studies of the resolution of analytical columns using a sample of a mixture of methyl esters of fatty acids 37 Component FAME Mix, etc. Supelco USA (cat. № 47885-U) and experimentally found the best resolution of the critical pair C18: 3-C20: 1 peak, which merge with the time of operation of the column.

The minimum analysis time of fatty acid methyl esters to 36.2 minutes was determined by selecting the carrier gas flow and the temperature gradient of the Zebtron-FAME column thermostat, which significantly reduces the duration of the study by gas-liquid chromatography, which is the reference.

It was found that over time, the use of sodium methylate on the chromatogram of methyl esters of fatty acids appear peaks of acylglycerols, which significantly affect the resolution of the chromatographic columns and adversely affect the final result. It has been experimentally determined that the shelf life of sodium methylate, which provides high quality chromatographic analysis, is one month.

Key words: cis- and trans-isomers of fatty acids, gas-liquid chromatography, separative power, sample handling conditions, analysis term, reference method.

Вступ. Характерною ознакою сучасного олійножирового і будь-якого харчового виробництва є удосконалення схем техно-хімічного контролю виробництва. Техно-хімічний контроль виробництва включає контроль сировини і матеріалів, контроль технологічного процесу та контроль готової продукції. З метою виконання вимог Європейських та міжнародних стандартів для здійснення техно-хімічного контролю виробництва все частіше залучаються інструментальні методи аналізу [1].

Найпоширенішим методом досліджень щодо контролю якості сировини та готової продукції в олійножировій галузі є визначення жирнокислотного складу олій та жирів за допомогою методу газорідинної хроматографії.

До цієї групи показників, зокрема, відносять [2]:

– склад жирних кислот (жирнокислотний склад), який знаходять для купажованих олій;

– визначення масової частки транс-ізомерів олеїнової кислоти – для жирів гідрогенізованих та переестерифікованих;

– визначення масової частки лінолевої кислоти (для жирів переестерифікованих).

Слід зазначити, що в Україні діє закон про маркування [3], згідно якого виробники повинні вказувати на етикетці відомості щодо складу готового продукту, в тому числі насичених жирних кислот і ТІЖК.

Запровадженню та удосконаленню методів газорідинної хроматографії (ГРХ) для аналізу жирнокислотного складу сприятиме видання спеціального довідникового видання [4].

Постановка проблеми у загальному вигляді та її зв'язок із важливими науковими та практичними завданнями. Дотепер газохромаграфічне дослідження жирнокислотного складу (в т.ч. транс-ізомерів жирних кислот) є методом тривалим за часом (близько 1,5–2 год.). Дистриб'юторами аналітичного обладнання пропонуються скринінгові методи –К-Фур'є, рефрактометричні, Іг-спектрометричні та ін. Але газорідинна хроматографія залишається головним (референсним) методом.

Для практичної реалізації методу ГРХ на підприємстві з метою оперативного контролю сировини та готової продукції потрібно скоротити термін аналітичного визначення та покращити роздільну здатність аналітичних колонок.

Основними факторами, що впливають на розділення суміші жирних кислот, є довжина і діаметр капілярної колонки, тип нерухомої фази і товщина її плівки в колонці, природа газу-носія та його швидкість, температура колонки, а також тип системи введення проб у колонку (інжекційна система). Перші три фактори є характеристиками колонки, тому їх слід враховувати при виборі колонки для аналізу. Інші параметри належать до умов експерименту, їх можна легко змінювати. Розділювальна капілярна колонка є однією з основних частин газового хроматографа. Нині використовують капілярні колонки з внутрішнім діаметром 0,25–0,5 мм і довжиною від 10–20 до 100–200 м і більше [5; 6]. Найчастіше використовують капілярні колонки з внутрішнім діаметром 0,25 мм з тонкою плівкою нерухомої фази, рівномірно нанесеною безпосередньо на внутрішню поверхню колонки. Такі колонки мають високу проникність і ефективність розділення, що вимірюється мільйонами теоретичних тарілок.

Викладання основного матеріалу досліджень. Метою даного дослідження є наукове обґрунтування експрес-методу визначення жирнокислотного складу (в т.ч. транс-ізомерів жирних кислот) природних та модифікованих жирів.

Завдання дослідження:

- дослідити роздільну здатність аналітичних колонок провідних виробників щодо стандартної суміші метилових ефірів жирних кислот
- дослідити роздільну здатність та ідентифікацію транс-ізомерів жирних кислот: олеїнової, лінолевої та ліноленової (відповідно С18:1, С18:2, С18:3);
- визначити чинники, які суттєво впливають на роздільну здатність хроматографічних колонок та термін їх придатності.

Готування проб здійснювали згідно [7]. Метиліві ефіри жирних кислот готували за методикою, в якій як реагент для етерифікації використовують метилат натрію [8]. Необхідною умовою правильного приготування проби зразка є використання антиоксиданту – 0,05% розчину бутилгідрокітолуолу (ВНТ) у гептані, оскільки він запобігає передчасному окисненню приготовлених метилових ефірів. Наважку розплавленого жиру (100 мг) розчинили у 2 мл ВНТ в гептані. До отриманого розчину додали 5–6 крапель (≈ 100 мкл) метилату натрію, перемішали протягом 2 хв і залишили на 15 хв для відстоювання. Нейтралізували пробу за допомогою

1–2 г $\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Відміту пробу пропустили крізь безводний Na_2SO_4 для зневоднення і перенесли у другу пробірку, додали ще 2 мл розчинника – ВНТ в гептані, струсили та профільтрували у другу пробірку. Промили фільтр 1 мл ВНТ в гептані та отриману пробу перенесли до віали для подальшого хроматографічного аналізу.

Аналіз жирно-кислотного складу здійснювали за стандартною методикою [5]. Дослідження метилових ефірів жирних кислот проводили на газовому хроматографі 7890 В (Agilent Technologies, США).

Умови хроматографічного аналізу з капілярною колонкою:

– **HP-88** (88%-суанопропіл арил-полісилоксан, Agilent Technologies, США) довжиною 100 м, з внутрішнім діаметром 0,25 мм та товщиною нерухомої фази 0,2 мкм за наступних умов: швидкість потоку газу-носія – 1,2 мл/хв., коефіцієнт поділу потоку – 1:100, температура випарувача – 280°C, температура детектора (ПД) – 290°C, температурний режим колонки – поступовий нагрів від 60°C до 230°C. Об'єм інжекції – 1,0 мкл;

– **SP-2380** (рідка фаза запатентована виробником Supelco, США), довжина 100 м, внутрішній діаметр 0,25 мм, товщина фази 0,2 мкм. Параметри газового хроматографа: швидкість потоку газу-носія (гелій) – 1,2 мл/хв, спосіб введення зразків – з поділом потоку 100:1, температура інжектора – 280°C, температура детектора (ПД) – 290°C, програма термостату колонки – повільний нагрів зі швидкістю 3°/хв. від 40 °C до 260 °C . Об'єм інжекції – 1,0 мкл;

– **Zebbron FAME** (рідка фаза запатентована виробником Phenomenex, США) довжиною 100 м, з внутрішнім діаметром 0,25 мм та товщиною нерухомої фази 0,2 мкм за наступних умов: швидкість потоку газу-носія – 1,2 мл/хв., коефіцієнт поділу потоку – 1:100, температура випарувача – 280°C, температура детектора (ПД) – 290°C, температурний режим колонки – поступовий нагрів від 60°C до 230°C. Об'єм інжекції – 1,0 мкл.

Першим етапом наших досліджень був аналіз впливу факторів таких, як довжина, діаметр та якість рідкої фази колонки на роздільну здатність колонки. Роздільну здатність аналітичних колонок провідних виробників оцінювання шляхом аналізування стандартного зразка суміші метилових ефірів жирних кислот 37 (Component FAME Mix т.м. Supelco, США ат. № 47885-U).

Метиллові ефіри жирних кислот ідентифікували за часом утримання відповідно до часу утримання стандартної (еталонної) суміші (метод порівняння). Кількісний склад суміші визначили методом внутрішньої нормалізації, коли сума площ всіх піків приймається за 100% і концентрація будь-якого компонента проби розраховується як відносна площа піка. Оптимальні умови розділення метилових ефірів жирних кислот, в тому числі й їх ізомерів, було підтверджено за допомогою калібрування колонки стандартною сумішшю метилових ефірів жирних кислот.

Враховуючи, що останнім часом виробники аналітичних капілярних колонок патентують свій продукт і рідка фаза колонки не вказується виробником, як у випадку з колонками SP-2380 та Zebbron-FAME, наші дослідження були спрямовані на те, щоб дослідним шляхом завдяки підбору потоку газу носія та градієнту температури термостату колонок встановити мінімальний час дослідження метилових ефірів жирних кислот.

Хроматограми розділення стандартної суміші метилових ефірів жирних кислот, одержані за допомогою досліджених колонок виявили повну схожість за набором ідентифікованих жирних кислот, але різний час утримання компонентів. Так, час виходу останнього компонента C22:6h3 (цис-, цис-, цис-, цис-, цис-,

цис-4,7,10,13,16,19-докозагесаєнова кислота) складає: на колонці HP-88 – 76,3 хв., на колонці SP-2380 – 82,1 хв., а на колонці Zebtron-FAME – 36,2 хв.

Мінімальний час дослідження одержано експериментальним шляхом підбору газу носія від 0,81,2 мл/хв. та градієнту температури термостату колонок від 60°C до 230°C; 40°C до 100°C; 100°C до 230°C встановлено, що при потоці газу носія 1,2 мл/хв. та градієнту температури термостату колонок від 100°C до 230°C. Таким чином, за умови однакової якості рухомої фази на основну роздільну якість впливає співвідношення діаметру колонки до довжини, яке для колонки Zebtron-FAME складає $\approx 0,0042$, а для двох інших колонок – 0,0025. Необхідним та важливим є визначення вмісту транс-ізомерів ненасичених жирних кислот. Транс-форми жирних кислот у значній кількості утворюються під час промислової переробки жирів, наприклад, гідрогенізовані – каталітичної реакції, яка полягає у приєднанні водню до ненасичених ацильних груп ацилгліцеридів, що дозволяє одержати з рідких жирів тверді із заданою температурою плавлення, необхідною твердістю, пластичністю тощо [2]. Рослинні жири в натуральному вигляді (дезодоровані або фракціоновані) майже не містять транс-ізомерів, але при їх оброблянні (часткового або повного гідрогенізування, або дезодорування за дуже високих температур) у їхньому складі з'являється велика кількість транс-ізомерів. Найбільш поширеною ненасиченою кислотою є олеїнова C18:1. Вона міститься практично у всіх жирах (як рослинного, так і тваринного походження). Дослідження роздільної здатності та ідентифікації транс-ізомерів здійснено на аналітичних колонках HP-88, SP-2380, Zebtron-FAME.

Фрагменти хроматограм транс-ізомер олеїнової кислоти C18:1 у складі гідрогенізованого рослинного жиру представлено на рис. 1, 2, 3. Роздільна здатність колонок транс-ізомерів C18:1 відрізняється. Кращу роздільну здатність мають колонки SP-2380 та Zebtron-FAME (рис. 2, 3).

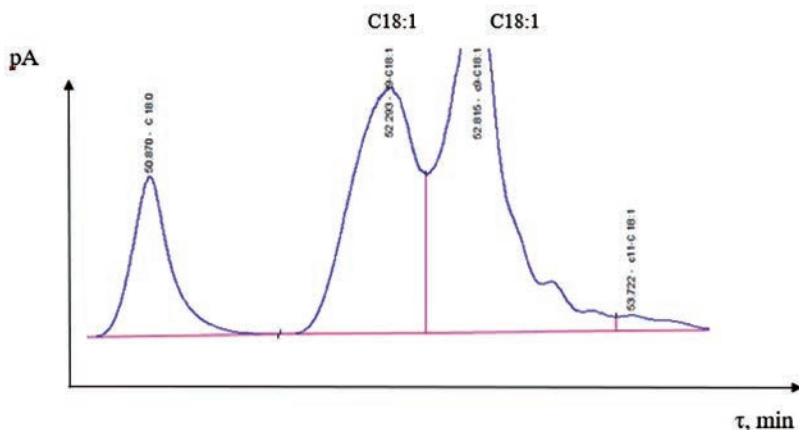


Рис. 1. Фрагмент хроматограми транс-ізомерів C18:1 на колонці HP-88

Враховуючи кращу роздільну здатність транс-ізомерів C18:1 подальші дослідження проводили на аналітичних колонках SP-2380 та Zebtron-FAME. Таким чином на аналітичних колонках були досліджені транс-ізомери лінолевої кислоти C18:2 (9t,12c-C18:2 та 9c,12t-C18:2) результати роздільної здатності колонок представлено на рис. 4, 5. Співставляючи фрагменти хроматограм на цих

рисунках видно, що роздільна здатність на колонках SP-2380 та Zebron-FAME транс-ізомерів лінолевої кислоти C18:2 (9t,12c-C18:2 та 9c,12t-C18:2) є однаковою.

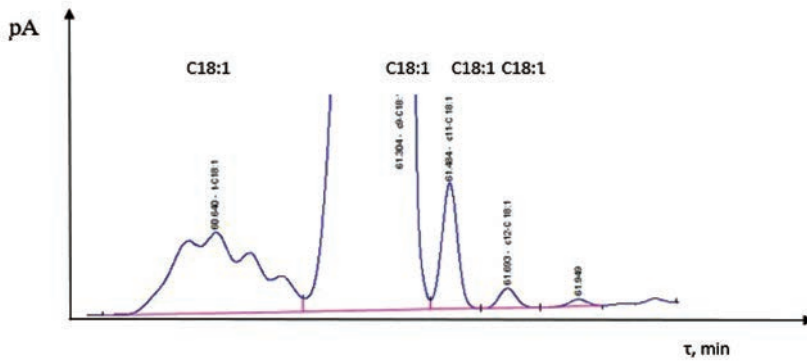


Рис. 2. Фрагмент хроматограми транс-ізомерів на колонці SP-2380 C18:1

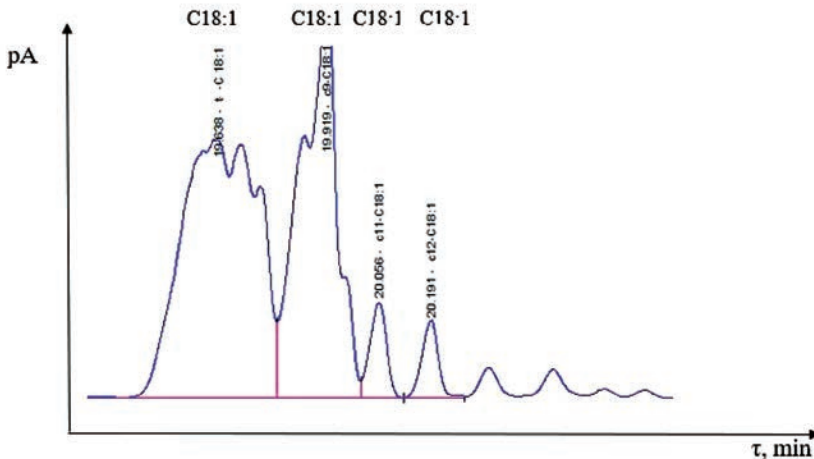


Рис. 3. Фрагмент хроматограми транс-ізомерів C18:1 на колонці Zebron-FAME

При дослідженні та транс-ізомерів ліноленової кислоти C18:3 встановлено, що на колонці Zebron-FAME результати є кращими ніж на колонці SP-2380, що підтверджено фрагментами хроматограм, представлених рис. 6, 7.

З часом експлуатації колонки піки цих жирних кислот зливаються, як це показано при дослідженнях на колонці HP-88 (рис. 8 А), а при використанні аналітичної колонки Zebron-FAME – інший порядок виходу, більша відстань між піками (рис. 8 Б). Тобто роздільна здатність колонки зберігається.

Слід зазначити, що під час ідентифікації рослинних олій певну хроматографічну складність представляє розділення так званої «критичної пари» транс-ізомерів жирних кислот – лінолевої та гадолеїнової (C18:3–C20:1).

Таким чином, для практичної реалізації хроматографічного методу аналізу вельми важливими є визначення умов функціонування хромато-графічних колонок, зокрема, якість прободготовки.

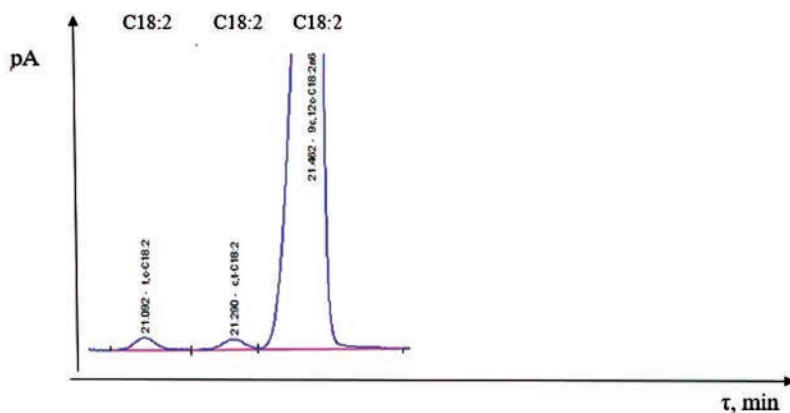


Рис. 4. Фрагмент хроматограми транс-ізомерів C18:2 (9*t*,12*c*-C18:2) та 9*c*,12*c*-C18:2) на колонці Zebron-FAME

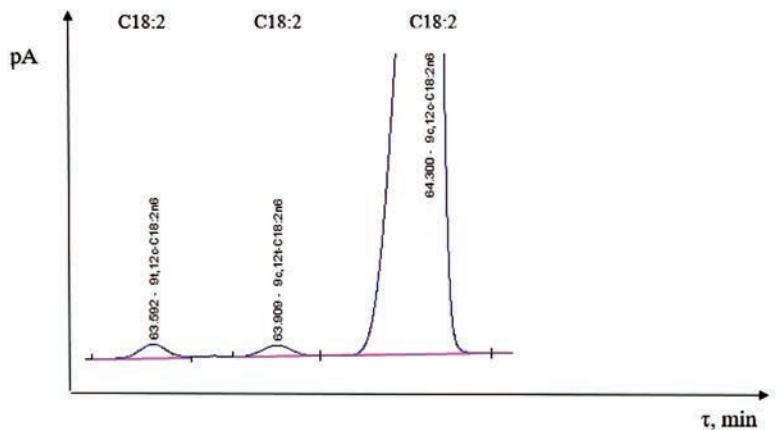


Рис. 5. Фрагмент хроматограми транс-ізомерів C18:2 (9*t*,12*c*-C18:2 та 9*c*,12*t*-C18:2) на колонці SP-2380

Тому подальші дослідження було спрямовано на перевірку реагентів, які приймають участь у підготовці проби метилових ефірів жирних кислот до дослідження.

Аналізуючи пробопідготовку, було зроблено акцент на повноту реакції гідроліза під час метилювання зразку жиру або олії, яке чиниться за участю метилату натрію. Аналіз метилових ефірів методом газорідинної хроматографії виявив, що при використанні свіжевикоротовленого розчину метилату натрію випробний зразок не містить домішок негідролізованих ацилгліцеринів. З часом використання метилату натрію на хроматограмі метилових ефірів жирних кислот з'являються піки ацилгліцеринів, які суттєво впливають на роздільну здатність хроматографічних колонок і негативно впливають на кінцевий результат. Експериментально визначено, що термін придатності метилату натрію, який забезпечує високу якість хроматографічного аналізу, складає один місяць.

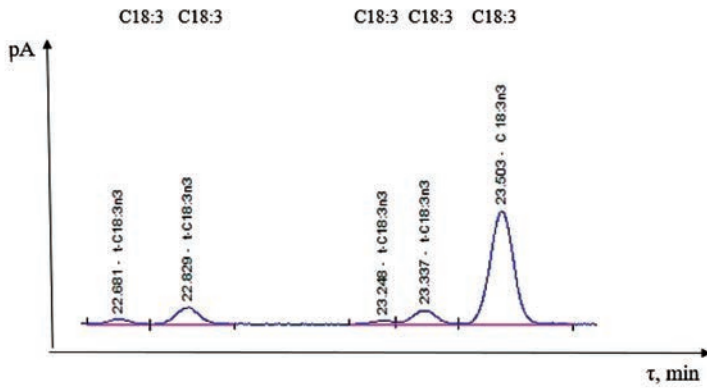


Рис. 6. Фрагмент хроматограми транс-ізомерів C18:3 на колонці Zebron-FAME

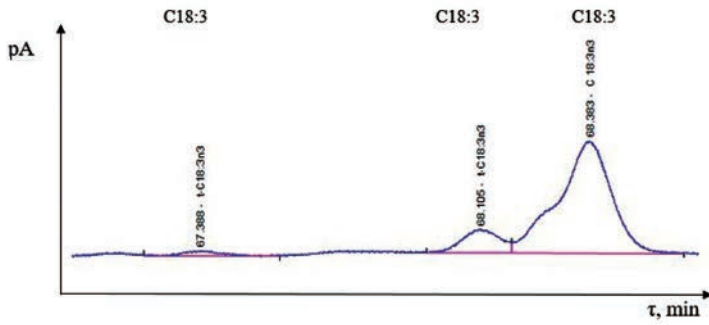


Рис. 7. Фрагмент хроматограми транс-ізомерів C18:3 на колонці SP-2380

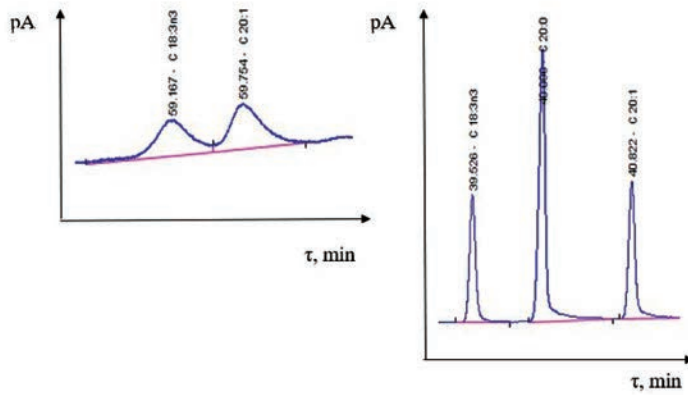


Рис. 8. Фрагмент хроматограми розподілу C18:3-C20:1 на колонках HP-88 (А) та Zebron-FAME (Б).

Висновки та перспективи подальшого розвитку даного напрямку. На підставі узагальнення експериментальних досліджень сформульовано такі висновки:

– результативність хроматографічного методу аналізу жирних кислот з використанням колонок провідних фірм США за умови відсутності даних щодо складу нерухомої фази, залежить від геометричних параметрів колонок та якості пробопідготовки;

– хроматограми розділення стандартної суміші метилових ефірів жирних кислот, одержані за допомогою 3-х досліджених колонок, виявили повну схожість за набором ідентифікованих жирних кислот, але різний час утримання компонентів; мінімальний час аналізування метилових ефірів досягнуто при використанні колонки Zebron-FAME – 36,2 хв., що вдвічі скорочує термін аналізу;

– кращу роздільну здатність колонки Zebron-FAME підтверджено під час аналізу метилових ефірів транс-ізомерів олеїнової (C18:1), лінолевої (C18:2), ліноленової (C18:3) кислот та ідентифікації «критичної пари» ліноленової та гадолеїнової кислот (C18:3–C20:1);

– якість хроматографічного аналізу, зокрема роздільна здатність колонок, залежить від умов пробопідготовки, яка в значній мірі лімітується терміном придатності основного реагенту – метилату натрія (1 місяць).

Подальші дослідження повинні бути спрямовані на узагальнення результатів моніторингу промислових випробувань експрес-методу визначення циста транс-ізомерів жирних кислот під час технохімконтролю виробництва природних та модифікованих жирів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. І.В. Левчук, І.М. Демидов, В.К. Тимченко. Технологічні аспекти запровадження систем безпечності харчових продуктів у схеми технохімконтролю сировини і готової продукції олієжирових виробництв / Левчук І.В., Демидов І.М., Тимченко В.К. *Вісник національного технічного університету «ХПІ». Серія: «Інноваційні дослідження у наукових роботах студентів»*. 2016. № 29(1201). С. 81–84.

2. Технологія модифікованих жирів : навч. посібник / Ф.Ф Гладкий, В.К. Тимченко, І.М. Демидов та ін., 2014. 241 с.

3. Про ідентифікацію для споживачів щодо харчових продуктів : Закон України від 6 грудня 2018 р. № 2639-VIII. *Відомості Верховної Ради*. 2019. № 7. С. 41.

4. Жирнокислотний, стеринний та ацилгліцеринний склад олій та жирів : довідник. І.В. Левчук, П.О. Некрасов, В.А. Кіщенко та ін., 2020. 207 с.

5. Жири та олії тваринні і рослинні. Аналізування методом газової хроматографії метилових ефірів жирних кислот : ДСТУ ISO 5508-2001. / Г. Єресько, М. Яцюта, М. Міщенко, О. Козаченко, С. Вербицький. Увед. вперше ; чинний від 2002-01-01. Київ : Держспоживстандарт України, 2002. 9 с. Національний стандарт України.

6. Trans fatty acids: scientific progress and labeling. *Bulletin of International Dairy Federation*. 2005. № 393. 25 р.

7. Жири тваринні і рослинні та олії. Готування випробного зразка : ДСТУ ISO 661:2004 [Текст]. Чинний від 01.05.2006. Київ : Держспоживстандарт України, 3 с.

8. Жири тваринні і рослинні та олії. Приготування метилових ефірів жирних кислот : ДСТУ ISO 5509-2002. / Г. Єресько, М. Яцюта, Г. Насирова, М. Міщенко, О. Козаченко. Увед. Вперше ; чинний від 2003-10-01. – Київ : Держспоживстандарт України, 2003. 22 с. Національний стандарт України.

REFERENCES:

1. Gladky F.F., Timchenko V.K., Demidov I.M. (2016) *Technologichni aspekty` zaprovadzhennya sy`stem bezpechnosti xarchovy`x produktiv u sxemy`*

texnoximkontrolyu sy'rovy'ny' i gotovoyi produkciyi oliyezhy'rovy'x vy'robny'cztv [Technological aspects of introduction of food safety systems in schemes of technochemical control of raw materials and finished products of oil and fat production]. Kharkiv: Visny'k nacional'nogo texnichnogo univerty'tetu «XPI» – Bulletin of the National Technical University “KhPI”, 29 (1201), 81–84 [in Ukrainian].

2. Gladky, F.F., Timchenko, V.K., Demidov, I.M. (2014) Texnologiyamody'fikovany'x zhy'riv: navch. posibny'k [Technology of modified fats] Kharkiv: Pidruchnyk NTU “KhPI” [in Ukrainian].

3. Zakon Ukrayiny' Pro identy'fikaciyu dlya spozhy'vachiv shhodo xarchovy'x produktiv (vidomosti Verxovnoyi rady'): pryiniaty 6 hrud. 2018 roku № 7 [Law of Ukraine. About identification for consumers concerning foodstuff (information of the Verkhovna Rada) from december 6 2018, № 7] p. 41.

4. Levchuk, I.V., Nekrasov, P.O., Kishchenko, V.A., Holubets, O.V., Tymchenko, V.K., Arutiunian, T.V. (2020) Zhyrnokyslotnyi, sterynovyi ta atsylhlitserynovyi sklad olii ta zhyriv: dovidnyk [Fatty acid, sterol and acylglycerol composition of oils and fats]. Kyiv: Stal' [in Ukrainian].

5. Zhyry ta olii tvarynni i roslynni. Analizuvannia metodom hazovoi khromatohrafi metylovykh efriv zhyrnykh kyslot [Animal and vegetable fats and oils. Analysis by gas chromatography of fatty acid methyl esters]. (2002). DSTU ISO 5508-2001 from 01st January 2002. Kyiv: Derzhstandart Ukraine [in Ukrainian].

6. Trans fatty acids: scientific progress and labeling. Bulletin od International Dairy Federation. (2005). № 393. p. 25.

7. Zhy'ry' tvary'nni i rosly'nni ta oliyi. Gotuvannya vy'probного zrazka [Animal and vegetable fats and oils. Preparation of a test sample]. (2004). DSTU ISO 661:2004 from 01st May 2006. Kyiv: Derzhstandart Ukraine [in Ukrainian].

8. Zhy'ry' tvary'nni i rosly'nni ta oliyi. Pry'gotuvannya mety'lovy'x efriv zhy'rny'x ky'slot [Animal and vegetable fats and oils. Preparation of methyl esters of fatty acids]. (2003). DSTU ISO 5509-2002 from 10th January 2003. Kyiv: Derzhstandart Ukraine [in Ukrainian].