

DIN EN ISO 22959



ICS 67.200.10

**Tierische und pflanzliche Fette und Öle –
Bestimmung polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoffe durch
gekoppelte Donor-Akzeptor-Komplex-Chromatographie und HPLC mit
Fluoreszenzdetektion (ISO 22959:2009);
Deutsche Fassung EN ISO 22959:2009**

Animal and vegetable fats and oils –

Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by on-line donor-acceptor complex chromatography and HPLC with fluorescence detection (ISO 22959:2009);

German version EN ISO 22959:2009

Corps gras d'origines animale et végétale –

Détermination de la teneur en hydrocarbures aromatiques polycycliques par chromatographie de complexe donneur-accepteur et CLHP avec détection par fluorescence (ISO 22959:2009);

Version allemande EN ISO 22959:2009

Gesamtumfang 28 Seiten

Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN

Nationales Vorwort

Diese Europäische Norm enthält unverändert die Internationale Norm ISO 22959:2009, die vom Unterkomitee SC 11 „Animal and vegetable fats and oils“ (Sekretariat: BSI, Vereinigtes Königreich) des Technischen Komitees ISO/TC 34 „Food products“ (Sekretariat: AFNOR, Frankreich) erarbeitet wurde. Auf Grund des Beschlusses des CEN/TC 307 wurde die Bearbeitung im parallelen Abstimmungsverfahren unter Federführung des ISO/SC 11 durchgeführt.

Die Mitarbeit des DIN beim Europäischen Komitee für Normung (CEN) wird für den Bereich des CEN/TC 307 (Sekretariat: AFNOR, Frankreich) über den „Gemeinschaftsausschuss für die Analytik von Fetten, Ölen, Fettprodukten, verwandten Stoffen und Rohstoffen“ (GA Fett) der Deutschen Gesellschaft für Fettwissenschaft (DGF) und des Normenausschusses Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) wahrgenommen.

Gegenüber dem ISO-Original wurde die falsche CAS-Nr. für Naphthalin in 3.2 korrigiert.

Für die in diesem Dokument zitierten Internationalen Normen wird im Folgenden auf die entsprechenden Deutschen Normen hingewiesen:

ISO 661	siehe	DIN EN ISO 661
ISO 1042	siehe	DIN EN ISO 1042
ISO 5555	siehe	DIN EN ISO 5555
ISO 5725-1	siehe	DIN ISO 5725-1
ISO 5725-2	siehe	DIN ISO 5725-2

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 661, *Tierische und pflanzliche Fette und Öle — Vorbereitung der Untersuchungsprobe*

DIN EN ISO 1042, *Laborgeräte aus Glas — Messkolben*

DIN EN ISO 5555, *Tierische und pflanzliche Fette und Öle — Probenahme*

DIN ISO 5725-1, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 1: Allgemeine Grundlagen und Begriffe*

DIN ISO 5725-2, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 2: Grundlegende Methode für Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision eines vereinheitlichten Messverfahrens*

Deutsche Fassung

**Tierische und pflanzliche Fette und Öle —
Bestimmung polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoffe
durch gekoppelte Donor-Akzeptor-Komplex-Chromatographie
und HPLC mit Fluoreszenzdetektion
(ISO 22959:2009)**

Animal and vegetable fats and oils —
Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by on-
line donor-acceptor complex chromatography and HPLC
with fluorescence detection
(ISO 22959:2009)

Corps gras d'origines animale et végétale —
Détermination de la teneur en hydrocarbures aromatiques
polycycliques par chromatographie de complexe donneur-
accepteur et CLHP avec détection par fluorescence
(ISO 22959:2009)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 1. Mai 2009 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim Management-Zentrum des CEN oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, der Schweiz, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

Management-Zentrum: Avenue Marnix 17, B-1000 Brüssel

Inhalt

Seite

Vorwort	3
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Kurzbeschreibung	6
5 Reagenzien, Materialien und Standardsubstanzen	6
5.1 Reagenzien	6
5.2 Standardsubstanzen	7
5.3 Standardlösungen	7
5.4 Eluents für die HPLC-Analyse	8
6 Prüfgerät	9
7 Probenahme und Vorbereitung der Untersuchungsprobe	9
8 Probenherstellung	10
8.1 Standardkalibrierproben	10
8.2 Zu prüfende Teilprobe	11
9 Durchführung	11
9.1 HPLC-Analyse	11
9.2 Identifizierung der PAK	11
10 Berechnung der einzelnen PAK	12
11 Daten für die Verfahrensvalidierung	12
11.1 Genauigkeit	12
11.2 Laborinterne Präzision	12
11.3 Wiederfindungsrate	13
11.4 Dynamischer Bereich	13
11.5 Quantifizierungsgrenze	13
12 Präzision	13
12.1 Internationaler Ringversuch	13
12.2 Wiederholpräzision	13
12.3 Vergleichpräzision	13
13 Prüfbericht	13
Anhang A (informativ) Beispiele der einzelnen Bestandteile eines HPLC-Systems	14
Anhang B (informativ) Beispiel für die Betriebsbedingungen der Pumpen des HPLC-Systems	15
Anhang C (informativ) Beispiel für die Betriebsbedingungen des Säulenthmostats und des Detektors des HPLC-Systems	16
Anhang D (informativ) Beispiel für das Autosampler-Programm des HPLC-Systems	17
Anhang E (informativ) Schlauchverbindungen des HPLC-Systems	18
Anhang F (informativ) Chromatogramm einer Kalibrierprobe	19
Anhang G (informativ) Bestimmungspräzision für Sonnenblumenöl, Bereich 0,1 µg/kg bis 3,5 µg/kg	20
Anhang H (informativ) Bestimmungspräzision für ein Olivenöl, Bereich 0,1 µg/kg bis 3,5 µg/kg	21
Anhang I (informativ) Bestimmungspräzision für ein Sojabohnenöl, Bereich 0,1 µg/kg bis 3,5 µg/kg	22
Anhang J (informativ) Bestimmungspräzision für ein Kokosnussöl, Bereich 0,1 µg/kg bis 3,5 µg/kg	23
Anhang K (informativ) Ringversuch	24
Literaturhinweise	26

Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 22959:2009) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 307 „Ölsamen, tierische und pflanzliche Fette und Öle und deren Nebenprodukte — Probenahme und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom AFNOR gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis November 2009, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis November 2009 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Texte dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN [und/oder CENELEC] sind nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Entsprechend der CEN/CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 22959:2009 wurde vom CEN als EN ISO 22959:2009 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Einleitung

Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) werden in pyrolytischen Prozessen, wie zum Beispiel bei der unvollständigen Verbrennung organischer Stoffe, gebildet oder sie sind petrogenen Ursprungs (Mineralöle). Speisefette und -öle können durch Umweltverschmutzung und/oder Verarbeitungsschritte vor dem Raffinieren verunreinigt sein. Das Vorhandensein von PAK in Fetten und Ölen stellt durch deren Karzinogenität ein Gesundheitsproblem dar. Unterschiedliche Konzentrationen von PAK wurden in Roh-Speiseölen gefunden. Das Raffinieren der Öle (Desodorierung, Bleichen, Kohlebehandlung) unter den geeigneten Bedingungen verringert den Gehalt der einzelnen PAK auf Werte im µg/kg-Bereich. Die bekannten Verfahren zur Analyse von PAK in Speisefetten und -ölen beinhalten komplexe und aufwändige Extraktions- und Reinigungsverfahren, um die geringen Konzentrationen der vorhandenen PAK zu isolieren.

Mit dem Verfahren der Donor-Akzeptor-Komplex-Chromatographie (DACC, en: donor-acceptor-complex-chromatography) können PAK aus verschiedenen Matrizen extrahiert werden. PAK sind Elektronendonors (π -Elektronen) und die starke Wechselwirkung zwischen den PAK und der stationären Phase eines Elektronenakzeptors führt zur Retention von PAK und zur Elution der (Masse der) anderen Bestandteile des Öls. Diese Internationale Norm legt ein automatisches Direktverfahren zur Bestimmung von PAK in Speisefetten und -ölen fest, das einfach als Routineanalyse anwendbar ist. Das Verfahren besteht aus einer LC-LC-Kopplung einer DACC-Reinigungssäule mit einer analytischen Trennsäule. Die Menge der PAK wird durch Fluoreszenzdetektion ermittelt.

Im Vergleich mit älteren Techniken ist bei diesem automatischen Direktverfahren die Menge des verwendeten Lösemittels deutlich geringer und es bietet eine beachtliche Zeitersparnis. Die DACC-Säulenreinigung ist schnell und wird während des HPLC-Durchlaufs der vorhergehenden Probe durchgeführt. Die Gesamtdauer der Analyse einer Probe beträgt etwa 90 min, verglichen mit den traditionellen Verfahren, die 8 h bis 10 h benötigen. Darüber hinaus kann das System 24 h/Tag betrieben werden. Letztendlich werden Verluste von flüchtigen PAK beispielsweise während der Lösemittelverdampfung eliminiert. Die Bestimmungsgrenzen von 0,1 µg/kg der einzelnen PAK wurden beim DACC-Verfahren zurückgehalten, welches automatisch mögliche unvollständige Retentionen korrigiert, da die Kalibrierproben derselben Behandlung unterzogen werden wie die zu analysierenden Proben. Das System wird mit üblichen HPLC-Geräten betrieben.

1 Anwendungsbereich

Diese Internationale Norm legt ein hochleistungs-flüssigchromatographisches (HPLC, en: high performance liquid chromatographic) Verfahren zur Bestimmung von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) in Speisefetten und -ölen.

Das Verfahren wurde bereits für Kokosnuss- (CN, en: coconut), Oliven- (OV, en: olive), Sonnenblumen- (SF, en: sunflower) und Sojabohnenöl (BO, en: Soyabean) validiert und ist möglicherweise anwendbar auf andere Öle, abhängig von der Bestimmung geeigneter Parameter.

Das geringste Niveau der Quantifizierung von PAKs beträgt 0,1 µg/kg. Die geringste mögliche Menge jedes PAK, die aus dem Basislinienrauschen differenziert werden kann, ist nicht ermittelt worden. Der validierte Konzentrationsbereich des Verfahrens liegt zwischen 0,1 µg/kg und 3,5 µg/kg für jeden einzelnen PAK. Für Proben, die (leichte) PAK-Gehalte > 3,5 µg/kg haben, ist eine Verdünnung möglich, um die Gehalte in einen validierten Bereich zu bringen. Eine Anpassung des Bereiches der Kalibrierkurven ist ebenfalls möglich. Bereiche oberhalb 3,5 µg/kg sind jedoch nicht validiert.

PAK, die mit diesem Verfahren bestimmt werden können sind: Anthracen, Phenanthren, Fluoranthren, Pyren, Chrysen, Benzo[a]anthracen, Benzo[e]pyren, Benzo[a]pyren, Perylen, Benzo[ghi]perylen, Anthanthren, Dibenzo[a,h]anthracen, Coronen, Indeno[1,2,3-cd]pyren, Benzo[a]fluoranthren, Benzo[b]fluoranthren, Benzo[k]fluoranthren.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden zitierten Dokumente sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

ISO 661, *Animal and vegetable fats and oils — Preparation of test sample*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

3.1

polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoff PAK

Verbindung, mit zwei oder mehreren kondensierten (verschmolzenen) aromatischen Kohlenwasserstoffringen enthält und dessen Gehalt, bestimmt mit dem in dieser Internationalen Norm festgelegten Verfahren

3.2

leichter polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoff

Verbindung mit zwei bis vier kondensierten (verschmolzenen) aromatischen Kohlenwasserstoffringen

BEISPIELE

Verbindung	CAS-Nr.	Verbindung	CAS-Nr.	Verbindung	CAS-Nr.
Acenaphthen	83-32-9	Benzo[e]pyren	192-97-2	Naphthalin	91-20-3
Acenaphthylen	208-96-8	Chrysen	218-01-9	Phenanthren	85-01-8
Anthracen	120-12-7	Fluoranthren	206-44-0	Pyren	129-00-0
Benzo[a]anthracen (1,2-Benzoanthracen)	56-55-3	Fluoren	86-73-79		

3.3

schwerer polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoff

Verbindung mit fünf und mehr kondensierten (verschmolzenen) aromatischen Kohlenwasserstoffringen

BEISPIELE

Verbindung	CAS-Nr.	Verbindung	CAS-Nr.	Verbindung	CAS-Nr.
Benzo[a]pyren (1,2-Benzopyren)	50-32-8	Benzo[k]fluoranthren	207-08-9	Dibenzo[a,h]anthracen (1,2,5,6-Dibenzoanthracen)	53-70-3
Benzo[a]fluoranthren	203-33-8	Benzo[ghi]perylene (1,12-Benzoperylene)	191-24-2	Indeno[1,2,3-cd]pyren	193-39-5
Benzo[b]fluoranthren	205-99-2	Coronen	191-07-1	Perylen	198-55-0

3.4

Gehalt an polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen

Massenanteil eines polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffes oder eines polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffgemisches in einer Matrix

BEISPIEL Einzelner polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoffgehalt; leichter polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoffgehalt; schwerer polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoffgehalt

ANMERKUNG Der Gehalt wird als Massenanteil in Mikrogramm je Kilogramm angegeben.

4 Kurzbeschreibung

PAK in Speiseölen werden durch gekoppelte Donor-Akzeptor-Komplex-Chromatographie (DACC) und HPLC mit Fluoreszenzdetektion bestimmt. Die Ölproben werden über einer Säule eluiert mit einer modifizierten stationären Phase (DACC-Säule), die als Elektronenakzeptor dient. Diese Säule hält die PAK (Elektronendonator) durch π - π -Wechselwirkung zurück. Nach der Elution des Öls werden die PAK direkt auf die analytische Umkehrphasensäule überführt. Die einzelnen PAK werden bei verschiedenen Wellenlängen erkannt. Die Retentionszeiten der PAK werden für die Identifizierung der einzelnen Bestandteile verwendet. Die Konzentrationen der PAK in den Ölproben werden durch Kalibrierung mit externem Standard berechnet.

5 Reagenzien, Materialien und Standardsubstanzen

WARNUNG — Das Verfahren erfordert gesundheitsschädliche Reagenzien. Die üblichen Labor-Sicherheitsvorschriften sind zu beachten. Alle PAK stehen in Verdacht, karzinogene Verbindungen zu sein. Daher muss die Herstellung der Stammlösungen, der Standardlösungen sowie der Kalibrierkurvenproben (5.3) unbedingt in einem Labor der Klasse 2 erfolgen. Darüber hinaus sind Laborkittel und Schutzhandschuhe für diese Arbeitsschritte zwingend erforderlich. Kontaminierte Tücher und Handschuhe müssen in einem Kunststoffbeutel gesammelt und entfernt werden, nachdem der Beutel versiegelt worden ist.

5.1 Reagenzien

5.1.1 Acetonitril, HPLC-Qualität, Massenanteil $w[\text{C}_2\text{H}_3\text{N}] > 99,9 \%$.

5.1.2 Ethylacetat, HPLC-Qualität, Massenanteil $w[\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2] > 99,8 \%$.

5.1.3 2-Propanol, HPLC-Qualität, Massenanteil $w[\text{C}_3\text{H}_8\text{O}] > 99,9 \%$.

5.1.4 Toluol, HPLC-Qualität, Massenanteil $w[\text{C}_7\text{H}_8] > 99,9 \%$.

5.1.5 Wasser, HPLC-Qualität.

5.2 Standardsubstanzen¹⁾

5.2.1 Anthracen, Massenanteil $w[\text{C}_{14}\text{H}_{10}] > 99 \%$.

5.2.2 Phenanthren, Massenanteil $w[\text{C}_{14}\text{H}_{10}] > 99 \%$.

5.2.3 Fluoranthren, Massenanteil $w[\text{C}_{16}\text{H}_{10}] > 99 \%$.

5.2.4 Pyren, Massenanteil $w[\text{C}_{16}\text{H}_{10}] > 99 \%$.

5.2.5 Chrysen, Massenanteil $w[\text{C}_{18}\text{H}_{12}] > 99 \%$.

5.2.6 Benzo[a]anthracen (1,2-Benzoanthracen), Massenanteil $w[\text{C}_{18}\text{H}_{12}] > 99 \%$.

5.2.7 Benzo[e]pyren, Massenanteil $w[\text{C}_{20}\text{H}_{12}] > 99 \%$.

5.2.8 Benzo[a]pyren (1,2-Benzopyren), Massenanteil $w[\text{C}_{20}\text{H}_{12}] > 99 \%$.

5.2.9 Perylen, Massenanteil $w[\text{C}_{20}\text{H}_{12}] > 99 \%$.

5.2.10 Benzo[ghi]perylene (1,12-Benzoperylene), Massenanteil $w[\text{C}_{22}\text{H}_{12}] > 99 \%$.

5.2.11 Anthanthren, Massenanteil $w[\text{C}_{22}\text{H}_{12}] > 99 \%$.

5.2.12 Dibenzo[a,h]anthracen (1,2,5,6-Dibenzoanthracen), Massenanteil $w[\text{C}_{22}\text{H}_{14}] > 99 \%$.

5.2.13 Coronen, Massenanteil $w[\text{C}_{24}\text{H}_{12}] > 99 \%$.

5.2.14 Indeno[1,2,3-cd]pyren, Massenanteil $w[\text{C}_{22}\text{H}_{12}] > 99 \%$.

5.2.15 Benzo[a]fluoranthren, Massenanteil $w[\text{C}_{20}\text{H}_{12}] > 99 \%$.

5.2.16 Benzo[b]fluoranthren, Massenanteil $w[\text{C}_{20}\text{H}_{12}] > 99 \%$.

5.2.17 Benzo[k]fluoranthren, Massenanteil $w[\text{C}_{20}\text{H}_{12}] > 99 \%$.

5.2.18 BCR zertifiziertes Referenzmaterial 458, Kokosnussöl mit 6 PAK.

5.3 Standardlösungen

5.3.1 PAK-Standardlösungen in Toluol, Massenkonzentration etwa 0,2 mg/ml. Etwa 10 mg aller PAK (5.2.1 bis 5.2.17) auf 0,01 mg in separate 50-ml-einmal-markierte-Messkolben (6.7) einwiegen und mit Toluol (5.1.4) bis zur Marke auffüllen.

1) IRMM (www.irmm.jrc.be) und Sigma-Aldrich (www.sigmaaldrich.com) sind geeignete Lieferanten. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Internationalen Norm und bedeutet keine Anerkennung von Produkten dieser Lieferanten durch ISO. Produkte anderer Herkunft dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu den gleichen Ergebnissen führen.