

DIN EN 17908

ICS 13.020.55

Einsprüche bis 2022-11-02

Entwurf**Algen und algenbasierte Produkte oder Zwischenprodukte –
Methoden zur Probeentnahme und Analyse –
Bestimmung von Gesamtlipiden mit der Ryckebosch-Foubert Methode;
Deutsche und Englische Fassung prEN 17908:2022**

Algae and algae-based products or intermediates –
Methods of sampling and analysis –
Determination of total lipids using the Ryckebosch-Foubert method;
German and English version prEN 17908:2022

Norme CEN pour la détermination des lipides totaux d'algues en utilisant la méthode de
Ryckebosch-Foubert;
Version allemande et anglaise prEN 17908:2022

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2022-09-02 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an nagus@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Grundlagen des Umweltschutzes (NAGUS), 10772 Berlin oder Am DIN-Platz, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin.

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 44 Seiten

DIN-Normenausschuss Grundlagen des Umweltschutzes (NAGUS)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17908:2022) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 454 „Algen und Algenprodukte“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN (Niederlande) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 172-00-16 AA „Algen und Algenprodukte“ im DIN-Normenausschuss Grundlagen des Umweltschutzes (NAGUS).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

**Algen und algenbasierte Produkte oder Zwischenprodukte – Methoden zur
Probeentnahme und Analyse – Bestimmung von Gesamtlipiden mit der
Ryckebosch-Foubert Methode**

Algae and algae-based products or intermediates – Methods of sampling and analysis – Determination of total lipids using the Ryckebosch-Foubert method

Norme CEN pour la détermination des lipides totaux d'algues en utilisant la méthode de Ryckebosch-Foubert

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	6
4 Kurzbeschreibung	6
5 Gerät	6
6 Reagenzien und Hilfsmittel	7
7 Probenahme und Probenhandhabung	7
8 Durchführung	7
8.1 Allgemeines	7
8.2 Verfahren ohne Zellaufschluss	8
8.2.1 Allgemeines	8
8.2.2 Erste Extraktion	8
8.2.3 Zweite Extraktion	9
8.3 Verfahren mit Zellaufschluss	10
8.3.1 Allgemeines	10
8.3.2 Erste Extraktion	10
8.3.3 Zweite Extraktion	11
9 Berechnungen	12
10 Qualitätskontrolle	13
10.1 Allgemeines	13
10.2 Vergleichpräzision zwischen Laboratorien	13
11 Prüfbericht	14
Anhang A (informativ) Ergebnisse des Ringversuchs und des Ringvergleichs	15
A.1 Einleitung	15
A.2 Ergebnisse des Ringversuchs	15
A.2.1 Einleitung	15
A.2.2 Material A, <i>Saccharina latissima</i>	15
A.2.3 Material B, <i>Nannochloropsis</i>	16
A.3 Ergebnisse des Ringvergleichs	17
A.3.1 Einleitung	17
A.3.2 Material A, <i>Saccharina latissima</i>	18
A.3.3 Material B, <i>Nannochloropsis</i>	18
Anhang B (informativ) Erläuterung zur Verwendung von Chloroform	20
B.1 Einleitung	20
B.2 Möglicher Ersatz von Chloroform durch Dichlormethan	20
Literaturhinweise	21

Bilder

Bild A.1 — Graphische Darstellung der berichteten Ergebnisse für Lipide in Material A	16
Bild A.2 — Graphische Darstellung der berichteten Ergebnisse für Lipide in Material A	16
Bild A.3 — Graphische Darstellung der berichteten Ergebnisse für Lipide in Material B	17
Bild A.4 — Graphische Darstellung der berichteten Ergebnisse für Lipide in Material B	17
Bild A.5 — Graphische Darstellung der berichteten Ergebnisse für Lipide in Material A	18
Bild A.6 — Graphische Darstellung der berichteten Ergebnisse für Lipide in Material B	19

Tabellen

Tabelle 1 — Qualitätsparameter der Ergebnisse des Ringvergleichs für die Ryckebosch-Foubert-Methode	13
Tabelle B.1 — Gesamtlipidgehalt von <i>Nannochloropsis</i> , angegeben in g/100 g trockene Biomasse	20

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17908:2022) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 454 „Algen und Algenprodukte“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wurde im Rahmen eines Normungsauftrags erarbeitet, den die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelsassoziation CEN erteilt haben, und unterstützt grundlegende Anforderungen der EU-Richtlinie(n).

Einleitung

Das Europäische Komitee für Normung (CEN) wurde von der Europäischen Kommission (EK) beauftragt, Europäische Normen oder europäische Normungsergebnisse zu erarbeiten, um die Umsetzung von Artikel 3 der Richtlinie 2009/28/EG für Algen und algenbasierte Produkte oder Zwischenprodukte zu unterstützen.

Dieser als Normungsauftrag M/547¹ vorgelegte Auftrag trägt auch zum Informationsaustausch über „Innovation für nachhaltiges Wachstum: Eine Bioökonomie für Europa“ bei.

Die frühere Arbeitsgruppe 218 „Algen“ des Technischen Lenkungsausschusses von CEN wurde im Jahr 2016 gegründet, um ein Arbeitsprogramm als Teil dieses Normungsauftrags zu erarbeiten. Das Technische Komitee CEN/TC 454 „Algen und Algenprodukte“ wurde gebildet, um das Arbeitsprogramm auszuführen, mit dem eine Normenreihe erarbeitet wird.

Das Interesse an Algen und algenbasierten Produkten oder Zwischenprodukten als wertvolle Quelle u. a. von Kohlenhydraten, Proteinen, Lipiden und verschiedenen Pigmenten hat in Europa deutlich zugenommen. Diese Stoffe eignen sich für ein breites Spektrum an Anwendungen, von Lebensmitteln und Futtermitteln bis hin zu anderen Bereichen wie Textilien, Kosmetika, Biopolymeren, Biokraftstoffen und Dünger/Biostimulanzien. Es wurde festgestellt, dass die Normung eine wichtige Rolle bei der Förderung der Nutzung von Algen und Algenprodukten spielt.

Die Arbeit des CEN/TC 454 sollte die Zuverlässigkeit der Lieferkette verbessern und so das Vertrauen der Industrie und der Verbraucher in Algen steigern, zu denen Makroalgen, Mikroalgen, Cyanobakterien, Labyrinthulomyceten (Netzschleimpilze), algenbasierte Produkte oder Zwischenprodukte gehören, und wird die Kommerzialisierung der europäischen Algenindustrie fördern und unterstützen.

Dieses Dokument wurde mit dem Ziel erarbeitet, die horizontalen Definitionen für Algen und algenbasierte Produkte oder Zwischenprodukte zu erfassen. Weitere Begriffe sind daher in den anderen erarbeiteten Normen des CEN/TC 454 „Algen und Algenprodukte“ enthalten.

Für Lebensmittel-, Futtermittel- und Non-Food- sowie Nicht-Futtermittelanwendungen können zusätzliche Definitionen in anderen produktspezifischen Normen vorliegen.

1 Abrufbar unter <http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/mandates/index.cfm?fuseaction=refSearch.search#>

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Laborverfahren zur Bestimmung des Gesamtlipidgehalts in Mikro- und Makroalgen mit der Ryckebosch-Foubert-Methode fest.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. 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).

EN 17399:2020, *Algen und Algenprodukte — Begriffe*

EN 17605:2022, *Algen und Algenprodukte — Methoden zur Probeentnahme und Analyse — Probebehandlung*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach EN 17399:2020 und die folgenden Begriffe.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

— ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <https://www.iso.org/obp>

— IEC Electropedia: verfügbar unter <https://www.electropedia.org/>

3.1

Gesamtlipidgehalt

alle unter den angegebenen Betriebsbedingungen aus der Messprobe extrahierten Lipidsubstanzen, ausgedrückt in % oder ‰ (d. h. mg/g oder g/kg) im Verhältnis zur Trockenmasse

4 Kurzbeschreibung

Die in der getrockneten und homogenisierten Algenbiomasse enthaltenen Lipide werden mit Chloroform/Methanol extrahiert. Anschließend wird eine Gegenstromextraktion mit Wasser durchgeführt, um die Nicht-Lipide zu entfernen. Es werden zwei aufeinanderfolgende Extraktionen mit jeweils zwei Phasen durchgeführt, die wie in Anhang A beschrieben optimiert wurden. Nach der Entfernung der Lösemittel wird die Gesamtlipidmenge gravimetrisch bestimmt.

5 Gerät

5.1 Rotationsverdampfer, einschließlich einer Vakuumpumpe mit einstellbarem Vakuumwert

5.2 Zentrifuge, auf Raumtemperatur

5.3 Vortexmischer

5.4 Analysenwaage mit einer Ablesepräzision von möglichst 0,01 mg

5.5 Schwingmühle mit Mahlkugeln (nur wenn Verfahren 8.2 verwendet wird)

Unterschiedliche Schwingmühlen und/oder Zellen können zu abweichenden Ergebnissen führen. Daher müssen bei Verwendung von Verfahren 8.2 die Spezifikationen der verwendeten Schwingmühle und Zellart im Bericht angegeben werden.

6 Reagenzien und Hilfsmittel

- 6.1 **Pyrex-Röhrchen mit Schraubverschluss**, 10 ml (1/Messprobe) oder vergleichbare Glasgefäße
- 6.2 **Pyrex-Röhrchen mit Schraubverschluss**, 20 ml (1/Messprobe) oder vergleichbare Glasgefäße
- 6.3 **Trichter** (1/Messprobe)
- 6.4 **Filterpapier mit 180 µm** (1/Messprobe), z. B. Whatman Typ Nr. 1
- 6.5 **Pasteurpipetten**
- 6.6 **Rundbodenkolben**, geeignet zur Verwendung mit der Analysenwaage (nicht über dem Höchstgewicht) für den Rotationsverdampfer (1/Messprobe), mit der gleichen Temperatur wie die Waage (um Wägefehler zu vermeiden)
- 6.7 **Mikropipetten**
- 6.8 **Chloroform** (mit einer Reinheit von mindestens 99,0 % (V/V))
- 6.9 **Methanol** (mit einer Reinheit von mindestens 99,0 % (V/V))
- 6.10 **Chloroform/Methanol (1:1 nach Volumen)**
- 6.11 **Wasserfreies Natriumsulfat**
- 6.12 **Entmineralisiertes Wasser**

7 Probenahme und Probenhandhabung

Die Probenahme ist nicht Bestandteil des im vorliegenden Dokument festgelegten Verfahrens. Ein empfohlenes Probenahmeverfahren ist in EN 17605:2022 angegeben, mit den folgenden Anpassungen/Ergänzungen:

- die Feinvermahlung muss wie in 3.13 in EN 17605:2022 definiert durchgeführt werden;
- der Transport muss auf Trockeneis erfolgen;
- die Lagerung muss bei -80 °C erfolgen. Auch müssen Makroalgen gefriergetrocknet werden.

Übermäßige Lagerungszeiten der Probe sollten vermieden werden. Falls diese nicht vermieden werden konnten, sollte die Probe vor der Verwendung erneut gefriergetrocknet werden.

Es müssen drei Messproben der Probe analysiert werden, um den Mittelwert und die Standardabweichung berechnen zu können.

8 Durchführung

8.1 Allgemeines

Manche Algen, die unter spezifischen Kulturbedingungen kultiviert wurden, können einen hohen Lipidgehalt und/oder eine starre Zellhülle aufweisen, was dazu führt, dass vor der Extraktion ein Zellaufschluss erforderlich ist. Für diese Fälle wurde Verfahren 8.2 entwickelt. Für Arten oder Kulturbedingungen, die noch nie zuvor analysiert wurden, müssen sowohl das Verfahren 8.1 als auch das Verfahren 8.2 durchgeführt und die Ergebnisse verglichen werden. In diesem Fall werden zuerst beide Verfahren durchgeführt (8.1 ohne Zellaufschluss und 8.2 mit Zellaufschluss), und die Ergebnisse werden verglichen. Falls der Gesamtlipidgehalt bei Anwendung von Verfahren 8.2 signifikant höher ist (Signifikanzniveau: 0,01) als bei Anwendung von Verfahren 8.1, wird für diese Probe weiterhin Verfahren 8.2 angewendet; andernfalls wird Verfahren 8.1 eingehalten.

Es ist nicht angebracht, das Zellaufschlussverfahren immer einzuschließen, da dieses für die meisten Proben nicht erforderlich ist und sogar zu niedrigeren Werten (aufgrund des Verlusts durch die Mahlkugeln) und höheren Abweichungen bei den Ergebnissen führt. Es setzt auch voraus, dass im Labor Spezialgeräte verfügbar sein sollten.

Bei allen Standardalgen, die unter Standardkultivierungsbedingungen kultiviert wurden, ist kein Zellaufschlussverfahren erforderlich, um alle Lipide zu extrahieren, und es ist Verfahren 8.1 anzuwenden.

8.2 Verfahren ohne Zellaufschluss

8.2.1 Allgemeines

Das Verfahren ohne Zellaufschluss muss in den folgenden Schritten durchgeführt werden. Das gesamte Verfahren, ausgenommen das Wägen, sollte unter dem Abzug durchgeführt werden.

8.2.2 Erste Extraktion

- a) Eine Messprobe von etwa 100 mg der Probe in ein 10-ml-Pyrex-Röhrchen mit Schraubverschluss einwiegen (d. h. Gewicht der Messprobe). Das Gewicht auf 0,01 mg (oder 0,1 mg, abhängig von der Ablesepräzision der Analysenwaage) aufzeichnen;
- b) 4 ml Methanol zugeben, gefolgt von 2 ml Chloroform;
- c) 0,4 ml entmineralisiertes Wasser zugeben;
- d) Mindestens 30 s im Vortexmischer mischen, bis die einzelnen Schichten gut durchmischt sind;
- e) 2 ml Chloroform zugeben, gefolgt von 2 ml Wasser (das 10-ml-Pyrex-Röhrchen ist nun vollständig gefüllt);
- f) Mindestens 30 s im Vortexmischer mischen, bis die einzelnen Schichten gut durchmischt sind;
- g) Das Röhrchen bei 450 g für 10 min zentrifugieren;
- h) Nach dem Zentrifugieren bilden sich 2 Lösemittelphasen (häufig getrennt durch das Biomasse-Pellet); die obere Schicht mit einer Pasteurpipette in einen Abfallbehälter entsorgen;

ANMERKUNG Bei dieser Schicht handelt es sich um Abfall, sie enthält Zucker, Proteine und Mineralien.

- i) Die untere Schicht mit einer Pasteurpipette in ein 20-ml-Pyrex-Röhrchen mit Schraubverschluss überführen. Für jede Messprobe muss eine andere Pasteurpipette verwendet werden. Diese Pipette sollte für die zweite Extraktion im 20-ml-Röhrchen belassen werden;

Es wird empfohlen, das Röhrchen um etwa 45° geneigt zu halten. Dadurch bewegt sich das Pellet, und es ist Platz verfügbar, um die Pasteurpipette am Biomasse-Pellet vorbeizuführen, ohne es zu berühren. Es ist möglich, dass das Pellet beim Neigen in kleinere Teile zerbricht, was kein Problem darstellt.

- j) Das Pellet im 10-ml-Pyrex-Röhrchen belassen;
- k) Zu diesem Pellet 4 ml Chloroform/Methanol (1:1) zugeben;
- l) Mindestens 30 s im Vortexmischer mischen, bis die einzelnen Schichten gut durchmischt sind;
- m) Das Röhrchen bei 450 g für 10 min zentrifugieren;
- n) Nach dem Zentrifugieren ist nur 1 Phase zu sehen. Diese Lösemittelschicht mit der gleichen Pasteurpipette wie zuvor in das gleiche 20-ml-Pyrex-Röhrchen wie zuvor überführen.

8.2.3 Zweite Extraktion

Schritt a) der ersten Extraktion für das gleiche verbliebene Biomasse-Pellet wiederholen. (Die neue Biomasse nicht wägen). Dann mit den folgenden Schritten fortfahren:

- a) 4 ml Methanol zugeben, gefolgt von 2 ml Chloroform;
- b) Mindestens 30 s im Vortexmischer mischen, bis die einzelnen Schichten gut durchmischt sind;
- c) 2 ml Chloroform zugeben, gefolgt von 2 ml Wasser (das 10-ml-Pyrex-Röhrchen ist nun vollständig gefüllt);
- d) Mindestens 30 s im Vortexmischer mischen, bis die einzelnen Schichten gut durchmischt sind;
- e) Das Röhrchen bei 450 g für 10 min zentrifugieren;
- f) Nach dem Zentrifugieren bilden sich 2 Lösemittelphasen; die obere Schicht mit einer Pasteurpipette in einen Abfallbehälter entsorgen;
- g) Die untere Schicht mit der gleichen Pasteurpipette wie zuvor, die sich noch im Röhrchen befindet, in das gleiche 20-ml-Pyrex-Röhrchen wie zuvor überführen. Nach diesem Schritt kann die Pipette entsorgt werden;
- h) Das Pellet im 10-ml-Pyrex-Röhrchen belassen;
- i) Zu diesem Pellet 4 ml Chloroform/Methanol (1:1) zugeben;
- j) Mindestens 30 s im Vortexmischer mischen, bis die einzelnen Schichten gut durchmischt sind;
- k) Den Rundbodenkolben (der zuvor bei 103 °C ofengetrocknet und dann abgekühlt wurde) auf der Analysenwaage auf 0,01 mg (oder 0,1 mg, abhängig von der Ablesepräzision der Analysenwaage) wägen (d. h. Gewicht des leeren Kolbens);
- l) Den Rundbodenkolben mit einem Trichter und Filterpapier Nr. 1 ausstatten. 5 g Natriumsulfat in das Filterpapier geben;

Es ist sehr wichtig, dass kein Natriumsulfatpulver in den Kolben gelangt, andernfalls wird der Gesamtidgehalt zu hoch eingeschätzt. Das Vorhandensein von Kristallen nach der Trocknung ist ein Anzeichen, dass Natriumsulfat in den Kolben gelangt ist. Falls dies auftritt, muss das Verfahren mit einer neuen Probe erneut begonnen werden. Es wird besondere Sorgfalt angeraten.

- m) Das Lösemittel aus dem 20-ml-Pyrex-Röhrchen durch das Filterpapier mit der Natriumsulfatschicht filtrieren, um das verbliebene Wasser zu entfernen;
- n) Das Lösemittel aus dem 10-ml-Pyrex-Röhrchen, das nach der erneuten Extraktion nur 1 Lösemittelschicht und das Pellet enthält, genauso behandeln. Beim Filtrieren des Lösemittels durch das Filterpapier kann auch das Pellet in das Filterpapier gelangen. Dies ist kein Problem;
- o) Nach dem Filtrieren, wenn die 10-ml-Röhrchen und 20-ml-Röhrchen leer sind, werden die Röhrchen und das Filterpapier sorgfältig mit Chloroform/Methanol (1:1) gespült. Die Röhrchen werden zweimal gespült, wobei jedes Mal das Volumen einer Pasteurpipette verwendet wird. Die Filterpapiere werden dreimal gespült, jedes Mal mit dem 6-fachen Volumen einer Pasteurpipette (es kann ein grüner Schleier auf dem Filterpapier zurückbleiben). Die Menge an Chloroform/Methanol braucht nicht ganz genau eingehalten werden;
- p) Wenn sich das gesamte Lösemittel im Kolben befindet, kann es bei vermindertem Druck mit dem folgenden Programm mit einem Rotationsverdampfer entfernt werden:

- von 300 mbar bis 270 mbar über einen Zeitraum von 2 min;
- von 270 mbar bis 160 mbar über einen Zeitraum von 5 min;
- bei 160 mbar für 5 min halten;
- von 160 mbar bis 43 mbar über einen Zeitraum von 1 min;
- bei 43 mbar für 4 min halten.

Während dieses Prozesses rotiert der Rundbodenkolben sanft (100 bis 200 Umdrehungen je Minute) in einem warmen Wasserbad bei 40 °C (nicht höher). Die letzten Kondenswasserreste müssen durch manuelles Spülen mit Stickstoff entfernt werden. Dafür die Pasteurpipette mit einer Schlauchverbindung mit der Stickstoffquelle verbinden und die Spitze der Pasteurpipette im Kolben bewegen. Falls das Spülen mit Stickstoff nicht möglich ist, diesen Schritt einfach weglassen (oder den Kolben länger auf dem Rotationsverdampfer oder über Nacht im Abzug belassen); den Schritt nicht durch Erhitzen auf höhere Temperaturen als 40 °C ersetzen.

- q) Den Kolben 15 min in einem Exsikkator auf Raumtemperatur abkühlen lassen und erneut auf 0,01 mg (oder 0,1 mg, abhängig von der Ablesepräzision der Analysenwaage) wägen (d. h. Gewicht des Kolbens nach der Extraktion).

8.3 Verfahren mit Zellaufschluss

8.3.1 Allgemeines

Das Verfahren mit Zellaufschluss muss in den folgenden Schritten durchgeführt werden. Das gesamte Verfahren, ausgenommen das Wägen, muss unter dem Abzug durchgeführt werden.

8.3.2 Erste Extraktion

- a) Eine Messprobe von etwa 100 mg der Probe in den Mahlbehälter der Schwingmühle einwiegen (d. h. Gewicht der Messprobe);
- b) Das Gewicht auf 0,01 mg (oder 0,1 mg, abhängig von der Ablesepräzision der Analysenwaage) aufzeichnen;
- c) 2 ml Methanol und eine Mahlkugel zugeben;
- d) 15 min bei 30 Hz mahlen;
- e) Das Lösemittel in ein 10-ml-Pyrex-Röhrchen überführen;
- f) 2 ml Methanol in den Mahlbehälter der Schwingmühle zugeben, schütteln und das Lösemittel in das 10-ml-Pyrex-Röhrchen überführen;
- g) 2 ml Chloroform in den Mahlbehälter der Schwingmühle zugeben, schütteln und das Lösemittel in das 10-ml-Pyrex-Röhrchen überführen;
- h) 0,4 ml entmineralisiertes Wasser in das 10-ml-Pyrex-Röhrchen zugeben;
- i) Mindestens 30 s im Vortexmischer mischen, bis die einzelnen Schichten gut durchmischt sind;
- j) 2 ml Chloroform zugeben, gefolgt von 2 ml Wasser (das 10-ml-Pyrex-Röhrchen ist nun vollständig gefüllt);
- k) Mindestens 30 s im Vortexmischer mischen, bis die einzelnen Schichten gut durchmischt sind;
- l) Das Röhrchen bei 450 g für 10 min zentrifugieren;

- m) Nach dem Zentrifugieren bilden sich 2 Lösemittelphasen (häufig getrennt durch das Biomasse-Pellet); die obere Schicht mit einer Pasteurpipette in einen Abfallbehälter entsorgen;

ANMERKUNG Bei dieser Schicht handelt es sich um Abfall, sie enthält Zucker, Proteine und Mineralien.

- n) Die untere Schicht mit einer Pasteurpipette in ein 20-ml-Pyrex-Röhrchen mit Schraubverschluss überführen. Für jede Messprobe eine andere Pasteurpipette verwenden und diese Pipette für die zweite Extraktion im 20-ml-Röhrchen belassen;

Es wird empfohlen, das Röhrchen um etwa 45° geneigt zu halten. Dadurch bewegt sich das Pellet, und es ist Platz verfügbar, um die Pasteurpipette am Biomasse-Pellet vorbeizuführen, ohne es zu berühren. Es ist möglich, dass das Pellet beim Neigen in kleinere Teile zerbricht, was kein Problem darstellt.

- o) Das Pellet im 10-ml-Pyrex-Röhrchen belassen. Zu diesem Pellet 4 ml Chloroform/Methanol (1:1) zugeben;
p) Mindestens 30 s im Vortexmischer mischen, bis die einzelnen Schichten gut durchmischt sind;
q) Das Röhrchen bei 450 g für 10 min zentrifugieren;
r) Nach dem Zentrifugieren ist nur 1 Phase zu sehen. Diese Lösemittelschicht mit der gleichen Pasteurpipette wie zuvor in das gleiche 20-ml-Pyrex-Röhrchen wie zuvor überführen.

8.3.3 Zweite Extraktion

Schritt a) und Schritt b) von 8.2.1 für das gleiche verbliebene Biomasse-Pellet wiederholen. (Die neue Biomasse nicht wägen). Dann mit den folgenden Schritten fortfahren:

- a) 4 ml Methanol zugeben, gefolgt von 2 ml Chloroform;
b) Mindestens 30 s im Vortexmischer mischen, bis die einzelnen Schichten gut durchmischt sind;
c) 2 ml Chloroform zugeben, gefolgt von 2 ml Wasser (das 10-ml-Pyrex-Röhrchen ist nun vollständig gefüllt);
d) Mindestens 30 s im Vortexmischer mischen, bis die einzelnen Schichten gut durchmischt sind;
e) Das Röhrchen bei 450 g für 10 min zentrifugieren;
f) Nach dem Zentrifugieren bilden sich 2 Lösemittelphasen; die obere Schicht mit einer Pasteurpipette in einen Abfallbehälter entsorgen;
g) Die untere Schicht mit der gleichen Pasteurpipette wie zuvor, die sich noch im Röhrchen befindet, in das gleiche 20-ml-Pyrex-Röhrchen wie zuvor überführen. Nach diesem Schritt kann die Pipette entsorgt werden;
h) Das Pellet im 10-ml-Pyrex-Röhrchen belassen;
i) Zum Pellet 4 ml Chloroform/Methanol (1:1) zugeben;
j) Mindestens 30 s im Vortexmischer mischen, bis die einzelnen Schichten gut durchmischt sind;
k) Den Rundbodenkolben auf der Analysenwaage auf 0,01 mg (oder 0,1 mg, abhängig von der Ablesepräzision der Analysenwaage) wägen (d. h. Gewicht des leeren Kolbens);
l) Den Rundbodenkolben mit einem Trichter und Filterpapier Nr. 1 ausstatten;
m) 5 g Natriumsulfat in das Filterpapier geben;

Es ist sehr wichtig, dass kein Natriumsulfatpulver in den Kolben gelangt, andernfalls wird der Gesamtlipidgehalt zu hoch eingeschätzt. Das Vorhandensein von Kristallen nach der Trocknung ist ein Anzeichen, dass Natriumsulfat in den Kolben gelangt ist. Falls dies auftritt, muss das Verfahren mit einer neuen Probe erneut begonnen werden. Es wird besondere Sorgfalt angeraten.

- n) Das Lösemittel aus dem 20-ml-Pyrex-Röhrchen durch das Filterpapier mit der Natriumsulfatschicht filtrieren, um das verbliebene Wasser zu entfernen;
- o) Das Lösemittel aus dem 10-ml-Pyrex-Röhrchen, das nach der erneuten Extraktion nur 1 Lösemittelschicht und das Pellet enthält, genauso behandeln. Beim Filtrieren des Lösemittels durch das Filterpapier kann auch das Pellet in das Filterpapier gelangen; dies ist aber kein Problem;
- p) Nach dem Filtrieren, wenn die 10-ml-Röhrchen und 20-ml-Röhrchen leer sind, werden die Röhrchen und das Filterpapier sorgfältig mit Chloroform/Methanol (1:1) gespült. Die Röhrchen werden zweimal gespült, wobei jedes Mal das Volumen einer Pasteurpipette verwendet wird. Die Filterpapiere werden dreimal gespült, jedes Mal mit dem 6-fachen Volumen einer Pasteurpipette (es kann ein grüner Schleier auf dem Filterpapier zurückbleiben). Die Menge an Chloroform/Methanol braucht nicht ganz genau eingehalten werden;
- q) Wenn sich das gesamte Lösemittel im Kolben befindet, kann es bei vermindertem Druck mit dem folgenden Programm mit einem Rotationsverdampfer entfernt werden:
- von 300 mbar bis 270 mbar über einen Zeitraum von 2 min;
 - von 270 mbar bis 160 mbar über einen Zeitraum von 5 min;
 - bei 160 mbar für 5 min halten;
 - von 160 mbar bis 43 mbar über einen Zeitraum von 1 min;
 - bei 43 mbar für 4 min halten.

Während dieses Prozesses rotiert der Rundbodenkolben sanft (100 bis 200 Umdrehungen je Minute) in einem warmen Wasserbad bei 40 °C (nicht höher). Die letzten Kondenswasserreste müssen durch manuelles Spülen mit Stickstoff entfernt werden. Dafür die Pasteurpipette mit einer Schlauchverbindung mit der Stickstoffquelle verbinden und die Spitze der Pasteurpipette im Kolben bewegen. Falls das Spülen mit Stickstoff nicht möglich ist, diesen Schritt einfach weglassen (oder den Kolben länger auf dem Rotationsverdampfer oder über Nacht im Abzug belassen); den Schritt nicht durch Erhitzen auf höhere Temperaturen als 40 °C ersetzen.

- r) Den Kolben 15 min bei Raumtemperatur belassen und erneut auf 0,01 mg (oder 0,1 mg, abhängig von der Ablesepräzision der Analysenwaage) wägen (d. h. Gewicht des Kolbens nach der Extraktion).

9 Berechnungen

Der Gesamtlipidgehalt muss anhand von Gleichung (1) berechnet werden:

$$w_{\text{lipid content}} = 100 \times (m_{\text{flask after extraction}} - m_{\text{empty flask}}) / m_{\text{test portion}} \quad (1)$$

Dabei ist:

- $w_{\text{lipid content}}$ der Gesamtlipidgehalt, angegeben als Massenanteil in Prozent (%);
- $m_{\text{flask after extraction}}$ die Summe der Massen von Kolben und Messprobe nach der Extraktion, angegeben in g;
- $m_{\text{empty flask}}$ die Masse des leeren Kolbens, angegeben in g;