

DIN EN ISO 12966-2



ICS 67.200.10

Entwurf

Einsprüche bis 2017-01-18
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN ISO 12966-2:2011-05

**Tierische und pflanzliche Fette und Öle –
Gaschromatographie von Fettsäuremethylestern –
Teil: 2: Herstellung von Fettsäuremethylestern (ISO/FDIS 12966-2:2016);
Deutsche und Englische Fassung FprEN ISO 12966-2:2016**

Animal and vegetable fats and oils –
Gas chromatography of fatty acid methyl esters –
Part 2: Preparation of methyl esters of fatty acids (ISO/FDIS 12966-2:2016);
German and English version FprEN ISO 12966-2:2016

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/FDIS 12966-2:2016);
Version allemande et anglaise FprEN ISO 12966-2:2016

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2016-11-18 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 nal@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 Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL), 10772 Berlin, 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 49 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (FprEN ISO 12966-2:2016) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ (Sekretariat: AFNOR, Frankreich) 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 von AFNOR (Frankreich) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-05-05 AA „Gemeinschaftsausschuss für die Analytik von Fetten, Ölen, Fettprodukten, verwandten Stoffen und Rohstoffen“ (GA Fett) der Deutschen Gesellschaft für Fettwissenschaft (DGF) und des DIN-Normenausschusses Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

Dieses Dokument ist Teil der Normenreihe ISO 12966 zur gaschromatographischen Untersuchung von Fettsäuremethylestern. ISO 12966, *Animal and vegetable fats and oils — Gas chromatography of fatty acid methyl esters* besteht aus:

- *Part 1: Guidelines on modern gas chromatography of fatty acid methyl esters*
- *Part 2: Preparation of methyl esters of fatty acids*
- *Part 3: Preparation of methyl esters using trimethylsulfonium hydroxide (TMSH)*
- *Part 4: Determination by capillary gas chromatography*

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 835	siehe DIN EN ISO 835
ISO 1042	siehe DIN EN ISO 1042
ISO 3696	siehe DIN ISO 3696
ISO 4800	siehe DIN ISO 4800
ISO 8655-2	siehe DIN EN ISO 8655-2

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung der FprEN ISO 12966-2 beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Änderungen

Gegenüber DIN EN ISO 12966-2:2011-05 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Milch und Milcherzeugnisse (oder Fett aus Milch und Milcherzeugnissen) wurden vom Anwendungsbereich dieser Norm ausgenommen;
- b) Abschnitt 3 Begriffe neu aufgenommen;
- c) Norm redaktionell überarbeitet und den derzeit gültigen Gestaltungsregeln angepasst.

Nationaler Anhang NA
(informativ)

Literaturhinweise

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

DIN EN ISO 835, *Laborgeräte aus Glas — Messpipetten*

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

DIN EN ISO 8655-2, *Volumenmessgeräte mit Hubkolben — Teil 2: Kolbenhubpipetten*

DIN ISO 3696, *Wasser für analytische Zwecke — Anforderungen und Prüfungen*

DIN ISO 4800, *Laborgeräte aus Glas — Scheidetrichter und Tropftrichter*

— Leerseite —

Tierische und pflanzliche Fette und Öle — Gaschromatographie von Fettsäuremethylestern — Teil 2: Herstellung von Fettsäuremethylestern (ISO/FDIS 12966-2:2016)

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/FDIS 12966-2:2016)

Animal and vegetable fats and oils — Gas chromatography of fatty acid methyl esters — Part 2: Preparation of methyl esters of fatty acids (ISO/FDIS 12966-2:2016)

ICS:

Deskriptoren:

Dokument-Typ: Europäische Norm
Dokument-Untertyp:
Dokumentstufe: parallele formelle Abstimmung vorgelegt
Dokumentsprache: D

STD Version 2.8f

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Vorwort	5
Einleitung	6
1 Anwendungsbereich	9
2 Normative Verweisungen	9
3 Begriffe	9
4 Reaktionen	9
5 Verfahrensweise	10
5.1 Vorbereitung der Untersuchungsprobe	10
5.2 Schnellverfahren	10
5.2.1 Anwendbarkeit	10
5.2.2 Kurzbeschreibung	10
5.2.3 Reagenzien	10
5.2.4 Geräte	11
5.2.5 Verfahren	11
5.3 Allgemeines Verfahren	12
5.3.1 Anwendbarkeit	12
5.3.2 Kurzbeschreibung	12
5.3.3 Reagenzien	12
5.3.4 Geräte und Materialien	13
5.3.5 Verfahren	13
5.4 Transmethylierung mit Bortriflourid (BF ₃)-Katalysator	14
5.4.1 Kurzbeschreibung	14
5.4.2 Anwendbarkeit	14
5.4.3 Reagenzien	14
5.4.4 Geräte	15
5.4.5 Verfahren	16
5.5 Säurekatalysierte Transmethylierung der Glyceride	18
5.5.1 Kurzbeschreibung	18
5.5.2 Reagenzien	18
5.5.3 Geräte	18
5.5.4 Vorbereitung der Untersuchungsprobe	18

5.5.5 Verfahren	19
Anhang A (informativ) Dünnschichtchromatographisches Verfahren für die Prüfung der Vollständigkeit der Derivatisierung.....	20
Literaturhinweise.....	24

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (FprEN ISO 12966-2:2016) 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.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen formellen Abstimmung vorgelegt.

Dieses Dokument wird EN ISO 12966-2:2011 ersetzen.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/FDIS 12966-2:2016 wurde vom CEN als FprEN ISO 12966-2:2016 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung von Nationalen Normungsorganisationen (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird normalerweise von ISO Technischen Komitees durchgeführt. Jede Mitgliedsorganisation, die Interesse an einem Thema hat, für welches ein Technisches Komitee gegründet wurde, hat das Recht, in diesem Komitee vertreten zu sein. Internationale Organisationen, staatlich und nicht-staatlich, in Liaison mit ISO, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) bei allen elektrotechnischen Themen zusammen.

Die Verfahren, die bei der Entwicklung dieses Dokuments angewendet wurden und die für die weitere Pflege vorgesehen sind, werden in den ISO/IEC-Direktiven, Teil 1 beschrieben. Im Besonderen sollten die für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten notwendigen Annahmekriterien beachtet werden. Dieses Dokument wurde in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC-Direktiven, Teil 2 erarbeitet (siehe www.iso.org/directives).

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren. Details zu allen während der Entwicklung des Dokuments identifizierten Patentrechten finden sich in der Einleitung und/oder in der ISO-Liste der empfangenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname wird als Information zum Nutzen der Anwender angegeben und stellt keine Anerkennung dar.

Eine Erläuterung der Bedeutung ISO-spezifischer Benennungen und Ausdrücke, die sich auf Konformitätsbewertung beziehen, sowie Informationen über die Beachtung der Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO) zu technischen Handelshemmnissen (TBT, en: Technical Barriers to Trade) durch ISO enthält der folgende Link: www.iso.org/iso/foreword.html.

Das für dieses Dokument verantwortliche Komitee ist ISO/TC 34, *Food products*, Unterkomitee SC 11, *Animal and vegetable fats and oils*.

Diese zweite Ausgabe ersetzt die erste Ausgabe (ISO 12966-2:2011), die eine geringfügige Änderung darstellt.

Die Änderungen im Vergleich zur vorhergehenden Ausgabe sind die folgenden:

— Milch und Milcherzeugnisse (und Fette daraus) sind vom Anwendungsbereich der Norm ausgeschlossen worden.

Eine Liste aller Teile der Normenreihe ISO 12966 kann auf der ISO-Website gefunden werden.

Einleitung

Allgemeines

Öle und Fette (d.h. flüssige und feste Lipide) bestehen überwiegend aus Fettsäureglycerinestern (Triacylglycerin, TAG) mit kleineren Mengen an Fettsäurestereylestern und langkettigen aliphatischen Alkoholen. Wegen der hohen Molekularmasse der TAG und der daraus folgenden Schwerflüchtigkeit sind sie schwer direkt durch Gaschromatographie (GC) zu analysieren, besonders wenn eine ausführliche Analyse von ungesättigten Fettsäuren notwendig ist. Fettsäuren selbst lassen sich nicht gut chromatographieren (mit Ausnahme der kurzkettigen Fettsäuren, z. B. Buttersäure und Pentansäure). Es ist deshalb eine bessere Praxis, vor der GC Fettsäureester zu bilden, üblicherweise Fettsäuremethylester (FAME).

Die Analyse der Öle und Fette wird im Literaturhinweis [9] umfassend beschrieben.

Bei der Analyse von Fettsäuren ist die Bildung der FAME ein kritischer Arbeitsgang. Die nicht quantitative Umwandlung der Fettsäuren zu FAME, die Modifikation der Struktur der Fettsäuren (z. B. Änderungen in den vorhandenen Stellungsisomeren und geometrischen Isomeren) und die Bildung von Nicht-FAME-Artefakten können die quantitative Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung beeinflussen.

Die Umesterung ist ein Vorgang, der zum Einsatz kommt, um FAME aus Fettsäureestern in Fette (z. B. Triacylglycerin) zu bilden. Alkali- oder säurekatalysierte Umesterungsverfahren können zur Bildung der FAME in einem methanolischen Medium angewendet werden; das Verfahren kann als „*Transmethylierung*“ bezeichnet werden. Die Transmethylierung ist ein umkehrbares Verfahren und es ist ein großer Überschuss an Methanol erforderlich, um eine Gleichgewichtslage aufrechtzuerhalten, die die Bildung der FAME begünstigt. Wasser kann verhindern, dass die Reaktion zum Abschluss kommt, und sein Vorliegen sollte deshalb minimiert werden. Wegen der Bildung von Seifen bilden alkalikatalysierte Verfahren keine FAME.

Die Veresterung ist ein säurekatalysierter Vorgang, der zur Bildung von FAME aus Fettsäuren zum Einsatz kommen kann. Es ist möglich, dass die Fettsäuren natürlich in der Probe des zu untersuchenden Fettes vorhanden sind. Die Bildung der FAME durch diesen Vorgang wird üblicherweise als „*Methylierung*“ bezeichnet. Wieder sind ein Überschuss an Methanol und die Abwesenheit von Wasser Voraussetzungen für die quantitative Bildung der FAME.

Dieses Dokument enthält Leitlinien für die Herstellung von Fettsäuremethylestern. In Anlehnung an diese Leitlinien sind verschiedene Verfahren zur Herstellung von Fettsäuremethylestern festgelegt. Diese beinhalten:

- a) „Schnelle“ Transmethylierung unter alkalischen Bedingungen;
- b) „Allgemeine“ Transmethylierung/Methylierung unter aufeinanderfolgenden alkalischen und sauren Bedingungen; und
- c) Bortriflourid (BF_3)-Transmethylierung/Methylierung.

„Schnelles“ Transmethylierungsverfahren unter alkalikatalysierten Bedingungen

Dieses Verfahren ist für die Routineanalyse von essbaren Fetten und Ölen mit der einen internen Standard anwendenden GC geeignet, die Fettsäuren bis hin zur Buttersäure (C4:0) enthalten und/oder für die Bestimmung von Butter- oder Hexansäure (C6:0).

Alkalische Katalysatoren estern neutrale Lipide in Anwesenheit von wasserfreiem Methanol (Transmethylierung) schneller als Säurekatalysatoren um. Die Nachteile dieser alkalikatalysierten Verfahren sind, dass freie Fettsäuren nicht verestert werden, und das Vorliegen von Wasser kann verhindern, dass die Transmethylierung zum Abschluss kommt (Hydrolyse der FAME zu freien Fettsäuren). Die am häufigsten verwendeten Reagenzien sind Kalium, Natriumhydroxid und Natriummethylat in Anwesenheit von wasserfreiem Methanol.

„Allgemeine“ Transmethylierung/Methylierung unter aufeinanderfolgenden alkalischen und sauren Bedingungen

Dieses Verfahren unter aufeinanderfolgenden alkalischen und sauren Bedingungen ist für alle Öle und Fette einschließlich Destillat und saure Öle geeignet, aber es ist nicht für laurische Öle zu empfehlen. Kurzkettige Fettsäuremethylester gehen während der Rückflussdestillation leicht verloren. Bei laurischen Ölen wird das „Schnellverfahren“ der Transmethylierung empfohlen.

Während der Methylierung können Substanzen, die die folgenden Bindungen enthalten, ganz oder teilweise gespalten werden:

- a) Keto-, Epoxid-, Hydroxyl-, Hydroperoxy-Gruppen;
- b) Cyclopropyl- und Cyclopropenyl-Gruppen;
- c) Acetylenfettsäuren.

Bortriflourid-(BF₃-)Transmethylierung/Methylierung

Wegen der Toxizität von BF₃ wird empfohlen, dass dieses Verfahren *nur im äußersten Fall* angewendet wird.

Das BF₃-Verfahren ist für die meisten Öle, Fette und Derivate (Fettsäuren, Seifen) geeignet, mit Ausnahme von MilCHFetten und Fetten, die Fettsäuren mit spezifischen Gruppen enthalten.

Während der Methylierung können Substanzen, die die folgenden Bindungen enthalten, ganz oder teilweise gespalten werden:

- a) Keto-, Epoxid-, Hydroxyl-, Hydroperoxy-Gruppen;
- b) Cyclopropyl- und Cyclopropenyl-Gruppen;
- c) Acetylenfettsäuren.

Falls die Fettmasse diese Substanzen in nur sehr geringen Mengen (z. B. Baumwollsaatöl) enthält, kann das Verfahren angewendet werden; ansonsten sollte den „Schnell-“ oder „allgemeinen“ Transmethylierungs-/Methylierungsverfahren gefolgt werden.

Bei der GC wird die optimale Wiederfindung der Methylester aus dem Reaktionsgemisch durch die Anwendung von Isooctan (2,2,4-Trimethylpentan) erhalten. Jedoch werden nur etwa 75 % des vorhandenen Methylcapronats wiedergefunden.

Bortriflourid ist eine starke Lewis-Säure, und kann in der Form seines Koordinationskomplexes mit Methanol unter Rückflussbedingungen schnell Fettsäuren methylieren. Methanolisches Bortriflourid transmethyliert Fettsäureester (z. B. Triglycerid), aber die Reaktionsgeschwindigkeit ist geringer als die Methylierung der Fettsäuren. Methanolische Bortriflouridlösung ist handelsüblich verfügbar, das steigert die Attraktivität dieses sauren Katalysators, aber es gibt viele mit der Anwendung dieses Reagens verbundene Nachteile.

- a) Es wurde berichtet, dass hohe Konzentrationen von Bortriflourid (50 % Massenanteil) Methoxy-Artefakte aus ungesättigten Fettsäuren erzeugen.
- b) Das Reagens hat eine begrenzte Haltbarkeitsdauer bei Umgebungstemperatur und sollte gekühlt aufbewahrt werden.
- c) Das gealterte Reagens kann Artefakte erzeugen und deshalb wird empfohlen, dass jede neu gelieferte Charge vor der Verwendung und periodisch während seiner Lebensdauer überprüft wird.
- d) Methanolisches Bortriflourid ist ein saures Reagens und deshalb kann es Derivate der Fettsäuren erzeugen, die instabile Gruppen enthalten, die zu störenden (falschen) Peaks auf den FAME-Chromatogrammen führen können.

Zusätzliche Information

Der Herstellung und Analyse von Estern der kurzkettigen Fettsäuren mit der GC ist viel Aufmerksamkeit gewidmet worden, im Wesentlichen infolge ihres Vorkommens in Milchfetten. Kurzkettige Fettsäuren, im ungebundenen Stadium oder verestert zu Glycerin, können mit allen in den vorausgehenden Absätzen beschriebenen Reagenzien vollständig zu Methylestern umgewandelt werden, aber die quantitative Wiederfindung vom Reaktionsmedium kann nicht erreicht werden, außer besondere Vorkehrungen werden getroffen. Verluste können bei verschiedenen Phasen in jedem Verfahren auftreten. Kurzkettige Fettsäureester (hauptsächlich Methyl) sind unbeständig und können wahlweise beim Rückfluss des Veresterungsmediums verloren gehen; sie sind in Wasser löslicher als langkettige Ester und können in einem wässrigen Extraktionsschritt verloren gehen, oder sie können abdestilliert werden, wenn das Extraktionslösemittel verdampft. Selektive Verluste können ebenfalls auftreten, wenn nicht verseifbare Verunreinigungen durch Sublimation oder Reinigung durch Dünnschichtchromatographie (DC) entfernt werden müssen. Die besten Veresterungsverfahren für kurzkettige Fettsäuren sind die, bei denen ein Erwärmen der Reagenzien vermieden wird und bei denen Phasen eine wässrige Extraktion zur Folge haben und ein Entfernen des Lösemittels fehlt.

Die Injektion des Reaktionsmediums, das basische und saure Veresterungskatalysatoren enthält, direkt auf die GC-Säulen verkürzt deren Nutzungsdauer. Die oberen wenigen Zentimeter der gepackten Säulen können periodisch aufgefüllt werden, solange Längen des deaktivierten Rohrs oder „Retentionsgaps“ (leere Vorsäulen) vor den Kapillarsäulen diese schützen. Das kann ein kleiner Preis sein, der für die Geschwindigkeit, Einfachheit und Genauigkeit dieser Verfahren zu zahlen ist.

Zur Überprüfung der Effektivität der Transmethylierung/Methylierung gibt dieses Dokument zusätzlich ein einfaches DC-Verfahren an. Dieses Verfahren darf auch angewendet werden, um die allgemeine Zusammensetzung eines Öles oder Fettes zu überprüfen, bevor die Transmethylierung/Methylierung durchgeführt wird.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt Verfahren zur Herstellung der Methylester von Fettsäuren fest.

Er bezieht Verfahren für die Herstellung von Fettsäuremethylestern aus tierischen und pflanzlichen Fetten und Ölen, Fettsäuren und Seifen mit ein. Um den verschiedenen Anforderungen gerecht zu werden, sind vier Methylierungsverfahren festgelegt, insbesondere:

- a) ein „Schnellverfahren“ der Transmethylierung unter alkalischen Bedingungen;
- b) ein „allgemeines“ Transmethylierungs-/Methylierungsverfahren unter aufeinanderfolgenden alkalischen und sauren Bedingungen;
- c) ein BF₃-Transmethylierungsverfahren;
- d) ein alternatives Verfahren mit säurekatalysierter Transmethylierung der Glyceride.

Die so gewonnenen Methylester werden für verschiedene analytische Verfahren verwendet, bei denen diese Derivate erforderlich sind, z. B. Gas-flüssig-Chromatographie (GC), Dünnschichtchromatographie (DC) und Infrarotspektrometrie (IR).

Milch und Milcherzeugnisse (oder Fett aus Milch und Milcherzeugnissen) sind vom Anwendungsbereich dieses Dokumentes ausgenommen.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text derart zitiert, 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).

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

3 Begriffe

Es werden keine Begriffe in diesem Dokument angegeben.

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

- IEC Electropedia: unter <http://www.electropedia.org/>
- ISO Online browsing platform: unter <http://www.iso.org/obp>

4 Reaktionen

Die Bestimmung der Zusammensetzung der Fettsäure von Ölen und Fetten ist eine der wichtigsten Analysen innerhalb des Fett- und Ölbereichs und wurde im Literaturhinweis [9] umfassend dargestellt. Für diesen Zweck werden die Fettsäurebestandteile der Lipide üblicherweise in Methylester umgewandelt, gefolgt von der GC-Analyse.

Das „Schnellverfahren“ (5.2) derivatisiert nicht die in Öl vorhandenen freien Fettsäuren (FFA) zu Fettsäuremethylestern (FAME). Falls FFA vorhanden sind, wird davon ausgegangen, dass die FFA die gleiche Fettsäureverteilung aufweisen, wie die Triglyceride. Das trifft normalerweise auf Rohöle zu, jedoch weniger auf fraktionierte oder raffinierte Öle. Mit Ausnahme einiger kaltgepresster Öle, sind in der Regel Öle mit < 0,5 % Massenanteil FFA vermutlich raffiniert worden; bei Ölen, die darüber liegen, kann angenommen werden, dass sie unverarbeitet (roh) sind. Die zulässige Konzentration der FFA in Öl hängt von dem einzelnen zu analysierenden Öl und auch von der vorgesehenen Anwendung der erzeugten FAME-Daten ab. Die Anwesenheit von FFA in Öl kann zu zusätzlichen Peaks auf dem endgültigen Gaschromatogramm führen und gestaltet die Identifizierung der synthetischen FAME mit dem „Schnellverfahren“ der Transmethylierung problematisch.

Das „allgemeine“ Verfahren (5.3) derivatisiert sowohl FFA als auch Glycerin-Ester zu FAME (siehe 5.3.1).

Es hängt vom Analytiker ab, zu entscheiden, ob, basierend auf der Art des zu analysierenden Öles, entweder das „Schnellverfahren“ oder das „allgemeine“ Verfahren geeigneter ist. Ungeachtet dessen, wird in der Regel die Anwendung des „Schnellverfahrens“ nur empfohlen, wenn der FFA-Gehalt $\leq 0,5$ % Massenanteil ist. Das „allgemeine“ Verfahren (5.3) wird für Öle mit einem FFA-Gehalt von $> 0,5$ % Massenanteil empfohlen. Falls ein teilweise hydrolysiertes Fett in FAME umgewandelt wird, darf alternativ das in 5.5 festgelegte säurekatalysierte Transmethylierungsverfahren angewendet werden.

Wegen der Toxizität von BF_3 wird empfohlen, das BF_3 -Verfahren (5.4) nur im *äußersten* Fall anzuwenden.

5 Verfahrensweise

WARNUNG — Das festgelegte Verfahren verlangt die Verwendung von gefährlichen Reagenzien. Es müssen die üblichen Vorkehrungen zum Schutz der Augen und vor der Gefahr von Verätzungen getroffen werden. Die methanolische Kaliumhydroxidlösung ist giftig.

5.1 Vorbereitung der Untersuchungsprobe

Die Untersuchungsprobe muss flüssig, wasserfrei und klar sein. Es ist nach ISO 661 vorzugehen, jedoch wird die Probe nur gerade über den Schmelzpunkt erwärmt.

5.2 Schnellverfahren

5.2.1 Anwendbarkeit

Das Schnellverfahren der Transmethylierung unter alkalikatalysierten Bedingungen ist für die Routineanalyse von essbaren Fetten und Ölen mit der einen internen Standard anwendenden GC geeignet, die Fettsäuren bis hin zur Buttersäure (C4:0) enthalten und/oder für die Bestimmung von Butter- oder Hexansäure (C6:0).

Dieses Verfahren derivatisiert keine FFA zu FAME. Der Analytiker sollte beachten, dass das Vorliegen von FFA in der fertigen Lösung die Qualität der anschließenden Gaschromatographie beeinflussen kann.

ANMERKUNG Entsprechend COI/T.20/Doc. No. 24:2001 [8] kann ein ähnliches Verfahren direkt auf Proben der folgenden Ölkategorien angewendet werden:

- a) natives Olivenöl mit einem Säuregehalt geringer als 3,3 %;
- b) raffiniertes Olivenöl;
- c) Olivenöl (Gemisch aus nativem und raffiniertem Olivenöl);
- d) raffiniertes Oliventresteröl;
- e) Oliventresteröl (Gemisch aus nativem Olivenöl und raffiniertem Oliventresteröl).

5.2.2 Kurzbeschreibung

Methylester werden durch Transmethylierung mit methanolischer Kaliumhydroxidlösung gebildet. Mit diesem Verfahren werden freie Fettsäuren nicht verestert.

5.2.3 Reagenzien

Sofern nicht anderweitig festgelegt, sind nur analysenreine Reagenzien zu verwenden.

Die Reagenzien dürfen keine Peaks erzeugen, die die der Fettsäuremethylester während der GC störend beeinflussen. Jede neue Charge des Reagens oder Lösemittels sollte durch deren Anwendung zur Herstellung des Methylesters von reiner Ölsäure überprüft werden. Bei jedem zusätzlichen, unerwarteten Auftreten von Peaks während der GC-Endanalyse sollte das Reagens verworfen werden.

5.2.3.1 Methanol, das nicht mehr als 0,5 % Massenanteil Wasser enthält.

5.2.3.2 Wasser, entsprechend ISO 3696 [3], Qualität 3.

5.2.3.3 Natriumhydrogensulfat, wasserfrei.

5.2.3.4 Isooctan (2,2,4-Trimethylpentan), chromatographische Qualität.

WARNUNG — Isooctan ist leicht entzündbar und feuergefährlich. Die Grenzen der explosiven Volumenanteile in Luft betragen 1,1 % bis 6,0 %. Es ist toxisch bei Aufnahme und beim Einatmen. Es ist mit einem korrekt funktionierenden Abzug zu arbeiten, wenn mit diesem Lösemittel umgegangen wird.

5.2.3.5 Kaliumhydroxid, methanolische Lösung, Menge der Stoffkonzentration c ungefähr 2 mol/l.

Unter leichtem Erwärmen sind 13,1 g Kaliumhydroxid (Massenanteil $w = 85$ g/100 g) in 100 ml absolutem Methanol aufzulösen.

5.2.3.6 Stammlösung des internen Standards, nur für die Bestimmung der Butter- und/oder Hexansäure.

250 mg Valeriansäuremethylester (Methylpentanoat) sind (auf 0,1 mg) in einen 50-ml-Messkolben (5.2.4.4) abzuwägen. Um die Probe aufzulösen, ist Isooctan zu verwenden und mit dem gleichen Lösemittel ist bis zur Marke aufzufüllen.

5.2.3.7 Referenzlösung des internen Standards, nur für die Bestimmung der Butter- und/oder Hexansäure.

10 ml Stammlösung sind in einen 100-ml-Messkolben (5.2.4.4) zu geben (5.2.4.2) und mit Isooctan bis zur Marke aufzufüllen. Die Konzentration dieser Referenzlösung ist zu berechnen.

5.2.3.8 Natriumchloridlösung, 40 g Natriumchlorid sind in 100 ml Wasser aufzulösen.

5.2.4 Geräte

Es werden die üblichen Laborgeräte und im Einzelnen die folgenden Geräte verwendet:

5.2.4.1 Probenröhrchen mit Schraubverschluss, 10 ml, mit einem Verschluss, der mit einer PTFE-Dichtung ausgerüstet ist.

5.2.4.2 Pipetten, mit einem Nennvolumen von 0,1 ml, 2 ml und 10 ml, ISO 8655-2 [6].

5.2.4.3 Probenfläschchen aus Glas, 3 ml.

5.2.4.4 Messkolben, Nennvolumen 50 ml und 100 ml, ISO 1042 [2], Klasse A.

5.2.5 Verfahren

Etwa 0,1 g der Untersuchungsprobe (5.1) ist in ein 10-ml-Probenröhrchen mit Schraubverschluss (5.2.4.1) einzuwägen. Falls Fettsäuren quantitativ mit der GC mit einem internen Standard(s) bestimmt werden sollen, ist es erforderlich, die Untersuchungsmenge genau zu wägen, d. h. auf 0,1 mg. Die Ergebnisse werden dann als prozentuale Massenanteile der Fettsäure in dem Fett oder Öl angegeben. Diese Ergebnisse sind nicht unbedingt vereinbar mit den aus der internen Normalisierung ermittelten Ergebnissen.

2 ml Isooctan (5.2.3.4) sind hinzuzufügen (5.2.4.2) und es ist zu schütteln. In bestimmten Fällen ist es nicht möglich, die festgelegte Probengröße von 0,1 g zu verwenden. In diesem Fall sollte die Menge des zu der Untersuchungsmenge hinzuzufügenden Isooctan proportional geändert werden.

Für die Butter- und/oder Hexansäure-Bestimmung sind 2 ml der Referenzlösung (5.2.3.7) anstelle des Isooctans zu pipettieren (5.2.4.2). Manchmal kann es notwendig sein, Fette und Öle zu analysieren, die