

DIN EN ISO 12966-4

ICS 67.200.10

Einsprüche bis 2014-04-14
Ersatzvermerk
siehe unten

Entwurf

**Tierische und pflanzliche Fette und Öle –
Bestimmung von Fettsäuremethylestern –
Teil 4: Kapillargaschromatographisches Verfahren
(ISO/DIS 12966-4:2014);
Deutsche Fassung prEN ISO 12966-4:2014**

Animal and vegetable fats and oils –
Determination of methyl esters of fatty acids –
Part 4: Capillary gas chromatographic method (ISO/DIS 12966-4:2014);
German version prEN ISO 12966-4:2014

Corps gras d'origines animale et végétale –
Détermination des esters méthyliques d'acides gras –
Partie 4: Méthode par chromatographie capillaire en phase gazeuse
(ISO/DIS 12966-4:2014);
Version allemande prEN ISO 12966-4:2014

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2014-02-14 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

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

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal des DIN unter www.entwuerfe.din.de 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/stellungnahme oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN, 10772 Berlin (Hausanschrift: 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.

Ersatzvermerk

Vorgesehen mit E DIN EN ISO 12966-1:2013-10 als Ersatz für DIN EN ISO 5508:1995-07;
vorgesehen als Ersatz für DIN EN ISO 15304:2002-07 und DIN EN ISO 15304 Berichtigung 1:2006-09

Gesamtumfang 31 Seiten

Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 12966-4:2014) enthält unverändert den internationalen Norm-Entwurf ISO/DIS 12966-4:2014, der vom Unterkomitee SC 11 „Animal and vegetable fats and oils“ (Sekretariat: Vereinigtes Königreich) des Technischen Komitees ISO/TC 34 „Food products“ (Sekretariat: Frankreich/Brasilien) erarbeitet wurde. Auf Grund des Beschlusses des CEN/TC 307 „Ölsamen, tierische und pflanzliche Fette und Öle und deren Nebenprodukte — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ wird die Bearbeitung im parallelen Abstimmungsverfahren unter Federführung des ISO/TC 34/SC 11 durchgeführt.

Die Mitarbeit des DIN beim Europäischen Komitee für Normung (CEN) wird für den Bereich des Technischen Komitees CEN/TC 307 (Sekretariat: AFNOR, Frankreich) über den 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 Normenausschusses Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) wahrgenommen.

Die ISO 12966-4 ist Teil der Normenreihe ISO 12966 zur gaschromatographischen Untersuchung von Fettsäuremethylestern. Die ISO 12966 wird unter dem Titel *Animal and vegetable fats and oils — Gas chromatography of fatty acid methyl esters* die folgenden Teile enthalten:

- *Part 1: Guidelines on modern gas chromatography of fatty acid methyl esters* (ersetzt teilweise ISO 5508:1990)
- *Part 2: Preparation of methyl esters of fatty acids* (ersetzt ISO 5509:2000)
- *Part 3: Preparation of methyl esters using trimethylsulfonium hydroxide (TMSH)*
- *Part 4: Capillary gas chromatographic method* (ersetzt ISO 15304:2002 und teilweise ISO 5508:1990)

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 3696	siehe DIN ISO 3696
ISO 12966-2	siehe DIN EN ISO 12966-2
ISO 12966-3	siehe DIN EN ISO 12966-3
ISO 12966-4	siehe DIN EN ISO 12966-4

Änderungen

Gegenüber DIN EN ISO 5508:1995-07, DIN EN ISO 15304:2002-07 und DIN EN ISO 15304 Berichtigung 1:2006-09 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) DIN EN ISO 5508:1995-07 wurde auf Grundlage der internationalen Norm-Entwürfe ISO/DIS 12966-1:2013 und ISO/DIS 12966-4:2014 redaktionell und technisch neu erarbeitet;
- b) DIN EN ISO 15304:2002-07 und DIN EN ISO 15304 Berichtigung 1:2006-09 wurden auf Grundlage des internationalen Norm-Entwurfes ISO/DIS 12966-4:2014 redaktionell und technisch neu erarbeitet;
- c) die Normen und die Berichtigung legen unter der neuen Bezeichnung DIN EN ISO 12966-4 ein Verfahren zur Bestimmung von Fettsäuremethylestern (FAME), die durch Umesterung oder Veresterung von Fetten, Ölen und Fettsäuren gewonnen wurden, mittels des kapillargaschromatographischen Verfahrens (GLC) fest.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

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

DIN EN ISO 12966-2, *Tierische und pflanzliche Fette und Öle — Gaschromatographie von Fettsäuremethylestern — Teil 2: Herstellung von Fettsäuremethylestern*

DIN EN ISO 12966-3, *Tierische und pflanzliche Fette und Öle — Gaschromatographie von Fettsäuremethylestern — Teil 3: Herstellung von Methylestern mittels Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH)*

DIN EN ISO 12966-4, *Tierische und pflanzliche Fette und Öle — Gaschromatographie von Fettsäuremethylestern — Teil 4: Kapillargaschromatographisches Verfahren*

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

— Leerseite —

Tierische und pflanzliche Fette und Öle — Gaschromatographie von Fettsäuremethylestern — Teil 4: Kapillargaschromatographisches Verfahren (ISO/DIS 12966-4:2014)

Corps gras d'origines animale et végétale — Détermination des esters méthyliques d'acides gras — Partie 4 : Méthode par chromatographie capillaire en phase gazeuse (ISO/DIS 12966-4:2014)

Animal and vegetable fats and oils — Determination of methyl esters of fatty acids — Part 4: Capillary gas chromatographic method (ISO/DIS 12966-4:2014)

ICS:

Deskriptoren:

Dokument-Typ: Europäische Norm
Dokument-Untertyp:
Dokumentstufe: parallele Umfrage
Dokumentsprache: D

Inhalt

	Seite
Vorwort	3
1 Anwendungsbereich	4
2 Normative Verweisungen	4
3 Kurzbeschreibung	4
4 Reagenzien und Materialien	4
4.1 Referenz-Fettsäuremethylester (FAME)	5
4.2 Interne Standards	5
4.2.1 Fettsäuremethylester (FAME) als interne Standard-(IS-)Lösung	5
4.2.2 Triacylglycerin (TAG) als interne Standard-(IS-)Lösung	5
5 Geräte	6
6 Probenahme	7
7 Vorbereitung der Untersuchungsprobe	7
8 Herstellung der Methylester aus Fetten, Ölen und Fettsäuren	7
9 Durchführung	7
9.1 Allgemeines	7
9.2 GC-Bedingungen	7
9.3 Überprüfung der Leistung	8
10 Berechnungen	8
10.1 Qualitative Analyse und Peak-Identifizierung	8
10.2 Quantitative Analyse	8
10.2.1 Berechnung der Zusammensetzung der Fettsäuremethylester	8
10.2.2 Berechnung der Zusammensetzung der Fettsäuremethylester mittels Korrekturfaktoren	9
10.2.3 Berechnung der Zusammensetzung der Fettsäuremethylester mittels einem internen Standards	10
11 Präzision	10
11.1 Ergebnisse des Ringversuchs	10
11.2 Wiederholpräzision	10
11.3 Vergleichpräzision	11
12 Untersuchungsbericht	11
Anhang A (informativ) Theoretischer Korrekturfaktor für den Flammenionisationsdetektor (FCF) für Fettsäuremethylester (FAME)	12
Anhang B (informativ) Beispiele von Chromatogrammen	13
Anhang C (informativ) Vergleich der FAME-Zusammensetzung durch Anwendung von zwei verschiedenen GC-Säulen	16
Anhang D (informativ) Ergebnisse eines Ringversuches	19
Literaturhinweise	26

Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 12966-4:2014) 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 Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wird EN 15304:2002, ISO 5508:1990 ersetzen.

ISO 12966 besteht unter dem allgemeinen Titel „*Animal and vegetable fats and oils — Gas chromatography of fatty acid methyl esters*“ aus folgenden Teilen:

- *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: Capillary gas chromatographic method*

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/DIS 12966-4:2014 wurde vom CEN als prEN ISO 12966-4:2014 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

1 Anwendungsbereich

Diese Internationale Norm legt ein Verfahren zur Bestimmung von Fettsäuremethylestern (FAME), die durch Umesterung oder Veresterung von Fetten, Ölen und Fettsäuren gewonnen wurden, mittels des kapillargaschromatographischen Verfahrens (GLC) fest. Durch die Anwendung der vorliegenden Norm können Fettsäuremethylester von C4 bis C26 einschließlich *trans*-Isomere, gesättigte Fettsäuremethylester, einfach ungesättigte *cis*- und *trans*-Fettsäuremethylester sowie mehrfach ungesättigte *cis*- und *trans*-Fettsäuremethylester abgetrennt werden.

Das Verfahren ist geeignet für rohe, raffinierte, teilweise oder vollständig hydrierte Fette, Öle und Fettsäuren, die aus tierischen und pflanzlichen Quellen sowie aus Lebensmitteln extrahierten Fetten gewonnen wurden.

Diese Norm ist nicht geeignet für di-, tri- polymerisierte und oxidierte Fettsäuren, Fette und Öle.

ANMERKUNG Für die Analytik von tierischen Fetten sollte die gesamte Elution sämtlicher FAME mit C26:0 FAME überprüft werden.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente, die in diesem Dokument teilweise oder als Ganzes zitiert werden, 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*

ISO 3696, *Water for Analytical Laboratory Use — Specifications and Test Methods*

ISO 6353-2, *Reagents for chemical analysis — Part 2: Specifications*

ISO 6353-3, *Reagents for chemical analysis — Part 3: Specifications*

ISO 12966-1, *Animal and vegetable fats and oils — Gas chromatography of fatty methyl esters — Part 1: Guidelines on modern gas chromatography of fatty acid methyl esters*

ISO 12966-2, *Animal and vegetable fats and oils — Gas chromatography of fatty acid methyl esters — Part 2: Preparation of methyl esters of fatty acids*

ISO 12966-3, *Animal and vegetable fats and oils — Gas chromatography of fatty acid methyl esters — Part 3: Preparation of methyl esters using trimethylsulfonium hydroxide (TMSH)*

3 Kurzbeschreibung

FAME werden mittels der Kapillargaschromatographie auf einer hochpolaren stationären Phase in Abhängigkeit von ihrer Kettenlänge, dem Sättigungsgrad (ge- oder ungesättigt) und der Geometrie und der Position der Doppelbindungen getrennt.

4 Reagenzien und Materialien

Falls nicht anders festgelegt, sind nur in ISO 6353-2 und ISO 6353-3 festgelegte Reagenzien zu verwenden (sofern sie in diesen Dokumenten aufgelistet sind); falls nicht, sind Reagenzien von anerkannter Analysenreinheit und Wasser des Reinheitsgrades 3 nach ISO 3696 zu verwenden.

WARNUNG — Die Vorschriften, in denen die Handhabung von Gefahrstoffen festgelegt wird, sind zu beachten. Maßnahmen hinsichtlich der technischen, organisatorischen und persönlichen Sicherheit sind einzuhalten.

4.1 Referenz-Fettsäuremethylester (FAME)

4.1.1 Referenzgemische von reinen FAME und/oder Ölen mit bekannter Fettsäurezusammensetzung sollten für die Identifizierung der Fettsäuren verwendet werden, die unter den Untersuchungsbedingungen des vorliegenden Verfahrens analysiert wurden.

4.1.2 Fette und Öle mit zertifizierter Zusammensetzung.

4.1.3 Referenz-Fettsäuremethylestern (FAME) — Methylester von reinen Fettsäuren, insbesondere *cis*- und *trans*-Isomere von Octadecensäure (Ölsäure), *trans*-Isomere von Octadecadiensäure (Linolsäure) und Octadecatriensäure (α -Linolensäure). Eine große Auswahl von *trans*-Isomeren von Octadecensäure-Methylestern ist auf dem Markt verfügbar¹⁾. Geometrische *trans*-Isomere von Linolsäuren und α -Linolensäuren können im Laborator mit Hilfe von p-Toluolsulfonsäure hergestellt werden. Außer den reinen Verbindungen sind auch geeignete Gemische von FAME im Handel erhältlich.

4.2 Interne Standards

Zur Bestimmung von Fettsäuren, in Gramm je 100 g, ist die Verwendung eines internen Standards (IS) notwendig.

Zur Überprüfung der Wiederfindung und der Effektivität des Derivatisierungsverfahrens müssen zwei Standards verwendet werden. Während der TAG-IS vor der Extraktion oder FAME-Herstellung zu der Probe gegeben wird, erfolgt das beim FAME-IS vor der Analyse. In diesem Fall ist eine andere Kettenlänge der Standards erforderlich. Bei der Überprüfung der Wiederfindung ist das Verhältnis der zugegebenen Massen und der FAME-Gehalte des TAG-IS und FAME-IS zu berechnen. Signifikante Abweichungen geben eine nicht ordnungsgemäße Verfahrensweise der Analyse an.

ANMERKUNG Bei fetthaltigen Lebensmitteln ist die Zugabe des TAG-IS vor der Extraktion eine weitere Möglichkeit, Informationen in Bezug auf die Extraktionswiederfindung zu erhalten.

Abhängig von der Art des Fettes können verschiedene interne Standards (z. B.: C5:0 FAME, C11:0 FAME, C17:0 FAME, C19:0 FAME, C21:0 FAME, C23:0 FAME usw.) verwendet werden. Eine externe Kalibrierung mit Gemischen von unterschiedlichen Fettsäuren ist ebenfalls möglich. Es wird empfohlen, eine weitere Analyse der Probe ohne die Zugabe des internen Standards durchzuführen, um den natürlichen Gehalt an der Fettsäure zu überprüfen, die als interner Standard verwendet wird. Der Gehalt muss bei der Berechnung berücksichtigt werden.

WICHTIG — Ist der TAG-IS (4.2.2) im kalten Methylierungsverfahren schwer löslich, muss ein heißes Methylierungsverfahren (ISO 12966-2, 4.3, 4.4, 4.5) angewendet werden.

Nachstehend ist ein Beispiel eines geeigneten Standards (als FAME und TAG) angegeben.

4.2.1 Fettsäuremethylester (FAME) als interne Standard-(IS-)Lösung

C21:0 FAME — Heneicosan-Fettsäuremethylester (Reinheit > 99 %), Massenkonzentration 5,0 mg/ml in Isooctan oder Methyl-tert-butylether (MTBE) sollte als interner Standard verwendet werden.

4.2.2 Triacylglycerin (TAG) als interne Standard-(IS-)Lösung

C21:0 TAG — Triheneicosanoin (Reinheit > 99 %), Massenkonzentration 5,0 mg/ml in Chloroform (Trichlormethan). Die TAG-IS-Lösung ist stabil, wenn Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden, um den Verlust des Lösemittels und somit eine Änderung der Konzentration des IS zu verhindern. Beispielsweise ist die Lösung, wenn sie nicht verwendet wird, im Kühlschrank in einer fest verschlossenen dunklen Flasche aufzubewahren. Reines Triheneicosanoin ist auf dem Markt verfügbar. Die Reinheit des IS muss mit einer Analyse mittels Dünnschichtchromatographie, Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie, Gaschromatographie oder mit anderen geeigneten Verfahren bestätigt werden.

1) Lieferanten sind z. B.: Alltech Associates, Inc., Deerfield, IL; Nu-Chek-Prep, Elysian, MN; Supelco Inc., Bellefonte, PA, and Sigma Chemical Co., St. Louis, MO; Larodan Fine Chemicals AB, Malmö, Sweden.

ANMERKUNG Unter Berücksichtigung der folgenden Aspekte kann Toluol anstelle von Chloroform verwendet werden. In Toluol ist Triheneicosanoin nicht so löslich wie in Chloroform. Eine Lösung mit einer Massenkonzentration von 2 mg/ml kann in Toluol hergestellt werden. Es ist notwendig, die Lösung etwas zu erwärmen, um Triheneicosanoin zu lösen, doch wenn es in der Lösung ist, wird es gelöst bleiben, wenn die Lösung bei Raumtemperatur aufbewahrt wird. Es ist darauf zu achten, dass kein Toluol verdampft, während es erwärmt wird. Ebenfalls ist darauf zu achten, den Verlust von Toluol während der Aufbewahrung zu verhindern. Andere Lösemittel als Isooctan (d. h. Chloroform oder Toluol) müssen nach der Zugabe des TAG-IS entfernt werden, da diese Lösemittel während des Derivatisierungsverfahrens nach ISO 12966-2 nicht verwendet werden.

4.3 Mikrospritze, für die Gaschromatographie, 10 µl Abgabe, mit gehärteter Nadel.

4.4 Trägergas, Wasserstoff (vorzugsweise) oder Helium, 99,999 5 % Reinheit oder besser, in gaschromatographischer Qualität, getrocknet und durch geeignete Filter von Sauerstoff befreit (< 0,1 mg/kg).

ANMERKUNG Stickstoff ist für dieses Verfahren nicht als Trägergas zulässig.

WARNUNG — Wasserstoff, der mit Kapillarsäulen verwendet wird, kann die Geschwindigkeit der Analyse (im Vergleich zu Helium) verdoppeln, das ist jedoch mit Gefahren verbunden. Sicherheits-einrichtungen sind verfügbar und es ist unbedingt notwendig, dass eine geeignete Einrichtung in das Gerät einbezogen wird.

4.5 Flammengase, Wasserstoff und Luft, in gaschromatographischer Qualität.

4.6 Make-up-Gase, Stickstoff oder Helium, in gaschromatographischer Qualität.

4.7 Isooctan (2,2,4-Trimethylpentan).

4.8 Methyl-tert-butylether (MTBE) (2-Methoxy-2-methylpropan).

4.9 Chloroform.

4.10 n-Hexan.

4.11 n-Heptan.

SICHERHEITSVORKEHRUNGEN — Gesundheitsschädlich, wenn es verschluckt wird und es besteht die Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen und Verschlucken. Beschränkte Beweise für eine krebserzeugende Wirkung. Karzinogen der Kategorie 3.

4.12 Toluol.

5 Geräte

Die übliche Laborausrüstung und im Einzelnen die folgenden Geräte:

5.1 Gaschromatograph, ausgerüstet mit Flammenionisationsdetektor (FID), Split- oder Splitlos-Injektor und Datenerfassungssystem.

ANMERKUNG Die Anwendung von Injektoren für die On-column-Injektion und die temperaturprogrammierte Verdampfung (PTV-Injektor) ist ebenfalls möglich.

5.2 Kapillarsäule, Quarzglas-(Fused-Silica-)Kapillarsäule, 100 m Länge und 0,25 mm Innendurchmesser, beschichtet mit SP-2560 oder CP-Sil 88, 100 % Cyanopropylsilikon als stationäre Phase, bis zu einer Dicke von 0,20 µm. Kommerziell hergestellte Säulen sind bei verschiedenen Lieferanten erhältlich.

ANMERKUNG Die Anwendung von Säulen mit 100 m Länge, 0,25 mm Innendurchmesser, 0,20 µm Filmdicke und mit SP-2560 oder CP-Sil 88 als stationäre Phase ist zu empfehlen, da die Trennkapazität dieser Säulen zur Trennung der meisten C18:1 *trans*- und *cis*-Isomere ausreichend ist. Ist diese Trennung nicht erforderlich kann auch eine 50 m oder