

DIN EN ISO 15753



ICS 67.200.10

Einsprüche bis 2016-02-04
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN ISO 15753:2011-11

Entwurf

**Tierische und pflanzliche Fette und Öle –
Bestimmung von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen
(ISO/FDIS 15753:2015);
Deutsche und Englische Fassung FprEN ISO 15753:2015**

Animal and vegetable fats and oils –

Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (ISO/FDIS 15753:2015);

German and English version FprEN ISO 15753:2015

Corps gras d'origines animale et végétale –

Détermination des hydrocarbures aromatiques polycycliques (ISO/FDIS 15753:2015);

Version allemande et anglaise FprEN ISO 15753:2015

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2015-12-04 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 DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL), 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.

Gesamtumfang 57 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (FprEN ISO 15753:2015) 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).

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

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung der FprEN ISO 15753 beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Änderungen

Gegenüber DIN EN ISO 15753:2011-11 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Milch und Milcherzeugnisse (oder Fett aus Milch und Milcherzeugnissen) wurden vom Anwendungsbereich dieser Norm ausgenommen;
- b) 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 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 die Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision eines vereinheitlichten Messverfahrens*

— Leerseite —

Tierische und pflanzliche Fette und Öle — Bestimmung von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (ISO/FDIS 15753:2015)

Corps gras d'origines animale et végétale — Détermination des hydrocarbures aromatiques polycycliques (ISO/FDIS 15753:2015)

Animal and vegetable fats and oils — Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (ISO/FDIS 15753:2015)

ICS:

Deskriptoren:

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

STD Version 2.7g

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Vorwort	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Kurzbeschreibung	6
5 Reagenzien und Materialien	6
6 Geräte	7
7 Probenahme	8
8 Probenvorbereitung	9
9 Durchführung für die Bestimmung von PAKs aus Fetten und Ölen: Allgemeines Verfahren	9
9.1 Einleitende Bemerkungen	9
9.2 Blindprobe	9
9.3 Bestimmung der Werte für die Wiederfindungsrate (ohne Matrix)	9
9.4 Extraktion (Flüssig-flüssig-Extraktion)	10
9.5 Reinigung auf einer Kartusche mit C18-gebundener Phase (Fest-flüssig-Extraktion)	10
9.6 Reinigung auf einer Kartusche mit Florisil-gebundener Phase (Fest-flüssig-Extraktion)	11
10 Durchführung für die Bestimmung von PAKs aus Fetten und Ölen: Verfahren speziell für Kokosfett	12
10.1 Erste Extraktion (Flüssig-flüssig-Extraktion)	12
10.2 Zweite Extraktion (Flüssig-flüssig-Extraktion)	12
10.3 Reinigung auf einer Kartusche mit C18-gebundener Phase (Fest-flüssig-Extraktion)	12
10.4 Reinigung auf einer Kartusche mit Florisil-gebundener Phase (Fest-flüssig-Extraktion)	13
11 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)	14
11.1 Betriebsbedingungen	14
11.2 Nachweisparameter	15
11.3 Analyse der Proben und Standards	16
11.4 Bestätigung des Vorliegens von PAKs	17
12 Auswertung	17
13 Präzision	17
13.1 Ringversuch	17
13.2 Wiederholpräzision	18
13.3 Vergleichpräzision	18
14 Untersuchungsbericht	18
Anhang A (informativ) Werte für die Wiederfindungsrate, Fließschemata, Chromatogramme und Reihenfolge der Injektionen	19
Anhang B (informativ) Ringversuchsergebnisse	24
Literaturhinweise	27

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (FprEN ISO 15753:2015) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Lebensmittelerzeugnisse“ 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 15753:2006 ersetzen.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/FDIS 15753:2015 wurde vom CEN als FprEN ISO 15753:2015 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 WTO-Grundsätze zu technischen Handelshemmnissen (TBT, en: Technical Barriers to Trade) durch ISO enthält der folgende Link: Foreword - Supplementary information.

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 15753:2006), die geringfügig geändert wurde.

Sie beinhaltet auch die Änderung ISO 15753:2006/Amd 1:2011.

1 Anwendungsbereich

Diese Internationale Norm beschreibt zwei Verfahren zur Bestimmung von 15 polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAKs) in tierischen und pflanzlichen Fetten und Ölen:

- ein allgemeines Verfahren;
- ein Verfahren, speziell für Kokosfett und Pflanzenöle mit kurzkettigen Fettsäuren.

Diese Verfahren sind bei leicht flüchtigen Verbindungen, wie z. B. Naphthalin, Acenaphthen und Fluoren nicht quantitativ. Aufgrund von Störungen, die durch die Matrix selbst bedingt sind, können Palmöl und Oliventresteröl nicht mit diesem Verfahren analysiert werden.

Die Bestimmungsgrenze beträgt bei fast allen analysierten Verbindungen 0,2 µg/kg, mit Ausnahme von Fluoranthen und Benzo(*g,h,i*)perylen, deren Bestimmungsgrenze bei 0,3 µg/kg liegt, sowie Indeno(1,2,3-*c,d*)pyren mit einer Bestimmungsgrenze von 1 µg/kg.

Milch und Milcherzeugnisse (oder Fett aus Milch und Milcherzeugnissen) sind vom Anwendungsbereich dieser Internationalen Norm ausgenommen.

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*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gilt der folgende Begriff.

3.1

polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoff PAK

Verbindung, die zwei oder mehr kondensierte (miteinander verbundene) aromatische Kohlenwasserstoffringe enthält und deren Gehalt, der nach dem in dieser Internationalen Norm festgelegten Verfahren bestimmt werden kann

Anmerkung 1 zum Begriff: Der Gehalt wird in Mikrogramm je Kilogramm angegeben.

Anmerkung 2 zum Begriff: Im Allgemeinen werden PAKs in leichte PAKs mit zwei bis vier aromatischen Ringen, und in schwere PAKs mit fünf oder mehr aromatischen Ringen unterteilt.

BEISPIEL Leichte PAKs umfassen:

Naphthalin (CAS-Nr. [91-20-3]), Acenaphthen (CAS-Nr. [83-32-9]), Acenaphthylen (CAS-Nr. [208-96-8]), Fluoren (CAS-Nr. [86-73-7]), Anthracen (CAS-Nr. [120-12-7]), Phenantren (CAS-Nr. [85-01-8]), Fluoranthen (CAS-Nr. [206-44-0]), Chrysen (CAS-Nr. [218-01-9]), Benz(*a*)anthracen (CAS-Nr. [56-55-3]), Pyren (CAS-Nr. [129-00-0]).

Schwere PAKs umfassen:

Benzo(*a*)pyren (CAS-Nr. 50-32-8]), Benzo(*b*)fluoranthen (CAS-Nr. [205-99-2]), Benzo(*k*)fluoranthen (CAS-Nr. [207-08-9]), Benzo(*g,h,i*)perylen (CAS-Nr. [191-24-2]), Dibenz(*a,h*)anthracen (CAS-Nr. [53-70-3]), Indeno(1,2,3-*c,d*)pyren (CAS-Nr. [193-39-5]).

4 Kurzbeschreibung

Die polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe werden mit einem Acetonitril-Aceton-Gemisch extrahiert, gefolgt von einer Reinigung auf Kartuschen mit C18-Umkehrphase und anschließend auf Kartuschen mit Florisil-gebundener Phase. Die Bestimmung des Gehalts der einzelnen polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe nach der Trennung wird durch Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) und Messung der Fluoreszenz bei verschiedenen Anregungs- und Emissionswellenlängen erreicht.

5 Reagenzien und Materialien

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

Falls nicht anders angegeben, sind nur Reagenzien von anerkannter Analysenreinheit zu verwenden.

Die Qualität der Lösungsmittel ist vor dem Gebrauch durch Konzentrieren des Lösungsmittels etwa 1 000 fach durch Eindampfen und Analysieren des Konzentrates durch HPLC (300 ml bis 300 µl) zu überprüfen. Im Elutionsbereich der PAKs muss das Chromatogramm frei von Peaks sein.

5.1 Methanol, zur „Rückstandsanalyse“¹⁾.

5.2 Hexan, für die HPLC¹⁾.

5.3 Acetonitril, für die HPLC¹⁾.

5.4 Aceton, für die HPLC¹⁾.

5.5 Dichlormethan, für die HPLC¹⁾.

5.6 Toluol (Toluol), für die HPLC¹⁾.

5.7 Wasser, für die HPLC¹⁾.

5.8 Tetrahydrofuran, für die HPLC¹⁾.

5.9 Lösemittelgemisch 1: Acetonitril/Aceton (Volumenanteile 60 %/40 %).

Je Probe verwendete Menge: bei dem allgemeinen Verfahren 41 ml, bei dem Verfahren speziell für Kokosfett 36 ml.

5.10 Lösemittelgemisch 2: Acetonitril/Aceton (Volumenanteile 80 %/20 %).

Je Probe verwendete Menge: bei dem Verfahren speziell für Kokosfett 2 × 11 ml.

5.11 Lösemittelgemisch 3: Hexan/Dichlormethan (Volumenanteile 75 %/25 %).

Je Probe verwendete Menge: bei dem allgemeinen Verfahren 7 ml, bei dem Verfahren speziell für Kokosfett 2 × 7 ml.

5.12 Gemisch aus Tetrahydrofuran/Methanol (Volumenanteile 50 %/50 %).

¹⁾ Dies kann zum Beispiel von Baker geliefert werden. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Internationalen Norm und bedeutet keine Anerkennung der genannten Produkte durch ISO. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.

5.13 Standardlösung von 16 zertifizierten EPA-PAKs in Toluol (Toluol)²⁾, mit einer Konzentration von 100 µg/ml (100 mg/l): Naphthalin, Acenaphthylen, Acenaphthen, Fluoren, Phenanthren, Anthracen, Fluoranthren, Pyren, Benz(a)anthracen, Chrysen, Benzo(b)fluoranthren, Benzo(k)fluoranthren, Benzo(a)pyren, Dibenz(a,h)anthracen, Benzo(g,h,i)perylene, Indeno(1,2,3-c,d)pyren.

ANMERKUNG 1 Die Lösung ist bei –20 °C aufzubewahren.

Vor dem Gebrauch ist die Lösung für durch mindestens einstündiges Stehenlassen auf Umgebungstemperatur zu erwärmen.

ANMERKUNG 2 Acenaphthylen ist nicht fluoreszierend und kann deshalb nicht mit diesen Verfahren bestimmt werden.

5.14 Stammstandardlösung, mit einer Konzentration von 200 ng/ml (200 µg/l).

100 µl der Standardlösung (5.13) sind mit einer 250-µl-Spritze (6.11) in einen 50-ml-Messkolben (6.20) zu geben und mit Acetonitril bis zur Markierung aufzufüllen.

5.15 Arbeitsstandardlösung, mit einer Konzentration von 50 ng/ml (50 µg/l).

250 µl der Stammstandardlösung (5.14) sind mit einer 250-µl-Spritze (6.11) zu 750 µl THF-Methanol-Gemisch (5.12) oder Acetonitril (5.3) hinzuzufügen.

5.16 Kartuschen mit C18-gebundener Phase³⁾, 2 g Phase, 12 ml Fassungsvermögen.

5.17 Kartuschen mit Florisil-gebundener Phase³⁾, 500 mg Phase, 3 ml Fassungsvermögen.

5.18 Stickstoffstrom, auf 34,5 kPa (5 psi, etwa 1,5 l/min) eingestellter Druck.

6 Geräte

Übliche Laborgeräte und im Besonderen die folgenden.

Die Verwendung von Einwegglasröhrchen ist zulässig. Die allgemeine Verwendung von Glasröhrchen ist notwendig, da in Kunststoffen PAKs enthalten sein können.

6.1 Zentrifuge, dafür geeignet, um mindestens 4 000 min⁻¹ zu erreichen, passend für 100-ml- und 10-ml-Röhrchen.

6.2 HPLC-System mit binärer Gradientenelution, mit Lösemittelbehälter mit einem Fassungsvermögen von 1 l, ein Inline-Filter für die mobile Phase, Pumpe, automatischer Probengeber, Regelvorrichtung für die Säulentemperatur, festgesetzt auf 25 °C, Fluoreszenzdetektor mit Zeitprogramm für verschiedene Anregungs- und Extinktionswellenlängen und computergestützte Erfassung und Datenverarbeitung.

6.3 C18-Umkehrphasensäule⁴⁾, Länge 250 mm, Innendurchmesser 4,6 mm, Teilchengröße 5 µm, geeignet für die Analyse von PAKs.

6.4 Vortex-Mischer.

2) Dies kann zum Beispiel von Promochem geliefert werden.

3) Dies kann zum Beispiel von Varian geliefert werden. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Internationalen Norm und bedeutet keine Anerkennung der genannten Produkte durch ISO. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.

4) Dies kann zum Beispiel von Vydac, Bezeichnung 201TP54 geliefert werden.

6.5 Automatischer Verdampfer⁵⁾, für 10-ml-Röhrchen (wahlweise) oder Wasserbad (6.6).

Empfohlene Betriebsbedingungen:

- Temperatur des Wasserbades: 35 °C;
- Stickstoffdruck: 34,5 kPa.

6.6 Wasserbad, eingestellt auf 35 °C.

6.7 Waage, ablesbar auf 0,1 mg.

6.8 Zentrifugenröhrchen, mit 100 ml Fassungsvermögen (eines je Probe).

6.9 Konische Zentrifugenröhrchen, mit 11 ml Fassungsvermögen (drei je Probe), mit PTFE-Septum und geschlossenen Schraubkappen (eine je Probe).

6.10 Messzylinder..

6.11 Mikrodosierspritze, 250 µl.

6.12 Spritze, 1 000 µl.

6.13 Messpipette, 5 ml.

6.14 Spritze, 5 ml, ausgestattet mit einem Adapter für SPE-Kartuschen.

6.15 Probenfläschchen für den automatischen Probengeber.

6.16 Mikrofläschchen, mit 250 µl Fassungsvermögen, für das HPLC-System geeignet.

6.17 Ultraschallbad, mit einer Wassertemperatur nicht höher als 40 °C.

6.18 Pasteurpipetten, mit Baumwollwatte im oberen Teil zur Verhinderung von Kontamination.

6.19 Vorrichtung aus Stativ und Klammern⁶⁾, zum Halten von SPE-Kartuschen oder, falls verfügbar, eine automatisierte Festphasenextraktionsarbeitsstation.

ANMERKUNG In Abhängigkeit von der Festphasenextraktionsarbeitsstation zur Probenvorbereitung erfordern die vorgeschlagenen Extraktionsverfahren möglicherweise geringfügige Anpassungen (Zeitdauer, Druck, Volumina).

6.20 Messkolben, Nennvolumen 50 ml.

7 Probenahme

An das Laboratorium sollte eine repräsentative Probe geschickt worden sein. Sie sollte während des Transports oder der Lagerung nicht beschädigt oder verändert worden sein.

Die Probenahme ist kein Bestandteil des in dieser Internationalen Norm festgelegten Verfahrens. Ein empfohlenes Probenahmeverfahren ist in ISO 5555 angegeben.

⁵⁾ Dies kann zum Beispiel von Zymark, Zymark TurboVap LV Verdampfer geliefert werden.

⁶⁾ Dies kann zum Beispiel von Zymark, Zymark Rapid Trace geliefert werden. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Internationalen Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produktes durch ISO. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.

8 Probenvorbereitung

Die Untersuchungsprobe ist nach dem in ISO 661 angegebenen Verfahren vorzubereiten. Vor der Probenahme müssen flüssige Proben bei Raumtemperatur aufbewahrt und mit einem Magnetrührer homogenisiert werden.

Bei einer festen Matrix erfolgt die Probenahme durch Schmelzen der gesamten Probe oder durch Schmelzen und Homogenisieren von mehreren Kernproben.

9 Durchführung für die Bestimmung von PAKs aus Fetten und Ölen: Allgemeines Verfahren

9.1 Einleitende Bemerkungen

Um wiederholbare Ergebnisse zu erreichen, muss die Umgebungstemperatur des Laboratoriums geregelt sein ($\leq 20\text{ °C}$). Das ist ein sehr wichtiger Parameter für die Extraktion von PAKs aus Kokosfett (oder Pflanzenölen, die kurzkettige Fettsäuren enthalten). Diese Öle enthalten Fettsäuren mit kurzen und langen Ketten; wenn die Umgebungstemperatur über 20 °C liegt, erhöht sich die Löslichkeit der kurzkettigen Fettsäuren.

Vor dem Gebrauch ist das gesamte Gefäß drei Mal mit Hexan (5.2) auszuspülen.

Jede Probenreihe muss eine Blindprobe (9.2) und eine Standardlösung enthalten, die unter denselben Bedingungen extrahiert wurden wie die Probe, um die Werte für die Wiederfindungsrate der Extraktion zu berechnen (9.3). Die Werte der Wiederfindungsraten müssen im Bereich von 70 % bis 110 % liegen. Die mittleren Werte für die Wiederfindungsrate sind in Tabelle A.1 angeführt.

Für eine quantitative Analyse müssen zwei Prüfmengen unabhängig voneinander extrahiert und analysiert werden, das Endergebnis ist der Mittelwert der Ergebnisse dieser zwei Teilproben.

Es ist nicht möglich, die gesamte Analyse an einem einzigen Tag fertig zu stellen. Die Probenextrakte müssen über Nacht im tiefgefrorenen Zustand bei mindestens -18 °C aufbewahrt werden:

- 1. Tag: Schritt 1, Schritt 2 und Schritt 3 bis zur Reinigung auf einer C18-Kartusche (siehe Bild A.1).
- 2. Tag: Schritt 3 – Reinigung auf einer Florisil-Kartusche und Vorbereitung eines HPLC-Systems zur Probenanalyse (siehe Bilde A.1).
- Die/der darauf folgende(n) Nacht und Tag(e): Analyse der Proben (siehe Tabelle A.2).

9.2 Blindprobe

Um sicherzustellen, dass Lösemittel und Kartuschen nicht verunreinigt sind, muss das Reinigungsverfahren (nach 9.5, 9.6 und Abschnitt 11) zuerst an einer Blindprobe (Probe mit Lösemittelgemisch, jedoch ohne Öl) durchgeführt werden. Das erhaltene Chromatogramm darf keine interessierenden Verbindungen enthalten. Wenn im Chromatogramm Störungen vorhanden sind, muss die Störquelle bestimmt und beseitigt werden. Die Blindwerte können nicht zur Korrektur der Werte für die Proben verwendet werden, weil die Blindwerte im Allgemeinen nicht einheitlich sind (Wiederholpräzision).

9.3 Bestimmung der Werte für die Wiederfindungsrate (ohne Matrix)

Zur Verifizierung der Extraktionseffizienz von Kartuschen ist eine Untersuchung mit einer Standardlösung durchzuführen. 1 750 µl Lösemittelgemisch 1 (5.9) sind mit einer 250-µl-Spritze (6.11) mit 250 µl Arbeitsstandardlösung (5.15) aufzustocken. Die Lösung ist auf eine C18-Kartusche zu überführen und wie in 9.5, 9.6 und Abschnitt 11 beschrieben zu behandeln.

WARNUNG — Wenn die Lösemittel unter einem Stickstoffstrom (siehe 9.5.6) entfernt werden, darf nicht bis zur Trockenheit eingedampft werden, sondern es sind etwa 50 µl im Probenfläschchen zu belassen, andernfalls gehen flüchtige PAKs verloren.

9.4 Extraktion (Flüssig-flüssig-Extraktion)

9.4.1 Das Fließschema des Abtrennungsverfahrens ist in Bild A.1 dargestellt.

9.4.2 Etwa 2,5 g Probe sind auf 1 mg in ein 100-ml-Zentrifugenröhrchen (6.8) einzuwägen. 10 ml Lösemittelgemisch 1 (5.9) sind hinzuzufügen.

9.4.3 Das Zentrifugenröhrchen ist 30 s mit dem Vortexmischer (halbe Geschwindigkeit) zu schütteln und anschließend ist das Röhrchen für 5 min in ein Ultraschallbad (6.17) zu stellen.

9.4.4 Die Röhrchen sind 5 min bei 4 000 min⁻¹ zu zentrifugieren.

9.4.5 Die obere Schicht ist vorsichtig mit einer Pasteurpipette (6.18) zu entfernen und in ein eingewogenes konisches Zentrifugenröhrchen (6.9) zu überführen.

9.4.6 Das Lösemittel aus dem konischen Zentrifugenröhrchen ist unter Anwendung eines Wasserbades bei 35 °C (6.6) oder eines automatischen Verdampfers (6.5) unter einem Stickstoffstrom (5.18) innerhalb von 30 min bis 40 min zu verdampfen.

9.4.7 Die Extraktion ist zwei Mal mit weiteren 10 ml Lösemittelgemisch 1 (5.9) zu wiederholen.

Die Extrakte sind in demselben konischen Zentrifugenröhrchen unter Anwendung eines Wasserbades, eingestellt auf 35 °C (6.6) oder eines automatischen Verdampfers (6.5) unter einem Stickstoffstrom (5.18) einzuengen. Der Rückstand an Fett sollte 200 mg bis 800 mg betragen.

Wenn die Masse des Fettrückstandes mehr als 800 mg beträgt, ist das allgemeine Verfahren (Abschnitt 9) nicht geeignet und das Verfahren, speziell für Kokosfett (Abschnitt 10) sollte Anwendung finden.

9.5 Reinigung auf einer Kartusche mit C18-gebundener Phase (Fest-flüssig-Extraktion)

9.5.1 Konditionieren der Kartusche: Die Kartusche (5.16) ist an einem Stativ (6.19) anzubringen.

Die Kartusche ist mit 2 Volumina von je 12 ml Methanol (5.1) und anschließend zwei Volumina von je 12 ml Acetonitril (5.3) zu spülen. Das Lösemittel ist bei atmosphärischem Druck durchfließen zu lassen.

9.5.2 Unter die Kartusche (5.16) ist ein eingewogenes konisches Zentrifugenröhrchen (6.9) zu stellen.

9.5.3 Mit einer Spritze (6.12) oder einer Messpipette (6.13) sind 2 ml Lösemittelgemisch 1 (5.9) in das konische Zentrifugenröhrchen einzubringen, das den Rückstand an fettigem Material (9.4.6) enthält.

Das Röhrchen ist 15 s mit dem Vortexmischer (6.4) zu schütteln. Das Zentrifugieren erfolgt für 30 s. Die obere Schicht ist mit einer Pasteurpipette (6.18) auf die Kartusche (5.16) zu überführen. Dieser Arbeitsvorgang ist zwei Mal zu wiederholen (2 ml Lösemittelgemisch 1, Mischen, Zentrifugieren und Überführen auf die Kartusche). Das aus der Kartusche eluierte Lösemittel ist zusammen mit dem Elutionsmittel zu sammeln.

9.5.4 Auf die Oberseite der Kartusche (5.16) sind 5 ml Lösemittelgemisch 1 (5.9) zu geben und die Elution ist bei atmosphärischem Druck weiterzuführen.

9.5.5 Mit einer Spritze (6.14) ist Luft in die Kartusche zu injizieren, um das verbliebene Lösemittel und jede PAKs, die in der Phase zurückgehalten sein könnten, zu eluieren.

9.5.6 Die Lösemittel sind unter Anwendung eines Wasserbades, eingestellt auf 35 °C (6.6) oder eines automatischen Verdampfers (6.5) unter einem Stickstoffstrom (5.18) zu entfernen.

Der Fettrückstand sollte nicht mehr als 50 mg betragen.

9.5.7 Der Rückstand ist mit 1 ml Hexan (5.2), gemessen mit einer Spritze (6.12), zu verdünnen.

Das konische Zentrifugenröhrchen ist hermetisch zu verschließen und bei –18 °C bis zur weiteren Verwendung aufzubewahren.

9.6 Reinigung auf einer Kartusche mit Florisil-gebundener Phase (Fest-flüssig-Extraktion)

9.6.1 Den Extrakt (9.5.7) durch mindestens einstündiges Stehenlassen auf Umgebungstemperatur bringen.

9.6.2 Konditionieren der Kartusche: Die Kartusche (5.17) ist an einem Stativ (6.19) anzubringen.

Die Kartusche ist mit 5 Volumina von je 3 ml Dichlormethan (5.5) und anschließend 4 Volumina von je 3 ml Hexan (5.2) zu spülen.

9.6.3 Unter die Kartusche (5.17) ist ein eingewogenes konisches Zentrifugenröhrchen (6.9) zu stellen.

9.6.4 Der Extrakt (9.5.7) ist mit einer Pasteurpipette (6.18) auf die Kartusche (5.17) zu überführen.

9.6.5 Mit einer Spritze (6.12) oder einer Messpipette (6.13) ist 1 ml Lösemittelgemisch 3 (5.11) in das konische Zentrifugenröhrchen einzubringen, das den Extrakt enthält.

Der Inhalt ist 15 s mit dem Vortexmischer zu schütteln und auf die Kartusche (5.17) zu überführen. Das Röhrchen ist mit 2×2 ml Lösemittelgemisch 3 (5.11) zu spülen und die Spülflüssigkeit ist auf die Kartusche zu überführen. Das aus der Kartusche eluierte Lösemittel ist zusammen mit dem Elutionsmittel zu sammeln.

Es ist besonders darauf zu achten, dass ein Kontakt zwischen der Pipette und dem konischen Röhrchen vermieden wird, um eine Kreuzkontaminierung zu verhindern.

9.6.6 4 ml Lösemittelgemisch 3 (5.11) sind durch die Kartusche (5.17) zu eluieren.

Mit einer Spritze (6.14) ist Luft in die Kartusche zu injizieren, um das verbliebene Lösemittel zu eluieren.

9.6.7 Die Lösung ist unter Anwendung eines Wasserbades, eingestellt auf 35 °C (6.6) oder eines automatischen Verdampfers (6.5) unter einem Stickstoffstrom (5.18) auf etwa 1 ml (benötigt 10 min bis 15 min) einzuziehen.

Etwa 0,5 ml Toluol (Toluol) (5.6) (Rückhaltesubstanz) sind hinzuzufügen und das Eindampfen ist fortzusetzen, bis etwa 50 µl verbleiben.

Das Lösemittel sollte nicht vollständig entfernt werden.

9.6.8 Das genaue Volumen wird durch Wägen des konischen Röhrchens und Berechnung unter Anwendung der Dichte von Toluol (Toluol) bestimmt.

Das notwendige Lösemittelvolumen [MeOH/THF (5.12) oder Acetonitril (5.3)], V_{add} , ist anschließend hinzuzufügen, um 250 µl zu erhalten:

$$V_{\text{add}} = 250 - \frac{m}{d} \quad (1)$$

Dabei ist

m die Masse der Probe, in Milligramm;

d die Dichte von Toluol (Toluol) (0,866 9 kg/m³).

9.6.9 Die Probe ist in ein in einem Probenfläschchen (6.15) befindliches Mikrofläschchen (6.16) zu überführen.

10 Durchführung für die Bestimmung von PAKs aus Fetten und Ölen: Verfahren speziell für Kokosfett

10.1 Erste Extraktion (Flüssig-flüssig-Extraktion)

10.1.1 Das Fließschema des Abtrennungsverfahrens ist in Bild A.2 dargestellt.

10.1.2 Etwa 2 g Probe sind auf 1 mg in ein 100-ml-Zentrifugenröhrchen (6.8) einzuwägen. 10 ml Lösemittelgemisch 1 (5.9) sind hinzuzufügen.

10.1.3 Das Zentrifugenröhrchen ist 30 s mit dem Vortexmischer (halbe Geschwindigkeit) zu schütteln und anschließend ist das Röhrchen für 5 min in ein Ultraschallbad (6.17) zu stellen.

10.1.4 Die Röhrchen sind 5 min bei 4 000 min⁻¹ zu zentrifugieren.

10.1.5 Die obere Schicht ist vorsichtig mit einer Pasteurpipette (6.18) zu entfernen und in ein konisches Zentrifugenröhrchen (6.9) zu überführen.

10.1.6 Das Lösemittel aus dem konischen Zentrifugenröhrchen ist unter Anwendung eines Wasserbades, eingestellt auf 35 °C (6.6) oder eines automatischen Verdampfers (6.5) unter einem Stickstoffstrom (5.18) innerhalb von 30 min bis 40 min zu verdampfen.

10.1.7 Die Extraktion ist zwei Mal mit einem weiteren 10 ml Lösemittelgemisch 1 (5.9) zu wiederholen.

Die Extrakte sind in demselben konischen Zentrifugenröhrchen unter Anwendung eines Wasserbades, eingestellt auf 35 °C (6.6) oder eines automatischen Verdampfers (6.5) unter einem Stickstoffstrom (5.18) einzuengen.

10.2 Zweite Extraktion (Flüssig-flüssig-Extraktion)

10.2.1 Mit einer Spritze (6.12) oder einer Messpipette (6.13) sind 2 ml Lösemittelgemisch 1 (5.9) in das konische Zentrifugenröhrchen einzubringen, das den Rückstand an fettigem Material (10.1.7) enthält.

Das Röhrchen ist 15 s mit dem Vortexmischer zu schütteln. Das Zentrifugieren erfolgt für 30 s. Der Extrakt ist in zwei gleiche Teile in zwei eingewogene konische Röhrchen (6.9) zu teilen.

Es ist besonders darauf zu achten, dass ein Kontakt zwischen der Pipette und dem konischen Röhrchen vermieden wird, um eine Kreuzkontamination zu verhindern.

10.2.2 Die in 10.2.1 dargelegte Verfahrensweise ist zwei Mal zu wiederholen, wobei dieselben konischen Röhrchen verwendet werden.

10.2.3 Die beiden Extrakte sind unter Anwendung eines Wasserbades, eingestellt auf 35 °C (6.6) oder eines automatischen Verdampfers (6.5) unter einem Stickstoffstrom (5.18) einzuengen.

Jeder Fettrückstand sollte etwa 250 mg betragen.

10.3 Reinigung auf einer Kartusche mit C18-gebundener Phase (Fest-flüssig-Extraktion)

10.3.1 Konditionieren der Kartusche: Zwei Kartuschen (5.16) sind an einem Stativ (6.19) anzubringen.

Die Kartuschen sind mit 2 Volumina von je 12 ml Methanol (5.1) und anschließend zwei Volumina von je 12 ml Acetonitril (5.3) zu spülen. Das Lösemittel ist bei atmosphärischem Druck durchfließen zu lassen.

10.3.2 Unter jede Kartusche (5.16) ist ein eingewogenes konisches Zentrifugenröhrchen (6.9) zu stellen.

10.3.3 Mit einer Spritze (6.12) oder einer Messpipette (6.13) sind 2 ml Lösemittelgemisch 2 (5.10) in die beiden konischen Zentrifugenröhrchen einzubringen, die den Rückstand an fettigem Material (10.2.3) enthalten.

Die Röhrchen sind 15 s mit dem Vortexmischer zu schütteln. Der vollständige Extrakt von jedem konischen Röhrchen ist mit einer Pasteurpipette (6.18) auf die jeweilige Kartusche (5.16) zu überführen. Das Röhrchen ist mit 2×2 ml Lösemittelgemisch 2 (5.10) zu spülen und die Spülflüssigkeit ist auf die Kartusche zu überführen. Das aus der Kartusche eluierte Lösemittel ist zusammen mit dem Elutionsmittel zu sammeln.

10.3.4 5 ml Lösemittelgemisch 2 (5.10) sind durch die Kartuschen zu eluieren (**es darf keine** Luft auf die Kartusche injiziert werden).

10.3.5 Die Lösemittel sind unter Anwendung eines Wasserbades, eingestellt auf 35 °C (6.6) oder eines automatischen Verdampfers (6.5) unter einem Stickstoffstrom (5.18) zu entfernen.

Der Fettrückstand sollte etwa 50 mg bis 100 mg betragen.

10.3.6 Die Rückstände sind mit 1 ml Hexan (5.2), gemessen mit einer Spritze (6.12), zu verdünnen.

Das konische Zentrifugenröhrchen ist hermetisch zu verschließen und bei -18 °C bis zum nächsten Tag aufzubewahren.

10.4 Reinigung auf einer Kartusche mit Florisil-gebundener Phase (Fest-flüssig-Extraktion)

10.4.1 Die Extrakte (10.3.6) durch mindestens einstündiges Stehenlassen auf Umgebungstemperatur bringen.

10.4.2 Konditionieren der Kartusche: Zwei Kartuschen (5.17) sind an einem Stativ (6.19) anzubringen.

Die Kartuschen sind mit 5 Volumina von je 3 ml Dichlormethan (5.5) und anschließend 4 Volumina von je 3 ml Hexan (5.2) zu spülen.

10.4.3 Unter jede Kartusche (5.17) ist ein eingewogenes konisches Zentrifugenröhrchen (6.9) zu stellen.

10.4.4 Jeder Extrakt (10.3.6) ist mit einer Pasteurpipette (6.18) auf die jeweilige Kartusche (5.17) zu überführen.

10.4.5 Mit einer Spritze (6.12) oder einer Messpipette (6.13) ist 1 ml Lösemittelgemisch 3 (5.11) in jedes Röhrchen einzubringen, das den Extrakt enthielt.

Der Inhalt ist 15 s mit dem Vortexmischer zu schütteln und auf die Kartusche (5.17) zu überführen. Das Röhrchen ist mit 2×2 ml Lösemittelgemisch 3 (5.11) zu spülen und die Spülflüssigkeit ist auf die Kartusche zu überführen. Das aus der Kartusche eluierte Lösemittel ist zusammen mit dem Elutionsmittel zu sammeln.

10.4.6 4 ml Lösemittelgemisch 3 (5.11) sind durch die Kartuschen (5.17) zu eluieren (**es darf keine** Luft in die Kartusche injiziert werden).

10.4.7 Die Lösung ist unter Anwendung eines Wasserbades, eingestellt auf 35 °C (6.6) oder eines automatischen Verdampfers (6.5) unter einem Stickstoffstrom (5.18) auf etwa 1 ml (benötigt 10 min bis 15 min) einzuengen.

Die beiden Extrakte sind in demselben konischen Röhrchen zu sammeln, der Extrakt ist dabei von einem konischen Röhrchen in das andere zu überführen. Das leere konische Röhrchen ist mit 3×1 ml Hexan (5.2) zu spülen. Etwa 0,5 ml Toluol (Toluol) (5.6) (Rückhaltesubstanz) sind mit einer Spritze (6.12) hinzuzufügen und das Eindampfen ist fortzusetzen, bis etwa 50 µl verbleiben.

Das Lösemittel sollte nicht vollständig entfernt werden.

10.4.8 Das genaue Volumen wird durch Wägen des konischen Röhrchens und Berechnung unter Anwendung der Dichte von Toluol (Toluol) bestimmt.

Das notwendige Lösemittelvolumen [MeOH/THF (5.12) oder Acetonitril (5.3)], V_{add} , ist anschließend hinzuzufügen, um 200 µl zu erhalten:

$$V_{\text{add}} = 200 - \frac{m}{d} \quad (2)$$

Dabei ist

m die Masse der Probe, in Milligramm;

d die Dichte von Toluol (Toluol) (0,8669 kg/m³).

10.4.9 Die Probe ist in ein in einem Probenfläschchen (6.15) befindliches Mikrofläschchen (6.16) zu überführen.

11 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

11.1 Betriebsbedingungen

Mobile Phase:	Lösemittelgemisch A: Acetonitril Lösemittelgemisch B: Acetonitril/Wasser (50:50, Volumenanteile)
Durchfluss:	1,2 ml/min
Injektorvolumen:	20 µl
Säulentemperatur:	25 °C

Ein Beispiel für die Programmierung der Lösemittel ist in Tabelle 1 angeführt. Das Gradientenelutionsprogramm sollte entsprechend der verwendeten Säule geändert werden.

Tabelle 1 — Gradientenelutionsprogramm auf einer C18-Umkehrphasensäule

Zeit min	Lösemittelgemisch A %	Lösemittelgemisch B %
0	0	100
5	0	100
27	60	40
36	100	0
41	100	0
43	0	100
45	0	100