

DIN EN ISO 18363-2

ICS 67.200.10

Einsprüche bis 2018-01-17

Entwurf

**Tierische und pflanzliche Fette und Öle –
Bestimmung von fettsäuregebundenen Chlorpropandiol (MCPD) und
Glycidol mittels GC/MS –
Teil 2: Verfahren mittels langsamer alkalischer Umesterung und Messung
für 2-MCPD, 3-MCPD und Glycidol (ISO/DIS 18363-2:2017);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 18363-2:2017**

Animal and vegetable fats and oils –
Determination of fatty-acid-bound chloropropanediols (MCPDs) and glycidol by GC/MS –
Part 2: Method using slow alkaline transesterification and measurement for 2-MCPD, 3-MCPD
and glycidol (ISO/DIS 18363-2:2017);
German and English version prEN ISO 18363-2:2017

Corps gras d'origines animale et végétale –
Détermination des esters de chloropropanediols (MCPD) et d'acides gras et des esters de
glycidol et d'acides gras par CPG/SM –
Partie 2: Méthode par transestérification alcaline et mesure pour le 2-MCPD, le 3-MCPD et le
glycidol (ISO/DIS 18363-2:2017);
Version allemande et anglaise prEN ISO 18363-2:2017

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2017-11-17 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 60 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 18363-2:2017) 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 von DIN und DGF 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 Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 3696	siehe	DIN ISO 3696
ISO 5555	siehe	DIN EN ISO 5555

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

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

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

**Tierische und pflanzliche Fette und Öle — Bestimmung von
fettsäuregebundenen Chlorpropandiol (MCPD) und Glycidol mittels
GC/MS — Teil 2: Verfahren mittels langsamer alkalischer Umesterung und
Messung für 2-MCPD, 3-MCPD und Glycidol (ISO/DIS 18363-2:2017)**

Corps gras d'origines animale et végétale — Détermination des esters de chloropropanediols (MCPD) et d'acides gras et des esters de glycidol et d'acides gras par CPG/SM — Partie 2 : Méthode par transestérification alcaline et mesure pour le 2-MCPD, le 3-MCPD et le glycidol (ISO/DIS 18363-2:2017)

Animal and vegetable fats and oils — Determination of fatty-acid-bound chloropropanediols (MCPDs) and glycidol by GC/MS — Part 2: Method using slow alkaline transesterification and measurement for 2-MCPD, 3-MCPD and glycidol (ISO/DIS 18363-2:2017)

ICS:

Deskriptoren:

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

STD Version 2.8l

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Vorwort	5
Einleitung	6
1 Anwendungsbereich	8
2 Normative Verweisungen	8
3 Begriffe	8
4 Kurzbeschreibung	9
5 Reagenz	10
5.1 Allgemeines	10
5.2 Lösungsmittel und Chemikalien	10
5.3 Standard- und Referenzgemische	10
5.4 Arbeitslösungen**	11
5.5 Andere Lösungen	11
6 Geräte	11
7 Probe	12
7.1 Probenahme	12
7.2 Probenvorbereitung	12
8 Verfahren (siehe 10.1.2.)	12
8.1 Versetzen mit Surrogatstandard und Homogenisierung	12
8.2 Esterspaltung und Glycidolumwandlung	12
8.3 Matrixentfernung	13
8.4 Derivatisierung	13
8.5 Gaschromatographie/Massenspektrometrie-Referenzen	13
9 Angabe der Ergebnisse (siehe Anmerkungen, 10.1.4.)	14
9.1 Bestimmungen des gebundenen Glycidols	14
9.2 Bestimmung des gebundenen 2-MCPD	16
9.3 Bestimmung des gebundenen 3-MCPD	16
9.4 Bestimmung des Grads der Diesterspaltung (siehe Anmerkungen, 10.1.6.):	16
9.5 Qualitätskontrolle	17
10 Anmerkungen	17
10.1 Nummerierte Anmerkungen	17
Anhang A (informativ) Beispiel für relevante Chromatogramme und Datenauswertung unter Verwendung von Palmöl mit „geringem MCPD-Gehalt“	20
A.1 Sim – Chromatogramm von 3-MCPD-d ₅ (5 mg/kg) in Probe A	20
A.2 Sim – Chromatogramm von 3-MCPD (0,155 mg/kg) in Probe A	21
A.3 Sim – Chromatogramm von Glycidol-d ₅ (5 mg/kg) in Probe A	21
A.4 Sim – Chromatogramm von Glycidol (0,113 mg/kg) in Probe A	22
A.5 Sim – Chromatogramm von 3-MCPD-d ₅ (5 mg/kg) in Probe B	22
A.6 Sim – Chromatogramm von 3-MCPD (0,156 mg/kg) in Probe B	23
A.7 Sim – Chromatogramm von 2-MCPD-d ₅ (2,5 mg/kg) in Probe B	23
A.8 Sim – Chromatogramm von 2-MCPD (0,036 mg/kg) in Probe B	24

A.9	Sim – Chromatogramm von Glycidol-d ₅ (zur Reaktionsbestimmung) in Probe B.....	24
A.10	Sim – Chromatogramm von Glycidol (zur Reaktionsbestimmung) in Probe B.....	25
A.11	Beispiel: Vorlage für die Datenauswertung.....	25
A.12	Beispiel: Datenauswertung für eine echte Probe („3-MCPD-armes“ Palmfett).....	26
Anhang B (informativ)	Ergebnisse von Laborvergleichsuntersuchungen.....	27
Literaturhinweise.....		31

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 18363-2:2017) 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 von AFNOR gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/DIS 18363-2:2017 wurde von CEN als prEN ISO 18363-2:2017 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler 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 staatliche und nichtstaatliche Organisationen, die in engem Kontakt mit ISO stehen, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet bei allen elektrotechnischen Themen eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) 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. Es sollten insbesondere die unterschiedlichen Annahmekriterien für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten 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*.

ISO 18363 besteht aus den folgenden Teilen unter dem allgemeinen Titel *Animal and vegetable fats and oils — Determination of fatty-acid-bound chloropropanediols (MCPDs) and glycidol by GC/MS*

- *Part 1: Method using fast alkaline transesterification and measurement for 3-MCPD and differential measurement for glycidol*
- *Part 2: Method using alkaline transesterification and measurement of 2-MCPD, 3-MCPD and glycidol*
- *Part 3: Method using acid transesterification and measurement of 2-MCPD, 3-MCPD and glycidol*

Einleitung

Die Normenreihe ISO 18363 ist eine Familie Internationaler Normen, die zur Bestimmung von estergebundenem MCPD und Glycidol verwendet werden kann. Diese Einleitung legt die in den drei kürzlich veröffentlichten oder vorgeschlagenen Dokumenten dargelegten Verfahren fest, damit Analytiker entscheiden können, welches Verfahren für die Anwendung geeignet ist. Die genaue Anwendung jedes Verfahrens ist im Anwendungsbereich des einzelnen Verfahrens festgelegt.

ISO 18363-1 ist ein anderes Verfahren, das mit der DGF-Norm C-VI 18 (10) vergleichbar und mit der AOCS Official Method Cd 29c-13 identisch ist. Kurz gesagt, basiert das Verfahren auf der alkalisch katalysierten Freisetzung von 3-MCPD und Glycidol aus Ester-Derivaten. Glycidol wird anschließend in induziertes 3-MCPD umgewandelt. Das Verfahren besteht aus zwei Teilen. Der erste Teil (A) ermöglicht die Bestimmung der Summe des estergebundenen 3-MCPD und estergebundenen Glycidols, während der zweite Teil (B) nur estergebundenes 3-MCPD bestimmt. Beide Proben basieren auf der Freisetzung der Ziel-Analyten 3-MCPD und Glycidol aus der estergebundenen Form durch alkalisch katalysierte Alkoholyse bei Raumtemperatur. In Teil A wird eine gesäuerte Natriumchloridlösung verwendet, um die Reaktion zu stoppen und anschließend das Glycidol in induziertes 3-MCPD umzuwandeln. 3-MCPD und Glycidol werden daher in Teil A ununterscheidbar. In Teil B wird die Beendigung der Reaktion durch die Hinzugabe einer gesäuerten chloridfreien Salzlösung erreicht. Dies verhindert auch die Umwandlung von Glycidol in induziertes MCPD. Teil B ermöglicht somit die Bestimmung des tatsächlichen 3-MCPD-Gehalts. Darüber hinaus ist der Glycidolgehalt der Probe proportional zur Differenz zwischen beiden Proben (A – B) und kann berechnet werden, sobald das Umwandlungsverhältnis von Glycidol zu 3-MCPD bestimmt wurde. ISO 18363-1 gilt für die schnelle Bestimmung von estergebundenem 3-MCPD und Glycidol in raffinierten und nichtraffinierten Pflanzenölen und Pflanzenfetten. ISO 18363-1 kann auch für tierische Fette und Frittier-Altöle und -fette gelten. Hierzu muss jedoch vor der Analyse dieser Matrizen eine Validierungsstudie erfolgen. Alle freien Analyten in der Probe wären in den Ergebnissen enthalten, aber das Dokument erlaubt keine Unterscheidung zwischen freien und gebundenen Analyten. Jedoch haben keine Forschungen seit der Veröffentlichung irgendeinen Nachweis eines Analytengehalts in raffinierten Pflanzenölen und -fetten in gleicher Höhe wie der veresterte Analytengehalt erbracht. Grundsätzlich kann diese ISO 18363-1 ebenfalls so modifiziert werden, dass die Bestimmung von 2-MCPD möglich wird, jedoch erfordert auch dies wieder eine Validierungsstudie vor der Analyse dieses Analyten.

Dieses Dokument repräsentiert die AOCS Official Method Cd 29b-13. Kurz gesagt, basiert das Verfahren auf der alkalisch katalysierten Freisetzung von MCPD und Glycidol aus Ester-Derivaten. Glycidol wird anschließend in 3-MCPD umgewandelt. ISO 18363-2 besteht aus zwei Probenvorbereitungen mit unterschiedlicher Anwendung interner Normen. Beide Vorbereitungen werden für die Bestimmung von estergebundenem 2-MCPD und 3-MCPD verwendet. In Teil A wird ein vorläufiges Ergebnis für estergebundenes Glycidol bestimmt. Da das in der Probe vorhandene 3-MCPD zu einem geringen Grad durch die Probenvorbereitung in induziertes Glycidol umgewandelt wird, dient Teil B dazu, die Menge des induzierten Glycidols zu bestimmen, die anschließend von dem vorläufigen Glycidolergebnis aus Teil A abgezogen wird. Durch die Anwendung isotopisch markierter freier MCPD-Isomere in Probe A und isotopisch markierter estergebundenem 2-MCPD und 3-MCPD in Teil B kann die Effizienz der Esterspaltung überwacht werden. Die beiden Proben A und B basieren auf der Freisetzung der Zielanalyten 2-MCPD, 3-MCPD und Glycidol aus der estergebundenen Form durch eine langsame alkalisch katalysierte Alkoholyse in Kälte. In beiden Probenvorbereitungen wird die Reaktion durch die Hinzugabe einer gesäuerten konzentrierten Natriumbromidlösung gestoppt, um das instabile und volatile Glycidol in 3-MCPD umzuwandeln, das mit 3-MCPD vergleichbare Eigenschaften hinsichtlich seiner Stabilität des chromatographischen Verhaltens aufweist. Darüber hinaus verhindert der erhebliche Überschuss an Bromidionen die Bildung von 3-MCPD aus Glycidol im Fall von Proben, die natürlich auftretende Chloridmengen enthalten. ISO 18363-2 gilt für die Bestimmung von estergebundenem 3-MCPD, 2-MCPD und Glycidol in raffinierten und nichtraffinierten Pflanzenölen und Pflanzenfetten. Die Norm gilt ebenfalls für tierische Fette und Frittier-Altöle und -fette. Hierzu muss jedoch vor der Analyse dieser Matrizen eine

Validierungsstudie erfolgen. Alle freien Analyten in der Probe wären in den Ergebnissen enthalten, aber das Dokument wird keine Unterscheidungen zwischen freien und gebundenen Analyten erlauben. Jedoch haben keine Forschungen seit der Veröffentlichung dieses Dokuments irgendeinen Nachweis eines freien Analytengehalts in Pflanzenölen und -fetten in gleicher Höhe wie der veresterte Analytengehalt erbracht.

ISO 18363-3 repräsentiert die AOCS Official Method Cd 29a-13. Kurz gesagt, basiert das Verfahren auf der Umwandlung von Glycidylestern in 3-MBPD-Ester und einer langsamen sauer katalysierten Freisetzung von MCPD und MBPD aus Esterderivaten. Dieses Dokument basiert auf einer einzelnen Probenvorbereitung, in der Glycidylester in MBPD-Monoester umgewandelt werden. Anschließend werden die freien Analyten 2-MCPD, 3-MCPD und 3-MBPD durch langsame säurekatalysierte Alkoholyse freigesetzt. Das 3-MBPD repräsentiert den tatsächlichen Gehalt an gebundenem Glycidol. Dieses Dokument kann für die Bestimmung von estergebundenem 2-MCPD, 3-MCPD und Glycidol in raffinierten und nichtraffinierten Pflanzenölen und Pflanzenfetten angewendet werden. Es kann auch für tierische Fette und Frittier-Altöl und -fette gelten. Hierzu muss jedoch vor der Analyse dieser Matrizen eine Validierungsstudie erfolgen. Das Verfahren eignet sich für die Analyse von gebundenen (veresterten) Analyten, kann aber im Bedarfsfall auch ohne die ursprüngliche Umwandlung von Glycidylester angewendet werden. In diesem Fall wären freie und gebundene 2-MCPD- und 3-MCPD-Formen in den Ergebnissen enthalten und die Menge an freien Analyten kann als Differenz zwischen den beiden in zwei Konfigurationen vorgenommenen Bestimmungen berechnet werden. Jedoch haben keine Forschungen seit der Veröffentlichung irgendeinen Nachweis eines freien Analytengehalt in Pflanzenölen und -fetten in gleicher Höhe wie der veresterte Analytengehalt erbracht.

1 Anwendungsbereich

Dieser Teil von ISO 18363 beschreibt ein Verfahren für die parallele Bestimmung von Glycidol mit 2-MCPD und 3-MCPD in gebundener und freier Form in Ölen und Fetten. Das Verfahren basiert auf der alkalisch katalysierten Esterspaltung, der Umwandlung von freigesetztem Glycidol in Monobrompropandiol (MBPD) und abgeleiteten freien Diolen (MCPD und MBPD) mit Phenylboronsäure (PBA). Obwohl angenommen wird, dass freies MCPD und Glycidol in Fetten und Ölen nur in geringen bis vernachlässigbaren Mengen enthalten sind, würde sich ein signifikanter Gehalt proportional zur Bestimmung der gebundenen Analyten erhöhen.

Dieses Verfahren ist für feste und flüssige Fette und Öle anwendbar. Dieser Teil von ISO 18363 kann auch für tierische Fette und Frittier-Altöle und -fette gelten. Hierzu muss jedoch vor der Analyse dieser Matrizen eine Validierungsstudie erfolgen.

Milch- und Milchprodukte (oder Fett aus Milch und Milchprodukten) sind nicht im Anwendungsbereich dieser internationalen Norm enthalten.

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 3696, *Water for analytical laboratory use — Specification and test methods* [8]

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

3.1

gebundenes 2-MCPD

die Summe aller 2-MCPD-Derivate, die durch alkalisch katalysierte Alkoholyse gespalten werden.

Anmerkung 1 zum Begriff: Der Gehalt des gebundenen 2-MCPD wird in Milligramm je Kilogramm (mg/kg) angegeben.

3.2

gebundenes 3-MCPD

die Summe aller 3-MCPD-Derivate, die durch alkalisch katalysierte Alkoholyse gespalten werden.

Anmerkung 1 zum Begriff: Der Gehalt des gebundenen 3-MCPD wird in Milligramm je Kilogramm (mg/kg) angegeben.

3.3

gebundenes Glycidol

die Summe aller durch alkalisch katalysierte Alkoholyse gespaltenen Glycidyl-derivate

Anmerkung 1 zum Begriff: Der Gehalt des gebundenen Glycidols wird in Milligramm je Kilogramm (mg/kg) angegeben.

4 Kurzbeschreibung

Für die Bestimmung des gebundenen 2-MCPD, des gebundenen 3-MCPD und des gebundenen Glycidols als freies 2-MCPD, freies 3-MCPD und freies 3-MBPD (3-Monobrompropandiol) werden zwei Teilproben (A und B) der Probe mit Surrogatstandards (d_5 -2-MCPD, d_5 -3-MCPD, d_5 -Glycidylester in Probe A und d_5 -2-MCPD-1,3-Diester, d_5 -3-MCPD-1,2-Diester in Probe B) versetzt und in Diethylether gelöst. Beide Proben werden parallel und wie folgt verarbeitet: Die Hinzugabe einer verdünnten Lösung aus Natriumhydroxid oder Natriummethoxid in Methanol in Kälte wird freies 2-MCPD, freies 3-MCPD und freies Glycidol über Nacht freisetzen. Diese Reaktion wird durch die Hinzugabe einer großen Menge Natriumbromid zu der sauren Lösung gestoppt. Freies Glycidol reagiert unter sauren Bedingungen mit anorganischem Bromid zu 3-MBPD und einer kleinen Menge 2-MBPD. Unerwünschte nichtpolare Bestandteile in der Probe werden durch doppelte Extraktion der wässrigen Phase mit Isohexan entfernt. Die Analyten werden zusammen mit den Surrogatstandards durch mehrfache Extraktion der wässrigen Phase mit Diethylether, Ethylacetat oder einer Mischung aus beiden Lösungsmitteln in eine organische Phase überführt. Die Derivatisierung findet in der organischen Phase durch Reaktion mit PBA statt. Um überschüssige Mengen des PBA zu entfernen, werden die Analyten konzentriert und anschließend in ein inertes organisches Lösungsmittel übertragen. Das Probenextrakt wird anschließend über einer kleinen Menge anhydriertem Natriumsulfat platziert und unter einem Stickstoffstrom zu Trockenheit verdampft, bevor es anschließend erneut in Isooktan für die Messung durch GC-MS gelöst wird.

Die alkalisch katalysierte Umesterung in Kälte minimiert die unerwünschte Umwandlung von 3-MCPD in Glycidol, die zu einem wesentlichen Teil stattfindet, wenn eine Reaktion bei Raumtemperatur durchgeführt wird. Nichtsdestotrotz kann im Fall großer vorhandener Mengen 3-MCPD selbst eine geringfügige Umwandlung in Glycidol die Glycidolergebnisse aus Probe A künstlich erhöhen. Um korrekte Glycidolergebnisse selbst bei einem hohen Gehalt an 3-MCPD zu erhalten, dient Probe B dazu, die unerwünschte Umwandlung von 3-MCPD zu Glycidol durch Ermittlung der Menge des d_5 -Glycidols, die durch die Probenvorbereitung aus d_5 -3-MCPD-Diesters generiert wurde, zu bestimmen. Das entsprechende Umwandlungsverhältnis wird für die Korrektur des aus Probe A abgeleiteten Glycidolwerts verwendet. Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass 3-MCPD etwa 1,2-mal schneller über Glycidol in 3-MBPD umgewandelt wird als 3-MCPD- d_5 über Glycidol- d_5 in 3-MBPD- d_5 . Dementsprechend muss der Isotopenfaktor $I = 1,2$ für die quantitative Bestimmung der zufällig aus dem nicht markierten 3-MCPD durch die alkalische Behandlung in Probe A generierten Glycidolmenge berücksichtigt werden.

Die Quantifizierung der Analyten erfolgt durch interne Einzelpunkt-Kalibrierung unter Verwendung der entsprechenden d_5 -Ester als Surrogatstandards. Eine externe Kalibrierung ist daher nicht erforderlich. Gleichmaßen muss keine Analyt-Wiederfindung berücksichtigt werden. Die Spaltraten von MCPD-Mono- und -Diestern können sich jedoch unterscheiden und da nur d_5 -MCPD-Diester als interne Standards dienen, sollte der Grad der Esterspaltung in größerem Rahmen stattgefunden haben. Der Abweichungsgrad der Esterspaltung wird durch die Berechnung der Differenzen zwischen den 3-MCPD-Ergebnissen aus Probe A und B überwacht.

Da 3-MCPD in bestimmten für Nassfestharze und andere Zwecke verwendeten Polymeren auftreten kann, ist auch ein Auftreten aus der Anwendung von Verbrauchsmaterialien wie etwa Fläschchen mit Schraubverschluss oder Filter möglich. Das Backen der Laborglaswaren bei 400 °C bis 500 °C kann dieses Problem reduzieren. Die Anwendung nicht kontaminierter Materialien ist eine bessere Lösung.

5 Reagenz

5.1 Allgemeines

WARNUNG — Die gesetzlichen und verordnungsrechtlichen Vorschriften für die Handhabung von Gefahrstoffen sind zu beachten. Technische, organisatorische und persönliche Sicherheitsvorkehrungen müssen befolgt werden.

Sofern nicht anders angegeben, müssen analytisch reine Reagenzien verwendet werden. Wasser muss der Qualität 3 nach ISO 3696 entsprechen.

5.2 Lösungsmittel und Chemikalien

5.2.1 Toluol.

5.2.2 *tertiärer* Methyltertiärbutylether (*t*BME), (2-Methoxy-2-Methylpropan).

5.2.3 Methanol.

5.2.4 *Iso*-Hexan (2-Methylpentan).

5.2.5 Ethylacetat.

5.2.6 Diethylether.

5.2.7 *Iso*-Oktan.

5.2.8 Anhydrisches Natriumsulfat, granulatförmig.

5.3 Standard- und Referenzgemische

5.3.1 2-MCPD.

5.3.2 2-MCPD- d_5 .

5.3.3 2-MCPD-1,3-*bis*-Stearoylester *.

5.3.4 2-MCPD- d_5 -1,3-*bis*-Stearoylester *.

5.3.5 3-MCPD.

5.3.6 3-MCPD- d_5 .

5.3.7 3-MCPD-1,2-*bis*-Palmitoylester *.

5.3.8 3-MCPD- d_5 -1,2-*bis*-Palmitoylester *.

5.3.9 Glycidyloleat*.

5.3.10 Glycidyl- d_5 -Oleat*.

*Andere handelsübliche Fettsäureester der Analyten dürfen ersetzt werden.

5.4 Arbeitslösungen**

5.4.1 2-MCPD: 10,0 µg/ml in Methanol.

5.4.2 2-MCPD-d₅: 10,0 µg/ml in Methanol.

5.4.3 3-MCPD: 10,0 µg/ml in Methanol.

5.4.4 3-MCPD-d₅: 10,0 µg/ml in Methanol.

5.4.5 2-MCPD-1,2-bis-Stearoylester: 29,1 µg/ml; entspricht 5,0 µg/ml freiem 3-MCPD in Toluol.

5.4.6 2-MCPD-d₅-1,2-bis-Stearoylester: 9,3 µg/ml in Toluol; entspricht 5,0 µg/ml freiem 3-MCPD.

5.4.7 3-MCPD-1,3-bis-Palmitoylester: 26,6 µg/ml in Toluol; entspricht 5,0 µg/ml freiem 2-MCPD.

5.4.8 3-MCPD-d₅-1,3-bis-Palmitoylester: 26,8 µg/ml in Toluol; entspricht 5,0 µg/ml freiem 2-MCPD.

5.4.9 Glycidyleoleat: 22,8 µg/ml in Toluol; entspricht 5,0 µg/ml freiem Glycidol.

5.4.10 Glycidyl-d₅-Oleat: 23,2 µg/ml in Toluol; entspricht 5,0 µg/ml freiem Glycidol.

**Andere Konzentrationen der Arbeitslösungen dürfen ersatzweise verwendet werden.

5.5 Andere Lösungen

5.5.1 Natriumhydroxidlösung: 0,25 g frisch gemahlenes Natriumhydroxid werden in einer 100-ml-Kunststoffflasche eingewogen. 100 ml Methanol werden hinzugegeben und die Flasche wird dicht verschlossen. Die Flasche wird gründlich geschüttelt (Vortex), bis sich das Natriumhydroxid vollständig aufgelöst hat. Die Lösung wird in einem Gefrierschrank bei –22 °C bis –25 °C (siehe Anmerkungen, 10.1.1.) aufbewahrt.

5.5.2 Gesäuerte Natriumbromidlösung: 600 g Natriumbromid werden in eine volumetrische Glasflasche mit Schraubverschluss mit einem Fassungsvermögen von 1 l eingewogen und die Flasche wird bis zur 1-Liter-Markierung mit entionisiertem Wasser aufgefüllt. Die Mischung wird mit 3 ml Orthophosphorsäure (85 %) gesäuert. Die Flasche wird dicht verschlossen und geschüttelt (Vortex), bis die Lösung klar ist. 600 µl dieser Lösung müssen 350 µl der Natriumhydroxidlösung (Lösungen, 1) neutralisieren und den pH-Wert auf den sauren Bereich (pH 3-1) einstellen. Die Lösung wird in einem Gefrierschrank bei –22 °C bis –25 °C (siehe Anmerkungen, 10.1.1.) aufbewahrt.

5.5.3 Gesättigte Lösung von Phenylboronsäure (PBA) in Diethylether: Etwa 200 mg PBA werden zu 10 ml Diethylether in einem Schraubverschlussfläschchen hinzugegeben. Das Fläschchen wird gründlich geschüttelt, sodass sich das gelöste PBA absetzt und als Ausfällung zurückbleibt. Verwenden Sie zu Derivatisierungszwecken nur den klaren Überstand.

6 Geräte

6.1 Eppendorf-Pipetten (z. B. 10 µl bis 100 µl, 10 µl bis 200 µl, 100 µl bis 1 000 µl).

6.2 Kolbenhub- und volumetrische Pipetten, in verschiedenen Größen.

6.3 Volumetrische Flaschen, in verschiedenen Größen.

6.4 Analysewaagen, mit Ablesegenauigkeit von 0,0 001 g und Wägegenauigkeit von 0,001 g.

6.5 Fläschchen mit Schraubverschluss (etwa 2 ml Kapazität) und Schraubverschlüsse mit Polytetrafluorethylen (PTFE)-beschichtetem Septum.

6.6 Pasteur-Pipetten und Vollpipetten.

6.7 Mikroeinsätze (etwa 200 µl Kapazität) für Fläschchen mit Schraubverschluss (etwa 2 ml Kapazität).

6.8 Stickstoffabblasgerät.

6.9 GC-MS-System mit temperaturprogrammierbarem Injektor.

6.10 Quarzglas-Trennsäule, stationäre Phase 50 %, Diphenyl 50 % Dimethylpolysiloxan, Länge 30 m, Innendurchmesser 0,25 mm, Filmdicke 0,25 µm, geringer Ablauf für MS-Zwecke, mit Vorsäule

ANMERKUNG Die Vorsäule, die regelmäßig ausgetauscht werden sollte, verzögert nichtflüchtige Komponenten und verlängert so die Lebensdauer der Hauptsäule.

7 Probe

7.1 Probenahme

Die Probenahme ist nicht Teil dieses Verfahrens. Ein empfohlenes Probenahmeverfahren ist ISO 5555 [9] zu entnehmen.

7.2 Probenvorbereitung

7.2.1 Flüssige Proben werden direkt aliquotiert. Feste oder halbfeste Fette werden bei etwa 80 °C in einem Trockenofen oder Wasserbad geschmolzen. Bei Fetten mit hohem Schmelzpunkt kann die Temperatur in Schritten von je 10 °C erhöht werden, bis der Schmelzprozess einsetzt. Feste Proben, die höhere Wassermengen enthalten, werden ohne Schmelzen aliquotiert, um eine Phasentrennung zu verhindern.

8 Verfahren (siehe 10.1.2.)

8.1 Versetzen mit Surrogatstandard und Homogenisierung

Zwei Aliquote der Probe von $100 \pm 0,5$ mg werden in zwei Fläschchen mit Schraubverschluss mit einer Kapazität von etwa 2 ml eingewogen oder es werden genau etwa zwei Aliquote von 100 mg der Probe eingewogen und Maßnahmen zur Sicherstellung der direkten Massenbilanz für die Quantifizierung getroffen. Zu Probe A werden 50 µl aller 2- und 3-MCPD-d₅ Standardarbeitslösungen (Arbeitslösungen, **5.4.2.** und **5.4.4.**) hinzugegeben. Zu Probe A werden 100 µl Glycidyl-d₅-Ester Standardarbeitslösung (Arbeitslösungen, **5.4.10.**) pipettiert. Zu Probe B werden 100 µl 2-MCPD-d₅-bis-Ester Standardarbeitslösung (Arbeitslösungen, **5.4.6.**) und 100 µl 3-MCPD-d₅-bis-Ester Standardarbeitslösung (Arbeitslösung, **5.4.8.**) überführt. Zu jeder Probe werden 600 µl Diethylether hinzugegeben und die Proben werden geschüttelt (Vortex), bis sich alle Mischungen vollständig gelöst haben. Im Fall von Probenmaterial mit hohem Schmelzpunkt kann eine leichte Erwärmung der Reaktionsgefäße erforderlich sein.

8.2 Esterspaltung und Glycidolumwandlung

Beide Proben werden für mindestens 15 min in einen Gefrierschrank gegeben, um auf –22 °C bis –25 °C (eine Ausfällung des Probenmaterials ist in dieser Phase der Probenvorbereitung kein Problem) abzukühlen. Zu jeder Probe werden 350 µl methanolische Natriumhydroxidlösung (Andere Lösungen, **5.5.1**) hinzugegeben. Um die Esterspaltung abzuschließen, werden die Fläschchen versiegelt, kurz geschüttelt (Vortex) und für mindestens 16 h bei –22 °C bis –25 °C aufbewahrt. Die Reaktionen werden mit 600 µl gesäuerter Natriumbromidlösung (Andere Lösungen, **5.5.2.**) gestoppt, die bei –22 °C bis –25 °C gehalten wird. Die Mischungen werden kurz geschüttelt (Vortex) und unter einen leichten Stickstoffstrom gehalten,

um das Volumen der organischen Phase auf etwa 100 µl zu reduzieren. Zu beiden Proben sind 600 µl Isohexan hinzuzugeben. Die Fläschchen werden verschlossen und gründlich geschüttelt (Vortex). Die Mischungen werden für etwa 5 bis 10 min bei Raumtemperatur stehengelassen, um die Umwandlung von Glycidol in MBPD abzuschließen. (siehe Anmerkungen, **10.1.3.**).

ANMERKUNG Andere Temperaturbereiche für das Verfahren der Esterspaltungen können angewendet werden, wenn eine Verfahrensvalidierung stattgefunden hat. Es ist wichtig, zu berücksichtigen, dass Arbeiten bei Temperaturbereichen über -22 °C zu einer erhöhten Umwandlung von 3-MCPD in Glycidol führt. Hierdurch kann sich die Unsicherheit der Glycidolbestimmung erhöhen.

8.3 Matrixentfernung

Die organische Phase wird mit der Pasteur-Pipette entfernt. Die wässrige Phase in jeder Probe wird mit weiteren 600 µl Isohexan gewaschen.

8.4 Derivatisierung

Mit einer neuen Pasteur-Pipette wird jede Probe dreimal mit 600 µl einer 3:2 (v:v) Mischung aus Diethylether/Ethylacetat extrahiert. Es ist darauf zu achten, dass die Pipette die wässrige Phase nicht berührt. Für jede Probe A und B werden die organischen Extrakte in einem neuen Fläschchen mit Schraubverschluss, das eine geringe Menge anhydrides Natriumsulfat enthält, kombiniert. Wenn das Trocknungsmittel klebrig wird, wird die Lösung in ein neues Fläschchen mit Schraubverschluss und frischem Natriumsulfat überführt. 20 µl des Derivatisierungsreagenz (Andere Lösungen, **5.5.3.**) werden beiden organischen Extrakten hinzugefügt, um die Derivatisierung zu erreichen. Wenn die Derivatisierungsreaktion zu einer kleinen Analyt-Signalreaktion führt, wird die Menge des Derivatisierungsmittels erhöht, bis der Rauschabstand in dem entsprechenden Chromatogramm sich nicht mehr erhöht. Die maximal verwendbare Menge des Derivatisierungsreagenz ist durch die jeweilige Kapazität des gaschromatographischen Massenspektrometers beschränkt, um übermäßiges PBA zu verhindern. Um die Derivatisierungsreaktion abzuschließen und überschüssiges Reagenz zu entfernen, werden bei Proben in einem sanften Stickstoffstrom bis zur Trockenheit verdunstet. Lösliche Fraktionen werden in etwa 300 µl bis 500 µl Isooktan erneut gelöst und die Mischung wird für einige Sekunden gründlich geschüttelt (Vortex). Für die GC/MS-Messung wird eine Portion jeder Lösung in einen 200 µl Mikroeinsatz überführt.

8.5 Gaschromatographie/Massenspektrometrie-Referenzen

8.5.1 Gaschromatographie a. Injektionsvolumen: 1 µl bis 2 µl

8.5.2 Trägergas: Helium 4,6 (99,996 %) oder Helium 5,0 (99,999 %), konstanter Fluss 1 ml/min bis 1,5 ml/min

8.5.3 PTV-Temperaturprogramm: z. B. 85 °C, Erhöhung der Temperatur mit 300 °C/min auf 165 °C, für 10 min isothermal halten, erhöhen mit 300 °C/min auf 320 °C, 8 min isothermal halten

8.5.4 Injektor: z. B. splitlos, Spülfluss 50 ml/min 0,5 min bis 1 min, Septumspülung 3 ml/min

8.5.5 GC-Ofentemperatur-Programm: z. B. 85 °C isothermal 0,5 min, Erhöhung mit 6 °C/min auf 150 °C, dann mit 12 °C/min auf 180 °C, dann mit 25 °C/min auf 280 °C, isothermal für 8 min halten

8.5.6 Massenspektrometrie a. Elektronenstoß (EI), Selected Ion Monitoring (SIM)

8.5.7 Identifizierte Ionenspur in Relation zur spezifischen Ladung (m/z) aus den Phenylboronderivaten der Analyten: 3-MCPD- d_5 : $m/z = 149/150/201/203$; 3-MCPD: $m/z = 146/147/196/198$; 2-MCPD- d_5 : $m/z = 201/203$; 2-MCPD: $m/z = 196/198$; 3-MBPD- d_5 (Glycidol- d_5 Umwandlungsprodukt): $m/z = 245/247$; 3-MBPD (Glycidol-Umwandlungsprodukt): $m/z = 240/242$, sollten für Zielionen markierter und unmarkierter Analyten zu Quantifizierungszwecken übereinstimmen; z. B. $m/z = 150$ vs. 147 (3-MCPD- d_5 vs. 3-MCPD), $m/z = 201$ vs. 196 (2-MCPD- d_5 vs. 2-MCPD), $m/z = 245$ vs. 240 (3-MBPD- d_5 vs. 3-MBPD)

8.5.8 Für die Quantifizierung wird eine geeignete Software mit automatischer Datenanalyse empfohlen.

9 Angabe der Ergebnisse (siehe Anmerkungen, 10.1.4.)

9.1 Bestimmungen des gebundenen Glycidols

9.1.1 Das gebundene Glycidol in Probe A wird in Angabe der Ergebnisse, **9.1.1.** ohne Korrektur angegeben, wenn der 3-MCPD-Gehalt im Vergleich zum Glycidolgehalt gering ist. Im Fall größerer Mengen 3-MCPD kann die Umwandlung von 3-MCPD in Glycidol unvollständig sein, was zu einer Überschätzung des Glycidolgehalts führt. Um dies auszugleichen, wird das Umwandlungsverhältnis von 3-MCPD- d_5 -Diester in 3-MBPD- d_5 in Probe B bestimmt und ein Faktor angewendet, um die potenzielle Umwandlung von 3-MCPD in 3-MBPD in Probe A zu quantifizieren. Diese Verfahren wird in der Angabe der Ergebnisse, **9.1.2. bis 9.1.5.** beschrieben.

9.1.2 Für die quantitative Bestimmung des gebundenen Glycidols wird der Signalbereich des Phenylboronderivats des 3-MBPD in Probe A mit dem Aufstockgrad des internen Standards Glycidol- d_5 (eingeführt als Glycidyl- d_5 -Ester) in Verbindung mit seiner Konzentration in der Probe multipliziert und geteilt durch den Signalbereich des Phenylboronderivats des 3-MBPD- d_5 :

$$w_{\text{glycidol unkorrigiert}(A)} = \frac{SA_{3-MBPD}(A) \times w_{\text{glycidol-}d_5(A)}}{SA_{3-MBPD-d_5}(A)}$$

Dabei ist

$w_{\text{glycidol unkorrigiert}(A)}$	der unkorrigierte Massenanteil von Glycidol in Probe A in mg/kg
$w_{\text{glycidol-}d_5(A)}$	der Massenanteil in mg/kg von Glycidol- d_5 in Probe A
$SA_{3-MBPD}(A)$	der Signalbereich des Phenylboronderivats von 3-MBPD in Probe A
$SA_{3-MBPD-d_5}(A)$	der Signalbereich des Phenylboronderivats von 3-MBPD- d_5 in Probe A

Wenn die Probe erhebliche Mengen 3-MCPD enthält, kann der unkorrigierte Glycidolwert wie folgt um einen Faktor angepasst werden.

9.1.3 Um die unerwünschte Umwandlung von 3-MCPD über Glycidol in 3-MBPD während der Probenvorbereitung zu bestimmen, wird das entsprechende Umwandlungsverhältnis 3-MCPD- $d_5 \rightarrow$ 3-MBPD- d_5 in Probe B durch Teilung des Signalbereichs des Phenylboronderivats von 3-MCPD- d_5 durch den Signalbereich des Phenylboronderivats von 3-MBPD- d_5 in Probe B berechnet:

$$t_{3MCPD} = \frac{SA_{3-MBPD-d_5}(B)}{SA_{3-MCPD-d_5}(B)}$$

Dabei ist

t_{3-MCPD}	das Umwandlungsverhältnis 3-MCPD-d ₅ → 3-MBPD-d ₅
$SA3-MBPD-d_5(B)$	der Signalbereich des Phenylboronderivats von 3-
$MBPD-d_5$	in Probe B
$SA3-MCPD-d_5(B)$	der Signalbereich des Phenylboronderivats von 3-MCPD-d ₅ in Probe B

9.1.4 Nach der Probenvorbereitung und der GC/MS-Analyse in Übereinstimmung mit den Verfahrens- und Geräteabschnitten korreliert das Verhältnis zwischen dem erkannten 3-MBPD und 3-MBPD-d₅ mit dem Isotopenfaktor (siehe Anmerkungen, **10.1.5.**):

$$I = \frac{SA\ 3 - MBPD}{SA\ 3 - MBPD - d_5}$$

Dabei ist

I	der Isotopenfaktor
$SA3-MBPD$	der Signalbereich des Phenylboronderivats von 3-MBPD
$SA3-MBPD-d_5$	der Signalbereich des Phenylboronderivats von 3-MBPD-d ₅

9.1.5 Demzufolge kann die korrigierte Glycidol-Menge wie folgt bestimmt werden:

$$w_{glycidol\ korrigiert(A)} = \frac{(SA3 - MBPD(A) - (t3 - MCPD \times SA3 - MCPD(A) \times I))w_{glycidol-d_5(A)}}{SA\ 3 - MBPD - d_5(A)}$$

Dabei ist

$w_{glycidol\ korrigiert(A)}$	der korrigierte Massenanteil von Glycidol in Probe A in mg/kg
$t3-MCPD$	das Umwandlungsverhältnis 3-MCPD → 3-MBPD (Angabe der Ergebnisse, 9.1.3.)
I	der Isotopenfaktor (Angabe der Ergebnisse, 9.1.4.)
$w_{glycidol-d_5(A)}$	der Massenanteil von Glycidol-d ₅ in Probe A in mg/kg
$SA3-MBPD(A)$	der Signalbereich des Phenylboronderivats von 3-MBPD in Probe A
$SA3-MCPD(A)$	der Signalbereich des Phenylboronderivats von 3-MCPD in Probe A
$SA3-MBPD-d_5(A)$	der Signalbereich des Phenylboronderivats von 3-MBPD-d ₅ in Probe A

9.2 Bestimmung des gebundenen 2-MCPD

Für die quantitative Bestimmung des gebundenen 2-MCPD wird der Signalbereich des Phenylboronderivats des 2-MCPD in Probe B mit dem Aufstockgrad des internen Standards 2-MCPD-d₅ (eingeführt als 2-MCPD-d₅-Ester) in Verbindung mit seiner Konzentration in der Probe multipliziert und geteilt durch den Signalbereich des Phenylboronderivats des 2-MCPD-d₅:

$$w_{2-MCPD(B)} = \frac{SA_{2-MCPD(B)} \times w_{2-MCPD-d_5(B)}}{SA_{2-MCPD-d_5(B)}}$$

Dabei ist

$w_{2-MCPD(B)}$	der Massenanteil von 2-MCPD in Probe B in mg/kg
$w_{2-MCPD-d_5(B)}$	der Massenanteil von 2-MCPD-d ₅ in Probe B in mg/kg
$SA_{2-MCPD(B)}$	der Signalbereich des Phenylboronderivats von 2-MCPD in Probe B
$SA_{2-MCPD-d_5(B)}$	der Signalbereich des Phenylboronderivats von 2-MCPD-d ₅ in Probe B

9.3 Bestimmung des gebundenen 3-MCPD

Für die quantitative Bestimmung des gebundenen 3-MCPD wird der Signalbereich des Phenylboronderivats von 3-MCPD in Probe B mit dem Aufstockungsgrad des internen Standards 3-

MCPD-d₅ (eingeführt als 3-MCPD-d₅-Ester) in Relation zu seiner Konzentration in der Probe multipliziert und durch den Signalbereich des Phenylboronderivats von 3-MCPD-d₅ geteilt:

$$w_{3-MCPD(B)} = \frac{SA_{3-MCPD(B)} \times w_{3-MCPD-d_5(B)}}{SA_{3-MCPD-d_5(B)}}$$

Dabei ist

$w_{3-MCPD(B)}$	der Massenanteil von 3-MCPD in Probe B in mg/kg
$w_{3-MCPD-d_5(B)}$	der Massenanteil von 3-MCPD-d ₅ in Probe B in mg/kg
$SA_{3-MCPD(B)}$	der Signalbereich des Phenylboronderivats von 3-MCPD in Probe B
$SA_{3-MCPD-d_5(B)}$	der Signalbereich des Phenylboronderivats von 3-MCPD-d ₅ in Probe B

9.4 Bestimmung des Grads der Diesterspaltung (siehe Anmerkungen, 10.1.6.):

Für die quantitative Bestimmung der Esterspaltung wird das gebundene 3-MCPD in Probe A durch das freie 3-MCPD-d₅ quantifiziert. Aus diesem Grund wird der Signalbereich des Phenylboronderivats von 3-MCPD mit dem Aufstockungsgrad von 3-MCPD-d₅ multipliziert und durch den Signalbereich des Phenylboronderivats von 3-MCPD-d₅ geteilt:

$$w_{3-MCPD(A)} = \frac{SA_{3-MCPD(A)} \times w_{3-MCPD-d_5(A)}}{SA_{3-MCPD-d_5(A)}}$$