

DIN EN ISO 18363-3



ICS 67.200.10

Einsprüche bis 2021-09-30

Entwurf**Tierische und pflanzliche Fette und Öle –
Bestimmung von fettsäuregebundenen Chlorpropandiol (MCPD) und
Glycidol mittels GC/MS –****Teil 3: Verfahren mittels Säureumesterung und Messung für 2-MCPD,
3-MCPD und Glycidol (ISO 18363-3:2017);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 18363-3:2021**

Animal and vegetable fats and oils –

Determination of fatty-acid-bound chloropropanediols (MCPDs) and glycidol by GC/MS –
Part 3: Method using acid transesterification and measurement for 2-MCPD, 3-MCPD and
glycidol (ISO 18363-3:2017);

German and English version prEN ISO 18363-3:2021

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 3: Méthode par transestérification acide et mesure pour le 2-MCPD, le 3-MCPD et le
glycidol (ISO 18363-3:2017);

Version allemande et anglaise prEN ISO 18363-3:2021

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2021-07-30 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 oder Saatwinkler Damm 42/43, 13627 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 48 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Der Text von ISO 18363-3:2017 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und als prEN ISO 18363-3:2021 durch das Technische Komitee CEN/TC 307 „Ölsaaten, tierische und pflanzliche Fette und Öle und deren Nebenprodukte — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ übernommen, dessen Sekretariat von AFNOR (Frankreich) gehalten wird.

Das zuständige nationale 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)“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

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

Für die in diesem Dokument zitierten Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 3696	siehe	DIN ISO 3696
ISO 5555	siehe	DIN EN ISO 5555
ISO 5725-1	siehe	DIN ISO 5725-1
ISO 5725-2	siehe	DIN ISO 5725-2

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

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*

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 Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision eines vereinheitlichten Messverfahrens*

<i>Titel de:</i>	Tierische und pflanzliche Fette und Öle — Bestimmung von fettsäuregebundenen Chlorpropandiol (MCPD) und Glycidol mittels GC/MS — Teil 3: Verfahren mittels Säureumesterung und Messung für 2-MCPD, 3-MCPD und Glycidol (ISO 18363-3:2017)
<i>Titel en:</i>	Animal and vegetable fats and oils — Determination of fatty-acid-bound chloropropanediols (MCPDs) and glycidol by GC/MS — Part 3: Method using acid transesterification and measurement for 2-MCPD, 3-MCPD and glycidol (ISO 18363-3:2017)
<i>Titel fr:</i>	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 3: Méthode par transestérification acide et mesure pour le 2-MCPD, le 3-MCPD et le glycidol (ISO 18363-3:2017)

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort.....	3
Vorwort	4
Einleitung.....	5
1 Anwendungsbereich.....	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Kurzbeschreibung.....	8
5 Reagenzien.....	8
5.1 Standard- und Referenzverbindungen.....	8
5.2 Standardlösungen.....	9
5.2.1 Allgemeines.....	9
5.2.2 Stammlösungen (1 mg/ml).....	9
5.2.3 Arbeitslösungen	9
5.3 Andere Reagenzien	10
5.4 Reagenzlösungen.....	10
6 Geräte.....	11
7 Probe	11
7.1 Probenahme	11
7.2 Vorbereitung der Untersuchungsprobe.....	12
8 Verfahren.....	12
8.1 Vorbereitung der Untersuchungsprobe.....	12
8.2 Erstellung der Kalibrierkurve.....	13
8.3 Gaschromatographie/Massenspektrometrie-Referenzen	13
9 Angabe der Ergebnisse.....	14
9.1 Quantifizierung von 3-MCPD-Estern.....	14
9.2 Quantifizierung von 2-MCPD-Estern.....	15
9.3 Quantifizierung von Glycidylestern	16
10 Präzision	17
10.1 Allgemeines.....	17
10.2 Wiederholpräzision	17
10.3 Vergleichpräzision von einem Tag zu einem anderen.....	17
11 Prüfbericht.....	17
Anhang A (informativ) Erstellung der Kalibrierkurven.....	18
Anhang B (informativ) Ergebnisse des Ringversuchs.....	22
Literaturhinweise	24

Europäisches Vorwort

Der Text von ISO 18363-3:2017 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und vom Technischen Komitee CEN/TC 307 „Ölsaaten, tierische und pflanzliche Fette und Öle und deren Nebenprodukte — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ als prEN ISO 18363-3:2021 übernommen, dessen Sekretariat von AFNOR gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 18363-3:2017 wurde von CEN als prEN ISO 18363-3:2021 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Liste dieser Institute ist auf den Internetseiten von CEN abrufbar.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsinstitute (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird üblicherweise von Technischen Komitees von ISO 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 Normungsthemen 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 erhaltenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname dient nur zur Unterrichtung der Anwender und bedeutet keine Anerkennung.

Für eine Erläuterung des freiwilligen Charakters von Normen, der Bedeutung ISO-spezifischer Begriffe und Ausdrücke in Bezug auf Konformitätsbewertungen sowie Informationen darüber, wie ISO die Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO, en: World Trade Organization) hinsichtlich technischer Handelshemmnisse (TBT, en: Technical Barriers to Trade) berücksichtigt, siehe www.iso.org/iso/foreword.html.

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34, *Food products*, Unterkomitee SC 11, *Animal and vegetable fats and oils* erarbeitet.

Eine Auflistung aller Teile der Normenreihe ISO 18363 ist auf der ISO-Internetseite abrufbar.

Einleitung

Die Normenreihe ISO 18363 ist eine Familie von Internationalen Normen, die zur Bestimmung von estergebundenem MCPD und Glycidol angewendet werden können. In dieser Einleitung werden die in den drei kürzlich veröffentlichten oder vorgeschlagenen Dokumenten festgelegten Verfahren beschrieben, damit der Analytiker entscheiden kann, welche Verfahren für die Anwendung geeignet sind. Die ausführliche Anwendung jedes Verfahrens ist im Anwendungsbereich des einzelnen Verfahrens enthalten.

ISO 18363-1 ist ein Differenzmessverfahren, das mit der DGF-Norm C-VI 18 (10) vergleichbar und mit der AOCS Official Method Cd 29c-13 identisch ist. In Kürze dargestellt, basiert das Verfahren auf der schnellen alkalisch katalysierten Freisetzung von 3-MCPD und Glycidol aus den Esterderivaten. 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 Assays 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 angesäuerte 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 angesäuerten 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 Assays (A – B) und kann berechnet werden, sobald das Umwandlungsverhältnis von Glycidol zu 3-MCPD bestimmt worden ist. ISO 18363-1 ist anwendbar für die schnelle Bestimmung von estergebundenem 3-MCPD und Glycidol in raffinierten und nicht raffinierten pflanzlichen Ölen und Fetten. ISO 18363-1 kann auch für tierische Fette und gebrauchte Frittieröle und -fette gelten, hierzu muss jedoch vor der Analyse dieser Matrices eine Validierungsstudie erfolgen. Alle freien Analyten in der Probe wären in den Ergebnissen enthalten, aber dieses Dokument erlaubt keine Unterscheidung zwischen freien und gebundenen Analyten. Zum Zeitpunkt seiner Veröffentlichung haben jedoch keine Forschungen irgendeinen Nachweis eines Gehaltes an freien Analyten in raffinierten Pflanzenölen und -fetten in gleicher Höhe wie der Gehalt an veresterten Analyten erbracht. Grundsätzlich kann ISO 18363-1 auch so modifiziert werden, dass die Bestimmung von 2-MCPD möglich wird, jedoch erfordert auch dies wieder eine Validierungsstudie vor der Analyse dieses Analyten.

ISO 18363-2 (vorgeschlagen) repräsentiert die AOCS Official Method Cd 29b-13. In Kürze dargestellt, basiert dieses Verfahren auf der langsamen alkalischen Freisetzung von MCPD und Glycidol aus den Esterderivaten. Glycidol wird anschließend in 3-MBPD umgewandelt. ISO 18363-2 wird aus zwei Probenvorbereitungen bestehen, die sich in der Anwendung interner Standards unterscheiden. 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 von isotoopenmarkierten freien MCPD-Isomeren in Assay A und isotoopenmarkiertem estergebundenem 2-MCPD und 3-MCPD in Teil B kann die Effizienz der Esterspaltung überwacht werden. Sowohl Assay A als auch Assay B basieren auf der Freisetzung der Zielanalyten 2-MCPD, 3-MCPD und Glycidol aus der estergebundenen Form durch eine langsame alkalisch katalysierte Alkoholyse in der Kälte. In beiden Probenvorbereitungen wird die Reaktion durch die Hinzugabe einer angesäuerten konzentrierten Natriumbromidlösung gestoppt, um das instabile und flüchtige Glycidol in 3-MBPD umzuwandeln, das mit 3-MCPD vergleichbare Eigenschaften hinsichtlich seiner Stabilität und des chromatographischen Verhaltens aufweist. Darüber hinaus verhindert der erhebliche Überschuss an Bromidionen die unerwünschte Bildung von 3-MCPD aus Glycidol im Fall von Proben, die natürlich auftretende Chloridmengen enthalten. ISO 18363-2 wird für die Bestimmung von estergebundenem 3-MCPD, 2-MCPD und Glycidol in raffinierten und nicht raffinierten pflanzlichen Ölen und Fetten anwendbar sein. Sie wird auch für tierische Fette und gebrauchte Frittieröle und -fette gelten, hierzu muss jedoch vor der Analyse dieser Matrices eine Validierungsstudie erfolgen. Alle freien Analyten in der Probe wären in den Ergebnissen enthalten, aber dieses Dokument wird keine Unterscheidung zwischen freien und gebundenen Analyten erlauben. Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung dieses Dokuments haben jedoch keine Forschungen irgendeinen Nachweis eines Gehaltes an freien Analyten in Pflanzenölen und -fetten in gleicher Höhe wie der Gehalt an veresterten Analyten erbracht.

Dieses Dokument repräsentiert die AOCS Official Method Cd 29a-13. In Kürze dargestellt, basiert dieses Verfahren auf der Umwandlung von Glycidylestern in 3-MBPD-Ester und einer langsamen säurekatalysierten Freisetzung von MCPD und MBPD aus den Esterderivaten. Dieses Dokument basiert auf einer einzigen Probenvorbereitung, bei der Glycidylester in MBPD-Monoester umgewandelt und anschließend die freien Analyten 2-MCPD, 3-MCPD und 3-MBPD durch eine langsame säurekatalysierte Alkoholyse freigesetzt werden. 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 nicht raffinierten pflanzlichen Ölen und Fetten angewendet werden. Es kann auch für tierische Fette und gebrauchte Frittieröle und -fette gelten, hierzu muss jedoch vor der Analyse dieser Matrices eine Validierungsstudie erfolgen. Das Verfahren eignet sich für die Analyse von gebundenen (veresterten) Analyten, aber bei Bedarf kann dieses Dokument auch ohne die ursprüngliche Umwandlung von Glycidylestern angewendet werden. In dieser Konfiguration wären sowohl freie als auch 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. Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung dieses Dokuments haben jedoch keine Forschungen irgendeinen Nachweis eines Gehaltes an freien Analyten in Pflanzenölen und -fetten in gleicher Höhe wie der Gehalt an veresterten Analyten erbracht.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Verfahren für die gleichzeitige Bestimmung von 2-MCPD-Estern (gebundenem 2-MCPD), 3-MCPD-Estern (gebundenem 3-MCPD) und Glycidylestern (gebundenem Glycidol) in einem einzigen Assay, basierend auf einer vor der GC/MS-Analyse erfolgenden säurekatalysierten Esterspaltung und Derivatisierung der abgespaltenen (freien) Analyte mit Phenylboronsäure (PBA).

Dieses Dokument ist auf feste und flüssige Fette und Öle anwendbar. Für alle drei Analyte liegt die Quantifizierungsgrenze (en: limit of quantification, LOQ) bei 0,1 mg/kg und die Nachweisgrenze (en: limit of detection, LOD) bei 0,03 mg/kg.

WARNUNG — Dieses Dokument erfordert den Umgang mit gefährlichen Stoffen. Technische, organisatorische und persönliche Sicherheitsvorkehrungen müssen befolgt werden.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

ISO 3696, *Water for analytical laboratory use — Specification and test methods*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

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

- IEC Electropedia: verfügbar unter <https://www.electropedia.org/>
- ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <https://www.iso.org/obp>

3.1

gebundenes 2-MCPD

Menge an 2-MCPD, die durch säurekatalysierte Umesterung nach dem Referenzverfahren von ihren veresterten (gebundenen) Formen abgespalten wurde

Anmerkung 1 zum Begriff: Der Gehalt an 2-MCPD wird als Massenanteil in Milligramm je Kilogramm (mg/kg) berechnet und angegeben.

3.2

gebundenes 3-MCPD

Menge an 3-MCPD, die durch säurekatalysierte Umesterung nach dem Referenzverfahren von ihren veresterten (gebundenen) Formen abgespalten wurde

Anmerkung 1 zum Begriff: Der Gehalt an 3-MCPD wird als Massenanteil in Milligramm je Kilogramm (mg/kg) berechnet und angegeben.

3.3

gebundenes Glycidol

Menge an Glycidol, die durch säurekatalysierte Umesterung nach dem Referenzverfahren von ihren veresterten (gebundenen) Formen abgespalten wurde

Anmerkung 1 zum Begriff: Der Gehalt an Glycidol wird als Massenanteil in Milligramm je Kilogramm (mg/kg) berechnet und angegeben.

4 Kurzbeschreibung

Die Öl-/Fettprobe wird in Tetrahydrofuran gelöst, und es werden die internen Standards (pentadeuterierter 3-MCPD-Diester und pentadeuterierter Glycidylester) hinzugegeben. Im ersten Schritt der Probenvorbereitung werden die Glycidylester durch die Zugabe einer angesäuerten Lösung von Natriumbromid in 3-MBPD-Monoester umgewandelt. Nach Abschluss der Reaktion wird die organische Phase, die 2- und 3-MCPD-Ester und 3-MBPD-Ester enthält, abgeschieden und bis zur Trockne eingedampft. Im zweiten Schritt wird der Rückstand in Tetrahydrofuran gelöst und durch Hinzugabe einer sauren alkoholischen Lösung die saure Umesterung eingeleitet. Nach einer 16 h dauernden Inkubation bei 40 °C wird die Probenmischung neutralisiert, und die bei der Umesterung gebildeten Fettsäuremethylester werden entfernt. Schließlich wird die gereinigte [abgespaltene (freie) Analyte enthaltende] Probe vor der GC/MS-Analyse mit Phenylboronsäure derivatisiert.

Die Quantifizierung von 2- und 3-MCPD-Estern (angegeben als gebundenes 2- und 3-MCPD) basiert auf dem Signalverhältnis 2-MCPD/3-MCPD-d5 bzw. 3-MCPD/3-MCPD-d5. Die Quantifizierung von Glycidylestern (angegeben als gebundenes Glycidol) basiert auf dem Signalverhältnis 3-MBPD/3-MBPD-d5.

Dieses Verfahren ermöglicht die gleichzeitige Quantifizierung aller drei Analyten in einem einzigen Assay.

5 Reagenzien

WARNUNG — Dieses Dokument erfordert den Umgang mit gefährlichen Stoffen. Technische, organisatorische und persönliche Sicherheitsvorkehrungen müssen befolgt werden.

Sofern nichts anderes angegeben ist, müssen analytisch reine Reagenzien verwendet werden. Wasser muss der Qualität 3 nach ISO 3696 entsprechen.

5.1 Standard- und Referenzverbindungen

5.1.1 1,2-Dipalmitoyl-3-Chlorpropandiol (PP-3-MCPD), Reinheit ≥ 95 % (z. B. von einem Zulieferer oder aus 3-MCPD und Palmitoylchlorid synthetisiert, wie in Literaturhinweis [1] beschrieben).

ANMERKUNG 1,2-Dipalmitoyl-3-Chlorpropandiol kann durch 1,2-Dioleoyl-3-Chlorpropandiol oder andere Fettsäurediester von 3-MCPD mit ähnlicher Kettenlänge ersetzt werden (C16-C18 werden bevorzugt, weil sie in den meisten Ölen/Fetten am häufigsten vorkommen).

5.1.2 1,3-Dipalmitoyl-2-Chlorpropandiol (PP-2-MCPD), Reinheit ≥ 95 % (z. B. aus 2-MCPD und Palmitoylchlorid synthetisiert, wie in Literaturhinweis [1] beschrieben).

ANMERKUNG In Analogie zu den für PP-3-MCPD gegebenen Empfehlungen kann 1,3-Dipalmitoyl-2-Chlorpropandiol durch andere Fettsäurediester von 2-MCPD mit ähnlicher Kettenlänge ersetzt werden (C16-C18 werden bevorzugt, weil sie in den meisten Ölen/Fetten am häufigsten vorkommen).

5.1.3 Pentadeuteriertes 1,2-Dipalmitoyl-3-Chlorpropandiol (PP-3-MCPD-d5), Reinheit ≥ 95 %.

ANMERKUNG Die gleichen Überlegungen, die für 1,2-Dipalmitoyl-3-Chlorpropandiol gelten, sind auch für dessen pentadeuteriertes Analogon gültig, siehe die Anmerkung in 5.1.1.

5.1.4 Glycidylpalmitat (Gly-P), Reinheit ≥ 98 %.

ANMERKUNG Glycidylpalmitat kann durch Glycidyleoleat oder andere Fettsäureester von Glycerin mit ähnlicher Kettenlänge ersetzt werden (C16-C18 werden bevorzugt, weil sie in den meisten Ölen/Fetten am häufigsten vorkommen).

5.1.5 Pentadeuteriertes Glycidylpalmitat (Gly-P-d5), Reinheit $\geq 98\%$.

ANMERKUNG Die gleichen Überlegungen, die für Glycidylpalmitat gelten, sind auch für dessen pentadeuteriertes Analogon gültig, siehe die Anmerkung in 5.1.4.

5.2 Standardlösungen

5.2.1 Allgemeines

Alle Standardlösungen können entweder mit Toluol (5.3.5) oder mit Tetrahydrofuran (5.3.1) hergestellt werden. Bei Standardlösungen, die Glycidylester enthalten, wird Toluol bevorzugt.

5.2.2 Stammlösungen (1 mg/ml)

- 10 mg PP-3-MCPD (5.1.1) werden in einen 10-ml-Messkolben eingewogen. Dann wird bis zur Marke aufgefüllt, wobei sicherzustellen ist, dass der Standard vollständig im Lösemittel gelöst ist.
- 10 mg PP-2-MCPD (5.1.2) werden in einen 10-ml-Messkolben eingewogen. Dann wird bis zur Marke aufgefüllt, wobei sicherzustellen ist, dass der Standard vollständig im Lösemittel gelöst ist.
- 10 mg PP-3-MCPD-d5 (5.1.3) werden in einen 10-ml-Messkolben eingewogen. Dann wird bis zur Marke aufgefüllt, wobei sicherzustellen ist, dass der Standard vollständig im Lösemittel gelöst ist.
- 10 mg Gly-P (5.1.4) werden in einen 10-ml-Messkolben eingewogen. Dann wird bis zur Marke aufgefüllt, wobei sicherzustellen ist, dass der Standard vollständig im Lösemittel gelöst ist.
- 10 mg Gly-P-d5 (5.1.5) werden in einen 10-ml-Messkolben eingewogen. Dann wird bis zur Marke aufgefüllt, wobei sicherzustellen ist, dass der Standard vollständig im Lösemittel gelöst ist.

ANMERKUNG Stammlösungen sind, wenn sie bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden, mindestens drei Monate stabil.

5.2.3 Arbeitslösungen

- Kalibrierung I (PP-3-MCPD, $55\text{ }\mu\text{g/ml}$). $550\text{ }\mu\text{l}$ der Stammlösung [5.2.2 a)] werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert, und es wird bis zur Marke mit dem Lösemittel aufgefüllt.
- Kalibrierung II (PP-3-MCPD, $5,5\text{ }\mu\text{g/ml}$). 1 ml der Kalibrierung-I-Lösung [5.2.3 a)] wird in einen 10-ml-Messkolben pipettiert, und es wird bis zur Marke mit dem Lösemittel aufgefüllt.
- Kalibrierung III (PP-2-MCPD, $55\text{ }\mu\text{g/ml}$). $550\text{ }\mu\text{l}$ der Stammlösung [5.2.2 b)] werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert, und es wird bis zur Marke mit dem Lösemittel aufgefüllt.
- Kalibrierung IV (PP-2-MCPD, $5,5\text{ }\mu\text{g/ml}$). 1 ml der Kalibrierung-III-Lösung [5.2.3 c)] wird in einen 10-ml-Messkolben pipettiert, und es wird bis zur Marke mit dem Lösemittel aufgefüllt.
- Kalibrierung V (Gly-P, $100\text{ }\mu\text{g/ml}$). 1 ml der Stammlösung [5.2.2 d)] wird in einen 10-ml-Messkolben pipettiert, und es wird bis zur Marke mit dem Lösemittel aufgefüllt.
- Kalibrierung VI (Gly-P, $10\text{ }\mu\text{g/ml}$). 1 ml der Kalibrierung-V-Lösung [5.2.3 e)] wird in einen 10-ml-Messkolben pipettiert, und es wird bis zur Marke mit dem Lösemittel aufgefüllt.

- g) Interner Standard I (PP-3-MCPD-d5, 40 µg/ml). 400 µl der Stammlösung [5.2.2 c)] werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert, und es wird bis zur Marke mit dem Lösemittel aufgefüllt.
- h) Interner Standard II (Gly-P-d5, 50 µg/ml). 500 µl der Stammlösung [5.2.2 e)] werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert, und es wird bis zur Marke mit dem Lösemittel aufgefüllt.

ANMERKUNG 1 Alternativ zur Vorbereitung von getrennten Standardlösungen für jedeneinzelnen Analyten können die drei [in 5.2.3 a), c) und e) angegebenen] in einer einzigen Standardlösung mit hoher Konzentration aller drei Analyten kombiniert werden („gemischte Kalibrierung I“). Zur Herstellung der gemischten Lösung werden 550 µl der PP-3-MCPD-Stammlösung [5.2.2 a)], 550 µl der PP-2-MCPD Stammlösung [5.2.2 b)] und 1 ml der Gly-P Stammlösung [5.2.2 d)] in einen 10-ml-Messkolben pipettiert, und es wird bis zur Marke mit dem Lösemittel aufgefüllt. Die Lösungen 5.2.3 b), d) und f) können auch zu einer einzigen Standardlösung mit niedriger Konzentration aller drei Analyten kombiniert werden („gemischte Kalibrierung II“). Um die gemischte Lösung vorzubereiten, wird 1 ml der gemischten Kalibrierung I in einen 10-ml-Messkolben pipettiert, und es wird bis zur Marke mit dem Lösemittel aufgefüllt.

ANMERKUNG 2 Die internen Standardlösungen [5.2.3 g) und h)] können auch in einer einzigen Lösung kombiniert werden („gemischter interner Standard“). Um die gemischte Lösung herzustellen, werden 400 µl PP-3-MCPD-d5 [5.2.2 c)] und 500 µl Gly-P-d5 [5.2.2 e)] in einen 10-ml-Messkolben pipettiert, und es wird bis zur Marke mit dem Lösemittel aufgefüllt.

5.3 Andere Reagenzien

5.3.1 **Tetrahydrofuran**, wasserfrei.

5.3.2 **Methanol**, von anerkannter Analysenreinheit.

5.3.3 **n-Heptan**, von anerkannter Analysenreinheit.

5.3.4 **Aceton**, von anerkannter Analysenreinheit.

5.3.5 **Toluol**, von anerkannter Analysenreinheit.

5.3.6 **Wasser**, hochrein (z. B. mit Hilfe eines Reinigungssystems erhalten).

5.3.7 **Schwefelsäure**, mit einer Reinheit $\geq 95 \%$.

5.3.8 **Natriumhydrogencarbonat**, mit einer Reinheit $\geq 99 \%$.

5.3.9 **Natriumsulfat**, mit einer Reinheit $\geq 99 \%$.

5.3.10 **Phenylboronsäure**, mit einer Reinheit $\geq 97 \%$.

5.3.11 **Natriumbromid**, mit einer Reinheit $\geq 99,5 \%$.

5.4 Reagenzlösungen

5.4.1 **Saure wässrige Natriumbromidlösung** [Natriumbromid 3 mg/ml, Schwefelsäure 5 % (Volumenanteil)]. Durch Lösen von 1 g Natriumbromid (5.3.11) in 10 ml hochreinem Wasser (5.3.6) wird eine konzentrierte wässrige Natriumbromidlösung hergestellt. 180 µl der konzentrierten Lösung werden in einen leeren Erlenmeyerkolben überführt. Dann werden 0,3 ml Schwefelsäure (5.3.7) und 5,5 ml hochreines Wasser (5.3.6) hinzugegeben. Gründlich schütteln.

Es ist ratsam, diese Lösung jeden Tag frisch herzustellen.

5.4.2 **Natriumhydrogencarbonatlösung** (0,6 %, Massenkonzentration). 0,6 g Natriumhydrogencarbonat (5.3.8) werden in einen 100-ml-Messkolben eingewogen, und es wird bis zur Marke mit hochreinem Wasser

(5.3.6) aufgefüllt. Um sicherzustellen, dass das Reagenz vollständig gelöst ist, ist ein Ultraschallbad (6.3) zu verwenden.

ANMERKUNG Alternativ kann die Lösung auch durch Verdünnung der gesättigten Lösung von Natriumhydrogencarbonat (5.4.4) hergestellt werden.

5.4.3 Schwefelsäure/Methanol-Lösung (1,8 %, Volumenanteil). 1,8 ml Schwefelsäure (5.3.7) werden in einen 100-ml-Messkolben pipettiert, und es wird bis zur Marke mit Methanol (5.3.2) aufgefüllt.

Es ist ratsam, diese Lösung jeden Tag frisch herzustellen.

5.4.4 Natriumhydrogencarbonatlösung (gesättigt). 9,6 g Natriumhydrogencarbonat (5.3.8) werden in einen 100-ml-Messkolben eingewogen, und es wird bis zur Marke mit hochreinem Wasser (5.3.6) aufgefüllt. Um sicherzustellen, dass das Reagenz vollständig gelöst ist, ist ein Ultraschallbad (6.3) zu verwenden.

ANMERKUNG Um die Robustheit des Verfahrens zu verbessern, kann die gesättigte Lösung von Natriumhydrogencarbonat durch eine Lösung der genauen Konzentration (9 %, Massenkonzentration) ersetzt werden.

5.4.5 Natriumsulfatlösung (20 %, Massenkonzentration). 20 g Natriumsulfat (5.3.9) werden in einen 100-ml-Messkolben eingewogen, und es wird bis zur Marke mit hochreinem Wasser (5.3.6) aufgefüllt. Um sicherzustellen, dass das Reagenz vollständig gelöst ist, ist ein Ultraschallbad (6.3) zu verwenden.

5.4.6 Phenylboronsäurelösung (gesättigt). 3 g Phenylboronsäure (5.3.10) sind abzuwägen, und es werden 12 ml einer Mischung aus Aceton (5.3.4) und hochreinem Wasser (5.3.6) (19/1 Volumenanteil) hinzugegeben. Gründlich schütteln.

ANMERKUNG Die Phenylboronsäure löst sich in dieser Lösemittelmischung nicht vollständig. Für den Derivatisierungsschritt (8.1.6) wird nur der Überstand verwendet.

6 Geräte

6.1 Vortexmischer.

6.2 Trockenschrank, dessen Temperatur auf $45\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ gehalten werden kann.

6.3 Ultraschallbad.

6.4 Verdampfer (Stickstoff).

6.5 Zentrifuge.

6.6 GC/MS-Ausrüstung bestehend aus

- a) Kapillargaschromatograph gekoppelt mit einem quadrupolmassenselektiven Detektor und einem Datenverarbeitungssystem, und
- b) einer gebundenen, Poly(dimethylsiloxan)-Kapillarsäule (z. B. 30 m Länge $\times$ 0,25 mm Innendurchmesser $\times$ 1,0 μm Filmdicke).

7 Probe

7.1 Probenahme

Die Probenahme ist nicht Teil dieses Verfahrens. Ein empfohlenes Probenahmeverfahren ist in ISO 5555 angegeben.

7.2 Vorbereitung der Untersuchungsprobe

Flüssige Proben müssen ohne zusätzliche Behandlung verwendet werden. Feste oder trübe Fette müssen bei etwa 80 °C in einem Trockenschrank oder Wasserbad vorsichtig geschmolzen werden. Bei hochschmelzenden Fetten muss die Temperatur vorsichtig in Schritten von je 10 °C erhöht werden, bis der Schmelzprozess einsetzt.

8 Verfahren

8.1 Vorbereitung der Untersuchungsprobe

8.1.1 100 mg bis 110 mg des Öls oder Fetts werden (mit einer Grenzabweichung von 0,01 mg) in ein Glasröhrchen mit Schraubverschluss eingewogen. Danach werden 50 µl der internen Standard-Arbeitslösungen I [5.2.3 g)] und II [5.2.3 h)] sowie 2 ml Tetrahydrofuran (5.3.1) hinzugegeben. Anschließend wird mit Hilfe eines Vortexmischers (6.1) für 15 s (oder bis sich die Bestandteile vollständig gelöst haben) gemischt.

Die Anwesenheit von Wasser behindert die Umwandlung der Glycidylester in MBPD-Monoester (8.1.2); daher wird empfohlen, wasserfreies Tetrahydrofuran (5.3.1) zu verwenden[2].

Falls die gemischte interne Standardlösung verwendet wird (siehe die Anmerkung in 5.2.3), müssen 50 µl dieser Lösung zur Probe hinzugegeben werden.

Falls der Verdacht besteht, dass die Probe große Mengen an Chloridsalzen enthält, ist ein zusätzlicher Schritt der Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Wasser erforderlich, wie in Literaturhinweis [3] beschrieben. In diesem Fall muss besonders darauf geachtet werden, dass die Wasserschicht nach der Extraktion vollständig verworfen wird.

8.1.2 30 µl saure wässrige Natriumbromidlösung (5.4.1) werden der Probe hinzugegeben, danach wird mit Hilfe eines Vortexmischers (6.1) gründlich geschüttelt, und die Mischung wird für 15 min bei 50 °C bebrütet. Die Reaktion wird durch Zugabe von 3 ml einer 0,6 %igen wässrigen Natriumhydrogencarbonatlösung (5.4.2) gestoppt. Um das Öl bzw. Fett von der Wasserphase zu trennen, werden 2 ml *n*-Heptan (5.3.3) hinzugegeben, und es wird mit Hilfe eines Vortexmischers (6.1) für 15 s gründlich gemischt. Nach der Trennung der beiden Phasen wird die obere Schicht in ein leeres Glasröhrchen überführt und unter einem Stickstoffstrom (für höchstens 15 min bis 20 min bei 35 °C bis 40 °C) bis zur Trockne verdampft. Der Rückstand wird in 1 ml Tetrahydrofuran (5.3.1) gelöst.

Sowohl die Reaktionsdauer als auch die Reaktionstemperatur müssen sorgfältig kontrolliert werden, um entweder eine unvollständige Umwandlung der Glycidylester oder eine ex-novo-Bildung von 3-MBPD-Estern zu vermeiden[2].

Die klare Trennung der organischen Phase von der Wasserphase kann sich schwierig gestalten. Häufig ist daher eine Zentrifugierung der Probe (für etwa 1 min bis 2 min bei 250g) notwendig.

Die Verdampfung der organischen Phase unter Stickstoffstrom muss sorgfältig überwacht werden und unmittelbar nach der Verdampfung des Lösemittels beendet werden. Eine kleine Restmenge an Lösemittel (< 50 µl), die in der Probe gelöst ist, beeinträchtigt die Qualität der Ergebnisse nicht und sollte einer längeren Einwirkung auf die Probe gegenüber einem Stickstoffstrom vorgezogen werden.

8.1.3 1,8 ml Schwefelsäure/Methanol-Lösung (5.4.3) werden der Probe hinzugegeben, und es wird für 10 s mit Hilfe eines Vortexmischers (6.1) geschüttelt. Der Verschluss des Glasröhrchens wird dicht verschlossen, und die Mischung wird bei 40 °C für 16 h bebrütet.

8.1.4 Nach der Inkubationszeit wird die Reaktion gestoppt, indem der Probe 0,5 ml gesättigte Natriumhydrogencarbonatlösung (5.4.4) hinzugegeben werden. Mit Hilfe eines Vortexmischers (6.1) wird

für 10 s geschüttelt. Die organischen Lösemittel der Mischung werden unter einem Stickstoffstrom verdampft.

ANMERKUNG Die Entfernung von organischen Lösungsmitteln erhöht die Empfindlichkeit des Verfahrens. Die Verdampfung kann gestoppt werden, wenn das Volumen im Reagenzglas bei einer Sichtprüfung etwa 1 ml beträgt.

8.1.5 2 ml Natriumsulfatlösung (5.4.5) und 2 ml *n*-Heptan (5.3.3) werden hinzugegeben. Mit Hilfe eines Vortexmischers (6.1) wird für 10 s geschüttelt. Die beiden Phasen trennen sich dann spontan innerhalb weniger Sekunden. Die obere Phase (die in *n*-Heptan gelöste Fettsäuremethylester enthält) wird verworfen, und die Extraktion wird mit *n*-Heptan wiederholt.

Bei der zweiten Extraktion ist es wichtig, die obere organische Phase vollständig zu entfernen.

8.1.6 Es werden 250 µl Phenylboronsäurelösung (5.4.6) hinzugegeben, danach wird mit Hilfe eines Vortexmischers (6.1) für 10 s geschüttelt und die Mischung anschließend bei Raumtemperatur für 5 min in einem Ultraschallbad (6.3) bebrütet.

8.1.7 Die Phenylboronderivate von 2- und 3-MCPD sowie 3-MBPD werden durch Zugabe von 1 ml *n*-Heptan (5.3.3) extrahiert, indem mit Hilfe eines Vortexmischers (6.1) für 10 s geschüttelt und dann die obere Phase in ein leeres Reagenzglas überführt wird. Die Extraktion wird mit 1 ml *n*-Heptan wiederholt und die beiden Extrakte werden miteinander kombiniert. Danach werden die Extrakte unter einem Stickstoffstrom bis zur Trockne verdampft. Der Rückstand wird in 400 µl *n*-Heptan gelöst, indem die Mischung 10 s mit Hilfe eines Vortexmischers (6.1) geschüttelt und dann der Überstand in ein leeres GC-Fläschchen überführt wird (üblicherweise wird ein Glaseinsatz mit einem Fassungsvermögen von etwa 250 µl verwendet).

Die Verdampfung der Extrakte unter Stickstoffstrom kann bei etwa 35 °C bis 40 °C durchgeführt werden, um die Verdampfung des *n*-Heptans zu erleichtern, sie muss aber gestoppt werden, sobald das Lösemittel verdampft ist, um durch die hohe Flüchtigkeit der Phenylboronderivate bedingte Verluste zu verhindern.

Wird die Verdampfung der Extrakte bei erhöhter Temperatur (von höchstens 40 °C) durchgeführt, so müssen die Reagenzgläser vor dem Lösen des Rückstandes auf Raumtemperatur abkühlen gelassen werden.

ANMERKUNG Während des Verdampfens der Extrakte kristallisiert der Überschuss an Phenylboronsäure, der nicht mit 2- und 3-MCPD sowie 3-MBPD reagiert hat, durch Bildung eines weißen Niederschlags an den Wänden des Reagenzglases. Die Zugabe von 400 µl *n*-Heptan (der letzte Schritt der Probenvorbereitung) führt nicht zu dessen vollständiger Lösung, die anderenfalls die Analyse stören würde.

8.2 Erstellung der Kalibrierkurve

8.2.1 Es werden neun Kalibrierproben vorbereitet, indem 50 µl der beiden internen Standard-Arbeitslösungen [5.2.3 g) und h)] und das in Tabelle A.1 angegebene Volumen der Kalibrierlösungen [5.2.3 a) bis f)] pipettiert werden. Es werden 2 ml Tetrahydrofuran (5.3.1) hinzugegeben, und anschließend wird mit Hilfe eines Vortexmischers (6.1) für 10 s gründlich geschüttelt.

ANMERKUNG Die Zugabe von 100 mg bis 110 mg eines Blind-Öls (das weder 2-MCPD- bzw. 3-MCPD-Ester noch Glycidylester enthält) zu den Kalibrierproben kann die Robustheit des Verfahrens verbessern, weil die Ölmatrix während des Verdampfungsschritts als Anker für die Analyten wirkt.

8.2.2 Die Kalibrierproben werden nach dem gleichen Verfahren behandelt, das auf die Untersuchungsproben angewendet wurde (8.1).

8.3 Gaschromatographie/Massenspektrometrie-Referenzen

8.3.1 Injektionsvolumen: 1,0 µl.