

	DIN EN ISO 18363-3	
ICS 67.200.10	<div>Entwurf</div>	Einsprüche bis 2024-06-12 Vorgesehen als Ersatz für DIN EN ISO 18363-3:2022-04
<p>Tierische und pflanzliche Fette und Öle – Bestimmung von fettsäuregebundenem Chlorpropandiol (MCPD) und Glycidol mittels GC/MS – Teil 3: Verfahren mittels Säureumesterung und Messung für 2-MCPD, 3-MCPD und Glycidol (ISO/FDIS 18363-3:2024); Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 18363-3:2024</p> <p>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/FDIS 18363-3:2024); German and English version prEN ISO 18363-3:2024</p> <p>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 du 2-MCPD, du 3-MCPD et du glycidol (ISO/FDIS 18363-3:2024); Version allemande et anglaise prEN ISO 18363-3:2024</p> <p>Anwendungswarnvermerk</p> <p>Dieser Entwurf mit Erscheinungsdatum 2024-04-12 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.</p> <p>Weil das beabsichtigte Dokument von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs besonders zu vereinbaren.</p> <p>Stellungnahmen werden erbeten</p> <ul style="list-style-type: none">– 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 Am DIN-Platz, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin. <p>Es wird gebeten, mit den Kommentaren zu diesem Entwurf jegliche relevanten Patentrechte, die bekannt sind, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.</p> <p>Gesamtumfang 51 Seiten</p> <p>DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)</p>		

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 18363-3:2024) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 307 „Ölsaaten, tierische und pflanzliche Fette und Öle und deren Nebenprodukte — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, 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
ISO 18363-1	siehe	DIN EN ISO 18363-1

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

Änderungen

Gegenüber DIN EN ISO 18363-3:2022-04 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) der Text der Einleitung wurde an Teil 4 der Normenreihe ISO 18363 angepasst.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

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

DIN EN ISO 18363-1, *Tierische und pflanzliche Fette und Öle — Bestimmung von fettsäuregebundenem Chlorpropandiol (MCPD) und Glycidol mittels GC/MS — Teil 1: Verfahren mittels schneller alkalischer Umesterung und Messung für 3-MCPD und Differenzmessung für Glycidol*

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 die Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision eines vereinheitlichten Messverfahrens*

– Leerseite –

März 2024

prEN ISO 18363-3

Tierische und pflanzliche Fette und Öle – Bestimmung von fettsäuregebundenem Chlorpropandiol (MCPD) und Glycidol mittels GC/MS – Teil 3: Verfahren mittels Säureumesterung und Messung für 2-MCPD, 3-MCPD und Glycidol (ISO/FDIS 18363-3:2024)

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/FDIS 18363-3:2024)

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 du 2-MCPD, du 3-MCPD et du glycidol (ISO/FDIS 18363-3:2024)

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Vorwort	5
Einleitung	6
1 Anwendungsbereich	8
2 Normative Verweisungen	8
3 Begriffe	8
4 Kurzbeschreibung	9
5 Reagenzien	9
5.1 Standard- und Referenzverbindungen	9
5.2 Standardlösungen	10
5.2.1 Allgemeines	10
5.2.2 Stammlösungen (1 mg/ml)	10
5.2.3 Arbeitslösungen	10
5.3 Andere Reagenzien	11
5.4 Reagenzlösungen	11
6 Prüfeinrichtung	12
7 Probe	12
7.1 Probenahme	12
7.2 Vorbereitung der Untersuchungsprobe	12
8 Verfahren	12
8.1 Vorbereitung der Untersuchungsprobe	12
8.2 Erstellung der Kalibrierkurve	14
8.3 Gaschromatographie/Massenspektrometrie-Referenzen	14
9 Angabe der Ergebnisse	15
9.1 Quantifizierung von 3-MCPD-Estern	15
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	19
Anhang B (informativ) Ergebnisse des Ringversuchs	24
Literaturhinweise	26

Bilder

Bild A.1 — Kalibrierkurve von PP-3-MCPD	19
Bild A.2 — Kalibrierkurve von Gly-P	20
Bild A.3 — SIM-Chromatogramm einer Probe eines vollständig raffinierten Palmöls (extrahierte Ionen m/z 147 und 150)	21
Bild A.4 — SIM-Chromatogramm einer Probe eines vollständig raffinierten Palmöls (extrahierte Ionen m/z 196 und 201)	22

Tabellen

Tabelle A.1 — Schema für die Erstellung der Kalibrierkurve für PP-3-MCPD, PP-2-MCPD und Gly-P 22

Tabelle B.1 — Statistische Ergebnisse für 3-MCPD 24

Tabelle B.2 — Statistische Ergebnisse für 2-MCPD 24

Tabelle B.3 — Statistische Ergebnisse für Glycidol 25

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 18363-3:2024) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 307 „Ölsaaten, 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 formellen Abstimmung vorgelegt.

Dieses Dokument wird EN ISO 18363-3:2021 ersetzen.

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.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/FDIS 18363-3:2024 wurde von CEN als prEN ISO 18363-3:2024 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

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 Directives, 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 Directives, Teil 2, erarbeitet (siehe www.iso.org/directives).

ISO weist auf die Möglichkeit hin, dass die Anwendung dieses Dokuments mit der Verwendung eines oder mehrerer Patente verbunden sein kann. ISO bezieht jedoch in dieser Hinsicht keinerlei Stellung bezüglich Nachweis, Gültigkeit oder Anwendbarkeit jeglicher beanspruchten Patentrechte. Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung dieses Dokuments lag ISO keine Mitteilung über ein Patent bzw. mehrere Patente vor, welche/s zur Umsetzung dieses Dokuments erforderlich sein könnte/n. Anwender werden jedoch darauf hingewiesen, dass dies möglicherweise nicht der aktuelle Informationsstand ist. Dieser kann jedoch der Patentdatenbank unter www.iso.org/patents entnommen werden. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

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*, in Zusammenarbeit mit dem Europäischen Komitee für Normung (CEN), Technisches Komitee CEN/TC 307, *Ölsaaten, tierische und pflanzliche Fette und Öle und deren Nebenprodukte — Probenahme- und Untersuchungsverfahren*, in Übereinstimmung mit der Vereinbarung zur technischen Zusammenarbeit zwischen ISO und CEN (Wiener Vereinbarung) erarbeitet.

Diese zweite Ausgabe ersetzt die erste Ausgabe (ISO 18363-3:2017), die geringfügig geändert wurde. Die Änderungen sind folgende:

— der Text der Einleitung wurde überarbeitet, damit er mit ISO 18363-4:2021 übereinstimmt.

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

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Auflistung dieser Institute ist unter www.iso.org/members.html zu finden.

Einleitung

Die Normenreihe ISO 18363 kann zur Bestimmung von estergebundenem MCPD und Glycidol angewendet werden. Diese Einleitung beschreibt die in den verschiedenen Teilen festgelegten Verfahren, damit der Analytiker entscheiden kann, welche Verfahren für die Anwendung geeignet sind. Die genaue Anwendung jedes Verfahrens ist im Anwendungsbereich jedes einzelnen Verfahrens enthalten.

ISO 18363-1 ist ein Differenzverfahren, das mit der DGF-Einheitmethode C-VI 18 (10) [11] gleichwertig und mit der AOCS Official Method Cd 29c-13 [10] identisch ist. Kurz gefasst beruht es auf einer schnellen alkalisch katalysierten Freisetzung von 3-MCPD und Glycidol aus den Ester-Derivaten. Glycidol wird anschließend in induziertes 3-MCPD umgewandelt. Es besteht aus zwei Teilen. Der erste Teil (A) ermöglicht die Bestimmung der Summe von estergebundenem 3-MCPD und estergebundenem Glycidol, während der zweite Teil (B) nur estergebundenes 3-MCPD bestimmt. Beide Prüfungen basieren auf der Freisetzung der Ziel-Analyten 3-MCPD und Glycidol aus der estergebundenen Form durch eine alkalisch katalysierte Alkoholyse, die bei Raumtemperatur erfolgt. In Teil A wird eine angesäuerte Natriumchloridlösung verwendet, um die Reaktion zu beenden 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 das Hinzufügen einer angesäuerten chloridfreien Salzlösung erreicht, die auch die Umwandlung von Glycidol in induziertes MCPD verhindert. Folglich ermöglicht Teil B die Bestimmung des tatsächlichen 3-MCPD-Gehalts. Letztendlich ist der Glycidolgehalt der Probe proportional zur Differenz zwischen beiden Prüfungen (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 auf tierische Fette und gebrauchte Frittieröle und -fette angewendet werden, jedoch muss vor der Analyse dieser Matrices eine Validierungsstudie durchgeführt werden. Alle freien Analyten in der Probe würden in die Ergebnisse einbezogen werden, aber dieses Dokument lässt keine Unterscheidung zwischen freien und gebundenen Analyten zu. Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung dieses Dokuments hat die Forschung jedoch keinen Nachweis eines Gehaltes an freien Analyten in gleicher Höhe wie der Gehalt an veresterten Analyten in raffinierten pflanzlichen Ölen und Fetten erbracht. Grundsätzlich kann ISO 18363-1 auch so modifiziert werden, dass die Bestimmung von 2-MCPD durchführbar ist, aber auch hier muss vor der Analyse dieses Analyten eine Validierungsstudie durchgeführt werden.

ISO 18363-2 stellt die AOCS Official Method Cd 29b-13 [9] dar. Kurz gefasst, beruht sie auf einer langsamen alkalischen Freisetzung von MCPD und Glycidol aus den Ester-Derivaten. Glycidol wird anschließend in 3-MBPD umgewandelt. ISO 18363-2 besteht aus zwei Probenvorbereitungen, die sich in der Verwendung 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, diese Menge des induzierten Glycidols quantitativ zu bestimmen, die anschließend von dem vorläufigen Glycidolergebnis aus Teil A subtrahiert wird. Durch die Verwendung von isotoopenmarkierten freien MCPD-Isomeren in Prüfung A und isotoopenmarkiertem estergebundenem 2-MCPD und 3-MCPD in Teil B kann die Wirksamkeit der Esterspaltung überwacht werden. Beide Prüfungen, A und B, basieren auf der Freisetzung der Ziel-Analyten 2-MCPD, 3-MCPD und Glycidol aus der estergebundenen Form durch eine langsame alkalisch katalysierte Alkoholyse bei Kälte. In beiden Probenvorbereitungen wird die Reaktion durch das Hinzufügen einer angesäuerten konzentrierten Natriumbromidlösung beendet, 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 ist anwendbar für die Bestimmung von estergebundenem 3-MCPD, 2-MCPD und Glycidol in raffinierten und nicht raffinierten pflanzlichen Ölen und Fetten. Sie wird auch auf tierische Fette und gebrauchte Frittieröle und -fette angewendet, jedoch muss vor der Analyse dieser Matrices eine Validierungsstudie durchgeführt werden. Alle freien Analyten in der Probe werden in die Ergebnisse einbezogen, aber dieses Dokument lässt keine Unterscheidung zwischen freien und gebundenen Analyten zu. Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung dieses Dokuments hat die Forschung jedoch keinen Nachweis eines Gehaltes an freien Analyten in gleicher Höhe wie der Gehalt an veresterten Analyten in raffinierten pflanzlichen Ölen und Fetten erbracht.

Dieses Dokument (d. h. ISO 18363-3) stellt die AOCS Official Method Cd 29a-13 [8] dar. Kurz gefasst, beruht sie auf der Umwandlung von Glycidylestern in 3-MBPD-Ester und einer langsamen säurekatalysierten Freisetzung von MCPD und MBPD aus den Ester-Derivaten. Dieses Dokument beruht auf einer einzigen Probenvorbereitung, bei der Glycidylester in MBPD-Monoester umgewandelt werden; anschließend werden die freien Analyten 2-MCPD, 3-MCPD und 3-MBPD durch eine langsame säurekatalysierte Alkoholyse freigesetzt. Das 3-MBPD steht für den tatsächlichen Gehalt an gebundenem Glycidol. Dieses Dokument ist für die Bestimmung von estergebundenem 2-MCPD, 3-MCPD und Glycidol in raffinierten und nicht raffinierten pflanzlichen Ölen und Fetten anwendbar. Es gilt auch für tierische Fette und gebrauchte Frittieröle und -fette, jedoch muss vor der Analyse dieser Matrices eine Validierungsstudie durchgeführt werden. 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. Bei einer derartigen Anordnung sind 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 zwei Bestimmungen berechnet werden, die in beiden Anordnungen vorgenommen wurden. Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung dieses Dokuments hat die Forschung jedoch keinen Nachweis eines Gehaltes an freien Analyten in gleicher Höhe wie der Gehalt an veresterten Analyten in raffinierten pflanzlichen Ölen und Fetten erbracht.

ISO 18363-4 legt ein schnelles Verfahren auf der Grundlage einer schnellen alkalischen Spaltung von MCPD und Glycidylestern fest. Das freigesetzte Glycidol wird anschließend in 3-MBPD umgewandelt. Der pH-Wert der schnellen alkalischen Spaltung führt im Allgemeinen dazu, dass sich das freigesetzte MCPD während der Spaltung der Ester teilweise in Glycidol umwandelt, was zu einer Überschätzung des Glycidylestergehalts der Probe führt. Durch Hinzufügen von zwei unterschiedlichen internen Standards von isotopenmarkiertem estergebundenem 3-MCPD und Glycidol ist es möglich, die Menge an markiertem Glycidol quantitativ zu bestimmen, die sich aus dem Abbau des freigesetzten internen Standards ergibt. Diese Information kann verwendet werden, um eine Überschätzung des Glycidylester-induzierten Glycidols durch 3-MCPD-induziertes Glycidol zu korrigieren. Die gleichen beiden internen Standards werden für die quantitative Bestimmung des gebundenen MCPD und Glycidols verwendet, wobei eine einzige Probenvorbereitung erforderlich ist, um die gebundenen 2-MCPD-, 3-MCPD- und Glycidolester quantitativ zu bestimmen. Analog zu ISO 18363-1, ISO 18363-2 und diesem Dokument werden die freigesetzten MCPD und 3-MBPD vor der GC-MS/MS-Analyse mit Phenylboronsäure derivatisiert. Im Gegensatz zu den anderen Teilen der Normenreihe ISO 18363 erfordert ISO 18363-4 eine Geräteausstattung für GC-MS/MS, um jedes der (isotopenmarkierten) MBPD eindeutig nachzuweisen, die für die korrekte quantitative Bestimmung des Glycidylester-induzierten Glycidols erforderlich sind. ISO 18363-4 ist anwendbar für die Bestimmung von estergebundenem 3-MCPD, 2-MCPD und Glycidol in raffinierten und nicht raffinierten pflanzlichen Ölen und Fetten. Es wird auch auf tierische Fette und gebrauchte Frittieröle und -fette angewendet, jedoch muss vor der Analyse dieser Matrices eine Validierungsstudie durchgeführt werden. Alle freien Analyten in der Probe werden in die Ergebnisse einbezogen, aber ISO 18363-4 lässt keine Unterscheidung zwischen freien und gebundenen Analyten zu. Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung dieses Dokuments hat die Forschung jedoch keinen Nachweis eines Gehaltes an freien Analyten in gleicher Höhe wie der Gehalt an veresterten Analyten in raffinierten pflanzlichen Ölen und Fetten 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 einer einzigen Prüfung fest, basierend auf einer vor der GC/MS-Analyse erfolgenden säurekatalysierten Esterspaltung und Derivatisierung der abgespaltenen (freien) Analyten mit Phenylboronsäure (en: phenylboronic acid, PBA).

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

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:

— ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <https://www.iso.org/obp>

— IEC Electropedia: verfügbar unter <https://www.electropedia.org/>

3.1

gebundenes 2-MCPD

Menge an 2-MCPD, die durch säurekatalysierte Umesterung nach dem Referenzverfahren aus 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 aus 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 aus 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, abgetrennt 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) Analyten 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 einer einzigen Prüfung.

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 5.1.1, Anmerkung.

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

ANMERKUNG Glycidylpalmitat kann durch Glycidyloleat oder andere Fettsäureester von Glycidol 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 ≥ 98 %.

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

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)

- a) 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.
- b) 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.
- c) 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.
- d) 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.
- e) 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°C gelagert werden, mindestens drei Monate stabil.

5.2.3 Arbeitslösungen

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

5.3.3 **n-Heptan**, analysenrein.

5.3.4 **Aceton**, analysenrein.

5.3.5 **Toluol**, analysenrein.

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. Es wird gründlich geschüttelt.

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.

E DIN EN ISO 18363-3:2024-05
prEN ISO 18363-3:2024 (D)

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. Es wird gründlich geschüttelt.

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

6 Prüfeinrichtung

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 massenselektiven Quadrupol-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 eingesetzt 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 (auf 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) 15 s (oder bis sich die Bestandteile vollständig gelöst haben) gemischt.