

DIN EN ISO 18363-4



ICS 67.200.10

Einsprüche bis 2021-02-11

Entwurf

**Tierische und pflanzliche Fette und Öle –
Bestimmung von fettsäuregebundenem Chlorpropandiol (MCPD) und
Glycidol mittels GC/MS –
Teil 4: Verfahren mittels schneller alkalischer Umesterung und Messung
für 2-MCPD, 3-MCPD und Glycidol (ISO/DIS 18363-4:2020);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 18363-4:2020**

Animal and vegetable fats and oils –
Determination of fatty-acid-bound chloropropanediols (MCPDs) and glycidol by GC/MS –
Part 4: Method using fast alkaline transesterification and measurement for 2-MCPD, 3-MCPD
and glycidol by GC-MS (ISO/DIS 18363-4:2020);
German and English version prEN ISO 18363-4:2020

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2020-12-11 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 61 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 18363-4:2020) 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 Nebenprodukt — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR (Frankreich) gehalten wird.

Das zuständige deutsche/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 661	siehe	DIN EN ISO 661

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

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

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

<i>Titel de:</i>	Tierische und pflanzliche Fette und Öle — Bestimmung von fettsäuregebundenem Chlorpropandiol (MCPD) und Glycidol mittels GC/MS — Teil 4: Verfahren mittels schneller alkalischer Umesterung und Messung für 2-MCPD, 3-MCPD und Glycidol (ISO/DIS 18363-4:2020)
<i>Titel en:</i>	Animal and vegetable fats and oils — Determination of fatty-acid-bound chloropropanediols (MCPDs) and glycidol by GC/MS — Part 4: Method using fast alkaline transesterification and measurement for 2-MCPD, 3-MCPD and glycidol by GC-MS/MS (ISO/DIS 18363-4:2020)
<i>Titel fr:</i>	

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	8
2 Normative Verweisungen	8
3 Begriffe	8
4 Kurzbeschreibung	9
5 Reagenzien	9
5.1 Allgemeines	9
5.2 Standard- und Referenzverbindungen	9
5.3 Standardlösungen	10
5.3.1 Stammlösungen	10
5.3.2 Arbeitslösungen	11
5.4 Weitere Reagenzien	11
5.5 Reagenzlösungen	12
6 Prüfeinrichtung	12
7 Probe und Lagerung	12
7.1 Probenahme	12
7.2 Vorbereitung der Untersuchungsprobe	13
7.3 Lagerungsbedingungen	13
8 Durchführung	13
8.1 Vorbereitung der Untersuchungsprobe	13
8.2 Erstellung der Kalibrierkurve	14
8.3 Gaschromatographie/Massenspektrometrie-Referenzen	14
9 Angabe der Ergebnisse	15
9.1 Quantitative Bestimmung von 2-MCPD- und 3-MCPD-Estern	16
9.2 Quantitative Bestimmung von Glycidylestern	17
9.3 Qualitätskontrolle	20
10 Anmerkungen	20
11 Präzision	22
11.1 Allgemeines	22
11.2 Wiederholpräzision	22
11.3 Vergleichpräzision zwischen Tagen	22
Anhang A (Unterstützende Tabellen)	23
Anhang B (informativ) Statistische Ergebnisse des Ringversuchs von ISO	25
Anhang C (informativ) Chromatogramme	29
Literaturhinweise	31

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 18363-4:2020) 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 Umfrage vorgelegt.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/DIS 18363-4:2020 wurde von CEN als prEN ISO 18363-4:2020 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-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 wird als Information zum Nutzen der Anwender angegeben und stellt keine Anerkennung dar.

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.

Das für dieses Dokument verantwortliche Komitee ist ISO/TC 34, *Food products*, Unterkomitee SC 11, *Animal and vegetable fats and oils*.

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

- 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
- Part 4: Method using fast alkaline transesterification and measurement for 2-MCPD, 3-MCPD and glycidol (MS/MS)

Einleitung

Die Normenreihe ISO 18363 ist eine Familie Internationaler Normen, die zur Bestimmung von estergebundenem MCPD und Glycidol verwendet werden kann. Diese Einleitung beschreibt die in den derzeit veröffentlichten oder vorgeschlagenen Dokumenten festgelegten Verfahren, damit der Analytiker entscheiden kann, welche Verfahren für die Anwendung geeignet sind. Die genaue Anwendung jedes Verfahrens ist im Anwendungsbereich des einzelnen Verfahrens enthalten.

ISO 18363-1 ist ein Differenzverfahren, das der DGF-Einheitsmethode C-VI 18 (10) gleichwertig und mit der AOCS Official Method Cd 29c-13 identisch ist. Kurz gefasst, beruht es auf einer schnellen alkalisch katalysierten Freisetzung von 3-MCPD und Glycidol aus 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 bei Raumtemperatur. 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. Teil B ermöglicht somit die Bestimmung des tatsächlichen 3-MCPD-Gehalts. Schließlich 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, vor der Analyse dieser Matrices muss jedoch eine Validierungsstudie erfolgen. Alle freien Analyten in der Probe würden in die Ergebnisse einbezogen werden, aber das Dokument lässt keine Unterscheidung zwischen freien und gebundenen Analyten zu. Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung 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 ist vor der Analyse dieses Analyten eine Validierungsstudie durchzuführen.

ISO 18363-2 stellt das AOCS Official Method Cd 29b-13 dar. Kurz gefasst, beruht es auf einer langsamen alkalischen Freisetzung von MCPD und Glycidol aus 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, vor der Analyse dieser Matrices muss jedoch eine Validierungsstudie erfolgen. Alle freien Analyten in der Probe würden in die Ergebnisse einbezogen werden, aber das 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 pflanzlichen Ölen und Fetten erbracht.

ISO 18363-3 stellt das AOCS Official Method Cd 29a-13 dar. Kurz gefasst, beruht es auf der Umwandlung von Glycidylestern in 3-MBPD-Ester und einer langsamen sauer katalysierten Freisetzung von MCPD und MBPD aus den Esterderivaten. Dieses Dokument beruht 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 eine langsame säurekatalysierte Alkoholyse freigesetzt. Das 3-MBPD steht für 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 auf tierische Fette und gebrauchte Frittieröle und -fette angewendet werden, vor der Analyse dieser Matrices muss jedoch eine Validierungsstudie erfolgen. Das Verfahren eignet sich für die Analyse von gebundenen (veresterten) Analyten, bei Bedarf kann dieses Dokument aber auch ohne die ursprüngliche Umwandlung von Glycidylestern angewendet werden. Bei einer derartigen Anordnung 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 zwei Bestimmungen berechnet werden, die in beiden Anordnungen vorgenommen wurden. Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung hat die Forschung jedoch keinen Nachweis eines Gehaltes an freien Analyten in gleicher Höhe wie der Gehalt an veresterten Analyten in pflanzlichen Ölen und Fetten erbracht.

In ISO 18363-4 wird ein schnelles Verfahren auf der Grundlage einer schnellen alkalischen Spaltung von MCPD und Glycidylestern beschrieben. 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 isotonenmarkiertem 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 Informationen können 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 Teil 1 bis Teil 3 werden die freigesetzten MCPD und 3-MBPD vor der GC-MS/MS-Analyse mit Phenylboronsäure derivatisiert. Im Gegensatz zu den anderen Teilen von ISO 18363 erfordert Teil 4 eine Geräteausstattung für GC-MS/MS, um jedes der (isotonenmarkierten) 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. Sie wird auch auf tierische Fette und gebrauchte Frittieröle und -fette angewendet, vor der Analyse dieser Matrices muss jedoch eine Validierungsstudie erfolgen. Alle freien Analyten in der Probe würden in die Ergebnisse einbezogen werden, aber das 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 pflanzlichen Ölen und Fetten erbracht.

1 Anwendungsbereich

Dieser Teil von ISO 18363 beschreibt ein schnelles Verfahren für die gleichzeitige Bestimmung von 2-MCPD-Estern (gebundenes 2-MCPD), 3-MCPD-Estern (gebundenes 3-MCPD) und Glycidylestern (gebundenes Glycidol) in einer einzigen Prüfung auf der Grundlage einer alkalisch katalysierten Esterspaltung und der Derivatisierung der abgespaltenen (freien) Analyten vor der GC-MS/MS-Analyse mit Phenylboronsäure (PBA).

Das Verfahren ist auf feste und flüssige Fette und Öle anwendbar. Dieser Teil von ISO 18363 kann auch auf tierische Fette und gebrauchte Frittieröle und -fette angewendet werden, vor der Analyse dieser Matrices muss jedoch eine Validierungsstudie erfolgen. Für alle drei Analyten beträgt die Bestimmungsgrenze (LOQ, en: limit of quantification) 0,1 mg/kg und die Nachweisgrenze (LOD, en: limit of detection) 0,03 mg/kg.

Milch- und Milcherzeugnisse (oder Fett aus Milch und Milcherzeugnissen), Säuglings(anfangs)nahrung, Emulgatoren, freie Fettsäuren sowie andere aus Fetten und Ölen gewonnene Matrices sind vom Anwendungsbereich dieser Internationalen Norm ausgenommen.

WARNUNG — Es wird auf die Vorschriften hingewiesen, in denen die Handhabung von gefährlichen Stoffen festgelegt ist. Technische, organisatorische und persönliche Sicherheitsvorkehrungen müssen eingehalten werden

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente, die in diesem Dokument teilweise oder als Ganzes zitiert werden, sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

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

ISO 5555, *Animal and vegetable fats and oils — Sampling*

ISO 661, *Animal and vegetable fats and oils — Preparation of test sample*

3 Begriffe

3.1 gebundenes 2-MCPD

Menge an 2-MCPD, die durch alkalisch katalysierte 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 im Bericht angegeben.

3.2 gebundenes 3-MCPD

Menge an 3-MCPD, die durch alkalisch katalysierte 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 im Bericht angegeben.

3.3

gebundenes Glycidol

Menge an Glycidol, die durch alkalisch katalysierte 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 im Bericht angegeben.

4 Kurzbeschreibung

Die Öl/Fett-Probe wird in Toluol und tert-Butylmethylether gelöst und die internen Standards (3-MCPD- $^{13}\text{C}_3$ -Diester und pentadeuterierter Glycidylester) werden hinzugefügt. Die Probe wird anschließend auf 10 °C abgekühlt, bevor die alkalische Umesterung durch die Zugabe einer Natrium-methoxid-Lösung in Methanol eingeleitet wird. Nach einer Inkubation von 12 min bei 10 °C wird die Probenmischung mit einer sauren Lösung von Natriumbromid angesäuert, um das freigesetzte Glycidol in 3-MBPD umzuwandeln. Die während der Umesterung erzeugten Fettsäuremethylester werden durch doppelte Extraktion der organischen Schicht entfernt. Abschließend wird die gereinigte Probe - die die abgespaltenen (freien) Analyten enthält - vor der GC-MS/MS-Analyse mit Phenylboronsäure derivatisiert [1].

Die quantitative Bestimmung von estergebundenem 2- und 3-MCPD beruht auf dem Signalverhältnis von 2-MCPD/3-MCPD- $^{13}\text{C}_3$ bzw. 3-MCPD/3-MCPD- $^{13}\text{C}_3$. Die quantitative Bestimmung von estergebundenem Glycidol beruht auf dem Signalverhältnis von 3-MBPD/3-MBPD-d5. Die Menge an 3-MBPD- $^{13}\text{C}_3$, die sich nach der Umesterungsreaktion gebildet hat, zeigt die Menge an freigesetztem 3-MCPD- $^{13}\text{C}_3$ an, die aufgrund der Bedingungen der alkalischen Umesterung zu Glycidol abgebaut wurde. Da zwischen 3-MCPD und 3-MCPD- $^{13}\text{C}_3$ kein Unterschied in der Abbaugeschwindigkeit beobachtet wurde, wird es dann verwendet, um die durch diesen Abbau von 3-MCPD verursachte Überschätzung des Glycidylester-induzierten Glycidols zu korrigieren. Unter den angewendeten Bedingungen wird die 2-MCPD als stabil angesehen und trägt daher nicht wesentlich zur möglichen Überschätzung von Glycidol bei [2].

Dieses Verfahren ermöglicht die gleichzeitige quantitative Bestimmung aller drei Analyten in einer einzigen Prüfung.

5 Reagenzien

5.1 Allgemeines

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

5.2 Standard- und Referenzverbindungen

5.2.1 1,2-Dipalmitoyl-3-chlorpropandiol (PP-3-MCPD), Reinheit $\geq 95\%$ (z. B. geliefert von Toronto Research Chemicals Inc., North York, ON, Canada¹ oder aus 3-MCPD und Palmitoylchlorid synthetisiert, wie von Kraft u. a. beschrieben [1]).

ANMERKUNG 1,2-Dipalmitoyl-3-chlorpropandiol kann durch 1,2-Dioleoyl-3-chlorpropandiol oder andere Fettsäurediester von 3-MCPD mit ähnlicher Kettenlänge (C16 bis C18 sollte bevorzugt werden, da sie in der Mehrzahl der Öle/Fette am häufigsten vorkommen) ersetzt werden.

1 Der Lieferant der Standard- und Referenzverbindung ist ein Beispiel für einen geeigneten Lieferanten von handelsüblichen Referenzstandards. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch ISO.

5.2.2 1,3-Distearoyl-2-chlorpropandiol (SS-2-MCPD), Reinheit $\geq 95\%$ (z. B. geliefert von Toronto Research Chemicals Inc., North York, ON, Canada¹).

ANMERKUNG In Analogie zu den Empfehlungen für PP-3-MCPD kann 1,3-Distearoyl-2-chlorpropandiol durch andere Fettsäurediester von 2-MCPD mit ähnlicher Kettenlänge (C16 bis C18 sollte bevorzugt werden, da sie in der Mehrzahl der Öle/Fette am häufigsten vorkommen) ersetzt werden.

5.2.3 Mit Kohlenstoff-13 markiertes 1,2-Dipalmitoyl-3-chlorpropandiol (PP-3-MCPD-¹³C₃), Reinheit $\geq 95\%$ (z. B. geliefert von Toronto Research Chemicals Inc., North York, ON, Canada¹).

ANMERKUNG Die gleiche Überlegung, die für 1,2-Dipalmitoyl-3-chlorpropandiol gilt, gilt auch für sein mit Kohlenstoff-13 markiertes Analogon, siehe Anmerkung in 5.2.1.

5.2.4 Glycidylstearat (Gly-S), Reinheit $\geq 98\%$ (z. B. geliefert von Toronto Research Chemicals Inc., North York, ON, Canada¹).

ANMERKUNG Glycidylstearat kann durch Glycidyloleat oder andere Fettsäureester von Glycidol mit ähnlicher Kettenlänge (C16 bis C18 sollte bevorzugt werden, da sie in der Mehrzahl der Öle/Fette am häufigsten vorkommen) ersetzt werden.

5.2.5 Pentadeuteriertes Glycidylstearat (Gly-S-d5), Reinheit $\geq 98\%$ (z. B. geliefert von Toronto Research Chemicals Inc., North York, ON, Canada¹).

ANMERKUNG Die gleiche Überlegung, die für Glycidylpalmitat gilt, gilt auch für sein pentadeuteriertes Analogon, siehe Anmerkung in 5.2.4.

5.3 Standardlösungen

Alle Standardlösungen werden mit Toluol (5.4.4) hergestellt. Alle Standards werden unter Verwendung estergebundener Referenzverbindungen (5.2) hergestellt. Die Konzentrationen sind als Äquivalentkonzentration der freien Komponente angegeben. Bezüglich einer beispielhaften Berechnung der Umwandlung der Konzentration des estergebundenen Äquivalents in die des freien Äquivalents siehe Anmerkung 3.

5.3.1 Stammlösungen

- Kalibrierstammlösung** (3-MCPD: 52,7 µg/mL, Glycidol: 52,2 µg/mL, 2-MCPD: 48,1 µg/mL): 14,0 mg PP-3-MCPD (5.2.1), 12,0 mg Gly-S (5.2.4) und 14,0 mg SS-2-MCPD (5.2.2) werden in einen 50-mL-Messkolben eingewogen. Es wird bis zur Marke aufgefüllt, wobei sichergestellt wird, dass die Standards vollständig im Lösemittel gelöst sind.
- Aufstockstammlösung** (3-MCPD: 52,7 µg/mL, Glycidol: 52,2 µg/mL, 2-MCPD: 34,4 µg/mL): 14,0 mg PP-3-MCPD (5.2.1), 12,0 mg Gly-S (5.2.4) und 10,0 mg SS-2-MCPD (5.2.2) werden in einen 50-mL-Messkolben eingewogen. Es wird bis zur Marke aufgefüllt, wobei sichergestellt wird, dass die Standards vollständig im Lösemittel gelöst sind.
- PP-3-MCPD-¹³C₃-Stammlösung** (3-MCPD-¹³C₃: 38,5 µg/mL): 20 mg PP-3-MCPD-¹³C₃ (5.2.3) werden in einen 100-mL-Messkolben eingewogen. Es wird bis zur Marke aufgefüllt, wobei sichergestellt wird, dass der Standard vollständig im Lösemittel gelöst ist.
- Gly-S-d5-Stammlösung** (Glycidol-d5: 45,8 µg/mL): 10 mg of Gly-S-d5 (5.2.5) werden in einen 50-mL-Messkolben eingewogen. Es wird bis zur Marke aufgefüllt, wobei sichergestellt wird, dass der Standard vollständig im Lösemittel gelöst ist.

ANMERKUNG Stammlösungen sind mindestens zwölf Monate stabil, wenn sie bei -18 °C gelagert werden. Die Anwendung eines Ultraschallbades kann dabei helfen sicherzustellen, dass alle Standards vollständig gelöst sind.

5.3.2 Arbeitslösungen

- a) **Kalibrierarbeitslösung I** (3-MCPD: 7,9 µg/mL, Glycidol: 7,8 µg/mL, 2-MCPD: 7,2 µg/mL): 300 µl der Stammlösung (5.3.1a) werden in ein 2,5-mL-GC-Glasfläschchen pipettiert, das 1 700 µl Toluol (5.4.4) enthält, und alles wird mit einem Vortexmischer homogenisiert.
- b) **Kalibrierarbeitslösung II** (3-MCPD: 3,2 µg/mL, Glycidol: 3,1 µg/mL, 2-MCPD: 2,9 µg/mL): 120 µl der Stammlösung (5.3.1a) werden in ein 2,5-mL-GC-Glasfläschchen pipettiert, das 1 880 µl Toluol (5.4.4) enthält, und alles wird mit einem Vortexmischer homogenisiert.
- c) **Kalibrierarbeitslösung III** (3-MCPD: 0,16 µg/mL, Glycidol: 0,16 µg/mL, 2-MCPD: 0,14 µg/mL): 40 µl der Stammlösung (5.3.2a) werden in ein 2,5-mL-GC-Glasfläschchen pipettiert, das 1 960 µl Toluol (5.4.4) enthält, und alles wird mit einem Vortexmischer homogenisiert.

ANMERKUNG Es ist ratsam, die Kalibrierarbeitslösungen am Tag des Gebrauchs frisch herzustellen.

- d) **Aufstocklösung** (3-MCPD: 1,05 µg/mL, Glycidol: 1,04 µg/mL, 2-MCPD: 0,69 µg/mL): 5,0 mL der Aufstockstammlösung (5.3.2b) werden in einen 250-mL-Messkolben pipettiert und dieser wird bis zur Marke mit dem Lösemittel aufgefüllt.
- e) **Lösung des internen Standards** (3-MCPD-¹³C₃: 1,54 µg/mL, Glycidol-d5: 0,92 µg/mL): 5,0 ml Gly-S-d5 (5.3.21d) und 10,0 mL PP-3-MCPD-¹³C₃ (5.3.1c) werden in einen 250-mL-Messkolben pipettiert und dieser wird bis zur Marke mit dem Lösemittel aufgefüllt.

ANMERKUNG 1 Die Aufstocklösung (5.3.2d) und die Lösung des internen Standards (5.3.2e) können im Kühlschrank mindestens 3 Monate aufbewahrt werden.

ANMERKUNG 2 Die Konzentrationen aller Stamm- und Standardlösungen müssen hinsichtlich der Reinheit der verwendeten Standards korrigiert werden.

5.4 Weitere Reagenzien

5.4.1 Methanol, analysenrein

5.4.2 Isooctan, analysenrein

5.4.3 Aceton, analysenrein

5.4.4 Toluol, analysenrein

5.4.5 tert-Butylmethylether, analysenrein

5.4.6 Wasser, ultrarein (z. B. erhalten unter Anwendung eines Milli-Q-Reinigungssystems von Millipore)

5.4.7 Schwefelsäure (Reinheit ≥ 95 %)

5.4.8 Phenylboronsäure (Reinheit ≥ 97 %)

5.4.9 Natriumbromid (Reinheit ≥ 99,5 %)

5.4.10 Natriummethoxidlösung in Methanol (25 % Massenanteil)

5.4.11 Nicht wärmebehandeltes, kaltgepresstes pflanzliches Öl (Blindwertöl, siehe 9.3.1)

5.5 Reagenzlösungen

5.5.2 Wässrige Schwefelsäurelösung (25%ig): 25 mL Schwefelsäure (5.4.7) werden in einen 100-mL-Messkolben überführt, der 50 mL H₂O (5.4.6) enthält. Der Kolben wird bis zur Marke mit H₂O (5.4.6) aufgefüllt und der Inhalt homogenisiert.

5.5.3 Saure wässrige Lösung von Natriumbromid (Natriumbromid 600 mg/mL, Schwefelsäure 0,9 % Volumenanteil). 600 g Natriumbromid (5.4.9) werden in 700 mL von ultrareinem Wasser (5.4.6) gelöst. Die Natriumbromidlösung wird in einen 100-mL-Messkolben überführt, der 36 mL Schwefelsäurelösung (5.5.1) enthält. Der Kolben wird bis zur Marke mit H₂O (5.4.6) aufgefüllt und der Inhalt homogenisiert.

5.5.4 Natriummethoxidlösung (0,35 M). 20 mL Natriummethoxid, 25 % Massenanteil, (5.4.10) werden in einen 250-mL-Messkolben überführt, dieser wird bis zur Marke mit Methanol (5.4.6) aufgefüllt und der Inhalt homogenisiert.

ANMERKUNG Die Natriummethoxidlösung (0,35 M) kann in einem Kühlschrank mindestens 3 Monate aufbewahrt werden.

5.5.5 Phenylboronsäurelösung (gesättigt). 12,0 g Phenylboronsäure (5.4.8) werden eingewogen und 100 ml einer Mischung (19/1 prozentuale Volumenanteile) aus Aceton (5.4.3)/ultrareinem Wasser (5.4.6) werden hinzugefügt. Es wird kräftig geschüttelt.

ANMERKUNG Die Phenylboronsäure löst sich in der Lösemittelmischung nicht vollständig. Für den Derivatisierungsschritt (8.1.118.1.11) wird nur die überstehende Flüssigkeit verwendet. Die Lösung kann bei Raumtemperatur mindestens 3 Monate aufbewahrt werden.

6 Prüfeinrichtung

6.1 Vortexmischer.

6.2 Gekühlter Proben-träger, eingestellt auf 10 °C ± 0,5 °C.

6.3 Beheizter Proben-träger mit Rührwerksfunktion, eingestellt auf 80 °C ± 4,0 °C.

6.4 Ultraschallbad.

6.5 GC-MS/MS-System mit Split/splitlos-Injektor und Rückspülfunktion.

6.6 Quarzglas-GC-Säule, stationäre Phase 5 %-Diphenyl-/95 %-Dimethylpolysiloxan oder ähnliche Polarität, Länge 20 m, Innendurchmesser 0,18 mm, Filmdicke 0,18 µm. Vorsäule: stationäre Phase 5 %-Diphenyl-/95 %-Dimethylpolysiloxan oder ähnliche Polarität, Länge 2 m, Innendurchmesser 0,53 mm, Filmdicke 0,10 µm.

ANMERKUNG Die Vorsäule sollte regelmäßig ausgetauscht werden, um eine gute Peakform und Empfindlichkeit beizubehalten.

7 Probe und Lagerung

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 60 °C in einem Trockenofen oder Wasserbad vorsichtig geschmolzen werden. Bei Fetten mit hohem Schmelzpunkt muss die Temperatur vorsichtig in Schritten von 10 °C erhöht werden, bis der Schmelzprozess einsetzt. Proben, die große Mengen an Wasser enthalten, müssen vor der Probenahme getrocknet werden (z. B. mit wasserfreiem NaSO₄).

7.3 Lagerungsbedingungen

Die Lagerungsbedingungen der Proben können die Glycidylesterkonzentration der Proben spezifisch beeinflussen, während die MCPD-Ester im Allgemeinen stabil sind. Raumtemperatur (22 °C) bietet nachweislich die beste Stabilität für Glycidylester und deshalb sollten Proben unter derartigen Bedingungen gelagert werden. Die Proben dürfen nicht unter Kühlbedingungen (4 °C) gelagert werden, da im Laufe der Zeit ein Abbau von Glycidylestern wahrscheinlich ist.

8 Durchführung

8.1 Vorbereitung der Untersuchungsprobe

8.1.1 100 mg bis 120 mg der Öl-/Fettprobe werden (auf 0,01 mg) in ein 2,5-mL-GC-Glasfläschchen eingewogen.

ANMERKUNG Bei Fett/Öl-Matrices mit Schmelzpunkten > 60 °C werden höchstens 100 mg Fett eingewogen, um ein Erstarren des Reaktionsgemisches während der Umesterung zu verhindern. (Siehe Anmerkung 1).

8.1.2 Zu allen Proben werden 100 µl Toluol (5.4.4d) und 200 µl tBME (5.4.4) hinzugefügt, gefolgt von 100 µl Arbeitslösung I des internen Standards (5.3.2e).

ANMERKUNG Die Schritte 8.1.3 bis 8.1.9 müssen ohne Unterbrechung ausgeführt werden, um eine korrekte quantitative Bestimmung sicherzustellen.

8.1.3 Alle Proben werden 120 s, oder bis das gesamte Fett geschmolzen und gelöst ist, mit einem beheizten Rührwerk (80 °C, 250 min⁻¹) gerührt.

8.1.4 Mit einem Vortexmischer wird 10 Sekunden homogenisiert, die Glasfläschchen werden in einen gekühlten Probenträger (10 °C) gestellt und zum Abkühlen für genau 240 s belassen.

8.1.5 Die Umesterung wird durch Zugabe von 200 µl Natriummethoxidlösung (5.5.4) begonnen. Nach der Zugabe der Natriummethoxidlösung (5.5.3) wird für 10 s unter Einsatz eines Vortexmischers homogenisiert und die Probe wird zurück in den gekühlten Probenträger gestellt.

8.1.6 Nach genau 12 min wird die Reaktion durch Zugabe von 700 µl wässriger angesäuerter Natriumbromidlösung (5.5.3) beendet. Für 10 s wird mit einem Vortexmischer homogenisiert und für die vollständige Umwandlung des gesamten Glycidol in 3-MBPD wird die Temperatur mindestens 5 Minuten bei Raumtemperatur stabilisieren gelassen.

8.1.7 Zu allen Proben werden 300 µl Isooctan (5.4.2) hinzugefügt und mit einem Vortexmischer wird 10 s homogenisiert.

8.1.8 Alle Proben werden 270 s ± 10 s, oder bis die (teilweise) erstarrte/gelierte obere Schicht vollständig gelöst und homogenisiert ist, mit einem beheizten Rührwerk (80 °C, 400 min⁻¹) gerührt. (Siehe Anmerkung 2).

8.1.9 Die Proben werden 3 min abkühlen gelassen, bevor die organische Schicht extrahiert wird, wobei darauf zu achten ist, dass nichts von der Wasserschicht extrahiert wird.

8.1.10 600 µl frisches Isooctan (5.4.2) werden hinzugefügt und es wird 10 s mit einem Vortexmischer homogenisiert, gefolgt von einer Extraktion der organischen Schicht, wobei darauf zu achten ist, dass nichts von der Wasserschicht extrahiert wird.

8.1.11 100 µl PBA-Lösung (5.5.5) werden hinzugefügt und mit einem Vortexmischer wird 10 s homogenisiert.

8.1.12 600 µl frisches Isooctan (5.4.2) werden hinzugefügt und es wird 10 s mit einem Vortexmischer homogenisiert, um die Derivate zu extrahieren, anschließend erfolgt die Analyse mit einem GC-MS/MS-System.

ANMERKUNG Das Verfahren wurde für eine einzelne Probe angegeben. Ein Zeitplan für die parallele Probenvorbereitung einer Charge von 20 Proben für die Schritte 8.1.5 und 8.1.6 ist in Anhang A, Tabelle A.2 angegeben.

8.2 Erstellung der Kalibrierkurve

8.2.1 100 mg bis 120 mg Blindwertöl (5.4.11) werden in zehn separate 2,5-mL-GC-Glasfläschchen eingewogen. Toluol (5.4.4), tBME (5.4.5), Lösung des internen Standards (5.3.2e) und die entsprechende Kalibrierlösung (5.3.2a bis c) werden wie in Tabelle A.1 angeführt hinzugefügt.

8.2.2 Die Kalibrierproben werden nach dem für die Untersuchungsproben angewendeten Verfahren behandelt, beginnend mit der Lösung der Probe (8.1.3).

ANMERKUNG Alle Verhältnisse von Lösemittel und Reagenzien sollten bei Kalibrierproben denen für unbekannte Proben entsprechen, wie in 8.1 beschrieben.

8.3 Gaschromatographie/Massenspektrometrie-Referenzen

8.3.1 Injektionsvolumen: 2,0 µl.

8.3.2 Injektionsmodus: splitlos, splitlose Zeit = 2,0 min.

8.3.3 Injektionstemperatur: 350 °C.

8.3.4 Trägergas: Helium, Durchfluss: 1,7 mL/min, konstanter Septum-Spüldurchfluss: 5,0 mL/min, Split-Durchfluss = 100 mL/min.

8.3.5 Zeit des Auslösens der Rückspülung: 6,0 Minuten.

ANMERKUNG Die Einstellung für das Auslösen der Rückspülung muss nach jeder Änderung an der Trenn- oder Vorsäule erneut bestimmt werden.

8.3.6 GC-Ofentemperaturprogramm: 70 °C (isotherm für 1 min), von 70 °C auf 120 °C mit 15 °C/min (isotherm für 0,5 min), von 120 °C auf 350 °C mit 40 °C/min (isotherm für 2,5 min).

8.3.7 Tandem-Massenspektrometer: Elektronenstoß (EI), Messung ausgewählter Übergänge (SRM, en: Selected Reaction Monitoring), Temperatur der Transferleitung: 315 °C, Temperatur der Ionenquelle: 290 °C.

8.3.8 Erwartete Retentionszeit ± Erfassungsfenster: 3-MCPD (6,70 ± 0,3) min, 2-MCPD (6,80 ± 0,3) min und 3-MBPD (7,00 ± 0,3) min.

Die Parameter für die MS/MS-Massenübergänge sind in Tabelle 1 angeführt.

Tabelle 1 — Übersicht über die Einstellungen des Tandem-Massenspektrometers für Massenübergänge jedes Ionenpaars

Komponenten-name	Ausgangсион (Q1, m/z)	Kollisionszelle (Q2, eV) ^a	Tochterion (Q3, m/z)	Zweck des Massenübergangs
3-MCPD	196	8	147	Quantitative Bestimmung 3-MCPD
3-MCPD	198	8	147	Qualitative Bestimmung 3-MCPD
3-MCPD- ¹³ C ₃	199	8	149	Quantitative Bestimmung Interner Standard 3-MCPD/2-MCPD
3-MCPD- ¹³ C ₃	201	8	149	Qualitative Bestimmung Interner Standard 3-MCPD/2-MCPD
2-MCPD	196	14	104	Quantitative Bestimmung 2-MCPD
2-MCPD	198	14	104	Qualitative Bestimmung 2-MCPD
3-MBPD	240	8	147	Quantitative Bestimmung Glycidol
3-MBPD	242	8	147	Qualitative Bestimmung Glycidol
3-MBPD- ¹³ C ₃ ^b	243	8	149	Quantitative Bestimmung Überschätzung von Glycidol aus 3-MCPD
3-MBPD-d5	245	8	150	Quantitative Bestimmung Interner Standard Glycidol
3-MBPD-d5	247	8	150	Qualitative Bestimmung Interner Standard Glycidol
^a Die eV-Einstellungen an Kollisionszellen können sich zwischen den Bauarten von Tandem-Massenspektrometern und/oder -Systemen verschiedener Hersteller unterscheiden und erfordern eine Optimierung für jedes einzelne System.				
^b Ein zur qualitativen Bestimmung geeigneter Massenübergang für 3-MBPD- ¹³ C ₃ ist aufgrund des Störeinflusses des natürlichen ¹³ C-Isotops von 3-MBPD (m/z 242), das unter den beschriebenen Bedingungen gleichzeitig eluiert, nicht möglich.				

9 Angabe der Ergebnisse

Die Berechnung der Ergebnisse ist in einer spezifischen Reihenfolge auszuführen, damit die Glycidol-Überschätzung quantitativ bestimmt und korrigiert werden kann. Das 3-MCPD ist die Quelle des während der Umesterungsreaktion in vitro gebildeten Glycidols (8.1.5) und die Menge des gebildeten Glycidols ist direkt proportional zur Konzentration des 3-MCPD-Esters. Deshalb werden die 2-MCPD- und 3-MCPD-Ester zuerst mit den in 9.1 dargestellten Gleichungen quantitativ bestimmt.

Die Berechnungen für die Glycidylester werden in 9.2 angegeben. Zu Beginn wird die Gesamtmenge an Glycidol quantitativ bestimmt. Da das 3-MCPD-¹³C₃ in einer bekannten Menge vorhanden ist, dient es als Modellverbindung, um den 3-MCPD-Abbau während der Umesterung nachzubilden. Da sich sowohl markiertes als auch unmarkiertes 3-MCPD mit der gleichen Geschwindigkeit und unabhängig von der 3-MCPD-Konzentration in das Glycidol-Gegenstück umwandelt, dient die Menge an Glycidol-¹³C₃ (9.2.3) als Einpunkt-Kalibrierung zur Berechnung der Menge an Glycidol, die durch die 3-MCPD-Ester induziert wird (9.2.4). Das Phänomen der Umwandlung von 3-MCPD in Glycidol ist matrixunabhängig. Deshalb müssen alle in 9.1 und 9.2 beschriebenen Gleichungen ausnahmslos auf alle Proben, einschließlich der für die Wiederfindungsbestimmung aufgestockten Proben, angewendet werden.

9.1 Quantitative Bestimmung von 2-MCPD- und 3-MCPD-Estern

9.1.1 Erstellt wird eine Kalibrierkurve, indem das Verhältnis der Menge des Standards (angegeben als freies x-MCPD-Äquivalent) zur Menge des internen Standards (angegeben als freies 3-MCPD- $^{13}\text{C}_3$ -Äquivalent) auf der x-Achse gegen das Verhältnis der entsprechenden Peakflächen auf der y-Achse aufgetragen wird. Für die quantitative Bestimmung werden Ionen bei m/z 104 (2-MCPD) oder m/z 147 (3-MCPD) und m/z 149 (3-MCPD- $^{13}\text{C}_3$) verwendet. Die Regressionsgerade wird wie folgt berechnet:

$$y = ax + b \quad (1)$$

Dabei ist

- y das gemessene Verhältnis der 2-/3-MCPD- und 3-MCPD- $^{13}\text{C}_3$ -Signale;
- x das theoretische Verhältnis von 2-/3-MCPD (μg) und 3-MCPD- $^{13}\text{C}_3$ (μg) in der Kalibrierprobe;
- a die Steigung der Kalibrierkurve;
- b der y-Achsenabschnitt der Kalibrierkurve.

Um eine gute Genauigkeit für Proben mit sehr niedriger Konzentration von 2-/3-MCPD-Estern zu erreichen, ist zu bestätigen, dass die Linearität gut ($R^2 > 0,99$) und der y-Achsenabschnitt vorzugsweise $< |0,01|$ ist. Siehe Anmerkung 5.

9.1.2 Die Konzentration der 2-MCPD- und 3-MCPD-Ester in der Untersuchungsprobe (mg/kg) wird mit der folgenden Gleichung bestimmt:

$$C_{\text{uncorrected}} = \frac{\left(\frac{A_{\text{analyte}}}{A_{\text{IS}}}\right) - b}{a} \cdot M_{\text{IS}} \cdot \frac{1\,000}{M_{\text{sample}}} \quad (2)$$

Dabei ist

- $C_{\text{uncorrected}}$ die unkorrigierte Konzentration von 2-/3-MCPD-Estern in der Untersuchungsprobe (angegeben als freies 2-/3-MCPD, mg/kg Öl);
- A_{analyte} die Fläche des unmarkierten Analyten (2-MCPD, m/z 104 oder 3-MCPD, m/z 147);
- M_{IS} die Masse (in μg) von 3-MCPD- $^{13}\text{C}_3$, die der Untersuchungsprobe zugegeben wurde;
- A_{IS} die Fläche des 3-MCPD- $^{13}\text{C}_3$ -Derivatpeaks (m/z 149);
- a die Steigung der Kalibrierkurve;
- b der y-Achsenabschnitt der Kalibrierkurve;
- M_{sample} die Masse der Probe (in mg).

9.1.3 Die Wiederfindung von 2-/3-MCPD-Estern in den aufgestockten Blindwertölproben (mg/kg) wird mit der folgenden Gleichung bestimmt:

$$Rec = \frac{C_{Spiked\ blank\ oil}}{C_{theoretical}} \cdot 100 \% \quad (3)$$

Dabei ist

- Rec die Wiederfindung (%) für 2-/3-MCPD-Ester in der Charge der untersuchten Proben;
- $C_{Spiked\ blank\ oil}$ die gemittelte unkorrigierte Konzentration von 2-/3-MCPD-Estern, die sich aus Gleichung 2 für die aufgestockten Blindwertöle ergibt;
- $C_{theoretical}$ ist die berechnete theoretische Konzentration von 2-/3-MCPD-Estern in den aufgestockten Blindwertölen (mg/kg), auf der Grundlage der Probenmasse und der Konzentration der Aufstocklösung (5.3.2d).

9.1.4 Das Endergebnis für die 2-/3-MCPD-Ester in der Untersuchungsprobe (mg/kg) wird mit der folgenden Gleichung bestimmt:

$$C_{final} = C \cdot \frac{100}{Rec} \quad (4)$$

Dabei ist

- C_{final} die korrigierte Endkonzentration der estergebundenen 2-/3-MCPD-Ester in der Untersuchungsprobe (angegeben als freies 2-/3-MCPD, mg/kg Öl);
- C die unkorrigierte Konzentration von 2-/3-MCPD-Estern in der Untersuchungsprobe (angegeben als freies 2-/3-MCPD, mg/kg Öl), die mit Gleichung (2) ermittelt wurde;
- Rec die berechnete Wiederfindung (%), die mit Gleichung (3) ermittelt wurde.

9.2 Quantitative Bestimmung von Glycidylestern

9.2.1 Erstellt wird eine Kalibrierkurve, indem das Verhältnis der Menge des Standards (angegeben als Glycidol-Äquivalent) zur Menge des internen Standards (angegeben als deuteriertes Glycidol-Äquivalent) auf der x-Achse gegen das Verhältnis der entsprechenden Peakflächen auf der y-Achse aufgetragen wird. Für die quantitative Bestimmung werden Ionen bei m/z 147 (3-MBPD) und m/z 150 (3-MBPD-d5) verwendet. Die Regressionsgerade wird wie folgt berechnet:

$$y = ax + b \quad (5)$$

Dabei ist

- y das gemessene Verhältnis der 3-MBPD- und 3-MBPD-d5-Signale;
- x das theoretische Verhältnis von 3-MBPD (µg) und 3-MBPD-d5 (µg) in der Kalibrierprobe;
- a die Steigung der Kalibrierkurve;
- b der y-Achsenabschnitt der Kalibrierkurve.