

DIN EN ISO 20122



ICS 67.200.10

Einsprüche bis 2023-11-08

Entwurf

**Pflanzliche Öle –
Bestimmung von gesättigten Mineralölkohlenwasserstoffen (MOSH) und
aromatischen Kohlenwasserstoffen (MOAH) mit online gekoppelter
HPLC-GC-FID-Analyse –
Verfahren für die niedrige Bestimmungsgrenze (ISO/DIS 20122:2023);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 20122:2023**

Vegetable oils –

Determination of mineral oil saturated hydrocarbons (MOSH) and aromatic
hydrocarbons (MOAH) with online coupled HPLC-GC-FID analysis –
Method for low limit of quantification (ISO/DIS 20122:2023);
German and English version prEN ISO 20122:2023

Huiles végétales –

Détermination des hydrocarbures saturés d'huile minérale (MOSH) et des hydrocarbures
aromatiques d'huile minérale (MOAH) par dosage HPLC-GC-FID en ligne –
Méthode pour une faible limite de quantification (ISO/DIS 20122:2023);
Version allemande et anglaise prEN ISO 20122:2023

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2023-09-08 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 Am DIN-Platz, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin.

Es wird gebeten, mit den Kommentaren zu diesem Entwurf jegliche relevanten Patentrechte, die bekannt sind, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 95 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 20122:2023) 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 661	siehe	DIN EN ISO 661
ISO 5725-2:2019	siehe	DIN ISO 5725-2:2022-05

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 661, *Tierische und pflanzliche Fette und Öle — Vorbereitung der Untersuchungsprobe*

DIN ISO 5725-2:2022-05, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 2: Grundlegende Methode für die Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision eines vereinheitlichten Messverfahrens (ISO 5725-2:2019); Text Deutsch und Englisch*

– *Entwurf* –

E DIN EN ISO 20122:2023-10

– Leerseite –

Pflanzliche Öle – Bestimmung von gesättigten Mineralölkohlenwasserstoffen (MOSH) und aromatischen Kohlenwasserstoffen (MOAH) mit online gekoppelter HPLC-GC-FID-Analyse – Verfahren für die niedrige Bestimmungsgrenze (ISO/DIS 20122:2023)

Vegetable oils – Determination of mineral oil saturated hydrocarbons (MOSH) and aromatic hydrocarbons (MOAH) with online coupled HPLC-GC-FID analysis – Method for low limit of quantification (ISO/DIS 20122:2023)

Huiles végétales – Détermination des hydrocarbures saturés d'huile minérale (MOSH) et des hydrocarbures aromatiques d'huile minérale (MOAH) par dosage HPLC-GC-FID en ligne – Méthode pour une faible limite de quantification (ISO/DIS 20122:2023)

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Vorwort	5
Einleitung	6
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Kurzbeschreibung	8
5 Reagenzien	9
6 Prüfeinrichtung	12
7 Probe	13
7.1 Probenahme	13
7.2 Herstellung der endgültigen Probe für flüssige und feste Fette	13
8 Durchführungen	13
8.1 Hexan-Ethanol-Verteilung zur Entfernung von störenden Substanzen	14
8.2 Verseifung	14
8.3 Entfernen von biogenen <i>n</i> -Alkanen mit Aluminiumoxid zur Bestimmung der MOSH-Fraktion	15
8.4 Aufreinigung vor der Epoxidierung zur Trennung polarer Substanzen	15
8.5 Epoxidierung der MOAH-Fraktion mit Ethanol zum Oxidieren ungesättigter nicht-aromatischer Verbindungen [8]	15
8.6 Trennung mittels HPLC-GC	16
8.6.1 HPLC-Bedingungen	16
8.6.2 GC-Konfiguration	17
8.6.3 Konfiguration des Lösemitteldampfaustritts	17
8.6.4 Peak-Ermittlung	18
8.6.5 Prüfung der Systemeignung	19
8.7 Blindlauf	20
8.8 Qualitätskontrolle	20
9 Ergebnis der Bestimmung	20
9.1 Prüfung der Chromatogramme auf ausreichende Epoxidierung und andere maßgebende Parameter	20
9.2 Berechnung	21
10 Präzision des Verfahrens	22
10.1 Wiederholgrenze (<i>r</i>)	22
10.2 Vergleichsgrenze (<i>R</i>)	22
11 Prüfbericht	22
Anhang A (informativ) Bilder und Chromatogramme	24
Anhang B (informativ) Präzisionsdaten	35
Anhang C (informativ) Alternatives Verfahren für die Epoxidierung der MOAH-Fraktion (Epoxidierung von Per(oxy)ameisensäure) [13]	44
C.1 Durchführungen	44
C.2 Validierungsdaten	44
Literaturhinweise	45

Bilder

Bild A.1 — HPLC-UV-Chromatogramm mit charakteristischem Signal- und Druckkanal für eine MOSH/MOAH-Messung	24
---	----

Bild A.2 — Elutionsschema der Stoffklassen der MOSH- und MOAH-Fraktion (oberer Teil) und der für die Grenzen der Fraktionierungsfenster genutzten Verifizierungsstandards (unterer Teil) [2]	25
Bild A.3 — HPLC-GC-FID-Chromatogramm der MOSH-Fraktion des ISTD-Gemischs	26
Bild A.4 — HPLC-GC-FID-Chromatogramm der MOAH-Fraktion des ISTD-Gemischs	26
Bild A.5 — HPLC-GC-FID-Chromatogramm eines Alkan-Standard-Gemischs von C10 bis C50 zur Prüfung des nicht-diskriminierenden Fraktionstransfers	27
Bild A.6 — HPLC-GC-FID-Chromatogramm eines verunreinigten Sonnenblumenöls mit biogenen langkettigen <i>n</i> -Alkanen	27
Bild A.7 — HPLC-GC-FID-Chromatogramm eines verunreinigten Sonnenblumenöls (80 mg/kg) nach der Aufreinigung mit Aluminiumoxidsäure	28
Bild A.8 — HPLC-GC-FID-Chromatogramm der MOAH-Fraktion eines verunreinigten Sonnenblumenöls	28
Bild A.9 — HPLC-GC-FID-Chromatogramm der MOAH-Fraktion eines verunreinigten Sonnenblumenöls (15 mg/kg) nach der Epoxidierung	29
Bild A.10 — HPLC-GC-FID-Chromatogramm der MOSH-Fraktion eines aufgereinigten Kokosfetts	29
Bild A.11 — HPLC-GC-FID-Chromatogramm der MOSH-Fraktion eines aufgereinigten Kokosfetts	30
Bild A.12 — HPLC-GC-FID-Chromatogramm der MOSH-Fraktion mit POSH-Gehalt	30
Bild A.13 — HPLC-GC-FID-Chromatogramm der MOSH-Fraktion mit PAO-Gehalt	31
Bild A.14 — HPLC-GC-FID-Chromatogramm der MOSH-Fraktion einer durch Harzoligomere verunreinigten Probe (ROSH)	31
Bild A.15 — HPLC-GC-FID-Chromatogramm der MOAH-Fraktion einer durch Harzoligomere verunreinigten Probe (ROAH)	32
Bild A.16 — HPLC-GC-FID-Chromatogramm der MOSH-Fraktion einer durch einen synthetischen Schmierstoff verunreinigten Kakaobutterprobe (Polyalphaolefin (PAO))	32
Bild A.17 — HPLC-GC-FID-Chromatogramm der MOSH-Fraktion einer durch einen synthetischen Schmierstoff verunreinigten Kakaobutterprobe (Polyalphaolefin (PAO))	33
Bild A.18 — Das Verhältnis von Höhe des Basislinienversatzes zu Höhe des MOH-Signals im Integrationsbereich sollte ein Viertel nicht überschreiten	33
Bild A.19 — HPLC-GC-FID-Chromatogramm der MOSH-Fraktion — Integration von nicht getrennten störenden Substanzen	34

Tabellen

Tabelle 1 — Gradientenprogramm für die Trennung von MOSH und MOAH auf einer Kieselgelsäule mit Strömungsumkehr nach 6 min und Rekonditionierung nach 15 min	16
Tabelle 2 — Fraktionen entsprechend dem Technischen Bericht der JRC	21
Tabelle B.1 — Festlegung der Proben	35
Tabelle B.2 — Validierungsdaten für MOSH [C10-C50] in unterschiedlichen Pflanzenölen	36
Tabelle B.3 — Validierungsdaten für MOAH [C10-C50] in unterschiedlichen Pflanzenölen	36
Tabelle B.4 — Validierungsdaten für MOSH [C10-C16] in unterschiedlichen Pflanzenölen	37
Tabelle B.5 — Validierungsdaten für MOSH [C16-C20] in unterschiedlichen Pflanzenölen	37
Tabelle B.6 — Validierungsdaten für MOSH [C20-C25] in unterschiedlichen Pflanzenölen	38
Tabelle B.7 — Validierungsdaten für MOSH [C25-C35] in unterschiedlichen Pflanzenölen	39
Tabelle B.8 — Validierungsdaten für MOSH [C35-C40] in unterschiedlichen Pflanzenölen	39
Tabelle B.9 — Validierungsdaten für MOSH [C40-C50] in verschiedenen Pflanzenölen	40
Tabelle B.10 — Validierungsdaten für MOAH [C10-C16] in unterschiedlichen Pflanzenölen	40
Tabelle B.11 — Validierungsdaten für MOAH [C16-C25] in unterschiedlichen Pflanzenölen	41
Tabelle B.12 — Validierungsdaten für MOAH [C25-C35] in unterschiedlichen Pflanzenölen	42
Tabelle B.13 — Validierungsdaten für MOAH [C35-C50] in unterschiedlichen Pflanzenölen	42

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 20122:2023) 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.

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/DIS 20122:2023 wurde von CEN als prEN ISO 20122:2023 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 [eine/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*, erarbeitet.

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

Um eine niedrige Bestimmungsgrenze (LOQ, en: limit of quantification) zu erhalten, umfasst das Verfahren zusätzliche und teilweise abgeänderte Verarbeitungsschritte, Spezifikationen für die einheitliche Verarbeitung definierter Produktgruppen und zusätzliche Anforderungen an die Systemeignung im Vergleich zu EN 16995:2017.

Das Verfahren wurde in einem Ringversuch durch die Analyse von sowohl natürlich verunreinigten als auch angereicherten Pflanzenölproben im Bereich von 1 mg/kg bis 75 mg/kg für MOSH und von 1 mg/kg bis 7 mg/kg für MOAH überprüft.

1 Anwendungsbereich

Diese Internationale Norm legt ein Verfahren für die Bestimmung von gesättigten und aromatischen Kohlenwasserstoffen (von C10 bis C50) in pflanzlichen Fetten und Ölen mithilfe einer online gekoppelten HPLC-GC-FID ([1], [2] und [3]) fest. Diese Norm ist nicht dafür vorgesehen, auf andere Lebensmittel angewendet zu werden.

Das Verfahren ist anwendbar für die Analyse von gesättigten Mineralölkohlenwasserstoffen (MOSH, en: mineral oil saturated hydrocarbons) und/oder aromatischen Mineralölkohlenwasserstoffen (MOAH, en: mineral oil aromatic hydrocarbons).

Entsprechend den Ergebnissen des Ringversuchs hat sich das Verfahren für MOSH-Massenkonzentrationen über 3 mg/kg und für MOAH-Massenkonzentrationen über 2 mg/kg als geeignet erwiesen.

Bei Verdacht auf Störungen kann die fossile Herkunft der MOSH- und MOAH-Fraktion durch Untersuchung mit GC×GC-MS verifiziert werden.

In Anhang C wird ein alternatives Verfahren für die Epoxidierung der MOAH-Fraktion (Epoxidierung mit Per(oxy)ameisensäure) vorgeschlagen. Dieses alternative Verfahren liefert Ergebnisse, die mit denen der in 8.5 beschriebenen Ethanol-Epoxidierung der MOAH-Fraktion vergleichbar sind. Dieses alternative Verfahren für die Epoxidierung hat sich für Proben mit einem hohen Anteil an Störungen in der MOAH-Fraktion (z. B. tropische Öle) als leistungsfähig erwiesen [13].

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

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

gesättigte Mineralölkohlenwasserstoffe

MOSH, en: mineral oil saturated hydrocarbons

paraffinische (offenkettige, üblicherweise verzweigte) und naphthenische (ringförmige, alkylierte) Kohlenwasserstoffe im Siedebereich der *n*-Alkane mit einer Kettenlänge von 10 bis 50 Kohlenstoffatomen, die mithilfe dieses Verfahrens durch online-gekoppelte HPLC-GC-FID aus Mineralöl gewonnen werden

3.2

aromatische Mineralölkohlenwasserstoffe

MOAH, en: mineral oil aromatic hydrocarbons

aromatische überwiegend alkylierte Kohlenwasserstoffe in Mineralöl im Siedebereich der *n*-Alkane mit einer Kettenlänge von 10 bis 50 Kohlenstoffatomen, bestimmt mithilfe einer Online-HPLC-GC-FID

3.3

nicht aufgetrennte komplexe Mischung

UCM, en: unresolved complex mixture

komplexe Mischung von gesättigten oder aromatischen Kohlenwasserstoffen wie verzweigte Paraffine, alkylierte Naphthene und alkylierte Aromaten, die mittels Gaschromatographie nicht aufgetrennt werden, und die bei der Analyse mittels GC-FID einen Hügel (en: hump) formen

3.4

gesättigte, oligomere Kohlenwasserstoffe aus Polyolefin

POSH, en: polyolefin oligomeric saturated hydrocarbons

synthetische Kohlenwasserstoffe aus Polyolefin-Oligomeren, wie Polyethylen, Polypropylen und Polybutylen. Zu den Anwendungen mit Lebensmittelkontakt gehören Kunststoffbeutel, -behälter oder -folien, heißsiegelfähige Schichten und andere Laminierungen sowie Klebstoffe und Weichmacher. POSH können von MOSH durch ihr chromatographisches Muster unterschieden werden, wobei es jedoch schwierig ist, sie zu differenzieren und chromatographisch von den MOSH zu trennen, wenn beide vorhanden sind [2]

3.5

gesättigte, oligomere Kohlenwasserstoffe aus Harz

ROSH, en: resin oligomeric saturated hydrocarbons

gesättigte synthetische Kohlenwasserstoffe (Oligomere von Monoterpenen, Cyclopentadienen und anderen C5- oder C9-Monomeren), die Bestandteile von Schmelzklebstoffen sind und in die Probe migrieren können, meist durch Gasphasenübergang oder durch direkten Kontakt

3.6

aromatische, oligomere Kohlenwasserstoffe aus Harz

ROAH, en: resin oligomeric aromatic hydrocarbons

aromatische synthetische Kohlenwasserstoffe, die Bestandteile von Schmelzklebstoffen sind und meist durch Gasphasenübergang oder durch direkten Kontakt in die Probe migrieren können

3.7

Polyalphaolefine

PAO, en: poly-alpha-olefins

synthetische kurz- und langkettige Isoparaffine, die als Schmierstoffe oder in Klebstoffen und Schmelzklebern zum Einsatz kommen. Bei der Analyse mit GC-FID lassen sie sich durch eine Reihe von eher schmalen Hügeln (en: humps) von nicht getrennten verzweigten Kohlenwasserstoffen mit regelmäßigen Abständen zwischen ihnen erkennen [2]

4 Kurzbeschreibung

Die Probe wird verseift und aus dem unverseiften Rückstand werden durch weitere Schritte aufgereinigte Anteile erhalten. Diese Anteile werden auf einer Kieselgelsäule des HPLC-GC-FID-Systems in MOSH- und MOAH-Fractionen getrennt, und jede Fraktion wird separat durch Online-Kopplung dem Gaschromatographen zugeführt. Der Großteil des Lösemittels wird über einen frühen Dampfaustritt zwischen der beschichteten vorgeschalteten Säule und der gaschromatographischen Trennsäule entfernt.

Um die Anforderungen im Hinblick auf die verschiedenen störenden Begleitstoffe, die in den Proben vorkommen, zu erfüllen, werden für unterschiedliche Produktgruppen spezifische Probenherstellungsverfahren beschrieben. Allerdings ist eine Epoxidierung als Aufreinigungsschritt zur quantitativen Bestimmung von MOAH für alle Pflanzenölproben notwendig. Dieser Aufreinigungsschritt ermöglicht das Entfernen von Olefinen wie Squalen, die in der MOAH-Fraktion eluieren und bei der quantitativen Bestimmung stören. Je nach Probe kann diese Reaktion die Epoxidierung eines Teils der MOAH oder eine unvollständige Abtrennung der störenden Olefine bewirken.

Der Signalbereich für Mineralöle wird durch Subtraktion der aufsitzenden Peaks von der Gesamtfläche berechnet. Die aufsitzenden Peaks können durch *n*-Alkane (natürlich vorkommende Kohlenwasserstoffe), Terpene, Sterine, Squalen und deren Isomerisierungsprodukte sowie andere Substanzen hervorgerufen werden. MOSH und MOAH werden über einen internen Standard quantifiziert, der vor der Untersuchung

hinzugegeben wird. Um die korrekte HPLC-Fraktionierung und die GC-Transferbedingungen zu überwachen, werden Verifizierungsstandards hinzugegeben.

ANMERKUNG Der Expoxidierungsschritt kann den Abbau von MOAH mit drei oder mehr aromatischen Ringen bewirken.

5 Reagenzien

WARNUNG — Es wird auf die Verordnungen verwiesen, in denen der Umgang mit gefährlichen Substanzen geregelt ist. Technische, organisatorische und persönliche Schutzmaßnahmen müssen eingehalten werden.

ANMERKUNG In einem Blindlauf muss der Einfluss aller Stoffe geprüft werden. Es wird empfohlen, alle Glasgeräte entsprechend den Anleitungen in einem Wärmeschrank zu erwärmen. Alle anderen Geräte, die in direkten Kontakt mit der Probe kommen, sollten ebenfalls erwärmt werden und sollten nicht aus Polyethylen oder Polypropylen bestehen.

Sofern nicht anders angegeben

- sind Reagenzien von analytischer Qualität zu verwenden;
- muss das Wasser entweder destilliertes Wasser sein oder eine gleichwertige Reinheit besitzen;
- wird eine Lösung als wässrige Lösung verstanden.

5.1 Kieselgel 60¹, von analytischer Qualität, für die Säulen-Chromatographie, mit einer Partikelgröße von 60 µm bis 200 µm (70 mesh bis 230 mesh), aufbewahrt in einer Glasflasche (als Schutz gegen Verunreinigung). Das Kieselgel wird mindestens 16 h in einem Wärmeschrank bei 400 °C erwärmt und in einem sauberen Exsikkator (ohne eingefettete Schliffflächen) abgekühlt.

5.2 Natriumsulfat, wasserfrei, von analytischer Qualität, Reinheit ≥ 99 %.

ANMERKUNG Im Fall einer Verunreinigung wird das Natriumsulfat mindestens 16 h in einem Wärmeschrank bei 400 °C erwärmt und dann in einem sauberen Exsikkator abgekühlt (ohne eingefettete Schliffflächen).

5.3 *n*-Hexan, frei von Kohlenwasserstoffen im Siedebereich der *n*-Alkane C10 bis C50 und anderen Verunreinigungen wie Oxidationsprodukten von Hexan.

Die Reinheit des *n*-Hexans wird wie folgt überprüft: es werden 30 ml *n*-Hexan mit 25 µl der Lösung des internen Standards (5.17) gemischt und 2 Tropfen Bis(2-ethylhexyl)maleat (5.26) hinzugegeben und in einer Verdampferereinheit verdampft. Der Rückstand wird in 0,2 ml *n*-Hexan gelöst, und 50 µl von dieser Lösung werden zur Untersuchung in das HPLC-GC-FID-System injiziert. Das Hügelssignal (ausgenommen alle scharfen Einzel-Peaks der Lösemittel-Blindprobe) sollte ein Zehntel der Bestimmungsgrenze (LOQ, en: limit of quantification) nicht überschreiten.

ANMERKUNG Kohlenwasserstoffe im untersuchten Siedebereich stören den spezifischen Nachweis von Mineralölbestandteilen bei der Gaschromatographie der MOSH- und MOAH-Fraktionen, während polare Bestandteile wie Oxidationsprodukte von Hexan die Trennung von langkettigen *n*-Alkanen bei der Säulenchromatographie auf Aluminiumoxid stören.

5.4 Dichlormethan (DCM), Reinheit ≥ 99 %.

1 Kieselgel ist bei Merck unter der Referenznummer 7754 oder 7734 erhältlich (www.merck-chemicals.com). Es ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.

ANMERKUNG Die Reinheit wird auf die gleiche Weise wie für *n*-Hexan (5.3) mit 30 ml DCM überprüft.

5.5 Toluol.

5.6 Perylen (PER), Reinheit > 99 %.

5.7 5- α -Cholestan (CHO), Reinheit ≥ 97 %.

5.8 *n*-Undecan (C11), Reinheit ≥ 99 %.

5.9 *n*-Tridecan (C13), Reinheit ≥ 99 %.

5.10 Tri-*tert*-butylbenzol (TBB), Reinheit ≥ 97 %.

5.11 Bicyclohexyl (CYCY), Reinheit ≥ 99 %.

5.12 1-Methylnaphthalin (1-MN), Reinheit ≥ 95 %.

5.13 2-Methylnaphthalin (2-MN), Reinheit ≥ 97 %.

5.14 Pentylbenzol (PB), Reinheit ≥ 99 %.

5.15 Stammlösungen, mit Massenkonzentrationen von $\rho = 5$ mg/ml, $\rho = 10$ mg/ml oder $\rho = 20$ mg/ml: es werden z. B. 50 mg C13 (5.9), jeweils 100 mg C11 (5.8), TBB (5.10), CYCY (5.11), 1-MN (5.12), 2-MN (5.13) und PB (5.14) sowie 200 mg CHO (5.7) und PER (5.6) auf 1 mg in einen 10-ml-Messkolben eingewogen und es wird bis zur Marke mit Toluol (5.5) aufgefüllt. Diese Lösungen werden bei Raumtemperatur gelagert, damit sie stabil bleiben. Wenn sich bei der Lagerung Kristalle bilden, werden diese durch leichtes Erwärmen der Lösung wieder aufgelöst.

ANMERKUNG Der Nachweis des Beginns der MOAH-Fraktion auf Grundlage von TBB kann zum Verlust höher alkylierter Benzole und Naphtaline führen, sofern sie in der Probe enthalten sind (z. B. kosmetische Mittel) und wenn die chromatographische Leistung der Säule beschränkt ist. In solchen Fällen darf Di(2-ethylhexyl)benzol (DEHB) zusätzlich als Verifizierungsstandard verwendet werden und die Fraktionierung muss angepasst werden [7].

5.16 Lösung des internen Standards 1 (ISTD1)², mit Massenkonzentrationen von $\rho = 150$ μ g/ml (C13), $\rho = 300$ μ g/ml (C11, CYCY, PB, 1-MN, 2-MN und TBB) und $\rho = 600$ μ g/ml (CHO und PER): 300 μ l Stammlösung (5.15) werden in einen 10-ml-Messkolben überführt und es wird bis zur Marke mit Toluol (5.5) aufgefüllt.

5.17 Lösung des internen Standards 2 (ISTD2), mit Massenkonzentrationen von $\rho = 30$ μ g/ml (C13), $\rho = 60$ μ g/ml (C11, TBB, CYCY, 1-MN, 2-MN und PB) und $\rho = 120$ μ g/ml (PER und CHO): die ISTD1-Lösung (5.16) wird 5-fach verdünnt, z. B. werden 1 000 μ l ISTD1-Lösung (5.16) mit *n*-Hexan auf 5 ml aufgefüllt.

5.18 Aluminiumoxid 90, alkalisch, für Säulenchromatographie, 0,063 mm bis 0,2 mm, aktiviert: das Aluminiumoxid wird vor Gebrauch mindestens 16 h bei 500 °C in einem Wärmeschrank erwärmt und in einem Exsikkator auf Raumtemperatur abgekühlt.

5.19 *meta*-Chlorperbenzoesäure (mCPBA), Mengenangaben basierend auf einer Reinheit von etwa ≤ 77 %.

ANMERKUNG Handelsübliche mCPBA enthält unterschiedliche Mengen an mCPBA, *meta*-Chlorperbenzoesäure und Wasser. Zur Aufreinigung des Reagens werden die Kohlenwasserstoffverunreinigungen entfernt: es werden z. B. 5 g

2 Dieses Standardgemisch ist z. B. bei Restek Corp., Cat.# 31070 erhältlich. Es ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.

*m*CPBA mit 200 ml *n*-Hexan in einem Becherglas aus Polyethylenterephthalat (PET) in einem Ultraschallbad gelöst und mithilfe einer Vakuumfritte filtriert. In einem Abzugsschrank wird die aufgereinigte *m*CPBA trocknen gelassen. Nicht in einem Glasbehälter aufbewahren, da *m*CPBA auf Glasoberflächen zerfällt. Handelsübliche *m*CPBA enthält noch *meta*-Chlorperbenzoesäure und Restfeuchte für eine sichere Handhabung im Laboratorium. Reine *m*CPBA ist hingegen explosionsgefährdet, weshalb eine Isolierung von *m*CPBA mit einer Reinheit, die über die hier beschriebene Aufreinigung hinausgeht, nicht empfehlenswert ist. Durch Waschen mit einem Lösemittelgemisch aus 200 ml *n*-Hexan und 20 ml DCM können weitere Verunreinigungen entfernt werden, allerdings führt dies zu deutlich höheren Verlusten (nur 75 % der *m*CPBA zu Beginn, mit einem Gehalt von etwa 74 g bis 84 g *m*CPBA /100 g Ausgangsmaterial im aufgereinigten Produkt).

Um den *m*CPBA-Gehalt in dem Reagens zu bestimmen, werden etwa 0,2 g *m*CPBA in ein PET-Becherglas eingewogen und mit 50 ml destilliertem Wasser aufgefüllt und es wird gründlich gemischt. Es werden 5 ml konzentrierte Essigsäure und 10 ml Natriumiodidlösung (10 g Natriumiodid in 100 ml Wasser) hinzugegeben. Anschließend wird eine Vor-Titration mit 0,1 N Natriumthiosulfatlösung von dunkelrot bis hin zu hellgelb durchgeführt. Ein paar Tropfen einer Stärkeindikatorlösung werden hinzugegeben und es wird eine Titration von dunkelblau bis hin zu farblos am Endpunkt (Verbrauch gewöhnlich unter 20 ml) durchgeführt.

Berechnung des Gehalts *w* (*m*CPBA) in % (Massenanteil):

$$w = \frac{N \times V \times 86,29 \times 100}{E} \quad (1)$$

Dabei ist

N die Normalität der Natriumthiosulfatlösung;

V das Gesamtvolumen der verbrauchten Natriumthiosulfatlösung, in l;

E die Masse des Reagens, in g.

5.20 *m*CPBA-Lösung in Ethanol, $\rho = 100$ mg/ml: es wird z. B. 1 g *m*CPBA (5.19) in 10 ml Ethanol (5.28) gelöst. Die Lösung wird an jedem Arbeitstag frisch hergestellt.

5.21 Natriumthiosulfat, wasserfrei, Reinheit > 90,0 %.

5.22 Natriumhydrogencarbonat (oder Natriumcarbonat), wasserfrei, Reinheit > 90,0 %.

5.23 Lösung zur Deaktivierung der überschüssigen *m*CPBA: Lösung aus Natriumthiosulfat und Natriumcarbonat, $\rho = 50$ g/l: es werden z. B. 5 g Natriumthiosulfat und 5 g Natriumhydrogencarbonat (oder Natriumcarbonat) in 100 ml destilliertem Wasser gelöst und es wird gründlich gemischt.

5.24 Aluminiumoxidsäule mit Kieselgelabdeckung: ein Filter (5.4) wird in eine Glassäule (5.3) eingebracht und es werden 10 g Aluminiumoxid (5.18), 3 g Kieselgel (5.1) und (1) g Natriumsulfat (5.2) zugegeben und verdichtet.

5.25 Säule für die Aufreinigung: Ein Filter (5.4) wird in eine leere SPE-Glaskartusche (mit 6 ml Fassungsvermögen) eingebracht, es werden 3 g Kieselgel (5.1) hinzugegeben, verdichtet und mit 1 g Natriumsulfat (5.2) bedeckt.

5.26 Bis(2-ethylhexyl)maleat, Reinheit 90 %. Die Reinheit wird in einem Blindlauf überprüft.

ANMERKUNG Bis(2-ethylhexyl)maleat darf durch Bis(2-ethylhexyl)sebacat ausgetauscht werden, um das Risiko von Störungen des Epoxidierungsprozesses einzuschränken.

5.27 Standardlösung der *n*-Alkane mit Kettenlängen zwischen 10 und 50 bei gleicher Massenkonzentration zur Überprüfung der Abgrenzung gegenüber leichter siedenden oder schwersiedenden Substanzen, $\rho = 1$ µg/ml. Diese Lösung wird bei Raumtemperatur gelagert, da C50 sonst kristallisieren kann.

5.28 Ethanol, absolut.

ANMERKUNG Die Reinheit wird auf die gleiche Weise wie für *n*-Hexan (5.3) mit 30 ml Ethanol überprüft.

5.29 Gemisch von Ethanol und *n*-Hexan, Volumenanteil $\varphi = 50 \%$: es werden z. B. 50 ml Ethanol (5.28) mit 50 ml *n*-Hexan (5.3) gemischt.

5.30 Elutionsgemisch aus *n*-Hexan und DCM: es werden z. B. 30 ml DCM (5.4) mit 70 ml *n*-Hexan (5.3) gemischt. Wegen der Flüchtigkeit von DCM muss die Lösung frisch hergestellt werden.

5.31 Kaliumhydroxidlösung: z. B. 50 g Kaliumhydroxid in 100 ml destilliertem Wasser, $w = 33 \text{ g}/100 \text{ g}$.

6 Prüfeinrichtung

ANMERKUNG Um einen Blindwert zu erzielen, der niedrig genug ist, hat sich Folgendes als wirksam erwiesen: Glasgeräte (außer Messkolben) sollten 4 Stunden in einem Wärmeschrank bei 430 °C oder über Nacht bei 400 °C erwärmt und anschließend in einem Exsikkator oder einem anderen Behälter bis zu ihrer Verwendung aufbewahrt werden. Darüber hinaus werden folgende Hinweise gegeben:

- mehrere Untersuchungen in verschiedenen Reihen und nicht eine nach der anderen durchführen;
- Schliffverbindungen nicht einfetten;
- keine Handcreme benutzen;
- Proben nur mit Handschuhen anfassen;
- nach Möglichkeit Glasgeräte benutzen;
- bei Trocknung in einem Stickstoffstrom, Stickstoffreinheit überprüfen;
- Messkolben, Gaspipetten und andere benötigte Glasgeräte vor deren Benutzung mit *n*-Hexan spülen.

6.1 Analysenwaage, auf 0,000 1 g ablesbar, mit einer Fehlergrenze von 0,001 g.

6.2 Zentrifuge und Zentrifugenröhrchen.

6.3 Glassäule ohne Absperrhahn, Länge 15 cm bis 20 cm und Innendurchmesser 15 mm bis 20 mm.

6.4 Filter für die Glassäule, extrahiert oder erwärmt, das Filter besteht aus Quarzwolle/Glasfaser.

6.5 Glasfläschchen, 40 ml, mit Schraubkappe mit Dichtung aus Polytetrafluorethylen (PTFE).

6.6 Rotationsverdampfer, mit Vakuum und Wasserbad bei 35 °C.

ANMERKUNG Es können auch vergleichbare Geräte eingesetzt werden. Verunreinigungen vermeiden. Gegebenenfalls das System zwischen den Untersuchungen gründlich reinigen.

6.7 HPLC-Säule, z. B.: LiChrospher Si 60 oder Allure Silica, 5 µm Material, 2 × 250 mm oder vergleichbares.

6.8 Unbeschichtete GC-Vorsäule, mit Quarz- oder Metallkapillaren, z. B. HydroGuard® MXT®5, 10 m × 0,53 mm oder vergleichbare.

ANMERKUNG Die Kapillaren in 6.8 bis 6.12 haben sich als geeignet erwiesen, können aber an das System angepasst werden, um die Anforderungen zu erfüllen und vergleichbare Ergebnisse zu erzielen.

6.9 GC-Trennsäule, mit Quarz- oder Metallkapillaren, programmiert temperaturstabil bis mindestens 370 °C: 100 % Dimethylpolysiloxan oder 95 % Dimethyl- und 5 % Phenylmethylpolysiloxan als stationäre Phase, Länge 15 m, Innendurchmesser (ID) 0,32 mm oder 0,25 mm und Filmdicke 0,10 µm bis 0,25 µm.

6.10 Quarz- oder Metallkapillare, deaktiviert, für den Transport der HPLC-Fraktionen vom Ventil zum T-Anschlussstück des Gaschromatographen, Länge 1 m, Innendurchmesser 0,1 mm.

6.11 Kapillare, deaktiviert, vom T-Anschlussstück zwischen Vorsäule und Trennsäule zum Dampfaustritt.

6.12 Drosselkapillare am Dampfaustritt, deaktiviert, Länge 1 m, Innendurchmesser 0,05 mm.

6.13 Injektionsspritze, 100 µl, geeignet für die Injektion von 5 µl bis 100 µl bei der Flüssigchromatographie.

6.14 Pasteur-Pipette aus Glas.

ANMERKUNG Die Verwendung von Pipettenspitzen aus Kunststoff und Polyethylenfolie führt zu erhöhten Blindwerten.

6.15 Online-gekoppeltes HPLC-GC-FID-System: besteht aus einer HPLC-Einrichtung, die in der Lage ist, einen binären Gradienten auszuführen, einem Einspritzventil, einer HPLC-Säule (6.7), einem UV-Detektor (Detektionswellenlänge: 230 nm), Umschaltventilen für die Strömungsumkehr der Säule und Fraktionsübertragung in GC, GC mit Lösemitteldampfaustritt (SVE, en: solvent vapour exit), pneumatischer Regelung und Auswertungssystem. Außerdem wird ein automatisches Regelsystem empfohlen.

6.16 Reagenzglasschüttler mit Temperaturregelung und Rührvorrichtung (z. B.: 500 min⁻¹ oder vergleichbar).

7 Probe

7.1 Probenahme

Die Probenahme ist nicht Teil dieses Verfahrens. Die Probe darf nur in Glasflaschen, in Aluminiumbehältern oder in Behältnissen aus anderen Materialien, die keine Kohlenwasserstoffe freisetzen, aufbewahrt werden. Verpackungsmaterialien aus Papier, Polyethylen oder Polypropylen sind ungeeignet. Behälter aus PET oder Folienbeutel aus RILSAN dürfen unter Umständen verwendet werden. Auch das Verschluss- und Versiegelungsmaterial der Behälter muss beachtet werden. Auf die Verwendung einer Handcreme sollte vor dem Umgang mit den Proben verzichtet werden. Die Probenahme sollte durch Blindläufe mit *n*-Hexan anstelle einer Probe überprüft werden.

Ein empfohlenes Probenahmeverfahren ist in EN ISO 5555, *Tierische und pflanzliche Fette und Öle — Probenahme* [9], angegeben.

7.2 Herstellung der endgültigen Probe für flüssige und feste Fette

Die Untersuchungsprobe wird in Übereinstimmung mit EN ISO 661 hergestellt.

Sonderbehandlungen der Untersuchungsprobe, z. B. Filtration, Schmelzen usw., müssen angegeben werden.

8 Durchführungen

Je nach der Art der Fette und Öle sind die Proben auf unterschiedliche Weisen herzustellen. Die spezifischen Fälle A bis C sind nachstehend beschrieben.

- A) Proben von Ölen und Fetten **mit unbekanntem oder hohem Gehalt an biogenen, langkettigen Alkanen** und ungesättigten Verbindungen [4] wie Olivenöl, Rapsöl, Sonnenblumenöl und vergleichbare Proben nach 8.1 (Ethanol-Hexan-Verteilung) werden mit zwei separaten 10-ml-Fractionen des Extrakts hergestellt, es wird 8.2 (Verseifung) an der ersten Fraktion für die Bestimmung des MOSH-Gehalts nach 8.3 (Aluminiumoxidsäule) durchgeführt, und es wird 8.2 (Verseifung) an der zweiten Fraktion für die Bestimmung des MOAH-Gehalts nach 8.4 (Aufreinigung) und 8.5 (Epoxidierung) durchgeführt.
- B) Proben von Ölen und Fetten mit **niedrigem Gehalt an biogenen, langkettigen Alkanen** und störenden ungesättigten Verbindungen wie Kokosfett, Leinöl, Palmöl und vergleichbare Proben werden ohne Aluminiumoxidsäule nach 8.1 (Ethanol-Hexan-Verteilung), 8.2 (Verseifung), 8.4 (Aufreinigung) und 8.5 (Epoxidierung) hergestellt und die MOSH- und MOAH-Fractionen werden aus der erhaltenen Lösung bestimmt.
- C) Bei der **automatisierten Verwendung der** Aluminiumoxidsäule werden Öle und Fette nach 8.1 (Ethanol-Hexan-Verteilung), 8.2 (Verseifung), 8.4 (Aufreinigung) und 8.5 (Epoxidierung) hergestellt und in das HPLC-GC-FID-System injiziert. Nach der Trennung der MOSH, die auf eine integrierte On-line-Aluminiumoxidsäule übertragen werden, können die MOAH-Fractionen im selben Lauf mithilfe eines Zwei-Kanal-Systems bestimmt werden.

ANMERKUNG 1 Jedes Laboratorium, in dem automatisierte Verfahren eingesetzt werden, muss Prüfungen durchführen, um sicherzustellen, dass die mit den automatisierten Verfahren erhaltenen Ergebnisse nicht von den Ergebnissen abweichen, die mit dem manuellen Verfahren erhalten wurden.

ANMERKUNG 2 Unbekannte Proben oder Proben aus Ölgemischen dürfen zuerst ohne Aufreinigung mit Aluminiumoxid analysiert werden, und wenn das Vorhandensein störender langkettiger *n*-Alkane die Hügelbildung (en: hump) erheblich beeinflusst und keine ordnungsgemäße Integration zulässt, darf der Extrakt mithilfe der Aluminiumoxidsäule erneut injiziert werden, um Störungen zu reduzieren (z. B. bei der On-line-Aluminiumoxid-Aufreinigung wird derselbe Probenextrakt, der für die MOAH-Bestimmung verwendet wurde, für die anschließende Trennung von langkettigen *n*-Alkanen mit der Aluminiumoxidsäule für die MOSH-Bestimmung verwendet).

ANMERKUNG 3 Während des Ringversuchs wurde nur das manuelle Aufreinigungsverfahren für die MOSH-Fraktion validiert.

8.1 Hexan-Ethanol-Verteilung zur Entfernung von störenden Substanzen

3 g der Fett- bzw. Ölprobe (im Fall von wasserhaltigen Nahrungsmitteln wird eine größere Menge eingewogen, um den entsprechenden Fettgehalt zu erhalten) werden in ein 40-ml-Zentrifugenröhrchen mit Schraubkappe eingewogen. 30 ml des Gemisches aus *n*-Hexan und Ethanol (5.29) und 20 µl ISTD1 (5.16) oder 100 µl ISTD2 (5.17) werden hinzugegeben und homogenisiert. 10 ml dieser Lösung werden für das weitere Verfahren (8.2) verwendet.

ANMERKUNG Im Fall von Ölen und Fetten wird keine Phasentrennung festgestellt. Dennoch wird durch diesen Schritt eine vollständige Verseifung der Öle und Fette sichergestellt. Bei Bedarf können weitere Mengen des internen Standards hinzugegeben werden.

8.2 Verseifung

Ein aliquoter Teil von 10 ml (8.1) wird in ein anderes Probenröhrchen überführt und es werden 3 ml Kaliumhydroxidlösung (5.31) hinzugegeben. Die Lösung wird für 30 min bei 60 °C in einem Wasserbad unter Schütteln verseift, bis die Lösung klar wird. Die Lösung wird abgekühlt und es werden 5 ml *n*-Hexan und 5 ml eines Ethanol-Wasser-Gemischs (1 + 1, V/V) hinzugegeben, das Gemisch wird erneut geschüttelt und die untere Phase nach der Phasentrennung wird in ein neues Fläschchen überführt und mit weiteren 5 ml *n*-Hexan erneut extrahiert. Beide *n*-Hexan-Extrakte werden zusammengeführt.

Je nach Art der Probenherstellung wird mit der Lösung zur Trennung biogener, langkettiger *n*-Alkane mit Aluminiumoxid (nach 8.3) oder mit der Lösung zur Epoxidierung (nach 8.4 und 8.5) fortgefahren.

ANMERKUNG Die Zugabe von Ethanol nach der Verseifung ermöglicht eine verbesserte Phasentrennung und verhindert Schaumbildung.

8.3 Entfernen von biogenen *n*-Alkanen mit Aluminiumoxid zur Bestimmung der MOSH-Fraktion

Die Aluminiumoxidsäule (5.24) wird mit 20 ml *n*-Hexan vorgereinigt, um störende Substanzen zu entfernen (siehe auch die nachstehende Anmerkung). Die nach 8.2 hergestellte Lösung wird auf die Aluminiumoxidsäule übertragen und die Kohlenwasserstoffe werden mit 25 ml *n*-Hexan (5.3) eluiert. Mit Beginn der Überführung der Probe wird mit dem Auffangen der Kohlenwasserstoffe begonnen. Das Lösemittel wird unter Vakuum (≥ 260 mbar) bei 35 °C verdampft, nachdem 2 Tropfen Bis(2-ethylhexyl)maleat (5.26) hinzugegeben wurden.

Der Rückstand wird in etwa 1 ml *n*-Hexan gelöst, bei Bedarf wird zentrifugiert und die Lösung wird in ein Fläschchen eingefüllt. 60 µl bis 90 µl der Lösung werden für die Analyse in das HPLC-GC-FID-System injiziert, um die MOSH-Fraktion zu bestimmen.

ANMERKUNG Die MOAH-Fraktion bleibt auf der Aluminiumoxidsäule zurück und ist in diesem Eluat nicht zu bestimmen. Es wird empfohlen, durch Vorspülen der Säule mit 20 ml *n*-Hexan störende Substanzen aus dem Aluminiumoxid zu entfernen. Sauberes Aluminiumoxid braucht allerdings nicht vorgespült zu werden.

Durch das Entfernen von biogenen *n*-Alkanen können gleichzeitig auch Paraffinwaxse entfernt werden, sofern sie in der Probe enthalten sind. In diesen Fällen muss die Analyse nach dem Verfahren B durchgeführt werden.

8.4 Aufreinigung vor der Epoxidierung zur Trennung polarer Substanzen

Die kombinierte obere Phase wird aus dem Verseifungsschritt (8.2) auf eine Säule für die Aufreinigung (5.25) übertragen und die eluierenden Kohlenwasserstoffe werden aufgefangen: das Auffangen wird sofort nach der Übertragung der oberen Phase aus dem Verseifungsschritt auf die Säule für die Aufreinigung begonnen. Das Eluieren der Kohlenwasserstoffe von der Säule wird mit zusätzlichen 15 ml Lösemittelgemisch von *n*-Hexan und DCM (7 + 3, V/V) (5.30) abgeschlossen. Das Eluat wird für die Epoxidierung (nach 8.5) verwendet.

ANMERKUNG Es wird empfohlen, durch Vorspülen der Säule mit *n*-Hexan störende Substanzen aus der Aufreinigungssäule zu entfernen. Saubere Glasgeräte und Reagenzien brauchen allerdings nicht vorgespült zu werden.

8.5 Epoxidierung der MOAH-Fraktion mit Ethanol zum Oxidieren ungesättigter nicht-aromatischer Verbindungen [8]

Nach der Zugabe von 2 Tropfen Bis(2-ethylhexyl)maleat (5.26) als ein Keeper wird die Lösung von 8.4 bei 35 °C unter Vakuum konzentriert, wobei alle internen Standards beibehalten werden, und auf ein Volumen von 1 ml mit *n*-Hexan eingestellt.

ANMERKUNG 1 Bei diesem Schritt sollte sämtliches DCM vollständig entfernt werden, um eine zuverlässige Fraktionierung im HPLC-GC-FID-System sicherzustellen.

1 ml ethanolhaltige *m*CPBA-Lösung (5.20) wird zu dem erhaltenen Extrakt hinzugegeben und die Probe wird für 20 min bei 40 °C in einen Schüttler (6.16) bei beispielsweise 500 min⁻¹ gegeben. Dann werden 500 µl Ethanol (5.28) und (2) ml der Lösung zur Deaktivierung der überschüssigen *m*CPBA (5.23) hinzugegeben und das Probenfläschchen wird für etwa 1 min bei etwa 750 min⁻¹ geschüttelt, um sämtliche *m*CPBA-Rückstände zu deaktivieren. Die obere Hexan-Phase wird in ein frisches Probenfläschchen überführt und die Hexan-Lösung wird mithilfe einer Spatelspitze Natriumsulfat (5.2) getrocknet. 90 µl getrocknete Lösung werden in das HPLC-GC-FID-System injiziert, um die MOAH zu bestimmen.

Es ist freigestellt, ein höher konzentriertes Endvolumen von beispielsweise 300 µl und ein entsprechendes Injektionsvolumen zu verwenden, so lange die Anreicherung verbessert wird und die internen Standards während des Verdampfens erhalten bleiben.

Bei der Herstellung von Proben nach dem Verfahren A und dem Verfahren B wird diese Lösung direkt für die Bestimmung der MOAH verwendet. Bei der automatisierten Probenherstellung nach Verfahren C wird diese Lösung für die anschließende Trennung langkettiger *n*-Alkane auf der Aluminiumoxidsäule (5.24) zur ergänzenden MOSH-Bestimmung verwendet.

ANMERKUNG 2 Kontinuierliches kräftiges Schütteln der Reaktionslösung bei der festgelegten Reaktionstemperatur für die Epoxidierung ist notwendig, um störende Substanzen ausreichend und auf vergleichbare Weise zu entfernen.

8.6 Trennung mittels HPLC-GC

8.6.1 HPLC-Bedingungen

Das HPLC-System wird mit Eluent A *n*-Hexan und Eluent B DCM vorgespült und die Systemeignung wird durch Injektion von *n*-Hexan überprüft. Tabelle 1 zeigt ein Beispiel für das Gradientenprogramm.

Tabelle 1 — Gradientenprogramm für die Trennung von MOSH und MOAH auf einer Kieselgelsäule mit Strömungsumkehr nach 6 min und Rekonditionierung nach 15 min

Zeit (min)	Hexan (%)	DCM (%)	Durchfluss (µl/min)
0,0	100	0	300
1,5	65	35	300
5,9	65	35	300
6,0	0	100	500 (Strömungsumkehr)
15,0	0	100	500 (Rekonditionierung)
15,3	100	0	500
25,0	100	0	500
25,2	100	0	300
30,0	100	0	300
0,0	100	0	300

Nach 6,0 min wird die Strömungsrichtung der Säule umgekehrt, um verbleibende Matrixkomponenten der Probe aus der Säule durch Strömungsumkehr zu entfernen. Dieser Schritt erhöht die Lebensdauer der HPLC-Säule deutlich. Für den Betrieb mit einer automatisierten On-line-Aluminiumoxidsäule hat es sich bewährt, den Gradienten etwa 0,1 min später zu starten.

Bild A.1 in Anhang A zeigt ein typisches HPLC-UV-Chromatogramm mit dem UV-Signal und einer zusätzlichen Druckkurve. Ab Minute 5,5 lässt sich ein starker Anstieg der Basislinie durch DCM erkennen. Perylen aus dem ISTD-Gemisch eluiert bei Minute 5,6 min. Eine Strömungsumkehr sollte das Basisliniensignal auf den Anfangswert verringern. Die Fraktionierung der MOSH-Fraktion von Minute 2 bis Minute 3,5 und der MOAH-Fraktion von Minute 5,7 bis Minute 6,2 kann durch leichte Basislinienverschiebungen festgestellt werden. Gegebenenfalls kann dabei auch eine Druckänderung festgestellt werden; hierbei sollte auf einen möglichen Druckanstieg geachtet werden, der auf eine Blockade innerhalb des Systems hinweist. Die angegebenen Zeiten können je nach System und verwendeten Säulen leicht abweichen und sollten regelmäßig durch Injizieren einer verdünnten ISTD-Lösung überprüft werden.

Die Kapillaren des Umschaltventils für die Fraktionsübertragung werden mit der Trägergasversorgung in einem T-Anschlussstück kombiniert und in die Vorsäule im GC-Ofen geleitet.

8.6.2 GC-Konfiguration

Die Säulen werden im Gaschromatographen installiert und die Funktion des Systems wird durch Injizieren von Lösemittel überprüft. Die Basislinie sollte gerade sein, mit einer kleinstmöglichen positiven Drift. Ist die Drift zu groß (siehe 7.6.5), wird die Säule erwärmt oder, wenn die stationäre Phase der GC-Trennsäule für dieses Verfahren geeignet ist, wird sie mit Lösemittel gespült oder die Säule wird ausgetauscht. Im Fall einer negativen Drift werden die Verbindungen der Säule auf Dichtheit überprüft. Säulen, die erstmalig zum Einsatz kommen, werden erwärmt (z. B. 4 h im Ofen mit einem Temperaturgradienten von mindestens 350 °C mit einem Trägergasstrom und die Endtemperatur wird für mindestens 30 min gehalten).

Die folgenden Betriebsbedingungen haben sich für die Analyse als geeignet erwiesen und dürfen an die Anforderungen des HPLC-GC-FID-Systems angepasst werden. Typische Chromatogramme können Anhang A entnommen werden.

- unbeschichtete Vorsäule, deaktiviert, 7 m bis 10 m × 0,53 mm (5.8);
- Trennsäule: 100 % Dimethylpolysiloxan, niedrigblutend (Länge 15 m, Innendurchmesser 0,25 mm, 0,1 µm bis 0,25 µm Filmdicke) (5.9);
- Ofentemperatur: Ausgangstemperatur 60 °C, 8 min isotherm, programmiert mit 15 °C/min bis auf 120 °C, fortgesetzt mit 25 °C/min bis auf 370 °C, halten der Temperatur für 6 min;
- Trägergas: Wasserstoff, Eingangsdruck für MOSH 70 kPa, nach Schließen des frühen Dampfaustritts 150 kPa, bis die MOAH-Fraktion bereit ist für die GC-Trennung, Eingangsdruck für MOAH 65 kPa, nach Schließen des frühen Dampfaustritts 150 kPa für beide Kanäle.

ANMERKUNG 1 In einem Zweikanal-System darf die erste Fraktion bei einem niedrigeren Druck, z. B. 30 kPa, auf der Vorsäule gehalten werden, bis die zweite Fraktion für die Trennung bereit ist. Für jedes einzelne System kann eine Feinabstimmung der Druckwerte erforderlich sein.

- Detektortemperatur: 380 °C;

ANMERKUNG 2 Sehr hohe Detektortemperaturen können zu einer verkürzten Lebensdauer der Temperaturfühler führen. Werden niedrigere Ofen- und Detektortemperaturen angewendet, kann eine höhere Basisliniendrift am Ende des Chromatogramms auftreten oder die FID-Düse muss häufiger gereinigt werden. Außerdem wird eine Überprüfung auf Abgrenzung schwersiedender *n*-Alkane vorgenommen.

- Fraktionsvolumen: 450 µl.

8.6.3 Konfiguration des Lösemitteldampfaustritts

Die Mehrheit des verdampften Lösemittels wird über den frühen Dampfaustritt zwischen der Vorsäule und der Trennsäule abgeführt. Der beste Zeitpunkt zum Schließen des frühen Dampfaustritts kann wie folgt ermittelt werden: während das Hexan einer Hexan-Injektion verdampft, wird der austretende Lösemitteldampf am Ende der Ventilkapillare mit einem Feuerzeug entzündet und die Zeit bis zum Erlöschen der Flamme wird aufgezeichnet. Diese Zeit minus 3 s stellt sicher, dass ein kleiner Rest des Hexans im System verbleibt, um eine erneute Konzentration der flüchtigen Bestandteile in der Trennsäule zu ermöglichen. Je nach Länge der Drosselkapillaren kann die Zeit leicht variieren. Die genauen Parameter sollten so optimiert werden, dass keine erheblichen Verluste für C10 festgestellt werden können. Bei der Arbeit mit einem zweikanaligen System hat es sich außerdem als bewährt erwiesen, das Ende der Lösemittelsignale an die gleiche Zeit anzugleichen, sofern dies möglich ist, um dieselben Retentionszeiten für *n*-Alkane zur Anzeige von Teilfraktionen für beide Kanäle verwenden zu können.

8.6.4 Peak-Ermittlung

Durch Injizieren von 50 µl einer Lösung aus 100 µl Standardlösung (5.17) in 600 µl *n*-Hexan werden die Retentionszeiten und Flächenverhältnisse der Standards überprüft. Die Auflösung von *n*-Undecan (C11) und des Lösemittels muss angegeben werden (siehe Bild A.3, Anhang A).

Die Konzentration der Standardlösung wird auf eine für das System geeignete Konzentration eingestellt, soweit dies notwendig ist.

Mithilfe des *n*-Alkan-Standard-Gemischs wird eine nicht-diskriminierende Detektion aller Kohlenwasserstoffe sichergestellt, werden die Flächen und die Retentionszeit bis C50 überprüft und werden die Retentionszeitgrenzen für MOSH- und MOAH-Fractionen bestimmt.

Ein sehr breites Peak (mit einer Breite von etwa 5 min bis 15 min, in Abhängigkeit von den GC-Bedingungen) in Probenextrakten repräsentiert ein nicht getrenntes komplexes Gemisch von Kohlenwasserstoffen (UCM, en: unresolved complex mixture of hydrocarbons), das mit dem chromatographischen System nicht aufgelöst werden kann. Dies wird auf die Kohlenwasserstoffe im Mineralöl zurückgeführt (Bild A.7, Anhang A).

Kohlenwasserstoffe aus Mineralöl enthalten keine *n*-Alkane mit dominanten ungeraden Kettenlängen oder terpen-ähnliche Kohlenwasserstoffe wie Squalen, Sterin oder Carotinoide, die natürlich in Speiseölen vorkommen. In der gesättigten Kohlenwasserstofffraktion von Sonnenblumenöl entsprechen die Haupt-Peaks den gesättigten aliphatischen Kohlenwasserstoffen C27, C29 und C31 (Bild A.6, Anhang A). **Für die MOSH-Bestimmung müssen alle scharfen Signale auf dem Hügel subtrahiert werden.**

Des Weiteren wird aus einigen Gründen zwischen MOSH und oligomeren Polyolefinen wie POSH (Bild A.12, Anhang A) oder ROSH (Bild A.14, Anhang A) oder synthetischen Schmierstoffen wie Polyalphaolefinen (PAO) (Bild A.13, Anhang A) unterschieden. In manchen Fällen können diese Substanzen mithilfe des HPLC-GC-FID nicht von Kohlenwasserstoffen aus Mineralöl unterschieden werden.

Wenn POSH oder ROSH im MOSH-Chromatogramm anhand ihres typischen Signalmusters feststellbar sind, dann sind die aufsitzenden Peaks zwar vom MOSH-Gehalt zu subtrahieren, aber deren Vorhandensein wird im Bericht angegeben, da ein Teil von ihnen zur MOSH-Fraktion hinzugezählt wird.

Wenn ROAH im MOAH-Chromatogramm anhand ihres typischen Signalmusters (Bild A.15, Anhang A) feststellbar sind, dann sind die aufsitzenden Peaks zwar vom MOAH-Gehalt zu subtrahieren, aber deren Vorhandensein wird im Bericht angegeben, da ein Teil von ihnen zur MOAH-Fraktion hinzugezählt wird.

Wenn PAO im MOSH-Chromatogramm anhand ihres typischen Signalmusters (Bild A.16 und Bild A.17, Anhang A) feststellbar sind, dann werden die aufsitzenden Peaks in den MOSH-Gehalt integriert und deren Vorhandensein wird im Bericht angegeben.

Im Fall von Mineralölerzeugnissen, die weder durch Hydrierung noch durch Mischen verschiedener Ausgangsprodukte gewonnen wurden, sollten die Signale in der MOSH- und der MOAH-Fraktion den gleichen Bereich der relativen Molekülmasse aufweisen und beide Signale sollten eine annähernd gaußförmige Kettenlängenverteilung besitzen. In den meisten Fällen ist die MOSH-Fraktion deutlich höher als die MOAH-Fraktion, die nur in speziellen Produkten mehr als 30 % des gesamten MOH-Anteils ausmacht. Bei Vorliegen von Mischungen mehrerer Mineralölerzeugnisse oder anderen technischen Verfahren sind diese Plausibilitätsannahmen jedoch möglicherweise nicht korrekt (Technischer Bericht JRC [5] und BfR-Kompodium [6]).

CYCY ist üblicherweise nicht in MOSH enthalten und dient als Quantifizierungsstandard. Die Flächen von CYCY und C13 sollten im Verhältnis von 2 : 1 stehen, ansonsten kann einer der beiden Standards überlagert werden.

TBB dient als interner Standard für die MOAH-Fraktion. 1-MN und 2-MN sind leicht als Peak-Paare erkennbar. Sie müssen vollständig voneinander getrennt werden und weisen eine gleich große Fläche auf, um Überlappungen auszuschließen (Bild A.4, Anhang A).

ANMERKUNG TBB zeigt einen höheren Alkylierungsgrad als 1- und 2-MN und war somit besser vergleichbar mit den Hauptbestandteilen der meisten in Speiseölen vorkommenden MOAH-Bestandteile. Des Weiteren war die Integration der Signal-Peaks für TBB häufig einfacher als bei 1- und 2-MN. Deshalb erzielte TBB bessere Wiederholpräzisions- und Vergleichpräzisionsdaten in den Ringversuchen und ist regelmäßig als Quantifizierungsstandard einzusetzen.

8.6.5 Prüfung der Systemeignung

Ein aliquoter Teil der verdünnten ISTD2-Lösung (5.17) und der Reihe von *n*-Alkanen von C10 bis C50 (5.27) wird injiziert. Für den internen Standard sollte dies einer absoluten Menge entsprechen, z. B. für CyCy im Bereich von etwa 1,5 ng (z. B. 20 µl einer Verdünnung von 1/150 oder 50 µl einer Verdünnung von 1/500).

Die folgenden Angaben beziehen sich auf das Vorhandensein oder Fehlen verschiedener Substanzen und deren Flächenverhältnisse. Wenn die MOSH- und MOAH-Fractionen vollständig getrennt werden, brauchen CyCy, C11, C13 und CHO ausschließlich in der MOSH-Fraktion bestimmt zu werden, während PB, 1-MN, 2-MN, TBB und Perylen nur in der MOAH-Fraktion vorkommen. Wenn ein Marker in der falschen Fraktion festgestellt wird, wird überprüft, ob die HPLC-Säule die MOSH- und MOAH-Fractionen korrekt trennt oder ob das Fraktionsfenster korrekt eingestellt ist. Das Ende der MOAH-Fraktion lässt sich leicht im UV-Chromatogramm der HPLC ablesen (Bild A.1, Anhang A). Die Reihenfolge der Stoffklassen bei der Fraktionierung ist in Bild A.2 von Anhang A schematisch dargestellt. Das leichte Abdriften oder die vollständige Eluierung der MOSH-Fraktion lässt sich an den unverminderten Flächen von C11 bzw. CHO erkennen. In der MOAH-Fraktion müssen TBB und Perylen vollständig wiedergefunden werden, um eine ordnungsgemäße Fraktionierung sicherzustellen. Treten Probleme auf, muss die Säule neu konditioniert, der Gradient angepasst oder die HPLC-Säule ausgetauscht werden [7].

C11 sollte ausreichend vom Lösemittelsignal getrennt werden und dessen Fläche braucht nicht von den anderen internen Standards abgegrenzt zu werden, um nach dem Abdriften von überschüssigem Lösemittel das ordnungsgemäße Refokussieren ohne den Verlust von flüchtigen Substanzen sicherzustellen. CHO eluiert im HPLC am Ende der MOSH-Fraktion. Im Falle niedriger CHO-Signale muss die Fraktionierungsgrenze überprüft werden. Störende langkettige *n*-Alkane, wie die in Sonnenblumenöl vorkommenden (Bild A.6, Anhang A), müssen durch die Verwendung der Aluminiumoxidsäule (8.3) beseitigt werden (Bild A.7, Anhang A).

Verluste von PB weisen auf eine schlechte Refokussierung oder auf ein zu starkes Abdriften am SVE hin und TBB zeigt den korrekten Beginn der Fraktion während des Übergangs an. Eine reduzierte Fläche von Perylen, das am Ende der MOAH-Fraktion eluiert, zeigt einen unvollständigen Fraktionstransfer auf oder kann durch Verluste nach der Epoxidierung entstanden sein. Das erfolgreiche Entfernen von störenden Substanzen ist in Bild A.8 und Bild A.9 von Anhang A dargestellt.

Das System ist einsatzbereit, wenn die Fraktionen von MOSH und MOAH vollständig entsprechend den Standards getrennt sind.

ANMERKUNG Siehe auch die Anmerkung in 5.15 hinsichtlich Proben, die hoch alkylierte Benzole und Naphtene enthalten. Hohe Anteile an MOSH können zu einem Übertrag von MOSH in die MOAH-Fraktion führen. In solchen Fällen muss die Konzentration in der Probe verringert werden, um falsch-positive Ergebnisse für MOAH zu vermeiden.

Mithilfe des Chromatogramms der Reihe von *n*-Alkanen von C10 bis C50 (5.27) wird überprüft, ob das Verhältnis der Peak-Flächen von C50 bis C20 und von C10 bis C20 zwischen 0,8 und 1,2 beträgt (siehe Bild A.5, Anhang A). Es werden keine weiteren Responsefaktoren verwendet.

Um besonders im Bereich der LOQ eine korrekte Signalauswertung sicherzustellen, darf der Versatz der Basislinie im Bereich der Integration von MOSH und MOAH ein Viertel der Höhe des zu integrierenden Signals nicht überschreiten (siehe Bild A.18, Anhang A). In solchen Fällen muss entweder die chromatographische Trennleistung des Systems verbessert oder die LOQ erhöht werden.

Zusammengefasst sollten die folgenden Bedingungen untersucht werden:

- geeignete gerade Basislinie, Blindwert $\leq 1/3$ der LOQ;

- die Peaks sind symmetrisch und zeigen keine signifikante Schwanzbildung;
- vollständige Trennung von Lösemittel und C10;
- Abgrenzung von C10/C20 und C50/C20 zwischen $80 \% \leq x \leq 120 \%$;
- Peak-Verhältnis zwischen TBB und 2MN $\leq 1,25$;
- Überprüfen der LOQ einer Matrix durch Zugabe eines geeigneten Mineralölerzeugnisses vor der Probenherstellung. Das Signal des Hügels an der LOQ sollte eine relative Standardabweichung $\leq 20 \%$ und einen Signal/Rausch-Abstand ≥ 10 aufweisen. Darüber hinaus sollte die LOQ mit einem Mineralölerzeugnis überprüft werden, dessen Signalbreite von Anfang bis Ende mit dem Siedebereich von MOH in der zu bewertenden Probe vergleichbar oder höher ist.

8.7 Blindlauf

An jedem Arbeitstag ist ein Blindlauf mit Reagenzien durchzuführen und auf die gleiche Weise wie mit Proben zu bewerten. Der Blindlauf sollte frei von störenden Hügeln (en: humps) sein und die Basislinie sollte so flach wie möglich verlaufen (ohne übermäßige Drifts). Dieses Ergebnis sollte vom Probenergebnis subtrahiert werden. Der Blindwert muss kleiner sein als ein Drittel der LOQ.

8.8 Qualitätskontrolle

In regelmäßigen Abständen wird die Messgenauigkeit bestimmt, indem bekannte Mengen eines Mineralölgemischs zu einer Probe hinzugegeben werden, die vorzugsweise nicht verunreinigt ist.

ANMERKUNG Die Zugabe eines zertifizierten Materials, das sowohl MOSH als auch MOAH und keine anderen Bestandteile enthält, hat sich als wirkungsvoll erwiesen. Ebenfalls wird die Verwendung von externem oder internem Referenzmaterial mit einer Qualitätsregelkarte empfohlen.

9 Ergebnis der Bestimmung

9.1 Prüfung der Chromatogramme auf ausreichende Epoxidierung und andere maßgebende Parameter

Vor der eigentlichen Berechnung der MOAH-Fraktion muss das anhand der epoxidierten Probe erhaltene Chromatogramm auf ausreichende Epoxidierung überprüft werden. Eine ausreichende Epoxidierung ist erreicht, wenn alle störenden Einzelpeaks auf dem Hügel (en: hump) so weit entfernt wurden, dass alle verbleibenden Peaks vollständig aufgelöst sind und der Verlauf des Hügels eindeutig erkennbar ist. Die Größe des Hügels bleibt von den schlecht aufgelösten Peaks unbeeinflusst. Eine Untersuchung des Chromatogramms sollte in einem Maßstab erfolgen, bei dem der Hügel in einer Größe dargestellt wird, die etwa zwei Drittel des Chromatogramms ausmacht. Ein Beispiel für eine unzureichende Entfernung von störenden Substanzen ist in dem Chromatogramm von Bild A.8 (Anhang A) dargestellt. Dagegen lässt das Chromatogramm in Bild A.9 (Anhang A) eine eindeutige Quantifizierung des Hügels zu.

Für Chromatogramme, die eine Überlastung anzeigen, kann es auch hilfreich sein, das Injektionsvolumen oder die Masse der Probe zu verringern.

Können die störenden Peaks nicht ausreichend entfernt werden, muss die LOQ soweit erhöht werden, dass die nicht getrennten störenden Signale einen Hügel simulieren.

Dabei wird wie folgt vorgegangen: die nicht getrennten Signale werden, wie in Bild A.19 (Anhang A) dargestellt, als aufsitzende Peaks integriert und von der darunterliegenden Gesamtfläche, die die aufsitzenden Peaks enthält, subtrahiert. Wenn keine eindeutige Unterscheidung zwischen nicht getrennten Signalen und möglicherweise zugrundeliegenden Hügeln mehr möglich ist, muss die LOQ um den Betrag, der sich aus der Summe der Gesamtfläche der nicht getrennten Signale und aller möglicherweise zugrundeliegenden Hügel ergibt, erhöht werden.

Darüber hinaus werden die Chromatogramme auf Folgendes überprüft:

- ausreichende Wiederfindung interner Standards;
- Vorhandensein der Verifizierungsstandards in den richtigen Fraktionen;
- fehlende Abgrenzung gegenüber leichter siedenden oder schwersiedenden Substanzen.

9.2 Berechnung

Um den Gehalt an Kohlenwasserstoffen aus Mineralöl in einer Probe zu berechnen, wird der Bereich aller Kohlenwasserstoffe A_1 durch manuelle Integration des Gesamtsignals der UCM und aller scharfen Peaks im Bereich der UCM (Bild A.10, Anhang A) bestimmt, ausgehend von der Basislinie bis zu dem Punkt, an dem die Basislinie im Elutionsbereich der n -Alkane von C10 bis C50 wieder erreicht ist.

Dann wird die Summe der Bereiche aller scharfen aufsitzenden Peaks oberhalb der UCM ermittelt, um die Fläche A_2 zu bestimmen. Die Basislinie im Chromatogramm muss von Tal zu Tal gezogen werden (Bild A.11, Anhang A).

Die Differenz A_i bei der Bestimmung der Fläche der UCM ist wie folgt:

$$A_i = A_1 - A_2$$

Liegen die Quantifizierungsstandards (CyCy, TBB oder 1-MN) auf dem UCM-Signal, werden die Flächen der Standards ebenfalls mit einer Tal-zu-Tal-Basislinie integriert.

Die MOSH- und MOAH-Massenanteile (w_{HC}), in mg/kg, ergeben sich nach Gleichung (2).

$$w_{HC} = \frac{A_i \times m_{IS} \times 1\,000}{A_{IS} \times m} \quad (2)$$

Dabei ist

A_i die Peak-Fläche der UCM nach Abzug aller scharfen Peaks oberhalb der UCM ($A_1 - A_2$);

A_{IS} die Peak-Fläche des Peaks des internen Standards;

m_{IS} die Masse des hinzugegebenen internen Standards, in Milligramm;

m die Masse der Probe, in Gramm.

Das Ergebnis muss auf zwei signifikante Stellen angegeben werden.

Zusätzlich zu diesen Angaben kann das Ergebnis auch in Fraktionen aufgeteilt werden, die den jeweiligen Elutionsbereichen der n -Alkane entsprechen. Die folgenden Fraktionen wurden separat in dem Technischen Bereich der JRC [6] angegeben:

Tabelle 2 — Fraktionen entsprechend dem Technischen Bericht der JRC

MOSH	MOAH
MOSH gesamt [C10–C50]	MOAH gesamt [C10–C50]
MOSH $\geq n$ -C10 bis $\leq n$ -C16	MOAH $\geq n$ -C10 bis $\leq n$ -C16
MOSH $> n$ -C16 bis $\leq n$ -C20	MOAH $> n$ -C16 bis $\leq n$ -C25
MOSH $> n$ -C20 bis $\leq n$ -C25	MOAH $> n$ -C25 bis $\leq n$ -C35
MOSH $> n$ -C25 bis $\leq n$ -C35	MOAH $> n$ -C35 bis $\leq n$ -C50

Tabelle 2 (fortgesetzt)

MOSH	MOAH
MOSH > n -C35 bis $\leq n$ -C40	
MOSH > n -C40 bis $\leq n$ -C50	

ANMERKUNG Um die Konzentration der Fraktion der UCM in dem Elutionsbereich der n -Alkane von z. B. C10 bis C16 zu ermitteln, werden die Retentionszeiten vom Peak-Beginn von C10 und vom Peak-Ende von C16 anhand eines Chromatogramms des Standardgemischs von n -Alkanen von C10 bis C50 (5.27) bestimmt und diese Retentionszeiten werden auf die UCM zur senkrechten Integration übertragen. Jede der folgenden Fraktionen beginnt am Peak-Ende der festgelegten n -Alkane.

Die LOQ hängt von der jeweiligen Breite und Höhe der Fläche des UCM-Signals ab. Der Flächenwert unterliegt einem größeren Fehler als bei einzelnen Substanzen, da kleine Schwankungen in der Basislinie zu großen Veränderungen in der Fläche mit breiten Signal-Peaks führen. Für eine sichere Quantifizierung müssen etwa 50 ng bis 100 ng der Substanz an einem Flammenionisationsdetektor ankommen.

Die LOQ gilt für die Summe aller Kohlenwasserstoffe aus Mineralöl in der MOSH- oder MOAH-Fraktion. Informationen zum Gehalt in Fraktionen mit bestimmten Kettenlängen ermöglichen darüber hinaus eine nähere Beschreibung der Ergebnisse und liefern Hinweise auf mögliche Pfade für die Übertragung. Substanzen im Elutionsbereich unterhalb C24 können über direkten Kontakt sowie über die Gasphase übertragen werden, wobei die länger-kettigen Substanzen nur über direkten Kontakt oder über gebundene Partikel übertragen werden.

10 Präzision des Verfahrens

Einzelheiten zur Präzision des Verfahrens in einem Ringversuch sind in Anhang B zusammengefasst. Es kann sein, dass die aus diesem Ringversuch stammenden Werte für andere als die angegebenen Konzentrationsbereiche und Matrices nicht zutreffen.

10.1 Wiederholgrenze (r)

Die absolute Differenz zwischen zwei einzelnen Untersuchungsergebnissen, die an identischem Untersuchungsmaterial durch einen Bearbeiter mit derselben Geräteausstattung innerhalb der kürzest möglichen Zeitspanne erhalten wurden, wird die Wiederholgrenze r , angegeben in Tabelle B.2 und Tabelle B.3, in nicht mehr als 5 % der Fälle überschreiten.

10.2 Vergleichgrenze (R)

Die absolute Differenz zwischen zwei einzelnen Untersuchungsergebnissen, die an identischem Untersuchungsmaterial in zwei Laboratorien erhalten wurden, wird die Vergleichgrenze R , angegeben in Tabelle B.2 und Tabelle B.3, in nicht mehr als 5 % der Fälle überschreiten.

11 Prüfbericht

Der Prüfbericht muss Folgendes festlegen:

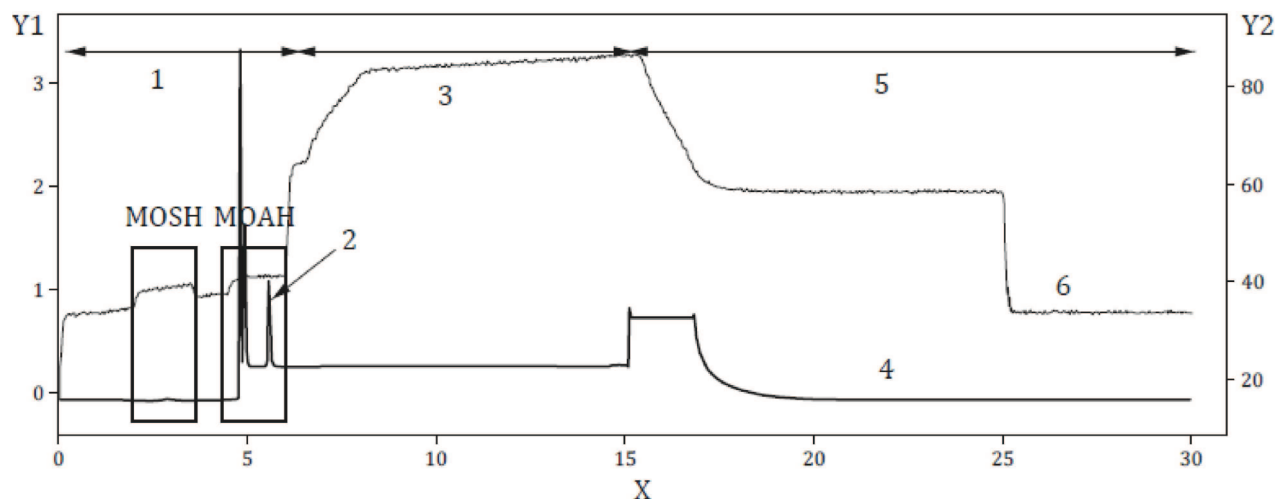
- alle Informationen, die für die vollständige Identifizierung der Probe notwendig sind;
- das angewendete Probenahmeverfahren, sofern dies bekannt ist;
- das angewendete Prüfverfahren mit einer Verweisung auf diese Internationale Norm, d. h. ISO 20122, einschließlich des Jahres der Veröffentlichung;
- Datum des Erhalts der Proben;

- e) Datum der Prüfung;
- f) die Masse(n) der Probe(n);
- g) den Bereich der untersuchten Kettenlängen der Kohlenwasserstoffe;
- h) alle Einzelheiten zur Arbeitsweise, die nicht in dieser Internationalen Norm festgelegt sind oder als optional gelten, zusammen mit Einzelheiten zu Vorkommnissen, die das/die Prüfergebnis(e) beeinflusst haben können;
- i) das/die Prüfergebnis(se) und die Einheiten, in denen es/sie angegeben wurde(n), oder, wenn die Wiederholpräzision überprüft wurde, das erhaltene und letztendlich angegebene Ergebnis;
- j) Angaben zu einer erhöhten LOQ aufgrund des Vorhandenseins nicht getrennter störender Signale, die einen Hügel simulieren;
- k) Angaben zum Vorhandensein von POSH, PAO, ROSH oder ROAH, die im Chromatogramm festgestellt wurden.

Anhang A (informativ)

Bilder und Chromatogramme

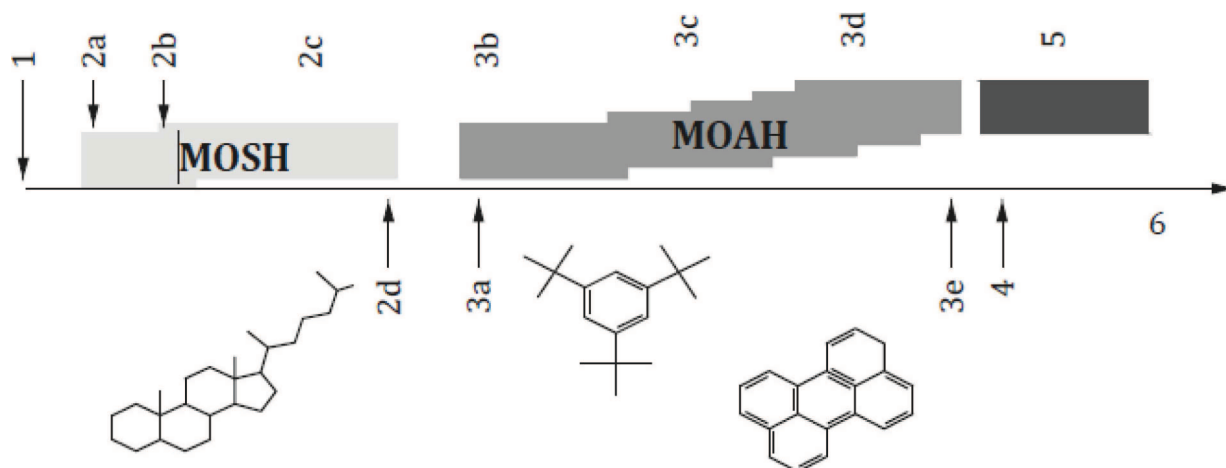
Alle nachstehend aufgeführten Chromatogramme werden mit einer x-Achse bezogen auf die Zeit in min und einer y-Achse bezogen auf die Intensität dargestellt.



Legende

- 1 Trennung
- 2 Perylen
- 3 Strömungsumkehr
- 4 UV-Signal
- 5 Wiederherstellung des Gleichgewichts
- 6 Druck

Bild A.1 — HPLC-UV-Chromatogramm mit charakteristischem Signal- und Druckkanal für eine MOSH/MOAH-Messung



Legende

- 1 Injektion
- 2 MOSH
- 2a Paraffine mit höherer Masse
- 2b Paraffine mit niedrigerer Masse
- 2c Naphthene
- 2d Cholestan
- 3 MOAH
- 3a Tri-tert-butylbenzol
- 3b alkylierte Benzole
- 3c hoch alkylierte polycyclische Aromaten
- 3d wenig alkylierte polycyclische Aromaten
- 3e Perylen
- 4 Wachsester
- 5 gesättigte Wachsester
- 6 Retentionszeit

Bild A.2 — Elutionsschema der Stoffklassen der MOSH- und MOAH-Fraktion (oberer Teil) und der für die Grenzen der Fraktionierungsfenster genutzten Verifizierungsstandards (unterer Teil) [2]