

ILNAS

Institut luxembourgeois de la normalisation
de l'accréditation, de la sécurité et qualité
des produits et services

ILNAS-EN 14105:2003

Erzeugnisse aus pflanzlichen und tierischen Fetten und Ölen - Fettsäure- Methylester (FAME) - Bestimmung des Gehaltes an freiem und

Fat and oil derivatives - Fatty Acid Methyl
Esters (FAME) - Determination of free and
total glycerol and mono-, di-, triglyceride
contents (Reference method)

Produits dérivés des corps gras - Esters
méthyliques d'acides gras (EMAG) -
Détermination de la teneur en glycérols
libre et total et en mono-, di- et

04/2003

Nationales Vorwort

Diese Europäische Norm EN 14105:2003 wurde als luxemburgische Norm ILNAS-EN 14105:2003 übernommen.

Alle interessierten Personen, welche Mitglied einer luxemburgischen Organisation sind, können sich kostenlos an der Entwicklung von luxemburgischen (ILNAS), europäischen (CEN, CENELEC) und internationalen (ISO, IEC) Normen beteiligen:

- Inhalt der Normen beeinflussen und mitgestalten
- Künftige Entwicklungen vorhersehen
- An Sitzungen der technischen Komitees teilnehmen

<https://portail-qualite.public.lu/fr/normes-normalisation/participer-normalisation.html>

DIESES WERK IST URHEBERRECHTLICH GESCHÜTZT

Kein Teil dieser Veröffentlichung darf ohne schriftliche Einwilligung weder vervielfältigt noch in sonstiger Weise genutzt werden - sei es elektronisch, mechanisch, durch Fotokopien oder auf andere Art!

Deutsche Fassung

Erzeugnisse aus pflanzlichen und tierischen Fetten und Ölen - Fettsäure-Methylester (FAME) - Bestimmung des Gehaltes an freiem und Gesamtglycerin und Mono-, Di- und Triglyceriden (Referenzmethode)

Fat and oil derivatives - Fatty Acid Methyl Esters (FAME) -
Determination of free and total glycerol and mono-, di-,
triglyceride contents (Reference method)

Produits dérivés des corps gras - Esters méthyliques
d'acides gras (EMAG) - Détermination de la teneur en
glycérols libre et total et en mono-, di- et triglycérides -
Méthode de référence

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 2. Januar 2003 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim Management-Zentrum oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Dänemark, Deutschland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Portugal, Schweden, Schweiz, der Slowakei, Spanien, der Tschechischen Republik, Ungarn und dem Vereinigten Königreich.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

Management-Zentrum: rue de Stassart, 36 B-1050 Brüssel

Vorwort

Dieses Dokument (EN 14105:2003) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 307 "Ölsamen, tierische und pflanzliche Fette und Öle und deren Nebenprodukte - Probenahme- und Untersuchungsverfahren" erarbeitet, dessen Sekretariat vom AFNOR gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Oktober 2003, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Oktober 2003 zurückgezogen werden.

Dieses Dokument wurde unter Mandat M/245 zu Fettsäure-Methylester (FAME) erarbeitet, das die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelszone dem CEN erteilt haben.

Die Anhänge A bis D sind informativ.

Entsprechend der CEN/CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Dänemark, Deutschland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Luxemburg, Malta, die Niederlande, Norwegen, Österreich, Portugal, Schweden, die Schweiz, die Slowakei, Spanien, die Tschechische Republik, Ungarn und das Vereinigte Königreich.

1 Anwendungsbereich

Diese Europäische Norm legt ein Verfahren fest, um freies Glycerin und Reste an Mono-, Di- und Triglyceriden in Fettsäure-Methylester (FAME), die als Zugabe zu Mineralölen vorgesehen sind, zu bestimmen. Der Gesamtglyceringehalt wird anschließend aus den erhaltenen Messwerten berechnet.

Das Verfahren ist einsetzbar für FAME aus Rapsöl, Sonnenblumenöl und Sojaöl. Es kann nicht eingesetzt werden für FAME aus Kokosnuss- und Palmkernölen, da hier überlappende Peaks auftreten.

WARNUNG — Bei der Anwendung dieses Verfahrens kann das Benutzen gefährlicher Substanzen und Ausrüstungen sowie das Durchführen gefährlicher Tätigkeiten erforderlich werden. Dieses Verfahren nimmt nicht für sich in Anspruch, alle Sicherheitsprobleme, die bei seiner Anwendung auftreten können, aufzuzeigen. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders dieses Verfahrens, entsprechende Sicherheitsmaßnahmen und Vorkehrungen zum Schutz der Gesundheit zu ergreifen.

2 Prinzip

Das Glycerin sowie die Mono-, Diglyceride werden in die besser flüchtigen silylierten Derivate durch Zugabe von N-Methyl-N-Trimethylsilyltrifluoracetamid (MSTFA) in Gegenwart von Pyridin umgesetzt.

Die silylierten Derivate werden mittels Gaschromatographie auf kurzen Dünnschicht-(Hochtemperatur-) Kapillarsäulen nach Kaltaufgabe (cool-on-column) und Flammenionisationsdetektor analysiert.

Nach der Kalibration des Verfahrens erfolgt die Quantifizierung anhand von zwei internen Standards:

- 1,2,4-Butantriol für die Bestimmung von freiem Glycerin;
- 1,2,3-Tricaproylglycerin (Tricaprin) für die Bestimmung der Glyceride (Mono-, Di- und Tri-).

3 Reagenzien

Sofern nicht anders angegeben, dürfen nur Reagenzien mit anerkannter analytischer Reinheit verwendet werden.

3.1 N-Methyl-N-Trimethylsilyltrifluoracetamid (MSTFA)

3.2 Pyridin, über Molekularsieb aufbewahrt.

3.3 n-Heptan

3.4 1,2,4-Butantriol, (Interner Standard Nr. 1)

3.5 1,2,3-Tricaproylglycerin (Triolein), (Interner Standard Nr. 2)

3.6 Referenzsubstanzen: Glycerin, 1-Monooleoylglycerin (Monoolein), 1,3-Dioleoylglycerin (Diolein), 1,2,3-Trioleoylglycerin (Tricaprin), rein, mit für die Gaschromatographie geeigneter Qualität.

3.7 Standard Nr. 1, Stammlösung, 1 mg/ml

Etwa 50 mg 1,2,4-Butantriol (3.4) in einen 50-ml-Messkolben (4.4) auf 0,1 mg einwiegen und mit Pyridin (3.2) bis zur Ringmarke auffüllen.

3.8 Interner Standard Nr. 2, Stammlösung, 8 mg/ml

Etwa 80 mg 1,2,3-Tricaproylglycerin (3.5) in einen 10-ml-Messkolben (4.5) auf 0,1 mg einwiegen und mit Pyridin (3.2) bis zur Marke auffüllen.

3.9 Glycerin-Stammlösung, 0,5 mg/ml

Etwa 50 mg Glycerin (3.6) in einen 10-ml-Messkolben (4.5) auf 0,1 mg einwiegen und mit Pyridin (3.2) bis zur Ringmarke auffüllen. Mit einer Pipette (4.7) 1 ml dieser Lösung in einen 10-ml-Messkolben (4.5) überführen und bis zur Ringmarke mit Pyridin (3.2) auffüllen.

3.10 Glycerid-Stammlösung, 5 mg/ml

Für jedes Referenzglycerid etwa 50 mg Mono- (a), Di- (b) und Triolein (c) (3.6) in einen 10-ml-Messkolben (4.5) auf 0,1 mg einwiegen und bis zur Ringmarke mit Pyridin (3.2) auffüllen.

3.11 Käufliche Monoglycerid-Mischungen¹⁾

Zusammensetzung: Monopalmitoylglycerin (Monopalmitin), Monostearoylglycerin (Monostearin) und Monooleoylglycerin (Monoolein) in gleichen Massenanteilen.

Zur Herstellung einer Stammlösung etwa 100 mg in einen 10-ml-Messkolben (4.5) einwiegen und mit Pyridin (3.2) bis zur Ringmarke auffüllen.

3.12 Kalibrierlösungen

Täglich vier Kalibrierlösungen herstellen. Dazu die in der Tabelle 1 angegebenen Mengen der Glycerin- und Glyceridstammlösungen (3.9 und 3.10) sowie die Standardlösungen 1 und 2 (3.7 und 3.8) mit Mikroliterspritzen (4.8 und 4.9) in Probengläser überführen. Die Auswahl der geeigneten Spritzen erfolgt nach Tabelle 1. Die Volumina dürfen nicht durch Ausnutzen des Maximalvolumens der Spritzen dosiert werden, sondern durch Dosieren des halben Volumens in zwei Schritten (z. B.: 100 µl werden mit der 100-µl-Spritze durch zweimaliges Zugeben von 50 µl dosiert). Der Glaskörper und der Spritzenkolben müssen frei von Luftblasen sein. Die Volumina werden durch Differenzmessung bestimmt (z. B.: Wenn 80 µl dosiert werden sollen, wird die Spritze zuerst bis zur 100-µl-Marke befüllt und die Lösung dann bis zur 20-µl-Marke herausgedrückt).

ANMERKUNG Die silylierten Standardlösungen sind nur einen Tag haltbar.

1) Diese Produkte sind erhältlich bei SIGMA, Referenz 178-8 (als Beispiel). Diese Information dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produktes durch CEN.

Tabelle 1 — Herstellung der Stammlösungen

Kalibrierlösung	1	2	3	4	Spritze, µl
µl der Glycerinlösung	10	40	70	100	100
µl der Monooleinlösung	50	120	190	250	500
µl der Dioleinlösung	10	40	70	100	100
µl der Trioleinlösung	10	30	60	80	100
µl Interner Standard Nr. 1	80	80	80	80	100
µl Interner Standard Nr. 2	100	100	100	100	500

3.13 Trägergas: Wasserstoff oder Helium.

3.14 Brenngase.

- Luft;
- Wasserstoff.

4 Geräte

Übliche Laborgeräte und insbesondere folgende Geräte:

4.1 Gaschromatograph, der mit einem on-column-Injektor oder einem gleichwertigen Injektor ausgerüstet ist, ein temperierbarer Ofen und ein FID (Flammenionisationsdetektor).

4.2 Kapillarsäule, die für Temperaturen bis 400 °C geeignet ist („Hochtemperatursäule“).

Folgende Eigenschaften werden empfohlen:

- stationäre Phase: 100 % Dimethylpolysiloxan oder 95 % Dimethyl - 5 % Diphenylpolysiloxan;
- Länge 10 m;
- Innendurchmesser: 0,32 mm;
- Filmdicke: 0,1 µm.

4.3 Chromatographische Bedingungen

Die Bedingungen werden auf die verwendete Säule und das Trägergas (Helium oder Wasserstoff) abgestimmt. Die Triglyceride sollten nach etwa 30 min von der Säule eluieren.

Folgende Bedingungen haben sich bewährt:

- Ofentemperatur: 50 °C halten für 1 min, dann programmiert 15 °C/min bis auf 180 °C, dann programmiert 7 °C/min bis auf 230 °C, dann programmiert 10 °C/min bis auf 370 °C, Endtemperatur halten für 5 min
- Detektortemperatur: 380 °C
- Trägergasdruck: 80 kPa
- Injektionsvolumen: 1 µl

4.4 Messkolben, 50 ml.

4.5 Messkolben, 10 ml.

4.6 Probengläschen mit Schraubverschluss und polytetrafluorethylenbeschichteten Septen (etwa 10 ml).

4.7 Präzisionspipette, 1 ml

4.8 Mikroliterspritze, 100 µl.

4.9 Mikroliterspritze, 500 µl.

4.10 Mikroliterspritze für die on-column-Injektion, 1 µl.

4.11 Messzylinder, 10 ml.

4.12 Waage, mit einer Genauigkeit von $\pm 0,1$ mg.

5 Durchführung

5.1 Vorbereitung und Analyse der Kalibrierlösungen

Mit einer Mikroliterspritze (4.8) werden 100 µl MSTFA-Lösung (3.1) zu jeder der vier Kalibrierlösungen (3.12) zugegeben, die Gläschen dicht verschlossen und kräftig geschüttelt und der Kontakt mit Feuchtigkeit vermieden. Nach 15 min (Raumtemperatur) werden 8 ml Heptan (3.3) mit einem Messzylinder (4.11) zugefügt.

Zu untersuchen nach den in (4.3) angegebenen GC-Bedingungen sind jeweils 1 µl jeder Reaktionsmischung. Jede Reaktionsmischung veranlasst zwei GC-Untersuchungen. Die Lösungen sind nach der Derivatisierung nur für einige Stunden stabil.

5.2 Vorbereitung und Analyse von käuflichen Monoglycerid-Mischungen

200 µl Monoglycerid-Mischung werden mit einer Mikroliterspritze (4.8 und 4.9) zusammen mit 100 µl MSTFA (3.1) in ein 10-ml-Gläschen (4.6) überführt. Der Kontakt mit Feuchtigkeit ist dabei zu vermeiden. Das Gläschen wird dicht verschlossen und kräftig geschüttelt. Nach 15 min (Raumtemperatur) werden 8 ml Heptan (3.3) mit einem Messzylinder (4.11) zugefügt und davon 1 µl nach den in 4.3 genannten Bedingungen gaschromatographisch injiziert.

5.3 Probenahme

Die Probenahme ist nicht Teil des Verfahrens, das in dieser Norm festgelegt wird. Ein empfohlenes Probenahmeverfahren ist in EN ISO 5555 [1] festgelegt.

5.4 Vorbereitung und Analyse der Proben

($100 \pm 0,1$) mg der homogenisierten Probe werden in ein 10-ml-Gläschen (4.6) überführt. Mit einer Mikroliterspritze (4.8 und 4.9) werden 80 µl Interner Standard Nr. 1 (3.7), 100 µl Interner Standard Nr. 2 (3.8) und 100 µl MSTFA (3.1) zugegeben. Der Kontakt mit Feuchtigkeit ist dabei zu vermeiden. Das Gläschen wird dicht verschlossen und kräftig geschüttelt. Nach 15 min (Raumtemperatur) wird mit 8 ml Heptan verdünnt. Anschließend wird 1 µl der Reaktionsmischung nach den in 4.3 genannten Bedingungen gaschromatographisch untersucht.

Für jede Probe sind jeweils zwei Probenteile in die Derivatisierung einzusetzen, woraus dann jeweils zwei GC-Analysen veranlasst werden. Die Lösungen sind nach der Derivatisierung nur für einige Stunden stabil.