
Rastlinske in živalske maščobe in olja - Plinska kromatografija metil estrov maščobnih kislin - 2. del: Priprava metil estrov maščobnih kislin (ISO/DIS 12966-2:2016)

Animal and vegetable fats and oils - Gas chromatography of fatty acid methyl esters - Part 2: Preparation of methyl esters of fatty acids

Tierische und pflanzliche Fette und Öle - Gaschromatographie von Fettsäuremethylestern - Teil: 2: Herstellung von Fettsäuremethylestern (ISO/DIS 12966-2:2016); Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 12966-2:2016

Corps gras d'origines animale et végétale - Chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques d'acides gras - Partie 2: Préparation des esters méthyliques d'acides gras

[SIST EN ISO 12966-2:2017](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/44413b11-3df9-4706-8cb9-97392e6f9b34/sist-en-iso-12966-2-2017)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/44413b11-3df9-4706-8cb9-97392e6f9b34/sist-en-iso-12966-2-2017>

Ta slovenski standard je istoveten z: prEN ISO 12966-2

ICS:

67.200.10	Rastlinske in živalske maščobe in olja	Animal and vegetable fats and oils
71.040.50	Fizikalnokemijske analitske metode	Physicochemical methods of analysis

oSIST prEN ISO 12966-2:2017

de

EUROPÄISCHE NORM
EUROPEAN STANDARD
NORME EUROPÉENNE

ENTWURF
prEN ISO 12966-2

Dezember 2016

ICS 67.200.10

Vorgesehen als Ersatz für EN ISO 12966-2:2011

Deutsche Fassung

Tierische und pflanzliche Fette und Öle - Gaschromatographie von Fettsäuremethylestern - Teil 2: Herstellung von Fettsäuremethylestern (ISO/FDIS 12966-2:2016)

Animal and vegetable fats and oils - Gas chromatography of
fatty acid methyl esters - Part 2: Preparation of methyl
esters of fatty acids (ISO/FDIS 12966-2:2016)

Corps gras d'origines animale et végétale -
Chromatographie en phase gazeuse des esters
méthylliques d'acides gras - Partie 2: Préparation des esters
méthylliques d'acides gras (ISO/FDIS 12966-2:2016)

Dieser Europäische Norm-Entwurf wird den CEN-Mitgliedern zur parallelen Umfrage vorgelegt. Er wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 307 erstellt.

Wenn aus diesem Norm-Entwurf eine Europäische Norm wird, sind die CEN-Mitglieder gehalten, die CEN-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.

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

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, der ehemaligen jugoslawischen Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, der Schweiz, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, der Türkei, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevante Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Warnvermerk : Dieses Schriftstück hat noch nicht den Status einer Europäischen Norm. Es wird zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt. Es kann sich noch ohne Ankündigung ändern und darf nicht als Europäischen Norm in Bezug genommen werden.



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

CEN-CENELEC Management-Zentrum: Avenue Marnix 17, B-1000 Brüssel

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Vorwort	5
Einleitung	6
1 Anwendungsbereich	9
2 Normative Verweisungen	9
3 Begriffe	9
4 Reaktionen	9
5 Verfahrensweise	10
5.1 Vorbereitung der Untersuchungsprobe	10
5.2 Schnellverfahren	10
5.2.1 Anwendbarkeit	10
5.2.2 Kurzbeschreibung	10
5.2.3 Reagenzien	10
5.2.4 Geräte	11
5.2.5 Verfahren	11
5.3 Allgemeines Verfahren	12
5.3.1 Anwendbarkeit	12
5.3.2 Kurzbeschreibung	12
5.3.3 Reagenzien	12
5.3.4 Geräte und Materialien	13
5.3.5 Verfahren	13
5.4 Transmethylierung mit Bortriflourid (BF₃)-Katalysator	14
5.4.1 Kurzbeschreibung	14
5.4.2 Anwendbarkeit	14
5.4.3 Reagenzien	14
5.4.4 Geräte	15
5.4.5 Verfahren	16
5.5 Säurekatalysierte Transmethylierung der Glyceride	18
5.5.1 Kurzbeschreibung	18
5.5.2 Reagenzien	18
5.5.3 Geräte	18
5.5.4 Vorbereitung der Untersuchungsprobe	18

5.5.5 Verfahren	19
Anhang A (informativ) Dünnschichtchromatographisches Verfahren für die Prüfung der Vollständigkeit der Derivatisierung.....	20
Literaturhinweise.....	24

iTeh Standards
(<https://standards.iteh.ai>)
Document Preview

[SIST EN ISO 12966-2:2017](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/44413b11-3df9-4706-8cb9-97392e6f9b34/sist-en-iso-12966-2-2017)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/44413b11-3df9-4706-8cb9-97392e6f9b34/sist-en-iso-12966-2-2017>

FprEN ISO 12966-2:2016 (D)

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (FprEN ISO 12966-2:2016) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem 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.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen formellen Abstimmung vorgelegt.

Dieses Dokument wird EN ISO 12966-2:2011 ersetzen.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/FDIS 12966-2:2016 wurde vom CEN als FprEN ISO 12966-2:2016 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

iTeh Standards
(<https://standards.iteh.ai>)
Document Preview

[SIST EN ISO 12966-2:2017](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/44413b11-3df9-4706-8cb9-97392e6f9b34/sist-en-iso-12966-2-2017)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/44413b11-3df9-4706-8cb9-97392e6f9b34/sist-en-iso-12966-2-2017>

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung von Nationalen Normungsorganisationen (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird normalerweise von ISO Technischen Komitees 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 Organisationen, staatlich und nicht-staatlich, in Liaison mit ISO, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) bei allen elektrotechnischen Themen 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. Im Besonderen sollten die für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten notwendigen Annahmekriterien 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 empfangenen 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.

Eine Erläuterung der Bedeutung ISO-spezifischer Benennungen und Ausdrücke, die sich auf Konformitätsbewertung beziehen, sowie Informationen über die Beachtung der Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO) zu technischen Handelshemmnissen (TBT, en: Technical Barriers to Trade) durch ISO enthält der folgende Link: 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*.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/44413b11-3df9-4706-8cb9-97392e6f9b34/sist-en-iso-12966-2-2017>

Diese zweite Ausgabe ersetzt die erste Ausgabe (ISO 12966-2:2011), die eine geringfügige Änderung darstellt.

Die Änderungen im Vergleich zur vorhergehenden Ausgabe sind die folgenden:

— Milch und Milcherzeugnisse (und Fette daraus) sind vom Anwendungsbereich der Norm ausgeschlossen worden.

Eine Liste aller Teile der Normenreihe ISO 12966 kann auf der ISO-Website gefunden werden.

Einleitung

Allgemeines

Öle und Fette (d.h. flüssige und feste Lipide) bestehen überwiegend aus Fettsäureglycerinestern (Triacylglycerin, TAG) mit kleineren Mengen an Fettsäurestereylestern und langkettigen aliphatischen Alkoholen. Wegen der hohen Molekularmasse der TAG und der daraus folgenden Schwerflüchtigkeit sind sie schwer direkt durch Gaschromatographie (GC) zu analysieren, besonders wenn eine ausführliche Analyse von ungesättigten Fettsäuren notwendig ist. Fettsäuren selbst lassen sich nicht gut chromatographieren (mit Ausnahme der kurzkettigen Fettsäuren, z. B. Buttersäure und Pentansäure). Es ist deshalb eine bessere Praxis, vor der GC Fettsäureester zu bilden, üblicherweise Fettsäuremethylester (FAME).

Die Analyse der Öle und Fette wird im Literaturhinweis [9] umfassend beschrieben.

Bei der Analyse von Fettsäuren ist die Bildung der FAME ein kritischer Arbeitsgang. Die nicht quantitative Umwandlung der Fettsäuren zu FAME, die Modifikation der Struktur der Fettsäuren (z. B. Änderungen in den vorhandenen Stellungsisomeren und geometrischen Isomeren) und die Bildung von Nicht-FAME-Artefakten können die quantitative Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung beeinflussen.

Die Umesterung ist ein Vorgang, der zum Einsatz kommt, um FAME aus Fettsäureestern in Fette (z. B. Triacylglycerin) zu bilden. Alkali- oder säurekatalysierte Umesterungsverfahren können zur Bildung der FAME in einem methanolischen Medium angewendet werden; das Verfahren kann als „*Transmethylierung*“ bezeichnet werden. Die Transmethylierung ist ein umkehrbares Verfahren und es ist ein großer Überschuss an Methanol erforderlich, um eine Gleichgewichtslage aufrechtzuerhalten, die die Bildung der FAME begünstigt. Wasser kann verhindern, dass die Reaktion zum Abschluss kommt, und sein Vorliegen sollte deshalb minimiert werden. Wegen der Bildung von Seifen bilden alkalikatalysierte Verfahren keine FAME.

Die Veresterung ist ein säurekatalysierter Vorgang, der zur Bildung von FAME aus Fettsäuren zum Einsatz kommen kann. Es ist möglich, dass die Fettsäuren natürlich in der Probe des zu untersuchenden Fettes vorhanden sind. Die Bildung der FAME durch diesen Vorgang wird üblicherweise als „*Methylierung*“ bezeichnet. Wieder sind ein Überschuss an Methanol und die Abwesenheit von Wasser Voraussetzungen für die quantitative Bildung der FAME.

Dieses Dokument enthält Leitlinien für die Herstellung von Fettsäuremethylestern. In Anlehnung an diese Leitlinien sind verschiedene Verfahren zur Herstellung von Fettsäuremethylestern festgelegt. Diese beinhalten:

- a) „Schnelle“ Transmethylierung unter alkalischen Bedingungen;
- b) „Allgemeine“ Transmethylierung/Methylierung unter aufeinanderfolgenden alkalischen und sauren Bedingungen; und
- c) Bortrifluorid (BF₃)-Transmethylierung/Methylierung.

„Schnelles“ Transmethylierungsverfahren unter alkalikatalysierten Bedingungen

Dieses Verfahren ist für die Routineanalyse von essbaren Fetten und Ölen mit der einen internen Standard anwendenden GC geeignet, die Fettsäuren bis hin zur Buttersäure (C4:0) enthalten und/oder für die Bestimmung von Butter- oder Hexansäure (C6:0).

Alkalische Katalysatoren estern neutrale Lipide in Anwesenheit von wasserfreiem Methanol (Transmethylierung) schneller als Säurekatalysatoren um. Die Nachteile dieser alkalikatalysierten Verfahren sind, dass freie Fettsäuren nicht verestert werden, und das Vorliegen von Wasser kann verhindern, dass die Transmethylierung zum Abschluss kommt (Hydrolyse der FAME zu freien Fettsäuren). Die am häufigsten verwendeten Reagenzien sind Kalium, Natriumhydroxid und Natriummethylat in Anwesenheit von wasserfreiem Methanol.

„Allgemeine“ Transmethylierung/Methylierung unter aufeinanderfolgenden alkalischen und sauren Bedingungen

Dieses Verfahren unter aufeinanderfolgenden alkalischen und sauren Bedingungen ist für alle Öle und Fette einschließlich Destillat und saure Öle geeignet, aber es ist nicht für laurische Öle zu empfehlen. Kurzkettige Fettsäuremethylester gehen während der Rückflussdestillation leicht verloren. Bei laurischen Ölen wird das „Schnellverfahren“ der Transmethylierung empfohlen.

Während der Methylierung können Substanzen, die die folgenden Bindungen enthalten, ganz oder teilweise gespalten werden:

- a) Keto-, Epoxid-, Hydroxyl-, Hydroperoxy-Gruppen;
- b) Cyclopropyl- und Cyclopropenyl-Gruppen;
- c) Acetylenfettsäuren.

Bortriflourid-(BF₃-)Transmethylierung/Methylierung

Wegen der Toxizität von BF₃ wird empfohlen, dass dieses Verfahren *nur im äußersten Fall* angewendet wird.

Das BF₃-Verfahren ist für die meisten Öle, Fette und Derivate (Fettsäuren, Seifen) geeignet, mit Ausnahme von Milchfetten und Fetten, die Fettsäuren mit spezifischen Gruppen enthalten.

Während der Methylierung können Substanzen, die die folgenden Bindungen enthalten, ganz oder teilweise gespalten werden:

- a) Keto-, Epoxid-, Hydroxyl-, Hydroperoxy-Gruppen;
- b) Cyclopropyl- und Cyclopropenyl-Gruppen;
- c) Acetylenfettsäuren.

Falls die Fettmasse diese Substanzen in nur sehr geringen Mengen (z. B. Baumwollsaatöl) enthält, kann das Verfahren angewendet werden; ansonsten sollte den „Schnell-“ oder „allgemeinen“ Transmethylierungs-/Methylierungsverfahren gefolgt werden.

Bei der GC wird die optimale Wiederfindung der Methylester aus dem Reaktionsgemisch durch die Anwendung von Isooctan (2,2,4-Trimethylpentan) erhalten. Jedoch werden nur etwa 75 % des vorhandenen Methylcapronats wiedergefunden.

Bortriflourid ist eine starke Lewis-Säure, und kann in der Form seines Koordinationskomplexes mit Methanol unter Rückflussbedingungen schnell Fettsäuren methylieren. Methanolisches Bortriflourid transmethyliert Fettsäureester (z. B. Triglycerid), aber die Reaktionsgeschwindigkeit ist geringer als die Methylierung der Fettsäuren. Methanolische Bortriflouridlösung ist handelsüblich verfügbar, das steigert die Attraktivität dieses sauren Katalysators, aber es gibt viele mit der Anwendung dieses Reagens verbundene Nachteile.

- a) Es wurde berichtet, dass hohe Konzentrationen von Bortriflourid (50 % Massenanteil) Methoxy-Artefakte aus ungesättigten Fettsäuren erzeugen.
- b) Das Reagens hat eine begrenzte Haltbarkeitsdauer bei Umgebungstemperatur und sollte gekühlt aufbewahrt werden.
- c) Das gealterte Reagens kann Artefakte erzeugen und deshalb wird empfohlen, dass jede neu gelieferte Charge vor der Verwendung und periodisch während seiner Lebensdauer überprüft wird.
- d) Methanolisches Bortriflourid ist ein saures Reagens und deshalb kann es Derivate der Fettsäuren erzeugen, die instabile Gruppen enthalten, die zu störenden (falschen) Peaks auf den FAME-Chromatogrammen führen können.

FprEN ISO 12966-2:2016 (D)**Zusätzliche Information**

Der Herstellung und Analyse von Estern der kurzkettigen Fettsäuren mit der GC ist viel Aufmerksamkeit gewidmet worden, im Wesentlichen infolge ihres Vorkommens in Milchfetten. Kurzkettige Fettsäuren, im ungebundenen Stadium oder verestert zu Glycerin, können mit allen in den vorausgehenden Absätzen beschriebenen Reagenzien vollständig zu Methylestern umgewandelt werden, aber die quantitative Wiederfindung vom Reaktionsmedium kann nicht erreicht werden, außer besondere Vorkehrungen werden getroffen. Verluste können bei verschiedenen Phasen in jedem Verfahren auftreten. Kurzkettige Fettsäureester (hauptsächlich Methyl) sind unbeständig und können wahlweise beim Rückfluss des Veresterungsmediums verloren gehen; sie sind in Wasser löslicher als langkettige Ester und können in einem wässrigen Extraktionsschritt verloren gehen, oder sie können abdestilliert werden, wenn das Extraktionslösemittel verdampft. Selektive Verluste können ebenfalls auftreten, wenn nicht verseifbare Verunreinigungen durch Sublimation oder Reinigung durch Dünnschichtchromatographie (DC) entfernt werden müssen. Die besten Veresterungsverfahren für kurzkettige Fettsäuren sind die, bei denen ein Erwärmen der Reagenzien vermieden wird und bei denen Phasen eine wässrige Extraktion zur Folge haben und ein Entfernen des Lösemittels fehlt.

Die Injektion des Reaktionsmediums, das basische und saure Veresterungskatalysatoren enthält, direkt auf die GC-Säulen verkürzt deren Nutzungsdauer. Die oberen wenigen Zentimeter der gepackten Säulen können periodisch aufgefüllt werden, solange Längen des deaktivierten Rohrs oder „Retentionsgaps“ (leere Vorsäulen) vor den Kapillarsäulen diese schützen. Das kann ein kleiner Preis sein, der für die Geschwindigkeit, Einfachheit und Genauigkeit dieser Verfahren zu zahlen ist.

Zur Überprüfung der Effektivität der Transmethylierung/Methylierung gibt dieses Dokument zusätzlich ein einfaches DC-Verfahren an. Dieses Verfahren darf auch angewendet werden, um die allgemeine Zusammensetzung eines Öles oder Fettes zu überprüfen, bevor die Transmethylierung/Methylierung durchgeführt wird.

iteh Standards
(<https://standards.iteh.ai>)
Document Preview

[SIST EN ISO 12966-2:2017](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/44413b11-3df9-4706-8cb9-97392e6f9b34/sist-en-iso-12966-2-2017)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/44413b11-3df9-4706-8cb9-97392e6f9b34/sist-en-iso-12966-2-2017>