

Nachweis und Bestimmung von Fremdfetten in Milchfett anhand einer gaschromatographischen Triglyceridanalyse

DIN
10336

ICS 67.100.10

Ersatz für DIN 10336-2 : 1979-07

Deskriptoren: Fremdfett, Melangeprodukt, Milchfett

Detection and determination of foreign fats in milk fat by gaschromatographic analysis of triglycerides

Détection et détermination des matières grasses étrangères dans les matières grasses du lait par chromatographie en phase gazeuse des triglycérides

1 Anwendungsbereich und Zweck

Diese Norm legt ein Verfahren zum Nachweis von Fremdfetten, sowohl von pflanzlichen Fetten als auch von tierischen Fetten wie Rindertalg und Schweinefett, im Milchfett von Milch und Milchprodukten anhand einer gaschromatographischen Triglyceridanalyse fest.

Unter Verwendung bestimmter Triglyceridformeln werden qualitativ und quantitativ pflanzliche und tierische Fette, unabhängig von fütterungs- und laktationsbedingten Einflüssen, in reinem Milchfett nachgewiesen.

ANMERKUNG 1: Aufgrund der nur im Milchfett vorkommenden Buttersäure (C4) können zwar quantitative Abschätzungen über geringe bis mittlere Anteile von Milchfett in Pflanzenfetten vorgenommen werden, jedoch können infolge des großen Schwankungsbereiches von C4 — etwa 3,5 bis 4,5 % (Massenanteil) — kaum qualitative und quantitative Aussagen im Bereich eines Zusatzes bis mindestens 20 % (Massenanteil) Fremdfett zu reinem Milchfett über den Buttersäuregehalt erfolgen.

ANMERKUNG 2: Quantitative Ergebnisse können praktisch nur durch Triglyceridanalysen erzielt werden, da der Steringehalt der Pflanzenfette in Abhängigkeit von deren Herstellungs- und Behandlungsbedingungen unterschiedlich ist.

2 Begriff

Fremdfette in Milchfett

Fremdfette im Sinne dieser Norm sind alle pflanzlichen und tierischen Fette außer Milchfett.

- ¹⁾ D. Precht und J. Molkentin: Quantitative triglyceride analysis using short capillary columns. Chrompack News 4, 16 – 17 (1993).
- ²⁾ Geeignete Produkte sind im Handel erhältlich. Über Bezugsquellen gibt Auskunft: DIN Bezugsquellen für normgerechte Erzeugnisse im DIN Deutsches Institut für Normung e.V., Burggrafenstraße 6, 10787 Berlin, Postanschrift 10772 Berlin.
- ³⁾ Die Angabe der Körnung wurde nach BS 410 : 1988 "British Standard Specification for test sieves" in die SI-Einheit μm übertragen.

3 Kurzbeschreibung des Verfahrens

Nach Extraktion des Milchfettes wird eine Stammlösung hergestellt.

Aus dieser Lösung werden gaschromatographisch an gepackten Säulen die Triglyceride bestimmt (Gesamtkohlenstoffzahlen). Durch Einsetzen der Gewichtsanteile der verschiedenen großen Fettmoleküle (C24 bis C54 — nur gerade Zahlen) in die Triglyceridformel werden die Fremdfette qualitativ nachgewiesen bzw. quantitativ bestimmt.

ANMERKUNG: Die Kapillargaschromatographie kann bei Beibehaltung der hier beschriebenen Auswertung verwendet werden, wenn sichergestellt wird, daß vergleichbare Ergebnisse erzielt werden. Geeignete Verfahren sind bereits veröffentlicht worden.¹⁾

4 Chemikalien

Es sind analysenreine Chemikalien zu verwenden.

- 4.1** Trägergas: Stickstoff, Reinheitsgrad $\geq 99,996\%$ (Volumenanteil)
- 4.2** Standard-Triglyceride²⁾, gesättigt, sowie Cholesterin zur Standardisierung eines Standardmilchfettes nach Abschnitt 6.5.4
- 4.3** Methanol, wasserfrei
- 4.4** n-Hexan
- 4.5** n-Heptan
- 4.6** Toluol
- 4.7** Dimethyldichlorsilan-Lösung: 50 ml Dimethyldichlorsilan werden in 283 ml Toluol gelöst.
- 4.8** Brenngas: Wasserstoff und synthetische Luft
- 4.9** Stationäre Phase, 3% OV-1 auf 125 bis 150 μm (100 bis 120 mesh)²⁾³⁾
- 4.10** 10%ige (Massenanteil) Kakaobutterlösung in n-Heptan

Fortsetzung Seite 2 bis 10

Normenausschuß Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

5 Geräte

Übliche Laboratoriumsgeräte und insbesondere die folgenden:

5.1 Hochtemperaturgaschromatograph

Geeignet für Temperaturen von mindestens 400 bis 450 °C, ausgerüstet mit Flammenionisationsdetektor (FID) und konstantem Massenflußregler für das Trägergas. Brenngas: 30 ml/min H₂, 270 ml/min synthetische Luft.

Aufgrund des großen Trägergasdurchflusses ist vorzugsweise ein Gerät mit einer besonders weiten Gasaustrittsdüse zu verwenden.

ANMERKUNG: Durch die bei der Triglyceridanalytik auftretenden hohen Temperaturen müssen häufig die Glasinserts im FID oder im Injektorsystem gereinigt werden.

Der Gaschromatograph muß mit Septa ausgestattet sein, die hohe Temperaturen aushalten, häufig benutzt werden können und generell sehr wenig "bleeding" aufweisen.²⁾

Die Septa müssen regelmäßig, z.B. nach etwa 100 Einspritzungen oder bei Verschlechterung der Auflösung (siehe Bild 4), gewechselt werden.

5.2 Chromatographiesäule

U-förmige Glassäule (Innendurchmesser 2 mm, Länge 500 mm), die zur Deaktivierung der Glasoberfläche zunächst mit Dimethyldichlorsilan nach Abschnitt 6.1 silanisiert wird.

ANMERKUNG: Geeignet sind auch etwas längere (800 bis 2000 mm Länge), gepackte Säulen. Mit ihnen kann eine geringfügig bessere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erreicht werden. Allerdings weist nach der Inbetriebnahme die stationäre Phase nach einiger Zeit gelegentlich Bruchstellen auf, was wiederum zu schlechteren quantitativen Ergebnissen führen kann. Auch wird die FID-Flamme durch den erforderlichen extrem hohen Trägergasdurchfluß von 75 bis 85 ml/min leicht gelöscht.

5.3 Vorrichtung zur Füllung der Chromatographiesäule (siehe Bild 1)

5.3.1 Kunststoffsäule mit verschraubten Endstücken, versehen mit einer Markierung, um die benötigte Menge stationärer Phase abmessen zu können

5.3.2 Feines Sieb (Maschenweite etwa 100 µm) mit Schraubverschluß, passend zum Verschließen der Glassäule nach Abschnitt 5.2

5.3.3 Deaktivierte, silanisierte Quarzwolle

5.3.4 Vibrator zum gleichmäßigen Verteilen der stationären Phase während des Füllvorganges

5.4 1- bis 3-ml-Extrelut-Fertigsäule⁴⁾ mit Kieselgurfüllung. Diese Säule kann wahlweise zur Extraktion für die MilCHFettgewinnung eingesetzt werden.

5.5 Graphitdichtung 6,4 mm (1/4") mit 6 mm Bohrung

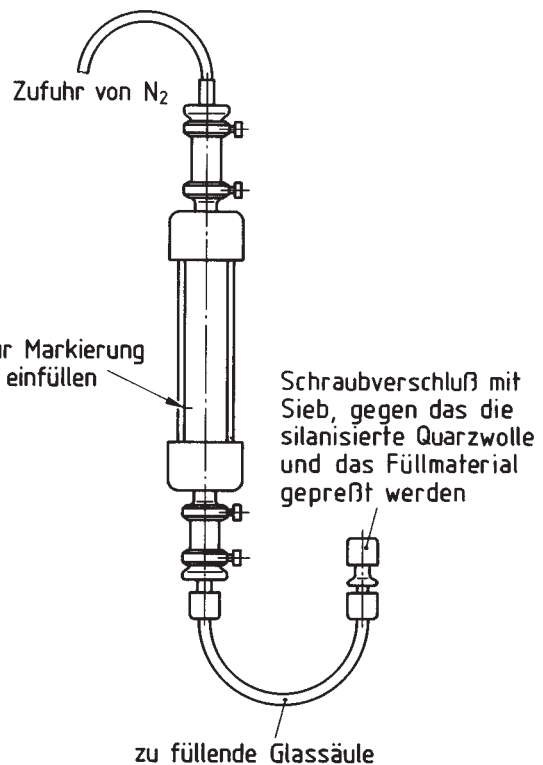


Bild 1: Füllen der Chromatographiesäule

5.6 Geräte für die Silanisierung der Glasoberfläche der Chromatographiesäule nach Abschnitt 6.1

5.6.1 Woulffsche Flasche

5.6.2 Wasserstrahlpumpe

5.7 Wasserbad, einstellbar auf (50 ± 2) °C

5.8 Wärmeschrank, einstellbar auf (50 ± 2) °C und (100 ± 2) °C

5.9 Mikroliterpipette

5.10 5-ml-Meßpipette zum Abmessen von 1,5 ml Methanol

5.11 50-ml-Rundkolben

5.12 Erlenmeyerkolben, Nennvolumen 50 ml

5.13 Trichter

5.14 Feinporiges Filter

5.15 Rotationsverdampfer

5.16 Ampullen, Nennvolumen 1 ml, verschließbar, mit einer Aluminiumkappe mit einem Septum im Inneren

5.17 Injektionsspritze, der Stempel der verwendeten Spritze darf nicht bis in die Nadelspitze reichen

ANMERKUNG: Die Verwendung derartiger Spritzen führt zu einer besseren Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

Um eine Beschädigung des Septums zu vermeiden, sollte in regelmäßigen Abständen eine Überprüfung der Nadelspitze (z. B. mit einem Stereomikroskop) erfolgen.

²⁾ Siehe Seite 1.

⁴⁾ Über Bezugsquellen gibt Auskunft: DIN Bezugsquellen für normgerechte Erzeugnisse im DIN Deutsches Institut für Normung e.V., Burggrafenstraße 6, 10787 Berlin, Postanschrift: 10772 Berlin.

6 Durchführung

6.1 Vorbereitung der Chromatographiesäule (Silanisierung)

Nachdem die Woulffsche Flasche wie in Bild 2 dargestellt mit der Wasserstrahlpumpe verbunden wurde, wird Schlauch 2 in die Lösung nach Abschnitt 4.7 getaucht. Durch Schließen des Hahns wird die Säule gefüllt, und anschließend werden die beiden Schläuche abgenommen.

Die Chromatographiesäule wird an einem Stativ angebracht und unter Zuhilfenahme einer Pipette vollständig mit der Dimethyldichlorsilan-Lösung gefüllt.

Nach 20 bis 30 min wird die Woulffsche Flasche durch eine Saugflasche ersetzt und durch Verbindung mit der Wasserstrahlpumpe die Säule entleert (siehe Bild 3).

6.2 Füllung der Chromatographiesäule

Anschließend wird nacheinander mit 75 ml Toluol und 50 ml Methanol gespült und die entleerte Säule etwa 30 min im Wärmeschrank bei 100 °C getrocknet.

Zum Füllen der Säule wird die in Bild 1 dargestellte Anordnung verwendet.

Die stationäre Phase nach Abschnitt 4.9 wird in die Kunststoffsaule bis zur Markierung eingefüllt.

Das untere Ende der zu füllenden Glassäule wird mit einem etwa 1 cm langen, vorher silanisierten Quarzwolstopfen abgedichtet, der mit einem Stahlstab festgedrückt wird. Anschließend wird das Ende der Säule mit dem Sieb nach Abschnitt 5.3.2 verschlossen.

Das Füllen der Säule mit stationärer Phase erfolgt durch Anlegen eines N_2 -Drucks von 3 bar. Um eine gleich-

mäßige, lückenlose, feste Packung zu erhalten, wird während des Füllvorganges ein Vibrator an der Glassäule hin und her bewegt.

Nach dem Füllen wird in die fertiggepackte Glassäule ein fester Stopfen aus silanisierter Quarzwolle gedrückt, der überstehende Rest abgeschnitten und der Stopfen mit einem Spatel einige mm in die Säule hineingedrückt.

6.3 Vorbereitung der Proben

Zur Probenvorbereitung wird eines der drei folgenden Verfahren verwendet:

6.3.1 Isolierung des Butterfettes aus Butter

5 bis 10 g Butter werden in einem geeigneten Gefäß im Wasserbad nach Abschnitt 5.7 bei 50 °C geschmolzen.

Ein 50-ml-Erlenmeyerkolben und ein Trichter mit eingeletem Filter nach Abschnitt 5.14 werden im Wärmeschrank auf 50 °C erwärmt. Die Fettschicht der geschmolzenen Butterprobe wird mit dem vorgewärmten Gerät filtriert.

Ein derartig gewonnenes Butterfett ist weitgehend phospholipidfrei.

6.3.2 Extraktion der Fettfraktion nach Röse-Gottlieb

Die Extraktion erfolgt entweder nach DIN 10312-1, DIN 10312-2, DIN 10312-3 oder DIN 10312-6.

Bei derart gewonnenem MilCHFett kann infolge von Phospholipiden ein um etwa 0,1 % vergrößerter Cholesterinpeak erhalten werden.

Das mit dem Cholesterin auf 100 eingestellte Triglyceridspektrum wird dadurch nur unwesentlich beeinflusst.

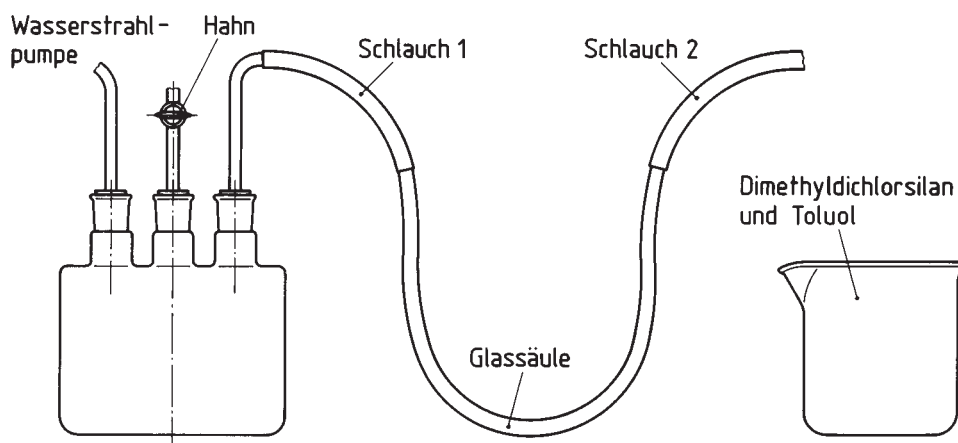


Bild 2: Anordnung für die Silanisierung

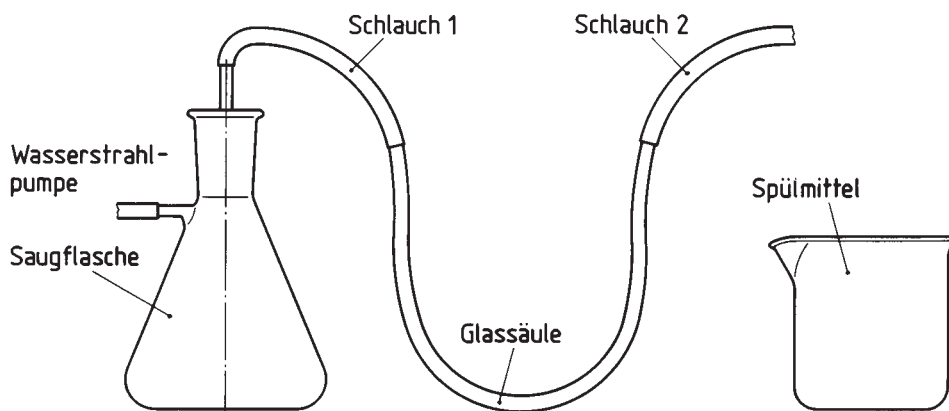


Bild 3: Anordnung für das Spülen