

DIN EN 17517



ICS 65.120

**Futtermittel: Probenahme- und Untersuchungsverfahren –
Bestimmung von mineralölgesättigten Kohlenwasserstoffen (MOSH) und
mineralölaromatischen Kohlenwasserstoffen (MOAH) mit Online-Analyse
durch HPLC-GC-FID;
Deutsche Fassung EN 17517:2021**

Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis –
Determination of mineral oil saturated hydrocarbons (MOSH) and mineral oil aromatic
hydrocarbons (MOAH) with on-line HPLC-GC-FID analysis;
German version EN 17517:2021

Aliments pour animaux: Méthodes d'échantillonnage et d'analyse –
Détermination des hydrocarbures saturés d'huile minérale (MOSH) et des hydrocarbures
aromatiques d'huile minérale (MOAH) par analyse CLHP CG-FID en ligne;
Version allemande EN 17517:2021

Gesamtumfang 44 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 17517:2021) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 327 „Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“, dessen Sekretariat von NEN (die Niederlande) gehalten wird, erarbeitet.

Das zuständige deutsche Gremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-03-03 AA „Futtermittel“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

Für die in diesem Dokument zitierten internationalen Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 5725-2 siehe DIN ISO 5725-2

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN ISO 5725-2, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 2: Grundlegende Methode für Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision eines vereinheitlichten Messverfahrens*

Deutsche Fassung

**Futtermittel: Probenahme- und Untersuchungsverfahren —
Bestimmung von mineralölgesättigten Kohlenwasserstoffen
(MOSH) und mineralölaromatischen Kohlenwasserstoffen
(MOAH) mit Online-Analyse durch HPLC-GC-FID**

Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis —
Determination of mineral oil saturated hydrocarbons
(MOSH) and mineral oil aromatic hydrocarbons (MOAH)
with on-line HPLC-GC-FID analysis

Aliments pour animaux: Méthodes
d'échantillonnage et d'analyse —
Détermination des hydrocarbures saturés
d'huile minérale (MOSH) et des hydrocarbures
aromatiques d'huile minérale (MOAH) par analyse
CLHP GC-FID en ligne

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 2. August 2021 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 CEN-CENELEC-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, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, der Republik Nordmazedonien, Rumänien, Schweden, der Schweiz, Serbien, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, der Türkei, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



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

CEN-CENELEC Management-Zentrum: Rue de la Science 23, B-1040 Brüssel

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Einleitung	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Kurzbeschreibung	6
5 Reagenzien	7
6 Geräte	9
7 Probenahme	11
8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe	11
9 Vorbereitung der Analysenprobe	11
9.1 Fettgewinnung aus der Futterprobe	11
9.2 Verfahren für Fette und Fettextrakte	11
9.3 Blindprobe	12
10 Flüssigchromatographie und Gaschromatographie	13
10.1 Einstellungen für die Flüssigchromatographie	13
10.2 Arbeitsbedingungen für die HPLC	13
10.3 HPLC-GC-Interface	14
10.4 Einstellungen für die Gaschromatographie	15
10.5 Arbeitsbedingungen für die GC	15
10.6 Lösemitteldampfausgang	16
10.7 Peakidentifizierung	16
10.8 Leistungsfähigkeit des HPLC-GC-Systems	16
10.9 Quantitative Bestimmung der aus Mineralöl stammenden Kohlenwasserstoffe	17
11 Präzision	18
11.1 Ringversuch	18
11.2 Wiederholpräzision	18
11.3 Vergleichpräzision	18
12 Untersuchungsbericht	18
Anhang A (informativ) Beispiele für Chromatogramme	20
Anhang B (informativ) Präzisionsdaten	26
Anhang C (informativ) Bestimmung von gesättigten Kohlenwasserstoffen aus Mineralöl – alternatives manuelles Verfahren für die Online-HPLC-GC-FID-Analyse	29
Literaturhinweise	42

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN 17517:2021) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 327 „Futtermittel – Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis April 2022, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis April 2022 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Dieses Dokument wurde im Rahmen eines Normungsauftrages erarbeitet, den die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelsassoziation CEN erteilt haben.

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.

Entsprechend der CEN-CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, die Republik Nordmazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Serbien, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Türkei, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

Einleitung

WARNUNG — Das in diesem Dokument beschriebene Verfahren beinhaltet die Verwendung von Reagenzien, die eine Gefahr für die Gesundheit darstellen. Dieses Dokument erhebt nicht den Anspruch, alle damit verbundenen Sicherheitsprobleme anzusprechen. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders dieses Dokuments, vor der Anwendung dieser Norm geeignete Maßnahmen für den Gesundheitsschutz und die Sicherheit des Personals zu ergreifen und sicherzustellen, dass behördliche und gesetzliche Anforderungen eingehalten werden.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Verfahren zur Bestimmung von gesättigten und aromatischen Kohlenwasserstoffen (von C10 bis C50) in Futter fest. Das Verfahren wurde im Ringversuch mit Online-HPLC-GC-FID validiert – siehe [1], [2] und [3]. Dieses Verfahren ist nicht für die Anwendung auf andere Matrices vorgesehen.

Das Verfahren kann für die Analyse von gesättigten Mineralöl-Kohlenwasserstoffen (MOSH) und/oder aromatischen Mineralöl-Kohlenwasserstoffen (MOAH) verwendet werden.

Das Verfahren ist anwendbar für Futtermittel, insbesondere Pflanzenöle und andere fettreiche Futtermittel, Mischfuttermittel und Vormischungen. Es ist nicht anwendbar auf Zusatzstoffe oder Deodestillate.

ANMERKUNG 1 Das Verfahren ist nicht für gekapselte Matrizen ausgelegt.

Das Verfahren wurde in einem Ringversuch sowohl an natürlich kontaminierten als auch an angereicherten Proben (Vormischung, Sojabohnenmehl, Sonnenblumenkerne, Hühnerfutter, Schweinefutter, Pflanzenöl) in Bereichen von 3 mg/kg bis 286 mg/kg für MOSH und von 1 mg/kg bis 16 mg/kg für MOAH getestet.

Nach den Ringversuchsergebnissen hat sich das Verfahren bei Massenkonzentrationen an MOSH und MOAH von jeweils über 10 mg/kg als geeignet erwiesen. Das Verfahren wurde jedoch während der gemeinsamen Studie für die Probe einer Vormischung wegen zu geringer MOSH- und MOAH-Konzentrationen nicht vollständig validiert. Außerdem wurde das Verfahren während der gemeinsamen Studie für die Sonnenblumenkern-Probe wegen einer zu geringen MOAH-Konzentration nicht vollständig validiert.

ANMERKUNG 2 Die Schlussfolgerungen in Bezug auf MOAH basieren auf 4 Analyt-/Matrix-Kombinationen, während das IUPAC-Protokoll [4] mindestens 5 erwartet.

Wenn Störungen durch natürliche Quellen vermutet werden, kann die fossile Herkunft der MOSH- und MOAH-Fraktion durch Untersuchung des chromatographischen Profils mit GC-MS verifiziert werden.

Für die Bestimmung von MOSH und MOAH in essbaren Fetten und Ölen steht auch eine andere Norm zur Verfügung: EN 16995. Weitere Informationen siehe [5].

In Anhang C wird ein manuelles Alternativverfahren zur Online-HPLC-GC-FID-Analyse vorgeschlagen, das als Screening-Verfahren für die Bestimmung von MOSH verwendet werden kann.

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).

EN ISO 6498, *Futtermittel — Leitfaden für die Probenvorbereitung (ISO 6498)*

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 Mineralöl-Kohlenwasserstoffe
MOSH, en: mineral oil saturated hydrocarbons
paraffinische (offenkettige, üblicherweise verzweigte) und naphthenische (ringförmige, alkylierte) Kohlenwasserstoffe

3.2
aromatische Mineralöl-Kohlenwasserstoffe
MOAH, en: mineral oil aromatic hydrocarbons
aromatische überwiegend alkylierte Kohlenwasserstoffe

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 können

4 Kurzbeschreibung

Das fetthaltige Material wird unter Verwendung organischer Lösemittel aus der Futtermittelprobe extrahiert. Nach der Konzentration eines Teils des Lösemittels wird das Extrakt einem Epoxidierungsschritt unterzogen. Die MOSH- und MOAH-Fractionen werden mit einem HPLC-GC-FID-System isoliert und aufgetrennt. Die MOSH- und MOAH-Fractionen werden auf einer Kieselgelsäule mit einem *n*-Hexan/Dichlormethan-Gradienten getrennt und jeweils als 450-µl-Fractionen mit einem Y-Interface [6] in den GC transferiert, während die Triglyceride auf der HPLC-Säule zurückgehalten werden. Lösemitteldämpfe werden über einen Lösemitteldampfausgang, der sich zwischen der unbelegten Vorsäule und der GC-Trennsäule befindet, abgeführt. Die flüchtigen Bestandteile werden unter Anwendung einer teilweise gleichzeitigen Eluentenverdampfung durch „solvent trapping“ zurückgehalten. Schwerflüchtige Bestandteile werden über die gesamte Länge der gefluteten unbelegten Vorsäule verteilt und mittels „Retention-Gap-Technik“ [2] refokussiert.

Die dem Mineralöl entsprechende Peakfläche wird nach Abzug der aufsitzenden Peaks durch *n*-Alkane (natürlich vorkommende Kohlenwasserstoffe), Terpene, Squalen und dessen Isomerisierungsprodukte, Sterine und Olefine mit Carotinoidstruktur bestimmt. MOSH und MOAH werden über einen internen Standard quantifiziert, der vor der Untersuchung hinzugefügt wird. Verifizierungsstandards werden hinzugefügt, um die korrekte HPLC-Fraktionierung und die GC-Transferbedingungen zu überwachen.

Epoxidierung ist als Aufreinigungsschritt zur quantitativen Bestimmung von MOAH erforderlich. Dieser Aufreinigungsschritt ermöglicht das Entfernen von Olefinen wie Squalen (z. B. Olivenöl, Palmöl), die in der MOAH-Fraktion eluieren und bei der quantitativen Bestimmung stören. Durch Epoxidierung werden auch bestimmte Olefine entfernt, die mit der MOSH-Fraktion koeluieren, daher darf die Epoxidierung auch als Aufreinigungsschritt für die MOSH-Fraktion verwendet werden. Obwohl der Epoxidierungsschritt nicht vollständig quantitativ ist und die Effizienz von der Probe abhängen kann, ist dies der beste Kompromiss zur Entfernung von Olefinen. Je nach Probe kann diese Reaktion die Epoxidierung eines Teils der MOAH oder eine unvollständige Abtrennung der störenden Olefine bewirken.

5 Reagenzien

WARNUNG — Das in diesem Dokument beschriebene Verfahren beinhaltet die Verwendung von Reagenzien, die eine Gefahr für die Gesundheit darstellen. Dieses Dokument erhebt nicht den Anspruch, alle damit verbundenen Sicherheitsprobleme anzusprechen. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders dieses Dokuments, vor der Anwendung dieser Norm geeignete Maßnahmen für den Gesundheitsschutz und die Sicherheit des Personals zu ergreifen und sicherzustellen, dass behördliche und gesetzliche Anforderungen eingehalten werden.

Sofern nicht anders angegeben, werden ausschließlich Reagenzien von anerkannter Analysequalität verwendet.

5.1 Entmineralisiertes Wasser, in einer Glasflasche gelagert

5.2 *n*-Hexan, für organische Spurenanalytik, für Pestizidrückstandsanalytik

Die Reinheit von *n*-Hexan kann überprüft werden, indem 30 ml *n*-Hexan mit 25 µl der internen Standardlösung (5.16) und 2 Tropfen Keeper (5.27) versetzt und im Rotationsverdampfer eingedunstet werden. Der Rückstand wird in 0,2 ml *n*-Hexan gelöst, und 50 µl von dieser Lösung werden mit Online-HPLC-GC-FID (6.10) untersucht. Während der Verdampfungsstufe ist darauf zu achten, dass der Rückstand nicht bis zur Trockne eingedunstet wird, damit keine flüchtigen Kohlenwasserstoffe verloren gehen. Die Signalintensität für den eingedunsteten Rückstand sollte ein Zehntel der bei der Bestimmungsgrenze erhaltenen Signalintensität nicht überschreiten.

5.3 Toluol

5.4 1,1,2-Trichlorethan

5.5 Perylen (Per), Reinheit $\geq 99 \%$

5.6 α -Cholestan (Cho), Reinheit $\geq 97 \%$

5.7 *n*-Undecan (*n*-C11), Reinheit $\geq 98 \%$

5.8 *n*-Tridecan (*n*-C13), Reinheit $\geq 97 \%$

5.9 Tri-tert-butylbenzol (TBB)

5.10 Bicyclohexyl (CyCy), Reinheit $\geq 99 \%$

5.11 1-Methylnaphthalin (1-MN), Reinheit $\geq 95 \%$

5.12 2-Methylnaphthalin (2-MN), Reinheit $\geq 97 \%$

5.13 Pentylbenzol (5-PB), Reinheit $\geq 96 \%$

5.14 Stammlösungen, mit einer Massenkonzentration von $\rho = 10 \text{ mg/ml}$

Zur Herstellung einzelner Stammlösungen werden jeweils 100 mg *n*-C11 (5.7), *n*-C13 (5.8), TBB (5.9), CyCy (5.10), 1-MN (5.11), 2-MN (5.12) und 5-PB (5.13) auf 1 mg in einen 10-ml-Messkolben eingewogen und bis zur Marke mit 1,1,2-Trichlorethan (5.4) oder Toluol (5.3) aufgefüllt. Die Lösungen werden bei Raumtemperatur aufbewahrt. Wenn sich bei der Lagerung Kristalle bilden, werden diese durch Erwärmung der Lösung wieder vollständig aufgelöst.

5.15 Interne Standardlösung 1 (ISTD1)

12 mg Per (5.5) und Cho (5.6) werden auf 0,5 mg in einen 20-ml-Messkolben (6.21) eingewogen und mit 600 µl jeder Stammlösung (5.14) versetzt, mit Ausnahme von *n*-C13, von der 300 µl hinzugefügt werden. Der Messkolben wird mit 1,1,2-Trichlorethan (5.4) oder Toluol (5.3) bis auf 20 ml aufgefüllt. Die sich daraus ergebenden Massenkonzentrationen sind für *n*-C13: $\rho = 150 \mu\text{g/ml}$, für *n*-C11, TBB, CyCy, 1-MN, 2-MN und 5-PB: $\rho = 300 \mu\text{g/ml}$ und für Per, Cho: $\rho = 600 \mu\text{g/ml}$.

ANMERKUNG Diese Mischung interner Standards ist ein handelsüblich erhältliches, gebrauchsfertiges Produkt.¹

5.16 Interne Standardlösung 2 (ISTD2)

Die ISTD1-Lösungen werden um den Faktor 10 verdünnt, z. B. wird 1 ml mit *n*-Hexan (5.2) auf 10 ml aufgefüllt. Die sich daraus ergebenden Massenkonzentrationen sind für *n*-C13: $\rho = 15 \mu\text{g/ml}$, für *n*-C11, TBB, CyCy, 1-MN, 2-MN und 5-PB: $\rho = 30 \mu\text{g/ml}$ und für Per, Cho: $\rho = 60 \mu\text{g/ml}$.

5.17 Chlorperbenzoesäure (CPBA), Reinheit 70 % bis 75%

5.18 CPBA-Lösung, $\rho = 0,2 \text{ g/ml}$ in reinem Ethanol

Zum Beispiel 5 g CPBA (5.17) in 25 ml reinem Ethanol (5.22). Die Lösung kann bis zu einer Woche verwendet werden.

5.19 Trägergas für die Gaschromatographie, vorzugsweise Wasserstoff, Reinheit $\geq 99,995 \%$

5.20 Hilfsgase für den Flammenionisationsdetektor, Wasserstoff, Luft und Stickstoff, geeignet für Gaschromatographie

5.21 Alkan-Standardgemisch C10 bis C40, Lösung gleicher Konzentration in einem apolaren Lösemittel, $\rho = 1 \mu\text{g/ml}$

5.22 Ethanol, rein

ANMERKUNG Die Reinheit des Ethanols kann durch Zugabe von 25 µl interner Standardlösung (5.16) zu 50 ml Ethanol und 2 Tropfen Keeper (5.27) und anschließend Einengen im Rotationsverdampfer überprüft werden. Der Rückstand wird in 0,2 ml *n*-Hexan gelöst, und 50 µl von der Lösung werden mit Online-HPLC-GC-FID (6.10) untersucht.

5.23 *n*-Pentacontan (C50), Reinheit $\geq 98 \%$

5.24 *n*-Pentacontan(C50)-Lösung in Toluol, ρ etwa $10 \mu\text{g/ml}$

2 mg C50 (5.23) werden in einen 20-ml-Messkolben (6.21) eingewogen und bis zur Marke mit Toluol (5.3) aufgefüllt. 1 ml dieser Lösung wird ein zweites Mal in einem 10-ml-Messkolben (6.21) verdünnt. Die Lösungen werden bei Raumtemperatur aufbewahrt.

ANMERKUNG 1 Pentacontan ist in Toluol bei Raumtemperatur nur eingeschränkt löslich. Allerdings braucht die Konzentration der Lösung von Pentacontan nicht präzise sein, da sie nur zur Anzeige des Integrationsbereiches des Mineralölpeaks verwendet wird.

1 Restek Corp. ®, Cat.# 31070 ist ein Beispiel eines geeigneten handelsüblichen Produkts. Diese Angabe dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN. Andere Produkte können verwendet werden, wenn die Ergebnisse vergleichbar sind.

ANMERKUNG 2 Es ist auch möglich, ein handelsübliches *n*-Alkan-Gemisch von C12 bis C60, das *n*-Pentacontan enthält, zu verwenden.²

5.25 Natriumcarbonat Lösung, $\rho = 0,1 \text{ g/ml}$ in Wasser (5.1)

5.26 Dichlormethan (DCM), für organische Spurenanalytik, Reinheit $\geq 99 \%$

Die Reinheit von DCM kann überprüft werden, indem 50 ml DCM mit 25 μl der internen Standardlösung (5.16) und 2 Tropfen Keeper (5.27) versetzt und im Rotationsverdampfer eingengt werden. Der Rückstand wird in 0,2 ml *n*-Hexan gelöst, und 50 μl von dieser Lösung werden mit Online-HPLC-GC-FID (6.10) untersucht. Während der Verdampfungsstufe ist darauf zu achten, dass der Rückstand nicht bis zur Trockne eingedampft wird, um den Verlust von flüchtigen Kohlenwasserstoffen zu vermeiden. Die Signalintensität für den eingedampften Rückstand sollte ein Fünftel der bei der Bestimmungsgrenze erhaltenen Signalintensität nicht überschreiten.

5.27 Keeper-Lösemittel

Der Keeper ist ein Lösemittel, das gar nicht oder während der Verdampfungsstufe nur in geringerem Maß verdampft, z. B. Bis(2-ethylhexyl)maleat. Ein Keeper wird verwendet, um die Rückgewinnung von flüchtigen Verbindungen zu verbessern.

6 Geräte

WICHTIG — Die für die Bestimmung verwendeten Glasgeräte müssen vor Gebrauch gründlich gereinigt und mit *n*-Hexan (5.2) gespült werden, so dass sie frei von Verunreinigungen sind.

Übliche Laborgeräte und insbesondere die folgenden. Glasgeräte müssen vor Gebrauch gründlich gereinigt und mit *n*-Hexan (5.2) gespült oder in einem Ofen ausgeheizt werden, so dass sie frei von Verunreinigungen sind.

6.1 Mühle mit Rotor aus nichtrostendem Stahl oder Kugelmühle, geeignet zum Erreichen einer Partikelgröße von $\leq 1 \text{ mm}$

6.2 Magnetrührwerk

6.3 Magnetrührstäbe

6.4 Analysenwaage, ablesbar auf 0,000 1 g

6.5 Rundkolben, 250 ml Nennvolumen

6.6 Glasfläschchen mit Schraubkappen, Nennvolumen 15 ml und 40 ml

6.7 Zentrifuge mit Zentrifugenröhrchen

2 ASTM® D5442 C12-C60 Qualitative Retention Time Mix ist beispielsweise erhältlich bei Supelco® Cat.# 500623. Dies ist ein Beispiel eines geeigneten handelsüblichen Produkts. Diese Angabe dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN. Andere Produkte können verwendet werden, wenn die Ergebnisse vergleichbar sind.

6.8 Automatischer Verdampfer (optional)³

6.9 Probengefäße aus Glas, Nennvolumen 2 ml

6.10 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatograph, gekoppelt mit einem Gaschromatographen und Flammenionisationsdetektor (HPLC-GC-FID)

6.11 Datenerfassungssystem, mit der Möglichkeit der manuellen Integration

6.12 LC-Säule, 5 µm (250 mm × 2 mm Innendurchmesser [i.d., en: inner diameter]) oder gleichwertig

Die Kieselgel-Säule muss eine Kapazität haben, um 20 mg Fett aufnehmen zu können.⁴

6.13 Unbelegte Vorsäule, 10 m × 0,53 mm oder gleichwertig⁵

6.14 Kapillarsäule 1, geeignet für Temperaturen bis 350 °C

Die Säule sollte folgende Eigenschaften haben: 100 % Dimethylpolysiloxan oder 95 % Dimethyl-/5 % Phenylmethylpolysiloxan stationäre Phase, Länge 15 m, Innendurchmesser 0,32 mm oder 0,25 mm und Filmdicke 0,10 µm bis 0,15 µm oder gleichwertig.

6.15 Kapillarsäule 2, vom Transferventil zum ersten Y-Stück, mit Methyl-Silikon deaktiviertes Quarzglas (FS, en: fused silica) (Länge 1 m, Außendurchmesser (o.d., en: outside diameter) 0,27 mm, Innendurchmesser (i.d.) 0,1 mm)

6.16 Kapillarsäule 3, für Trägergas Wasserstoff, FS-Methyl-Silikon (Länge 1 m, o.d. 360 µm, i.d. 25 µm)

6.17 Kapillarsäule 4, für Lösemitteldampfausgang, FS Methyl-Silikon (Länge 1 m, o.d. 0,68 mm, i.d. 0,53 mm)

Die in 6.15, 6.16 und 6.17 angegebenen Säulen haben sich für die Untersuchung als geeignet erwiesen. Diese Säulen können jedoch in Übereinstimmung mit den Eigenschaften des HPLC-GC-Geräts und den Untersuchungsbedingungen angepasst werden.

6.18 Restriktionskapillarsäule, Transferventil und Lösemitteldampfausgang, FS unbelegt (Länge 1 m, o.d. 360 µm, i.d. 50 µm)

6.19 Mikrospritze, Kapazität 5 µl bis 100 µl, geeignet zur Injektion in der Flüssigchromatographie

6.20 Pasteurpipette, Glas

Die Verwendung von Pasteurpipetten aus Kunststoff und Polyethylenfolie muss vermieden werden.

3 MicroDancer®, IR-Dancer (z. B. Zinser) oder Syncore® Analyst (Büchi) sind Beispiele für geeignete handelsübliche Produkte. Diese Angaben dienen nur der Information der Anwender dieses Dokuments und stellen keine Anerkennung dieser Produkte durch CEN dar. Andere Produkte können verwendet werden, wenn die Ergebnisse vergleichbar sind.

4 LiChrospher® Si 60 ist ein Beispiel eines geeigneten handelsüblichen Produkts. Diese Angabe dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN. Andere Produkte können verwendet werden, wenn die Ergebnisse vergleichbar sind.

5 Hydroguard® MXT® ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN. Andere Produkte können verwendet werden, wenn die Ergebnisse vergleichbar sind.

6.21 Messkolben, verschiedene Größen

7 Probenahme

Die Probe sollte tatsächlich repräsentativ sein und während des Transports oder der Lagerung nicht beschädigt oder verändert worden sein.

Um weitere Verunreinigungen zu verhindern, sollten Proben in Glasflaschen oder Aluminiumfolie verpackt sein. Verpackungen aus Kunststoff oder Papier sind ungeeignet.

Die Probenahme ist nicht Bestandteil des in diesem Dokument festgelegten Verfahrens. Ein empfohlenes Probenahmeverfahren ist in EN ISO 6497 [7] angegeben.

8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe

Die Untersuchungsprobe wird nach EN ISO 6498 vorbereitet.

Die Laborprobe (üblicherweise 50 g) wird in der Mühle (6.1) auf eine Partikelgröße von mindestens 1 mm zerkleinert, um repräsentative Daten sicherzustellen. Die Probe wird gründlich gemischt.

9 Vorbereitung der Analysenprobe

9.1 Fettgewinnung aus der Futterprobe

9.1.1 Die Gewinnung von fetthaltigem Material aus Proben mit einem Fettgehalt unter 30 %

Es werden 5 g der gemahlenen Probe in einen 250-ml-Rundkolben (6.5) eingewogen, ein Magnetrührstab (6.3) wird hinzugefügt. Der Probe werden 500 µl ISTD2 (5.16) und 100 ml *n*-Hexan (5.2) hinzugefügt, und dann wird 1 h mit einem Magnetrührer (6.2) gemischt.

Von der Lösemittelphase werden 20 ml in ein 40-ml-Glasfläschchen (6.6) übertragen und mit 5 ml entmineralisiertem Wasser (5.1) gewaschen. Es wird mit einer Drehzahl von 2 500 min⁻¹ für 2 min zentrifugiert und 10 ml des Probenextrakts werden in ein 15-ml-Glasfläschchen (6.6) übertragen und das Lösemittel wird unter einem Stickstoffstrom auf 1 ml eingeengt (Triglyceride aus der Probe wirken als Keeper), entweder unter Verwendung eines Wasserbads bei 35 °C oder eines automatischen Verdampfers (6.8).

9.1.2 Gewinnung von fetthaltigem Material aus einer Probe mit einem Fettgehalt über 30 %

Es werden 2 g der gemahlenen Probe in einen 250-ml-Rundkolben (6.5) eingewogen, ein Magnetrührstab (6.3) wird hinzugefügt. Der Probe werden 250 µl ISTD2 (5.16) und 100 ml *n*-Hexan (5.2) hinzugefügt, und dann wird 1 h mit einem Magnetrührer (6.2) gemischt. Von der Lösemittelphase werden 30 ml in ein 40-ml-Glasfläschchen (6.6) übertragen und mit 5 ml entmineralisiertem Wasser (5.1) gewaschen. Es wird mit einer Drehzahl von 2 500 min⁻¹ für 2 min zentrifugiert und 20 ml des Probenextrakts werden in ein 40-ml-Glasfläschchen (6.6) übertragen und das Lösemittel wird unter einem Stickstoffstrom auf 1 ml eingeengt (Triglyceride aus der Probe wirken als Keeper), entweder unter Verwendung eines Wasserbads bei 35 °C oder eines automatischen Verdampfers (6.8).

9.2 Verfahren für Fette und Fettextrakte

9.2.1 Verfahren für flüssige und feste Fette

300 mg Probe werden auf 1 mg in ein 10-ml-Glasfläschchen eingewogen, mit 600 µl *n*-Hexan aufgefüllt und mit 50 µl ISTD2 (5.16) versetzt. Das Fläschchen wird geschüttelt.

Die Menge der zugegebenen internen Standards darf erhöht werden, um, falls erforderlich, die Auswirkungen der Matrixstörungen zu reduzieren.

Die Menge der zugegebenen internen Standards darf verringert werden, falls niedrige Konzentrationen gemessen werden müssen.

Es werden 500 µl ethanolische CPBA-Lösung (5.18) hinzugefügt, und das Glasfläschchen wird in ein Rührwerk gegeben, um für 15 min mit einer Drehzahl von 1 800 min⁻¹ bei Raumtemperatur geschüttelt zu werden. Sofort werden 3 ml Natriumcarbonatlösung (5.25) hinzugefügt, die Mischung wird 2 min geschüttelt und dann 2 min mit einer Drehzahl von 2 500 min⁻¹ zentrifugiert.

ANMERKUNG Die gemeinsame Studie wurde im Jahr 2018 durchgeführt. Daher entspricht das Epoxidationsverfahren nicht dem Verfahren, das während des Roundtable-Workshops zur Bestimmung von MOAH in Säuglingsnahrung vorgeschlagen wurde [11].

Von der Hexanphase werden 500 µl in ein Autosampler-Fläschchen übertragen. Höchstens 50 µl werden in die HPLC injiziert.

Je nach Kontaminationsgrad darf das Injektionsvolumen zur Vermeidung von überladenen Chromatogrammen verändert werden.

9.2.2 Verfahren für gewonnene Fette

Zu dem Probenextrakt werden 500 µl ethanolische CPBA-Lösung (5.18) hinzugefügt, die im Fettgewinnungsschritt (9.1) erhalten wurden, und das Fläschchen wird in ein Rührwerk gegeben, um es für 15 min mit einer Drehzahl von 1 800 min⁻¹ bei Raumtemperatur zu schütteln. Sofort werden 3 ml Natriumcarbonatlösung (5.25) hinzugefügt, die Mischung wird 2 min geschüttelt und dann für 2 min mit einer Drehzahl von 2 500 min⁻¹ zentrifugiert.

ANMERKUNG Die gemeinsame Studie wurde im Jahr 2018 durchgeführt. Daher entspricht das Epoxidationsverfahren nicht dem, das während des Roundtable-Workshops zur Bestimmung von MOAH in Säuglingsnahrung vorgeschlagen wurde [11].

Von der Hexanphase werden 500 µl in ein Autosampler-Fläschchen übertragen. Höchstens 50 µl werden in die HPLC injiziert.

Je nach Kontaminationsgrad darf das Injektionsvolumen zur Vermeidung von überladenen Chromatogrammen verändert werden.

9.3 Blindprobe

Eine verfahrensbezogene Blindprobe, die den Fettgewinnungsschritt umfasst (von 9.1.2), sollte analysiert werden, um die Reinheit der Reagenzien zu prüfen, aber auch, um andere mögliche Kontaminationsquellen zu ermitteln, wie z. B. die Glasgeräte und das Analysegerät.

Der Mineralölgehalt der verfahrensbezogenen Blindprobe darf den Wert von 3 mg/kg Fett nicht überschreiten, wenn man von einer Prüfmenge ausgeht, die 5 g der Probe entspricht. Wenn dieser Wert überschritten wird, muss die Kontaminationsquelle identifiziert und eliminiert werden.

Ergebnisse dürfen nicht durch Ableitung des Blindprobengehalts korrigiert werden.