

DIN EN ISO 16958



ICS 67.100.10

**Milch, Milcherzeugnisse, Säuglingsnahrung und Nahrungsergänzungsmittel
für Erwachsene –
Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung –
Verfahren mit Kapillargaschromatographie (ISO 16958:2015);
Deutsche Fassung EN ISO 16958:2020**

Milk, milk products, infant formula and adult nutritionals –
Determination of fatty acids composition –
Capillary gas chromatographic method (ISO 16958:2015);
German version EN ISO 16958:2020

Lait, produits laitiers, formules infantiles et produits nutritionnels pour adultes –
Détermination de la composition en acides gras –
Méthode de chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire (ISO 16958:2015);
Version allemande EN ISO 16958:2020

Gesamtumfang 64 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Der Text von ISO 16958 | IDF 231:2015 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und als EN ISO 16958 | IDF 231:2020 durch das Technische Komitee CEN/TC 302 „Milch und Milcherzeugnisse — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ übernommen, dessen Sekretariat von NEN (Niederlande) gehalten wird.

Für die deutsche Mitarbeit ist der Arbeitsausschuss NA 057-05-13 AA „Milch und Milcherzeugnisse — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) verantwortlich.

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

ISO 707 IDF 50	siehe	DIN EN ISO 707
ISO 1042	siehe	DIN EN ISO 1042
ISO 1211 IDF 1	siehe	DIN EN ISO 1211
ISO 1735 IDF 5	siehe	DIN EN ISO 1735
ISO 1737 IDF 13	siehe	DIN EN ISO 1737
ISO 5725-1	siehe	DIN ISO 5725-1
ISO 5725-2	siehe	DIN ISO 5725-2
ISO 8381 IDF 123	siehe	DIN EN ISO 8381

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 707, *Milch und Milcherzeugnisse — Leitfaden zur Probenahme*

DIN EN ISO 1042, *Laborgeräte aus Glas — Meßkolben*

DIN EN ISO 1211, *Milch — Bestimmung des Fettgehaltes — Gravimetrisches Verfahren (Referenzverfahren)*

DIN EN ISO 1735, *Käse und Schmelzkäse — Bestimmung des Fettgehaltes — Gravimetrisches Verfahren (Referenzverfahren)*

DIN EN ISO 1737, *Kondensmilch und gezuckerte Kondensmilch — Bestimmung des Fettgehaltes — Gravimetrisches Verfahren (Referenzverfahren)*

DIN EN ISO 8381, *Säuglingsnahrung auf Milchbasis — Bestimmung des Fettgehaltes — Gravimetrisches Verfahren (Referenzverfahren)*

DIN ISO 5725-1, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Meßverfahren und Meßergebnissen — Teil 1: Allgemeine Grundlagen und Begriffe*

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

— Leerseite —

Deutsche Fassung

Milch, Milcherzeugnisse, Säuglingsnahrung und
Nahrungsergänzungsmittel für Erwachsene —
Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung —
Verfahren mit Kapillargaschromatographie
(ISO 16958:2015)

Milk, milk products, infant formula and adult
nutritionals —
Determination of fatty acids composition —
Capillary gas chromatographic method
(ISO 16958:2015)

Lait, produits laitiers, formules infantiles et produits
nutritionnels pour adultes —
Détermination de la composition en acides gras —
Méthode de chromatographie en phase gazeuse sur
colonne capillaire
(ISO 16958:2015)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 10. Mai 2020 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
Vorwort	4
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	7
4 Kurzbeschreibung	7
5 Reagenzien	7
6 Prüfeinrichtung	12
7 Probenahme	15
8 Vorbereitung der Prüfprobe	15
8.1 Flüssige und pulverförmige Milch und Säuglingsnahrung mit einem Fettgehalt $\geq 1,5$ % m/m	15
8.2 Flüssige und pulverförmige Milch und Säuglingsnahrung mit einem Fettgehalt $< 1,5$ % m/m	15
8.3 Käse	15
9 Durchführung	15
9.1 Prüfteilprobe	15
9.2 Quantitative Bestimmung	16
9.2.1 Bestimmung der Responsfaktoren	16
9.2.2 Bestimmung der Prüfteilprobe	16
9.2.3 Fettsäurenidentifizierung	17
10 Berechnung und Angabe der Ergebnisse	19
10.1 Berechnung	19
10.1.1 Berechnung des Responsfaktors	19
10.1.2 Fettsäuren im Erzeugnis	19
10.1.3 Fettsäuren im gesamten Fett	20
10.1.4 Summe der Fettsäurenklasse oder -gruppe in 100 g des Erzeugnisses	20
10.1.5 Summe der Fettsäurenklasse oder -gruppe in 100 g Fett	21
10.1.6 Umesterungsleistung	21
10.2 Angabe der Ergebnisse	22
11 Präzision	22
11.1 Ringversuch	22
11.2 Wiederholpräzision	22
11.3 Vergleichpräzision	22
11.4 Nachweisgrenze	22
11.5 Quantifizierungsgrenze	22
12 Prüfbericht	23
Anhang A (normativ) Fettsäuregruppen oder -klassen und einzelne Fettsäuren	24
Anhang B (informativ) Beispiele für die Analyse mittels Gas-Flüssigkeits-Chromatographie	28
Anhang C (informativ) Ergebnisse eines Ringversuchs	38
Literaturhinweise	60

Europäisches Vorwort

Der Text von ISO 16958:2015 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und als EN ISO 16958:2020 durch das Technische Komitee CEN/TC 302 „Milch und Milcherzeugnisse — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ übernommen, 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 Dezember 2020, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Dezember 2020 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.

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.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 16958:2015 wurde von CEN als EN ISO 16958:2020 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-Direktiven, 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-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 erhaltenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname dient nur zur Unterrichtung der Anwender und bedeutet keine Anerkennung.

Für eine Erläuterung 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 Foreword – Supplementary Information (www.iso.org/iso/foreword.html).

Die für dieses Dokument verantwortlichen Komitees sind ISO/TC 34, *Food products*, Unterkomitee SC 5, *Milk and milk products* und die International Dairy Federation (IDF) in Zusammenarbeit mit AOAC INTERNATIONAL. Es wird von ISO und IDF gemeinsam und gesondert durch AOAC INTERNATIONAL veröffentlicht. Das in dieser Internationalen Norm beschriebene Verfahren ist dem amtlichen Verfahren der AOAC „Official Method 2012.13: *Determination of labeled fatty acids content in milk products and infant formula*“ gleichwertig.

IDF (die **International Dairy Federation**) ist eine gemeinnützige Privatwirtschaftsorganisation, die die Interessen diverser interessierter Parteien der Milchwirtschaft weltweit vertritt. Die Mitglieder der IDF sind in Nationalen Komitees organisiert, bei denen es sich um nationale Verbände von Vertretern der in der Milchwirtschaft tätigen nationalen Interessengruppen, einschließlich Milchbauern, milchverarbeitender Industrie, Milcherzeugnislieferern, Wissenschaftlern und Regierungen/Lebensmittelüberwachungsbehörden, handelt.

ISO und IDF arbeiten in allen Angelegenheiten der Normung zu den Analyse- und Probenahmeverfahren für Milch und Milcherzeugnisse eng zusammen. ISO und IDF veröffentlichen seit 2001 ihre Internationalen Normen gemeinsam unter Verwendung der Logos und Bezugsnummern beider Organisationen.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. IDF 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 erhaltenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname dient nur zur Unterrichtung der Anwender und bedeutet keine Anerkennung.

ISO 16958 | IDF 231 wurde vom IDF Standing Committee on *Analytical Methods for Composition* und vom Technischen Komitee ISO/TC 34, *Food products*, Unterkomitee SC 5, *Milk and milk products* (ISO/TC 34/SC 5) in Zusammenarbeit mit AOAC INTERNATIONAL erarbeitet. Es wird von ISO und IDF gemeinsam und gesondert von AOAC INTERNATIONAL veröffentlicht. Das in dieser Internationalen Norm beschriebene Verfahren ist dem amtlichen Verfahren der AOAC „Official Method 2012.13: *Determination of labeled fatty acids content in milk products and infant formula*“ gleichwertig.

Sämtliche Arbeiten wurden von der ISO/IDF-Projektgruppe C11 des Standing Committee on *Analytical Methods for Composition* unter Federführung ihres Projektleiters, Herrn Pierre-Alain Golay (CH), durchgeführt.

1 Anwendungsbereich

Diese Internationale Norm legt ein Verfahren zur Quantifizierung von einzelnen und/oder allen Fettsäuren im Profil von Milch, Milcherzeugnissen, Säuglingsnahrung und Nahrungsergänzungsmitteln für Erwachsene fest, die Milchfett und/oder pflanzliche Öle enthalten, gegebenenfalls ergänzt um Öle, die reich an langkettigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren (LC-PUFA, en: long chain polyunsaturated fatty acids) sind. Dazu gehören auch Gruppen von Fettsäuren, die häufig auf dem Etikett angegeben werden (d. h. *trans*-Fettsäuren [TFA, en: *trans* fatty acids], gesättigte Fettsäuren [SFA, en: saturated fatty acids], einfach ungesättigte Fettsäuren [MUFA, en: monounsaturated fatty acids], mehrfach ungesättigte Fettsäuren [PUFA, en: polyunsaturated fatty acids], Omega-3-, Omega-6- und Omega-9-Fettsäuren), und/oder einzelne Fettsäuren (d. h. Linolsäure [LA, en: linoleic acid], α -Linolensäure [ALA, en: α -linolenic acid], Arachidonsäure [ARA, en: arachidonic acid], Eicosapentaensäure [EPA, en: eicosapentaenoic acid] und Docosahexaensäure [DHA, en: docosahexaenoic acid]).

Die Bestimmung erfolgt durch direkte Umesterung in Lebensmittelmatrizes ohne vorherige Fettextraktion und ist daher auf flüssige Proben oder auf mit Wasser wiederaufbereitete Pulverproben mit einem Gesamtfettgehalt $\geq 1,5$ % m/m anwendbar.

Nach einer vorab erfolgten Fettextraktion unter Anwendung der in Abschnitt 2 angegebenen Verfahren kann das aus Produkten mit einem Fettgehalt von weniger als 1,5 % m/m extrahierte Fett nach demselben Verfahren analysiert werden. Milcherzeugnisse, wie z. B. Weich- oder Hartkäse mit einem Säuregrad ≤ 1 mmol/100 g Fett, können nach einer vorab erfolgten Fettextraktion unter Anwendung der in Abschnitt 2 angegebenen Verfahren analysiert werden. Im Falle von Produkten, die um aus Fischöl oder Algen stammende PUFA ergänzt oder damit angereichert wurden, sollte die Verdampfung von Lösemitteln bei der niedrigstmöglichen Temperatur (z. B. höchstens 40 °C) erfolgen, um diese empfindlichen Fettsäuren zurückzugewinnen.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente, die in diesem Dokument teilweise oder als Ganzes zitiert werden, sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. 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 1042, *Laboratory glassware — One-mark volumetric flasks*

ISO 1735 | IDF 5, *Cheese and processed cheese products — Determination of fat content — Gravimetric method (Reference method)*

ISO 1740 | IDF 6, *Milk fat products and butter — Determination of fat acidity (Reference method)*

ISO 14156 | IDF 172, *Milk and milk products — Extraction methods for lipids and liposoluble compounds*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

3.1

Fettsäuregehalt

Massenanteil einzelner Substanzen oder von Substanzgruppen, der nach dem in dieser Internationalen Norm festgelegten Verfahren bestimmt wurde

Anmerkung 1 zum Begriff: Siehe Tabelle A.1.

Anmerkung 2 zum Begriff: Der Fettsäuregehalt wird als Massenanteil in Gramm (oder in Milligramm) der Fettsäuren je 100 g des Erzeugnisses angegeben (siehe Tabelle A.1). Fettsäureergebnisse können in andere Formate zur Angabe von Ergebnissen umgerechnet werden (siehe 10.2).

4 Kurzbeschreibung

Zugabe der internen Standardlösung zur Probe, Herstellung von Fettsäuremethylestern (FAMES, en: fatty acid methyl esters) durch direkte Umesterung mit methanolischem Natriummethanolat bei flüssigen Proben; Auflösen in Wasser (d.h. Wiederaufbereitung bzw. Rekonstitution) und direkte Umesterung mit methanolischem Natriummethanolat bei pulverförmigen Proben. Das gleiche Umesterungsverfahren wird auf das aus verschiedenen Lebensmitteln (z. B. fettarmen Erzeugnissen, Käse) extrahierte Fett angewendet.

Trennung der FAMES mittels Kapillargas-Flüssigkeits-Chromatographie. Identifizierung der FAMES durch Vergleich mit der Retentionszeit von reinen Standards und Quantifizierung als Fettsäuren durch Bezugnahme auf einen internen Standard (C11:0 FAME) und auf Responsfaktoren der Messgeräteausrüstung. Verifizierung der Umesterungsleistung mit Hilfe eines zweiten internen Standards (C13:0 TAG).

5 Reagenzien

Sofern nichts anderes festgelegt ist, werden ausschließlich Reagenzien von anerkannter Analysenreinheit verwendet.

5.1 *n*-Hexan, $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3]$, von für die Chromatographie geeigneter Qualität.

5.2 Methanol, $[\text{CH}_3\text{OH}]$, von für die Chromatographie geeigneter Qualität.

5.3 Wasser, HPLC-Qualität oder von gleichwertiger Reinheit und Güte.

5.4 Natriummethanolat-Lösung, $[\text{CH}_3\text{ONa}]$, gelöst in Methanol 30 % m/v oder 25 % m/v, je nach örtlicher Verfügbarkeit.

5.5 Umesterungslösung (Natriummethanolat-Lösung 5 % m/v in Methanol).

50 ml (oder 60 ml) Natriummethanolat-Lösung 30 % m/v (oder 25 % m/v) werden in einen 300-ml-Messkolben pipettiert und mit Hilfe eines Magnetrührers vorsichtig mit 250 ml Methanol gemischt. Der Magnetrührer wird entnommen, anschließend wird auf Raumtemperatur abgekühlt und bis zur Markierung mit Methanol aufgefüllt.

Bei Lagerung in dunkler Umgebung bei 4 °C ist diese Lösung für eine Dauer von einer Woche stabil. Vor ihrer Verwendung muss die Lösung Raumtemperatur erreicht haben. Dieses Lösungsvolumen reicht für die Analyse von etwa 40 Proben aus. Im Falle einer kleineren Anzahl an Analysen kann das Reagenzienvolumen entsprechend angepasst werden.

Die Umesterungsreaktion wird bei Umgebungstemperatur (zwischen 20 °C und 25 °C) durchgeführt.

ANMERKUNG In Klammern () angegebene Werte entsprechen der Natriummethanolat-Lösung mit einer Konzentration von 25 % m/v.

5.6 Di-Natriumhydrogencitrat-Sesquihydrat, $[\text{HOC}(\text{COOH})(\text{CH}_2\text{COONa})_2 \cdot 1,5 \text{H}_2\text{O}]$.

5.7 Natriumchlorid, $[\text{NaCl}]$.

5.8 Neutralisierungslösung, (Di-Natriumhydrogencitrat-Sesquihydrat 10 % m/v, Natriumchlorid 15 % m/v in Wasser).

50,0 g Di-Natriumhydrogencitrat-Sesquihydrat und 75,0 g Natriumchlorid werden in einen 500-ml-Messkolben eingewogen. Diese werden mit Hilfe eines Magnetrührers in 450 ml Wasser gelöst. Der Magnetrührer wird entnommen, anschließend wird bis zur Markierung mit Wasser aufgefüllt.

Bei Lagerung in dunkler Umgebung bei 4 °C ist diese Lösung für eine Dauer von einem Monat stabil. Während der Lagerung können sich Salzkristalle in der Lösung bilden, die jedoch nach dem Schütteln wieder verschwinden.

Vor ihrer Verwendung muss die Lösung Raumtemperatur erreicht haben. Dieses Lösungsvolumen reicht für die Analyse von etwa 40 Proben oder mehr aus. Im Falle einer kleineren Anzahl an Analysen (oder einer einzelnen Analyse) können Masse und Volumen der Lösung entsprechend angepasst werden.

5.9 Tert-Butylmethylether (MTBE), von für die Chromatographie geeigneter Qualität.

5.10 Methylundecanoat (C11:0 FAME), mit einer Reinheit ≥ 99 % Massenanteil.

5.11 Propan-1,2,3-triyltridecanoat (en: Tritridecanoïn) (C13:0 TAG), mit einer Reinheit ≥ 99 % Massenanteil.

5.12 C11:0 FAME/C13:0 TAG-Standardlösung.

Etwa 500 mg Propan-1,2,3-triyltridecanoat und 500 mg Methylundecanoat werden auf 0,1 mg in einen 250-ml-Messkolben eingewogen. Diese werden gelöst und es wird bis zur Markierung mit MTBE aufgefüllt.

Bei Lagerung in dunkler Umgebung bei 4 °C ist diese Lösung für eine Dauer von einer Woche stabil. Vor ihrer Verwendung muss die Lösung Raumtemperatur erreicht haben.

Dieses Lösungsvolumen reicht für die Analyse von etwa 40 Proben oder mehr aus. Im Falle einer kleineren Anzahl an Analysen können die Standard-Masse und das Volumen des Lösemittels entsprechend angepasst werden.

5.13 Octadecensäuremethylester, *cis*- und *trans*-Isomergemisch von C18:1 mit *trans*-4- bis *trans*-16-Octadecen (alle Isomere) und Haupt-*cis*-Isomeren. Konzentration 2,5 mg/ml in Dichlormethan.

ANMERKUNG Dieser Standard ist im Handel erhältlich bei Supelco Inc, einer Marke von Sigma-Aldrich (Cat. 40495-U)¹.

5.14 Linolsäuremethylester, *cis*- und *trans*-Isomergemisch von C18:2 mit *trans*-9,*trans*-12-Octadecadiensäure (etwa 50 %), *cis*-9,*trans*-12-Octadecadiensäure (etwa 20 %), *trans*-9,*cis*-12-Octadecadiensäure (etwa 20 %) und *cis*-9,*cis*-12-Octadecadiensäure (etwa 10 %). Konzentration 10 mg/ml in Dichlormethan.

¹ Supelco Inc., eine Marke von Sigma Aldrich, ist ein Beispiel für ein geeignetes im Handel erhältliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch ISO oder IDF. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.

ANMERKUNG Dieser Standard ist im Handel erhältlich bei Supelco Inc, einer Marke von Sigma-Aldrich (Cat. 47791)¹.

5.15 Linolensäuremethylester, *cis*- und *trans*-Isomergemisch von C18:3 mit

- *cis*-9,*cis*-12,*cis*-15-Octadecatriensäuremethylester (etwa 3 % m/m);
- *cis*-9,*cis*-12,*trans*-15-Octadecatriensäuremethylester (etwa 7 % m/m);
- *cis*-9,*trans*-12,*cis*-15-Octadecatriensäuremethylester (etwa 7 % m/m);
- *cis*-9,*trans*-12,*trans*-15-Octadecatriensäuremethylester (etwa 15 % m/m);
- *trans*-9,*cis*-12,*cis*-15-Octadecatriensäuremethylester (etwa 7 % m/m);
- *trans*-9,*cis*-12,*trans*-15-Octadecatriensäuremethylester (etwa 15 % m/m);
- *trans*-9,*trans*-12,*cis*-15-Octadecatriensäuremethylester (etwa 15 % m/m) und
- *trans*-9,*trans*-12,*trans*-15-Octadecatriensäuremethylester (etwa 30 % m/m).

Konzentration 10 mg/ml in Dichlormethan.

ANMERKUNG Dieser Standard ist im Handel erhältlich bei Supelco Inc, einer Marke von Sigma Aldrich (Cat. 47792)¹. Dieser Standard enthält alle *trans*-Isomere von C18:3 (insgesamt acht), deren Isotopenhäufigkeit und Verhältnis unterscheiden sich jedoch von den in raffinierten/desodorierten Ölen und Fetten gefundenen.

5.16 Methyloctadecadienoat-konjugierte Säuren, Gemisch von C18:2 *cis*-9,*trans*-11 und *cis*-10,*trans*-12-Octadecadienoat-konjugierten Säuren mit einer Reinheit ≥ 99 % Massenanteil.

ANMERKUNG Dieser Standard ist im Handel erhältlich bei Supelco Inc, einer Marke von Sigma Aldrich (Cat. 05507)¹. Dieser Standard enthält die beiden Haupt-CLA-Isomere, das Isomerverhältnis kann jedoch von Charge zu Charge schwanken.

5.17 Qualitative *cis*- und *trans*-Isomer-Standardgemischlösung

Für die Identifizierung der *cis*- und *trans*-Isomere anhand der Retentionszeit (RT, en: retention time) (d. h. C18:1, C18:2, C18:3 und CLA) wird eine qualitative Standardlösung aus den in 5.13 bis 5.16 aufgelisteten Standards hergestellt. Es könnten alle handelsüblichen Standards verwendet werden. Alle Standardisomerlösungen werden zu gleichen Teilen in einen 50-ml-Messkolben hinzugegeben. Diese werden gelöst und es wird bis zur Markierung mit Hexan aufgefüllt. Es wird dem Typ des verwendeten Injektors entsprechend verdünnt.

5.18 FAME-Standard-Kalibrierlösung

5.18.1 Herstellung mit einzelnen FAME-Standards

5.18.1.1 Einzelne FAME-Standards

Im Handel werden die folgenden einzelnen FAME-Standards (Reinheit $\geq 99\%$) erworben:

Buttersäuremethylester (C4:0), Capronsäuremethylester (C6:0), Caprylsäuremethylester (C8:0), Caprinsäuremethylester (C10:0), Undecansäuremethylester (C11:0), Laurinsäuremethylester (C12:0), Tridecansäuremethylester (C13:0), Myristinsäuremethylester (C14:0), Myristoleinsäuremethylester (C14:1 *cis*-9 oder *n*-5), Pentadecansäuremethylester (C15:0), *cis*-10-Pentadecensäuremethylester (C15:1 *cis*-10 *n*-5), Palmitinsäuremethylester (C16:0), Palmitoleinsäuremethylester (C16:1 *cis*-9 oder *n*-7), Heptadecansäuremethylester (C17:0), *cis*-10-Heptadecensäuremethylester (C17:1 *cis*-10 oder *n*-7), Stearinsäuremethylester (C18:0), Elaidinsäuremethylester (C18:1 *trans*-9 oder *n*-9), Ölsäuremethylester (C18:1 *cis*-9 oder *n*-9), Linolelaidinsäuremethylester (C18:2 alle *trans*-9,12 oder *n*-6), Linolsäuremethylester (C18:2 alle *cis*-9,12 oder *n*-6), Arachinsäuremethylester (C20:0), Gammalinolsäuremethylester (C18:3 alle *cis*-6,9,12 oder *n*-6), *cis*-11-Eicosensäuremethylester (C20:1 *cis*-11 oder *n*-9), Linolensäuremethylester (C18:3 alle *cis*-9,12,15 oder *n*-3), Heneicosansäuremethylester (C21:0), *cis*-11,14-Eicosadiensäuremethylester (C20:2 alle *cis*-11,14 oder *n*-6), Behensäuremethylester (C22:0), *cis*-8,11,14-Eicosatriensäuremethylester (C20:3 alle *cis*-8,11,14 oder *n*-6 *cis*), Erucasäuremethylester (C22:1 *cis*-13 oder *n*-9), *cis*-11,14,17-Eicosatriensäuremethylester (C20:3 alle *cis*-11,14,17 oder *n*-3), Arachidonsäuremethylester (C20:4 alle *cis*-5,8,11,14 oder *n*-6), *cis*-13,16-Docosadiensäuremethylester (C22:2 alle *cis*-13,16 oder *n*-6), Lignocerinsäuremethylester (C24:0), *cis*-5,8,11,14,17-Eicosapentaensäuremethylester (C20:5 alle *cis*-5,8,11,14,17 oder *n*-3), Nervonsäuremethylester (C24:1 *cis*-15 oder *n*-9), *cis*-4,7,10,13,16,19-Docosahexaensäuremethylester (C22:6 alle *cis*-4,7,10,13,16,19 oder *n*-3).

ANMERKUNG Die FAME-Standards einzeln zu kaufen, ist teurer als ein einzelnes FAME-Standardgemisch. Außerdem könnte das gesonderte Wägen jedes einzelnen FAME-Standards zu größeren Messabweichungen führen und erfordert eine hohe Präzision beim Wägen.

5.18.1.2 Stammlösung 1 — Gesättigt

Es werden etwa 25 mg Lignocerinsäuremethylester (C24:0), 25 mg Behensäuremethylester (C22:0), 25 mg Heneicosansäuremethylester (C21:0), 25 mg Arachinsäuremethylester (C20:0), 25 mg Stearinsäuremethylester (C18:0), 25 mg Heptadecansäuremethylester (C17:0), 50 mg Palmitinsäuremethylester (C16:0), 25 mg Pentadecansäuremethylester (C15:0), 25 mg Myristinsäuremethylester (C14:0), 25 mg Tridecansäuremethylester (C13:0), 25 mg Laurinsäuremethylester (C12:0), 25 mg Undecansäuremethylester (C11:0), 25 mg Caprinsäuremethylester (C10:0), 25 mg Caprylsäuremethylester (C8:0), 25 mg Capronsäuremethylester (C6:0) und 25 mg Buttersäuremethylester (C4:0) auf 0,1 mg in einen 100-ml-Messkolben eingewogen. Es wird bis zur Markierung mit *n*-Hexan aufgefüllt.

Palmitinsäure wird in der doppelten Menge eingewogen. Kurzkettige Fettsäuremethylester (d. h. C4:0, C6:0 und C8:0) sind flüchtig und müssen am Ende des Verfahrens eingewogen werden.

5.18.1.3 Stammlösung 2 — Einfach ungesättigt

Es werden etwa 25 mg Nervonsäuremethylester (C24:1 *cis*-15 oder *n*-9), 25 mg Erucasäuremethylester (C22:1 *cis*-13 oder *n*-9), 25 mg *cis*-11-Eicosensäuremethylester (C20:1 *cis*-11 oder *n*-9), 25 mg Ölsäuremethylester (C18:1 *cis*-9 oder *n*-9), 25 mg Elaidinsäuremethylester (C18:1 *trans*-9 oder *n*-9 *trans*), 25 mg *cis*-10-Heptadecensäuremethylester (C17:1 *cis*-10 oder *n*-7), 25 mg Palmitoleinsäuremethylester (C16:1 *cis*-9 oder *n*-7), 25 mg *cis*-10-Pentadecensäuremethylester (C15:1 *cis*-10 oder *n*-5) und 25 mg Myristoleinsäuremethylester (C14:1 *cis*-9 oder *n*-5) auf 0,1 mg in einen 100-ml-Messkolben eingewogen. Es wird bis zur Markierung mit *n*-Hexan aufgefüllt.

5.18.1.4 Stammlösung 3 — Mehrfach ungesättigt

Es werden etwa 25 mg Linolelaidinsäuremethylester (C18:2 alle *trans*-9,12 oder *n*-6 *trans*), 25 mg Linolsäuremethylester (C18:2 alle *cis*-9,12 oder *n*-6), 25 mg Gammalinolsäuremethylester (C18:3 alle *cis*-9,12 oder *n*-6), 25 mg Linolensäuremethylester (C18:3 alle *cis*-12,15 oder *n*-3), 25 mg *cis*-11,14-Eicosadiensäuremethylester (C20:2 alle *cis*-11,14 oder *n*-6), 25 mg *cis*-8,11,14-Eicosatriensäuremethylester (C20:3 alle *cis*-8,11,14 oder *n*-6), 25 mg *cis*-11,14,17-Eicosatriensäuremethylester (C20:3 alle *cis*-11,14,17 oder *n*-3), 25 mg Arachidonsäuremethylester (C20:4 alle *cis*-5,8,11,14 oder *n*-6), 25 mg *cis*-13,16-Docosadiensäuremethylester (C22:2 *cis*-13,16 oder *n*-6), 25 mg *cis*-5,8,11,14,17-Eicosapentaensäuremethylester (C20:5 alle *cis*-5,8,11,14,17 oder *n*-3) und 25 mg *cis*-4,7,10,13,16,19-Docosahexaensäuremethylester (C22:6 *cis*-4,7,10,13,16,19 oder *n*-3) auf 0,1 mg in einen 100-ml-Messkolben eingewogen. Es wird bis zur Markierung mit *n*-Hexan aufgefüllt.

5.18.1.5 Herstellung der FAME-Standard-Kalibrierlösungen

25,0 ml der Kalibrierstandard-Stammlösung 1 (5.18.1.2), 25,0 ml der Kalibrierstandard-Stammlösung 2 (5.18.1.3) und 25,0 ml der Kalibrierstandard-Stammlösung 3 (5.18.1.4) werden in einen 100-ml-Messkolben pipettiert. Dann wird bis zur Markierung mit *n*-Hexan aufgefüllt. Es wird dem Typ des verwendeten Injektors entsprechend verdünnt.

Bei Lagerung in dunkler Umgebung bei -20°C ist diese Lösung für eine Dauer von etwa sechs Monaten stabil. Um eine Verunreinigung der Standardlösung zu verhindern, wird die Lösung in verschiedene Fläschchen verteilt (sodass sie bereit für die Injektion sind) und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Jedes Fläschchen wird nur einmal verwendet und dann verworfen.

5.18.2 Herstellung aus einem quantitativen FAME-Standardgemisch

5.18.2.1 Quantitatives FAME-Standardgemisch

Im Handel ein quantitatives FAME-Standardgemisch erwerben: Nu-Check-Prep, Cat.-Nummer GLC-Nestle-36².

Das FAME-Kalibrierstandardgemisch wird vom Lieferanten unter sorgfältiger Einhaltung der Massenanteile hergestellt. Die prozentualen Massenanteile der einzelnen Komponenten sind im Begleitschein angegeben. Jede Ampulle enthält etwa 100 mg des FAME-Kalibrierstandardgemischs. Alle einzelnen FAME-Standards sind zu gleichen Teilen im Standardgemisch enthalten, mit Ausnahme des Palmitinsäuremethylesters (C16:0), der in doppelter Menge zugegeben wird,

5.18.2.2 Herstellung des FAME-Standardkalibriergemischs

Vor der Verwendung ist der Ampulle in dunkler Umgebung ohne Beheizung Zeit zu lassen, um Raumtemperatur (höchstens 25°C) zu erreichen. Die Ampulle wird mit einem Glasmesser aufgeschnitten, mit Hilfe einer Pasteur-Pipette wird der Inhalt der Ampulle zügig in einen zuvor gewogenen 50-ml-Messkolben überführt und es wird gewogen. Es wird bis zur Markierung mit *n*-Hexan aufgefüllt. Es wird dem Typ des verwendeten Injektors entsprechend verdünnt.

Bei Lagerung in dunkler Umgebung bei -20°C ist diese Lösung für eine Dauer von etwa sechs Monaten stabil. Um eine Verunreinigung der Standardlösung zu verhindern, wird die Lösung in verschiedene Fläschchen verteilt (sodass sie bereit für die Injektion sind) und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Jedes Fläschchen wird nur einmal verwendet und dann verworfen.

2 Nu-Check-Prep GLC-Nestle-36 ist ein Beispiel für ein geeignetes, im Handel erhältliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch ISO oder IDF. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.

6 Prüfeinrichtung

WARNUNG — Da die Bestimmung mit der Verwendung von flüchtigen brennbaren Lösemitteln verbunden ist, müssen alle verwendeten elektrischen Geräte der Gesetzgebung zu den mit der Verwendung derartiger Lösemittel verbundenen Gefahren entsprechen.

Es werden übliche Laborgeräte insbesondere die folgenden Geräte verwendet:

- 6.1 Analysenwaage**, die in der Lage ist, bei einer Lesbarkeit von 0,1 mg auf 1 mg zu wägen.
- 6.2 Messkolben**, mit Fassungsvermögen von 50 ml, 100 ml, 250 ml, 300 ml und 500 ml.
- 6.3 Vollpipetten mit einer Markierung**, mit Fassungsvermögen von 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml und 50 ml, Klasse AS (ISO 1042).
- 6.4 Vollpipetten mit zwei Markierungen**, mit Fassungsvermögen von 2 ml und 5 ml, Klasse AS (ISO 1042).
- 6.5 Mikropipette**, mit einem Fassungsvermögen von 200 µl.
- 6.6 Dispenser**, mit Fassungsvermögen von 2 ml, 5 ml und 10 ml.
- 6.7 Reagenzgläser, mit einem Durchmesser von 26 mm, einer Länge von 100 mm**, ausgerüstet mit einer Schraubkappe mit PTFE-beschichteter Einlage.
- 6.8 Reagenzglasschüttler Vortex-Genie**, oder ein gleichwertiges Gerät.
- 6.9 Laborzentrifuge**, ausgerüstet mit Adaptern für Reagenzgläser mit Außendurchmessern von 26 mm.
- 6.10 Gas-Flüssigkeits-Chromatograph**, ausgerüstet mit einem Flammenionisationsdetektor und Split/Splitless- oder On-Column-Injektor. Autosampler und Integrationssystem vorzugsweise computergesteuert.

Um Verunreinigungen im FAME-Chromatogramm zu vermeiden, müssen die verwendeten Glasgeräte und Verschlusskappen von größtmöglicher Sauberkeit sein.

6.10.1 Trägergas, Wasserstoff oder Helium mit einer Reinheit $\geq 99,999\,7\%$.

ANMERKUNG Die Verwendung von Wasserstoff oder Helium als Trägergas hat in erster Linie Einfluss auf die Chromatographiedauer (d. h. die Verlängerung der Zeit um 10 min bis 15 min bei Verwendung von Helium), aber bei optimierten Bedingungen keine signifikanten Auswirkungen auf die chromatographische Auflösung.

Die anderen für den Detektor (FID) benötigten Gase sollten frei von organischen Verunreinigungen sein (d. h. einen C_nH_m unter 1 ppm) und eine Reinheit von mindestens $\geq 99,995\%$ aufweisen. Es kann synthetische Luft oder Druckluft verwendet werden. Es ist auch möglich, einen Gaserzeuger zu verwenden.

6.10.2 Kapillarsäule, gebunden mit einer Cyanopropylpolysiloxan-Phase oder Gleichwertigem (mit einer Länge von 100 m, einem Innendurchmesser von 0,25 mm und einer Filmdicke von 0,2 µm), die die FAMES hauptsächlich nach der Kohlenstoffkettenlänge und nachgeordnet auch nach der Anzahl der Doppelbindungen eluiert.

Spuren von Sauerstoff und Feuchtigkeit schädigen die polare Phase der Säule. Falls kein reines Gas zur Verfügung steht, wird eine Filtervorrichtung zur Gasreinigung verwendet.

6.10.3 Flammenionisationsdetektor, der sich auf eine Temperatur von 50 °C über der Endtemperatur des Säulenofens erwärmen lässt.

6.10.4 Split/Splitless-Injektor, der sich auf eine Temperatur von 30 °C über der Endtemperatur des Säulenofens erwärmen lässt.

6.10.5 On-Column-Injektor, der die Möglichkeit bietet, nicht beheizt zu werden (kalt) oder der sich auf eine Temperatur von 30 °C über der Endtemperatur des Säulenofens erwärmen lässt.

ANMERKUNG Es reicht aus, nur einen Injektor (d. h. einen Split/Splitless- oder einen On-Column-Injektor) in das GC-Messgerät einzubauen.

6.10.6 Injektionsspritze, mit einem Fassungsvermögen von 10 µl.

6.10.7 Integrationssystem.

6.11 Gaschromatographiebedingungen

Die Ofentemperatur und der Trägergasvolumenstrom sind von der gewählten Säule und vom verwendeten Trägergas (d. h. Wasserstoff oder Helium) abhängig. In jedem Falle müssen die gewählten Bedingungen für die Trennung zwischen der *cis*- und der *trans*-Zone für C18:1, C18:2, C18:3 und konjugierte Linolsäuren (CLA, en: conjugated linoleic acids) sorgen, wie in Anhang B, Bild B.1, Bild B.2 und Bild B.3 dargestellt.

Die Beispiele in 6.11.1 und 6.11.2 listen anwendbare Bedingungen für eine vorschriftsmäßige Trennung/Identifizierung von *cis* und *trans* auf.

6.11.1 Beispiel 1 — Split-Injektion

- Säule: mit einer Länge von 100 m, einem Innendurchmesser von 0,25 mm, einer Filmdicke von 0,2 µm, Kieselgel-Kapillarsäule;
- stationäre Phase: Cyanopropylpolysiloxan;
- Trägergastyp: Helium;
- Säulenkopf-Trägergas-Druck: 225 kPa (175 kPa bis 225 kPa);
- Splittedurchfluss: 25,5 ml/min;
- Splitverhältnis: 10:1;
- Injektortemperatur: 250 °C;
- Detektortemperatur: 275 °C;
- Ofentemperaturprogramm: Anfangstemperatur von 60 °C, für eine Dauer von 5 min halten, mit einer Geschwindigkeit von 15 °C min⁻¹ auf bis zu 165 °C erhöhen, auf dieser Temperatur für eine Dauer von 1 min halten und dann mit einer Geschwindigkeit von 2 °C min⁻¹ auf bis zu 225 °C für 20 min erhöhen;
- injizierte Probenmenge: 1,0 µl.

Anhang B, Bild B.4, zeigt ein Beispiel für das unter diesen Bedingungen erhaltene vollständige Gaschromatographie-Gesamtprofil.

6.11.2 Beispiel 2 — On-Column-Injektion

- Säule: mit einer Länge von 100 m, einem Innendurchmesser von 0,25 mm, einer Filmdicke von 0,2 µm, Kieselgel-Kapillarsäule;
- stationäre Phase: Cyanopropylpolysiloxan;
- Trägergastyp: Wasserstoff;
- Säulenkopf-Trägergas-Druck: 210 kPa (175 kPa bis 225 kPa);
- Injektortemperatur: kalt;
- Detektortemperatur: 275 °C;
- Ofentemperaturprogramm: Anfangstemperatur von 60 °C, für eine Dauer von 5 min halten, mit einer Geschwindigkeit von 15 °C min⁻¹ auf bis zu 165 °C erhöhen, auf dieser Temperatur für eine Dauer von 1 min halten und dann mit einer Geschwindigkeit von 2 °C min⁻¹ auf bis zu 225 °C für 17 min erhöhen;
- injizierte Probenmenge: 1,0 µl.

Anhang B, Bild B.5, zeigt ein Beispiel für das unter diesen Bedingungen erhaltene vollständige Gaschromatographie-Gesamtprofil.

6.12 Auflösung zwischen C18:1 *cis* und *trans*

Für die genaue Quantifizierung von C18:1 TFA (bei einem Niveau $\geq 0,5$ g/100 g Fett) ist eine ausreichende Auflösung zwischen C18:1 *trans*-13/14 und C18:1 *cis*-9 (Ölsäure) erforderlich. Die Auflösung wird mit der Injektion der qualitativen *cis*- und *trans*-C18:1 FAME-Isomer-Standardgemischlösung (5.17) bestimmt.

1,0 µl der Kalibrierlösung (5.13) wird in den Gaschromatographen injiziert. Es wird die Peakbreite bei halber Höhe und der Abstand zwischen der linken Seite des Chromatogramms und dem höchsten Punkt des Peaks für C18:1 *trans*-13/14 und C18:1 *cis*-9 (Ölsäuremethylester) bestimmt. Das Auflösungskriterium R wird mit Hilfe von Gleichung (1) berechnet:

$$R = 1,18 \times (t_{R2} - t_{R1}) / (W_{(\frac{1}{2})1} + W_{(\frac{1}{2})2}) \quad (1)$$

Dabei ist

- | | |
|----------------------|---|
| t_{R1} | der Abstand, in Zentimeter, zwischen der linken Seite des Chromatogramms und dem höchsten Punkt von Peak 1 (C18:1 <i>trans</i> -13/14); |
| t_{R2} | der Abstand, in Zentimeter, zwischen der linken Seite des Chromatogramms und dem höchsten Punkt von Peak 2 (C18:1 <i>cis</i> -9); |
| $W_{(\frac{1}{2})1}$ | die Peakbreite, in Zentimeter, bei der halben Höhe von Peak 1 (C18:1 <i>trans</i> -13/14); |
| $W_{(\frac{1}{2})2}$ | die Peakbreite, in Zentimeter, bei der halben Höhe von Peak 2 (C18:1 <i>cis</i> -9). |

Die Auflösung ist ausreichend, wenn das Kriterium $R \geq 1,00 \pm 5 \%$ ist (siehe Anhang B, Bild B.3).

ANMERKUNG Falls die Auflösung nicht ausreicht, R jedoch dem Sollwert schon nahe kommt, kann eine Feinabstimmung der Chromatographiebedingungen (d. h. eine geringfügige Veränderung von Druck und Durchflussmenge des Trägergases oder am Ofentemperaturprogramm) zu einem annehmbaren R -Wert führen.

7 Probenahme

Es ist wichtig, dass das Labor eine repräsentative Probe erhält, die während Transport oder Lagerung weder beschädigt noch verändert wurde.

Die Probenahme ist nicht Bestandteil des in dieser Internationalen Norm festgelegten Verfahrens. Ein empfohlenes Probenahmeverfahren ist in ISO 707 | IDF 50 angegeben.

8 Vorbereitung der Prüfprobe

8.1 Flüssige und pulverförmige Milch und Säuglingsnahrung mit einem Fettgehalt $\geq 1,5$ % m/m

Die Probe wird auf Raumtemperatur gebracht und vor der Verwendung kräftig geschüttelt. Es wird sichergestellt, dass die Probe homogen ist (d. h. gründlich mischen).

8.2 Flüssige und pulverförmige Milch und Säuglingsnahrung mit einem Fettgehalt $< 1,5$ % m/m

Die Probe wird auf Raumtemperatur gebracht und vor der Verwendung kräftig geschüttelt. Es wird sichergestellt, dass die Probe homogen ist (d. h. gründlich mischen).

Das Fett wird nach ISO 14156 | IDF 172 extrahiert, wobei darauf geachtet wird, dass das (die) Extraktionslösemittel durch Erwärmung auf eine Temperatur von höchstens 40 °C vollständig verdampft wird, um einen Abbau von langkettigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren (LC-PUFA) zu vermeiden.

ANMERKUNG Für nützliche Hinweise zu den Fettextraktionsverfahren siehe auch ISO 1211 | IDF 1, ISO 1737 | IDF 13, ISO 8381 | IDF 123 und ISO 8262-1 | IDF 124-1.

8.3 Käse

Die Probe wird auf Raumtemperatur gebracht. Es wird sichergestellt, dass die Probe homogen ist (d. h. gründlich mischen).

Das Fett wird nach ISO 1735 | IDF 5 extrahiert, wobei darauf geachtet wird, dass das Extraktionslösemittel durch Erwärmung des Fetts auf eine Temperatur von höchstens 60 °C vollständig entfernt wird.

Die Acidität des Fetts wird nach ISO 1740 | IDF 6 verifiziert (Annahmekriterien ≤ 1 mmol/100 g Fett).

ANMERKUNG Bei Anwesenheit von methanolischem Natriummethanolat werden freie Fettsäuren nicht in Methyl ester (FAME) umgewandelt. Im Falle höherer Acidität (d. h. freie Fettsäuren) werden diese Fettsäuren nicht mit den anderen quantifiziert.

9 Durchführung

9.1 Prüfteilprobe

In ein 25-ml-Zentrifugenglas mit Schraubkappe wird eine Probenmenge (8.1) auf 0,1 mg eingewogen, die dem entspricht, was notwendig ist, um im Zentrifugenglas etwa 50 mg Fett zu erhalten. (So beträgt die entsprechende Probenmasse z. B. bei einer Probe, die auf 100 g des Erzeugnisses 26 g Fett enthält, etwa 190 mg.)

ANMERKUNG 1 Für die Fettsäurenanalyse der aus Lebensmitteln extrahierten Fette ist dieselbe Fettprobenmenge erforderlich (d. h. etwa 50 mg).

Im Falle einer pulverförmigen Probe werden mit Hilfe einer Mikropipette 2,0 ml Wasser zugegeben. Bei einer flüssigen Probe ist keine Zugabe von Wasser erforderlich. Das Zentrifugenglas wird verschlossen, dann wird die Probe vorsichtig mit einem Vortex-Mixer gelöst. Für eine Dauer von 15 min wird bei Raumtemperatur abgewartet.

Für das aus dem Erzeugnis extrahierte Fett (8.2 und 8.3) gilt: 50 mg des geschmolzenen Fetts werden auf 0,1 mg in ein 25-ml-Zentrifugenglas eingewogen. Für die Fettsäureanalyse von Fettproben ist keine Zugabe von Wasser erforderlich.

5 ml der internen Standardlösung (5.12) werden pipettiert. Mit Hilfe einer Pipette werden 5 ml der methanolischen Natriummethanolat-Lösung 5 % (m/v) (5.5) zugegeben. Die Umesterungszeit beginnt mit der Zugabe des ersten Reagenstropfens. Das Zentrifugenglas wird hermetisch verschlossen und 10 s mit Hilfe eines Vortex-Mixers gründlich geschüttelt.

180 s nach dem Start wird das Zentrifugenglas geöffnet und 2 ml Hexan zugegeben. 210 s nach dem Start werden 10 ml der wässrigen Lösung von Di-Natriumhydrogencitrat und Natriumchlorid (5.8) zugegeben. Die Umesterungszeit endet mit der Zugabe des letzten Tropfens der Neutralisierungslösung. Mit Hilfe eines Vortex-Mixers wird für eine Dauer von 30 s vorsichtig geschüttelt. Die Umesterungszeit sollte ab dem Start höchstens 240 s betragen.

ANMERKUNG 2 Es ist wichtig, die Umesterungszeit (240 s) einzuhalten. Die Anzahl an gleichzeitig eingesetzten Zentrifugengläsern kann unter diesen Bedingungen höchstens sechs betragen. Für die Zugabe der Reagenzien kann ein schnelles Zuführsystem (Dispenser) verwendet werden, nicht jedoch für die Zugabe der internen Standardlösung, weil bei dieser eine hohe Präzision erforderlich ist.

Das Zentrifugenglas wird für eine Dauer von 5 min mit $1\,750\text{ min}^{-1}$ (oder dem Äquivalent von $g = 375 \pm 25$) zentrifugiert.

200 µl des Überstandes werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert und bis zur Markierung mit *n*-Hexan aufgefüllt.

ANMERKUNG 3 Der Verdünnungsfaktor wurde ausschließlich für On-Column- und/oder Splitless-Injektion berechnet. Bei Anwendung von Split-Injektion ist die Verdünnung zu verringern, um die entsprechend dem angewendeten Split-Verhältnis gewünschten Peak-Antworten zu erhalten (besonders bei kleinen Peaks ist auf eine ausreichende und genaue Nachweisgrenze zu achten). Bei Lagerung in dunkler Umgebung bei 4 °C ist die Probenlösung nach der Verdünnung für eine Dauer von zwei Tagen stabil.

ANMERKUNG 4 Im Probenchromatogramm zeigt sich manchmal ein „Hügel“ auf der Basislinie zwischen dem Lösemittel-Peak und der Elution von C6:0; dieses Phänomen wird durch die mögliche Anwesenheit von Wasserspuren hervorgerufen, die während der Probenherstellung vom MTBE-Lösemittel gefangen wurden. Der „Hügel“ lässt sich leicht aus dem Gas-Chromatogramm entfernen, indem der verdünnten Probenlösung vor der Gaschromatographie-Injektion einige mg CaCl₂ zugegeben werden.

9.2 Quantitative Bestimmung

9.2.1 Bestimmung der Respsnfaktoren

Es wird dreimal 1 µl der kalibrierten Lösung injiziert (siehe 5.18.1.5 oder 5.18.2.2).

9.2.2 Bestimmung der Prüfteilprobe

Es wird 1 µl der Prüfteilprobe (9.1) unter Anwendung derselben Bedingungen wie bei der FAME-Standards-Kalibrierlösung in den Gaschromatographen injiziert.