

DIN EN ISO 16958

ICS 67.100.10

Einsprüche bis 2020-03-10

Entwurf

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

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

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2020-01-10 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an nal@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL), 10772 Berlin, Saatwinkler Damm 42/43, 13627 Berlin.

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

Gesamtumfang 113 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 prEN 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.

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Für die in diesem Dokument zitierten internationalen 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

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 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 Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision eines vereinheitlichten Messverfahrens*

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

— Leerseite —

**Milch, Milcherzeugnisse, Säuglingsnahrung und Nahrungsergänzungsmittel
für Erwachsene — Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung —
Verfahren mit Kapillargaschromatographie (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)

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

ICS:

Deskriptoren

Dokument-Typ: Europäische Norm

Dokument-Untertyp:

Dokument-Stage: CEN-Umfrage

Dokument-Sprache: D

STD Version 2.9p

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort.....	4
Vorwort.....	5
1 Anwendungsbereich.....	7
2 Normative Verweisungen.....	7
3 Begriffe.....	7
4 Kurzbeschreibung.....	8
5 Reagenzien.....	8
6 Prüfeinrichtung.....	12
7 Probenahme.....	15
8 Vorbereitung der Analysenprobe.....	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.....	16
9 Durchführung.....	16
9.1 Analysenteilprobe.....	16
9.2 Quantitative Bestimmung.....	17
9.2.1 Bestimmung der Responsfaktoren.....	17
9.2.2 Bestimmung der Analysenteilprobe.....	17
9.2.3 Fettsäurenidentifizierung.....	17
10 Berechnung und Darstellung der Ergebnisse.....	19
10.1 Berechnung.....	19
10.1.1 Berechnung des Responsfaktors.....	19
10.1.2 Fettsäuren im Erzeugnis.....	20
10.1.3 Fettsäuren im gesamten Fett.....	21
10.1.4 Summe der Fettsäurenklasse oder -gruppe in 100 g des Erzeugnisses.....	21
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.....	23
12 Prüfbericht.....	23
Anhang A (normativ) Fettsäuregruppen oder -klassen und einzelne Fettsäuren.....	24
A.1 Fettsäuregruppe oder -klasse.....	24
A.1.1 <i>trans</i> -Fettsäuren.....	24
A.1.2 Konjugierte Linolsäuren.....	24

A.1.3	Gesättigte Fettsäuren	24
A.1.4	Einfach ungesättigte Fettsäuren.....	24
A.1.5	Mehrfach ungesättigte Fettsäuren.....	24
A.1.6	Omega-3-Fettsäuren.....	24
A.1.7	Omega-6-Fettsäuren.....	24
A.1.8	Omega-9-Fettsäuren.....	25
A.2	Einzelne Fettsäuren.....	25
A.2.1	Linolsäure	25
A.2.2	Linolensäure	25
A.2.3	Arachidonsäure.....	25
A.2.4	Eicosapentaensäure	25
A.2.5	Docosahexaensäure.....	25
Anhang B (informativ) Beispiele für die Analyse mittels Gas-Flüssigkeits-Chromatographie.....		28
Anhang C (informativ) Ergebnisse eines Ringversuchs.....		38
Literaturhinweise		59

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 prEN ISO 16958:2020 durch das Technische Komitee CEN/TC 302 „Milch und Milcherzeugnisse — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ übernommen, dessen Sekretariat von NEN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 16958:2015 wurde von CEN als prEN ISO 16958:2020 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsorganisationen (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 Themen 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 des freiwilligen Charakters von Normen, der Bedeutung ISO-spezifischer Begriffe und Ausdrücke in Bezug auf Konformitätsbewertungen sowie Informationen darüber, wie ISO die Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO) hinsichtlich technischer Handelshemmnisse (TBT) berücksichtigt, siehe Foreword - Supplementary information.

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 Probenahme- und Analyseverfahren für Milch und Milcherzeugnisse eng zusammen. Seit 2001 veröffentlichen ISO und IDF 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 auch 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 [TFS], 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 erfolgenden Fettextraktion unter Anwendung der in Abschnitt 2 angegebenen Verfahren kann das aus Proben 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 erfolgenden 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 Substanzengruppen, 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 lassen sich in andere Formate zur Angabe von Ergebnissen umrechnen (siehe 10.2).

4 Kurzbeschreibung

Zugabe der internen Standardlösung zur Probe, Herstellung von Fettsäuremethylestern (FAME, en: fatty acid methyl ester) 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 auch 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 Messgeräte-ausrüstung. Verifizierung der erfolgten Umesterung mit Hilfe eines zweiten internen Standards (C13:0 TAG).

5 Reagenzien

Sofern nichts anderes festgelegt ist, sind ausschließlich Reagenzien von anerkannter Analysenreinheit zu verwenden.

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

5.2 Methanol [CH_3OH] von für die Chromatographie geeigneter Qualität.

5.3 Wasser der Sorte HPLC oder von gleichwertiger Reinheit und Güte.

5.4 Natriummethanolat-Lösung [CH_3ONa], 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) in einen 300-ml-Messkolben pipettieren und mit Hilfe eines Magnetrührers vorsichtig mit 250 ml Methanol mischen. Den Magnetrührer entnehmen, auf Raumtemperatur abkühlen und bis zur Markierung mit Methanol auffüllen.

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

Die Umesterungsreaktion ist bei Umgebungstemperatur (zwischen 20 °C und 25 °C) durchzuführen.

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 [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 in einen 500-ml-Messkolben einwiegen. Mit Hilfe eines Magnetrührers in 450 ml Wasser auflösen. Den Magnetrührer entnehmen, dann bis zur Markierung mit Wasser auffüllen.

Bei Lagerung in einer dunklen Umgebung bei einer Temperatur von 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 aus für die Analyse von annähernd 40 Proben oder mehr. Im Falle einer kleineren Anzahl an Analysen (oder einer einzelnen Analyse) können Masse und Volumen der Lösung entsprechend angepasst werden.

5.9 Methyl-*tert*-butylether (MTBE) von für die Chromatographie geeigneter Qualität.

5.10 Methylundecanoat (C11:0 FAME) mit einer Reinheit ≥ 99 Masse-%.

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

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

Annähernd 500 mg Propan-1,2,3-triyltridecanoat und 500 mg Methylundecanoat auf 0,1 mg in einen 250-ml-Messkolben einwiegen. Lösen und bis zur Markierung mit MTBE auffüllen.

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

Dieses Lösungsvolumen reicht aus für die Analyse von annähernd 40 Proben oder mehr. Im Falle einer kleineren Anzahl an Analysen können die genormte 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 (annähernd 50 %), *cis*-9,*trans*-12-Octadecadiensäure (annähernd 20 %), *trans*-9,*cis*-12-Octadecadiensäure (annähernd 20 %) und *cis*-9,*cis*-12-Octadecadiensäure (annähernd 10 %). Konzentration 10 mg/ml in Dichlormethan.

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 (annähernd 3 % m/m);
- *cis*-9,*cis*-12,*trans*-15-Octadecatriensäuremethylester (annähernd 7 % m/m);
- *cis*-9,*trans*-12,*cis*-15-Octadecatriensäuremethylester (annähernd 7 % m/m);

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.

- *cis*-9,*trans*-12,*trans*-15-Octadecatriensäuremethylester (annähernd 15 % m/m);
- *trans*-9,*cis*-12,*cis*-15-Octadecatriensäuremethylester (annähernd 7 % m/m);
- *trans*-9,*cis*-12,*trans*-15-Octadecatriensäuremethylester (annähernd 15 % m/m);
- *trans*-9,*trans*-12,*cis*-15-Octadecatriensäuremethylester (annähernd 15 % m/m) und
- *trans*-9,*trans*-12,*trans*-15-Octadecatriensäuremethylester (annähernd 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 Masse-%.

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 Los zu Los 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) eine qualitative Standardlösung aus den in 5.13 bis 5.16 aufgelisteten Standards herstellen. Es könnten alle handelsüblichen Standards verwendet werden. Alle Standardisomerlösungen zu gleichen Teilen in einen 50-ml-Messkolben einwiegen. Lösen und bis zur Markierung mit Hexan auffüllen. Dem Typ des verwendeten Injektors entsprechend verdünnen.

5.18 FAME-Standard-Kalibrierlösung

5.18.1 Herstellung mit einzelnen FAME-Standards

5.18.1.1 Einzelne FAME-Standards

Im Handel die folgenden einzelnen FAME-Standards (Reinheit ≥ 99 %) erwerben:

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

Jeweils etwa 25 mg Lignocerinsäuremethylester (C24:0), 25 mg Behensäuremethylester (C22:0), 25 mg Heneicosäuremethylester (C21:0), 25 mg Arachinsäuremethylester (C20:0), 25 mg Sacidmethylester (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) sorgfältig auf 0,1 mg in einen 100-ml-Messkolben einwiegen. Bis zur Markierung mit *n*-Hexan auffüllen.

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

Jeweils 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) sorgfältig auf 0,1 mg in einen 100-ml-Messkolben einwiegen. Bis zur Markierung mit *n*-Hexan auffüllen.

5.18.1.4 Stammlösung 3 — Mehrfach ungesättigt

Jeweils 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-Docosaheptaensäuremethylester (C22:6 *cis*-4,7,10,13,16,19 oder *n*-3) sorgfältig auf 0,1 mg in einen 100-ml-Messkolben einwiegen. Bis zur Markierung mit *n*-Hexan auffüllen.

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) in einen 100-ml-Messkolben pipettieren. Dann bis zur Markierung mit *n*-Hexan auffüllen. Dem Typ des verwendeten Injektors entsprechend verdünnen.

Bei Lagerung in einer dunklen Umgebung bei einer Temperatur von –20 °C ist diese Lösung für eine Dauer von annähernd 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 vor der Verwendung bei –20 °C gelagert. Jedes Fläschchen nur einmal verwenden und dann verwerfen.

5.18.2 Herstellung aus einem quantitativen FAME-Standardgemisch

5.18.2.1 Quantitatives FAME-Standardgemisch

Ein quantitatives FAME-Standardgemisch kaufen: Nu-Check-Prep, Cat. Nummer GLC-Nestle-36².

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

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 mit einem Glasmesser aufschneiden und mit Hilfe einer Pasteur-Pipette den Inhalt der Ampulle zügig in einen zuvor gewogenen 50-ml-Messkolben einwiegen und bis zur Markierung mit *n*-Hexan auffüllen. Dem Typ des verwendeten Injektors entsprechend verdünnen.

Bei Lagerung in einer dunklen Umgebung bei einer Temperatur von –20 °C ist diese Lösung für eine Dauer von annähernd 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 vor der Verwendung bei –20 °C gelagert. Jedes Fläschchen nur einmal verwenden und dann verwerfen.

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.

Zu verwenden sind übliche Laborgeräte und für das hier beschriebene Verfahren die folgenden Geräte:

6.1 Analysenwaage, die in der Lage ist, bei einer Lesbarkeit von 0,1 mg auf 1 mg zu wiegen.

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 Prüfröhrchen mit einem Durchmesser von 26 mm, einer Länge von 100 mm, ausgerüstet mit einer Schraubkappe mit PTFE-beschichteter Einlage.

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.

6.8 Prüfröhrchenmischer Vortex-Genie oder ein gleichwertiges Gerät.

6.9 Laboratorzentrifuge, ausgerüstet mit Adaptern für Prüfröhrchen 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 chromatografische Auflösung.

Die anderen für den Detektor (FID) benötigten Gase sollten frei von organischen Verunreinigungen sein (d. h. einen CnHm 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 Mikron), 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, ist eine Filtervorrichtung zur Gasreinigung zu verwenden.

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 sich nicht beheizen lässt (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-Injektionsbetrieb

- 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-Trärgas-Druck: 225 kPa (175 kPa bis 225 kPa);
- Splitdurchfluss: 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 Gaschromatographie-Gesamtprofil.

6.11.2 Beispiel 2 — On-Column-Injektionsbetrieb

- 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-Trärgas-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 Gaschromatographie-Gesamtprofil.

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

Für die genaue Quantifizierung von C18:1 TFS (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) werden in den Gaschromatographen injiziert. Es wird die Peakbreite bei halber Höhe und Abstand zwischen der Linken des Chromatogramms und dem höchsten Wert des Peaks für C18:1 *trans*-13/14 und C18:1 *cis*-9 (Ölsäuremethylester) bestimmt. Die Auflösungskriterien R werden 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 des Chromatogramms und dem höchsten Punkt von Peak 1 (C18:1 *trans*-13/14);
- t_{R2} der Abstand, in Zentimeter, zwischen der Linken des Chromatogramms und dem höchsten Punkt von Peak 2 (C18:1 *cis*-9);
- $W_{(\frac{1}{2})1}$ die Peakbreite, in Zentimeter, bei der halben Höhe von Peak 1 (C18:1 *trans*-13/14);
- $W_{(\frac{1}{2})2}$ die Peakbreite, in Zentimeter, bei der halben Höhe von Peak 2 (C18:1 *cis*-9).

Die Auflösung gilt als ausreichend, wenn das R -Kriterium $\geq 1,00 \pm 5\%$ (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 Trärgases oder am Ofentemperaturprogramm) zu einem annehmbaren R -Wert führen.

7 Probenahme

Es ist wichtig, dass das Laboratorium eine repräsentative Probe erhält, die bei 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 Analysenprobe

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

Die Probe auf Raumtemperatur bringen und vor der Verwendung kräftig schütteln. Sicherstellen, 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 auf Raumtemperatur bringen und vor der Verwendung kräftig schütteln. Sicherstellen, dass die Probe homogen ist (d. h. gründlich mischen).

Das Fett nach ISO 14156 | IDF 172 extrahieren, wobei darauf zu achten ist, 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 auf Raumtemperatur bringen. Sicherstellen, dass die Probe homogen ist (d. h. gründlich mischen).

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

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

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

9 Durchführung

9.1 Analysenteilprobe

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 annähernd 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, annähernd 190 mg.)

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

Im Falle einer pulverförmigen Probe mit Hilfe einer Mikropipette 2,0 ml Wasser zugeben. Bei flüssigen Proben ist keine Zugabe von Wasser erforderlich. Das Zentrifugenglas verschließen, dann vorsichtig mit einem Vortex-Mixer lösen. Für eine Dauer von 15 min bei Raumtemperatur abwarten.

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

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

180 s nach dem Start das Zentrifugenglas öffnen und 2 ml Hexan zugeben. 210 s nach dem Start 10 ml der wässrigen Lösung von di-Natriumhydrogencitrat und Natriumchlorid (5.8) zugeben. Die Umesterungszeit endet mit der Zugabe des letzten Tropfens der Neutralisierungslösung. Mit Hilfe eines Vortex-Mixers für eine Dauer von 30 s vorsichtig schütteln. 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 hohe Präzision erforderlich ist.

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

200 µl des Überstandes in einen 10-ml-Messkolben pipettieren und bis zur Markierung mit *n*-Hexan auffüllen.

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 einer dunklen Umgebung bei einer Temperatur von 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 Responsfaktoren

Dreimal 1 µl der kalibrierten Lösung injizieren (siehe 5.18.1.5 oder 5.18.2.2).

9.2.2 Bestimmung der Analysenteilprobe

1 µl der Analysenteilprobe (9.1) unter Anwendung derselben Bedingungen wie bei der FAME-Standards-Kalibrierlösung in den Gaschromatographen injizieren.

9.2.3 Fettsäurenidentifizierung

Die Fettsäuren im Chromatogramm der Probenlösung sind durch Vergleich von deren Retentionszeiten mit denjenigen der entsprechenden Peaks in der Kalibrierstandardlösung (5.18) und im qualitativen Standardgemisch, das alle TFSs und CLA-Isomere enthält (siehe 5.13 und 5.17), zu identifizieren.

C18:1 TFA

Alle *trans*-Isomere von C18:1 sind nach Anhang B, Bild B.1 oder Bild B.2 zu identifizieren und zu gruppieren (dabei ist auch die Peakfläche von C18:1 *trans*-16 eluiert in der C18:1 *cis*-Region des Chromatogramms unmittelbar nach dem C18:1 *cis*-9 oder n-9 einzubeziehen).

ANMERKUNG 1 Bei Anwesenheit von MilCHFett werden zwei *trans*-Isomere von C18:1 in der C18:1 *cis*-Region des Chromatogramms (das C18:1 *trans*-15 und C18:1 *trans*-16) eluiert, mit der 100 m langen Kapillarsäule wird aber nur ein Isomer (das C18:1 *trans*-16) aufgelöst. Das zweite Isomer (C18:1 *trans*-15) wird in der Regel vom Ölsäure-Peak (C18:1 *cis*-9) überlagert, und seine Fläche lässt sich nur durch vorab erfolgende Trennung (d. h. TLC A⁺, HPLC A⁺), gefolgt von einer Kapillar-Gaschromatographie-Analyse quantifizieren. Jüngere Befunde haben gezeigt, dass sich bei Ausschluss der Peakfläche von C18:1 *trans*-15 (des nicht aufgelösten Peaks) von der Summenbildung keine signifikante Differenz zwischen den C18:1 TFS-Gesamtmenge im Vergleich zu dem nach einem vorab erfolgenden Trennungsverfahren gefolgt von einer Kapillar-Gas-Flüssigkeits-Chromatographie-Analyse erhaltenen Ergebnis ergibt. Dieses Phänomen lässt sich zum Teil durch die Anwesenheit einiger C18:1 *cis*-Isomere (d. h. *cis*-6–8) erklären, die mit der C18:1 *trans*-Region eluieren und infolgedessen indirekt zur Gesamtmenge der C18:1 TFS addiert werden. Der Beitrag dieser Isomere zur Gesamtmenge der C18:1 TFS dient als Ausgleich dafür, dass C18:1 *trans*-15 unberücksichtigt bleibt.

C18:2 TFA

Alle *trans*-Isomere der Linolsäure sind zu identifizieren und zu gruppieren (siehe Anhang B, Bilder B.1, B.2 und B.6). Zur Bestimmung der Gesamtmenge an TFS von C18:2 sind alle in der MilCHFettprobe enthaltenen *trans*-Isomere wie in Bild B.1 und Bild B.2 dargestellt einzubeziehen.

C18:3 TFA

Alle TFS der Linolensäure sind zu identifizieren und zu gruppieren (siehe Anhang B, Bilder B.1, B.2 und B.6).

ANMERKUNG 2 Enthält die Probe MilCHFett und/oder Fischöl, so eluiert ein anderes Isomer von C20:1 unmittelbar vor C20:1 *cis*-11 (oder *n*-9). Je nach der Säulenauflösung darf die Retentionszeit dieser Fettsäure auch einem *trans*-Isomer von C18:3 (d. h. C18:3 *cis*-9,*trans*-12,*cis*-15 oder C18:3 *trans*-9,*cis*-12,*cis*-15) entsprechen. Enthält die betreffende Zone von C18:3 TFS nur einen Peak, so entspricht dessen korrekte Identifizierung einem C20:1-Isomer. Werden in der betreffenden Zone von C18:3 TFS zwei, drei oder vier Peaks beobachtet, so werden alle diese Peakflächen in die Gesamtflächen von C18:3 TFS einbezogen (siehe die nachstehenden Regeln zur Elutionsreihenfolge und -bildung). Wechselwirkungen lassen sich möglicherweise auch zwischen C18:3 TFS-Isomeren (d. h. C18:3 *cis*-9,*cis*-12,*trans*-15; *cis*-9,*trans*-12,*cis*-15; oder *trans*-9,*cis*-12,*cis*-15) und C20:1 *cis*-11 (oder *n*-9) beobachten. Das C20:1 *cis*-11 (oder *n*-9) kann mit C18:3 *cis*-9,*trans*-12,*cis*-15 (dem untergeordneten C18:3 *trans*-Isomer) eluieren, sein Beitrag zur Gesamtmenge an C18:3 TFS ist jedoch vernachlässigbar. Falls allerdings C20:1 *cis*-11 (oder *n*-9) Wechselwirkungen mit C18:3 *cis*-9,*cis*-12,*trans*-15 oder mit C18:3 *trans*-9,*cis*-12,*cis*-15 zeigt, können die Chromatographiebedingungen geringfügig modifiziert werden, um eine ausreichende Trennung zu erzielen. Wechselwirkungen sind auch dann sichtbar, wenn das falsche Verhältnis zwischen C18:3 *cis*-9,*cis*-12,*trans*-15 und C18:3 *trans*-9,*cis*-12,*cis*-15 beobachtet wird (das Verhältnis zwischen diesen Isomeren beträgt immer annähernd 5 : 4).

ANMERKUNG 3 Die Kinetik der C18:3 *trans*-Isomerbildung in raffinierten und desodorierten Ölen wurde mit Hilfe einer hoch polaren Kapillarsäule analysiert und ist in der Fachliteratur ausführlich beschrieben. Sie lässt sich als Bestätigungswerkzeug zur Verifizierung der Anwesenheit von C18:3 *trans*-Isomeren nutzen. Am häufigsten wird eine Anzahl von höchstens vier *trans*-Isomeren von C18:3 beobachtet.

Fall 1 — Abwesenheit von C18:3 TFS-Isomeren

Kein Peak (für den Fall, dass nur ein Peak detektiert wird, siehe den oben stehenden Kommentar zur Anwesenheit eines anderen C20:1-Isomers in Milch). Dass nur ein einziges C18:3 *trans*-Isomer anwesend ist, ist nicht möglich.

Fall 2 — Anwesenheit von zwei C18:3 TFS-Isomeren (C18:3 *cis*-9,*cis*-12,*trans*-15 und C18:3 *trans*-9,*cis*-12,*cis*-15)

Die Peakfläche von C18:3 *trans*-9,*cis*-12,*cis*-15 beträgt annähernd 80 % der Peakfläche von C18:3 *cis*-9,*cis*-12,*trans*-15 (oder Verhältnis 5 : 4). Dieses Verhältnis ist immer konstant, wenn andere C18:3 *trans*-Isomere anwesend sind.

Fall 3 — Anwesenheit von drei C18:3 TFS-Isomeren (C18:3 *cis*-9,*cis*-12,*trans*-15; C18:3 *cis*-9,*trans*-12,*cis*-15; und C18:3 *trans*-9,*cis*-12,*cis*-15).

Wie oben für Fall 2 (zwei Isomere) beschrieben, jedoch in Anwesenheit von C18:3 *cis*-9,*trans*-12,*cis*-15. Die Peakfläche dieses *trans*-Isomers ist immer klein und liegt in einigen Fällen unterhalb der Quantifizierungsgrenze (LOQ, en: limit of quantification). Falls dieses *trans*-Isomer mit C20:1 *cis*-11 (*n*-9) oder einem anderen C20:1-Isomer koeluiert, ist sein Beitrag zur Gesamtmenge an C18:3 TFS vernachlässigbar.

Fall 4 — Anwesenheit von vier C18:3 TFS-Isomeren (C18:3 *trans*-9,*cis*-12,*trans*-15; C18:3 *cis*-9,*cis*-12,*trans*-15; C18:3 *cis*-9,*trans*-12,*cis*-15; und C18:3 *trans*-9,*cis*-12,*cis*-15).

Wie oben für Fall 3 (drei *trans*-Isomere) beschrieben, jedoch mit C18:3 *trans*-9,*cis*-12,*trans*-15. Dieses Isomer wird durch den teilweisen Abbau von C18:3 *cis*-9,*cis*-12,*trans*-15 und C18:3 *trans*-9,*cis*-12,*cis*-15 gebildet (die ersten beiden C18:3 *trans*-Isomere treten in desodorierten pflanzliche Ölen auf). Ist diese Menge $\geq 50\%$ der Peakfläche von C18:3 *cis*-9,*cis*-12,*trans*-15), so kann die Anwesenheit von anderen

C18:3 *trans*-Isomeren vermutet werden und außernormale Öl-Desodorisierungsbedingungen (d. h. hohe Temperatur und/oder lange Dauer) anzeigen. Siehe auch Anhang B, Bild B.6, das ein reales Beispiel einer Säuglingsnahrungsprobe zeigt, die aus desodorierten pflanzlichen Ölen stammendes C18:2 TFS und C18:3 TFS enthält.

Die Anwesenheit anderer C18:3 *trans*-Isomere kann durch Injektion des qualitativen Standardgemischs (5.17) bestätigt werden.

Bei der Angabe der TFS-Ergebnisse sind folgende Benennungen zu verwenden:

- C18:1 TFS ist die Gesamtmenge an *trans*-Positionalisomeren von C18:1;
- C18:2 TFS ist die Gesamtmenge an *trans*-Isomeren von C18:2 (Linolsäure) in desodorierten Ölen (d. h. C18:2 *trans*-9,*trans*-12, *cis*-9,*trans*-12, und *trans*-9,*cis*-12) und in Milchlamm (d. h. C18:2 *cis*-9,*trans*-13, C18:2 *trans*-8,*cis*-12 und C18:2 *trans*-11,*cis*-15);
- C18:3 TFS ist die Gesamtmenge an *trans*-Isomeren von C18:3 (Linolensäure) in desodorierten pflanzlichen Ölen (*trans*-9,*cis*-12,*trans*-15, *cis*-9,*cis*-12,*trans*-15, *cis*-9,*trans*-12,*cis*-15 und *trans*-9,*cis*-12,*cis*-15);
- Gesamtmenge an TFS ist die Gesamtmenge an C18:1 TFS, C18:2 TFS und C18:3 TFS.

ANMERKUNG 4 Das Verfahren hat das Ziel, sämtliche in Lebensmitteln enthaltenen (d. h. von Wiederkäuern oder durch Hydrierung erzeugten und/oder aus Öl-Desodorisationsprozessen stammenden) TFS zu quantifizieren. Dieses Verfahren hat nicht das Ziel, den Ursprung von C18:1- und C18:2-TFS (d. h. natürliche TFS gegenüber industriell hergestellten TFS) in komplexen Lebensmitteln zu bestimmen, die TFS verschiedenen Ursprungs (d. h. von Wiederkäuern stammendes Fett, hydrogenierte und desodorierte pflanzliche Öle) enthalten. Es kann eine Schätzung anhand der Verteilung und/oder des Verhältnisses der C18:1 *trans*-Isomere (d. h. C18:1 *trans*-9 und C18:1 *trans*-11) aus der Anwesenheit von aus dem Öl-Desodorisierungsprozess stammenden C18:2 TFS und C18:3 TFS und auch durch Betrachtung der Verteilung/Isotopenhäufigkeit einiger Fettsäuren im Verlauf des gesamten Fettsäurenprofils vorgenommen werden. Die Quantifizierung der TFS unterschiedlichen Ursprungs ist bei den einzelnen Ingredienzien genauer.

ANMERKUNG 5 Verzweigt-kettige Fettsäuren (d. h. gesättigte *iso*- und *anteiso*-methylverzweigte Fettsäuren) sind in Milchlamm ebenfalls enthalten, und sie eluieren mit anderen auftretenden Fettsäuren. In reinen Milchlamm weisen die am häufigsten auftretenden verzweigten Fettsäuren 14 bis 17 Kohlenstoffatome in der Kette auf und stellen zwischen 1 % und 2 % des Milchlammprofils dar. Daher wird diese Fettsäurenkategorie im Standard nicht berücksichtigt. Dennoch können entsprechende Peakflächen dieser Fettsäuren und/oder anderer nicht identifizierter Fettsäuren der Gesamtmenge der „anderen Fettsäuren“ (OFA) hinzugerechnet werden. Zu deren Quantifizierung kann ein Responsfaktor (Mittelwert der Responsfaktoren von C12:0 bis C24:0) angewendet werden. Für weitere Informationen siehe Anhang B, Bild B.7.

10 Berechnung und Darstellung der Ergebnisse

10.1 Berechnung

10.1.1 Berechnung des Responsfaktors

Es wird die Fläche der Peaks bestimmt, die sich den einzelnen in das Kalibrierstandardgemisch injizierten Fettsäuremethylestern zuordnen lassen (9.2.1), und es werden deren jeweilige Responsfaktoren (Rf_i) im Verhältnis zum internen Standard (C11:0) nach Gleichung (2) berechnet:

$$Rf_i = \frac{m'_i \times A'_0}{m'_0 \times A'_i} \quad (2)$$

Dabei ist

m'_i der Massenanteil von FAME_i in der Kalibrierstandardlösung (5.18.1.5 oder 5.18.2.2);

A'_0 die Peakfläche von C11:0 im Chromatogramm der Kalibrierstandardlösung;

m'_0 die Masse von C11:0 in der Kalibrierstandardlösung (5.18.1.5 oder 5.18.2.2);

A'_i die Peakfläche von FAME_i im Chromatogramm der Kalibrierstandardlösung.

Die Abweichung zwischen drei Injektionen gilt als optimal, wenn die Variationskoeffizienten kleiner als 2 % sind. Ein Beispiel für die Berechnung findet sich in Anhang B, Bild B.8.

ANMERKUNG Die für C18:2 *cis*-9,12 (oder *n*-6) berechneten Responsfaktoren können auf C-18:2 CLA (*cis*-9,*trans*-11) und die für C18:3 *cis*-9,12,15 (*n*-3) berechneten auf C18:3 *trans*-Isomere angewendet werden.

10.1.2 Fettsäuren im Erzeugnis

Der Massenanteil der einzelnen Komponenten wird nach Gleichung (3) berechnet und in g FA_i/100 g des in der Analysenprobe enthaltenen Erzeugnisses angegeben:

$$\text{gFA}_i/100 \text{ g product} = \frac{m_0 \times A_i \times R_{fi} \times S_i(\text{FA}) \times 100}{A_0 \times m} \quad (3)$$

Dabei ist

m_0 die Masse des der Probenlösung zugegebenen internen C11:0-Standards, in Milligramm;

A_i die Peakfläche von FAME_i im Chromatogramm der Probe;

R_{fi} der nach 10.1.1 berechnete Responsfaktor;

$S_i(\text{FA})$ der stöchiometrische Faktor zur Umrechnung von FAME_i in FA_i (Anhang B, Tabelle B.1);

A_0 die Peakfläche des internen C11:0-Standards im Chromatogramm der Probe;

m die Masse der Analysenmenge, in Milligramm.

Ein Beispiel für die Berechnung findet sich in Anhang B, Bild B.9.

ANMERKUNG 1 Falls die Fettsäurenanalyse an aus Lebensmitteln extrahiertem Fett erfolgt, entspricht die Masse der Analysenteilprobe, m , dem Fett und nicht dem Erzeugnis. Entsprechend werden die Fettsäureresultate mit dieser Gleichung in g FA/100 g Fett und nicht in g FA/100 g des Erzeugnisses angegeben. Die in g FA/100 g Fett erhaltenen Ergebnisse lassen sich anhand des nach einem geeigneten validierten Extraktionsverfahren ermittelten Fettextraktionswertes (g/100 g) in g FA/100 g des Erzeugnisses umrechnen. Der deklarierte Fettwert kann eine hohe Grenzabweichung im Verhältnis zum Fettextraktionswert haben, und es wird empfohlen, ihn nicht für die Angabe der Fettsäuren von Endprodukten heranzuziehen.

ANMERKUNG 2 Die den nicht identifizierten Fettsäuren entsprechenden Peakflächen können addiert und als Gesamtmenge der anderen Fettsäuren im Prüfbericht angegeben werden. Der Beitrag dieser Fettsäuren kann im Bereich von 0 g/100 g bis 5 g/100 g Fett (d. h. in Milchfett) schwanken und somit zur Gesamtmenge aller Fettsäuren beitragen. Die den Verunreinigungen (Materialien und Chemikalien, Proben oder Substanzen chromatographischen Ursprungs) entsprechenden Peaks können nicht die Gesamtmenge der OFA einbezogen werden.

10.1.3 Fettsäuren im gesamten Fett

Der Massenanteil der einzelnen Komponenten wird nach Gleichung (4) berechnet und in g FA_i/100 g des in der Analysenprobe enthaltenen Fetts angegeben:

$$\text{FA}_i/100 \text{ g fat} = \frac{\text{gFA}_i/100 \text{ g product} \times 100}{\% \text{ Fat}} \quad (4)$$

Diese Berechnung ist nur dann durchführbar, wenn der Fettgehalt nach einem geeigneten validierten Extraktionsverfahren ermittelt wurde. Der deklarierte Fettwert darf nicht zur Angabe der Fettsäuren in Endprodukten herangezogen werden.

10.1.4 Summe der Fettsäurenklasse oder -gruppe in 100 g des Erzeugnisses

Der Massenanteil aller einer Klasse oder Gruppe entsprechenden Fettsäuren ist in Übereinstimmung mit Anhang A, Tabelle A.1 durch einfache Addition der einzelnen (in g FA/100 g des Erzeugnisses angegebenen) Fettsäurenergebnisse nach Gleichung (5) zu berechnen:

$$\Sigma \text{FA} = \sum_{i=1}^n \text{g FA}_i / 100 \text{ g product} \quad (5)$$

10.1.5 Summe der Fettsäurenklasse oder -gruppe in 100 g Fett

Der Massenanteil aller einer Klasse oder Gruppe entsprechenden Fettsäuren ist in Übereinstimmung mit Anhang A, Tabelle A.1 durch einfache Addition der einzelnen (in g FA/100 g Fett angegebenen) Fettsäurenergebnisse nach Gleichung (6) zu berechnen:

$$\Sigma \text{FA} = \sum_{i=1}^n \text{g FA}_i / 100 \text{ g fat} \quad (6)$$

10.1.6 Umesterungsleistung

Die Peakflächen der beiden internen Standard-Peaks (Methylundecanoat und Propan-1,2,3-triyltridecanoat) in den analysierten Proben werden aufgezeichnet.

Die Umesterungsleistung *P_t* (en: performance of transesterification) wird aus der Rückgewinnung des Propan-1,2,3-triyltridecanoat als dem zweiten internen Standard nach Gleichung (7) berechnet und in % angegeben:

$$P_t = \frac{m_{c11} \times A_{c13} \times R_{c13} \times S_{c13}(\text{TAG})}{A_{c11} \times m_{c13}} \times 100 \quad (7)$$

Dabei ist

- m_{c11}* die Masse des der Lösung zugegebenen internen C-11:0-Standards, in Milligramm;
- A_{c13}* die Peakfläche des internen C-13:0-Standards im Chromatogramm;
- R_{c13}* der nach 10.1.1 berechnete Responsfaktor von C13:0 im Verhältnis zu C11:0;
- S_{c13}* der stöchiometrische Faktor zur Umrechnung von C13:0 FAME in C13:0 TAG (Anhang B, Tabelle B.1);
- A_{c11}* die Peakfläche des internen C-11:0-Standards im Chromatogramm;
- m_{c13}* die Masse des der Lösung zugegebenen internen C13:0 TAG-Standards, in Milligramm.

Die durch den Rückgewinnungswert von Propan-1,2,3-triyltridecanoat (C13:0 TAG) angezeigte Umesterungsleistung sollte $100,0 \% \pm 2,0 \%$ entsprechen. Ist die Umesterungsleistung $> 102,0 \%$ oder $< 98,0 \%$, so könnte das Problem folgende Ursachen haben:

- unvollständige Umesterung (d. h. Problem mit einem Reagens/einer Chemikalie);
- teilweiser Abbau des (der) internen Standards oder Probleme mit deren Reinheit/Stabilität;
- Probleme aufgrund der Auswirkungen der Probenmatrix.

ANMERKUNG Die Analyse einer Bezugsprobe kann dabei helfen, festzustellen, ob das Problem seine Ursache in Reagenzien und/oder Chemikalien oder in der analysierten Probe hat.

10.2 Angabe der Ergebnisse

Die Ergebnisse sind bei Angabe in g/100 g auf drei Dezimalstellen und bei der Angabe in mg/100 g auf eine Dezimalstelle anzugeben.

ANMERKUNG In g (oder mg)/100 g des Erzeugnisses angegebene Fettsäureergebnisse lassen sich in andere Ergebnisangabeformate g (oder mg) Fettsäuren/100 g Fett umwandeln:

- g (oder mg) Fettsäuren/100 g des wiederaufbereiteten Pulvers (d. h. 25 g Pulver in 200 g Wasser), des flüssigen (d. h. trinkfertigen) Erzeugnisses oder des im Massenverhältnis 1 : 1 verdünnten Flüssigkonzentrats;
- g (oder mg) Fettsäuren/Portion (je nach Portionsmasse).

11 Präzision

11.1 Ringversuch

Einzelheiten zu den nach ISO 5725-1 und ISO 5725-2 organisierten und ausgearbeiteten Ringversuchstudien zur Präzision des Verfahrens sind in Anhang C zusammengefasst.

Die Werte der Wiederhol- und der Vergleichsgrenze sind für das 95-%-Wahrscheinlichkeitsniveau angegeben und möglicherweise nicht auf andere als die angegebenen Konzentrationsbereiche und/oder Matrices anwendbar.

11.2 Wiederholpräzision

Die absolute Differenz zwischen zwei unabhängigen im selben Laboratorium von derselben Bedienungsperson mit Hilfe derselben Prüfeinrichtung nach demselben Verfahren unter Verwendung identischen Prüfmaterials innerhalb eines kurzen Zeitraums erhaltenen Einzelprüfergebnissen darf in höchstens 5 % der Fälle größer als der in Anhang C in den Tabellen C.1 und C.2 angegebene Wert r sein.

11.3 Vergleichpräzision

Die absolute Differenz zwischen zwei unabhängigen in verschiedenen Laboratorien von verschiedenen Bedienungspersonen mit Hilfe verschiedener Prüfeinrichtungen nach demselben Verfahren unter Verwendung identischen Prüfmaterials erhaltenen Einzelprüfergebnissen darf in höchstens 5 % der Fälle größer als der in Anhang C in den Tabellen C.1 und C.2 angegebene Wert R sein.

11.4 Nachweisgrenze

Unter den beschriebenen Bedingungen (Detektorempfindlichkeit, Rauschen, Probenverdünnung usw.) liegt die geschätzte und als das Dreifache der Standardabweichung des Hintergrundsignals (Rauschen) angegebene Nachweisgrenze bei näherungsweise 0,000 3 g/100 g des Erzeugnisses.

11.5 Quantifizierungsgrenze

Die Quantifizierungsgrenze für die einzelnen Fettsäuren beträgt jeweils 0,001 g/100 g des Erzeugnisses. Die Quantifizierungsgrenze entspricht dem niedrigsten Niveau, für das die robuste Wiederholpräzision mit zufriedenstellenden Ergebnissen errechnet wurde.

12 Prüfbericht

Der Prüfbericht muss mindestens die folgenden Angaben enthalten:

- a) alle Informationen, die für die vollständige Identifizierung der Probe erforderlich sind;
- b) das angewendete Probenahmeverfahren, sofern bekannt; mit Verweisung auf diese Internationale Norm, d. h. ISO 16958 | IDF 231;
- c) das angewendete Prüfverfahren in Verbindung mit einer Verweisung auf diese Internationale Norm;
- d) alle Einzelheiten zur Vorgehensweise, die in dieser Internationalen Norm nicht festgelegt sind oder als wahlfrei angesehen werden, in Verbindung mit Einzelheiten zu allen Vorkommnissen, die Einfluss auf das (die) Prüfergebnis(se) gehabt haben können;
- e) das (die) erhaltene(n) Prüfergebnis(se).

Anhang A (normativ)

Fettsäuregruppen oder -klassen und einzelne Fettsäuren

A.1 Fettsäuregruppe oder -klasse

A.1.1 *trans*-Fettsäuren

Trans-Fettsäuren (TFS) sind sämtliche Fettsäuren, die eine oder mehrere nichtkonjugierte Doppelbindungen in *trans*-Konfiguration enthalten (die Gesamtmenge enthält nur C18:1, C18:2 und C18:3 *trans*).

ANMERKUNG In der Fachliteratur wurde über die Anwesenheit anderer in Milchfett natürlich vorkommender *trans*-Isomere (z. B. C16:1 *trans*) berichtet, deren Beiträge haben jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Gesamtmenge an *trans*-Fettsäuren in Milcherzeugnissen. Dazu kommt, dass sich deren Identifizierung eher kompliziert gestaltet, weil diese Isomere häufig Wechselwirkungen mit anderen (z. B. *cis*-, *iso*- und *anteiso*-)Isomeren von Fettsäuren unterliegen und daher eine vorab erfolgende Trennung oder die Anwendung spezieller Bedingungen bei der Chromatographie notwendig machen.

A.1.2 Konjugierte Linolsäuren

Konjugierte Linolsäuren (CLA) sind sämtliche Octadecadiensäuren, die konjugierte Doppelbindungen in *cis*- oder *trans*-Konfiguration enthalten; dabei handelt es sich hauptsächlich um *cis*-9, *trans*-11 Octadecadiensäure (d. h. Rumensäure). CLA gehören nicht zur Gesamtmenge an TFSs.

A.1.3 Gesättigte Fettsäuren

Gesättigte Fettsäuren (SFA) sind sämtliche Fettsäuren ohne Doppelbindungen.

A.1.4 Einfach ungesättigte Fettsäuren

Einfach ungesättigte Fettsäuren (MUFA) sind sämtliche Fettsäuren, die eine Doppelbindung in *cis*-Konfiguration enthalten.

A.1.5 Mehrfach ungesättigte Fettsäuren

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA) sind sämtliche Fettsäuren, die zwei oder mehr Doppelbindungen in *cis*-Konfiguration enthalten.

ANMERKUNG LC-PUFA ist die Gattungsbezeichnung zur Beschreibung der langkettigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Diese Fettsäuren sind eine Teilmenge der PUFA (d. h. Arachidon-, Eicosapentaen- und Docosahexaensäure).

A.1.6 Omega-3-Fettsäuren

Omega-3-Fettsäuren sind sämtliche mehrfach ungesättigten *cis*-Fettsäuren, die die erste Doppelbindung am Kohlenstoff n-3 (ω -3) von der terminalen Methylgruppe haben.

A.1.7 Omega-6-Fettsäuren

Omega-6-Fettsäuren sind sämtliche mehrfach ungesättigten *cis*-Fettsäuren, die die erste Doppelbindung am Kohlenstoff n-6 (ω -6) von der terminalen Methylgruppe haben.

A.1.8 Omega-9-Fettsäuren

Omega-9-Fettsäuren sind sämtliche mehrfach ungesättigten *cis*-Fettsäuren, die die erste Doppelbindung am Kohlenstoff n-9 (ω -9) von der terminalen Methylgruppe haben.

A.2 Einzelne Fettsäuren

A.2.1 Linolsäure

Linolsäure (LA) ist eine essentielle Fettsäure, eine 18 Kohlenstoffatome enthaltende Fettsäure mit zwei Doppelbindungen am Kohlenstoff 9 und 12 (C18:2 alle *cis*-9,12), die auch als C18:2 n-6 (ω -6) bezeichnet wird.

A.2.2 Linolensäure

Linolensäure (ALA), auch α -Linolensäure genannt, ist eine essentielle Fettsäure, eine 18 Kohlenstoffatome enthaltende Fettsäure mit drei Doppelbindungen am Kohlenstoff 9, 12 und 15 (C18:3 alle *cis*-9,12,15), die auch als C18:3 n-3 (ω -3) bezeichnet wird.

A.2.3 Arachidonsäure

Arachidonsäure (ARA) ist keine essentielle Fettsäure, sondern eine 20 Kohlenstoffatome enthaltende Fettsäure mit vier Doppelbindungen am Kohlenstoff 5, 8, 11 und 14 (C20:4 alle *cis*-5,8,11,14), die auch als C20:4 n-6 (ω -6) bezeichnet wird.

A.2.4 Eicosapentaensäure

Eicosapentaensäure (EPA) ist eine semi-essentielle Fettsäure (essentiell für Schwangere und Kleinkinder), eine 20 Kohlenstoffatome enthaltende Fettsäure mit fünf Doppelbindungen am Kohlenstoff 5, 8, 11, 14 und 17 (C20:5 alle *cis*-5,8,11,14,17), die auch als C20:5 n-3 (ω -3) bezeichnet wird.

A.2.5 Docosahexaensäure

Docosahexaensäure (DHA) ist eine semi-essentielle Fettsäure (essentiell für Schwangere und Kleinkinder), eine 22 Kohlenstoffatome enthaltende Fettsäure mit sechs Doppelbindungen an den Kohlenstoffatomen 4, 7, 10, 13, 16 und 19 (C22:6 alle *cis*-4,7,10,13,16,19), die auch als C22:6 n-3 (ω -3) bezeichnet wird.

Tabelle A.1 — Konfiguration und Gruppen von Fettsäuren

Kettenlänge	Konfiguration und Gruppe			Systematischer Name	Trivialname	Abkürzung
C4:0			SFA	Butan	Butter	
C6:0			SFA	Hexan	Capron	
C8:0			SFA	Octan	Capryl	
C10:0			SFA	Decan	Caprin	
C12:0			SFA	Dodecan	Laurin	
C14:0			SFA	Tetradecan	Myristin	
C14:1	ω -5 (oder n-5)	<i>cis</i>	MUFA	Δ 9-Tetradecen	Myristolein	
C15:0			SFA	Pentadecan		
C15:1	ω -5 (oder n-5)	<i>cis</i>	MUFA	Δ 10-Pentadecen		
C16:0			SFA	Hexadecan	Palmitin	

Kettenlänge	Konfiguration und Gruppe			Systematischer Name	Trivialname	Abkürzung
C16:1	ω -7 (oder n-7)	<i>cis</i>	MUFA	Δ 9-Hexadecen	Palmitolein	
C17:0			SFA	Heptadecan		
C17:1	ω -7 (oder n-7)	<i>cis</i>	MUFA	Δ 10-Heptadecen		
C18:0			SFA	Octadecan	Stearin	
C18:1 TFA		<i>trans</i> ^a		Sämtliche C18:1 <i>trans</i> -Isomere	Das gesamte <i>trans</i> 4 bis 16-Octadecen	
C18:1	ω -9 (oder n-9)	<i>cis</i>	MUFA	Δ 9-Octadecen	Olein	
C18:2 TFA		<i>trans</i> ^a		Sämtliche C18:2 <i>trans</i> -Isomere	Das gesamte <i>trans</i> 9,12-Octadecadien in desodorierten Ölen und die aus Milhfett stammenden <i>trans</i> (d. h. C18:2 <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -13, C18:2 <i>trans</i> -8, <i>cis</i> -12 und C18:2 <i>trans</i> -11, <i>cis</i> -15)	
C18:2	ω -6 (oder n-6)	<i>cis</i>	PUFA	Δ 9,12-Octadecadien	Linol	LA
C18:2 CLA	ω -7 (oder n-7)	<i>cis/trans</i>	PUFA	Δ 9,11-Octadecadien	Rumen	CLA
C18:3	ω -6 (oder n-6)	<i>cis</i>	PUFA	Δ 6,9,12-Octadecatrien	Gammalinolen	
C18:3 TFA		<i>trans</i> ^a		Sämtliche C18:3 <i>trans</i> -Isomere	Alle <i>trans</i> -9,12,15-Octadecatrien	
C18:3	ω -3 (oder n-3)	<i>cis</i>	PUFA	Δ 9,12,15-Octadecatrien	Linolen	ALA
C20:0			SFA	Eicosan	Arachin	
C20:1	ω -9 (oder n-9)	<i>cis</i>	MUFA	Δ 11-Eicosen	Gondo	
C20:2	ω -6 (oder n-6)	<i>cis</i>	PUFA	Δ 11,14-Eicosadien		
C20:3	ω -6 (oder n-6)	<i>cis</i>	PUFA	Δ 8,11,14-Eicosatrien	Dihomogammalinolen (DHGLA)	
C20:3	ω -3 (oder n-3)	<i>cis</i>	PUFA	Δ 11,14,17-Eicosatrien		
C20:4	ω -6 (oder n-6)	<i>cis</i>	PUFA	Δ 5,8,11,14-Eicosatetraen	Arachidon	ARA
C20:5	ω -3 (oder n-3)	<i>cis</i>	PUFA	Δ 5,8,11,14,17-Eicosapentaen	Eicosapentaen	EPA
C21:0			SFA	Heneicosan		
C22:0			SFA	Docosan	Behen	
C22:1	ω -9 (oder n-9)	<i>cis</i>	MUFA	Δ 13-Docosen	Eruca	
C22:2	ω -6 (oder n-6)	<i>cis</i>	PUFA	Δ 13,16-Docosadien		
C22:6	ω -3 (oder n-3)	<i>cis</i>	PUFA	Δ 4,7,10,13,16,19-Docosahexaen	Docosahexaen	DHA
C24:0			SFA	Tetracosan	Lignocerin	
C24:1	ω -9 (oder n-9)	<i>cis</i>	MUFA	Δ 15-Tetracosen	Nervon	

^a *trans*-Fettsäuren dürfen nicht in die MUFA- und PUFA-Gesamtmenen einbezogen werden.

Tabelle A.2 — Abkürzungen

FAME	Fettsäuremethylester	MUFA	Einfach ungesättigte Fettsäuren
FA	Fettsäure	PUFA	Mehrfach ungesättigte Fettsäuren
GLC	Gas-Flüssigkeits-Chromatographie	LC-PUFA	Langkettige mehrfach ungesättigte Fettsäuren
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether	ω -3 (oder n-3)	Omega-3-Fettsäuren
MeOH	Methanol	ω -6 (oder n-6)	Omega-6-Fettsäuren
R	Auflösungsfaktor	ω -9 (oder n-9)	Omega-9-Fettsäuren
HF	Responsfaktor	LA	Linolensäure (C18:2 alle <i>cis</i> -9,12 oder n-6)
RT	Retentionszeit	ALA	Linolensäure (C18:3 alle <i>cis</i> -9,12,15 oder n-3), auch als α -Linolensäure bezeichnet
TAG	Triacylglycerol	ARA (AA)	Arachidonsäure (C20:4 alle <i>cis</i> -5,8,11,14,17 oder n-6)
TFS	<i>trans</i> -Fettsäure	EPA	Eicosapentaensäure (C20:5 alle <i>cis</i> -5,8,11,14,17 oder n-3)
CLA	Konjugierte Linolsäure (C18:2 <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11), auch als Rumensäure bezeichnet	DHA	Docosahexaensäure (C22:6 alle <i>cis</i> -4,7,10,13,16,19 oder n-3)
SFA	Gesättigte Fettsäuren	OFA	Andere Fettsäuren (Gesamt Mengen der unbekannten [d. h. nicht identifizierten], weniger wichtigen, weniger häufig vorkommenden oder nicht betrachteten [d. h. verzweigten] Fettsäuren). OFA sind in den TFS-, SFA-, MUFA- und PUFA-Gesamt Mengen nicht enthalten.

Anhang B (informativ)

Beispiele für die Analyse mittels Gas-Flüssigkeits-Chromatographie

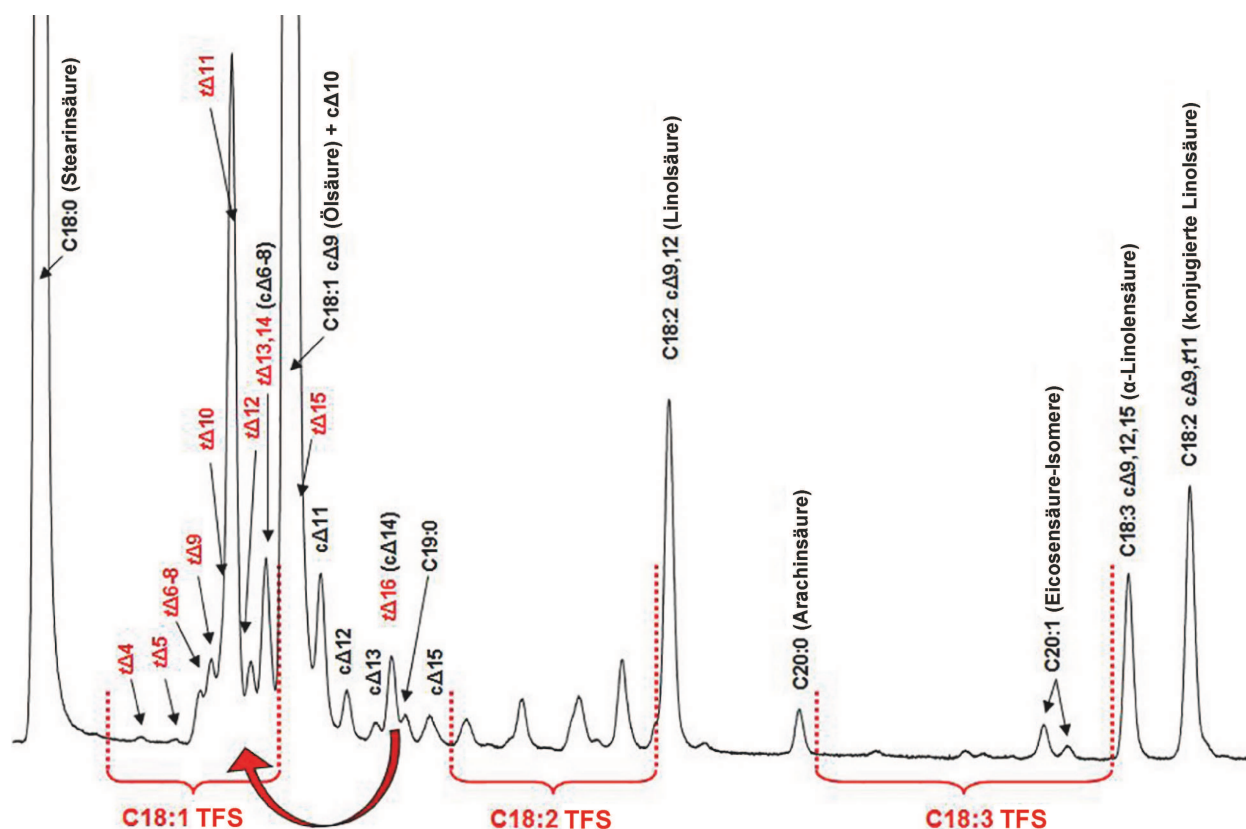


Bild B.1 — Beispiel für das GC-Chromatogramm eines Milcherzeugnisses (vergrößerte Darstellung von C18:1 TFS, C18:2 TFS, C18:3 TFS und CLA) bei Split-Injektion

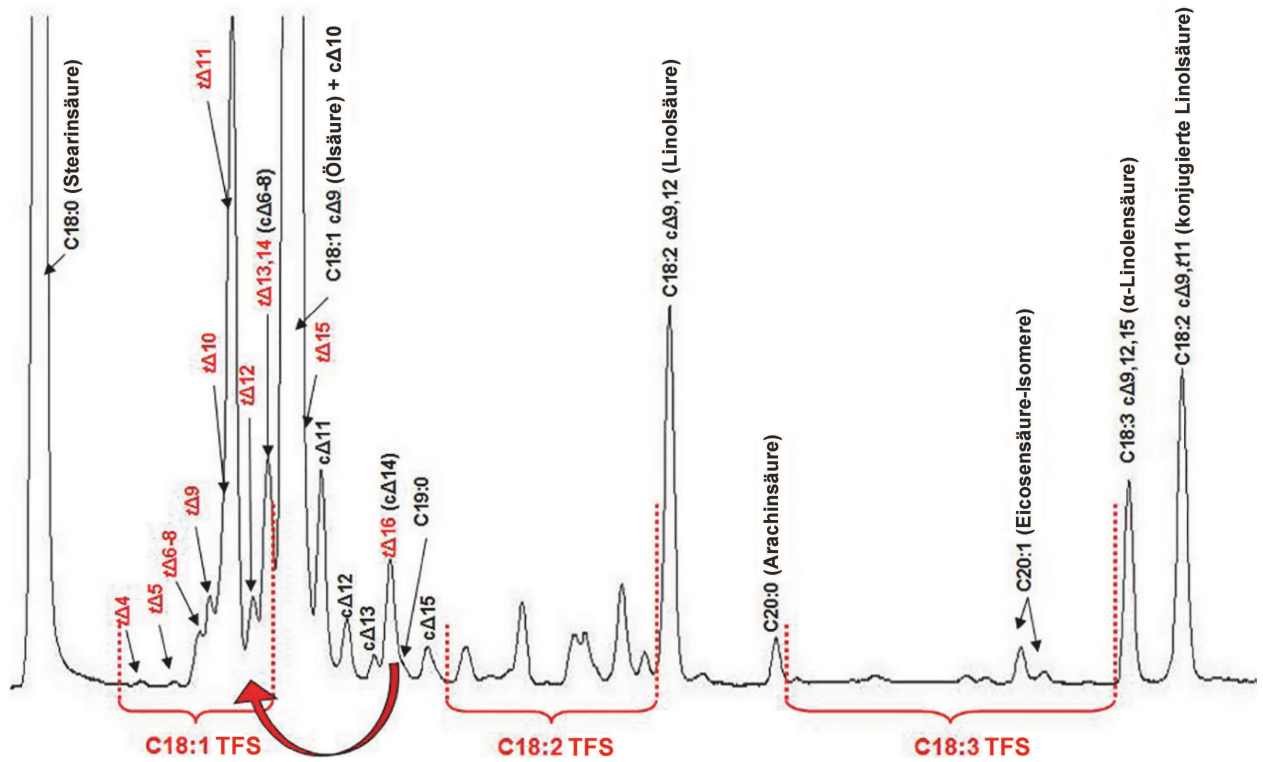


Bild B.2 — Beispiel für das GC-Chromatogramm eines Milcherzeugnisses (vergrößerte Darstellung von C18:1 TFS, C18:2 TFS, C18:3 TFS und CLA) bei On-Column-Injektion

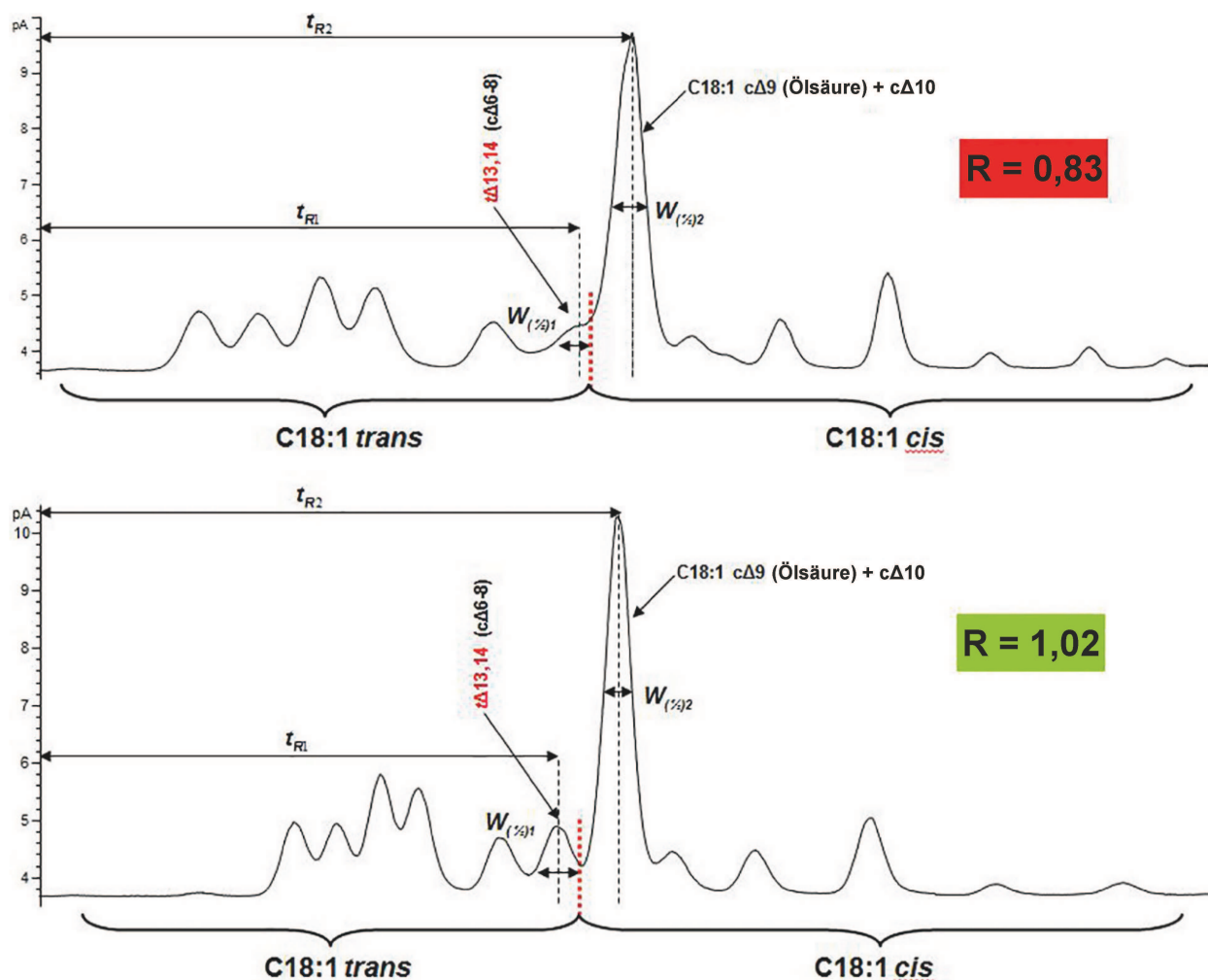


Bild B.3 — Beispiel für das GC-Chromatogramm (mangelnde und ausreichende Auflösung zwischen C18:1 *cis*- und *trans*-Isomeren)