

DIN EN ISO 17678

ICS 67.100.10

Einsprüche bis 2018-01-03
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN ISO 17678:2010-06

Entwurf

**Milch und Milcherzeugnisse –
Bestimmung der Reinheit des MilCHFetts durch gaschromatographische
Triglyceridanalyse (Referenzverfahren) (ISO/DIS 17678:2017);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 17678:2017**

Milk and milk products –

Determination of milk fat purity by gas chromatographic analysis of triglycerides (Reference method) (ISO/DIS 17678:2017);

German and English version prEN ISO 17678:2017

Lait et produits laitiers –

Détermination de la pureté des matières grasses laitières par analyse chromatographique en phase gazeuse des triglycérides (Méthode de référence) (ISO/DIS 17678:2017);

Version allemande et anglaise prEN ISO 17678:2017

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2017-11-03 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, Burggrafenstr. 6, 10787 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 67 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)



Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 17678:2017) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ (Sekretariat: AFNOR, Frankreich) in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 302 „Milch und Milcherzeugnisse — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ (Sekretariat: NEN, Niederlande) dem Internationalen Milchwirtschaftsverband (IDF) erarbeitet. Beim IDF ist dieses Dokument unter der Bezeichnung IDF 202 veröffentlicht worden.

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

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 1211	siehe	DIN EN ISO 1211
ISO 2450	siehe	DIN EN ISO 2450
ISO 3696	siehe	DIN ISO 3696
ISO 7328	siehe	DIN EN ISO 7328
ISO 5725-1	siehe	DIN ISO 5725-1
ISO 5725-2	siehe	DIN ISO 5725-2

Änderungen

Gegenüber DIN EN ISO 17678:2010-06 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Anwendungsbereich um eine detailliertere Beschreibung der Methode ergänzt sowie die Liste der Fälle, die falsch positive Ergebnisse hervorrufen können, um den Fall stark unterernährter Kühe und den Fall Käse, der eine verstärkte Lipolyse zeigt, erweitert;
- b) Abschnitt 2 „Normative Verweisungen“ aktualisiert;
- c) Unterabschnitt 8.1.5 „Isolierung von Käse“ neu aufgenommen;
- d) Literaturverzeichnis aktualisiert;
- e) Norm redaktionell überarbeitet.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

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

DIN EN ISO 2450, *Sahne — Bestimmung des Fettgehaltes — Gravimetrisches Verfahren (Referenzverfahren)*

DIN EN ISO 7328, *Speiseeis und Eis-Mischungen auf Milchbasis — Bestimmung des Fettgehaltes — Gravimetrisches Verfahren (Referenzverfahren)*

DIN ISO 3696, *Wasser für analytische Zwecke; Anforderungen und Prüfungen*

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: Ein grundlegendes Verfahren für die Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichspräzision von festgelegten Meßverfahren*

— Leerseite —

**Milch und Milcherzeugnisse — Bestimmung der Reinheit des Milchfetts
durch gaschromatographische Triglyceridanalyse (Referenzverfahren)
(ISO/DIS 17678:2017)**

Lait et produits laitiers — Détermination de la pureté des matières grasses laitières par analyse chromatographique en phase gazeuse des triglycérides (Méthode de référence) (ISO/DIS 17678:2017)

Milk and milk products — Determination of milk fat purity by gas chromatographic analysis of triglycerides (Reference method) (ISO/DIS 17678:2017)

ICS:

Deskriptoren:

Dokument-Typ: Europäische Norm
Dokument-Untertyp:
Dokumentstufe: parallele Umfrage
Dokumentsprache: D

STD Version 2.8l

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Vorwort	5
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	8
3 Begriffe	8
4 Kurzbeschreibung	8
5 Reagenzien	8
6 Geräte	9
7 Probenahme	11
8 Durchführung	11
8.1 Herstellung der Untersuchungsproben	11
8.1.1 Allgemeines	11
8.1.2 Isolierung aus Butter oder Butteröl	11
8.1.3 Extraktion nach dem gravimetrischen Verfahren nach Röse-Gottlieb	11
8.1.4 Extraktion aus Milch mit Kieselgel-Säulen	11
8.1.5 Isolierung aus Käse	12
8.2 Herstellung der Fettproben-Lösung	12
8.3 Chromatographische Triglyceridbestimmung	12
8.3.1 Basisliniendrift	12
8.3.2 Einspritztechnik	12
8.3.3 Kalibrierung	13
8.3.4 Chromatographische Bedingungen	14
9 Integration, Auswertung und Überwachung des analytischen Leistungsverhaltens	15
10 Berechnung und Auswertung	17
10.1 Triglyceridzusammensetzung	17
10.1.1 Berechnung	17
10.1.2 Angabe der Untersuchungsergebnisse	17
10.2 S-Werte	18
10.2.1 Berechnung	18
10.2.2 Angabe der Untersuchungsergebnisse	18
10.3 Nachweis von Fremdfett	18
11 Präzision	19
11.1 Ringversuch	19
11.2 Wiederholpräzision	19
11.3 Vergleichpräzision	20
12 Prüfbericht	20
Anhang A (normativ) Herstellung der gepackten Säule	21
A.1 Reagenzien, Geräte und Materialien	21
A.2 Silanisierung (Deaktivierung der Glasoberfläche)	21
A.3 Füllen	22
A.4 Konditionierung	23

Anhang B (informativ) Quantitative Bestimmung des Fremdfett-Gehalts.....	25
B.1 Allgemeines	25
B.2 Berechnung.....	26
B.3 Angabe der Untersuchungsergebnisse.....	27
Anhang C (informativ) Messunsicherheit.....	28
C.1 Erweiterte Messunsicherheit.....	28
Anhang D (informativ) Ringversuch.....	29
Literaturhinweise.....	32

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 17678:2017) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 302 „Milch und Milcherzeugnisse —Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wird EN ISO 17678:2010 ersetzen.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/DIS 17678:2017 wurde von CEN als prEN ISO 17678:2017 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.

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

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34, *Food products*, Unterkomitee SC 5 *Milk and milk products*, in Zusammenarbeit mit der International Dairy Federation (IDF) erarbeitet. Es wird von ISO und IDF gemeinsam veröffentlicht.

Bei der **IDF (International Dairy Federation)** handelt es sich um eine private, gemeinnützige Organisation, welche auf globaler Ebene die Interessen verschiedener Stakeholder der Milchwirtschaft vertritt. Die Mitglieder der IDF sind in nationalen Komitees organisiert, die als landesweite Vereinigungen aus Interessenvertretern der nationalen Milchwirtschaft bestehen. Hierzu zählen unter anderem Molkereibetriebe, die milchverarbeitende Industrie, Lieferanten von Molkereiprodukten, Wissenschaftler und Regierungsstellen sowie Lebensmittelbehörden.

ISO und IDF arbeiten in allen Belangen der Normung von Probenahme- und Analyseverfahren bei Milch und Milcherzeugnissen eng zusammen. Seit 2001 veröffentlichen ISO und IDF gemeinsam ihre Internationalen Normen. Dabei verwenden sie die Logos und Verweisnummern beider Organisationen.

Besonders zu beachten ist, dass einige der Elemente dieses Dokuments Gegenstand von Patentrechten sein 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 empfangenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Alle in diesem Dokument verwendeten Handelsnamen werden als Information zum Nutzen der Anwender angegeben und stellen keine Empfehlung dar.

ISO 17678 | IDF 202 wurde von der International Dairy Federation (IDF) und vom Technischen Komitee ISO/TC 34, *Food products*, Unterkomitee SC 5, *Milk and milk products*, erarbeitet. Diese Norm wird von ISO und IDF gemeinsam veröffentlicht.

Alle Arbeiten wurden vom Joint ISO IDF Action Team C23 des Standing Committee on Analytical Methods for Composition unter Federführung seines Projektleiters, J. Molkentin (Deutschland) durchgeführt.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Referenzverfahren zur Bestimmung der Reinheit des Milchfetts durch gaschromatographische Triglyceridanalyse fest. Bei diesem Verfahren werden die Unterschiede zwischen dem Triglycerid-Fingerprint von Milchfett und den individuellen Triglycerid-Fingerprints anderer Fette und Öle zur Bestimmung von Proben analysiert, die außerhalb des bei Milchfett üblicherweise festgestellten Bereichs liegen. Dies wird anhand von festgelegten Triglyceridgleichungen erreicht, die auf der normalisierten gewichteten Summe der einzelnen Triglyceridspitzen beruht, die auf die Integrität des Milchfetts reagieren. Die Integrität des Milchfetts kann durch Vergleiche der Ergebnisse dieser Gleichungen mit den zuvor bei einer Reihe reiner Milchfettproben beobachteten Ergebnissen bestimmt werden. Es können sowohl pflanzliche als auch tierische Fette wie Rindertalg und Schweinefett nachgewiesen werden.

Grundsätzlich gilt das Verfahren für Sammelmilch oder daraus hergestellte Produkte, unabhängig von Abweichungen bei den allgemeinen Fütterungs-, Zucht- oder Laktationsbedingungen. Insbesondere ist das Verfahren auf Fett anwendbar, das aus Milchprodukten extrahiert wurde, die reines Milchfett in unveränderter Zusammensetzung enthalten sollen, wie z. B. Butter, Sahne, Milch und Milchpulver.

Jedoch kann in den nachstehend erwähnten Fällen ein falsch-positives Ergebnis ermittelt werden. Deshalb ist das Verfahren nicht anwendbar auf Milchfett,

- a) das aus anderer Milch als Kuhmilch gewonnen wurde;
- b) das von einzelnen Kühen gewonnen wurde;
- c) das von Kühen gewonnen wurde, deren Futter einen besonders hohen Pflanzenölanteil aufwies, wie Raps-, Baumwollsaamen- oder Palmöl usw.;
- d) das von Kühen gewonnen wurde, die an erheblicher Unterernährung leiden (starkes Energiedefizit);
- e) das aus Kolostrum (Vormilch) gewonnen wurde;
- f) das einer technologischen Behandlung unterzogen wurde, wie z. B. dem Entfernen von Cholesterol oder einer Fraktionierung;
- g) das aus Magermilch, Buttermilch oder Molke gewonnen wurde;
- h) das aus Käse mit hoher Fettspaltung gewonnen wurde;
- i) das mit Verfahren nach Gerber, Weibull-Berntrop oder Schmid-Bondzynski-Ratzlaff extrahiert oder mittels Detergenzien isoliert wurde [z. B. mit dem Bureau of Dairy Industries (BDI)-Verfahren].

Mit den in Punkt i) festgelegten Extraktionsverfahren können beträchtliche Mengen von Partialglyceriden oder Phospholipiden in die Fettphase übertreten.

ANMERKUNG 1 In der Natur kommt Buttersäure (*n*-Butansäure) (C4) ausschließlich im Milchfett vor und ermöglicht quantitative Abschätzungen von geringen bis mittleren Anteilen von Milchfett in pflanzlichen und tierischen Fetten. Aufgrund der großen Schwankungen von C4, deren ungefähre Gehalt von etwa 3,1 % Massenanteil bis 3,8 % Massenanteil reicht, ist es schwierig, qualitative und quantitative Aussagen für einen Massenanteil von bis zu 20 % Fremdfett in reinem Milchfett zu treffen (siehe Literaturhinweis [11]).

ANMERKUNG 2 In der Praxis können keine quantitativen Ergebnisse über den Sterolgehalt von Pflanzenfetten erhalten werden, da dieser von den Herstellungs- und Verarbeitungsbedingungen abhängig ist. Darüber hinaus ist die qualitative Bestimmung von Fremdfett mittels Sterolen nicht eindeutig.

ANMERKUNG 3 Aufgrund spezieller Fütterungspraktiken, wie beispielsweise zu den Punkten c) und d), wurden bei Milch aus bestimmten asiatischen Ländern bisweilen falsch-positive Ergebnisse gemeldet. [15] Auch die ausschließliche Grasfütterung, wie bei Gebirgs- und insbesondere Hochlandhaltung, kann bisweilen zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Dies geht aus dem Vorhandensein von konjugierter Linolsäure (C18:2 c9t11) mit einem Masseanteil von $\geq 1,3$ % hervor (siehe Literaturhinweise [16] und [17]). Dennoch werden Ergebnisse, die den in dieser Norm festgelegten Kriterien für die Reinheit des Milchfetts entsprechen auch dann akzeptiert, wenn die Proben zweifelsfrei unter den in dieser Anmerkung gemeldeten Bedingungen, einschließlich denen in Punkt h), hergestellt wurden.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden zitierten Dokumente 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 1211, *Milk — Determination of fat content — Gravimetric method (Reference method)*

ISO 1740, *Milkfat products and butter — Determination of fat acidity (Reference method)*

ISO 2450, *Cream — Determination of fat content — Gravimetric method (Reference method)*

ISO 3696, *Water for analytical laboratory use — Specification and test methods*

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

ISO 7328, *Milk-based edible ices and ice mixes — Determination of fat content — Gravimetric method (Reference method)*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

3.1
Reinheit des Milchfetts
Nichtvorhandensein von pflanzlichen und tierischen Fetten, bestimmt nach dem in dieser Internationalen Norm festgelegten Verfahren

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Reinheit wird mittels *S*-Werten bestimmt, die aus dem Gehalt der Triglyceride berechnet werden. Die Massenanteile der Triglyceride werden in Prozent angegeben.

4 Kurzbeschreibung

Das aus der Milch oder aus Milchprodukten extrahierte Fett wird gaschromatographisch (GC) mit einer gepackten Säule oder einer kurzen Kapillarsäule untersucht, um die Triglyceride (TG), getrennt nach Gesamtkohlenstoffzahlen, zu bestimmen. Durch Einsetzen der prozentualen Massenanteile der verschiedenen großen Fettmoleküle (C24 bis C54, wobei nur die geraden C-Zahlen verwendet werden), in geeignete TG-Gleichungen werden die *S*-Werte berechnet. Falls die *S*-Werte außerhalb der für reines Milchfett aufgestellten Grenzwerte liegen, ist die Zugabe von Fremdfett nachgewiesen.

ANMERKUNG 1 Die Eignung und die Gleichwertigkeit von gepackten Säulen und Kapillarsäulen wurden bereits nachgewiesen (siehe Literaturhinweise [8] bis [10]).

ANMERKUNG 2 Ein *S*-Wert ist die Summe von gewichteten TG-Massenanteilen.

5 Reagenzien

Sofern nicht anders festgelegt, sind für die Untersuchung nur Reagenzien von anerkannter Analysenreinheit zu verwenden.

5.1 Wasser, entsprechend den Anforderungen von ISO 3696, Qualität 2.

5.2 Trägergas, Stickstoff oder wahlweise Helium oder Wasserstoff, jeweils mit einem Reinheitsgrad von mindestens 99,995 % Volumenanteil.

5.3 Fett-Standards, Reinheitsgrad mindestens 99 % Massenanteil, zum Standardisieren eines MilCHFett-Standards wie in Abschnitt 8.3.3 beschrieben.

5.3.1 Triglycerid-Standards, gesättigt; geeignete Produkte sind im Handel erhältlich.

5.3.2 Cholesterol-Standard.

5.4 Methanol (CH_3OH), mit einem Wassergehalt von höchstens 0,05 % Massenanteil.

5.5 n-Hexan [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$].

5.6 n-Heptan [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$].

5.7 Andere Gase, Wasserstoff, Reinheit mindestens 99,995 % Volumenanteil, frei von organischen Verunreinigungen ($\text{C}_n\text{H}_m < 1 \mu\text{l/l}$), synthetische Luft, frei von organischen Verunreinigungen ($\text{C}_n\text{H}_m < 1 \mu\text{l/l}$).

5.8 Wasserfreies Natriumsulfit (Na_2SO_4).

6 Geräte

Übliche Laboratoriumsausstattung und besonders Folgendes.

6.1 Hochtemperaturgaschromatograph, geeignet für Einsatz bei Temperaturen von mindestens 400 °C und ausgerüstet mit einem Flammenionisationsdetektor (FID). Bei der Kapillar-GC ist ein On-column-Injektor oder ein PTV-Injektor (en: programmed temperature vaporization, temperaturprogrammierte Verdampfung) unabdingbar, während ein Split-Injektor ungeeignet ist.

Die im Injektor verwendeten Septa müssen hohen Temperaturen standhalten und ein sehr geringes „Bluten“ aufweisen. Für den Anschluss der Säule sowie für die Einsätze im Injektor und/oder Detektor (wo zutreffend) sind grundsätzlich Graphitdichtungen zu verwenden.

6.2 Chromatographiesäule.

6.2.1 Gepackte Säule, Glassäule, mit einem Innendurchmesser von 2 mm und einer Länge von 500 mm, gepackt mit einer stationären Phase von 3 % OV-1 auf 125 μm bis 150 μm (100 mesh bis 120 mesh) Gas ChromQ ¹⁾.

Herstellung, Silanisierung, Packung und Konditionierung der gepackten Säule sind in Anhang A beschrieben.

Alternativ darf eine Kapillarsäule verwendet werden (6.2.2).

1) Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Internationalen Norm und bedeutet keine Anerkennung dieses genannten Produktes durch ISO und IDF.

6.2.2 Kapillarsäule, kurz, z. B. mit einer Länge von 5 m, mit einer unpolaren stationären Phase, die Temperaturen von bis zu 400 °C oder mehr standhalten kann²⁾.

Die Säule wird konditioniert, indem 20 Analysen einer MilCHFett-Lösung (8.2) innerhalb von nicht mehr als zwei Tagen mit den in Abschnitt 8.3.4.2 angegebenen Einstellungen durchgeführt werden. Danach wird sichergestellt, dass die Response-Faktoren (8.3.3) nahe 1 liegen und nicht höher als 1,250 0 sind.

Wegen der veränderlichen Überlappung zwischen C24 und Cholesterol darf ein höherer Response-Faktor für C24 akzeptiert werden.

Säulen mit anderen Maßen und einer anderen nichtpolaren, hoch temperaturbeständigen Phase dürfen verwendet werden, solange deren Leistungsverhalten mit dieser Internationalen Norm übereinstimmt. Jedoch ist die Säulenlänge durch die notwendige Begrenzung der Auflösung, wie in Bild 1 dargestellt, eingeschränkt. Siehe auch 8.3.4.2.

6.3 Extrelut-Säule¹⁾, mit einem Fassungsvermögen von 1 ml bis 3 ml, mit Kieselgel gefüllt, nur zur Extraktion von MilCHFett nach Abschnitt 8.1.4 benötigt.

6.4 Graphitdichtungen, geeignet, um Temperaturen von mindestens 400 °C standzuhalten, verwendet für den Anschluss der GC-Säule sowie für die Einsätze im Injektor und/oder Detektor.

6.5 Wasserbad, mit dem eine Temperatur von 50 °C ± 2 °C aufrechterhalten werden kann.

6.6 Wärmeschrank, der bei 50 °C ± 2 °C und 100 °C ± 2 °C betrieben werden kann.

6.7 Mikroliterpipette.

6.8 Messpipette, mit einem Fassungsvermögen von 5 ml, in Übereinstimmung mit ISO 835 (siehe Literaturhinweis [2]), Klasse A.

6.9 Rundkolben, mit einem Fassungsvermögen von 50 ml.

6.10 Erlenmeyerkolben, mit einem Nennvolumen von 250 ml.

6.11 Trichter.

6.12 Feinporiges Filterpapier.

6.13 Rotationsverdampfer.

6.14 Ampullen, mit einem Nennvolumen von 1 ml, ausgestattet mit einer mit Polytetrafluorethylen abgedichteten Aluminiumbördelkappe oder einer Schraubkappe.

6.15 Injektionsspritze, deren Kolben nicht bis in die Nadelspitze reicht (GC mit gepackter Säule).

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

6.16 Analysenwaage, geeignet zum Wägen auf 1 mg, mit einer Ablesbarkeit von 0,1 mg.

2) CP-Ultimetel SimDist (5 m, 0,53 mm, 0,17 µm) ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Internationalen Norm und bedeutet keine Anerkennung dieses genannten Produktes durch ISO und IDF.

7 Probenahme

Die Probennahme ist nicht Bestandteil des in dieser Internationalen Norm beschriebenen Verfahrens. Ein empfohlenes Probenahmeverfahren ist in ISO 707 | IDF 50 angegeben. [1]

Dem Labor sollte eine repräsentative Probe zur Verfügung gestellt werden. Sie sollte während des Transports oder der Lagerung nicht beschädigt oder verändert werden.

8 Durchführung

8.1 Herstellung der Untersuchungsproben

8.1.1 Allgemeines

Zur Vorbereitung der Untersuchungsproben wird eines der in 8.1.2 bis 8.1.5 festgelegten Verfahren zur Isolierung oder Extraktion des Milchfetts angewendet.

8.1.2 Isolierung aus Butter oder Butteröl

50 g bis 100 g der Untersuchungsprobe werden in einem auf 50 °C eingestellten Wasserbad (6.5) oder Wärmeschrank (6.6) geschmolzen.

0,5 g bis 1,0 g Natriumsulfat (5.7) werden auf ein gefaltetes Filterpapier (6.12) gegeben. Ein 250-ml-Erlenmeyerkolben (6.10) und ein Trichter (6.11) mit dem eingelegten Filterpapier mit Natriumsulfat werden im Wärmeschrank (6.6) vorgewärmt, der auf 50 °C eingestellt ist.

In Fällen, bei denen eine begrenzte Menge der Probe vorhanden ist, kann eine kleinere Untersuchungsprobe verwendet werden und das Verfahren sollte demgemäß angepasst werden.

Jedoch ist die Verarbeitung einer kleineren Untersuchungsmenge mit einem höheren Risiko verbunden, eine nicht repräsentative Probe zu erhalten.

Die Fettschicht der geschmolzenen Probe wird, während der vorgewärmte Kolben mit Trichter und eingesetztem Filterpapier im Wärmeschrank verbleibt, filtriert. Es ist darauf zu achten, dass kein Serum übertragen wird.

ANMERKUNG 1 Butter kann aus Sahne durch Buttern und gründliches Waschen des erhaltenen Butterkorns gewonnen werden.

ANMERKUNG 2 Das mit dem in diesem Unterabschnitt beschriebenen Verfahren gewonnene Milchfett ist weitgehend phospholipidfrei.

8.1.3 Extraktion nach dem gravimetrischen Verfahren nach Röse-Gottlieb

Die Fettfraktion wird nach einem der in ISO 1211 | IDF 1, ISO 2450 | IDF 16 oder ISO 7328 | IDF 116 festgelegten gravimetrischen Verfahren aus der Untersuchungsprobe extrahiert.

8.1.4 Extraktion aus Milch mit Kieselgel-Säulen

Von einer auf 20 °C temperierten Untersuchungsprobe werden 0,7 ml mit einer Mikroliterpipette (6.7) auf eine 1-ml- bis 3-ml-Extrelut-Säule (6.3) gegeben. Die Probe ist für eine gleichmäßige Verteilung etwa 5 min auf dem Kieselgel zu belassen.

Zur Denaturierung der Protein-Lipid-Komplexe werden mit einer Messpipette (6.8) 1,5 ml Methanol (5.4) auf die Extrelut-Säule gegeben. Anschließend wird die Fettfraktion mit 20 ml *n*-Hexan (5.5) aus der Untersuchungsprobe extrahiert. Das *n*-Hexan wird dabei langsam portionsweise zugegeben. Das ablaufende

Lösemittel wird in einem zuvor bis zur Massenkonzanz getrockneten 50-ml-Rundkolben (6.9) mit bekannter, auf 1 mg gewogener und 0,1 mg erfasster Masse gesammelt.

Nach der Extraktion ist die Säule leerlaufen zu lassen. Die Lösemittel werden aus dem Eluat mit einem Rotationsverdampfer (6.13) bei einer Wasserbadtemperatur zwischen 40 °C und 50 °C abdestilliert.

Nach dem Abdestillieren der Lösemittel werden der Rundkolben und dessen Inhalt getrocknet und anschließend auf 1 mg gewogen, die Masse wird auf 0,1 mg erfasst. Die sich ergebende Fettmasse (Ausbeute) wird durch Subtraktion der Masse des trockenen, leeren Rundkolbens von der erhaltenen Masse ermittelt.

In Abhängigkeit vom Fettgehalt der Milch und der erforderlichen Konzentration der Probenlösung wird geprüft, ob es notwendig ist, die Ausbeuten von zwei oder mehreren Extraktionen zu vereinigen, um eine geeignete Menge an Fett zu erhalten.

8.1.5 Isolierung aus Käse

Die Käsefettfraktion wird mithilfe des in ISO 14156 | IDF 172 angegebenen Verfahrens aus der Untersuchungsprobe extrahiert. Bei Käse, der üblicherweise höhere Lipolysewerte aufweist, was häufig bei schimmel- oder lang gereiften Käsesorten auftritt, wird die Fettazidität anhand des in ISO 1740 | IDF 6 angegebenen Verfahrens festgestellt. Falls die Azidität über 8 mmol/100 g Fett liegt, ist diese Norm nicht geeignet (siehe Literaturhinweise [18] und [19]).

8.2 Herstellung der Fettproben-Lösung

Für die Gaschromatographie mit einer gepackten Säule wird eine 5%ige Lösung (Volumenanteil) des nach 8.1.2, 8.1.3 oder 8.1.4 gewonnenen Fetts in *n*-Hexan (5.5) oder *n*-Heptan (5.6) hergestellt. In Abhängigkeit von den Abmessungen der Säule wird für On-column-Injektion auf eine Kapillarsäule eine Konzentration von 1 % (0,53 mm innerer Durchmesser [ID] „Widebore“) oder niedriger eingesetzt.

Bei Verwendung der nach 8.1.4 hergestellten Fettprobe wird die der Untersuchungsprobe im Kolben zuzusetzende Menge Lösemittel (5.5 oder 5.6) anhand der Masse des erhaltenen Fetts ermittelt.

Das Fett wird vollständig im verwendeten Lösemittel gelöst. Hierzu werden 0,5 ml bis 1 ml der erhaltenen Fettproben-Lösung in eine Ampulle (6.14) gegeben.

8.3 Chromatographische Triglyceridbestimmung

8.3.1 Basisliniendrift

Zur Verringerung des Anstiegs der Basislinie muss die Säule nach den Angaben in 6.2.2 (Kapillarsäule) oder in Abschnitt A.4 (gepackte Säule) konditioniert werden.

ANMERKUNG Auf Grund der hohen Temperaturen der Säule ist die Analyse von TG besonders anfällig für einen Anstieg der Basislinie im Bereich hoher Kohlenstoffzahlen.

8.3.2 Einspritztechnik

8.3.2.1 Gepackte Säule

Um Diskriminierungseffekte zu vermeiden und die Quantifizierung von hochsiedenden TG-Komponenten zu verbessern, wird die „hot needle“-Technik verwendet.

Die Fettlösung wird in der Spritze hochgezogen, um die Nadel mit Luft zu füllen. Die Nadel wird in den Injektor eingeführt. Vor dem Einspritzen wird die Nadel etwa 3 s erwärmt. Danach wird der Spritzeninhalt schnell injiziert.

8.3.2.2 Kapillarsäule

Bei der Anwendung einer kalten On-column-Injektion (8.3.4.2) wird die Nadel der Spritze eingeführt und die Injektion unmittelbar danach vorgenommen. Die anschließende Verweilzeit der Nadel in der Injektionsöffnung sollte derart sein, dass ein breites „Tailing“ des Lösemittelpeaks vermieden wird.

ANMERKUNG Die optimale Verweilzeit beträgt typischerweise etwa 3 s.

8.3.3 Kalibrierung

8.3.3.1 Allgemeines

Für die Kalibrierung von Untersuchungsproben werden zu Beginn jedes Arbeitstages zwei bis drei Analysen eines standardisierten MilCHFetts durchgeführt. Die letzte Analyse des standardisierte MilCHFetts wird zur Bestimmung der Response-Faktoren, f_i , (Massenanteil geteilt durch Flächenanteil) der TG und des Cholesterols verwendet, die auf die folgenden Untersuchungsproben angewendet werden (siehe Abschnitt 10.1):

$$f_i = \frac{w_i \times \sum A_i}{\sum w_i \times A_i} \quad (1)$$

Dabei ist

w_i der Massenanteil jedes TG oder von Cholesterol im standardisierten MilCHFett, angegeben in Prozent;

A_i der Zahlenwert der Peakfläche jedes TG oder von Cholesterol im standardisierten MilCHFett.

Die Response-Faktoren werden auf vier Dezimalstellen angegeben.

Es wird entweder nach 8.3.3.2 oder 8.3.3.3 verfahren, um ein standardisiertes MilCHFett mit einer bekannten TG-Zusammensetzung zu erhalten.

8.3.3.2 Handelsüblicher MilCHFett-Standard

Es wird ein standardisiertes MilCHFett mit einer zertifizierten TG-Zusammensetzung³⁾ verwendet, um den Response-Faktor jedes Bestandteils der Untersuchungsprobe zu bestimmen.

8.3.3.3 Laboreigener MilCHFett-Standard

Es wird etwa 1 g einer Mischung der Fett-Standards (5.3) – die mindestens die gesättigten TG, C24, C30, C36, C42, C48 und C54 sowie Cholesterol enthält, zuzüglich vorzugsweise C50 und C52 – durch Wägen auf 1 mg und Erfassen der Masse auf 0,1 mg derart hergestellt, dass eine relative TG-Zusammensetzung erhalten wird, die der von MilCHFett ähnelt.

Eine Lösung der Mischung der Fett-Standards in *n*-Hexan (5.5) oder *n*-Heptan (5.6) wird wiederholt nach Abschnitt 8.3.4 analysiert. In der gleichen Analysenfolge wird wiederholt ein durchschnittlich zusammengesetztes MilCHFett analysiert.

3) CRM 519 (wasserfreies MilCHFett) ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Internationalen Norm und bedeutet keine Anerkennung dieses genannten Produktes durch ISO und IDF.

Die Response-Faktoren der TG werden aus der Mischung der Fett-Standards bestimmt. Dazwischen liegende Response-Faktoren von TG, die nicht in der Mischung enthalten sind, können durch mathematische Interpolation berechnet werden. Die erhaltenen Response-Faktoren werden auf das MilCHFett angewendet, um eine standardisierte Zusammensetzung zu erhalten.

Das so erhaltene standardisierte MilCHFett hat bei Lagerung unter Stickstoff und einer Aufbewahrungstemperatur von höchstens –18 °C eine Haltbarkeitsdauer von mehreren Jahren.

8.3.4 Chromatographische Bedingungen

Die Verwendung von gepackten oder Kapillarsäulen führt im Allgemeinen zu einer Auflösung ähnlich der in Bild 1. Die Aufspaltung von geradzahigen TG ist üblicherweise nicht zu beobachten und muss vermieden werden.

8.3.4.1 Gepackte Säule

8.3.4.1.1 Die Verwendung von gepackten Säulen führt im Allgemeinen zu einer Auflösung ähnlich der in Bild 1. Die Aufspaltung von geradzahigen TG ist üblicherweise nicht zu beobachten und muss vermieden werden.

8.3.4.1.2 Temperaturprogrammierung: Die Anfangstemperatur des Ofens wird auf 210 °C eingestellt. Für 1 min wird der Ofen auf dieser Temperatur gehalten. Anschließend wird die Temperatur mit einer Geschwindigkeit von 6 °C/min auf 350 °C erhöht. Diese (End-)Temperatur wird für 5 min beibehalten.

8.3.4.1.3 Detektor- und Injektortemperaturen: Werden jeweils auf 370 °C eingestellt.

8.3.4.1.4 Trägergas: Es wird Stickstoff mit einem konstanten Durchfluss von etwa 40 ml/min verwendet. Der genaue Trägergasstrom wird so eingestellt, dass C54 bei 341 °C eluiert wird.

8.3.4.1.5 Dauer der Analyse: 29,3 min.

8.3.4.1.6 Injektionsvolumen: Es werden 0,5 µl einer 5%igen (Volumenanteil) Probenlösung eingespritzt.

8.3.4.1.7 Wenn keine TG-Analysen durchgeführt werden, werden dennoch die in 8.3.4.1.2 angegebenen Anfangstemperatur des Ofens, die Detektor- und Injektortemperatur wie in 8.3.4.1.3 und der Trägergasstrom wie in 8.3.4.1.4 konstant gehalten, auch über Nacht sowie an Wochenenden und Feiertagen. Dadurch wird das beste Leistungsverhalten der Säule sichergestellt.

8.3.4.2 Kapillarsäule

8.3.4.2.1 Die Verwendung von Kapillarsäulen führt im Allgemeinen zu einer Auflösung ähnlich der in Bild 1. Die Aufspaltung von geradzahigen TG ist üblicherweise nicht zu beobachten und muss vermieden werden.

8.3.4.2.2 Temperaturprogramm: die Anfangstemperatur des Ofens wird auf 80 °C eingestellt. Für 0,5 min wird der Ofen auf dieser Temperatur gehalten. Danach wird die Temperatur mit einer Geschwindigkeit von 50 °C/min auf 190 °C und anschließend mit einer Geschwindigkeit von 6 °C/min auf 350 °C erhöht. Diese (End-)Temperatur wird für 5 min beibehalten.

8.3.4.2.3 Detektortemperatur: Wird auf 370 °C eingestellt.

8.3.4.2.4 Trägergas: Es wird Stickstoff mit einem konstanten Durchfluss von etwa 3 ml/min verwendet.

8.3.4.2.5 Dauer der Analyse: 34,4 min.

8.3.4.2.6 Injektionsvolumen: Es werden 0,5 µl einer 1%igen (Volumenanteil) Probenlösung eingespritzt.

8.3.4.2.7 Die Einstellungen werden während der Betriebsbereitschaft beibehalten, um das beste Leistungsverhalten sicherzustellen (siehe **8.3.4.1.7**).

Bei Anwendung der „cool On-column-Injektion“ wird die Injektortemperatur entsprechend der Ofentemperatur eingestellt („oven track mode“), um die besten Ergebnisse zu erhalten.

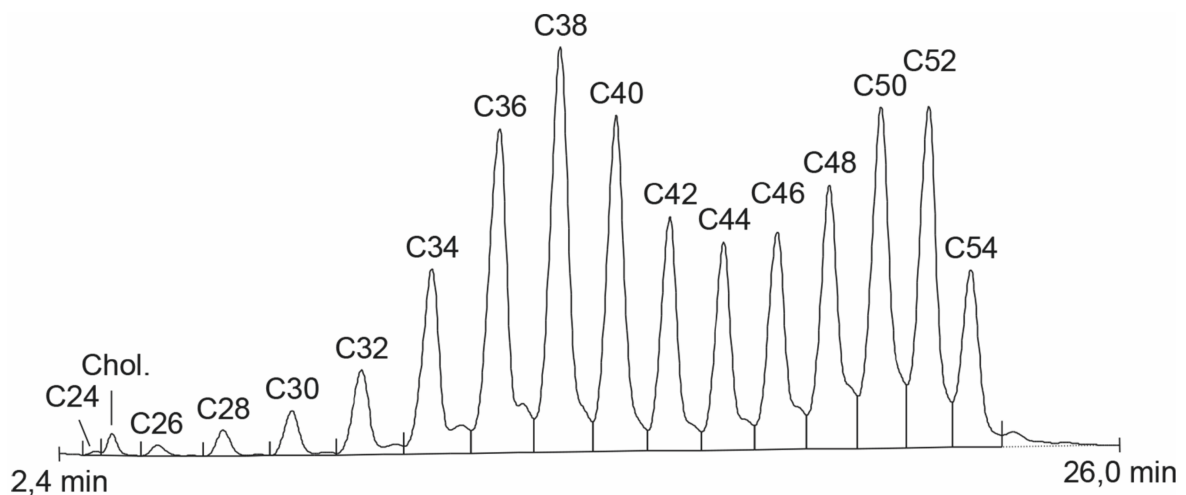
Die in 8.3.4.2 angegebenen Einstellungen sind geeignet für die On-column-Injektion auf „Widebore“-Säulen (0,53 mm ID) wie in Abschnitt 6.2.2 angegeben. Andere Bedingungen dürfen angewendet werden, falls mit anderen Säulenmaßen oder Phasen gearbeitet wird. Der Anwendungsbereich schließt die Verwendung der „Ultrafast-GC“-Technik ein. [14] In jedem Fall wird eine geeignete Auflösung, die eine unerlässliche Anforderung darstellt, beachtet (Bild 1).

9 Integration, Auswertung und Überwachung des analytischen Leistungsverhaltens

Die Peaks der Chromatogramme werden mit einem Integrationssystem ausgewertet, das in der Lage ist, eine Basislinie einzuzeichnen und eine Reintegration vorzunehmen.

Bild 1 zeigt ein Beispiel eines fehlerfrei integrierten Chromatogramms, während in Bild 2 ein sporadisch auftretender Fehler in der Basislinie, die nach C54 aufhört, dargestellt ist, der die prozentualen Anteile aller TG beeinflusst. Trotzdem werden Peaks aus der Auswertung ausgeschlossen, die nach C54 eluiert werden.

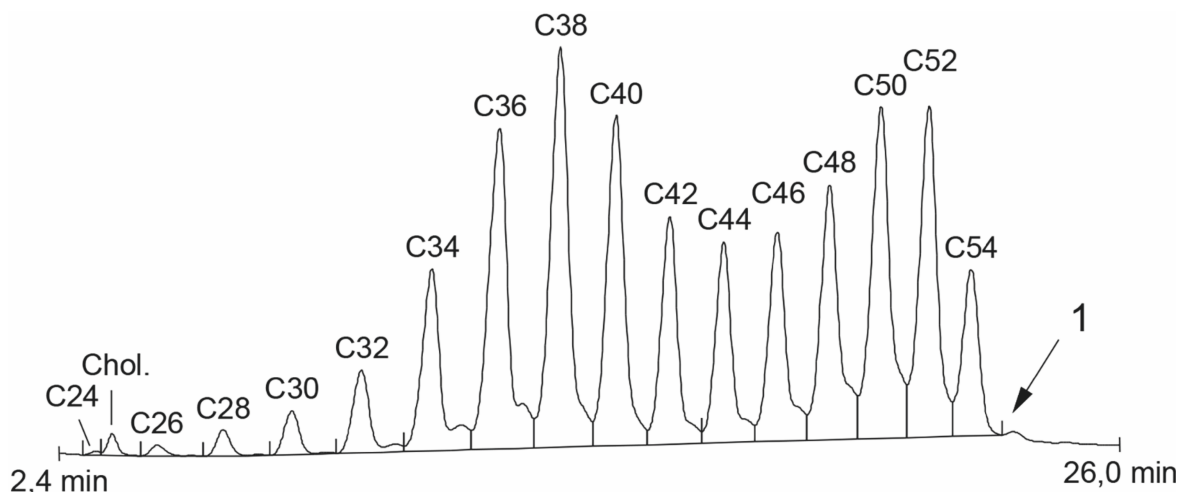
TG mit ungerader Acyl-C-Zahl ($2n + 1$) werden mit dem jeweils vorangehenden geradzahligen Triglycerid ($2n$) zusammengefasst. Der geringe C56-Anteil wird nicht berücksichtigt. Die prozentualen Flächenanteile der verbleibenden TG, einschließlich Cholesterol, werden mit den entsprechenden Response-Faktoren des standardisierten MilCHFetts (letzte Kalibrierung) multipliziert und nach 10.1 zusammen auf 100 % festgelegt.



Legende

Chol.: Cholesterol

Bild 1 — Beispiel für ein Triglycerid-Chromatogramm von MilCHFett mit ordnungsgemäß festgelegter Basislinie



Legende

Chol.: Cholesterol

1: nicht ordnungsgemäß festgelegter Basislinien-Endpunkt

Bild 2 — Beispiel für ein Triglycerid-Chromatogramm von MilCHFett mit nicht ordnungsgemäß festgelegter Basislinie

Zur Kontrolle der Messbedingungen werden die Variationskoeffizienten, C_V , angegeben in Prozent, der verschiedenen aus mindestens 10 Analysen ermittelten TG mit den in Tabelle 1 angegebenen verglichen, die auf 19 aufeinander folgenden Analysen derselben MilCHFettprobe beruhen.

Wenn die Werte der ermittelten C_V erheblich höher sind als die in Tabelle 1 angegebenen Werte, sind die chromatographischen Bedingungen ungeeignet.

ANMERKUNG Die in Tabelle 1 angeführten Werte sind nicht verbindlich, sie sind jedoch zum Zweck der Qualitätskontrolle indikativ.

Wenn jedoch höhere C_V -Werte zugelassen werden, müssen die in Abschnitt 11 angegebenen Wiederhol- und Vergleichsgrenzen trotzdem eingehalten werden.

Tabelle 1 — Variationskoeffizienten für die Gehalte an Triglyceriden

Triglycerid	Variationskoeffizien C_V %
C24	10,00
C26	2,69
C28	3,03
C30	1,76
C32	1,03
C34	0,79
C36	0,25
C38	0,42
C40	0,20
C42	0,26
C44	0,34
C46	0,37
C48	0,53
C50	0,38
C52	0,54
C54	0,75

10 Berechnung und Auswertung

10.1 Triglyceridzusammensetzung

10.1.1 Berechnung

Der Massenanteil, w_i , angegeben als prozentualer Anteil, von jedem TG (für $i = \text{C24, C26, C28, C30, C32, C34, C36, C38, C40, C42, C44, C46, C48, C50, C52 bis C54}$) zuzüglich Cholesterol am Gesamtgehalt der TG der Untersuchungsprobe, wird nach der folgenden Gleichung (2) berechnet:

$$w_i = \frac{A_i \times f_i}{\sum(A_i \times f_i)} \times 100 \quad (2)$$

Dabei ist

A_i der Zahlenwert der Peakfläche jedes TG in der Untersuchungsprobe;

f_i der durch die Kalibrierung (8.3.3) bestimmte Response-Faktor jedes TG.

10.1.2 Angabe der Untersuchungsergebnisse

Die Untersuchungsergebnisse werden auf zwei Dezimalstellen angegeben.