

DIN EN ISO 22184



ICS 67.100.01

Einsprüche bis 2019-11-13

Entwurf

**Milch und Milcherzeugnisse –
Bestimmung des Zuckergehalts –
Hochleistungs-Anionenaustausch-Chromatographieverfahren
(HPAEC-PAD) (ISO/DIS 22184:2019);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 22184:2019**

Milk and milk products –
Determination of the sugar contents –
High performance anion exchange chromatographic method (HPAEC-PAD)
(ISO/DIS 22184:2019);
German and English version prEN ISO 22184:2019

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2019-09-13 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 61 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 22184:2019) 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 (Niederlande) gehalten wird.

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 5725-2:1994 siehe DIN ISO 5725-2:2002-12

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN ISO 5725-2:2002-12, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 2: Grundlegende Methode für die Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision eines vereinheitlichten Messverfahrens (ISO 5725-2:1994 einschließlich Technisches Korrigendum 1:2002)*

**Milch und Milcherzeugnisse — Bestimmung des Zuckergehalts —
Hochleistungs-Anionenaustausch-Chromatographieverfahren (HPAEC-PAD)
(ISO/DIS 22184:2019)**

Milk and milk products — Determination of the sugar contents — High performance anion exchange chromatographic method (HPAEC-PAD) (ISO/DIS 22184:2019)

ICS:

Deskriptoren:

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

STD Version 2.9p

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Vorwort	4
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Kurzbeschreibung	6
4 Reagenzien	6
5 Geräte	9
6 Probenahme	11
7 Vorbereitung des Prüfmusters	11
7.1 Allgemeines	11
7.2 Probenherstellung bei gezuckerter Kondensmilch	11
7.2.1 Proben kürzlich hergestellter Produkte, in denen keine merkliche Trennung von Bestandteilen zu erwarten ist	11
7.2.2 Proben älterer Produkte, in denen eine Trennung von Bestandteilen erwartet werden kann	12
8 Durchführung	12
8.1 Probenextraktion und -reinigung	12
8.1.1 Allgemeines	12
8.1.2 Probenextraktion und -reinigung	12
8.2 Chromatographische Analyse	14
9 Berechnung und Angabe der Ergebnisse	16
10 Präzision	16
10.1 Allgemeines	16
10.2 Wiederholpräzision	16
10.3 Vergleichspräzision	19
11 Prüfbericht	21
Anhang A (informativ) Typisches Chromatogramm	22
Anhang B (informativ) Präzisionsdaten	23
Anhang C (informativ) Genauigkeitsdaten	28
Literaturhinweise	31

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 22184:2019) 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.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/DIS 22184:2019 wurde von CEN als prEN ISO 22184:2019 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, en: World Trade Organization) hinsichtlich technischer Handelshemmnisse (TBT, en: Technical Barriers to Trade) berücksichtigt, siehe 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.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Auflistung dieser Institute ist unter www.iso.org/members.html zu finden.

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.

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.

Dieses Dokument wurde von dem IDF *Standing Committee on Analytical Methods for Composition* und vom Technischen Komitee ISO/TC 34, *Food products*, Unterkomitee SC 5, *Milk and milk products*, erarbeitet. Es wird von ISO und IDF gemeinsam veröffentlicht.

Die Arbeiten wurden vom IDF/ISO Action Team C22 des *Standing Committee on Analytical Methods for Composition* unter Federführung seines Projektleiters, Herrn H. Cruijssen (NL) durchgeführt.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung spezifischer Zucker (Galactose, Glucose, Fructose, Sucrose, Lactose und Maltose) in Milch und verschiedenen Milchprodukten mittels Flüssigkeits-Chromatographie unter Anwendung von Arabinose als internationalen Standard fest. Das Verfahren gilt für die folgenden unterschiedlichen Molkerei-Grundsubstanzen: Milch, Milchpulver, Käse, Molkenpulver, Säuglingsnahrung, Milchdessert und Joghurt.

Sojahlaktige Molkereiprodukte sind ausgenommen. Die Bestimmung des Lactosegehalts in lactosearmen Milchprodukten wird ebenfalls nicht behandelt.

Es wird ein Verfahren der Hochleistungs-Anionenaustausch-Chromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) angewendet.

Mit diesem Verfahren können die folgenden dreizehn Mono- und Disaccharide getrennt werden: Fucose, Arabinose, Galactose, Glucose, Fructose, Sucrose, Lactose, Lactulose, Maltose, Melibiose, Trehalose, Isomaltulose (z. B. PalatinoseTM) und Maltotriose.

Das Verfahren dient insbesondere dem Zweck der Kennzeichnung der sechs wichtigsten Zuckerarten, die in Milch und Milchprodukten natürlich oder durch Zusatz vorkommen können. Das Verfahren ist nicht auf Zuckeranteile kleiner als 0,1 % anwendbar.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

EN ISO 3696, *Wasser für analytische Laborzwecke — Spezifikation und Prüfverfahren*

3 Kurzbeschreibung

Die in der Probe enthaltenen Zucker werden mithilfe einer wässrigen Pufferlösung aus Ethanol extrahiert, um mögliche probiotische Aktivitäten zu unterbinden. Das erhaltene Extrakt wird mittels Carrez-Klärung deproteinisiert. Nach der Klärung wird die Lösung verdünnt, und die vorhandenen Zucker werden durch Hochleistungs-Anionenaustausch-Chromatographie (HPAEC) getrennt und quantitativ bestimmt. Um die Sensitivität und Stabilität des gepulsten amperometrischen Detektors (PAD) zu verbessern, wurde dem HPAEC-Abfluss eine Natriumhydroxidlösung mit gepulster amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) hinzugefügt. GOS und Fructane haben keinen Einfluss aufeinander. Arabinose wird als internationaler Standard für die Quantifizierung der Zucker angewendet.

4 Reagenzien

Sofern nicht anders festgelegt, sind nur Reagenzien von anerkannter Analysenreinheit und Wasser nach EN ISO 3696 zu verwenden.

4.1 Wasser, EN ISO 3696, Grad 3, entsprechend.

4.2 Natriumhydroxidgranulat (NaOH).

4.3 Wässrige Natriumhydroxidlösung, Substanzkonzentration $c = 1 \text{ mol/l}$.

Einem 1 000-ml-Messkolben sind $40 \text{ g} \pm 1 \text{ g}$ NaOH-Granulat (4.2) hinzuzufügen, in etwa 500 ml Wasser aufzulösen und nach dem Abkühlen bis zur Marke mit Wasser zu verdünnen und zu homogenisieren.

4.4 Wässrige Natriumhydroxidlösung, $c = 4 \text{ mol/l}$.

Einem 1 000-ml-Messkolben sind $160 \text{ g} \pm 1 \text{ g}$ NaOH-Granulat (4.2) hinzuzufügen, in etwa 500 ml Wasser aufzulösen und nach dem Abkühlen bis zur Marke mit Wasser zu verdünnen und zu homogenisieren.

4.5 Natriumhydroxid, Massenanteil $w(\text{NaOH}) = 33 \%$ in Wasser.

4.6 Natriumhydroxid, $w(\text{NaOH}) = 50 \%$ in Wasser.

Das Reagenz sollte die Mindestmenge von Carbonat und Quecksilber enthalten. Die Lösung darf vor Gebrauch weder geschüttelt noch gerührt werden.

4.7 Konzentrierte Salzsäure, 36 % bis 38 %.

4.8 Wässrige Salzsäurelösung, $c = 1 \text{ mol/l}$.

Einem 1 000-ml-Messkolben (5.2) sind 500 ml Wasser und danach 83 ml konzentrierte Salzsäure (4.7) hinzuzufügen, nach dem Abkühlen bis zur Marke mit Wasser zu verdünnen und zu homogenisieren.

4.9 Acetonitril.

4.10 Acetonitril in Wasser, 5 % in Wasser.

Einem 1 000-ml-Messkolben (5.2) sind 50 ml Acetonitril (4.9) hinzuzufügen, bis zur Marke mit Wasser zu verdünnen und zu homogenisieren.

4.11 Wasserfreies Natriumacetat (CH_3COONa).

4.12 Eluent 1 (E1), wässrige Natriumacetatlösung (CH_3COONa), $c = 1,0 \text{ mol/l}$.

Einem 1 000-ml-Messkolben (5.2) sind etwa 800 ml entgastes Wasser (Eluent 3, 4.14) und danach 82 g Natriumacetat (4.11) hinzuzufügen. Die wässrige Lösung ist bis zur Marke mit entgastem Wasser (Eluent 3, 4.14) zu verdünnen und zu homogenisieren. Der Eluent ist unter Schutzgasatmosphäre zu lagern.

4.13 Eluent 2 (E2), wässrige karbonatfreie Natriumhydroxidlösung (NaOH), $c = 0,2 \text{ mol/l}$.

Einem 1 000-ml-Messkolben (5.2) sind etwa 800 ml entgastes Wasser (Eluent 3, 4.14) hinzuzufügen und danach für 15 min mit Helium zu spülen. 16,0 g Natriumhydroxidlösung (4.6) sind hinzuzufügen. Die wässrige Lösung ist schnell bis zur Marke mit entgastem Wasser (Eluent 3, 4.14) zu verdünnen; die Flasche ist unverzüglich zu verschließen und zu homogenisieren. Der Eluent ist unter Schutzgasatmosphäre zu lagern.

4.14 Eluent 3 (E3), entgastes Wasser, unter Schutzgasatmosphäre gelagert.

4.15 Eluent 4 (E4), wässrige Natriumacetatlösung (CH_3COONa), $c = 0,025 \text{ mol/l}$.

Einem 1 000-ml-Messkolben (5.2) sind etwa 800 ml entgastes Wasser (Eluent 3, 4.14) und danach 2,05 g Natriumacetat (4.11) hinzuzufügen. Die wässrige Lösung ist bis zur Marke mit entgastem Wasser (Eluent 3, 4.14) zu verdünnen und zu homogenisieren. Der Eluent ist unter Schutzgasatmosphäre zu lagern.

4.16 Nachsäulenreagenz, wässrige Natriumhydroxidlösung, $c = 0,3 \text{ mol/l}$.

Einem 1 000-ml-Messkolben (5.2) sind etwa 800 ml entgastes Wasser (Eluent 3, 4.14) hinzuzufügen. Es ist für 15 min mit Helium zu spülen. 24 g Natriumhydroxidlösung (4.6) sind hinzuzufügen und schnell bis zur

Marke mit dem entgastem Wasser (Eluent 3, 4.14) zu verdünnen; der Kolben ist unverzüglich zu verschließen und zu homogenisieren. Das Nachsäulenreagenz ist unter Schutzgasatmosphäre zu lagern.

WICHTIG — Es ist äußerst wichtig, gelöstes Kohlenstoffdioxid vor und während des Gebrauchs aus den Eluenten und dem Nachsäulenreagenz zu entfernen. Die Eluenten und das Nachsäulenreagenz werden während des Gebrauchs unter Schutzgasatmosphäre gehalten.

4.17 Mischung aus Ethanol 96 % (v/v) und 5 % (v/v) Methanol.

4.18 Kaliumhexacyanoferrat (II)-Trihydrat, $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$.

4.19 Zinkacetat-Dihydrat, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$.

4.20 Eisessig.

4.21 Carrez-Reagenz I.

In einen 1 000-ml-Messkolben (5.2) sind 106 g $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ (4.18) einzuwiegen, in 800 ml Wasser (4.1) aufzulösen und bis zur Marke mit Wasser zu verdünnen. Carrez-Reagenz I ist im Kühlschrank zu lagern.

4.22 Carrez-II-Reagenz

In einen 1 000-ml-Messkolben (5.2) sind 220 g $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ (4.19) einzuwiegen, in 800 ml Wasser aufzulösen, danach sind 30 ml Eisessig (4.20) hinzuzufügen und bis zur Marke mit Wasser zu verdünnen. Carrez-II-Reagenz ist im Kühlschrank zu lagern.

WICHTIG — Carrez-II-Reagenz darf nicht zusammen mit Zinksulfat verwendet werden.

4.23 Pufferlösung aus Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure) (PIPES) ($c = 1,5$ mol/l und $pH = 6,9$).

Einem 100-ml-Erlenmeyer-Kolben sind 22,5 g PIPES hinzuzufügen und in 20 ml Natriumhydroxidlösung (4.3) aufzulösen. Der pH-Wert ist mit NaOH 33 % (4.5) in Wasser auf einen pH-Wert von 6,9 einzustellen. Die PIPES-Pufferlösung ist quantitativ in ein kalibriertes 50-ml-Röhrchen zu überführen und mit entmineralisiertem Wasser bis auf 50 ml aufzufüllen. Der pH-Wert der erhaltenen Pufferlösung muss zwischen 6,8 und 7,0 liegen.

4.24 Arabinose.

4.25 Galactose.

4.26 Glucose.

4.27 Fructose.

4.28 Sucrose.

4.29 Lactose.

4.30 Maltose.

4.31 Internationale Standard-Stammlösung Arabinose.

In einen 50-ml-Messkolben (5.2) sind etwa 7 g Arabinose (4.24) auf 1 mg genau einzuwiegen. 30 ml Wasser sind hinzuzufügen und die Arabinose ist aufzulösen. 2,5 ml Acetonitril (4.9) sind hinzuzufügen, bis zur Marke mit Wasser aufzufüllen und die Lösung ist zu homogenisieren.

4.32 Zucker-Standard-Stammlösungen.

In einen 500-ml-Messkolben (5.2) sind etwa 260 mg der Monosaccharide Galactose (4.25), Glucose (4.26) und Fructose (4.27) und etwa 400 mg der Disaccharide Sucrose (4.28), Lactose (4.29) und Maltose (4.30) auf 0,1 mg genau einzuwiegen. Etwa 200 ml Wasser sind hinzuzufügen und die Zucker sind aufzulösen. 25 ml Acetonitril (4.9) sind hinzuzufügen, bis zur Marke mit Wasser aufzufüllen und die Lösung ist zu homogenisieren.

4.33 Zucker-Standardlösungen für die Kalibrierung.

Die verschiedenen Verdünnungen von den Zucker-Kalibrierungsstandards sind nach Tabelle 1 herzustellen. In einem 200-ml-Messkolben sind die angegebenen Volumen der internationalen Standard-Stammlösung Arabinose (4.31) und der Zucker-Standard-Stammlösung (4.32) aufzulösen, 50 ml Wasser hinzuzufügen und zu homogenisieren. 10 ml Acetonitril (4.9) sind hinzuzufügen, bis zur Marke mit Wasser aufzufüllen und zu homogenisieren.

Tabelle 1 — Herstellung der Zucker-Standardlösungen für die Kalibrierung

Zucker-Standardlösung	Volumen der Zucker-Standard-Stammlösung (¶4.32)	Volumen der internationalen Standard-Stammlösung Arabinose (¶4.31)
	ml	ml
1	0,2	0,050
2	1,0	0,050
3	6,0	0,050
4	10,0	0,050
5	20,0	0,050
6	40,0	0,050
7	80,0	0,050
8	100,0	0,050

5 Geräte

5.1 Analysenwaage, mit der auf $\pm 0,1$ mg gewogen werden kann.

5.2 Messkolben, mit einem Volumen von 50 ml, 500 ml und 1 000 ml.

5.3 pH-Messgerät.

5.4 Schwarzbandfilterpapier.

5.5 Glas-Zentrifugenröhrchen.

5.6 Homogenisiergerät¹⁾.

1) Ein IKA Ultra-Turrax mit einer passenden Sonde ist ein Beispiel für ein geeignetes, handelsübliches Homogenisiergerät.

5.7 Vortexmischer.

5.8 Graduierte Schraubverschluss-Röhrchen, 50 ml Volumen²⁾.

5.9 Direktverdrängungs-Multipipette.

5.10 Dispenser, die gegen organisches Lösemittel beständig und auf 2,5 ml und 25 ml eingestellt sind.

5.11 HPLC-Phiolen.

5.12 Metallfreies Flüssigkeits-Chromatographie-System³⁾, anwendbar für ein quaternäres Gradienten-Elutionsprofil.

5.13 Säulenofen, eingestellt auf $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

5.14 Analytische Hochleistungs-Anionenaustausch-Säule⁴⁾, gefüllt mit membranartigem Polystyrol-Divinylbenzol-Harz.

5.15 Hochleistungs-Anionenaustausch-Vorsäule⁵⁾, gefüllt mit membranartigem Polystyrol-Divinylbenzol-Harz.

5.16 Gepulster amperometrischer Detektor⁶⁾, mit Gold-Arbeitsselektrode, der zusammen mit den Chromatographiesäulen im Säulen-Ofen bei 20 °C angeordnet wird.

Die Potenzialeinstellungen des Detektors (gegenüber Ag/AgCl-Referenz) entsprechen denen in Tabelle 2.

5.17 Metallfreie Nachsäulenreagenzpumpe⁷⁾.

5.18 Integrator für das Chromatographie-Datensystem⁸⁾.

2) Sarstedt-Röhren (Artikelnr. 62.547.254) sind ein Beispiel für geeignete, handelsübliche kalibrierte 50-ml-Schraubverschluss-Röhrchen.

3) Das Modul „Thermo Dionex ICS 3000“ ist ein Beispiel für ein geeignetes, handelsübliches metallfreies Chromatographie-System mit einer quaternären Gradienten-Elutionspumpe.

4) Die analytische Säule „Dionex Carbopac PA1“ (2 × 250 mm) ist ein Beispiel für eine geeignete, handelsübliche Hochleistungs-Anionenaustausch-Säule.

5) Die Vorsäule „Dionex Carbopac PA1“ (2 × 50 mm) ist ein Beispiel für eine geeignete, handelsübliche Hochleistungs-Anionenaustausch-Säule.

6) Der „Thermo Dionex model PAD“ ist ein Beispiel für einen geeigneten, handelsüblichen gepulsten amperometrischen Detektor.

7) Die Einfachkolbenpumpe „Thermo Dionex Axp“ ist ein Beispiel für eine geeignete, handelsübliche metallfreie Nachsäulenreagenzpumpe.

8) Das Softwarepaket „Thermo Dionex Chromeleon“ ist ein Beispiel für ein geeignetes, handelsübliches Chromatographie-Integrations-Softwarepaket.

Tabelle 2 — Zeitprogrammierung der Potenzialeinstellungen des Detektors der Gold-Arbeitsselektrode

Schritt	Zeit	Potenzial Gold-Elektrode ^a	Signal des Integrationsdetektors
	s		
1	0,00	0,10	
2	0,20	0,10	Beginn
3	0,40	0,10	Ende
4	0,41	–2,00	
5	0,42	–2,00	
6	0,43	0,60	
7	0,44	–0,10	
8	0,50	–0,10	
^a Potenzial gegenüber Ag/AgCl-Referenzelektrode.			

Das Integrationsfenster liegt zwischen 0,20 s und 0,40 s.

6 Probenahme

Es ist wichtig, dass das Laboratorium eine Probe erhält, die tatsächlich repräsentativ ist und bei Transport und/oder Lagerung nicht beschädigt oder verändert worden ist. Die Probenahme ist nicht Bestandteil des in dieser Norm beschriebenen Verfahrens.

7 Vorbereitung des Prüfmusters

7.1 Allgemeines

Die Probe ist in Übereinstimmung mit dem entsprechenden Probenahmeverfahren herzustellen. Für gezuckerte Kondensmilch ist eine gesonderte Probenherstellung [4] erforderlich, siehe 7.2.

7.2 Probenherstellung bei gezuckerter Kondensmilch

7.2.1 Proben kürzlich hergestellter Produkte, in denen keine merkliche Trennung von Bestandteilen zu erwarten ist

Das Behältnis ist zu öffnen, am Deckel haftendes Material ist in das Behältnis zu überführen und der Inhalt ist durch die Auf-und-Ab-Bewegung eines Löffels gründlich zu mischen, so dass die oberen Schichten und der Inhalt in den unteren Ecken gerührt und vermischt wird. Handelt es sich bei dem Produkt um eine Konservendose, ist der Inhalt in ein Konservenglas mit einem dicht schließenden Deckel zu überführen. Handelt es sich bei dem Produkt um eine Tube, ist der Inhalt soweit möglich in ein Konservenglas mit dicht schließendem Deckel zu überführen; danach ist die Tube aufzuschneiden, das im Inneren haftende Material herauszuschaben und ebenfalls in das Konservenglas zu überführen. Der Inhalt des Konservenglases ist wie oben beschrieben zu mischen.

7.2.2 Proben älterer Produkte, in denen eine Trennung von Bestandteilen erwartet werden kann

Die Probe ist in einem Wasserbad mit 40 °C zu erhitzen, bis sie diese Temperatur nahezu erreicht hat. Das Behältnis ist zu öffnen und es ist wie in 7.2.1 beschrieben weiter zu verfahren. Handelt es sich bei dem Produkt um eine Konservendose oder Tube, ist der Inhalt in ein Konservenglas zu überführen, das an den Wänden haftende Material herauszuschaben (bei einer Tube erfolgt dies nach dem Aufschneiden der Tube) und mit dem Verrühren fortzufahren, bis die gesamte Masse homogen ist, wobei die Größe sämtlicher Kristalle durch Zerdrücken mit einem Glasstab zu verringern ist. Das Konservenglas ist mit einem dicht schließenden Deckel zu verschließen. Abkühlen lassen.

8 Durchführung

8.1 Probenextraktion und -reinigung

8.1.1 Allgemeines

Falls das Chromatographie-Integrations-Softwarepaket über die Option „Variabler interner Standard“ verfügt (z. B. in Chromeleon), ist die Vorgehensweise in 8.1.2 anzuwenden. In einem solchen Fall ist das Verfahren zur Probenextraktion und -reinigung nur einmal mit zwei verschiedenen Verdünnungen durchzuführen. Die Integrator-Einstellungen sind für die 50-fache Verdünnung auf die Option des variablen internen Standards einzustellen.

Für niedrige Zuckergehalte ist die Vorgehensweise in 8.1.2.1 und für hohe Zuckergehalte die Vorgehensweise in 8.1.2.2 anzuwenden. Die Grenzwerte für niedrige und hohe Zuckergehalte sind in Tabelle 3 angegeben.

Tabelle 3 — Grenzwerte für niedrigen und hohen Zuckergehalt

Zucker	Niedriger Gehalt g/100 g	Hoher Gehalt g/100 g
Galactose	< 12	> 12
Glucose	< 12	> 12
Fructose	< 12	> 12
Sucrose	< 18	> 18
Lactose	< 18	> 18
Maltose	< 18	> 18

Für den Fall, dass die Chromatographie-Integrationssoftware über keine Option „Variabler interner Standard“ verfügt und kein Vorwissen über die Zuckerwerte in der zu untersuchenden Milchproduktprobe vorhanden ist, wird empfohlen, mit der Anwendung des Protokolls in 8.1.2.1 für niedrige Zuckerwerte zu beginnen. Für den Fall, dass ein Zucker-Peak größer als der entsprechende Zucker-Peak im höchsten Kalibrierungsstandard ist, muss die Vorgehensweise in 8.1.2.2 für eine korrekte quantitative Bestimmung des Zuckergehalts angewendet werden.

8.1.2 Probenextraktion und -reinigung

In ein kalibriertes 50-ml-Röhrchen (5.8) ist etwa 1,0 g $\pm$ 0,1 g auf 0,000 1 g genau einzuwiegen.

Es sind 4 ml der Mischung aus Ethanol und Methanol (4.17), 0,125 ml der internationalen Standardlösung Arabinose (4.31) und 0,5 ml der PIPES-Pufferlösung (4.23) hinzuzufügen.

Das Gemisch ist durch Vortexen (5.7) gut zu mischen und die Probensuspension für 10 min bei Umgebungstemperatur stehen zu lassen.

Das kalibrierte Röhrchen ist bis zur 25-ml-Marke mit entmineralisiertem Wasser, Grad 3 (4.1), mit einer Temperatur von $40\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, aufzufüllen und danach mit einem Ultra-Turrax (5.6) für 1 min zu homogenisieren.

ANMERKUNG Bereits gut gelöste Proben können durch Schütteln homogenisiert werden.

Es ist der pH-Wert der homogenisierten Probenlösung zu überprüfen. Der pH-Wert muss zwischen den Werten $\text{pH} = 5,0$ und $\text{pH} = 7,0$ liegen. Gegebenenfalls ist der pH-Wert mit NaOH-Lösung (4.3) oder HCl-Lösung (4.8) anzupassen.

Mit einem Dispenser (5.10) sind zunächst 0,5 ml Carrez-I-Reagenzlösung (4.21) hinzuzufügen, zu mischen, dann 0,5 ml Carrez-II-Reagenzlösung (4.22) hinzuzufügen, dann mit einem Dispenser (5.10) 2,5 ml Acetonitril (4.9) hinzuzufügen und bis zur 50-ml-Marke mit Wasser aufzufüllen (4.1); das kalibrierte Röhrchen ist mit dem Schraubdeckel zu verschließen und der Inhalt gut zu mischen.

Die Suspension ist über Schwarzband-Filterpapier (5.4) zu filtern und das Filtrat ist aufzufangen.

Aus jedem Filtrat sind direkt in den HPLC-Phiolen (5.11) zwei verschiedene Verdünnungen herzustellen:

- 10-fache Verdünnung: 100 µl des Filtrats sind mit 900 µl Wasser, Grad 3 (4.1), zu vermischen.
- 50-fache Verdünnung: 20 µl des Filtrats sind mit 980 µl Wasser, Grad 3 (4.1), zu vermischen und die Integrator-Einstellungen sind für diese 50-fach verdünnten Filtrate innerhalb der Vorgehensweise des variablen internen Standards einzustellen.

5 µl der verdünnten Filtrate sind in das Hochleistungs-Anionenaustausch-Chromatographie-System (5.12) zu injizieren.

Sollte der gemessene Zucker-Peak außerhalb der Kalibrierkurve für die 10-fach verdünnte Probe liegen, sind die für die 50-fach verdünnten Proben gemessenen Ergebnisse zu verwenden, nachdem die Einstellungen für die Option des variablen internen Standards korrekt eingestellt wurden.

8.1.2.1 Probenextraktion und -reinigung für die niedrigen Zuckergehalte (10-fache Verdünnung)

In ein kalibriertes 50-ml-Röhrchen (5.8) ist etwa $1,0\text{ g} \pm 0,1\text{ g}$ auf 0,000 1 g genau einzuwiegen.

Es sind 4 ml der Mischung aus Ethanol und Methanol (4.17), 0,125 ml der internationalen Standardlösung Arabinose (4.31) und 0,5 ml der PIPES-Pufferlösung (4.23) hinzuzufügen.

Das Gemisch ist durch Vortexen (5.7) gut zu mischen und die Probensuspension für 10 min bei Umgebungstemperatur stehen zu lassen.

Das kalibrierte Röhrchen ist bis zur 25-ml-Marke mit entmineralisiertem Wasser, Grad 3 (4.1), mit einer Temperatur von $40\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, aufzufüllen und danach mit einem Ultra-Turrax (5.6) für 1 min zu homogenisieren.

ANMERKUNG Bereits gut gelöste Proben können durch Schütteln homogenisiert werden.

Es ist der pH-Wert der homogenisierten Probenlösung zu überprüfen. Der pH-Wert muss zwischen den Werten $\text{pH} = 5,0$ und $\text{pH} = 7,0$ liegen. Gegebenenfalls ist der pH-Wert mit NaOH-Lösung (4.3) oder HCl-Lösung (4.8) anzupassen.

Mit einem Dispenser (5.10) sind zunächst 0,5 ml Carrez-I-Reagenzlösung (4.21) hinzuzufügen, zu mischen, dann 0,5 ml Carrez-II-Reagenzlösung (4.22) hinzuzufügen, dann mit einem Dispenser (5.10) 2,5 ml Acetonitril (4.9) hinzuzufügen und bis zur 50-ml-Marke mit Wasser aufzufüllen (4.1); das kalibrierte Röhrchen ist mit dem Schraubdeckel zu verschließen und der Inhalt gut zu mischen.

Die Suspension ist über Schwarzband-Filterpapier (5.4) zu filtern, das Filtrat ist aufzufangen, und 100 µl des Filtrats sind mit 900 µl Wasser, Grad 3 (4.1), in einer HPLC-Phiole (5.11) zu mischen.

5 µl der verdünnten Filtrate sind in das Hochleistungs-Anionenaustausch-Chromatographie-System (5.12) zu injizieren.

8.1.2.2 Probenextraktion und -reinigung für die hohen Zuckergehalte (50-fache Verdünnung)

In ein kalibriertes 50-ml-Röhrchen (5.8) ist etwa $1,0 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$ auf 0,000 1 g genau einzuwiegen.

Es sind 4 ml der Mischung aus Ethanol und Methanol (4.17), 0,625 ml der internationalen Standardlösung Arabinose (4.31) und 0,5 ml der PIPES-Pufferlösung (4.23) hinzuzufügen.

Das Gemisch ist durch Vortexen (5.7) gut zu mischen und die Probensuspension für 10 min bei Umgebungstemperatur stehen zu lassen.

Das kalibrierte Röhrchen ist bis zur 25-ml-Marke mit entmineralisiertem Wasser, Grad 3 (4.1), mit einer Temperatur von $40 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$, aufzufüllen und danach mit einem Ultra-Turrax (5.6) für 1 min zu homogenisieren.

ANMERKUNG Bereits gut gelöste Proben können durch Schütteln homogenisiert werden.

Es ist der pH-Wert der homogenisierten Probenlösung zu überprüfen. Der pH-Wert muss zwischen den Werten $\text{pH} = 5,0$ und $\text{pH} = 7,0$ liegen. Gegebenenfalls ist der pH-Wert mit NaOH-Lösung (4.3) oder HCl-Lösung (4.8) anzupassen.

Mit einem Dispenser (5.10) sind zunächst 0,5 ml Carrez-I-Reagenzlösung (4.21) hinzuzufügen, zu mischen, dann 0,5 ml Carrez-II-Reagenzlösung (4.22) hinzuzufügen, dann mit einem Dispenser (5.10) 2,5 ml Acetonitril (4.9) hinzuzufügen und bis zur 50-ml-Marke mit Wasser aufzufüllen (4.1); das kalibrierte Röhrchen ist mit dem Schraubdeckel zu verschließen und der Inhalt gut zu mischen.

Die Suspension ist über Schwarzband-Filterpapier (5.4) zu filtern, das Filtrat ist aufzufangen, und 20 µl des Filtrats sind mit 980 µl Wasser, Grad 3 (4.1), in einer HPLC-Phiole (5.11) zu mischen.

5 µl der verdünnten Filtrate sind in das Hochleistungs-Anionenaustausch-Chromatographie-System (5.12) zu injizieren.

8.2 Chromatographische Analyse

Das Chromatographie-System (5.12) ist mit dem Säulenofen (5.13), der Hochleistungs-Anionenaustausch-Vorsäule (5.15) und der analytischen Säule (5.14), der Nachsäulenreagenzpumpe (5.17), dem Detektor (5.16) und dem Integrator (5.18) aufzubauen. Die linearen Gradienten-Elutionsprofile sind entsprechend Tabelle 3 zu programmieren.

Es ist mindestens 15 min zu warten, bis das Chromatographie-System im Gleichgewicht ist; danach ist dreimal ein Teststandard zu injizieren, um das Chromatographie-System unter den in Tabelle 2 und Tabelle 3 festgelegten Bedingungen zu stabilisieren.

Unter den in Tabelle 2 und Tabelle 3 festgelegten Bedingungen ist das Chromatographie-System durch die anschließende Injektion von 5 µl der 8 Zuckerkalibrierproben (4.33) zu kalibrieren.

Unter den in Tabelle 2 und Tabelle 3 festgelegten Bedingungen sind die hergestellten Filtrate durch Injektion von 5 µl der Filtratproben (8.1) in das Chromatographie-System zu analysieren.

Nach jeder Reihe von 8 Filtratproben (8.1) ist eine Reihe von 4 Zuckerkalibrierproben (4.33) zu injizieren, um geringfügige Veränderungen der Retentionszeiten und/oder der Detektorempfindlichkeit zu berücksichtigen. Die 4 Kalibrierproben Nummer 1, 3, 5 und 7 sind mit den 4 Kalibrierproben Nummer 2, 4, 6 und 8 abwechselnd zu verwenden.

Tabelle 4 — Lineares Gradienten-Elutionsprofil für die chromatographische Trennung von Zuckern

Zeit min	Prozentsatz E1 CH₃COONa, c = 1 mol/l	Prozentsatz E2 NaOH, c = 0,2 mol/l	Prozentsatz E3 H₂O	Prozentsatz E4 CH₃COONa, c = 0,025 mol/l	
zu Beginn	0	5	88	7	
0	0	5	88	7	Probeninjektion und Beginn der Datenerfassung
10	0	5	88	7	
15	0	17	76	7	
25	0	93	0	7	
28,1	20	73	0	7	Ende der Datenerfassung und Beginn des Säulenwaschens
32,0	20	73	0	7	Ende des Säulenwaschens
32,1	0	5	88	7	Beginn des Säulengleich- gewichts
52	0	5	88	7	Ende der Säulenäquili- bration und Ende des Zyklus

ANMERKUNG Das Gradienten-Profil ist für das Chromatographie-System spezifisch. Es wird dringend empfohlen, das Gradienten-Profil zu überprüfen. Die geforderten chromatographischen Auflösungen sind nachstehend in Tabelle 4 aufgeführt. Falls die Auflösungen zwischen Glucose und Sucrose und zwischen Sucrose und Fructose kleiner als die geforderten 1,5 sind, wird empfohlen, den Prozentsatz des Eluents E2 (NaOH, 0,2 mol/l) etwas zu erhöhen (von 5 % auf 5,5 %) und den Prozentsatz des Eluents E3 (entgastes Wasser) um denselben Betrag zu reduzieren.

Tabelle 5 — Anforderungen an die chromatographische Auflösung

Zucker	Mindestens geforderte Auflösung
Arabinose-Galactose	> 1,5
Galactose-Glucose	> 1,5
Glucose-Sucrose	> 1,5
Sucrose-Fructose	> 1,5
Fructose-Melibiose	> 1,5

9 Berechnung und Angabe der Ergebnisse

Die Zucker in den Probelösungen sind durch Vergleichen der Retentionszeiten der entsprechenden Peaks in den Zuckerkalibrierproben zu ermitteln. Das Chromatographie-System ist unter Verwendung beider Reihen der Zuckerkalibrierproben (4.33) zu kalibrieren, die jeweils vor und nach einer Reihe von 8 Filtratproben (8.1) angewendet werden. Die mengenmäßige Erfassung der Kohlenhydrate in den Proben erfolgt durch Anwenden der eingeklammerten Kalibrierungen.

10 Präzision

10.1 Allgemeines

Die Einzelheiten des Ringversuchs zur Präzision des Verfahrens sind in Anhang B angegeben. Die Werte, die im Ringversuch ermittelt wurden, können für andere Analytkonzentrationsbereiche und/oder Matrices als die in Anhang B angegebenen nicht unbedingt anwendbar sein.

10.2 Wiederholpräzision

Die absolute Differenz zwischen zwei einzelnen Prüfergebnissen, die an identischem Prüfmateri- al von demselben Untersucher mit derselben Prüfeinrichtung im kürzestmöglichen Zeitabstand erhalten wurden, sollte in nicht mehr als 5 % der Fälle die Wiederholgrenze r überschreiten.

Die Werte für Galactose sind:

$\bar{x} = 0,70 \text{ g/100 g}$	$r = 0,03 \text{ g/100 g}$	Gezuckerter Trinkjoghurt
$\bar{x} = 0,10 \text{ g/100 g}$	$r = 0,02 \text{ g/100 g}$	Handelsübliche Säuglingsnahrung
$\bar{x} = 2,14 \text{ g/100 g}$	$r = 0,07 \text{ g/100 g}$	lactosearme H-Milch (MUVA-Referenzprobe)
$\bar{x} = \text{nd}$	$r = \text{nd}$	Säuglingsnahrung (MUVA-Referenzprobe)
$\bar{x} = 0,40 \text{ g/100 g}$	$r = 0,03 \text{ g/100 g}$	Friskkäse (MUVA-Referenzprobe)
$\bar{x} = 0,60 \text{ g/100 g}$	$r = 0,02 \text{ g/100 g}$	Molkenpulver (MUVA-Referenzprobe)
$\bar{x} = 0,24 \text{ g/100 g}$	$r = 0,02 \text{ g/100 g}$	Schmelzkäse (MUVA-Referenzprobe)
$\bar{x} = \text{nd}$	$r = \text{nd}$	Gezuckerte Kondensmilch
$\bar{x} = \text{nd}$	$r = \text{nd}$	Säuglingsnahrung (NIST-zertifiziertes Referenzmaterial)

nd = nicht nachweisbar.

Die Werte für Glucose sind:

$\bar{x} = 0,45 \text{ g/100 g}$	$r = 0,02 \text{ g/100 g}$	Gezuckerter Trinkjoghurt
$\bar{x} = 1,17 \text{ g/100 g}$	$r = 0,06 \text{ g/100 g}$	Handelsübliche Säuglingsnahrung
$\bar{x} = 2,23 \text{ g/100 g}$	$r = 0,06 \text{ g/100 g}$	lactosearme H-Milch (MUVA-Referenzprobe)
$\bar{x} = 1,08 \text{ g/100 g}$	$r = 0,09 \text{ g/100 g}$	Säuglingsnahrung (MUVA-Referenzprobe)
$\bar{x} = 0,38 \text{ g/100 g}$	$r = 0,02 \text{ g/100 g}$	Frischkäse (MUVA-Referenzprobe)
$\bar{x} = 0,48 \text{ g/100 g}$	$r = 0,06 \text{ g/100 g}$	Molkenpulver (MUVA-Referenzprobe)
$\bar{x} = \text{nd}$	$r = \text{nd g/100 g}$	Schmelzkäse (MUVA-Referenzprobe)
$\bar{x} = \text{nd g/100 g}$	$r = \text{nd g/100 g}$	Gezuckerte Kondensmilch
$\bar{x} = 2,00 \text{ g/100 g}$	$r = 0,09 \text{ g/100 g}$	Säuglingsnahrung (NIST-zertifiziertes Referenzmaterial)

nd = nicht nachweisbar.

Die Werte für Fructose sind:

$\bar{x} = 2,16 \text{ g/100 g}$	$r = 0,10 \text{ g/100 g}$	Gezuckerter Trinkjoghurt
$\bar{x} = \text{nd}$	$r = \text{nd}$	Handelsübliche Säuglingsnahrung
$\bar{x} = \text{nd}$	$r = \text{nd}$	lactosearme H-Milch (MUVA-Referenzprobe)
$\bar{x} = 5,53 \text{ g/100 g}$	$r = 0,98 \text{ g/100 g}$	Säuglingsnahrung (MUVA-Referenzprobe)
$\bar{x} = \text{nd}$	$r = \text{nd}$	Frischkäse (MUVA-Referenzprobe)
$\bar{x} = \text{nd}$	$r = \text{nd}$	Molkenpulver (MUVA-Referenzprobe)
$\bar{x} = \text{nd}$	$r = \text{nd}$	Schmelzkäse (MUVA-Referenzprobe)
$\bar{x} = \text{nd}$	$r = \text{nd}$	Gezuckerte Kondensmilch
$\bar{x} = \text{nd}$	$r = \text{nd}$	Säuglingsnahrung (NIST-zertifiziertes Referenzmaterial)

nd = nicht nachweisbar.

Die Werte für Sucrose sind:

$\bar{x} = 2,29 \text{ g/100 g}$	$r = 0,10 \text{ g/100 g}$	Gezuckerter Trinkjoghurt
$\bar{x} = 7,80 \text{ g/100 g}$	$r = 0,72 \text{ g/100 g}$	Handelsübliche Säuglingsnahrung
$\bar{x} = \text{nd}$	$r = \text{nd}$	lactosearme H-Milch (MUVA-Referenzprobe)
$\bar{x} = 1,08 \text{ g/100 g}$	$r = 0,11 \text{ g/100 g}$	Säuglingsnahrung (MUVA-Referenzprobe)
$\bar{x} = \text{nd}$	$r = \text{nd}$	Frischkäse (MUVA-Referenzprobe)