

DIN EN ISO 22579



ICS 67.050

Einsprüche bis 2020-04-21

Entwurf

**Säuglingsnahrung und Nahrungsergänzungsmittel für Erwachsene –
Bestimmung von Fructanen –
Hochleistungs-Anionenaustausch-Chromatographieverfahren mit
gepulster amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) nach enzymatischer
Behandlung (ISO/DIS 22579:2019);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 22579:2019**

Infant formula and adult nutritionals –
Determination of fructans –
High performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection
(HPAEC-PAD) after enzymatic treatment (ISO/DIS 22579:2019);
German and English version prEN ISO 22579:2019

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2020-02-21 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 53 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 22579:2019) 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 Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision eines vereinheitlichten Messverfahrens (ISO 5725-2:1994 einschließlich Technisches Korrigendum 1:2002)*

**Säuglingsnahrung und Nahrungsergänzungsmittel für Erwachsene —
Bestimmung von Fructanen — Hochleistungs-Anionenaustausch-
Chromatographieverfahren mit gepulster amperometrischer Detektion
(HPAEC-PAD) nach enzymatischer Behandlung (ISO/DIS 22579:2019)**

Infant formula and adult nutritionals — Determination of fructans — High performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) after enzymatic treatment (ISO/DIS 22579:2019)

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 Begriffe	6
4 Kurzbeschreibung	7
5 Chemikalien und Reagenzien	7
6 Prüfeinrichtung	12
7 Durchführung	13
7.1 Probenvorbereitung	13
7.1.1 Pulvrige oder konzentrierte Produkte auf Basis von Fertignahrung (RTF) und Pulverprodukte, die auf Subgramm-Ebene inhomogen sind	13
7.1.2 Wiederaufbereitete Produkte, wie in 7.1.1 vorbereitet oder als RTF verkaufte Produkte	14
7.1.3 Homogene pulvrige Produkte ohne vorherige Wiederaufbereitung	14
7.1.4 Verdünnung	14
7.1.5 Hydrolyse von Saccharose und α -Glucanen	14
7.1.6 Carrez-Klärung (optional, Anwendung bei Schwierigkeiten beim Durchleiten der Probe durch die SPE)	14
7.1.7 Entfernung von Monosacchariden	15
7.1.8 Hydrolyse von Fructanen	15
7.2 Chromatographische Bedingungen bei der Verwendung von Säule A (6.13.1)	15
7.3 Chromatographische Bedingungen bei der Verwendung von Säulen B (6.13.2)	16
7.4 Systemeignungsprüfung	17
7.5 Kalibrierung	17
8 Berechnung	17
9 Angabe der Ergebnisse	19
10 Präzisionsdaten	19
10.1 Allgemeines	19
10.2 Wiederholpräzision	19
10.3 Vergleichspräzision	20
11 Prüfbericht	20
Anhang A (informativ) Beispiel-Chromatogramme und Kalibrierkurven	21
Anhang B (informativ) Präzisionsdaten	23
Anhang C (informativ) Überprüfung des Prüf-Enzymgemischs aus Sucrase, β -Amylase, Pullulanase und Maltase	24
Literaturhinweise	27

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 22579:2019) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 302 „Milch und Milcherzeugnisse — Probe-
nahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/DIS 22579:2019 wurde von CEN als prEN ISO 22579:2019 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*, und der International Dairy Federation (IDF) in Zusammenarbeit mit AOAC INTERNATIONAL erarbeitet.

Es wird von ISO und IDF gemeinsam und gesondert durch AOAC INTERNATIONAL veröffentlicht. Das in diesem Dokument beschriebene Verfahren ist dem amtlichen Verfahren der AOAC „Official Method 2015.06: *Fructans in Infant Formula and Adult Nutrition*“ gleichwertig.

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. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren. Einzelheiten zu Patentrechten, die während der Erarbeitung des Dokumentes identifiziert werden, werden in der Einleitung und/oder in der ISO-Liste der erhaltenen Patentdeklarationen (siehe www.iso.org/patents) angegeben.

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 C41 des *Standing Committee on Analytical Methods for Composition* unter Federführung seines Projektleiters, Herrn S. Austin (CH) durchgeführt.

WARNUNG — Das in diesem Dokument beschriebene Verfahren verwendet ätzende (Natriumhydroxid, Essigsäure) und giftige (Natriumazid) Chemikalien. Es sind die Sicherheitsdatenblätter zu beachten und entsprechende zusätzliche Sicherheitsvorkehrungen für die Handhabung und Entsorgung zu treffen.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Verfahren zur Bestimmung von Fructanen des Inulintyps (einschließlich Oligofruktose, Fruktooligosaccharide) in Säuglingsnahrung und Nahrungsergänzungsmitteln für Erwachsene (sowohl Pulver als auch Flüssigkeit) fest, die 0,03 g/100 g bis 5,0 g/100 g Fructane in dem verzehrfertigen Enderzeugnis enthalten.

Das Verfahren wurde in einer Multi-Laborstudie [1] mit wiederaufbereitetem Standardreferenzmaterial (SRM) für Säuglingsnahrung/Nahrungsergänzungsmittel für Erwachsene mit einem Gehalt von 0,204 g/100 g, Nahrungsergänzungsmitteln für Erwachsene als Fertignahrung (RTF, en: ready-to-feed) mit einem Gehalt von 1,28 g/100 g und 2,67 g/100 g, Säuglingsnahrung als Fertignahrung mit einem Gehalt von 0,300 g/100 g, wiederaufbereiteter Folgenahrung im Bereich von 0,209 g/100 g bis 0,275 g/100 g, wiederaufbereiteter Säuglingsnahrung im Bereich von 0,0308 g/100 g bis 0,264 g/100 g validiert. Während der Validierungsstudie im Einzellabor [2] wurden Versuche zur Wiederfindungsrate der Aufstockung von bis zu 5 g/100 g in wiederaufbereiteten Säuglingsnahrungspulvern (auf Milchbasis, auf teilweise hydrolysiertes Milchbasis und Sojabasis), Nahrungsergänzungsmitteln für Erwachsene als Fertignahrung und wiederaufbereiteten pulverförmigen Nahrungsergänzungsmitteln für Erwachsene durchgeführt.

2 Normative Verweisungen

Es gibt keine normativen Verweisungen in diesem Dokument.

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <http://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: verfügbar unter <http://www.electropedia.org/>

3.1

Nahrungsergänzungsmittel für Erwachsene

ernährungsphysiologisch vollständige, besonders zusammengesetzte Lebensmittel, die in flüssiger Form verzehrt werden und die einzige Nahrungsquelle darstellen können, hergestellt in einer beliebigen Zusammensetzung aus Milch, Soja, Reis, Molke, hydrolysiertem Protein, Stärke und Aminosäuren, mit oder ohne intaktem Protein

3.2

Säuglingsnahrung

Ersatzprodukt für Muttermilch, das speziell hergestellt wurde, um die Ernährungsanforderungen von Säuglingen in den ersten Lebensmonaten bis zur Einführung einer geeigneten Beikost abzudecken

[QUELLE: Codex Standard 72-1981]

3.3

Folgenahrung (einschließlich Kindernahrung und Kleinkindnahrung)

ein Lebensmittel, das als flüssiger Bestandteil der Entwöhnungsdiät für Säuglinge ab dem 6. Monat und für Kleinkinder bis zum Alter von 3 Jahren vorgesehen ist

[QUELLE: Codex Standard 156-1987]

4 Kurzbeschreibung

Die Proben werden in Wasser (sofern erforderlich) wiederaufbereitet und weiter verdünnt, bis die Konzentration der Fructane in der Lösung so ist, dass die Fructose- und Glucosekonzentration nach der Hydrolyse innerhalb des Bereichs liegt, der von der Standardkurve abgedeckt wird. Die verdünnte Probe wird mit einem Gemisch aus einer hochspezifischen Sucrase und α -Glucanasen behandelt, um Sucrose und α -Glucooligosaccharide zu ihren einzelnen Monosacchariden zu hydrolysieren. Die Probe wird durch eine mit graphitiertem Kohlenstoff befüllte Säule zur Festphasenextraktion (SPE, en: solid phase extraction) geleitet. Salze und Monosaccharide gehen durch und werden ausgespült, während die Fructane zurückgehalten werden. Die Fructane werden mit einer Acetonitril-Lösung aus der Säule freigegeben. Die freigegebenen Fructane werden mit einem Fructasegemisch hydrolysiert, und die freigegebene Glucose und Fructose werden mittels Hochleistungs-Anionenaustausch-Chromatographieverfahren mit gepulster amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD, en: high performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection) analysiert. Der Fructangehalt wird durch Addition des gemessenen Glucose- und 0,9-fachen Fructosegehalts berechnet. In einigen Matrices kann eine Blindwertkorrektur erforderlich sein und durchgeführt werden.

5 Chemikalien und Reagenzien

Es sind ausschließlich Reagenzien von anerkannter Analysenreinheit zu verwenden, sofern nicht anders festgelegt. Lösungsmittel müssen für die HPLC-Analyse von hoher Qualität sein, sofern nicht anders festgelegt.

5.1 Deionisiertes Wasser, gereinigt mit einem spezifischen Widerstand $\geq 18 \text{ M}\Omega$.

5.2 Maleinsäure, Reinheit $\geq 99,0 \%$.

5.3 Acetonitril.

5.4 Essigsäure, Eisessig 100 %, wasserfrei.

5.5 Kaliumhexacyanoferrat(II)-Trihydrat, optional.

5.6 Zinkacetat, optional.

5.7 Trifluoressigsäure (TFA, en: Trifluoroacetic acid).

5.8 Salzsäure, Stoffmengenkonzentration $c = 1 \text{ mol/l}$.

5.9 Natriumacetat, wasserfrei, Reinheit $\geq 99,0 \%$, nur bei Verwendung der Säulen B (6.13.2) für HPAEC-PAD.

5.10 Natriumhydroxidlösung, 50 % (w/w).

5.11 Natriumhydroxidplättchen.

5.12 Natriumchlorid.

5.13 Natriumazid, optional.

5.14 D-(–)-Fructose, Reinheit $\geq 99,0\%$ (bezogen auf die Trockenmasse).

5.15 D-(+)-Glucose, Reinheit $\geq 99,5\%$ (bezogen auf die Trockenmasse).

5.16 N,N'-Diacetylchitobiose, Reinheit $> 90\%$.

5.17 Gemisch aus hochreiner Sucrase, β -Amylase, Pullulanase und Maltase, aus dem Fructan Assay Kit K-FRUC¹ (Megazyme International Ireland Ltd. oder gleichwertig). 200 μ l Enzymgemisch-Arbeitslösung (5.19.10) sollten unter den für das Verfahren beschriebenen Bedingungen (90 min bei 40 °C) 2 mg Saccharose vollständig hydrolysieren können, ohne dass Fructane hydrolysiert werden.

5.18 Gemisch aus hochreinen rekombinanten Exo- und Endo-Inulinase und rekombinanter Endo-Levanase, aus dem Fructan Assay Kit K-FRUC¹ (Megazyme International Ireland Ltd. oder gleichwertig). 100 μ l Enzymgemisch-Arbeitslösung (5.19.11) sollten unter den für das Verfahren beschriebenen Bedingungen (40 min bei 40 °C) ausreichen, um 70 μ g Fructan zu hydrolysieren.

5.19 Vorbereitung der Reagenzien

5.19.1 Natriumhydroxidlösung, $c = 2$ mol/l.

In einem 500-ml-Messkolben werden 40 g $\pm$ 1 g Natriumhydroxidplättchen in 250 ml deionisiertem Wasser gelöst. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird mit deionisiertem Wasser bis zur Marke aufgefüllt und gut gemischt. Diese Lösung ist bei Raumtemperatur 6 Monate haltbar.

5.19.2 Natriummalat-Pufferlösung, $c = 0,100$ mol/l, pH = 6,5.

In einen großen Becher (> 500 ml) werden 5,8 g Maleinsäure eingewogen und mit 450 ml deionisiertem Wasser unter Verwendung eines Magnetrührstabs aufgelöst. Mit Natriumhydroxidlösung (5.19.1) auf pH = 6,5 einstellen. Die Lösung wird in einen 500-ml-Messkolben überführt und mit deionisiertem Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Diese Lösung ist bei 4 °C für 3 Monate haltbar.

5.19.3 Natriumacetat-Pufferlösung, $c = 0,100$ mol/l, pH = 4,5.

In einen großen Becher (> 500 ml) mit 450 ml deionisiertem Wasser werden 2,9 ml Eisessig pipettiert. Mit Natriumhydroxidlösung (5.19.1) auf pH = 4,5 einstellen. Die Lösung wird in einen 500-ml-Messkolben überführt und mit deionisiertem Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Diese Lösung ist bei 4 °C für 3 Monate haltbar.

5.19.4 interne N,N'-Diacetylchitobiose Standardlösung, Massenkonzentration $\rho = 600$ μ g/ml.

In einen 25-ml-Messkolben werden 15 mg N,N'-Diacetylchitobiose eingewogen und mit deionisiertem Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Diese Lösung ist bei –20 °C für 1 Jahr haltbar.

5.19.5 Glucose-Stammlösung, $\rho = 5$ mg/ml.

In einen 25-ml-Messkolben werden 125 mg Glucose eingewogen und mit deionisiertem Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Diese Lösung ist bei –20 °C für 1 Jahr haltbar.

1 Dies ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches 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.

5.19.6 Fructose-Stammlösung, $\rho = 10 \text{ mg/ml}$.

In einen 25-ml-Messkolben werden 250 mg Fructose eingewogen und mit deionisiertem Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Diese Lösung ist bei -20°C für 1 Jahr haltbar.

5.19.7 Carrez-I-Lösung

Es werden 10,6 g Kaliumhexacyanoferrat(II)-Trihydrat in 100 ml deionisiertem Wasser gelöst und in einer braunen Flasche aufbewahrt. Diese Lösung ist bei Raumtemperatur 6 Monate haltbar (optionales Reagenz).

5.19.8 Carrez-II-Lösung

In einem 100-ml-Messkolben werden 22,0 g Zinkacetat in 90 ml deionisiertem Wasser gelöst und 2,9 ml Eisessig zugegeben. Mit deionisiertem Wasser wird bis zur Marke aufgefüllt und homogenisiert. Diese Lösung ist bei Raumtemperatur 6 Monate haltbar (optionales Reagenz).

5.19.9 Natriumazid-Lösung, $\rho = 5 \text{ g/l}$.

Es wird 1 g Natriumazid in 200 ml deionisiertem Wasser gelöst (optionales Reagenz).

5.19.10 Mischung aus Sucrase-, β -Amylase-, Pullulanase- und Maltaselösung

Der Inhalt der Flasche, die gefriergetrocknetes Sucrase-, β -Amylase-, Pullulanase- und Maltasepulver enthält, wird in 22,0 ml Natriummalat-Pufferlösung (5.19.2) gelöst. Es wird gut gemischt und in Aliquote von je 2 ml aufgeteilt und bis zur Verwendung in Polypropylenröhrchen bei -20°C gefroren aufbewahrt. Diese Lösung ist bei -20°C für 5 Jahre haltbar.

WICHTIG — Für die Entwicklung und Validierung dieses Verfahrens wurde ein handelsübliches vorgefertigtes Enzymgemisch von Megazyme² (5.17) verwendet. Wenn Enzyme aus einer anderen Quelle verwendet werden, muss die Zusammensetzung des Puffers (Art, Konzentration und pH-Wert) möglicherweise an die Empfehlungen des Lieferanten angepasst werden. Ebenfalls ist es dringend erforderlich sicherzustellen, dass das eingesetzte Enzymgemisch die gesamte Saccharose im Produkt vollständig hydrolysiert, ohne das Fructan zu hydrolysieren. Dies kann überprüft werden, indem eine Analyse mit Saccharose als Analyt und mit einem reinen Fructan als Analyt durchgeführt wird. Bei der Analyse von Saccharose sollte kein Fructan gemessen werden und es sollte eine Wiederfindung von mehr als 90 % erreicht werden, wenn ein Fructan von bekannter Reinheit analysiert wird (es wird empfohlen, sowohl langkettiges Inulin als auch kurzkettige Fructooligosaccharide zu verwenden). Eine alternative Prüfung zur Überprüfung der Eignung und Leistung des Enzymgemisches ist in Anhang C beschrieben.

5.19.11 Fructase-Lösung (Exo-/Endo-Inulinasen und Endo-Levanase)

Der Inhalt der Flasche, die gefriergetrocknete Exo- und Endo-Inulinasen und Endo-Levanase enthält, wird in 22,0 ml Natriumacetat-Pufferlösung (5.19.3) gelöst. Es wird gut gemischt und in Aliquote von je 2 ml aufgeteilt und bis zur Verwendung in Polypropylenröhrchen bei -20°C gefroren aufbewahrt. Diese Lösung ist bei -20°C für 5 Jahre haltbar.

WICHTIG — Für die Entwicklung und Validierung dieses Verfahrens wurde ein handelsübliches vorgefertigtes Enzymgemisch von Megazyme² (5.18) verwendet. Wenn Enzyme aus einer anderen Quelle verwendet werden, muss die Zusammensetzung des Puffers (Art, Konzentration und

2 Dies ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches 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.

pH-Wert) möglicherweise an die Empfehlungen des Lieferanten angepasst werden. Außerdem muss unbedingt sichergestellt werden, dass das eingesetzte Enzymgemisch das Fructan vollständig hydrolysiert, ohne andere Glucose oder Fructose zu hydrolysieren, die Oligo- oder Polysaccharide enthalten, die nach der Aufbereitung mit dem obigen Sucrasegemisch vorhanden sein können. Dies kann überprüft werden, indem eine Analyse mit einem reinen Fructan als ein Analyt durchgeführt wird. Bei der Messung eines Fructans mit bekannter Reinheit sollte eine Wiederfindung von mehr als 90 % erreicht werden.

5.19.12 Waschlösung für mit graphitiertem Kohlenstoff befüllte Säule zur Festphasenextraktion (SPE), TFA 0,1 % in Acetonitril 80 % (v/v)

In einen 100-ml-Messkolben werden 80 ml Acetonitril und 100 µl TFA gegeben. Mit deionisiertem Wasser wird bis zur Marke aufgefüllt. Diese Lösung ist bei Raumtemperatur 6 Monate haltbar.

5.19.13 Natriumchlorid-Lösung, $c = 1$ mol/l, für mit graphitiertem Kohlenstoff befüllte SPE-Säule.

In einen 100-ml-Messkolben werden 5,8 g Natriumchlorid eingewogen und mit 90 ml deionisiertem Wasser gelöst. Mit deionisiertem Wasser wird bis zur Marke aufgefüllt. Diese Lösung ist bei Raumtemperatur 6 Monate haltbar.

5.19.14 Elutionslösung für mit graphitiertem Kohlenstoff befüllte SPE-Säule, TFA 0,05 % in Acetonitril 25 % (v/v)

In einen 100-ml-Messkolben werden 25 ml Acetonitril und 50 µl TFA gegeben. Mit deionisiertem Wasser wird bis zur Marke aufgefüllt. Diese Lösung ist bei Raumtemperatur 6 Monate haltbar.

5.20 Herstellung der mobilen Phasen mit Säule A (6.13.1) oder gleichwertig

Bei Verwendung von Säulen B (6.13.2) ist dieser Abschnitt zu überspringen und direkt zu 5.21 überzugehen.

5.20.1 Eluent A für Säule A (6.13.1), Natriumhydroxidlösung, $c = 0,600$ mol/l.

In eine Elutionsmittelflasche werden 970 ml deionisiertes Wasser gegeben und mit Helium 20 min entgast. Es werden 31,2 ml Natriumhydroxidlösung (5.10) zugegeben (mit einer Kunststoffpipette für den Einmalgebrauch). Mit Helium wird 20 min entgast und der Eluent mit geeigneten Maßnahmen, bis einschließlich während der Verwendung, vor der Einwirkung durch Kohlendioxid geschützt (z. B. durch Aufbewahrung unter einer Heliumdecke). Diese Lösung ist bei Raumtemperatur 1 Woche haltbar.

5.20.2 Eluent B für Säule A (6.13.1), deionisiertes Wasser mit einem spezifischen Widerstand ≥ 18 MΩ.

In eine Elutionsmittelflasche werden 2 000 ml deionisiertes Wasser (5.1) gegeben und mit Helium für 20 min entgast. Der Eluent wird mit geeigneten Maßnahmen, bis einschließlich während der Verwendung, vor der Einwirkung durch Kohlendioxid geschützt (z. B. durch Aufbewahrung unter einer Heliumdecke). Diese Lösung ist bei Raumtemperatur 4 Tage haltbar.

5.20.3 Eluent C für Säule A (6.13.1), Natriumhydroxidlösung ($c = 0,030$ mol/l).

In eine Elutionsmittelflasche werden 1 000 ml deionisiertes Wasser gegeben und mit Helium 20 min entgast. Es werden 1,6 ml Natriumhydroxidlösung (5.10) zugegeben (mit einer Kunststoffpipette für den Einmalgebrauch). Mit Helium wird 20 min entgast und der Eluent mit geeigneten Maßnahmen, bis einschließlich während der Verwendung, vor der Einwirkung durch Kohlendioxid geschützt (z. B. durch Aufbewahrung unter einer Heliumdecke). Diese Lösung ist bei Raumtemperatur 1 Woche haltbar.

5.20.4 Nachsäulen-Zugabereagens, Natriumhydroxid ($c = 0,300 \text{ mol/l}$).

In eine Elutionsmittelflasche werden 985 ml deionisiertes Wasser gegeben und 15,6 ml Natriumhydroxidlösung (5.10) hinzugefügt (mit einer Kunststoffpipette für den Einmalgebrauch). Zum Mischen wird die Lösung leicht verwirbelt. Mit Helium wird 20 min entgast. Diese Lösung ist bei Raumtemperatur 1 Monat haltbar, am Tag der Verwendung entgasen.

5.21 Herstellung der mobilen Phasen mit Säulen B (6.13.2) oder gleichwertig.

Bei Verwendung von Säule A (6.13.1) ist dieser Abschnitt zu überspringen.

5.21.1 Eluent A für Säulen B (6.13.2), Natriumhydroxidlösung ($c = 0,200 \text{ mol/l}$).

In eine Elutionsmittelflasche werden $1\,923 \text{ g} \pm 2 \text{ g}$ deionisiertes Wasser eingewogen und mit Helium 20 min entgast. Es werden 20 ml Natriumhydroxidlösung (5.10) zugegeben (mit einer Kunststoffpipette für den Einmalgebrauch). Mit Helium wird 20 min entgast und der Eluent mit geeigneten Maßnahmen, bis einschließlich während der Verwendung, vor der Einwirkung durch Kohlendioxid geschützt (z. B. durch Aufbewahrung unter einer Heliumdecke). Diese Lösung ist bei Raumtemperatur 1 Woche haltbar.

5.21.2 Eluent B für Säulen B (6.13.2), deionisiertes Wasser mit einem spezifischen Widerstand $\geq 18 \text{ M}\Omega$.

Eine 2-l-Elutionsmittelflasche wird mit 2 000 ml deionisiertem Wasser gefüllt. Mit Helium wird 20 min entgast und der Eluent mit geeigneten Maßnahmen, bis einschließlich während der Verwendung, vor der Einwirkung durch Kohlendioxid geschützt (z. B. durch Aufbewahrung unter einer Heliumdecke). Diese Lösung ist für 4 Tage haltbar.

Wahlweise können 5 g/l Natriumazid-Lösung (5.19.9) bis zu einer Endkonzentration von 0,125 g/l zur mobilen Phase B zugegeben werden. Dies verlängert die Haltbarkeit des Eluenten auf etwa 2 Wochen und kann bei Problemen die chromatographische Auflösung um Chitobiose verbessern.

5.21.3 Eluent C für Säulen B (6.13.2), Natriumacetatlösung ($c = 1 \text{ mol/l}$).

In einen 1 000-ml-Messkolben werden 82,0 g wasserfreies Natriumacetat eingewogen und mit 800 ml deionisiertem Wasser durch Mischen gelöst. Mit deionisiertem Wasser wird bis zur Marke aufgefüllt und auf einem 0,20- μm -Nylonmembranfilter in eine Elutionsmittelflasche filtriert. Mit Helium wird 20 min entgast und der Eluent mit geeigneten Maßnahmen, bis einschließlich während der Verwendung, vor der Einwirkung durch Kohlendioxid geschützt (z. B. durch Aufbewahrung unter einer Heliumdecke).

5.21.4 Nachsäulen-Zugabereagens, Natriumhydroxidlösung ($c = 0,300 \text{ mol/l}$).

In eine Elutionsmittelflasche werden 985 ml deionisiertes Wasser gegeben und 15,6 ml Natriumhydroxidlösung (5.10) hinzugefügt (mit einer Kunststoffpipette für den Einmalgebrauch). Zum Mischen wird die Lösung leicht verwirbelt. Mit Helium wird 20 min entgast. Diese Lösung ist bei Raumtemperatur 1 Monat haltbar, am Tag der Verwendung entgasen.

5.22 Herstellung der Standardlösungen

Unter Verwendung von Messkolben wird eine 6-stufige Standardkurve erstellt, indem die Glucose-Stammlösung (5.19.5) und die Fructose-Stammlösung (5.19.6) mit deionisiertem Wasser auf das Endvolumen verdünnt werden, wie in Tabelle 1 beschrieben.

Tabelle 1 — Verdünnungsschema für die Erstellung der Standardkurve

Standard- lösung	Volumen der Fructose-Stamm- lösung (5.19.6) µl	Volumen der Glucose-Stamm- lösung (5.19.5) µl	End- volumen ml	Fructose Konzentration µg/ml	Glucose Konzentration µg/ml
Stufe 1	200	40	100	20	2
Stufe 2	400	200	20	200	50
Stufe 3	800	400	20	400	100
Stufe 4	1 200	600	20	600	150
Stufe 5	1 600	800	20	800	200
Stufe 6	2 000	1 000	20	1 000	250

Jede der 6 Standardlösungen wird wie folgt behandelt: in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß werden 200 µl Standardlösung, 200 µl deionisiertes Wasser und 100 µl interne N,N'-Diacetylchitobiose-Standardlösung (5.19.4) gegeben und gut gemischt. Anschließend werden 400 µl dieser Lösung in ein 2-ml-Reaktionsgefäß überführt, es werden 1 200 µl Elutionslösung für die SPE (5.19.14) zugegeben und gut gemischt. Zu 700 µl dieser Lösung werden 300 µl Natriumacetat-Pufferlösung (5.19.3) zugegeben. Gut mischen, dann wird für 5 Minuten bei 10 000 *g* zentrifugiert. 900 µl des Überstandes werden in ein Fläschchen überführt, das für den automatischen Probengeber des Messinstruments geeignet ist.

6 Prüfeinrichtung

Übliche Laborgeräte und insbesondere die folgenden.

- 6.1 **Analysenwaage**, Ablesbarkeit von 0,1 g.
- 6.2 **pH-Messgerät**, Ablesbarkeit von pH = 0,1.
- 6.3 **Mikrozentrifugenröhrchen**, Volumen von 1,5 ml und 2 ml.
- 6.4 **Wasserbad**, bei 80 °C ± 1 °C, mit Magnetrührer, sofern vorhanden.
- 6.5 **Wasserbad**, bei 40 °C ± 1 °C.
- 6.6 **Zentrifuge**, für 1,5 ml- und 2 ml-Mikroröhrchen, die bei 10 000 *g* arbeiten kann.
- 6.7 **Mikropipetten mit Spitzen**, Volumen von 0,1 ml bis 1 ml.
- 6.8 **Vortex-Mischer**.
- 6.9 **Kunststoffpipette für den Einmalgebrauch**, graduiert, Volumen von 2 ml, 10 ml und 25 ml.
- 6.10 **Einmalspritzen**, Volumen von 2 ml.

6.11 Mit graphitiertem Kohlenstoff (100 mg, 1 ml) befüllte SPE-Säulen (Supelclean™ ENVI-Carb™³ oder gleichwertig).

6.12 Membranfilter aus Nylon, 0,2 µm und ein Durchmesser von 4,7 cm.

6.13 Trennsäulen.

6.13.1 Säule A, CarboPac™³ PA20, (150 mm × 3 mm, 6,5 µm) oder gleichwertig.

6.13.2 Säulen B, CarboPac™³ PA1, (250 mm × 2 mm, 10 µm) mit Vorsäule (50 mm × 2 mm, 10 µm) oder gleichwertig.

6.13.3 Metallfreier Flüssigchromatograph bestehend aus:

- Quaternäre Gradientenpumpe, die einen Durchfluss von 0,5 ml/min für Säule A (6.13.1) oder 0,25 ml/min für Säule B (6.13.2) liefern kann;
- Automatischer Probengeber (eine Kühleinrichtung wird empfohlen), der 25 µl für Säule A (6.13.1) oder 20 µl für Säule B (6.13.2) injizieren kann;
- Säulenfach, das eine Temperatur von 30 °C für Säule A (6.13.1) oder 20 °C für Säulen B (6.13.2) aufrechterhalten kann;
- elektrochemischer Detektor, der im gepulsten amperometrischen Detektormodus arbeitet, ausgestattet mit einer Gold-Arbeits Elektrode und einer Ag/AgCl-Referenzelektrode;
- isokratische Pumpe zur Nachsäulenförderung, mit Pulsationsdämpfer, 125 µl Reaktionsschleife und T-Stück;
- Datenerfassungssystem.

7 Durchführung

7.1 Probenvorbereitung

7.1.1 Pulvrige oder konzentrierte Produkte auf Basis von Fertignahrung (RTF) und Pulverprodukte, die auf Subgramm-Ebene inhomogen sind

Pulver- oder Flüssigkeitskonzentrate werden entsprechend den Anweisungen wiederaufbereitet. Zum Beispiel wird Säuglingsnahrungspulver auf 25 g (m_R) genau in eine geeignete Flasche eingewogen, 200 g deionisiertes Wasser (V_R) zugegeben und bei Raumtemperatur gut gemischt, um eine homogene Suspension zu bilden. Es wird wie in 7.1.2 beschrieben vorgegangen.

3 Dies ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches 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.

7.1.2 Wiederaufbereitete Produkte, wie in 7.1.1 vorbereitet oder als RTF verkaufte Produkte

Es wird gut gemischt, um die Homogenität der Prüfmenge sicherzustellen. Es werden 9 g (m_A) der Probe in einen 50 ml-Messkolben (V_A) eingewogen. Es werden 30 ml deionisiertes Wasser zugegeben und bestätigt, dass der pH-Wert zwischen pH = 5 und pH = 9 liegt (mit Salzsäure oder Natriumhydroxid anpassen, sofern erforderlich). Bei 80 °C wird unter ständigem Rühren für 20 min erhitzt. Es wird auf Raumtemperatur abgekühlt und mit deionisiertem Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Dies ist Lösung A. Es wird wie in 7.1.4 beschrieben vorgegangen.

7.1.3 Homogene pulvrige Produkte ohne vorherige Wiederaufbereitung

Es wird 1 g (m_A) des Pulvers in einen 50 ml-Messkolben (V_A) eingewogen. Es werden 30 ml deionisiertes Wasser hinzugegeben und bestätigt, dass der pH-Wert zwischen pH = 5 und pH = 9 liegt (mit Salzsäure oder Natriumhydroxid anpassen, sofern erforderlich). Bei 80 °C wird unter ständigem Rühren für 20 min erhitzt. Es wird auf Raumtemperatur abgekühlt und mit deionisiertem Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Dies ist Lösung A. Es wird wie in 7.1.4 beschrieben vorgegangen.

7.1.4 Verdünnung

Die oben hergestellten Lösungen werden je nach erwartetem Fructangehalt weiter verdünnt. Empfohlene Verdünnungen sind in Tabelle 2 angegeben. Die resultierende Lösung ist Lösung B.

Tabelle 2 — Schema für die Probenverdünnung in Abhängigkeit vom erwarteten Fructangehalt

Erwarteter Fructangehalt g/100 g		Verdünnung		Verdünnungsfaktor
Pulver	RTF	Volumen von Lösung A (7.1.2 oder 7.1.3)	Endvolumen ml	
0,2 – 4,0	0,03 – 0,45	Keine Verdünnung	Keine Verdünnung	1
2,5 – 45	0,3 – 4,5	5	50	10
25 – 100	3,0 – 45	0,5	50	100

7.1.5 Hydrolyse von Saccharose und α -Glucanen

Es werden 200 μ l von Lösung B in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt, 100 μ l interne N,N'-Diacetylchitobiose-Standardlösung (5.19.4) und 200 μ l des Enzymgemischs aus Sucrase, β -Amylase, Pullulanase und Maltase (5.19.10) zugegeben. Es wird gut gemischt, die Reaktionsgefäße werden auf einen Schwimmständer gestellt und bei 40 °C für 90 min inkubiert. Es wird auf Raumtemperatur abgekühlt.

WICHTIG — Diese Bedingungen (Zeit und Temperatur) sind entsprechend den Empfehlungen der Enzymhersteller anzupassen.

7.1.6 Carrez-Klärung (optional, Anwendung bei Schwierigkeiten beim Durchleiten der Probe durch die SPE)

Der Probe werden 10 μ l Carrez I-Lösung (5.19.7) zugegeben und gut gemischt. Anschließend werden der Probe 10 μ l Carrez II-Lösung (5.19.8) zugegeben und erneut gut gemischt. Es wird bei 10 000 g für 10 min zentrifugiert und der Überstand für den nächsten Schritt verwendet.