

DIN 10482-2

ICS 67.100.30

**Bestimmung des Annattogetherhaltes in Käse –
Teil 2: Hochleistungsflüssigchromatographisches Verfahren**

Determination of Annatto content in cheese –
Part 2: High performance liquid chromatographic method

Détermination de la teneur d'annatto en fromage –
Partie 2: Méthode par chromatographie en phase liquide à haute performance

Gesamtumfang 14 Seiten

Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN

Inhalt

	Seite
Vorwort	3
1 Anwendungsbereich	3
2 Normative Verweisungen	3
3 Begriffe	3
4 Abkürzungen	3
5 Kurzbeschreibung	3
6 Chemikalien	4
7 Geräte und Hilfsmittel	6
8 Probenahme	7
9 Durchführung	7
10 Auswertung	9
11 Präzision des Verfahrens	10
12 Untersuchungsbericht	11
Anhang A (informativ) Musterchromatogramm	12
Anhang B (informativ) Ergebnisse des Ringversuchs	13
Literaturhinweise	14

Vorwort

Diese Norm wurde vom Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte, Arbeitsausschuss „Chemische und physikalische Untersuchung von Milch und Milchprodukten“ erarbeitet.

DIN 10482, *Bestimmung des Annattogehaltenes in Käse* besteht aus:

- Teil 1: *Photometrisches Verfahren*
- Teil 2: *Hochleistungsflüssigchromatographisches Verfahren*

1 Anwendungsbereich

Diese Norm legt ein Verfahren zur Bestimmung von Annatto (E160b) nach Festphasenextraktion (SPE) mit Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) fest [1]. Es ist für Käse anwendbar.

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).

DIN EN 707, *Milch und Milchprodukte — Leitfaden zur Probenahme*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieser Norm gilt der folgende Begriff.

3.1

Annatto (E160b)

natürlicher gelber Farbstoff, der in den reifen Samenschalen von *bixa orellana* enthalten ist

ANMERKUNG Der aus dem Samen extrahierte Farbstoff besteht, abhängig vom Extraktionsverfahren, aus den Carotinoiden Bixin ($C_{25}H_{30}O_4$) und/oder Norbixin ($C_{24}H_{28}O_4$), die jeweils als cis- oder trans-Isomere auftreten können [2].

4 Abkürzungen

SPE: (en: Solid Phase Extraction) Festphasenextraktion

HPLC: (en: High Performance Liquid Chromatography) Hochleistungsflüssigchromatographie

5 Kurzbeschreibung

Die Bestimmung des Annattogehaltenes erfolgt durch HPLC-Messung nach Extraktion aus der Probe und Abtrennung von Begleitstoffen mittels Festphasenextraktion (SPE). Hierzu wird das Probenmaterial mit salzsaurem Aceton ausgeschüttelt. Durch Aufarbeitung an einer Festphasenextraktionssäule werden Fett und

β -Carotin abgetrennt und anschließend Annatto eluiert. Die Annattobestandteile Bixin (cis-, trans-Isomere) und Norbixin (cis-, trans-Isomere) werden in einer geeigneten Probenlösung durch HPLC-Analyse getrennt und spektralphotometrisch bei 460 nm detektiert. Die Annattobestandteile werden anhand der Retentionszeiten identifiziert und mithilfe einer Regressionsgeraden quantitativ bestimmt.

6 Chemikalien

6.1 Allgemeines

Es sind analysenreine Chemikalien zu verwenden. Das verwendete Wasser muss bidestilliert oder mindestens von entsprechender Reinheit sein.

6.2 Chemikalien für die Extraktion von Annatto aus Käse

6.2.1 Seesand (Filtrationshilfe)

6.2.2 Extraktionslösung salzsaures Aceton

200 ml Aceton $w(\text{C}_3\text{H}_6\text{O}) = 100 \%^{1)}$ und 2 ml Salzsäure mit $c(\text{HCl}) = 2 \text{ mol/l}^{2)}$ werden miteinander vermischt.

6.2.3 Ethanol abs. $w(\text{C}_2\text{H}_6\text{O}) = 100 \%^{1)}$

6.2.4 Stickstoff, gasförmig

Der für die Vertreibung des salzsauren Acetons verwendete Stickstoff muss partikelfrei sein. Der Gasdruck muss fein regulierbar sein (Reduzierventil).

6.2.5 Aceton

6.3 Chemikalien für die Festphasenextraktion (SPE)

6.3.1 n-Hexan

6.3.2 n-Hexan/Diethylether, im Volumenverhältnis 1 : 1

10 ml n-Hexan und 10 ml Diethylether werden miteinander vermischt.

6.3.3 Methanol-Eisessig, im Volumenverhältnis 7 : 3

70 ml Methanol und 30 ml Eisessig werden miteinander vermischt.

Die Lösung wird für jede Untersuchung frisch hergestellt.

1) w ist der Massenanteil.

2) c ist die Stoffmengenkonzentration.

6.4 Chemikalien für die HPLC

6.4.1 Acetonitril, geeignet für die HPLC

6.4.2 Essigsäure $\phi(\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2) = 5\%^{3)}$

5 ml Eisessig werden mit 95 ml Wasser vermischt.

6.5 Mobile Phase für die HPLC (Acetonitril/Essigsäure 75 : 25 (Volumenverhältnis))

250 ml der 5%igen Essigsäure (6.4.2) werden mit 750 ml Acetonitril (6.4.1) vermischt.

6.6 Chemikalien für photometrische Annattogehaltsbestimmung

WARNUNG — Bei Arbeiten mit Trichlormethan muss Verschlucken und Berührung mit der Haut vermieden werden. Daher sind unbedingt geeignete Schutzkleidung und Handschuhe zu tragen.

6.6.1 Trichlormethan, geeignet für photometrische Messungen

6.6.2 Kaliumhydroxid-Lösung, $w(\text{KOH}) = 2,5\%$

2,5 g Kaliumhydroxid werden in 97,5 g Wasser gelöst.

6.7 Standardsubstanzen

Dragoco Annatto-Gelb (Bixin in Pflanzenöl, etwa 0,5 %); Dragoco Holzminden⁴⁾; wasserlösliches Annatto-A-160-WS (0,53 % bis 0,60 % Norbixin in 2,5%iger Kaliumhydroxid-Lösung); Hansen Dänemark⁴⁾

6.8 Stamm- und Standardlösungen

Bixin-Stammlösung: 500 μl Dragoco Annatto-Gelb⁴⁾ werden mit Trichlormethan (6.6.1) auf 50 ml aufgefüllt.

Norbixin-Stammlösung: 500 μl wasserlösliches Annatto-A-160-WS⁴⁾ werden mit 2,5%iger Kaliumhydroxid-Lösung (6.6.2) auf 50 ml aufgefüllt.

Die Stammlösung ist bei lichtgeschützter Lagerung bei 4 °C für sechs Tage haltbar.

Fünf Standardlösungen mit einem Gehalt von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ bis 5 $\mu\text{g/ml}$ werden jeweils durch Verdünnen der Bixin-Stammlösung und der Norbixin-Stammlösung mit Methanol/Eisessig (6.3.3) hergestellt. Dafür werden 20 μl , 100 μl , 200 μl , 500 μl und 1 000 μl Stammlösung auf das Endvolumen von 10 ml verdünnt. Der exakte Gehalt der Standardlösungen wird photometrisch bestimmt und für die HPLC-Quantifizierung unmittelbar angewendet. Bei Verwendung eines Mischstandards dürfen aufgrund von Entmischungseffekten maximal 500 μl der jeweiligen Standardlösung eingesetzt werden.

3) ϕ ist der Volumenanteil.

4) Die in 6.7 bzw. 6.8 festgelegten Standardsubstanzen sind Herstellerbezeichnungen der Produkte und Beispiele für geeignete handelsübliche Produkte. Die Angaben dienen nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Norm und bedeuten keine Anerkennung der genannten Produkte durch das DIN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.