

DIN EN 12821

ICS 67.050

Ersatz für
DIN EN 12821:2000-07

**Lebensmittel –
Bestimmung von Vitamin D mit
Hochleistungs-Flüssigchromatographie –
Bestimmung von Cholecalciferol (D₃) oder Ergocalciferol
(D₂);
Deutsche Fassung EN 12821:2009**

Foodstuffs –

Determination of vitamin D by high performance liquid chromatography –
Measurement of cholecalciferol (D₃) or ergocalciferol (D₂);
German version EN 12821:2009

Produits alimentaires –

Dosage de la vitamine D par chromatographie liquide haute performance –
Dosage du cholécalfcérol (D₃) ou de l'ergocalciferol (D₂);
Version allemande EN 12821:2009

Gesamtumfang 26 Seiten

Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 12821:2009) ist vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ (Sekretariat: DIN, Deutschland) des Europäischen Komitees für Normung (CEN) nach eingehenden Vorarbeiten der Arbeitsgruppe 9 „Vitamine und Carotinoide“ erarbeitet worden.

Das zuständige deutsche Arbeitsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-01-13 AA „Vitamine und Carotinoide“ des Normenausschusses „Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte“ (NAL) im DIN Deutsches Institut für Normung e. V. Deutsche Experten haben maßgeblich an der Erstellung dieser Norm mitgewirkt.

Für die in diesem Dokument zitierten Normen wird im Folgenden auf die entsprechenden Deutschen Normen hingewiesen:

EN ISO 3696 siehe DIN ISO 3696

Änderungen

Gegenüber DIN EN 12821:2000-07 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) der Titel wurde geändert („Bestimmung von Cholecalciferol (D₃) oder Ergocalciferol (D₂)“ statt „Bestimmung von Cholecalciferol (D₃) und Ergocalciferol (D₂)“);
- b) die Normative Verweisung auf EN ISO 5555 wurde gestrichen;
- c) die Validierungsdaten für das Verfahren nach externem Standard wurden gelöscht;
- d) die Angaben zu den validierten Lebensmitteln wurden präzisiert;
- e) die Angaben zu einzelnen Reagenzien wurden präzisiert;
- f) die Bilder wurden aktualisiert;
- g) Formulierungen aus dieser Norm wurden an Formulierungen aus neueren Normen aus diesem Bereich angepasst;
- h) die Norm wurde den gültigen Gestaltungsregeln angepasst.

Frühere Ausgaben

DIN EN 12821: 2000-07

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

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

Deutsche Fassung

**Lebensmittel —
Bestimmung von Vitamin D mit Hochleistungs-
Flüssigchromatographie —
Bestimmung von Cholecalciferol (D₃) oder Ergocalciferol (D₂)**

Foodstuffs —
Determination of vitamin D by high performance liquid
chromatography —
Measurement of cholecalciferol (D₃) or ergocalciferol (D₂)

Produits alimentaires —
Dosage de la vitamine D par chromatographie liquide haute
performance —
Dosage du cholécalfcérol (D₃) ou de l' ergocalciférol (D₂)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 21. Februar 2009 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim Management-Zentrum des CEN oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, der Schweiz, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

Management-Zentrum: Avenue Marnix 17, B-1000 Brüssel

Inhalt

	Seite
Vorwort	3
1 Anwendungsbereich	4
2 Normative Verweisungen	4
3 Kurzbeschreibung	4
4 Chemikalien	4
5 Geräte	8
6 Durchführung	9
7 Berechnung	12
8 Präzision	12
9 Untersuchungsbericht	13
Anhang A (informativ) Beispiele für geeignete HPLC-Systeme	14
Anhang B (informativ) Beispiele für geeignete Extraktions- und Verseifungsbedingungen	15
Anhang C (informativ) Beispiele für Chromatogramme in der semipräparativen und analytischen HPLC	16
Anhang D (informativ) Präzisionsdaten	18
Anhang E (informativ) Zusätzliche Reinigungsschritte für die Bestimmung von Vitamin D unter Verwendung präparativer TLC, chromatographischer Säulen und/oder SPE	20
Literaturhinweise	24

Vorwort

Dieses Dokument (EN 12821:2009) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelerzeugnisse — Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Oktober 2009, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Oktober 2009 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Texte dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN [und/oder CENELEC] sind nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Dieses Dokument ersetzt EN 12821:2000.

Entsprechend der CEN/CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

1 Anwendungsbereich

Diese Europäische Norm legt ein Verfahren zur Bestimmung von Vitamin D₃ (Cholecalciferol) oder Vitamin D₂ (Ergocalciferol) in Lebensmitteln mit Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) fest.

Vitamin D₃ kommt hauptsächlich in tierischen Lebensmitteln vor, während Vitamin D₂ hauptsächlich in wilden Pilzen nachgewiesen wird. Beide Vitamine D₂ und D₃ können in angereicherten Lebensmitteln vorkommen. Diese Europäische Norm ist nicht auf Lebensmittel anwendbar, die gleichzeitig Vitamin D₂ und Vitamin D₃ enthalten.

Neben der Vitamin-D-Aktivität von Vitamin D₂ und D₃ tragen auch die entsprechenden Metabolite 25-Hydroxy-Vitamin D und 1,25-Dihydroxy-Vitamin D zur Vitamin D-Aktivität bei. Diese Europäische Norm deckt nur die Messung von Vitamin D₂ oder Vitamin D₃ ab.

Diese Europäische Norm bietet die Basis für analytische Vorgehensweisen. Sie dient als Rahmen für den Analytiker, sein eigenes analytisches Verfahren in Übereinstimmung mit dieser Norm zu definieren.

Das Verfahren wurde in einem Ringversuch an angereicherten und naturbelassenen Proben wie Margarine, Milch, Milchpulver, flüssige Säuglingsnahrung, Säuglingsnahrung (Pulver), Speiseöl und Fischöl im Ringversuch getestet, wobei Proben im Bereich von 0,4 µg/100 g bis 14 µg/100 g eingesetzt wurden. Weitere Informationen zu Validierungsdaten sind in Anhang D angegeben.

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).

EN ISO 3696, *Wasser für analytische Laborzwecke — Spezifikation und Prüfverfahren* (ISO 3696:1987)

3 Kurzbeschreibung

Vitamin D₃ und Vitamin D₂ werden in dem Lebensmittel mit alkoholischer Kaliumhydroxid-Lösung verseift und mit einem geeigneten Lösemittel extrahiert. Die Bestimmung von Vitamin D₃ oder Vitamin D₂ erfolgt aus einer geeigneten Probenmesslösung durch semipräparative Normalphasen-HPLC mit anschließender analytischer Umkehrphasen-HPLC.

Bei der Bestimmung von Vitamin D₃ wird Vitamin D₂ als interner Standard verwendet. Bei der Bestimmung von Vitamin D₂ wird Vitamin D₃ als interner Standard verwendet.

Vitamin D wird mit Ultraviolett-(UV-)Spektralphotometrie detektiert. Die Peaks werden anhand ihrer Retentionszeiten und zusätzlich, falls mit einem Dioden-Array detektiert wird, anhand eines UV-Spektrums identifiziert. Der Massenanteil wird mit dem Verfahren des internen Standards über die Peakflächen bzw. Peakhöhen bestimmt, siehe [1] bis [8].

4 Chemikalien

4.1 Allgemein

Falls nicht anders angegeben, werden bei der Analyse nur analysenreine Chemikalien und Wasser von mindestens Qualität 1 nach EN ISO 3696 verwendet.

4.2 Methanol

4.3 Ethanol, Volumenanteil φ (C₂H₅OH) = 100 %

4.4 Ethanol, φ (C₂H₅OH) = 96 %

4.5 Natriumsulfat, wasserfrei

4.6 Kaliumhydroxid-Lösungen für die Verseifung, in geeigneten Konzentrationen, z. B. Massenkonzentration ρ (KOH) = 50 g/100 ml oder ρ (KOH) = 60 g/100 ml, oder alkoholische Lösungen, z. B. 28 g KOH in 100 ml einer Ethanol-Wasser-Mischung mit einem Volumenanteil an Ethanol von 90 %.

4.7 Antioxidantien, wie Ascorbinsäure (AS), Natriumascorbat, Pyrogallol, Natriumsulfid (Na₂S) oder Butylhydroxytoluol (BHT).

4.8 Lösemittel und Extraktionsmittel, wie Diethylether (peroxidfrei), Dichlormethan, Petroleumbenzin, *n*-Hexan, Ethylacetat oder geeignete Mischungen davon.

4.9 Mobile Phasen für die HPLC

4.9.1 Beispiele für Lösemittelmischungen für die semi-präparative Normalphasen-HPLC

Beispiele geeigneter Lösemittelmischungen (angegeben als Volumenanteile) für die semipräparative Normalphasen-HPLC:

- *n*-Hexan und 2-Propanol (98 + 2), (99 + 1) oder (95 + 5);
- *n*-Hexan und Isoamylalkohol (99 + 1);
- *n*-Hexan, 2-Propanol und Tetrahydrofuran (98 + 1 + 1);
- Isooctan und Isobutanol (99 + 1);
- *n*-Heptan und 2-Propanol (97 + 3).

4.9.2 Beispiele für Lösemittel und Lösemittelmischungen für die analytische Umkehrphasen-HPLC

Beispiele geeigneter Lösemittel und Lösemittelmischungen (angegeben als Volumenanteile) für die analytische Umkehrphasen-HPLC:

- Methanol;
- Methanol und Wasser (95 + 5) oder (93 + 7);
- Acetonitril und Methanol (80 + 20), (90 + 10) oder (70 + 30);
- Acetonitril, Chloroform und Methanol (93 + 4 + 3).

4.10 Standardsubstanzen

4.10.1 Ergocalciferol-Standardsubstanz (Vitamin D₂), Molare Masse M (C₂₈H₄₄O) = 396,7 g/mol

Die Vitamin D₂-Standardsubstanz muss die höchste lieferbare Reinheit aufweisen (Massenanteil von mindestens 98 %) und nach den Vorschriften des Herstellers aufbewahrt werden (unter Lichtausschluss, üblicherweise unter 4 °C).

4.10.2 Cholecalciferol-Standardsubstanz (Vitamin D₃), $M(C_{27}H_{44}O) = 384,6 \text{ g/mol}$

Die Vitamin D₃-Standardsubstanz muss die höchste lieferbare Reinheit aufweisen (Massenanteil von mindestens 98 %) und nach den Vorschriften des Herstellers aufbewahrt werden (unter Lichtausschluss, üblicherweise unter 4 °C).

4.11 Stammlösungen

4.11.1 Vitamin D₂-Stammlösung

Etwa 100 mg Vitamin D₂ (4.10.1) werden auf 1 mg in einen 100 ml-Messkolben eingewogen, in Ethanol (4.4) gelöst, und die Lösung wird mit Ethanol bis zur Marke aufgefüllt. Diese Lösung enthält etwa 1 mg/ml Vitamin D₂. Die Lösung wird bei weniger als 4 °C und lichtgeschützt aufbewahrt.

Die Massenkonzentration der Stammlösung und der Massenanteil der Vitamin D₂-Standardsubstanz werden nach dem in 4.12.1 beschriebenen Verfahren berechnet.

Diese Lösung ist 6 Monate bei –18 °C stabil.

4.11.2 Vitamin D₃-Stammlösung

Etwa 100 mg Vitamin D₃ (4.10.2) werden auf 1 mg in einen 100-ml-Messkolben eingewogen, in Ethanol (4.4) gelöst, und die Lösung wird mit Ethanol bis zur Marke aufgefüllt. Diese Lösung enthält etwa 1 mg/ml Vitamin D₃. Die Lösung wird bei weniger als 4 °C und lichtgeschützt aufbewahrt.

Die Massenkonzentration der Stammlösung und der Massenanteil der Vitamin D₃-Standardsubstanz werden nach dem in 4.12.2 beschriebenen Verfahren berechnet.

Diese Lösung ist 6 Monate bei –18 °C stabil.

4.12 Standardlösungen

4.12.1 Vitamin D₂-Standardlösung

1 ml Vitamin D₂-Stammlösung (4.11.1) wird in einen 100-ml-Messkolben pipettiert und mit Ethanol (4.4) bis zur Marke aufgefüllt. Diese Lösung enthält etwa 10 µg/ml Vitamin D₂. Diese Lösung ist am Verwendungstag herzustellen.

ANMERKUNG Die Massenkonzentrationen der Standardlösungen können falls nötig und je nach Untersuchungsbedingungen verändert werden.

Die Absorption der Vitamin D₂-Standardlösung wird in einer 1-cm-Quarzküvette bei 265 nm gegen Ethanol gemessen. Die Massenkonzentration an Vitamin D₂, ρ_{D_2} , in Mikrogramm je Milliliter in der Standardlösung wird nach Gleichung (1) berechnet:

$$\rho_{D_2} = \frac{A_{265} \times M_{D_2} \times 1000}{\varepsilon \times b} \quad (1)$$

Dabei ist

A_{265} ist die Absorption der Vitamin D₂-Standardlösung bei 265 nm;

M_{D_2} ist die Molare Masse von Vitamin D₂ ($M_{D_2} = 396,7 \text{ g/mol}$);