

© DIN Deutsches Institut für Normung e.V. · Jede Art der Vervielfältigung, auch auszugsweise,  
nur mit Genehmigung des DIN Deutsches Institut für Normung e.V., Berlin, gestattet.  
Alleinverkauf der Normen durch Beuth Verlag GmbH, 10772 Berlin

– Leerseite –

## Deutsche Fassung

Lebensmittel

### Bestimmung von Vitamin A mit Hochleistungs-Flüssigchromatographie

Teil 1: Bestimmung von all-trans-Retinol und 13-cis-Retinol

Foodstuffs – Determination of vitamin A by high performance liquid chromatography – Part 1: Measurement of all-trans-retinol and 13-cis-retinol

Produits alimentaires – Dosage de la vitamine A par chromatographie liquide haute performance – Partie 1: Dosage du tout-trans-rétinol et du 13-cis-rétinol

Diese Europäische Norm wurde von CEN am 2. Januar 2000 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 Zentralsekretariat 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 Zentralsekretariat mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Dänemark, Deutschland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Luxemburg, Niederlande, Norwegen, Österreich, Portugal, Schweden, Schweiz, Spanien, der Tschechischen Republik und dem Vereinigten Königreich.

# CEN

EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG

European Committee for Standardization

Comité Européen de Normalisation

**Zentralsekretariat: rue de Stassart 36, B-1050 Brüssel**

## Inhalt

|                                                               | Seite |
|---------------------------------------------------------------|-------|
| Vorwort .....                                                 | 2     |
| 1 Anwendungsbereich .....                                     | 2     |
| 2 Normative Verweisungen .....                                | 2     |
| 3 Prinzip .....                                               | 3     |
| 4 Chemikalien .....                                           | 3     |
| 5 Geräte .....                                                | 5     |
| 6 Probenahme .....                                            | 5     |
| 7 Durchführung .....                                          | 6     |
| 8 Berechnung .....                                            | 7     |
| 9 Präzision .....                                             | 8     |
| 10 Untersuchungsbericht .....                                 | 9     |
| Anhang A (informativ) Beispiele für HPLC-Chromatogramme ..... | 10    |
| Anhang B (informativ) Präzisionsdaten .....                   | 11    |
| Anhang C (informativ) Alternative HPLC-Systeme .....          | 12    |
| Literaturhinweise .....                                       | 12    |

## Vorwort

Diese Europäische Norm wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik – Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN geführt wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis August 2000, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis August 2000 zurückgezogen werden.

Entsprechend der CEN/CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen:

Belgien, Dänemark, Deutschland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Luxemburg, Niederlande, Norwegen, Österreich, Portugal, Schweden, Schweiz, Spanien, die Tschechische Republik und das Vereinigte Königreich.

Diese Europäische Norm EN 12823 *Lebensmittel – Bestimmung von Vitamin A mit Hochleistungs-Flüssigchromatographie* besteht aus zwei Teilen:

Teil 1: *Bestimmung von all-trans-Retinol and 13-cis-Retinol.*

Teil 2: *Bestimmung von  $\beta$ -Carotin.*

Diese Europäische Norm ist die Grundlage für Analyseverfahren. Es ist vorgesehen, dass der Analytiker anhand dieser Rahmenbedingungen seine eigene Untersuchungsweise wählt, die in Übereinstimmung mit dieser standardisierten Vorgehensweise ist.

## 1 Anwendungsbereich

Diese Europäische Norm legt ein Verfahren zur Bestimmung von Vitamin A in Lebensmitteln mit Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) fest. Die Bestimmung des Vitamin A-Gehaltes erfolgt durch Bestimmung von all-trans-Retinol, von 13-cis-Retinol sowie von  $\beta$ -Carotin. Dieser Teil enthält die Bestimmung von all-trans-Retinol und 13-cis-Retinol.

Der in diesem Verfahren nach der Verseifung gewonnene Extrakt kann für die Bestimmung des  $\beta$ -Carotins verwendet werden, wie in EN 12823-2 : 2000 „Lebensmittel – Bestimmung von Vitamin A mit Hochleistungs-Flüssigchromatographie – Bestimmung von  $\beta$ -Carotin“ beschrieben.

## 2 Normative Verweisungen

Diese Europäische Norm enthält durch datierte oder undatierte Verweisungen Festlegungen aus anderen Publikationen. Diese normativen Verweisungen sind an den jeweiligen Stellen im Text zitiert, und die Publikationen sind nachstehend aufgeführt. Bei datierten Verweisungen gehören spätere Änderungen oder Überarbeitungen dieser Publikationen nur zu dieser Europäischen Norm, falls sie durch Änderung oder Überarbeitung eingearbeitet sind. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe der in Bezug genommenen Publikation (einschließlich Änderungen).

EN ISO 3696, *Wasser für analytische Zwecke – Anforderungen und Prüfungen* (ISO 3696 : 1987).

EN ISO 5555, *Tierische und pflanzliche Fette und Öle – Probenahme* (ISO 5555 : 1991).

### 3 Prinzip

Retinol wird aus Lebensmitteln durch Verseifung mit ethanolischer oder methanolischer Kaliumhydroxid-Lösung freigesetzt; danach erfolgt eine Lösemittel-Extraktion und die Bestimmung mit Hochleistungs-Flüssigchromatographie mit Fluoreszenz- (F) oder Ultraviolett (UV)-Detektion. Die Substanzen werden anhand ihrer Retentionszeiten identifiziert und mit externem Standard über die Peakflächen bzw. Peakhöhen bestimmt, siehe [1] bis [4].

### 4 Chemikalien

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

#### 4.1 Methanol

**4.2 Ethanol abs.**, Volumenanteil  $\varphi$  ( $C_2H_5 OH$ ) = 100 %

**4.3 Ethanol**  $\varphi$  ( $C_2H_5 OH$ ) = 96 %

**4.4 Natriumsulfat**, wasserfrei

**4.5 Kaliumhydroxid-Lösungen zur Verseifung** in geeigneten Massenkonzentrationen, z. B.  $\rho$  (KOH) = 50 g/100 ml oder 60 g/100 ml, oder alkoholische Lösungen, z. B. 28 g KOH in 100 ml einer Ethanol/Wasser-Mischung (9 + 1)(V + V).

**4.6 Antioxidantien** wie Ascorbinsäure (AS), Natriumascorbat, Natriumsulfid ( $Na_2S$ ) oder Butylhydroxytoluol (BHT), Pyrogallol oder Hydroxychinon.

**4.7 Lösemittel und Extraktionsmittel**, z. B. wie Diethylether (peroxidfrei), Diisopropylether, Petroleumbenzin (Siedebereich 40 °C bis 60 °C), *n*-Hexan, Butanol oder geeignete Mischungen davon.

#### 4.8 Mobile Phasen für die HPLC

Beispiele geeigneter Mischungen (in Volumenanteilen) sind:

*n*-Hexan + 2-Propanol (98 + 2);

Isooctan + 2-Propanol (98,5 + 1,5);

Isooctan + Isobutanol (98 + 2);

*n*-Hexan + *n*-Butanol (98 + 2)

und ein Gradient mit 2-Propanol + *n*-Heptan, (0,5 + 99,5) bis (8,5 + 91,5) in 12 min.

#### 4.9 Standardsubstanzen

##### 4.9.1 Allgemeines

All-trans-Retinol (all-trans-Vitamin A-Alkohol) und 13-cis-Retinol sind in unterschiedlichen Formen und von verschiedenen Lieferanten erhältlich. Es ist deshalb erforderlich, die Konzentration der Kalibrierlösung spektralphotometrisch (siehe 4.10.4) zu bestimmen. Falls Vitamin A-Ester (z. B. Retinylpalmitat oder -acetat) verwendet werden, muss die Konzentration nach der Verseifung geprüft werden (siehe 7.3.1).

ANMERKUNG Die Angaben über den Vitamin A-Gehalt der von verschiedenen Herstellern gelieferten Standardsubstanzen sollten besonders beachtet werden.

**4.9.2 All-trans-Retinol**, all-trans-Vitamin A-Alkohol,  $M(C_{20}H_{30}O) = 286,5$  g/mol, Reinheit von mindestens 90 %.

##### 4.9.3 Vitamin A-Ester

**4.9.3.1 Retinylpalmitat**, Vitamin A-Palmitat,  $M(C_{36}H_{60}O_2) = 524,9$  g/mol.

**4.9.3.2 Retinylacetat**, Vitamin A-Acetate,  $M(C_{22}H_{32}O_2) = 328,5$  g/mol, Reinheit von mindestens 90 %.

**4.9.4 13-cis-Retinol**,  $M(C_{20}H_{30}O) = 286,5$  g/mol, Reinheit von mindestens 60 % für qualitative Analysen.

#### 4.10 Stamm- und Standardlösungen

##### 4.10.1 All-trans-Retinol-Stammlösung

Etwa 50 mg all-trans-Retinol (4.9.2) werden auf 1 mg in einen 100-ml-Messkolben eingewogen, in *n*-Hexan oder anderen geeigneten Lösemitteln (4.7) gelöst, und die Lösung wird bis zur Marke aufgefüllt. Die Stammlösung enthält etwa 0,5 mg/ml.