

Tierische und pflanzliche Fette und Öle
Bestimmung der individuellen und der Gesamtsterine
 Gaschromatographisches Verfahren
 (ISO 12228 : 1999) Deutsche Fassung EN ISO 12228 : 1999

DIN
EN ISO 12228

ICS 67.200.10

Animal and vegetable fats and oils — Determination of individual and total sterols contents — Gas chromatographic method
 (ISO 12228 : 1999);
 German version EN ISO 12228 : 1999

Corps gras d'origines animale et végétale — Détermination de la teneur en stérols individuels et totaux — Méthode par chromatographie en phase gazeuse (ISO 12228 : 1999);
 Version allemande EN ISO 12228 : 1999

Die Europäische Norm EN ISO 12228 : 1999 hat den Status einer Deutschen Norm.

Nationales Vorwort

Diese Europäische Norm enthält unverändert die Internationale Norm ISO 12228, die vom Unterkomitee SC 11 „Tierische und pflanzliche Öle und Fette“ (Sekretariat: Vereinigtes Königreich) des Technischen Komitees ISO/TC 34 „Landwirtschaftliche Lebensmittelerzeugnisse“ (Sekretariat: Ungarn) unter deutscher Federführung erarbeitet wurde. Aufgrund der Ergebnisse des parallelen Abstimmungsverfahrens wurde ISO 12228 als Europäische Norm EN ISO 12228 übernommen.

Die Mitarbeit des DIN beim Europäischen Komitee für Normung (CEN) wird für den Bereich des CEN/TC 307 (Sekretariat: Frankreich) über das nationale Spiegelgremium „Öle, Fette und Ölsamen“ des Normenausschusses Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) wahrgenommen.

Für die im Abschnitt 2 zitierten Internationalen Normen wird im folgenden auf die entsprechenden Deutschen Normen hingewiesen:

ISO 661 siehe DIN EN ISO 661

ISO 3696 siehe DIN ISO 3696

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 661

Tierische und pflanzliche Fette und Öle — Vorbereitung der Untersuchungsprobe (ISO 661 : 1989);
 Deutsche Fassung EN ISO 661 : 1995

DIN ISO 3696

Wasser für analytische Zwecke — Anforderungen und Prüfungen; Identisch mit ISO 3696 : 1987

Fortsetzung 16 Seiten EN

Normenausschuß Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN Deutsches Institut für Normung e. V.

– Leerseite –

Deutsche Fassung

Tierische und pflanzliche Fette und Öle
Bestimmung der individuellen und der Gesamtsterine
Gaschromatographisches Verfahren
(ISO 12228 : 1999)

Animal and vegetable fats and oils — Determination of individual and total sterols contents — Gas chromatographic method (ISO 12228 : 1999)

Corps gras d'origines animale et végétale — Détermination de la teneur en stérols individuels et totaux — Méthode par chromatographie en phase gazeuse (ISO 12228 : 1999)

Diese Europäische Norm wurde von CEN am 17. Januar 1999 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 Definitionen.....	2
4 Prinzip.....	3
5 Chemikalien	3
6 Geräte	3
7 Probenahme.....	3
8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe	4
9 Durchführung	4
10 Angabe der Ergebnisse	5
11 Präzision.....	6
12 Untersuchungsbericht	6
Anhang A (informativ) Ringversuchsergebnisse	9
Anhang B (informativ) Literaturhinweise.....	16
Anhang ZA (normativ) Normative Verweisungen auf internationale Publikationen mit ihren entsprechenden europäischen Publikationen	16

Vorwort

Der Text der Internationalen Norm ISO 12228 : 1999 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Agricultural food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 307 „Ölsamen, tierische und pflanzliche Fette und Öle und deren Nebenprodukte — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“, dessen Sekretariat von AFNOR geführt wird, erarbeitet.

Diese Europäische Norm muß den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis September 1999, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis September 1999 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.

Anerkennungsnotiz

Der Text der Internationalen Norm ISO 12228 : 1999 wurde von CEN als Europäische Norm ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

ANMERKUNG: Die normativen Verweisungen auf internationale Publikationen sind im Anhang ZA (normativ) aufgeführt.

1 Anwendungsbereich

Diese Internationale Norm legt ein Verfahren zur gaschromatographischen Bestimmung des Gehalts an Sterinen und deren Zusammensetzung in tierischen und pflanzlichen Fetten und Ölen fest.

ISO 661 : 1989

Animal and vegetable fats and oils — Preparation of test samples

ISO 3696 : 1987

Water for analytical laboratory use — Specification and test methods

2 Normative Verweisungen

Die folgenden normativen Dokumente enthalten Festlegungen, die durch Verweisung in diesem Text Bestandteil der vorliegenden Internationalen Norm sind. Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung dieser Internationalen Norm waren die angegebenen Ausgaben gültig. Alle Normen unterliegen der Überarbeitung. Vertragspartner, deren Vereinbarungen auf dieser Internationalen Norm basieren, werden gebeten, die Möglichkeit zu prüfen, ob die jeweils neuesten Ausgaben der im folgenden genannten Normen angewendet werden können. Die Mitglieder von IEC und ISO führen Verzeichnisse der gegenwärtig gültigen Internationalen Normen.

3 Definitionen

Für die Anwendung dieser Internationalen Norm gelten die folgenden Definitionen:

3.1

Zusammensetzung der Sterine

Die Zusammensetzung der einzelnen Sterine in der Probe, beginnend mit Cholesterin und endend mit $\Delta 7$ -Avenasterin (siehe Tabelle 1), untersucht unter den in dieser Internationalen Norm festgelegten Bedingungen.

ANMERKUNG: Die Zusammensetzung wird als Peakfläche in Prozent, bezogen auf 100 %, angegeben.

3.2

Gesamtsteringehalt

Die Summe der Massen aller einzelnen Sterine, wie sie nach dem in dieser Internationalen Norm festgelegten Verfahren bestimmt wurden, beginnend mit Cholesterin und endend mit Δ^7 -Avenasterin (siehe Tabelle 1), dividiert durch die Masse der Prüfmenge.

ANMERKUNG: Der Gehalt wird in Milligramm je 100 Gramm angegeben.

4 Prinzip

Eine Prüfmenge wird durch Kochen mit einer ethanolischen Kaliumhydroxidlösung unter Rückfluß verseift. Die unverseifbaren Bestandteile werden durch Festphasenextraktion an einer Aluminiumoxidsäule abgetrennt. Durch die Aluminiumoxidsäule werden die Fettsäureanionen zurückgehalten; Sterine durchlaufen die Säule. Die Sterinfraction wird von den unverseifbaren Bestandteilen durch Dünnschichtchromatographie abgetrennt. Die Bestimmung der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung der Sterinfraction erfolgt durch Gaschromatographie unter Verwendung von Betulin als interner Standard.

5 Chemikalien

Falls nicht anders festgelegt, sind nur Chemikalien von anerkannter Analysenreinheit und Wasser des Reinheitsgrades 3 nach ISO 3696 zu verwenden.

5.1 Kaliumhydroxid, ethanolische Lösung, $c(\text{KOH}) \approx 0,5 \text{ mol/l}$.

3 g Kaliumhydroxid werden in 5 ml Wasser gelöst und auf 100 ml mit Ethanol (5.3) aufgefüllt. Die Lösung muß farblos oder hellgelb sein.

5.2 Interne Standardlösung, Betulin 1,0 mg/ml, gelöst in Aceton (siehe Anmerkung zu 5.10).

ANMERKUNG: Bei Oliventresterölen, die Betulin enthalten können, empfiehlt sich die Verwendung von 5α -Cholestan- 3β -ol (Peak 2 in Tabelle 1) als interner Standard.

5.3 Ethanol, min. 95 % (V/V).

5.4 Aluminiumoxid, neutral, 0,063 mm bis 0,200 mm, Aktivitätsstufe I.

5.5 Diethylether, frisch destilliert, frei von Peroxiden und Rückständen.

Warnhinweis: Diethylether ist hochentzündlich und kann explosive Peroxide bilden. Die Grenzen der Explosivität in Luft liegen zwischen 1,7 % (V/V) und 48 % (V/V). Bei seiner Verwendung sind besondere Vorsichtsmaßnahmen anzuwenden.

5.6 Platten für die Dünnschichtchromatographie, Kieselgel, wie handelsüblich erhältlich, Größe 20 cm $\times$ 20 cm. Schichtdicke 0,25 mm.

5.7 Fließmittel, Hexan/Diethylether [1 : 1 (V/V)].

5.8 Standardlösung für die Dünnschichtchromatographie, 1,0 mg/ml Cholesterin und 5,0 mg/ml Betulin in Aceton.

5.9 Sprühmittel, Methanol.

5.10 Silylierungsreagens, hergestellt durch Hinzufügen von 50 μl 1-Methylimidazol zu 1 ml N-Methyl-N-trimethylsilyl-Heptafluorobutyramid (MSHFBA).

ANMERKUNG: Andere Silylierungsreagenzien sollten üblicherweise nicht verwendet werden, ohne daß spezielle Vorkehrungen getroffen werden, um sicherzustellen, daß beide Hydroxylgruppen des Betulins silyliert werden. Wenn dies nicht der Fall ist, dann kann das Betulin zwei Peaks im Chromatogramm zeigen.

6 Geräte

Die übliche Laboratoriumsausrüstung und im einzelnen folgende Geräte:

6.1 Rundkolben, 25 ml und 50 ml Nennvolumen mit Schliffhals.

6.2 Rückflußkühler mit Schliffverbindung für einen Kolben (6.1).

6.3 Glassäule mit PTFE-Hahn, Glasfritte und Vorratsbehälter mit 100 ml Inhalt, Länge 25 cm, Innendurchmesser 1,5 cm.

6.4 Rotationsverdampfer, angeschlossen an eine Vakuumpumpe und ein auf 40 °C eingestelltes Wasserbad.

6.5 Trennkammer aus Glas mit Schliffdeckel, geeignet zur Verwendung von Platten von 20 cm $\times$ 20 cm Größe.

6.6 Mikroinjektionsspritze oder Mikropipette, zum Aufgeben von 100 μl .

6.7 Wärmeschrank, einstellbar auf $(105 \pm 3) ^\circ\text{C}$.

6.8 Exsikkator, gefüllt mit einem wirksamen Trockenmittel zur Aufbewahrung der Platten.

6.9 Reaktionsgefäß zur Herstellung von Sterinderivaten, 0,3 ml Inhalt, mit Schraubdeckel und PTFE-Dichtung.

6.10 Gaschromatograph für Kapillarsäulen, mit Split-Injektor, Flammenionisationsdetektor und geeigneter Registriereinrichtung.

6.11 Kapillarsäule aus Quarz oder Glas, Länge 25 m bis 60 m, Innendurchmesser 0,2 mm bis 0,35 mm; stationäre Phase OV-1 (oder gleichwertige nichtpolare Phase mit einer Temperaturgrenze von mindestens 280 °C bis 300 °C); Filmdicke etwa 0,1 μm .

6.12 Mikroinjektionsspritze, für die Gaschromatographie für Injektionsvolumen von 1 μl .

6.13 Analysenwaage mit einer Wägegenauigkeit von 0,001 g und einer Anzeigenauigkeit von 0,000 1 g.

7 Probenahme

Es ist wichtig, daß das Laboratorium eine Probe erhält, die repräsentativ ist und die während des Transportes oder der Lagerung nicht beschädigt oder verändert wurde.

Die Probenahme ist kein Teil des in dieser Internationalen Norm festgelegten Verfahrens. Ein zu empfehlendes Verfahren für die Probenahme ist in ISO 5555 [1] angegeben.

8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe

Die Untersuchungsproben werden nach ISO 661 vorbereitet.

9 Durchführung

9.1 Prüfmenge

Etwa 250 mg der Untersuchungsprobe werden auf 1 mg in einen 25-ml-Kolben (6.1) eingewogen.

Bei Fetten und Ölen mit einem Steringehalt von unter 100 mg je 100 g wird die dreifache Menge der Untersuchungsprobe verwendet. Die Chemikalien und die Geräte sind dementsprechend anzupassen.

9.2 Bestimmung

9.2.1 Herstellung der Aluminiumoxidsäule

10 g Aluminiumoxid (5.4) werden in 20 ml Ethanol (5.3) suspendiert, und die Suspension wird in die Glassäule (6.3) gegeben. Nach Absetzen des Aluminiumoxids muß das Lösungsmittel ablaufen, bis dessen Flüssigkeitsspiegel den oberen Rand der Säulenfüllung erreicht hat.

9.2.2 Extraktion des Unverseifbaren

Der Prüfmenge (9.1) werden genau 1,00 ml interne Standardlösung (5.2) zugesetzt.

Es werden 5 ml ethanolische Kaliumhydroxidlösung (5.1) und einige Siedesteinchen zugegeben. Der Rückflußkühler (6.2) wird mit dem Kolben verbunden und der Inhalt 15 min bei leichtem Sieden gehalten. Nach Ausschalten der Heizung wird der noch heiße Inhalt des Kolbens unverzüglich mit 5 ml Ethanol (5.3) versetzt und zur Homogenisierung gerührt oder geschüttelt.

5 ml dieser Lösung werden auf die vorbereitete Aluminiumoxidsäule (9.2.1) pipettiert. Das Eluat wird in einem 50-ml-Rundkolben (6.1) aufgefangen und die Säule ablaufen gelassen, bis der Flüssigkeitsspiegel des Lösungsmittels den oberen Rand der Säulenfüllung erreicht hat. Das Unverseifbare wird erst mit 5 ml Ethanol (5.3) und danach mit 30 ml Diethylether (5.5) bei einer Flußrate von etwa 2 ml/min eluiert. Die Lösungsmittel werden am Rotationsverdampfer (6.4) aus dem Kolben abdestilliert.

WARNUNG: Die Aluminiumoxidsäule ist für dieses Verfahren zwingend erforderlich. Sie darf nicht durch eine Kieselgel- oder andere Säule oder durch eine Lösungsmittelextraktion ersetzt werden.

9.2.3 Dünnschichtchromatographie

Das nach 9.2.2 erhaltene Unverseifbare wird in wenig Diethylether (5.5) gelöst. Die Lösung wird mit der Mikroinjektionsspritze (6.6) strichförmig in einer Entfernung von 2 cm vom unteren Rand einer DC-Platte (5.6) aufgetragen. An jedem Seitenrand der Platte wird ein Bereich von mindestens 3 cm Breite freigelassen. 5 µl Standardlösung für die Dünnschichtchromatographie (5.8) werden in 1,5 cm Entfernung vom Rand aufgetragen. Die Trennkammer (6.5) wird mit etwa 100 ml des Fließmittels (5.7) gefüllt. Die Platte wird in die Trennkammer gebracht und entwickelt, bis das Lösungsmittel den oberen Rand erreicht. Die Platte

wird aus der Trennkammer entnommen und unter einen Abzug zum Verdunsten des Lösungsmittels gestellt.

ANMERKUNG: Bei diesem Arbeitsgang ist eine quantitative Überführung des Materials (9.2.2) auf die DC-Platte nicht erforderlich. Zum Auftragen können automatische Geräte verwendet werden. Es wird ohne Kammerfüllung gearbeitet.

9.2.4 Isolierung der Sterine

Die Platten werden mit Methanol (5.9) besprüht, bis die Sterin- und Betulinzonen weiß auf naß-transparentem Hintergrund erscheinen. Die Betulinzone erscheint etwas unterhalb der Sterinzone. Die Zonen werden in Höhe der Standardpunkte 2 mm oberhalb und 4 mm unterhalb der sichtbaren Zonen markiert (siehe Bild 1). Mit einem Spatel wird dieser Teil der Schicht vollständig abgekratzt und das Kieselgel quantitativ in einem kleinen Becherglas gesammelt.

ANMERKUNG: Der breitere Abstand am unteren Rand der sichtbaren Zonen (4 mm gegenüber 2 mm am oberen Rand) ist eine Vorsichtsmaßnahme zur Vermeidung teilweiser Verluste von Betulin bei diesem Arbeitsgang. Sonnenblumenöl kann drei Zonen aufweisen (Δ^5 -Sterine, Δ^7 -Sterine und Betulin).

Dem gesammelten Kieselgel werden 0,5 ml Ethanol zugegeben. Das Kieselgel wird im Becherglas dreimal mit 5 ml Diethylether (5.5) extrahiert und in einen Kolben (6.1) filtriert. Die vereinigten Etherextrakte werden am Rotationsverdampfer (6.4) auf etwa 1 ml eingengt, und die verbleibende Lösung wird in das Reaktionsgefäß (6.9) übergeführt. Das Lösungsmittel wird mit einem Stickstoffstrom aus dem Reaktionsgefäß abgeblasen.

9.2.5 Herstellung des Sterintrimethylsilyl-Ether

In das Reaktionsgefäß (6.9) mit den isolierten Sterinen werden 100 µl Silylierungsreagens (5.10) gegeben. Nach dichtem Verschuß wird das Gefäß 15 min im Wärmeschrank bei 105 °C erhitzt. Nach Abkühlen des Reaktionsgefäßes auf Raumtemperatur wird die Lösung direkt in den Gaschromatographen (6.10) injiziert.

9.2.6 Gaschromatographie

Das Temperaturprogramm und die Geschwindigkeit des Trägergasstroms werden so optimiert, daß Chromatogramme erhalten werden, die dem in Bild 2 ähnlich sind. Die Trennung wird mit silylierten Sterinfraktionen überprüft, die aus Ölen mit bekannter Zusammensetzung gewonnen wurden, wie in Bild 2 dargestellt.

ANMERKUNG 1: Folgende Parameter wurden geprüft und als geeignet befunden: GC-Säule: SE-54 50 m Länge, 0,25 mm Innendurchmesser, Filmdicke 0,10 µm; Trägergas H₂, Trägergasgeschwindigkeit 36 cm/s, Split 1 : 20; Temperatur des Detektors/Injektors 320 °C, Temperaturprogramm 240 °C bis 255 °C mit einem Anstieg von 4 °C/min; Injektionsvolumen 1 µl. Kapillarsäulen gleichwertiger Qualität können verwendet werden.

ANMERKUNG 2: Eine Standardlösung mit Cholesterin, Campesterin, Stigmasterin und Sitosterin kann zur Überprüfung der Retentionszeiten verwendet werden. Ein Blindwert zur Prüfung auf mögliche Kontamination (z. B. Cholesterin) durch Lösungsmittel, Glasoberflächen, Filter, Fingerabdrücke usw. sollte angefertigt werden.