

DIN EN ISO 9936

ICS 67.200.10

Ersatz für
DIN EN ISO 9936:2011-11**Tierische und pflanzliche Fette und Öle –
Bestimmung des Tocopherol- und Tocotrienol-Gehaltes mittels
Hochleistungsflüssigchromatographie (ISO 9936:2016);
Deutsche Fassung EN ISO 9936:2016**

Animal and vegetable fats and oils –
Determination of tocopherol and tocotrienol contents by high-performance liquid
chromatography (ISO 9936:2016);
German version EN ISO 9936:2016

Corps gras d'origines animale et végétale –
Détermination des teneurs en tocophérols et en tocotriénols par chromatographie en phase
liquide à haute performance (ISO 9936:2016);
Version allemande EN ISO 9936:2016

Gesamtumfang 24 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 9936:2016) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ (Sekretariat: AFNOR, Frankreich) in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 307 „Ölsamen, tierische und pflanzliche Fette und Öle und deren Nebenprodukte — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR (Frankreich) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-05-05 AA „Gemeinschaftsausschuss für die Analytik von Fetten, Ölen, Fettprodukten, verwandten Stoffen und Rohstoffen“ (GA Fett) der Deutschen Gesellschaft für Fettwissenschaft (DGF) und des DIN-Normenausschusses Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

Für die in diesem Dokument 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
ISO 5555	siehe	DIN EN ISO 5555
ISO 5725-1	siehe	DIN ISO 5725-1
ISO 5725-2	siehe	DIN ISO 5725-2

Änderungen

Gegenüber DIN EN ISO 9936:2011-11 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Milch und Milcherzeugnisse (oder Fett aus Milch und Milcherzeugnissen) wurden vom Anwendungsbereich dieser Norm ausgenommen;
- b) Norm redaktionell überarbeitet und den derzeit gültigen Gestaltungsregeln angepasst.

Frühere Ausgaben

DIN EN ISO 9936: 2006-07, 2011-11

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 661, *Tierische und pflanzliche Fette und Öle — Vorbereitung der Untersuchungsprobe*

DIN EN ISO 5555, *Tierische und pflanzliche Fette und Öle — Probenahme*

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

DIN ISO 5725-1, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Meßverfahren und Meßergebnissen — Teil 1: Allgemeine Grundlagen und Begriffe*

DIN ISO 5725-2, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Meßverfahren und Meßergebnissen — Teil 2: Grundlegende Methode für die Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision eines vereinheitlichten Messverfahrens*

Deutsche Fassung

**Tierische und pflanzliche Fette und Öle —
Bestimmung des Tocopherol- und Tocotrienol-Gehaltes
mittels Hochleistungsflüssigchromatographie
(ISO 9936:2016)**

Animal and vegetable fats and oils —
Determination of tocopherol and tocotrienol contents
by high-performance liquid chromatography
(ISO 9936:2016)

Corps gras d'origines animale et végétale —
Détermination des teneurs en tocophérols et en
tocotriénols par chromatographie en phase liquide à
haute performance
(ISO 9936:2016)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 4. März 2016 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-CENELEC 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, der ehemaligen jugoslawischen Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, der Schweiz, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, der Türkei, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



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

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

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Vorwort	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Kurzbeschreibung	5
5 Reagenzien	5
6 Geräte	6
7 Probenahme	7
8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe	7
9 Durchführung	8
9.1 Herstellung der Kalibrierlösungen	8
9.1.1 Kalibrier-Stammlösungen	8
9.1.2 Standardlösung	8
9.2 Optimierung der Betriebsparameter	9
9.3 Herstellung der Prüflösung	9
9.4 Bestimmung	9
10 Angabe der Ergebnisse	10
11 Präzision	10
11.1 Ringversuch	10
11.2 Wiederholpräzision	11
11.3 Vergleichpräzision	11
12 Untersuchungsbericht	11
Anhang A (informativ) Beispiele von Chromatogrammen	12
Anhang B (informativ) Verseifung	14
B.1 Allgemeines	14
B.2 Reagenzien	14
B.3 Durchführung	14
Anhang C (informativ) Ringversuchsergebnisse	16
Literaturhinweise	22

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 9936:2016) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 307 „Ölsamen, tierische und pflanzliche Fette und Öle und deren Nebenprodukte — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom AFNOR gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Oktober 2016, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Oktober 2016 zurückgezogen werden.

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

Dieses Dokument ersetzt EN ISO 9936:2006.

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

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 9936:2016 wurde vom CEN als EN ISO 9936:2016 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung von Nationalen Normungsorganisationen (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird normalerweise von ISO Technischen Komitees 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 Organisationen, staatlich und nicht-staatlich, in Liaison mit ISO, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) bei allen elektrotechnischen Themen 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. Im Besonderen sollten die für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten notwendigen Annahmekriterien 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 empfangenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname wird als Information zum Nutzen der Anwender angegeben und stellt keine Anerkennung dar.

Eine Erläuterung der Bedeutung ISO-spezifischer Benennungen und Ausdrücke, die sich auf Konformitätsbewertung beziehen, sowie Informationen über die Beachtung der WTO-Grundsätze zu technischen Handelshemmnissen (TBT, en: Technical Barriers to Trade) durch ISO enthält der folgende Link: Foreword - Supplementary information

Das für dieses Dokument verantwortliche Komitee ist ISO/TC 34, *Food products*, Unterkomitee SC 11, *Animal and vegetable fats and oils*.

Diese dritte Ausgabe ersetzt die zweite Ausgabe (ISO 9936:2006), die technisch überarbeitet wurde. Sie beinhaltet auch die Änderung ISO 9936:2006/Amd. 1:2011 und das Technische Korrigendum ISO 9936:2006/Cor. 1:2008. Im Anwendungsbereich ist eine Angabe zur Nichtanwendbarkeit für Milch und Milchprodukte aufgenommen worden.

1 Anwendungsbereich

Diese Internationale Norm legt ein Verfahren zur Bestimmung des Gehalts an freien α -, β -, γ - und δ -Tocopherolen und Tocotrienolen (nachfolgend insgesamt als Tocole bezeichnet) in tierischen und pflanzlichen Fetten und Ölen (nachfolgend als Fette bezeichnet) durch Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC, en: high-performance liquid chromatography) fest.

Bei Produkten, die Ester von Tocopherolen oder Tocotrienolen enthalten, ist es erforderlich, eine vorausgehende Verseifung durchzuführen.

Milch und Milcherzeugnisse (oder Fett aus Milch und Milcherzeugnissen) sind vom Anwendungsbereich dieser Internationalen Norm ausgenommen.

ANMERKUNG Ein geeignetes Verfahren mit einer Kaltverseifung wird in Anhang B nur zur Information beschrieben.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente, die in diesem Dokument teilweise oder als Ganzes zitiert werden, 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).

ISO 661, *Animal and vegetable fats and oils — Preparation of test sample*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gilt der folgende Begriff.

3.1

Tocolgehalt

Massenanteile der einzelnen Tocole, die nach dem in dieser Internationalen Norm festgelegten Verfahren bestimmt werden

Anmerkung 1 zum Begriff: Der Gehalt wird in Milligramm je Kilogramm als ganze Zahl angegeben.

4 Kurzbeschreibung

Eine Prüfmenge wird in *n*-Heptan gelöst und die einzelnen Tocole werden durch Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) getrennt. Der Gehalt an jedem Tocol wird mit Kalibrierfaktoren berechnet, die aus Kalibrierlösungen ermittelt werden.

5 Reagenzien

Es sind nur Reagenzien vom Reinheitsgrad für die HPLC oder gleichwertig zu verwenden.

5.1 Standardsubstanzen von α -, β -, γ - und δ -Tocopherol und Tocotrienol

Wenn Tocopherol-Standardsubstanzen nicht zur Verfügung stehen, darf ein Gemisch aus Weizenkeimöl und Sojaöl verwendet werden, um α -, β -, γ - und δ -Tocopherol zu identifizieren.

Wenn Tocotrienol-Standardsubstanzen nicht zur Verfügung stehen, darf Palmöl verwendet werden, um α - und γ -Tocotrienol zu identifizieren. Die erhaltenen Chromatogramme können verwendet werden, um bei der Identifizierung der Peaks in Chromatogrammen von Untersuchungsproben zu helfen; in diesem Fall sollten die Kalibrierfaktoren für die entsprechenden Tocopherole verwendet werden.

ANMERKUNG α -, β -, γ - und δ -Tocopherol-Standardsubstanzen und Tocotrienol-Standardsubstanzen können bei Merck¹⁾ bezogen werden. α -Tocopherol kann von verschiedenen Lieferanten bezogen werden. Tocotrienol-Standardsubstanzen sind bei Sigma Aldrich²⁾ erhältlich. Es ist berichtet worden, dass die Reinheit einiger handelsüblich erhältlicher Tocopherol-Standardsubstanzen zwischen 85 % und 100 % liegen kann. Daher ist es wichtig, die Konzentration der hergestellten Kalibrierlösungen mittels UV-Spektrometrie zu bestimmen (siehe 9.1.1).

5.2 Tetrahydrofuran, filtriert durch ein Nylonfilter für die HPLC (Porenweite 0,45 μm).

5.3 *n*-Heptan, filtriert durch ein Nylonfilter für die HPLC (Porenweite 0,45 μm).

5.4 Mobile Phase für die HPLC.

Es sollte ein geeignetes Lösemittelgemisch verwendet werden (siehe Tabelle C.3), für das nachgewiesen worden ist, dass mit ihm eine ebenso gute chromatographische Trennung der Peaks erreicht wird wie die in Tabelle 2 (relative Retentionszeit von Tocopherolen und Tocotrienolen) und im Anhang A (Chromatogramme eines Gemisches pflanzlicher Öle) dargestellten.

Eine gute Trennung von γ -Tocopherol und β -Tocotrienol kann durch eine Mischung von 5 % Volumenanteil *t*-Butyl-Methyl-Ether + 95 % Volumenanteil *n*-Heptan und einer Diolsäule erreicht werden.

Die Herstellung einer geeigneten mobilen Phase, 3,85 % (Volumenanteil) Tetrahydrofuran in *n*-Heptan gelöst, ist wie folgt: Unter Verwendung eines 1 000-ml-Messzylinders (6.5) werden 1 000 ml *n*-Heptan (5.3) in eine 2-Liter-Flasche gefüllt. Unter Verwendung einer 20-ml-Messpipette (6.6) werden zweimal 20 ml Tetrahydrofuran (5.2) zugegeben. Die mobile Phase wird mit Hilfe eines Ultraschallbades (6.8) für 15 min homogenisiert.

5.5 Methanol.

6 Geräte

Übliche Laborgeräte und im Besonderen die folgenden.

6.1 HPLC-System, bestehend aus einer Hochdruckpumpe, einem Probeneinspritzgerät, einem auf 25 °C eingestellten Thermostaten (optional) für die Säule, einem Fluoreszenzdetektor mit auf 295 nm eingestellter Anregungswellenlänge und auf 330 nm eingestellter Emissionswellenlänge und einer Auswerteeinheit.

Wenn kein Fluoreszenzdetektor zur Verfügung steht, darf ein Ultraviolett- (UV-)Detektor verwendet werden, dies ist aber nicht empfehlenswert. Wenn jedoch ein UV-Detektor verwendet wird, sollte die Wellenlänge auf 292 nm eingestellt werden.

1) Der Bestimmungssatz Merck Tocopherol 613424 ist bei Calbiochem erhältlich (www.calbiochem.com). Er enthält je ein 50-mg-Fläschchen DL- α -Tocopherol, D- β -Tocopherol, D- γ -Tocopherol und D- δ -Tocopherol mit einer durch HPLC bestimmten Reinheit von 95 % (für jeden Bestandteil). Der Bestimmungssatz Merck Tocotrienol 613432 ist auch bei Calbiochem erhältlich. Er enthält je ein 50-mg-Fläschchen α -Tocotrienol, β -Tocotrienol, γ -Tocotrienol und δ -Tocotrienol mit einer durch HPLC bestimmten Reinheit von 95 % (75 % für γ -Tocotrienol). Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Internationalen Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch ISO. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.

2) Tocotrienole sind bei Sigma Aldrich (www.sigmaaldrich.com) und bei Chromadex (www.chromadex.com) mit Reinheiten zwischen 65 % und 98 % erhältlich. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Internationalen Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch ISO. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.