

DIN ISO 14502-2

ICS 67.140.10

Bestimmung von charakteristischen Substanzen von grünem und schwarzem Tee –**Teil 2: Gehalt an Catechinen in grünem Tee –****Verfahren mit Hochleistungs-Flüssigchromatographie
(ISO 14502-2:2005 + Corrigendum 1:2006)**

Determination of substances characteristic of green and black tea –
Part 2: Content of catechins in green tea –
Method using high-performance liquid chromatography
(ISO 14502-2:2005 + Corrigendum 1:2006)

Détermination des substances caractéristiques du thé vert et du thé noir –
Partie 2: Dosage des catechins dans le thé vert –
Méthode par chromatographie en phase liquide à haute performance
(ISO 14502-2:2005 + Corrigendum 1:2006)

Gesamtumfang 26 Seiten

Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN

Inhalt

	Seite
Nationales Vorwort	3
Nationaler Anhang NA (informativ) Literaturhinweise.....	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen.....	5
3 Kurzbeschreibung	5
4 Reagenzien	5
5 Geräte.....	9
6 Probenahme	10
7 Vorbereitung der Untersuchungsproben	10
8 Durchführung.....	10
8.1 Allgemeines.....	10
8.2 Bestimmung des Trockenmassegehaltes.....	10
8.3 Einwaage	10
8.4 Extraktion der Polyphenole	10
8.5 Verdünnung.....	11
8.6 Bestimmung	11
9 Berechnung	12
9.1 Allgemeines.....	12
9.2 Quantitative Bestimmung mit Catechinstandards	13
9.3 Quantitative Bestimmung mit einem Coffeinstandard und den Relativen Catechin-Responsfaktoren (RRF)	13
10 Präzision	15
10.1 Ringversuch	15
10.2 Wiederholpräzision.....	15
10.3 Vergleichpräzision	15
11 Prüfbericht.....	15
Anhang A (informativ) Ergebnisse des Ringversuches	16
Anhang B (informativ) Beurteilung der Reinheit der Standards	18
Anhang C (informativ) Typische HPLC-Chromatogramme	19
Anhang D (informativ) Der Einfluss von Eisen(III)-Ionen auf Catechin-RRFs.....	22
Anhang E (informativ) Quantitativer Vergleich — Verwendung von Catechin-Standards oder eines Coffein-Standards in Verbindung mit Catechin-RRFs.....	24
Literaturhinweise	26

Nationales Vorwort

Die Internationale Norm ISO 14502-2:2005 „Determination of substances characteristic of green and black tea — Part 2: Content of catechins in green tea — Method using high-performance liquid chromatography“ wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34/SC 8 „Tea“ ausgearbeitet, dessen Sekretariat von BSI, Großbritannien, geführt wird. Der zuständige Arbeitsausschuss „Tee“ des Normenausschusses Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN beschloss die Übernahme der zweiteiligen Internationalen Norm ins Deutsche Normenwerk. Das im Jahre 2006 erschienene Corrigendum ist in der vorliegenden Version bereits berücksichtigt.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Texte dieses Dokuments Patentrechte berühren können. Das DIN ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

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

ISO 3696 siehe DIN ISO 3696

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

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

Bestimmung von charakteristischen Substanzen von grünem und schwarzem Tee

Teil 2: Gehalt an Catechinen in grünem Tee – Verfahren mit Hochleistungs-Flüssigchromatographie

1 Anwendungsbereich

Dieser Teil von ISO 14502 legt ein Verfahren der Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) zur Bestimmung des Gesamt-Catechingehalts von Tee durch Summierung aller einzelnen Catechine fest. Das Verfahren gilt sowohl für grünen Blatt-Tee als auch löslichen Grüntee und mit Präzisionseinschränkungen auch für Schwarztee (siehe Anhang A).

Gallussäure und Coffein wie auch Theogallin und Theaflavine können ebenfalls nach diesem Verfahren bestimmt werden.

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).

ISO 1572, *Tea — Preparation of ground sample of known dry matter content*

ISO 3696:1987, *Water for analytical laboratory use — Specification and test methods*

ISO 7513, *Instant tea in solid form — Determination of moisture content (loss in mass at 103 °C)*

3 Kurzbeschreibung

Der Gesamt-Catechingehalt wird aus einer Prüfmenge fein gemahlenem Blatt-Tee mit 70%igem Methanol bei 70 °C extrahiert. Lösliche Tees werden in heißem Wasser gelöst und zum Stabilisieren des Extraktes mit 10 % (Volumenanteil) Acetonitril versetzt. Die einzelnen Catechine im Extrakt werden mit HPLC auf einer Säule mit phenyl-gebundener (stationärer) Phase mit Gradient(en)elution getrennt und durch UV-Detektion bei 278 nm bestimmt. Für die quantitative Bestimmung werden externe Standards verwendet. Externe Catechin-Standards von definierter Reinheit und definiertem Feuchtegehalt dürfen direkt eingesetzt werden. Alternativ dazu darf ein Coffein-Standard in Verbindung mit Relativen Responsfaktoren (RRF) verwendet werden. Die RRF für die einzelnen Catechine wurden in einem von der ISO veranlassten internationalen Ringversuch ermittelt.

4 Reagenzien

Sofern nicht anderweitig festgelegt, werden nur Reagenzien von definiertem analytischen Reinheitsgrad verwendet.

4.1 Wasser, das der Qualität 1 nach ISO 3696:1987 entspricht.

4.2 Acetonitril, geeignet für die HPLC.

4.3 Methanol.

4.4 Eisessig, geeignet für die HPLC.

4.5 Methanol/Wasser-Extraktionsgemisch, 70 % (Volumenanteil) Methanol.

700 ml Methanol (4.3) werden in einen 1-Liter-Messkolben gegeben. Der Messkolben wird mit Wasser (4.1) bis zur Marke aufgefüllt und der Inhalt durchmischt.

4.6 EDTA-Lösung, 10 mg/ml.

1,00 g $\pm$ 0,01 g (Na_2)EDTA (Dinatriummethylenediamintetraacetat-Dihydrat) werden in einen 100-ml-Messkolben eingewogen. Der Messkolben wird mit warmem Wasser bis zur Hälfte gefüllt, zum Lösen des EDTA geschwenkt, auf Raumtemperatur gekühlt, mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt und der Inhalt durchmischt.

Die Lösung wird täglich frisch hergestellt.

4.7 Ascorbinsäurelösung, 10 mg/ml.

1,00 g $\pm$ 0,01 g L-Ascorbinsäure werden in einen 100-ml-Messkolben eingewogen und in Wasser gelöst. Der Messkolben wird bis zur Marke aufgefüllt und die Lösung durchmischt.

Die Lösung wird täglich frisch hergestellt.

4.8 Stabilisierungslösung, 10 % (Volumenanteil) Acetonitril mit 500 µg/ml EDTA und Ascorbinsäure.

25 ml EDTA-Lösung (4.6), 25 ml Ascorbinsäurelösung (4.7) und 50 ml Acetonitril (4.2) werden in einen 500-ml-Messkolben pipettiert. Der Kolben wird bis zur Marke aufgefüllt und die Lösung durchmischt.

Die Lösung wird täglich frisch hergestellt.

4.9 Mobile Phasen für die HPLC

SICHERHEITSVORKEHRUNGEN — Es müssen Handschuhe und eine Schutzbrille getragen und die Dosierung der Reagenzien im Abzug vorgenommen werden.

4.9.1 Mobile Phase A, 9 % (Volumenanteil) Acetonitril, 2 % (Volumenanteil) Essigsäure mit 20 µg/ml EDTA.

180 ml Acetonitril (4.2) und 40 ml Eisessig (4.4) werden in einen 2-Liter-Messkolben überführt, mit Wasser bis zur Hälfte aufgefüllt und mit 4,0 ml der EDTA-Lösung (4.6) versetzt. Der Messkolben wird bis zur Marke aufgefüllt, die Lösung durchmischt und durch einen Filter mit der Porengröße 0,45 µm (5.10) filtriert.

4.9.2 Mobile Phase B, 80 % (Volumenanteil) Acetonitril, 2 % (Volumenanteil) Essigsäure mit 20 µg/ml EDTA.

800 ml Acetonitril (4.2) und 20 ml Eisessig (4.4) werden in einen 1-Liter-Messkolben überführt, mit etwa 100 ml Wasser aufgefüllt und 2,0 ml EDTA-Lösung (4.6) zugegeben. Der Messkolben wird bis zur Marke aufgefüllt, die Lösung durchmischt und durch einen Filter mit der Porengröße 0,45 µm (5.10) filtriert.

4.10 Stammlösungen

4.10.1 Allgemeines

Wenn Catechin-Standards bekannter Reinheit zur Verfügung stehen, dürfen diese direkt als externe Standards eingesetzt werden. Zusätzlich zur üblicherweise angegebenen HPLC-Reinheit ist es wichtig, dass deren Feuchtegehalt ebenfalls bekannt ist, da hohe Kristallwassergehalte bei der HPLC-Auswertung nicht (rechnerisch) berücksichtigt werden. Die Daten für die Reinheit und den Feuchtegehalt der bei dem Ringversuch verwendeten Standards sind in Anhang B angegeben. Wenn umfassende Reinheitsdaten nicht zur Verfügung stehen oder bestimmt werden können, sollten die Catechine nur als Referenzsubstanz zur Identifizierung verwendet werden. Unter diesen Umständen kann die quantitative Bestimmung durch Verwendung von Coffein als externem Standard in Verbindung mit den bei den Ringversuchen für die einzelnen Catechine erhaltenen RRF-Werten (in Bezug auf Coffein) durchgeführt werden (siehe 9.3 und Literaturhinweis [3]).

4.10.2 Stammlösung des Coffeins, die 2,00 mg/ml entspricht.

0,200 g $\pm$ 0,001 g wasserfreies Coffein werden in einen 100-ml-Messkolben eingewogen. Der Messkolben wird mit warmem Wasser bis zur Hälfte aufgefüllt, zum Lösen des Coffeins geschwenkt, auf Raumtemperatur gekühlt, mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt und durchmischt.

4.10.3 Stammlösung der Gallussäure, die etwa 1,00 mg/ml wasserfreier Gallussäure entspricht.

0,110 g $\pm$ 0,001 g Gallussäuremonohydrat ($M = 188,14$ g/mol) werden in einen 100-ml-Messkolben eingewogen und in Wasser gelöst. Der Kolben wird bis zur Marke aufgefüllt und die Lösung durchmischt.

Die Stammlösung wird täglich frisch hergestellt.

Das Monohydrat wird der wasserfreien Gallussäure aus folgenden Gründen vorgezogen: es ist besser löslich, weniger hygroskopisch, und es sind zertifizierte Reagenz-Reinheitsgrade verfügbar (z. B. A.C.S., als Kennzeichnung für die Übereinstimmung mit Standards der American Chemical Society [Amerikanische Chemische Gesellschaft]). Falls der Feuchtegehalt (Masseverlust bei 103 °C) unbekannt ist, sollte dieser an einer Teilmenge der Standardsubstanz bestimmt werden.

4.10.4 Herstellung der Stammlösung der einzelnen Catechine

Die in Tabelle 1 angegebenen Mengen der Vergleichssubstanzen werden jeweils in Messkolben eingewogen und in der Stabilisierungslösung (4.8) falls erforderlich unter leichtem Erwärmen (höchstens 40 °C) gelöst. Die Messkolben werden nach Abkühlen auf Raumtemperatur jeweils bis zur Marke aufgefüllt und der Inhalt durchmischt.

Tabelle 1 — Stammlösungen der Catechine

Vergleichssubstanz	Masse der Vergleichssubstanzen g	Volumen der Stabilisierungslösung ml	Nennkonzentration der Stammlösung mg/ml
(+)-Catechin (+C)	0,020 $\pm$ 0,001	20	1,0
(-)-Epicatechin (EC)	0,020 $\pm$ 0,001	20	1,0
(-)-Epigallocatechin (EGC)	0,040 $\pm$ 0,001	20	2,0
(-)-Epigallocatechingallat (EGCG)	0,040 $\pm$ 0,001	20	2,0
(-)-Epicatechingallat (ECG)	0,040 $\pm$ 0,001	20	2,0

Wenn ausreichende Mengen (d. h. > 20 mg) zur Verfügung stehen, wird zur Herstellung der einzelnen Stammlösungen eine Analysenwaage mit einer Messgenauigkeit von mindestens 0,1 mg verwendet. Bei eingeschränkten Mengen (d. h. < 20 mg) wird eine Analysenwaage verwendet, mit der auf 0,01 mg gewogen werden kann.

4.11 Standardlösungen

4.11.1 Gallussäure-Standardlösung, die etwa 200 µg/ml entspricht.

20 ml der Stammlösung der Gallussäure (4.10.3) werden in einen 100-ml-Messkolben pipettiert. Der Messkolben wird mit der Stabilisierungslösung (4.8) bis zur Marke aufgefüllt und der Inhalt durchmischt.

4.11.2 Gemischte Standardlösungen

Die drei jeweils Coffein, Gallussäure und Catechine enthaltenden Standardlösungen A, B und C, die als externe Standards oder Identifizierungssubstanzen Verwendung finden, werden hergestellt. Hierzu werden die in Tabelle 2 angegebenen Volumina der Stammlösung des Coffeins (4.10.2), der Gallussäure-Standard-

lösung (4.11.1) und aller verfügbaren Stammlösungen der einzelnen Catechine (4.10.4) in drei getrennte 20-ml-Messkolben pipettiert und anschließend mit der Stabilisierungslösung (4.8) bis zur Marke verdünnt und durchmischt. Von jeder gemischten Standardlösung werden 1,0-ml-Aliquote in gekennzeichnete kleine Probengefäße aus braunem Glas pipettiert. Vor dem Verschließen wird vorsichtig mit Stickstoff gespült und die Lösungen werden tiefgefroren bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Die Nennkonzentrationen der Vergleichssubstanzen der Standardlösungen A, B und C sind in Tabelle 3 angegeben.

Bei Catechinen mit unbekannter Reinheit muss zuerst eine individuelle HPLC-Analyse durchgeführt werden, um auf andere potenziell störende Bestandteile zu prüfen.

ANMERKUNG Die Nennkonzentrationen der gemischten Standardlösungen A, B und C sind in Tabelle 2 angegeben und wurden so ausgewählt, dass der üblicherweise in Tee gefundene Konzentrationsbereich abgedeckt wird.

Die tatsächlichen Konzentrationen der wasserfreien Verbindungen werden aus den zur Herstellung der Stammlösungen verwendeten Einwaagen zusammen mit den Feuchtegehalten der Standards berechnet.

Die gemischten Standardlösungen A, B und C sind bei Aufbewahrung im gefrorenen Zustand bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ mindestens 2 Monate stabil. Lediglich die für jede Analysenreihe ausreichende Menge an Probengefäßen der gemischten Standard-Arbeitslösungen wird aufgetaut. Jegliche übrig gebliebene Lösung wird verworfen und nicht wieder eingefroren.

Tabelle 2 — Herstellung der gemischten Standardlösungen A, B und C

Vergleichs- substanz	Lösung	Erforderliche Aliquote für die Herstellung von 20 ml gemischter Standardlösung ml		
		A	B	C
Coffein	2,00 mg/ml Stammlösung des Coffeins (4.10.2)	0,5	1,0	1,5
Gallussäure	200 µg/ml Gallussäure-Standardlösung (4.11.1)	0,5	1,0	2,5
+C	1,00 mg/ml Stammlösung des +C (4.10.4)	1,0	2,0	3,0
EC	1,00 mg/ml Stammlösung des EC (4.10.4)	1,0	2,0	3,0
EGC	2,00 mg/ml Stammlösung des EGC (4.10.4)	1,0	2,0	3,0
EGCG	2,00 mg/ml Stammlösung des EGCG (4.10.4)	1,0	2,0	4,0
ECG	2,00 mg/ml Stammlösung des ECG (4.10.4)	0,5	1,0	2,0

Tabelle 3 — Nennkonzentrationen der gemischten Standardlösungen A, B und C

Bestandteil	Nennkonzentration µg/ml		
	A	B	C
Gallussäure	5	10	25
Coffein	50	100	150
+C	50	100	150
EC	50	100	150
EGC	100	200	300
EGCG	100	200	400
ECG	50	100	200