

DIN ISO 18447



ICS 67.140.10

**Tee –
Bestimmung von Theaflavinen in schwarzem Tee –
Verfahren mittels Hochleistungsflüssigchromatographie
(ISO 18447:2021)**

Tea –
Determination of theaflavins in black tea –
Method using high performance liquid chromatography (ISO 18447:2021)

Thé –
Détermination des théaflavines dans le thé noir –
Méthode par chromatographie liquide à haute performance (ISO 18447:2021)

Gesamtumfang 26 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Inhalt

	Seite
Nationales Vorwort	4
Nationaler Anhang NA (informativ) Literaturhinweise	5
Vorwort	6
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Kurzbeschreibung	7
5 Reagenzien	7
5.1 Allgemeines	7
5.2 Mobile Phasen für die HPLC	8
5.3 Standard-Stammlösungen	9
5.3.1 Allgemeines	9
5.3.2 Herstellung der Standard-Stammlösungen der einzelnen Theaflavine	9
5.4 Gemischte Standardlösungen	9
5.5 Coffein-Standard — Herstellung der Stammlösung des Coffeins, die 2,00 mg/ml entspricht	10
6 Geräte und Hilfsmittel	10
7 Probenahme	12
8 Vorbereitung der Untersuchungsproben	12
9 Durchführung	12
9.1 Allgemeines	12
9.2 Bestimmung des Trockenmassegehaltes	12
9.3 Untersuchungsmenge	12
9.3.1 Löslicher Tee	12
9.3.2 Blatt-Tee	12
9.4 Extraktion von Theaflavinen	12
9.4.1 Löslicher Tee	12
9.4.2 Blatt-Tee	13
9.5 Verdünnung	13
9.6 Bestimmung	13
9.6.1 Allgemeines	13
9.6.2 Geräteeinstellung	13
9.6.3 HPLC-Analyse	14
9.6.4 Identifizierung	14
10 Berechnung	14
10.1 Allgemeines	14
10.2 Quantitative Bestimmung unter Verwendung von Theaflavin-Standards	15
10.3 Quantitative Bestimmung unter Verwendung eines Coffein-Standards und der RRF von Theaflavin	16
11 Präzision	17
11.1 Ringversuch	17
11.2 Wiederholpräzision	17
11.3 Vergleichpräzision	17
12 Untersuchungsbericht	17
Anhang A (informativ) Ringversuchsergebnisse	18
Anhang B (informativ) Beurteilung der Reinheit der verwendeten Standards in Verbindung mit den RRF	19
Anhang C (informativ) Typische HPLC-Chromatogramme	20
Literaturhinweise	26

Bilder

Bild C.1 — Gemischter Theaflavin-Standard mittels HPLC 20

Bild C.2 — Schwarzteepulver mittels HPLC 21

Bild C.3 — Gemischter Theaflavin-Standard mittels UHPLC 22

Bild C.4 — Schwarzteepulver mittels UHPLC 23

Bild C.5 — UV-Spektren von Theaflavinen 24

Bild C.6 — Massenspektren von Theaflavinen 25

Tabellen

Tabelle 1 — Herstellung von gemischten TF-Arbeitsstandards 9

Tabelle 2 — Herstellung von Coffein-Arbeitsstandards 10

Tabelle 3 — Einvernehmlich festgelegte relative Responsefaktoren bei 278 nm 16

Tabelle A.1 — Präzisionsdaten 18

Nationales Vorwort

Dieses Dokument enthält die deutsche Übersetzung der Internationalen Norm ISO 18447:2021, die vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ erarbeitet wurde, dessen Sekretariat von AFNOR (Frankreich) gehalten wird.

Das zuständige nationale Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-05-11 AA „Tee“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

Für die in diesem Dokument zitierten Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 3696	siehe	DIN ISO 3696
ISO 5725-2	siehe	DIN ISO 5725-2

Dieses Dokument enthält in Abschnitt 5.1, Anhang B und Anhang C Nationale Fußnoten, die ergänzende oder erläuternde Hinweise zur Anwendung des Dokuments geben.

Dieses Dokument enthält neben den gesetzlichen Einheiten auch die Einheit Mikron (μ), die in Deutschland nicht zugelassen ist. Es wird ausdrücklich darauf hingewiesen, dass die Anwendung dieser Einheit im nationalen amtlichen und geschäftlichen Verkehr auf Grund des Gesetzes über Einheiten im Messwesen und die Zeitbestimmung (EinhZeitG) nicht zulässig ist. Die Angabe dieser Einheit dient lediglich als Hilfe im amtlichen und geschäftlichen Verkehr (z. B. bei Einfuhr und Ausfuhr) mit solchen Staaten, die diese Einheit anwenden.

Nicht zugelassene Einheit	Zugelassene Einheit	Umrechnung
μ	m	$1 \mu = 10^{-6} \text{ m}$

Die Anwendung dieses Dokumentes kann die Anwendung gefährlicher Stoffe, Arbeitsgänge und Geräte mit sich bringen. Dieses Dokument beansprucht nicht, alle damit verbundenen Sicherheitsprobleme zu behandeln. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders dieses Dokumentes, vor der Anwendung geeignete Maßnahmen für die Sicherheit und den Gesundheitsschutz des Personals zu ergreifen, und die Geltung existierender nationaler und europäischer Vorschriften und Regelungen zu prüfen.

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

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

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*

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsinstitute (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird üblicherweise von Technischen Komitees von ISO 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 staatliche und nichtstaatliche Organisationen, die in engem Kontakt mit ISO stehen, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet bei allen elektrotechnischen Normungsthemen eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) 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. Es sollten insbesondere die unterschiedlichen Annahmekriterien für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten 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 erhaltenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname dient nur zur Unterrichtung der Anwender und bedeutet keine Anerkennung.

Für eine Erläuterung des freiwilligen Charakters von Normen, der Bedeutung ISO-spezifischer Begriffe und Ausdrücke in Bezug auf Konformitätsbewertungen sowie Informationen darüber, wie ISO die Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO, en: World Trade Organization) hinsichtlich technischer Handelshemmnisse (TBT, en: Technical Barriers to Trade) berücksichtigt, siehe www.iso.org/iso/foreword.html.

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34, *Food products*, Unterkomitee SC 8, *Tea* erarbeitet.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Auflistung dieser Institute ist unter www.iso.org/members.html zu finden.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Verfahren der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC, en: high performance liquid chromatography) oder Ultrahochleistungsflüssigchromatographie (UHPLC, en: ultra-high performance liquid chromatography) für die Bestimmung des Gehalts der vier wichtigsten Theaflavine von Tee fest.

Es ist sowohl auf Blatt- als auch lösliche Schwarz- und Oolong-Tees anwendbar. Das Verfahren ist derzeit nicht für trinkfertige (RTD, en: ready-to-drink) Getränke validiert.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. 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, *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 Begriffe

In diesem Dokument werden keine Begriffe aufgeführt.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: verfügbar unter <http://www.electropedia.org/>

4 Kurzbeschreibung

Die Extraktion der Theaflavine aus einer Untersuchungsmenge fein gemahlenen Blatt-Tees erfolgt mit 70%igem Methanol bei 70 °C. Lösliche Tees werden in heißem Wasser gelöst, dem zum Stabilisieren des Extraktes 10 % (Volumenanteil) Acetonitril zugegeben werden. Die einzelnen Theaflavine im Extrakt werden mittels HPLC auf einer Umkehrphasen-Säule unter Anwendung einer isokratischen Elution und mit UV-Detektion bei 274 nm, optional bei 375 nm (als eine alternative Detektionswellenlänge, die nicht bei der Verfahrensvalidierung verwendet wird), bestimmt. Zur quantitativen Bestimmung werden externe Standards verwendet. Externe Theaflavin-Standards von festgelegter Reinheit und mit festgelegtem Feuchtegehalt dürfen direkt verwendet werden. Alternativ dazu darf Coffein als ein Standard in Verbindung mit relativen Responsefaktoren (RRF) für die einzelnen Theaflavine verwendet werden, die in einem internationalen Ringversuch der ISO ermittelt wurden (siehe Tabelle 3).

5 Reagenzien

5.1 Allgemeines

Sofern nicht anders festgelegt, werden nur Reagenzien von anerkannter analytischer Qualität verwendet.

SICHERHEITSVORKEHRUNGEN — Es werden Handschuhe und eine Schutzbrille getragen und die Reagenzien werden in einem Abzug dosiert.^{N1}

5.1.1 Wasser, Qualität 1 nach ISO 3696.

5.1.2 Acetonitril, HPLC-Qualität.

5.1.3 Methanol, HPLC-Qualität.

5.1.4 Essigsäure, Eisessig, HPLC-Qualität.

5.1.5 Ascorbinsäure, analytische Qualität.

5.1.6 Dinatriumsalz der Ethylendiamintetraessigsäure, Dihydrat (EDTA), analytische Qualität.

5.1.7 Methanol/Wasser-Extraktionsgemisch, mit einem Volumenanteil von Methanol von 70 %.

700 ml Methanol (5.1.3) werden in einen 1-l-Messkolben gegeben. Der Messkolben wird mit Wasser (5.1.1) bis zur Marke aufgefüllt und der Inhalt durchmischt.

5.1.8 Stabilisierungslösung mit 20 % Acetonitril

Ein 500-ml-Messkolben wird zur Hälfte mit Wasser (5.1.1) gefüllt. 10 ml Eisessig (5.1.4) und 100 ml Acetonitril (5.1.2) werden hinzugefügt. Je 125 mg Ascorbinsäure (5.1.5) und EDTA (5.1.6) werden hinzugefügt und mit Wasser (5.1.1) wird bis zur Marke aufgefüllt. Diese Lösung darf bis zu einer Woche im Kühlschrank aufbewahrt werden.

5.1.9 Stabilisierungslösung für Blatt-Tee-Aufgüsse

0,062 5 g EDTA (5.1.6) und 0,062 5 g Ascorbinsäure (5.1.5) werden in einen 25-ml-Messkolben eingewogen und dieser wird mit Wasser (5.1.1) bis zur Marke aufgefüllt, was eine Lösung ergibt, die 2,5 mg/ml EDTA und 2,5 mg/ml Ascorbinsäure enthält. Diese Lösung darf bis zu einer Woche im Kühlschrank aufbewahrt werden.

5.2 Mobile Phasen für die HPLC

5.2.1 Mobile Phase A, 2 % (Volumenanteil) Essigsäure in Wasser.

40 ml Essigsäure (5.1.4) werden in einen 2-l-Messkolben überführt. Es wird ausreichend Wasser (5.1.1) hinzugefügt, um den Kolben bis zur Hälfte zu füllen, und der Inhalt wird gut durchmischt. Der Messkolben wird mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt, der Inhalt durchmischt und filtriert (6.10).

5.2.2 Mobile Phase B, 2 % (Volumenanteil) Essigsäure in Acetonitril.

20 ml Essigsäure (5.1.4) werden in einen 1-l-Messkolben überführt. Etwa 400 ml Acetonitril (5.1.2) werden hinzugefügt, der Inhalt wird gut durchmischt und es wird bis zur Marke mit Acetonitril aufgefüllt, der Inhalt wird erneut durchmischt und filtriert.

N1 Nationale Fußnote: Die Anwendung dieses Dokumentes kann die Anwendung gefährlicher Stoffe, Arbeitsgänge und Geräte mit sich bringen. Dieses Dokument beansprucht nicht, alle damit verbundenen Sicherheitsprobleme zu behandeln. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders dieses Dokumentes, vor der Anwendung geeignete Maßnahmen für die Sicherheit und den Gesundheitsschutz des Personals zu ergreifen, und die Geltung existierender nationaler und europäischer Vorschriften und Regelungen zu prüfen.