

DIN EN ISO 9936



ICS 67.200.10

Einsprüche bis 2016-02-11
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN ISO 9936:2011-11

Entwurf

**Tierische und pflanzliche Fette und Öle –
Bestimmung des Tocopherol- und Tocotrienol-Gehaltes mittels
Hochleistungsflüssigchromatographie (ISO/FDIS 9936:2015);
Deutsche und Englische Fassung FprEN ISO 9936:2015**

Animal and vegetable fats and oils –

Determination of tocopherol and tocotrienol contents by high-performance liquid chromatography (ISO/FDIS 9936:2015);

German and English version FprEN ISO 9936:2015

Corps gras d'origines animale et végétale –

Détermination des teneurs en tocophérols et en tocotriénols par chromatographie en phase liquide à haute performance (ISO/FDIS 9936:2015);

Version allemande et anglaise FprEN ISO 9936:2015

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2015-12-11 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfes besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal des DIN unter www.entwuerfe.din.de bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an nal@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/stellungnahme oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL), 10772 Berlin (Hausanschrift: Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin).

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 44 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (FprEN ISO 9936:2015) 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

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung der FprEN ISO 6886 beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

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.

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 (Identisch mit ISO 3696:1987)*

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*

— Leerseite —

Tierische und pflanzliche Fette und Öle — Bestimmung des Tocopherol- und Tocotrienol-Gehaltes mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (ISO/FDIS 9936:2015)

Corps gras d'origines animale et végétale — Détermination des teneurs en tocophérols et en tocotriénols par chromatographie en phase liquide à haute performance (ISO/FDIS 9936:2015)

Animal and vegetable fats and oils — Determination of tocopherol and tocotrienol contents by high-performance liquid chromatography (ISO/FDIS 9936:2015)

ICS:

Deskriptoren:

Dokument-Typ: Europäische Norm
Dokument-Untertyp:
Dokumentstufe: parallele formelle Abstimmung vorgelegt
Dokumentsprache: D

STD Version 2.7g

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	11
11.1 Ringversuch	11
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 (FprEN ISO 9936:2015) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Lebensmittelerzeugnisse“ 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.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen formellen Abstimmung vorgelegt.

Dieses Dokument wird EN ISO 9936:2006 ersetzen.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/FDIS 9936:2015 wurde vom CEN als FprEN ISO 9936:2015 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 6886:2006), 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

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 Tocol bezeichnet) in tierischen und pflanzlichen Fetten und Ölen (nachfolgend als Fette bezeichnet) durch Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) 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 Tocol, 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 Tocol werden durch Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) getrennt. Der Gehalt an jedem Tocol wird unter Anwendung von 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 Standardsubstanzen von α -, β -, γ - und δ -Tocopherol sind bei Merck¹⁾ erhältlich. α -Tocopherol kann von verschiedenen Lieferanten bezogen werden. Es wurde berichtet, 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, für das nachgewiesen 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 Anhang A (Chromatogramme eines Gemisches pflanzlicher Öle) dargestellten, verwendet werden (siehe Tabelle C.3).

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 (optional) eingestellten Thermostaten 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, kann ein UV-Detektor verwendet werden, dies ist aber nicht empfehlenswert. Wenn jedoch ein UV-Detektor verwendet wird, sollte die Wellenlänge auf 292 nm eingestellt werden.

6.2 HPLC-Analysensäule, es sind zwei Typen möglich:

- 250 mm $\times$ 4 mm, gepackt mit in kleinen Teilchen vorliegendem **Diol** mit einer mittleren Teilchengröße von etwa 5 μm oder
- 250 mm $\times$ 4,6 mm, gepackt mit in kleinen Teilchen vorliegendem **Kieselgel** mit einer mittleren Teilchengröße von etwa 5 μm .

ANMERKUNG 1 Ein geeignetes handelsüblich erhältliches Diol-Kieselgel zur Säulenpackung ist LiChrospher 100 Diol 5 μm ; geeignete handelsüblich erhältliche Kieselgele zur Säulenpackung sind LiChrosorb SI 60 5 μm und Kromasil 100²⁾

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). Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Internationalen Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch ISO.

2) Diese Säulentypen sind Beispiele geeigneter handelsüblich erhältlicher Produkte. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Internationalen Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch ISO.

Wenn β -Tocotrienol in der Probe erwartet wird, wird die Säule mit Diol-Kieselgel bevorzugt, da γ -Tocopherol und β -Tocotrienol bei Verwendung der Kieselgelsäule gemeinsam eluiert werden.

ANMERKUNG 2 Länge und Durchmesser der Säule können entsprechend der angewendeten HPLC-Technik abgewandelt werden.

ANMERKUNG 3 Beide Säulentypen wurden für die Bewertung der Präzisionsangaben (Anhang C) angewendet.

6.3 UV-Spektrometer, mit dem die Extinktion bei genau festgelegten Wellenlängen absolut gemessen werden kann, mit einer Kantenlänge der Küvette von 10 mm.

6.4 Rotationsverdampfer.

6.5 Messzylinder, Nennvolumen 1 000 ml.

6.6 Vollpipetten, Nennvolumen 5ml, 10 ml und 20 ml.

6.7 Messkolben, Nennvolumen 50 ml und 25 ml.

6.8 Ultraschallbad.

7 Probenahme

Dem Laboratorium sollte eine repräsentative Probe eingesandt werden. Es ist wichtig, dass die Probe bei Transport oder Lagerung nicht geschädigt oder verändert wurde.

Die Probenahme ist kein Teil des in dieser Internationalen Norm festgelegten Verfahrens. Ein empfohlenes Probenahmeverfahren ist in ISO 5555 angegeben.

8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe

Bei flüssigen Laboratoriumsproben wird die Untersuchungsprobe durch Homogenisieren nach ISO 661 vorbereitet, wobei die Filtration vermieden werden sollte.

Bei festen Proben wird ein repräsentativer Anteil (d. h. nicht weniger als ein Massenanteil von 10 % der Laboratoriumsprobe) in ein Becherglas überführt und unter leichtem Durchmischen in einem Wasserbad mit einer Temperatur von nicht über 40 °C sorgfältig durch Schmelzen homogenisiert.

Soweit es durchführbar ist, sollte die Vorbereitung der Untersuchungsproben unter gedämpftem Licht und in allen Fällen außerhalb direkten Sonnenlichts erfolgen.

9 Durchführung

WICHTIG — Im Allgemeinen kann die Oxidation der Tocol während der Analyse zu niedrigen Ergebnissen führen. Die Oxidationsrate erhöht sich in Gegenwart von Alkalien oder unter dem Einfluss von Wärme oder Licht, und es sollten Maßnahmen zum Schutz gegen diese Einflüsse unternommen werden.

9.1 Herstellung der Kalibrierlösungen

9.1.1 Kalibrier-Stammlösungen

Von jedem Tocol wird eine Stammlösung hergestellt, indem (10 ± 1) mg der Standardsubstanz (5.1) in einen 50-ml-Messkolben eingewogen werden und dann mit *n*-Heptan (5.3) zur Marke aufgefüllt wird.

5 ml dieser Lösung werden in einen Rundkolben aus Braunglas pipettiert und das gesamte *n*-Heptan wird mit einem Rotationsverdampfer (6.4) unter Vakuum bei einer Temperatur nicht über 40 °C entfernt. Das Vakuum wird mit Stickstoff aufgehoben und der Kolben abgenommen, sobald das gesamte Lösemittel entfernt ist. In den Kolben werden 10 ml Methanol (5.5) pipettiert und er wird zwecks Lösung des Rückstands gedreht. Die Höchstextinktion dieser Lösung wird in einem Wellenlängenbereich zwischen 270 nm und 310 nm (siehe die entsprechende Wellenlänge in Tabelle 1) mit dem UV-Spektrometer (6.3), mit einer Kantenlänge der Küvette von 10 mm, gemessen. Die gemessene Extinktion sollte zwischen 0,2 und 0,8 liegen. Die Konzentration (in Mikrogramm je Milliliter) wird durch Division der Extinktionswerte durch den entsprechenden in Tabelle 1 angegebenen Faktor berechnet.

Tabelle 1 — Divisionsfaktoren

Wellenlänge nm	Tocopherol	Divisionsfaktor
292	α -Tocopherol	0,007 6
296	β -Tocopherol	0,008 9
298	γ -Tocopherol	0,009 1
298	δ -Tocopherol	0,008 7
ANMERKUNG Die angegebenen Faktoren sind von den <i>E</i> -Werten (1 %/1 cm) der Tocopherole abgeleitet. Zum Beispiel beträgt der <i>E</i> -Wert (1 %/1 cm) von α -Tocopherol (in Methanol) bei 292 nm 76; deshalb wird eine Lösung von 1 µg/ml α -Tocopherol bei 292 nm eine Extinktion von 0,007 6 aufweisen.		

9.1.2 Standardlösung

Entsprechend der Empfindlichkeit des verwendeten Fluoreszenzdetektors sollten geeignete Standardlösungen hergestellt werden.

Die folgende Herstellung einer Gebrauchslösung wird als Beispiel angegeben: Geeignete Volumen, zum Beispiel 1 ml, der Kalibrier-Stammlösungen (siehe 9.1.1) werden gemischt, um eine gemischte Tocol-Standardlösung zu erhalten, und mit *n*-Heptan aufgefüllt, um eine Lösung zu erhalten, die je Milliliter zwischen 1 µg und 5 µg jeder Standardsubstanz enthält.

Die Standardlösung muss an jedem Arbeitstag frisch hergestellt werden.

Alle Lösungen sind vor Licht zu schützen und zwischen 0 °C und 4 °C aufzubewahren.

Unter Kühlung können Standard-Stammlösungen zufrieden stellend in Braunglasgefäßen bis zu einer Woche aufbewahrt werden. Die Flaschen dürfen mit Aluminiumfolie umhüllt sein.

ANMERKUNG Bei Verwendung eines UV-Detektors kann eine stärker konzentrierte Lösung erforderlich sein.

9.2 Optimierung der Betriebsparameter

9.2.1 Wenn die Säule (6.2) neu ist, eine unbekannte Vorgeschichte hat oder sie aus irgendeinem anderen Grund konditioniert werden muss, wird sie etwa 10 min mit Methanol gespült und konditioniert, dann mit Dichlormethan und anschließend mit *n*-Heptan bei einem Durchfluss von etwa 1 ml/min.

Die mobile Phase für die HPLC (5.4) wird mindestens 30 min bei einem Durchfluss von 1 ml/min durch die Säule gepumpt.

WARNUNG — Methanol und Dichlormethan sind für die Menschen und die Umwelt gefährlich. Mit ihnen ist vorsichtig umzugehen.

9.2.2 10 µl oder 20 µl der Standardlösung (siehe 9.1.2) werden auf die Säule injiziert (je nach Empfindlichkeit des Detektors) und, falls erforderlich, werden der Tetrahydrofuran Gehalt der mobilen Phase und der Durchfluss neu eingestellt, um folgende Bedingungen zu erreichen:

- a) Retentionszeit für α -Tocopherol zwischen 8 min und 12 min;
- b) Auflösungsfaktor (resolution factor, RF) für die Trennung von β - und γ -Tocopherol nicht unter 1,0; d. h. eine Trennung fast auf der Grundlinie, wobei RF nach folgender Gleichung berechnet wird:

$$RF = \frac{d_r(I) - d_r(II)}{0,5 \cdot [b(I) + b(II)]}$$

Dabei ist

- $d_r(I)$ die Retentionszeit des γ -Tocopherols;
- $d_r(II)$ die Retentionszeit des β -Tocopherols;
- $b(I)$ die Breite an der Basis des γ -Tocopherol-Peaks;
- $b(II)$ die Breite an der Basis des β -Tocopherol-Peaks.

9.2.3 Die optimalen Einstellungen für das Datenaufnahme/-auswertungs-System werden gewählt. 10 µl oder 20 µl der Standardlösung (siehe 9.1.2) werden injiziert. Die Injektion wird wiederholt und überprüft, ob reproduzierbare Chromatogramme erhalten werden.

9.3 Herstellung der Prüflösung

Abhängig von der Konzentration der Tocale (siehe 9.1.2) werden $(0,25 \pm 0,1)$ g der Untersuchungsprobe (siehe Abschnitt 8) auf 1 mg in einen 25-ml-Messkolben eingewogen. Es wird *n*-Heptan (5.3) zugegeben, der Kolben zur Lösung der Prüfmenge gedreht und mit dem gleichen Lösemittel zur Marke aufgefüllt. Wenn die Lösung nicht klar ist, wird sie durch ein Nylonfilter für die HPLC mit 0,45 µm Porenweite filtriert.

Es ist wichtig, dass die Prüflösungen vor der Analyse vor Licht geschützt sind und am Herstellungstag untersucht werden.

ANMERKUNG Es kann erforderlich sein, eine stärker konzentrierte Lösung herzustellen oder die Lösung vor der Chromatographie weiter zu verdünnen.

9.4 Bestimmung

9.4.1 10 µl oder 20 µl der Standardlösung (siehe 9.1.2) werden auf die Säule injiziert (je nach Empfindlichkeit des Detektors) und die Peakflächen aufgezeichnet.

9.4.2 10 µl oder 20 µl der Prüflösung (siehe 9.3) werden auf die Säule injiziert (je nach Empfindlichkeit des Detektors) und die vorhandenen Tocolen werden durch Bezug auf die Chromatogramme der Kalibrierung festgestellt. Die Peakflächen werden aufgezeichnet. Die Injektion der Prüflösung und die Messung werden wiederholt. Als Ergebnis einer Bestimmung werden die Mittelwerte der beiden Messungen verwendet.

Erneut werden 10 µl oder 20 µl der Standardlösung (siehe 9.1.2) injiziert (je nach Empfindlichkeit des Detektors) und die Peakflächen aufgezeichnet.

Die in Tabelle 2 angegebenen relativen Retentionszeiten wurden als typisch befunden.

Tabelle 2 — Beispiele relativer Retentionszeiten von Tocopherolen und Tocotrienolen

Kieselgelsäule (α -Tocopherol als Referenzsubstanz)		Diolsäule (α -Tocopherol als Referenzsubstanz)	
α -Tocopherol = 1,00	α -Tocotrienol = 1,19	α -Tocopherol = 1,00	α -Tocotrienol = 1,24
β -Tocopherol = 1,34	β -Tocotrienol = 1,63	β -Tocopherol = 1,59	β -Tocotrienol = 2,03
γ -Tocopherol = 1,63	γ -Tocotrienol = 2,00	γ -Tocopherol = 1,74	γ -Tocotrienol = 2,22
δ -Tocopherol = 2,24	δ -Tocotrienol = 2,79	δ -Tocopherol = 2,46	δ -Tocotrienol = 3,19

10 Angabe der Ergebnisse

Der Gehalt der Probe an α -Tocopherol, w , angegeben in Milligramm je Kilogramm (mg/kg), ergibt sich nach folgender Gleichung:

$$w = \frac{\rho \cdot \bar{A}_t \cdot V}{\bar{A}_s \cdot m}$$

Dabei ist

- ρ die Konzentration des α -Tocopherols in der Standardlösung (9.1.2), in Mikrogramm je Milliliter;
- $\bar{A}_s$ der Mittelwert der für die α -Tocopherol-Standardlösung erhaltenen Peakflächen;
- $\bar{A}_t$ der Mittelwert der für das α -Tocopherol in der Untersuchungsprobe erhaltenen Peakflächen;
- m die Masse der Untersuchungsprobe (9.3), in Gramm;
- V das Volumen der hergestellten Prüflösung (= 25 ml).

Die übrigen Tocolgehalte in der Untersuchungsprobe werden unter Verwendung der mittels der entsprechenden Standardlösung gewonnenen Daten auf gleiche Weise berechnet.

Wenn die einzige zur Verfügung stehende Standardsubstanz α -Tocopherol ist, werden alle Tocopherole auf diesen Standard bezogen, aber dies ist beim Berichten der Ergebnisse deutlich herauszustellen. Bei Verwendung der UV-Detektion werden ebenfalls alle Tocopherole auf den α -Tocopherol-Standard bezogen, aber die Peakflächen sind mit den in 9.1.1 angegebenen Divisionsfaktoren auf α -Tocopherol anzugleichen.

ANMERKUNG Die Intensität der Fluoreszenz der Tocotrienole ist die gleiche wie die der entsprechenden Tocopherole, und die UV-Extinktionen sind ähnlich.

Der Gehalt wird in Milligramm je Kilogramm als ganze Zahl angegeben.