

DIN ISO 18447



ICS 67.140.10; 71.040.50

Einsprüche bis 2022-05-18

Entwurf

**Tee –
Bestimmung von Theaflavinen in schwarzem Tee –
Verfahren mittels Hochleistungsflüssigchromatographie
(ISO 18447:2021);
Text Deutsch und Englisch**

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

Thé –
Détermination des théaflavines dans le thé noir –
Méthode par chromatographie liquide à haute performance (ISO 18447:2021);
Texte en allemand et anglais

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2022-03-18 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

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

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe 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/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe 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 oder Am DIN-Platz, 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 47 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	8
5.3.1 Allgemeines	8
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	11
8 Vorbereitung der Untersuchungsproben	11
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	12
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	14
10.3 Quantitative Bestimmung unter Verwendung eines Coffein-Standards und der RRF von Theaflavin	15
11 Präzision	16
11.1 Ringversuch	16
11.2 Wiederholpräzision	17
11.3 Vergleichpräzision	17
12 Untersuchungsbericht	17
Anhang A (informativ) Ringversuchsergebnisse	18
Anhang B (informativ) Beurteilung der Reinheit der in der Arbeit zu RRF verwendeten Standards	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	15
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).

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

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

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) oder Ultrahochleistungsflüssigchromatographie (UHPLC) 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 müssen Handschuhe und eine Schutzbrille getragen werden und die Reagenzien sind in einem Abzug zu dosieren.

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 mit einer Marke 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 (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 mit einer Marke 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 mit einer Marke 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.

5.3 Standard-Stammlösungen

5.3.1 Allgemeines

Wenn Theaflavine bekannter und garantierter Reinheit zur Verfügung stehen, dürfen diese direkt als externe Standards eingesetzt werden. Zusätzlich zum üblicherweise angegebenen HPLC-Reinheitsgrad ist es wichtig, dass deren Feuchtegehalt ebenfalls bekannt ist, da hohe Kristallwassergehalte bei der HPLC-Auswertung nicht berücksichtigt werden. Die Daten für die Reinheit und den Feuchtegehalt der bei dem Ringversuch von ISO verwendeten Standards sind in Anhang A angeführt. Wenn umfassende Daten zur Reinheit nicht zur Verfügung stehen oder bestimmt werden können, sollten die Theaflavine nur als Markerverbindungen zur Unterstützung der Identifizierung verwendet werden. Unter diesen Umständen darf die quantitative Bestimmung unter Verwendung von Coffein als externem Standard in Verbindung mit den bei den Ringversuchen von ISO für die einzelnen Theaflavine erhaltenen, einvernehmlich festgelegten RRF-Werten (in Bezug auf Coffein) durchgeführt werden (siehe Tabelle 3).

ANMERKUNG Die statistischen Daten in Anhang A wurden unter Verwendung der Kalibrierung gegen Coffein gewonnen (siehe 5.5).

5.3.2 Herstellung der Standard-Stammlösungen der einzelnen Theaflavine

Etwa 20 mg (die genaue Masse wird notiert) der folgenden einzelnen Theaflavine werden in getrennte 10-ml-Messkolben eingewogen: Theaflavin (TF), Theaflavin-3-gallate (TF-3-g), Theaflavin-3'-gallat (TF-3'-g) und Theaflavin-3,3'-digallat (TF-3,3'-dig). Der Kolben wird mit Stabilisierungslösung mit 20 % Acetonitril (5.1.8) bis zur Marke aufgefüllt, um Standard-Stammlösungen mit einer Konzentration von etwa 2 mg/ml zu erhalten.

ANMERKUNG Wenn ausreichende Mengen (d. h. > 20 mg) zur Verfügung stehen, ist zur Herstellung der einzelnen Standard-Stammlösungen eine Analysenwaage erforderlich, mit der mindestens auf 0,1 mg gewogen werden kann, während bei begrenzten Mengen (d. h. < 20 mg) eine Analysenwaage erforderlich ist, mit der auf 0,01 mg gewogen werden kann.

5.4 Gemischte Standardlösungen

Zur Herstellung der gemischten Standardlösungen werden aliquote Mengen der einzelnen Standards nach Tabelle 1 in 20-ml-Messkolben pipettiert und die Messkolben werden mit Stabilisierungslösung mit 20 % Acetonitril (5.1.8) bis zur Marke aufgefüllt.

Tabelle 1 — Herstellung von gemischten TF-Arbeitsstandards

Bezeichnung des Standards	Standard-Stammlösungen einzelner Theaflavine, verdünnt auf 20 ml ml	Nennkonzentration einzelner Theaflavine mg/l	Nennkonzentration des Injektionsvolumens µg/10 µl
A 4,0 µg Std.	4	400	4,0
B 3,0 µg Std.	3	300	3,0
C 2,0 µg Std.	2	200	2,0
D 1,0 µg Std.	1	100	1,0
E 0,5 µg Std.	0,5	50	0,5
F 0,25 µg Std.	0,25	25	0,25

Die Konzentration der einzelnen, in Tabelle 1 angeführten TF beruht auf einer Reinheit der Standards von 100 %. Die Reinheit der TF-Standards sollte durch hochauflösende magnetische Kernresonanz(NMR)-Spektroskopie bestimmt werden und die Nennkonzentrationen der Standards sollten dementsprechend die genaue Konzentration der einzelnen TF in jedem Standard ergeben.

Bei Theaflavinen unbekannter Reinheit wird dringend empfohlen, dass zuerst eine individuelle HPLC-Auswertung durchgeführt wird, um auf andere potenziell störende Bestandteile zu prüfen.

Die Nennkonzentrationen der gemischten Standardlösungen A bis F sind in Tabelle 1 angegeben und wurden so ausgewählt, dass der üblicherweise in Tee vorliegende Konzentrationsbereich abgedeckt wird. Die tatsächlichen Konzentrationen der wasserfreien Verbindungen werden aus den zur Herstellung der Standard-Stammlösungen verwendeten Einwaagen zusammen mit den Feuchtegehalten der Standards berechnet.

Die gemischten Standard-Arbeitslösungen A bis F bleiben bei Aufbewahrung im gefrorenen Zustand bei -20 °C mindestens zwei Monate stabil. Es wird nur die für jede Analysenreihe ausreichende Menge an Probengefäßen der gemischten Standard-Arbeitslösungen aufgetaut. Die gesamte übrig gebliebene Lösung wird verworfen und darf nicht wieder eingefroren werden.

5.5 Coffein-Standard — Herstellung der Stammlösung des Coffeins, die 2,00 mg/ml entspricht.

(0,200 ± 0,001) g wasserfreies Coffein werden in einen 100-ml-Messkolben mit einer Marke eingewogen. Es wird ausreichend warmes Wasser hinzugefügt, um den Kolben bis zur Hälfte zu füllen. Zum Lösen des Coffeins wird der Kolben geschwenkt, anschließend wird auf Raumtemperatur gekühlt. Mit Wasser wird bis zur Marke aufgefüllt und der Inhalt wird durchmischt, um eine Standard-Stammlösung mit einer Konzentration von 2 mg/ml zu erhalten.

Es werden aliquote Mengen der Standard-Stammlösung des Coffeins in 20-ml-Messkolben hergestellt, wie Tabelle 2 genau beschrieben, und anschließend wird mit der Stabilisierungslösung mit 20 % Acetonitril (5.1.8) bis zur Marke aufgefüllt.

Tabelle 2 — Herstellung von Coffein-Arbeitsstandards

Bezeichnung des Standards	Einzelne Standard-Stammlösungen von Coffein, verdünnt auf 20 ml ml	Nennkonzentration von Coffein mg/l	Nennkonzentration des Injektionsvolumens µg/10 µl
A 1,0 µg Std.	1	100	1,0
B 0,5 µg Std.	0,5	50	0,5
C 0,25 µg Std.	0,25	25	0,25
D 0,1 µg Std.	0,1	10	0,1
E 0,05 µg Std.	0,05	5	0,05
F 0,025 µg Std.	0,025	2,5	0,025

ANMERKUNG Niedrigere Konzentrationen von Standards (z. B. G entsprechend 1 mg/l) sind optional. Höhere Konzentrationen können zu einer nichtlinearen Kalibrierkurve führen.

6 Geräte und Hilfsmittel

Die üblichen Laborgeräte werden verwendet, insbesondere folgende Geräte.

6.1 Analysenwaagen, mit einer Fehlergrenze von ± 0,000 1 g und ± 0,000 01 g (siehe ANMERKUNG unter 5.3.2).

6.2 Wasserbad, mit einer Temperatur von (70 ± 1) °C.

6.3 Dispenser, für das Methanol/Wasser-Extraktionsgemisch (5.1.5), der auf 5,0 ml eingestellt ist.

6.4 Zentrifuge, die eine relative Zentrifugalbeschleunigung von 2 000 g (üblicherweise 3 500 min⁻¹) erreichen kann.

6.5 Vortex-Mischer, zum wirksamen Durchmischen während der Extraktion.

6.6 Extraktionsröhrchen, aus Glas, mit einem Fassungsvermögen von 10 ml, mit Stopfen und in der Lage, dem Zentrifugieren standzuhalten.

6.7 Messröhrchen, aus Glas, mit einem Fassungsvermögen von 10 ml, mit 0,1-ml-Teilungen.

6.8 Messkolben, mit einer Marke und einem Fassungsvermögen von 5 ml, 10 ml, 20 ml, 100 ml, 500 ml, 1 l und 2 l.

6.9 Pipetten, aus Glas oder automatische, um den Volumenbereich für die Standard- und Probenextraktverdünnungen abzudecken.

6.10 Filter, Membranfiltereinheiten mit einer Porenweite von 0,45 µm und 0,2 µm (für UHPLC) zum Filtrieren der mobilen Phasen und verdünnten Probenextrakte.

PTFE- und Nylonmembranfilter haben sich als geeignet erwiesen, es müssen jedoch alle Membranen überprüft werden, um sicherzustellen, dass keine Theaflavine zurückgehalten werden.

6.11 Hochleistungsflüssigchromatograph, ausgestattet für die Durchführung einer isokratischen Elution, mit einem thermostatisch geregelten Säulenofen und einem auf 278 nm und (optional) 375 nm eingestellten Ultraviolett-Detektor.

Die Verwendung eines Photodiodenarray-Detektors wird empfohlen. Alternativ kann ein Ultrahochleistungsflüssigchromatograph verwendet werden.

Bei Verwendung eines Autosamplers wird dringend empfohlen, ein Gerät mit einer Kühlmöglichkeit zu verwenden, um sicherzustellen, dass kein Abbau der Probe auftritt. Eingestellt auf 10 °C.

6.12 Datenerfassungs-/integrationssystem.

6.13 Chromatographiesäule für HPLC. Geeignete RP-Säulen für HPLC, Maße z. B. 100 × 4,6, 150 × 4,6 oder 250 × 4,6, ein Innendurchmesser von 2 mm ist auch möglich (bei der Verwendung von 2-mm-Säulen muss der Durchfluss angepasst werden), Partikelgröße 5 µ, 3,5 µ oder 3 µ. Bei UHPLC sind die typischen Maße 100 mm × 2,1 mm, der Partikeldurchmesser beträgt 1,8 µ.

ANMERKUNG Hypersil C18, 3 µ, 100 mm × 4,6 mm oder Zorbax Eclipse XBD 18, 3,5 µ, 150 mm × 4,6 mm ausgestattet mit einer C18-SecurityGuard-Kartusche (z. B. Phenomenex) oder gleichartige Säulen¹. Für UHPLC wird zum Beispiel Eclipse Plus C18 RRHD, 1,8 µ, 100 mm × 2,1 mm verwendet².

7 Probenahme

Es ist wichtig, dass das Labor eine Probe erhält, die tatsächlich repräsentativ ist und während des Transports oder der Lagerung nicht beschädigt oder verändert wurde.

Die Probenahme ist nicht Bestandteil des in diesem Dokument festgelegten Verfahrens. Ein empfohlenes Probenahmeverfahren ist angegeben in:

- ISO 1839 für Blatt-Tee;
- ISO 7516 für löslichen Tee.

8 Vorbereitung der Untersuchungsproben

Um die Homogenität sicherzustellen, wird die Probe des Blatt-Tees nach ISO 1572 gemahlen und die Proben werden in gut verschlossenen Behältern lichtgeschützt aufbewahrt.

-
- 1 Das sind Beispiele für geeignete handelsübliche Produkte. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung dieser genannten Produkte durch ISO. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.
 - 2 Das ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung dieser genannten Produkte durch ISO. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.

Das Mahlen von löslichem Tee ist nur bei Proben mit einer groben Granulatstruktur (z. B. gefriergetrockneter löslicher Tee) erforderlich.

9 Durchführung

9.1 Allgemeines

Wenn es erforderlich ist, zu überprüfen, ob die Anforderungen an die Wiederholpräzision (11.2) eingehalten werden, werden zwei Einzelbestimmungen nach 9.2 bis 9.6 unter Wiederholbedingungen durchgeführt.

9.2 Bestimmung des Trockenmassegehaltes

Der Trockenmassegehalt wird aus dem Feuchtegehalt (Masseverlust bei 103 °C) an einer Teilmenge der Untersuchungsprobe (siehe Abschnitt 8) nach folgenden Normen bestimmt:

- ISO 1572 für Blatt-Tee;
- ISO 7513 für löslichen Tee.

9.3 Untersuchungsmenge

9.3.1 Löslicher Tee

(0,2 ± 0,001) g Untersuchungsprobe (siehe Abschnitt 7) werden in einen 10-ml-Messkolben mit einer Marke eingewogen.

9.3.2 Blatt-Tee

(0,2 ± 0,001) g Untersuchungsprobe (siehe Abschnitt 7) werden in ein Extraktionsröhrchen (6.6) eingewogen.

9.4 Extraktion von Theaflavinen

9.4.1 Löslicher Tee

Zu dem löslichen Tee im Kolben (9.3.1) wird Stabilisierungslösung mit 20 % Acetonitril (5.1.8) hinzugefügt. Es wird sichergestellt, dass sich die Probe gelöst hat; bei Bedarf erfolgt eine Behandlung mit Ultraschall. Der Kolben wird mit Stabilisierungslösung mit 20 % Acetonitril (5.1.8) bis zur Marke aufgefüllt, der Inhalt durchmischt und filtriert (6.10). Bei UHPLC wird ein 0,2-µm-Filter verwendet.

9.4.2 Blatt-Tee

9.4.2.1 Das im Dispenser (6.3) enthaltene Methanol/Wasser-Extraktionsgemisch (5.1.5) wird in das auf 70 °C eingestellte Wasserbad (6.2) gestellt und zur Gleichgewichtseinstellung mindestens 30 min belassen.

9.4.2.2 Das die Probe enthaltende Extraktionsröhrchen (9.3.2) wird in das auf 70 °C eingestellte Wasserbad gestellt. 5,0 ml des heißen Methanol/Wasser-Extraktionsgemisches aus 9.4.2.1 werden in das Extraktionsröhrchen dosiert, dieses wird mit einem Stopfen verschlossen und der Inhalt mit dem Vortex-Mischer (6.5) durchmischt.

9.4.2.3 Das Extraktionsröhrchen wird im Wasserbad weitere 10 min erwärmt, wobei nach 5 min und 10 min auf dem Vortex-Mischer durchmischt wird.

ANMERKUNG Es ist wichtig, die Proben gründlich zu durchmischen, um eine vollständige Extraktion sicherzustellen.

9.4.2.4 Das Extraktionsröhrchen wird aus dem Wasserbad entnommen und auf Raumtemperatur abkühlen gelassen. Der Stopfen wird abgenommen, das Röhrchen wird in der Zentrifuge (6.4) angeordnet und für 10 min bei 3 500 min⁻¹ zentrifugiert.

9.4.2.5 Die überstehende Flüssigkeit wird vorsichtig in ein Messröhrchen (6.7) oder einen 10-ml-Messkolben mit einer Marke (6.8) dekantiert.

9.4.2.6 Die Extraktionsschritte 9.4.2.2 bis 9.4.2.5 werden wiederholt. Die beiden Extrakte werden vereinigt, mit kaltem Methanol/Wasser-Extraktionsgemisch (5.1.5) auf 10 ml aufgefüllt und die Inhalte durchmischt.

Der nach 9.4.2.6 erhaltene Extrakt ist bei Aufbewahrung bei 4 °C mindestens 24 h stabil. Der Extrakt muss vor dem Fortsetzen der Bestimmung Raumtemperatur annehmen können. Die erneute Suspension geringer Mengen an Feststoffen, die bei der Aufbewahrung ausfallen können, ist nicht notwendig.

9.5 Verdünnung

Bei Bedarf wird mit einer Pipette 1,0 ml des Probenextraktes (bei löslichem Tee der Extrakt nach 9.4.1 oder bei Blatt-Tee der Extrakt nach 9.4.2.6) in ein Messröhrchen (6.7) überführt und mit Stabilisierungslösung (5.1.9) auf 2,0 ml bis 5,0 ml verdünnt. Bei Extrakten von Blatt-Tee kann bei längerer Aufbewahrungszeit vor der Analyse ein Abbau eintreten, wenn keine Stabilisierungslösung verwendet wird. Es wird durchmischt und filtriert (6.10). Bei UHPLC wird ein 0,2-µm-Filter verwendet.

9.6 Bestimmung

9.6.1 Allgemeines

Theaflavine sind sehr anfällig für einen Abbau, wobei die Verunreinigung des Chromatographiesystems mit Metallionen ein wesentlicher dazu beitragender Faktor zu sein scheint. Ein gründliches Spülen des Systems, z. B. mit 50%igem (Volumenanteil) Acetonitril (oder anfänglich mit einem geeigneten mischbaren Lösemittel in Abhängigkeit von der vorangegangenen Anwendung) vor und nach der Verwendung zum Entfernen der Rückstände von Puffersalzen und Säuren und zum Verhindern von Korrosion wird empfohlen.

9.6.2 Geräteeinstellung

Der Chromatograph (6.11) wird entsprechend den Herstelleranweisungen eingerichtet und wie folgt eingestellt:

- a) Durchflussgeschwindigkeit der mobilen Phase (5.2): 2,0 ml/min (bei UHPLC: 0,5 ml bis 1 ml/min), beide in Abhängigkeit von der verwendeten Säule.
- b) Bedingungen: 78 % mobile Phase A (5.2.1) und 22 % mobile Phase B (5.2.2); in Abhängigkeit von der verwendeten Säule kann es notwendig sein, die Zusammensetzung des Lösemittels geringfügig anzupassen (z. B. 77/23 oder 79/21).
- c) Laufzeit: 25 min (bei UHPLC: 8 min bis 10 min), beide in Abhängigkeit von der verwendeten Säule und der Lösemittelzusammensetzung.
- d) Temperatur der Säule (6.13): 30 °C ± 0,5 °C.
- e) Bei Verwendung eines thermostatisierten Autosamplers wird empfohlen, die Proben bis zur Analyse bei 10 °C zu kühlen; Proben, die nach dieser Norm hergestellt wurden, wurden auf ihre Stabilität bei 10 °C für mindestens 24 h überprüft.

Die Regelung der Säulentemperatur ist unerlässlich (Chromatographiesäulenofen oder im Kreislauf betriebener Wassermantel), wenn größere Abweichungen der Retentionszeiten vermieden werden sollen.

- f) Auf 278 nm und 375 nm (optional) eingestellter UV-Detektor. Bei der Verwendung authentischer (stoffspezifischer) TF-Standards ist 375 nm bei einigen Proben eine Option, um bessere Chromatogramme zu erhalten.

Es wird sichergestellt, dass der gewählte Empfindlichkeitsbereich des Detektors in der Lage ist, alle Peaks der am höchsten konzentrierten gemischten Standard-Arbeitslösung F innerhalb des Messbereichs des verwendeten Datenerfassungssystems zu erfassen.

9.6.3 HPLC-Analyse

Sobald die Durchflussgeschwindigkeit der mobilen Phase (5.2) und die Temperatur stabil sind, wird die Säule mit einem Gradientenlauf ohne Probe (9.6.2) konditioniert. Anschließend werden je 10 µl bis 20 µl (bei UHPLC: 1 µl bis 10 µl) aller gemischten Standardlösungen A bis F (5.4) auf die Säule injiziert, gefolgt von dem gleichen Volumen an verdünnter Untersuchungslösung (9.5). Die Injektion der gemischten Standard-Arbeitslösungen wird in regelmäßigen Abständen (üblicherweise nach 6 bis 10 Untersuchungslösungen) wiederholt. Für alle Peaks der gemischten Standardlösungen und der Lösungen der Untersuchungsprobe werden die Daten mit Hilfe des Datenerfassungs-/integrationssystems (5.12^{N1}) erfasst.

Nach jeder Analysenreihe werden das Chromatographiesystem und die Säule mit 50%igem (Volumenanteil) Acetonitril (siehe 9.6.1) sorgfältig gespült und, falls die Säule zur Aufbewahrung aus dem Chromatographen ausgebaut wird, die Verschlussstopfen der Säule wieder eingesetzt.

9.6.4 Identifizierung

Die einzelnen Theaflavine werden durch Vergleich der Retentionszeiten aus den Probenchromatogrammen mit den für die gemischten Standardlösungen unter den gleichen chromatographischen Bedingungen (9.6.2) erhaltenen Retentionszeiten identifiziert. Die Anwendung einer Diodenarray-Detektion ermöglicht die genaue Untersuchung des UV-Profiles der Theaflavinpeaks und eine Beurteilung der Peakreinheit, was besonders bei der Bestimmung der niedrigen Gehalte von Theaflavinen in schwarzem Tee hilfreich sein kann.

ANMERKUNG Wenn die Verfügbarkeit von Theaflavin-Markerverbindungen begrenzt ist, unterstützen die Analyse eines schwarzen Blatt-Tees und der Vergleich mit einem typischen HPLC-Chromatogramm sowie mit den in Anhang C angeführten UV- und Massenspektren die Identifizierung.

10 Berechnung

10.1 Allgemeines

Die quantitative Bestimmung erfolgt unter Verwendung externer Standards:

- entweder mit einzelnen Theaflavin-Standards mit bestimmter Reinheit und bestimmtem Feuchtegehalt; oder
- mit einem Coffein-Standard, verwendet in Verbindung mit den in Bezug auf Coffein gemessenen einvernehmlich festgelegten RRF-Werten der einzelnen Theaflavine (siehe 5.5 und 10.3).

ANMERKUNG Coffein eluiert sehr früh in den Chromatogrammen.

10.2 Quantitative Bestimmung unter Verwendung von Theaflavin-Standards

10.2.1 Die Konzentration an wasserfreiem Standard in jeder der gemischten Standardlösungen A bis F (5.4) wird auf 0,1 g/ml berechnet.

10.2.2 Für jeden Standard werden Kalibriergeraden durch Auftragen der Konzentrationen (g/ml) der wasserfreien Verbindungen gegen die aus dem Datenerfassungs-/integrationssystem (6.12) erhaltenen Peakflächen erstellt und die Werte für die Steigung und den Achsenschnittpunkt ermittelt.

N1 Nationale Fußnote: Diese Verweisung ist fehlerhaft. Hier muss auf 6.12 verwiesen werden.

10.2.3 Der Gehalt der einzelnen Bestandteile, angegeben als Massenanteil in Prozent, auf Grundlage der Trockenmasse der Probe, ist durch Gleichung (1) gegeben:

$$\frac{(A_{\text{sample}} - A_{\text{intercept}}) \times V \times d \times 100}{S_{\text{Std}} \times m \times 10\,000 \times D} \quad (1)$$

Dabei ist

- A_{sample} die Peakfläche des einzelnen Bestandteils in der Untersuchungsprobe;
- $A_{\text{intercept}}$ die Peakfläche am Punkt, an dem die Standard-Kalibriergerade die y-Achse schneidet;
- S_{Std} die Steigung der Standard-Kalibriergeraden;
- V das Probenextraktionsvolumen (in ml), bei löslichem Tee und bei Blatt-Tee üblicherweise 10 ml;
- d der Verdünnungsfaktor (siehe 9.5), üblicherweise 1 bis 5;
- m die Masse der Untersuchungsmenge der Probe, in g;
- D der Trockenmassegehalt der Untersuchungsprobe, angegeben als Massenanteil in Prozent, bestimmt nach 9.2.

10.2.4 Der Gesamtgehalt an Theaflavin, T , angegeben als Massenanteil in Prozent, auf Grundlage der Trockenmasse der Probe, entspricht der Summe der einzelnen Theaflavine.

$$T = T_1 + T_2 + T_3 + T_4$$

Dabei ist

- T_1 der prozentuale Anteil des Theaflavingehalts;
- T_2 der prozentuale Anteil des Theaflavin-3-gallat-Gehalts;
- T_3 der prozentuale Anteil des Theaflavin-3'-gallat-Gehalts;
- T_4 der prozentuale Anteil des Theaflavin-3,3'-digallat-Gehalts.

10.3 Quantitative Bestimmung unter Verwendung eines Coffein-Standards und der RRF von Theaflavin

10.3.1 Die aus dem internationalen Ringversuch erhaltenen RRF-Werte (gemessen in Bezug auf Coffein) für die einzelnen Theaflavine sind in Tabelle 3 angegeben. Diese einvernehmlich festgelegten Werte, die mit Standards bekannter Reinheit erhalten wurden und auf Basis der wasserfreien Standards angegeben sind, ermöglichen die quantitative Bestimmung bezogen auf den Coffein-Standard. Angaben zu den Standards sind in Anhang B angeführt.

Tabelle 3 — Einvernehmlich festgelegte relative Responsefaktoren bei 278 nm

Bestandteil	RRF in Bezug auf Coffein (berechnet auf der Basis der <i>DM</i> des Standards), einschließlich des mit NMR bestimmten Reinheitsfaktors
Theaflavin	0,779 3
Theaflavin-3-gallat	0,777 7
Theaflavin-3'-gallat	0,818 6
Theaflavin-3,3'-digallat	0,855 3