

## Bestimmung des Eigehaltes von Lebensmitteln mit der CHRONECT Workstation Cholesterin



**Applikationsnote 1905**

## Bestimmung des Eighaltes von Lebensmitteln Applikationsnote 1905

### Einleitung

Die Bestimmung von Cholesterin wird routinemäßig in eihaltigen Lebensmitteln durchgeführt. Ziel ist es, die Menge der Zutat Vollei bzw. Eigelb zu ermitteln, da es sich hierbei um wertgebende Bestandteile handelt. Der Arbeitskreis Lebensmittelchemischer Sachverständiger (ALS) hat im Jahr 2006 zur Zusammensetzung eines durchschnittlichen Schaleneis unter Berücksichtigung verschiedener Faktoren Stellung genommen. Demnach besitzt ein Ei mit 50 g Masse und 24 % Trockenmasse einen Reineigelbanteil von 16 g. Der Reineigelbanteil weist eine Trockenmasse von 50 % auf, der Cholesteringehalt beträgt 195 mg pro 50 g Vollei. Aus diesen Angaben lässt sich über den Cholesteringehalt einer Probe der Eighalt ermitteln.

### Methode und Geräteaufbau

Die CHRONECT Workstation Cholesterin basiert auf der CHRONECT Workstation Sterine. Das System besteht aus folgenden Komponenten:

- CHRONECT Robotic XYZ Roboter
- HPLC Pumpe (Nexera XR LC-20AD)
- UV/VIS Detektor (SPD-20AD)
- GC mit FID (Nexis GC-2030)
- CHRONECT LC-GC Interface
- CHRONOS Software

### Probenvorbereitung

Die Proben, stärkehaltig und stärkefrei, werden homogenisiert und falls nötig gesiebt. Es werden 200 bis 300 mg Probe in ein 10-mL-Vial eingewogen und verschlossen. Die Probenvials werden anschließend ins Probenrack gestellt.

Alle folgenden Schritte werden automatisiert mit dem CHRONECT Robotic Autosampler durchgeführt. Zunächst wird der interne Standard (ISTD) 5 $\beta$ -Cholestan-3 $\alpha$ -ol (Trivialname: Epico-prostanol,  $c = 1 \text{ mg/mL}$ ,  $V = 0,1 \text{ mL}$ ) zugegeben. Darauf folgt für stärkehaltige Proben eine enzymatische Stärkehydrolyse durch die Zugabe von 1 mL verdünnter  $\alpha$ -Amylase-Lösung. Der Stärkeabbau dauert 30 Minuten. Die Option, dass die Stärkehydrolyse durchgeführt werden soll, ist bei der Sequenzerstellung über die Software CHRONOS möglich. Nach dem Stärkeab-

bau ist der Analysenablauf für alle stärkehaltigen und stärkefreien Proben identisch. Es folgt ein Verseifungsschritt nach Zugabe von 1,5 mL ethanolischer Kaliumhydroxidlösung, welcher 40 Minuten dauert. Das Unverseifbare wird daraufhin mit 4 mL *n*-Hexan extrahiert. Zudem werden 2,5 mL gesättigte Zitronensäurelösung zur Neutralisation zugegeben. Die Durchmischung des Probenextrakts wird jeweils durch den Agitator des CHRONECT Robotic realisiert. Ein 200  $\mu\text{L}$ -Aliquot der organischen Phase wird anschließend in ein 2-mL-Vial überführt, in dem sich bereits getrocknetes  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  und 800  $\mu\text{L}$  *n*-Hexan befinden. Somit werden etwaige Wasserrückstände gebunden und die Probe wird nochmals verdünnt. Diese Probenvorbereitung basiert damit im Wesentlichen auf den Methoden der ASU gemäß §64 LFGB und wurde für die CHRONECT Workstation lediglich angepasst und optimiert.

### LC-GC Analyse

Es werden 10  $\mu\text{L}$  des verdünnten Extrakts in das LC-GC-System injiziert. Der LC-Lauf dient zur Fraktionierung der Probe. Als HPLC-Säule kommt eine Normalphasensäule (Kieselgel, 250 mm x 2,1 mm; 5  $\mu\text{m}$ ; 60 Å) zum Einsatz. Die Eluenten sind *n*-Hexan/2-Propanol (98/2 (v/v)) und Methyl-*tert*-butylether (MTBE). Es handelt sich um eine isokratische Trennung. Das MTBE dient dem Backflush der Säule.

Die  $\Delta^5$ -4-Desmethylsterin-Fraktion, inklusive des ISTD und Cholesterins, eluiert nach ca. 8 min von der LC-Säule. Der Elutionsbeginn und das Elutionsende der Fraktion werden regelmäßig durch die Injektion einer Lösung kontrolliert, welche den ISTD und Cholesterin enthält. Die Überprüfung erfolgt mittels UV-Detektor bei 205 nm. In der Regel eluiert die Fraktion innerhalb von 2,5 min. Bei einem Eluentenfluss von 0,3 mL/min werden somit 0,75 mL zur Retention Gap transferiert. Die Retention Gap ist innerhalb des GC-Ofens installiert, welcher zum Transferstart auf +80 °C eingestellt ist und diese für 5 min konstant hält. Der überwiegende Teil des transferierten Lösungsmittels wird über ein Solvent-Vapor-Exit-Ventil (SVE) abgedampft, das nach dem Transfer schließt. Die Regelung von Gasen und Temperaturen erfolgt über das LC-GC-Interface. Der interne Standard und Cholesterin haben einen deutlich höheren Siedepunkt als das Lösungsmittel (*n*-Hexan/2-Propanol, 98/2 (v/v)), wodurch sie zunächst auf der Retention Gap verbleiben. GC-

## Bestimmung des Eigenhaltes von Lebensmitteln Applikationsnote 1905

Ofenprogramm und Gasfluss wurden so optimiert, dass der ISTD und Cholesterin basisliniengenrennt sind. Ebenso ist es wichtig, dass keine Koelution mit den möglicherweise ebenfalls enthaltenen Phytosterinen auftritt, beispielsweise durch Sonnenblumenöl in Mayonnaise. Die Detektion erfolgt mittels FID.

Parallel zum GC-Lauf wird die LC-Säule zurückgespült und äquilibriert. Ein vollständiger Analysenlauf, beginnend bei der Zugabe des ISTD bis hin zum Ende des GC-Laufs, dauert für stärkehaltige Proben ca. 150 Minuten. Durch die von CHRONOS gesteuerte Überlappung einzelner Probenvorbereitungsschritte können innerhalb einer Sequenz zwei Proben gleichzeitig bearbeitet werden. Während eine Probe noch gemessen wird, startet bereits die Probenvorbereitung der nächsten Probe. Dadurch können

pro Tag zwischen 12 und 18 Proben analysiert werden.

Der Cholesteringehalt wird durch Kalibrierung nach der Methode des internen Standards ermittelt. Die Herstellung der einzelnen Kalibrierlösungen bzw. -level erfolgt vollautomatisch durch CHRONECT Robotic nach entsprechender Vorlage der Stamm-lösungen des internen Standards und Cholesterins. Die Vermessung verläuft analog zu der oben beschriebenen Methode. Der praktische Arbeitsbereich erstreckt sich von 10 mg/100 g bis 400 mg/100 g. Die Cholesterin-Bestimmungsgrenze beträgt demnach 10 mg/100 g. Das ermittelte Bestimmtheitsmaß ist größer als 0,999.

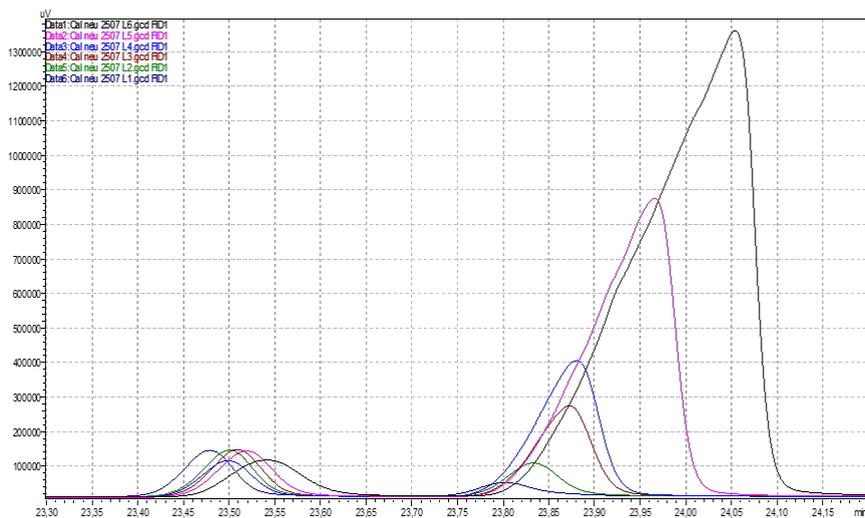


Abbildung 1: Kalibrierungen von 10-400 mg/100 g.

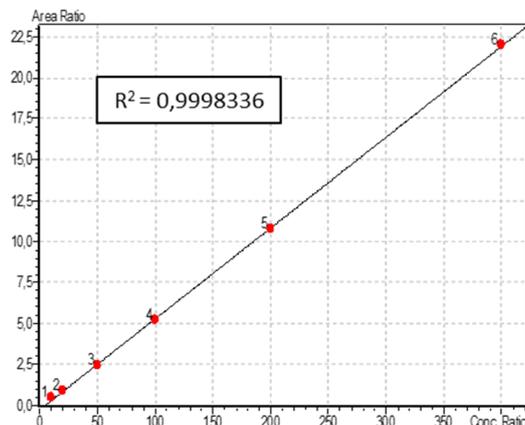


Abbildung 2: Regressionsgerade mit Bestimmtheitsmaß  $R^2$ .

## Bestimmung des Eigenhaltes von Lebensmitteln Applikationsnote 1905

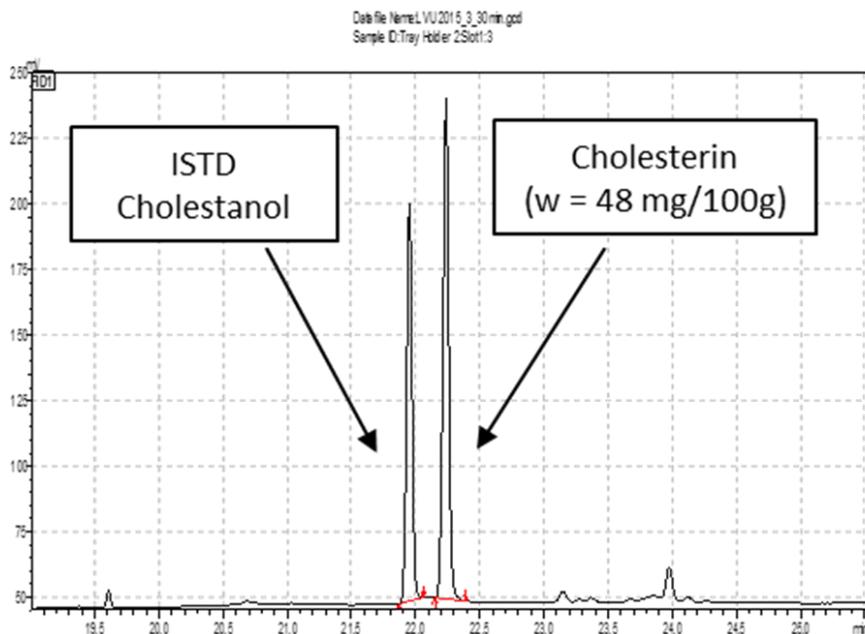


Abbildung 3: Chromatogramm einer Butterkeksprobe.

### Ergebnisse

Zur Überprüfung von Richtigkeit und Präzision der vorgestellten Methode wurden Validierungs- und Verifizierungsuntersuchungen durchgeführt. Für die Validierung wurden vier unterschiedliche Probenmaterialien ausgewählt: Baumkuchen, Butterkeks, Spätzle (jeweils stärkehaltig) und Mayonnaise (stärkefrei). Die Validierungskenndaten sind in Tabelle 2 dargestellt. Die relative Wiederholstandardabweichung bei einer Zehnfachbestimmung liegt bei den untersuchten Matrices unter 5 % und somit in einem üblichen Rahmen für gaschromatographische Verfahren.

Für die Verifizierung der Methode wurden zunächst neun repräsentative Probenmatrices

ausgewählt und deren Cholesteringehalt mithilfe der Methoden ASU L 18.00- 17 bzw. ASU L20.01-13 in einer Dreifachbestimmung ermittelt. Diese Werte dienen als Referenzwerte (= SOLL-Wert) für den Vergleich mit der vollautomatischen Eigenhaltbestimmung mittels LC-GC-FID (= IST-Wert, auch Dreifachbestimmung). In Tabelle 1 sind die Werte beider Verfahren gegenübergestellt. Die erzielten Gehalte sind sehr gut vergleichbar. Der Quotient aus IST/SOLL liegt bei allen neun getesteten Proben zwischen 90 und 110 %. Die Abweichungen zwischen den Ergebnissen der entwickelten Methode und den Referenzmethoden sind demnach äußerst gering.

Tabelle 1: Vergleich mit Referenzverfahren.

[mg/100 g]	Verfahren gemäß § 64 LFGB	Vollautomatisiertes LC-GC-Verfahren	IST/SOLL [%]
Biskuit Tortenboden	171	162	95
Eiernudel	49	45	92
Schwäbische Bandnudel	107	100	93
Baumkuchen (Krumen)	238	236	99
Butterkeks	46	49	107
Spätzle	81	83	102
Salat-Mayonnaise	38	40	105
Mayonnaise	59	63	107
Eierlikör	247	255	103

## Bestimmung des Eigenhaltes von Lebensmitteln Applikationsnote 1905

**Tabelle 2:** Präzisionsdaten.

[mg/100 g]	Mittelwert (n=10)	Wiederholstand- dardabweichung	Relative Stand- dardabweichung
Baumkuchen (Krumen)	236	5,3	5,0 %
Butterkeks	49	0,7	6,3 %
Spätzle	83	0,4	5,8 %
Mayonnaise	71	2,4	6,0 %

### Zusammenfassung

Die CHRONECT Workstation Cholesterin erlaubt eine routinefeste, vollautomatische Eigenhaltsbestimmung mittels LC-GC-FID. Die Workstation ist sowohl für die Untersuchung stärkehaltiger als auch stärkefreier Proben geeignet. Im Vergleich zu Referenzmethoden ist der Verbrauch organischer Lösungsmittel fast halbiert und die Bearbeitungszeit kann ebenfalls deutlich reduziert werden. Bei den Referenzmethoden gemäß § 64 des LFGB benötigt ein/e Mitarbeiter/in bis zu acht Stunden für eine Sequenz von acht Proben. Die anschließende Messung der Extrakte kann dann über Nacht erfolgen, sodass nach 24 Stunden acht Ergebnisse vorliegen.

Bei Verwendung der CHRONECT Workstation Cholesterin benötigt ein/e Mitarbeiter/in lediglich eine Stunde zur Vorbereitung der Einwaagen und des Messsystems und erhält nach 24 Stunden mindestens 12 und maximal 18 Ergebnisse. Durch umfangreiche Validierungs- und Verifizierungsuntersuchungen konnten eine sehr gute Präzision und die Richtigkeit der neuen Methode bewiesen werden. Die CHRONECT Workstation Cholesterin eignet sich daher als optimale Grundlage zur Berechnung der wertgebenden Zutat Ei in der jeweiligen Lebensmittelmatrix.

Die CHRONECT Workstation  
Cholesterin ist eine gemeinsame  
Entwicklung des Landeslabors  
Berlin-Brandenburg und Axel  
Semrau.

#### Technische Änderungen vorbehalten

Axel Semrau GmbH & Co. KG  
Stefansbecke 42  
45549 Sprockhövel  
Tel.: 02339 / 12090  
Fax: 02339 / 6030  
[www.axelsemrau.de](http://www.axelsemrau.de)  
[info@axelsemrau.de](mailto:info@axelsemrau.de)