Methode zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Phytosterinen in Pflanzenölen mittels LC-GC off-line = Method for qualitative and quantitative determination of phytosterols in vegetable oils by LC-GC off-line

Autor(en): **Schuhmann, Peggy / Schneller, Reinhard**

Objekttyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **87 (1996)**

Heft 6

PDF erstellt am: **04.06.2024**

Persistenter Link: https://doi.org/10.5169/seals-982099

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.
Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.
Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Ein Dienst der *ETH-Bibliothek*
ETH Zürich, Rämistrasse 101, 8092 Zürich, Schweiz, www.library.ethz.ch

http://www.e-periodica.ch

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **87**, 708–715 (1996)
Eingegangen 29. Juli 1996. Angenommen 29. September 1996

Methode zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Phytosterinen in Pflanzenölen mittels LC-GC off-line

Method for Qualitative and Quantitative Determination of Phytosterols in Vegetable Oils by LC-GC off-line

Key words: Phytosterols, LC-GC off-line, Vegetable oils, HPLC, Capillary-GC

Peggy Schuhmann und *Reinhard Schneller*
Zentrallaboratorium Migros-Genossenschaftsbund, Zürich

Einleitung

Zur Bestimmung der Sterine werden in der Fachliteratur und in amtlichen Methodensammlungen (1) verschiedene Analysenmethoden vorgeschlagen. Nach dem klassischen Verfahren wird die Sterinfraktion aus dem Unverseifbaren dünnschichtchromatographisch isoliert und die einzelnen Sterine gaschromatographisch identifiziert und bestimmt. Die Methode des Schweizerischen Lebensmittelbuches (1) basiert auf dem erwähnten Analysengang mit dem Hinweis auf neuere Methoden zur Beschleunigung des klassischen Verfahrens. Von *Homberg* et al. (2) wird vorgeschlagen, nach Verseifung die Sterine aus der Alkalilösung, statt durch Extraktion, über eine Aloxsäule abzutrennen. *Horstmann* und *Montag* (3) ersetzen die Dünnschichtchromatographie durch Festphasenextraktion oder präparative HPLC. Zur getrennten Bestimmung der freien und veresterten Sterine wird von *Worthington* und *Hitchcock* (4) eine kombinierte HPLC-Dünnschichtchromatographie-Methode vorgeschlagen.

Grundsätzlich neu ist die Sterinbestimmung erst von *Biedermann* und *Grob* (5) beschrieben worden. Anstelle der Verseifung werden die Triglyceride mit Natriummethylat umgeestert und die Sterinfraktion mittels HPLC unter anderem von den Fettsäuremethylestern abgetrennt. Die freien und ursprünglich veresterten Sterine werden im On-line-Verfahren (GC-LC-Kopplung) gaschromatographisch identifiziert und bestimmt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, abzuklären, ob die nach *Biedermann* und *Grob* vorgeschlagene Methode auch im Off-Line-Betrieb (LC-GC nicht gekoppelt) als zuverlässige, effiziente Routinemethode eingesetzt werden kann.

Prinzip

Das Öl wird mit methanolischer Natriummethylatlösung umgeestert und die freien und aus ihren Estern freigesetzten Sterine mit n-Hexan extrahiert. Die Sterinfraktion wird mittels HPLC an einer Kieselgelsäule abgetrennt. Die Retentionszeit der Sterinfraktion wird anhand einer Sterinstandardmischung mit einem UV-Detektor bestimmt. Die aufgefangene Sterinfraktion wird unter leichtem Erwärmen im Stickstoffstrom eingeengt und die einzelnen Sterine gaschromatographisch identifiziert und quantitativ bestimmt.

Proben

Untersuchungsmaterial: 10 verschiedene Speiseöle (siehe Tabelle 3).

Geräte und Zubehör

Hochdruckflüssigchromatographie

UV-VIS-Detektor L-4200	Merck
Intelligent Pump L-6200	Merck-Hitachi
Autosampler AS-200A	Merck-Hitachi
HPLC-Software	Hewlett-Packard

Gaschromatographie

Gaschromatograph HRGC 2 Series	Fisons Instruments
GC-Software	Carlo Erba (Chromcard)
Schüttelgerät KS10	Edmund Bühler AG

Chemikalien

5α-Cholestanol	Fluka 26710
Natriummethylat 30% in MeOH	Fluka 71748
Citronensäuremonohydrat	Merck 12014
n-Hexan	Merck 1.04391
tert.-Butylmethylether	Fluka 20247
i-Propanol	Merck 9634
β-Sitosterin	Merck 3739
Stigmasterin	Fluka 85860
Cholesteryloleat	Fluka 26850

Reagenzien

Interner Standard (IS): 1%ige Lösung von 5-Cholestanol in n-Hexan
Umesterungslösung: 10%ige methanolische Natriummethylatlösung in

tert.-Butylmethylether (4+6/V+V)
Citronensäurelösung: 0,1% Citronensäuremonohydrat in Wasser

Methode/Ausführung

Umesterung

In ein 3-ml-Reaktionsgläschen mit Schraubverschluss werden ca. 100 mg Öl genau eingewogen, 5 µl interne Standardlösung sowie 1 ml Natriummethylatlösung zugegeben und leicht geschüttelt (wenn notwendig leicht erwärmen), bis sich das Öl vollständig gelöst hat. Die Lösung wird 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschliessend mit 0,7 ml destilliertem Wasser und 1 ml n-Hexan versetzt und auf der Schüttelmaschine 10 Minuten (UpM ca. 400) extrahiert. Die wässerige Bodenphase wird mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgezogen und die verbleibende organische Phase mit 100 µl Citronensäurelösung versetzt und kurz geschüttelt. Nach der vollständigen Phasentrennung ist die obere organische Phase für die HPLC-Abtrennung der Sterinfraktion bereit.

HPLC-Bedingungen

Säule: Lichrosorb Si 60 (5 µm), Länge 250 mm, I.D. 4 mm
Fliessmittel: 1% i-Propanol in n-Hexan
Fluss: 1,5 ml/min
Injektionsvolumen: 100 µl
UV-VIS Detektor: Wellenlänge 200 nm

Um die Retentionszeit der Sterinfraktion der Analysenprobe zu bestimmen, wird zuerst die Sterinstandardmischung chromatographiert und mit der Analysenprobe ein Testlauf durchgeführt. Nachdem die genaue Retentionszeit der Sterine feststeht, wird die Analysenlösung ein weiteres Mal chromatographiert und die Sterinfraktion (ca. 2 ml) am Detektorausgang in einem Reagenzglas aufgefangen. Die Sterinfraktion wird anschliessend im Stickstoffstrom im Wasserbad bei ca. 50 °C auf 1 ml eingeengt und in GC-Autosamplerfläschchen abgefüllt. Da die Retentionszeiten während der Messungen unter gleichen Bedingungen konstant sind, ist für den Routinebetrieb ein Fraktionensammler zu empfehlen. Damit kann

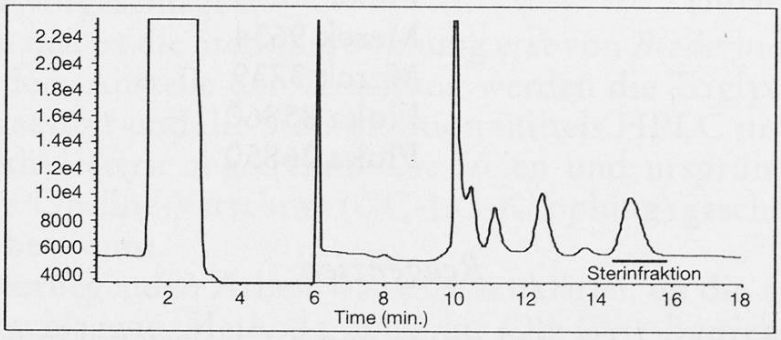

Abb. 1. HPLC-Chromatogramm von Traubenkernöl

der Zeitaufwand für die Probensammlung erheblich verkürzt und die Präzision der ausgeschnittenen Sterinfraktion verbessert werden (Abb. 1).

Die einzelnen Sterine wurden anhand von Standardsubstanzen (soweit sie uns zur Verfügung standen) und mit Hilfe von Literaturdaten über ihre Retentionszeiten im Chromatogramm identifiziert (siehe Abb. 2).

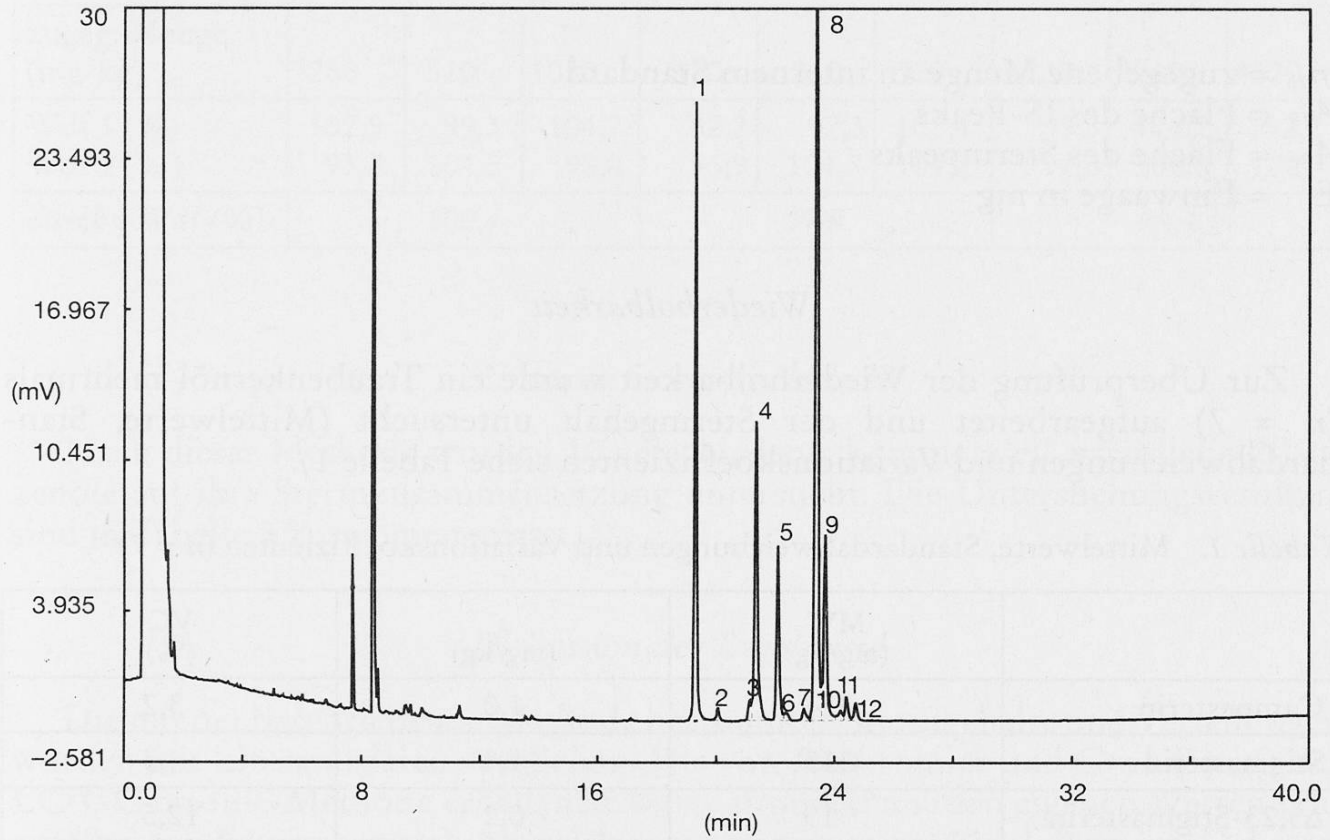

Abb. 2. Gaschromatogramm von Erdnussöl
1 = 5α-Cholestanol; 2 = Brassicasterin; 3 = 24-Methylcholesterin; 4 = Campesterin; 5 = Stigmasterin; 6 = Δ7-Campesterol; 7 = Δ5,23-Stigmastadienol; 8 = β-Sitosterin; 9 = Δ5-Avenasterin; 10 = Δ5,24-Stigmastadienol; 11 = Δ7-Stigmastenol; 12 = Δ7-Avenasterin

Gaschromatographische Bedingungen

Gaschromatograph:	HRGC 2 Series Fisons Instruments
Trennsäule:	SE-54, 30 m, I.D.: 0,32 mm
Retention Gap:	2 m, I.D.: 0,53 mm
Trägergas:	Wasserstoff (15 psi)
Injektion:	cold-on column
Injektionsvolumen:	2–4 µl
Temperaturprogramm:	Anfangstemperatur: 80 °C (Haltezeit: 3 min)
Aufheizrate (1):	30 °C / min auf 220 °C (Haltezeit: 0 min)
Aufheizrate (2):	2 °C / min auf Endtemperatur 290 °C (Haltezeit: 15 min)
Detektortemperatur:	320 °C

Berechnung des Gehaltes an Sterinen im Öl

Die Berechnung des Gehaltes an Sterinen in Öl erfolgt nach nachstehender Formel:

$$\text{Gehalt (mg/kg)} = \frac{m_{IS} \cdot 1000 \cdot A_{St}}{A_{IS} \cdot E}$$

m_{IS} = zugegebene Menge an internem Standard
A_{IS} = Fläche des IS-Peaks
A_{St} = Fläche des Sterinpeaks
E = Einwaage in mg

Wiederholbarkeit

Zur Überprüfung der Wiederholbarkeit wurde ein Traubenkernöl mehrmals (n = 7) aufgearbeitet und der Steringehalt untersucht (Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten siehe Tabelle 1).

Tabelle 1. Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten (n = 7)

	MW (mg/kg)	s (mg/kg)	VC (%)
Campesterin	324	1,0	3,2
Stigmasterin	315	1,4	4,3
Δ5,23-Stigmasterin	19	0,2	12,5
β-Sitosterin*	2396	7,1	3,0
Δ5,24-Stigmasterin	43	0,6	14,5
Δ7-Stigmastenol	97	0,8	7,9
Δ7-Avenasterin	32	0,4	13,8
Summe	3223	10,1	3,1

MW = Mittelwert; s = Standardabweichung; VC = Variationskoeffizient
β-Sitosterin*: Summe aus β-Sitosterin und Δ5-Avenasterin

Wiederfindbarkeit

Die Wiederfindbarkeit wurde anhand von Stigmasterin und β-Sitosterin überprüft. Als Probenmatrix diente Erdnussöl mit einem Eigengehalt von 230 mg/kg Stigmasterin und 2030 mg/kg β-Sitosterin (Summe aus β-Sitosterin und Δ5-Avenasterin). Cholesterin war in diesem Öl nicht nachweisbar. Stellvertretend für die

Sterinester wurde Traubenkernöl mit Cholesteryloleat dotiert und die Wiederfindbarkeit überprüft (Tabelle 2).

Tabelle 2. Wiederfindbarkeit (Wdf) von Cholesteryloleat, Stigmasterin und β-Sitosterin

Standard	Cholesteryloleat			Stigmasterin			β-Sitosterin		
zugeg. Menge (mg/kg)	260	510	1030	130	260	520	1130	2260	4520
Wdf 1 (%)	102,9	99,3	104,2	82,2	97,3	101,4	95,3	101,2	92,2
Wdf 2 (%)	93,7	104,5	98,0	96,9	104,7	104,3	92,6	108,6	100,7
durchs. Wdf (%)	*100,4*			*97,8*			*98,4*		

Untersuchungsergebnisse

Nach dieser Methode wurden 10 verschiedene, kommerziell erhältliche Pflanzenöle auf ihre Sterinzusammensetzung untersucht. Die Untersuchungsresultate sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Diskussion der Ergebnisse

Die mit der beschriebenen Methode bestimmten Steringehalte und Verteilungen wurden mit Literaturdaten verglichen. Die von *Biedermann* und *Grob* (5) mit der LC-GC on-line-Methode erhaltenen Werte stimmen mit den eigenen Werten sehr gut überein. Es ergeben sich Abweichungen von maximal 10 rel. Prozent. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die einzelnen Öle in ihren Steringehalten natürlichen Schwankungen unterliegen.

Ebenfalls zeigt ein Vergleich der Ergebnisse von *Homberg* (6) sehr gute Übereinstimmungen der Sterinverteilungen in den einzelnen Ölen.

Damit kann bestätigt werden, dass mit der beschriebenen Methode genaue und vergleichbare Werte produziert werden können.

Zusammenfassung

In Anlehnung an die Arbeit von *Biedermann* und *Grob* (5) wird eine schnelle und zuverlässige Methode zur quantitativen Bestimmung der freien und veresterten Sterine von Speiseölen und Speisefetten beschrieben. Nach Umesterung der Triglyceride werden die Sterine im LC-GC-Verfahren (off-line) von den Fettsäuremethylestern abgetrennt und ohne zu derivatisieren quantitativ bestimmt. Der Zeitbedarf für eine Einzelbestimmung beträgt ca. 2 Stunden. Durch weitere Automatisierung (Einsatz von Autosampler und Verdampfungsapparatur) lässt sich die Analysenzahl problemlos auf 15 bis 20 Proben pro Tag steigern. Der Einsatz eines Fraktionensammlers ist empfehlenswert.

Tabelle 3. Steringehalt verschiedener Speiseöle – Mittelwerte aus Vierfachbestimmungen

Sterin/Öl	Distel	Maiskeim	Sonnenbl.	Raps	Traubenk.	Olive*	Olive**	Haselnuss	Erdnuss	Baumnuss
	G/V	G/V	G/V	G/V	G/V	G/V	G/V	G/V	G/V	G/V
Cholesterin	1/0,0	46/0,5	14/0,4	4/0,5	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
Brassicasterin	5/0,2	6/0,1	n. n.	910/10,8	5/0,1	n. n.	n. n.	n. n.	21/0,6	5/0,2
24-Methylen-cholesterin	12/0,4	122/1,3	5/0,1	157/1,9	9/0,3	3/0,2	5/0,3	n. n.	n. n.	2/0,1
Campesterin	349/12,4	1898/12,0	334/8,2	2967/35,3	342/10,0	53/3,3	52/3,1	120/6,9	35/1,0	127/6,8
Campestanol	20/0,7	n. n.	3/0,1	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	616/18,1	2/0,1
Stigmasterin	163/5,8	635/6,7	319/7,8	56/0,7	319/9,3	13/0,8	19/1,1	13/0,8	305/8,9	17/0,9
Δ7-Campesterol	142/5,1	32/0,3	98/2,4	51/0,6	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	22/0,6	2/0,1
Δ5,23-Stig-mastadienol	22/0,8	85/0,9	49/1,2	57/0,7	24/0,7	17/1,1	18/1,1	18/1,0	29/0,9	19/1,0
Chlerosterin	21/0,7	n. n.	16/0,4	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
β-Sitosterin	1211/43,1	5766/60,7	2261/55,4	3786/45,1	2268/66,3	1284/79,5	1186/71,2	1483/84,8	1909/56,0	1500/80,7
Sitostanol	68/2,4	246/2,6	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
Δ5-Avenasterin	76/2,7	459/4,8	248/6,1	280/3,3	261/7,6	235/14,5	362/21,8	73/4,2	364/10,7	139/7,5
Δ5,24-Stigma-stadienol	58/2,1	52/0,6	43/1,0	52/0,6	49/1,4	11/0,7	17/1,0	5/0,3	24/0,7	23/1,2
Δ7-Stigmastenol	529/18,8	71/0,8	505/12,4	29/0,4	106/3,1	n. n.	5/0,3	25/1,4	48/1,4	17/0,9
Δ7-Avenasterin	136/4,8	89/0,9	189/4,6	12/0,1	38/1,1	n. n.	2/0,1	11/0,6	38/1,1	7/0,4
Gesamtsterine	2812	9507	4083	8396	3420	1615	1665	1748	3409	1858

G = Steringehalt (mg/kg), V = Sterinverteilung in %, n. n. = nicht nachweisbar
* = raffiniert, ** = kalt gepresst

Résumé

Basée sur les travaux de *Biedermann* et *Grob* (5), une analyse rapide et rationnelle pour la quantification des stérols libres et estérifiés dans les huiles et les graisses comestibles est décrite. Après transestérification des acides gras d'échantillons d'huiles et de graisses, les stérols sont séparés des esters méthyliques d'acides gras et déterminés quantitativement par LC-GC (off-line) sans dérivatisation. La durée d'analyse pour un seul échantillon est d'environ 2 heures. En utilisant les possibilités d'automatisation actuelles (échantillonneur automatique et appareil pour l'évaporation), 15 à 20 échantillons peuvent être analysés par jour. L'utilisation d'un collecteur de fractions est recommandée.

Summary

Based on work by *Biedermann* and *Grob*. (5) an efficient and reliable method for the analysis of free and esterified sterols in oils and fats has been developed. After transesterification of triglycerides and sterolates in oil or fat samples, sterols were separated from fatty acid methyl esters by LC-GC (off-line) and quantified without further derivatisation. A single analysis takes about 2 hours. By using an autosampler and an evaporating apparatus for small volumes, 15–20 samples per day may be analysed. We recommend the use of a fraction sampler.

Literatur

1. Schweizerisches Lebensmittelbuch 5. Aufl. Bd. 1 Kap. 7 / 4.5 Bestimmung von Sterinen. Eidg. Drucksachen- und Materialzentrale, Bern 1994.
2. *Homberg, E.* und *Seher, A.:* Isolierung von Steringemischen aus Fetten und Ölen, I. Mitteilung Chromatographisches Verfahren. Z. Lebensm.-Unters.-Forsch. **148,** 133–137 (1972).
3. *Horstmann, P.* und *Montag, A.:* Neue Methoden zur schnellen Isolierung von Sterinen aus Fettmatrices. Fette, Seifen, Anstrichmittel **88,** 262–264 (1986).
4. *Worthington, R. E.* and *Hitchcock, H. L.:* A method for the separation of seed oil steryl esters and free sterols: Application to peanut and corn oils. J. Am. Oil Chem. Soc. **61,** 1085–1087 (1984).
5. *Biedermann, M., Grob, K.* and *Mariani, C.:* Transesterification and on-line LC-GC for determining the sum of free and esterified sterols in edible oils and fats. Fett Wiss. Technol. **95,** 127–133 (1993).
6. *Homberg, E.* und *Bielefeld, B.:* Sterinzusammensetzung und Steringehalt in 41 verschiedenen pflanzlichen und tierischen Fetten. Fett Wiss. Technol. **91,** 23–27 (1989).

Peggy Schuhmann
Reinhard Schneller
Migros-Genossenschaftsbund
Zentrallaboratorium
Postfach 266
CH-8031 Zürich