

Cholesterin

Farb-Test

zur Bestimmung von Cholesterin in Lebensmitteln und anderen Probematerialien

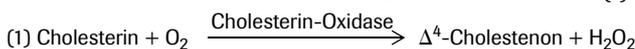
Vereinfachtes Verfahren s. bei Flüssigei, etc. (s. Pkt. 12)

Best. Nr. 10 139 050 035

Test-Combination für 31 Bestimmungen

Prinzip (Lit. 1)

Cholesterin wird von Cholesterin-Oxidase zu Cholestenon oxidiert (1).



Das bei dieser Reaktion entstehende Wasserstoffperoxid oxidiert Methanol in Gegenwart von Katalase zu Formaldehyd (2).



Formaldehyd bildet mit Acetylaceton in Gegenwart von NH_4^+ -Ionen einen gelben Lutidin-Farbstoff (3).



Die Konzentration des entstehenden Lutidin-Farbstoffes (3,5-Diacetyl-1,4-dihydrolutidin) ist der Menge an Cholesterin äquivalent und wird aufgrund seiner Absorption im sichtbaren Bereich bei 405 nm gemessen.

Die Test-Combination enthält

- Flasche 1 mit ca. 95 ml Lösung, zusammengesetzt aus: Ammoniumphosphat-Puffer, pH ca. 7,0; Methanol, 2,6 M Katalase, ca. 220.000 U
- Flasche 2 mit ca. 60 ml Lösung, zusammengesetzt aus: Acetylaceton, 0,05 M; Methanol, 0,3 M
- Flasche 3 mit ca. 0,8 ml Suspension Cholesterin-Oxidase, ca. 12 U
- Flasche 5 mit Cholesterin-Testkontroll-Lösung zur Testkontrolle. (Die Messung der Testkontroll-Lösung ist nicht erforderlich zur Berechnung von Ergebnissen.) Testkontroll-Lösung unverdünnt verwenden. (Verwendbar bis: s. Packungsetikett).

Herstellung der Lösungen

Cholesterin-Reagenz-Mischung (im Test "Lösung 4"):

3 Teile der Lösung aus Flasche 1 mit 2 Teilen der auf 20-25°C gebrachten Lösung aus Flasche 2 mischen (braune Flasche verwenden!). Mischung vor Gebrauch 1 Stunde bei 20-25°C stehen lassen.

Inhalt der Flasche 3 unverdünnt verwenden (im Test "Lösung 3").

Stabilität der Reagenzien

Der Inhalt der Flaschen 1, 2 und 3 ist stabil bei 2-8°C (s. Packungsetikett).

Lösung 4 ist in brauner Flasche bei 2-8°C 3 Monate haltbar.

Eine leichte Gelbfärbung stört den Test nicht.

Lösung 4 vor Gebrauch auf 20-25°C bringen und 1h stehen lassen.

Bestimmungsansatz

Wellenlänge: (Hg) 405 nm

Glasküvette¹: 1,00 cm Schichtdicke

Inkubationstemperatur: 37-40°C

Messtemperatur: 20-25°C

Inkubationsvolumen: 5,400 ml

Messvolumen: ca. 2,5 ml

Messung von Probeerwert und Probe nacheinander in derselben Küvette gegen Luft (im Strahlengang keine Küvette)

Probelösung: 8-160 µg Cholesterin/Ansatz² (in 0,400 ml Probevolumen)

¹ Anstelle der Glasküvetten sind auch handelsübliche Einwegküvetten geeignet.

² Siehe Hinweise zur Testdurchführung

³ Der in einer Enzymtest-Pipette verbleibende Rest wird in das Reagenzglas, das den Probeerwert enthält, zurückgegeben.

⁴ Z.B. mit Parafilm (Warenzeichen der American Can Company, Greenwich, Ct., USA), **besser jedoch Reagenzgläser mit Schliff und Stopfen verwenden**

BOEHRINGER MANNHEIM / R-BIOPHARM Enzymatische BioAnalytik / Lebensmittelanalytik

Nur zur Verwendung in der Lebensmittelhygiene.

Lagern bei 2-8°C

Methoden-Empfehlungen und standardisierte Verfahren siehe unter Literatur (2)

In Glas-Reagenzröhrchen pipettieren	Probeerwert	Probe
Lösung 4	5,000 ml	-
Probelösung*	0,400 ml	-
Inhalt des Reagenzglases gut mischen		
aus dem Reagenzglas des Probeerwertes abpipettieren ³ und in ein weiteres Glas-Reagenzröhrchen geben	-	2,500 ml
Lösung 3	-	0,020 ml
gut mischen, Probeerwert und Probe verschliessen und 60 min bei 37-40°C im Wasserbad inkubieren. Nach Abkühlen auf 20-25°C Extinktionen von Probeerwert und Probe nacheinander in derselben Küvette gegen Luft messen (s. Pkt. 2.8). Extinktion des Leerwerts von der Extinktion der Probe abziehen (= ΔE).		

* Vor der Dosierung der Probelösung Enzymtest-Messpipette bzw. Pipettenspitze der Kolbenhubpipette mit der Probelösung vorspülen.

Die gemessene Extinktionsdifferenz sollte zur Erzielung eines ausreichend präzisen Ergebnisses in der Regel mindestens 0,100 Extinktionseinheiten betragen (s. "Hinweise zur Testdurchführung" und "Empfindlichkeit und Nachweisgrenze", s. Pkt. 5).

Berechnung

Nach der allgemeinen Berechnungsformel für die Bestimmung der Konzentration gilt:

$$c = \frac{V \times MG}{\epsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta E \text{ [g/l]}$$

V = Testvolumen [ml]

v = Probevolumen [ml]

MG = Molekulargewicht der zu bestimmenden Substanz [g/mol]

d = Schichtdicke [cm]

ϵ = Extinktionskoeffizient des Lutidinfarbstoffs bei 405 nm
= 74 [l × mmol⁻¹ × cm⁻¹]

Hieraus ergibt sich unter Berücksichtigung der im Testansatz vorgenommenen Verdünnung

(Verdünnungsfaktor $\frac{2,52}{2,5} = 1,008$) für den Steringehalt, berechnet als

Cholesterin:

$$c = \frac{5,400 \times 386,64 \times 1,008}{74 \times 1,00 \times 0,400 \times 1000} \times \Delta E = 0,711 \times \Delta E \text{ [g Cholesterin/l Probelösung]}$$

Ist bei der Vorbereitung der Probe eine weitere Verdünnung vorgenommen worden, muss das Ergebnis mit dem Verdünnungsfaktor F multipliziert werden.

Bei der Analyse fester und halbfester Proben, die für die Vorbereitung der Probe eingewägt werden, wird das Analysenergebnis auf die Einwaage bezogen:

$$\text{Gehalt}_{\text{Cholesterin}} = \frac{c_{\text{Cholesterin}} \text{ [g/l Probelösung]}}{\text{Einwaage}_{\text{Probe}} \text{ in g/l Probelösung}} \times 100 \text{ [g/100 g]}$$

1. Hinweise zur Testdurchführung

Im Testansatz muss die Cholesterinmenge zwischen 8 µg und 160 µg betragen. Zur Erzielung einer ausreichend hohen Extinktionsdifferenz ist die Probelösung soweit mit Isopropanol zu verdünnen, dass die Cholesterinkonzentration zwischen 0,07 und 0,4 g/l liegt.

Verdünnungstabelle

Geschätzte Menge Cholesterin im Liter	Verdünnung mit Isopropanol	Verdünnungsfaktor F
< 0,4 g	-	1
0,4- 4,0 g	1 + 9	10
4,0-40,0 g	1 + 99	100

2. Technische Hinweise

2.1 Feste Proben, z.B. Nudeln, sind vollständig zu zerkleinern und quantitativ zu sieben: Korngrösse < 0,2 mm.

2.2 Von den verschiedenen Verfahren der Vorbereitung der Probe (s. Pkt. 11) wird das "Eintopfverfahren" = Kochen im 50 ml-Messkolben empfohlen (s. Pkt. 11c). Volumenfehler durch Erwärmen des Messkolbens und die Volumenverdrängung durch unlösliche Anteile der Probe können vernachlässigt werden.

2.3 Der zu verwendende Messkolben sollte einen möglichst flachen Boden besitzen. Die Länge des Magnetes sollte dem Durchmesser des Messkolbenbodens entsprechen und die Rührgeschwindigkeit sollte so gross sein, dass weder Probe noch Seesand auf dem Boden liegen bleiben (Vermeiden von Siedeverzügen).

2.4 Anstelle von 1 g Seesand (Volumenverdrängung von ca. 0,4 ml) können auch einige kleine Bimssteinchen verwendet werden (Volumenverdrängung ist dann zu vernachlässigen).

2.5 Das Kochen unter Rückfluss kann erfolgen mit einem beheizbaren Magnetrührer oder mit einem Magnetrührer und Heizpflanz. Es wird empfohlen langsam anzuhetzen, um ein Überkochen zu vermeiden.

2.6 Zur Absicherung der Ergebnisse sollte ein Wiederfindungsversuch ausgeführt werden. Einzelheiten s. bei "Cholesterin-Testkontroll-Lösung".

2.7 Der Inkubationsansatz (mit Cholesterin-Oxidase) darf nicht in Kunststoffröhrchen erfolgen, da Kunststoff sowohl Cholesterin absorbieren kann (es werden zu niedrige Ergebnisse erhalten), als auch könnte Kunststoff Formaldehyd freisetzen, das zu zu hohen Ergebnissen führt. Es wird empfohlen, die Inkubation in Glasröhrchen mit Schliff und Glassstopfen auszuführen. Das Verschliessen der Röhrchen mit Parafilm (Warenzeichen der American Can Company, Greenwich, Ct., USA) kann nicht empfohlen werden, da dieser beim Erwärmen reissen kann und damit Lösungsmittel verdunstet.

2.8 Bei der photometrischen Messung wird $E_{2, \text{Probe}}$ gegen $E_{2, \text{Leerwert}}$ gemessen. Die Messung von E_1 entfällt. Es wird folgendes Vorgehen empfohlen:

- Leerwertansatz in eine trockene Küvette geben und Extinktion gegen Luft messen;
- Leerwertansatz in das Inkubationsgefäss zurückschütten;
- Küvette mit Öffnung nach unten kräftig auf Filterpapier aufstossen;
- Probeansatz in dieselbe Küvette füllen, in Inkubationsgefäss zurückschütten und nochmals in Küvette geben (hierdurch werden Schlieren im Messansatz vermieden);
- Extinktion des Probeansatzes gegen Luft messen.

Für jedes Paar Leerwert- und Probeansatz eine Küvette verwenden. Niemals Leerwertansatz nach Probeansatz messen (durch Verschleppung werden falsche = zu niedrige Ergebnisse ermittelt). Bei der Analyse einer Reihe von Proben ggf. erst alle Leerwertansätze und dann alle Probeansätze messen (wenn nur eine Küvette verwendet werden soll).

Eine Messung der Ansätze in 2 Küvetten ist nur dann möglich, wenn sichergestellt ist, dass beide Küvetten bei der Messwellenlänge absolut gleiche Lichtabsorption besitzen.

3. Spezifität der Bestimmung (Lit. 1.4)

Cholesterin-Oxidase oxidiert Cholesterin und andere Sterine, bei denen sich die Hydroxylgruppe am Kohlenstoffatom 3 in β -Stellung befindet (ausser Lanosterin). Es werden daher auch Phytosterine, wie Stigmasterin und Sitosterin, erfasst, die bei der Berechnung des Eigenhaltes von "Ei-haltigen Lebensmitteln" berücksichtigt werden müssen.

Die Internationale Union für Reine und Angewandte Chemie (IUPAC) empfiehlt bei der Analyse von tierischen Fetten die Berechnung der Ergebnisse als Cholesterin (Molmasse 386,64 g/Mol), bei der Analyse pflanzlicher Fette die Berechnung als β -Sitosterin (Molmasse 414,69 g/Mol) (Lit. 2.1).

Tabelle 1: Mittlere Sterinzusammensetzung von Pflanzenölen (Lit.3.11)

Verbindung	Sonnenblumen	Erdnuss	Soja	Baumwollsaat	Mais	Oliven	Palm
Cholesterin	0,5	6,2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Brassicasterin	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Campesterin	242	278	563	276	2655	19	88
Stigmasterin	236	145	564	17	499	0,5	42
β -Sitosterin	1961	1145	1317	3348	9187	732	252
Δ^5 -Avenasterin	163	253	46	85	682	78	0,5
Δ^7 -Stigmasterin	298	0,5	92	0,5	96	0,5	51
Δ^7 -Avenasterin	99	34	63	18	102	30	0,5
24-Methylen-cycloartenol	204	0,5	53	0,5	425	580	0,5

Angaben in mg/kg

4. Richtigkeit der Messung

Mit handelsüblichen Cholesterin-Präparaten wurden Ergebnisse z.B. von $92 \pm 1,8\%$ erhalten. Standard-Referenzmaterial 911 des National Bureau of Standards, Washington, wurde mit $99\% \pm 0,5\%$ gefunden (Lit. 1.3).

Bei der Beurteilung von Ergebnissen aus der enzymatischen Bestimmung ist die Spezifität der Methode (s. Pkt. 3) zu berücksichtigen: Bei der Analyse von tierischen Proben ist die enzymatische Methode "relativ spezifisch", da die Substrate der unspezifischen Reaktionen in der Probe praktisch nicht enthalten sind. Bei der Analyse pflanzlicher Proben, oder von Gemischen, ist zu berücksichtigen, dass auch eine Reihe von Phytosterinen miterfasst werden (Lit. 1.4).

Beim Vergleich von Ergebnissen aus verschiedenen Methoden ist deren unterschiedliche Spezifität in Betracht zu ziehen.

Zur Absicherung von Ergebnissen ist die Durchführung eines Wiederfindungsversuchs zu empfehlen (s. Pkt. 9.2 und Hinweise zu "Cholesterin-Testkontroll-Lösung").

5. Empfindlichkeit und Nachweisgrenze

Die geringste Extinktionsdifferenz, die das Verfahren unterscheiden kann, beträgt 0,010 Extinktionseinheiten. Das entspricht bei einem Probevolumen $v = 0,400$ ml einer Konzentration an Cholesterin von 7 mg/l.

Die Nachweisgrenze errechnet sich aus der Extinktionsdifferenz von 0,030 und dem maximalen Probevolumen $v = 0,400$ ml zu 20 mg/l.

6. Linearität (Lit. 1.3)

Linearität der Bestimmung ist gegeben von 8 μg Cholesterin/Ansatz (20 mg Cholesterin/l Probeflösung; Probevolumen $v = 0,400$ ml) bis 160 μg Cholesterin/Ansatz (0,4 g Cholesterin/l Probeflösung; Probevolumen $v = 0,400$ ml).

7. Präzision

Bei einer Doppelbestimmung, ausgehend von einer Probeflösung, ist mit Unterschieden bei den Extinktionsdifferenzen von 0,010 bis 0,020 Extinktionseinheiten zu rechnen. Das entspricht bei einem Probevolumen $v = 0,400$ ml einer Cholesterin-Konzentration von ca. 7-15 mg/l. (Ist bei der Vorbereitung der Probe eine Verdünnung vorgenommen worden, ist mit dem Verdünnungsfaktor F zu multiplizieren. Bei einer Einwaage von 1 g Probe/100 ml = 10 g/l sind die zu erwartenden Unterschiede ca. 0,07-0,15 g/100 g.)

In der Literatur sind folgende Daten veröffentlicht:

$x = 0,05 \mu\text{mol/Test}$	VK = 1,05 %	$n = 18$ in der Serie
$x = 0,2 \mu\text{mol/Test}$	VK = 0,80 %	$n = 18$ in der Serie
$x = 0,5 \mu\text{mol/Test}$	VK = 1,46 %	$n = 18$ in der Serie

Lit. 1.3)

Trockenvollei-Pulver:

$x = 1665 \text{ mg/100 g}$	$r = 111 \text{ mg/100 g}$	$s_{(r)} = 39 \text{ mg/100 g}$
	$R = 172 \text{ mg/100 g}$	$s_{(R)} = 61 \text{ mg/100 g}$

(Lit. 2.2)

8. Störungen

Handelsübliche methanolische Kalilauge enthält meist Stabilisatoren, die Inhibitoren der Cholesterin-Oxidase sein können. Daher ist es erforderlich, die methanolische Kalilauge selbst *frisch herzustellen*.

Hierzu verdünnt man wässrige KOH (10 M; p.a.) mit dem 9-fachen Volumen Methanol (p.a.).

9. Erkennen von Störungen

9.1 Grobe Fehler beim Testansatz und Störungen der Bestimmung durch Inhaltsstoffe der Probe können erkannt werden, wenn aus einer Probelösung eine Doppelbestimmung mit verschiedenen Probevolumina (z.B. 0,200 ml und 0,400 ml) ausgeführt wird: Die gemessenen Extinktionsdifferenzen müssen den eingesetzten Probevolumina proportional sein.

Bei der Analytik fester Proben wird die Einwägung verschiedener Mengen (z.B. 1 g und 2 g) für die Vorbereitung der Proben empfohlen. Bei gleichen Probevolumina für die Testansätze muss Proportionalität zwischen Extinktionsdifferenz und Einwaage gegeben sein.

9.2 Unzureichende Extraktion oder Verluste während der Vorbereitung der Probe können durch Wiederfindungsversuche erkannt werden: Die Probe wird mit und ohne zugesetztem Standardmaterial vorbereitet und anschliessend gemessen. Der Zusatz muss (innerhalb des Analysenfehlers) quantitativ wiedergefunden werden (Einzelheiten s. bei "Cholesterin-Testkontroll-Lösung").

10. Gefährlichkeit der Reagenzien

Flasche 1 enthält ca. 8 g Methanol in ca. 100 ml wässriger Lösung; Flasche 2 enthält ca. 0,6 g Methanol und ca. 0,3 ml Acetylaceton in ca. 60 ml wässriger Lösung; Flasche 5 enthält ca. 32 ml Isopropanol.

Methanol in dieser Verdünnung ist gesundheitsschädlich beim Einatmen und beim Verschlucken; Isopropanol ist leicht entzündlich.

Nach Gebrauch können die Reagenzien unter Beachtung der örtlichen Vorschriften zum Abwasser gegeben werden. Das Verpackungsmaterial kann dem Recycling zugeführt werden.

11. Allgemeine Hinweise zur Vorbereitung der Proben

Halbfeste und pastöse Proben sind ausreichend zu homogenisieren; feste Proben sind vollständig zu zerkleinern und quantitativ zu sieben (Maschenweite < 0,2 mm).

Cholesterin muss aus der Probematrix herausgelöst werden, Cholesterin-Ester sind alkalisch zu hydrolysieren. Hierfür gibt es folgende technische Möglichkeiten zur Bestimmung des Gesamt-Cholesterin:

- Kochen unter Rückfluss mit methanolischer Kalilauge, Abfiltrieren des Überstands mit Fritte, zweimaliges Kochen des Rückstands mit Isopropanol und Abfiltrieren mit Fritte im Potterat-Eschmann-Kolben, Sammeln der Filtrate im Messkolben.
- Kochen unter Rückfluss mit methanolischer Kalilauge in 50 ml-Rundkolben und anschliessend zweimaliges Kochen des Rückstands unter Rückfluss mit Isopropanol, Transfer der Überstände mit Pipette in einen 50 ml-Messkolben.
- Kochen unter Rückfluss mit methanolischer Kalilauge und Isopropanol im 50 ml-Messkolben ("vereinfachtes Verfahren"). Dieses Verfahren kann allgemein empfohlen werden, besonders dann, wenn ein Potterat-Eschmann-Kolben nicht zur Verfügung steht oder wenn der Transfer eines klaren Überstandes nicht oder nur sehr schwer möglich ist.**

Bei der Bestimmung von **freiem Cholesterin** wird die Probe in Isopropanol gelöst, bzw. mit Isopropanol extrahiert. Unlösliche Bestandteile werden durch Filtrieren entfernt.

Fettsäuren können durch Ansäuern der Probe in der Kälte entfernt werden. Ist die Entfernung nicht ausreichend (die Probelösung ist trübe), so empfiehlt die IUPAC (Lit. 2.1) die Verwendung kleinerer Probemengen.

Farbstoffe in gefärbten (pflanzlichen) Ölen, wie z.B. in rohem Palmöl, werden mit Aktivkohle entfernt: 5% bezogen auf die Einwaage der Probe (Lit. 2.1).

Bei Proben mit **geringen Cholesterin-Gehalten** wird Cholesterin nach dem Rückflusskochen mit methanolischer Kalilauge mit einem Gemisch Ether/Petrolether (1:1) bei 20-25°C ausgeschüttelt, die organische Phase am Rotationsverdampfer eingeeengt und der Rückstand mit Isopropanol aufgenommen (Lit. 3.8).

12. Anwendungsbeispiele

Bestimmung von Cholesterin in Teigwaren

Etwa 2 g einer in einer Pulvermühle zerkleinerten und quantitativ gesiebten Teigware (Korngrösse max. 0,2 mm) in einen 50 ml-Rundkolben genau einwiegen. 1 g Seesand hinzufügen; 25 min mit 10 ml *frisch hergestellter* methanolischer Kalilauge (1,0 M; s. Pkt. 8) unter Rühren (Magnetrührer) am Rückflusskühler erhitzen.

Die überstehende Lösung mit Pipette in einen 25 ml-Messkolben überführen. Den Rückstand 2 mal mit je 6 ml Isopropanol am Rückflusskühler 5 min erhitzen.

Die Lösungen im Messkolben sammeln, abkühlen lassen, Kolben mit Isopropanol bis zur Marke auffüllen und mischen.

Trübe Lösungen durch ein Faltenfilter filtrieren. Klare Lösung zum Test einsetzen.

Berechnung:

Steringehalt, berechnet als Cholesterin in 100 g Teigwaren in [mg/100 g]

$$= \text{Steringehalt der Probelösung [g/l]} \times \frac{100 \times 25}{m}$$

m = Einwaage der Teigware in Gramm.

Anstelle eines 50 ml-Rundkolbens kann auch ein Potterat-Eschmann-Kolben verwendet werden. **Bei Anwendung des "vereinfachten Verfahrens" (s. unter "Bestimmung von Cholesterin in Flüssigei etc.") ca. 4 g zerkleinerte Probe genau einwiegen.**

Zur Berechnung des Eigenhalts aus dem Steringehalt der Teigwarenprobe muss der durchschnittliche Phytosteringehalt von Ei-freien Teigwaren berücksichtigt werden. Die Resultate nach der vorliegenden Methode entsprechen weitgehend den Ergebnissen der Methode nach Acker und Greve (Lit. 3.1), empfohlen vom Bundesgesundheitsamt (Lit. 3.2).

Bei einem sauren Aufschluss (AOAC-Methode Nr. 14141, Lit. 3.4) erhält man nach Dresselhaus und Acker (Lit. 3.5, 3.6) um etwa 10 mg Gesamtsterine, berechnet als Cholesterin/100 g Teigwaren i. T., höhere Werte (Hydrolyse von Phytosterinlycosiden).

Weiterhin wurde berichtet, dass der mit der Digitonid-Methode gefundene durchschnittliche Cholesteringehalt in Eiern offenbar geringer ist als früher gefunden wurde [statt 2,93% nur mehr 2,55% (Lit. 3.5, 3.6) bzw. 2,45% (Lit. 3.7) in Trockeneigelb, entspricht ca. 190-200 mg Cholesterin/16 g Dotter].

Wird die in Lit. 3.5 und 3.6 angegebene Tabelle zur Berechnung des Eigenhalts von Hartweizen-Teigwaren angewendet, sind zuvor (wegen des anderen Aufschlussverfahrens) zu den bei der enzymatischen Analyse erhaltenen Ergebnissen 10 mg Sterin/100 g Teigware (i.T.) zu addieren.

Eigenhalt: Eier/kg Griess	Gesamtsterine, mg/100 g Tr. bei Verwendung von Hartweizengriess	
	Digitonid-Methode saurem Aufschluss (Lit. 3.5, 3.6)	enzymatische Methode mit alkalischem Aufschluss
0	48.0	38.0
1	71.5	61.5
2	94.5	84.5
3	117.1	107.1
4	139.3	129.3
5	161.1	151.1
6	182.5	172.5

Der Eigenhalt von Nudeln kann mit einer grösseren Genauigkeit ermittelt werden, wenn neben der Nudel auch das zu ihrer Herstellung verwendete Mehl/Griess mit der enzymatischen Methode analysiert wird. Hierbei kann der unterschiedliche Gehalt von Phytosterinen berücksichtigt werden.

Hinweis:

Das Verfahren (Vorbereitung der Probe mittels alkalischer Hydrolyse) ist nicht anwendbar bei der Analyse vorgekochter Teigwaren (Spätzle).

Bestimmung von Cholesterin in Mayonnaise und Remoulade

Etwa 1 g Mayonnaise bzw. Remoulade und 1 g Seesand in einen 50 ml-Rundkolben genau einwiegen; 25 min mit 10 ml frisch hergestellter methanolischer Kalilauge (1,0 M) unter Rühren (Magnetrührer) am Rückflusskühler erhitzen. Die überstehende Lösung mit Pipette in einen 25 ml-Messkolben überführen. Den Rückstand 2 mal mit je 6 ml Isopropanol am Rückflusskühler 5 min erhitzen. Die Lösung im Messkolben sammeln, abkühlen lassen. Kolben mit Isopropanol bis zur Marke auffüllen und mischen. Trübe Lösungen durch ein Faltenfilter filtrieren und klares Filtrat zum Test einsetzen.

Berechnung:

Steringehalt der Mayonnaise in [mg/100 g], berechnet als Cholesterin

$$= \text{Steringehalt der Probelösung [g/l]} \times \frac{100 \times 25}{m}$$

m = Einwaage der Mayonnaise in Gramm.

Zur Berechnung des Eigelbanteils der Mayonnaise (Remoulade) aus dem Steringehalt der Probe muss der durchschnittliche Phytosteringehalt der verwendeten Pflanzenfette berücksichtigt werden (Lit. 3.3).

Öl oder Fett	% Sterine		Öl oder Fett	% Sterine	
	Gesamt	freie		Gesamt	freie
<i>Pflanzenöle</i>					
Ricinusöl	0,23	0,16	Erdnussöl	0,24	0,15
Kakaobutter	0,24	0,17	geh. Erdnussöl	~ 0,07	0,03
Cocosöl	0,10	0,06	Kürbiskernöl	0,38	0,22
Kottonöl	0,31	0,20	Rapsöl	0,62	0,27
Leinöl	0,43	-	Saffloröl	0,31	0,22
Maisöl	0,85	0,25	Sesamöl	0,50	0,21
Olivenöl	0,11	0,06	Sojaöl	0,34	0,22
Palmöl	0,04	0,03	geh. Sojaöl	0,30	-
Palmkernöl	0,08	-	Sonnenblumenöl	0,35	0,16

Bei Anwendung des "vereinfachten Verfahrens" (s. unter "Bestimmung von Cholesterin in Flüssigei, etc.") ca. 2 g Probe genau einwiegen.

Bestimmung von Cholesterin in Eierlikör

Etwa 1 g Eierlikör in einen 50 ml-Rundkolben genau einwiegen. 1 g Seesand hinzufügen; 25 min mit 10 ml *frisch hergestellter* methanolischer Kalilauge (1,0 M) unter Rühren (Magnetrührer) am Rückflusskühler erhitzen. Die überstehende Lösung mit Pipette in einen 25 ml-Messkolben überführen. Den Rückstand 2 mal mit je 6 ml Isopropanol am Rückflusskühler 5 min erhitzen. Die Lösungen im Messkolben sammeln, abkühlen lassen, Kolben mit Isopropanol bis zur Marke auffüllen und mischen. Trübe Lösungen durch ein Faltenfilter filtrieren und klares Filtrat zum Test einsetzen. Zur Berechnung des Eigelbanteils aus dem Steringehalt der Probelösung wird die durchschnittliche Cholesterinkonzentration im Ei mit ca. 200 mg Cholesterin/16 g Eigelb zugrunde gelegt (Lit. 3.5-3.7).

Bei diesem Wert ergibt sich die Anzahl Eier (Eigelb)/l Eierlikör

$$= \text{Steringehalt der Probelösung [g/l]} \times \frac{1000 \times 25 \times D}{m \times 200}$$

m = Einwaage des Eierlikörs in Gramm

D = Dichte des Eierlikörs [g/ml].

Bei Anwendung des "vereinfachten Verfahrens" (s. unter "Bestimmung von Cholesterin in Flüssigei, etc.") ca. 2 g Probe genau einwiegen.

Bestimmung von Cholesterin in Schweineschmalz (Gesamtcholesterin)

Etwa 2 g Probe in einen 50 ml-Rundkolben genau einwiegen. 10 ml *frisch hergestellte* methanolische Kalilauge (1,0 M) zupipettieren und 25 min am Rückflusskühler im Sieden halten. Abkühlen, Inhalt des Rundkolbens in einen 25-ml Messkolben überführen, Rundkolben mit Isopropanol nachspülen und dieses ebenfalls in den Messkolben überführen.

1 ml HCl (8 M) zugeben, mit Isopropanol auf 25 ml auffüllen. 10 min in ein Eisbad stellen. Die freien Fettsäuren fallen hierbei aus.

Die noch trübe Probelösung schnell durch ein Faltenfilter filtrieren. Das Filtrat sofort zum Test einsetzen.

Nach Mischen von Lösung 4 und Probelösung tritt eine leichte Trübung auf. Zu deren Beseitigung das Reagenzglas 10 min in ein Wasserbad von 37°C stellen oder 0,5 ml KOH (1 M) zugeben, mischen und erst dann weiterarbeiten. Volumenänderung bei der Berechnung berücksichtigen.

Bestimmung von Cholesterin in Leberwurst

a) *Gesamt-Cholesterin*: Etwa 2,5 g Leberwurst in einen 50 ml-Rundkolben genau einwiegen, 1 g Seesand hinzufügen; 25 min mit 10 ml *frisch hergestellter* methanolischer Kalilauge (1,0 M) unter Rühren (Magnetrührer) am Rückflusskühler erhitzen. Die überstehende Lösung mit Pipette in einen 25 ml-Messkolben überführen.

Den Rückstand 2 mal mit je 6 ml Isopropanol am Rückflusskühler 5 min erhitzen. Die Lösungen im Messkolben sammeln, abkühlen lassen, Kolben mit Isopropanol bis zur Marke auffüllen und mischen.

Durch ein Faltenfilter filtrieren und klare Lösung zum Test einsetzen.

b) *Freies Cholesterin*: Ca. 10 g Leberwurst homogenisieren. Davon ca. 1 g genau einwiegen, 3 mal mit je 5 ml Isopropanol durch Schütteln bei 20-25°C extrahieren und durch ein Faltenfilter in einen 25 ml Messkolben filtrieren.

5 ml Salzsäure (8 M) zugeben, mit Isopropanol auf 25 ml auffüllen und zur Fettabscheidung 20 min in den Kühlschrank stellen. Durch ein Faltenfilter filtrieren und klare Lösung zum Test einsetzen.

Bestimmung von Cholesterin in Flüssigei, technischem Eigelb und Trockenei (Vereinfachtes Verfahren)

Etwa 1 g Flüssigei, bzw. 0,5 g Eigelb oder 0,25 g Trockenei in einen 50 ml-Messkolben genau einwiegen, 1 g Seesand (die Volumenverdrängung von 0,400 ml ist bei der Berechnung zu berücksichtigen) hinzufügen; 30 min mit 20 ml *frisch hergestellter* methanolischer Kalilauge (1,0 M) und 10 ml Isopropanol unter Rühren (Magnetrührer) am Rückflusskühler erhitzen. Trübe Lösung abkühlen lassen, nach Entfernen des Magnetstabes (mit Isopropanol abspülen) bei 20-25°C Messkolben mit Isopropanol bis zur Marke auffüllen; mischen, durch Faltenfilter filtrieren und klare Lösung zum Test einsetzen.

Berechnung:

Steringehalt von Ei in [mg/100 g], berechnet als Cholesterin

$$= \text{Steringehalt der Probelösung [g/l]} \times \frac{100 \times 49,6}{m}$$

m = Einwaage der Probe in Gramm.

Bestimmung von Cholesterin in Milchfett (Lit. 3.8)

Etwa 5 g Milchfett in einen 250 ml-Rundkolben genau einwiegen; 30 min mit 50 ml *frisch hergestellter* methanolischer Kalilauge (2 M) unter Rühren (Magnetrührer) am Rückflusskühler erhitzen.

Die noch warme Lösung mit 100 ml bidest. Wasser in einen 1000 ml-Scheidetrichter spülen. Nach Abkühlen auf 20-25°C mit 100ml Ether/Petrolether (1 + 1) ausschütteln. Nach ca. 20 bis 30 min die klar abgesetzte Unterphase in den Verseifungskolben ablassen, die organische Phase in einen 500 ml-Rundkolben geben. Das Ausschütteln zweimal wiederholen. Die gesammelten Ether/Petrolether-Phasen bei 35°C am Rotationsverdampfer einengen und den Rückstand mit Isopropanol in einen 50 ml-Messkolben überführen. Bei 20-25°C Kolben mit Isopropanol bis zur Marke auffüllen, mischen und die Lösung durch Faltenfilter filtrieren. Klare Lösung zum Test einsetzen.

Berechnung:

Steringehalt von Milchfett in [mg/100 g], berechnet als Cholesterin

$$= \text{Steringehalt der Probelösung [g/l]} \times \frac{100 \times 50}{m}$$

m = Einwaage der Probe in Gramm.

13. Weitere Anwendungsmöglichkeiten

Die Methode ist auch bei der Untersuchung von Kosmetika anwendbar. Zur Bestimmung von Cholesterin in "Ei"-Shampoos siehe König, H. & Walldorf, E. (1979) Fresenius Z. Anal. Chem. **299**, 1-18; zur Bestimmung von Cholesterin in kosmetischen Erzeugnissen, die mit Wollwachs und Wollwachsalkoholen hergestellt sind, siehe Orlick, B. & Montag, A. (1982) Mitt. Lebensm. Chemie u. Gerichtl. Chemie **36**, 30-31.

Literatur

- 1.1 Röschlau, P., Bernl, E. & Gruber, W. (1974) Enzymatische Bestimmung des Gesamt-Cholesterins im Serum, Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. **12**, 403-407
- 1.2 Kageyama, N. (1971), Clinica Chimica Acta **31**, 421-426
- 1.3 Beutler, H.-O., Michal, G. (1976) Eine Eigehaltsbestimmung für die Routineanalytik: Enzymatische Bestimmung von Cholesterin, Getreide Mehl Brot **30**, 116-118
- 1.4 Wortberg, B. (1975) Zur Spezifität der Cholesterinoxidase für die enzymatische Cholesterinbestimmung, Z. Lebensm. Unters.-Forsch. **157**, 333-338
- 2.1 International Union of Pure and Applied Chemistry, Applied Chemistry Division, Commission on Oils, Fats and Derivatives: Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats, and Derivatives, 7th Revised and Enlarged Edition (1987) Determination of the total sterols content, vorbereitet für die Publikation von Paquot, C. & Hautfenne, A., Seiten 170-179; Blackwell Scientific Publications Oxford London Edinburgh Boston Palo Alto Melbourne
- 2.2 Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64. LFGB; Untersuchung von Lebensmitteln: Bestimmung des Cholesteringehaltes in Eiern und Eiprodukten, 05.00-17 (Dezember 1992)
- 2.3 Schweizer. Lebensmittelbuch, Kapitel 32 (Spirituosen)/11: Bestimmung des Eigehaltes, enzymatisch; Kapitel 22 (Diätetische Lebensmittel und Speziallebensmittel), Provisorische Methode der Subkommission 5 (1990)
- 3.1 Acker, L., Greve, H. (1964) Untersuchungen über Sterine in Eierteigwaren und ihre quantitative Bestimmung (I. Die gravimetrische Bestimmung der Sterine), Z. Lebensm. Unters. Forsch. **124**, 257-265
- 3.2 Bundesgesundheitsblatt (1962) **5**, 223
- 3.3 Pardun, H. (1969) Analyse der Fette und Fettbegleitstoffe im Handbuch der Lebensmittelchemie IV, S. 777, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York
- 3.4 Official Methods of Analysis of AOAC, 11th ed. Washington (1970) pp. 176-177
- 3.5 Dresselhaus, M., Acker, L. (1974) Zur Bestimmung des Eigehaltes in Eierteigwaren - Überprüfung der Methodik, Getreide Mehl Brot **28**, 137-142
- 3.6 Dresselhaus, M., Acker, L. (1974) Zur Methodik der Bestimmung des Eigehaltes in Eierteigwaren, Mitteilungsblatt GDCh-Fachgruppe Lebensmittelchemie u. gerichtl. Chemie **28**, 355-367
- 3.7 Wenker, K., Herrmann, H. (1975) Zusammensetzung von Hühnereiern des Handels, Mitteilungsblatt GDCh-Fachgruppe Lebensmittelchemie u. gerichtl. Chemie **29**, 253-257
- 3.8 Grossmann, A., Timmen, H., Klostermeyer, H. (1976) Die enzymatische Bestimmung von Cholesterin in Milchlaktose - eine Alternative zu den bisher gebräuchlichen Methoden, Milchwissenschaft **31**, 721-724
- 3.9 Shen, Ch.S.J., Chen, I.S. & Sheppard, A.J. (1982) Enzymatic determination of cholesterol in egg yolk, J. Assoc. Off. Anal. Chem. **65**, 1222-1224
- 3.10 Karkalas, J., Donald, A.E. & Clegg, K.M. (1982) Cholesterol content of poultry meat and cheese determined by enzymatic and gas-liquid chromatography methods, J. Food Technol. **17**, 281-283
- 3.11 Belitz, H.-D. & Grosch, W. (1992) Lehrbuch der Lebensmittelchemie, 4. Auflage, Seite 210, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo Hong Kong Barcelona Budapest
- 3.12 Littmann-Nienstedt, S. (1993) Auswertung des Ringversuches der § 35-Arbeitsgruppe "Ei-Analytik" zur Bestimmung von Cholesterin in Eiprodukten, Deutsche Lebensmittel-Rundschau **89**, 283-285
- 3.13 Lückner, E. & Bülte, M. (1997) Verfahren zum Nachweis von im Hinblick auf die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) unerwünschten Zutaten in Fleisch-Erzeugnissen, 1. Enzymatische Cholesterinbestimmung als Schnellverfahren zur Erfassung von Hirngewebe, Fleischwirtschaft **77**, 836-840

Cholesterin-Testkontroll-Lösung (Flasche 5)

Konzentration: 1,00 mg Cholesterin/ml

Cholesterin-Testkontroll-Lösung ist eine Lösung von Cholesterin in Isopropanol. Sie dient als Testkontroll-Lösung für die enzymatische Bestimmung von Cholesterin in Lebensmitteln und anderen Probematerialien.

Anwendung:

1. Zusatz der Cholesterin-Testkontroll-Lösung zum Testansatz:

Anstelle der im Pipettierschema angegebenen Probelösung werden in das Reagenzglas pipettiert:

Testkontroll-Lösung: 0,100 ml
Isopropanol: 0,300 ml

Dies entspricht einer verdünnten Testkontroll-Lösung mit einer Konzentration von 0,25 mg Cholesterin/ml. Im Testansatz selbst sind 100 µg Cholesterin aus der Testkontroll-Lösung enthalten

2. Zusatz der Cholesterin-Testkontroll-Lösung zur Probe vor Verseifung der Cholesterinester:

Der mit *frisch hergestellter* methanolischer Kalilauge (1 M) versetzten Probe werden vor Verseifung der Cholesterinester 5,0 ml Testkontroll-Lösung hinzugefügt. Die Verseifung erfolgt in üblicher Weise durch Erhitzen am Rückflusskühler, wie sie in der Arbeitsvorschrift unter "Hinweise zur Vorbereitung der Probe" angegeben ist. Von der auf 25 ml aufgefüllten Lösung (nach Verseifung) werden 0,400 ml zum Test eingesetzt. Der Test enthält 80 µg Cholesterin aus der zugesetzten Testkontroll-Lösung.

Qualität des Standards:

Das in der Testkontroll-Lösung eingesetzte Cholesterin wurde gegen das *Standard Reference Material 911b* des National Bureau of Standards, Washington D.C., USA, geprüft.



R-BIOPHARM AG
An der neuen Bergstraße 17
64297 Darmstadt/Germany
Telefon + 49 61 51 / 81 02-0
Fax + 49 61 51 / 81 02-20
www.r-biopharm.com

