

Afd. Koolhydraat- en Vetchemie
RAPPORT 83.49 1983-06-20
Pr.nr. 505.3000
Onderwerp: Enzymatische sterolbepaling.

Tabellen: 3
Bijlagen: 4

Verzendlijst: directeur, sektorhoofd (2x), direktie VKA, afd.
Koolhydraat- en Vetchemie (4x), afd. Normalisatie
(Humme), Projektbeheer, Projektleider (Muuse).

RAPPORT 83.49

Pr.nr. 505.3000

Projekt: Ontwikkeling en verbetering van onderzoekmethoden voor oliën, vetten, vette produkten en oliezaden

Onderwerp: Enzymatische sterolbepaling

Tabellen: 5

Bijlage(n): 4

Doel:

Momenteel wordt het sterolgehalte gravimetrisch bepaald met behulp van Digitonine (NEN 6350).

Internationaal (IUPAC) wil men deze methode vervangen door een enzymatische methode omdat deze vooral geschikt is voor kleine hoeveelheden monster.

In dit onderzoek werd nagegaan of deze methode in onze praktijk geschikt is.

Samenvatting:

De enzymatische bepalingen werden uitgevoerd met behulp van de cholesterol enzymkit van Boehringer. Vergelijken werden de sterolgehalten verkregen met de digitonine en met de enzymatische methode in een aantal produkten (botervetten, margarines en halvarines).

Conclusie:

Door de Boehringer methode een weinig aan te passen is deze geschikt voor een enzymatische sterolbepaling in botervet. Enzymatisch wordt gemiddeld \pm 0,011% lager gevonden dan met de digitonine methode.

Met een nog verder gewijzigde Boehringer methode werden voor margarines en halvarines bij de meeste monsters goed overeenstemmende gehalten gevonden t.o.v. digitonine, bij enkele niet. Deze methode is nog niet geschikt voor routinematische enzymatische sterolbepaling in margarine en halvarine. Er zal nog verder onderzoek verricht moeten worden.

De IUPAC methode geeft voor plantaardige sterolen te lage waarden.

Verantwoordelijk: drs B.G. Muuse

Medewerker(s)/Samensteller(s): M.L. Essers, L.M.H. Frijns

Projektleider: drs B.G. Muuse

INHOUD

I Inleiding

II Enzymatische sterolbepaling m.b.v. cholesterolkit van Boehringer

III Vergelijking enzymatische methode - digitonine methode (1)

IV Ruggedness test

V Vergelijking enzymatische methode - digitonine methode (2)

VI Conclusie.

Overzicht bijlagen en tabellen.

Bijlagen:

I Bepaling sterolgehalte NEN 6350

II Cholesterolbepaling. Boehringer methode.

III Ringtest IUPAC (Doc. 370 02/82/92)

IV Ruggedness test.

Tabellen:

I Vergelijking gewijzigde enzymatische sterolbepaling I met de digitonine methode in monsters botervetten

II Vergelijking gewijzigde enzymatische sterolbepaling I met de digitonine methode in monsters margarine en halvarine

III Resultaten Ruggedness test

IV Vergelijking gewijzigde enzymatische sterolbepaling II met de digitonine methode in monsters botervetten

V Vergelijking gewijzigde enzymatische sterolbepaling II met de digitonine methode in monsters margarine en halvarine

I Inleiding

Momenteel wordt voor de bepaling van sterolgehalten de digitonine methode volgens NEN 6350 gebruikt (bijlage I).

Dit is een gravimetrische bepaling waarbij de sterolen, verkregen na verzeping van het vet, worden neergeslagen met digitonine. Na affiltreren van het neerslag kan het gehalte aan sterolen bepaald worden. Tevens biedt deze methode de mogelijkheid om het zo verkregen sterol-digitonine neerslag na oplossen in een geschikt oplosmiddel te gebruiken voor de sterol samenstelling door middel van gaschromatografie. Deze bepalingsmethode heeft als nadeel dat men veel vet uit een monster nodig heeft nl. 15 gram. Volgens voorschrift mag het verschil tussen een duplo niet meer dan 0,05% absoluut bedragen. In de praktijk kan echter een herhaalbaarheid van < 0,02% absoluut bereikt worden.

Internationaal wil men overgaan tot de bepaling van sterolgehalte met behulp van enzymen (IUPAC bijlage III). Het voordeel van deze bepaling is de kleinere benodigde hoeveelheid vet (1-4 gram). Deze enzymatische methode, op basis van de cholesterol enzymkit van Boehringer, heeft echter de volgende bezwaren:

- de enzymatische bepaling van sterolen geeft geen inzicht in de sterolsamenstelling
- de enzymspecificiteit is niet voor alle sterolen hetzelfde. De methode is met name specifiek voor cholesterol en bepaalt daarnaast ook fytoosterolen echter met een geringere affiniteit
- daar in de berekeningsformule de molmassa van het te bepalen sterol moet worden ingevuld zal naast de enzymatische bepaling altijd een sterolsamenstelling via gaschromatografie uitgevoerd moeten worden om een juist sterolgehalte te verkrijgen ofwel moet een bepaalde molmassa worden aangenomen.

In dit onderzoek werd de juistheid van deze enzymatische methode getoetst aan de hand van monsters die ook onderzocht werden op sterolgehalte met behulp van digitonine en op sterolsamenstelling met behulp van gaschromatografie.

II Enzymatische sterolbepaling m.b.v. cholesterolkit van Boehringer.

Deze methode (zie bijlage II) bepaalt naast cholesterol ook andere sterolen waarvan de hydroxylgroep aan het derde C-atoom zich in de β positie bevindt (behalve lanosterol).

Hierdoor worden bij deze methode ook fytosterolen, zoals stigmasterol en sitosterol, meebepaald en is dus ook toepasbaar op plantaardige oliën en vetten.

De bepalingen werden uitgevoerd volgens het voorschrift voor varkensvet (zie bijlage II). Dit voorschrift komt het meest overeen met het IUPAC voorschrift. Een cholesterol standaard werd voor 96,8% terugvonden, een stigmasterol standaard echter maar voor \pm 43%. De methode werd nu getest op twee plantaardige oliën (soya en zonnebloem) en een boterconcentraat waaraan fytosterolen waren toegevoegd. De recovery's waren voor de plantaardige olien \pm 50% en voor boterconcentraat \pm 80% ten opzichte van de digitonine methode.

Bij de ringtest van IUPAC Doc. nr. 370 02/82/92 (zie bijlage III) werd ook al geconstateerd dat een dierlijk vet goed overeenkwam met de digitonine methode en dat bij een plantaardige olie slechts \pm 65% van de digitonine waarde werd gevonden, waarbij de spreiding tussen de verschillende laboratoria bovendien groot was.

Naar aanleiding van de slechte resultaten bij de plantaardige monsters werden de volgende wijzigingen, na overleg met Boehringer, t.o.v. het voorschrift ingevoerd en uitgetest op boterconcentraat, soyaolie, palmolie en raapolie.

Boehringer voorschrift	wijzigingen
5 ml oplossing 4	eerst 0,1, 0,2 of 0,4 ml
+ 0,4 cc monsteroplossing (max. 0,4 g sterol/L)	monster indien nodig aangevuld tot 0,4 ml met isopropanol, dan 5 ml oplossing 4.
goed mixen	mixer: 15 sec. + ultra sonic, 15, 30, 60, 90 sec.
incubatie 60 min	incubatie 60, 75, 90, 105 en 120 min.

Resultaat:

De beste resultaten ten opzichte van digitonine werden verkregen met een monstervolume van 0,1 ml (0,05-0,10 gr sterol/L) 90 sec mixen van oplossing 4 + monster, en een incubatie tijd van 90 min. De recovery's ten opzichte van digitonine waren nu rekening houdend met hun sterolsamenstelling: boterconcentraat 95%, plantaardige olie 83-90%.

Naar aanleiding hiervan werd besloten de volgende wijzigingen in het Boehringer voorschrift toe te passen:

Boehringer	wijzigingen I
5 ml oplossing 4 +	0,1 ml monster
0,4 ml monsteroplossing (max. 0,4 gr sterol/L)	(max. 0,4 gr sterol/L) + 0,3 ml isopropanol + 5 ml oplossing 4.
incubatie 60 min	incubatie 60 en 90 min. (eventueel 120 min).

Van een standaard fytosterol (\pm 90-95% zuiver sterol, waarvan \pm 95% sito en \pm 5% andere fytosterolen) werd met deze aanpassing 95% van de gezochte waarde teruggevonden.

Met de aangepaste methode werd enzymatisch het sterolgehalte bepaald in verschillende soorten monsters, te weten botervetten, margarines en halvarines (hoofdstuk III).

III Vergelijking gewijzigde enzymatische methode I - digitonine methode

Botervetten:

Daar in het voorschrift van Boehringer ook een voorbewerking vermeld staat voor botervet (zie bijlage II) werd deze methode vergeleken met de methode voor varkensvet (IUPAC).

De sterolgehalten van een monster botervet waren met de varkensvetmethode 0,268% en 0,250% en met de botervetmethode 0,275% en 0,273%. Daar volgens de botervetmethode de beste resultaten t.o.v. digitonine werden verkregen werd een serie botervetten enzymatisch volgens deze methode vergeleken met digitonine (zie tabel I).

Enzymatisch werd gemiddeld 0,011% lager gevonden dan met de digitonine methode.

Margarine/halvarine:

Er werden 8 monsters onderzocht waarvan de samenstelling bestond uit plantaardige oliën of plantaardige + dierlijke oliën (zie tabel II). De enzymatische methode gaf daarbij ca. 0,04% lagere gehalten dan de digitonine methode.

Bespreking resultaten:

Daar de resultaten bij de monsters die fytosterolen bevatten nog steeds niet overeenkwamen met de digitonine methode werd besloten een Ruggedness test uit te voeren om na te gaan welke factor de grootste invloed op het resultaat heeft. Daarbij werd voor het mixen van oplossing 4 en monster een emulgator toegevoegd (Tween 20) daar het vermoeden bestond dat het probleem van de slecht vergelijkbare cijfers veroorzaakt werd door het slecht mengen van de olie in de waterfase (buffer).

IV Ruggedness test.

De test werd uitgevoerd op soya-olie volgens het schema vermeld in bijlage IV.

De volgende varianten werden ingevoerd:

A 25 min. verzepen op waterbad 80°C

a 25 min. verzepen op kokend waterbad.

B 0,1 cc monstervolume

b 0,4 cc monstervolume.

C Oplossing 4 + monster

c monster + oplossing 4.

D Zonder tween 20 0,1 cc

d met tween 20 0,1 cc.

E Oplossing 4 + monster 90 sec mixen

e oplossing 4 + monster 30 sec mixen.

F1 60 min. incubatie

f1 90 min. incubatie.

F2 120 min incubatie

f2 150 min incubatie.

Conclusies uit Ruggedness test.

De resultaten van de Ruggedness test staan vermeld in tabel III.

Uit de verschillen kan geconcludeerd worden welke factoren een grote invloed op het analyseresultaat hebben.

De factoren zijn (met afnemende invloed op het analyseresultaat):

- monstervolume 0,1 cc i.p.v. 0,4 cc
- incubatietijd
- wel of geen Tween toevoeging
- verzepen op waterbad 80°C of op waterbad 100°C.

Naar aanleiding van deze resultaten werd nogmaals een vergelijkend onderzoek (hoofdstuk V) verricht met de volgende wijzigingen II:

- 0,2 cc monstervolume
- incubatietijd 60 en 90 min
- 0,1 cc Tween 20
- 2x 20 µl enzym.

De hoeveelheid monstervolume is verdubbeld om een grotere aflezing op de spectrometert te verkrijgen. (De hoeveelheid enzym is daarbij aangepast)

Daar de verzeping (waterbad 80°C of 100°C) een kleine invloed op het analyseresultaat had werd besloten om te verzepen op een waterbad bij 80°C.

V Vergelijking gewijzigde enzymatische methode II - digitonine methode
Enkele van de onderzochte monsters in hoofdstuk III werden met de na de Ruggedness test aangepaste methode nogmaals onderzocht.

Botervetten:

Er werden vier monsters onderzocht. De resultaten staan vermeld in tabel IV. Bij deze monsters werd een lager gehalte gevonden dan bij de resultaten vermeld in tabel I (0,02-0,04 lager). Bij één monster werd nagenoeg hetzelfde gevonden (\pm 0,002).

Margarine/halvarine:

Er werden acht monsters onderzocht. De resultaten staan vermeld in tabel V. Ten opzichte van de resultaten in tabel II werden nu bij 7 monsters hogere gehalten gevonden. Vijf van de acht enzymatische gehalten kwamen goed overeen met de digitonine methode (verschil kleiner dan 0,01%). Twee waren enzymatisch lager (0,02% en 0,07%) en een monster \pm 0,03% hoger dan de digitonine methode.

Bespreking resultaten:

De enzymatische sterolbepaling in botervet met deze gewijzigde methode II (hoofdstuk IV blz. 5) geeft over het algemeen lagere gehalten dan met de methode vermeld in hoofdstuk II blz. 3 (gewijzigde methode I). Bij margarine/halvarine daarentegen is duidelijk een verbetering met deze gewijzigde methode II te constateren.

VI Conclusie.

- De enzymatische sterolbepaling in botervetten kan het best uitgevoerd worden met de gewijzigde methode I van Boehringer (zie hoofdstuk II blz. 3). Enzymatisch wordt dan gemiddeld 0,011% lager gevonden.
- Bij margarine/halvarine kan gebruik gemaakt worden van de gewijzigde methode II vermeld in hoofdstuk IV blz. 5. Daar niet bij alle monsters de gehalten overeenkwamen met de digitonine waarde, mag nog niet gesteld worden dat deze methode geschikt is als onderzoeksmethode voor plantaardige sterolen.
Er zal daartoe nog verder onderzoek verricht moeten worden.
- De IUPAC methode geeft voor plantaardige sterolen onjuiste, te lage waarden.

Tabel I

Vergelijking gewijzigde enzymatische sterolbepaling I met de digitonine methode in monsters botervetten.

RIKILTnr.	% sterol berekend als cholesterol		
	enzymatisch na 90 min incubatie		digitonine
22007	0,267	0,279	0,269
22008	0,272	0,283	
22009	0,270	0,280	0,291 0,287
22010	0,269	0,269	0,277
22011	0,273	0,268	0,282
22012	0,295	0,287	0,303
22013	0,290	0,285	0,303
22014	0,285	0,278	0,295 0,300
22015	0,279	0,275	0,285
22016	0,288	0,292	0,294 0,299
22017	0,247	0,250	0,235 0,261
22018	0,191	0,186	0,194
22019	0,252	0,248	0,270 0,271
22020	0,215	0,211	0,222
22021	0,236	0,236	0,243

Met de enzymatische methode werd gemiddeld 0,011% lager gevonden dan met de digitonine methode.

Enzymatische methode:

$$\Delta \bar{x} = 0,005$$

$$S_{\Delta} = 0,0036 \text{ afronden } 0,001$$

$$P = 0,0072$$

Tabel II

Vergelijking gewijzigde enzymatische sterolbepaling I met de digitonine methode
in monsters margarine en halvarine

RIKILnr.	Declaratie ¹	enzymatisch				digitonine methode	
		% sterol na incubatie (min)	60 ²	90 ²	120 ²		
25759	P1		0,262	0,285	0,297	0,315	0,355
25760	P1 + D		0,374	0,393	0,402	0,416	0,458
26011	P1		0,207	0,228	0,237	0,246	0,278
26012	P1 + D		0,284	0,305	0,311	0,324	0,349
26013	P1		0,207	0,232	0,247	0,262	0,277
26014	P1		0,212	0,235	0,241	0,256	0,289
26313	P1 + D		0,495	0,530	0,540	0,568	0,521
26315	P1		0,301	0,352	0,362	0,386	0,466

1 P1 = plantaardige oliën

D = dierlijke oliën

2 Berekend als cholesterol

3 Berekend met gemiddelde molmassa via de sterolsamenstelling

Bij de plantaardige margarines/halvarines werd gemiddeld 0,040% lager gevonden dan met de digitonine methode. Bij de plantaardige + dierlijke margarine was dit 0,034% terwijl bij één monster 0,047% hoger werd gevonden.

Tabel III

Resultaten Ruggedness test.

Bij deze ruggedness test werden voor de incubatie tijd twee varianten ingevoerd.

F1 60 min variant 90 min (f1)

F2 120 min variant 150 min (f2).

Hierdoor was het mogelijk om in één ruggedness test 4 incubatietijden te verwerken (60-90-120-150 min).

Resultaat

Analysenummer	% sterol	
	F1 en f1	F2 en f2
1	0,292	0,335
2	0,323	0,346
3	0,313	0,345
4	0,260	0,323
5	0,297	0,340
6	0,319	0,330
7	0,261	0,287
8	0,216	0,296

Uit de verkregen analysecijfers kan nu bekijken worden welke factor(en) de grootste invloed heeft op het analyseresultaat ($\Delta a = A - a$ enz.)

incubatietijd

	F1 variant f1	F2 variant f2
Δa	+ 0,024	+ 0,024
Δb	+ 0,045	+ 0,025
Δc	+ 0,011	+ 0,003
Δd	- 0,024	- 0,019
Δe	0,000	0,003
Δf	- 0,038	- 0,003

Tabel IV

Vergelijking gewijzigde enzymatische sterolbepaling II met digitonine methode in monsters botervetten.

RIKILTnr.	% sterol berekend als cholesterol		
	enzymatisch na 90 min incubatie	B	digitonine
	A		
22007	0,239	0,235	0,280
22010	0,275	0,271	0,277
22014	0,252	0,248	0,295 0,300
22019	0,236	0,232	0,270 0,271

A = zelfde berekeningswijze als in tabel I

B = daar nu 2x20 µl enzym gebruikt werd in plaats van 1x20 µl enzym is van het percentage vermeld in kolom A de blanco enzym in mindering gebracht

Gemiddeld werd nu enzymatisch 0,033% lager gevonden dan met de digitonine methode.

Ten opzichte van vergelijkingsonderzoek vermeld in tabel I werd voor drie monsters een lager gehalte gevonden (0,020%-0,040% lager). Voor een monster nagenoeg hetzelfde (+ 0,002%).

Tabel V

Vergelijking gewijzigde enzymatische sterolbepaling II met de digitonine methode in monsters margarine en halvarine.

RIKILTnr.	Declaratie ¹	enzymatisch			digitonine	
		% sterol na incubatie (min)	60 ²	90 ²	90 ³	methode
25759	P1	0,307	0,316	0,336	0,355	
25760	P1 + D	0,446	0,450	0,467	0,458	
26011	P1	0,245	0,255	0,270	0,278	
26012	P1 + D	0,333	0,338	0,353	0,349	
26013	P1	0,247	0,259	0,275	0,277	
26014	P1	0,252	0,264	0,280	0,289	
26313	P1 + D	0,529	0,541	0,569	0,554	0,521
26315	P1	0,341	0,358	0,381	0,441	0,466

1 P1 = plantaardige oliën

D = dierlijke oliën

2 Berekend als cholesterol en gecorrigeerd voor 2x20 µl enzym

3 Berekend met gemiddelde molmassa via de sterolsamenstelling

De enzymatische methode kwam bij vijf monsters goed overeen met de digitonine methode (verschil < 0,010%).

Bij twee monsters werd enzymatisch 0,02% en 0,07% lager gevonden en bij een monster ± 0,03% hoger.

Onderzoeksmethoden voor plantaardige en dierlijke
oliën en vetten

Bepaling van het totaal-sterolgehalte

Test methods for vegetable and animals oils and fats - Determination of the total sterol content

1e druk, juni 1977

1 Onderwerp

Deze norm beschrijft een methode voor de gravimetrische bepaling van het totaal-sterolgehalte.

2 Toepassingsgebied

De norm is van toepassing bij het onderzoek van plantaardige en dierlijke vetten.

3 Definitie

totaal-sterolgehalte: Het massapercentage bestanddelen dat volgens de beschreven werkwijze als digitoniden kan worden geprecipiteerd.

4 Beginsel

Het sterolgehalte wordt gravimetrisch bepaald na verzeping van een hoeveelheid vet en precipitatie van de sterolen als steroldigitoniden.

5 Reagentia

Kaliumhydroxide-oplossing, ca. 40% (*m/m*).

Digitonienoplossing

Los 10 g digitonien ($C_{56}H_{92}O_{29}$) op in 1 l ethanol ca. 96% (*V/V*).

Waarschuwing:

Digitonide en zijn verbindingen zijn zeer giftig.

Ethanol ca. 96% (*V/V*).

Ethanol-wateroplossing

Meng 2 volumedelen ethanol ca. 96% (*V/V*) met 1 volumedeel water.

Diëthylether.

6 Toestellen, glaswerk en hulpmiddelen

Gebruikelijk laboratoriumglaswerk en hulpmiddelen en in het bijzonder:

Conische kolf van 500 ml, door middel van een slijpstuk verbonden met een koeler.

Kokend-waterbad

Filterkroes

Droogstoof, ingesteld op een temperatuur van 103 ± 2 °C.

Weegflesje.

7 Monsterneming

Zie NEN 6301.

8 Voorbehandeling van het monster

Indien het monster bij kamertemperatuur niet geheel gesmolten is, verwarm het dan tot maximaal 10 °C boven de temperatuur waarbij dit wél het geval is. Wanneer het monster in vloeibare toestand niet helder is, filtreer het dan door een kwalitatief, normaal filterend, papierfilter, zo nodig onder toevoeging van watervrij natriumsulfaat, er zorg voor dragend dat tijdens deze behandeling geen stolling optreedt.

9 Werkwijze

Weeg ca. 15 g van het monster op 100 mg nauwkeurig af in een conische kolf. Voeg 10 ml kaliumhydroxide-oplossing en 20 ml ethanol toe.

Plaats de luchtkoeler op de conische kolf en verwarm op het waterbad onder rondzwengelen totdat het mengsel helder is geworden. Kook vervolgens nog gedurende een half uur.

Voeg achtereenvolgens ca. 60 ml water en ca. 180 ml ethanol toe en verwarm tot ca. 40 °C. Dit mengsel dient volkomen helder te zijn. Voeg 30 ml van de alcoholische digitonienoplossing toe, zwenk rond en laat afkoelen. Laat de kolf gedurende 12 tot 16 uur staan bij een temperatuur van ca. 5 °C. Breng de kolf weer op kamertemperatuur.

Opmerking

Indien het totaal-sterolgehalte hoger is dan 0,45% (m/m), herhaal dan de bepaling met een kleinere hoeveelheid monster en pas de reagentia voor de verzeping dienovereenkomstig aan.

Verzamel het neergeslagen steroldigitonide op het ronde filter door afzuigen op de filterkroes.

Opmerking

De kroes kan worden gereinigd met dimethylformamide.

Was het neerslag driemaal met telkens 25 ml van de ethanol-wateroplossing en daarna achtereenvolgens eenmaal met 15 ml ethanol en eenmaal met 15 ml diëthylether. Droog, nadat de diëthylether verdampft is, de filterkroes met het neerslag in de droogstoof gedurende 10 tot 15 minuten.

Laat de filterkroes afkoelen en weeg op 1 mg nauwkeurig.

10 Berekening

Bereken het totaal-sterolgehalte met behulp van de formule:

$$S = 25 \frac{m_1}{m_0}$$

waarin:

S is het totaal-sterolgehalte, in% (m/m);

m_1 is de hoeveelheid steroldigitonide, in g;

m_0 is de inweeg, in g.

Rond de uitkomst af tot op 0,01% (m/m).

11 Herhaalbaarheid

Het verschil tussen de uitkomsten van een bepaling in duplo, gelijktijdig of kort na elkaar door dezelfde persoon verkregen, mag niet meer bedragen dan 0,05% absoluut.

12 Verslag

Vermeld in het verslag:

- a. het totaal-sterolgehalte als gemiddelde van twee bepaling tot op 0,01% (m/m);
- b. de gevolgde methode door de vermelding: volgens NEN 6350.

Titel van de vermelde norm

NEN 6301 — Plantaardige, dierlijke en synthetische oliën en vetten en daarvan afgeleide produkten. Monsterneming.

Normcommissie 370 02 "Plantaardige en dierlijke oliën en vetten"

Niets uit deze norm mag worden verveelvoudigd en/of openbaar gemaakt door middel van druk, fotocopie, microfilm of op welke wijze ook, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van het NNI.

Nederlands Normalisatie-instituut

Polakweg 5, Rijswijk (ZH), telefoon (070) 90 68 00*, telex 32123, postrekening 25301

Cholesterol

Colorimetric method

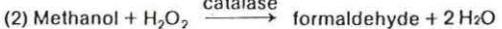
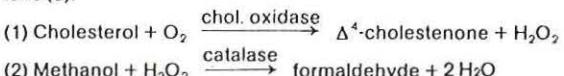
for the determination of cholesterol in foodstuffs

Cat. No. 139050

Test-Combination
for 25 determinations

Principle

Cholesterol is oxidized by cholesterol oxidase to cholestenone (1). In the presence of catalase, the hydrogen peroxide produced in this reaction oxidizes methanol to formaldehyde (2). The latter reacts with acetylacetone forming a yellow lutidine dye in the presence of NH_4^+ ions (3).



(3) Formaldehyde + NH_4^+ + 2 acetylacetone \longrightarrow Lutidine + 3 H_2O
The concentration of the lutidine dye formed is stoichiometric with the amount of cholesterol and is measured by the increase of absorbance in the visible range at 405 nm.

Each Test-Combination Contains

1. Bottle 1 with ca. 95 ml of solution, consisting of:
ammonium phosphate buffer - 0.8 mol/l, pH 7.0

methanol - 2.6 mol/l

catalase - 220.000 U

2. Bottle 2 with 60 ml of solution, consisting of:

acetylacetone - 0.05 mol/l

methanol - 0.3 mol/l

stabilizers

3. Bottle 3 with 0.8 ml of suspension, consisting of:
cholesterol oxidase - 12 U

Preparation of Solutions

Cholesterol reagent mixture ("solution 4" in the assay):

Mix 3 parts of the solution from bottle 1 with 2 parts of the solution from bottle 2 adjusted to room temperature (use brown bottle!).

Use contents of bottle 3 undiluted ("solution 3" in the assay).

Stability of Solutions

The contents of bottles 1, 2, and 3 are stable for at least 1 year when stored at +4°C.

Solution 4 is stable for at least 3 months when stored in a brown bottle at +4°C. Development of a slight yellow colour does not interfere in the test.

Procedure

Wavelength: Hg 405 nm

Glass cuvette¹: 1 cm light path

Incubation temperature: 37–40°C

Read against the sample blank.

Sample solution: 8–160 µg cholesterol/cuvette²

Pipette into test tubes	sample blank	sample
solution 4 sample solution	5.00 ml 0.40 ml	- -
mix contents of test tube thoroughly.		
pipette off from the test tube containing the sample blank ³ solution 3	- -	2.50 ml 0.02 ml
mix thoroughly, cover test tubes containing the sample blank and the sample ⁴ , and incubate in a water bath at 37–40°C for 60 min. Allow to cool to room temperature. Read absorbance of the sample against the sample blank to obtain ΔA_{sample} ⁵ .		

Calculations

According to the general formula for calculating the concentration, the equation is:

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



food analysis
boehringer mannheim

where V = final volume [ml]

v = sample volume [ml]

MW = molecular weight of the substance to be assayed

d = light path [cm]

ϵ = absorption coefficient of the lutidine dye at Hg 405 nm
 $= 7.4 [\text{l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}]$

Considering the dilution carried out in the test mixture (dilution factor 2.52 = 1.008), it follows that the sterol content, calculated as cholesterol, is

$$c = \frac{386.64 \times 5.4 \times 1.008}{7.4 \times 1 \times 0.4 \times 1000} \times \Delta A = 0.711 \times \Delta A$$

[g cholesterol/l sample solution]

If a further dilution has been made when preparing the sample, the results must be multiplied by the dilution factor F.

Further Instructions

1. Performance of Assay

The cholesterol content in the test tube should range between 8 µg and 160 µg. The sample solution must therefore be diluted with a sufficient quantity of isopropanol in order to obtain a cholesterol concentration between 0.02 and 0.4 g/l.

Dilution Table

estimated amount of cholesterol per litre	dilution with isopropanol	dilution factor F
< 0.4 g	-	1
0.4– 4.0 g	1 + 9	10
4.0–40.0 g	1 + 99	100

2. Preparation of Sample

Determination of Cholesterol in Noodles

Accurately weigh approx. 2 g of noodles which have been ground in a powder mill and quantitatively passed through a sieve, (corn-size: max. 0.3 mm) into a 50 ml round-bottomed flask. Add 1 g of sea-sand and heat for 25 min with 10 ml of a freshly prepared methanolic potassium hydroxide solution (0.5 mol/l) under a reflux condenser while stirring (magnetic stirrer).

Transfer the supernatant solution into a 25 ml volumetric flask with a pipette. Boil the residue twice with portions of 6 ml isopropanol each, under a reflux condenser for 5 min.

Collect the solutions in the volumetric flask, allow to cool to room temperature, dilute to the mark with isopropanol, and mix.

Filter turbid solutions through a fluted filter paper. The clear solution is used for the assay.

Calculations:

Sterol content, calculated as cholesterol in 100 g of noodles [mg/100 g]

$$= \text{sterol content of the sample solution [g/l]} \times \frac{100 \times 25}{E [\text{g}]}$$

where E [g] = weight of the sample in grams.

When calculating the egg content from the sterol concentration in the sample of noodles, it is necessary to take into account the average phytosterol content of the egg-free sample. The results obtained according to the present method correspond well with the results of the method of Acker and Greve⁶.

In case of an acid pretreatment (AOAC method no. 14141⁷) a sterol content, which is elevated by 10 mg sterol (calculated as cholesterol) per 100 g noodles dry weight is obtained, as has been found by Dresselhaus and Acker^{6, 9}. This is caused by hydrolysis of phytosterol glycosides.

¹ If desired, disposable cuvettes may be used instead of glass cuvettes.

² See instructions for performance of the test and sample preparation.

³ The residue left in the pipette is returned to the test tube.

⁴ e.g. by Parafilm®

⁵ Use a pair of cuvettes with the same absorption or simply use the same cuvette (flow-through cuvette, too). Put the cuvette in the same direction into the photometer, avoid scratching of the cuvettes between A_1 and A_2 .

Recently it has been reported, that the average cholesterol content of eggs, as determined with the digitonid method is lower as formerly found (instead of 2.93% only 2.55%^{8,9} or 2.45%, respectively¹⁰, corresponding to about 190–200 mg cholesterol/16 g egg yolk).

In case the table given in^{8,9} is used for calculation of the egg content of durum noodles, due to the different method of pretreatment 10 mg sterol/100 mg noodles dry weight have to be added.

Determination of Cholesterol in Mayonnaise and Remoulade

Accurately weigh approx. 1 g of mayonnaise or remoulade and 1 g of sea-sand into a 50 ml round-bottomed flask. Add 10 ml of a freshly prepared methanolic potassium hydroxide solution (ca. 0.5 mol/l) and heat under a reflux condenser for 25 min while stirring (magnetic stirrer). Transfer the supernatant solution into a 25-ml volumetric flask with a pipette. Boil the residue twice with portions of 6 ml isopropanol each under a reflux condenser for 5 min. Collect the solutions in the volumetric flask, allow to cool down. Dilute contents of the volumetric flask up to the mark with isopropanol and mix. Filter turbid solutions through a fluted filter paper. The clear solution is used for the assay.

Calculations:

Sterol content of the mayonnaise [mg/100 g], calculated as cholesterol

$$= \text{sterol content of the sample solution [g/l]} \times \frac{100 \times 25}{E \text{ [g]}}$$

where E [g] = weight of the sample in grams.

To determine the content of egg yolk in the mayonnaise (remoulade) from the sterol content of the sample, it is necessary to take into account the average phytosterol content of the vegetable fats contained therein¹¹.

Determination of Cholesterol in Egg Liqueur

Accurately weigh approx. 1 g of egg liqueur into a 50 ml round-bottomed flask. Add 1 g of sea-sand and heat for 25 min with 10 ml of a freshly prepared methanolic potassium hydroxide solution (ca. 0.5 mol/l) under a reflux condenser while stirring (magnetic stirrer). Transfer the supernatant solution into a 25 ml volumetric flask with a pipette. Boil the residue twice with portions of 6 ml isopropanol under a reflux condenser for 5 min. Collect the solutions in the volumetric flask, allow to cool, dilute to the mark with isopropanol, and mix.

Filter turbid solutions through a fluted filter paper. The clear solution is used for the assay.

To calculate the egg content from the sterol content of the sample solution, the average cholesterol concentration of ca. 200 mg cholesterol/egg yolk (16 g), is taken as a basis^{8,10}. With this value it follows:

$$\text{eggs (egg yolks)/l egg liqueur} \\ = \text{sterol content in the sample solution [g/l]} \times \frac{1000 \times 25 \times D}{E \text{ [g]} \times 200}$$

where E [g] = weight of the sample in grams

D = density of the egg liqueur

Determination of Cholesterol in Lard (Total Cholesterol)

Accurately weigh a sample of about 2.5 g into a 50 ml round-bottomed flask. Add 10 ml of a freshly prepared methanolic potassium hydroxide solution (ca. 0.5 mol/l) and heat under a reflux condenser for 25 min. Cool down, transfer the contents of the flask with a pipette into a 25 ml volumetric flask. Rinse the round-bottomed flask with isopropanol and transfer these rinses also to the volumetric flask. Add 1 ml HCl (8 mol/l) and fill up with isopropanol to the mark. Place in an refrigerator for 20 min. The free fatty acids precipitate. Filter the turbid solution quickly through a fluted filter paper. The filtrate can be used immediately for the assay. After mixing of solution 4 and sample solution a slight turbidity appears. To remove this, place the test tube for 10 minutes into a water bath of 37°C. Continue the analysis after this.

References:

- 6 Acker, L., Greve, H. (1964) Z. Lebensm. Unters. Forsch. 124, 257–265
- 7 Official Methods of Analysis of AOAC, 11th ed., Washington (1970)
- 8 Dresselhaus, M., Acker, L. (1974) Getreide, Mehl, Brot 28, 137–142
- 9 Dresselhaus, M., Acker, L. (1974) Mitteilungsblatt GDCh-Fachgruppe Lebensmittelchemie, gerichl. Chem. 28, 355–367
- 10 Wenker, K., Herrmann, H. (1975) Mitteilungsblatt GDCh- Fachgruppe Lebensmittelchemie, gerichl. Chem. 29, 253–257
- 11 Pardun, H. Analyse der Fette und Fettbegleitstoffe in Handbuch der Lebensmittelchemie IV, p. 777. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1969).
- 12 Wortberg, B. (1975) Z. Lebensm. Forsch. 157, 333–338
- 13 Grossmann, A., Timmen, H. & Klostermeyer, H. (1976) Milchwissenschaft 31, 721–724

Determination of Cholesterol in Liver Sausage

a) Total cholesterol: Accurately weigh a sample of about 2.5 g and 1 g of sea-sand into a 50 ml round-bottomed flask. Add 10 ml of a freshly prepared methanolic potassium hydroxide solution (ca. 0.5 mol/l). Heat under a reflux condenser for 25 min while stirring (magnetic stirrer). Transfer the supernatant solution into a 25 ml volumetric flask with a pipette.

Boil the residue twice with portions of 6 ml isopropanol each under a reflux condenser for 5 min. Collect the solutions in the volumetric flask, allow to cool. Dilute contents of the volumetric flask up to the mark with isopropanol and mix. Filter through a fluted filter paper and use the clear solution for the assay.

b) Free cholesterol: Homogenize ca. 10 g liver sausage. Accurately weigh about 1 g and extract three times at room temperature by shaking with 5 ml portions of isopropanol each. Filter through a fluted filter paper into a 25 ml volumetric flask. Add 5 ml HCl (8 mol/l), dilute with isopropanol to the mark and place into a refrigerator for 20 min in order to separate the fat. Filter through a fluted filter paper and use the clear solution for the assay.

Determination of Cholesterol in Liquid Egg, Technical Yolk and Dry Egg (Simplified Procedure)

Accurately weigh ca. 1 g liquid egg, 0.5 g yolk or 0.25 g dry egg, respectively, into a 50 ml volumetric flask and add 1 g sea-sand (the volume displacement of 0.4 ml must be taken into account in the calculation formula); heat under a reflux condenser for 30 min with 20 ml freshly prepared methanolic potassium hydroxide solution, ca. 0.5 mol/l, and 10 ml isopropanol while stirring (magnetic stirrer). Allow to cool the turbid solution, and fill up to the mark with isopropanol at room temperature after removal of the magnetic rod (rinse with isopropanol); mix, filter through a folded filter and take the clear solution for the assay.

Calculation:

Sterol content in the egg [mg/100 g], calculated as cholesterol

$$= \text{sterol content in the sample solution [g/l]} \times \frac{100 \times 49.6}{E \text{ [g]}}$$

Determination of Cholesterol in Milk Fat

Accurately weigh ca. 5 g milk fat into a 250 ml round bottomed flask; heat for 30 min under a reflux condenser with 50 ml freshly prepared methanolic potassium hydroxide, ca. 2 mol/l, while stirring (magnetic stirrer). Transfer the still warm solution with 100 ml redist. water into a 1000 ml separating funnel. After cooling to room temperature shake with 100 ml ether / petroleum ether (1 + 1). After 20 to 30 min drain off the clearly separated bottom phase and transfer the organic phase into a 500 ml round bottomed flask. This extraction is to be repeated twice. The collected ether / petroleum ether phases are to be evaporated under a rotation evaporator at 35°C and the residue is to be transferred with isopropanol into a 50 ml volumetric flask. Fill up to the mark with isopropanol at room temperature, mix and filter through a fluted filter. Take the clear solution for the assay.

Calculation:

Sterol content of milk fat [mg/100 g], calculated as cholesterol

$$= \text{sterol content in the sample solution [g/l]} \times \frac{100 \times 50}{E \text{ [g]}}$$

3. Specificity

Cholesterol oxidase oxidizes cholesterol and other sterols in which the hydroxyl group at the carbon atom 3 is in the β-position (except lanosterol¹²). Therefore, phytosterols, such as stigmasterol and sitosterol also react in the assay. This must be taken into account when calculating the egg content.

4. Sources of Error

Commercially available methanolic potassium hydroxide solution usually contains stabilizers which may inhibit cholesterol oxidase. The methanolic potassium hydroxide solution should therefore be prepared by individual user.

For this, dilute aqueous KOH (10 mol/l; A.R.) with 19 volumes of methanol (A.R.).

5. References

Beutler, H.-O. & Michal, G. (1976) Getreide, Mehl, Brot 30, 116–118

Groupe de travail 2/79
DOSAGE DES STEROLS TOTAUX

Le but de ce groupe de travail, dont la création a été décidée lors des réunions de Davos en 1979, est de rechercher une méthode d'estimation globale de l'ensemble des stérols dans les huiles et les graisses (et non de donner la composition centésimale relative de la fraction stérolique, comme le fait la méthode 2.403).

Deux méthodes furent soumises à examen :

- une méthode par chromatographie en phase gazeuse avec étalonnage interne,
- une méthode basée sur une oxydation enzymatique des stérols suivie d'un dosage spectrophotométrique.

L'analyse circulaire organisée en 1980-81 portait sur 3 échantillons : une graisse animale - une huile végétale - une base complexe pour margarines.

Les résultats obtenus par la méthode chromatographique furent suffisamment nombreux pour permettre l'évaluation de cette méthode. Ainsi qu'en témoignent le rapport de l'année dernière (Appendix 8-81 du Working Report 1981) et son complément annexé au procès-verbal des réunions de Louvain (Appendix 12-81 of the Minutes 1981), l'étude statistique brute montre que la dispersion des résultats est très élevée, et que la reproductibilité interopérateurs n'est pas satisfaisante.

Le nombre d'opérateurs ayant utilisé la méthode enzymatique étant trop limité, une nouvelle analyse circulaire portant sur cette seule méthode fut organisée cette année.

Le mode opératoire détaillé (reproduit intégralement en annexe) ainsi que deux échantillons à analyser : une graisse animale (suif de boeuf raffiné non antioxydé) et une huile végétale (huile d'arachide raffinée) ont été envoyés fin novembre 1981 à 11 opérateurs potentiels en demandant de faire sur chaque échantillon deux déterminations indépendantes.

A la date de rédaction de ce rapport, 9 feuilles de résultats provenant de

- 1 opérateur Suisse Ch 1
 - 5 opérateurs Français Fr 1 à Fr 5
 - 2 opérateurs Japonais Ja 1 et Ja 2
 - 1 opérateur Néerlandais Ne 1
- avaient été reçues.

Les résultats numériques sont repris dans le tableau I.

De nombreux opérateurs ont signalé une erreur d'écriture dans la formule de calcul - correction a été faite dans le texte joint.

L'opérateur Ch 1 indique qu'il convient de transvaser les solutions savonneuses chaudes pour éviter les solidifications - en particulier dans le cas de graisses concrètes.

L'opérateur Fr 5 signale que des troubles dans les solutions à mesurer lui ont causé des difficultés. Il insiste sur la nécessité d'utiliser des coffrets de réactif aussi éloignés que possible de la date de péremption.

Plusieurs opérateurs ont fait plus de deux essais indépendants; les résultats sont tous très homogènes, indiquant une bonne répétabilité de la méthode (en dépit de quelques exceptions évidentes).

En vue de juger de la reproductibilité interopérateurs, un examen statistique simple des données brutes limitées à deux par opérateur a été fait dans les mêmes conditions que pour la méthode chromatographique. Les résultats en sont reportés dans le tableau II.

Ces résultats indiquent une reproductibilité satisfaisante (coefficient de variation de l'ordre de 10%) pour la graisse animale, un petit peu moins bonne pour l'huile végétale, ceci étant probablement dû à deux résultats visiblement erronés opposés.

Quoi qu'il en soit, ces résultats sont nettement meilleurs que ceux obtenus par la méthode chromatographique.

Bien que dans l'un et l'autre cas l'étude statistique des résultats doive être reprise dans des conditions plus élaborées, avec élimination des valeurs aberrantes en particulier (ce qui sera fait en principe pour la réunion de Zeist), le rapporteur estime d'ores et déjà qu'il convient de retenir la méthode enzymatique et elle seule, et qu'une nouvelle analyse circulaire n'est pas nécessaire.

Annexe

DOSAGE DES STEROLS TOTAUX Méthode enzymatique

BUT DE LA METHODE

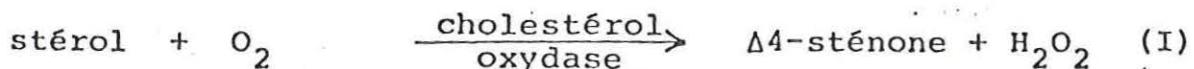
La méthode décrite a pour objectif de doser, dans un corps gras animal ou végétal, l'ensemble des stérols existant soit sous forme libre, soit sous forme estérifiée par un acide gras.

PRINCIPE

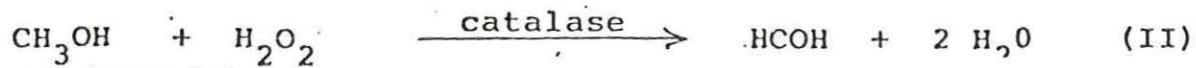
Après saponification, les stérols libérés sont dosés enzymatiquement par action de la cholestérol oxydase (Note 1).

Principe du dosage proprement dit : une suite de réactions couplées sont effectuées, de manière à obtenir un composé coloré (la lutidine) aisément dosable par spectrophotométrie.

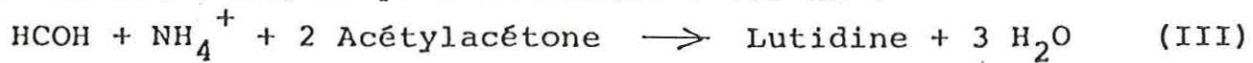
Les stérols sont tout d'abord oxydés (en présence de cholestérol oxydase) en sténones avec formation de peroxyde d'hydrogène :



Le peroxyde d'hydrogène formé oxyde, en présence de catalase, le méthanol en donnant du formaldéhyde :



Le formaldéhyde, à son tour, réagit avec l'acétylacétone pour former la lutidine, composé absorbant à 405 nm :



La quantité de lutidine formée est proportionnelle à la quantité des stérols initialement présents.

EXPRESSION DES RESULTATS

La teneur en stérols est exprimée en milligrammes de cholestérol par 100 g de corps gras.

MATERIEL

- ballons piriformes de 25 ml à col rodé 14/19, équipés d'un réfrigérant et d'un système de chauffage approprié - ou tout autre dispositif permettant la saponification de quelques grammes de corps gras.
- fioles jaugées de 25 ml.
- tubes à essais (\varnothing 18).
- tubes à hémolyse en verre, bouchés hermétiquement.
- bains thermostatés régulant vers 40°C.
- enceinte réfrigérante (4°C) (un simple réfrigérateur suffit).
- papier à filtration rapide, entonnoirs de filtration.
- pipettes de 0,1 - 0,5 - 1 et 5 ml graduées (classe A).
- spectrophotomètre (permettant si possible une lecture à 0,001 unité de D.O. près).
- cuves pour spectrophotomètre (les cuves à usage unique en matière plastique peuvent parfaitement convenir, et sont même souhaitables pour éviter les risques éventuels de pollution).

REACTIFS

- Potasse méthanolique 0,5 N :
Dissoudre 2,8 g de potasse dans un peu de méthanol à chaud, ajuster à V = 100 ml.
- acide chlorhydrique 8 N :
Mélanger 60 ml d'HCl concentré ($d = 1,98$) à 30 ml d'eau.
- propanol-2 (isopropanol) qualité pour analyse.
- eau distillée :
En général on distille dans un appareillage de verre une eau déminéralisée sur colonne.
- solution de catalase (solution 1) (Note 2) : /0,8M
Dans 50 ml de solution tampon phosphate d'ammonium/ajustée à pH 7, ajouter 19,1 ml d'acétone et une quantité de catalase (hydrogène peroxyde oxydo-réductase E.C 1-11-1-6) de foie de boeuf équivalente à 230.000 u. Ajuster à V = 100 ml avec la solution tampon.
- solution 2 (Note 2) :
Dans 25 ml d'eau dissoudre 0,26 ml d'acétylacétone et 1,10 ml d'acétone. Ajuster à V = 50 ml.
- suspension 3 de cholestérol oxydase (cholestérol oxygen oxydo-réductase E.C 1-1-3-6) de Nocardia Erythropolis/(Note 2). /12 unités dans 0,8 ml
- solution 4 :
Juste avant dosage mélanger 3 volumes de solution 1 avec 2 volumes de solution 2 (Note 3).

SAPONIFICATION

Peser exactement environ 1 à 2 g de corps gras dans le ballon piriforme de 25 ml.

Ajouter 10 ml de potasse méthanolique 0,5 N et quelques billes de verre (Note 4).

Porter le contenu du ballon à reflux pendant 25 min.

Après léger refroidissement, transvaser le contenu encore tiède du ballon dans une fiole jaugée de 25 ml en s'aidant de quelques ml d'isopropanol. Rincer le ballon avec de l'isopropanol.

Ajouter 1 ml de la solution d'HCl 8 N. Ajuster au volume avec l'isopropanol. Agiter. Placer la fiole dans l'enceinte réfrigérante (4°C) pendant environ 20 min.

Filtrer très rapidement. Le filtrat, appelé solution d'essai, est utilisé immédiatement pour le dosage enzymatique (Note 5).

DOSAGE DES STEROLS

Dans un tube à essais (Ø 18) introduire 5 ml de la solution 4 et 0,4 ml de la solution d'essai. Bien mélanger.

Transvaser dans un tube à hémolyse 2,5 ml de ce mélange et y ajouter 0,02 ml de la suspension 3. Bien mélanger. Le reste du contenu du tube à essais est également transvasé dans un second tube à hémolyse et constitue la solution témoin.

Boucher hermétiquement les tubes essai et témoin et incuber 60 min. dans un bain-marie réglé entre 37 et 40°C.

Laisser refroidir à température ambiante et transvaser dans les cuves de spectrophotométrie.

Mesurer la différence d'absorbance, à 405 nm, entre l'essai et le témoin (ΔE).

CALCUL DES TENEURS EN STEROLS

La formule générale pour le calcul des concentrations est la suivante :

$$c = \frac{V}{\epsilon \cdot d \cdot n} \Delta E$$

dans laquelle :

c = concentration (m.moles/ml) de la solution d'essai

V = volume total contenu dans le tube à essai (ml) = 5,4 ml

n = volume de la prise d'essai (ml) = 0,4 ml

d = trajet optique de la cuve (cm) = 1 cm

ϵ = coefficient d'extinction de la lutidine à 405 nm = 7400 ml.m.mole⁻¹.cm⁻¹

En tenant compte de la dilution de l'essai par la solution 4 (facteur de dilution 2,52/2,5 = 1,008) cette formule se simplifie en :

$$c = \frac{V \cdot 1,008}{\epsilon \cdot d \cdot n} \Delta E$$

$$5,4 \cdot 1,008$$

$$c = \frac{7400 \cdot 1 \cdot 0,4}{5,4 \cdot 1,008} \Delta E$$

$$c = 1,839 \cdot 10^{-3} \Delta E$$

Si une dilution a été effectuée lors de la préparation de la solution d'essai, il faut multiplier ce résultat par le facteur de dilution F.

La teneur en stérols totaux du corps gras examiné, arbitrairement exprimée en cholestérol, est donnée par la formule :

$$\text{Teneur en stérols totaux} = \frac{c \cdot V_e \cdot M \cdot 100}{P}$$

(en mg/100 g corps gras)

où :

c = concentration (m.moles/ml) de la solution

V_e = volume total de la solution d'essai (ml)

M = masse molaire du cholestérol (g)

P = masse de la prise d'essai du corps gras (g)

(Note 6).

NOTES

- 1 - L'activité de la cholestérol oxydase n'est absolument pas spécifique du cholestérol. Cette enzyme, en fait, catalyse l'oxydation de l'hydroxyle lié au carbone 3 lorsqu'il se trouve en position β .
- 2 - Ces solutions peuvent être obtenues prêtes à l'emploi auprès de la Société Bechninger Mannheim, en commandant le coffret "dosage du cholestérol en chimie alimentaire", test-combinaison pour 25 dosages, réf. 139050.
- 3 - Les solutions fournies prêtes à l'emploi par la Société Bechninger sont stables 1 année lorsqu'elles sont conservées à + 4°C. La solution 4 préparée est stable 3 mois lorsqu'elle est stockée en flacons bruns à + 4°C et lorsqu'elle a été préparée de manière à éviter les contaminations bactériennes (flacons stérilisés, eau bi-distillée, etc....).
- 4 - Il vaut mieux en général, dans le cas des huiles fluides, travailler sur de faibles quantités de corps gras, car, après saponification puis acidification, les acides gras libérés et non totalement précipités à froid peuvent perturber le dosage lorsque l'on ajoute la solution de méthanol, en provoquant l'apparition d'un trouble. D'autre part, dans le cas d'huiles fortement colorées (palme brute) l'addition d'environ 5% du corps gras en charbon actif lors de la saponification permet de se débarrasser de la couleur parasite. Enfin, dans le cas des margarines, l'addition de sulfate de sodium anhydre permet d'obtenir une saponification complète par fixation de l'eau.
- 5 - Pour obtenir une mesure spectrophotométrique correcte, la concentration en stérols dans le milieu réactionnel (solution d'essai) doit être comprise entre 0,02 et 0,4 g/l. Il convient donc d'en tenir compte lors de la prise d'essai ou de la dilution par l'isopropanol.
- 6 - A partir de la composition centésimale de la fraction stérol que, il est possible de calculer la teneur en chacun des stérols présents dans cette fraction, en appliquant la formule donnée pour le calcul. Il convient dans ce cas de tenir compte de la masse molaire du stérol considéré.

Tableau I

DOSAGE DES STEROLS TOTAUX
Méthode enzymatique

Opérateurs

	Ch 1	Fr 1	Fr 2	Fr 3	Fr 4	Fr 5	Ja 1	Ja 2	Ne 1 TRL
Graisse animale									
1er essai	98	108	108	116	115	92	115	113	120 117
2ème essai	97	107	102	110	138	93	112	110	116 98
Moyenne	97	108	105	113	126	93	114	112	118 105
(arachide) Huile végétale <i>bonne et sans chal!</i>									
1er essai	186	245	194	211	176	134	195	200	220 253
2ème essai	183	259	194	201	189	138	201	203	211 253
Moyenne	184	252	194	206	183	136	198	202	215 253

Tableau II

	Graisse animale	Huile végétale
Nombre de résultats n	18	18
Valeur moyenne mg/g \bar{x}	109	197
Ecart type σ	11	30
Coefficient de variation v%	10,1	15,3
Nombre de résultats dans l'intervalle	14	14
$\bar{x} \pm \sigma$		

Ruggedness test.

Hoofddoel van een ruggedness test.

Het ontdekken van knelpunten in een analyse, die speciale aandacht moeten hebben, om goede analyseresultaten te verkrijgen.

Inleiding

Voordat men aan een ringonderzoek begint kan het gewenst zijn oriënterend na te gaan of kleine veranderingen in een analysemethode grote invloeden hebben op het analyseresultaat. Men kan dit doen met factoriële proefschema's waarin alle faktoren twee niveaus hebben de z.g. 2^n -proeven. Voor het onderzoeken van n factoren met alle interacties tussen de n factoren heeft men 2^n analyses nodig. Is men alleen geïnteresseerd in hoofdeffekten dan kan men met veel minder analyses toe. W.J. Youden, een Amerikaans chemicus, die later statisticus is geworden, beschrijft een 2^7 -proef met slechts 8 analyses (1/16 van 128) om van een chemische analyse de invloed van 7 kleine veranderingen op het analyseresultaat te bepalen.

Werkwijze

Men doet elke analyse iets anders.

Stel A, B, C, D, E, F en G zijn de nominale waarden of condities die in het analysevoorschrift voorkomen en a, b, c, d, e, f en g zijn de alternatieve veranderingen dan is de proefopzet als in tabel 1.

Tabel 1 Acht combinaties van zeven factoren om de "ruggedness" van een analysemethode te bepalen.

Faktor	Combinatie van analyse no.							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A of a	A	A	A	A	a	a	a	a
B of b	B	B	b	b	B	B	b	b
C of c	C	c	C	c	C	c	C	c
D of d	D	D	d	d	d	d	D	D
E of e	E	e	E	e	e	E	e	E
F of f	F	f	f	F	F	f	f	F
G of g	G	g	g	G	g	G	G	g
analyseresultaat	s	t	u	v	w	x	y	z

$$\Delta a = A-a = (s+t+u+v)/4 - (w+x+y+z)/4$$

$$\Delta b = B-b = (s+t+w+x)/4 - (u+v+y+z)/4$$

enz.

Indien een faktor een invloed op de analyse heeft dan is het verschil essentieel groter dan bij de andere factoren. Uit de verschillen Δa t/m Δg en uit de analyse uitkomsten s t/m z kan men de standaardafwijking berekenen die men tussen laboratoria minstens kan verwachten.

$$s^2 = 2 \sum d^2 / 7 \text{ en } s^2 = \sum (\text{analyse-gemiddelde})^2 / 7.$$

Bruikbaarheid van de 2⁷ proef met 1/16 herhaling

1. Deze proef is niet geschikt om kleine invloeden van factoren te meten. Men vergelijkt slechts op 2 niveaus het gemiddelde van slechts 4 analyses.
2. Deze proef is niet aan te bevelen voor essentiële veranderingen in de analyse-methode, omdat deze veranderingen zelden onafhankelijk optreden.

Literatuur.

1. Youden, W.J., Statistical Techniques for Collaborative Tests, Association of Official Analytical Chemists 1967, blz. 29 t/m 32 en 46 t/m 51.
2. Water Task Report, NPFI Chemical Control Committee, National Plant Food Institute, Washington, D.C., August 1964 (private communication).
3. Upperman, P.M., Statistische methoden en proefopzetten, Universitaire Pers Rotterdam 1974, blz. 288 t/m 339.
4. Plackett, R.L. and Burman, J.P., The Design of Optimum Multifactorial Experiments, Biometrika, 33, 305-325 (1946).
5. Sieben, W.J. Een cursus Statistiek en Proefopzetten, Interne Technische Opleidingen N.V. Philips