

	Lebensmittel Bestimmung von Acesulfam-K, Aspartam und Saccharin Hochleistungs-flüssigchromatographisches Verfahren Deutsche Fassung EN 12856 : 1999	<u>DIN</u> EN 12856
ICS 67.050 Foodstuffs – Determination of acesulfame-K, aspartame and saccharin – High performance liquid chromatographic method; German version EN 12856 : 1999 Produits alimentaires – Dosage de l'acésulfame-K, de l'aspartame et de la saccharine – Méthode par chromatographie liquide haute performance; Version allemande EN 12856 : 1999 Die Europäische Norm EN 12856 : 1999 hat den Status einer Deutschen Norm. Nationales Vorwort Diese Europäische Norm ist vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebens- mittelanalytik – Horizontale Verfahren“ (Sekretariat: DIN) unter intensiver deutscher Mitarbeit erarbeitet worden. Das zuständige deutsche Normungsgremium ist der Arbeitsausschuß „Süßstoffe“ des Normenausschusses „Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte“ (NAL) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V. Fortsetzung 15 Seiten EN Normenausschuß Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V.		

– Leerseite –

Deutsche Fassung

Lebensmittel

Bestimmung von Acesulfam-K, Aspartam und Saccharin Hochleistungs-flüssigchromatographisches Verfahren

Foodstuffs – Determination of acesulfame-K,
aspartame and saccharin – High performance liquid
chromatographic method

Produits alimentaires – Dosage de l'acésulfame-K,
de l'aspartame et de la saccharine – Méthode par
chromatographie liquide haute performance

Diese Europäische Norm wurde von CEN am 16. April 1999 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist.

Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim Zentralsekretariat oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Zentralsekretariat mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Dänemark, Deutschland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Luxemburg, Niederlande, Norwegen, Österreich, Portugal, Schweden, Schweiz, Spanien, der Tschechischen Republik und dem Vereinigten Königreich.

CEN

EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
European Committee for Standardization
Comité Européen de Normalisation

Zentralsekretariat: rue de Stassart 36, B-1050 Brüssel

Inhalt

	Seite
Vorwort	2
1 Anwendungsbereich	2
2 Normative Verweisungen	2
3 Prinzip	2
4 Chemikalien	3
5 Geräte und Hilfsmittel	4
6 Durchführung	5
7 Auswertung	6
8 Präzision	7
9 Untersuchungsbericht	8
Anhang A (normativ) Beispiele für chromatographische Bedingungen, die zu zufriedenstellenden Ergebnissen geführt haben	9
Anhang B (informativ) Bilder	10
Anhang C (informativ) Präzisionsdaten	12
Literaturhinweise	15

Vorwort

Diese Europäische Norm wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik – Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN geführt wird.

Diese Europäische Norm muß den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Oktober 1999, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Oktober 1999 zurückgezogen werden.

Entsprechend der CEN/CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen:

Belgien, Dänemark, Deutschland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Luxemburg, Niederlande, Norwegen, Österreich, Portugal, Schweden, Schweiz, Spanien, die Tschechische Republik und das Vereinigte Königreich.

1 Anwendungsbereich

Diese Europäische Norm legt ein hochleistungs-flüssigchromatographisches (HPLC) Verfahren zur Bestimmung von Acesulfam-K, Aspartam und Saccharin fest, siehe [1], [2] und [3]. Sie erlaubt auch die Bestimmung von Coffein, Sorbinsäure und Benzoesäure in Lebensmitteln. Ringversuche wurden mit Acesulfam-K in Marzipan, Joghurt, Fruchtjoghurt, Orangensaft, Orangenfruchtsaftgetränk, Cola, Sahne und Konfitüre durchgeführt sowie mit Aspartam in Marzipan, Fruchtjoghurt, Orangenfruchtsaftgetränk, Orangenlimonade, Cola, Konfitüre und Kuchenbackzubereitung und mit Saccharin-Natrium in Marzipan, Joghurt, Fruchtjoghurt, Orangensaft, Orangenfruchtsaftgetränk, Cola, Sahne und Konfitüre.

2 Normative Verweisungen

Diese Europäische Norm enthält durch datierte oder undatierte Verweisungen Festlegungen aus anderen Publikationen. Diese normativen Verweisungen sind an den jeweiligen Stellen im Text zitiert, und die Publikationen sind nachstehend aufgeführt. Bei datierten Verweisungen gehören spätere Änderungen oder Überarbeitungen dieser Publikationen nur zu dieser Europäischen Norm, falls sie durch Änderung oder Überarbeitung eingearbeitet sind. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe der in Bezug genommenen Publikation.

EN ISO 3696

Wasser für analytische Zwecke – Anforderungen und Prüfungen (ISO 3696 : 1987)

3 Prinzip

Die Probe wird mit Wasser extrahiert oder verdünnt. Falls notwendig, wird die Probenlösung mit den Süßstoffen an einer Festphasen-Extraktionssäule oder mit Carrez-Reagenzien gereinigt. Die Süßstoffe in der Probenlösung werden an einer HPLC-Umkehrphasensäule getrennt und spektralphotometrisch bei 220 nm bestimmt.

4 Chemikalien

Falls nicht anders angegeben, werden bei der Untersuchung nur HPLC-geeignete Chemikalien und Wasser von mindestens Qualität 1 nach EN ISO 3696 verwendet. Bei der Herstellung von Lösungen ist die Reinheit der Substanzen zu berücksichtigen.

4.1 Acetonitril, für HPLC

4.2 Methanol, für HPLC

4.3 Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)

4.4 di-Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)

4.5 Phosphorsäure, $\rho_{20}(\text{H}_3\text{PO}_4) = 1,71 \text{ g/ml}$, $w(\text{H}_3\text{PO}_4) = 85 \%^{1)}$

4.6 Phosphorsäure, $w(\text{H}_3\text{PO}_4) = 5 \%$

6 ml Phosphorsäure (4.5) werden vorsichtig in einen 100-ml-Meßkolben pipettiert, der 80 ml Wasser enthält. Der Kolben wird mit Wasser bis zur Eichmarke aufgefüllt.

4.7 Carrez-Lösung Nr. I

15 g Kaliumhexacyanoferrat(II) ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3 \text{ H}_2\text{O}$) werden in Wasser gelöst auf 100 ml aufgefüllt.

4.8 Carrez-Lösung Nr. II

30 g Zinksulfat ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$) werden in Wasser gelöst und auf 100 ml aufgefüllt.

4.9 Phosphat-Pufferlösung I, $c(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 0,02 \text{ mol/l}^2$, $\text{pH} = 4,3$

2,72 g Kaliumdihydrogenphosphat (4.3) werden in einem 1000-ml-Becherglas in 800 ml Wasser gelöst. Der pH-Wert wird mit Phosphorsäure (4.6) auf $\text{pH} = 4,3$ eingestellt. Die Lösung wird in einen 1000-ml-Meßkolben überführt und bis zur Eichmarke mit Wasser aufgefüllt.

4.10 Phosphat-Pufferlösung II, $c(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 0,0125 \text{ mol/l}$, $\text{pH} = 3,5$

1,70 g Kaliumdihydrogenphosphat (4.3) werden in einem 1000-ml-Becherglas in 800 ml Wasser gelöst. Der pH-Wert wird mit Phosphorsäure (4.6) auf $\text{pH} 3,5$ eingestellt. Die Lösung wird in einen 1000-ml-Meßkolben überführt und bis zur Eichmarke mit Wasser aufgefüllt.

4.11 Mobile Phase, Phosphatpuffer und Acetonitril

Die nach A.5 erforderlichen Mengen an Phosphatpuffer und Acetonitril werden sorgfältig abgemessen, gemischt und danach durch geeignete Membranfilter, z. B. mit einer Porenweite von $0,45 \mu\text{m}$, filtriert und 5 min im Ultraschallbad entgast. Die mobile Phase wird am Verwendungstag frisch hergestellt.

4.12 Kontrolllösung (optional)

Die Kontrolllösung enthält Acesulfam-K, Saccharin-Natrium, Aspartam, 5-Benzyl-3,6-Dioxo-2-Piperazin-Essigsäure (Diketopiperazin), Aspartylphenylalanin, Phenylalanin, Coffein, Benzoesäure, Theobromin, Hydroxymethylfurfural und Vanillin.

In einen 100-ml-Meßkolben werden auf 0,1 mg eingewogen: 30 mg Acesulfam-K, 20 mg Saccharin-Natrium, 220 mg Aspartam, 60 mg Coffein, 100 mg Sorbinsäure, 100 mg Benzoesäure, 100 mg Vanillin, 10 mg Diketopiperazin, 10 mg Phenylalanin, 10 mg Aspartylphenylalanin, 20 mg Hydroxymethylfurfural und 70 mg Theobromin. Die Substanzen werden gelöst, und die Lösung wird mit Wasser bis zur Eichmarke aufgefüllt.

20 ml dieser Lösung werden in einen 100-ml-Meßkolben pipettiert und mit Wasser bis zur Eichmarke aufgefüllt.

4.13 Stammlösung

100 mg Acesulfam-K, 100 mg Saccharin-Natrium und 100 mg Aspartam werden auf 0,1 mg in einen 100-ml-Meßkolben eingewogen. Die Substanzen werden gelöst, und die Lösung wird mit Wasser bis zur Eichmarke aufgefüllt. Diese Lösung enthält 1 g/l eines jeden Süßstoffes.

¹⁾ w ist der Massenanteil.

²⁾ c ist die Stoffmengenkonzentration.

4.14 Standardlösungen (optional)

4.14.1 Standardlösung I

10 ml Stammlösung (4.13) werden in einen 100-ml-Meßkolben pipettiert und mit Wasser bis zur Eichmarke aufgefüllt. Diese Lösung enthält 100 mg/l eines jeden Süßstoffes.

4.14.2 Standardlösung II

5 ml Stammlösung (4.13) werden in einen 100-ml-Meßkolben pipettiert und mit Wasser bis zur Eichmarke aufgefüllt. Diese Lösung enthält 50 mg/l eines jeden Süßstoffes.

4.14.3 Standardlösung III

1 ml Stammlösung (4.13) wird in einen 100-ml-Meßkolben pipettiert und mit Wasser bis zur Eichmarke aufgefüllt. Diese Lösung enthält 10 mg/l eines jeden Süßstoffes.

5 Geräte und Hilfsmittel

Übliche Laborgeräte und insbesondere die folgenden:

5.1 Hochleistungsmischer oder Homogenisiergerät

5.2 Meßkolben in geeigneten Größen, z. B. 1000 ml, 500 ml und 100 ml

5.3 Becherglas, 1000 ml

5.4 Pipetten in geeigneten Größen, z. B. 100 ml, 25 ml, 20 ml, 10 ml, 5 ml und 1 ml

5.5 Mikropipette, 1000 µl

5.6 Meßzylinder, 1000 ml

5.7 Faltenfilter, mittelschnell, qualitativ

5.8 Ultraschallbad

5.9 Zentrifuge mit Zentrifugenröhrchen geeigneter Größe, die am Boden der Zentrifugenröhrchen eine Zentrifugalbeschleunigung von mindestens 1400 g erzeugen kann.

5.10 Entgasungssystem, für Lösemittel (optional, statt Ultraschallbehandlung)

5.11 Membranfilter mit einer Porenweite von 0,45 µm oder kleiner

5.12 Filterhalter für Membranfilter mit entsprechender Spritze

5.13 Festphasen-Extraktionssäule mit RP C 18-Kartusche (wahlweise), z. B. mit 500 mg Füllung

5.14 Hochleistungs-Flüssigchromatograph mit einem variablen Ultraviolett-(UV-)Detektor (geeignet für Messungen bei 220 nm, vorzugsweise ein Diodenarray-Detektor) und einem Schreiber und/oder einem Integrator für die Messung von Peakhöhen und Peakflächen

5.15 HPLC-Trennsäule, Umkehrphase (reversed phase, RP), mit

- stationärer Phase RP C 18 von 3 µm bis 10 µm;
- Länge 100 mm bis 300 mm;
- Innendurchmesser 3 mm bis 4 mm;
- Vorsäule, RP C 18 (wahlweise, aber besonders für alle festen Probenmaterialien empfohlen).

Leistungskriterium für geeignete Trennsäulen ist die Grundlinienauflösung des entsprechenden Analyts.

Beispiele für geeignete Säulen oder günstige chromatographische Bedingungen werden in Anhang A angegeben.

Wenn Störungen mit einem Diodenarray-Detektor oder bei der Messung bei einer zweiten Wellenlänge festgestellt werden, müssen andere chromatographische Bedingungen gewählt werden.