

DIN EN 15911

ICS 67.180.10

**Lebensmittel –
Gleichzeitige Bestimmung von neun Süßungsmitteln mit
Hochleistungs-Flüssigchromatographie und
Verdampfungs-Lichtstreu-Detektion;
Deutsche Fassung EN 15911:2010**

Foodstuffs –

Simultaneous determination of nine sweeteners by high performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection;
German version EN 15911:2010

Denrées alimentaires –

Détermination simultanée de neuf édulcorants par chromatographie liquide haute performance et détection à diffusion de lumière;
Version allemande EN 15911:2010

Gesamtumfang 33 Seiten

Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 15911:2010) ist vom Technischen Komitee TC 275 „Lebensmittelanalytik – Horizontale Verfahren“ (Sekretariat: DIN, Deutschland) des Europäischen Komitees für Normung (CEN) nach eingehenden Vorarbeiten der Arbeitsgruppe 2 „Süßungsmittel“ erarbeitet worden.

Das zuständige deutsche Arbeitsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-01-11 AA „Süßungsmittel“ des Normenausschusses „Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte“ (NAL) im DIN Deutsches Institut für Normung e. V.

Der übermäßige Verzehr von Süßungsmitteln kann abführend wirken. Daher müssen Lebensmittel entsprechend gekennzeichnet werden, um auf dem Europäischen Markt verkehrsfähig zu sein. Die Verwendung von Süßungsmitteln wie Acesulfam-K, Aspartam, Cyclamat, Neosperidin-Dihydrochalcon, Saccharin und Sucralose ist durch Europäische Richtlinien geregelt.

Diese Norm soll es dem Handel, der amtlichen Lebensmittelüberwachung und den privaten Laboratorien ermöglichen, zu überprüfen, ob die vorliegenden Lebensmittelproben den Anforderungen der europäischen Rechtsetzung entsprechen.

Darüber hinaus kann das Verfahren für die Bestimmung der Süßungsmittel Alitام, Dulcin und Neotam verwendet werden.

Für die im Abschnitt 2 zitierte Internationale Norm wird im Folgenden auf die entsprechende Deutsche Norm hingewiesen:

EN ISO 3696 siehe DIN ISO 3696

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN ISO 3696, *Wasser für analytische Zwecke — Anforderungen und Prüfungen; Identisch mit ISO 3696:1987*

Deutsche Fassung

Lebensmittel —
Gleichzeitige Bestimmung von neun Süßungsmitteln mit
Hochleistungs-Flüssigchromatographie und Verdampfungs-
Lichtstreu-Detektion

Foodstuffs —

Simultaneous determination of nine sweeteners by high
performance liquid chromatography and evaporative light
scattering detection

Denrées alimentaires —

Détermination simultanée de neuf édulcorants par
chromatographie liquide haute performance et détection à
diffusion de lumière

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 18. September 2010 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 Management-Zentrum des CEN-CENELEC 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 Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, der Schweiz, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

Management-Zentrum: Avenue Marnix 17, B-1000 Brüssel

Inhalt

	Seite
Vorwort	3
1 Anwendungsbereich	4
2 Normative Verweisungen	4
3 Kurzbeschreibung	4
4 Chemikalien	5
5 Geräte und Ausrüstung	7
6 Durchführung	8
7 Berechnung der Ergebnisse	12
8 Präzision	13
9 Untersuchungsbericht	16
Anhang A (informativ) Tabelle A.1 — Geeignete Versuchsbedingungen	17
Anhang B (informativ) Beispiele für Chromatogramme	18
Anhang C (informativ) Präzisionsdaten	20
Anhang D (informativ) Derzeitige EU-Grenzwerte für die neun Süßungsmittel	30
Literaturhinweise	31

Vorwort

Dieses Dokument (EN 15911:2010) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis April 2011, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis April 2011 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Texte dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN [und/oder CENELEC] sind nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Entsprechend der CEN/CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

1 Anwendungsbereich

Diese Europäische Norm legt ein Verfahren zur gleichzeitigen Bestimmung von neun Intensivsüßungsmitteln in Getränken und in Dosen konserviertem oder eingemachtem Obst durch Hochleistungs-Flüssigchromatographie mit Verdampfungs-Lichtstreu-Detektion (HPLC-ELSD) fest. Das Verfahren wurde in einem Ringversuch durch die Analyse von aufgestockten Proben an den folgenden Matrices validiert:

- Acesulfam-K (ACS-K) (von 38,3 mg/l bis 383,5 mg/l) in Getränken und (von 38,4 mg/kg bis 391,3 mg/kg) in Dosenobst;
- Alitam (ALI) (von 31,1 mg/l bis 114,5 mg/l) in Getränken und (von 36 mg/kg bis 175,2 mg/kg) in Dosenobst;
- Aspartam (ASP) (von 38,1 mg/l bis 702 mg/l) in Getränken und (von 37,2 mg/kg bis 1 120,2 mg/kg) in Dosenobst;
- Cyclohexansulfamidsäure (CYC) (von 28,3 mg/l bis 307,2 mg/l) in Getränken und (von 27,5 mg/kg bis 1 100,6 mg/kg) in Dosenobst;
- Dulcin (DUL) (von 55,0 mg/l bis 115,1 mg/l) in Getränken und (von 49,8 mg/kg bis 172,6 mg/kg) in Dosenobst;
- Neotam (NEO) (von 37,6 mg/l bis 115,3 mg/l) in Getränken und (von 37,3 mg/kg bis 173,7 mg/kg) in Dosenobst;
- Neohesperidin-Dihydrochalcon (NHDC) (von 31,4 mg/l bis 59,3 mg/l) in Getränken und (von 35,3 mg/kg bis 59,3 mg/kg) in Dosenobst;
- Saccharin (SAC) (von 36,2 mg/l bis 87,6 mg/l) in Getränken und (von 44,3 mg/kg bis 235,3 mg/kg) in Dosenobst;
- Sucralose (SCL) (von 36,8 mg/l bis 346,8 mg/l) in Getränken und (von 35,3 mg/kg bis 462,4 mg/kg) in Dosenobst.

Weitere Informationen zu den Validierungsergebnissen siehe Abschnitt 8 und Anhang C.

ANMERKUNG Das Verfahren wurde durch einen Ringversuch [1] nach dem IUPAC-Harmonisierungsprotokoll [2] an Analyt-Matrix-Kombinationen aller neun Süßungsmittel in Getränken und in Dosen konserviertem oder eingemachtem Obst vollständig validiert.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden zitierten Dokumente sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

EN ISO 3696:1995, *Wasser für analytische Laborzwecke — Spezifikation und Prüfverfahren (ISO 3696:1987)*

3 Kurzbeschreibung

Das Verfahren umfasst die Extraktion der neun Süßungsmittel mit einer Pufferlösung, die Probenreinigung mit Festphasenextraktionskartuschen und die anschließende HPLC-ELSD-Analyse.

4 Chemikalien

Falls nicht anders angegeben, werden bei der Untersuchung nur Chemikalien von anerkannter Analysenreinheit für die HPLC-Analyse 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 Acesulfam-K, mit einem Massenanteil w von mindestens 99,0 %

4.2 Alitam, $w \geq 99,0$ %

4.3 Aspartam, $w \geq 99,0$ %

4.4 Dulcin, für HPLC

4.5 Neotam, $w \geq 99,0$ %

4.6 Neohesperidin-Dihydrochalcon, $w \geq 95,0$ %

4.7 Saccharin, Natriumsalz, Dihydrat, $w \geq 98,0$ %

4.8 Natriumcyclamat, $w \geq 99,0$ %

4.9 Sucralose, $w \geq 99,0$ %

4.10 Ameisensäure, HCOOH , für HPLC

4.11 Triethylamin, $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$, $w \geq 99,5$ %

4.12 Methanol, für HPLC

4.13 Aceton, für HPLC

4.14 Pufferlösung (pH = 4,5)

4 ml Ameisensäure (4.10) werden in 5 l Wasser gelöst. Der pH-Wert wird mit etwa 12,5 ml Triethylamin (4.11) auf 4,5 eingestellt.

4.15 Mobile Phase A für die HPLC, Methanol/Pufferlösung/Aceton 69:24:7 (V/V/V)

690 ml Methanol (4.12) werden mit 240 ml Pufferlösung (4.14) und 70 ml Aceton (4.13) gemischt. Das Entgasen erfolgt durch Ultraschallbehandlung für 10 min.

4.16 Mobile Phase B für die HPLC, Methanol/Pufferlösung/Aceton 11:82:7 (V/V/V)

110 ml Methanol (4.12) werden mit 820 ml Pufferlösung (4.14) und 70 ml Aceton (4.13) gemischt. Das Entgasen erfolgt durch Ultraschallbehandlung für 10 min.

4.17 Gemischte Stammlösung, die ACS-K, ALI, ASP, CYC-Na, DUL, NEO, NHDC, SAC-Na und SCL enthält; Massenkonzentration ρ (Süßungsmittel i) = 30 $\mu\text{g/ml}$ bis 250 $\mu\text{g/ml}$.

Eine gemischte Stammlösung aller neun Süßungsmittel wird hergestellt, indem zuerst die vorgegebenen Massen der einzelnen Süßungsmittel-Standards (Tabelle 1) in ein 100-ml-Becherglas eingewogen werden und in etwa 50 ml Methanol/Wasser (1:1) vollständig gelöst werden. Anschließend wird die erhaltene Lösung quantitativ in einen 500-ml-Messkolben überführt und dieser wird mit der Pufferlösung (4.14) bis zur Marke aufgefüllt. Bis zum vollständigen Lösen wird gründlich durch Ultraschallbehandlung gemischt.

Tabelle 1 — Massen der einzelnen Standards zur Herstellung einer gemischten Stammlösung

Standard	In den 500-ml-Messkolben eingewogene Masse ^c mg	Endmassenkonzentration vom Süßungsmittel <i>i</i> in der gemischten Stammlösung µg/ml
Acesulfam-K (ACS-K)	45	90
Alitam (ALI)	25	50
Aspartam (ASP)	125	250
Natriumcyclamat (CYC-Na)	140 ^a	–
Cyclohexansulfamidsäure (CYC) (freie Säure)	–	249,42
Dulcin (DUL)	25	50
Neotam (NEO)	25	50
Neohesperidin-Dihydrochalcon (NHDC)	15	30
Saccharin, Natriumsalz, Dihydrat (SAC-Na·2H ₂ O)	35 ^b	–
Saccharin (SAC) (freies Imid)	–	53,17
Sucralose (SCL)	50	100

^a entspricht 124,71 mg freier Cyclohexansulfamidsäure; Umrechnungsfaktor zur Berechnung der Masse an freier Cyclohexansulfamidsäure = 0,890 8; $m_{CYC} = 0,890\ 8 \times m_{CYC-Na}$

^b entspricht 26,58 mg freien Saccharins; Umrechnungsfaktor zur Berechnung der Masse an freiem Saccharin = 0,759 5; $m_{SAC} = 0,759\ 5 \times m_{SAC-Na \cdot 2H_2O}$

^c Zuerst wird die Substanz in 100-ml-Becherglas eingewogen, dann wird sie in 50 ml eines Methanol-Wasser-Gemischs (1:1) gelöst und anschließend wird die Lösung quantitativ in einen 500-ml-Messkolben überführt.

ANMERKUNG Im Fall von Cyclohexansulfamidsäure und Saccharin werden deren Natriumsalze verwendet, da sie in freier Form entweder nicht verfügbar oder schwer löslich sind.

Die Endkonzentrationen der einzelnen Süßungsmittel in Mikrogramm per Milliliter in der gemischten Stammlösung sind unter Anwendung der tatsächlich eingewogenen Massen zu berechnen.

4.18 Standardlösungen

Aus der gemischten Stammlösung (4.17) wird eine Reihe von Standardlösungen hergestellt, die die Süßungsmittel in Konzentrationen enthält, die annähernd mit den entsprechenden Grenzwerten übereinstimmen, z. B. muss die höchste Konzentration bei der Kalibrierung mindestens 125 % der vorgegebenen Grenzwerte, wie sie z. B. in Richtlinien der Kommission [3], [4], [5] (siehe Tabelle D.1) angegeben sind, betragen, wobei die Verdünnungsschritte innerhalb des Verfahrens berücksichtigt werden (siehe Tabelle 2). Bei Süßungsmitteln, die von der derzeitigen EU-Gesetzgebung nicht zugelassen sind (ALI, DUL und NEO), werden fiktive Verwendungshöchstmengen (en: maximum usable dosage, MUD) von etwa 200 mg/l oder 200 mg/kg angenommen.

Der Anwender der Norm hat zu prüfen, ob die in Tabelle D.1 enthaltenen Grenzwerte noch gültig sind. Falls nicht, muss die Massenkonzentration der Standardsubstanz in der Kalibrierlösung angepasst werden, um die aktuellen Verwendungshöchstmengen einzuhalten.

ANMERKUNG Das vorliegende Verfahren ist dadurch vereinfacht, dass eine Kalibrierreihe für beide Lebensmittelmatrices hergestellt wird. Die beschriebene Kalibrierreihe ist an Dosenobst angepasst, da die Verwendungshöchstmengen für Dosenobst in einigen Fällen höher sind als die Verwendungshöchstmengen für Getränke. Wenn nur letztere Matrix analysiert wird, kann die Kalibrierreihe an die Verwendungshöchstmengen von Getränken angepasst werden.

Die folgenden Volumina (siehe Tabelle 2) aus der gemischten Stammlösung (4.17) werden in geeignete Messkolben (10 ml bis 50 ml) pipettiert, diese werden bis zur Marke mit Pufferlösung (4.14) aufgefüllt und der Inhalt wird gründlich geschüttelt.

Tabelle 2 — Herstellung einer Reihe von Standardlösungen

Kalibrier- lösung	Volumen des Messkolbens ml	Der gemischten Stammlösung (4.17) entnommenes Volumen ml	Der Pufferlösung (4.14) entnommenes Volumen ml
1 ^a	10	10	0
2	10	8	2
3	10	6	4
4	10	4	6
5	10	2	8
6	25	3	22
7	50	3	47
8	50	1,5	48,5
^a unverdünnte gemischte Stammlösung (4.17)			

In Tabelle 3 wird die Konzentration des Süßungsmittels *i* in jedem Kalibrierstandard nach der Herstellung entsprechend der Beschreibung in Tabelle 2 genau angegeben.

Sofern nicht alle in dieser Norm behandelten Süßungsmittel in der Routineanalyse untersucht werden, darf bei einzelnen Proben abgewägt werden, die Anzahl der Kalibrierlösungen für diese Proben zu reduzieren.

Tabelle 3 — Konzentration des Süßungsmittels *i* in den einzelnen Standardlösungen

Süßungs- mittel	Kalibrierlösung mg/ml							
	1	2	3	4	5	6	7	8
ACS-K	90,0	72,0	54,0	36,0	18,0	10,8	5,4	2,7 ^a
ALI	50,0	40,0	30,0	20,0	10,0	6,0	3,0 ^a	1,5 ^a
ASP	250,0	200,0	150,0	100,0	50,0	30,0	15,0	7,5
CYC	249,4	199,5	149,7	99,8	49,9	29,9	15,0	7,5
DUL	50,0	40,0	30,0	20,0	10,0	6,0 ^a	3,0 ^a	1,5 ^a
NEO	50,0	40,0	30,0	20,0	10,0	6,0	3,0 ^a	1,5 ^a
NHDC	30,0	24,0	18,0	12,0	6,0	3,6 ^a	1,8 ^a	0,9 ^a
SAC	53,2	42,5	31,9	21,3	10,6	6,4	3,2 ^a	1,6 ^a
SCL	100,0	80,0	60,0	40,0	20,0	12,0	6,0	3,0 ^a
^a Die Konzentration liegt möglicherweise unterhalb der Bestimmungsgrenze (en: Limit of quantification (LOQ)). Wenn das der Fall ist, wird das bei der HPLC-Analyse erhaltene Ergebnis nicht in die Erstellung der Kalibrierkurve einbezogen, z. B. wird im Fall von ACS-K eine Sieben-Punkt-Kalibrierung durchgeführt, bei der das für die Kalibrierlösung 8 erhaltene Ergebnis nicht beachtet wird.								

5 Geräte und Ausrüstung

Übliche Laborgeräte und insbesondere die folgenden:

5.1 Übliche Laborgeräte aus Glas, wie z. B. Messzylinder, Vollpipetten, Bechergläser.

5.2 Analysenwaage, mit der auf 0,01 mg gewogen werden kann.

5.3 Laborwaage, mit der auf 0,01 g gewogen werden kann.

5.4 Eppendorfpipette oder eine gleichwertige Pipette, mit der 1 ml bis 10 ml (verschiedene Volumina) abgegeben werden können.

5.5 Messkolben, von geeignetem Fassungsvermögen, z. B. 10 ml, 25 ml, 50 ml, 100 ml und 500 ml.

5.6 Zentrifugengläser, aus Polypropylen, von geeignetem Fassungsvermögen, z. B. 50 ml.

5.7 Graduierte Reagenzgläser, von geeignetem Fassungsvermögen, z. B. 5 ml.

5.8 Mixer, geeignet für die Homogenisierung von Lebensmittelproben.

5.9 Ultraschallbad

5.10 Zentrifuge, mit einer Zentrifugalbeschleunigung von $4\,000\text{ min}^{-1}$.

5.11 SPE-Vakuumsystem oder ein gleichwertiges System.

5.12 Einrichtung für die Lösemittelverdunstung

5.13 pH-Messgerät

5.14 C₁₈-SPE-Kartuschen

5.15 Umkehrphasen-Trennsäule, vollständig endgruppengeschützt, die eine hinreichende Trennung aller neun Süßungsmittel ermöglicht.

Z. B. mit:

- einer stationären Phase C₁₈/RP von 5 µm;
- einer Länge von 250 mm;
- einem Innendurchmesser von 3 mm.

5.16 HPLC-System,

ausgestattet mit einer binären Pumpe, mit der ein Durchfluss von 0,5 ml/min aufrechterhalten werden kann, vorzugsweise mit einem automatischen Einspritzsystem und mit einem Verdampfungs-Lichtstreu-Detektor.

Es können auch andere Nachweissysteme, wie MS als Ersatz für ELSD, oder bei UV-absorbierenden Substanzen UV und DAD eingesetzt werden, vorausgesetzt, die entsprechenden Leistungskennzahlen können erreicht werden.

5.17 Software für die Datenerfassung und -analyse.

6 Durchführung

6.1 Allgemeines

Die gesamte Untersuchungsprobe wird zerkleinert, wobei eine homogene Suspension (5.8) erhalten wird. Flüssige Proben können direkt extrahiert werden.