

DIN EN 12014-2

ICS 67.080.20

Einsprüche bis 2016-09-15
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN 12014-2:1997-08

Entwurf

**Lebensmittel –
Bestimmung des Nitrat- und/oder Nitritgehaltes –
Teil 2: HPLC/IC-Verfahren für die Bestimmung des Nitratgehaltes in
Gemüse und Gemüseerzeugnissen;
Deutsche und Englische Fassung prEN 12014-2:2016**

Foodstuffs –

Determination of nitrate and/or nitrite content –

Part 2: HPLC/IC method for the determination of nitrate content of vegetables and vegetable products;

German and English version prEN 12014-2:2016

Produits alimentaires –

Détermination de la teneur en nitrates et/ou en nitrites –

Partie 2: Détermination par CLHP/CI de la teneur en nitrates des légumes et produits à base de légumes;

Version allemande et anglaise prEN 12014-2:2016

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2016-07-15 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal des DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an nal@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL), 10772 Berlin, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin.

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 40 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 12014-2:2016) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik - Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN (Deutschland) gehalten wird. Das zuständige deutsche Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-01-07 AA „Nitrat, Nitrit“ des DIN-Normenausschusses Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung der prEN 12014-2 beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Für die in diesem Dokument zitierte internationale Norm wird im Folgenden auf die entsprechende Deutsche Norm hingewiesen:

ISO 3696	siehe DIN ISO 3696
ISO 5725-3	siehe DIN ISO 5725-3

Änderungen

Gegenüber DIN EN 12014-2:1997-08 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) der Anwendungsbereich wurde von 50 mg/kg Nitrat auf 25 mg/kg Nitrat verringert und der obere Grenzwert gestrichen;
- b) die Aufreinigungsverfahren 1 und 2 bei der Herstellung der Probenmesslösung wurden gestrichen;
- c) eine neue Probenmatrix (Eisbergsalat) wurde im Ringversuch geprüft;
- d) Aktualisierung der HPLC/IC-Bedingungen und Chromatogramme im Anhang A;
- e) das Verfahren wurde umfangreich nachvalidiert und die Präzisionsdaten in Anhang B überarbeitet;
- f) redaktionelle Änderungen vorgenommen.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN ISO 3696, *Wasser für analytische Zwecke — Anforderungen und Prüfungen*

DIN ISO 5725-3, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 3: Präzisionsmaße eines vereinheitlichten Messverfahrens unter Zwischenbedingungen*

Lebensmittel — Bestimmung des Nitrat- und/oder Nitritgehaltes — Teil 2: HPLC/IC-Verfahren für die Bestimmung des Nitratgehaltes in Gemüse und Gemüseerzeugnissen

Produits alimentaires — Détermination de la teneur en nitrates et/ou en nitrites — Partie 2 : Détermination par CLHP/CI de la teneur en nitrates des légumes et produits à base de légumes

Foodstuffs — Determination of nitrate and/or nitrite content — Part 2: HPLC/IC method for the determination of nitrate content of vegetables and vegetable products

ICS:

Deskriptoren

Dokument-Typ: Europäische Norm
Dokument-Untertyp:
Dokument-Stage: CEN-Umfrage
Dokument-Sprache: D

STD Version 2.8f

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Einleitung	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Kurzbeschreibung	5
4 Chemikalien	5
5 Geräte und Hilfsmittel	6
6 Durchführung	7
7 Auswertung	8
8 Untersuchungsbericht	10
Anhang A (informativ) Beispiele für HPLC/IC-Chromatogramme	11
Anhang B (informativ) Präzisionsdaten	14
Anhang C (informativ) Beispiele für geeignete HPLC Bedingungen	16
Anhang D (informativ) Beispiele für geeignete IC Bedingungen	17
Literaturhinweise	19

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 12014-2:2016) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik - Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wird EN 12014-2:1997 ersetzen.

Einleitung

Das in dieser Norm beschriebene Verfahren ist für die Überprüfung der europäischen Rechtssetzung für Nitrat in Gemüse und Gemüseerzeugnissen erarbeitet und validiert worden. Laborerfahrungen haben gezeigt, dass sich die Analytik auch für die Bestimmung von Nitrit in anderen Matrices eignet, dies ist jedoch nicht in dem hier zitierten Ringversuch validiert worden.

1 Anwendungsbereich

Diese Europäische Norm legt ein hochleistungs-flüssigchromatographisches (HPLC) und ein ionenchromatographisches (IC) Verfahren zur Bestimmung des Nitratgehaltes in Gemüse und Gemüseerzeugnissen fest. Dieses Verfahren ist auf Proben mit einem Gehalt von 25 mg/kg oder größer anwendbar.

Es wurde auf natürlich kontaminierte und aufgestockte Proben wie Rote Beetesaft mit Nitrat-Massenanteilen von 194 mg/kg und 691 mg/kg, auf pürierte Karotten mit Nitrat-Massenanteilen von 26 mg/kg und 222 mg/kg sowie auf Eisbergsalat mit Nitrat-Massenanteilen von 623 mg/kg und 3 542 mg/kg validiert.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente, die in diesem Dokument teilweise oder als Ganzes zitiert werden, 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).

ISO 3696 *Water for analytical laboratory use — Specification and test methods*

3 Kurzbeschreibung

Das Nitrat wird mit heißem Wasser aus dem Lebensmittel extrahiert. Die Bestimmung erfolgt entweder mit Umkehrphasen-HPLC und UV-Detektion oder mit IC und Leitfähigkeits- oder UV-Detektion.

4 Chemikalien

Sofern nicht anders festgelegt, sind nur Chemikalien von anerkannter Analysenreinheit zu verwenden. Das Wasser muss frei von Nitrat sein und muss der Qualität 1 nach ISO 3696 entsprechen.

4.1 Kaliumnitrat.

4.2 Natriumnitrat.

4.3 Schwefelsäure 96 % ($\rho = 1,84 \text{ mg/ml}^1$).

4.4 Regenerat für Suppressor, z. B. Schwefelsäure ($c = 0,0125 \text{ mol/l}^2$).

20 ml Schwefelsäure (4.3) werden vorsichtig in einen 1 000-ml-Messkolben, der 800 ml Wasser enthält, pipettiert. Die Lösung wird gemischt, bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt und erneut gemischt. 33 ml dieser Lösung werden in einen 1 000-ml-Messkolben überführt, der 500 ml Wasser enthält. Diese Lösung wird bis zur Marke aufgefüllt und gemischt.

4.5 Nitrat-Stammlösung, $\rho = 1\,000 \text{ mg/l}$ (angegeben als Ion NO_3^-)

1,630 7 g Kaliumnitrat (4.1) werden auf 0,1 mg genau eingewogen und in einem 1000-ml-Messkolben in Wasser gelöst.

1) ρ = Massenkonzentration

2) c = Stoffmengenkonzentration

Alternativ können auch 1,370 9 g Natriumnitrat (4.2) verwendet werden. Falls erforderlich können zur Konservierung 15 ml Schwefelsäure (4.3) zugegeben werden. Die Lösung wird gemischt, bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt und wieder gemischt. Diese Lösung ist mindestens zwei Monate haltbar, wenn sie bei +4 °C im Dunkeln (Kühlschrank) aufbewahrt wird.

Alternativ können auch handelsübliche Standardlösungen verwendet werden.

4.6 Nitrat-Standardlösungen.

Aus der Nitrat-Stammlösung (4.5) werden geeignete Verdünnungen, vorzugsweise im Bereich von 1 mg/l bis 50 mg/l hergestellt. Ein entsprechendes Volumen der Nitrat-Stammlösung wird in einen 100-ml-Messkolben pipettiert, bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt, gemischt und durch einen Membranfilter (5.4) filtriert.

4.7 Mobile Phase, für die HPLC.

Beispiele für geeignete Eluenten sind in Anhang C aufgeführt.

4.8 Mobile Phase, für die IC.

Beispiele für geeignete Eluenten sind in Anhang D aufgeführt.

5 Geräte und Hilfsmittel

Übliche Laborausrüstung und insbesondere Folgendes:

5.1 Handelsübliches Labormixgerät, z. B. Laborkutter.

5.2 Homogenisiergerät.

5.3 Faltenfilter (stickstoffarm).

5.4 Membranfilter, für wässrige Lösungen, mit einer Porengröße von 0,45 µm (z. B. regenerierte Cellulose).

5.5 Filterhalter für Membranfilter, mit geeigneter Spritze.

5.6 HPLC Ausrüstung.

5.6.1 Hochleistungs-Flüssigchromatograph, bestehend aus einem Eluentenreservoir, einer Pumpe, einem Probenaufgabesystem, einem UV-Detektor, einstellbar auf 190 nm bis 800 nm und einer Auswerteeinheit.

5.6.2 Analytische (Umkehrphasen-) Trennsäule.

Beispiele für geeignete Trennsäulen sind in Anhang C aufgeführt.

Zum Schutz der analytischen Trennsäule wird eine Vorsäule mit Füllmaterial gleichen Typs verwendet.

5.7 IC-Gerät

5.7.1 Ionenaustausch-Chromatographieeinheit, bestehend aus einem Eluentenreservoir, einer Pumpe, einem Pulsationsdämpfer, einer Dialyseeinheit (falls erforderlich), einem Suppressor (falls erforderlich), einem Probenaufgabesystem mit Probenschleife, einem Leitfähigkeitsdetektor oder UV-Detektor, einstellbar auf 190 nm bis 800 nm und einer Auswerteeinheit.

5.7.2 Analytische Trennsäule.

Beispiele für geeignete Trennsäulen sind in Anhang D aufgeführt.

Zum Schutz der analytischen Trennsäule wird eine Vorsäule mit Füllmaterial gleichen Typs verwendet.

6 Durchführung

6.1 Probenvorbereitung

6.1.1 Flüssige Proben, z. B. Gemüsesäfte

Eine repräsentative Probe wird kräftig geschüttelt, bis sie gut gemischt ist. Falls erforderlich wird die Probe durch ein Faltenfilter (5.3) filtriert oder gegebenenfalls vorher mit Wasser so weit verdünnt, dass die Probenlösung etwa 25 mg/l Nitrat enthält.

6.1.2 Feste Proben, z. B. Blattgemüse

Eine repräsentative Probe wird von anhaftenden Tieren, Erde oder Schmutzpartikeln befreit. Falls erforderlich werden äußere, nicht essbare und beschädigte Blätter entfernt. Die gesamte so vorbereitete Probe wird, z. B. in einem Labormixgerät (5.1), zerkleinert und mit einem Homogenisiergerät (5.2) gründlich homogenisiert. Die Probe wird nach der Homogenisierung unverzüglich untersucht.

Die Anforderungen der europäischen Rechtssetzung müssen berücksichtigt werden, z. B. [1], [2]³⁾. Sofern eine unmittelbare Untersuchung des Probenhomogenats nicht möglich ist, wird die Probe sofort tiefgefroren. Zur Untersuchung wird die Probe möglichst schonend aufgetaut (z. B. über Nacht im Kühlschrank).

Sofern es nicht möglich ist die Probenzerkleinerung von Frischware innerhalb von 24 h durchzuführen, sollte die gesamte Probe tiefgefroren und innerhalb von maximal 6 Wochen untersucht werden.

6.1.3 Pastöse Proben, z. B. Gemüsebrei

Eine repräsentative Probe wird durch mehrmaliges Umrühren, z. B. mit einem Homogenisiergerät, gut durchgemischt.

6.2 Heißwasser-Extraktion der Proben (Feste und pastöse Proben)

Von der nach 6.1.2 bzw. 6.1.3 vorbereiteten Probe werden etwa 10 g Probenmaterial auf 1 mg in einen 500-ml-Erlenmeyerkolben eingewogen. Etwa 400 ml heißes Wasser (etwa 80 °C) werden zugegeben und der Erlenmeyerkolben wird in ein siedendes Wasserbad gestellt. Wenn das Wasserbad die Siedetemperatur erneut erreicht hat, wird der Erlenmeyerkolben 15 min darin gehalten. Die Lösung wird auf Raumtemperatur abgekühlt, in einen 500-ml-Messkolben überführt, bis zur Marke aufgefüllt, gründlich geschüttelt, und der Inhalt durch einen Faltenfilter (5.3) filtriert.

Bei Probenmaterial mit geringem Nitratgehalt werden die Einwaagen und Volumenverhältnisse, falls erforderlich, entsprechend geändert. Falls die Einwaage vergrößert oder verringert wird (z. B. Trockenprodukte), wird empfohlen, die Auswirkung dieser Änderung auf die Leistungsfähigkeit der Methode zu überprüfen.

³⁾ Beispielsweise schreiben die Festlegungen der Verordnung (EG) Nr. 1882/2006 zur Probenvorbereitung (in der Version vom Jahr 2015) vor, dass Proben nicht gewaschen werden dürfen.

6.3 Herstellung der Probenmesslösungen

Die Probenlösungen (6.1.1 und 6.2) werden, falls erforderlich, durch einen geeigneten Membranfilter (5.4) filtriert. Wenigstens ein Minimum von 15 ml der Messlösung (z. B. stärkehaltige Proben) ist erforderlich. Die ersten Milliliter des Filtrates werden verworfen (um eine evtl. Kontamination zu vermeiden). Das Filtrat wird dialysiert oder direkt injiziert. Parallel dazu wird mindestens ein Reagenzien-Blindwert aufgearbeitet.

6.4 Erstellung der Kalibriergeraden

Zur Erstellung der Kalibriergeraden wird eine Reihe von Standardlösungen (4.6) geeigneter Konzentrationen hergestellt (in der Regel fünf verschiedene Konzentrationsstufen und ein Blindwert). Von der Probenlösung und den Standardlösungen werden, wie in 7.1 beschrieben, gleiche Volumina eingespritzt. Die Kalibriergerade wird mit frisch hergestellten Standardlösungen geprüft (siehe z. B. EN ISO/IEC 17025).

6.5 Bestimmung

6.5.1 Hochleistungsflüssigchromatographie

Beispiele für HPLC-Bedingungen, die sich im Ringversuch bewährt haben, sind in Anhang C aufgeführt.

6.5.2 Ionenchromatographie

Beispiele für IC-Bedingungen, die sich im Ringversuch bewährt haben, sind in Anhang D aufgeführt.

7 Auswertung

7.1 Identifizierung und quantitative Bestimmung

Geeignete Volumina (siehe Tabellen C.1 und D.1) der Probenmesslösung (6.3) und der Standardlösung (4.6) werden in das HPLC/IC-System eingespritzt. Der Nitratpeak wird durch Vergleich der Retentionszeiten der Standardlösung und der Probenmesslösung identifiziert.

Die quantitative Bestimmung erfolgt mit einer anhand von Peakflächen oder Peakhöhen erstellten Kalibrierfunktion in mg/kg bzw. mg/l.

Sofern die Peakfläche/Peakhöhe der gemessenen Probenmesslösung außerhalb des Bereichs der Kalibriergeraden liegt, wird die Probenmesslösung mit Wasser verdünnt und die Untersuchung wiederholt.

Die eingespritzten Volumina der Probenmesslösungen und der Standardlösungen müssen gleich sein.

7.2 Berechnung

Der Massenanteil an Nitrat w in mg/kg bzw. die Massenkonzentration ρ in mg/l der Probe wird nach Gleichung (1) berechnet:

$$w \text{ oder } \rho = \frac{x \cdot F \cdot 1\,000 \cdot V}{m} \quad (1)$$

Dabei ist:

- x die aus der Kalibriergeraden abgelesene Nitratkonzentration aus der Probenmesslösung abzüglich Reagenzien-Blindwert, in mg/l;
- F der Verdünnungsfaktor der sich aus jeglichen weiteren Verdünnungsschritten ergibt;

- m die eingesetzte Probenmenge, in g oder ml;
 V das Volumen der Extraktionslösung (6.2), in l, hier 0,5 l.

Das Ergebnis wird, nach der aktuellen Rechtssetzung, in mg/kg oder mg/l ohne Dezimalstellen angegeben.

7.3 Präzision

7.3.1 Allgemeines

Einzelheiten über einen Ringversuch zur Präzision des Verfahrens für Rote Beetesaft, pürierte Karotten und Eisbergsalat sind in Tabelle B.1 angegeben. Die aus dem Ringversuch abgeleiteten Werte sind möglicherweise nicht auf andere als die angegebenen Konzentrationsbereiche und/oder Matrices in Anhang B anwendbar.

7.3.2 Wiederholpräzision

Die absolute Differenz zwischen zwei einzelnen Untersuchungsergebnissen, die an identischem Untersuchungsmaterial durch denselben Bearbeiter mit derselben Geräteausrüstung in kurzen Zeitabständen erhalten wurde, wird in nicht mehr als 5 % der Fälle die Wiederholgrenze r überschreiten.

Die Werte sind: $\bar{x}$

Rote Beetesaft, natürlich kontaminiert	$\bar{x} = 194 \text{ mg/kg}$	$r = 14 \text{ mg/kg}$
Rote Beetesaft, aufgestockt	$\bar{x} = 691 \text{ mg/kg}$	$r = 17 \text{ mg/kg}$
Karotten püriert, natürlich kontaminiert	$\bar{x} = 26 \text{ mg/kg}$	$r = 3,3 \text{ mg/kg}$
Karotten püriert, aufgestockt	$\bar{x} = 222 \text{ mg/kg}$	$r = 12 \text{ mg/kg}$
Eisbergsalat, natürlich kontaminiert	$\bar{x} = 623 \text{ mg/kg}$	$r = 39 \text{ mg/kg}$
Eisbergsalat, aufgestockt	$\bar{x} = 3\,542 \text{ mg/kg}$	$r = 105 \text{ mg/kg}$

7.3.3 Vergleichpräzision

Die absolute Differenz zwischen zwei einzelnen Untersuchungsergebnissen, die an identischem Untersuchungsmaterial in zwei Laboratorien erhalten wurde, wird in nicht mehr als 5 % der Fälle die Vergleichsgrenze R überschreiten.

Die Werte sind:

Rote Beetesaft, natürlich kontaminiert	$\bar{x} = 194 \text{ mg/kg}$	$R = 51 \text{ mg/kg}$
Rote Beetesaft, aufgestockt	$\bar{x} = 691 \text{ mg/kg}$	$R = 32 \text{ mg/kg}$
Karotten püriert, natürlich kontaminiert	$\bar{x} = 26 \text{ mg/kg}$	$R = 12 \text{ mg/kg}$
Karotten püriert, aufgestockt	$\bar{x} = 222 \text{ mg/kg}$	$R = 71 \text{ mg/kg}$
Eisbergsalat, natürlich kontaminiert	$\bar{x} = 623 \text{ mg/kg}$	$R = 122 \text{ mg/kg}$
Eisbergsalat, aufgestockt	$\bar{x} = 3\,542 \text{ mg/kg}$	$R = 876 \text{ mg/kg}$

8 Untersuchungsbericht

Der Untersuchungsbericht sollte die Angaben nach EN ISO/IEC 17025 und muss mindestens die folgenden Informationen enthalten:

- a) alle notwendigen Informationen zur Identifizierung der Probe (Art, Herkunft und Bezeichnung der Probe);
- b) eine Verweisung auf diese Europäische Norm;
- c) das Datum der Probenahme und die Art des Probenahmeverfahrens (wenn bekannt);
- d) das Datum des Probeneinganges;
- e) das Datum der Untersuchung;
- f) die Untersuchungsergebnisse und die Einheiten, in denen sie angegeben wurden;
- g) jegliche im Verlauf der Prüfung beobachteten besonderen Punkte;
- h) alle Arbeitsschritte, die nicht im Verfahren festgelegt sind oder als optional angesehen wurden und welche die Ergebnisse möglicherweise beeinflusst haben.