

DIN EN 16466-1



ICS 67.220.10

Einsprüche bis 2023-06-14
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN 16466-1:2013-03

Entwurf

**Lebensmittelauthentizität –
Isotopenanalyse von Essigsäure und Wasser in Essig –
Teil 1: ^2H -NMR-Analyse von Essigsäure;
Deutsche und Englische Fassung prEN 16466-1:2023**

Food authenticity –
Isotopic analysis of acetic acid and water in vinegar –
Part 1: ^2H -NMR analysis of acetic acid;
German and English version prEN 16466-1:2023

Authenticité des aliments –
Analyse isotopique de l'acide acétique et de l'eau dans le vinaigre –
Partie 1: Analyse RMN- ^2H de l'acide acétique;
Version allemande et anglaise prEN 16466-1:2023

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2023-04-14 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 von 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 oder Am DIN-Platz, 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 34 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 16466-1:2023) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 460 „Lebensmittelauthentizität“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Normungsgremium ist der Arbeitskreis NA 057-08-02-06 AK „Stabilisotopenanalyse“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

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

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

Änderungen

Gegenüber DIN EN 16466-1:2013-03 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Ausweitung auf andere Matrices als Weinessig;
- b) Änderung der NMR-Sequenz;
- c) redaktionell überarbeitete Norm.

**Lebensmittelauthentizität – Isotopenanalyse von Essigsäure und Wasser in Essig –
Teil 1: ^2H -NMR-Analyse von Essigsäure**

Food authenticity – Isotopic analysis of acetic acid and water in vinegar – Part 1: ^2H -NMR analysis of acetic acid

Authenticité des aliments – Analyse isotopique de l'acide acétique et de l'eau dans le vinaigre – Partie 1: Analyse RMN- ^2H de l'acide acétique

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Einleitung	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Kurzbeschreibung	5
5 Reagenzien	5
6 Prüfeinrichtung	6
7 Durchführung	7
7.1 Extraktion von Essigsäure aus Essig	7
7.1.1 Allgemeines	7
7.1.2 Flüssig-Flüssig-Extraktion	7
7.1.3 Reinigung des Extrakts	8
7.2 Kombinierte NMR-Bestimmung von Essigsäure aus Essig	10
7.2.1 Allgemeines	10
7.2.2 Vorbereitung der NMR	10
7.2.3 Aufnahme kombinierter NMR-Spektren	10
7.2.4 Berechnungen und Angabe der Ergebnisse	11
7.2.5 Qualitätskontrolle der Analyse	12
8 Präzision	12
8.1 Allgemeines	12
8.2 Wiederholpräzision	12
8.3 Vergleichpräzision	12
Anhang A (informativ) Ergebnisse des Ringversuchs (2020)	13
Literaturhinweise	14

Bilder

Bild 1 — Flüssig-Flüssig-Extraktionsapparat	7
Bild 2 — Beispiel einer vollständig ausgestatteten Destillationsvorrichtung (aus Thomas und Jamin, 2009)	9

Tabellen

Tabelle A.1 — Ergebnisse des Versuchs für den Parameter $(D/H)_{CH_3}$ von Essigsäure	13
---	----

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 16466-1:2023) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 460 „Lebensmittelauthentizität“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wird EN 16466-1:2013 ersetzen.

Die wesentlichen Änderungen im Vergleich zur Vorgängerausgabe sind nachstehend aufgeführt:

- a) Erweiterung auf andere Matrices als Weinessig;
- b) Modifikation des NMR-Ablaufs;
- c) die Norm wurde redaktionell überarbeitet.

Einleitung

Essig ist in EN 13188 [3] als Essigsäure-Lösung definiert, die durch doppelte Gärung entsteht:

- a) Umwandlung von Zuckern in Ethanol und
- b) Umwandlung von Ethanol in Essigsäure.

Im Gegensatz dazu ist in EN 13189 [4] Essigsäure als „Erzeugnis, das aus Rohstoffen nicht landwirtschaftlicher Herkunft hergestellt wird“ definiert.

Durch die Europäischen Verordnungen 1308/2013 [5] ist Weinessig als Erzeugnis definiert, das ausschließlich durch Essigsäuregärung aus Wein hergestellt wird, der wiederum als Erzeugnis definiert ist, das ausschließlich durch alkoholische Gärung der frischen, auch eingemaischten, Weintrauben oder des Traubenmostes gewonnen wird. In ähnlicher Weise wird Apfelessig als Erzeugnis definiert, das durch die Essigsäuregärung von Äpfeln hergestellt wird. Somit kann der Essigsäureanteil dieser Essige nicht durch die Gärung von Fremdzuckern (z. B. aus Rüben oder Zuckerrohr) gewonnen werden.

In der Verordnung (EG) Nr. 813/2000 [6] werden Aceto balsamico tradizionale di Modena und Aceto balsamico tradizionale di Reggio Emilia als g. U. (geschützte Ursprungsbezeichnung) festgelegt, während Aceto Balsamico di Modena in der Verordnung (EG) Nr. 583/2009 [7] als g. g. A. (geschützte geografische Angabe) festgelegt wird.

Bei allen Arten von Essig sollten sowohl das Ethanol als auch die Essigsäure durch ein biotechnologisches Verfahren erhalten werden und die Verwendung von Essigsäuren, die entweder aus Erdölderivaten oder durch Pyrolyse von Holz gewonnen werden, ist entsprechend der vorstehenden Definitionen nicht zulässig.

Die Isotopenanalyse von aus Essig extrahierter Essigsäure durch ^2H -SNIF-NMR und ^{13}C -IRMS ermöglicht es zu unterscheiden, ob der Essig aus Trauben oder anderen Quellen, wie z. B. Zuckerrüben, Zuckerrohr, Malz, Äpfeln und Synthese, stammt [8]. Isotopenanalytische Verfahren wurden vom Europäischen Komitee für Normung (CEN) und zum Teil von der Internationalen Organisation für Rebe und Wein (OIV, fr: Organization Internationale de la Vigne et du Vin) als ein Mittel zum Nachweis des nicht zulässigen Vorhandenseins von fremder Essigsäure und Fremdwasser in Essig (CEN) und insbesondere in Weinessig (OIV) anerkannt. Die angewendeten Verfahren sind EN 16466-1 für D/H auf der Methyl-Seite von Essigsäure $[(\text{D}/\text{H})_{\text{CH}_3}]$ mittels ^2H -SNIF-NMR (en: Site Specific Natural Isotope Fractionation-Nuclear Magnetic Resonance), EN 16466-2 und OIV 510/2013 für die Analyse von $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ in Essigsäure mittels IRMS (en: Isotope Ratio Mass Spectrometry) sowie EN 16466-3 und OIV 511/2013 für die Analyse von $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ in Wasser mittels IRMS. Kürzlich wurde experimentell nachgewiesen, dass die OIV- und CEN-Verfahren auch für die Analyse von aus Aceto Balsamico di Modena extrahierter Essigsäure (D/H, ^{13}C) geeignet sind [9].

Dieses Dokument bildet die Grundlage für die Analyseverfahren. Der Aufbau der erforderlichen Geräte hängt in hohem Maße von deren Konstruktionsprinzipien ab, und die spezifischen Empfehlungen der Hersteller sollten eingehalten werden. Es soll als Rahmen dienen, innerhalb dessen der Analytiker seine eigene analytische Arbeit in Übereinstimmung mit dem Standardverfahren festlegen kann.

Dieses Dokument beruht auf einem internationalen Ringversuch zu den Verfahren, der in *Molecules* 2020, 25, 2932 [1] veröffentlicht wurde, und ist eine Aktualisierung und Erweiterung der vorherigen Fassung, die 2013 nach einem ersten internationalen Ringversuch veröffentlicht wurde, der in *Analytica Chimica Acta* 649 (2009) 98-105 [2] veröffentlicht und unter der Schirmherrschaft des Ständigen Internationalen Ausschusses der Essighersteller (CPIV, fr: Comité Permanent. International du Vinaigre, Brüssel) organisiert wurde.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein isotonenanalytisches Verfahren zur Überprüfung der Authentizität von Essig und von Lebensmitteln, die Essig als Zutat enthalten, (zum Beispiel Aceto Balsamico di Modena) mit einer Dichte von weniger als $1,28 \text{ g/cm}^3$ fest. Dieses Verfahren ist anwendbar auf Essigsäure aus Essig (aus Wein, Apfelwein, Agraralkohol usw.), um den botanischen Ursprung der Essigsäure zu charakterisieren und um Verfälschungen von Essig durch Verwendung synthetischer Essigsäure oder Essigsäure nicht zulässigen Ursprungs nachzuweisen (in Kombination mit dem in EN 16466-2 beschriebenen Verfahren).

Die Isotonenanalyse der extrahierten Essigsäure durch ^2H -NMR-Spektroskopie beruht auf einem ähnlichen Verfahren, das bereits für die Weinanalyse genormt wurde [10].

Die Anwendung dieses Dokuments kann die Verwendung gefährlicher Stoffe, Vorgänge und Prüfeinrichtungen vorsehen. Dieses Dokument erhebt nicht den Anspruch, alle damit verbundenen Sicherheitsprobleme zu behandeln. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders dieses Dokuments, vor der Anwendung geeignete Maßnahmen für die Sicherheit und den Gesundheitsschutz des Personals zu ergreifen und die Anwendbarkeit bestehender nationaler und europäischer Regeln und Vorschriften (Regelwerke) zu prüfen.

2 Normative Verweisungen

Es gibt keine normativen Verweisungen in diesem Dokument.

3 Begriffe

In diesem Dokument werden keine Begriffe aufgeführt.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: verfügbar unter <http://www.electropedia.org/>

4 Kurzbeschreibung

Die Essigsäure aus Essig wird zuerst mit Diethylether (oder alternativ einem anderen Lösemittel mit ähnlichen Eigenschaften, z. B. tert-Butylmethylether) unter Anwendung eines Flüssig-Flüssig-Extraktionsapparates mindestens 5 h lang extrahiert. Anschließend wird das Lösemittel durch Destillation entfernt. Die aus der Probe extrahierte Essigsäure wird dann mittels ^1H -NMR und ^2H -SNIF-NMR unter Anwendung einer kombinierten NMR-Untersuchung [10], [11] analysiert: das Massenverhältnis zwischen Tetramethylharnstoff (TMU, en: tetramethylurea) und Essigsäure wird durch ^1H -NMR bestimmt, und das Isotonenverhältnis der Wasserstoffatome auf der Methyl-Seite von Essigsäure, $(\text{D}/\text{H})_{\text{CH}_3}$, wird durch ^2H -SNIF-NMR (kernmagnetische Resonanzanalyse von Deuterium) an demselben NMR-Röhrchen bestimmt.

5 Reagenzien

Alle verwendeten Reagenzien und Verbrauchsmaterialien müssen die festgelegten Anforderungen des angewendeten Verfahrens/Gerätes (wie vom Hersteller angegeben) erfüllen. Jedoch können alle Reagenzien und Verbrauchsmaterialien durch andere mit gleichen Leistungsmerkmalen ersetzt werden.

5.1 Diethylether, analysenrein. Reinheit $\geq 99 \%$.

5.2 Standard N,N-Tetramethylharnstoff (TMU), Standard-TMU mit einem kalibrierten Isotonenverhältnis D/H.

5.3 Hexafluorbenzol (C_6F_6), wird als Substanz zur Stabilisierung der Feldfrequenz (Lock-Substanz) verwendet. Alternativ Trifluoressigsäure (TFA, CAS-Nr.: 76-05-1) oder Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA, CAS-Nr.: 407-25-0) oder eine Mischung davon (z. B. 10 ml C_6F_6 + 1 ml TFA).

6 Prüfeinrichtung

Alle nachstehend aufgeführten Materialien sind im Handel erhältlich und werden in verschiedenen Laboren der Lebensmittelüberwachung eingesetzt:

6.1 Für die Extraktion von Essigsäure aus Essig

6.1.1 Flüssig-Flüssig-Extraktionsapparat, 400 ml oder 800 ml.

6.1.2 Cadiot- (mit Drehband) oder Vigreux-Destillationskolonne.

6.1.3 Rundkolben, 500 ml.

6.1.4 Erlenmeyerkolben, 250 ml.

6.1.5 Kühler.

6.1.6 Heizmantel.

6.1.7 Bimssteinchen.

6.1.8 Mikropipetten, die die Entnahme von 0,1 ml bis 5 ml ermöglichen.

6.1.9 Abzugshaube.

6.2 Für die kombinierte SNIF-NMR-Analyse von Essigsäure aus Essig

6.2.1 Filter, 0,45 μm .

6.2.2 NMR-Spektrometer, ausgestattet mit einem selektiven Deuterium-Messkopf (Deuterium-Sonde), der auf eine Frequenz ν_0 abgestimmt ist, die für den Kanal B0 charakteristisch ist (z. B. B0 = 7,05 T, ν_0 = 46,05 MHz und für B0 = 9,4 T, ν_0 = 61,4 MHz), mit einem Entkopplungskanal (B2) und einem Kanal zur Stabilisierung der Feldfrequenz (Lock) bei der Fluorfrequenz. Der zweite Kanal, B2, wird auch für die ^1H -NMR-Untersuchung verwendet.

Die bei der ^2H -Untersuchung am Spektrum ermittelte Auflösung, umgewandelt ohne exponentielle Multiplikation (d. h. LB = 0) und angegeben als die Halbwertsbreite des Methylsignals der Essigsäure und des Methylsignals von TMU muss weniger als 0,7 Hz betragen.

Die Empfindlichkeit (Signal/Rausch-Verhältnis), gemessen mit einem exponentiellen Multiplikationsfaktor LB gleich 2 Hz, muss mindestens 150 für das Methylsignal von Essigsäure, die weniger als 25 % Wasser enthält, betragen.

Zum Beispiel sind bei Anwendung eines NMR-Spektrometers des Feldes B0 = 7,05 T 200 Scans erforderlich, um diesen Wert zu erreichen (abhängig vom Rauschen des Messgerätes).

6.2.3 Automatischer Probenwechsler (optional).

6.2.4 Software zur Datenauswertung, die die Lorentz-Integration ermöglicht.

6.2.5 Probenröhrchen, 10 mm, von ausreichender Qualität für 400-MHz-NMR-Spektrometer.

6.2.6 Abzugshaube.

7 Durchführung

7.1 Extraktion von Essigsäure aus Essig

7.1.1 Allgemeines

Das Extraktionsverfahren ist nur auf Proben mit einer Dichte von weniger als $1,25 \text{ g/cm}^3$ anwendbar. Bei Proben mit einer höheren Dichte muss die Probe verdünnt und das Volumen entsprechend angepasst werden.

7.1.2 Flüssig-Flüssig-Extraktion

Ein Flüssig-Flüssig-Extraktionsapparat ist in Bild 1 dargestellt.



Bild 1 — Flüssig-Flüssig-Extraktionsapparat

125 ml Diethylether werden in einen 250-ml-Rundkolben gegeben. In Abhängigkeit vom Essigsäuregehalt des Essigs wird ein 400-ml- oder 800-ml-Flüssig-Flüssig-Extraktionsapparat verwendet. Am Ende des Extraktionsvorgangs muss die Ausbeute an reiner Essigsäure mindestens 6 ml betragen.

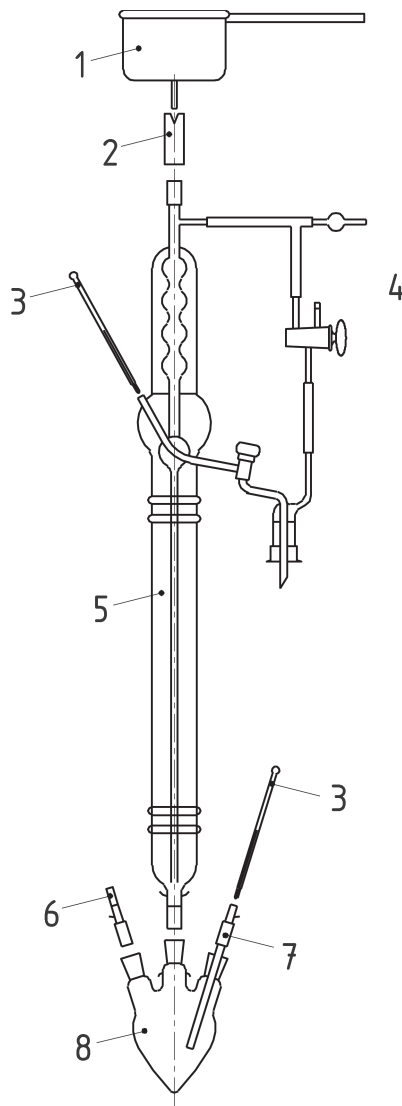
Etwa 400 ml der Probe werden in den Extraktionsapparat eingefüllt und mit Diethylether wird aufgefüllt. Der Rundkolben des Extraktionsapparates wird angebracht und im Heizmantel angeordnet. Das Wasser für den Kühler, der sich im oberen Teil des Extraktionsapparates befindet, wird angestellt und das Heizgerät wird eingeschaltet. Die Extraktion muss nach Beginn des Rückflusses mindestens 5 h dauern.

Nach dieser Zeitdauer werden die im Extraktionsapparat enthaltene wässrige und die organische Lösung getrennt. Die organische Lösung aus dem Extraktionsapparat wird rückgewonnen und zu dem Extrakt im zuvor tarierten Rundkolben gegeben.

ANMERKUNG Wenn ein kleiner Teil der wässrigen Phase zusammen mit der organischen Lösung rückgewonnen wurde, ist es möglich, mit wasserfreiem Natriumsulfat zu trocknen und dann durch ein Baumwoll- oder Papierfilter filtrieren.

7.1.3 Reinigung des Extrakts

Die im Rundkolben enthaltene in Diethylether gelöste Essigsäure wird an einer Cadiotkolonne (Drehbandkolonne, wie nachstehend in Bild 2 dargestellt) oder an einer Vigreux-Kolonne destilliert.



Legende

- 1 Motor
- 2 wasserdichter Verschluss
- 3 Thermometer
- 4 Atmosphäre
- 5 Kolonne
- 6 Stopfen
- 7 Sonde
- 8 Kolben

Bild 2 — Beispiel einer vollständig ausgestatteten Destillationsvorrichtung (aus Thomas und Jamin, 2009)

Zum Auffangen des Destillats wird ein geeigneter 250-ml-Erlenmeyerkolben verwendet.

Das Wasser für den Kühler wird angestellt und der Heizmantel eingeschaltet. Während der Destillation des Lösemittels darf nur eine leichte Erwärmung erfolgen (Siedepunkt von Diethylether: 34 °C). Wenn die Dämpfe das obere Ende der Kolonne erreichen, wird das Drehband gestartet. Nach einer Wartezeit von 5 min wird der Hahn geöffnet, um das Lösemittel im Erlenmeyerkolben aufzufangen. Während der Destillation wird geprüft, ob der Rückfluss während der gesamten Extraktion noch vorhanden ist, andernfalls wird die Temperatur des Heizmantels erhöht. Der Extraktionsschritt dauert je nach Rückflussgeschwindigkeit zwischen 60 min und