

DIN EN 16852

ICS 67.160.10

Einsprüche bis 2015-05-20

Entwurf**Lebensmittel –****Bestimmung von Ethylcarbamat in Steinobstbränden, Obstbränden und anderen alkoholischen Getränken –****GC-MS-Verfahren;****Deutsche und Englische Fassung prEN 16852:2015**

Foodstuffs –

Determination of ethyl carbamate in stone fruit spirits, fruit marc spirits and other spirit drinks –

GC-MS method;

German and English version prEN 16852:2015

Produits alimentaires –

Détermination de la teneur en carbamate d'éthyle dans les eaux-de-vie de fruits à noyaux, les eaux-de-vie de marc de fruits et les autres boissons alcoolisées –

Méthode GC-MS;

Version allemande et anglaise prEN 16852:2015

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2015-03-20 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

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

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal des DIN unter www.entwuerfe.din.de 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/stellungnahme 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 (Hausanschrift: 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 37 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 16852:2015) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige nationale Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-01-14 AA „Prozesskontaminanten“ des DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung der prEN 16852:2015 beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Lebensmittel — Bestimmung von Ethylcarbamat in Steinobstbränden, Obstbränden und anderen alkoholischen Getränken — GC-MS-Verfahren

Produits alimentaires — Détermination de la teneur en carbamate d'éthyle dans les eaux-de-vie de fruits à noyaux les eaux-de-vie de marc de fruits et les autres boissons alcoolisées — Méthode GC-MS

Foodstuffs — Determination of ethyl carbamate in stone fruit spirits, fruit marc spirits and other spirit drinks — GC-MS method

ICS:

Deskriptoren

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

Inhalt

	Seite
Vorwort	3
1 Anwendungsbereich	4
2 Normative Verweisungen	4
3 Kurzbeschreibung	4
4 Chemikalien	4
5 Geräte	7
6 Durchführung	8
7 Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC-MS)	9
8 Berechnung	10
9 Präzisionsdaten	11
10 Untersuchungsbericht	12
Anhang A (informativ) Typische Chromatogramme	13
Anhang B (informativ) Präzisionsdaten	17
Literaturhinweise	18

Vorwort

Dieses Dokument (prEN 16852:2015) 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 wurde unter einem Mandat erarbeitet, das die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelszone dem CEN erteilt haben.

WARNUNG — Bei der Anwendung dieses Dokuments ist es möglich, dass gefährliche Substanzen, Arbeitsgänge und Geräte angewendet werden. Dieses Dokument erhebt nicht den Anspruch, dass alle mit seiner Anwendung verbundenen Sicherheitsprobleme angesprochen werden. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders dieses Dokuments, geeignete Vorkehrungen für den Arbeits- und Gesundheitsschutz zu treffen und vor der Anwendung die Anwendbarkeit einschränkender Vorschriften zu bestimmen.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Verfahren zur Bestimmung von Ethylcarbamat (EC) in Steinobstbränden, Obstbränden und anderen alkoholischen Getränken mit Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC-MS) fest.

Das Verfahren wurde in einem Ringversuch für Steinobstbrände und Obstliköre im Bereich von 0,253 mg/l bis 1,11 mg/l validiert. Die Linearität des Ansprechverhaltens des Gerätes wurde jedoch für den Konzentrationsbereich von 0,10 mg/l bis 4,0 mg/l (vereinfachtes Verfahren) und von 0,025 mg/l bis 3,0 mg/l (Verfahren mit Probenreinigung) nachgewiesen.

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).

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

3 Kurzbeschreibung

Steinobstbrände mit einem Gesamt-Trockenextraktgehalt von weniger als 10 g/l werden nach der Einstellung des Alkoholgehaltes des Getränkes, falls angegeben, und der Zugabe des internen Standards (ISTD), direkt in das Gaschromatographie/Massenspektrometrie-System (GC-MS) injiziert. Mit Zucker versetzte (gesüßte) Brandys, Liköre und andere alkoholische Getränke mit einem höheren Gesamt-Trockenextraktgehalt werden zuerst auf eine Kartusche für die Festphasenextraktion (en: solid phase extraction, SPE) überführt und das Ethylcarbamat mit einem Gemisch von Cyclohexan und Ethylacetat eluiert.

Steinobstbrände können Vorstufen von Ethylcarbamat enthalten, die unter dem Einfluss von Sonnenlicht in EC umgewandelt werden, z. B. während der Haltbarkeitsdauer einer Spirituose. Um den tatsächlichen Gehalt an EC zu ermitteln, müssen vor Licht schützende Glasgeräte (z. B. Braunglas) während der Analyse eingesetzt werden.

4 Chemikalien

Sofern nicht anders festgelegt, sind nur Chemikalien von anerkannter Analysenreinheit und Wasser der Qualität 1 nach EN ISO 3696:1995 zu verwenden. Die Lösemittel müssen einen für die HPLC-Analyse geeigneten Reinheitsgrad (HPLC-Qualität) aufweisen.

WARNUNG — Weil Ethylcarbamat als toxisch und möglicherweise als karzinogen für Menschen (von der Internationalen Agentur für Krebsforschung (International Agency for Research on Cancer (IARC) in Gruppe 2A eingestuft) angesehen wird, müssen bei der Arbeit mit den Standardsubstanzen geeignete Schutzmaßnahmen getroffen werden.

4.1 Ethanol absolut

4.2 Ethanollösungen

4.2.1 Ethanollösung, mit einem Volumenanteil von 65 %.

65 ml Ethanol (4.1) werden in einen 100-ml-Messkolben pipettiert und der Inhalt wird mit Wasser bis zum Nennvolumen verdünnt.

4.2.2 Ethanollösung, mit einem Volumenanteil von 35 %.

35 ml Ethanol (4.1) werden in einen 100-ml-Messkolben pipettiert und der Inhalt wird mit Wasser bis zum Nennvolumen verdünnt.

4.3 Cyclohexan

4.4 Ethylacetat

4.5 Elutionsmittel, ein Volumenteil Cyclohexan wird mit einem Volumenteil Ethylacetat gemischt.

4.6 *n*-Pentan

4.7 Stabiles Trägermaterial

Etwa 20 g einer Festphase aus chemisch inerten, großporiger und hochreiner Diatomeenerde (Kieselgur), z.B. Extrelut® NT¹⁾

4.8 Natriumchlorid

4.9 Ethylcarbamat, > 99 %.

4.10 Butylcarbamat

4.11 *d*₅-Ethylcarbamat, > 99 %.

4.12 Ethylcarbamat-Stammlösung, Massenkonzentration $\rho(\text{EC}) = 1\,000\text{ mg/l}$.

50 mg Ethylcarbamat (4.9) werden auf 0,01 mg genau in einen 50-ml-Messkolben eingewogen und der Inhalt wird mit Ethanol (4.1) bis zum Nennvolumen verdünnt.

4.13 Ethylcarbamat-Arbeitslösung 1, $\rho(\text{EC}) = 100\text{ mg/l}$.

5 ml Ethylcarbamat-Stammlösung (4.12) werden in einen 50-ml-Messkolben pipettiert und der Inhalt wird mit Ethanol (4.1) bis zum Nennvolumen verdünnt.

4.14 Ethylcarbamat-Arbeitslösung 2, $\rho(\text{EC}) = 10\text{ mg/l}$.

5 ml Ethylcarbamat-Arbeitslösung 1 (4.13) werden in einen 50-ml-Messkolben pipettiert und der Inhalt wird mit Ethanol (4.1) bis zum Nennvolumen verdünnt.

4.15 Butylcarbamat-Stammlösung, $\rho(\text{BC}) = 1\,000\text{ mg/l}$.

50 mg Butylcarbamat (4.10) werden auf 0,01 mg genau in einen 50-ml-Messkolben eingewogen und mit Ethanol (4.1) bis zum Nennvolumen verdünnt.

4.16 *d*₅-Ethylcarbamat-Stammlösung, $\rho(d_5\text{-EC}) = 1\,000\text{ mg/l}$.

50 mg *d*₅-Ethylcarbamat (4.11) werden auf 0,01 mg genau in einen 50-ml-Messkolben eingewogen und der Inhalt wird mit Ethanol (4.1) bis zum Nennvolumen verdünnt.

4.17 Butylcarbamat-Arbeitslösung, $\rho(\text{BC}) = 40\text{ mg/l}$.

2 ml Butylcarbamat-Stammlösung (4.15) werden in einen 50-ml-Messkolben pipettiert. 33 ml Ethanol (4.1) werden zugefügt und der Inhalt wird mit Wasser bis zum Nennvolumen verdünnt.

1) Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu den gleichen Ergebnissen führen.

4.18 d_5 -Ethylcarbamat-Arbeitslösung, $\rho(d_5\text{-EC}) = 40 \text{ mg/l}$.

2 ml d_5 -Ethylcarbamat-Stammlösung (4.16) werden in einen 50-ml-Messkolben pipettiert. 33 ml Ethanol (4.1) werden zugefügt und der Inhalt wird mit Wasser bis zum Nennvolumen verdünnt.

4.19 Ethylcarbamat-Stammlösungen für das vereinfachte Verfahren, Trockenextrakt < 10 g/l.

Die Injektion von Proben mit einem Trockenextraktgehalt von mehr als 10 g/l könnte abhängig von der Art des verwendeten Liners und der GC-Säule zu einem schnellen Verlust der Empfindlichkeit des GC-MS-Systems führen. Bei Proben mit einem größeren Trockenextraktgehalt wird eine Reinigung der Probe empfohlen (siehe 6.2).

Die Ethylcarbamat-Stammlösungen für das vereinfachte Verfahren werden nach Tabelle 1 hergestellt. Zur Durchführung der GC-Analyse werden die Ethylcarbamat-Stammlösungen bis zum ausgewählten Alkoholgehalt hergestellt.

Beispielsweise wird für eine Ethanollösung mit einem Volumenanteil von 70 % die in Tabelle 1 angegebene Menge der Ethylcarbamat-Verdünnung in einen 10-ml-Messkolben pipettiert und die entsprechende Menge Ethanol (4.1) zugefügt. Der Messkolben wird mit einer Ethanollösung mit einem Volumenanteil von 65 % (4.2.1) bis zu Marke aufgefüllt.

Für eine Ethanollösung mit einem Volumenanteil von 40 % wird eine Ethanollösung mit einem Volumenanteil von 35 % (4.2.2) zum Auffüllen der Messkolben verwendet.

Tabelle 1 — Herstellung von Ethylcarbamat-Stammlösungen für das vereinfachte Verfahren

Standardlösung	Volumen der EC-Arbeitslösung 2 (4.14) μl	Volumen des Ethanols (4.1) μl	Konzentration des Ethylcarbamats mg/l
C0	0	500	0,00
C1	100	400	0,10
C2	200	300	0,20
C3	500	0	0,50
	Volumen der EC-Arbeitslösung 1 (4.13) μl		
C4	80	420	0,80
C5	100	400	1,00
C6	200	300	2,00
C7	300	200	3,00
C8	400	100	4,00

Nach dem Füllen des Kolbens bis zur Marke werden 0,25 ml Butylcarbamat-Arbeitslösung (4.17) in jeden der 10-ml-Messkolben pipettiert.

Es ist sehr wichtig, dass die Volumina der Standardlösungen und der Probenlösungen (vor einer optionalen Einstellung des Alkoholgehaltes, siehe 6.1) gleich sind. Üblicherweise werden 10 ml verwendet.

Die Lösung wird gründlich durchmischt und ein aliquoter Anteil in ein GC-Fläschchen überführt, das anschließend mit einer Septumkappe verschlossen wird.

4.20 Ethylcarbamat-Standardlösungen für das Verfahren mit Probenreinigung

Die in Tabelle 2 angegebene Menge der Ethylcarbamat-Standardlösung wird in ein GC-Fläschchen pipettiert und die entsprechende Menge Ethanol (4.1) und 100 µl d_5 -Ethylcarbamat-Arbeitslösung (4.18) werden zugefügt. Das GC-Fläschchen wird mit einer Septumkappe verschlossen und der Inhalt gründlich durchmischt.

Die in Tabelle 2 in mg/l angegebene Ethylcarbamatmenge ist auf eine Probenmenge von 20 ml bezogen.

Bei Verwendung eines anderen Probenvolumens muss die Menge, in µg/ISTD, durch die Probenmenge, in ml, geteilt werden, um die Ethylcarbamatmenge, in mg/l, zu ermitteln.

Tabelle 2 — Herstellung von Ethylcarbamat-Stammlösungen für das Verfahren mit Probenreinigung

Standard- lösung	Volumen der EC-Arbeitslösung 2 (4.14) µl	Volumen des Ethanol (4.1) µl	Konzentration des Ethylcarbamats µg/ISTD	Konzentration des Ethylcarbamats mg/l, 20 ml Probe
C0	0	900	0,00	0,00
C1	50	850	0,50	0,025
C2	200	700	2,00	0,10
C3	500	400	5,00	0,25
	Volumen der EC-Arbeitslösung 1 (4.13) µl			
C4	100	800	10,0	0,50
C5	150	750	15,0	0,75
C6	200	700	20,0	1,00
C7	400	500	40,0	2,00
C8	600	300	60,0	3,00

ANMERKUNG Die von den Teilnehmern des Ringversuchs bereitgestellten Daten haben gezeigt, dass es möglich ist, verschiedene interne Standards für das vereinfachte Verfahren zu verwenden (z. B. d_5 -Ethylcarbamat, Propylcarbamat (PC) oder Methylcarbamat (MC)).

5 Geräte

Übliche Laborausrüstung und insbesondere Folgende. Die Messkolben sollten EN ISO 1042:1999 entsprechen.

5.1 Glasfläschchen für die GC-Analyse, aus Braunglas mit Septumkappen.

5.2 Säulen für die Festphasenextraktion (SPE), 20 ml Volumen.

5.3 Rotationsverdampfer, mit einem Wasserbad oder ein geeigneter Verdampfer zu Einengung.

5.4 Gaschromatograph mit massenspektrometrischem Nachweis (GC-MS), geeignet zur Einzelionenregistrierung (en: single ion monitoring, SIM), vorzugsweise mit einem temperaturprogrammierten Verdampfungsinjektor (en: programmed temperature vaporising, PTV).

ANMERKUNG Die PTV-Injektion ermöglicht die Injektion größerer Extraktvolumina im Vergleich zur Split-/splitlosen (SSL) Injektion. Dies bietet größere Signalintensitäten und kann im Hinblick auf die Nachweisgrenze (LOD) von Vorteil sein. Jedoch erwies sich in der Validierungsstudie während des Ringversuchs für den Anwendungsbereich dieser Europäischen Norm die Split-/splitlose Injektion als geeignet.

5.5 Kapillarsäule für die Gaschromatographie, stationäre Phase mit Polyethylenglycol (PEG), z. B. DB-WAX, 30 m × 0,25 mm Innendurchmesser × 0,25 µm Filmdicke.

6 Durchführung

6.1 Vorbereitung von Proben für das vereinfachte Verfahren, Trockenextrakt < 10 g/l

10 ml der Probe werden in Probenkolben aus Braunglas pipettiert. Um den bevorzugten Alkoholgehalt zu erhalten, werden die berechnete Menge Ethanol oder Wasser (siehe Formel 1 bis Formel 4) und 0,25 ml des internen Standards Butylcarbamat-Arbeitslösung (4.17) hinzugefügt. Die dadurch erhaltene Probenlösung wird gründlich durchmischt.

Ein aliquoter Anteil der so erhaltenen Probenlösung wird in ein GC-Fläschchen überführt und der GC-MS-Analyse unterzogen.

Für die GC-MS-Analyse eines Alkoholgehalts mit einem Volumenanteil von 70 % wird die Zugabe wie folgt berechnet:

Alkoholgehalt > 70 Volumen-%:

$$w = \frac{y}{7} - 10 \quad (1)$$

Alkoholgehalt < 70 Volumen-%:

$$e = \frac{(70 - y)}{3} \quad (2)$$

Für die GC-MS-Analyse eines Alkoholgehalts mit einem Volumenanteil von 40 % wird die Zugabe wie folgt berechnet:

Alkoholgehalt > 40 Volumen-%:

$$w = 10 - \frac{400}{y} \quad (3)$$

Alkoholgehalt < 40 Volumen-%:

$$e = \frac{(400 - 10y)}{(100 - y)} \quad (4)$$

Dabei ist

- y der ursprüngliche Alkoholgehalt des Getränkes, in Volumen-% (Volumenanteil);
- e die zugefügte Menge des Ethanols (4.1), in ml;
- w die zugefügte Wassermenge, in ml.

Unsicherheiten beim Alkoholgehalt, die sich aus der Volumenkontraktion ergeben, wenn der Alkohol mit Wasser gemischt wird, haben keinen signifikanten Einfluss auf die gemessene Menge von EC.

6.2 Vorbereitung von Proben für das Verfahren mit Probenreinigung

20 g der Festphase aus chemisch inerten, großporiger und hochreiner Diatomeenerde (Kieselgur) (4.7) werden mit 10 g Natriumchlorid (4.8) gemischt und auf eine Säule für die Festphasenextraktion überführt. In einem Labor-Becherglas werden 20 ml der Probe mit 100 µl d_5 -Ethylcarbamat-Arbeitslösung (4.18) gemischt. Die Probe wird auf das Material der Festphasenextraktion überführt und das Becherglas mit 2 ml Ethanol (4.1) ausgespült. Der Probe wird ermöglicht, für 15 min in das Material einzudringen. Anschließend wird das Extraktionsmaterial zweimal mit 20 ml n -Pentan (4.6) gewaschen, das Eluat wird verworfen. Das Ethylcarbamat wird in mehrere Portionen von etwa 20 ml mit insgesamt 90 ml Elutionsmittel (4.5) eluiert. Das Eluat wird auf etwa 1 ml eingengt und in ein GC-Fläschchen überführt.

Wird zur Einengung des Eluats ein Rotationsverdampfer eingesetzt, haben sich die folgenden Bedingungen als geeignet erwiesen: 25 kPa bis 30 kPa (250 mbar bis 300 mbar) und eine Wasserbadtemperatur von 40 °C.

ANMERKUNG Falls die Proben während des SPE-Reinigungsverfahrens trüb werden, kann das eingengte Eluat durch ein 0,45-mm-Spritzenfilter filtriert werden.

7 Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC-MS)

7.1 GC-Bedingungen

Die folgenden Bedingungen geben ein Beispiel für angemessene GC-Arbeitsbedingungen, die zur Analyse von Ethylcarbamat mithilfe eines PTV-Injektors geeignet sind. Wie in der ANMERKUNG in 5.4 angegeben, darf ebenso ein SSL-Injektor verwendet werden.

Säule:	WAX, 30 m × 0,25 mm Innendurchmesser × 0,25 µm Filmdicke (siehe 5.5)
Injektionsprogramm:	PTV, splitlos Splitlose Zeit: 1,00 min, Split-Durchfluss: 20 ml/min PTV-Programm: 50 °C — 14,5 °C/s — 250 °C (5 min)
Trärgas	He, 1,2 ml/min konstanter Durchfluss
Injektionsvolumen:	1 µl
Ofenprogramm:	50 °C (1 min) — 5 °C/min — 150 °C — 20 °C/min — 220 °C (10,5 min)
Retentionszeiten:	EC, d_5 -EC etwa 18 min, BC etwa 22 min

7.2 MS-Bedingungen

Die folgenden Bedingungen geben ein Beispiel für angemessene MS-Arbeitsbedingungen, die zur Analyse von Ethylcarbamat geeignet sind.

Ionisation:	Elektronenstoß, Positiv-Modus (EI+), Einzelionenregistrierung (SIM)
Quellentemperatur:	230 °C
Elektronenionisierungsenergie	70 eV
Ionenfalle:	Übertragungsleitung: 240 °C Mikroscans: 3 max. Ionenzeit: 20 ms Massendefekt: 0
Quadrupol:	Übertragungsleitung: 250 °C Verweilzeit: 100 ms
Ausgewählte Ionen:	m/z 44 und m/z 62 für EC und BC m/z 64 für d_5 -EC

Beispiele für typische Chromatogramme sind in Anhang A enthalten.

8 Berechnung

Am Anfang jeder Reihe werden die in 4.19 oder 4.20 aufgeführten Kalibrierlösungen injiziert. Vor der Injektion werden alle Lösungen auf Raumtemperatur gebracht. Die Injektion der Standards muss von der niedrigeren zur höheren Konzentration erfolgen, um das Risiko einer Kreuzkontamination zu verringern.

Die Kalibrierkurve wird mit der analytischen Software des betreffenden GC-MS-Systems oder mit anderen Berechnungsprogrammen (z. B. Tabellenkalkulation) durch Auftragen der Peakflächenverhältnisse von EC und ISTD gegen die Konzentration von EC in den Kalibrierlösungen berechnet.

Die EC-Menge in den Proben wird mit der ermittelten Kalibrierfunktion berechnet. Die Menge wird auf zwei signifikante Stellen, üblicherweise in mg/l, angegeben.

Liegen die Peakflächenverhältnisse außerhalb des Kalibrierbereiches, werden die Proben entsprechend verdünnt.