

DIN EN 16857

ICS 67.160.20; 67.230

Einsprüche bis 2015-06-17

Entwurf**Lebensmittel –****Bestimmung von Benzol in Erfrischungsgetränken, anderen Getränken und gemüsehaltiger Babynahrung mit Headspace Gaschromatographie/Massenspektrometrie; Deutsche und Englische Fassung prEN 16857:2015**

Foodstuffs –

Determination of benzene in soft drinks, other beverages and vegetable-based infant foods by headspace gas chromatography mass spectrometry (HS-GC-MS);
German and English version prEN 16857:2015

Produits alimentaires –

Détermination de la teneur en benzène dans les boissons non alcoolisées, les jus de fruits et les denrées alimentaires pour nourrissons et enfants en bas âge;
Version allemande et anglaise prEN 16857:2015

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2015-04-17 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 33 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 16857:2015) 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 16857 beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Lebensmittel — Bestimmung von Benzol in Erfrischungsgetränken, anderen Getränken und in gemüsehaltiger Babynahrung mit Headspace-Gaschromatographie/Massenspektrometrie (HS-GC-MS)

Produits alimentaires — Détermination de la teneur en benzène dans les boissons non alcoolisées, les jus de fruits et les denrées alimentaires pour nourrissons et enfants en bas âge

Foodstuffs — Determination of benzene in soft drinks, other beverages and vegetable-based infant foods by headspace gas chromatography mass spectrometry (HS-GC-MS)

ICS:

Deskriptoren

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

STD Version 2.5a

Inhalt

	Seite
Vorwort	3
1 Anwendungsbereich	4
2 Normative Verweisungen	4
3 Kurzbeschreibung	4
4 Reagenzien	4
5 Geräte	7
6 Durchführung	8
7 HS-GC-MS-Analyse	9
8 Berechnung	11
9 Präzisionsdaten	12
10 Untersuchungsbericht	13
Anhang A (informativ) Typische Chromatogramme	14
Anhang B (informativ) Präzisionsdaten	15
Literaturhinweise	16

Vorwort

Dieses Dokument (prEN 16857:2015) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Horizontale Verfahren — Lebensmittelanalytik“ 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. Benzol wurde von der Internationalen Agentur für Krebsforschung (International Agency for Research on Cancer (IARC)) als krebserregend für Menschen eingestuft (siehe [1]).

1 Anwendungsbereich

Diese Europäische Norm legt ein Verfahren zur Bestimmung von Benzol in Erfrischungsgetränken, anderen Getränken und in gemüsehaltiger Babynahrung mit Headspace-Gaschromatographie/Massenspektrometrie (HS-GC-MS) fest. Das Verfahren wurde in einem Ringversuch durch die Analyse von aufgestockten Proben von kohlensäurehaltigen Erfrischungsgetränken, kohlensäurefreien (stillen) Fruchtsaftgetränken, kohlensäurehaltigen Fruchtsaftgetränken, Gemüse- und Fruchtsäften mit Karotten, gemüsehaltiger Babynahrung und fleischhaltiger Babynahrung im Bereich von 1,9 µg/kg bis 18,6 µg/kg validiert. Die Linearität des Ansprechverhaltens des Gerätes wurde jedoch für den Konzentrationsbereich von 0,5 µg/kg bis 20 µg/kg nachgewiesen. Die Bestimmungsgrenze (en: LOQ, limit of quantification) hängt von der Art des Gerätes ab, sie kann aber im Allgemeinen im Bereich von 0,5 µg/kg bis 1,0 µg/kg erwartet werden.

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

Die Probe wird homogenisiert. Ein Teil der zu untersuchenden Probe wird in einem geschlossenen System mit als internen Standard hinzugefügtem isotopen-markiertem Benzol erhitzt. Zur Identifizierung und Quantifizierung wird eine Menge der Gasphase im Dampfraum in ein GC-MS-System injiziert. Die Probenaufgabe erfolgt mit einem Split-/splitlosen Injektor. Die chromatographische Trennung erfolgt an einer GC-Kapillarsäule mittlerer Polarität. Das Benzol wird bei 70 eV ionisiert und im Modus der Einzelionenregistrierung (en: selected ion monitoring, SIM) aufgezeichnet und unter Bezug auf stabilisotopen-markierte Analoge quantitativ bestimmt.

4 Reagenzien

4.1 Allgemeines

Sofern nicht anders festgelegt, sind nur Reagenzien von anerkannter Analysenreinheit und Wasser der Qualität 1 nach EN ISO 3696:1995 zu verwenden. Die Standardlösungen werden vorzugsweise gravimetrisch hergestellt. Für die Herstellung des sowohl nativen als auch des stabilisotopen-markierten Benzols wird eine Analysenwaage (5.1) verwendet.

WARNUNG 1 — Benzol wird als karzinogen angesehen. Personen, die dieses Dokument anwenden, sollten mit der üblichen Laborpraxis vertraut sein. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders dieses Dokuments, Vorkehrungen zu treffen, die mit den geltenden Praktiken des Arbeits- und Gesundheitsschutzes übereinstimmen.

WARNUNG 2 — Chemikalienabfälle sind nach den geltenden Umweltschutzregeln und -bestimmungen zu entsorgen.

WARNUNG 3 — Bei der Verwendung von Kunststoffen wie Polypropylen oder Polytetrafluorethylen (PTFE) sind gewisse Vorsichtsmaßnahmen notwendig, da Benzol auf diesen Materialien absorbiert werden kann.

4.2 Benzol, C_6H_6 , mit einer Reinheit $\geq 99,0 \%$ (CAS 71-43-2).

Aufbewahrung bei 4 °C bis 6 °C.

4.3 Benzol- d_6 , mit einer Reinheit $\geq 99,6$ Atom-% D (CAS 1076-43-3).

Aufbewahrung bei 4 °C bis 6 °C.

4.4 Helium, gereinigtes Druckgas, mit einer Reinheit von 99,995 % oder höher.

4.5 Methanol, HPLC-Qualität (CAS 67-56-1).

4.6 Herstellung der Stamm- und Standardlösungen

4.6.1 Allgemeines

Sämtliche Standardlösungen werden bevorzugt gravimetrisch hergestellt. Die Leermassen (Eigenmassen) sämtlicher Behälter und die Massen nach jedem Herstellungsschritt werden aufgezeichnet und zur Berechnung der Konzentrationen der Standards verwendet.

Vorausgesetzt dass die verwendeten Glasgeräte EN ISO 1042 (siehe [2]) entsprechen, darf ebenfalls die volumetrische Herstellung von Standards angewendet werden.

4.6.2 Benzol-Stammlösung, Massenkonzentration ρ etwa 2,20 mg/ml.

20 ml $\pm$ 0,1 ml Methanol werden in ein 20-ml-Headspace-Fläschchen (5.17) pipettiert und das Fläschchen wird mit einer Bördelkappe verschlossen. Das verschlossene Fläschchen wird auf 0,1 mg genau gewogen und die Masse als W_1 aufgezeichnet. Mit einer Mikroliterspritze werden 50 μ l Benzol (4.2) durch das Septum des Fläschchens in das Methanol überführt, der Inhalt wird durch kräftiges Schütteln oder Verwirbeln (Vortexen) durchmischt. Das verschlossene Fläschchen wird erneut gewogen und die Masse (W_2) auf 0,1 mg genau aufgezeichnet. Zur Bestimmung der Masse des überführten Benzols (W_3) wird W_1 von W_2 subtrahiert. Die Konzentration der Stammlösung wird durch Dividieren von W_3 durch das Gesamtvolumen (20,05 ml) berechnet.

Falls verfügbar, dürfen alternativ handelsübliche zertifizierte Standardlösungen verwendet werden. Die Benzol-Stammlösung wird bei 4 °C bis 6 °C aufbewahrt, jedoch sollte sie vor der Verwendung die Umgebungstemperatur erreichen. Nach zwei Wochen ist die Lösung zu verwerfen. Sobald das Septum über der Stammlösung angestochen wurde, muss die Kappe ersetzt werden.

4.6.3 Intermediäre Benzol-Standardlösung, ρ etwa 54 μ g/ml.

Mit einer Mikroliterspritze werden 500 μ l Benzol-Stammlösung (4.6.2) in ein verschlossenes Headspace-Fläschchen überführt, das 20 ml $\pm$ 0,1 ml Methanol enthält, der Inhalt wird kräftig geschüttelt. Die Lösung wird täglich frisch hergestellt. Die genaue Konzentration der Stammlösung (4.6.2) wird berechnet.

4.6.4 Benzol-Arbeitsstandardlösung, ρ etwa 0,5 μ g/ml.

Mit einer Mikroliterspritze werden 200 μ l intermediäre Benzol-Standardlösung (4.6.3) in ein verschlossenes Headspace-Fläschchen überführt, das 20 ml $\pm$ 0,1 ml Wasser enthält, der Inhalt wird kräftig geschüttelt. Die Lösung wird täglich frisch hergestellt. Die genaue Konzentration aus der Stammlösung (4.6.2) wird berechnet. Dieser Standard wird zur Herstellung einer 6-Punkt-Kalibrierung von 0,5 μ g/kg bis 20 μ g/kg (siehe 4.7) verwendet.

4.6.5 Benzol- d_6 -Stammlösung des interne Standards (IS), Massenkonzentration ρ etwa 2,36 mg/ml.

20 ml $\pm$ 0,1 ml Methanol werden in ein 20-ml-Headspace-Fläschchen (5.17) pipettiert und das Fläschchen wird mit einer Bördelkappe verschlossen. Das verschlossene Fläschchen wird auf 0,1 mg genau gewogen und die Masse als W_1 aufgezeichnet. Mit einer Mikroliterspritze werden 50 μ l Benzol- d_6 (4.3) durch das Septum des Fläschchens in das Methanol überführt, der Inhalt wird durch kräftiges Schütteln oder Verwirbeln (Vortexen) durchmischt. Das verschlossene Fläschchen wird erneut gewogen und die Masse (W_2) auf 0,1 mg genau aufgezeichnet. Zur Bestimmung der Masse des überführten Benzol- d_6 (W_3) wird W_1 von W_2 subtrahiert. Die Konzentration des IS-Standards wird durch Dividieren von W_3 durch das Gesamtvolumen (20,05 ml) berechnet.

Falls verfügbar, dürfen alternativ handelsübliche zertifizierte Standardlösungen verwendet werden. Die interne Standard-Stammlösung von Benzol- d_6 wird bei 4 °C bis 6 °C aufbewahrt, jedoch sollte sie vor der Verwendung die Umgebungstemperatur erreichen. Nach zwei Wochen ist die Lösung zu verwerfen. Sobald das Septum über der internen Standard-Stammlösung angestochen wurde, muss die Kappe ersetzt werden.

4.6.6 Benzol- d_6 -Arbeitslösung des internen Standards, ρ etwa 4,2 μ g/ml.

Mit einer Mikroliterspritze werden 36 μ l interne Standard-(IS)-Stammlösung von Benzol- d_6 (4.6.5) in ein verschlossenes Headspace-Fläschchen überführt, das 20 ml $\pm$ 0,1 ml Wasser enthält, der Inhalt wird kräftig geschüttelt. Die Lösung wird täglich frisch hergestellt. Die genaue Konzentration aus der internen Standard-Stammlösung (4.6.5) wird berechnet.

4.7 Herstellung der Kalibrierstandardlösungen

Kalibrierstandardlösungen von etwa 0 μ g/kg, 0,5 μ g/kg, 1 μ g/kg, 2,5 μ g/kg, 5 μ g/kg, 10 μ g/kg und 20 μ g/kg Benzol sowie etwa 10 μ g/kg IS werden nach dem folgenden Schema hergestellt.

10 ml $\pm$ 0,05 g Wasser werden jeweils in sieben 20-ml-Headspace-Fläschchen gegeben und mit einer Direktverdrängerpipette werden die Benzol-Arbeitsstandardlösung (4.6.4) und die IS-Arbeitsstandardlösung (4.6.6) entsprechend den in Tabelle 1 angegebenen Werten überführt. Zur Vermeidung von Benzolverlusten werden die Fläschchen unmittelbar nach der Zugabe der Benzol- und Benzol- d_6 -Lösungen verschlossen.

Tabelle 1 — Herstellung der Kalibrierstandardlösungen

Masse des Wassers	Volumen von 0,5 μ g/ml Benzol (4.6.4)	Volumen von 4,2 μ g/ml Benzol- d_6 (4.6.6)	Volumen des Wassers	Benzol-Konzentration	Benzol- d_6 -Konzentration
g	μ l	μ l	μ l	μ g/kg	μ g/kg
10	0	25	400	0	10,1
10	10	25	390	0,5	10,1
10	20	25	380	1,0	10,1
10	50	25	350	2,5	10,1
10	100	25	300	5,0	10,1
10	200	25	200	10	10,1
10	400	25	0	20	10,1

5 Geräte

WARNUNG — Sämtliche Glasgeräte müssen sorgfältig gereinigt werden (ausgenommen Glasgeräte zum einmaligen Gebrauch).

Übliche Laborglasgeräte und -ausrüstung und insbesondere Folgende:

5.1 Analysenwaage, mit einer Genauigkeit von 0,0001 g.

5.2 Oberschalige Präzisionswaage, mit einer Genauigkeit von 0,001 g.

5.3 Gerät für die Headspace-Gaschromatographie und Massenspektrometrie (HS-GC-MS), das Folgendes umfasst:

5.3.1 Headspace-Probenahme- und Injektionssystem, geeignet für Inkubationstemperaturen bis zu 60 °C und eine Inkubationszeit von 30 min. Die Spritze (Nadel) für die Headspace-Probenahme sollte geeignet sein, 100 °C und für die Transferline 105 °C aufrechtzuerhalten.

5.3.2 Injektionssystem, Split-/splitloser Injektor, geeignet für Temperaturen bis zu 250 °C.

ANMERKUNG Ein temperaturprogrammierter Verdampfungsinjektor (en: programmed temperature vaporising, PTV) darf alternativ zur Split-/splitlos-Injektion eingesetzt werden. Jedoch erwies sich in der Validierungsstudie während des Ringversuchs für den Anwendungsbereich dieser Norm die Split-/splitlos-Injektion als ebenso geeignet.

5.4 GC-Ofen, geeignet für Temperaturen von bis zu 240 °C und mit Temperaturprogrammierung.

5.5 Probenkarussell, geeignet für den Einsatz mit 20-ml-Headspace-Fläschchen und Bördekappen (5.17)

5.6 GC-Kapillarsäule, DB-VRX¹⁾, mit einer Länge von 60 m, einem Innendurchmesser von 0,25 mm, $d_f = 1,4 \mu\text{m}$ ($\beta = 44$) oder eine beliebige Säule mit vergleichbaren Trenneigenschaften.

5.7 Transferlinie zum Massenspektrometer, mit einer Temperaturregeleinrichtung, geeignet für Temperaturen von bis zu 250 °C.

5.8 Massenspektrometer mit den folgenden Kenngrößen:

- Elektronenstoßionisationsquelle;
- Ionisierungsenergie von 70 eV;
- Massenauflösung: mindestens 1 u;
- Temperaturregeleinrichtungen für die Ionenquelle (230 °C) und die GC-MS-Schnittstelle (225 °C). Wahlweise eine Temperaturregeleinrichtung für den Quadrupol (150 °C);
- Abgleichstabilität von mindestens 48 h (ermöglicht die Analyse einer Reihe von Proben oder Standards);
- Linearitätsbereich von mindestens zwei Größenordnungen.

5.9 Rechnergestütztes Gerätesteuersystem, das die Programmierung der Headspace-Probenahme, der gaschromatographischen und massenspektrometrischen Erfassung in Abhängigkeit von der Laufzeit ermöglicht.

5.10 Datenverarbeitungssystem, rechnergestützt.

1) Dieses ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produktes durch CEN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweislich zu den gleichen Ergebnissen führen.

5.11 Bördelzange, zum Verschließen der Glasfläschchen mit den Bördelkappen (5.17).

5.12 Öffnungszange für Bördelkappen, zum Entfernen der Bördelkappen von den Glasfläschchen (5.17).

5.13 Ofen, mit Umluft, die bei $90\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ gehalten wird.

5.14 Pipetten, aus Glas, mit einem Fassungsvermögen von 10 ml und 20 ml.

5.15 Pipetten, kalibrierte Direktverdrängung, mit einem Fassungsvermögen von 10 µl bis 400 µl.

5.16 Spritzen, aus kalibriertem Präzisionsglas, mit einem Fassungsvermögen von 50 µl, 100 µl, 250 µl und 500 µl.

5.17 Fläschchen, aus Glas, für die Headspace-Analyse (Headspace-Vials), mit einem Fassungsvermögen von 20 ml, mit Bördelverschlüssen aus Aluminium und PTFE-beschichteten Silikonsepten. Falls erforderlich, werden die Fläschchen in einem Umluftofen für etwa 1 h bei $90\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ getrocknet und anschließend auf Umgebungstemperatur abgekühlt.

6 Durchführung

6.1 Allgemeines

Die Bildung von Benzol kann in Erfrischungsgetränken (und anderen Lebensmitteln) auftreten, die Benzoatsalze enthalten, besonders bei den mit Ascorbinsäure angereicherten Produkten, wenn sie höheren Temperaturen und/oder UV-Licht ausgesetzt werden. Um Veränderungen bei den Benzolkonzentrationen auszuschließen, sollte die Analyse innerhalb eines möglichst kurzen Zeitraums nach dem Eingang der Proben durchgeführt werden. Die Proben sollten unter geeigneten Temperaturbedingungen und im Dunkeln aufbewahrt werden. Es gibt keine Hinweise darauf, dass Benzol sich während der Analyse nach diesem Verfahren bildet.

6.2 Probenbearbeitung

Die Proben werden in doppelter Ausführung bearbeitet. Als eine allgemeine Vorsichtsmaßnahme muss das gesamte beim Labor eingegangene Probenmaterial zum Erhalt einer repräsentativen und homogenen Laborprobe verwendet werden, ohne eine Sekundärkontamination einzubringen.

Gefrorene Proben werden durch Lagerung in einem Kühlschrank (4 °C bis 6 °C) über Nacht vollständig aufgetaut und anschließend wird ihnen vor der Ausführung der folgenden Arbeitsschritte ermöglicht, die Raumtemperatur anzunehmen.

6.3 Vorbereitung der Untersuchungsprobe

Um eine Untersuchungsprobe zu erhalten und zur Vermeidung von Benzolverlust werden zügig Probenportionen von $10\text{ g} \pm 0,01\text{ g}$ in Headspace-Fläschchen eingewogen, 25 µl der $4,2\text{ µg/ml}$ Benzol- d_6 -Arbeitslösung des internen Standards (4.6.6) und 400 µl Wasser werden hinzugefügt, das Fläschchen wird fest mit der Kappe verschlossen und der Inhalt durch angemessenes Schütteln oder Verwirbeln gemischt.

Bei einigen festen Proben kann es erforderlich sein, die Probe mit Wasser in einem Probe/Wasser-Verhältnis von 1:1 aufzuschlämmen, um ein geeignetes mobiles Produkt zu erhalten, z. B. $5\text{ g} \pm 0,005\text{ g}$ Probe aufgeschlämmt in $5\text{ ml} \pm 0,005\text{ ml}$ Wasser. Dieser Prozess wird die LOQ effektiv um einen Faktor von 2 erhöhen und die daraus folgende Verdünnung muss bei der Endberechnung des Benzolgehaltes nach Abschnitt 8 berücksichtigt werden.