

DIN EN 17958



ICS 67.180.10; 67.180.20

Einsprüche bis 2023-03-27

Entwurf

**Lebensmittelauthentizität –
Bestimmung des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes von Mono- (Fructose und Glucose),
Di- und Trisacchariden in Honig durch
Flüssigchromatographie-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie
(LC-IRMS);
Deutsche und Englische Fassung prEN 17958:2023**

Food authenticity –

Determination of the $\delta^{13}\text{C}$ value of mono- (fructose and glucose), di-, and trisaccharides in honey by liquid chromatography-isotope ratio mass spectrometry (LC-IRMS);
German and English version prEN 17958:2023

Authenticité des aliments – Détermination de la valeur $\delta^{13}\text{C}$ des mono- (fructose et glucose), di-, et trisaccharides dans le miel par chromatographie liquide-spectrométrie de masse à rapport isotopique (LC-IRMS);
Version allemande et anglaise prEN 17958:2023

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2023-01-27 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 35 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17958:2023) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 460 „Lebensmittelauthentizität“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige nationale 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.

Für die in diesem Dokument zitierten Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 5725-2 siehe DIN ISO 5725-2

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

Nationaler Anhang NA
(informativ)

Literaturhinweise

DIN ISO 5725-2, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 2: Grundlegende Methode für die Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision eines vereinheitlichten Messverfahrens*

– *Entwurf* –

E DIN EN 17958:2023-03

– Leerseite –

Lebensmittelauthentizität – Bestimmung des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes von Mono- (Fructose und Glucose), Di- und Trisacchariden in Honig durch Flüssigchromatographie-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (LC-IRMS)

Food authenticity – Determination of the $\delta^{13}\text{C}$ value of mono- (fructose and glucose), di-, and trisaccharides in honey by liquid chromatography-isotope ratio mass spectrometry (LC-IRMS)

Authenticité des aliments – Détermination de la valeur $\delta^{13}\text{C}$ des mono- (fructose et glucose), di-, et trisaccharides dans le miel par chromatographie liquide-spectrométrie de masse à rapport isotopique (LC-IRMS)

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Einleitung	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Kurzbeschreibung	6
5 Reagenzien	6
6 Prüfeinrichtung	7
7 Durchführung	8
7.1 Vorbereitung der Untersuchungsprobe	8
7.2 Vorbereitung der Lösung der Untersuchungsprobe	8
7.3 Einrichtung und Leistungsqualifizierung des LC-IRMS	8
7.3.1 Einrichtung der LC-IRMS-Schnittstelle	8
7.3.2 Kalibrierung des IRMS	8
7.4 Bestimmung und Analysensequenz	8
7.5 Berechnungen	8
7.5.1 Allgemeines	8
7.5.2 Berechnung von verbindungsspezifischen $\delta^{13}\text{C}$ -Werten unter Anwendung einer linearen Zweipunkt-Normierung	8
8 Präzision	9
8.1 Allgemeines	9
8.2 Wiederholpräzision	9
8.3 Vergleichpräzision	9
Anhang A (informativ) Von den Teilnehmern bei der Vergleichsprüfung zwischen Laboratorien angewendete Untersuchungsbedingungen	11
Anhang B (informativ) Präzisionsdaten	12
Literaturhinweise	15

Tabellen

Tabelle 1 — Wiederholpräzision	9
Tabelle 2 — Vergleichpräzision	9
Tabelle A.1 — Bei der Vergleichsprüfung zwischen Laboratorien angewendete Untersuchungsbedingungen	11
Tabelle B.1 — Präzisionsdaten für $\delta^{13}\text{C}$ von Fructose	12
Tabelle B.2 — Präzisionsdaten für $\delta^{13}\text{C}$ von Glucose	12
Tabelle B.3 — Präzisionsdaten für $\delta^{13}\text{C}$ von Disacchariden	13
Tabelle B.4 — Präzisionsdaten für $\delta^{13}\text{C}$ von Trisacchariden	13

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17958:2023) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 460 „Lebensmittelauthentizität“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Einleitung

Honig ist ein natürliches Süßungsmittel mit attraktiven sensorischen Eigenschaften. Die Nachfrage ist im Laufe der Jahre gestiegen, was zum Teil auf das Bevölkerungswachstum, aber auch auf die Bevorzugung natürlicher und unverarbeiteter Lebensmittel durch die Verbraucher zurückzuführen ist. Es handelt sich um eine weltweit gehandelte Ware, die komplexen Handelswegen folgt, was die Kontrolle von Qualität und Authentizität erschwert. Honig gehört zu den Waren, die am stärksten anfällig für Betrug sind [1]. Die EU-Honigrichtlinie legt die Kriterien für die Zusammensetzung und Authentizität von Honig fest [2]. Die Internationale Honigkommission hat eine Reihe von Analyseverfahren genormt [3], die die Durchsetzung der Bestimmungen der Richtlinie ermöglichen. Diese Verfahren sind weit verbreitet, aber nicht immer für die Beurteilung der Authentizität des Erzeugnisses geeignet: im Besonderen nicht für die Verfälschung von Honig durch nicht deklarierte Verdünnung mit fremden Zuckern/Süßungsmitteln, die zu den am häufigsten vorkommenden Fällen gehört.

Sirupe, die die Zusammensetzung von Honig imitieren und durch chemische und/oder enzymatische Modifikation von Stärke oder Saccharose hergestellt werden, sind schwer festzustellen [4]. Wenn das Ausgangsprodukt aus einer Pflanze stammt, die den Hatch-Slack-(Kortschak-)Zyklus zur Kohlenstofffixierung nutzt (C_4 -Pflanze), wie z. B. Mais oder Zuckerrohr, bietet die Analyse des Verhältnisses stabiler Kohlenstoffisotope (SCIRA, en: stable carbon isotope ratio analysis) unter Verwendung einer Kombination aus einem Elementaranalysator und einem Isotopenverhältnis-Massenspektrometer (EA-IRMS) die Möglichkeit, Zusatzstoffe bis zu einem Gehalt von 7 % nachzuweisen [5]. Zucker aus C_3 -Pflanzen, die den Calvin-Benson-Zyklus nutzen, wie z. B. Zuckerrübe oder Zucker aus Reis- oder Weizenstärke, werden mit SCIRA nicht nachgewiesen. Die Kombination von Flüssig(keits)chromatographie (LC) und IRMS (LC-IRMS) bietet neue Möglichkeiten zum Nachweis von Honigverfälschungen mit Zuckern aus C_3 -Pflanzen und erhöht die Empfindlichkeit beim Nachweis von C_4 -Zuckern [6][7]. Das Verfahren hat an Zuspruch gewonnen, wurde aber noch nie einer Validierung durch mehrere Labore unterzogen, was eine Voraussetzung für die Weiterentwicklung zu einer Norm durch eine Normungsorganisation ist.

Ein LC-IRMS-Verfahren zur Bestimmung des $^{13}C/^{12}C$ -Isotopenverhältnisses von Glucose, Fructose, Glycerin und Ethanol in Erzeugnissen weinbaulichen Ursprungs wurde von der Internationalen Organisation für Rebe und Wein (OIV, frz: Organisation Internationale de la Vigne et du Vin) gemeinsam untersucht und zur Aufnahme in den Sammelband der internationalen Methoden zur Analyse von Wein und Traubenmost empfohlen (OIV-OENO-Resolution 479-2017).

Dieses Dokument bildet die Grundlage für das Analyseverfahren. Der Aufbau der erforderlichen Prüfeinrichtung hängt weitgehend von deren Konstruktionsprinzipien ab, und die spezifischen Empfehlungen der Hersteller sollten eingehalten werden. Es soll als Rahmen dienen, in dem der Analytiker seine eigene analytische Arbeit in Übereinstimmung mit dem genormten Verfahren festlegen kann.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Verfahren zur Bestimmung des Verhältnisses stabiler Kohlenstoffisotope ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) von in Honig enthaltenen Zuckern mittels Flüssigchromatographie gekoppelt mit einem Isotopenverhältnis-Massenspektrometer (LC-IRMS) zur Trennung der Verbindungen und anschließender Bestimmung des $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisses von Mono-, Di- und Trisacchariden fest. Diese Verhältnisse können zur Beurteilung der Authentizität von Honig verwendet werden, indem sie mit den veröffentlichten Richtwerten für echten Honig verglichen werden, da sich die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse von Zuckern in echtem Honig und Zuckern in Verfälschungsmitteln (Sirupe aus stärkereichen Pflanzen oder aus Zuckerrohr oder Zuckerrüben) in gewissem Maße unterscheiden. Der Prozess der Konformitätsbewertung ist nicht Teil dieses Dokuments.

2 Normative Verweisungen

Es gibt keine normativen Verweisungen in diesem Dokument.

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

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 <https://www.electropedia.org/>

3.1

Isotopen-Delta-Wert

δ

Verhältnis von stabilen Isotopen einer Probe, ausgedrückt bezogen auf eine Referenz

Anmerkung 1 zum Begriff: Für Kohlenstoff ist dieser Ausdruck in Gleichung (1) angegeben:

$$\delta_{\text{ref}}(^{13}\text{C}/^{12}\text{C}) = \frac{R_{\text{sample}}(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})}{R_{\text{reference}}(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})} - 1 \quad (1)$$

Anmerkung 2 zum Begriff: Der Term $\delta_{\text{ref}}(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})$ wird häufig vom IUPAC-Format in $\delta^{13}\text{C}_{\text{ref}}$ geändert; in diesem Dokument wird aus Gründen der Vertrautheit das IUPAC-Format verwendet.

Anmerkung 3 zum Begriff: Um die internationale Vergleichbarkeit von Isotopen-Delta-Werten sicherzustellen, wird eine gemeinsame Referenz verwendet; diese Referenz ist ein internationales Messnormal, das vereinbarungsgemäß zugeordnet wird und dessen Isotopen-Delta-Wert genau gleich null ist.

Anmerkung 4 zum Begriff: Die Isotopen-Delta-Werte für die natürliche Isotopenhäufigkeit von Kohlenstoff in Lebensmitteln sind klein und werden in Promille (‰) und nicht in ihrer ursprünglichen Form angegeben.

3.2

Vienna Pee Dee Belemnite

VPDB

internationales Messnormal für $\delta^{13}\text{C}$

Anmerkung 1 zum Begriff: $\delta^{13}\text{C}$ ist ein virtuelles Carbonat.

3.2.1

VPDB-Skala des Isotopen-Delta-Werts von Kohlenstoff

genauer Isotopen-Delta-Wert, der dem Calciumcarbonat-Referenzmaterial NBS 19 zugeordnet wurde, von $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = +1,95 \text{ ‰}$

Anmerkung 1 zum Begriff: Um die Rückführbarkeit auf die VPDB-Skala sicherzustellen, müssen die Isotopen-Delta-Werte von Kohlenstoff mit zwei oder mehr Referenzmaterialien normiert werden, um Skalierungseffekte während der Messung zu berücksichtigen.

3.3

Masse-zu-Ladung-Verhältnis

Masse/Ladungs-Verhältnis

m/z

dimensionslose Größe, die aus der Division der Massenzahl eines Ions durch seine Ladungszahl gebildet wird

3.4

Arbeitsgas

Gas, das aus demselben Molekül besteht wie das Analytgas (Messgas) (d. h. CO_2), aber direkt aus einer Hochdruckgasflasche in das Massenspektrometer eingeleitet und nicht aus der Probe erzeugt wird

3.5

Sequenz

Abfolge

kontinuierlicher Satz von Analysen, einschließlich Referenzmaterialien für die Normierung, QA/QC-Materialien (QS/QK-Materialien), verfahrensbezogener Blindproben und Proben, die zusammen vorbereitet und analysiert werden

4 Kurzbeschreibung

Der Honig wird mit Wasser verdünnt, filtriert und zur Trennung in Mono-, Di-, Tri- und Oligosaccharide in ein Flüssigchromatographiesystem injiziert. Der Säulenausfluss wird in ein Zwischenstück geleitet, wo die organischen Verbindungen zu CO_2 oxidiert werden. Die CO_2 -Isotopologe mit m/z 44, 45 und 46 werden im Spektrometer getrennt und mit Faraday-Auffängern (Faraday-Bechern) nachgewiesen. Die verbindungsspezifischen $\delta^{13}\text{C}$ (‰)-Werte werden anschließend nach Gleichung (1) berechnet.

5 Reagenzien

Sofern nicht anders angegeben, werden nur Reagenzien von anerkannter analytischer Qualität (Reinheit $\geq 99 \%$) und Reinstwasser mit einem spezifischen Widerstand $> 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ verwendet.

5.1 Arbeitsgas, Kohlenstoffdioxid, 99,995 %.

5.2 Helium, 99,999 %.

5.3 Zertifizierte Referenzmaterialien, mindestens zwei Referenzmaterialien mit zertifizierten $\delta^{13}\text{C}$ -Werten, die rückführbar auf VPDB sind und den erwarteten Messbereich umfassen, müssen zur Kalibrierung verwendet werden¹. Bei Verwendung zur Kalibrierung müssen die auf den beiliegenden Zertifikaten angegebenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte und die zugehörigen Unsicherheiten verwendet werden. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Personen, die dieses Dokument anwenden, und bedeutet keine Anerkennung dieser

1 Benzoessäure (IAEA-601), Glucose (BCR-657), Rübenzucker (BEET-1), Fructose (FRUT-1), Galactose (GALT-1), Saccharose (Sucrose) (UME CRM 1309), Glucose (UME CRM 1310), Fructose (UME CRM 1311), Honig (unverfälscht) (UME CRM 1312), Honig (verfälscht) (UME CRM 1313) sind Beispiele für geeignete handelsübliche Produkte. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Personen, die dieses Dokument anwenden, und bedeutet keine Anerkennung dieser genannten Produkte durch CEN.

genannten Produkte durch CEN. Entsprechend den Spezifikationen des Geräteanbieters müssen wässrige Lösungen dieser Referenzmaterialien hergestellt und zur Kalibrierung verwendet werden.

5.4 Referenzmaterialien, Zucker, wie z. B. Fructose, Glucose oder Saccharose, von analytischer Qualität (Reinheit > 98 %), die gegen zertifizierte, auf VPDB rückführbare Referenzmaterialien kalibriert sind, können zur Normierung der gemessenen Isotopen- δ -Werte auf die VPDB-Skala und zur Überprüfung der Drift während des Betriebs des Isotopenverhältnis-Massenspektrometers verwendet werden. Honig, bei dem die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte seiner Hauptzucker durch ein geeignetes Eignungsprüfungsprogramm (PTS, en: proficiency testing scheme) charakterisiert wurden, kann zur Qualitätskontrolle verwendet werden.

5.5 Natriumperoxodisulfat oder Ammoniumperoxodisulfat.

5.6 Orthophosphorsäure.

ANMERKUNG 5.5 und 5.6 sind erforderlich, falls ein Zwischenstück für die chemische Oxidation (6.4) verwendet wird.

6 Prüfeinrichtung

Die üblichen Laborgeräte, insbesondere folgende Geräte:

6.1 Flüssigchromatographie(LC)-System, bestehend aus einer Pumpe, einem Entgaser für die mobile Phase, einem Säulenofen und einer Probeninjektionsvorrichtung.

6.2 LC-Säule, geeignet für die Trennung von Mono-, Di-, Tri- und Oligosacchariden, wobei nur Wasser als mobile Phase verwendet wird, muss verwendet werden. Geeignete stationäre Phasen sind polymere Styrol-Divinylbenzoharze, die mit Ca^{2+} beladen sind und eine Partikelgröße von 8 μm bis 10 μm aufweisen. Geeignete Säulenmaße sind eine Länge von 300 mm Länge und ein Durchmesser zwischen 6 mm und 8 mm; die typische Durchflussrate der mobilen Phase (hochreines Wasser, 6.3) für derartige Säulen liegt je nach verwendeter Säulenart zwischen 0,2 ml/min und 0,6 ml/min.

Die Säule muss bei einer Temperatur zwischen 50 °C und 70 °C betrieben werden.

ANMERKUNG Die im Ringversuch verwendeten Säulenarten, Maße und Durchflussraten sind in Anhang A zu Informationszwecken aufgeführt; andere Säulenarten und Partikelgrößen werden ebenfalls verwendet.

6.3 Mobile Phase für die LC, Wasser, HPLC-Qualität (spezifischer Widerstand > 18 $\text{M}\Omega\text{ cm}^{-1}$).

6.4 Zwischenstück, für die Online-Kopplung des LC-Systems mit dem Isotopenverhältnis-Massenspektrometer und die Oxidation kohlenstoffhaltiger Verbindungen entweder durch chemische Oxidation oder Verbrennung zu CO_2 .

6.5 Isotopenverhältnis-Massenspektrometer (IRMS, en: Isotope ratio mass spectrometer), mit einem Arbeitsgaseinlass und Kollektoren, die CO_2 -Isotopologe mit m/z 44 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$), 45 ($^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$ und $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$) und 46 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$) registrieren.

ANMERKUNG Der Ionenstrom m/z 45 ist um den Beitrag von $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$ korrigiert, der aus der für m/z 46 gemessenen Stromstärke unter Berücksichtigung der relativen Häufigkeit von ^{18}O und ^{17}O berechnet wird.

6.6 Datensystem, das das LC-System, die LC-IRMS-Schnittstelle, das IRMS, die Datenerfassung und Berechnung von $\delta^{13}\text{C}$ -Werten steuert.

6.7 Filtriervorrichtungen, zum Filtrieren der mobilen Phase für die LC (Wasser) und der Probenlösungen.

ANMERKUNG Eine Porengröße von 0,45 μm ist für das Filtrieren von Probenlösungen geeignet.

6.8 Wasserbad oder Wärmeschränk, bei $(40 \pm 2) ^\circ\text{C}$.