

DIN EN 17992



ICS 67.140.20

Einsprüche bis 2023-08-23

Entwurf

**Lebensmittelauthentizität –
Bestimmung des Gehalts von 16-O-Methylcafestol, 16-O-Methylkahweol
und deren Derivaten als Summenparameter in Röstkaffee mittels
¹H-qNMR;
Deutsche und Englische Fassung prEN 17992:2023**

Food authenticity –
Determination of the sum of 16-O-Methylcafestol, 16-O-Methylkahweol and their
derivatives in roasted coffee by ¹H-qNM;
German and English version prEN 17992:2023

Authenticité alimentaire du café –
Détermination de la teneur en 16-O-méthylcafestol –
Méthode par NMR;
Version allemande et anglaise prEN 17992:2023

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2023-06-23 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 51 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17992:2023) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 460 „Lebensmittel-authentizität“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige nationale Normungsgremium ist der Arbeitskreis NA 057-08-02 AK „NMR-Analytik“ 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 3310-1	siehe	DIN ISO 3310-1
ISO 5725-3	siehe	DIN ISO 5725-3
ISO 23118:2021	siehe	DIN EN ISO 23118:2021-08

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 EN ISO 23118:2021-08, *Molekularanalytische in-vitro-diagnostische Verfahren — Spezifikationen für präanalytische Prozesse für Metabolomuntersuchungen in Urin, venösem Blutserum und -plasma (ISO 23118:2021); Deutsche Fassung EN ISO 23118:2021*

DIN ISO 3310-1, *Analysensiebe — Technische Anforderungen und Prüfung — Teil 1: Analysensiebe mit Metalledrahtgewebe*

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

– *Entwurf* –

E DIN EN 17992:2023-07

– Leerseite –

Lebensmittelauthentizität – Bestimmung des Gehalts von 16-O-Methylcafestol, 16-O-Methylkahweol und deren Derivaten als Summenparameter in Röstkaffee mittels ^1H -qNMR

Food authenticity – Determination of the sum of 16-O-Methylcafestol, 16-O-Methylkahweol and their derivatives in roasted coffee by ^1H -qNM

Authenticité alimentaire du café – Détermination de la teneur en 16-O-méthylcafestol – Méthode par NMR

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	6
4 Reagenzien	9
5 Prüfeinrichtung	11
6 Messung und Prüfverfahren	12
6.1 Allgemeines	12
6.2 Probenahme	12
6.3 Probenvorbereitung	12
6.3.1 Allgemeines	12
6.3.2 Probenvorbereitung bei geröstetem Kaffee	12
6.3.3 Extraktion und Herstellung der Messlösung	12
6.4 NMR-Untersuchungen	13
6.4.1 Allgemeines	13
6.4.2 Grundlegende Kriterien für das NMR-Spektrum	13
6.4.3 Gültige beispielhafte Messbedingungen/Parameter für die 1D-Untersuchung	14
6.4.4 Aufnahmeparameter für die 1D-Untersuchung	14
6.4.5 Verarbeitungsparameter für die 1D-Untersuchung	15
6.5 Kalibrierung und Auswertung	15
6.5.1 Überprüfung der Aufnahmequalität des Spektrums und der Kalibrierung	15
6.6 Bestimmung des PULCON-Faktors	16
6.7 Berechnung der Massenkonzentration des Analyten in Kaffee	17
6.8 Liste von Analyten und relevanten Parametern	18
7 Genauigkeit	19
7.1 Ringversuch/Vergleichsprüfung zwischen Laboren	19
7.2 Wiederholpräzision	19
7.3 Vergleichspräzision	19
7.4 Bestimmungsgrenze (LOQ, en: Limit of quantification)	19
8 Prüfbericht	19
Anhang A (informativ) Zusammenfassung der statistischen Auswertung der Verfahrensvalidierungsstudie „16-OMC in Kaffee“	20
Anhang B (informativ) Gemeinsamer Ringversuch zum NMR- und HPLC-Verfahren (prEN XXXX und prEN YYYY)	23
B.1 Hintergrund des Ringversuchs	23
B.2 Erläuterung der systematischen Unterschiede zwischen den Ergebnissen des NMR- und HPLC-Verfahrens (prEN XXXX und prEN YYYY)	23
Literaturhinweise	24

Bilder

Bild 1 — Vier in Kaffee enthaltene Diterpene	7
Bild 2 — Impulsprogramm für ¹ H-qNMR an Kaffee-Extrakt	14
Bild 3 — TMS-Resonanz mit guter Aufnahmequalität	16
Bild A.1 — Absolute Standardabweichungen	22
Bild A.2 — Relative Standardabweichungen	22

Tabellen

Tabelle 1 — Parameter für die Integration und Berechnung	18
Tabelle A.1 — Statistische Parameter nach ISO 5725-3 für 16-O-Methylditerpene (16-OMD), berechnet als 16-O-Methylcafestol (16-OMC) — vorgemahlener Kaffee	20
Tabelle A.2 — Statistische Parameter nach ISO 5725-3 für 16-O-Methylditerpene (16-OMD), berechnet als 16-O-Methylcafestol (16-OMC) — vorgemahlener Kaffee	20
Tabelle A.3 — Statistische Parameter nach ISO 5725-3 für 16-O-Methylditerpene (16-OMD), berechnet als 16-O-Methylcafestol (16-OMC) — ganze Bohnen	21
Tabelle A.4 — Statistische Parameter nach ISO 5725-3 für 16-O-Methylditerpene (16-OMD), berechnet als 16-O-Methylcafestol (16-OMC) — ganze Bohnen	21

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17992:2023) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 460 „Lebensmittel-authentizität“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Einleitung

Dieses Dokument wurde als Reaktion auf den Bedarf an einem effizienten und zuverlässigen Prüfverfahren erarbeitet, mit dem die Authentizität von Kaffee sowohl bei der Kontrolle der Handelsqualität als auch bei der amtlichen Lebensmittelkontrolle bestätigt werden kann.

Die Kaffeesorten mit der größten kommerziellen Bedeutung sind *Coffea arabica* und *Coffea canephora* var. *robusta*, allgemein bekannt als „Arabica“ und „Robusta“. Unter diesen Sorten haben Arabica-Kaffees einen deutlich höheren Marktwert als Robusta-Kaffees. Bei ungemischtem Kaffee kann die botanische Herkunft des Kaffees durch die Analyse der Konzentration von 16-O-Methylcafestol und 16-O-Methylkahweol und ihrer Derivate (z. B. Fettsäureester) eindeutig bestimmt werden, da diese Markersubstanzen in Arabica-Kaffee in sehr geringen Konzentrationen (üblicherweise < 20 mg/kg) vorhanden sind. In Robusta-Kaffees liegen die Konzentrationen deutlich höher und liegen in einem Bereich von annähernd 800 mg/kg bis 2 500 mg/kg¹ [1 bis 5].

1 Diese veröffentlichten Werte sind nur als Richtwerte angeführt und nicht als strenge Grenzwertempfehlungen vorgesehen.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Verfahren zur Bestimmung des Gehalts an löslichem 16-O-Methylcafestol und 16-O-Methylkahweol (Summe der freien Formen und Derivate, z.B. Fettsäureester, im Folgenden abgekürzt als 16-OMD = „Diterpene“) in geröstetem Kaffee (Bohnen oder gemahlen) mittels quantitativer Protonen-nuklearmagnetischer Resonanzspektroskopie (^1H -qNMR) fest.

Bei Einhaltung der nachstehend beschriebenen Versuchsparameter hat sich dieses Prüfverfahren für den folgenden Konzentrationsbereich bewährt:

16-OMD: 20 mg/kg bis 2 000 mg/kg.

Der Konzentrationsbereich kann durch geeignete Änderungen der Versuchsparameter erweitert werden, z. B. durch eine andere Einwaage des gemahlenen Kaffees oder die Akkumulation von mehr NMR-Transienten.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. 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 1042, *Laborgeräte aus Glas — Messkolben (ISO 1042)*

ISO 3310-1, *Test sieves — Technical requirements and testing — Part 1: Test sieves of metal wire cloth*

ISO 3509, *Coffee and coffee products — Vocabulary*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach ISO 3509 und 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

mit Chloroform extrahierbarer Gehalt an Derivaten von 16-OMC und 16-OMK (= 16-O-Methyl-Diterpen („16-OMD“))

Gehalt im Kaffee, bestimmt nach diesem Prüfverfahren und angegeben als Massenanteil w in mg je kg Kaffee, berechnet als freies 16-OMC

Anmerkung 1 zum Begriff: Ein weiterer Anteil des Gesamtgehaltes an 16-OMD (ca. 25 %) kann nur durch eine starke chemische Aufbereitung extrahiert werden.

Anmerkung 2 zum Begriff: Etwa ein Massenanteil von 90 % des 16-OMD wird durch 16-O-Methylcafestol repräsentiert, und 16-O-Methylkahweol stellt den verbleibenden Massenanteil von 10 % der Mischung dar.

Anmerkung 3 zum Begriff: Der relative Fehler aufgrund von Unterschieden in der molaren Masse beträgt 0,6 %.

[QUELLE: [1]]

3.2

16-OMC

16-O-Methylcafestol

(CAS RN[®] 2: 108214-28-4), $M = 330,5 \text{ g/mol}$

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Substanz kommt in ihrer freien Form oder verestert vor, siehe Bild 1.

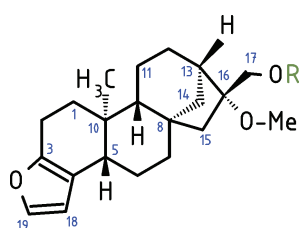
3.3

16-OMK

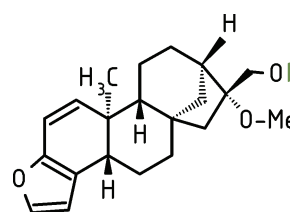
16-O-Methylkahweol

(CAS-RN[®]: noch nicht verfügbar), $M = 328,5 \text{ g/mol}$

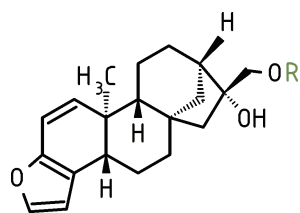
Anmerkung 1 zum Begriff: Die Substanz kommt in ihrer freien Form oder verestert vor, siehe Bild 1.



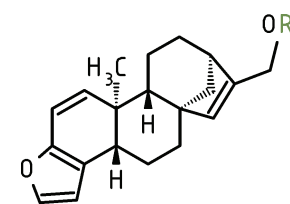
a) 16-OMC



b) 16-OMK



c) Kahweol



d) Dehydrokahweol

Legende

R Rest (H oder Fettsäure)

ANMERKUNG Die Nummerierung der Atome ist bei den dargestellten Substanzen gleich.

Bild 1 — Vier in Kaffee enthaltene Diterpene

3.4

FID, en: free induction decay

freier Induktionszerfall

NMR-Signal im Zeitbereich, das sich aus der Präzession des Kernmagnetisierungsvektors innerhalb der Sondenspule nach Anlegen eines HF-Anregungsimpulses an eine Probe in einem statischen Magnetfeld ergibt

[QUELLE: ISO 24583:2022, 3.6]

2 CAS Registry Number[®] ist das Warenzeichen des Produkts, geliefert von CAS. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Personen, die dieses Dokument anwenden, und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu den gleichen Ergebnissen führen.

3.5

FWHM, en: full width at half maximum

Halbwertsbreite

Breite einer Linienform bei der Hälfte der maximalen Signalintensität

Anmerkung 1 zum Begriff: Sie wird in Hz angegeben.

[QUELLE: ISO 24583:2022, 3.9 – modifiziert: Anmerkung 2 zum Begriff wurde gestrichen.]

3.6

Kahweol

1,2-Dehydrocafestol (CAS-RN®: 6894-43-5)

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Substanz kommt in ihrer freien Form oder verestert vor, siehe Bild 1.

3.7

Dehydrokahweol

1,2,15,16-Bis-dehydrocafestol (CAS-RN®: noch nicht verfügbar)

Anmerkung 1 zum Begriff: Es ist ein Röstprodukt von Kahweol.

Anmerkung 2 zum Begriff: Die Substanz kommt in ihrer freien Form oder verestert vor, siehe Bild 1.

3.8

NMR

nuklearmagnetische Resonanzspektroskopie

Verfahren, das sich auf die selektive Absorption von hochfrequenten Radiowellen durch Atomkerne stützt, die einem stationären Magnetfeld ausgesetzt sind

Anmerkung 1 zum Begriff: Durch NMR lassen sich chemische und strukturelle Eigenschaften von Molekülen ermitteln.

[QUELLE: ISO 23118:2021, 3.10]

3.9

ppm

Teile je Million

<NMR> Einheit für die chemische Verschiebung (δ) eines Resonanzsignals

Anmerkung 1 zum Begriff: Durch Dividieren der tatsächlichen Resonanzfrequenz eines Signals f_{res} (in Hz, Zyklen je Sekunde) durch den Nennwert der Frequenz des NMR-Spektrometers f_{spect} und Multiplizieren mit 10^6 wird ein normiertes Verschiebungsmaß erhalten, das von der Feldstärke des Spektrometers unabhängig ist. Zur Erläuterung siehe die folgende Gleichung:

$$\delta_{\text{res}} = \frac{f_{\text{res}}}{f_{\text{spect}}} \times 1\,000\,000$$

3.10

PULCON, en: Pulse-Length-based CONcentration determination

impulslängenbasierte Konzentrationsbestimmung

quantitatives NMR-Verfahren mit externem Standard, bei dem die Dauer des 90°-Anregungsimpulses bei der Berechnung der Konzentrationen berücksichtigt wird

3.11

QuantRef

Referenzsubstanz(en) für die quantitative Bestimmung

externer Standard zur Bestimmung des Ansprechverhaltens des Spektrometers (Signalintegral je Menge NMR-aktiver, gemessener Kerne)

Anmerkung 1 zum Begriff: Die QuantRef muss eine stabile Lösung einer oder mehrerer zertifizierter Referenzsubstanzen sein, die mindestens eine intensive und an der Basislinie getrennte Resonanz im NMR-Spektrum aufweisen. Vorzugsweise sollten Substanzen mit kleinem transversalen Relaxationswert T_1 verwendet werden, was die Verwendung kürzerer Wiederholverzögerungen (Wartezeiten) zwischen FID ermöglicht. Die Konzentration(en) sollte(n) hoch genug sein, um bei den angewendeten NMR-Aufnahmeparametern ein $\text{SNR} > 150$ (Verringerung der durch Rauschen bedingten Unsicherheit auf unter 1 %) zu erzielen (typische Konzentrationen sollten zwischen 10 mmol/l und 50 mmol/l liegen). Referenzsubstanzen, die für die Verwendung in einer QuantRef vorgesehen sind, müssen nachweislich über eine lange Zeit in dieser Mischung stabil sein (Umgebungslicht, normale Raumtemperatur). Die Signale der Referenzsubstanzen sollten nicht in der Nähe des Restsignals des nicht deuterierten Lösemittels oder eines Spurenwasser-Signals liegen. Es ist darauf zu achten, sicherzustellen, dass die Signale durch eine klare, flache Basislinie ohne Signalüberlappung, z. B. von ^{13}C -Satelliten, getrennt sind.

3.12

Probentemperatur

kalibrierte Temperatur der Probe während der NMR-Untersuchung(en)

3.13

SNR

Signal-Rausch-Verhältnis

4 Reagenzien

4.1 Allgemeine Anforderungen

Als Referenzsubstanzen dürfen nur zertifizierte und rückführbare Substanzen höchster Reinheit verwendet werden. Diese Referenzsubstanzen müssen getrennt von den Proben gelagert werden.

4.2 Deuteriertes Chloroform (CDCl_3), Deuterierungsgrad mindestens 99,8 % (at.), CAS RN®: 865-49-6

Deuteriertes Lösemittel für die Extraktion und die NMR-Messung von lipophilen Substanzen in Kaffee.

4.3 Tetramethylsilan (TMS), CAS RN®: 75-76-3

Interner Standard für die Kalibrierung der ppm-Skala $\delta(\text{TMS}) = 0,00 \text{ ppm}$ (def). Darf weggelassen werden, wenn das Restsignal des nicht deuterierten Lösemittels zur Kalibrierung der Skala für die chemische Verschiebung verwendet wird.

4.4 Deuteriertes Chloroform mit TMS

TMS wird zu CDCl_3 hinzugefügt, um einen TMS-Gehalt zwischen 0,03 % und 0,1 % zu erreichen. Die Lösung muss im Dunkeln, vorzugsweise in einer Braunglasflasche, aufbewahrt werden. Einige Zentimeter Silberband sollten hinzugefügt werden, um die Bildung von aggressiven Verbindungen (Phosgen, Chlorwasserstoff) zu verhindern, die später die Proben beeinträchtigen könnten. Die mögliche Zugabe von Molekularsieben ($3 \text{ \AA}$ oder $4 \text{ \AA}$)³ hilft, Restwasser zu absorbieren.

4.5 1,2,4,5-Tetrachlor-3-nitrobenzen (TCNB), CAS RN®: 117-18-0, M = 260,89 g/mol

3 $1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ m}$, Molekularsiebe mit unterschiedlichen Porengrößen werden im Allgemeinen in Ångström-Einheiten angeboten.

Beispielhafte Referenzsubstanz für die QuantRef-Lösung, δ (in CDCl_3) = 7,74 ppm, s, 1 H; sehr stabil in CDCl_3 , aber großer transversalen Relaxationswert T_1 .

4.6 Ethylbenzen, CAS RN[®]: 100-41-4, M = 106,17 g/mol

Beispielhafte Referenzsubstanz für die QuantRef-Lösung, δ (in CDCl_3) = 7,30 ppm bis 7,26 ppm, m, 2 H; 7,23 ppm bis 7,15 ppm, m, 2 H; 7,23 ppm bis 7,15 ppm, m, 1 H; 2,65 ppm, q (7,6 Hz), 2 H und 1,24 ppm, t (7,6 Hz), 3 H.

4.7 1,3,5-Trimethoxybenzen, CAS RN[®]: 621-23-8, M = 168,19 g/mol

Beispielhafte Referenzsubstanz für die QuantRef-Lösung, δ (in CDCl_3) = 6,1 ppm, s, 3 H und 3,8 ppm, s, 9 H.

4.8 p-Xylen, CAS RN[®]: 106-42-3, M = 106,2 g/mol

Beispielhafte Referenzsubstanz für die QuantRef-Lösung, δ (in CDCl_3) = 7,06 ppm, s, 4 H und 2,31 ppm, s, 6 H.

4.9 Dimethylsulfon, CAS RN[®]: 67-71-0, M = 94,13 g/mol

Beispielhafte Referenzsubstanz für die QuantRef-Lösung, δ (in CDCl_3) = 2,31 ppm, s, 6 H.

4.10 Cyclohexan, CAS RN[®]: 110-82-7, M = 84,16 g/mol⁴

Beispielhafte Referenzsubstanz für die QuantRef-Lösung, δ (in CDCl_3) = 1,43 ppm, s, 12 H. Achtung: Die Resonanz liegt in der Nähe des Wassersignals in CDCl_3 .

4.11 QuantRef-Lösung

In einem 5-ml-Messkolben wird mindestens eine der Referenzsubstanzen (4.5 bis 4.10) in CDCl_3 gelöst, um Konzentrationen zwischen 5 mg/ml und 10 mg/ml zu erreichen. Die genauen Einwaagen müssen dokumentiert werden (6.3.1). Nach gründlichem Mischen werden 0,6 ml dieser QuantRef-Lösung in ein NMR-Röhrchen gefüllt, das anschließend zugeschmolzen wird. Durch wiederholtes Wägen ist das Röhrchen auf Auslaufen zu prüfen, das geprüfte Röhrchen muss mit einer eindeutigen ID und dem Datum der Herstellung gekennzeichnet werden.

Im Allgemeinen dürfen andere Referenzsubstanzen und Konzentrationen für die QuantRef-Lösung verwendet werden, sofern die in 3.9 aufgeführten Bedingungen erfüllt sind. Durch die Verwendung von mehr als einer Substanz kann eine höhere Zuverlässigkeit der QR-Lösung erreicht werden.

4.12 Qualitätskontrollprobe zur Überwachung der Wiederhol- und Vergleichpräzision

Zur regelmäßigen Überwachung des gesamten Prozesses muss eine entsprechend große Probe echten Kaffees mit einem wesentlichen 16-OMD-Gehalt in einem dicht verschlossenen Gefäß im Dunkeln aufbewahrt werden. Von dieser Qualitätskontrollprobe muss ein aliquoter Anteil hergestellt und bei jeder neuen Probenreihe gemessen werden; die Ergebnisse müssen in einer Regelkarte dokumentiert werden. Der Mittelwert (Erwartungswert) und die oberen/unteren Schwellenwerte müssen auf einer angemessenen Anzahl von Wiederho-

4 Chloroform kann den Kaffee-Extrakt langsam beeinträchtigen und ist ein gefährliches Lösemittel. Cyclohexan extrahiert nachweislich (an anderer Stelle) das 16-OMD ebenso gut wie Chloroform und kann daher als Ersatz verwendet werden: Es wird eine 95/5-Mischung aus nicht deuteriertem/deuteriertem Cyclohexan hergestellt, die für den Extraktionsschritt verwendet wird, dann wird die Suspension zentrifugiert (die Zentrifugation funktioniert gut mit Cyclohexan, aber nicht mit Chloroform). Aus dem klaren Überstand wird ein gefilterter aliquoter Anteil von 600 µl für die NMR-Messung entnommen. Die NMR-Untersuchung wird angepasst, um die Resonanz von Cyclohexan (1,41 ppm, s) zu unterdrücken, und dann wird wie üblich vorgegangen. Das Extraktionsvermögen von Cyclohexan für andere Substanzen (HMF, Furfurylalkohol) kann nicht zufriedenstellend sein. Diese Modifikation würde eine individuelle Validierung erfordern.

lungen (früherer Zeitraum) beruhen. Es werden Warnschwellenwerte von $\pm 2 \sigma$ und Eingriffsschwellenwerte von $\pm 3 \sigma$ empfohlen. Das aktuelle Ergebnis sollte innerhalb der Warnschwellenwerte und muss innerhalb der Eingriffsschwellenwerte bleiben, andernfalls sollte die Messreihe wiederholt werden.

5 Prüfeinrichtung

5.1 Allgemeines

Übliche Laborausrüstung ist erforderlich, außerdem die in 5.2 bis 5.12 aufgeführten Geräte.

Die Volumenmessgeräte müssen der Klasse A nach EN ISO 1042 entsprechen.

Alle Gefäße oder Werkzeuge, die direkt mit der Probe oder den Lösungen in Berührung kommen, müssen zuverlässig sauber sein, um Kontaminationen zu verhindern und die Blindwerte zu minimieren.

5.2 Hochfeld-NMR-Spektrometer, üblicherweise wird ein 400-MHz-FT-NMR mit einer 5 mm Protonen-sonde, angepasst für die Analyse von Lösungen, und mit einer Temperaturstabilisierung von $\pm 0,2$ K, oder ein Gerät mit mindestens gleichwertiger Leistung verwendet.

5.3 NMR-Röhrchen, 5 mm Außendurchmesser, geeignet für Hochfeld-NMR-Messungen, Abweichung des Innendurchmessers weniger als ± 1 %, um eine geringe Abweichung des angeregten Volumens zwischen den einzelnen Proben sicherzustellen, und mit dicht schließendem, für CDCl_3 geeignetem (z. B. PTFE) Verschlussstopfen. Für die QuantRef und alle Proben muss dieselbe Röhrchenart verwendet werden.

5.4 Probenhalter (Spinner) für 5-mm-NMR-Röhrchen

5.5 Justierhilfe für die korrekte Tiefeneinstellung des NMR-Röhrchens in der Sonde

5.6 Analysenwaage, geeignet zum Wägen mit einer Fehlergrenze von mindestens $\pm 0,000$ 1 g.

5.7 Kaffee- oder Labormühle, geeignet für das Mahlen von gerösteten Kaffeebohnen. Die Mühle muss so kalibriert sein, dass sie eine homogene Partikelgröße liefert, wie sie für die Zubereitung von Filterkaffee verwendet wird. Mindestens 2/3 der gemahlenen Kaffeepartikel müssen feiner als 0,63 mm sein. Die Mühle sollte ein minimales Totvolumen haben und leicht zu reinigen sein.

5.8 Laborsiebe, Drahtsiebe mit einer Maschenweite von 0,63 mm und 0,25 mm, die die Anforderungen nach ISO 3310-1 erfüllen.

5.9 Spritzen zum Einmalgebrauch, 1 ml oder 2 ml, vorzugsweise nicht silikonisiert und mit Luer-Lock-Anschluss.

5.10 Spritzenfilter, mit chloroformbeständiger Membran (z. B. PTFE), Porosität (Por.) von $0,45 \mu\text{m}$, ein Kombinationsfilter (Glasfaser + PTFE) kann die Filtration erleichtern.

5.11 Zentrifugenfilter (optional), mit chloroformbeständiger Membran (z. B. PTFE), $\text{Por.} \leq 0,45 \mu\text{m}$, Fassungsvermögen ≥ 800 ml.

5.12 Direktverdrängerpipette, einstellbar auf bis zu $1\,000 \mu\text{l}$ oder $2\,000 \mu\text{l}$.

Um den Volumenfehler des zugegebenen Chloroform-d zu minimieren, sollte vorzugsweise eine Direktverdrängerpipette verwendet werden; alternativ kann die Probe nach Zugabe von CDCl_3 gewogen werden, um die tatsächlich zugegebene Menge festzustellen.

5.13 Kreisschüttler (Vortexmischer), geeignet für $> 500 \text{ min}^{-1}$.

6 Messung und Prüfverfahren

6.1 Allgemeines

WARNUNG — Die Anwendung dieses Dokuments kann die Verwendung gefährlicher Stoffe, Vorgänge und Prüfeinrichtungen vorsehen. Es wird nicht der Anspruch erhoben, dass in dieser Norm alle mit ihrer Anwendung verbundenen Sicherheits- und Umweltrisiken angemessen behandelt werden.

Eine gut homogenisierte Probe gemahlenen Kaffees wird eingewogen und mit einer festgelegten Menge an deuteriertem Chloroform gemischt. Nach gründlicher Extraktion wird die Suspension aufgetrennt, filtriert und zur Messung in ein NMR-Röhrchen gefüllt. Die Analyten werden durch Integration spezifischer Resonanzen mit dem PULCON-qNMR-Verfahren quantitativ bestimmt. Alternativ könnte dem Kaffeeextrakt zur quantitativen Bestimmung ein interner Standard zugefügt werden.

Die Probe des gemahlenen Kaffees sollte als Doppelbestimmung analysiert werden; wenn die Differenz zwischen den Ergebnissen mehr als 5 % beträgt, muss die Analyse anhand der gesiebten Mittelfraktion (Partikelgröße $0,63\text{ mm} > x > 0,25\text{ mm}$) des Kaffeepulvers wiederholt werden.

6.2 Probenahme

Das Probenahmeverfahren ist durch dieses Dokument nicht vorgeschrieben. Die Probenahme sollte so durchgeführt werden, wie es von den Beteiligten vereinbart wurde. Es ist darauf zu achten, dass die Proben während des Transports oder der Zwischenlagerung nicht beschädigt oder verfälscht werden.

6.3 Probenvorbereitung

6.3.1 Allgemeines

Alle Zahlenwerte, die zur Berechnung des (der) Ergebnisses (Ergebnisse) verwendet werden, z. B. Einwaagen oder Flüssigkeitsvolumina, müssen mit mindestens drei, besser vier signifikanten Ziffern gemessen und dokumentiert werden.

Die gerösteten Kaffeebohnen (oder der gemahlene Kaffee) müssen (muss) gründlich homogenisiert werden, um sicherzustellen, dass die Teilprobe repräsentativ ist. Die Teilprobe sollte mindestens 200 g wiegen (etwa 1 000 Bohnen). Sind Bohnen zu analysieren, so müssen sie mit einer in 5.7 beschriebenen Mühle zu einem Pulver von gleichmäßiger Feinheit gemahlen werden, wie es für die Zubereitung von Filterkaffee typisch ist.

6.3.2 Probenvorbereitung bei geröstetem Kaffee

Geröstete Kaffeebohnen müssen in einer Mühle (5.7) gemahlen werden. Der Mahlgrad muss so eingestellt werden, dass zwischen 30 % und 50 % des gemahlenen Kaffees als Mittelfraktion (Partikelgröße zwischen 0,25 mm und 0,63 mm) gewonnen werden. Mindestens 2/3 der gemahlenen Kaffeepartikel müssen feiner als 0,63 mm sein.

Handelsüblicher gemahlener Röstkaffee muss erneut gemahlen werden, wenn er nicht den vorstehend angeführten Anforderungen an die Größe gemahlener Partikel entspricht.

6.3.3 Extraktion und Herstellung der Messlösung

Der gemahlene Kaffee muss erneut gründlich homogenisiert werden, anschließend werden 200 mg in ein Glasfläschchen mit einem dichten Verschluss gegeben. Die genaue Einwaage muss dokumentiert werden. 1,50 ml (= 2,25 g) deuteriertes Chloroform + TMS werden in das Glasfläschchen gegeben, dann sollte das verschlossene Glasfläschchen 20 min kräftig mechanisch geschüttelt werden ($> 500\text{ min}^{-1}$, z. B. mit einem Vortexmischer oder Kreisschüttler).

Um feste Partikel zu entfernen, sollte der Extrakt durch einen Spritzenfilter gesiebt werden: