

DIN EN 18003



ICS 67.140.20

Einsprüche bis 2023-10-25
Vorgesehen als Ersatz für
DIN 10779:2011-03

Entwurf

**Lebensmittelauthentizität –
Bestimmung des Gehaltes an 16-O-Methylcafestol in Roh- und
Röstkaffee –
HPLC-Verfahren;
Deutsche und Englische Fassung prEN 18003:2023**

Food Authenticity –
Determination of 16-O-methylcafestol content of green and roasted coffee –
HPLC-method;
German and English version prEN 18003:2023

Authenticité alimentaire du café et des produits à base de café –
Détermination de la teneur en 16-O-méthylcafestol dans le café vert et le café torréfié –
Méthode par HPLC;
Version allemande et anglaise prEN 18003:2023

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2023-08-25 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.

Es wird gebeten, mit den Kommentaren zu diesem Entwurf jegliche relevanten Patentrechte, die bekannt sind, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 42 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 18003:2023) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 460 „Lebensmittelauthentizität“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige nationale Normungsgremium ist der Arbeitskreis NA 057-08-02-03 AK „Kaffee und Kaffeeprodukte“ 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 3696	siehe	DIN ISO 3696
ISO 5725-3	siehe	DIN ISO 5725-3

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 10779:2011-03 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Vollständige Überarbeitung der bestehenden Methode mit dem Ziel, Zeit zu sparen und den Einsatz von Lösungsmitteln zu verringern;
- b) Dokument redaktionell überarbeitet.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

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

DIN ISO 3696, *Wasser für analytische Zwecke; Anforderungen und Prüfungen*

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

– *Entwurf* –

E DIN EN 18003:2023-10

– Leerseite –

**Lebensmittelauthentizität – Bestimmung des Gehaltes an 16-O-Methylcafestol in
Roh- und Röstkaffee – HPLC-Verfahren**

Food Authenticity – Determination of 16-O-methylcafestol content of green and roasted coffee – HPLC-method

Authenticité alimentaire du café et des produits à base de café – Détermination de la teneur en 16-O-méthylcafestol dans le café vert et le café torréfié – Méthode par HPLC

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	6
4 Kurzbeschreibung	6
5 Reagenzien	6
6 Prüfeinrichtung	8
7 Probenahme	9
8 Prüfverfahren	10
8.1 Allgemeines	10
8.2 Probenvorbereitung bei Röstkaffee	10
8.2.1 Geröstete ganze Bohnen	10
8.2.2 Handelsüblicher gemahlener Röstkaffee	10
8.3 Probenvorbereitung bei Rohkaffee	10
8.3.1 Rohe ganze Kaffeebohnen	10
8.4 Isolierung der unverseifbaren Bestandteile	10
8.4.1 Hydrolyse	10
8.4.2 Extraktion	11
8.4.3 Anschließendes Waschen	11
8.4.4 Vorbereitung der Messlösung	11
8.4.5 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	11
9 Auswertung	11
9.1 Allgemeines	11
9.2 Berechnung	11
10 Prüfbericht	12
11 Ringversuch	12
Anhang A (informativ) Typische HPLC-Chromatogramme	14
Anhang B (informativ) Statistische Kenngrößen und Präzisionsdaten	16
Anhang C (informativ) Gemeinsamer Ringversuch zum HPLC- und NMR-Verfahren (prEN 18003:2023 und prEN 17992:2023) in Bezug auf Röstkaffees	19
C.1 Hintergrund des Ringversuchs	19
C.2 Erläuterung der systematischen Unterschiede zwischen den Ergebnissen des NMR- und HPLC-Verfahrens	19
Literaturhinweise	20

Bilder

Bild A.1 — HPLC-Chromatogramm eines Robusta-Röstkaffees (Methanol/Wasser (70 : 30) isokratisch, 0,9 ml/min, 15 °C)	14
Bild A.2 — HPLC-Chromatogramm eines Robusta-Röstkaffees (Acetonitril/Wasser (45 : 55) isokratisch, 1,5 ml/min, 22 °C)	15
Bild B.1 — Absolute Standardabweichungen	17
Bild B.2 — Relative Standardabweichungen	18

Tabellen

Tabelle 1 — Standardlösungen für den oberen Kalibrierbereich (160 mg/kg bis 1 600 mg/kg) . .	7
Tabelle 2 — Standardlösungen für den unteren Kalibrierbereich (16 mg/kg bis 120 mg/kg) . . .	8
Tabelle B.1 — Statistische Kenngrößen für 16- <i>O</i> -Methylcafestol (16-OMC)	16
Tabelle B.2 — Statistische Kenngrößen für 16- <i>O</i> -Methylcafestol (16-OMC)	16

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 18003:2023) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 460 „Lebensmittelauthentizität“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Einleitung

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 eindeutig bestimmt werden, da diese Markersubstanz in Arabica-Kaffee in sehr geringen Konzentrationen (üblicherweise < 20 mg/kg) vorhanden ist. In Robusta-Kaffees liegen die Konzentrationen deutlich höher und liegen in einem Bereich von annähernd 800 mg/kg bis 2 500 mg/kg.

ANMERKUNG Diese veröffentlichten Werte sind nur als Orientierungswerte angeführt und nicht als strenge Grenzwertempfehlungen vorgesehen.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)-Verfahren zur Bestimmung des Gehaltes an 16-*O*-Methylcafestol in Roh- und Röstkaffee fest.

Das beschriebene Verfahren ist mit einer angemessenen Präzision für einen Gehalt von 40 mg bis 1 600 mg 16-*O*-Methylcafestol je kg Roh- bzw. Röstkaffee geeignet. Der Ringversuch hat gezeigt, dass je nach Laboraus-rüstung auch Konzentrationen zwischen 20 mg/kg und 40 mg/kg erfolgreich analysiert werden können.

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).

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

ISO 3696, *Water for analytical laboratory use — Specification and test methods*

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

Gehalt an 16-*O*-Methylcafestol

Konzentration von 16-*O*-Methylcafestol in Rohkaffee oder Röstkaffee, angegeben in mg je kg

4 Kurzbeschreibung

Ein aliquoter Anteil der gemahlenden und gut gemischten Probe wird mit ethanolischer Kaliumhydroxid-Lösung hydrolysiert (verseift). Anschließend wird durch wiederholtes Schütteln mit *tert*-Butylmethylether (*t*BME) der nicht hydrolysierbare Anteil isoliert. Die vereinigten Ether-Extrakt-Phasen werden nach dem Waschen zur Trockenheit reduziert. Der Rückstand wird in die mobile HPLC-Phase aufgenommen und der Gehalt an 16-*O*-Methylcafestol wird mittels HPLC untersucht.

Die Identifizierung der Substanz erfolgt durch Vergleich der jeweiligen Retentionszeit mit der betreffenden Standardsubstanz; die Quantifizierung wird dann nach dem Verfahren des externen Standards über die Peak-flächen vorgenommen.

5 Reagenzien

Soweit nicht anders angegeben, sind Reagenzien von analytischer Qualität zu verwenden. Das verwendete Was-ser muss Qualität 1 nach ISO 3696 entsprechen.

5.1 Acetonitril, HPLC-Qualität.

5.2 L(+)-Ascorbinsäure, 99,5 %, geeignet für analytische Zwecke.

5.3 Ethanol, HPLC-Qualität.

5.4 Mobile Phase, Acetonitril/bidestilliertes Wasser oder Methanol/bidestilliertes Wasser (siehe 8.4.5).

ANMERKUNG Das Mischungsverhältnis darf in Abhängigkeit vom verwendeten Analysesystem angepasst werden.

5.5 Kaliumhydroxid, Plätzchen.

5.6 Ethanolische Kaliumhydroxid-Lösung, hergestellt durch Lösen von 10 g Kaliumhydroxid in 10 ml bidestilliertem Wasser und Auffüllen auf 100 ml mit Ethanol; die Lösung muss immer frisch hergestellt und darf höchstens zwei Tage verwendet werden.

5.7 Methanol, HPLC-Qualität.

5.8 Natriumchlorid.

5.9 Natriumchlorid-Lösung, hergestellt durch Lösen von 2 g Natriumchlorid in einem mit Wasser gefüllten 100-ml-Messkolben und Auffüllen bis zur Kalibriermarke.

5.10 tert-Butylmethylether (tBME), HPLC-Qualität.

5.11 Flüssigstickstoff oder Trockeneis (optional), zum Kühlen.

5.12 16-O-Methylcafestol-Standardlösungen.

5.12.1 Standardsubstanz.

Es muss ein 16-O-Methylcafestol-Standard verwendet werden, der eine Mindestreinheit von 95 % aufweist.

5.12.2 Stammlösung.

Etwa 10 mg 16-O-Methylcafestol in einen 50-ml-Messkolben einwiegen (etwa 200 µg/ml). Die Substanz unter Einsatz eines Ultraschallbades in Acetonitril (5.1) lösen und anschließend den Messkolben bis zur Marke mit Acetonitril (5.1) auffüllen.

ANMERKUNG Die Stammlösung bleibt bei Kühlschranklagerung über eine Zeitspanne von mindestens 12 Wochen stabil.

5.12.3 Kalibrierlösungen für den oberen Kalibrierbereich (160 mg/kg bis 1 600 mg/kg).

Die Stammlösung (5.11.2) mit Acetonitril (5.1) verdünnen, um fünf verschiedene verdünnte Lösungen für die Erstellung der Fünfpunktkalibrierung und die Berechnung des Gehalts an 16-O-Methylcafestol zu erhalten, wie in Tabelle 1 dargestellt.

ANMERKUNG Die Kalibrierlösungen bleiben bei Aufbewahrung im Kühlschrank, aber auch bei Lagerung bei Raumtemperatur (20 °C), keine direkte Sonneneinstrahlung, mindestens drei Wochen stabil.

Tabelle 1 — Standardlösungen für den oberen Kalibrierbereich (160 mg/kg bis 1 600 mg/kg)

Standardlösung	V_{16-OMC} ml	C_{16-OMC} µg/ml	W_{16-OMC} mg/kg
H1	2,0	80	1 600
H2	1,5	60	1 200
H3	1,0	40	800

Tabelle 1 (fortgesetzt)

Standardlösung	V_{16-OMC} ml	C_{16-OMC} µg/ml	W_{16-OMC} mg/kg
H4	0,5	20	400
H5	0,2	8	160

Die festgelegten Volumina in einen 5-ml-Messkolben pipettieren und diesen mit Acetonitril (5.1) auffüllen.

5.12.4 Kalibrierlösungen für den unteren Kalibrierbereich (16 mg/kg bis 120 mg/kg).

Zuerst die Stammlösung (5.12.2) 1 : 10 mit Acetonitril (5.1) verdünnen, um eine Standardlösung mit 20 µg/ml (10 ml) zu erhalten. Daraus fünf verschiedene verdünnte Lösungen für die Erstellung der Fünfpunktkalibrierung und die Berechnung des Gehalts an 16-*O*-Methylcafestol herstellen, wie in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2 — Standardlösungen für den unteren Kalibrierbereich (16 mg/kg bis 120 mg/kg)

Standardlösung	V_{16-OMC} ml	C_{16-OMC} µg/ml	W_{16-OMC} mg/kg
L1	1,5	6,0	120
L2	1,2	4,8	96
L3	0,8	3,2	64
L4	0,4	1,6	32
L5	0,2	0,8	16

Die festgelegten Volumina in einen 5-ml-Messkolben pipettieren und diesen mit Acetonitril (5.1) auffüllen.

Falls der Gehalt der Kaffee-Messlösung den höchsten Wert der Kalibrierkurve übersteigt, muss die Messlösung 1 : 5 oder 1 : 10 verdünnt werden. Die Linearität der Kalibrierkurven muss individuell überprüft werden.

6 Prüfeinrichtung

Die üblichen Laborgeräte und insbesondere die in 6.1 bis 6.20 angegebenen Geräte müssen verwendet werden.

6.1 Kaffeemühle, kältebeständig und damit geeignet für das Mahlen von Rohkaffeebohnen.

ANMERKUNG Zum Beispiel haben sich kryogene Mühlen als geeignet für das Mahlen von Rohkaffeebohnen erwiesen.

6.2 Mühle, geeignet für das Mahlen von gerösteten Kaffeebohnen.

ANMERKUNG Zum Beispiel haben sich handelsübliche Mühlen als geeignet für das Mahlen von gerösteten Kaffeebohnen erwiesen.

6.3 Siebe mit Drahtsiebböden der Maschenweiten 0,63 mm und 0,25 mm, die die Anforderungen nach ISO 3310-1 erfüllen.

6.4 Glycerinbad oder Heizblock.

6.5 Heizplatte mit integriertem Rührwerk.

- 6.6 **Röhrchen mit Schraubverschluss¹ und Verschlüsse für diese Röhrchen²** (für die Hydrolyse).
- 6.7 **Magnetrührer**, dreieckig, 16 mm × 10 mm.
- 6.8 **Heizvorrichtung zum Austreiben von Lösemitteln³**.
- 6.9 **Ultraschallbad**, Raumtemperatur.
- 6.10 **Messzylinder**, 10 ml.
- 6.11 **Messkolben**, unterschiedliche Größen (5 ml, 10 ml, 50 ml, 100 ml).
- 6.12 **Pasteurpipetten**.
- 6.13 **Gewindeflaschen mit Verschluss**, 60 ml Nennvolumen (Höhe × Durchmesser 140 mm × 28 mm).
- 6.14 **Rundkolben**, 50 ml.
- 6.15 **Vakuumrotationsverdampfer** oder gleichartige Laborgeräte.
- 6.16 **Membranfilter**, regenerierte Cellulose, Porengröße von 0,2 µm, oder eine gleichartige Membran.
- 6.17 **HPLC-Glasfläschchen**, 2 ml, Klarglas oder Braunglas.
- 6.18 **Hochleistungsflüssigchromatograph mit UV-Detektor**, Messungen bei 224 nm, mit Auswertesystem, vorzugsweise mit einem Säulenofen.
- 6.19 **Trennsäule**, Umkehrphase C₁₈⁴.
- 6.20 **Gefäß**, nichtrostender Stahl, 600 ml.

7 Probenahme

Es ist von einer repräsentativen Probe auszugehen.

-
- 1 DURAN Kulturröhrchen (Z620262), 30 ml Nennvolumen (180 mm × 18 mm, Höhe × Durchmesser) aus Borosilicatglas sind ein Beispiel für handelsübliche Röhrchen mit Schraubverschluss. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Personen, die dieses Dokument anwenden, und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.
 - 2 PBT-Verschluss für DURAN (2924011), temperaturbeständig bis zu 180 °C, Größe GL 18 ist ein Beispiel für handelsübliche Verschlüsse für Röhrchen mit Schraubverschluss. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Personen, die dieses Dokument anwenden, und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.
 - 3 Reacti-Therm™ von PIERCE ist ein Beispiel für eine handelsübliche Vorrichtung zum Austreiben. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Personen, die dieses Dokument anwenden, und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.
 - 4 Chromolith HR (100 mm × 4,6 mm, Länge × Durchmesser), Phenomenex Luna 3 µm C18 (150 mm × 4,6 mm), LiChrospher 100 RP 18 (250 mm × 5 mm) und Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 mm × 3 mm) wurden unter anderem im Ringversuch verwendet und sind Beispiele für handelsübliche Umkehrphasen-C₁₈-HPLC-Säulen. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Personen, die dieses Dokument anwenden, und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.