



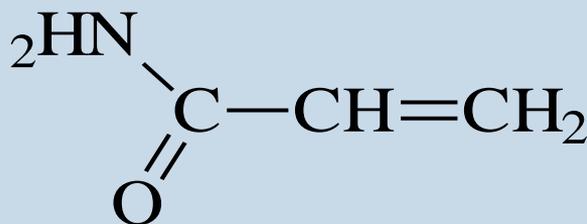
# Methoden zum quantitativen und qualitativen Nachweis von Acrylamid

Dr. Klaus Vosmann

Institut für Sicherheit und Qualität bei Getreide

# Einige Fakten zu Acrylamid

Strukturformel:



- kleines, polares Molekül
- Molgewicht:  $m/z$  71
- gut löslich in Wasser und polaren Lösungsmitteln
- wird im Körper rasch verteilt und zu Glycidamid metabolisiert
- hatte bis zum April 2002 nur eine Bedeutung als Monomer für Polyacrylamid
- Polyacrylamid wird in verschiedenen technische Gebieten eingesetzt (z.B. Verpackungsmaterialien, Papier- und Textilindustrie, Flockungsmittel bei der Trinkwasseraufbereitung, Gelelektrophorese)
- bis 2002 kaum Analytik für Acrylamid in Lebensmitteln bekannt

# Rechtliche Aspekte 1

- ✓ Acrylamid (AA) fällt nicht unter die Commission Regulation (EC) No 1881/2006
- ✓ lange waren keine Grenzwerte definiert
- ✓ seit 2003 **Signalwerte** in Deutschland
- ✓ abgelöst 2011 durch **EU-Richtwerte**
- ✓ **Werte bis 11/2017**: Commission Recommendation 2013/647/EU
- ✓ Neu: **Verordnung (EU) 2017/2158 der Kommission**  
zur Festlegung von Minimierungsmassnahmen und Richtwerten für die Senkung des Acrylamidgehaltes in Lebensmitteln
  - u.a. Einführung von Höchstgehalten für bestimmte Lebensmittel vorgesehen

# Rechtliche Aspekte 2

Analytische Methoden bis heute nicht vollständig normiert, aber EU definiert z.Zt. Standards:

**1.EN 16987:2016** Food analysis - Determination of acrylamide in coffee and coffee products by HPLC-MS/MS and GC-MS [dt. Fassung: DIN EN 16987]

**2.CEN/TS 17083:2017** Foodstuffs - Determination of acrylamide in food and coffee by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) (under approval)

**3.EN 16618:2015** Food analysis - Determination of acrylamide in food by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) [dt. Fassung: DIN EN 16618]

Anforderung an alle Methoden: **LoQ** of **30** µg/kg (**Brot** und Kindernahrung) und **50** µg/kg (Kartoffelprodukte, **andere Getreideprodukte**, Kaffee und weitere Produkte)

Dies galt bis zur neuen EU Verordnung vom November 2017

# Anforderungen an die Analytik gemäß neuer Verordnung (Anhang, Absatz II)

- Anwendbarkeit: Lebensmittel gemäß der Verordnung
- Blindwert: unter der Nachweisgrenze
- Spezifität: frei von Matrixinterferenzen
- Wiederfindung: 75 – 110 %
- Nachweisgrenze: drei Zehntel der Quantifizierungsgrenze
- Quantifizierungsgrenze:
  - für Richtwerte  $< 125 \mu\text{g}/\text{kg}$ :  $<$  zwei Fünftel des Richtwerts, jedoch nicht kleiner als  $20 \mu\text{g}/\text{kg}$
  - für Richtwerte  $> 125 \mu\text{g}/\text{kg}$ :  $< 50 \mu\text{g}/\text{kg}$

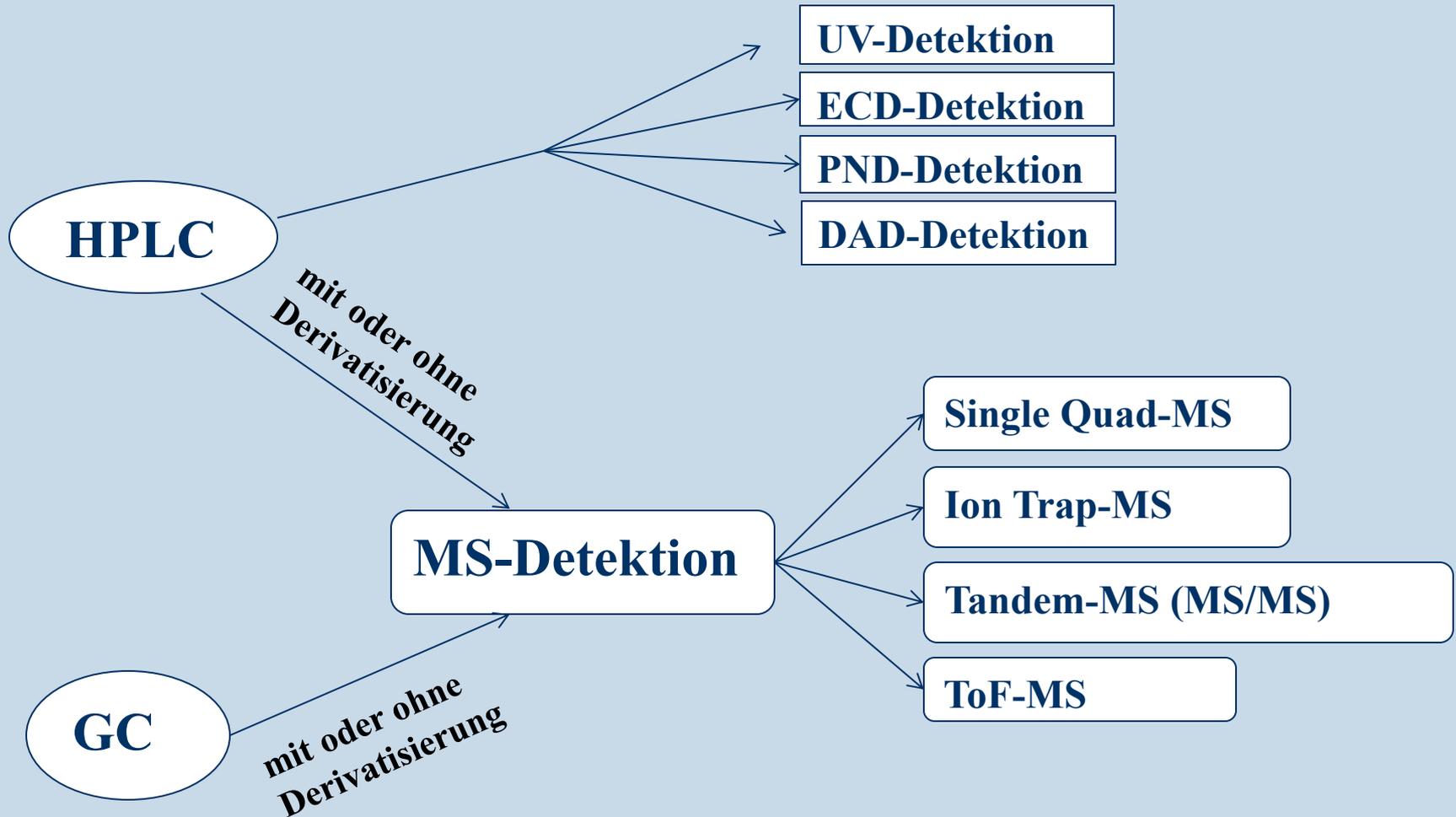
# Aktuelle Richtwerte der EU für Backwaren und Getreideerzeugnisse (Gehalte in $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), neue Verordnung

weiches Brot auf Weizenbasis	50	(80)
anderes weiches Brot	100	(150)
Kekse und Waffeln	350	(500)
Cracker	400	(500)
Knäckebrot	350	( 450)
Lebkuchen	800	(1000)
andere ähnliche Produkte auf Getreidebasis	300	(500)
Kekse und Zwieback für Säuglinge und Kleinkinder	150	(200)
andere Getreidebeikost für Säuglinge und Kleinkinder	40	(50)

*(in Klammern alte Richtwerte)*

# Methoden zur Bestimmung von Acrylamid

## Ein Überblick



# LC-MS Methoden 1

## LC-MS (Single Ion-Trap Massenspektrometer)

- **Vorteile:** kostengünstig, Full-Scan-Daten, schnelle Scanrate, ESI- und APCI-Quelle verwendbar
- **Nachteile:** Genauigkeit und Empfindlichkeit nicht optimal, nur für wenig komplexe Matrices
- Derivatisierung mit Mercaptobenzoessäure verbessert Analytik, aber aufwendigere Probenaufarbeitung

# LC-MS Methoden 2

## LC-MS/MS (Triple-Quad Massenspektrometer)

- **Vorteile:** hohe Empfindlichkeit und Genauigkeit, Signal to Noise Verhältnis excellent, ESI- und APCI-Quelle verwendbar, keine Derivatisierung notwendig, Identifizierung und Quantifizierung durch Massenübergänge, sehr niedriger LoD (3-20µg/kg) und LoQ (10-50µg/kg), alle Matrices
- **Nachteile:** sehr hohe Anschaffungs – und Unterhaltungskosten des Geräts

# GC-MS Methoden 1

## GC-MS ohne Derivatisierung im EI-Modus

### Vorteile

- Probenaufarbeitung nicht sehr aufwändig
- Vermeidung zeitaufwändiger Derivatisierung → Höherer Probendurchsatz
- Geringe Geräte- und Unterhaltungskosten

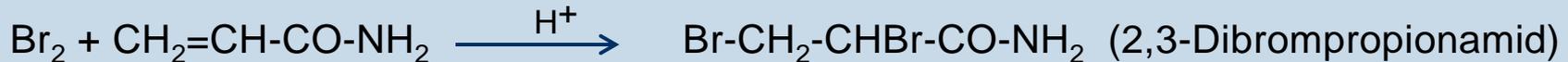
### Nachteile

- Keine charakteristischen Ionen ( $m/z$  71 und 55)
- Coelution mit Matrixkomponenten (z.B. Maltol, Heptansäure)
- → erhöhter Untergrund → Verschlechterung der Empfindlichkeit
- Potentielle Acrylamidbildung im heißen Injektor (Coextrahierte Precursors)
- Hochpolares Molekül → eingeschränkte Auswahl bei der Wahl der Säulenphase
- Exakte Coelution von 3-Hydroxypropionitril → Überbestimmung von Acrylamid

# GC-MS Methoden 2

## GC-MS mit Derivatisierung im EI-Modus

Derivatisierung mit Brom ( $\text{Br}_2$ ) unter sauren Bedingungen (Additionsreaktion)



### Vorteile

- Weniger polarer Analyt  $\longrightarrow$  leichter aus Wasser extrahierbar
- Erhöhung des Molekulargewichts des Analyten  $\longrightarrow$  Steigerung Empfindlichkeit
- Erhöhte Flüchtigkeit des Analyten  $\longrightarrow$  bessere Trennung

### Nachteile

- Schwierigere und zeitaufwändigere Probenaufarbeitung
- Analyt ist thermisch instabil  $\longrightarrow$  partielle Zersetzung zu 2-Brompropenamid
- Ausweg: Vollständige Umwandlung des Analyten
- Zugabe von Triethylamin vor der Chromatographie

# GC-MS Methoden 3

## GC-MS ohne Derivatisierung im PCI-Modus

### Ionisierung mit Reaktandgas (Methan oder Ammoniak)

#### Vorteile

- Probenaufarbeitung nicht sehr aufwändig
- Vermeidung zeitaufwändiger Derivatisierung → Höherer Probendurchsatz
- Geringe Geräte- und Unterhaltungskosten
- Charakteristischen Ionen ( $m/z$  72 (Analyt) und 75 (ISDT))
- Kaum Coelution mit Matrixkomponenten
- Wenig Untergrund → Steigerung von Selektivität und Empfindlichkeit

# GC-MS Methoden 4

**GC-MS ohne Derivatisierung im PCI-Modus**

**Ionisierung mit Reaktandgas (Methan oder Ammoniak)**

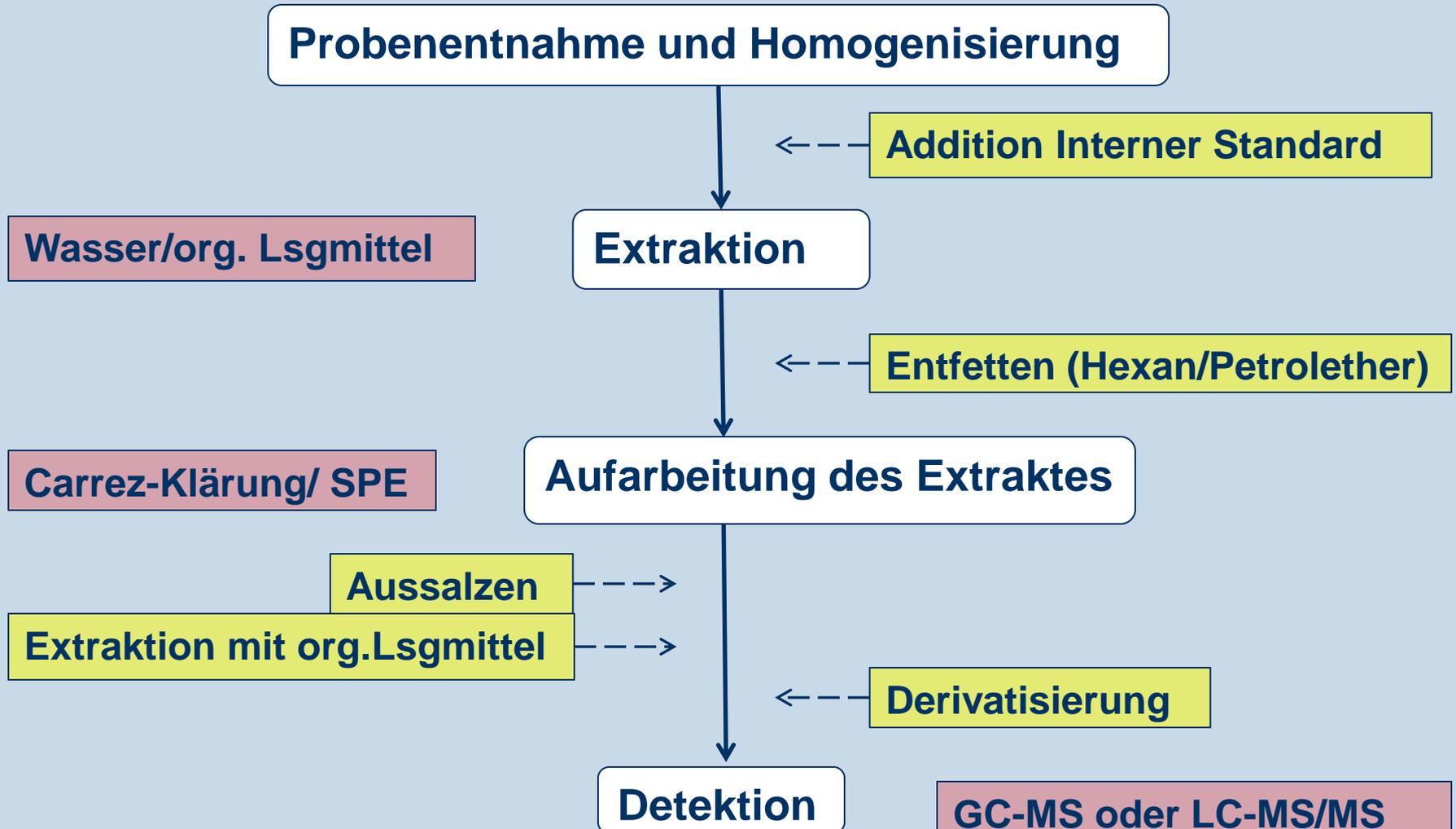
## **Nachteile**

- Potentielle Acrylamidbildung im heißen Injektor (Coextrahierte Precursor)
- Hochpolares Molekül → eingeschränkte Auswahl bei der Wahl der Säulenphase

**GC-MS/MS im SRM-Mode: Untersuchung von Massenübergängen**

keine Überlagerung mit Störpeaks, aber hohe Kosten

# Allgemeine Darstellung der Probenaufarbeitung



# Bestimmung von Acrylamid (Methode MRI)

**4g Probenmaterial + 50ml H<sub>2</sub>O + ISTD (D<sub>3</sub>-AA) (7,5µg/ml)**

**Extraktion bei 60 ° C im Ultraschallbad (30 min)**

**Entfettung mit Petrolether**

**Klärung mit Carrez I und II (Proteinentfernung)**

**Aussalzen von AA mit NaCl**

**Extraktion von AA mit Essigester aus wäßriger Phase**

**GC-MS (PCI)**

# GC/MS-Methode / EI-Modus

## GC-Säule

Innowax, 60m, 0.25 mm i.D, 0.25 µm Filmdicke

## Ofenprogramm

60° C/2min  $\xrightarrow{15^\circ \text{ C/min}}$  240° C/15min

## Injektor

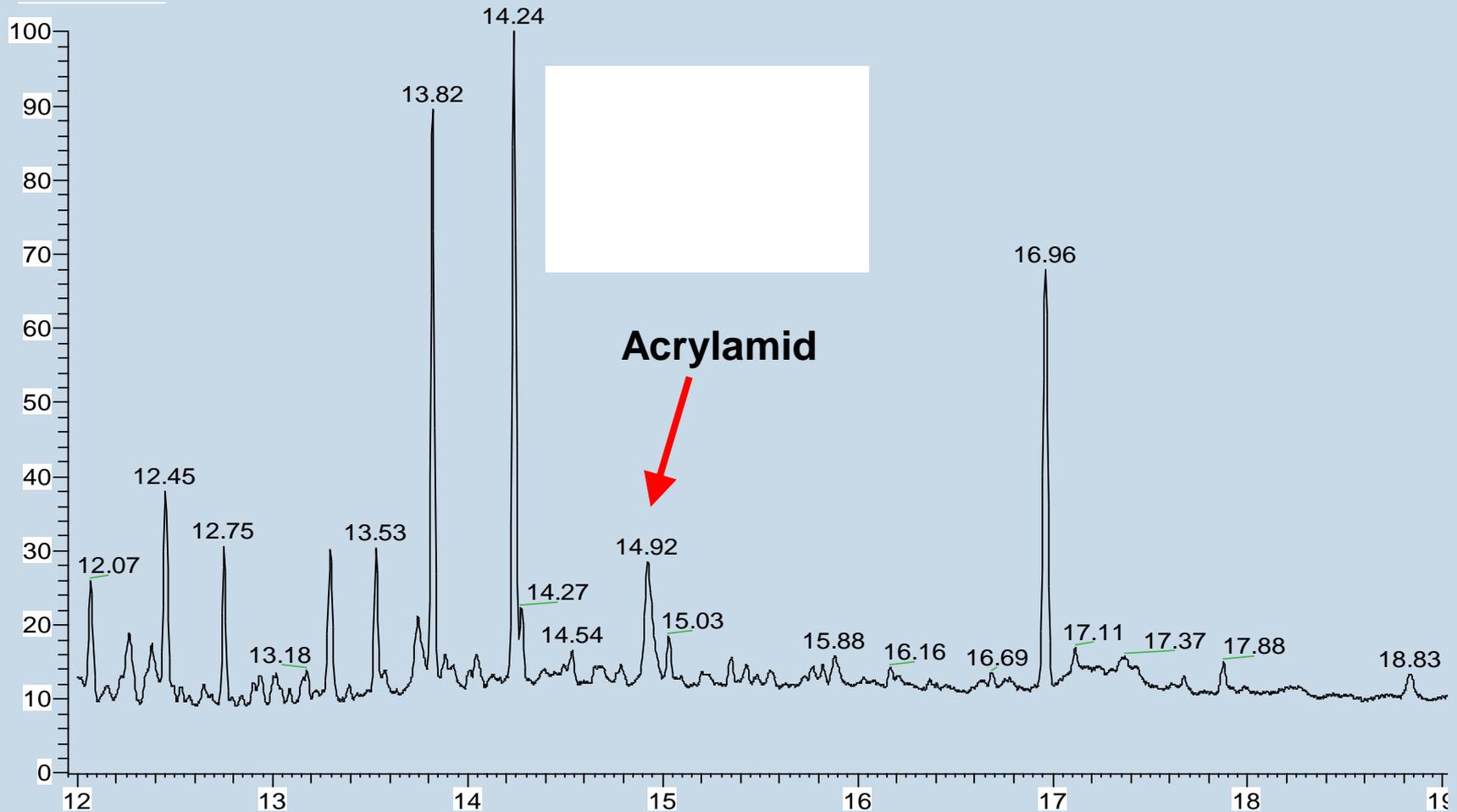
Temperatur 200° C, Splitless-Modus , 1ml/min (konstanter Fluss)

## MS-Methode

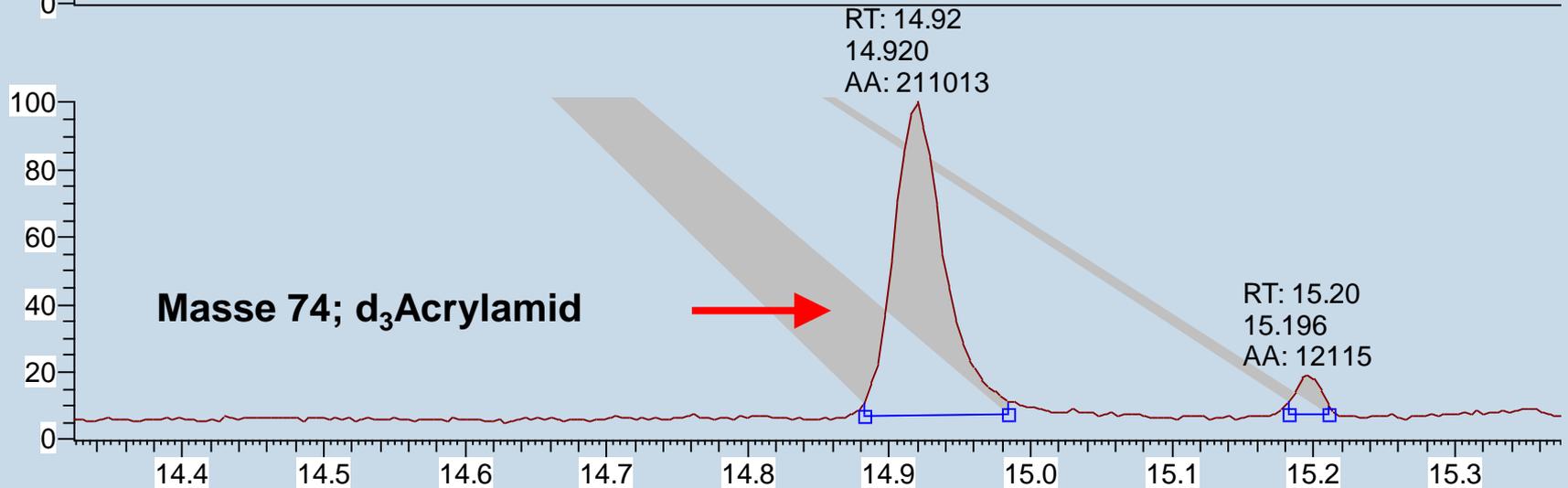
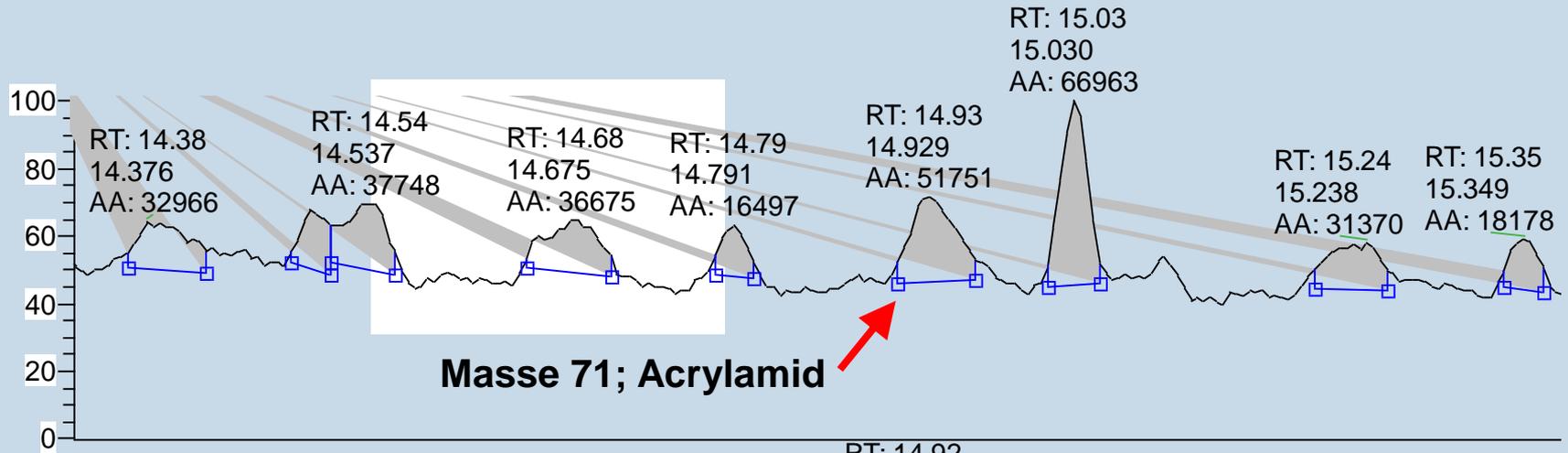
Quellentemperatur 230° C, SIM mit Massen 55, 58, 71 und 74

# Acrylamid - EI Messung

Beispiel für eine auswertbare Probe aus einer typischen Messreihe

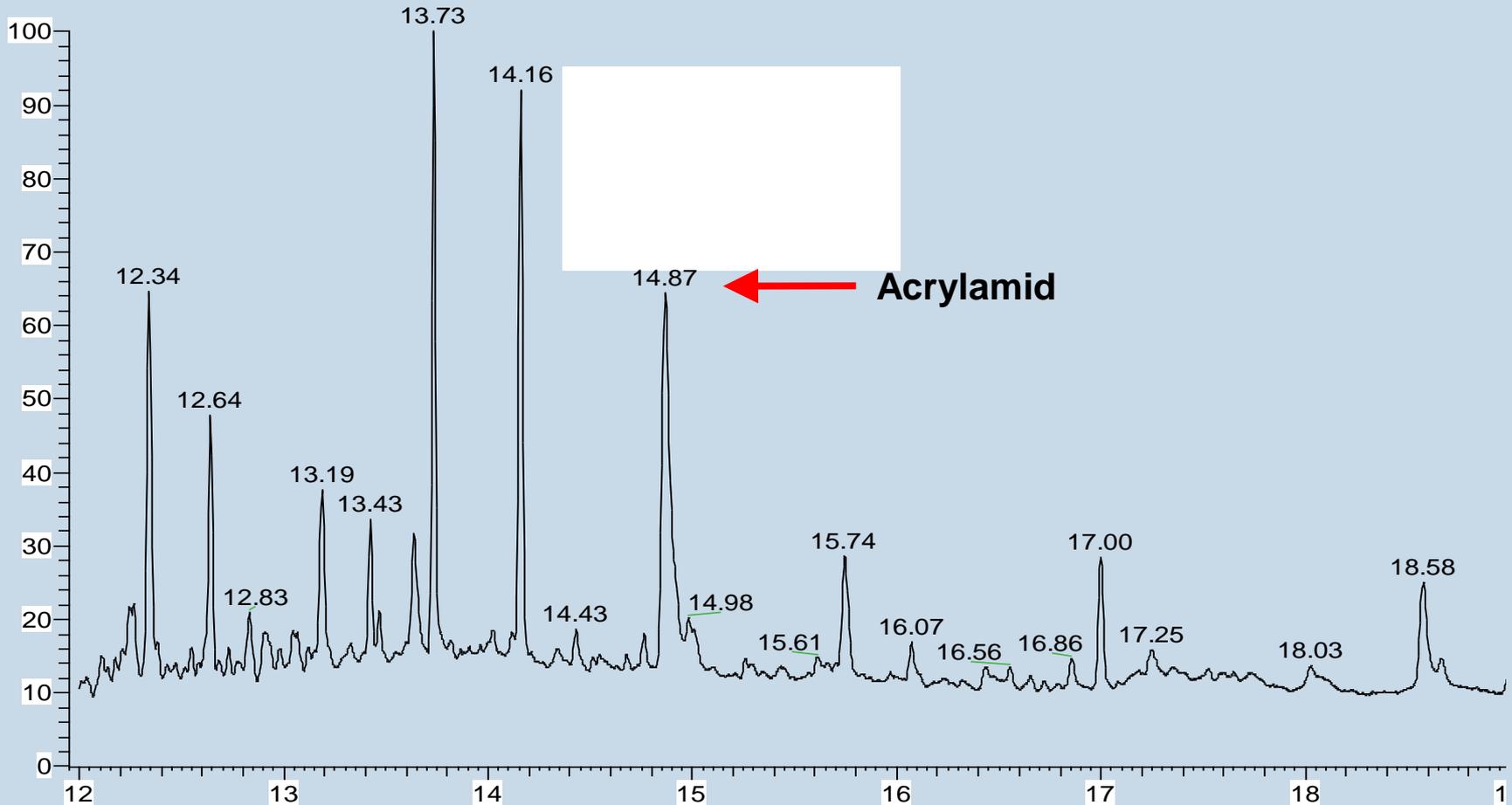


# Darstellung der Massenspuren zur Auswertung

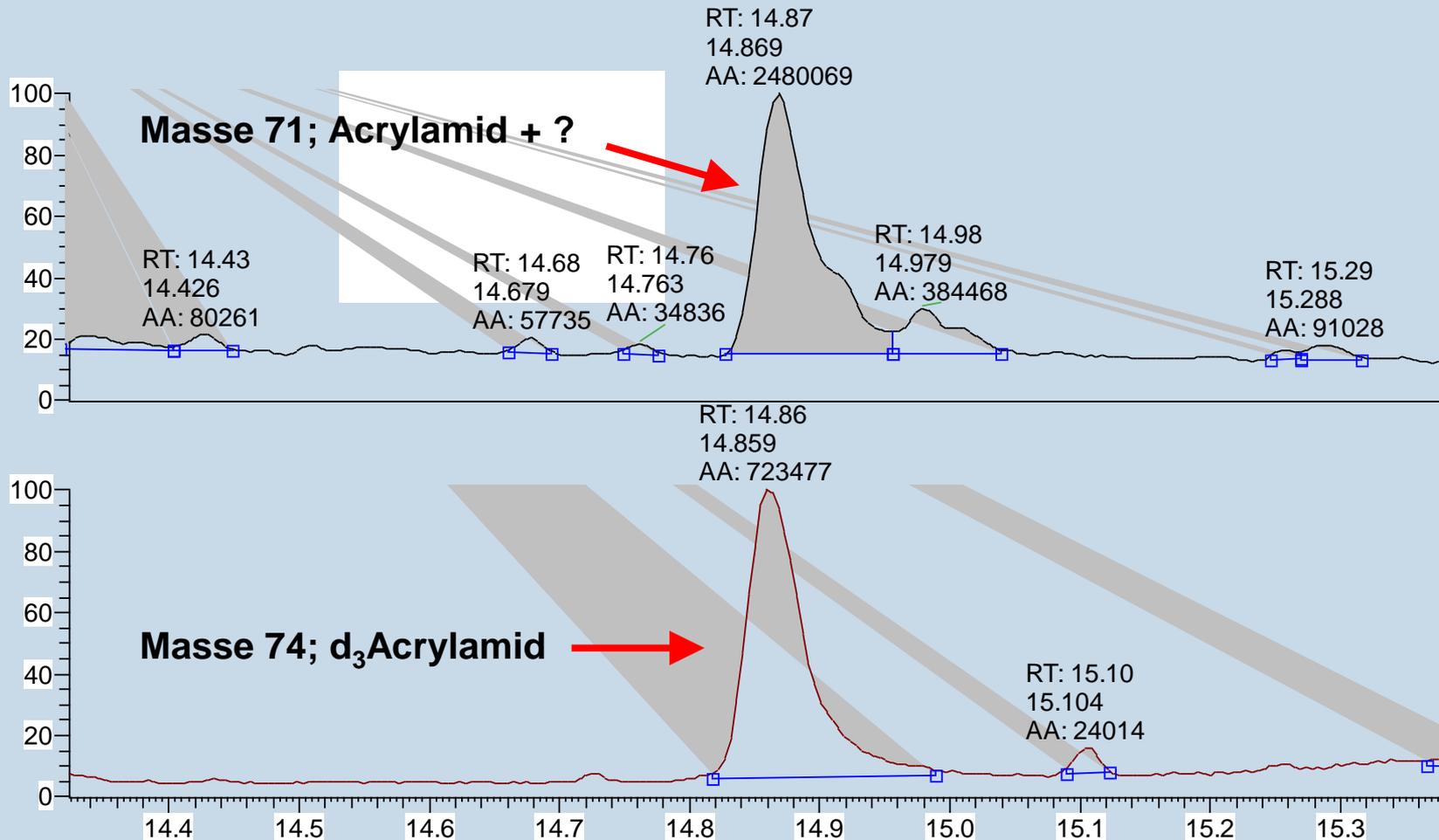


# Acrylamid - EI Messung

Beispiel für eine schwer auswertbare Probe aus einer typischen Messreihe



# Darstellung der Massenspuren zur Auswertung



# GC/MS-Methode / PCI-Modus

## GC-Säule

Innowax, 60m, 0.25 mm i.D, 0.25 µm Filmdicke

## Ofenprogramm

60° C/2min  $\xrightarrow{15^\circ \text{ C/min}}$  240° C/15min

## Injektor

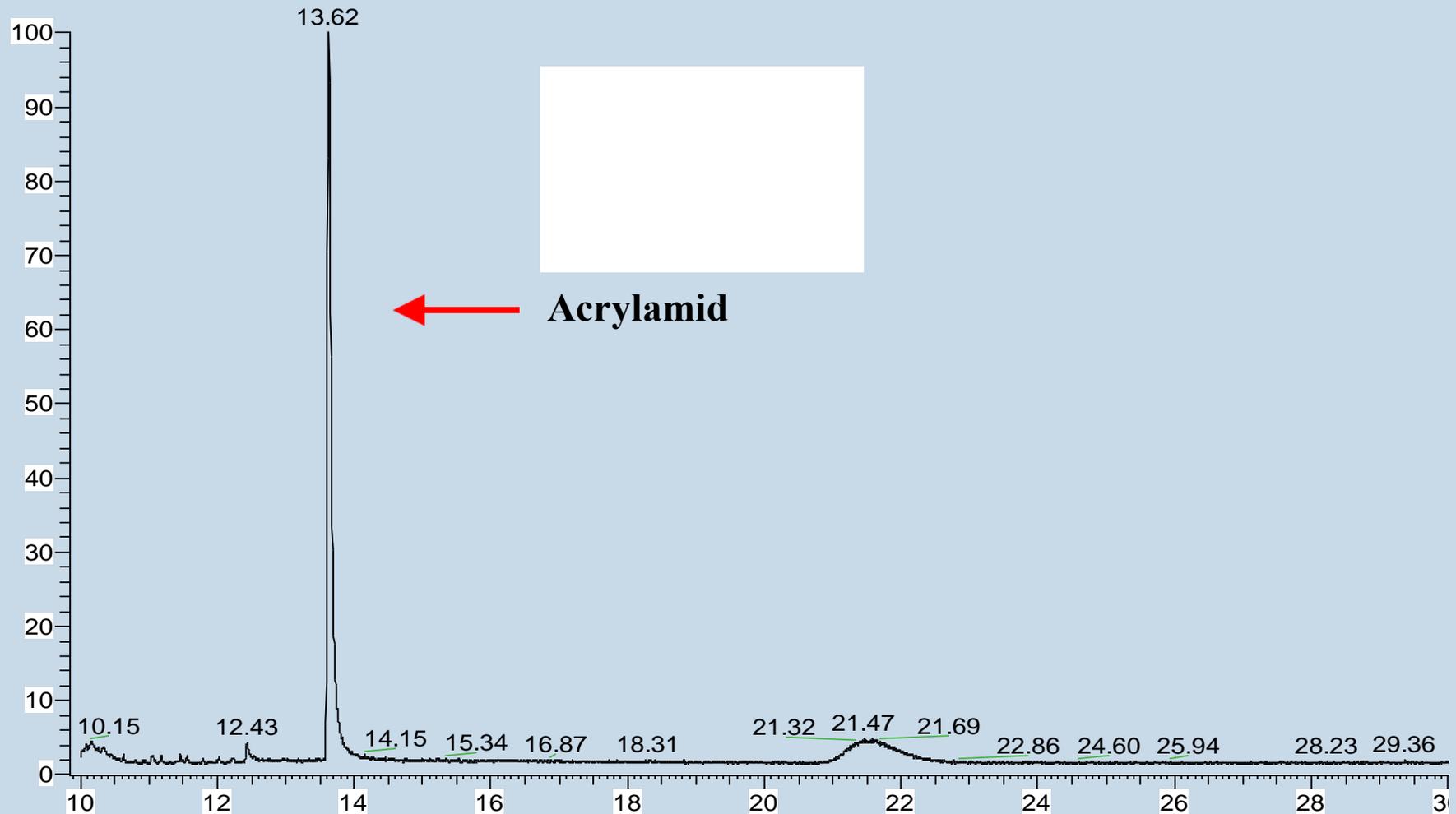
Temperatur 200° C, Splitless-Modus , 1ml/min (konstanter Fluss)

## MS-Methode

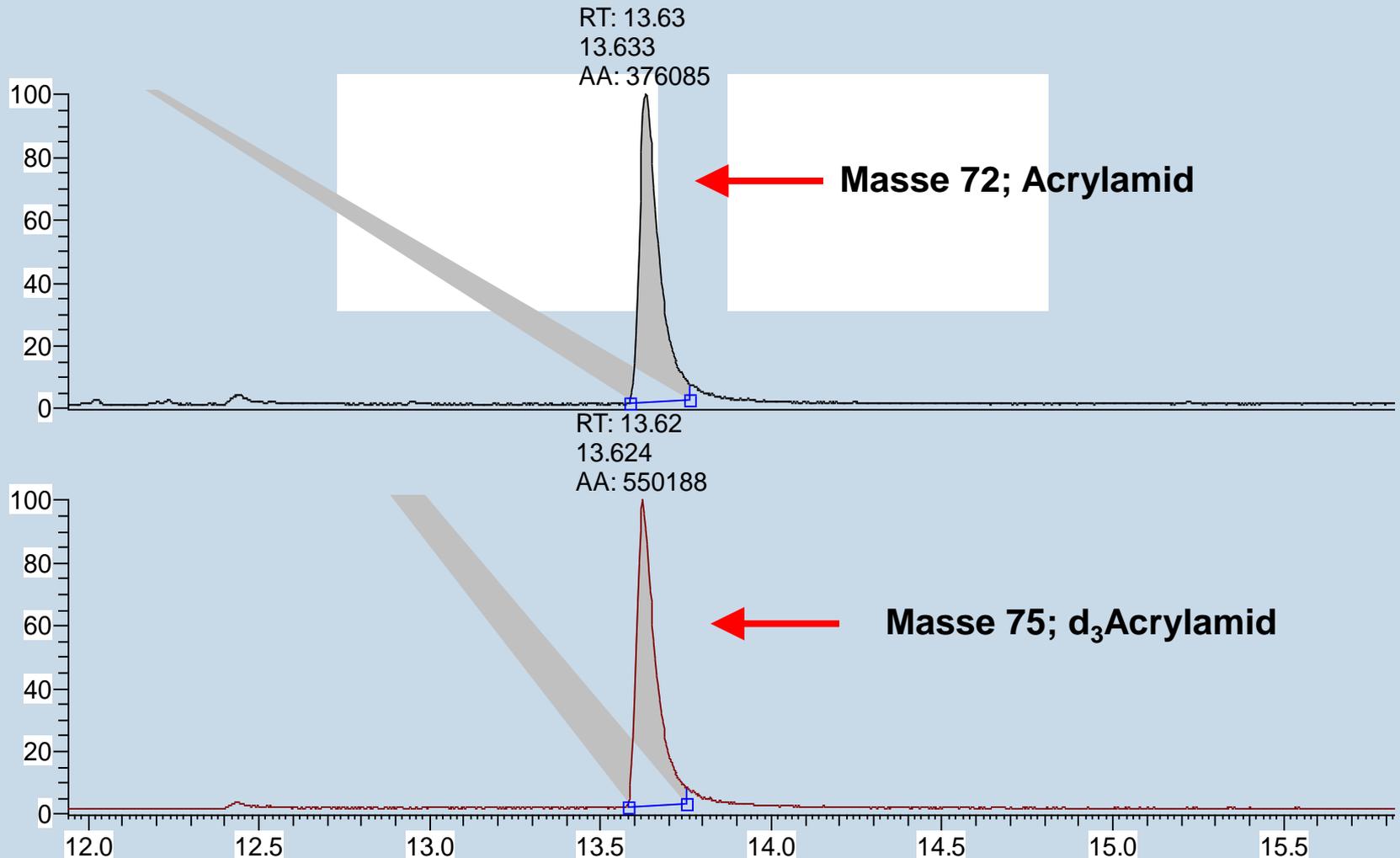
Quellentemperatur 180° C, SIM mit Massen 72 und 75  
Reaktandgas Methan, Fluss: 1,3mL/min

# Acrylamid - PCI Messung

Beispiel für eine sehr gut auswertbare Probe aus einer typischen Messreihe

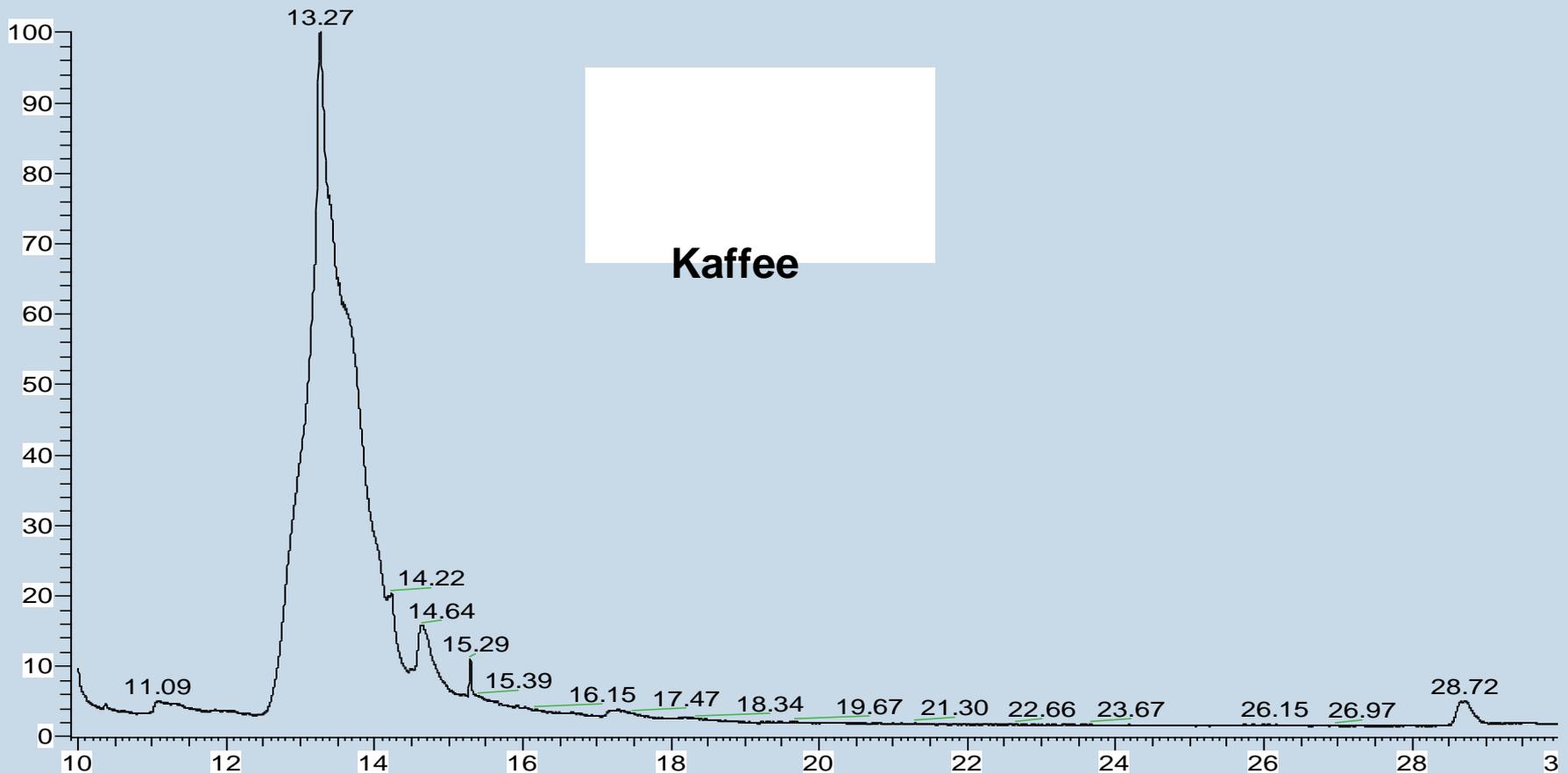


# Darstellung der Massenspuren zur Auswertung

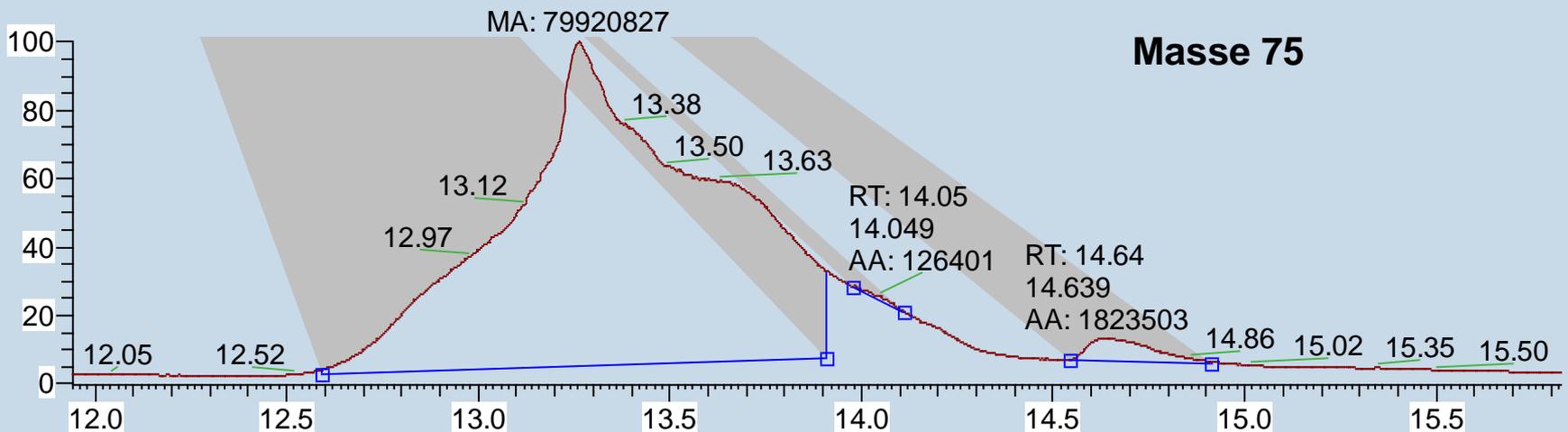
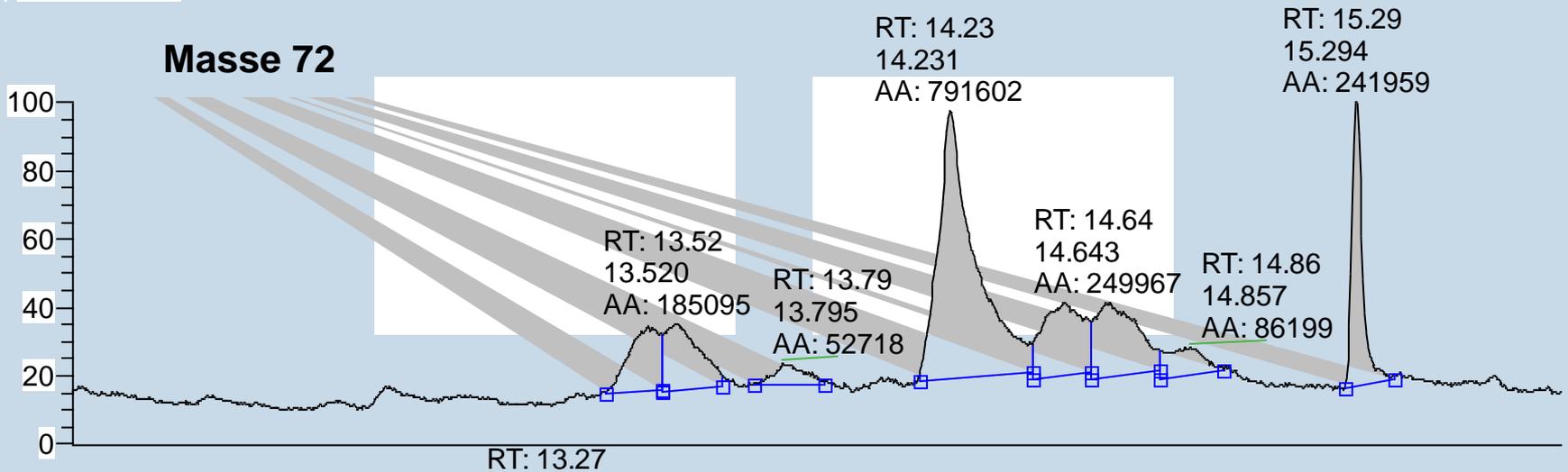


# Acrylamid - PCI Messung

Beispiel für eine nicht auswertbare Probe aus einer typischen Messreihe



# Darstellung der Massenspuren zur Auswertung



# Wichtige Parameter der PCI-Methode

- EI-Modus aufgrund der Matrix ungeeigneter als PCI-Modus
- Nachweisgrenze (LoD): 5 - 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (20 - 40 pg absolut)
- Bestimmungsgrenze (LoQ): 20 - 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (80 - 120 pg absolut)
- Acrylamid in Matrix Kaffee nicht bestimmbar (Coelutionen)
- Linearer Messbereich: 50 – 4000  $\mu\text{g}/\text{kg}$
- Wiederfindung Acrylamid: 75-95%

# Roggenbrot

## Einfluss der Backtemperatur auf den Acrylamidgehalt



<b>Backtemperatur :</b>	<b>260 à 210° C</b>	<b>180° C</b>
<b>Backzeit :</b>	<b>60 min</b>	<b>80 min</b>
<b>Acrylamidgehalt :</b>	<b>250</b>	<b>160</b>
<b>[µg/kg]</b>	<b>(136/354)</b>	<b>(123/189)</b>

# Aktuelle Richtwerte der EU für Backwaren und Getreideerzeugnisse (Gehalte in $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), neue Verordnung

<b>weiches Brot auf Weizenbasis</b>	<b>50</b>	<b>(80)</b>
<b>anderes weiches Brot</b>	<b>100</b>	<b>(150)</b>
<b>Kekse und Waffeln</b>	<b>350</b>	<b>(500)</b>
<b>Cracker</b>	<b>400</b>	<b>(500)</b>
<b>Knäckebrötchen</b>	<b>350</b>	<b>(450)</b>
<b>Lebkuchen</b>	<b>800</b>	<b>(1000)</b>
<b>andere ähnliche Produkte auf Getreidebasis</b>	<b>300</b>	<b>(500)</b>
<b>Kekse und Zwieback für Säuglinge und Kleinkinder</b>	<b>150</b>	<b>(200)</b>
<b>andere Getreidebeikost für Säuglinge und Kleinkinder</b>	<b>40</b>	<b>(50)</b>

*(in Klammern alte Richtwerte)*

**Mein Dank gilt ebenso den vielen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Lipide, die im Laufe der Jahre an der Probenaufarbeitung beteiligt waren, insbesondere Frau Uda Eggers-Müller. Durch ihre wertvollen Hinweise konnten immer wieder kleine Details bei der Aufarbeitung der Proben verbessert werden.**



**Ebenso möchte ich mich bei Herrn Marjan Tomas und Frau Petra Weitkamp für die Messungen der vielen Tausend Proben an unserem GC/MS-System bedanken.**

**Vielen Dank für ihre Aufmerksamkeit!**