

Bestimmung von Acrylamid aus Kaffee – ein Methodenvergleich

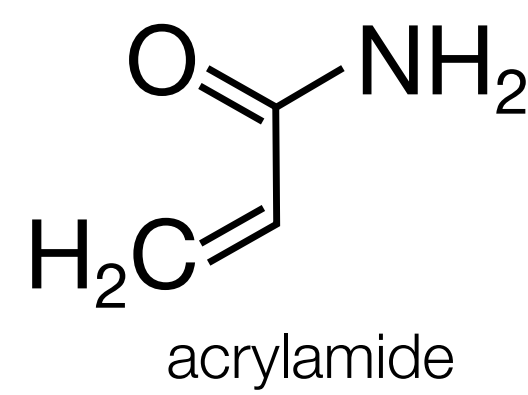
H. R. Wollseifen, Düren/D, T. Kretschmer, Düren/D, M. Roedel, Düren/D, H. Riering, Düren/D

Dr. H. R. Wollseifen, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Neumann-Neander-Str. 6–8, 52355 Düren/D



Einleitung:

Die Untersuchung von Acrylamid in Lebensmitteln wird im Rahmen der allgemeinen Lebensmittelkontrolle häufig durchgeführt [1]. Empfehlungen zu Richtwerten von Acrylamid in Lebensmitteln wurden seitens der EU-Kommission veröffentlicht und werden bei den Untersuchungen berücksichtigt [2]. Es haben sich Probenvorbereitungsmethoden etabliert, die eine effiziente Abreicherung der Matrixkomponenten aus den Lebensmittelextrakten ermöglichen. Cleanup-Verfahren mit klassischen SPE-Säulen, aber auch per dispersiver SPE (QuEChERS) finden in der Lebensmittelanalytik Anwendung.



Anschlussanalytik für alle Probenaufbereitungsverfahren:

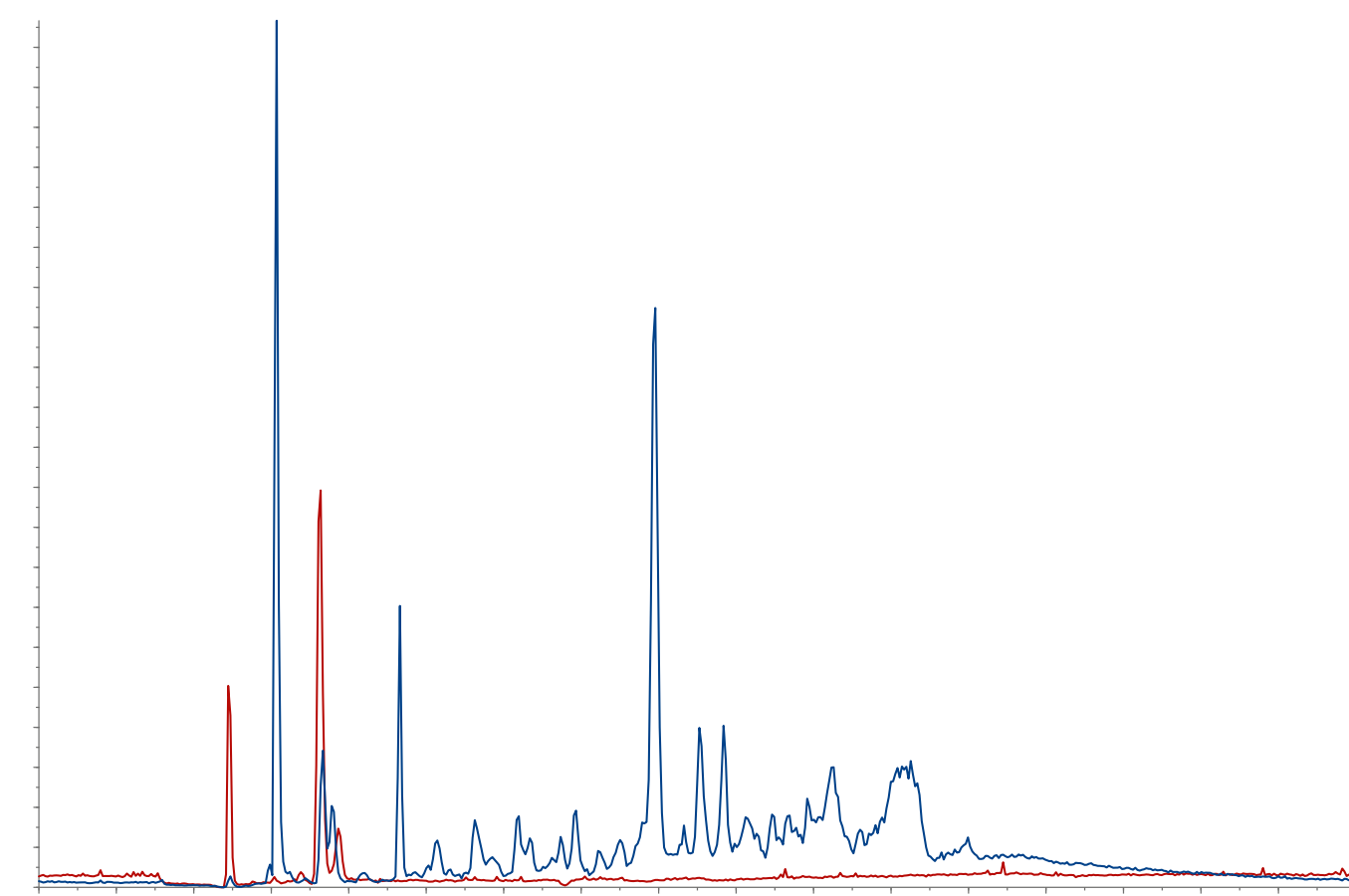
Säule:	EC 150/3 NUCLEODUR® C ₁₈ Gravity, 3 µm	Detektion:	MS/MS, AB Sciex API QTRAP 5500
Eluent A:	0.001 % Ameisensäure in Wasser	Ion source:	Turbo Spray (ESI)
Eluent B:	0.001 % Ameisensäure in Methanol	Scan type:	MRM
Gradient:	10 % B in 10 min auf 100 % B, zurück auf 10 % B in 2 min, für 5 min 10% B halten	Polarity:	positive
Fluss:	0.25 mL/min	Curtain gas:	15 psig
Temperatur:	60 °C	Ion spray voltage:	5000 V
Injektionsvolumen:	10 µL	Temperature:	650 °C
		Gas 1 (nebulizer):	60 psig
		Gas 2 (turbo gas):	50 psig
		CAD gas:	medium

Probenvorbereitung für klassische SPE

- 2 g Kaffeeprobe mit 2 mL Hexan versetzen und schütteln
- 100 µL einer wässrigen D₃-Acrylamidlösung (β = 1 µg/mL) hinzufügen
- Bei Proben zur Bestimmung der Wiederfindung zusätzlich 100 µL einer wässrigen Acrylamidlösung (β = 1 µg/mL) hinzufügen
- 20 mL Wasser hinzufügen, schütteln und 15 min bei 40 °C im Ultraschallbad extrahieren
- Abzentrifugieren (4500 u/min, 5 min, 4 °C)
- 10 mL Überstand abnehmen
- 1 mL Carrez I –Lösung hinzufügen und schütteln
- 1 mL Carrez II –Lösung hinzufügen und schütteln
- Abzentrifugieren (4500 u/min, 5 min, 4 °C)
- Überstand abnehmen
- Rückstand mit 2 mL Wasser erneut extrahieren
- Abzentrifugieren (4500 u/min, 5 min, 4 °C)
- Beide Überstände vereinigen

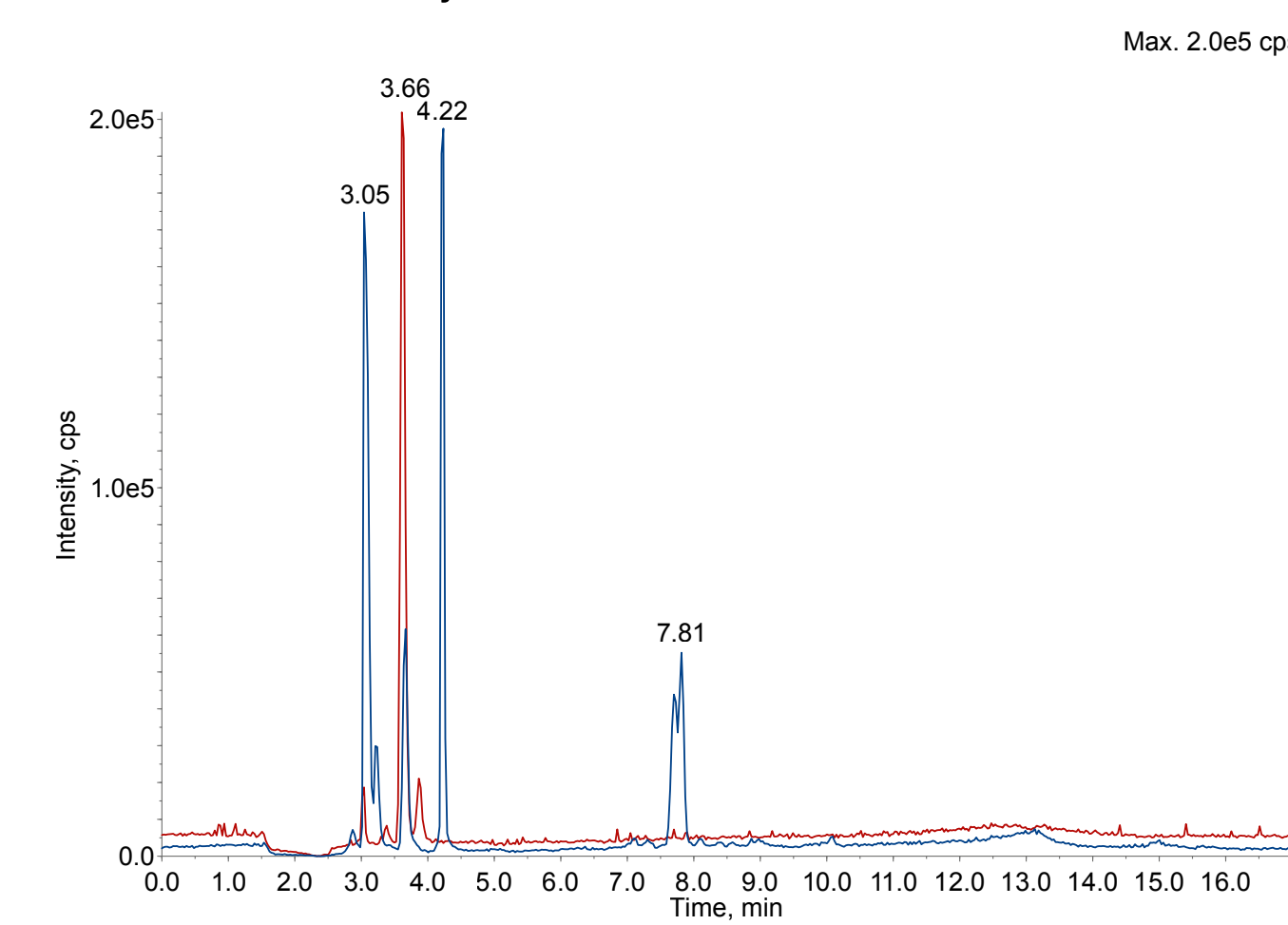
Cleanup für klassische SPE

- Säule: CHROMABOND® ABC₁₈, 6 mL, 500 mg
- Konditionierung: 1 x 10 mL Methanol
1 x 10 mL Wasser
- Probenaufgabe: Probe unter leichtem Vakuum auftragen
- Trocknen: 1 min trocken saugen
- Probe auf 20 mL mit Wasser auffüllen



Retentionszeit: 3,6 min
Blau MRM von Acrylamid 72,4/55,1 , 72,4/44,1
Rot MRM von D3-Acrylamid 75,4/58,0 , 75,4/44,1

- Säulen: CHROMABOND® C₁₈ec, 6 mL, 500 mg und CHROMABOND® HR-XC, 6 mL, 500 mg
- Konditionierung: jeweils mit 1 x 10 mL Methanol
jeweils mit 1 x 10 mL Wasser
- Probenaufgabe: Probe unter leichtem Vakuum auftragen (Säulen können mit einem Konnektor übereinander gesteckt werden, dabei CHROMABOND® C₁₈ec oben)
- Trocknen: 1 min trocken saugen
- Probe auf 20 mL mit Wasser auffüllen



Retentionszeit: 3,6 min
Blau MRM von Acrylamid 72,4/55,1 , 72,4/44,1
Rot MRM von D3-Acrylamid 75,4/58,0 , 75,4/44,1

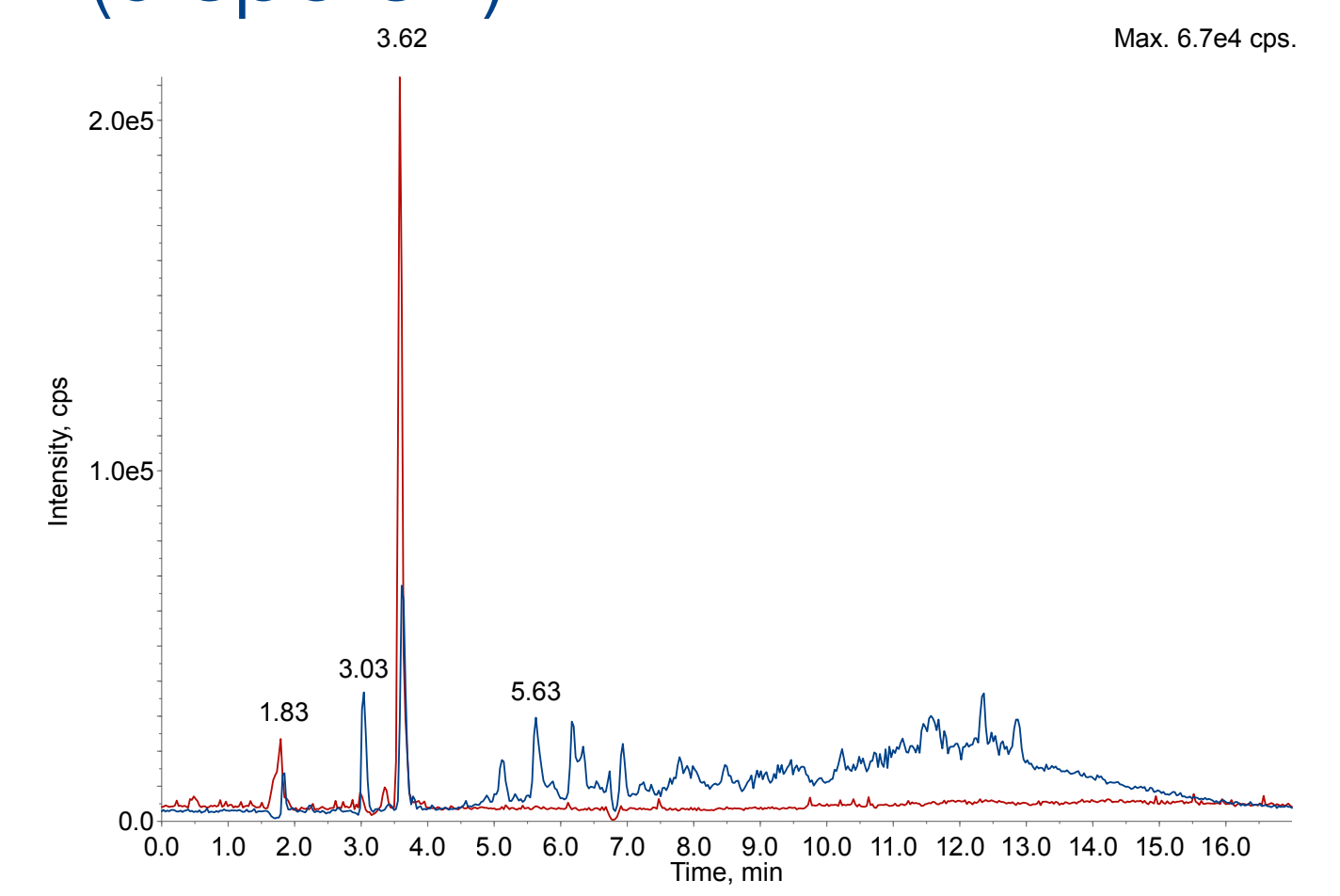
Probenvorbereitung für disperse SPE

- 1 g Kaffeeprobe in ein 50 mL Falcon einwiegen
- 50 µL einer wässrigen D₃-Acrylamidlösung (β = 1 µg/mL) hinzufügen
- Bei Proben zur Bestimmung der Wiederfindung zusätzlich 50 µL einer wässrigen Acrylamidlösung (β = 1 µg/mL) hinzufügen
- Mit 5 mL Hexan versetzen und schütteln
- 10 mL Wasser hinzufügen, schütteln
- 10 mL Acetonitril hinzufügen, schütteln
- QuEChERS Mix I (4 g MgSO₄, 1 g NaCl, 0,5 g Na₂H Citrat * 1,5 H₂O, 1 g Na₃ Citrat * 2 H₂O)
- 1 min kräftig schütteln
- Abzentrifugieren (4500 u/min, 5 min, 4 °C)
- Acetonitril-Überstand abnehmen



Cleanup für QuEChERS Extraktionsmix I und QuEChERS Extraktionsmix XX (dispersiv)

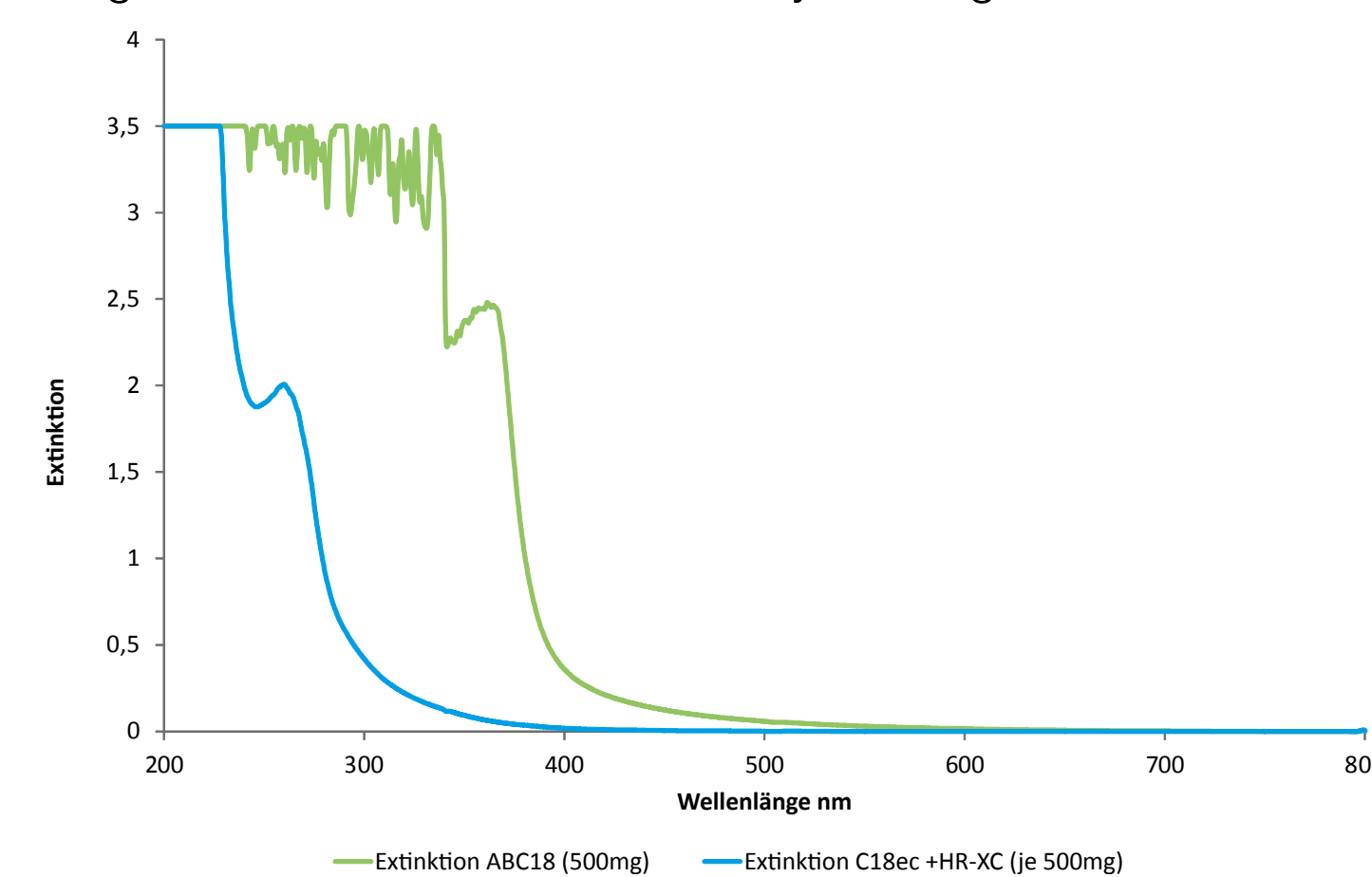
- 6 mL Überstand in 15 mL Falcon geben
- QuEChERS Mix XX (1,20 g MgSO₄, 0,40 g CHROMABOND® Diamino) zugeben
- 1 min schütteln (vortex)
- Abzentrifugieren (4500 u/min, 5 min, 4 °C)
- Überstand abnehmen
- 1:10 mit Wasser verdünnen und membranfiltrieren (PET, 20 µm, 13 mm i.D.)



Retentionszeit: 3,6 min
Blau MRM von Acrylamid 72,4/55,1 , 72,4/44,1
Rot MRM von D3-Acrylamid 75,4/58,0 , 75,4/44,1

Abreicherung der Kaffeematrix im UV-Spektrum

Vergleich der Extrakte von Octadecyl-Kieselgelen mit Ionenaustauschfunktion



Testmix 1 (MgSO₄/CHROMABOND® Diamino, 4/1)

Vergleich der Wiederfindungsraten

Phase	Wiederfindung in %
CHROMABOND® ABC ₁₈ , 500 mg, 6 mL	97 ± 4
CHROMABOND® C ₁₈ ec 500 mg, 6 mL, CHROMABOND® HR-XC 500 mg, 6 mL	90 ± 0
Extraktionsmix I dispersiv + Extraktionsmix XX in 3 mL Kartusche	83 ± 2
Extraktionsmix I + Extraktionsmix XX	79 ± 5

Zusammenfassung

Die Ergebnisse zeigen, dass die Bestimmung von Acrylamid aus Kaffee, bzw. die Matrixabreicherung mit allen getesteten Produkten erfolgreich durchgeführt werden konnte. Unter Anwendung klassischer SPE Kartuschen mit Octadecyl-Kieselgelen mit Ionenaustauschfunktion konnten grundsätzlich Wiederfindungen von über 90 % erzielt werden.

Allerdings enthalten Chromatogramme von Extrakten dieser Phasen mehr relevante Matrixsignale als die Chromatogramme, die mit QuEChERS Extraktionsmischen aufgearbeitet wurden. Die UV-Spektren von aufgereinigten Probenextrakten zeigen ebenfalls, dass eine stärkere Abreicherung der Probenmatrix mit höherer Sorbentienmenge bzw. mit der Kombination von C₁₈ ec und HR-XC möglich ist. Die Abreicherung von Kaffeematrix mit dem Extraktionsmix XX führt ebenfalls zu guten Wiederfindungen von ca. 80 %. Die resultierenden Chromatogramme zeigten wenige relevante Störsignale, so dass eine Integration des Acrylamidsignals einfach möglich ist. Weitere Versuche mit unterschiedlichen Diaminogehalten im Extraktionsmix führten zu dem Ergebnis, dass für die Matrixabreicherung in Kaffee der Diamino-Gehalt entscheidend ist – je höher desto besser bei gleicher Wiederfindung. CHROMABOND® C₁₈ ec als zusätzliche Komponente im Extraktionsmix führt zu keiner Verbesserung bei der Probenmatrix Kaffee.

Vergleicht man die Methoden in Bezug auf den Zeitaufwand und des Arbeitsaufwandes sowie der Abreicherung der Probenmatrix, ergeben sich mit der dispersiven SPE deutliche Vorteile.

Literatur:

- [1] Bestimmung von Acrylamid in Kaffee und Kaffee-Erzeugnissen, § 64 L 46.00, 5.
- [2] EMPFEHLUNG DER KOMMISSION vom 10.1.2011 zur Untersuchung des Acrylamidgehalts von Lebensmitteln

www.mn-net.com

MACHEREY-NAGEL



MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
Valencienner Str. 11
52355 Düren · Deutschland

DE Tel.: +49 24 21 969-0 info@mn-net.com
CH Tel.: +41 62 388 55 00 sales-ch@mn-net.com
FR Tel.: +33 388 68 22 68 sales-fr@mn-net.com
US Tel.: +1 888 321 62 24 sales-us@mn-net.com