

## **Analytik von Acrylamid in Lebensmitteln**

Protokoll einer Sitzung im BgVV vom 2. Juli 2002

Zu einer ersten Sitzung der Arbeitsgruppe Analytik von Acrylamid in Lebensmitteln hatte das BgVV am 19. Juni 2002 nach Berlin eingeladen. 35 Vertreter der amtlichen Lebensmittelüberwachung, von Forschungseinrichtungen, privater Laboratorien und der Industrie aus Deutschland und der Schweiz nahmen an der Sitzung teil.

Bereits im Vorfeld hatte das BgVV Fragebögen versandt und darin um Informationen zum aktuellen Stand der Methodenentwicklung gebeten. Im Verlauf der Sitzung präsentierten zehn Teilnehmer und das BgVV selbst ihre Analysenmethoden und erste Untersuchungsergebnisse. Wie allen anderen bisher veröffentlichten Daten lag auch diesen Ergebnissen noch keine validierte Methode zugrunde.

Die Entwicklung einer solchen Methode wird mit höchster Priorität vorangetrieben, u.a. um eine quantitative Abschätzung des gesundheitlichen Risikos für den Verbraucher zu ermöglichen.

Im Anschluss an dieses Protokoll sind exemplarisch Messergebnisse aufgeführt, die das BgVV nach dem 19. Juni 2002 unter Verwendung eines internen Standards gewonnen hat.

### **Begrüßung**

Nach der Begrüßung der Teilnehmer verdeutlichte der Leiter der Sitzung die Dringlichkeit für die Erarbeitung einer validierten Methode zum Nachweis von Acrylamid in Lebensmitteln. Da von verschiedenen Teilnehmern eigene Methoden erstellt worden sind und die Erstellung einer gemeinsamen Methode zum jetzigen Zeitpunkt aus Gründen des Zeitdruckes und der verschiedenartigen Laborausstattung nicht durchführbar ist, wurde vom Leiter vorgeschlagen, die Vergleichbarkeit der Methoden durch eine Laborvergleichsuntersuchung (Proficiency Testing) zu ermitteln. Aufgrund der hohen Aktualität und der gesundheitlichen Bedeutung des Acrylamids sollte diese Studie in einem zeitlich eng gefassten Rahmen durchgeführt werden.

### **Stand der Analytik**

Um das Problem der Methodenerstellung eingehender und an konkreten Problemlösungen diskutieren zu können, stellten verschiedene Teilnehmer ihre Methoden vor:

Im Vorfeld der Sitzung hatte das BgVV ein Fragenkatalog versandt, um auch nicht teilnehmenden Einrichtungen eine Methodenpräsentation zu ermöglichen. Eine zusammenfassende Aufstellung der vorgestellten und ausgewerteten Methoden ist dem Protokoll beigelegt. Aus den Vorträgen und den Fragebögen ergibt sich, dass derzeit keine validierte Methode vorliegt.

### **Probennahme, Extraktion, Cleanup, Derivatisierung**

Die regen Diskussionen bei jeder vorgestellten Methode zeigten, dass bei der Erstellung einer Methode zur Erfassung von Acrylamid bestimmte Analysenschwerpunkte eingehender betrachtet werden müssen.

Bezogen auf die Probennahme wurde von vielen Teilnehmern festgestellt, dass dieser Punkt als besonders kritisch angesehen werden muss. Alle Teilnehmer waren sich dahingehend einig, dass geeignete Maßnahmen der Vermahlung oder anderer Zerkleinerungstechniken eingesetzt werden müssen, um die Homogenität der Proben zu gewährleisten. Trockene Lebensmittel (Kekse, Knäckebrötchen) sind relativ leicht zu homogenisieren, wohingegen fetthaltige (Chips) größeren Aufwand erfordern.

Zur Entfettung können die Proben unmittelbar im Faltenfilter mit Hexan behandelt werden. Die Extrakte können auch innerhalb des Clean-ups durch Ausschütteln mit Hexan, durch Ausfrieren, durch Zentrifugation und/oder Säulenfiltration (SPE, Mischbett-Ionenaustauscher) entfettet werden.

Es wurde darauf hingewiesen, dass bei der Nassaufschlammung einer genügend großen Probenmenge Inhomogenitäten in den Lebensmittelproben umgangen werden können.

Bezogen auf die Extraktion des Analyten aus der Lebensmittelmatrix wurden jeweils verschiedene Extraktionsmittel (1-Propanol, Methanol, Acetonitril, Wasser und Mischungen daraus und mit Aceton) und Extraktionsverfahren (Schütteln, Ultraschall, beschleunigte Lösungsmittelextraktion [ASE] u. a.) vorgestellt und diskutiert, die abhängig von der im Anschluss eingesetzten instrumentellen Messmethode ausgewählt wurden.

Einige Teilnehmer berichteten über gute Erfahrungen bei dem Einsatz der Carrez-Klärung zur Eiweißentfernung im Anschluss an die wässrige Extraktion. Bei diesem Schritt sind bisher keine Analytenverluste beobachtet worden.

Der Einsatz mit überkritischem CO<sub>2</sub> für die Extraktion von Acrylamid wurde ebenfalls getestet. Befunde, die eine Weiterfolgung dieser Verfahrensweise rechtfertigen würden, liegen jedoch bislang nicht vor.

Eine Alternative zur herkömmlichen Extraktion ist die Festphasenmikroextraktion (SPME), allerdings wurde diese Methode noch nicht ausreichend getestet.

Bei der Diskussion zur Verwendung der Festphasenaufreinigung wurde der Einsatz von Umkehrphasenmaterialien bzw. Ionenaustauschern und der Einsatz von Diatomeenerde (z. B. Extrelut, Isolut u. ä.) erwähnt. Die bisher vorliegenden Ergebnisse zeigen aber, dass hier weitere Untersuchungen notwendig sind.

In einigen Laboratorien wurde als Teil der Probenvorbereitung auch ein enzymatischer Stärkeabbau durchgeführt. Auch wenn dabei durch den Abbau der Polymeren besser instrumentell vermessbare Extrakte entstehen, so kann doch die Vielzahl dabei entstehender Monomere die Selektivität der Analytik verschlechtern.

In Bezug auf die verwendete Detektion wurde auch die Derivatisierung des Analyten erörtert. Dabei zeigte sich, dass vor allem die Bromierung der Doppelbindung vom Acrylamid vorgenommen wird. Es wurde angemerkt, dass diese Derivatisierung nicht besonders selektiv ist. Eine höhere Selektivität wäre durch die Derivatisierung der Amidgruppe zu erwarten. Erfahrungswerte liegen dazu allerdings noch nicht vor.

## **Interne Standards**

Alle Anwesenden waren sich darin einig, dass beim quantitativen Nachweis von Acrylamid unbedingt interne Standards eingesetzt werden müssen. Es lagen Erfahrungen mit deuterierten Standards vor. Ein H/D-Austausch am Kohlenstoff unter den gegebenen Clean-up Bedingungen wurde bisher nicht beobachtet. Systematische Untersuchungen liegen hierzu allerdings nicht vor. Bei Deuteriummarkierungen an der Amidgruppe erfolgt ein Austausch von H/D. Ein derartiger interner Standard sollte demzufolge nicht verwendet werden. Der

Einsatz von dreifach  $^{13}\text{C}$  markierten Standards sollte vorgezogen werden. Nach Mitteilung der Teilnehmer ist dieser bereits kommerziell erhältlich.

Der Einsatz von Methacrylamid und Butyrylacrylamid, insbesondere als Wiederfindungsstandard (Spritzenstandard), wurde diskutiert.

## **Messmethoden**

Die von den Teilnehmern vorgestellten Methoden zur Quantifizierung sind:

### GC-MS

Bei der GC-MS-Analytik wird vorwiegend die Elektronenstoßionisation ( $\text{EI}^+$ ) angewandt. Da jedoch die nachzuweisenden Ionen vom Acrylamid ( $m/z$  71 als Molpeak und  $m/z$  55 als Hauptfragment) nicht sonderlich spezifisch sind, besteht die Gefahr, dass durch Koelution mit anderen Verbindungen die Ergebnisse verfälscht werden. So konnte vom BgVV gezeigt werden, dass z. B. Maltol (Molgewicht 126), welches die Fragmentionen  $m/z$  71 und  $m/z$  55 bildet, auf einer 60 m Carbowax-Säule 30 sec nach dem Acrylamid eluiert wird. Es müsste daher überprüft werden, inwieweit z. B. diese Verbindung die Ergebnisse verfälschen kann. Maltol ist eine der Hauptkomponenten der Maillard-Reaktion und kommt in fast allen hoch erhitzten und gerösteten Lebensmitteln vor. Die Möglichkeit, dass auch andere Produkte der Maillard-Reaktion zu falsch positiven Ergebnissen führen können, vor allem bei Verwendung kurzer Trennsäulen, kann zur Zeit nicht ausgeschlossen werden.

Ein Teilnehmer berichtete über gute Erfahrungen mit der positiven Chemischen Ionisation ( $\text{CI}^+$ ) mit Methan als Reaktandgas. Vom BgVV wurde berichtet, dass die negative chemische Ionisation ( $\text{CI}^-$ ) sowohl mit Methan als auch mit Ammoniak als Reaktandgas erfolgreich getestet wurde.

### LC-MS/MS

Beim Einsatz von LC-MS/MS-Systemen zum Nachweis von Acrylamid wird die Elektrospray-Technik ( $\text{ESI}^+$ ) angewandt. Sie wird im MRM-Modus (Multiple Ion Reaction Monitoring) zur Messung des Übergangs  $m/z$  72 / 55 für das native Produkt und  $m/z$  75 / 58 für den internen Standard zum Quantifizieren verwendet. Als Qualifier-Übergänge werden  $m/z$  72 / 44 und  $m/z$  72 / 72 für das native Acrylamid und sowohl  $m/z$  75 / 44 als auch  $m/z$  75 / 75 für den internen Standard aufgenommen.

Bedingt durch sehr kurze Retentionszeiten durch die HPLC-Säulen für das Acrylamid (max. 5 min) wurde trotz der hohen Spezifität der MS/MS-Technik die Gefahr von falsch positiven Ergebnissen diskutiert. Durch höhere Temperaturen (  $40^\circ\text{C}$ ) kann die Trennleistung der Säulen verbessert werden.

Im Laufe von Messserien wurde eine Erhöhung des Grundrauschens beobachtet, was auf Kontaminationsvorgänge im Linsensystem des Massenspektrometers hindeutet. Ferner wurde berichtet, dass LC-MS-Systeme basierend auf der ITD-Technik für diese Applikationen nur bedingt geeignet sind.

### GC-ECD

Die GC-ECD-Technik ist als Methode zum Nachweis von Acrylamid in Trinkwasser bereits bekannt und etabliert. Dazu wird eine Derivatisierung mit Brom durchgeführt. Bei der Bromierung von Lebensmittelextrakten erhöht sich die Anzahl der Verbindungen im Aliquot erheblich. Ferner ist der Informationsgehalt der ECD Chromatogramme im Hinblick auf die komplizierte Probenmatrix bei den in Rede stehenden Lebensmitteln als kaum ausreichend anzu-

sehen. Die Verwendung eines markierten Acrylamid-Standards ist hierbei jedoch nicht möglich.

### HPLC-UV

Der Einsatz der HPLC-UV Technik konnte als preiswertes Messsystem vorgestellt werden. Dabei zeigte sich, dass für das System, obgleich es auf Grund der Verwendung der UV-Detektion nicht als spezifisch für Acrylamid bewertet wurde, doch durch den Einsatz der für diesen Analyten selektiven Ionenaustauschersäule eine ausreichende Spezifität erzielt werden konnte. Auch hier ist die Verwendung eines markierten Acrylamid-Standards jedoch nicht möglich.

### **Vorliegende Ergebnisse über den Acrylamidgehalt in Lebensmitteln**

Zur Abschätzung desjenigen Konzentrationsbereiches, der bei der Durchführung des Proficiency Tests, auch im Hinblick auf die Bezugsmatrix, abgedeckt werden sollte, wurden bereits vorliegende Ergebnisse vorgestellt.

Von zwei Teilnehmern wurde darauf hingewiesen, dass im Öl, welches längere Zeit zum Frittieren genutzt wurde und Schwebstoffe bzw. verbrannte Partikel enthielt, kein Acrylamid nachgewiesen werden konnte. Ferner wurde berichtet, dass Speiseöle auf die Bildung von Acrolein hin untersucht wurden. Dabei hat sich gezeigt, dass Acrolein mit dem Wasserdampf aus dem Fett vertrieben wird und auf diesem Weg als Reaktionspartner für die Bildung von Acrylamid in frittierten Lebensmitteln nicht zur Verfügung steht.

Es wurde darauf hingewiesen, dass bestimmte Lebensmittel ein eigenes Potential zur Acrylamidbildung besitzen. In getrockneten Kartoffeln waren nach dem Erhitzen für 1 Stunde auf 120°C ohne Zugabe von Öl Acrylamidgehalte von 20-30 ppm nachweisbar.

Bei den bisher untersuchten Lebensmitteln konnten die höchsten Acrylamidgehalte in Kartoffelprodukten sowie in Knäckebrötchen nachgewiesen werden. In Pommes Frites wurde ein starker Anstieg der Konzentrationen an Acrylamid nachgewiesen, wenn dieses Produkt länger als vom Hersteller empfohlen, erhitzt wurde. Geringere Gehalte wurden in Teigwaren wie Keksen und Zwieback gefunden. Auch in Kaffee- und Kakaopulver konnte Acrylamid nachgewiesen werden.

Diese Befunde weisen darauf hin, dass erst nach weitgehender Abwesenheit von Wasser, Acrylamid verstärkt gebildet werden kann.

Anhand der vorgestellten Ergebnisse konnte eine gewisse größenordnungsbezogene Übereinstimmung in den Gehalten an Acrylamid in verschiedenen Lebensmitteln festgestellt werden, es gibt jedoch bislang keine systematischen Untersuchungen hinsichtlich der Übereinstimmung von Ergebnissen beim Einsatz verschiedener Messmethoden.

### **Auswahl geeigneter Referenzmaterialien**

Um im Proficiency Test möglichst alle relevanten Matrices mit den möglichen Konzentrationsbereichen abdecken zu können, wurden die vorgestellten Befunde herangezogen und folgende Lebensmittel als zunächst vorrangig definiert:

- Knäckebrötchen
- Kekse
- Zwieback
- Kartoffelchips
- Pommes Frites

Zusätzlich soll Kartoffelmehl für diesen Versuch vorbereitet werden.

## Zeitplan für einen Proficiency Test

Der Termin für den Start des Proficiency Tests wurde auf Mitte August d. J. festgelegt. Die Organisation, der Versand und die Auswertung werden vom BgVV übernommen. Bis Ende September sollen die Ergebnisse im BgVV vorliegen. Die für diesen Test notwendigen Standards werden zusammen mit den Proben an die Teilnehmer verschickt. Alle Sitzungsteilnehmer haben sich bereit erklärt, an dieser Studie teilzunehmen. Bereits Mitte Juli wird jedes Labor eine Probe bekannten Gehaltes (Knäckebrötchen) bekommen, um die eigene Analytik zur Vorbereitung des Proficiency Tests überprüfen zu können. Das Hamburger Handelslabor WEJ wird hierzu eine homogene Probe zur Verfügung stellen, die vom BgVV an die Teilnehmer verschickt wird. Die Übermittlung der dabei erzielten Ergebnisse an das BgVV wurde als sinnvoll angesehen.

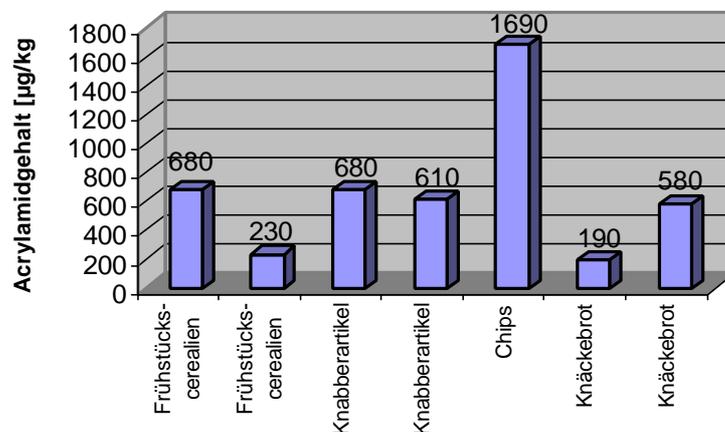
## Verschiedenes

Das Food Analysis Performance Assessment Scheme (FAPAS, UK) plant die Durchführung eines Ringsversuches zum Nachweis von Acrylamid in Lebensmitteln für Mitte Juli des Jahres. Das BgVV, NAFU und WEJ aus Hamburg werden daran teilnehmen. Falls die Anzahl der Teilnehmer für einen Ringversuch der NFPA aus den USA es zulässt, würden sich daran das BgVV und WEJ aus Hamburg beteiligen.

Die nächste Sitzung der Arbeitsgruppe "Analytik von Acrylamid in Lebensmitteln" soll Anfang Oktober stattfinden.

## Untersuchungsergebnisse des BgVV:

**Acrylamid [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ] in Lebensmitteln [Einzelproben]**



## Weitere Informationen:

- [Auswertung der Fragebögen](#)



**Acrylamid-Analytik - Auswertung der Fragebögen**

	Labor 1	Labor 2	Labor 3	Labor 4	Labor 5	Labor 6	Labor 7a
Liegt eine eigene Methode vor?	Ja, modifiziert	Ja	Ja	Ja, modifiziert	Ja	Ja	Ja
Ist diese validiert?	Nein	Nein	Ja, teilweise	Ja, teilweise	Ja, teilweise	Nein	Nein
Behandlung vor der Extraktion	Homogenisierung/ Slurry	Homogenisierung / Slurry	Homogenisierung Entfettung	Homogenisierung	Homogenisierung/ Slurry	Homogenisierung / Slurry	Homogenisierung
Extraktion mit	Ultraturrax/ Schütteln bzw. ASE	mechanisch	Ultraschall	Ultraturrax	Ultraschall	Schütteln	Schütteln/ Ultraschall
Extraktionsmittel	1-Propanol	Wasser	Wasser	Methanol/Wasser	Wasser	1-Propanol	Wasser
Derivatisierung	Nein	Ja, Bromierung	Nein	Ja, Bromierung	Nein	Nein	Nein
Clean-up	Nein	Flüssig/Flüssig-Extraktion	Carrezklärung / SPE (Mischphase)	Flüssig/Flüssig-Extraktion	Flüssig-Flüssig Extraktion/ Carrezklärung	Nein	Filtrieren, Ausfrieren, Zentrifugieren
Meßprinzip	GC-MS	GC-ECD / MS	LCMS/MS	GC-MS	GC-MS, LC-MS/MS	GC-MS	LC-MS/MS
MS-Modus	CI negativ	EI positiv	ESI positiv	EI positiv	EI positiv, ESI positiv	CI positiv	ESI positiv
GC-Säulen	Carbowax, 60m	FFAP		SGE BPx50, 30m	DB-Wax, 30m	Carbowax, 30m	
Retention Gap	Nein	Nein		Nein		Ja	
HPLC-Säulen			Hypercarb		Lichrospher 100CN		Lunar C-18 3µm
Kalibrierung (GC)	Intern (d3-Acrylamid)	Intern		Extern/Intern (Dimethylacrylamid)	Intern (d3-Acrylamid)	Intern (Methacrylamid Butyramid)	
Kalibrierung (LC)			Intern (d3-Acrylamid)		Intern (d3-Acrylamid)		Intern (d3-Acrylamid)
Catcher/Retainer	Öl bzw. Octanol		Nein		Nein	Ja, Öl	
Entfettung	Ja (Hexan)	Ja (Toluol)	Ja (Hexan)	Ja (Toluol)	Ja (Hexan)	Ja (Hexan)	Ja (Cyclohexan)

Frage	Labor 7 b	Labor 8	Labor 9	Labor 10	Labor 11
Liegt eine eigene Methode vor?	Ja, modifiziert!	Ja	Ja, modifiziert	Ja	Ja
Ist diese validiert?	Nein	Nein	Ja, teilweise	Nein	Ja, teilweise
Behandlung vor der Extraktion	Homogenisierung	Homogenisierung	Homogenisierung	Homogenisierung	Homogenisierung
Extraktion mit	Schütteln/Ultraschall	ASE		Ultraturrax	Rühren
Extraktionsmittel	Wasser	Acetonitril/Wasser	Wasser/Aceton	Methanol	Wasser
Derivatisierung	Ja, Bromierung	Nein	Ja, Bromierung	Nein	Nein
Clean-up	Flüssig/Flüssig Extraktion	SPE mit Chemelut / Elutionsmittel Ethylacetat	Flüssig./Flüssig-Extraktion; SPE (Ionentauscher)	Carrezklärung; SPME	HPLC-Säulenschaltung
Meßprinzip	GC-MS	GC-MS; LC-MS/MS	LC-MS/MS	GC-Q	HPLC-UVDAD
MS-Modus	EI positiv	EI positiv; ESI positiv	APCI positiv	EI	
GC-Säulen	DB35 MS, 30m	Carbowax / DB-225, jeweils 30m lang		FFAP, 30m	
Retention Gap	Ja	Ja (60 cm)		Nein	
HPLC-Säulen		YMC ODS AQ, Hypercarb	Prodigy COD 53		C18/ Ionenaustauscher
Kalibrierung (GC)	Intern (d3-Acrylamid, Methacrylamid)	Intern (d3-Acrylamid)		Extern	
Kalibrierung (LC)		Intern (d3-Acrylamid)	Intern (d3-Acrylamid)		Extern
Catcher/Retainer		Nein	Nein	Nein	Nein
Entfettung	Ja (Cyclohexan)	Ja (Hexan)	Ja (Hexan)	Nein	