

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)

Bestimmung von Acrylamid in festen und pastösen Lebensmitteln mittels GC-MS und LC-MS/MS (Auszug aus der Prüfvorschrift)

1. Zweck und Anwendungsbereich

Acrylamid oder Acrylsäureamid (IUPAC: Propensäureamid) ist ein Vertreter der Säureamide. Es besitzt die chemische Strukturformel $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ und wird als Monomer zur Herstellung des Polymers Polyacrylamid eingesetzt. In einer schwedischen Untersuchung wurde Acrylamid nicht nur als Hämoglobin-Addukt im Blut von exponierten Arbeitern, sondern auch in der vermeintlich unbelasteten Vergleichsgruppe gefunden. Als Ursache dieser offensichtlich allgemeinen Belastung konnte Acrylamid in verschiedenen Nahrungsmitteln wie Pommes frites, Knäckebrot u.a. in hohen Konzentrationen nachgewiesen werden.

Bisher wird davon ausgegangen, dass Acrylamid im Herstellungsprozess durch die Reaktionen von Aminosäuren mit Zuckern im Verlauf der Maillardreaktion entsteht. Die vorliegende Prüfvorschrift (PV) soll dazu eingesetzt werden, Acrylamid in festen oder pastösen Lebensmitteln zu bestimmen. Für flüssige Lebensmittel kann diese Methode nicht eingesetzt werden.

2. Geltungsbereich

Diese Prüfvorschrift gilt für den Bereich der "OE Analytik".

3. Prinzip

Der aus einer wässrigen Slurry mit Propanol erhaltene Extrakt wird eingeeengt, mit Acetonitril aufgenommen und mit Hexan entfettet. Acrylamid wird darin direkt mittels GC-MS bzw. LC-MS/MS bestimmt.

4. Sicherheits-Hinweis

Acrylamid wirkt im Tierversuch neurotoxisch, krebserzeugend und in vitro sowie im Tierversuch erbgutverändernd und wird daher als ein so genanntes genotoxisches Kanzerogen beurteilt, für dessen Wirkungsweise grundsätzlich kein Schwellenwert anzunehmen ist. Nach international üblichem Vorgehen wird für die Risikoquantifizierung daher von einer linearen Dosis-Effekt-Beziehung ausgegangen. Für eine Belastung des Menschen mit $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ Acrylamid pro Tag ergeben sich aus verschiedenen Berechnungsmodellen zwar unterschiedlich hohe Krebsrisiken; sie liegen aber alle in einem sehr hohen Bereich. Beim Umgang mit der Reinsubstanz ist daher grundsätzlich nur mit ausreichender Schutzkleidung (Handschuhe, Schutzbrille) und ggf. Mundschutz in gut belüfteten Abzügen zu arbeiten.

Acrylamid-haltige Lösungen und Feststoffe, die Acrylamid enthalten, werden getrennt gesammelt und sachgemäß entsorgt.

5. Chemikalien, Reagenzien und Geräte

5.1 Chemikalien

- Dest. Wasser oder bidestilliertes Wasser geeigneter Qualität (gemäß DIN ISO 3639)
- 1-Propanol (HPLC grade)
- Acetonitril (HPLC grade)
- Hexan (HPLC grade)
- Octanol p.a.

5.2 Hilfsmittel

- Direktverdrängerpipetten (Transferpipetten[®]) in verschiedenen Ausführungen
- Zentrifugalmühle, z.B. ZM 100
- Laborblender, z.B. Grindomix[®] GM 200
- Diverse Vollpipetten, z.T. Zweieichstrichvollpipetten (2mL)
- Dispenser (20-100 mL), z.B. Dispensette[®]
- Eindampfstation, z.B. Turbo-Vap[®] LV
- Laborschüttler, z.B. Vortexer[®]
- Zentrifuge mit Einsätzen und Zentrifugenbechern
- temperiertes Ultraschallbad, z.B. Supersonic Digital[®]
- Überkopfschüttler, z.B. Turbular[®]
- Haushalt-Aluminiumfolie
- 250mL-Schraubgläser, braun
- Stomacher, z.B. Bagmixer[®] 400
- Tischzentrifuge mit 2mL-Zentrifugenröhrchen, z.B. Eppendorfzentrifuge 5415 C

5.3 GC-MS-Anlage

HP 5890 GC gekoppelt an Finnigan MAT 4 oder an Finnigan TSQ

- Injektionsart: Splitless bei 230°C; 2 µL ; 1 Min Vent
- Trennsäule: Carbowax 60 x 0,25 mm; 0,25 µm Filmdicke
- Ofenprogramm: Start 70°C; 2 Min halten; 20°C/Min auf 220°C; 6°C/Min auf 280°C; 280 °C 1 Min halten
- Massenspektrometereinstellungen: negative chemische Ionisation (CI -) mit Ammoniak oder Methan

5.4 LC-MS/MS-Anlage

Shimadzu LC-10AD VP HPLC-Anlage mit Autosampler, zwei Doppelkolbenpumpen mit Hochdruckgradientenmischer, Säulenthermostat und SCIEX API 2000 LC-MS/MS

HPLC-Parameter

- Säule: Hypercarb, 150 x 2,1 mm; Partikelgröße 5 µm; 1 cm Vorsäule aus dem gleichen Phasenmaterial
- Laufmittel: 0,1 % Essigsäure,
- Durchfluss: 0,15 ml/min isokratisch
- Säulentemperatur: 25°C
- Injektionsvolumen: 25 µl

MS/MS-Parameter

- ESI+, MRM
- Temperatur: 350 °C
- Curtain Gas: 15,0 psi
- Collision Gas: 4 psi
- IonSpray Voltage: 6000 V
- IonSource Gas1: 60 psi
- IonSource Gas2: 60 psi
- CEM: 2690 V

	Q1 Mass	Q3 Mass	Dwell [msec]	CE [eV]
Acrylamid	72,07	55,15	150	17
D3-Acrylamid	75,07	58,00	150	17
Methacrylamid	86,00	58,13	150	17

5.5 Standardlösungen

5.5.1 Stammlösungen

➤ Acrylamid

0,05 g Acrylamid werden in einen 100mL-Messkolben auf 0,1 mg genau eingewogen und in 30 mL Methanol gelöst. Anschließend wird mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt (c: 500 µg/mL).

➤ Interner Standard (D3-Acrylamid, $\text{CD}_2=\text{CD}-\text{CO}-\text{NH}_2$)

0,1 g D3-Acrylamid werden in einen 100 mL-Messkolben auf 0,1 mg genau eingewogen und in 30 mL Methanol gelöst. Anschließend wird mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt (c: 1000 µg/mL). Es kann statt D3- auch $^{13}\text{C}_3$ -Acrylamid verwendet werden.

➤ Methacrylamid

0,05 g Methacrylamid werden in einen 100mL-Messkolben auf 0,1 mg genau eingewogen und in 30 mL Methanol gelöst. Anschließend wird mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt (c: 500 µg/mL).

Alle Lösungen sind in abgedunkelten Standardflaschen bei -18 °C 6 Monate haltbar.

5.5.2 Gebrauchslösungen

➤ Acrylamid (AA)

Aus der Stammlösung wird 1 mL entnommen und in einen 50ml-Messkolben überführt. Anschließend wird mit Acetonitril zur Marke aufgefüllt (c: 10 µg/mL).

➤ Interner Standard (D3-Acrylamid) zum Probenspiking (IS-Spikelösung)

Aus der Stammlösung wird 10 mL entnommen und in einen 100ml-Messkolben überführt. Mit Acetonitril wird zur Marke aufgefüllt (c: 100 µg/mL).

➤ Interner Standard für die Kalibrierung (IS-Kal-Lösung)

Aus der Lösung des Internen Standard (D3-Acrylamid) zum Probenspiking (IS-Spikelösung) werden 5 mL entnommen und in einen 50 mL-Messkolben überführt. Anschließend wird mit Acetonitril zur Marke aufgefüllt (c: 10 µg/mL).

➤ Wiederfindungsstandard Methacrylamid (Wdf-Stand. MAA)

Aus der Stammlösung wird 1 mL entnommen, in einen 50 mL-Messkolben überführt und mit Acetonitril zur Marke aufgefüllt (c: 10 µg/mL).

Diese Lösungen sind in abgedunkelten Standardflaschen (kaum Gasraum) bei 5 °C 3 Monate haltbar.

5.5.3 Kalibrierlösungen

Substanz-Standard	AA Gebrauchslösung [µL]	IS-Kal-Lösung [µL]	Wdf-Stand. MAA [µL]	Acetonitril [µL]	Konzentration Acrylamid [µg/mL]
St 1 IS	200	50	50	700	2,00
St 2 IS	150	50	50	750	1,50
St 3 IS	100	50	50	800	1,00
St 4 IS	80	50	50	820	0,80
St 5 IS	60	50	50	840	0,60
St 6 IS	40	50	50	860	0,40
St 7 IS	20	50	50	880	0,20
St 8 IS	10	50	50	890	0,10
St 9 IS	5	50	50	895	0,05
Blank IS	0	50	50	900	0

Die Konzentration des D3-Acrylamides und Methacrylamides betragen in diesen Lösungen 0,5 µg/mL. Die Lösungen können nur kurz gelagert werden und sind unmittelbar zu verbrauchen.

6 Durchführung

6.1 Probenaufarbeitung

Hinweis: Um einen Analytverlust zu vermeiden, ist unbedingt dafür zu sorgen, dass es bei der Probenzerkleinerung/-homogenisation nicht zu einer zu starken Erhitzung ($T \leq 60^\circ\text{C}$) des Produktes kommt!

6.1.2 Probenaufarbeitung fettarme und fettfreie Produkte (Brot, Knäckebrot o.ä.)

Die Proben werden vermahlen, bis der mittlere Teilchendurchmesser ≤ 1 mm beträgt (Zentrifugalmühle mit 1 mm Distanzsieb). Die Probenmehle können bei 4 °C nur ca. 3 Tage gelagert werden, ansonsten muss die Gesamtprobe vor dem Analysenbeginn abermals homogenisiert werden (Laborblender).

6.1.2 Probenaufarbeitung fettige Produkte (Chips, Pommes u.ä.)

Diese Proben werden mittels Laborblender homogenisiert und können bei 4 °C nur ca. 3 Tage gelagert werden, ansonsten muss die Gesamtprobe vor dem Analysenbeginn abermals homogenisiert werden (Laborblender).

6.2 Extraktion

Hinweis: Um einen Analytverlust zu vermeiden, ist unbedingt dafür zu sorgen, dass die Proben bei der Extraktion und der weiteren Aufarbeitung so wenig wie möglich dem Licht ausgesetzt sind. Aus diesem Grund sollten stets braune Gefäße verwendet werden. Anderenfalls sollte der Inhalt der Gefäße und Kolben mit Alufolie vor Lichteinfall geschützt werden.

6.2.1 Herstellung der Nassaufschlämmung (Slurry)

20 g Probenmaterial werden mit 20 mL Wasser versetzt, manuell vorvermengt oder verknetet und anschließend mittels Stomacher zu einer Nassaufschlämmung 3 Minuten auf mittlerer Stufe (Stufe 7) homogenisiert.

Hinweis: Bei stark saugfähigen Materialien ist der Wasseranteil auf bis zu 3:1 (Wasser : Probeeinwaage) so weit zu erhöhen, dass sich eine pastöse Masse beim Verkneten mit dem Stomacher ergibt!

6.2.2 Extraktion mit Überkopfschüttler und Ultraschallbad

30 g Slurry (gemäß 6.2.1 entspricht dies ≤ 15 g Probe) werden auf 1mg genau in ein braunes 250mL-Schraubglas eingewogen.

Es werden 50 mL 1-Propanol und 250 μ L Interner Standard (IS-Spikelösung) hinzugefügt und das Gefäß verschlossen. Das Extraktionsgefäß wird für 30 Min turbulent im Überkopfschüttler geschüttelt. Anschließend wird zur Vervollständigung der Extraktion bei 60°C im Ultraschallbad 30 Minuten nachextrahiert. Nach kurzem Absetzen (5 Minuten im Dunkeln) bzw. Temperierung auf 20°C im Thermostaten wird bei nicht sedimentierenden Proben der Überstand in einen Zentrifugenbecher überführt und zur Abtrennung der Schwebstoffe die Probe bei 3000 g (10°C) 10 Minuten zentrifugiert. Bei gut sedimentierenden Proben kann der Überstand direkt weiterverwendet werden .

6.3 Aufreinigung und Analytkonzentrierung

2 mL des Überstandes/Extraktes werden entnommen und in ein Reagenzglas überführt. Nach Zusatz von 200 μ L Octanol wird unter Stickstoff, z.B. mittels Turbovap (45°C, ca. 30 min, Gasdruck 10 psi) nahezu zur Trockne ($\cong 100$ μ L) eingeeengt.

Anschließend wird der Probenrückstand mit 950 μ L Acetonitril aufgenommen und auf dem Laborschüttler, z.B. Vortexer, behandelt bzw. kurz zur besseren Lösung in ein Ultraschallbad gestellt. Dann wird die Lösung mit 1 ml Hexan versetzt und nochmals auf dem Laborschüttler vermischt. Nach Trennung der Phasen wird die obere Phase mittels einer Pasteurpipette abgenommen und verworfen. Die Lösung wird abermals mit 1 mL Hexan und 50 μ L Wiederfindungsstandard Methacrylamid (Wdf-Stand. MAA) versetzt und das Fett mittels Laborschüttler extrahiert.

Danach werden beide Phasen zusammen in ein 2mL-Zentrifugenröhrchen überführt, dieses fest verschlossen und zur besseren Phasentrennung 5 Minuten in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Schließlich wird die Acetonitrilphase (untere Phase) in ein Vial überführt und zur Messung eingesetzt.

7 QS-Proben

In geeigneten Abständen sind in-house-validierte Referenzmaterialien im Analysengang mitzuführen, d.h. für jede Messserie ist mindestens eine Aufarbeitung eines Referenzmaterials durchzuführen.

8 Berechnung

Die Berechnung des Acrylamidgehaltes erfolgt über den internen Standard D3-Acrylamid. Dazu werden gemäß folgender Formel die Responsefaktoren anhand der Kalibrierlösungen bestimmt.

$$Rf = \frac{C_{IS} * PF_{AA}}{C_{AA} * PF_{IS}}$$

Rf : Responsefaktor

C_{IS}: Konzentration des internen Standards d3-Acrylamid in µg/mL

C_{AA}: Konzentration des Acrylamid in µg/mL

PF_{AA}: Peakfläche des Acrylamids

PF_{IS}: Peakfläche des internen Standards d3-Acrylamids

Aus den Responsefaktoren der Kalibrierlösungen einer Messserie wird ein arithm. Mittelwert gebildet, der bei den weiteren Berechnung verwendet wird.

Unter Berücksichtigung dieses mittleren Responsefaktors kann die Konzentration der Probe wie folgt berechnet werden:

$$AA - \text{Gehalt} = (M_{IS} / (E_{\text{Probe}} * \frac{E_{\text{Slurry}}}{(E_{\text{Probe}} + E_{\text{Wasser}})})) * \frac{PF_{AA}}{PF_{IS}} * \frac{1}{R_{fm}} * 1000$$

AA-Gehalt: Acrylamidgehalt in der Probe in µg/kg

R_{fm}: mittlerer Responsefaktor

M_{IS}: Zugesezte Menge an d3-Acrylamid zur Probe in µg, z.B. 25

E_{Slurry}: Einwaage an Slurry in g, z.B. 30

E_{Probe}: Einwaage an Lebensmittelprobe, z.B. 20

E_{Wasser}: Einwaage des zur Slurryherstellung zugesezten Wassers in g, z.B. 20

PF_{AA}: Peakfläche des Acrylamids

PF_{IS}: Peakfläche des internen Standards d3-Acrylamids

9 Angabe der Ergebnisse

Die Angabe der Ergebnisse erfolgt ohne Nachkommastelle in µg/kg Lebensmittel.

10 Validierung/Validierungsdaten

10.1 Wiederfindung

Hinweis: Es sind je Ausgangsprobenmaterial zusätzlich mindestens 2 Standardadditionen durchzuführen.

30 g Slurry (gemäß 6.2.1 entspricht dies ≤15 g Probe) werden auf 1mg genau in ein braunes 250 mL-Schraubglas eingewogen.

Anschließend werden 0,5 bzw. 1,0 mL Acrylamid Gebrauchslösung (gemäß 5.5.2; Gehalt ≤333 µg/kg bzw. ≤667 µg/kg Acrylamid), 250 µL Interner Standard (IS-Spikelösung) und 50 mL 1-Propanol hinzugefügt und das Gefäß verschlossen.

Die weitere Aufarbeitung und Messung erfolgt analog gemäß 6.2.2 und folgenden.

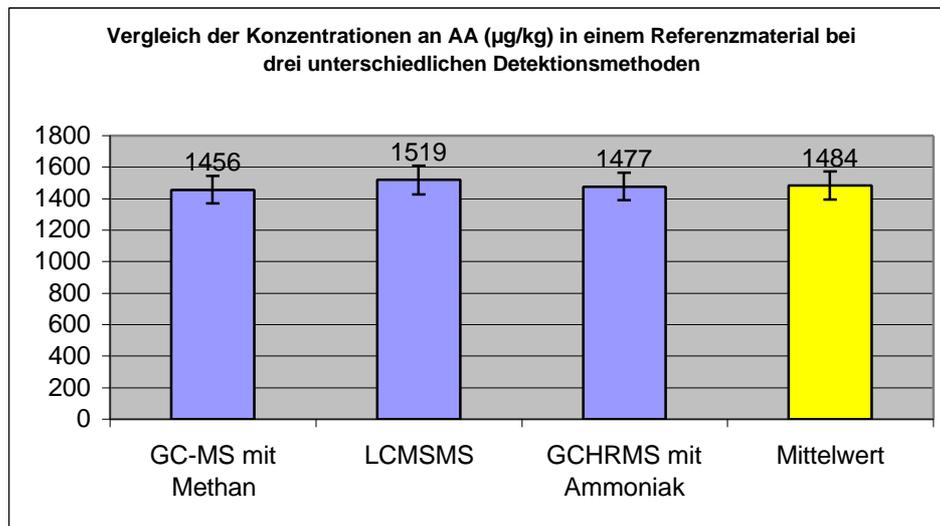
11.2 Validierungsdaten

Bestimmungsgrenze: 40 µg/kg

Nachweisgrenze: 20 µg/kg

Linearer Messbereich: 0,05 µg/mL bis 5,0 µg/mL

Der Vergleich der mit drei unterschiedlichen Messmethoden erhaltenen Untersuchungsergebnisse eines Referenzmaterials zeigte, dass keine signifikanten Unterschiede in den Messergebnissen bestehen. In der nachfolgenden Abbildung sind die Ergebnisse dieses Detektionsvergleichs aufgeführt.



Der relative Fehler für die drei Probenaufbereitungen mit unterschiedlichen Detektionsverfahren betrug ca. 6 % und liegt damit im Bereich für Wiederholungsmessungen.

Die weiteren Validierungsdaten zur Unrichtigkeit und Unpräzision wurden im Rahmen eines von FAPAS (FAPAS Report 3001) organisierten Proficiency Testes ermittelt. Anbei als Anlage die z-Scores der teilnehmenden Laboratorien (Labor 26 ist der Code für dieses Labor).

Table 1: Results and z-Scores for Crispbread Test Material

laboratory number	analyte			laboratory number	analyte		
	acrylamide assigned value 1213 $\mu\text{g}/\text{kg}$				acrylamide assigned value 1213 $\mu\text{g}/\text{kg}$		
	result $\mu\text{g}/\text{kg}$	recovery %	z-score		result $\mu\text{g}/\text{kg}$	recovery %	z-score
001	1276	96	0.3	020	1264	96	0.3
002	950	uncorr	-1.4	021	1070	88	-0.8
003	1060	80	-0.8	022	1230	87.2	0.1
004	1358	95	0.8	023	1331	uncorr	0.6
005	1554	107	1.8	024	1246	112	0.2
006	1160	75	-0.3	025	1080	100	-0.7
007	1282	75.1	0.4	026	1456	119	1.3
008	1710	s/a	2.6	027	1650	87	2.3
009	1250	uncorr	0.2	028	1320.5	78.13	0.6
010	1160	s/a	-0.3	029	1251	102	0.2
011	1120	100	-0.5	030	1207	96	0.0
012	1290	95	0.4	031	1029	95	-1.0
013	1193	85.4	-0.1	032	1603	43	2.1
014	480	90.6	-4.0	033	1186	103	-0.1
015	1050	70	-0.9	034	919	78	-1.6
016	1205	s/a	0.0	035	1332	83	0.6
017	1345	uncorr	0.7	036	1116	96	-0.5
018	762	100	-2.4	037	1115	88	-0.5
019	1300	uncorr	0.5				

Notes: uncorr: participant did not state recovery or stated NOT corrected for recovery
s/a: corrected by standard addition
s: corrected by internal standard

12 Literatur

Die vorliegende Methode ist eine Modifikation der Arbeitsmethode „Bestimmung von Acrylamid in Lebensmitteln“ von Dr. K. Grob (persönliche Mitteilung)

Rosén, Johan; Hellenäs, Karl-Erik, Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry, *The Analyst*, Volume 127, Issue 7, July 2002, Pages 880-882.

Tareke, E; Rydberg, P; Karlsson, P; Eriksson, S; Törnqvist, M, Acrylamide: a cooking carcinogen?, *Chemical Research in Toxicology*, Volume 13, Issue 6, June 2000, Pages 517-522.

Mottram, Donald S; Wedzicha, Bronislaw L; Dodson, Andrew T, Acrylamide is formed in the Maillard reaction, *Nature*, Volume 419, Issue 6906, October 3, 2002, Pages 448-449.

Stadler, Richard H; Blank, Imre; Varga, Natalia; Robert, Fabien; Hau, Jörg; Guy, Philippe A; Robert, Marie-Claude; Riediker, Sonja, Acrylamide from Maillard reaction products, *Nature*, Volume 419, Issue 6906, October 3, 2002, Pages 449-450.

Tekel, J; Farkas, P; Kovác, M, Determination of acrylamide in sugar by capillary GLC with alkali flame-ionization detection, *Food Additives and Contaminants*, Volume 6, Issue 3, July - September 1989, Pages 377-381.

IARC Acrylamide, Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 60, 1994,389.

MAFF, Acrylamid, FAPAS[®] Series 30 Round 1; Report No. 3003, York 2002