DEUTSCHE NORM

Oktober 2012

DIN 10785

DIN

ICS 67.140.20

Untersuchung von Kaffee und Kaffee-Erzeugnissen – Bestimmung von Acrylamid – Verfahren mittels HPLC-MS/MS und mittels GC-MS nach Derivatisierung

Analysis of coffee and coffee products –
Determination of acrylamide –
Methods using HPLC-MS/MS and GC-MS after derivatization

Analyse de café et des dérivés –
Dosage de l'acrylamide –
Méthodes CLHP-MS/MS et CG-MS après derivatisation

Gesamtumfang 20 Seiten

Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: DIN 10785:2012-10

Inhalt

Seite

Vorwort ... 3
1 Anwendungsbereich ... 4
2 Normative Verweisungen ... 4
3 Kurzbeschreibung ... 4
4 Reagenzien ... 4
5 Geräte ... 5
6 Probenahme ... 6
7 Durchführung ... 6
8 Kalibrierung ... 9
9 Auswertung ... 10
10 Ermittlung der Verfahrenskenndaten und der Präzision ... 10
11 Messunsicherheit ... 11
12 Prüfbericht ... 11
Anhang A (informativ) **Verfahrenskenndaten** ... 12
Anhang B (informativ) **Beispiele für Absorbermaterialien** ... 13
Anhang C (informativ) **Beispiele empfohlener Trennsäulen und Analysebedingungen** ... 14
Literaturhinweise ... 20

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: DIN 10785:2012-10

Vorwort

Diese Norm wurde vom Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL), Arbeitsausschuss NA 057-05-09 AA „Kaffee“ erarbeitet.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Texte dieses Dokuments Patentrechte berühren können. Das DIN [und/oder die DKE] sind nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

WARNUNG — Anwender dieser Norm sollten mit der üblichen Laborpraxis vertraut sein. Diese Norm gibt nicht vor, alle unter Umständen mit der Anwendung des Verfahrens verbundenen Sicherheitsaspekte anzusprechen. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, angemessene Sicherheits- und Schutzmaßnahmen zu treffen und sicherzustellen, dass diese mit nationalen Festlegungen übereinstimmen.

Documents
Document Sharing Hub
Full document details: DIN 10785:2012-10

1 Anwendungsbereich

Diese Norm legt Verfahren zur Bestimmung des Acrylamidgehalts in Kaffee und Kaffee-Erzeugnissen durch Extraktion, Festphasenaufreinigung und Bestimmung mittels HPLC-MS/MS bzw. GC-MS fest. Sie ist anwendbar für Röstkaffee, löslichen Kaffee, Kaffeesurrogate und Kaffee-Erzeugnisse.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden zitierten Dokumente sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. 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).

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

3 Kurzbeschreibung

Die Kaffeeprobe wird mit Wasser extrahiert oder, bei löslichen Produkten, in Wasser aufgelöst. Durch Festphasenextraktion werden störende Begleitsubstanzen zurückgehalten. Zur Bestimmung werden alternativ die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion (HPLC-MS/MS) oder, nach Bromierung des Acrylamids, die Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion (GC-MS) eingesetzt. In beiden Fällen werden isotopenmarkierte Interne Standards benötigt.

4 Reagenzien

WARNUNG — Beim Arbeiten mit Acrylamid sind mit Rücksicht auf dessen gesundheitliche Bedenklichkeit entsprechende Vorsichts- und Schutzmaßnahmen zu beachten, wie Arbeiten unter dem Abzug, Ansaugen acrylamidhaltiger Lösungen nur mit Pipettierhilfen, Vermeiden von Haut- und Augenkontakt sowie des Einatmens acrylamidhaltiger Dämpfe.

Als Reagenzien müssen, soweit erhältlich, solche des Reinheitsgrades „zur Rückstandsanalyse“ oder „zur Analyse“ eingesetzt werden. Der Gehalt der Reagenzien an Verunreinigungen, die zum Blindwert beitragen, sollte vernachlässigbar klein sein. Der Blindwert ist regelmäßig zu überprüfen.

4.1 Wasser, entsprechend der Qualität 1 der DIN ISO 3696, MS-Qualität wird empfohlen.

4.2 Betriebsgase, geeignet für GC und Massenspektroskopie entsprechend den Angaben der Geräte-hersteller.

4.3 Lösemittel, wie Methanol, Ethylacetat, Acetonitril, n-Hexan, MS-Qualität wird empfohlen.

4.4 Acrylamid, C_3H_5NO, Referenzsubstanz.

4.4.1 Acrylamid-Kalibrier-Stammlösung (β = 1 000 µg/ml), (0,10 ± 0,001) g Acrylamid werden in einen 100-ml-Messkolben eingewogen und in 30 ml Wasser unter Schwenken gelöst. Anschließend wird mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt (β = 1 000 µg/ml). Die Stammlösung ist, bei höchstens 6 °C lichtgeschützt aufbewahrt, mindestens drei Monate haltbar.

4.4.2 Arbeitslösungen zur Kalibrierung (β = 10 µg/ml), (1,0 ± 0,001) ml der Kalibrier-Stammlösung (4.4.1) werden in einem 100-ml-Messkolben vorgelegt und anschließend mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Diese Lösung ist bei höchstens 6 °C lichtgeschützt aufzubewahren und muss arbeitstäglich frisch hergestellt werden.

In Abhängigkeit vom Arbeitsbereich können weitere Verdünnungsschritte nach 4.4.2 notwendig sein.

4.5 D3-Acrylamid (2,3,3 D3-Acrylamid), Interner Standard, $C_3H_2D_3NO$, Referenzsubstanz

4.5.1 Stammlösung des Internen Standards, Herstellung der Stammlösung des Internen Standards erfolgt analog zur Herstellung der Kalibrier-Stammlösung (4.4.1).

Alternativ kann eine fertige Lösung mit einer Massenkonzentration, β, von 1 000 µg/ml eingesetzt werden, die kommerziell erhältlich ist. Die Haltbarkeitsangabe des Herstellers ist zu beachten.

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: DIN 10785:2012-10

4.5.2 Arbeitslösung des Internen Standards, Arbeitslösungen des Internen Standards werden analog zu 4.4.2 aus der käuflichen oder der selbstbereiteten Stammlösung (4.5.1) hergestellt.

ANMERKUNG 1 Für die HPLC MS/MS Methode können die Lösungen nach 4.4.1 bis 4.5.2 auch im für die HPLC vorgesehenen Eluenten angesetzt werden.

Bei Verwendung der GC-MS Methode müssen die Standards nach 4.4.2 und 4.5.2 den Derivatisierungsschritt nach 7.5.1 durchlaufen.

ANMERKUNG 2 Anstelle von D3-Acrylamid können die Internen Standards auch mit Hilfe von $^{13}C_3$ Acrylamid hergestellt werden. In der Folge wird jedoch nur die Vorgehensweise und Berechnung für D3-Acrylamid näher beschrieben.

4.6 Bromwasser, destilliertes Wasser wird in einem 100-ml-Messkolben mit Glasstopfen mit Brom gesättigt, bis sich im unteren Teil des Kolbens eine Phase aus elementarem Brom ausbildet (etwa 3,5 % Brom bei 4 °C). Das Bromwasser wird mit Bromwasserstoffsäure (HBr, Dichte 1,48 g/cm^3) auf pH etwa 1 angesäuert. Das Reagenz kann, sofern es lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahrt wird, etwa 4 Wochen verwendet werden.

4.7 Kaliumbromid, KBr, p. a.

4.8 Natriumthiosulfat-Pentahydrat, $Na_2S_2O_3 \cdot 5\ H_2O$, p. a.

4.9 Triethylamin, $(C_2H_5)_3N$, p. a.

4.10 Natriumsulfat (wasserfrei, granuliert), Na_2SO_4, p. a.

4.11 Carrez-Lösung I, 10,6 g Kaliumhexacyanoferrat-Trihydrat $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3\ H_2O$, p. a., werden in 100 ml gelöst. Die Lösung ist, bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt, 6 Monate haltbar.

4.12 Carrez-Lösung II, 21,9 g Zinkacetat-dihydrat $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2\ H_2O$, p. a., werden in 100 ml Wasser gelöst. Die Lösung ist, bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt, 6 Monate haltbar.

4.13 Borat-Puffer, pH 8,6

In einem 100-ml-Messkolben werden 68 ml einer 0,1 molaren Natriumboratlösung (20,12 g $Na_2B_4O_7$ je Liter Wasser) mit 32 ml einer 0,1 molaren Salzsäure, c(HCl) = 0,1 mol/l, gemischt.

5 Geräte

5.1 Allgemeines

Erforderlich sind eine Standard-Laborausrüstung und speziell die Geräte nach 5.2 bis 5.15.

Geräte und Geräteteile, die mit der Probe und dem Extrakt in Berührung kommen, müssen frei von Rückständen sein, die Blindwerte verursachen können. Vorzugsweise müssen Geräte aus Glas, nicht-rostendem Stahl und PTFE (Polytetrafluorethen) verwendet werden.

5.2 Analysenwaage, mit einer Fehlergrenze von 0,1 mg.

5.3 Kaffeemühle, geeignet zum Vermahlen von gerösteten Kaffeebohnen.

5.4 Glasgefäße, zum Auffangen und Aufbewahren der Extrakte, vorzugsweise aus Braunglas, als Probengefäße für den manuellen bzw. automatischen Betrieb mit inertem Verschluss (z. B. Vials mit PTFE-beschichtetem Septum).

5.5 Ultraschallbad, temperaturgeregelt, einstellbar auf 40 °C.

5.6 Labor-Zentrifuge, geeignet für 15 ml und 50 ml Zentrifugengefäße und mit einer Leistung von mindestens 2 000 g.

AVA Documents Document Sharing Hub

Full document details: DIN 10785:2012-10

5.7 Zentrifugenröhrchen, Nennvolumen 15 ml und 50 ml.

5.8 Messkolben, Nennvolumen 20 ml und 100 ml.

5.9 Vollpipetten aus Glas oder Mikroliterpipetten, geeignet zum Abmessen der erforderlichen Volumina.

5.10 Glas- oder Polypropylen-Kartuschen, mit Sorbentien für die Festphasen-Extraktion (SPE) zur Reinigung der Extrakte in 7.3.2 und/oder 7.5.1 (Beispiele siehe Tabelle B.1).

5.11 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatograph (bei Prüfverfahren nach 7.4), mit ESI und massenspektrometrischem Detektor (HPLC-MS/MS), Gasversorgung entsprechend den Angaben des Herstellers.

5.12 HPLC-Trennsäule (bei Prüfverfahren nach 7.4), geeignet zur Chromatographie von Acrylamid (Beispiele siehe Tabelle C.1).

5.13 Gaschromatograph (bei Prüfverfahren nach 7.5), mit massenspektrometrischem Detektor (GC-MS), und Versorgung mit Betriebsgasen (4.3) entsprechend den Angaben des Herstellers.

5.14 GC-Trennsäule (bei Prüfverfahren nach 7.5), Kapillarsäule, geeignet zur Chromatographie von Acrylamid (Beispiele siehe Tabelle C.3).

5.15 Mikromembranfilter, Spritzenvorsatzfilter, z. B. aus Celluloseacetat (0,45 µm), geeignet zur Fitration des Probeneluates der Festphasenextraktion vor der Injektion ins Chromatographiesystem.

6 Probenahme

Bis zum Erscheinen einer DIN-Norm über die Probenahme ist diese zu vereinbaren. Es ist eine repräsentative, gut durchmischte Probe zu verwenden, die bei Transport und Lagerung nicht beschädigt oder verändert wurde.

Um Veränderungen des Acrylamid-Gehaltes auszuschließen, muss die Analyse innerhalb eines kurzen Zeitraums nach Probeneingang durchgeführt werden. Die Proben sind kühl und unter Lichtausschluss zu lagern und nur zur Analytik der Raumtemperatur auszusetzen.

Der Probeneingang sowie das Röstdatum bzw. das angegebene Mindesthaltbarkeitsdatum sind zu dokumentieren, ebenfalls der Tag der Analytik.

7 Durchführung

7.1 Allgemeines

Um einen Analytverlust zu vermeiden, ist unbedingt dafür zu sorgen, dass die Proben bei der Extraktion und der weiteren Aufarbeitung wenig Licht ausgesetzt sind. Aus diesem Grund müssen stets braune Gefäße verwendet werden. Anderenfalls muss der Inhalt der Gefäße und Kolben mit Aluminiumfolie vor Lichteinfall geschützt werden.

7.2 Bereitung des Extraktes

Die Probe wird, wenn nötig, mit einer Kaffeemühle (5.3) vermahlen und das Mahlgut gründlich homogenisiert.

Auf einer Analysenwaage werden aus einer homogenen Probe 2 g Röstkaffee, löslicher Kaffee bzw. Kaffee-Surrogat-Extrakt oder 5 g flüssiges Kaffeegetränk auf 1 mg in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen eingewogen.

Die Analysenprobe wird mit 2 ml n-Hexan versetzt und kurz geschüttelt. Dann wird sie mit D3-Acrylamid als Internem Standard versetzt, so dass seine Konzentration in etwa der des zu erwartenden Analytgehaltes entspricht.

BEISPIEL Bei 2 g Kaffee werden 100 µl der Internen Standard-Arbeitslösung (β = 10 µg/ml) zugesetzt, dies entspricht 500 µg/kg bezogen auf die Kaffeeprobe.

Anschließend werden 20 ml destilliertes Wasser hinzugefügt, kurz aber intensiv geschüttelt und dann 15 min im Ultraschallbad (5.5) bei etwa 40 °C behandelt.

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: DIN 10785:2012-10