

DIN EN 16618

ICS 67.050; 67.060; 67.080.20; 67.140.20

**Lebensmittelanalytik –
Bestimmung von Acrylamid in Lebensmitteln mit
Flüssigchromatographie und Tandem-Massenspektrometrie
(LC-ESI-MS/MS);
Deutsche Fassung EN 16618:2015**

Food analysis –

Determination of acrylamide in food by liquid chromatography tandem mass spectrometry
(LC-ESI-MS/MS);

German version EN 16618:2015

Analyse des produits alimentaires –

Dosage de l'acrylamide dans les produits alimentaires par chromatographie en phase
liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CL-ESI-SM-SM);

Version allemande EN 16618:2015

Gesamtumfang 27 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 16618:2015) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige nationale Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-01-14 AA „Prozesskontaminanten“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

Deutsche Fassung

Lebensmittelanalytik —
Bestimmung von Acrylamid in Lebensmitteln mit
Flüssigchromatographie und Tandem-Massenspektrometrie
(LC-ESI-MS/MS)

Food analysis —
Determination of acrylamide in food by liquid
chromatography tandem mass spectrometry
(LC-ESI-MS/MS)

Analyse des produits alimentaires —
Dosage de l'acrylamide dans les produits alimentaires par
chromatographie en phase liquide couplée à la
spectrométrie de masse en tandem (CL-ESI-SM-SM)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 7. Februar 2015 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim Management-Zentrum des CEN-CENELEC oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, der ehemaligen jugoslawischen Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, der Schweiz, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, der Türkei, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

CEN-CENELEC Management-Zentrum: Avenue Marnix 17, B-1000 Brüssel

Inhalt

	Seite
Vorwort	3
1 Anwendungsbereich	4
2 Normative Verweisungen	4
3 Kurzbeschreibung	4
4 Reagenzien	5
5 Geräte	7
6 Probenvorbereitung	9
7 Messung	11
8 Bestimmung von Konzentrationen	15
9 Präzision	16
10 Untersuchungsbericht	18
Anhang A (informativ) Typische Chromatogramme	19
Anhang B (informativ) Präzisionsdaten	21
Literaturhinweise	25

Vorwort

Dieses Dokument (EN 16618:2015) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Oktober 2015, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Oktober 2015 zurückgezogen werden.

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

Dieses Dokument wurde unter einem Mandat erarbeitet, das die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelszone dem CEN erteilt haben.

WARNUNG — Bei der Anwendung dieses Dokuments ist es möglich, dass gefährliche Substanzen, Arbeitsgänge und Geräte angewendet werden. Dieses Dokument erhebt nicht den Anspruch, dass alle mit seiner Anwendung verbundenen Sicherheitsprobleme angesprochen werden. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders dieses Dokuments, geeignete Vorkehrungen für den Arbeits- und Gesundheitsschutz zu treffen und vor der Anwendung die Anwendbarkeit einschränkender Vorschriften zu bestimmen.

Entsprechend der CEN-CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Türkei, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

1 Anwendungsbereich

Diese Europäische Norm legt ein Verfahren zur Bestimmung von Acrylamid in Backwaren, wie z. B. Brot, getoastetem (geröstetem) Brot, Knäckebrot, Butterkeksen und Keksen, sowie in Kartoffelprodukten, wie z. B. Pommes frites, Kartoffelchips und Kartoffelpuffern, und Röstkaffee durch Flüssigchromatographie in Kombination mit Elektrospray-Ionisation und Tandem-Massenspektrometrie (LC-ESI-MS/MS) fest. Dieses Verfahren wurde in einem Ringversuch mit sowohl natürlich kontaminierten als auch aufgestockten Proben im Bereich von 14,3 µg/kg bis 9 083 µg/kg validiert. Es wurde von der Schwedischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (Swedish National Food Administration) entwickelt und in einer Studie validiert, die von der Generaldirektion Gemeinsame Forschungsstelle (Directorate General Joint Research Centre, DG JRC), der Schwedischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und dem Nordischen Komitee für Lebensmittelanalytik (Nordic Committee on Food Analysis, NMKL) organisiert wurde, siehe [1] und [2].

Die Bestimmungsgrenze (en: LOQ, limit of quantification) hängt von der Art des eingesetzten Gerätes und dessen tatsächlichem Leistungsvermögen ab. Die Mehrheit der an der Validierungsstudie teilnehmenden Laboratorien war in der Lage, Acrylamid in einer Butterkeksprobe bei einer Konzentration von 14,3 µg/kg zu bestimmen. Die Validierung durch den Ringversuch zeigte daher, dass die Bestimmungsgrenze im Bereich von weniger als 15 µg/kg bis 30 µg/kg erwartet werden kann.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente, die in diesem Dokument teilweise oder als Ganzes zitiert werden, 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).

EN ISO 1042:1999, *Laborgeräte aus Glas — Meßkolben (ISO 1042:1998)*

EN ISO 3696:1995, *Wasser für analytische Laborzwecke — Spezifikation und Prüfverfahren (ISO 3696:1987)*

3 Kurzbeschreibung

Acrylamid wird mit Wasser extrahiert und Isotopen-markiertes Acrylamid hinzugefügt. Der Extrakt wird zentrifugiert und der Überstand wird mit zwei Festphasenextraktionssäulen (SPE-Säulen) aufgereinigt. Die erste SPE-Säule enthält C18-Gruppen auf Kieselgelbasis und sowohl Anionen- als auch Kationen-austauscher. Da Acrylamid von der Säule nicht zurückgehalten wird, läuft der Extrakt nur durch die Säule und wird wieder aufgefangen. Der Grund für die Verwendung dieser Säule besteht darin, so viele Matrixbestandteile (unpolare Verbindungen ebenso wie Anionen und Kationen) wie möglich zurückzuhalten, ohne dabei Acrylamid zurückzuhalten, d. h. diese erste SPE-Säule wird als chemischer Filter eingesetzt.

Die zweite SPE-Säule enthält eine Phase auf Polymerbasis mit einem verhältnismäßig hohen Vermögen, Acrylamid zu binden. Der Extrakt wird auf die Säule aufgebracht, die Säule wird mit Wasser gewaschen und abschließend mit einem Gemisch aus 60 Volumenteilen Methanol und 40 Volumenteilen Wasser eluiert. Der Zweck dieses Schrittes besteht, neben der weiteren Aufreinigung des Extrakts, in der Konzentrierung des Extrakts, um geringe Bestimmungsgrenzen zu erreichen.

Nach dem Verdampfen des Methanols wird der Extrakt mit LC-MS/MS analysiert. Zu diesem Zweck wird eine HPLC-Säule mit graphitiertem Kohlenstoff als stationäre Phase verwendet, weil der Retentionsfaktor (k) im Vergleich zu anderen handelsüblichen Säulen verhältnismäßig hoch ist (wenn zu der mobilen Phase kein organisches Lösemittel hinzugefügt wird, ist $k = 4$).

4 Reagenzien

Sofern nicht anders festgelegt, sind nur Reagenzien von anerkannter Analysenreinheit und Wasser der Qualität 1 nach EN ISO 3696:1995 zu verwenden. Die Lösemittel müssen von für die HPLC-Analyse geeignetem Reinheitsgrad sein.

4.1 Acrylamid (CAS 79-06-1), Reinheit mindestens 99,9 %, Massenanteil.

Die chemische Struktur ist:

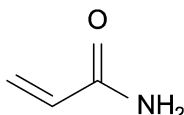


Bild 1 — Acrylamid

WARNUNG — Acrylamid wurde von der Internationalen Agentur für Krebsforschung (International Agency for Research on Cancer (IARC)) als möglicherweise krebserregend für Menschen eingestuft. Es muss Schutzkleidung, wie z. B. Laborkittel, Handschuhe zum Einmalgebrauch und eine Sicherheitsbrille, getragen werden. Die gesamte Handhabung von Acrylamid und organischen Lösemitteln muss in einem Laborabzug mit angemessenem Luftstrom durchgeführt werden.

4.2 Mit Deuterium markiertes Acrylamid — Acrylamid-2,3,3-D₃ (CAS 122775-19-3).

Die chemische Struktur ist:

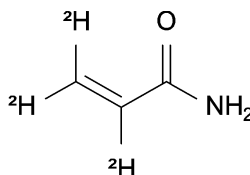


Bild 2 — Mit Deuterium markiertes Acrylamid

Alternativ darf ¹³C-markiertes Acrylamid (Acrylamid-¹³C₃, CAS 287399-26-2) verwendet werden.

4.3 Methanol (CAS 67-56-1).

4.4 Eisessig (CAS 64-19-7).

4.5 *n*-Hexan (CAS 110-54-3).

Alternativ darf Cyclohexan (CAS 110-82-7) verwendet werden.

4.6 Eluent für SPE-Säule 2 (5.2.3)

60 Volumenteile Methanol (4.3) werden mit 40 Volumenteilen Wasser gemischt.

4.7 Mobile Phase für HPLC

1 Volumenteil Eisessig (4.4) wird mit 1 000 Volumenteilen Wasser gemischt.

4.8 Stammlösungen von Acrylamid und Acrylamid-2,3,3-D₃, Massenkonzentration $\rho = 1\,000\ \mu\text{g/ml}$.

Etwa 100 g Acrylamid bzw. Acrylamid-2,3,3-D₃ werden auf 0,05 mg in getrennte 100-ml-Messkolben eingewogen, in Wasser gelöst und auf 100 ml aufgefüllt. Die Lösungen können bei 4 °C mindestens 3 Monate aufbewahrt werden.

4.9 Lösung des internen Standards 1, $\rho = 10\ \mu\text{g/ml}$.

1 000 μl der Stammlösung von Acrylamid-2,3,3-D₃ (4.8) werden in einen 100-ml-Messkolben überführt, und der Kolben wird bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt.

4.10 Lösung des internen Standards 2, $\rho = 1\,000\ \text{ng/ml}$.

5 000 μl der Lösung des internen Standards 1 (4.9) werden in einen 50-ml-Messkolben überführt, und der Kolben wird bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt.

4.11 Acrylamid-Standardlösung 1, $\rho = 100\ \mu\text{g/ml}$.

5 000 μl der Stammlösung von Acrylamid (4.8) werden in einen 50-ml-Messkolben überführt, und der Kolben wird bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt.

4.12 Acrylamid-Standardlösung 2, $\rho = 10\ \mu\text{g/ml}$.

5 000 μl der Acrylamid-Standardlösung 1 (4.11) werden in einen 50-ml-Messkolben überführt, und der Kolben wird bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt.

4.13 Acrylamid-Standardlösung 3, $\rho = 100\ \text{ng/ml}$.

1 000 μl der Acrylamid-Standardlösung 2 (4.12) werden in einen 100-ml-Messkolben überführt, und der Kolben wird bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt.

4.14 Kalibrierlösungen für LC-MS

Aliquote Anteile der Standardlösungen (4.9), (4.11), (4.12) und (4.13) werden mit Wasser verdünnt, um Kalibrierlösungen von z. B. 0 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 250 ng/ml, 500 ng/ml, 1 000 ng/ml, 2 000 ng/ml, 5 000 ng/ml bzw. 10 000 ng/ml Acrylamid zu erhalten, die alle 400 ng/ml Acrylamid-2,3,3-D₃ enthalten. Beispiele für die Herstellung von Kalibrierlösungen sind in Tabelle 1 angeführt. In Tabelle 2 ist der Zusammenhang zwischen den Konzentrationen der Kalibrierlösungen und den Acrylamidgehalten von Lebensmittelproben angeführt. Die Kalibrierung muss an mindestens sechs Konzentrationsstufen durchgeführt werden, die gleichmäßig über den Arbeitsbereich verteilt sind. Wenn ein derartig großer Konzentrationsbereich (0 $\mu\text{g/kg}$ bis 10 000 $\mu\text{g/kg}$) zu erfassen ist, sollte die Analyse einer noch größeren Anzahl von Kalibrierlösungen erfolgen.

Tabelle 1 — Herstellung von Kalibrierlösungen für die LC-MS

Kalibrierlösung ng/ml	Messkolben ml	Lösung des internen Standards (4.9) µl	Acrylamid- Standardlösung µl
0	100	4 000	0
5	100	4 000	5 000 von (4.13)
10	100	4 000	10 000 von (4.13)
20	100	4 000	200 von (4.12)
50	100	4 000	500 von (4.12)
100	100	4 000	1 000 von (4.12)
250	100	4 000	2 500 von (4.12)
500	100	4 000	5 000 von (4.12)
1 000	100	4 000	1 000 von (4.11)
2 000	100	4 000	2 000 von (4.11)
5 000	100	4 000	5 000 von (4.11)
10 000	50	4 000	5 000 von (4.11)

Tabelle 2 — Zusammenhang zwischen Acrylamidgehalten von Kalibrierlösungen und Lebensmitteln

Kalibrierlösung ng/ml	Backwaren und Kartoffelprodukte µg/kg	Röstkaffee µg/kg
10	10	50

5 Geräte

Übliche Laborglasgeräte und -ausrüstung und insbesondere Folgendes:

5.1 LC-MS/MS-System.

5.1.1 HPLC-Gerät, das Folgendes umfasst:

5.1.1.1 Thermostatisierbarer Säulenofen.

5.1.1.2 Injektionssystem, geeignet für die Injektion von 10 µl Probe.

5.1.1.3 Pumpe für die mobile Phase, geeignet für eine Flussrate der mobilen Phase von 0,4 ml/min.