

DIN EN 16987



ICS 67.140.20

Einsprüche bis 2016-07-06
Vorgesehen als Ersatz für
DIN 10785:2013-06

Entwurf**Lebensmittel –****Bestimmung von Acrylamid in Kaffee und Kaffee-Erzeugnissen mit HPLC-MS/MS und GC-MS;****Deutsche und Englische Fassung prEN 16987:2016**

Foodstuffs –

Determination of acrylamide in coffee and coffee products by HPLC-MS/MS and GC-MS;
German and English version prEN 16987:2016

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2016-05-06 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfes besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal des DIN unter www.entwuerfe.din.de bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an nal@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/stellungnahme oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL), 10772 Berlin (Hausanschrift: Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin).

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 49 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 16987:2016) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik - Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird. Das zuständige deutsche Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-01-14 AA „Prozesskontaminanten“ des DIN-Normenausschusses Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung der prEN 16987 beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Für die in diesem Dokument zitierten Internationalen Normen wird im Folgenden auf die entsprechenden Deutschen Normen hingewiesen:

ISO 3696	siehe DIN ISO 3696
ISO 5725-1	siehe DIN ISO 5725-1
ISO 5725-2	siehe DIN ISO 5725-2

Änderungen

Gegenüber DIN 10785:2013-06 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Titel geändert;
- b) Abschnitt 4 „Reagenzien“ und 11 „Untersuchungsbericht“ präzisiert;
- c) Abschnitt 6 „Probenahme“ gestrichen;
- d) Gleichung (1) in 8.2 erweitert;
- e) Tabelle B.2 hinzugefügt;
- f) Tabelle C.1 gestrichen;
- g) alte Tabelle C.2 (Tabelle C.1 in DIN EN 16987) um zwei HPLC-Säulen erweitert;
- h) redaktionelle Änderungen vorgenommen.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

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

DIN ISO 5725-1, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 1: Allgemeine Grundlagen und Begriffe*

DIN ISO 5725-2, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 2: Grundlegende Methode für Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision eines vereinheitlichten Messverfahrens*

Lebensmittel — Bestimmung von Acrylamid in Kaffee und Kaffee-Erzeugnissen mit HPLC-MS/MS und GC-MS

Foodstuffs — Determination of acrylamide in coffee and coffee products by HPLC-MS/MS and GC-MS

ICS:

Deskriptoren

Dokument-Typ: Europäische Norm
Dokument-Untertyp:
Dokument-Stage: CEN-Umfrage
Dokument-Sprache: D

STD Version 2.8f

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Einleitung	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Kurzbeschreibung	5
4 Reagenzien	5
5 Geräte	7
6 Durchführung	7
6.1 Allgemeines	7
6.2 Vorbereitung des Probenextraktes	8
6.3 Aufreinigung des Extraktes	8
6.4 HPLC-MS/MS Messung	9
6.5 Prüfverfahren mit GC-MS	9
7 Kalibrierung	11
7.1 Allgemeines	11
7.2 Bestimmung der Linearität und Festlegung des Arbeitsbereichs	11
7.3 Kalibrierung mit internem Standard	11
7.4 Bestimmung der laborinternen Wiederfindung	11
8 Auswertung	12
8.1 Identifizierungskriterien	12
8.2 Berechnung und Angabe des Ergebnisses	12
9 Präzisionsdaten	12
9.1 Allgemeines	12
9.2 Wiederholpräzision	13
9.3 Vergleichpräzision	13
9.4 Wiederfindungsrate	13
10 Messunsicherheit	13
11 Untersuchungsbericht	13
Anhang A (informativ) Verfahrenskennndaten	14
Anhang B (informativ) Beispiele für Absorbermaterialien	15
Anhang C (informativ) Beispiele für empfohlene Säulen und Untersuchungsbedingungen	16
C.1 Prinzipiell geeignete chromatographische Säulen	16
C.2 Beispielfahren und ungefähre Retentionszeit für die HPLC-MS/MS	17
C.3 Beispiel geeigneter Bedingungen und ungefähre Retentionszeit für die GC-MS-Analyse	18
C.4 Beispielchromatogramme für die HPLC-MS/MS	19
C.5 Beispielchromatogramme für die GC	21
Literaturhinweise	23

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 16987:2016) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik - Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

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

Einleitung

Bei Anwendung dieser Europäischen Norm sollten alle bestehenden Sicherheitsbestimmungen befolgt werden.

Die Anhänge A bis C sind informativ.

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.

1 Anwendungsbereich

Diese Norm legt Verfahren zur Bestimmung von Acrylamid in Kaffee und Kaffee-Erzeugnissen durch Extraktion mit Wasser, Aufreinigung mit Festphasenextraktion und Bestimmung mittels HPLC-MS/MS bzw. GC-MS fest. Es wurde in einem Ringversuch für Röstkaffee, löslichen Kaffee, Kaffeesurrogate und Kaffee-Erzeugnisse in Bereichen von 53 µg/kg bis 612,1 µg/kg validiert.

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).

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 Aufreinigung mit Festphasenextraktion werden störende Begleitsubstanzen zurückgehalten. Zur Bestimmung können 2 alternative Verfahren verwendet werden: die Hochleistungs-Flüssigchromatographie mit massenspektrometrischer Detektion (HPLC-MS/MS) oder, nach Bromierung des Acrylamids, die Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion (GC-MS). In beiden Fällen werden isotopenmarkierte Interne Standards benötigt.

4 Reagenzien

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

Soweit verfügbar, müssen Reagenzien des Reinheitsgrades „zur Rückstandsanalyse“ oder „zur Analyse“ eingesetzt werden. Der Gehalt an Verunreinigungen in den Reagenzien, die zum Blindwert beitragen, sollte vernachlässigbar klein sein. Der Blindwert muss regelmäßig überprüft werden.

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

4.2 Betriebsgase von hoher Qualität, geeignet für GC und Massenspektroskopie nach den Angaben der Gerätehersteller.

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

4.4 Acrylamid, C₃H₅NO, Reinheit > 98 %, Referenzsubstanz.

4.4.1 Acrylamid-Stammlösung, Massenkonzentration $\rho = 1\,000\text{ µg/ml}$. (0,10 ± 0,001) g Acrylamid werden in einen 100-ml-Messkolben eingewogen und in 30 ml Wasser geschwenkt um das Acrylamid zu lösen. Es wird bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt und gut vermischt. Die Stammlösung ist, bei höchstens 6 °C lichtgeschützt aufbewahrt, mindestens drei Monate haltbar.

Alternativ darf eine handelsübliche Lösung mit einer Massenkonzentration von $\rho = 1\,000\text{ µg/ml}$ eingesetzt werden. Die Haltbarkeitsangabe des Herstellers für die Lösung muss beachtet werden.

4.4.2 Acrylamid-Kalibrierlösung, $\rho = 10 \mu\text{g/ml}$. Mit einer Pipette werden $(1,0 \pm 0,001)$ ml der Acrylamid-Stammlösung (4.4.1) in einem 100-ml-Messkolben vorgelegt und bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt. Diese Lösung muss bei höchstens 6°C lichtgeschützt aufbewahrt und arbeitstäglich frisch hergestellt werden. In Abhängigkeit vom Arbeitsbereich könnten weitere Verdünnungsschritte notwendig sein.

4.5 D3-Acrylamid (2,3,3 D3-Acrylamid), Interner Standard, $\text{C}_3\text{H}_2\text{D}_3\text{NO}$, Reinheit $> 98 \%$, Referenzsubstanz.

4.5.1 D3-Acrylamid-Stammlösung (Interner Standard).

$(0,10 \pm 0,001)$ g D3-Acrylamid werden in einen 100-ml-Messkolben eingewogen und in 30 ml Wasser geschwenkt um das D3-Acrylamid zu lösen. Es wird bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt und gut vermischt. Die Stammlösung ist, bei höchstens 6°C lichtgeschützt aufbewahrt, mindestens drei Monate haltbar.

Alternativ darf eine handelsübliche Lösung mit einer Massenkonzentration von $\rho = 1\,000 \mu\text{g/ml}$ eingesetzt werden. Die Haltbarkeitsangabe des Herstellers für die Lösung muss beachtet werden.

4.5.2 D3-Acrylamid-Lösung des internen Standards.

Mit einer Pipette werden $(1,0 \pm 0,001)$ ml der D3-Acrylamid-Stammlösung (4.5.1) in einem 100-ml-Messkolben vorgelegt und bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt. Diese Lösung muss bei höchstens 6°C lichtgeschützt aufbewahrt und arbeitstäglich frisch hergestellt werden. In Abhängigkeit vom Arbeitsbereich könnten weitere Verdünnungsschritte notwendig sein.

Für die HPLC MS/MS können die Lösungen nach 4.4.1 bis 4.5.2 hergestellt werden, indem man den HPLC-Eluenten als Lösemittel verwendet.

Bei Verwendung der GC-MS müssen alle Standards nach 4.4.2 und 4.5.2 den Derivatisierungsschritt nach 6.5.1 durchlaufen.

Anstelle von D3-Acrylamid ist es auch möglich $^{13}\text{C}_3$ Acrylamid für die Herstellung des Internen Standards zu verwenden. In den folgenden Abschnitten wird jedoch nur die Vorgehensweise und Berechnung für D3-Acrylamid näher beschrieben.

4.6 Bromgesättigtes Wasser. Destilliertes Wasser wird in einem 100-ml-Messkolben (mit einem Glasstopfen) mit Brom gesättigt, bis sich im unteren Teil des Kolbens eine Phase aus Brom ausbildet (etwa 3,5 % Brom bei 4°C). Das Bromwasser wird mit konzentrierter Bromwasserstoffsäure (HBr, mit einer spezifischen Dichte von $1,48 \text{ g/cm}^3$) auf einen pH-Wert von etwa 1 angesäuert.

Die Lösung kann, sofern es lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt wird, etwa 4 Wochen verwendet werden.

4.7 Kaliumbromid, KBr.

4.8 Natriumthiosulfat-Pentahydrat, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$.

4.9 Triethylamin, $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$.

4.10 Natriumsulfat (wasserfrei, granuliert), Na_2SO_4 .

4.11 Carrez-Lösung I

10,6 g Kaliumhexacyanoferrat-Trihydrat (II) $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$, werden in 100 ml Wasser gelöst. Die Lösung ist, bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt, 6 Monate haltbar.

4.12 Carrez-Lösung II

21,9 g Zinkacetat-dihydrat $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 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 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ je Liter Wasser) mit 32 ml einer 0,1 molaren Salzsäure, $c(\text{HCl}) = 0,1$ 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, imstande mit einer Fehlergrenze von 0,1 mg zu wiegen.

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 oder automatischen Betrieb mit inertem Verschluss (z. B. Gefäße mit PTFE-beschichtetem Septum).

5.5 Ultraschallbad, imstande 40 °C beizubehalten.

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

5.7 Zentrifugenröhrchen, 15 ml und 50 ml.

5.8 Messkolben, 20 ml und 100 ml.

5.9 Pipetten, Glas oder automatisch, geeignet zum Abmessen der Volumina von Standardlösungen und Probenextraktlösungen.

5.10 Glas- oder Polypropylen-Kartuschen, mit Sorbentien für die Festphasen-Extraktion (SPE) zur Reinigung der Extrakte in 6.3.2 und/oder 6.5.1 (Beispiele siehe Tabelle B.1).

5.11 Hochleistungs-Flüssigchromatograph (bei Prüfverfahren nach 6.4), mit ESI und massenspektrometrischem Detektor (HPLC-MS/MS), Gasversorgung entsprechend den Herstellerangaben.

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

5.13 Gaschromatograph (bei Prüfverfahren nach 6.5), mit massenspektrometrischem Detektor (GC-MS), und Versorgung mit Betriebsgasen (4.2) entsprechend den Herstellerangaben.

5.14 GC-Trennsäule (bei Prüfverfahren nach 6.5), Kapillarsäule, geeignet zur Chromatographie von Acrylamid (Beispiele siehe Tabelle C.2).

5.15 Membranfiltereinheiten, Spritzenvorsatzfilter (z. B. Celluloseacetatfilter (0,45 μm Porengröße)), geeignet zur Filtration des Probeneluates der Festphasenextraktion vor der Injektion ins Chromatographiesystem.

6 Durchführung

6.1 Allgemeines

Um einen Analytverlust zu vermeiden, ist es notwendig, dass die Proben bei der Extraktion und der weiteren Aufarbeitung vor Licht geschützt sind. Daher sollten stets braune Gefäße verwendet werden. Anderenfalls muss der Inhalt der Gefäße und Kolben mit Aluminiumfolie vor Lichteinfall geschützt werden.

Um Veränderungen des Acrylamid-Gehaltes auszuschließen, muss die Untersuchung kurz nach dem Probeneingang durchgeführt werden. Die Proben sind höchstens 6 Monaten, bei kühlen Bedingungen unter 6 °C, unter Lichtausschluss zu lagern und sie sind der Raumtemperatur nur während der Untersuchung auszusetzen.

Das Datum des Probeneingangs sowie das Röstdatum oder das Mindesthaltbarkeitsdatum müssen zusammen mit dem Tag der Untersuchung dokumentiert werden.

6.2 Vorbereitung des Probenextraktes

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

Auf einer Analysenwaage (5.2) werden aus einer homogenen Probe 2 g Röstkaffee, löslicher Kaffee oder Kaffee-Surrogat 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 die Analysenprobe mit D3-Acrylamid als Internem Standard versetzt, so dass seine Konzentration in etwa der des zu erwartenden Analytgehaltes entspricht.

BEISPIEL Es werden 2 g Kaffee gewogen und 100 µl der Internen Standardlösung ($\rho = 10 \mu\text{g/ml}$) zugesetzt, der einem Massenanteil an Acrylamid von 500 µg/kg der Kaffeeprobe entspricht.

Es werden 20 ml destilliertes Wasser hinzugefügt, es wird kurz aber intensiv geschüttelt und 15 min bei etwa 40 °C ultraschallbehandelt (5.5).

Einige Minuten wird ein Absetzen ermöglicht und im Falle nicht sedimentierender Proben wird zur Abtrennung der Schwebstoffe 15 min bei 2 000 g zentrifugiert (5.6). Bevor Flüssigchromatographie (6.4) oder Derivatisierung und gaschromatographische Auftrennung (6.5) erfolgen, werden 10 ml aus der unteren wässrigen Phase zur weiteren Aufreinigung nach 6.3 eingesetzt. Die untere wässrige Phase wird mit einer Pipette durch die obere Hexanphase entnommen ohne die Hexanphase zu entfernen. Gegebenenfalls darf auch die Hexanphase vorsichtig mit einer Pasteurpipette entfernt werden.

6.3 Aufreinigung des Extraktes

6.3.1 Carrez-Klärung

Die nach 6.2 hergestellte Probe wird durch Carrez-Klärung gereinigt. Es werden 1 000 µl Carrez-Lösung I (4.11) zugegeben und es wird geschüttelt. Es werden 1 000 µl Carrez-Lösung II (4.12) zugegeben und es wird wieder geschüttelt. Nach kurzer Einwirkzeit wird 4 min bei 2 000 g zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert, der Rückstand mit 2 ml bis 3 ml Wasser nachgewaschen, erneut zentrifugiert und dekantiert. Die beiden wässrigen Lösungen werden vereinigt.

6.3.2 Festphasenextraktion

Der Probenextrakt wird nach der Carrez-Klärung (6.3.1) durch Festphasen-Extraktion (Solid Phase Extraction, SPE), mittels zwei aufeinanderfolgender Kartuschen mit Adsorber-Material (Beispiele siehe Tabelle B.1), gereinigt. Die erste Kartusche enthält 500 mg C18-Material, die zweite Kartusche 500 mg Ionenaustauscher. Die Kartuschen können in Serien-Anordnung verwendet werden. Gegebenenfalls kann eine Kombisäule verwendet werden.

Die beiden SPE-Säulen werden nach den Herstellerangaben nacheinander mit Methanol und mit destilliertem Wasser konditioniert. Der gesamte Probenextrakt (6.3.1) wird auf die obere (erste) SPE-Säule gegeben, einwirken gelassen und es werden 2 ml bis 3 ml Wasser hinzugefügt. Die Eluate werden gesammelt bis die Kartusche trocken ist. Das Eluat wird auf die zweite bzw. untere konditionierte Ionenaustauscher-Säule gegeben, es werden 2 ml bis 3 ml Wasser hinzugefügt und das Eluat gesammelt. Eine vollständige Eluierung kann durch Anlegen von leichtem Vakuum oder Druck erreicht werden. Das Eluat inklusive Waschwasser wird in einem 20-ml Messkolben gesammelt und auf 20 ml mit Wasser aufgefüllt.

6.4 HPLC-MS/MS Messung

6.4.1 Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC)

Vor der HPLC-MS/MS-Analyse wird das organische Lösemittel zu dem gereinigten Extrakt (6.3.2) hinzugefügt um die gewünschte Eluenten-Zusammensetzung zu erhalten und es wird durch einen Membranfilter (5.15) filtriert, bevor ein geeignetes Volumen (z. B. 10 µl bis 100 µl abhängig von der verwendeten Säule) auf die HPLC-Trennsäule injiziert wird.

Die Geräteparameter des HPLC-Systems werden nach den Herstellerangaben optimiert. Die chromatographischen Bedingungen müssen passend zur gewählten Säule eingestellt werden (Beispiele siehe Tabellen in C.1).

Die Reinigungsschritte nach 6.3.1 und 6.3.2 sind wichtig für die chromatographische Abtrennung des Analyten-Peaks von Störpeaks. Ein Beispiel-Chromatogramm ist in den Bildern C.1 und C.2 dargestellt.

6.4.2 Identifizierung und Quantifizierung mittels Massenspektrometrie (HPLC-MS/MS)

Acrylamid wird mittels MS/MS im positiven Ionisierungsmodus gemessen (Elektrospray-Ionisation, ESI).

Zur Identifizierung wird der Massenübergang mit $m/z = 72 \rightarrow 55$ herangezogen. Acrylamid gilt als identifiziert, wenn im MS/MS-Chromatogramm auf der Massenspur des Tochterions ($m/z = 55$) ein Signal erscheint und die Abweichung der Retentionszeit um nicht mehr als 5 % von derjenigen der echten Referenzverbindung abweicht, die unter gleichen HPLC-Bedingungen gemessen wurde.

Mögliche Übergänge für Acrylamid und D3-Acrylamid sind in Tabelle 1 dargestellt.

Der Analyt wird durch Vergleich der Häufigkeit der Mutter-Tochterionen von Acrylamid mit dem des isotope markierten Internen Standards an den Massenübergängen $72 \rightarrow 55$ (Acrylamid) und $75 \rightarrow 58$ (D3-Acrylamid) quantifiziert.

Ein 3. Massenübergang $72 \rightarrow 54$ darf als zusätzliche Bestätigung der Ergebnisse verwendet werden. Die Bewertung dieses Übergangs war nicht Teil des Ringversuchs (Anhang A).

Tabelle 1 — Massenspektrometrische Übergänge zur Identifizierung und Quantifizierung von Acrylamid

Bezugsverbindung	Ausgewählte Übergänge zur Identifizierung und Quantifizierung von Acrylamid im MS/MS-Modus	
	<i>m/z</i>	
Acrylamid	72 → 55	Identifizierung und Quantifizierung
	72 → 44	Identifizierung (informativ, Qualifier)
D3-Acrylamid	75 → 58	Identifizierung und Quantifizierung
	75 → 44	Identifizierung (informativ, Qualifier)

6.5 Prüfverfahren mit GC-MS

6.5.1 Derivatisierung und Probenvorbereitung für die Gaschromatographie

3,5 g Kaliumbromid (4.7) werden zu der wässrigen Probenlösung (6.3.2) hinzugefügt. Es werden 2,5 ml bromgesättigtes Wasser (4.6) zugegeben und es wird ermöglicht für 2 h bei Raumtemperatur im Dunkeln zu reagieren. Einige Tropfen Natriumthiosulfat-Lösung (4.8) werden hinzugegeben um überschüssiges Brom zu zersetzen. Bei einer 1-molaren Lösung reichen wenige Tropfen, um die durch das Brom verursachte Braunfärbung zu beseitigen. Eine deutliche Überdosierung von Natriumthiosulfat sollte vermieden werden.

Der Extrakt wird quantitativ über eine zuvor nach den Herstellerangaben konditionierte Polymerharzkartusche (Inhalt 500 mg) mit starken polaren und kationischen Austauschqualitäten gegeben (Beispiele siehe Tabelle B.2). Während dieses Vorgangs und bei den anschließenden Spülschritten ist es notwendig sicherzustellen, dass die Säule nicht trocken läuft. Danach wird die Säule mit 3 ml Wasser, 1 ml Boratpuffer pH 8,6 (4.13) und wieder mit 0,5 ml Wasser gewaschen. Die Säule wird dann, gefolgt von einer Elution mit 2 ml Ethylacetat, bei einer Einwirkzeit von 1 min bis 2 min auf der Säule, trocken gesaugt.

ANMERKUNG 1 Es kann von Vorteil sein, mit mehr Ethylacetat zu eluieren, um die Wiederfindungsraten zu verbessern. Dies kann jedoch die Störeinflüsse verstärken.

Der Extrakt wird mit der geringstmöglichen Menge an Natriumsulfat (4.10) getrocknet, um einen wasserfreien Extrakt zu gewährleisten und danach werden 50 µl Triethylamin (4.9) hinzugefügt. Diese Lösung kann unmittelbar zur GC-Analyse eingesetzt werden.

Zur Kontrolle der Vollständigkeit der Umsetzungsreaktion kann der Probenlösung vor der Bromierung Methacrylamid zugegeben werden (z. B. 100 µl einer wässrigen 0,5 µg/ml-Lösung). Wird das Methacrylamid-Derivat in ausreichendem Maße wiedergefunden, ist davon auszugehen, dass auch Acrylamid vollständig bromiert wurde.

ANMERKUNG 2 Durch Zugabe von Triethylamin wird eine quantitative Umsetzung des labilen Dibrompropionamid zum stabilen Monobrompropenamid, das mit GC-MS bestimmt wird, bewirkt. Ohne diese Umsetzung kann die HBr-Eliminierung im weiteren Analysengang unkontrolliert verlaufen (z. B. an aktiven Stellen im Injektor), und nicht reproduzierbare Ergebnisse liefern.

6.5.2 Gas-Chromatographie

Der aufgereinigte Extrakt (6.5.1) wird vor der GC-MS-Analyse entsprechend dem zu erwartenden Analytgehalt mit Ethylacetat (4.3) verdünnt und ggf. durch einen Mikromembranfilter (5.15) filtriert.

Der Gaschromatograph (5.13) muss nach den Herstellerangaben in Betrieb genommen und die Geräteparameter optimiert werden. Die chromatographischen Bedingungen müssen passend zur gewählten Trennsäule eingestellt werden. Beispiele sind in den Tabellen C.2 und C.5 und Beispiel-Chromatogramme in den Bildern C.3, C.4 und C.5 dargestellt.

6.5.3 Identifizierung und Quantifizierung mittels Massenspektrometrie

Die Analyten werden durch Elektronenstoß-Ionisierung (EI) in positive Ionen (Molekül-Ionen) und charakteristische Fragment-Ionen überführt. Diese Ionen werden zur Quantifizierung und Identifizierung herangezogen.

Die Quantifizierung wird durch den Vergleich der Peakfläche der Ionen aus Brompropenamid mit denen des isopenmarkierten Internen Standards erfolgen (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2 — Beobachtete Ionen

Ausgangsverbindung	Beobachtete Ionen <i>m/z</i>	
Brompropenamid	149: [C ₃ H ₄ ⁷⁹ BrON] ⁺	Identifizierung und Quantifizierung
	106: [C ₂ H ₃ ⁷⁹ Br] ⁺	Identifizierung
D2-Brompropenamid	153: [C ₃ ² H ₂ ¹ H ₃ ⁸¹ BrON] ⁺	Identifizierung und Quantifizierung
	110: [C ₂ ² H ₂ ¹ H ₁ ⁸¹ Br] ⁺	Identifizierung
ANMERKUNG Die auftretenden Ionen der <i>m/z</i> 151 und 108 sind wegen der natürlichen Isotopenverteilung des Brom nicht auswertbar.		

7 Kalibrierung

7.1 Allgemeines

Vor Anwendung des GC-Verfahren müssen alle Kalibrierlösungen das Derivatisierungsverfahren nach 6.5.1 durchlaufen.

Um eine richtige Kalibrierung des Bestimmungsverfahrens nach 6.4 zu erhalten ist es notwendig die Retentionszeit von Acrylamid (LC-MS/MS) oder, bei Verfahren nach 6.5, die Retentionszeit von Brompropenamid (GC-MS) zu bestimmen. Die Retentionszeiten werden mit einer wässrigen Lösung der Referenzsubstanz unter den vorgegebenen chromatographischen Bedingungen ermittelt.

7.2 Bestimmung der Linearität und Festlegung des Arbeitsbereichs

Die Linearität und der Arbeitsbereich werden durch Untersuchung der Acrylamid-Lösungen (4.4.2) bei unterschiedlichen Konzentrationsniveaus, aufgestockt mit D3-Acrylamid auf dem gleichen Niveau wie in 6.2 dargestellt, bestimmt, z. B. 0,5 µg/ml. Diese Daten werden angewendet um eine Kalibriergerade zu erstellen und den Linearitätsbereich für Acrylamid (Arbeitsbereich) zu berechnen.

7.3 Kalibrierung mit internem Standard

Definierte Mengen von Internem Standard (4.5.2) werden zu verschiedenen Einwaagen einer ausgewählten Kaffeeprobe auf verschiedenen Konzentrationsniveaus, die den Arbeitsbereich überdecken, hinzugefügt. Dann wird der gesamte Analysengang durchgeführt (6.2). Die so ermittelten Messwerte werden verwendet, um eine matrixbezogene Kalibrierfunktion mit Internem Standard zu berechnen. Diese Untersuchung muss für jede Art der Probenmatrix (Extraktkaffee, Surrogate) gesondert durchgeführt werden.

ANMERKUNG Die Bestimmung des Analytgehaltes unbekannter Proben erfolgt grundsätzlich nach matrix- und probenspezifischen Eigenschaften mit Hilfe des Internen Standards, der jeder Probe vor der Analyse zugegeben wird (siehe 6.2 und 9.2).

7.4 Bestimmung der laborinternen Wiederfindung

Definierte Mengen von Acrylamid-Kalibrierlösung (4.4.2) werden zu verschiedenen Einwaagen einer Kaffeeprobe auf verschiedenen Konzentrationsniveaus hinzugefügt. Dann wird der gesamte Analysengang durchgeführt (6.2). Aus den ermittelten Werten wird die durchschnittliche laborinterne Wiederfindungsrate bestimmt. Sofern verfügbar, kann die Wiederfindung durch Untersuchung der Referenzprobe mit zertifiziertem oder anderweitig bekanntem Acrylamidgehalt bestimmt werden. Es wird empfohlen solch ein Material als eine Wiederfindungsprobe in der Routineanalyse zu verwenden.

8 Auswertung

8.1 Identifizierungskriterien

Siehe Tabellen 1 und 2.

8.2 Berechnung und Angabe des Ergebnisses

Die nach 8.2 aufgestellte Kalibrierreihe wird dazu verwendet, das Peakflächenverhältnis von Acrylamid zu Internem Standard gegen das Konzentrationsverhältnis von Acrylamid zu Internem Standard aufzutragen und eine lineare Regression durchzuführen.

Für die Probe mit unbekannter Massenkonzentration an Acrylamid wird das Peakflächenverhältnis von Acrylamid zu Internem Standard berechnet. Das Konzentrationsverhältnis von Acrylamid zu Internem Standard für die Probe kann mit Hilfe der allgemeinen Geradengleichung berechnet werden. Die Massenkonzentration von Acrylamid, w , in der Probe, in $\mu\text{g}/\text{kg}$ wird mit Gleichung (1) berechnet. Das Ergebnis ist dadurch automatisch wiederfindungsratenkorrigiert.

$$w = K \cdot \frac{(y_i - b)}{a} \cdot \frac{V}{m \cdot 1000} \quad (1)$$

Dabei ist

- K die Soll-Massenkonzentration des Internen Standards in der unbekannten Probe, in $\mu\text{g}/\text{kg}$;
- y_i die Peakfläche von Acrylamid dividiert durch die Peakfläche des Internen Standards der unbekannten Probe;
- a die Steigung der Regressionsgeraden, Flächenverhältnis gegen Konzentrationsverhältnis;
- b der Achsenabschnitt der Regressionsgeraden, Flächenverhältnis gegen Konzentrationsverhältnis;
- V das Endvolumen der Probenvorbereitung, in ml;
- m die Probenmasse, in g.

Alternativ kann ein vereinfachtes Berechnungsverfahren verwendet werden. Bei dieser Methode wird davon ausgegangen, dass die Response des D3-Acrylamid-Peaks einer bestimmten Probe der Konzentration an Internem Standard von $500 \mu\text{g}/\text{kg}$ (siehe Beispiel in 6.2) entspricht. Die entsprechende Konzentration an Acrylamid kann aus der Response des Peaks für das native Acrylamid mittels Dreisatz errechnet und das Ergebnis mit dem Faktor 0,974 (Molekülmasse von Acrylamid/Molekülmasse von D3-Acrylamid) multipliziert werden. Bei Anwendung dieser Methode wird dringend empfohlen, in jeder Analysenserie mindestens eine Probe mit einem bekannten Acrylamidgehalt zu analysieren, um die grundsätzliche Funktionsfähigkeit der Messeinrichtung abzusichern.

9 Präzisionsdaten

9.1 Allgemeines

Einzelheiten des Ringversuches zur Präzision des Verfahrens sind in Tabelle 3 und Tabelle A.1 zusammengefasst. Die aus dem Ringversuch abgeleiteten Werte dürfen nicht auf Analyt-Konzentrationsbereiche und/oder andere Matrices als die in Tabelle 3 und Tabelle A.1 angegebenen angewendet werden.

9.2 Wiederholpräzision

Die absolute Differenz zwischen zwei einzelnen Untersuchungsergebnissen, die an identischem Untersuchungsmaterial durch denselben Bearbeiter mit derselben Geräteausrüstung in kurzen Zeitabständen erhalten wurde, wird in nicht mehr als 5 % der Fälle die Wiederholgrenze r überschreiten.

9.3 Vergleichpräzision

Die absolute Differenz zwischen zwei einzelnen Untersuchungsergebnissen, die an identischem Untersuchungsmaterial in zwei Laboratorien erhalten wurde, wird in nicht mehr als 5 % der Fälle die Vergleichsgrenze R überschreiten.

Tabelle 3 — Präzisionsdaten zur Bestimmung von Acrylamid in Kaffee

Probe	$\bar{x}$ µg/kg	r µg/kg	R µg/kg
Probe A (Extrakt-Kaffee)	612,1	51,86	328,44
Probe B (Kaffeesurrogat-Extrakt)	204,1	34,80	141,26
Probe C (Röstkaffee)	53,74	12,13	38,576
Probe D (Röstkaffee)	217,1	26,49	109,20

9.4 Wiederfindungsrate

Bei der HPLC-Methode sollte die Wiederfindung in Bezug auf die matrixbezogene Kalibrierung zwischen 80 % und 120 % liegen. Bei der GC-Methode sollte die Wiederfindungsrate zwischen 70 % und 120 % liegen.

10 Messunsicherheit

Die laborspezifische Messunsicherheit sollte für jede Matrix gesondert ermittelt werden.

11 Untersuchungsbericht

Der Untersuchungsbericht sollte die Angaben nach ISO/IEC 17025 [3] und mindestens die folgenden Angaben enthalten:

- alle notwendigen Informationen zur Identifizierung der Probe (Art, Herkunft und Bezeichnung der Probe);
- eine Verweisung auf diese Europäische Norm;
- das Datum der Probenahme und die Art des Probenahmeverfahrens (wenn bekannt);
- das Datum des Probeneinganges;
- das Datum der Untersuchung;
- die Untersuchungsergebnisse und die Einheiten, in denen sie angegeben wurden;
- alle Arbeitsschritte, die nicht im Verfahren festgelegt sind oder als optional angesehen wurden und welche die Ergebnisse möglicherweise beeinflusst haben.