

DIN EN ISO 18862

ICS 67.140.20

Entwurf

Einsprüche bis 2018-08-22
 Vorgesehen mit
 E DIN EN 16987:2016-06
 als Ersatz für
 DIN 10785:2013-06

**Kaffee und Kaffee-Erzeugnisse –
 Bestimmung von Acrylamid –
 Verfahren mittels HPLC-MS/MS und mittels GC-MS nach Derivatisierung
 (ISO 18862:2016);
 Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 18862:2018**

Coffee and coffee products –
 Determination of acrylamide –
 Methods using HPLC-MS/MS and GC-MS after derivatization (ISO 18862:2016);
 German and English version prEN ISO 18862:2018

Café et de ses dérivés –
 Dosage de l'acrylamide –
 Méthodes utilisant CLHP-MS/MS et CG-MS après dérivation (ISO 18862:2016);
 Version allemande et anglaise prEN ISO 18862:2018

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2018-06-22 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und
 Stellungnahme vorgelegt.

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

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe 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/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe 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, 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 51 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 18862:2018) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Gremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-05-09 AA „Kaffee“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

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

Für die in diesem Dokument zitierten internationalen Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 3696	siehe DIN ISO 3696
ISO 5725-1	siehe DIN ISO 5725-1
ISO 5725-2	siehe DIN ISO 5725-2
ISO/IEC 17025	siehe DIN EN ISO/IEC 17025

Änderungen

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

- a) Aufnahme des Abschnittes 3 „Begriffe“;
- b) Aufnahme der Tabelle B.1;
- c) Streichung von Tabelle C.1;
- d) redaktionell überarbeitet.

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*

DIN EN ISO/IEC 17025, *Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien*

**Kaffee und Kaffee-Erzeugnisse — Bestimmung von Acrylamid — Verfahren
mittels HPLC-MS/MS und mittels GC-MS nach Derivatisierung
(ISO 18862:2016)**

*Café et de ses dérivés — Dosage de l'acrylamide — Méthodes utilisant CLHP-MS/MS et CG-MS après dérivation
(ISO 18862:2016)*

*Coffee and coffee products — Determination of acrylamide — Methods using HPLC-MS/MS and GC-MS after
derivatization (ISO 18862:2016)*

ICS:

Deskriptoren

Dokument-Typ: Europäische Norm

Dokument-Untertyp:

Dokument-Stage: CEN-Umfrage

Dokument-Sprache: D

STD Version 2.9d

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Vorwort	5
Einleitung	6
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Kurzbeschreibung	7
5 Reagenzien	7
6 Geräte	9
7 Probenahme	10
8 Durchführung	10
8.1 Allgemeines	10
8.2 Bereitung des Probeextraktes	10
8.3 Reinigung des Extraktes	11
8.3.1 Carrez-Klärung	11
8.3.2 Festphasen-Extraktion	11
8.4 Messung mit HPLC-MS/MS	11
8.4.1 Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC)	11
8.4.2 Identifizierung und Quantifizierung mittels Massenspektrometrie (HPLC-MS/MS)	12
8.5 Messung mit GC-MS	12
8.5.1 Derivatisierung und Probenvorbereitung zur Gaschromatographie	12
8.5.2 Gas-Chromatographie	13
8.5.3 Identifizierung und Quantifizierung mittels Massenspektrometrie	13
9 Kalibrierung	14
9.1 Allgemeines	14
9.2 Bestimmung der Linearität und Festlegung des Arbeitsbereichs	14
9.3 Kalibrierung mit der Lösung des Internen Standards	14
9.4 Bestimmung der laborinternen Wiederfindung	14
10 Auswertung	14
10.1 Identifizierungskriterien	14
10.2 Berechnung und Endergebnisse	14
11 Präzisionsdaten	15
11.1 Allgemeines	15
11.2 Wiederholpräzision	15
11.3 Vergleichpräzision	15
11.4 Wiederfindungsrate	16
12 Messunsicherheit	16
13 Prüfbericht	16
Anhang A (informativ) Verfahrenskenndaten	17
Anhang B (informativ) Beispiele für Absorbermaterialien	18

Anhang C (informativ) Beispiele für Trennsäulen und Analysebedingungen	19
C.1 Prinzipiell geeignete chromatographische Trennsäulen	19
C.2 Beispielmethode und ungefähre Retentionszeit für die HPLC-MS/MS	20
C.2.1 Beispiel A	20
C.2.2 Beispiel B	20
C.3 Beispiel für angemessene Bedingungen und ungefähre Retentionszeit für die GC-MS-Analyse	21
C.4 Beispielchromatogramme für die HPLC-MS/MS	21
C.5 Beispielchromatogramm für die GC-MS	24
Literaturhinweise	26

Europäisches Vorwort

Der Text von ISO 18862:2016 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und als prEN ISO 18862:2018 durch das Technische Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ übernommen, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 18862:2016 wurde von CEN als prEN ISO 18862:2018 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsorganisationen (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird üblicherweise von Technischen Komitees von ISO durchgeführt. Jede Mitgliedsorganisation, die Interesse an einem Thema hat, für welches ein Technisches Komitee gegründet wurde, hat das Recht, in diesem Komitee vertreten zu sein. Internationale staatliche und nichtstaatliche Organisationen, die in engem Kontakt mit ISO stehen, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet bei allen elektrotechnischen Themen eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) zusammen.

Die Verfahren, die bei der Entwicklung dieses Dokuments angewendet wurden und die für die weitere Pflege vorgesehen sind, werden in den ISO/IEC-Direktiven, Teil 1 beschrieben. Es sollten insbesondere die unterschiedlichen Annahmekriterien für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten beachtet werden. Dieses Dokument wurde in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC-Direktiven, Teil 2 erarbeitet (siehe www.iso.org/directives).

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren. Details zu allen während der Entwicklung des Dokuments identifizierten Patentrechten finden sich in der Einleitung und/oder in der ISO-Liste der erhaltenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname dient nur zur Unterrichtung der Anwender und bedeutet keine Anerkennung.

Eine Erläuterung der Bedeutung ISO-spezifischer Begriffe und Ausdrücke in Bezug auf Konformitätsbewertungen sowie Informationen darüber, wie ISO die Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO) hinsichtlich technischer Handelshemmnisse (TBT) berücksichtigt, enthält der folgende Link: www.iso.org/iso/foreword.html.

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34, *Food products*, Unterkomitee SC 15, *Coffee*, erarbeitet.

Einleitung

Bei der Anwendung dieses Dokuments sind alle bestehenden Sicherheitsbestimmungen zu beachten.

WARNUNG — Die Anwendung dieses Dokuments kann den Einsatz gefährlicher Werkstoffe, Arbeitsgänge und Geräte mit sich bringen. Dieses Dokument erhebt nicht den Anspruch, dass alle mit seiner Anwendung verbundenen Sicherheitsprobleme angesprochen werden. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders dieses Dokuments, vor der Anwendung dieses Dokuments geeignete Maßnahmen für die Sicherheit und den Gesundheitsschutz des Personals zu ergreifen, und dafür Sorge zu tragen, dass behördliche und gesetzliche Anforderungen eingehalten werden.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt Verfahren zur Bestimmung des Acrylamidgehalts in Kaffee und Kaffee-Erzeugnissen durch Wasserextraktion, Aufreinigung durch Festphasen-Extraktion und Bestimmung mittels HPLC-MS/MS und GC-MS fest. Es wurde in einer Verfahrensvalidierungsstudie an Röstkaffee, löslichem Kaffee, Kaffeesurrogaten und Kaffee-Erzeugnissen mit Bereichen von 53 µg/kg bis 612,1 µg/kg validiert.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. 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, *Water for analytical laboratory use — Specification and test methods*

3 Begriffe

Es werden keine Begriffe in diesem Dokument angegeben.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

— IEC Electropedia: unter <http://www.electropedia.org/>

— ISO Online Browsing Platform: unter <http://www.iso.org/obp>

4 Kurzbeschreibung

Die Kaffeeprobe wird mit Wasser extrahiert oder, bei löslichen Produkten, in Wasser aufgelöst. Durch eine Aufreinigung mittels Festphasen-Extraktion werden störende Begleitsubstanzen zurückgehalten. Zur Bestimmung können zwei alternative Verfahren verwendet werden: die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion (HPLC-MS/MS) oder, nach Bromierung des Acrylamids, die Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion (GC-MS). In beiden Fällen werden isoto penmarkierte Lösungen des Internen Standards verwendet.

5 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.

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

5.2 Betriebsgase mit einem hohen Reinheitsgrad, geeignet für GC und Massenspektroskopie nach den Angaben der Gerätehersteller.

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

5.4 Acrylamid, C_3H_5NO , Reinheit > 98 %, Referenzsubstanz.

5.4.1 Acrylamid-Stammlösung, Massenkonzentration $\rho = 1\,000\ \mu\text{g/ml}$.

$(0,10 \pm 0,001)$ 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 und alles wird gut gemischt. Die Stammlösung ist, bei höchstens 6 °C lichtgeschützt aufbewahrt, mindestens drei Monate haltbar.

Alternativ darf eine fertige Lösung mit einer Massenkonzentration von $\rho = 1\,000\ \mu\text{g/ml}$ eingesetzt werden, die kommerziell erhältlich ist. Die Haltbarkeitsangabe des Herstellers ist zu beachten.

5.4.2 Acrylamid-Kalibrierlösung, $\rho = 10\ \mu\text{g/ml}$.

$(1,0 \pm 0,001)$ ml Acrylamid-Stammlösung (5.4.1) werden mit einer Pipette in einen 100-ml-Messkolben gegeben. Anschließend wird 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 notwendig sein.

5.5 D3-Acrylamid (2,3,3 D3-Acrylamid), Lösung des Internen Standards, $C_3H_2D_3NO$, Reinheit > 98 %, Referenzsubstanz.

5.5.1 D3-Acrylamid-Stammlösung (Lösung des Internen Standards)

$(0,10 \pm 0,001)$ g D3-Acrylamid werden in einen 100-ml-Messkolben eingewogen und in 30 ml Wasser unter Schwenken gelöst. Anschließend wird mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt und alles wird gut gemischt. Die Stammlösung ist, bei höchstens 6 °C lichtgeschützt aufbewahrt, mindestens drei Monate haltbar.

Alternativ kann eine fertige Lösung mit einer Massenkonzentration von $\rho = 1\,000\ \mu\text{g/ml}$ eingesetzt werden, die kommerziell erhältlich ist. Die Haltbarkeitsangabe des Herstellers ist zu beachten.

5.5.2 D3-Acrylamid-Lösung des Internen Standards

$(1,0 \pm 0,001)$ ml D3-Acrylamid-Stammlösung (5.5.1) werden mit einer Pipette in einen 100-ml-Messkolben gegeben. Anschließend wird 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 notwendig sein.

ANMERKUNG 1 Für das HPLC-MS/MS-Verfahren können die Lösungen nach 5.4.1 bis 5.5.2 auch unter Verwendung des HPLC-Eluenten als Lösemittel hergestellt werden. Die Haltbarkeit dieser Lösungen hängt von der verwendeten mobilen Phase ab und muss validiert werden.

Bei Anwendung des GC-MS Verfahrens müssen alle Standardlösungen nach 5.4.2 und 5.5.2 den Derivatisierungsschritt nach 8.5.1 durchlaufen.

ANMERKUNG 2 Anstelle von D3-Acrylamid kann die Lösung des Internen Standards auch mit Hilfe von $^{13}\text{C}_3$ -Acrylamid hergestellt werden. In den folgenden Abschnitten wird jedoch nur die Vorgehensweise und Berechnung für D3-Acrylamid näher beschrieben.

5.6 Gesättigtes 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 konzentrierter Bromwasserstoffsäure (HBr, relative Dichte 1,48 g/cm³) auf pH etwa 1 angesäuert.

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

5.7 Kaliumbromid, KBr.

5.8 Natriumthiosulfat-Pentahydrat, Na₂S₂O₃ · 5 H₂O.

5.9 Triethylamin, (C₂H₅)₃N.

5.10 Natriumsulfat (wasserfrei, granuliert), Na₂SO₄.

5.11 Carrez-Lösung I

10,6 g Kaliumhexacyanoferrat-Trihydrat (II) K₄[Fe(CN)₆] · 3 H₂O werden in 100 ml Wasser gelöst. Die Lösung ist, sofern lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahrt, 6 Monate haltbar.

5.12 Carrez-Lösung II

21,9 g Zinkacetat-Dihydrat Zn(CH₃COO)₂ · 2 H₂O werden in 100 ml Wasser gelöst. Die Lösung ist, sofern lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahrt, 6 Monate haltbar.

5.13 Borat-Puffer, pH 8,6

In einem 100-ml-Messkolben werden 68 ml einer 0,1 molaren Natriumboratlösung (20,12 g Na₂B₄O₇ je Liter Wasser) mit 32 ml einer 0,1 molaren Salzsäure, c(HCl) = 0,1 mol/l, gemischt.

6 Geräte

Erforderlich sind übliches Laborgerät und speziell die Geräte nach 6.1 bis 6.14.

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.

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

6.2 Kaffeemühle, geeignet zum Vermahlen von gerösteten Kaffeebohnen.

6.3 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).

6.4 Ultraschallbad, einstellbar auf 40 °C.

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

6.6 Zentrifugenröhrchen, 15 ml und 50 ml.

6.7 Messkolben, 20 ml und 100 ml.

6.8 Pipetten, Glas oder automatisch, geeignet zum Abmessen der erforderlichen Volumina von Standardlösungen und Probenextraktverdünnungen.

6.9 Glas- oder Polypropylen-Kartuschen, mit Sorbentien für die Festphasen-Extraktion (SPE) zur Reinigung der Extrakte in 8.3.2 und 8.5.1 (Beispiele siehe Tabelle B.1).

6.10 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatograph (bei Prüfverfahren nach 8.4), mit ESI und massenspektrometrischem Detektor (HPLC-MS/MS), Gasversorgung entsprechend den Angaben des Herstellers.

6.11 HPLC-Trennsäule (bei Prüfverfahren nach 8.4), geeignet zur Chromatographie von Acrylamid (Beispiele siehe Tabelle C.1).

6.12 Gaschromatograph (bei Prüfverfahren nach 8.5), mit massenspektrometrischem Detektor (GC-MS), und Versorgung mit Betriebsgasen (5.2) entsprechend den Angaben des Herstellers.

6.13 GC-Trennsäule (bei Prüfverfahren nach 8.5), Kapillarsäule, geeignet zur Chromatographie von Acrylamid (Beispiele siehe Tabelle C.2).

6.14 Mikromembranfilter, Spritzenvorsatzfilter (z. B. aus Celluloseacetat mit einer Porengröße von 0,45 µm), geeignet zur Filtration des Probeneluates der Festphasenextraktion vor der Injektion ins Chromatographiesystem.

7 Probenahme

Die Probenahme ist kein Bestandteil des in diesem Dokument festgelegten Verfahrens. Das Probenahmeverfahren unterliegt der Vereinbarung der interessierten Parteien. 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, d. h. unter 6 °C, unter Lichtausschluss und für höchstens 6 Monate zu lagern und der Raumtemperatur nur zur Analytik auszusetzen.

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

8 Durchführung

8.1 Allgemeines

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

8.2 Bereitung des Probeextraktes

Die Probe wird, wenn nötig, mit einer Kaffeemühle (6.2) vermahlen und das Mahlgut gründlich homogenisiert.

Auf einer Analysenwaage (6.1) werden aus einer homogenen Probe 2 g Röstkaffee, löslicher Kaffee oder Kaffeesurrogat oder 5 g flüssiges Kaffeegetränk auf 1 mg in ein 50-ml Zentrifugenröhrchen (6.6) eingewogen.

Die Analysenprobe wird mit 2 ml n-Hexan versetzt und kurz geschüttelt. Dann wird sie mit D3-Acrylamid als Lösung des Internen Standards versetzt, so dass dessen Konzentration in etwa der des zu erwartenden Acrylamidgehaltes der Probe entspricht.

BEISPIEL Bei 2 g Kaffee werden 100 µl der Lösung des Internen Standards ($\rho = 10 \mu\text{g/ml}$) zugesetzt, dies entspricht 500 µg/kg Massenanteil von Acrylamid bezogen auf die Kaffeeprobe.

Anschließend werden 20 ml destilliertes Wasser hinzugefügt, kurz aber intensiv geschüttelt und dann 15 min im Ultraschallbad (6.4) bei etwa 40 °C behandelt.

Nach kurzem Absetzen für einige Minuten wird das Gemisch, bei nicht sedimentierenden Proben, zur Abtrennung der Schwebstoffe 15 min in der Laborzentrifuge (6.5) bei 2 000 g zentrifugiert. Aus der unteren wässrigen Phase werden 10 ml zur weiteren Aufreinigung nach 8.3 eingesetzt, bevor Flüssigchromatographie (8.4) bzw. Derivatisierung und gaschromatographische Auftrennung (8.5) erfolgen. Die Entnahme der wässrigen Phase erfolgt mit einer Pipette durch die obere Hexanphase hindurch. Falls erforderlich, darf die Hexanphase auch vorsichtig mit einer Pasteurpipette entfernt werden.

8.3 Reinigung des Extraktes

8.3.1 Carrez-Klärung

Die Probe aus 8.2 wird durch Carrez-Klärung gereinigt. Hierzu werden zunächst 1 000 µl Carrez-Lösung I (5.11) zugegeben und geschüttelt. Danach werden 1 000 µl Carrez-Lösung II (5.12) zugegeben und wieder geschüttelt. Nach kurzer Einwirkzeit wird 4 min bei 2 000 g zentrifugiert. Dann wird die Lösung dekantiert, der Rückstand anschließend mit 2 ml bis 3 ml Wasser nachgewaschen, dann erneut zentrifugiert und dekantiert. Die beiden wässrigen Lösungen werden kombiniert.

8.3.2 Festphasen-Extraktion

Der Probenextrakt aus der Carrez-Klärung (8.3.1) wird durch Festphasen-Extraktion (Solid Phase Extraction, SPE) weiter aufgereinigt, und zwar aufeinanderfolgend an zwei Kartuschen mit Adsorber-Material (Beispiele siehe Tabelle B.1). Die erste Kartusche enthält 500 mg C18-Material, die zweite Kartusche 500 mg Ionenaustauscher. Eine Serien-Anordnung der Kartuschen ist möglich. Gegebenenfalls kann auch eine Kombikartusche verwendet werden.

Die SPE-Säulen werden entsprechend der Hersteller-Vorschrift nacheinander mit Methanol und mit destilliertem Wasser konditioniert. Der gesamte Probenextrakt (8.3.1) wird auf die erste (obere) SPE-Säule gegeben. Nach einer Einweichzeit werden etwa 2 ml bis 3 ml Wasser hinzugefügt. Die Eluate werden gesammelt, bis die Kartusche trocken ist. Das Eluat wird nachfolgend auf die zweite bzw. untere Ionenaustauscher-Säule gegeben; es werden 2 ml bis 3 ml Wasser hinzugefügt, und die Eluate werden gesammelt. Durch Anlegen von leichtem Vakuum oder Druck kann eine vollständige Elution erreicht werden. Das Eluat inklusive Waschwasser wird in einem 20-ml-Messkolben gesammelt und mit Wasser auf 20 ml aufgefüllt.

8.4 Messung mit HPLC-MS/MS

8.4.1 Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC)

Der aufgereinigte Extrakt (8.3.2) wird vor der HPLC-MS/MS-Analyse entsprechend der vorgesehenen Eluentenzusammensetzung mit organischem Lösemittel versetzt und durch einen Mikromembranfilter (6.14) filtriert, bevor ein geeignetes Volumen (z. B. 10 µl bis 100 µl je nach verwendeter Säule) auf die HPLC-Säule injiziert wird.

Die Geräteparameter des HPLC-Systems sind zuvor nach den Betriebsanweisungen des Herstellers zu optimieren. Chromatographische Bedingungen sind entsprechend der gewählten Säule einzustellen (Beispiele siehe Tabelle C.1).

Die Reinigungsschritte nach 8.3.1 und 8.3.2 sind wichtig für die chromatographische Abtrennung der Analyten-Peaks von Störpeaks. Bild C.1 und Bild C.2 zeigen ein Beispiel-Chromatogramm.

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

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

Zur Identifizierung ist der Massenübergang mit $m/z = 72 \rightarrow 55$ heranzuziehen. Acrylamid gilt als identifiziert, wenn im MS/MS-Chromatogramm auf der Massenspur des Tochterions (m/z 55) ein Signal erkennbar ist, dessen Retentionszeit um weniger als 5 % von derjenigen einer authentischen Referenzsubstanz abweicht, die unter gleichen HPLC-Bedingungen analysiert wurde.

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

Die Quantifizierung erfolgt durch Vergleich der Abundanz der Mutter-Tochterionen von Acrylamid mit der des isotoopenmarkierten Internen Standards an den Massenübergängen $72 \rightarrow 55$ (Acrylamid) und $75 \rightarrow 58$ (D3-Acrylamid).

Ein dritter Massenübergang $72 \rightarrow 54$ kann zur weiteren 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

Bezugssubstanz	Ausgewählte Übergänge zur Identifizierung und Quantifizierung von Acrylamid im MS/MS-Modus	
	m/z	
Acrylamid	$72 \rightarrow 55$	Identifizierung und Quantifizierung
	$72 \rightarrow 44$	Identifizierung (informativ, als Qualifier)
D3-Acrylamid	$75 \rightarrow 58$	Identifizierung und Quantifizierung
	$75 \rightarrow 44$	Identifizierung (informativ, als Qualifier)

8.5 Messung mit GC-MS

8.5.1 Derivatisierung und Probenvorbereitung zur Gaschromatographie

Die wässrige Probenlösung (8.3.2) wird mit 3,5 g Kaliumbromid (5.7) versetzt. Anschließend werden 2,5 ml gesättigtes Bromwasser (5.6) zugegeben und der Ansatz zur Reaktion zwei Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln stehen gelassen. Danach wird überschüssiges Brom durch Zugabe von einigen Tropfen Natriumthiosulfat-Lösung (5.8) zersetzt. Bei einer einmolaren 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 nach Herstellervorschrift konditionierte Polymerharzkartusche (Inhalt 500 mg) mit polaren und starken kationischen Austauschqualitäten gegeben (Beispiele siehe Tabelle B.2). Dabei, und bei den anschließenden Spülschritten ist darauf zu achten, dass die Säule nicht trocken läuft. Es wird mit 3 ml Wasser, 1 ml Boratpuffer pH 8,6 (5.13) und wieder 0,5 ml Wasser nachgewaschen. Dann wird die Säule trocken gesaugt. Danach wird der Analyt mit 2 ml Ethylacetat eluiert, mit einer Einwirkzeit von 1 min bis 2 min auf der Säule.

ANMERKUNG 1 Es kann von Vorteil sein, mit mehr Ethylacetat zu eluieren, um die Wiederfindungsraten zu verbessern. Dabei kann es jedoch zur Verstärkung von Störeinflüssen kommen.

Der Extrakt wird mit so wenig wie möglich Natriumsulfat (5.10) getrocknet, um sicherzustellen, dass er frei von Wasser ist. Anschließend wird der Extrakt mit 50 µl Triethylamin (5.9) versetzt. Die Lösung kann unmittelbar zur GC-Analyse eingesetzt werden.

ANMERKUNG 2 Zur Kontrolle der Vollständigkeit der Umsetzungsreaktion kann der Probenlösung vor der Bromierung Methacrylamid zugegeben werden (z. B. 100 µl einer wässrigen Lösung mit 0,5 µg/ml). Wird das Methacrylamid-Derivat in ausreichendem Maße wiedergefunden, ist davon auszugehen, dass auch Acrylamid vollständig bromiert wurde.

ANMERKUNG 3 Der Triethylamin-Zusatz bewirkt eine quantitative Umsetzung des labilen Dibrompropionamid zum stabilen Monobrompropenamid, das mit GC-MS bestimmt wird. Ohne diesen Zusatz kann im weiteren Analysengang möglicherweise eine unkontrollierte HBr-Eliminierung erfolgen, z. B. an aktiven Stellen im Injektor. Dies hat nicht reproduzierbare Ergebnisse zur Folge.

8.5.2 Gas-Chromatographie

Der aufgereinigte Extrakt (8.5.1) wird vor der GC-MS-Analyse entsprechend dem zu erwartenden Analytgehalt mit Ethylacetat (5.3) verdünnt und ggf. durch einen Mikromembranfilter (6.14) filtriert.

Das Gaschromatograph-System (6.12) ist nach der Bedienungsanweisung des Herstellers einzurichten und die Geräteparameter zu optimieren. Die chromatographischen Bedingungen sind entsprechend der gewählten Trennsäule einzustellen. Beispiele siehe Tabellen C.2 und C.5. Bilder C.3, C.4 und C.5 zeigen Beispiel-Chromatogramme.

8.5.3 Identifizierung und Quantifizierung mittels Massenspektrometrie

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

Die Quantifizierung erfolgt durch Vergleich der Peakfläche der Ionen aus Brompropenamid mit denen der isotoopenmarkierten Lösung des Internen Standards (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
Brompropenamid-D ₂	153: [C ₃ ² H ₂ ¹ H ₂ 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 <i>m/z</i> 108 sind wegen der natürlichen Isotopenverteilung des Brom nicht auswertbar.		

9 Kalibrierung

9.1 Allgemeines

Vor der Verwendung des GC-Verfahrens müssen alle Kalibrierlösungen den Derivatisierungsschritt nach 8.5.1 durchlaufen.

Voraussetzung für die richtige Kalibrierung des Bestimmungsverfahrens nach 8.4 ist die Bestimmung der Retentionszeit von Acrylamid (LC-MS/MS) oder bei Verfahren nach 8.5 der von Brompropenamid (GC-MS). Die Retentionszeit wird mit einer wässrigen Lösung der Bezugssubstanz unter den vorgegebenen chromatographischen Bedingungen ermittelt.

9.2 Bestimmung der Linearität und Festlegung des Arbeitsbereichs

Bestimmen der Linearität und des Arbeitsbereichs durch Analyse von Lösungen von Acrylamid (5.4.2) bei verschiedenen Konzentrationen, die wie in 8.2 angegeben mit D3-Acrylamid auf dem gleichen Niveau versetzt sind, z. B. 0,5 µg/ml. Diese Daten werden verwendet, um eine Kalibrierungsfunktion zur Berechnung des Linearitätsbereichs für Acrylamid (Arbeitsbereich) einzurichten.

9.3 Kalibrierung mit der Lösung des Internen Standards

Mehreren Prüfmengen einer ausgewählten Kaffeeprobe werden definierte Mengen der Lösung des Internen Standards (5.5.2) auf verschiedenen Konzentrationsniveaus, die den Arbeitsbereich überdecken, zugesetzt. Dann wird der gesamte Analysengang durchgeführt (8.2). Die so ermittelten Messwerte werden verwendet, um eine matrixbezogene Kalibrierfunktion mit der Lösung des Internen Standards zu berechnen. Werden andere Matrices (Extraktkaffee, Surrogate) untersucht, ist diese Bestimmung für jede dieser Probenarten gesondert durchzuführen.

ANMERKUNG Die Bestimmung des Analytgehaltes unbekannter Proben erfolgt grundsätzlich basierend auf matrix- und probenbezogenen Eigenschaften mit Hilfe der Lösung des Internen Standards, die jeder einzelnen Probe vor der Analyse zugegeben wird (siehe 8.2 und 10.2).

9.4 Bestimmung der laborinternen Wiederfindung

Mehreren Prüfmengen einer Kaffeeprobe werden definierte Mengen von Acrylamid-Kalibrierlösung (5.4.2) auf verschiedenen Konzentrationsniveaus zugesetzt. Dann wird der gesamte Analysengang durchgeführt (8.2). Aus den so ermittelten Werten wird die durchschnittliche laborinterne Wiederfindungsrate bestimmt. Falls verfügbar, kann die Wiederfindungsrate durch Analyse einer Referenzprobe mit zertifiziertem oder anderweitig bekanntem Acrylamidgehalt bestimmt werden. Es wird empfohlen, bei der Routineanalyse eine solche Substanz als Probe der Wiederfindungsrate zu verwenden.

10 Auswertung

10.1 Identifizierungskriterien

Siehe Tabellen 1 und 2.

10.2 Berechnung und Endergebnisse

Die nach 9.2 aufgestellte Kalibrierreihe wird dazu verwendet, das Peakflächenverhältnis von Acrylamid zur Lösung des Internen Standards gegen das Konzentrationsverhältnis Acrylamid zur Lösung des Internen Standards aufzutragen und eine lineare Regression durchzuführen.

Für die Probe mit unbekanntem Acrylamidgehalt wird das Peakflächenverhältnis von Acrylamid zur Lösung des Internen Standards berechnet. Mit Hilfe der allgemeinen Geradengleichung lässt sich das Konzentrationsverhältnis von Acrylamid zur Lösung des Internen Standards für die Probe bestimmen. Der