
**Neue Methoden zur Kontrolle von Acrylamid in
Lebensmitteln mit der beschleunigten
Lösemittelextraktion (ASE) und HPLC/MS**

Frank Höfler

Dionex (Europe) Management AG

Solothurnerstrasse 259, CH-4600 Olten

Switzerland

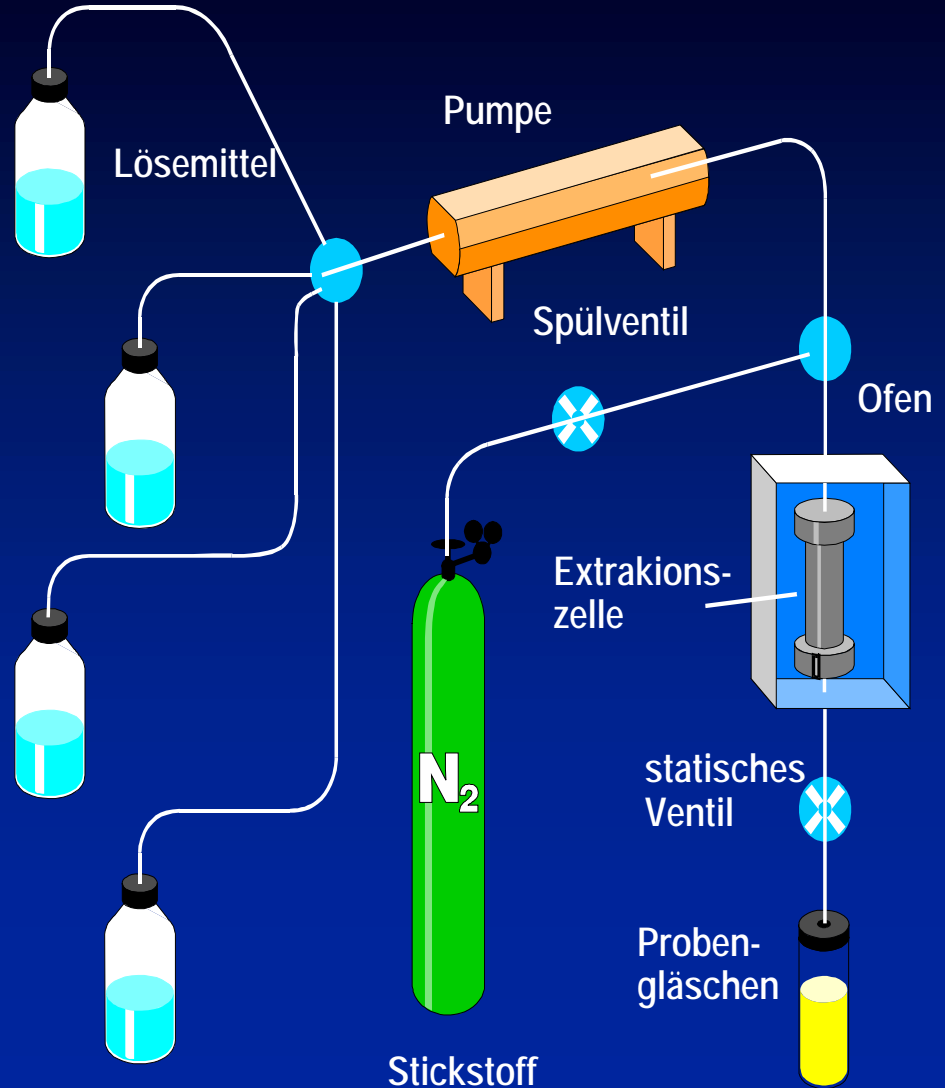
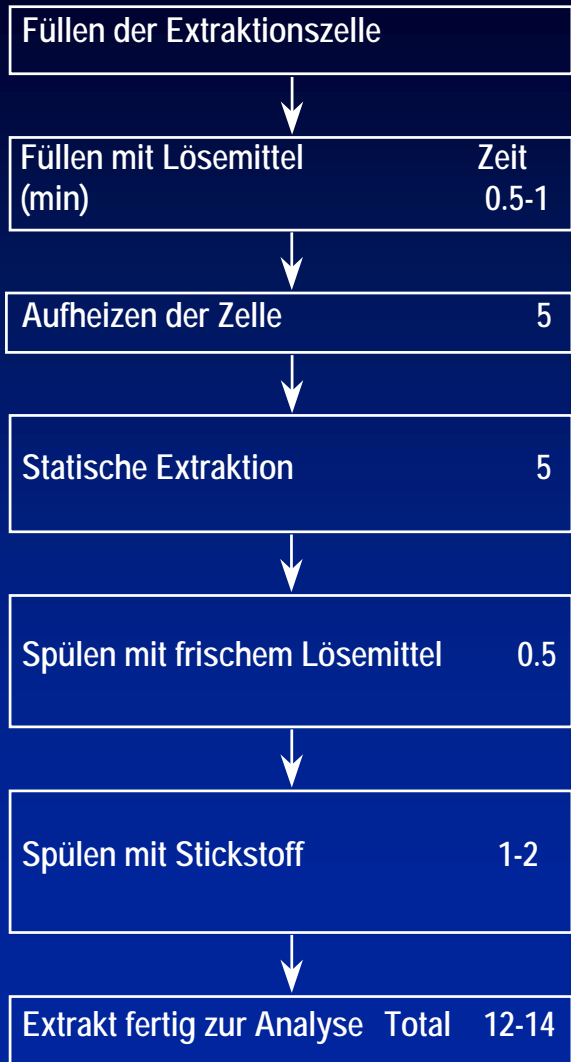
Acrylamid-Problematik

- ◆ Acrylamid wird beim Frittieren, Rösten und Backen von stärkehaltigen Lebensmittel gebildet
- ◆ Acrylamid steht im Verdacht toxisch, mutagen und cancerogen zu sein.
- ◆ Bisher gibt es Analysemethoden für die Bestimmung in Trinkwasser im unteren $\mu\text{g/L}$ -Bereich. Eine U.S. Methode existiert.
- ◆ In den Lebensmitteln kommt Acrylamid bis zu 50 mg/kg vor!

Konventionelle Methoden

- ◆ Acrylamid wird mit Wasser bei 60-80°C Becherglas extrahiert.
- ◆ Anschließend werden die Extrakte mit organischen Lösemittel extrahiert und entfettet
- ◆ 1. Acrylamid wird nach Derivatisierung mit GC-MS-bestimmt.
- ◆ 2. Die Extrakte werden direkt mit LC/MS/MS bestimmt.
- ◆ Problematisch werden die Extraktion und der Clean up angesehen.

ASE -Flussdiagramm



Extraktion mit ASE

◆ Extraktionsbedingungen:

- Zellgröße: 33 mL
- Probenmenge: 10 -15 g
- Ofentemperatur: 80 °C
- Druck: 10 MPa
- Lösemittel: Acetonitril
- Extraktvolumen: ca. 40 mL
- Extraktionszeit: 23 Minuten

◆ Extrakte analysiert mit HPLC/MS

Acrylamid in der RPLC

◆ Probleme in der LC:

Geringe Retention von Acrylamid auf Umkehrphasen HPLC-Säulen (C18)

- sehr polare Verbindung (ionisch)
- geringes Molekulargewicht (71 g/mol)
- Koelution mit Matrixkomponenten, selektive Detektion erforderlich

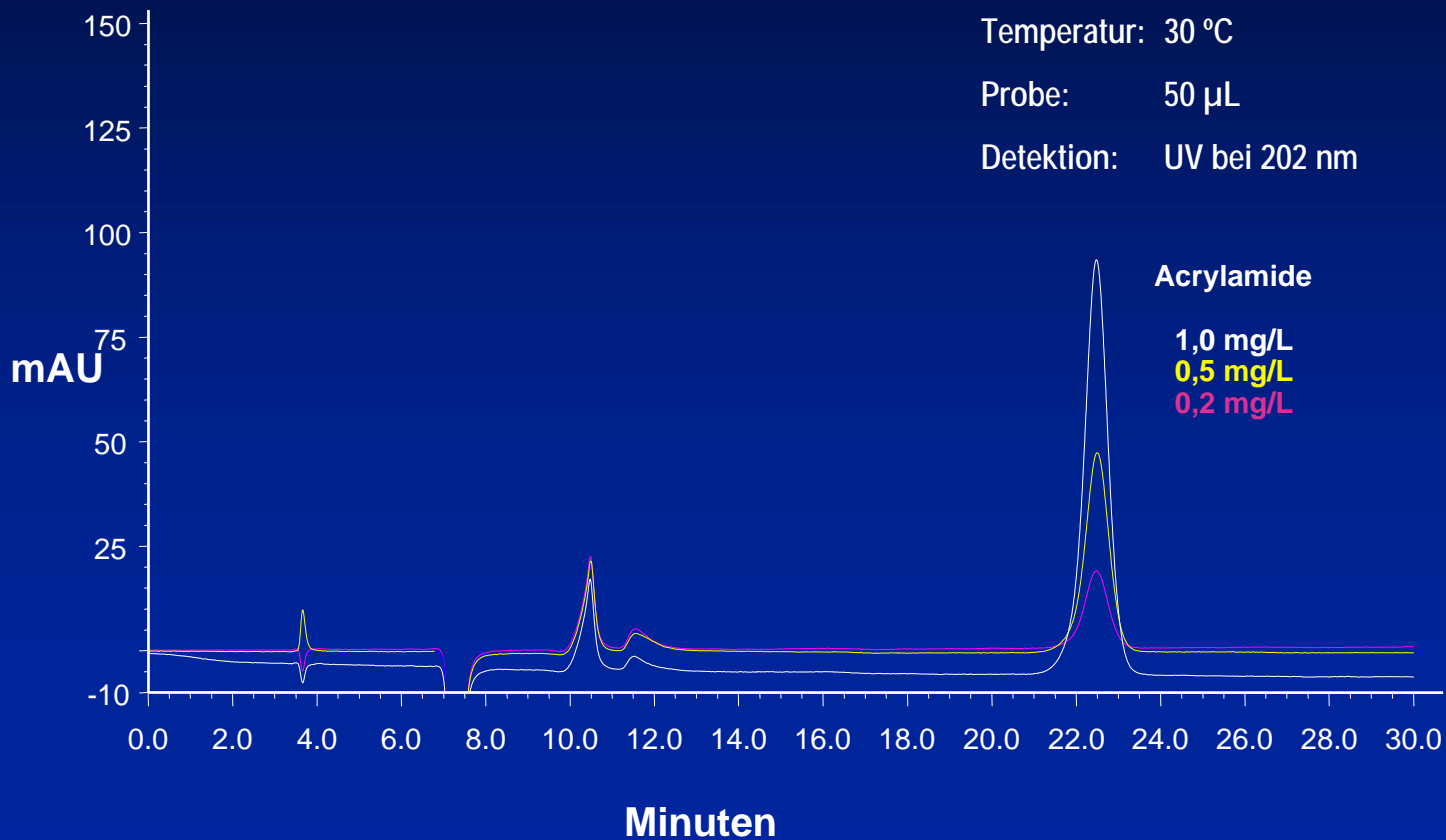
◆ Acrylamid kann bei sauren pH-Werten als Kation an einem sulfonierten Ionenaustauscherharz getrennt werden.

Ionenausschluss-Säule

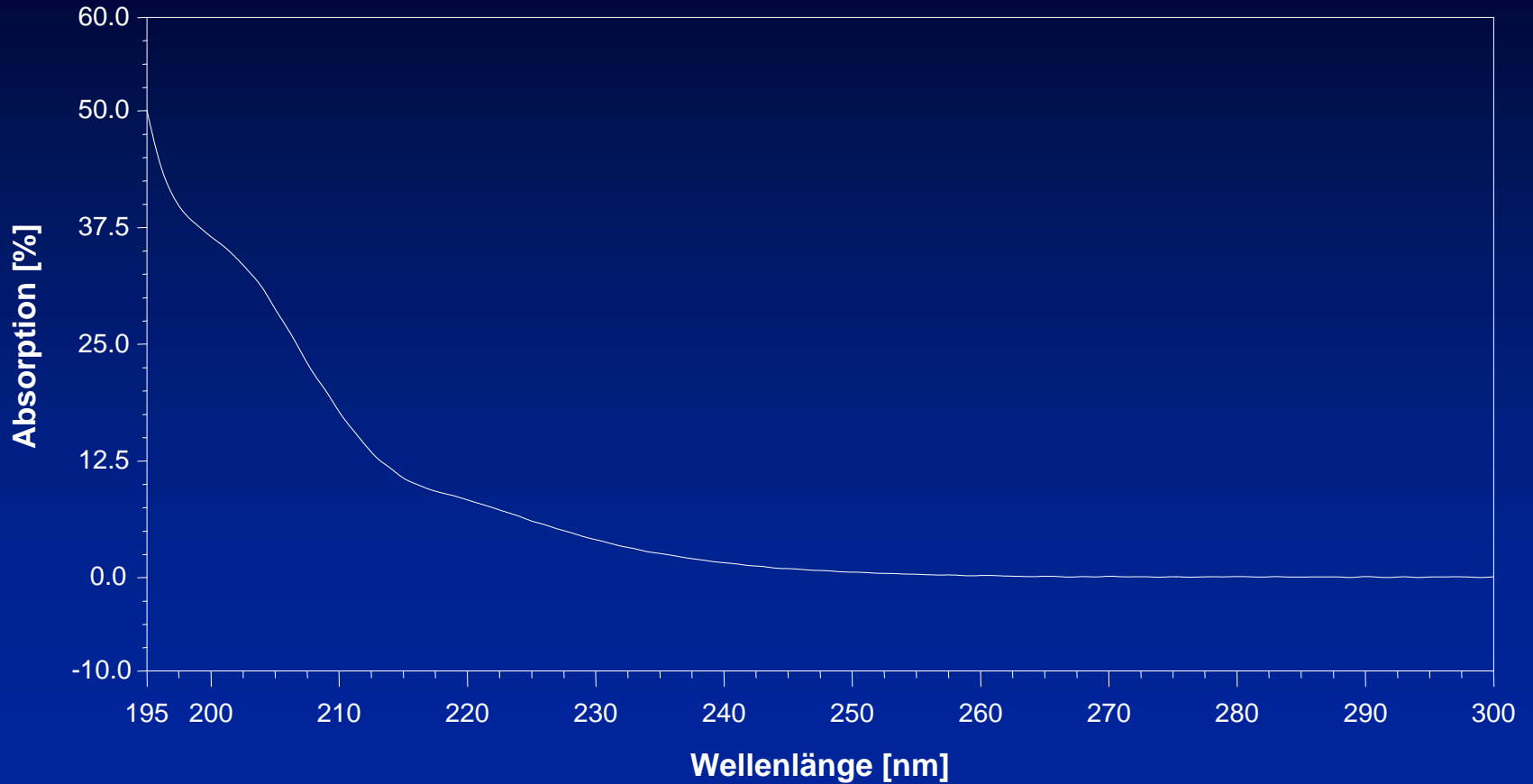
| Säule | ICE-AS1 |
|--------------------------|------------------------------|
| Teilchendurchmesser | 7,5 µm |
| Harz | Polystyrol/ Divinylbenzol |
| Partikelporosität | makroporös |
| Quervernetzung | 8% |
| Hydrophobizität | gering |
| Funktionelle Gruppen | Sulfonsäuren |
| Säulenkapazität | 27000 µeq |
| pH-Stabilität | 0 - 14 |
| Lösemittelkompatibilität | 0 - 50% |
| Abmessungen | 9 x 250 mm 4 x 250 mm |

Acrylamid auf der ICE-AS1

Säule: IonPac ICE-AS1, 250 x 9 mm
Eluent: 3 mmol/L HCOOH - 30% Acetonitril
Fluss: 1 mL/min
Temperatur: 30 °C
Probe: 50 µL
Detektion: UV bei 202 nm

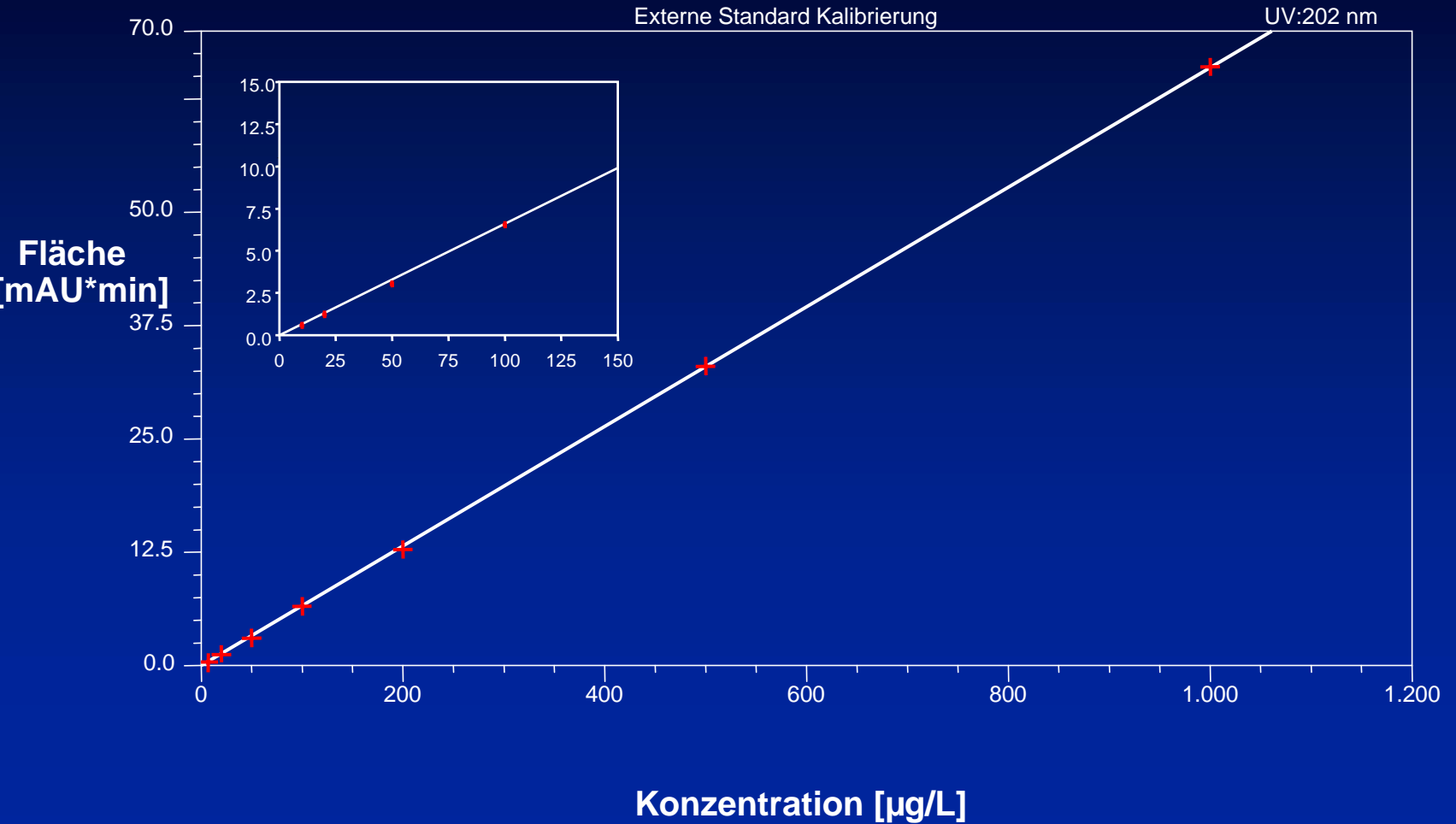


UV-Spektrum von Acrylamid



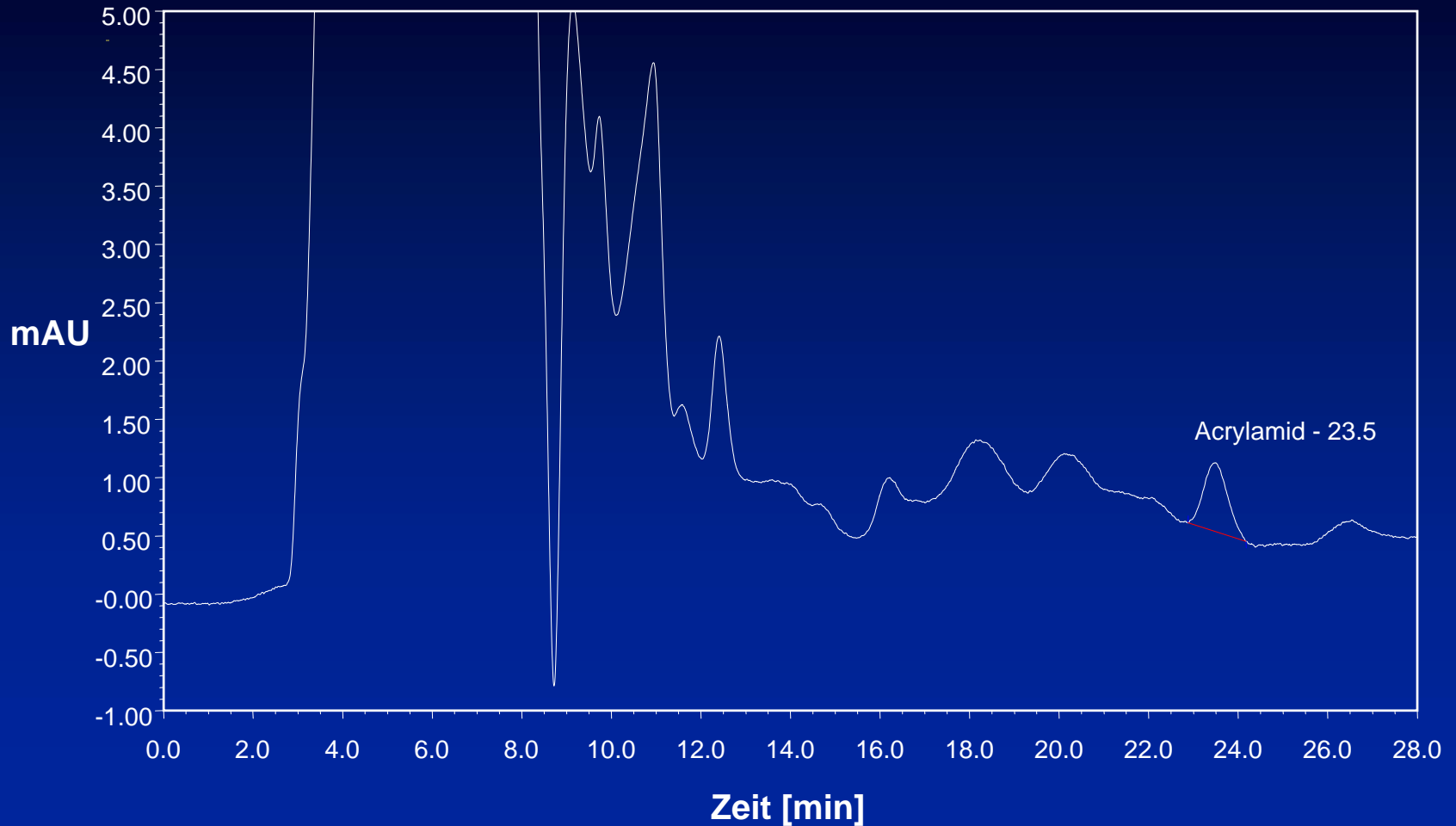
Kalibrierfunktion UV @ 202 nm

- 10 – 1000 $\mu\text{g/L}$ -

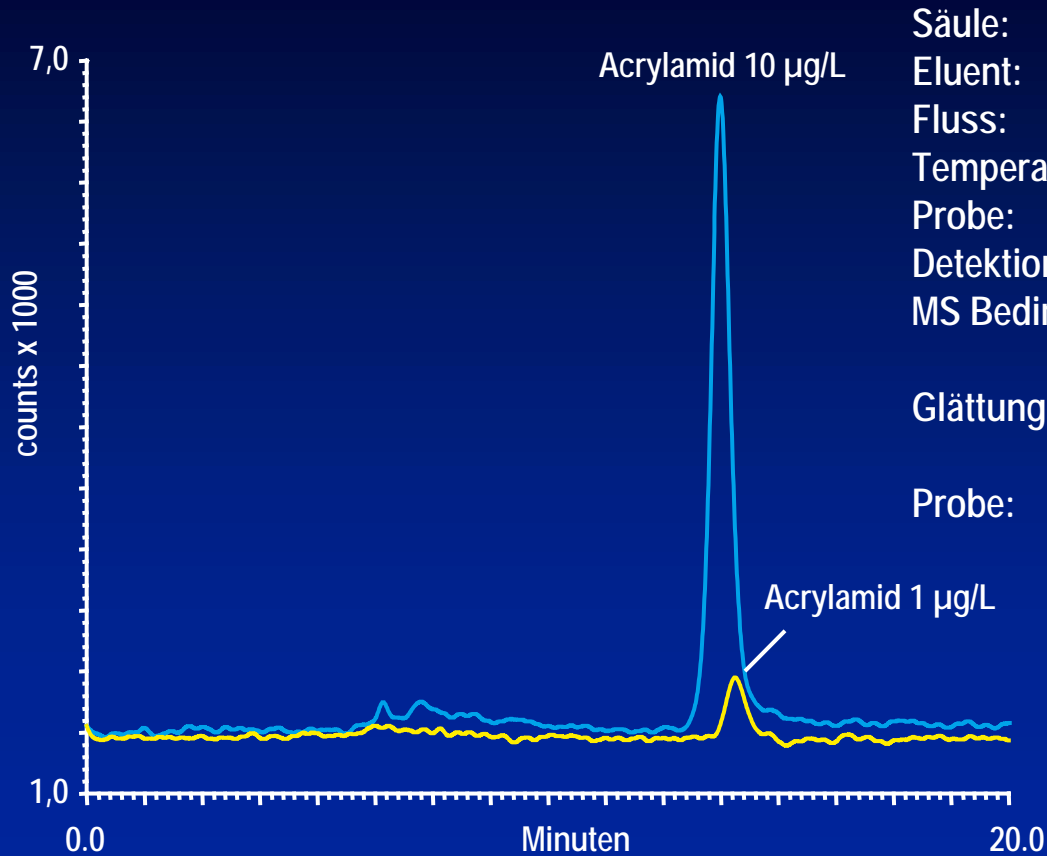


Acrylamid aus Kartoffelchips mit IC/UV

- ASE wässrig ohne Clean up-

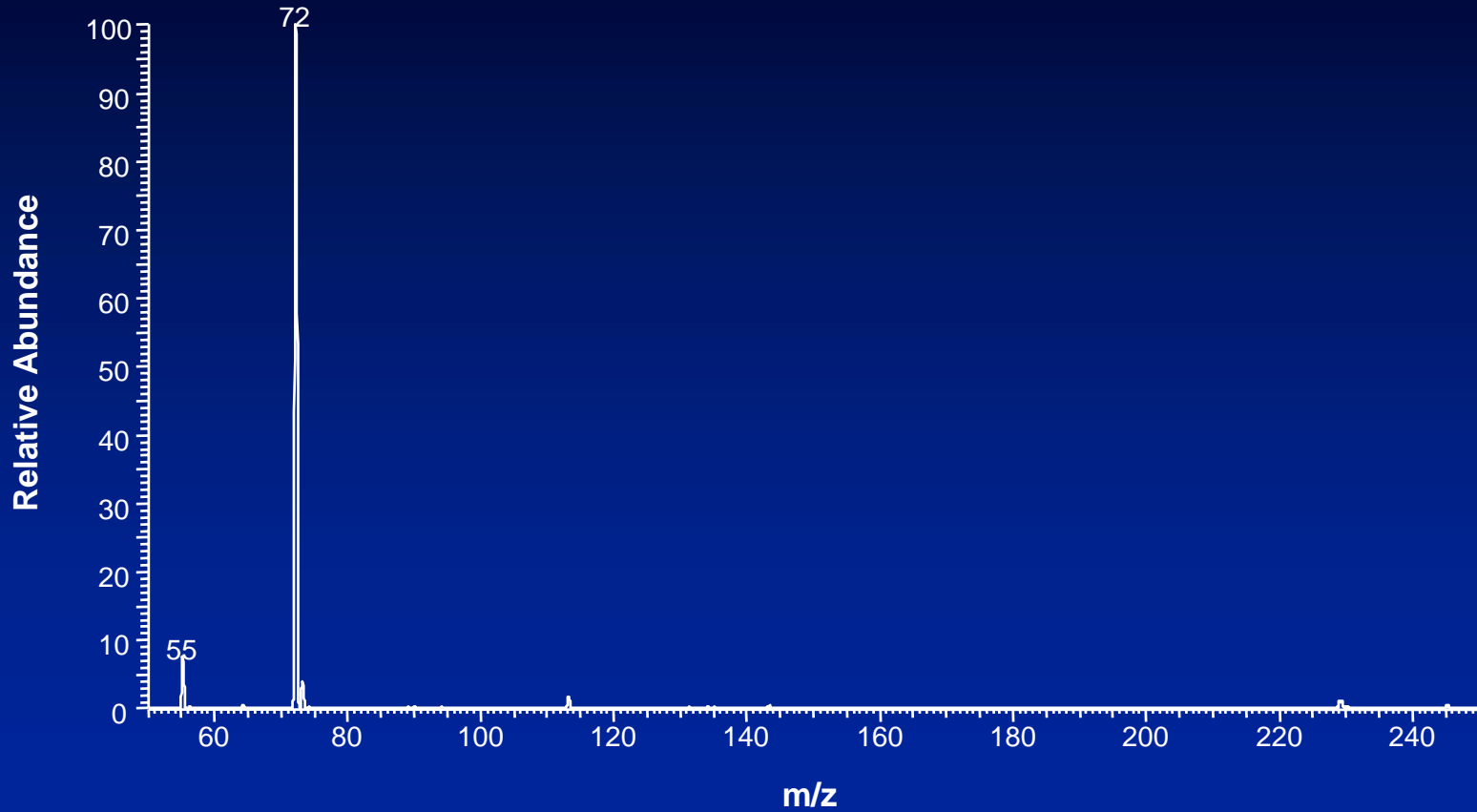


Acrylamid in Wasser mit IC/MS

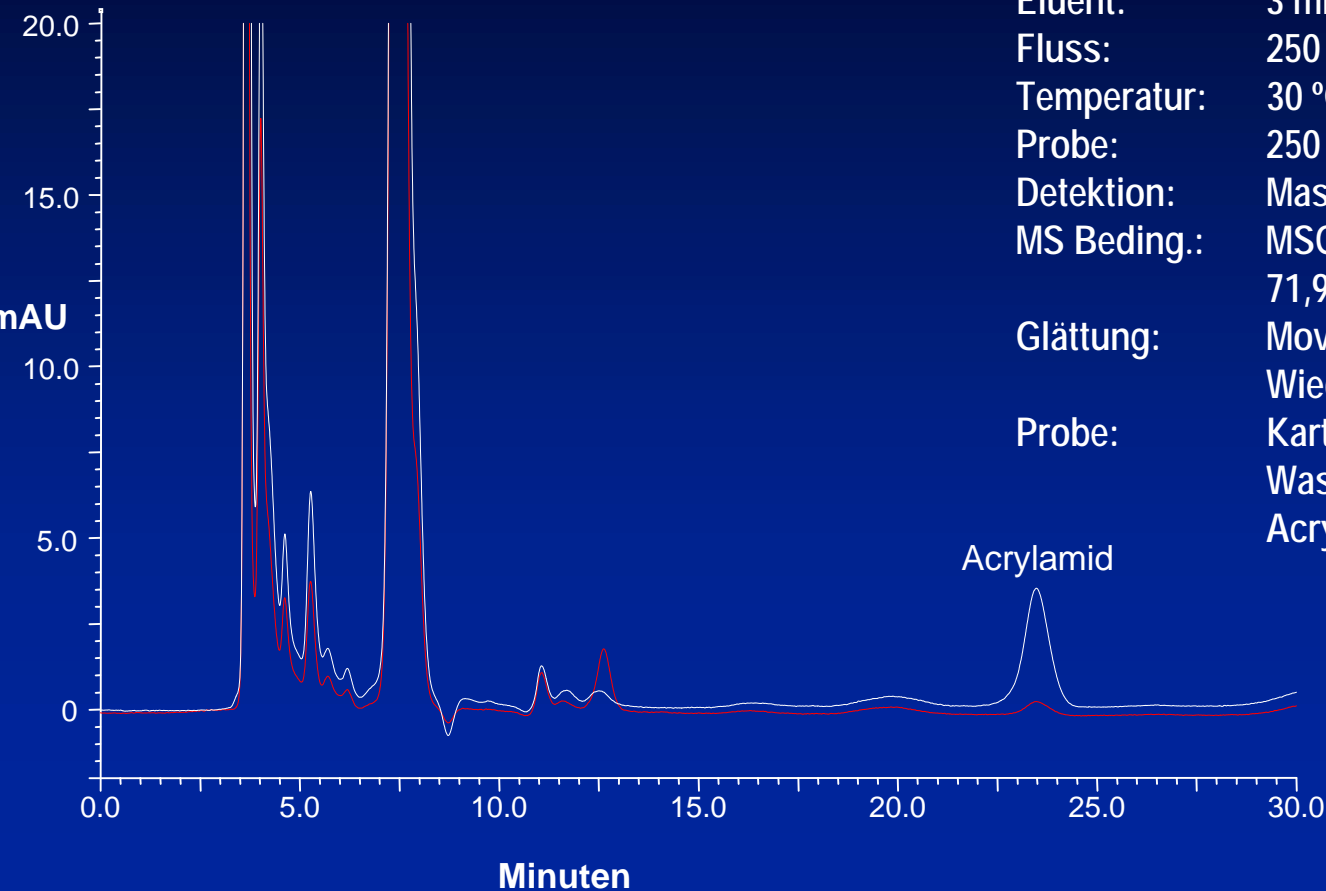


Säule: IonPac ICE-AS1, 250 x 4 mm
Eluent: 3 mmol/ HCOOH - 30% ACN
Fluss: 250 µL/min
Temperatur: 30 °C
Probe: 250 µL
Detektion: Massenspektrometrie
MS Beding.: MSQ™ +ESI, 50 V, 350°C, SIM
71,91-72,09 m/z
Glättung: Moving Average 5 Punkte 50
Wiederholungen
Probe: Leitungswasser dotiert mit
Acrylamid

ESI-Massenspektrum von Acrylamid



IC/MS von Acrylamid in Kartoffelchips



Säule: IonPac ICE-AS1, 250 x 4 mm
Eluent: 3 mmol/ HCOOH - 30% ACN
Fluss: 250 µL/min
Temperatur: 30 °C
Probe: 250 µL
Detektion: Massenspektrometrie
MS Beding.: MSQ™ +ESI, 50 V, 350°C, SIM
71,91-72,09 m/z
Glättung: Moving Average 5 Punkte 50
Wiederholungen
Probe: Kartoffelchips extrahiert mit
Wasser und dotiert mit 40 µg
Acrylamid

Acrylamid in Lebensmitteln

Probenvorbereitung

- ◆ Proben: Bratkartoffeln
 - Frittiert in Pflanzenöl bei 180 bis 190 °C (goldbraun)
- ◆ Proben bei -18°C gelagert bis zur Extraktion
- ◆ Wasserzugabe und Temperierung vor der Extraktion
- ◆ Entfettung der Proben vor der Extraktion
- ◆ Proben wurden nicht zerkleinert

ASE Methode 1

- ◆ Einwaage der Probe
- ◆ Einfüllen in eine ASE-Zelle (33-mL), Totvolumen mit Sand aufgefüllt.
- ◆ Extraktion erst mit Hexan und dann mit Acetonitril oder nur mit Acetonitril
- ◆ Membranfiltrieren (0,2 µm PP Filter)
- ◆ Analyse mit HPLC/MS

ASE Methode 2

- ◆ Einwaage der Probe
- ◆ Zugabe von 5 mL Wasser
- ◆ Temperieren im GC-Ofen bei 70°C für 15 Minuten. Abkühlen innerhalb von 20 Minuten. Einfüllen in eine ASE-Zelle (33-mL), Totvolumen mit Sand aufgefüllt.
- ◆ Extraktion erst mit Hexan und dann mit Acetonitril oder nur mit Acetonitril
- ◆ Membranfiltrieren (0,2 µm PP Filter)
- ◆ Analyse mit HPLC/MS

ASE Methode 3

- ◆ Einwaage der Probe
- ◆ Zugabe von 5 mL Wasser
- ◆ Einfüllen in eine ASE-Zelle (33-mL), Totvolumen mit Sand aufgefüllt.
- ◆ **Vorheizen im ASE 200 bei 80°C für 15 Minuten**
- ◆ Extraktion erst mit Hexan und dann mit Acetonitril oder nur mit Acetonitril
- ◆ Membranfiltrieren (0,2 µm PP Filter)
- ◆ Analyse mit HPLC/MS

Effekt von Wasser und Vorheizen auf die Extraktion von Acrylamid auf Bratkartoffeln: Methode 1 – kein Wasser, kein Vorheizen

| Probe | Wasser/ Temperierung | Entfetten | Acrylamid Gehalt ($\mu\text{g/g}$) |
|------------|-------------------------|-----------|---|
| HB 200 #3b | Nein/Nein | Ja | 0,008 |
| HB 200 #4 | Nein/Nein | Nein | 0,014 |

Effekt von Wasser und Vorheizen auf die Extraktion von Acrylamid auf Bratkartoffeln: Methode 2 – Wasser, Vorheizen im GC

| Probe | Wasser/ Temperierung | Entfetten | Acrylamid Gehalt ($\mu\text{g/g}$) |
|------------|-------------------------|-----------|---|
| HB 200 #5b | Ja/Ja | Ja | 0,665 |
| HB 200 #6 | Ja/Ja | Nein | 0,539 |

Effekt von Wasser und Vorheizen auf die Extraktion von Acrylamid auf Bratkartoffeln: Methode 3 – Wasser, Vorheizen (ASE)

| Probe | Wasser/ Temperierung | Entfetten | Acrylamid Gehalt ($\mu\text{g/g}$) |
|------------|-------------------------|-----------|---|
| HB 200 #1b | Ja/Ja, ASE | Ja | 0,700 |
| HB 200 #2 | Ja/Ja, ASE | Nein | 0,750 |

Zusammenfassung

- ◆ Automatische, schnelle Extraktion mit ASE
- ◆ Selektive Bestimmung mit ICE-AS1 und MS-Detektion

Bestimmungsgrenzen von Acrylamid in Wasser

- ◆ UV (S/N: 3:1) LOD: 2 µg/L
- ◆ MSQ (ELMO): LOD (S/N: 3:1) 0,5 µg/L

Ausblick

- ◆ Einfluss des Wasservolumens auf die Ausbeute?
Einfluss des pH-Wertes?
- ◆ Einfluss der Temperatur auf die Ausbeuten?
- ◆ Wird Acrylamid nur an der Oberfläche gebildet?
- ◆ Untersuchung anderer Lebensmittelproben