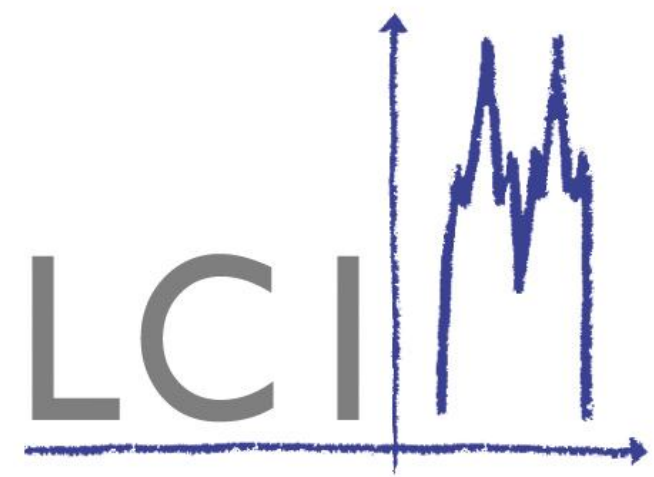


Entwicklung einer Methode zur Routinebestimmung

von PAH4 in Kakaobutter mittels HPLC-FLD



^{1,2}Saskia Krisch, ¹Sven Rosendahl, ¹Marion Raters,
³Brigitte Petersen, ¹Reinhard Matissek



¹LCI, Lebensmittelchemisches Institut des Bundesverbandes der Deutschen Süßwarenindustrie (BDSI) e. V., Adamsstraße 52-54, 51063 Köln, www.lci-koeln.de

²Institut für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften, Bereich Lebensmittelchemie, Universität Bonn, Endenicher Allee 11-13, 53115 Bonn

³Institut für Tierwissenschaften, Bereich Präventives Gesundheitsmanagement, Universität Bonn, Katzenburgweg 7-9, 53115 Bonn

Hintergrund

Die Bezeichnung polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (engl. polycyclic aromatic hydrocarbon, PAH) steht als Sammelbegriff für organische Verbindungen, die sich aus kondensierten, aromatischen Ringen zusammensetzen. PAH sind in der Umwelt ubiquitär verbreitet und gelten als unerwünschte Kontaminanten, da sie z. T. über ein cancerogenes und genotoxisches Potenzial verfügen. Gemäß EU-Kontaminanten-Verordnung Nr. 1881/2006 wurde bisher BaP als Leitsubstanz für die große Gruppe der PAH herangezogen [1]. In der neuen VO (EU) Nr. 835/2011 zur Änderung der EU-Kontaminanten-VO wird nun BaP um weitere Verbindungen („PAH4“: BaP, BaA, Chr, BbF) ergänzt, um die Gruppe der PAH in Lebensmitteln besser zu repräsentieren [2].

Für „Kakaobohnen und Folgeerzeugnisse“ war in der VO (EG) Nr. 1881/2006 weder ein Höchstgehalt für PAH4 noch für BaP festgelegt [1]. In der VO (EU) Nr. 835/2011 werden nunmehr als Höchstgehalte für diese Produktgruppe 5,0 µg/kg Fett für BaP und 35,0 µg/kg Fett für PAH4 festgelegt. Diese Grenzwerte gelten ab dem 01.04.2013 [2].

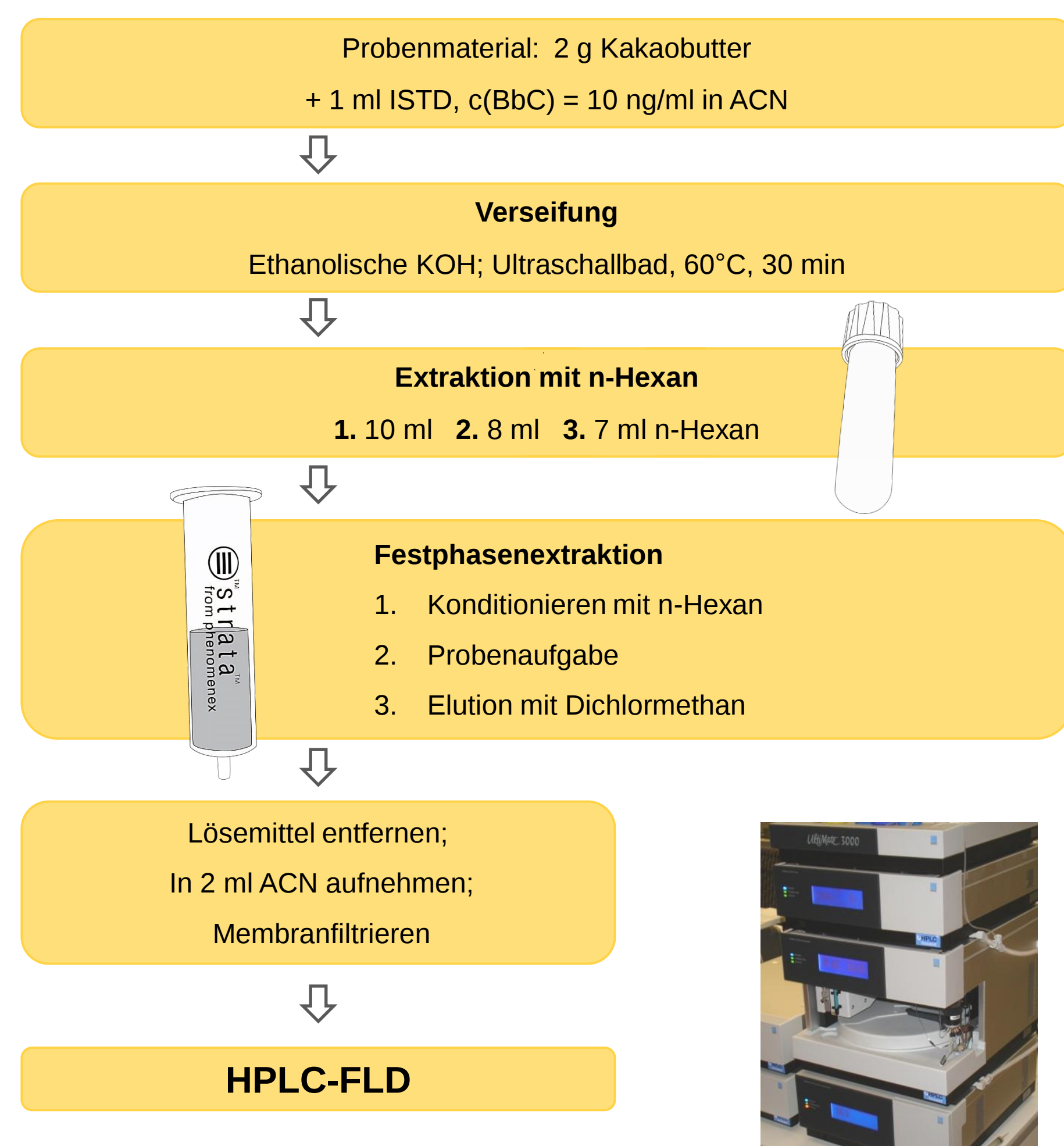
PAH4



Ziel

Ziel dieser Studie war es, eine für die Routineanalytik geeignete Analysenmethode zur PAH4-Bestimmung in Kakaobutter zu entwickeln und zu validieren. Für die Aufarbeitung wird Kakaobutter zuerst verseift, anschließend werden die PAH4 aus dem Unverseifbaren mit n-Hexan extrahiert und durch Festphasenextraktion aufgereinigt. Die Gehaltsbestimmung erfolgt durch hochleistungsflüssigchromatographische Trennung mit Fluoreszenzdetektion (HPLC-FLD) und über die Zugabe von BbC als Internem Standard (ISTD). Das Verfahren ist angelehnt an die DGF-Einheitsmethode C-III 17a (97) [3].

Aufarbeitung



Validierung

Die vorgestellte Methode wurde in Anlehnung an die Vorgaben von Kromidas [4] validiert. Hierzu wurde eine Kakaobutterprobe mit einer PAH4-Lösung dotiert, entsprechend der in dieser Arbeit entwickelten Methode aufgearbeitet und vermessen. Eine Auswahl der Validierungsdaten, wie Linearität, Wiederfindungsrate, relative Standardabweichung der Wiederholbarkeit (RSD_r), HORRAT_r-Faktor, sowie Nachweis- und Bestimmungsgrenze (LOD bzw. LOQ) sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1: Ergebnisse der Methodenvalidierung der PAH4

	BaA	Chr	BbF	BaP
Linearer Arbeitsbereich [µg/kg]	0,02 – 15,57	0,02 – 9,45	0,13 – 36,32	0,17 – 67,33
Wiederfindungsrate [%]	81 - 101	66 - 91	94 - 103	90 - 100
RSD _r [%]	10	13	7	6
HORRAT _r	0,66	0,88	0,46	0,42
LOD [µg/kg]	0,01	0,01	0,04	0,07
LOQ [µg/kg]	0,02	0,02	0,13	0,17

Die beschriebene Methode zeigt sich in einem weiten Messbereich als linear, verfügt über eine gute Reproduzierbarkeit und ist äußerst sensitiv (LOD zwischen 0,01 und 0,07 µg/kg). Die Linearitätsprüfung am Beispiel von BaP ist in Abbildung 4 dargestellt.

In der VO (EG) Nr. 836/2011 werden als Leistungskriterien für die Analytik von PAH4 in Lebensmitteln Wiederfindungsraten von 50–120 %, LOD ≤0,30 µg/kg, LOQ ≤0,90 µg/kg und HORRAT_r <2 für jede der vier Substanzen gefordert [5]. Das im LCI entwickelte Verfahren erfüllt diese Forderungen.

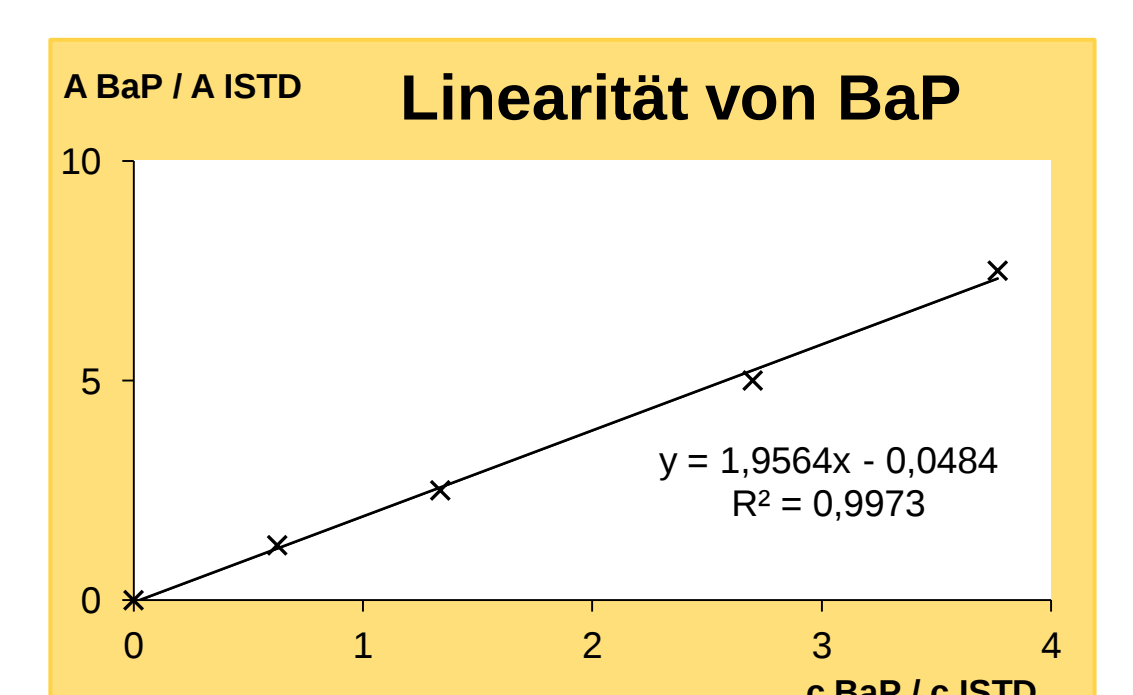
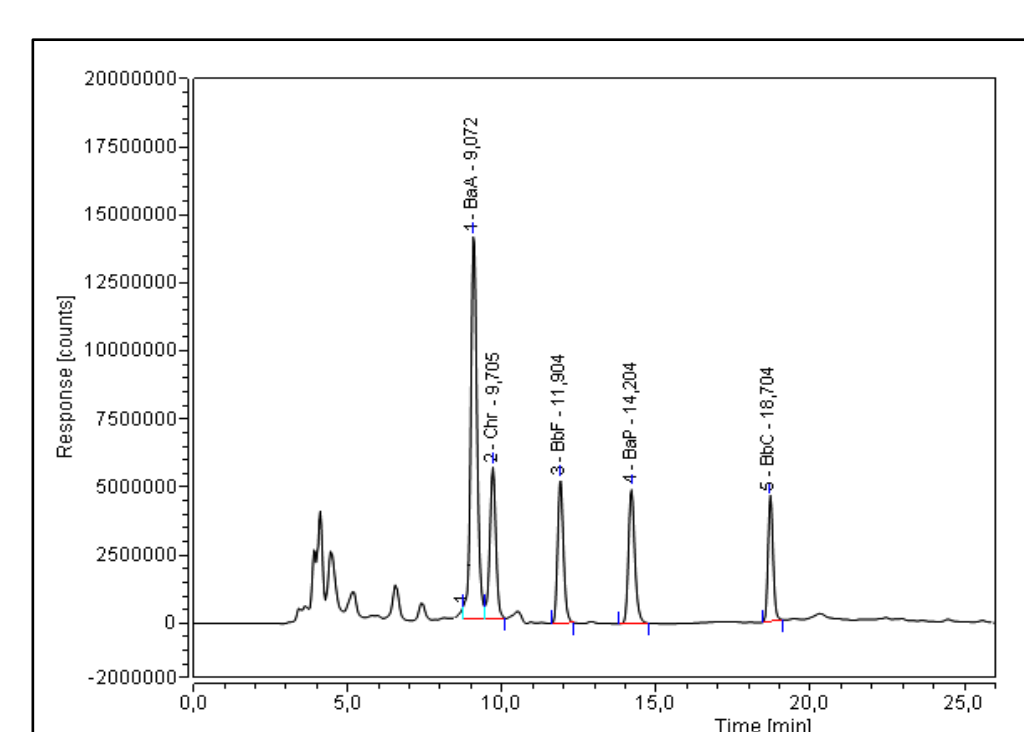
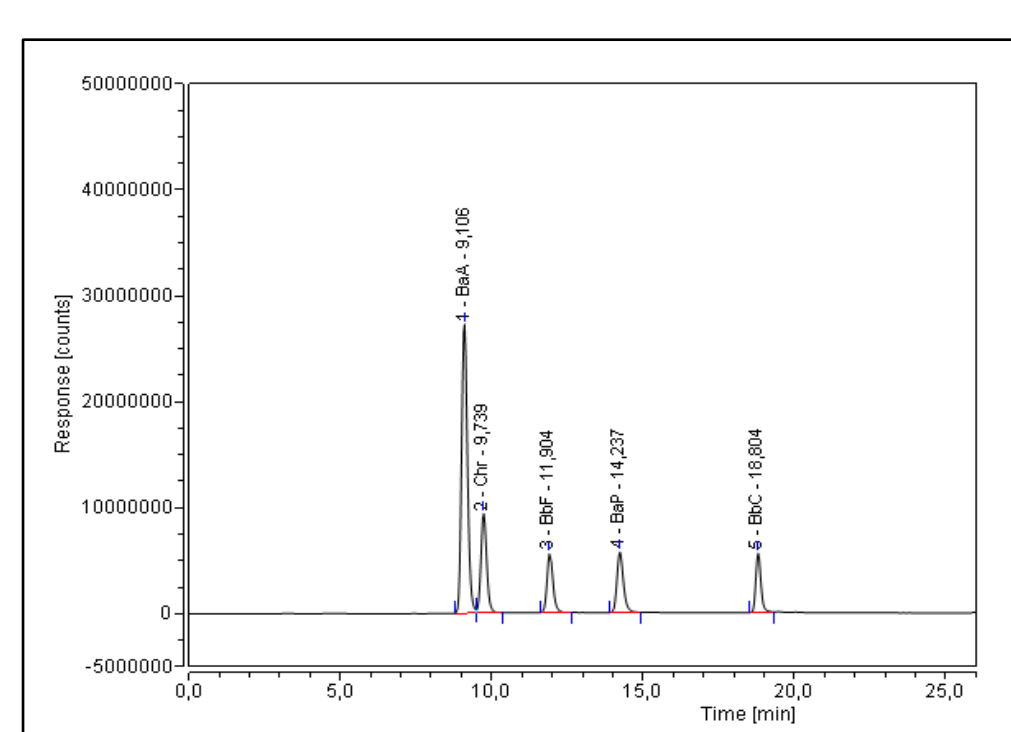
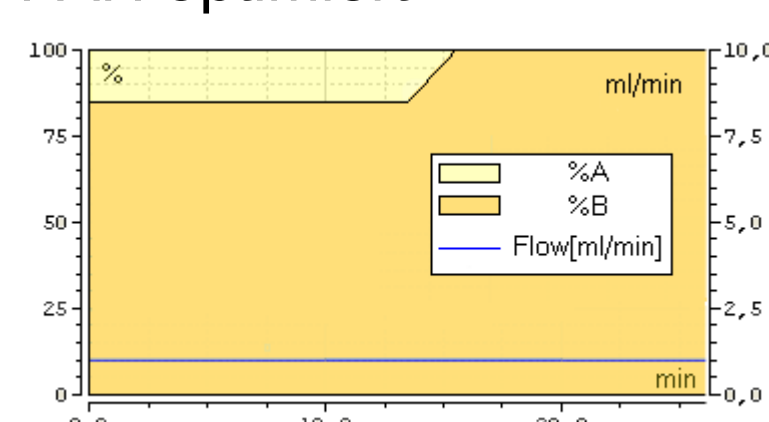


Abbildung 4: Linearitätsprüfung

HPLC

- Säule: Multospher® PAH-III, 250 x 4,6 mm
- Vorsäule: Multospher® PAH-III, 20 x 4 mm
- Säulenofen (Temperaturprogramm):
25°C (t = 0 min); 45°C (t = 4 min)
- Detektion: FLD; die Wellenlängen der Extinktion und der Emission wurden für die jeweiligen PAH optimiert
- Gradientenprogramm:
siehe Abbildung 1
Eluent A: H₂O
Eluent B: Acetonitril (ACN)
- Beispiel-Chromatogramme:
siehe Abbildung 2 & 3



Schlussfolgerung

Im LCI wurde eine Analysenmethode zur schnellen, selektiven Erfassung und Quantifizierung der PAH4 mittels HPLC-FLD entwickelt und erfolgreich validiert. Die Methode genügt den Anforderungen der VO (EU) Nr. 836/2011 über Kriterien für Analysenmethoden zur PAH-Bestimmung [5] und ist somit zur Überprüfung der Einhaltung der ab 01.04.2013 geltenden Grenzwerte der neuen VO (EU) Nr. 835/2011 [2] gut geeignet.

Die entwickelte Methode ist vergleichsweise sparsam. Zur Extraktion und Messung werden nur geringste Lösungsmittelmengen verbraucht bzw. lassen sich nach Analyse durch Rückdestillation regenerieren. Die Methode ist zudem äußerst empfindlich und bietet somit eine gute Alternative zu der häufig verwendeten PAH-Bestimmung per GC-MS.

Literatur

- [1] Europäische Kommission (2006) VO (EG) Nr. 1881/2006 der Kommission vom 19. Dezember 2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln.
- [2] Europäische Kommission (2011) VO (EU) Nr. 835/2011 der Kommission vom 19. August 2011 zur Änderung der VO (EG) Nr. 1881/2006 im Hinblick auf Höchstgehalte an polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen in Lebensmitteln. Brüssel.
- [3] DGF (Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft) (1997) DGF-Einheitsmethode C-III 17a (97) zur Bestimmung von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen in Ölen und Fetten. Deutsche Einheitsmethoden zur Untersuchung von Fetten, Fettprodukten, Tensiden und verwandten Stoffen. Abteilung C. 1. WVG. Stuttgart.
- [4] Kromidas S (2000) Handbuch Validierung in der Analytik. Wiley-VCH. Weinheim:1–40.
- [5] Europäische Kommission (2011) VO (EU) Nr. 836 der Kommission vom 19. August 2011 zur Änderung der VO (EG) NR. 333/2007 zur Festlegung der Probenahmeverfahren und Analysenmethoden für die amtliche Kontrolle des Gehalts an Blei, Cadmium, Quecksilber, anorganischem Zinn, 3-MCPD und Benzo[a]pyren in Lebensmitteln. Brüssel.

