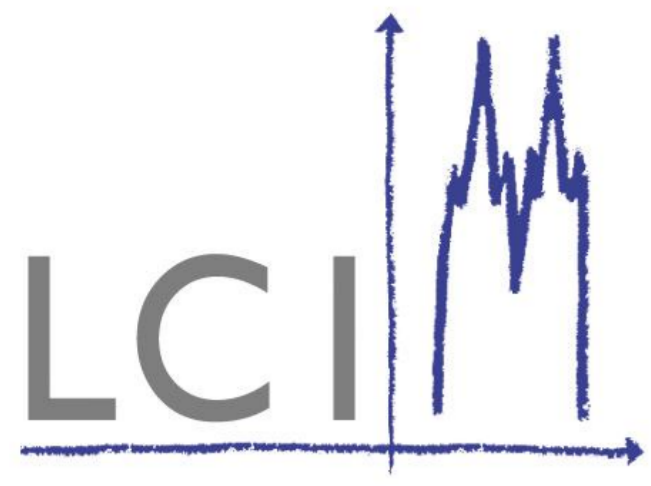


Quantifizierung der Imidazole 4-MEI und THI

IN ZUCKERKULÖR UND ANDEREN LEBENSMITTELN MITTELS SIVA-LC-MS/MS



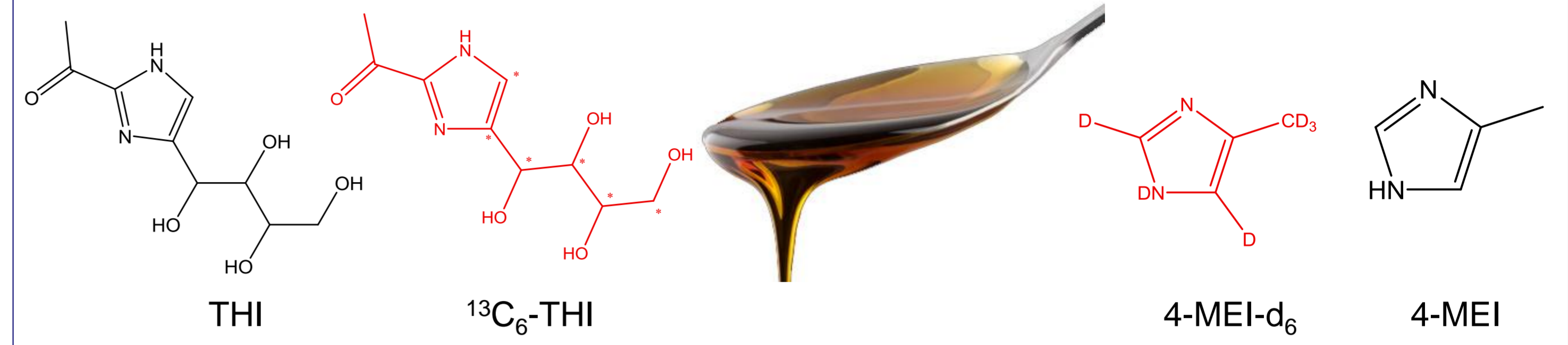
¹Anna Dingel, ¹Stephanie Goetze, ¹Marion Raters, ²Paul Elsinghorst, ¹Reinhard Matissek

¹LCI, Lebensmittelchemisches Institut des Bundesverbandes der Deutschen Süßwarenindustrie, Adamsstraße 52-54, 51063 Köln, www.lci-koeln.de
²ELFI Analytik GbR, Massenhausenerstr. 18a, 85375 Neufahrn, www.elfi-analytik.de

Hintergrund

Im Rahmen der Maillard-Reaktion können aus reduzierenden Zuckern in Anwesenheit von Ammoniumverbindungen u.a. 4-Methylimidazol (4-MEI) und 2-Acetyl-4-(1,2,3,4-tetrahydroxybutyl)imidazol (THI) gebildet werden. Auch bei der Herstellung von Zuckerkulör entstehen die o.g. Imidazole als sog. food born toxicants [1]. Im Februar 2011 wurde 4-MEI von der IARC (International Agency for Research on Cancer) in die Gruppe 2B als „möglicherweise krebserregend für den Menschen“ eingestuft [2], während für THI in mehreren Studien eine immunsuppressive Wirkung beschrieben wurde. Auf europäischer Ebene wurden daher gemäß VO(EU) Nr. 231/2012 (Spezifikationen für Lebensmittelzusatzstoffe) für 4-MEI und THI Höchstwerte in Ammoniak-Zuckerkulör (E 150c) und Ammoniumsulfit-Zuckerkulör (E 150d) festgelegt [3].

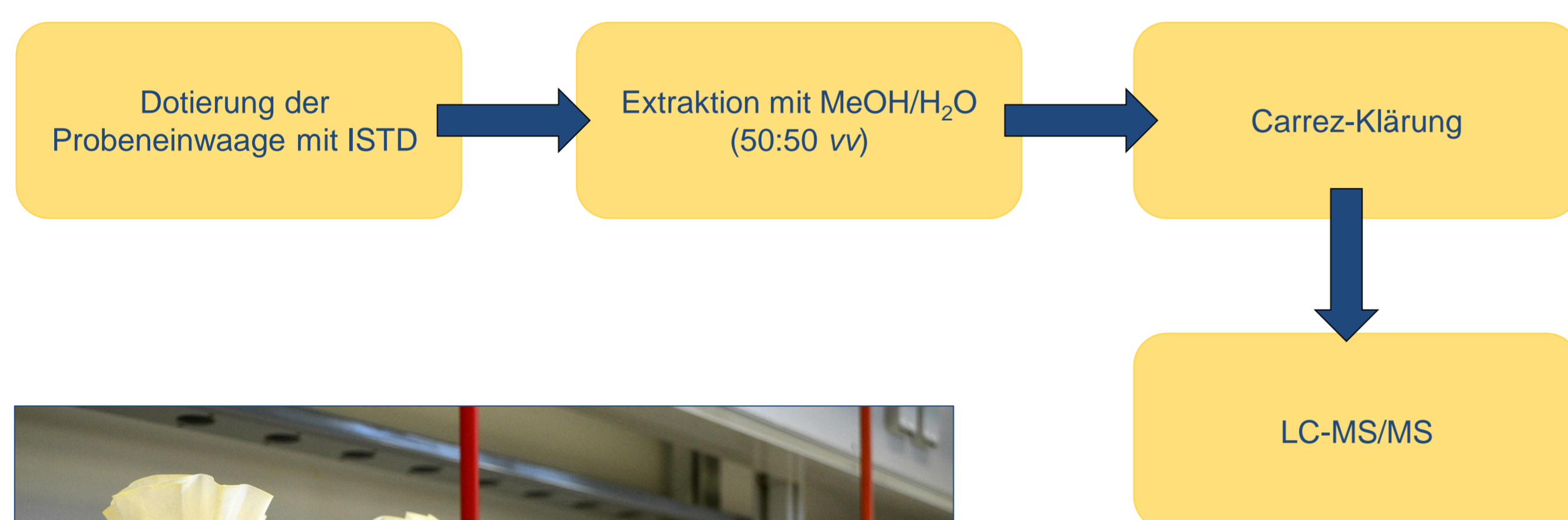
Neben früher beschriebenen Methoden zur Bestimmung von 4-MEI mittels GC-MS nach Derivatisierung [4] und HPLC-UV-Methoden zur Quantifizierung von THI [5] werden aktuell Multimethoden mittels LC-MS/MS zur Simultananalytik von 4-MEI und THI angewendet [6]. Bisher ist als stabilisotopenmarkierte Standardsubstanz für die LC-MS/MS Analytik nur markiertes 4-MEI, z.B. als 4-MEI-d₆ kommerziell erhältlich.



Innovation

Im LCI wurde eine Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA) basierend auf einer LC-MS/MS-Methode zur Quantifizierung von 4-MEI und THI in Zuckerkulör entwickelt. Hierbei findet neben 4-MEI-d₆ erstmals auch ¹³C₆-THI [7] als interner Standard Anwendung.

Schnelle Probenvorbereitung



Validierung

Die hier vorgestellte Methode wurde in Anlehnung an die Vorgaben von Kromidas [8] validiert. Hierzu wurde ein Karamellsirup mit 4-MEI und THI dotiert, entsprechend der in dieser Arbeit entwickelten Methode aufgearbeitet und vermessen. Eine Auswahl der Validierungsdaten (Linearität, Wiederfindung, relative Standardabweichung der Wiederholbarkeit (RSD_r) und der Vergleichbarkeit (RSD_R) sowie Nachweis- und Bestimmungsgrenze (LOD bzw. LOQ)) sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2: Ergebnisse der Methodvalidierung

	THI	4-MEI
Linearität [mg/kg]	0,23-50,00	0,12-500,00
Wiederfindung [%]	101-105	100-106
RSD _r [%]	10,6	2,7
RSD _R [%]	9,1	11,0
Nachweisgrenze (LOD) [mg/kg]	0,08	0,04
Bestimmungsgrenze (LOQ) [mg/kg]	0,23	0,12

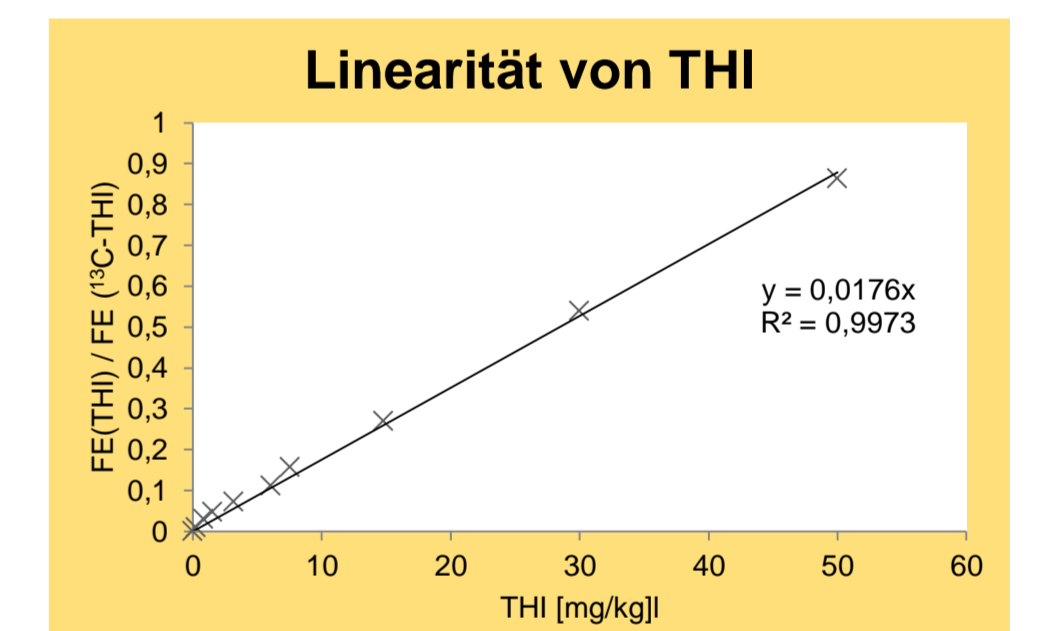


Abbildung 3: Linearitätsprüfung von THI

Die beschriebene Methode zeigt sich für beide der hier betrachteten Analyten 4-MEI und THI in einem weiten Messbereich als linear, verfügt über eine gute Reproduzierbarkeit und ist äußerst sensitiv (LOD = 0,04 und 0,08 mg/kg). Auf Grund des neu in die Analytik integrierten ¹³C₆-THI kann eine mehr als zufriedenstellende Wiederfindung (101-105%) für THI erreicht werden. Die Linearitätsprüfung am Beispiel von THI ist in Abbildung 3 dargestellt.

LC-MS/MS

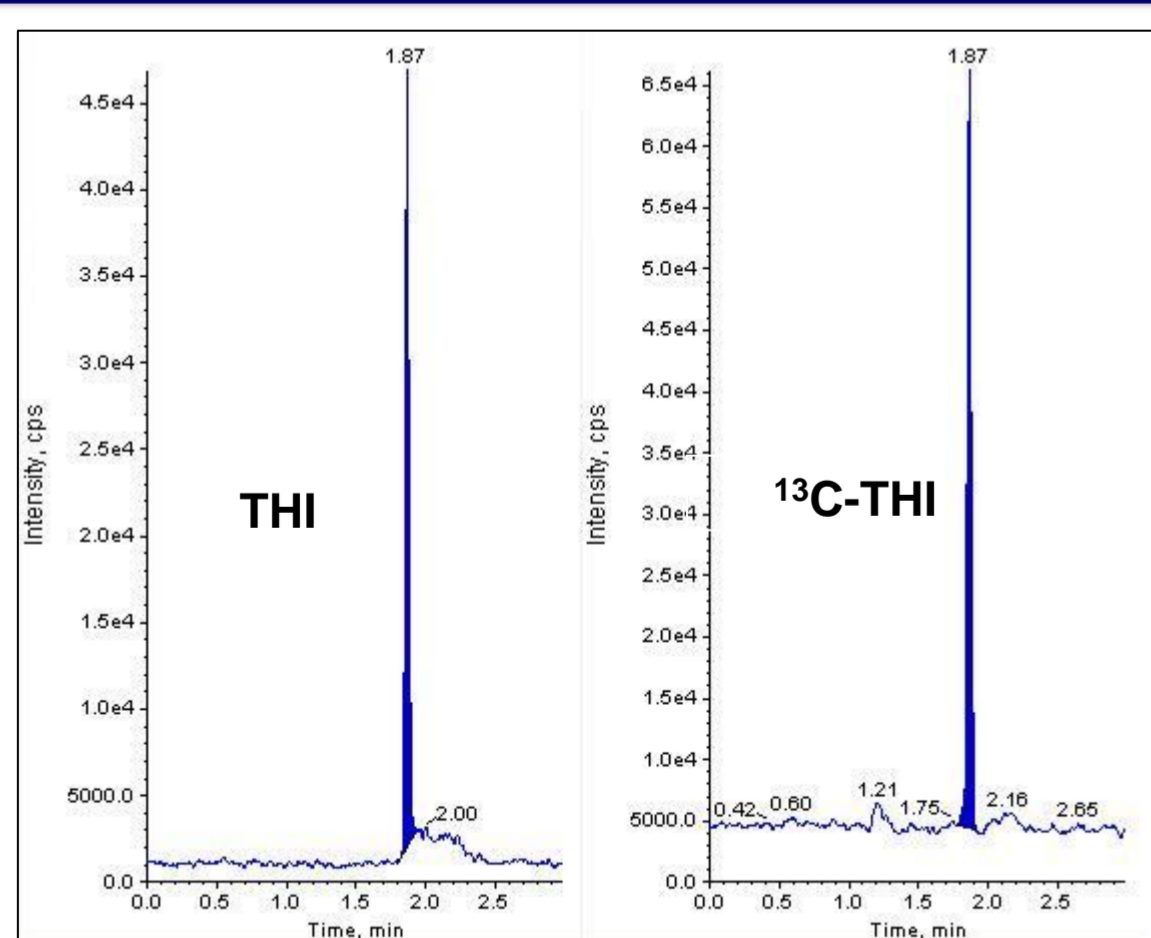


Abbildung 1: Chromatogramme einer Externen Standardlösung von THI und ¹³C₆-THI (je 9 ng/mL)

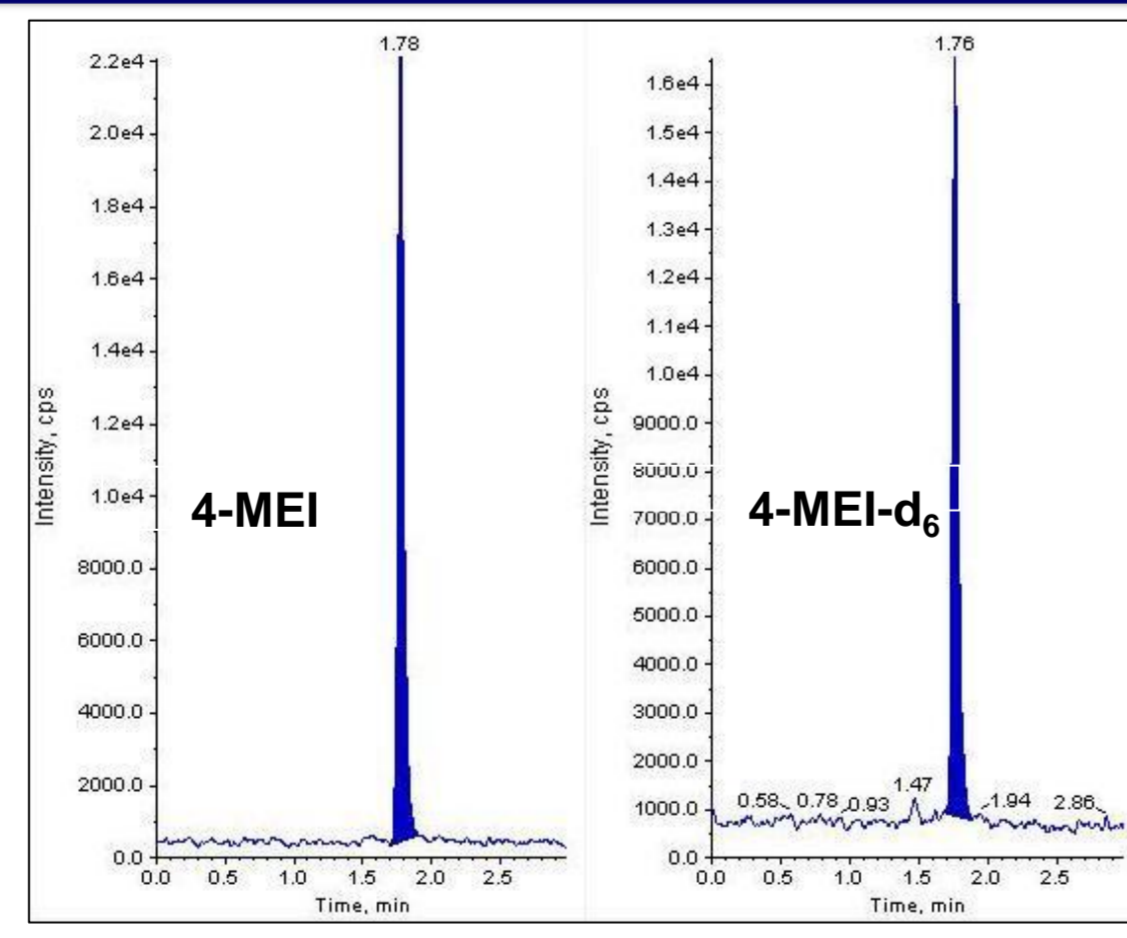


Abbildung 2: Chromatogramme einer Externen Standardlösung von 4-MEI und 4-MEI-d₆ (je 4,5 ng/mL)

Tabelle 1: LC-MS/MS Parameter

LC-Eksigent ekspert micro LC 200		Triple Quad 4500 von AB SCIEX				
Säule	Develosil RP Aqueous C30, 3 µm von Phenomenex (100 x 1 mm)	Scan Mode	MRM			
Mobile Phase		Scanzeit	3 Minuten			
• Eluent A	Ameisensäure (0,1%)	Detektion	ESI+			
• Eluent B	MeOH/NH ₃ (0,05%) (10/90; v/v)		MRM (4-MEI)	MRM (4-MEI-d ₆)	MRM (THI)	MRM (¹³ C ₆ -THI)
Injektionsvolumen	5 µL		83→56	88→61	231→153	237→159
Fluss	30 µl/min		83→42	88→47	231→195	237→201
Temperatur	20°C	Temperatur	450°C			

Fazit und Ausblick

Im LCI wurde eine schnelle und selektive Methode zur quantitativen Bestimmung der Imidazole THI und 4-MEI mittels SIVA-LC-MS/MS in Zuckerkulör entwickelt und erfolgreich validiert. In der hier vorgestellten Methode findet zum ersten Mal der Interne Standard ¹³C₆-THI zur Quantifizierung von THI Anwendung. Durch den Einsatz der Stabilisotopenmarkierten Standards kann eine valide Probenvorbereitung gewährleistet werden. Die entwickelte Methode ist durch die verwendete Mikro-HPLC zudem sehr Ressourcenschonend was den Chemikalien- und Materialverbrauch betrifft und ermöglicht eine sehr schnelle Chromatographie.

Durch die universelle Probenvorbereitung ist eine Adaptierung an andere Lebensmittelmatrices einfach möglich. Dies ist im LCI derzeit in der Etablierungsphase.

Literatur

- [1] B. Klejdus, J. Moravcová, L. Lojková, J. Vacek, V. Kubáň, J. Sep. Sci. 2006, 29,378.
 [2] International Agency for Research on Cancer IARC 2012 <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol101/index.php> (09.01.2013). [3] Amtsblatt der Europäischen Union 2012 Verordnung (EU)Nr. 231/2012. [4] S. Casal, J.O. Fernandes, M.B.P.P. Oliveira, M.A. Ferreira J. Chromatogr. A. 2002, 976,285. [5] X.D. Ding, D.J. Magiera, J.R. Mazzeo, K. Edmar, I.S. Krull, J. Agric. Food. Chem. 1991, 39,1954. [6] C. Schlee, M. Markova, J. Schrank, F. Laplagne, R. Schneider, D.W. Lachenmeier, J. Chromatogr. B. 2013, 927: 223-226 [7] P.W. Elsinghorst, M. Raters, A. Dingel, J. Fischer, R. Matissek, J. Agric. Food Chem. 2013, 61: 7494-7499 [8] S. Kromidas (2000) Handbuch Validierung in der Analytik. Wiley-VCH. Weinheim: 1-40.