

PAK-Bestimmung in Lebensmitteln mit der CHRONECT Workstation PAK



Applikationsnote 1802

PAK-Bestimmung in Lebensmitteln

Applikationsnote 1802

Einführung

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) stellen eine Substanzgruppe dar, aus der zahlreiche Vertreter als potentiell krebserregend angesehen werden [1]. Aus diesem Grund sind die Kontrolle und Regelung dieser Substanzen von besonderer Wichtigkeit. Die Europäische Union (EU) hat strenge Grenzwerte für die wichtigsten Vertreter dieser Analytklasse erlassen, die es strikt einzuhalten gilt. Die Liste dieser sog. prioritären EU PAK umfasst 15 Substanzen, die üblicherweise noch um eine 16. Substanz erweitert wird, die ebenfalls im Verdacht steht, krebserregend zu sein (sog. 15+1 EU PAK) [2]. Von diesen 16 Substanzen wiederum sind vier mit Grenzwerten versehen. Je nach Lebensmittel und Konsumentengruppe bewegen sich diese Werte zwischen $< 1 \mu\text{g}/\text{kg}$ und $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ [3, 4].

PAK gelangen typischerweise durch Verarbeitungsprozesse ins Lebensmittel. Beim Braten, Frittieren, Räuchern oder Rösten können PAK durch unvollständige Verbrennung oder Pyrolyse gebildet und nachfolgend im Lebensmittel detektiert werden. Aber auch Dieselabgase oder Umweltquellen können für die Kontamination einzelner Produkte verantwortlich gemacht werden.

Methodik und Geräteaufbau

Während die Bestimmung von PAK in vielen Lebensmitteln unproblematisch ist, kann sie in einigen Produkten überaus schwierig sein. Besonders die Existenz PAK-ähnlicher biogener Substanzen oder großer Mengen an Emulgatoren können die Analytik erschweren.

Die PAK-Detektion erfolgt generell mit Hilfe chromatographischer Trenntechniken auf Basis der Flüssigkeits-(HPLC) oder Gaschromatographie (GC). Die Kopplung der GC mit massenspektrometrischer Detektion (GC-MS) ist jedoch als Methode der Wahl anzusehen. Besonderes Augenmerk ist dabei auf die Probenvorbereitung zu richten. Aufgrund der notwendigen Empfindlichkeit muss mit einer hohen Lebensmitteleinwaage gearbeitet werden, aus welcher die PAK extrahiert werden müssen. Hierbei ist allerdings darauf zu achten, neben den PAK nicht weitere Substanzen zu extrahieren, die die Analytik verfälschen oder im schlimmsten Fall die teuren Analysengeräte beschädigen können.

Die CHRONECT Workstation PAK basiert auf der imPAHct-Methode (innovative multidimensional PAH cleanup technology), welche eine schnelle manuelle Probenextraktion mit einer mehrdimensionalen chromatographischen Aufreinigungstechnik kombiniert, die vollautomatisch erfolgt [5]. Der erhaltene Extrakt wird daraufhin online mittels GC-MS(/MS) analysiert, wodurch das finale Probenergebnis nach Einstellen der Probe ins System nach 45 min zur Verfügung steht.

Die Workstation baut auf der seit Jahren bewährten LC-GC-Technologie von Axel Semrau auf. Der LC-Teil dient hier der Probenvorbereitung. Die nachgeschaltete Überführung des Probenextraktes in die GC-Dimension geschieht mittels eines sogenannten Large-Volume-On-Column-Transfers. Hierzu wird das CHRONECT LC-GC-Interface genutzt.

Die eigentliche Probenaufreinigung geschieht in einem zweistufigen LC-Prozess. Nach Injektion der Probe durch den xyz-Roboter, wird die Probe von allen Substanzen befreit, die polarer als PAK sind. Dazu wird eine unbelegte Kieselsäule im Normalphasen-HPLC-Modus eingesetzt.

Die aufgereinigte PAK-Fraktion enthält jedoch noch zahlreiche interferierende Substanzen, die mittels einer zweiten LC-Dimension abgetrennt werden müssen. Dazu wird eine sogenannte π -Donor-Akzeptor-Chromatographie eingesetzt, die selektiv π -elektronenreiche Substanzen anreichern kann. Der so erhaltene PAK-reiche Probenextrakt wird dann, wie zuvor beschrieben, in den Gaschromatographen überführt und mittels klassischer GC-MS(/MS)-Analytik aufgetrennt, detektiert und quantifiziert. Für den HPLC-Teil des Systems wurden bereits erfolgreich klassische Baugruppen der Firmen Agilent, Knauer und Shimadzu verwendet. Ebenso ist die Verwendung üblicher GC-MS-Systeme, wie von Bruker o.a., möglich. Kernstück zur Steuerung und Zusammenführung der einzelnen Module stellt die Steuerungssoftware CHRONOS dar. In Kombination mit dem LC-GC-Interface koordiniert CHRONOS alle Subsysteme, damit sie zur richtigen Zeit die richtige Aktion ausführen, und dies unabhängig vom Datensystem der einzelnen Gerätehersteller.

PAK-Bestimmung in Lebensmitteln

Applikationsnote 1802

Systemkomponenten:

- CHRONECT LC-GC Interface
- CHRONECT Robotic Autosampler mit 85 cm-Achse
- Software CHRONOS
- CHRONECT LC-GC-Interface
- Agilent 1260 Infinity II HPLC (Pumpe und VWD)
- Bruker EVOQ GC-TQ oder Agilent MSD 5977B
- Alternativ kann ein System aus Komponenten des Herstellers Shimadzu aufgebaut werden (LC-40 und GCMS-QP2020 NX)

Probenvorbereitung

Alle Proben müssen vor der eigentlichen Messung aufbereitet werden. Je nach Probenmatrix ist dies einfacher oder komplexer gestaltet.

Manuelle Vorarbeiten an der Probe können durch Anwendung der imPAHct-Methode auf ein Minimum reduziert werden. Abbildung 1 zeigt den Ablauf der Probenvorbereitung in Abhängigkeit der Lebensmittelgruppe. Speiseöle können meist nach Verdünnen direkt eingespritzt werden, während andere Lebensmittel in 10-15 min vorbereitet sind.

Ergebnisse

Zur Etablierung einer zweistufigen LC-Probenaufräumung war die Entwicklung einer speziellen Ventilschaltung von Nöten. Abbildung 2 zeigt exemplarisch das Resultat. Mit nur vier HPLC-Ventilen können alle nötigen Schaltungen vorgenommen werden. Tabelle 1 fasst alle relevanten Aktionen zusammen.

Zur Demonstration der Leistungsfähigkeit des Systems wurde eine Kalibriergerade für Benzo[a]pyren im Bereich zwischen 0,04 – 4 µg/kg angelegt (s. Abb. 3). Weiterhin wurde eine zuvor mit Aktivkohle behandelte Kakaobutter mit 0,05 µg/kg PAK dotiert. Alle 16 PAK konnten eindeutig mit einer Wiederfindung von über 85 % detektiert werden. Somit sind alle wichtigen Vorgaben der EU-Richtlinie 836/2011 erfüllt [4].

Abbildung 4 zeigt einen Ausschnitt des extrahierten Ionenchromatogramms besagter Kakaobutter. Auch anspruchsvollere Lebensmittel wie Gewürze können mit der beschriebenen Methode analysiert werden. Es wurde zum Test Pfeffer sowie Amaranthöl aufgearbeitet und vermessen. Während Pfeffer reich an ätherischen Ölen ist, weist Amaranthöl etwa 10 % an olefinischen Kohlenwasserstoffen auf, die bekannt dafür sind, mit PAK chromatographisch zu interferieren.

Abbildung 5 zeigt für beide Proben Chromatogrammausschnitte, in welchen üblicherweise mit Matrixstörungen zu rechnen ist. Jedoch kann hier eindeutig belegt werden, dass nur noch die gewünschten Analyten sichtbar sind.

PAK-Bestimmung in Lebensmitteln
 Applikationsnote 1802

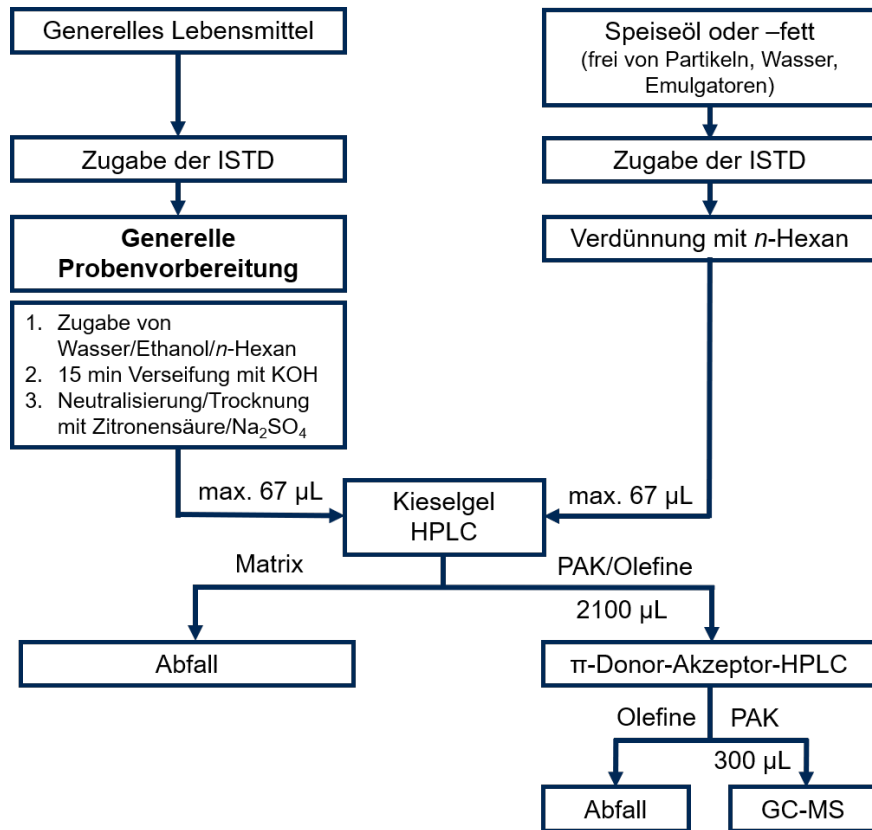


Abbildung 1: Ablaufschema der manuellen Probenvorbereitung [5].

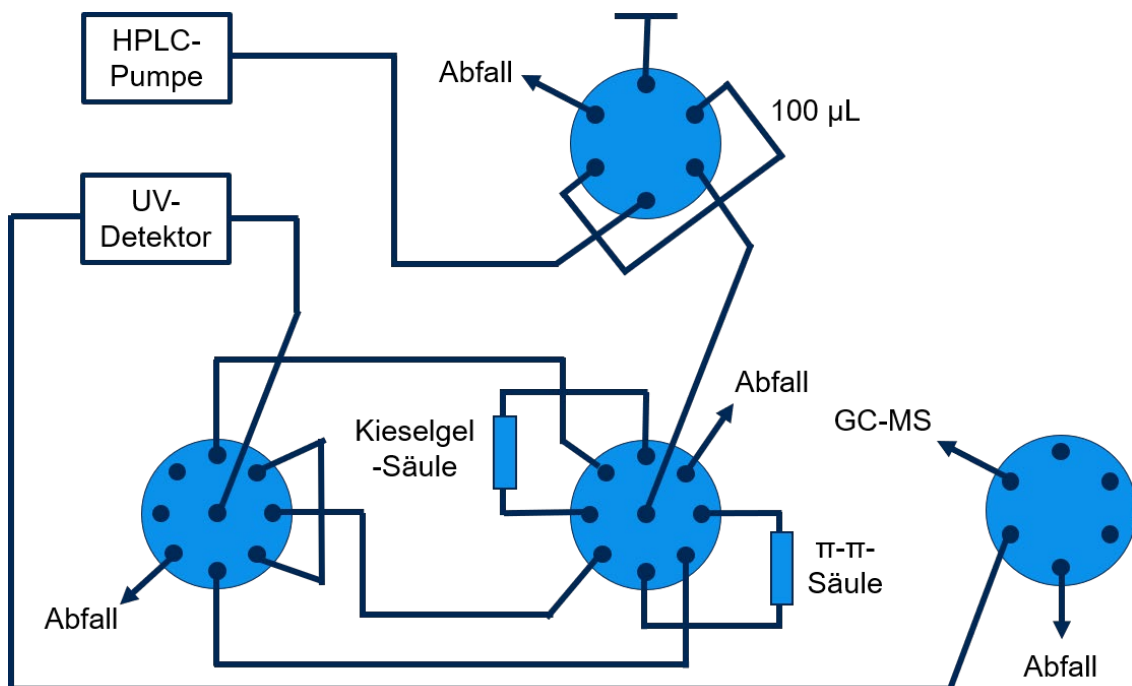


Abbildung 2: HPLC-Ventilschaltung [5].

PAK-Bestimmung in Lebensmitteln Applikationsnote 1802

Tabelle 1: Schaltungsvorgänge während einer PAK-Analyse [5].

Zeit [min]	Aktion
0.00	Injektion auf die Kieselgelsäule
0.00 – 2.00	Abtrennung der PAK & Olefine von restlicher Matrix
2.00 – 5.00	Transfer der PAK-haltigen Fraktion von der Kieselgel- auf die π - π -Säule
5.00 – 10.00	Abtrennung der PAK von den Olefinen
ab 10.00	Start des Backflushes der π - π -Säule
13.10 – 14.10	Elution der PAK-Fraktion von der π - π -Säule ins GC-MS
bis 20.00	Backflush der π - π -Säule zur Matrixentfernung
20.00 – 29.00	Backflush der Kieselgelsäule zur Matrixentfernung
29.00 – 34.00	Re-äquilibrierung der Kieselgelsäule in Vorwärtsrichtung
34.00 – 40.00	Re-äquilibrierung der π - π -Säule in Vorwärtsrichtung

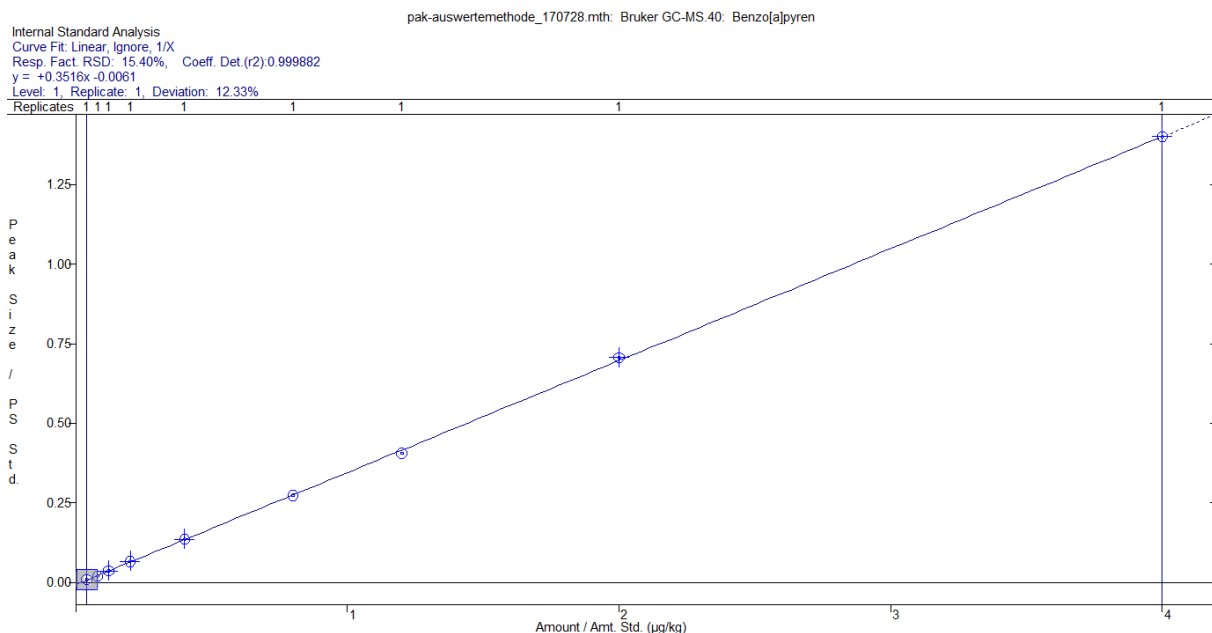


Abbildung 3: Kalibriergerade für Benzo[a]pyren im Konzentrationsbereich 0,04 – 4 µg/kg.

PAK-Bestimmung in Lebensmitteln Applikationsnote 1802

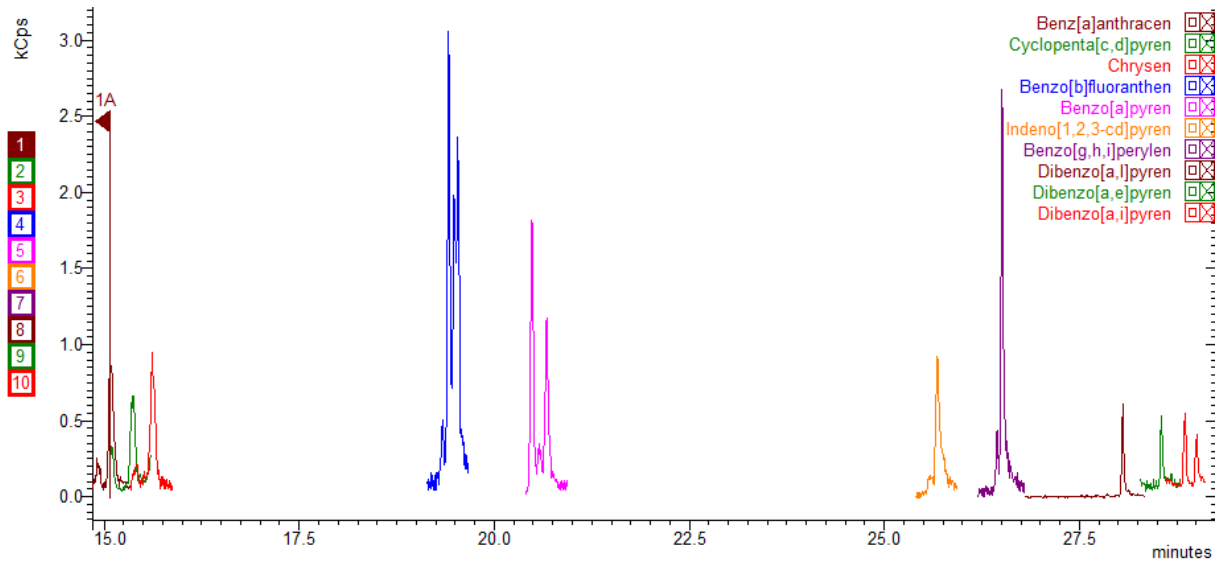


Abbildung 4: Extrahiertes MS-Ionenchromatogramm einer auf 0,05 µg/kg dotierten Kakaobutter. Alle dotierten PAK sind frei von Interferenzen und eindeutig identifizierbar.

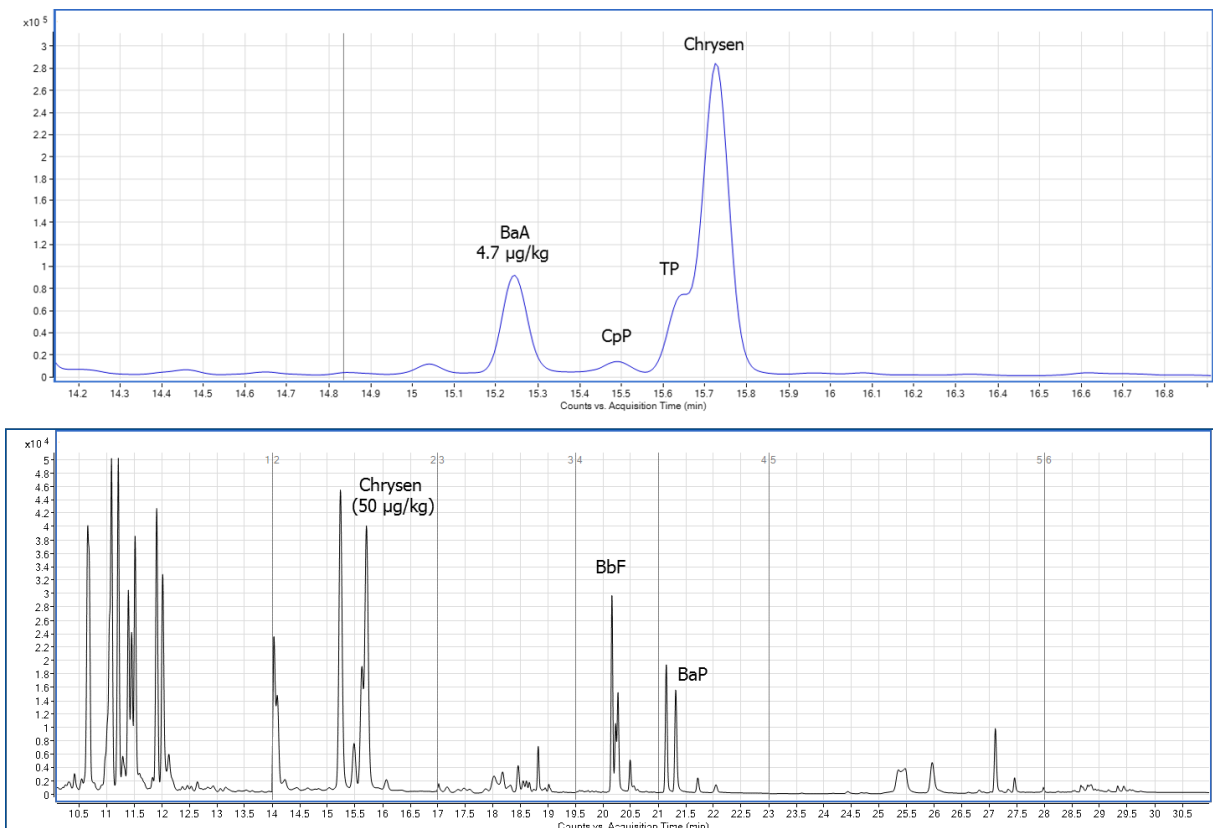


Abbildung 5: MS-Chromatogrammausschnitt einer Pfeffer- (oben) und Amaranthölprobe (unten). Besonders im Bereich von Benz[a]anthracen (BaA), Cyclopenta[c,d]pyren (CpP), Triphenylen (TP), Chrysen sowie Benzo[b]fluoranthren (BbF) und Benzo[a]pyren (BaP) kann es zu starken Matrixinterferenzen kommen.

PAK-Bestimmung in Lebensmitteln Applikationsnote 1802

Zusammenfassung

Die CHRONECT Workstation PAK ist in der Lage, die strengen Grenzwerte der PAK-Analytik für die 16 regulierten EU PAK kontrollieren zu können. Je nach GC-MS-Detektionssystem sind Nachweisgrenzen haltbar, die um den Faktor 100 niedriger liegen als die europäischen Grenzwerte für PAK in Säuglingsnahrung (1,0 µg/kg) [3]. Ermöglicht wird dies durch imPAHct, einer schnellen manuellen Extraktion gepaart mit einer effizienten mehrdimensionalen chromatographischen Probenaufreinigung.

Literatur

- [1] Scientific Committee on Food, Opinion of the Scientific Committee on Food on the Risks to Human Health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food. 4 December 2002. European Commission (EC), Brussels, 2002.
- [2] European Food Safety Authority (EFSA). EFSA J. 2008, 724, 1–114.
- [3] The European Commission. Off. J. Eur. Unions 2011, 215, 4–8.
- [4] The European Commission. Off. J. Eur. Unions 2011, 215, 9–16.
- [5] Nestola, M.; Friedrich, R.; Bluhme, P.; Schmidt, T. C. *Anal. Chem.* 2015, 87(12), 6195–6203.

imPAHct und die CHRONECT
Workstation PAK ist eine Ent-
wicklung von Axel Semrau.

Technische Änderungen vorbehalten

Axel Semrau GmbH & Co. KG
Stefansbecke 42
45549 Sprockhövel
Tel.: 02339 / 12090
Fax: 02339 / 6030
www.axelsemrau.de
info@axelsemrau.de