

Automatisierte Methode zur Bestimmung von Sudan-Farbstoffen in Lebensmitteln

Silke Ubben - Gilson International, Limburg-Offheim

subben@gilson.com · www.gilson.com

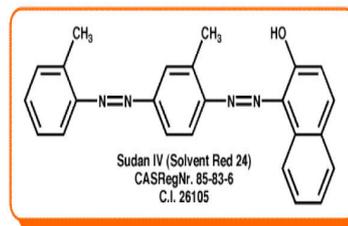
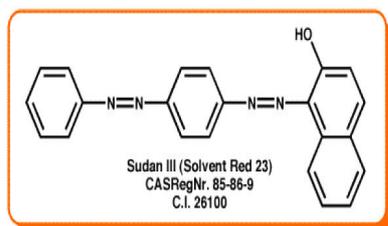
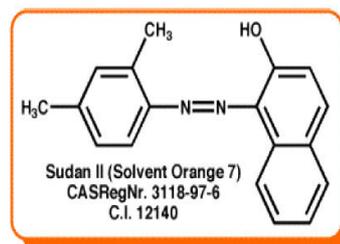
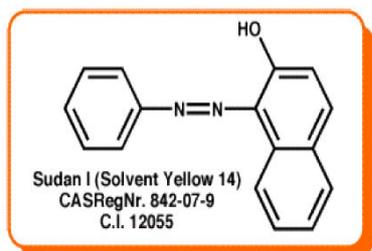
Einleitung

Die „International Agency for Research on Cancer“ (IARC) stuft Sudan-Farbstoffe als krebserregende Stoffe der Kategorie 3 ein. Diese sind laut FDA und der EU verbotene Lebensmittelzusatzstoffe. Die Europäische Kommission verlangt einen entsprechenden dokumentarischen Nachweis, der die Abwesenheit von Sudan Farbstoffen bestätigt.

Seit 2003 schreibt die EU stichprobenartige Tests, sowie die Untersuchung von verdächtigen verfälschten Lebensmitteln vor. Produkte, bei denen Sudanfarbstoffe nachgewiesen wurden, müssen als Sonderabfall entsorgt werden. Das im Folgenden präsentierte System bietet einen komplett automatisierten Ansatz zur Extraktion von Sudanfarbstoffen aus Lebensmittel-Produkten. Die Probe wird in Lösung gebracht, filtriert und anschließend wird eine Festphasenextraktion vor der HPLC Analyse durchgeführt. Die von der EU vorgegebene Nachweisgrenze von 0,5 - 1 mg/kg wird mit dieser Methode erreicht, dies ganz ohne manuelle Eingriffe oder menschlichen Kontakt. Die erhaltenen Daten belegen die Effektivität dieses Verfahren im Vergleich zu bereits bestehenden Methoden.

Hintergrundinformationen zu Sudanrot

Sudanrot sind Farbstoffe, die zum Einfärben von z. B. Wachsen, Lösemitteln, Öl, Schuhen und Bodenreinigern eingesetzt werden. Vereinzelt werden sie auch in Chili-Pulver, das aus Indien importiert wurde, gefunden. Dieses Pulver wird in Gewürzen, Chutney sowie in diversen Saucen verwendet. Sudanfarbstoffe sind in Europa, USA, und Japan verboten, weil es sich um Azo-Farbstoffe handelt, die beim Verzehr in karzinogene Amine umgewandelt werden können.



Probenvorbereitung

- 4 g Chili-Pulver werden mit 20 ml Aceton in einem Orbitalshaker intensiv geschüttelt (600 RPM)
- Die Chililösung wird über ein 0,45 µm Teflon-Filter filtriert
- 1 ml der Chililösung wird mit 5 ml wässriger NaOH-Lösung (pH11) verdünnt
- Die verdünnte Chililösung wird mit einem 100 ppb Standard von Sudan I, II, III, IV aufgestockt
- Anschließend werden die Chililösungen über Spritzenfilter filtriert
- Das Filtrat wird mittels automatisierter SPE auf dem 215 SPE aufgereinigt
- Die Eluate werden zur Trockene eingeeengt und dann in 200 µl ACN/H₂O gelöst

Festphasenextraktionsmethode

- 215 SPE automatisches 4 Kanal Probenvorbereitungssystem
- Oasis MCX 3 ml Kartuschen mit 60 mg
- Säulenmaterial
- Konditionierung: 2 ml Ethylacetat
- 2 ml Methanol
- 1 ml NaOH 0,1 molar
- 2 ml H₂O

Beladen der Kartusche: 5 ml Probe in 2 Schritten mit jeweils 2,5 ml

Waschen: 2 ml MeOH:H₂O (70:30)

1 ml NaOH 1,0 molar

2 ml MeOH

1 ml Ethylacetat

Elution: 2 ml einer Mischung von Ethylacetat, MeOH und Ameisensäure (89:9:2)

Das Eluat wird zur Trockene eingedampft und dann in 200 µl ACN:H₂O (90:10) gelöst

215 SPE: automatisiertes Festphasen-Extraktions-System

Das 215 SPE System arbeitet mit positivem Druck, um die Flüssigkeiten durch die Kartuschen zu pressen und kann mit 1, 3 und 96 Extraktionsplatten arbeiten.

HPLC Methode

- Solvent A: Wasser, 0,1 % TFA
- Solvent B: ACN, 0,1 % TFA
- Flow: 1,5 mls/min
- Gradient conditions: 75 % (B)
- 0 - 1 min
- 75 - 95 % (B) 1 - 10 min
- 95 % (B) 10 - 12 min
- 95 - 75 % (B) 12 - 12.5 min

- 75 % (B) 12,5 - 13,5 min
- Injektionsvolumen: 25 µl, Säule:
- Thermo BetaBasic C-18, 4,6 x 150
- mm, 3 µm
- UV/VIS Detektor 504 nm, Empfindlichkeit 0,1 AUFS

Wiederfindung

Wiederfindung (n = 10, 7 - 11 µg)

- Sudan I 95 % (4 % RSD)
- Sudan II 85 % (2 % RSD)
- Sudan III 93 % (3 % RSD)
- Sudan IV 75 % (3 % RSD)

Die untere Nachweisgrenze der Detektion ohne LC/MS liegt im Bereich von 0,1 – 0,5 ppm

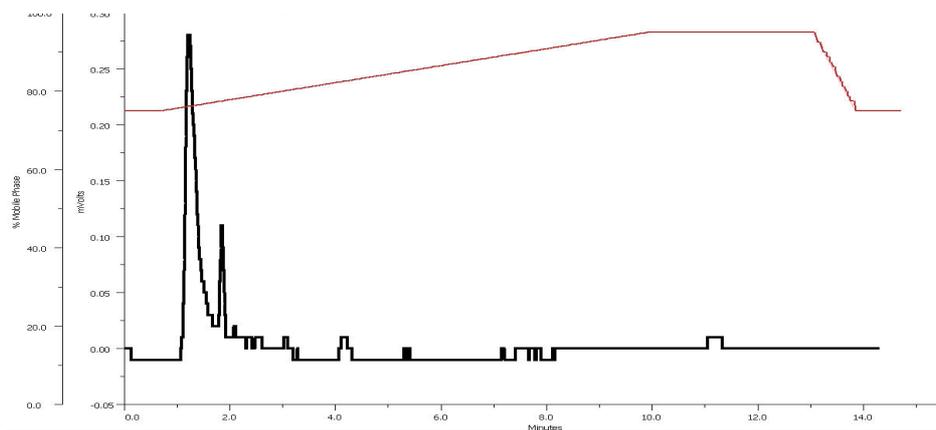


Abb. 1: McCormick´s Chili-Pulver: Die Chromatogramme dreier Sorten (Chili-Pulver, Hot Mexican und Chipotle) zeigen keine Detektion von Sudan 1 oder dessen Analogen

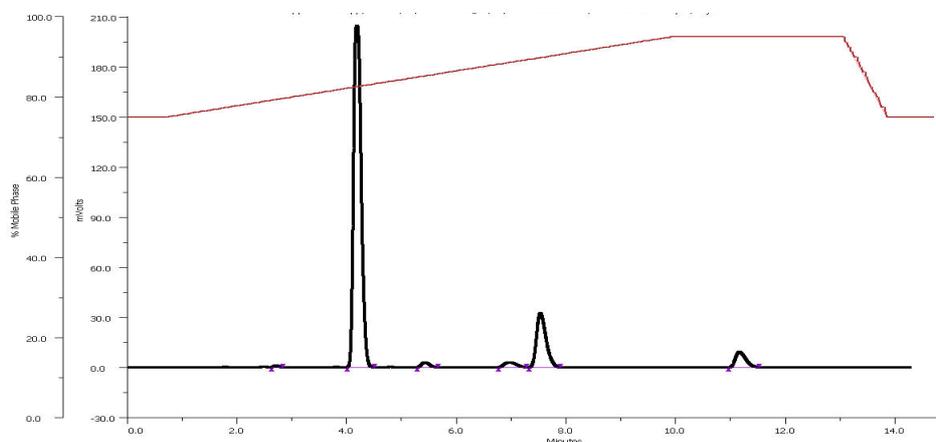


Abb. 2: Chromatogramm eines mit Sudan I, II, III, IV angereicherten Chili-Pulvers, 7-11 µg

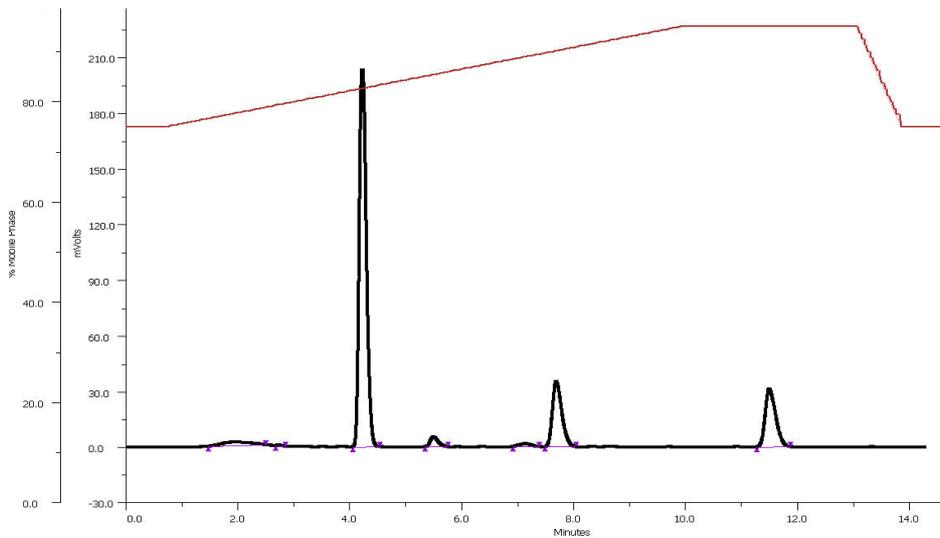


Abb. 3: Chromatogramm einer Mischung von Sudan I und dessen Analogen gelöst in Aceton/NaOH ohne Chili-Pulver

Schlussfolgerung

Es wurde eine vielseitig einsetzbare Methode zum Nachweis von Sudan I, Sudan II, Sudan III und Sudan IV in Lebensmitteln entwickelt, dies innerhalb nur eines Chromatogramms.

Eine chromatographische Analysezeit von 10 Minuten und eine Gesamtzeit für die SPE von weniger als 5 Minuten pro Probe wurde erreicht, so dass der Probendurchsatz erhöht werden konnte.

Die Ausbeute und die Nachweisgrenze (LOD) haben bestätigt, dass LC/MS nicht benötigt wird, um Lebensmittel auf Sudan I und dessen Analoge zu testen.

Wir können auch weiterhin unser heimisches Chili-Pulver benutzen, weil keine Spuren von Sudan I oder deren Analogen im gelagerten Chili-Pulver nachgewiesen werden konnten.

Autoren:

Ph.D. Joan M Stevens
 Mike Halvorson, Ph.D
 Greg Robinson
 Gilson, Inc