

Bestimmung von Fettsäureestern von 3-MCPD und Glycidol.

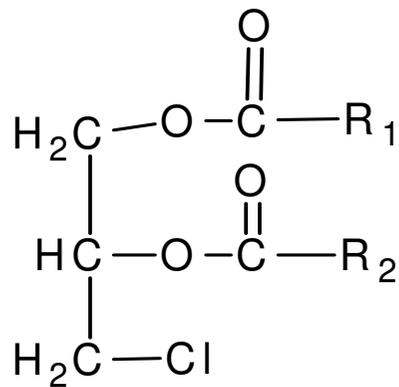
Überblick über die verschiedenen Methoden

Dr. Rüdiger Weisshaar

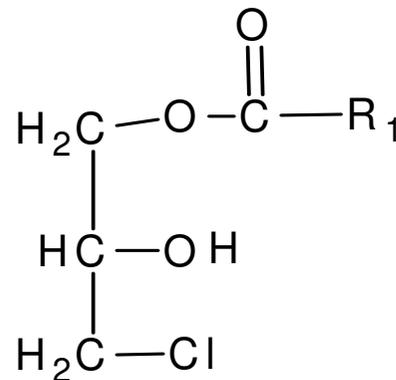


3-MCPD-Fettsäureester

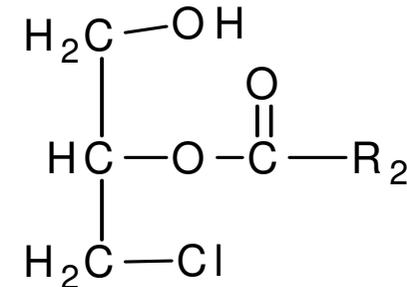
3-MCPD-Ester sind eine komplexe Mischung aus den zwei verschiedenen 3-MCPD-Monoestern und 3-MCPD-1,2-Diestern, mit jeweils unterschiedlicher Fettsäureverteilung.



1,2-Diester



1-Monoester

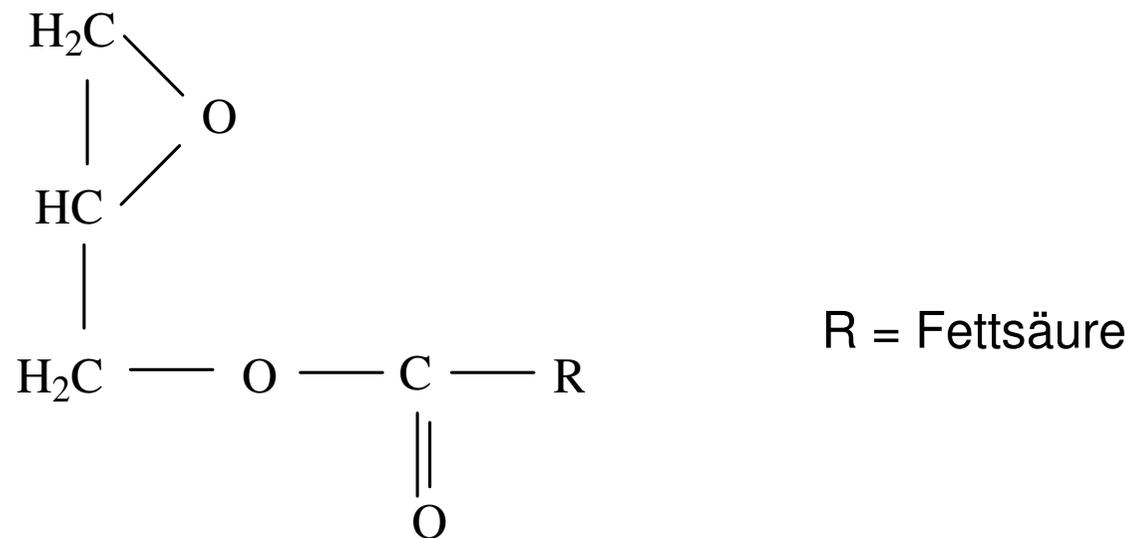


2-Monoester

Bei n (5) unterschiedlichen Fettsäuren gibt es $n(n + 2)$ (35) verschiedene verschiedene 3-MCPD-Ester, die bestimmt werden müssen!

Glycidylester

Fettsäureester des Glycidol = Glycidylester: nur Monoester möglich.



Bei n unterschiedlichen Fettsäuren gibt es n verschiedene Verbindungen, die bestimmt werden müssen!

Bestimmung von 3-MCPD-Estern



3-MCPD-Fettsäureester können prinzipiell auf 2 Arten bestimmt werden:

- 1.) **Direkte Bestimmung** der intakten Fettsäureester

- 2.) **Indirekte Bestimmung**, d.h. Bestimmung von 3-MCPD nachdem es durch Spaltung der 3-MCPD-Ester freigesetzt worden ist.



Direkte Bestimmung von 3-MCPD-Estern



Fettsäureester von 3-MCPD können mittels Säulenchromatographie bzw. Festphasenextraktion von anderen Fettbestandteilen, insbesondere von Triglyceriden abgetrennt und angereichert werden.

Die Bestimmung der einzelnen 3-MCPD-Ester erfolgt dann z.B. mittels

- GC-ToF-MS: Arbeitsgruppe J. Velisek: Bestimmung in Humanmilch
- LC-MS: (siehe z.B. Vortrag M. Collision, ADM)

Grundlegendes Problem bei der direkten Bestimmung:

Es muss der Gehalt von vielen unterschiedlichen Einzelsubstanzen bestimmt werden. Bisher sind jedoch nur einige wenige Standardsubstanzen kommerziell erhältlich.

Indirekte Bestimmung von 3-MCPD-Estern als 3-MCPD nach Esterspaltung



Fette und Öle enthalten nur vernachlässigbare Spuren an freiem 3-MCPD!

Wegen der großen Anzahl an möglichen 3-MCPD-Estern ist es daher sinnvoll, die Ester zu spalten und 3-MCPD, die gemeinsame Alkoholkomponente der Ester, zu bestimmen.

Als Katalysatoren für die Esterspaltung dienen:

- Enzyme (Lipasen, Esterasen)
- Säuren (Methanol / H_2SO_4)
- Alkoholate (NaOCH_3 + Methanol)

Alkalihydroxide (KOH, NaOH) sind nicht geeignet!

Gemeinsamkeiten und Unterschiede



Alle Methoden zur Bestimmung von 3-MCPD-Estern durch Esterspaltung weisen ein einheitliches Grundschema auf:

- **Esterspaltung**
- Entfernung der Lipidmatrix, insbesondere der Fettsäuren
- **Derivatisierung**
- Ggf. Aufreinigung der Derivate
- Bestimmung mittels GC-MS

Die einzelnen Methoden unterscheiden sich in Art und Kombination von **Esterspaltung** und **Derivatisierung**.

Saure Hydrolyse von 3-MCPD-Estern



Standardverfahren: 1,8 vol% H₂SO₄ in Methanol, 40 °C, 16 hr



Bildung von zusätzlichem 3-MCPD bei der Hydrolyse in Gegenwart von Chloridionen (aus Probe, Reagenzien, Glasgefäßen).

Glycidol wird durch Säurehydrolyse vollständig zerstört!

NaOCH₃ katalysierte Umesterung von 3-MCPD-Estern



Standardverfahren: 0,5 M NaOCH₃ in Methanol, 10 min bei Raumtemperatur



Vorhandenes Glycidol bleibt bei der Umesterung unverändert!

Keine Bildung von zusätzlichem 3-MCPD beim Umesterungsschritt, auch in Gegenwart von Chloridionen.

NaOCH₃ katalysierte Umesterung von 3-MCPD-Estern



Zu beachten:

Teilweiser Abbau von 3-MCPD durch Substitution von Cl durch OCH₃

In geringem Umfang wird 3-MCPD auch zu Glycidol umgewandelt:



Abhilfe:

Derivatisierung mit NaCl / Phenylboronsäure → dabei wird Glycidol nahezu vollständig wieder zurück in 3-MCPD umgewandelt.

Bei Verwendung von NaOCH₃ ist die Verwendung eines isotopenmarkierten internen Standards unerlässlich!

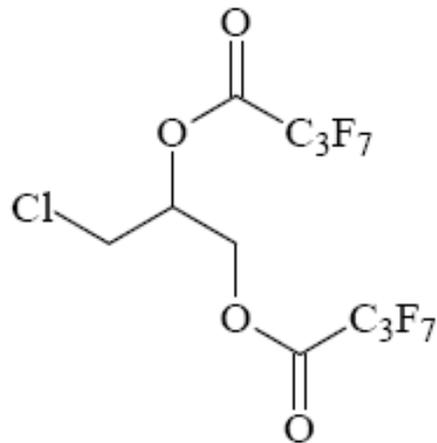
Derivatisierung

Flüchtige Derivate für die GC/MS durch Reaktion von 3-MCPD mit

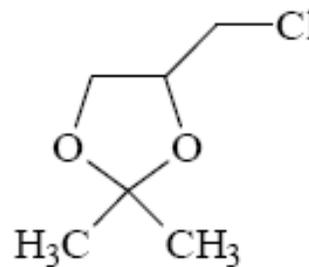
(a) Heptafluorobutyrylimidazol (HFBI) oder HFBA

(b) Aceton

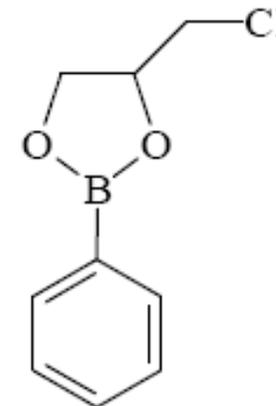
(c) Phenylboronsäure (PBS)



(a) 3-chloropropane-1,2-diol-
di(heptafluoro)butyrate



(b) 4-chloromethyl-2,2-
dimethyl-1,3-dioxolane



(c) 4-chloromethyl-2-phenyl
1,3,2-dioxaborolane

Derivatisierung mit HFBI bzw. Aceton



Derivatisierung mit Heptafluorobutyrylimidazol (HFBI) oder HFBA:

Nur in wasserfreiem / alkoholfreiem Medium möglich; daher vor der Derivatisierung Phasenwechsel erforderlich.

Derivatisierung mit Aceton:

Nur in wasserfreiem / alkoholfreiem Medium möglich; daher vor der Derivatisierung Phasenwechsel erforderlich.

Clean-up der Derivate mittels Festphasenextraktion.

Bei der Derivatisierung mit HFBI / HFBA oder Aceton wird

Glycidol nicht erfasst!

Derivatisierung mit Phenylboronsäure



Die Derivatisierung mit Phenylboronsäure findet in wässrigen Salzlösungen statt (Aussalzeffekt für eine effektive Extraktion des Derivates).

Bei Verwendung von NaCl-Lösung wird Glycidol nahezu quantitativ (>> 90%) in das Phenylboronsäurederivat des 3-MCPD umgewandelt.

In der Probe vorhandenes Glycidol wird in diesem Fall bei der GC-MS nahezu quantitativ als 3-MCPD erfasst!

Bei Verwendung anderer Neutralsalze z.B. Na_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 wird Glycidol nicht umgewandelt und daher nicht erfasst!

(Allerdings sind die Signalgrößen bei der GC-MS niedriger als mit NaCl).

Ein Spezialfall stellt die **Derivatisierung mit Phenylboronsäure in NaBr-Lösung** dar (siehe Vortrag J. Kuhlmann, SGS).

Was wird bei den einzelnen Verfahren gemessen?

Methode	Hydrolyse	Derivatisierung	erfasst wird
Velisek et al.	H ₂ SO ₄ /MeOH	PBS in NaCl	nur 3-MCPD
Nestle / BfR	H ₂ SO ₄ /MeOH	HFBI / HFBA	nur 3-MCPD
BfR	H ₂ SO ₄ /MeOH	PBS in (NH ₄) ₂ SO	nur 3-MCPD
BfR + Andere	NaOCH ₃ /MeOH	PBS in (NH ₄) ₂ SO ₄	nur 3-MCPD
SGS Fresenius	NaOCH ₃ /MeOH	PBS in NaBr	3-MCPD / Glycidol getrennt
DGF C-III 18 A*	NaOCH ₃ /MeOH	PBS in NaCl	3-MCPD + Glycidol (Summe)
* Identisch mit der im BfR-Ringversuch 2008 getesteten Methode			
DGF C-III 18 B	NaOCH ₃ /MeOH	PBS in NaCl	3-MCPD

Direkte Bestimmung von Glycidylestern



Bei Glycidol sind wesentlich weniger unterschiedliche Fettsäureester möglich als im Falle des 3-MCPD. Daher müssen bei einer direkten Bestimmung der Glycidylester nur einige wenige Einzelsubstanzen bestimmt werden.

Beispiel Palmöl:

Palmitinsäure, Ölsäure und Linolsäure machen über 90% der Fettsäuren aus.

Der größte Teil der Glycidylester würde daher bereits erfasst, wenn nur die Einzelsubstanzen Glycidylpalmitat, Glycidyloleat und Glycidyllinolat quantitativ bestimmt werden.

Für eine Quantifizierung braucht man in diesem Fall nur drei Vergleichssubstanzen mit definiertem Gehalt + einen internen Standard.

Direkte Bestimmung von Glycidylestern



Intakte Glycidylester können direkt, ohne Spaltung oder Derivatisierung, mittels LC-MS und mittels GC-MS bestimmt werden.

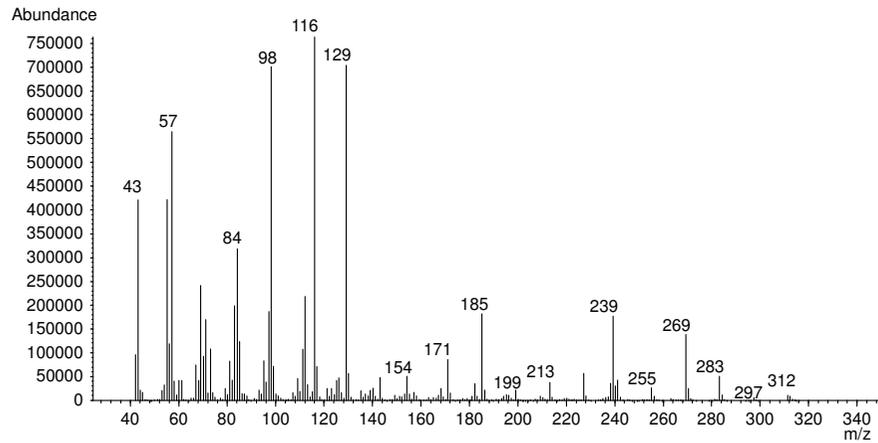
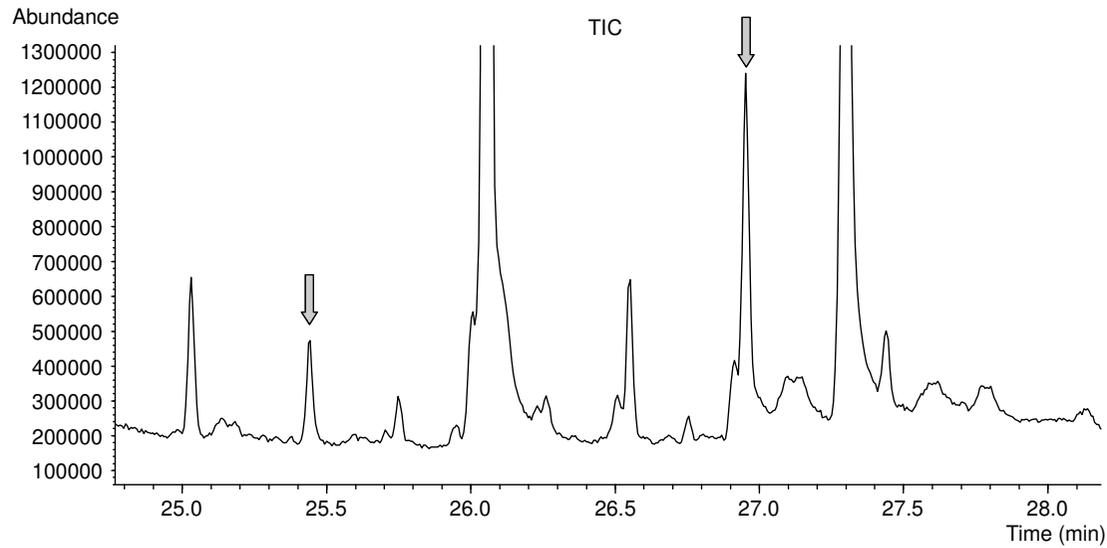
Bestimmung mittels LC-MS (Kao Corp. 2009):

- Abtrennung der Lipidmatrix durch zweimalige Festphasenextraktion
- LC-APCI-MS auf RP-18-Phase

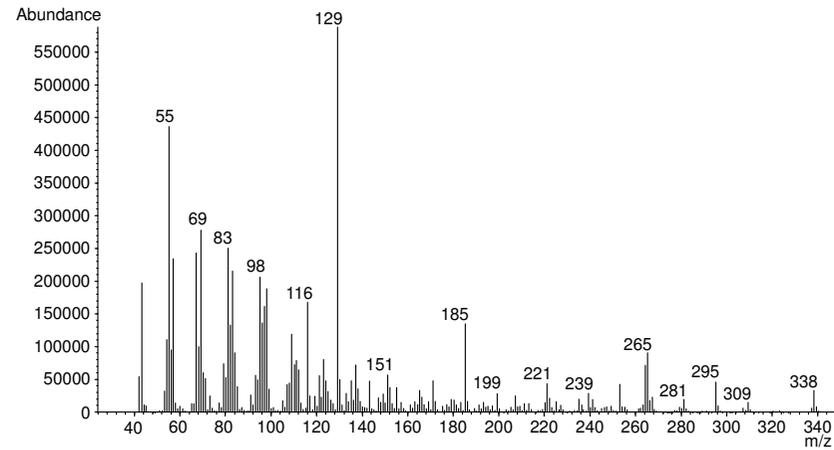
Bestimmung mittels GC-MS (CVUA Stuttgart 2009):

- Abtrennung der Triglyceride mittels Gelchromatographie
- Abtrennung der Mono- und Diglyceride mittels SPE an Kieselgel
- GC-EI-MS auf DB-5-Phase

TIC eines Hartfettes auf Palmölbasis (aus BfR-Ringversuch 2008)



MS von Glycidylpalmitat ($t_R = 25,4$ min)



MS von Glycidyloleat ($t_R = 26,9$ min)

Indirekte Bestimmung von Glycidylestern



In Zukunft werden Verfahren zur direkten Bestimmung von Glycidylestern erheblich an Bedeutung gewinnen, da mögliche Fehlerquellen durch Hydrolyse oder Derivatisierung vermieden werden.

Eine routinemäßigen Anwendung direkter Methoden wird es allerdings erst dann geben, wenn die entsprechenden Standardsubstanzen mit definiertem Gehalt für einen breiten Anwenderkreis erhältlich sind.

Im Augenblick wird der Gehalt an Glycidylestern fast ausschließlich mit Differenzverfahren bzw. mit anderen indirekten Verfahren ermittelt.

Diese Verfahren weisen i.A. recht gute Reproduzierbarkeiten auf, sie beruhen aber alle auf der Annahme, dass die auf indirektem Wege erhaltenen Messwerte ausschließlich auf das Vorhandensein von Glycidylestern zurückzuführen sind.

Indirekte Bestimmung von Glycidylestern



Differenzverfahren:

Bei Differenzverfahren werden für jede Probe 2 Analysen durchgeführt:

1. Analyse: Verfahren zur Bestimmung der Summe 3-MCPD + Glycidol
2. Analyse: Verfahren zur selektiven Bestimmung von 3-MCPD

Aus der Differenz der beiden Analysen wird der Glycidolgehalt berechnet.

Indirekte Verfahren mit selektiver Derivatisierung der Epoxigruppe:

Nur eine Analyse notwendig, da 3-MCPD und Glycidol zu zwei unterschiedlichen Derivaten führen.

Beispiel: Derivatisierung mit PBS / NaBr (siehe Vortrag J. Kuhlmann)

DGF Einheitsmethode C-III 18 (09)

Manchmal umstritten – nicht immer ganz verstanden



Die Methode wurde 2007 am CVUA Stuttgart entwickelt und fand schnell weite Verbreitung.

Prinzip der Methode:

Spaltung mit NaOCH_3 → Derivatisierung mit PBS / NaCl → GC-MS

2008 – Test der Methode im BfR-Ringversuch:

Es zeigte sich, dass mit dieser Methode nicht nur 3-MCPD-Ester, sondern auch eine andere Substanz erfasst wird, die im Verlauf der Analyse in 3-MCPD umgewandelt wird.

Diese Substanz wurde wenig später als Glycidol identifiziert.

DGF Einheitsmethode C-III 18 (09)



Da die Verfahrenskenndaten aus dem BfR-Ringversuch bei Betrachtung als **Summenmethode** die einschlägigen Standards für Wiederholbarkeit und Vergleichbarkeit erfüllen, wurde die Methode im März 2009 als DGF-Einheitsmethode C-III-18 (09) unter dem Titel

„Ester-bound 3-chloropropane-1,2-diol (3-MCPD esters) and 3-MCPD forming substances - Determination in fats and oils by GC-MS“

auf der DGF-Homepage vorab veröffentlicht.

Inzwischen ist die Methode erweitert worden, so dass nicht nur der Summengehalt, sondern über ein Differenzverfahren zusätzlich auch die separaten Gehalte an estergebundenem 3-MCPD und an Glycidol ermittelt werden können.

DGF Einheitsmethode C-III 18 (09)

Die erweiterte Methode ersetzt die bisherige Methode. Sie wurde unter dem Titel:

„Fettsäuregebundenes 3-Chlorpropan-1,2-diol (3-MCPD-Ester) und Glycidol (Glycidylester). Bestimmung in Fetten und Ölen durch GC-MS (Differenzmethode)“

mit der 14. Ergänzungslieferung endgültig als DGF-Einheitsmethode in die Methodensammlung aufgenommen.

Die Methode besteht aus 2 Einzelmethode(n).



DGF Einheitsmethode C-III 18 (09)



Teil A:

„Bestimmung der Summe von estergebundenem 3-MCPD und Glycidol“

Teil B:

„Bestimmung von estergebundenem 3-MCPD nach Entfernung von Glycidol mittels 1-Propanol / H_2SO_4 “

Aus der Differenz der Analyseergebnisse nach Teil A und Teil B lässt sich der Gehalt an estergebundenem Glycidol berechnen.

Teil A ist identisch mit der Originalmethode, die im BfR-Ringversuch 2008 getestet wurde und ist daher validiert.

Teil B ist bisher nur „In-house“ validiert. Die Validierung durch einen Ringversuch steht noch aus.

Unterschiedliche Analysemethoden können zu unterschiedlichen Schlussfolgerungen (ver)führen

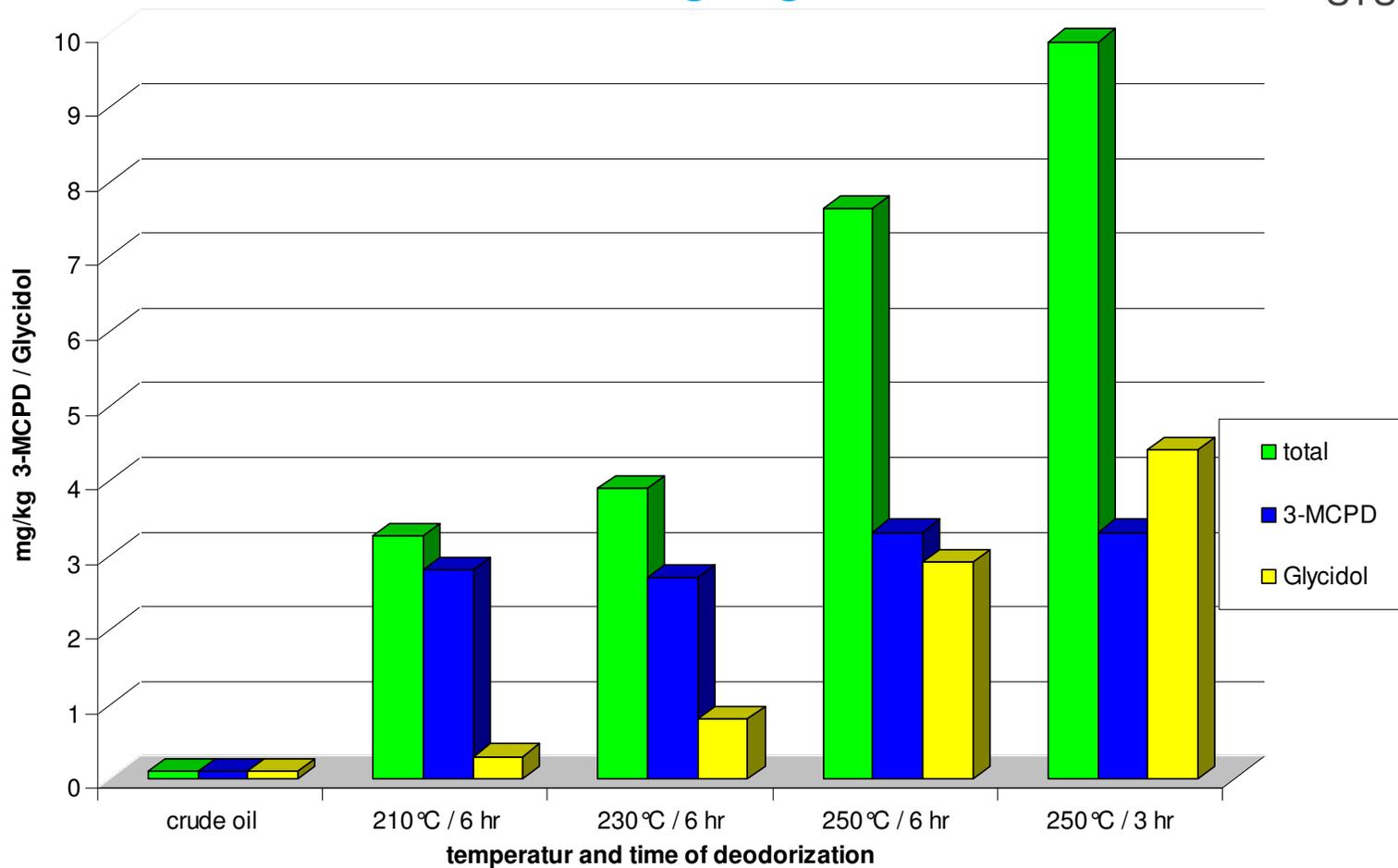


„Der Vergleich der 3-MCPD-Entstehung bei einer Desodorierungstemperatur von 180 °C mit 260 °C führt mit den unterschiedlichen Analyseverfahren zu vollkommen unterschiedlichen Schlüssen. Während bei dem einen Verfahren die 3-MCPD-FE-Gehalte verdoppelt werden, bleiben sie bei Analyse nach dem neueren Analyseverfahren konstant.“

OVID „3-MCPD-Fettsäureester – Hintergründe“, März 2009

Der Grund für diese Unstimmigkeiten liegt darin, dass mit dem ersten Verfahren 3-MCPD- **und** Glycidylester erfasst werden, mit dem zweiten Verfahren jedoch nur die 3-MCPD-Ester. Veränderungen der Glycidylester-Konzentration bleiben mit dem zweiten Verfahren unerkannt.

Beispiel: Desodorierung von Palmöl unter verschiedenen Bedingungen



Grün: Summe von 3-MCPD + Glycidol (DGF C-III 18, Teil A)

Blau/gelb: individueller Gehalt an 3-MCPD bzw. Glycidol (DGF C-III 18, Teil B)

.....herzlichen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!

Ruediger.Weisshaar@cvuas.bwl.de

<http://www.cvua-stuttgart.de>

