

**Ein neues analytisches Verfahren zur Bestimmung
von Glycidyl- und MCPD-Fettsäureestern
mittels GC-MS**

01/2010

SGS Germany GmbH
Dr. Jan Kuhlmann

WHEN YOU NEED TO BE SURE

SGS

Einleitung

Vorstellung der neuen Methode

Ergebnisse aktueller Untersuchungen

Zusammenfassung

3-MCPD- & Glycidylester sind Prozesskontaminanten

3-Monochlor-1,2-propandiol-Fettsäureester (**3-MCPD-Ester**) und 2,3-Epoxi-1-propanol-Fettsäureester (**Glycidylester**) sind Prozesskontaminanten, von denen man annimmt, dass sie bei der Raffination pflanzlicher Öle & Fette entstehen.

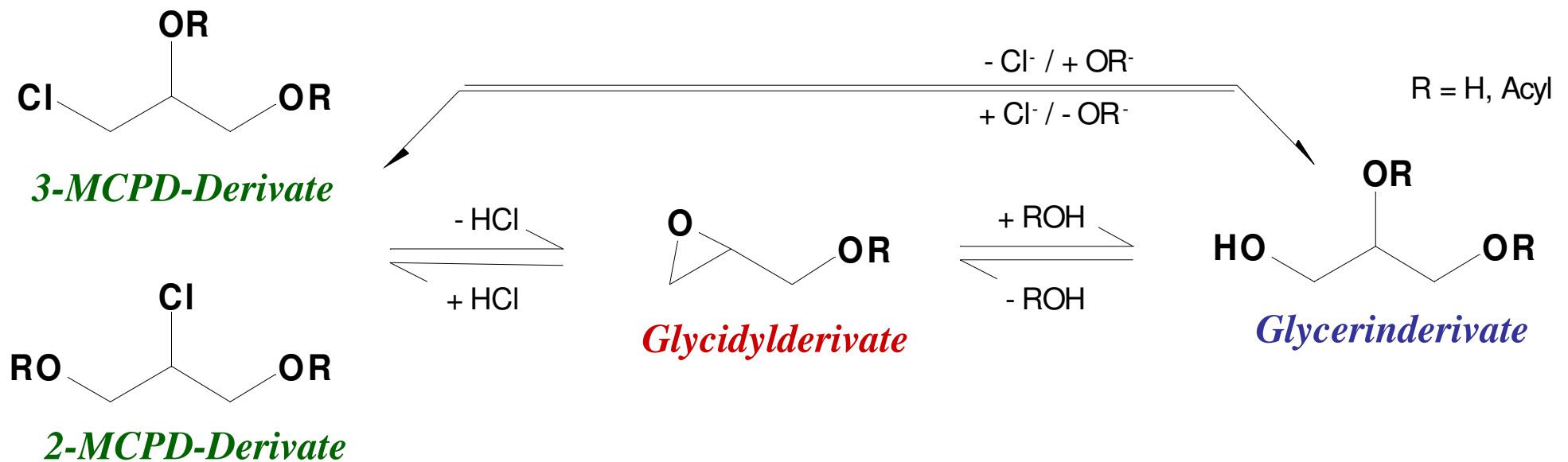


Abb. 1: Formal dargestellte Gleichgewichtsreaktionen zwischen MCPD-, Glycidyl- und Glycerinderivaten

Geeignete Analytik für 3-MCPD- & Glycidylester ist notwendig

Da aus Glycidyl- und 3-MCPD-Estern im menschlichen Stoffwechsel möglicherweise 3-MCPD und Glycidol frei gesetzt werden können, ist für beide Analyten die Etablierung einer geeigneten Analytik notwendig, mittels derer die in Abhängigkeit von der Probenart und der Prozess-Steuerung sehr unterschiedlichen Gehalte an “gebundenem” Glycidol und MCPD in Ölen und Fetten bestimmt werden können.

Übersicht über geläufige analytische GC/MS-Methoden I

“**Summenmethode**”: Bei der ursprünglich für die Analytik von 3-MCPD-Fettsäureestern entwickelten Methode nach R. Weißhaar ^[1] werden durch die Anwesenheit von Chloridionen bei der Probenaufarbeitung 3-MCPD- und Glycidylester gemeinsam in freies 3-MCPD überführt, das als Summenparameter (*3-MCPD- + Glycidyl-derivate*) bestimmt werden kann. Diese Methode wurde in einem Ringversuch des BfR 2008 validiert, eignet sich aber nicht zur alleinigen Bestimmung von 3-MCPD-Fettsäureestern. ^[2]

[1]: R Weisshaar: Determination of total 3-chloropropan-1,2-diol (3-MCPD) in edible oils by cleavage of 3-MCPD esters by sodium methoxide, European Journal of Lipid Science and Technology, 2008 , **110**, 183-186

[2]: Protokoll zur 2. Sitzung der AG Analytik von 3-MCPD-Fettsäureestern in raffinierten Speiseölen und -fetten, sowie fetthaltigen Lebensmitteln Auswertung Ringversuch Teil I, Besprechung künftige Vorgehensweise 20.11.2008

Übersicht über geläufige analytische GC/MS-Methoden II

“3-MCPD-Methoden”:

Die aktuelle vorgestellte Wiederholung des BfR-Ringversuches liefert mehrere valide Methoden zur alleinigen Bestimmung von 3-MCPD-Fettsäureestern in Ölen & Fetten. Hierbei erfolgt entweder die Probenaufarbeitung nach basischer oder saurer Fettsäureabspaltung chloridfrei oder nach einer Zerstörung eventuell vorhandener Glycidylester in Anwesenheit von Chlorid. Glycidol kann mittels dieser Methoden nicht direkt bestimmt werden.

“Differenzmethoden”:

Hierbei erfolgt die rechnerische Ermittlung des Gehaltes an Glycidol über eine Differenzbildung nach Bestimmung des Summenparameters (*3-MCPD- + Glycidyl-derivate*) sowie des reinen Gehaltes an 3-MCPD-Fettsäureestern.

Analytische Hürden

1. Hindernis:

Bei Differenzmethoden verstärken sich die Messunsicherheiten beider Verfahren. Dadurch nimmt die Ergebnisunschärfe für Glycidyl-derivate proportional dem 3-MCPD : Glycidol-Verhältnis zu.

2. Hindernis:

Die direkte Glycidolbestimmung ist bei den üblichen Esterspaltungen unmöglich, weil im alkalischen Milieu 3-MCPD (partiell) in zusätzliches Glycidol überführt wird. Bei der üblichen Esterspaltung im saurem Milieu können vorhandene Glycidylester abgebaut werden, gleichzeitig besteht die Gefahr, dass sich aus der Probe heraus Glycidyl-derivate nachbilden.

Analysekonzept

Dem neuen Verfahren liegt folgendes Konzept zugrunde:

Alkalische Fettsäurespaltung unter kontrollierten Bedingungen und Bestimmung der freigesetzten Analyten 3-MCPD und Glycidol in derivatisierter Form mittels GC/MS

Verwendung geeigneter deuterierter Surrogatstandards für beide Analyten.

Etablierung einer Reaktionsführung, die zukünftig auch die quantitative Bestimmung von 2-MCPD-Fettsäureestern erlaubt.

Realisierung des Analysekonzeptes

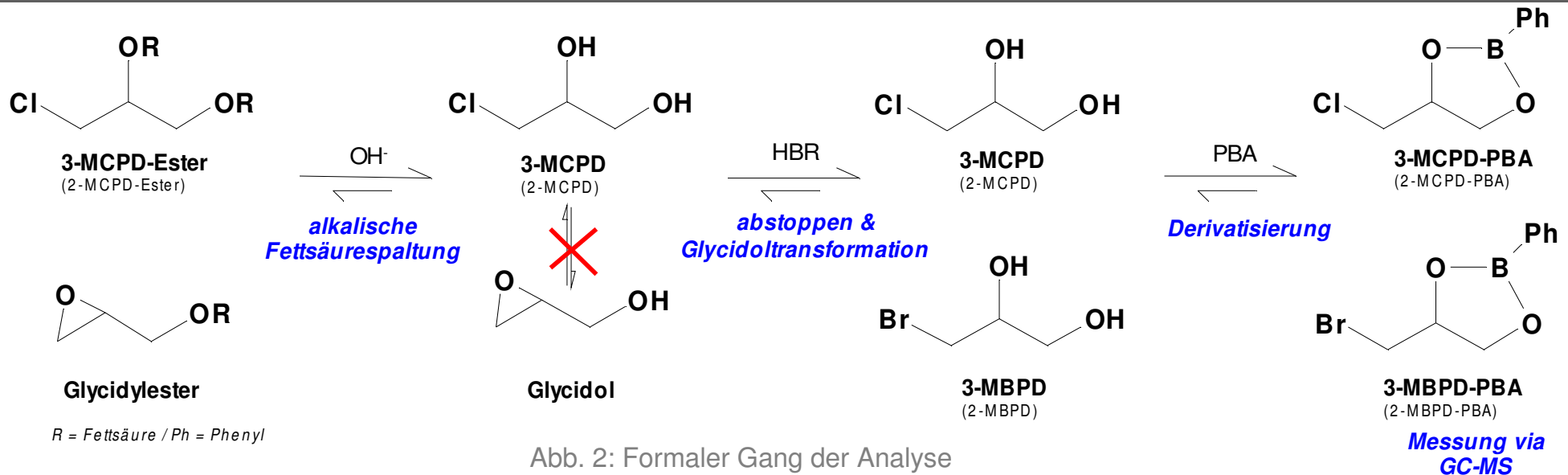


Abb. 2: Formaler Gang der Analyse

Durch eine besonders gesteuerte Fettsäureabspaltung kann die Bildung von Glycidol aus 3-MCPD minimiert werden. Dies wird für jede Probe quantitativ kontrolliert.

Die Umwandlung von Glycidol zu 3-MBPD verleiht dem ansonsten schwierig zu messenden Analyten hervorragende chromatographische Eigenschaften.

Mit D5-3-MCPD (-Ester) und D5-3MBPD sind geeignete isopenmarkierte Quantifizierungsstandards. Die Analytik ist auch für die quantitative Bestimmung von 2-MCPD-Derivaten einsetzbar.

Interne Validierung

| 8 äquidistante Konzentrationen über die Gesamtmethode (0,1 bis 5,7 mg/kg in Sesamöl) | Linearität | LOQ (s/n ≥ 10) |
|--|--|-------------------------|
| | r ² | mg/kg |
| Glycidylester in Anwesenheit von 5 mg/kg 3-MCPD | 0,9994 | ≤ 0,10 |
| 3-MCPD-Ester | 0,9996 | 0,10 |
| Färberdistelöl (0,71 mg/kg Glycidol / 1,01 mg/kg 3-MCPD) | | |
| Glycidylester | Methodenpräzision n = 10 (6 Tage) | |
| | RSD = 4,6 % | |
| 3-MCPD-Ester | RSD = 2,9 % | |
| Wiederfindung (via Aufstockung von Realproben) | | |
| Glycidylester | Rel. WFR | Dotierung |
| | 98-108 % | 0,05 - 2,5 mg/kg |
| 3-MCPD-Ester | 102-111 % | 0,1 – 5,7 mg/kg |
| Glycidylester: Glycidylstearat 3-MCPD-Ester: 3-MCPD-1,2-bispalmitoylester | | |

Tab. 1: Interne Validierungsparameter

Kalibriergerade Glycidylester in Anwesenheit von 3-MCPD

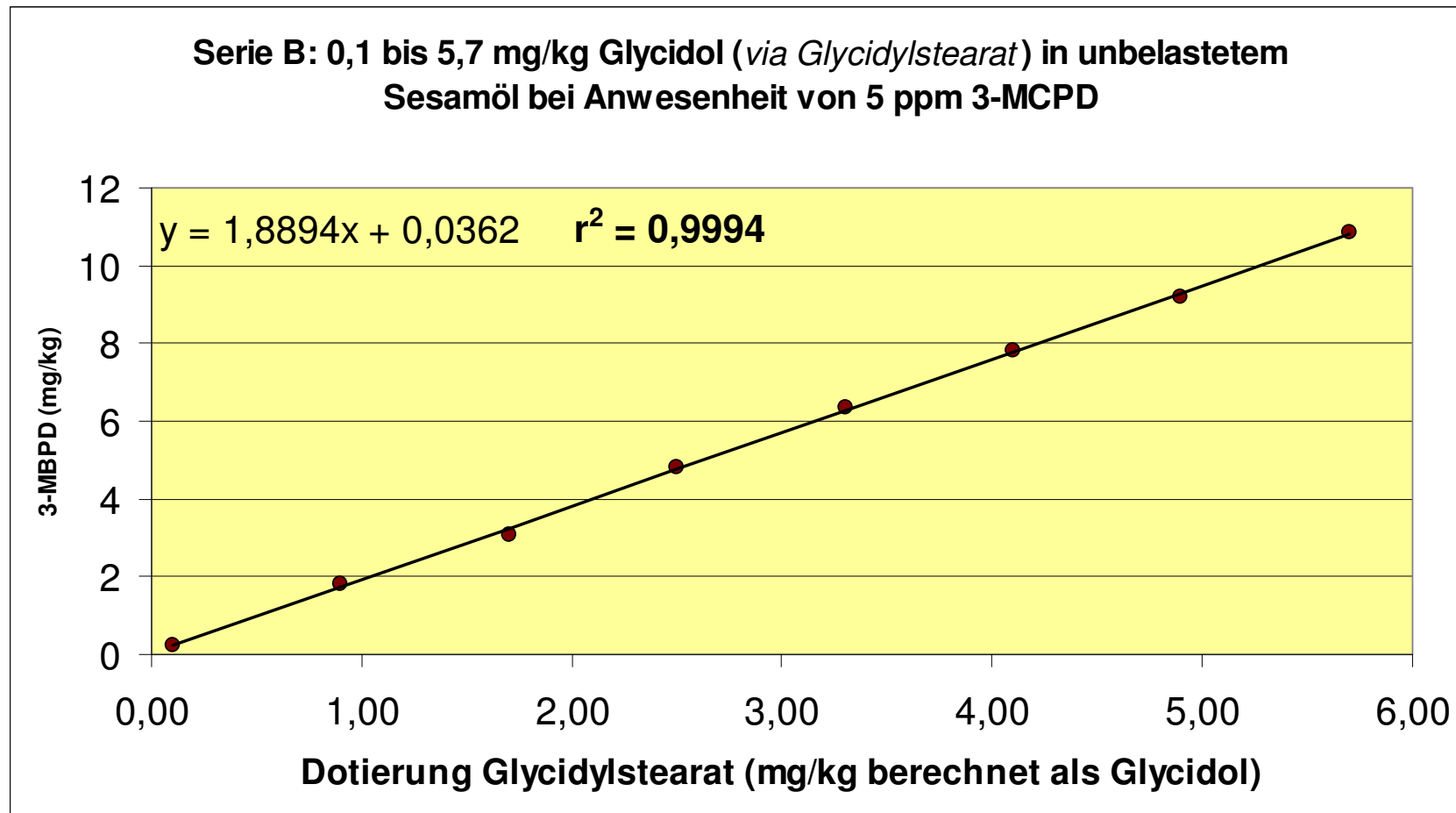


Abb. 3: Kalibrierdaten Glycidylstearat über die Gesamtmethode in Anwesenheit von 5 mg/kg 3-MCPD

Chromatographie & Detektion Beispiel A

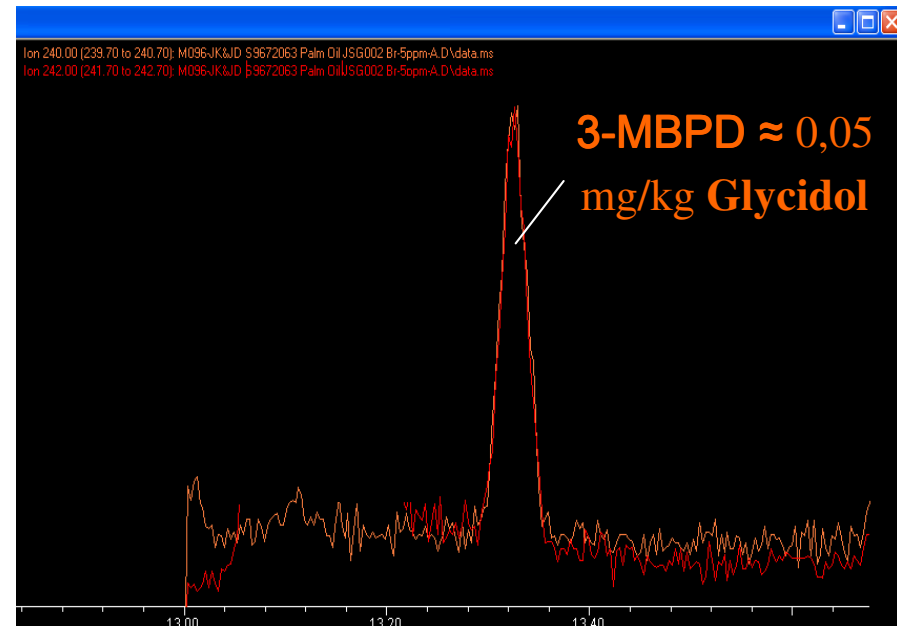
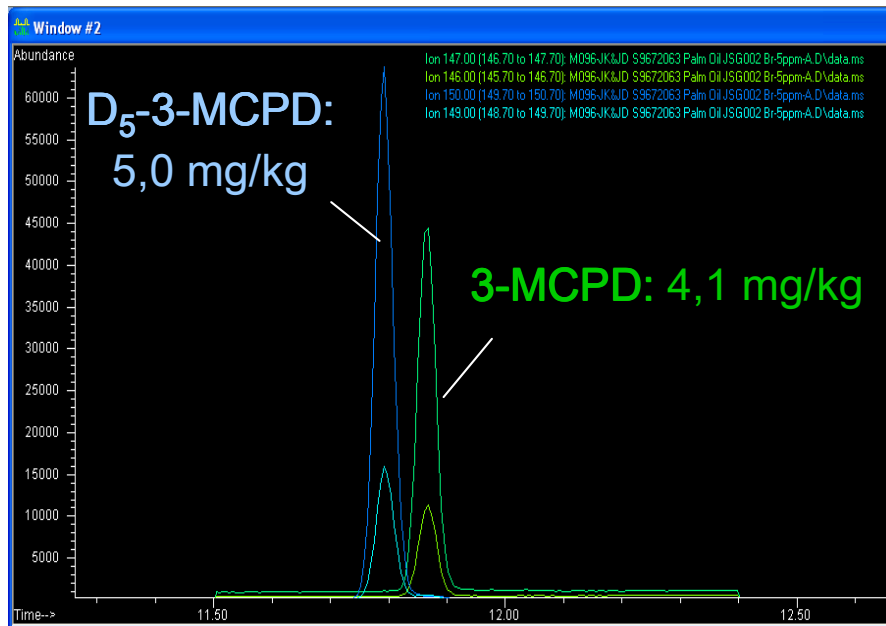


Abb.4,5): GC/MS-SIM-Chromatogramme aus der Messung eines Palmölextraktes. Alle Analyten werden als PBA-Derivate detektiert.

Beispiel A: Realprobe Palmöl, belastet mit 4,1 mg/kg gebundenem 3-MCPD und < 0,1 mg/kg (LOQ) gebundenem Glycidol

Chromatographie & Detektion Beispiel B

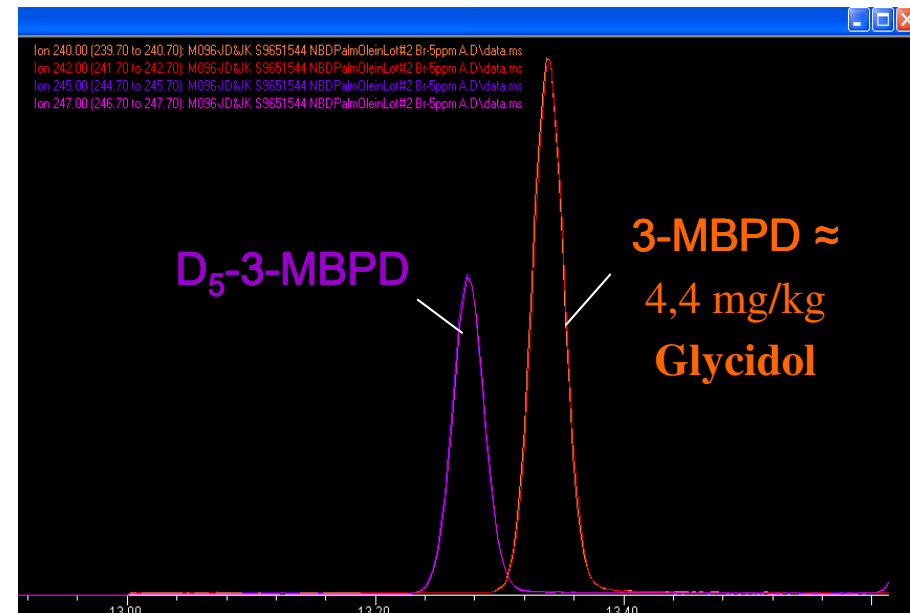
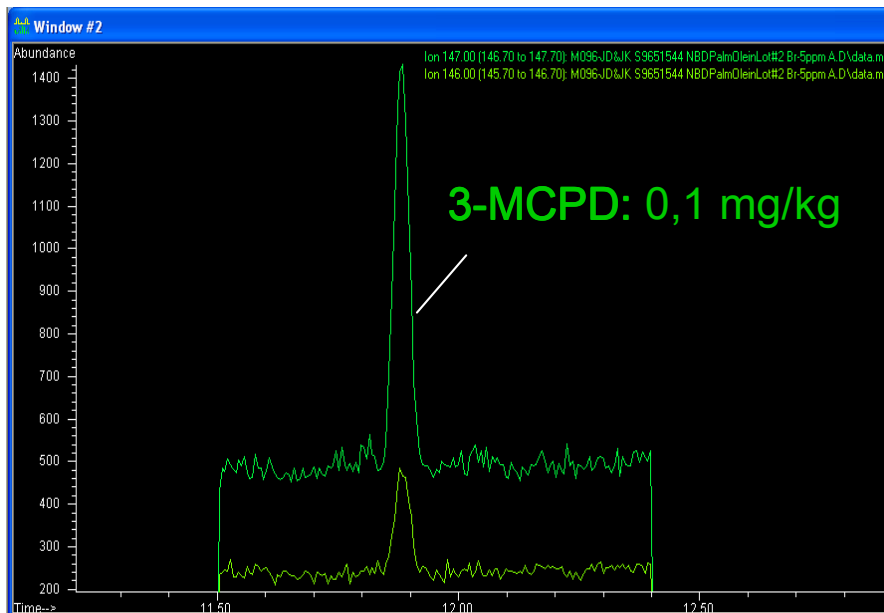


Abb.6,7: GC/MS-SIM-Chromatogramme aus der Messung eines Palmoleinextraktes. Alle Analyten werden als PBA-Derivate detektiert.

Beispiel B: Realprobe Palmolein, belastet mit 0,1 mg/kg gebundenem 3-MCPD und 4,4 mg/kg gebundenem Glycidol

3-MCPD- und Glycidylesterbefunde in Ölen & Fetten I

| Matrix | Probenzahl | Glycidol (mg/kg) | 3-MCPD (mg/kg) |
|--------------------------------|-------------------|-------------------------|-----------------------|
| | n | Maximalwert | Maximalwert |
| Sesamöl kaltgepreßt | 1 | < LOD | < LOD |
| Butter / Butterreinfett | 2 | < LOD | < LOD |
| Rapsöl | 16 | 0,14 | 0,46 |
| Sonnenblumenöl | 9 | 0,14 | 0,90 |
| “Babyöl” | 1 | 0,24 | 0,24 |
| Palmkernöl | 3 | 0,34 | 0,51 |
| Sojaöl | 9 | 0,45 | 0,48 |
| Maiskeimöl | 1 | 0,69 | 1,02 |
| Margarine | 4 | 1,4 | 2,4 |
| Kokosöl | 3 | 1,9 | 1,1 |
| Palmöl | 7 | 6,2 | 4,2 |
| Palmfett | 11 | 14 | 4,6 |

Tab. 2: Aktuelle 3-MCPD- & Glycidylesterbefunde in verschiedenen Ölen & Fetten; Maximalwerte

3-MCPD- und Glycidylesterbefunde in Ölen & Fetten II

| Matrix | Glycidol (mg/kg) | 3-MCPD (mg/kg) |
|--------|------------------|----------------|
| ÖI A | < LOD | < LOD |
| ÖI B | 1,84 | 17,9 |
| ÖI A | 0,47 | 0,47 |
| ÖI B | 4,50 | 0,49 |
| ÖI A | 2,0 | 0,10 |
| ÖI B | 61 | 0,15 |
| Fett A | 272 | < LOQ |
| Fett B | < LOQ | 6,5 |
| ÖI A | > 1000 | < LOQ |
| ÖI B | 4,8 | 55 |

Tab. 3: Ausgewählte Beispiele unterschiedlicher 3-MCPD- & Glycidylesterbefunde in unbekanntem Ölen & Fetten

Qualitative 2-MCPD-Befunde in Ölen & Fetten

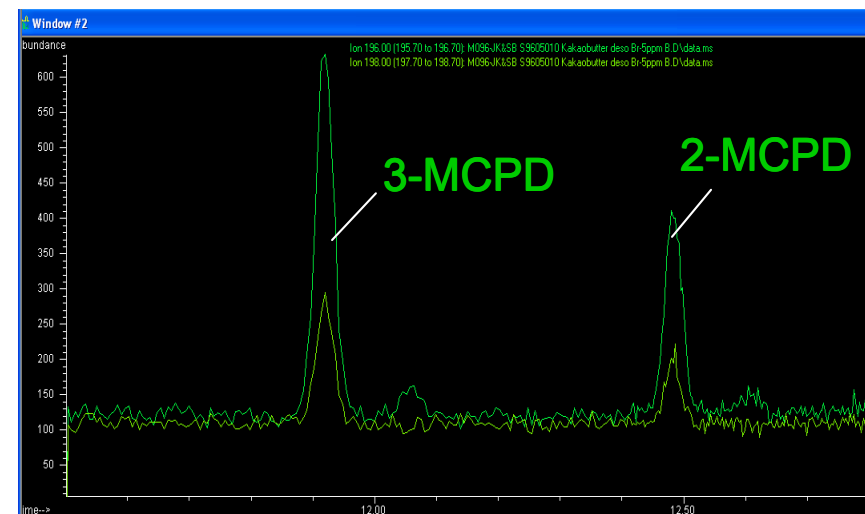
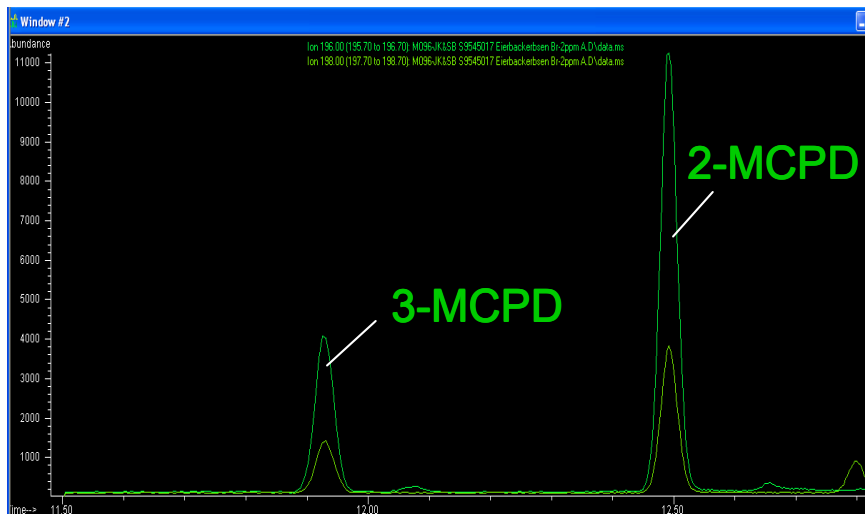


Abb. 8,9: GC/MS-SIM-Chromatogramme zweier Probenextrakte, angezeigt werden die Molekülionenspuren $m/z = 196$, 198 . Alle Analyten werden als Phenylboronsäurederivate detektiert.

Die Signalintensitäten spiegeln nicht die quantitativen Verhältnisse wider. 2-MCPD wird auf den hier dargestellten Molekülionenspuren **ca. 3-fach** intensiver detektiert als 3-MCPD.

2-MCPD-Fettsäureester sollten für die Bewertung eines Gesamt-MCPD-Gehaltes in raffinierten Ölen und Fetten berücksichtigt werden.

Für die Bestimmung von 3-MCPD- und Glycidylestern in Ölen & Fetten wurde eine GC-MS-Methode entwickelt, mittels derer beide Analyten unter Verwendung verschiedener isotopenmarkierter interner Standards parallel quantifiziert werden können.

Die neue Methode ist empfindlich, linear und liefert reproduzierbare Ergebnisse.

Die Untersuchung unterschiedlicher Öle und Fette hat gezeigt, dass die Belastung mit 3-MCPD- und Glycidylestern hinsichtlich der Gesamtmenge und Verteilung beider Analyten sehr unterschiedlich sein kann.

Mittels der hier vorgestellten Analytik können auch 2-MCPD-Fettsäureester erfasst werden. Eine stichpunktartige qualitative Auswertung zeigt, dass diese Analyten ebenfalls regelmäßig in raffinierten Ölen und Fetten vorkommen und für die Gesamtbewertung von Proben eine Rolle spielen können.



Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!

SGS Germany GmbH

Dr. Jan Kuhlmann

Weidenbaumsweg 137 · 21035 Hamburg

Telefon: +49 (0)40 88 309 423

Telefax: +49 (0)40 88 309 170

Internet: www.de.sgs.com

E-Mail: jan.kuhlmann@sgs.com

WHEN YOU NEED TO BE SURE

SGS