

# 3-MCPD-, 2-MCPD- und Glycidyl-Fettsäureester – Analytik, Stabilität und Reaktivität

---

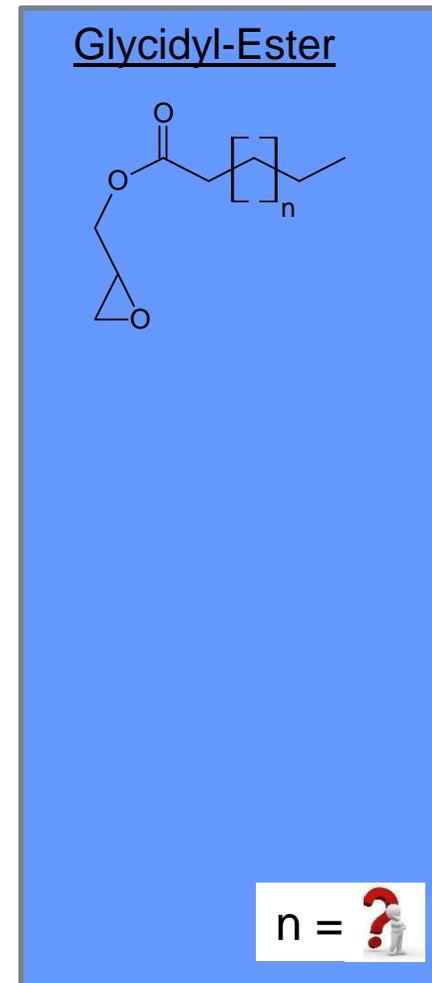
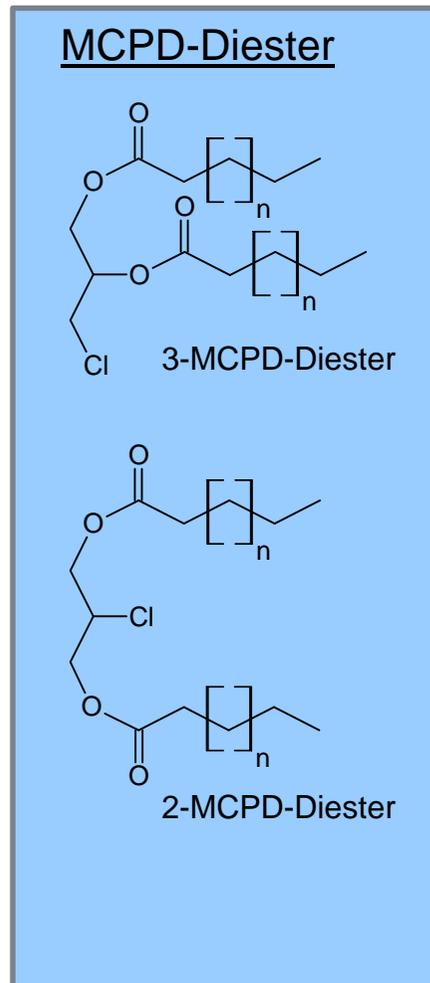
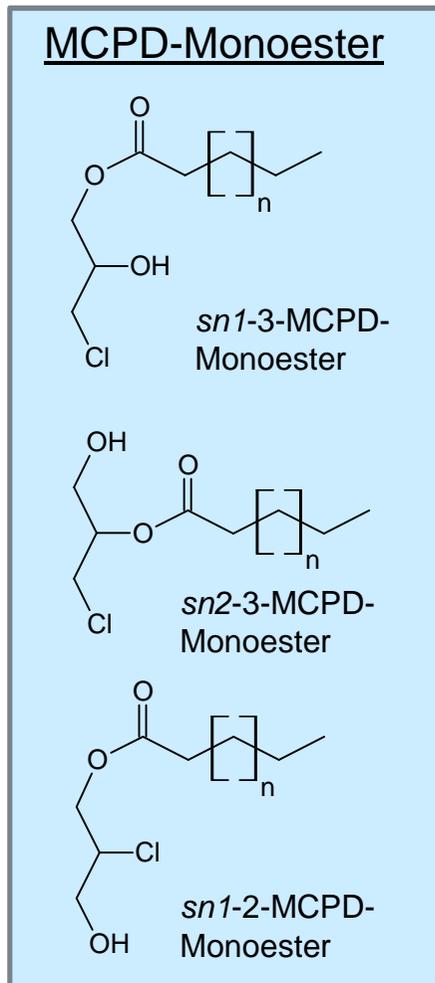
*Jasmine Thorkildsen<sup>1</sup>, Michael Granvogl<sup>2</sup> und Peter Schieberle<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Leibniz-Institut, Lise-Meitner-Straße 34, D-85354 Freising

<sup>2</sup>Lehrstuhl für Lebensmittelchemie, Technische Universität München, Lise-Meitner-Straße 34, D-85354 Freising

# Strukturen

- den natürlichen Mono-, Di- und Triglyceriden in Fetten und Ölen sehr ähnlich



## □ **Prozesskontaminanten**



## □ **freies 3-Monochlorpropan-1,2-diol (3-MCPD)**

- seit Ende der 70er Jahre: Reaktionsprodukt bei der Herstellung von säurehydrolysierten Pflanzenproteinen

## □ **MCPD- und Glycidyl-Fettsäureester (FE)**

- seit 2004: Nachweis in raffinierten Speisefetten und -ölen sowie daraus hergestellten Produkten

## □ **freies 3-MCPD**

- Joint Food and Agriculture Organization / World Health Organization Expert Committee on Food Additives (JECFA):  
TDI (*tolerierbare tägliche Aufnahmemenge*) von 2 µg/kg Körpergewicht pro Tag
- International Agency for Research on Cancer (IARC):  
Gruppe 2B „möglicherweise krebserregend“
- Verordnung (EG) Nr. 466/2001  
Höchstmenge von 0.02 mg/kg in hydrolysiertem Pflanzenprotein

## □ **freies Glycidol**

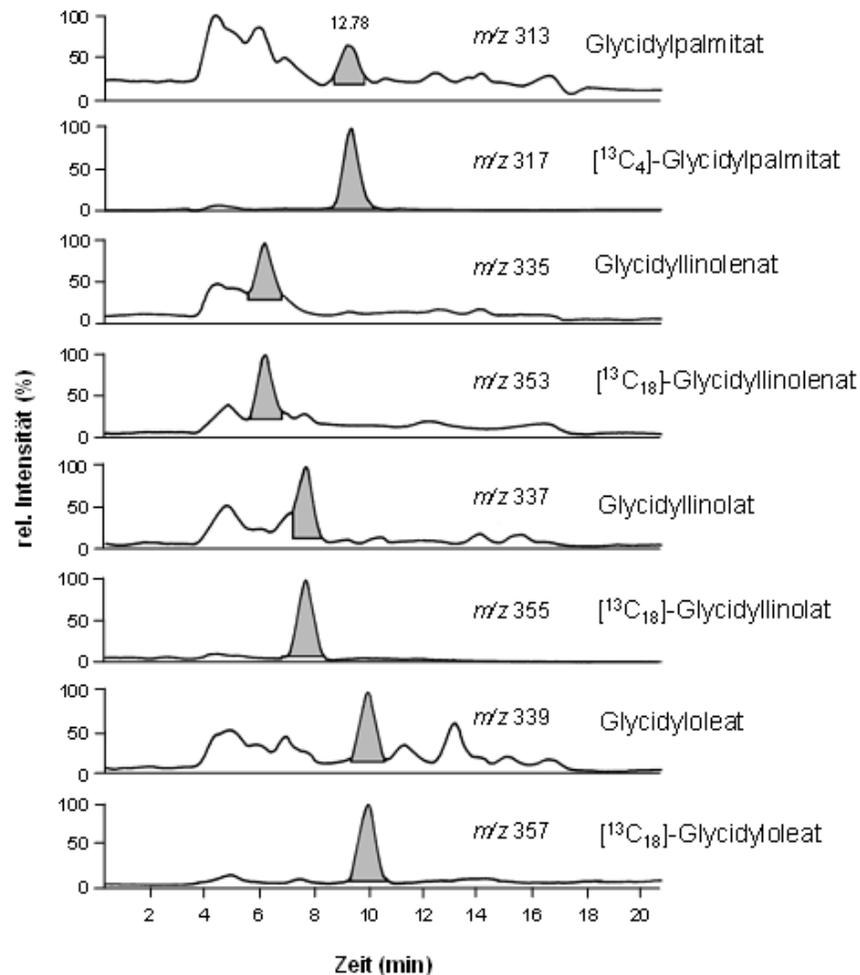
- IARC: Gruppe 2A „*wahrscheinlich krebserregend*“  
→ kein TDI (“ALARA“-Prinzip = “so niedrig wie vernünftigerweise erreichbar”)

- **3-MCPD- und Glycidyl-FE**
  - Glycidylstearat und -oleat
    - IARC: Gruppe 3 „Stoff ist hinsichtlich der Kanzerogenität für den Menschen nicht einstuftbar.“
  - Studien des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR) und der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA):
    - Annahme: Spaltung der Ester im menschlichen Körper zu 100 % durch körpereigene Enzyme
      - Übernahme der Bewertung für die freien Verbindungen

**AF 16004 BG**

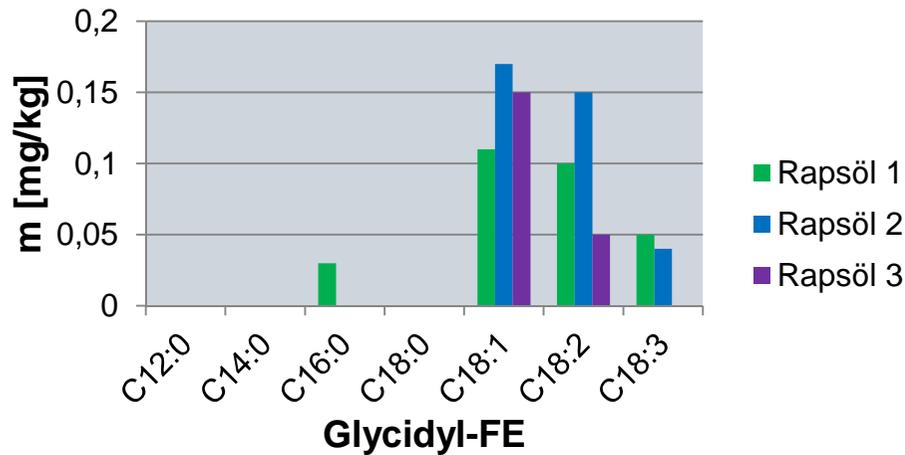
**“Untersuchungen zur Bildung von 3-MCPD-Fettsäureester in Pflanzenölen und Entwicklung von Strategien zu deren Minimierung”**

- Entwicklung einer Methode zur Quantifizierung von einzelnen Glycidyl-FE in Fetten und Ölen mittels LC-MS (APCI+)

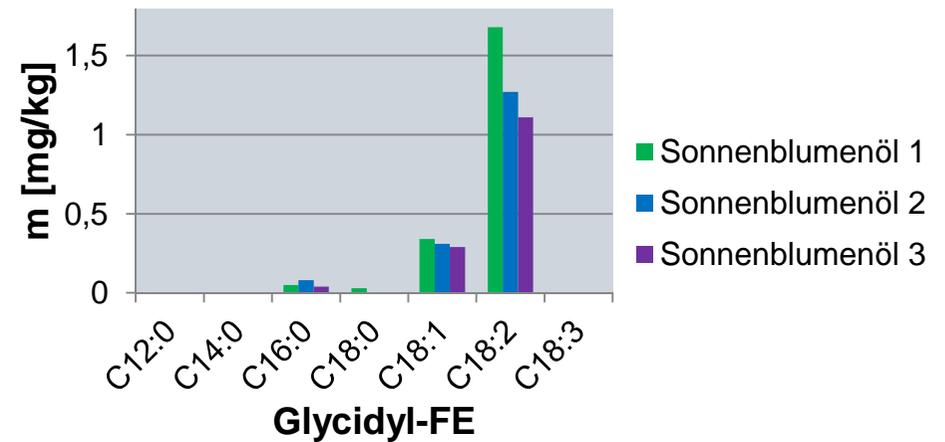


# Quantifizierungsergebnisse der Glycidyl-FE in Fetten und Ölen

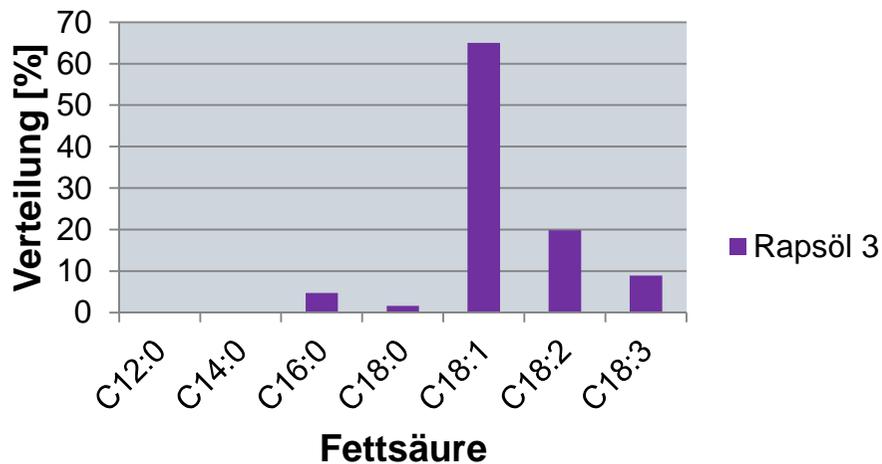
**Glycidyl-FE in kommerziell erhältlichen raffinierten Rapsölen**



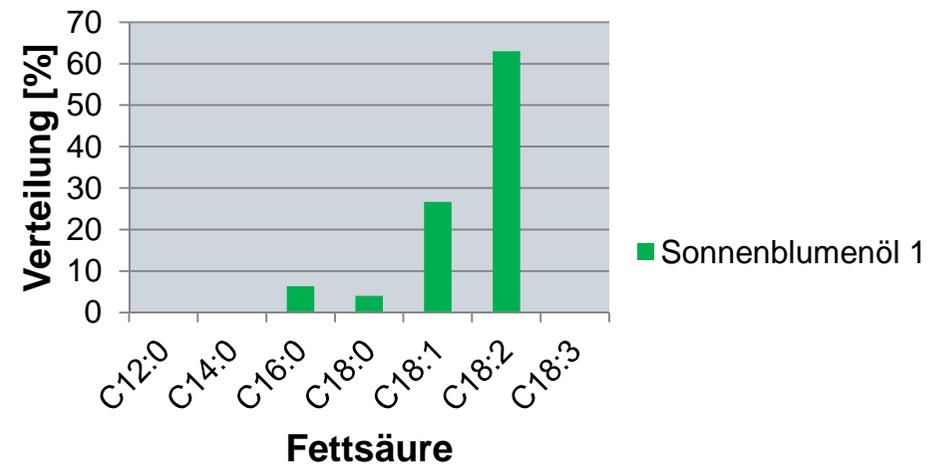
**Glycidyl-FE in kommerziell erhältlichen raffinierten Sonnenblumenölen**



**Fettsäureverteilung von Rapsöl**



**Fettsäureverteilung von Sonnenblumenöl**



# Vergleich der DFA-Methode mit indirekten Methoden

Probe	Glycidyl-FE-Konzentrationen als Summe [mg/kg] mittels		
	DFA-Methode	DGF-C-III 18 (09), (A-B) x 0,67	SGS-“3 in 1“- Methode
Avocado A	1,38	1,49	1,46
Avocado B	0,98	< NG <sup>a</sup>	0,97
Sonnenblumen	0,35	< NG <sup>a</sup>	0,43
Palm	3,63	2,92	3,32
TG <sup>b</sup> -reiches Öl 1	6,01	5,60	7,99
DG <sup>c</sup> -reiches Öl 1	70,3	68,5	70,9
DG <sup>c</sup> -reiches Öl 2	2,40	0,43	2,00

<sup>a</sup> NG = Nachweisgrenze

<sup>b</sup> TG = Triglycerid

<sup>c</sup> DG = Diglycerid

# Vergleich der DFA-Methode mit direkten Methoden

Palmöl	Glycidyl-FE-Konzentrationen als Summe [mg/kg] mittels		
	DFA-Methode	Nestlé-Methode	SGS-“3 in 1“- Methode
1	< BG <sup>a</sup>	< BG <sup>a</sup>	< BG <sup>a</sup>
2	0,01	0,067	< BG <sup>a</sup>
3	0,01	0,022	< BG <sup>a</sup>
4	0,53	0,44	0,68
5	0,83	0,81	1,05
6	1,02	1,03	1,44
7	2,54	2,14	2,66
8	3,39	2,98	3,45
9	4,13	3,26	4,10
10	4,12	3,53	4,32

<sup>a</sup> BG = Bestimmungsgrenze

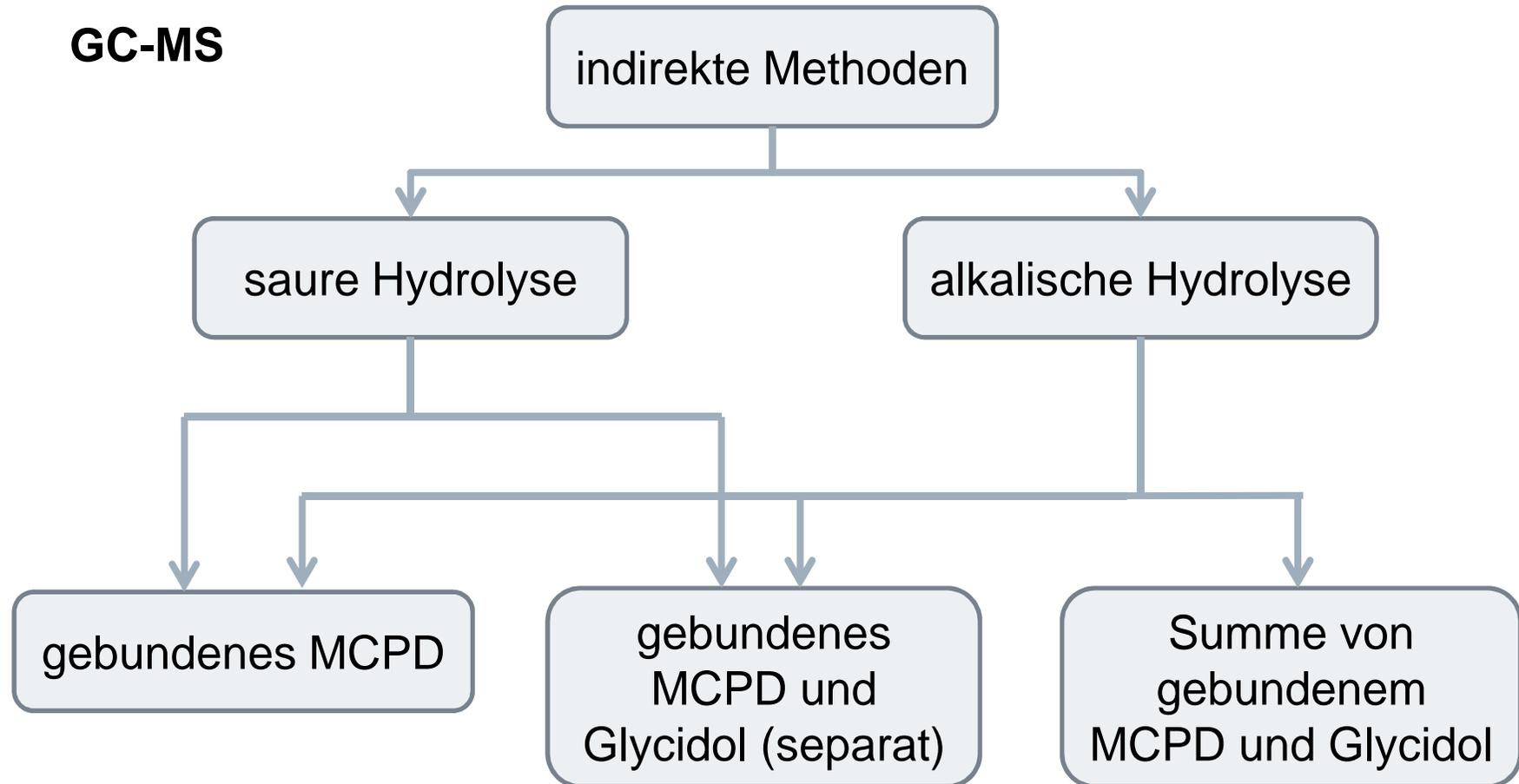
- Folgeprojekt erforderlich
  - Abschluss der Methodenentwicklung zur direkten Quantifizierungsmethode von MCPD-FE
  - Aufklärung des Bildungsmechanismus

→ **AIF** 17059 BG

„Grundlagen für die großtechnische Anwendung von Verfahren zur Herstellung von Speisefetten und -ölen mit reduzierten Gehalten an 3-MCPD-Fettsäureestern und verwandten Verbindungen.“

# **Analytik – Entwicklung einer direkten Quantifizierungsmethode für MCPD- und Glycidyl-Fettsäureester**

## GC-MS



- DGF C-VI18(10) B
- Divinova et al. (2004)
- Zelinkova et al. (2006)

- Kuhlmann, SGS (2011) („3 in 1“)
- Ermacora und Hrncirik (2012)

- DGF C-VI18 (10) A oder DGF C-VI 17 (10)

## LC-MS/MS

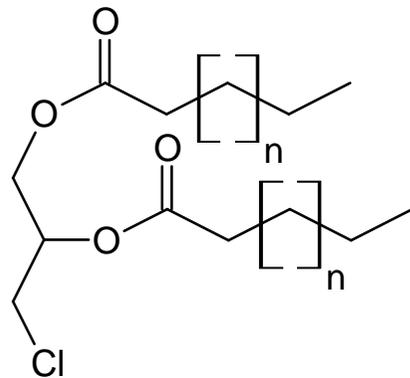
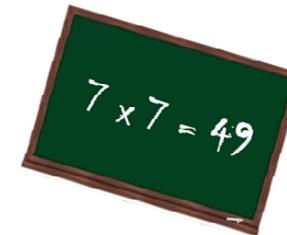


- Haines *et al.* (2011)
- Collison (2011)
- Pinkston (2011)

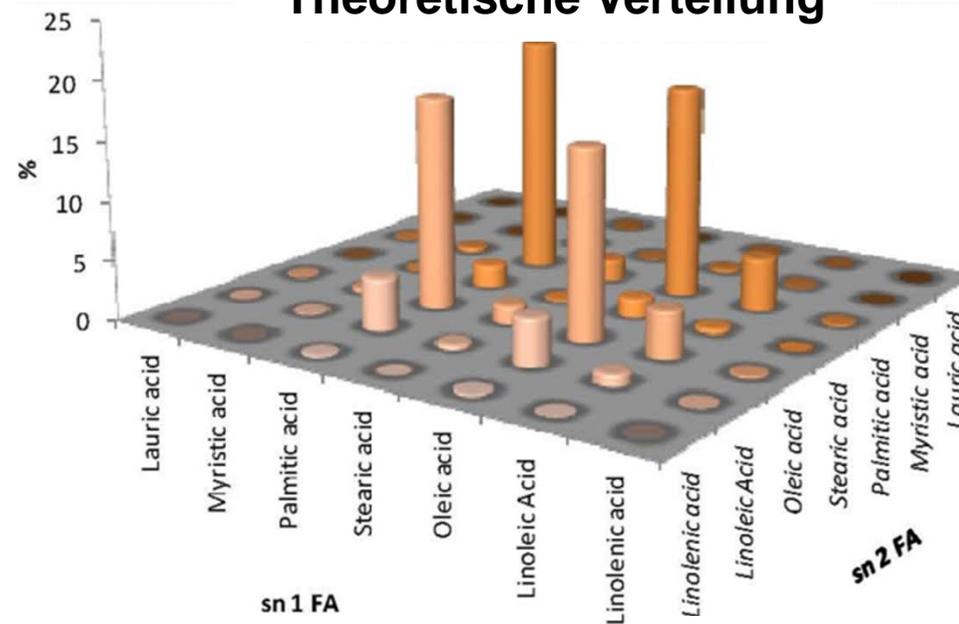
- 2-Phasen SPE
  - Shiro *et al.* (2011)
- Säulenchromatographie
  - Zelinkova *et al.* (2009)
- GPC
  - Weißhaar and Perez (2010)
- SPE auf Kieselgel

- MCPD-FE: komplexe Mischung aus 1-Monoester, 2-Monoester und Diester mit unterschiedlichen Fettsäureresten
  - große Anzahl von Einzelverbindungen müssen chromatographisch getrennt und quantifiziert werden
  
- von n unterschiedlichen Fettsäuren können  $n \cdot (n + 2)$  verschiedene MCPD-Ester generiert werden (Enantiomere ausgeschlossen)
  - Theorie → viele Referenzsubstanzen und markierte Standards werden benötigt

- Beispiel: Palmfett (100 % Abdeckung in Theorie)
  - 3-MCPD-1,2-Diester: 49 Standards
  - 3-MCPD-1-Monoester: 7 Standards
  - 3-MCPD-2-Monoester: 7 Standards

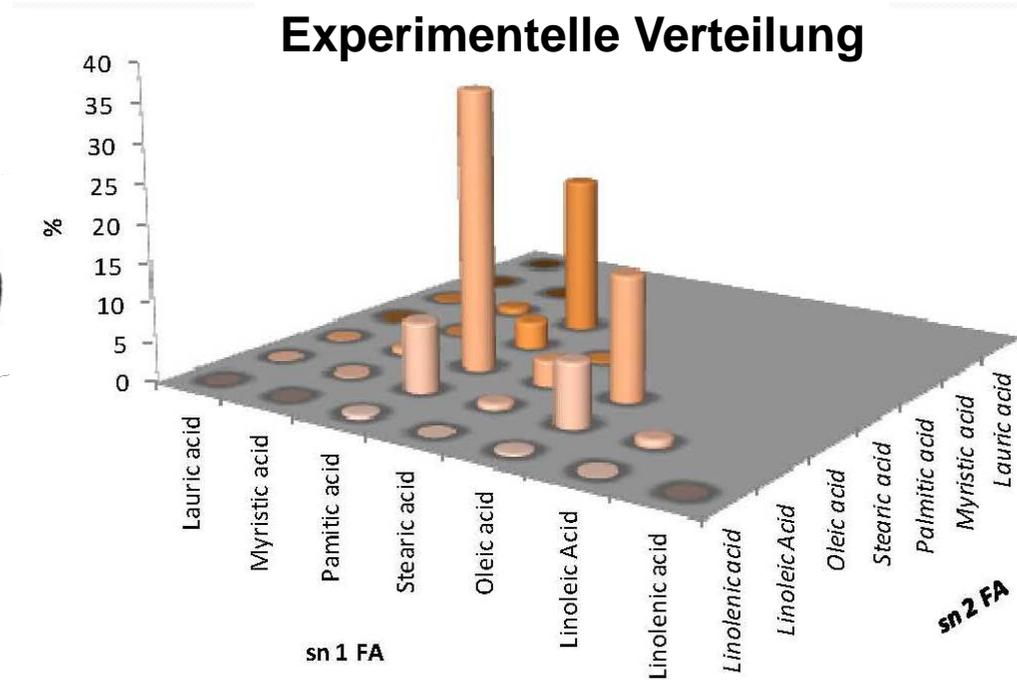
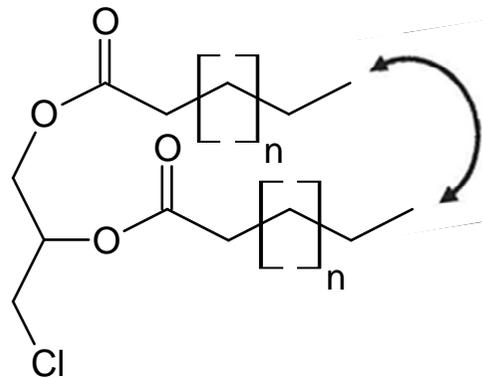


**Theoretische Verteilung**



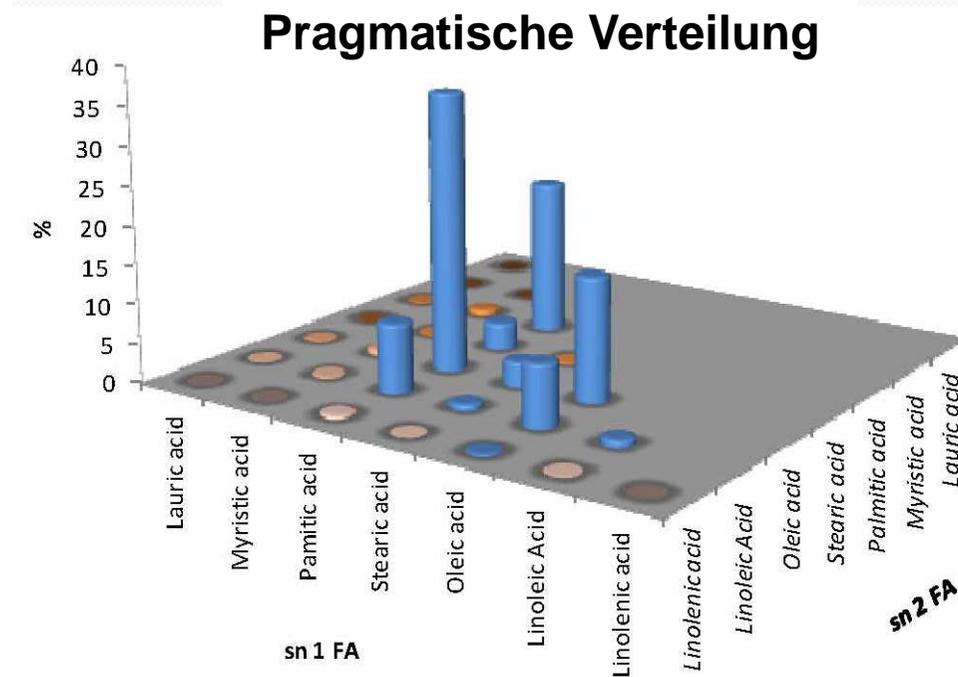
Dubois, AOCS, 2011

- Beispiel: Palmfett (100 % experimentelle Abdeckung)
  - 3-MCPD-1,2-Diester: 28 Standards
  - 3-MCPD-1-Monoester: 7 Standards



- Beispiel: Palmfett (98 % pragmatische Abdeckung)
  - 3-MCPD-1,2-Diester: 10 Standards
  - 3-MCPD-1-Monoester: 4 Standards

Öl	Abdeckung der 3-MCPD-Diester (10 Standards)
Rapsöl	93%
Getreidekeimöl	98%
Baumwollsamensöl	96%
Traubenkernöl	99%
Olivenöl	95%
Palmfett	98%
Palmolein	96%
Distelöl	99%
Sojaöl	90%

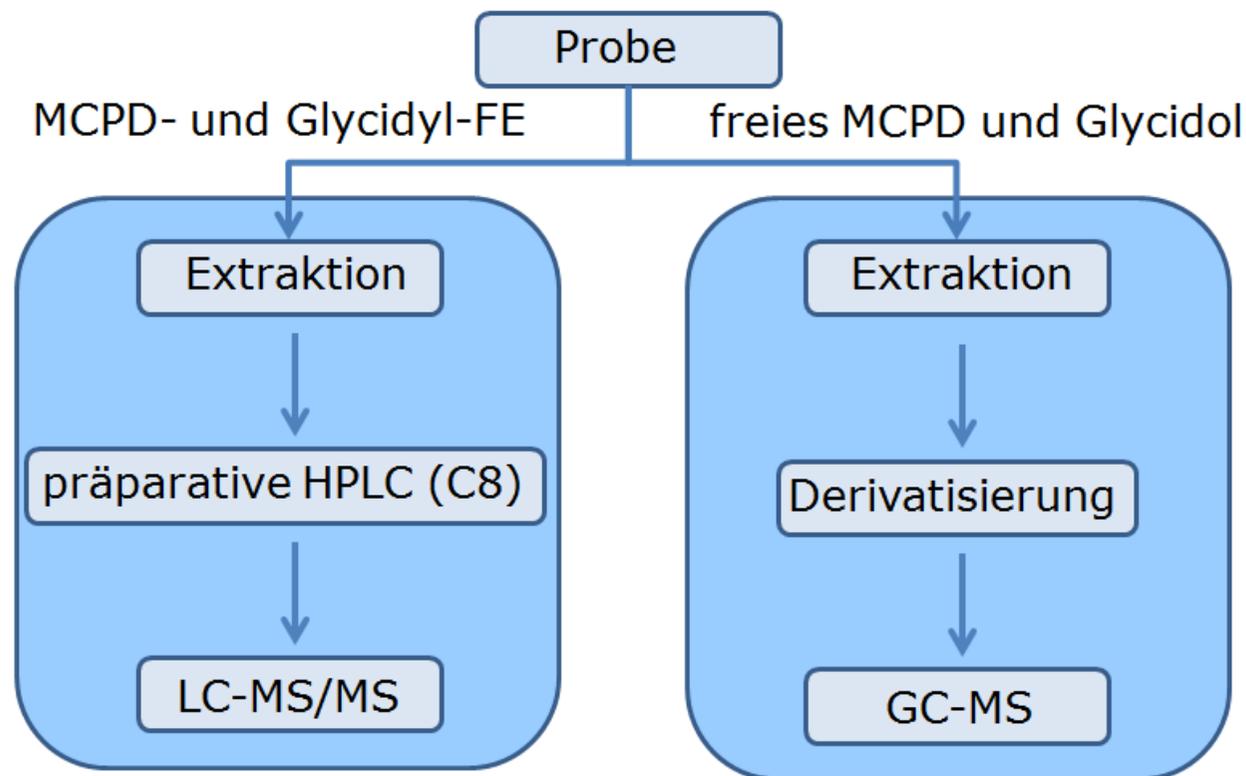


→ problematisch z.B. mit Leinöl und Kokosfett

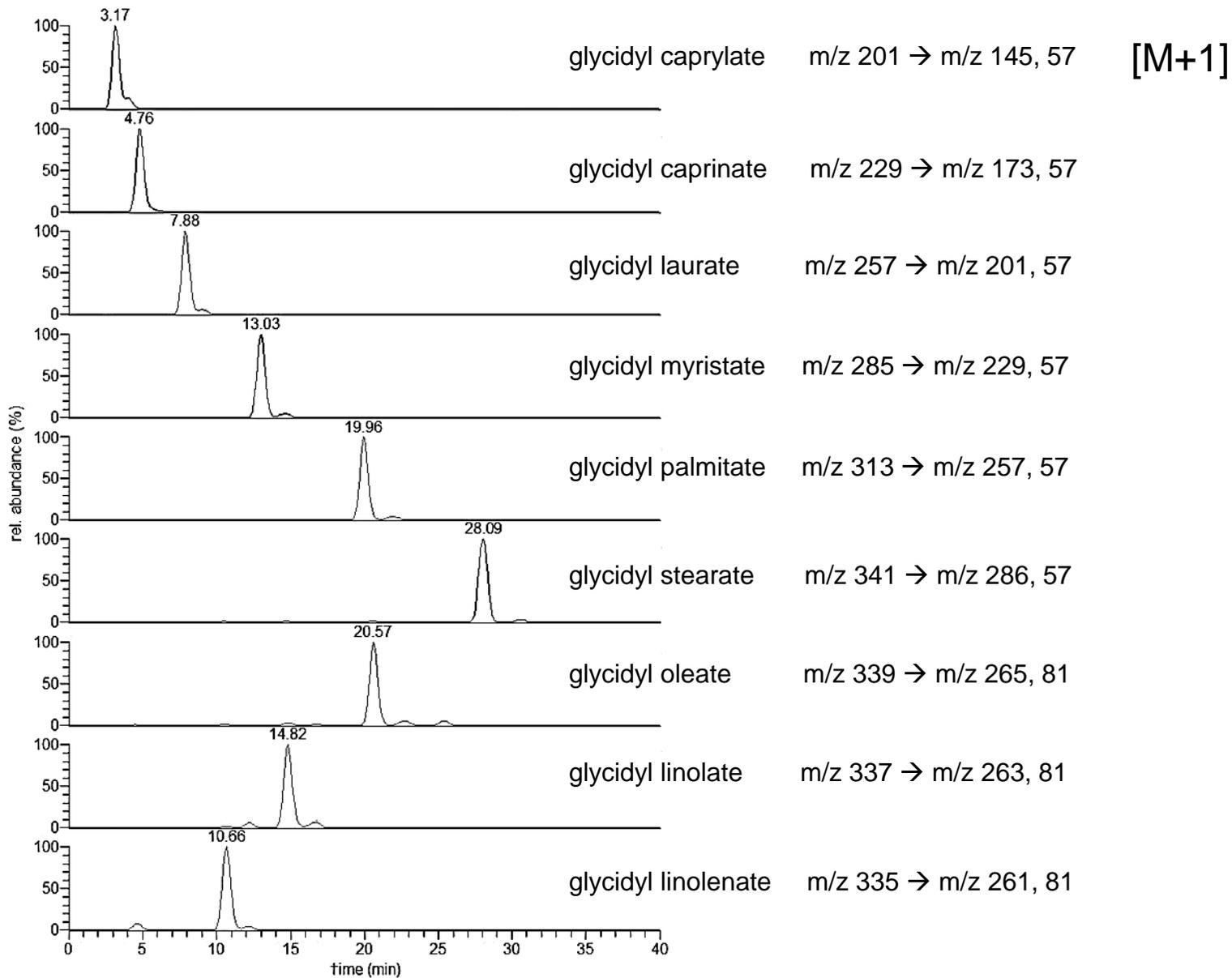
Dubois, AOCS, 2011

- Vorhandene stabilisotopen-markierte Standards (kommerziell erhältlich)
  - 3-MCPD-1,2-Diester: 7 Standards
  - 3-MCPD-1-Monoester: 4 Standards
  - 2-MCPD-1,3-Diester: 3 Standards
  - 2-MCPD-1-Monoester: 1 Standard
  - Glycidylester: 9 Standards

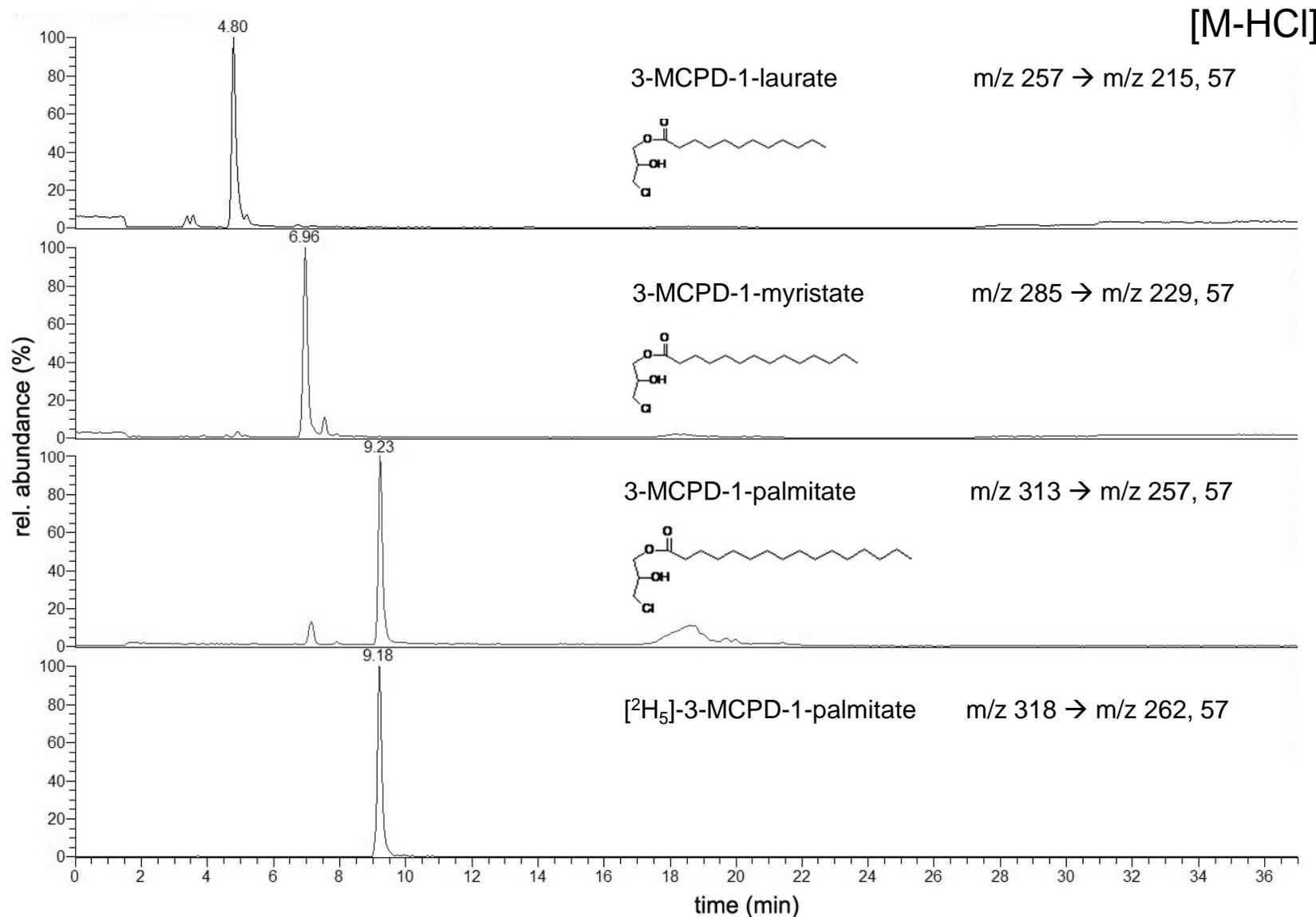
- Entwicklung einer direkten Quantifizierungsmethode der FE basierend auf Stabilisotopenverdünnungsassays mittels LC-MS/MS
- Bestimmung der freien Verbindungen unter Verwendung einer etablierten GC-MS-Methode (in Anlehnung an SGS „3 in 1“-Methode)



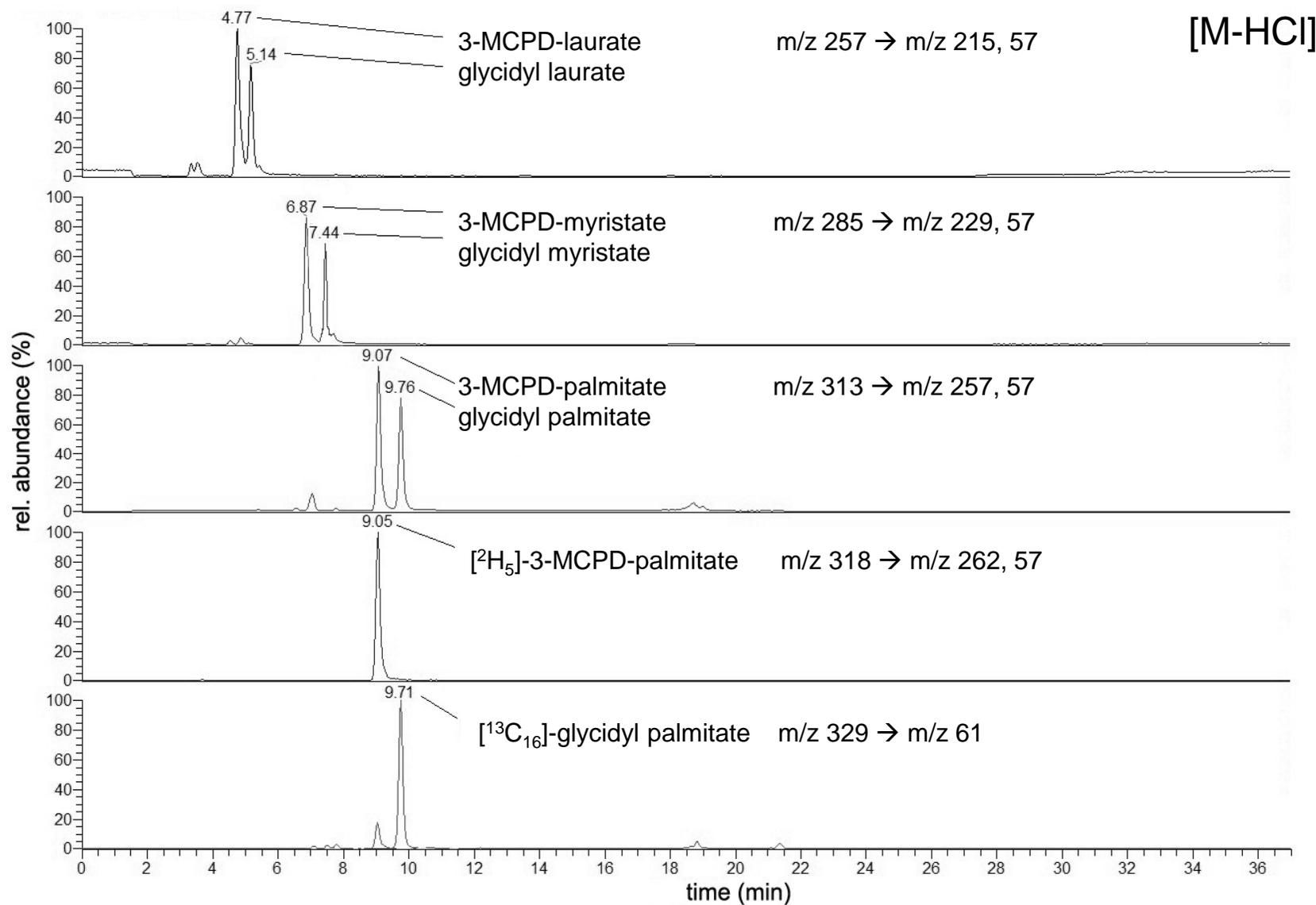
# LC-MS/MS (ESI+) – Glycidyl-FE



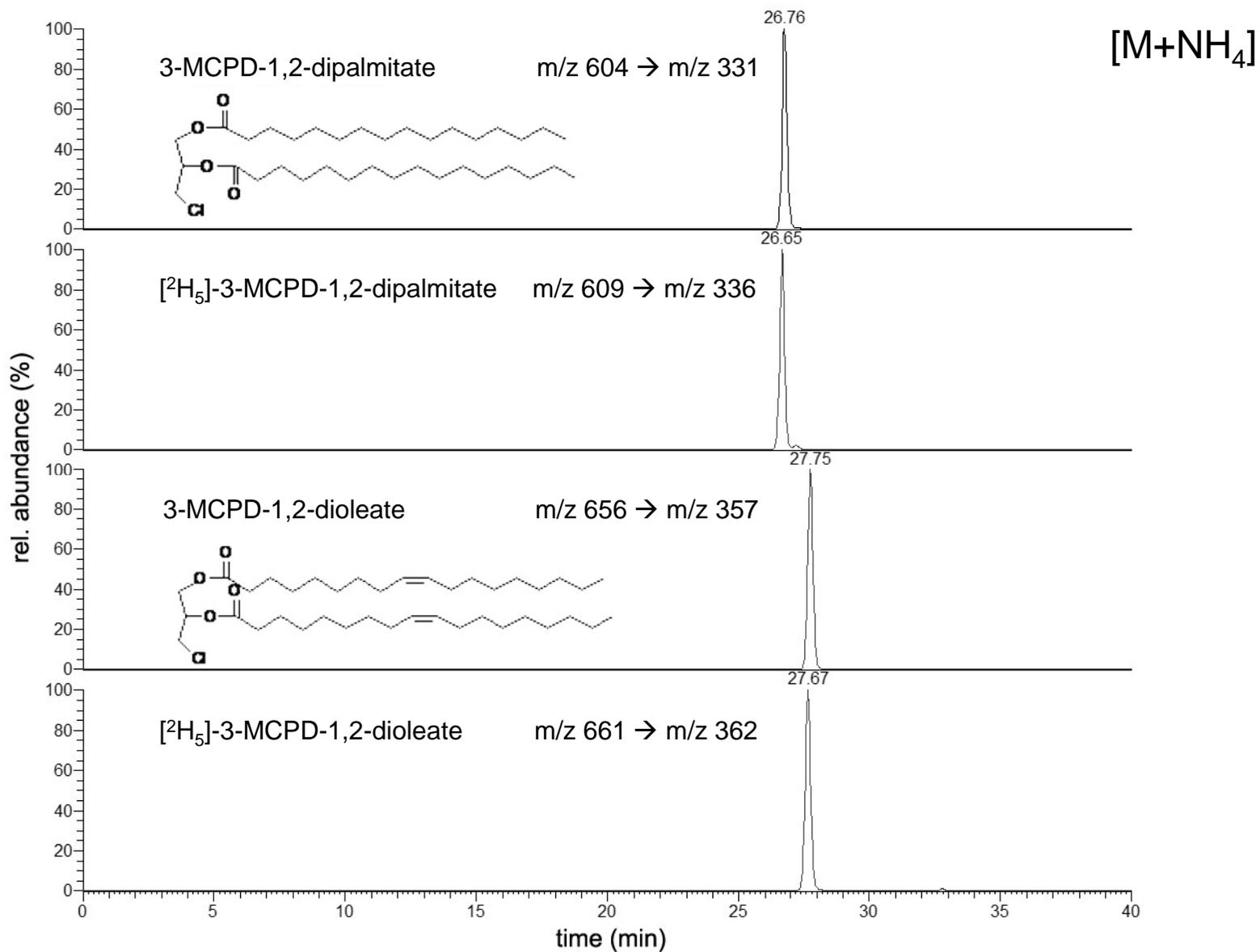
# LC-MS/MS (APCI+) – 3-MCPD-1-Monoester



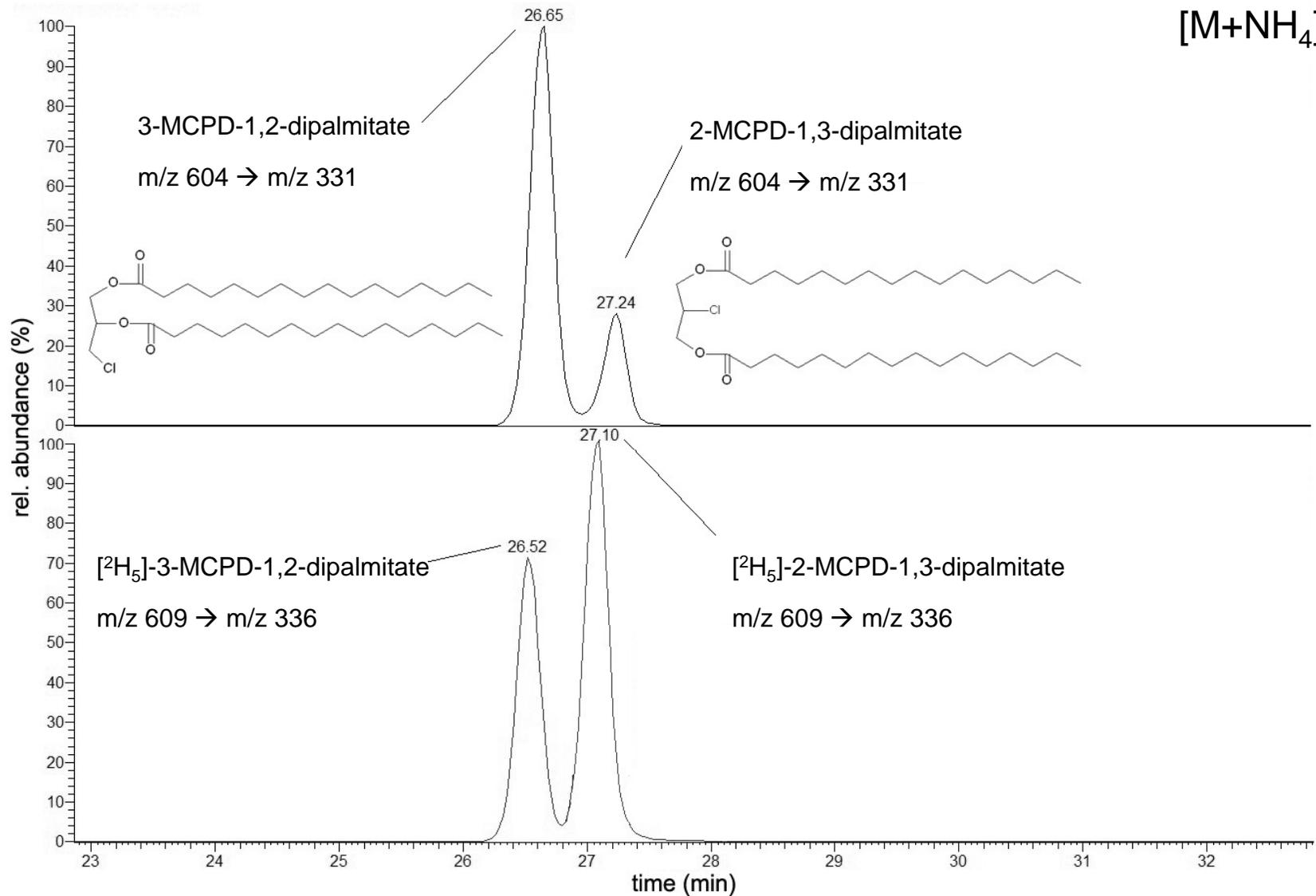
# Trennung von Glycidyl-Ester und 3-MCPD-1-Monoester (APCI+)



# LC-MS/MS (ESI+) – 3-MCPD-1,2-Diester

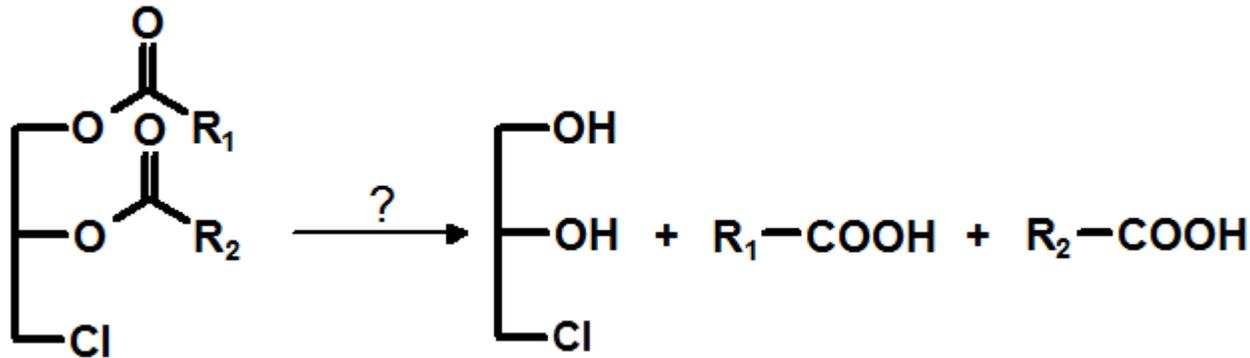


# Trennung von 3-MCPD-1,2-Diester und 2-MCPD-1,3-Diester (ESI<sup>+</sup>)



# Enzymatische Stabilität der Ester

- Entstehung von freiem MCPD und freiem Glycidol aus ihren Fettsäureestern ?



→ enzymatisch durch Lipasen

→ hitze-induziert

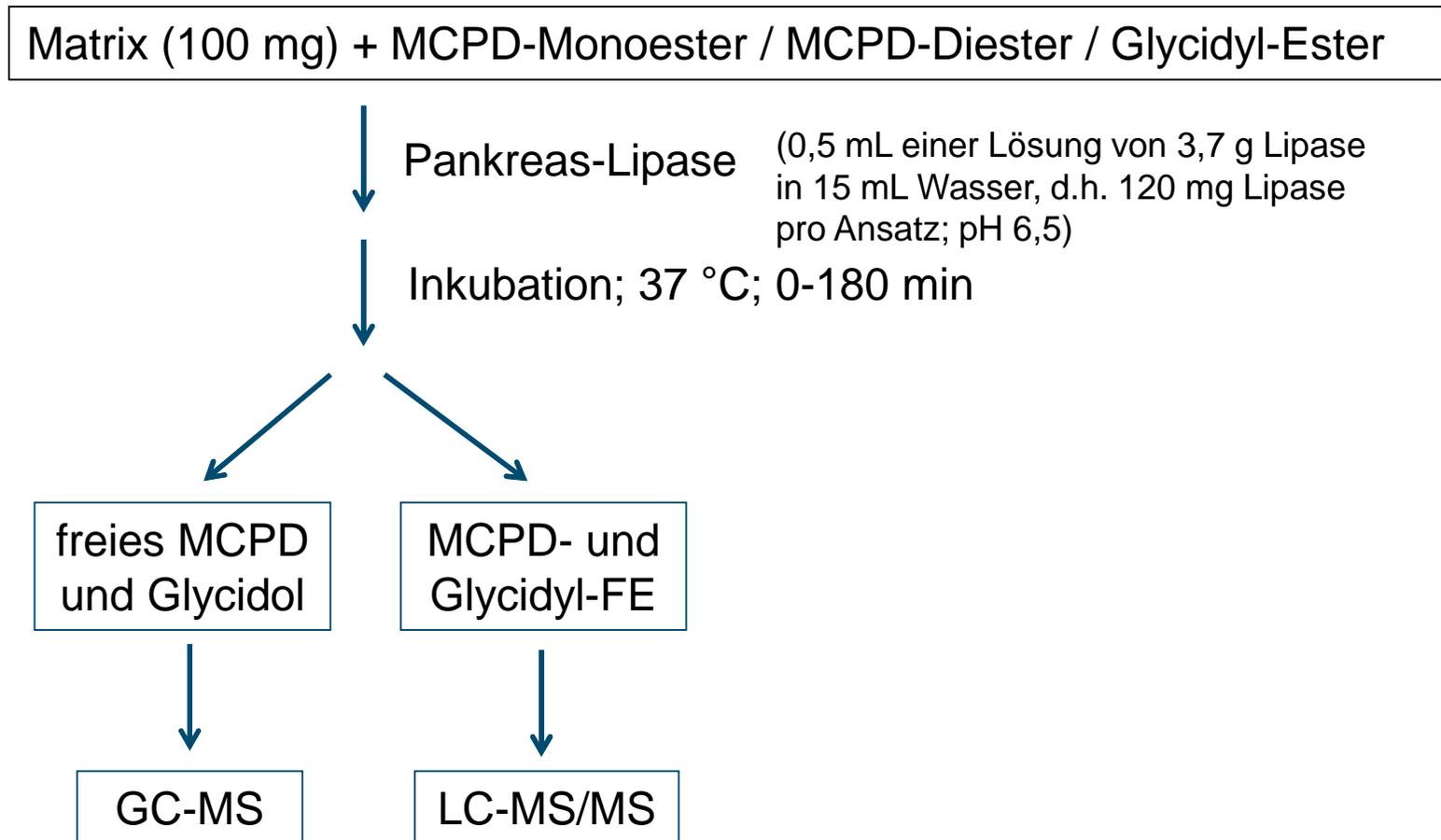
## Seefelder *et al.* (2008)

- Inkubation von 3-MCPD-Estern mit Pankreas-Lipase *in vitro*
  - Hydrolyse von 3-MCPD-1-Monoestern (-stearat, -oleat, -palmitat, and -myristat)
    - nach 1 min > 95 %
  - Hydrolyse von 3-MCPD-palmitat-oleat:
    - nach 1 min ca. 45 %
    - nach 5 min ca. 65 %
    - nach 90 min > 95 %

Seefelder, W.; Varga, N.; Studer, A.; Williamson, G.; Scanlan, F. P.; Stadler, R. H. **Esters of 3-chloro-1,2-propanediol (3-MCPD) in vegetable oils: Significance in the formation of 3-MCPD.** *Food Additives & Contaminants, Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment* **2008**, 25, 391-400.

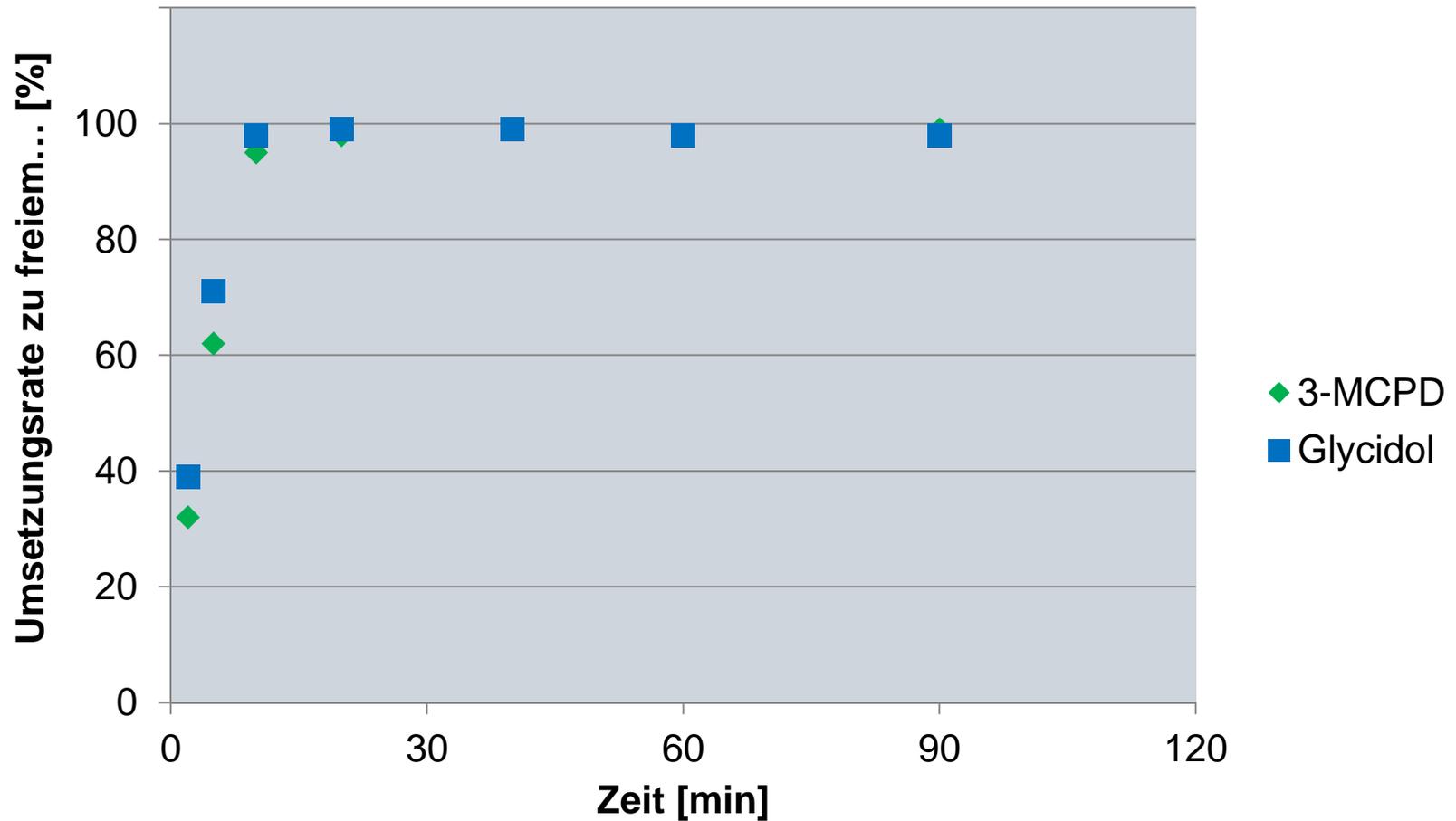
# Enzymatische Stabilität der MCPD- und Glycidyl-FE in Modellversuchen

- Versuchsaufbau
  - Hydrolyse der FE unter Verwendung von Pankreas-Lipase in einer Ölmatrix



# Enzymatische Stabilität der MCPD- und Glycidyl-FE in Modellversuchen

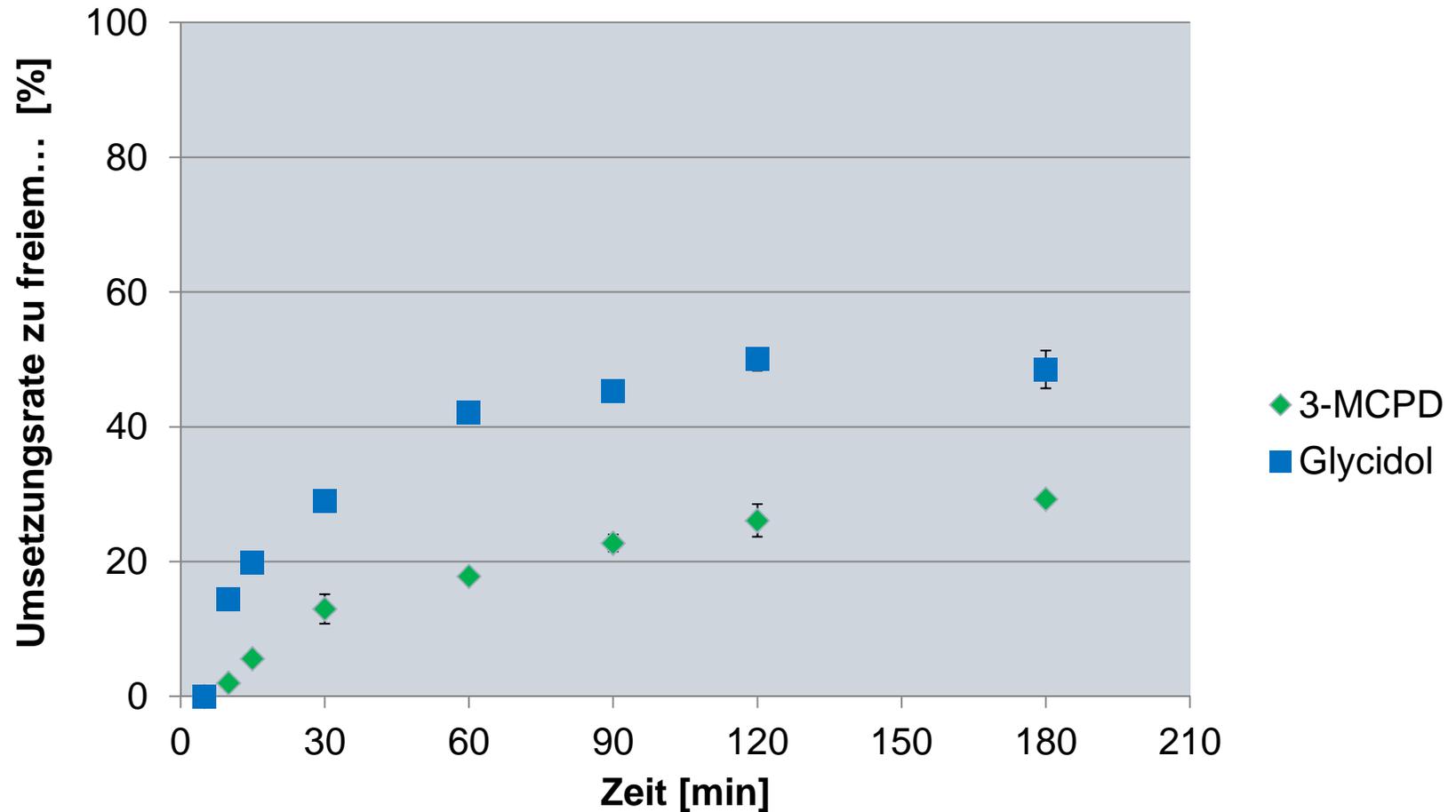
- als Funktion der Zeit in Wasser...



3-MCPD-1-palmitat und Glycidylstearat wurden als Modellverbindungen verwendet.

# Enzymatische Stabilität der MCPD- und Glycidyl-FE in Modellversuchen

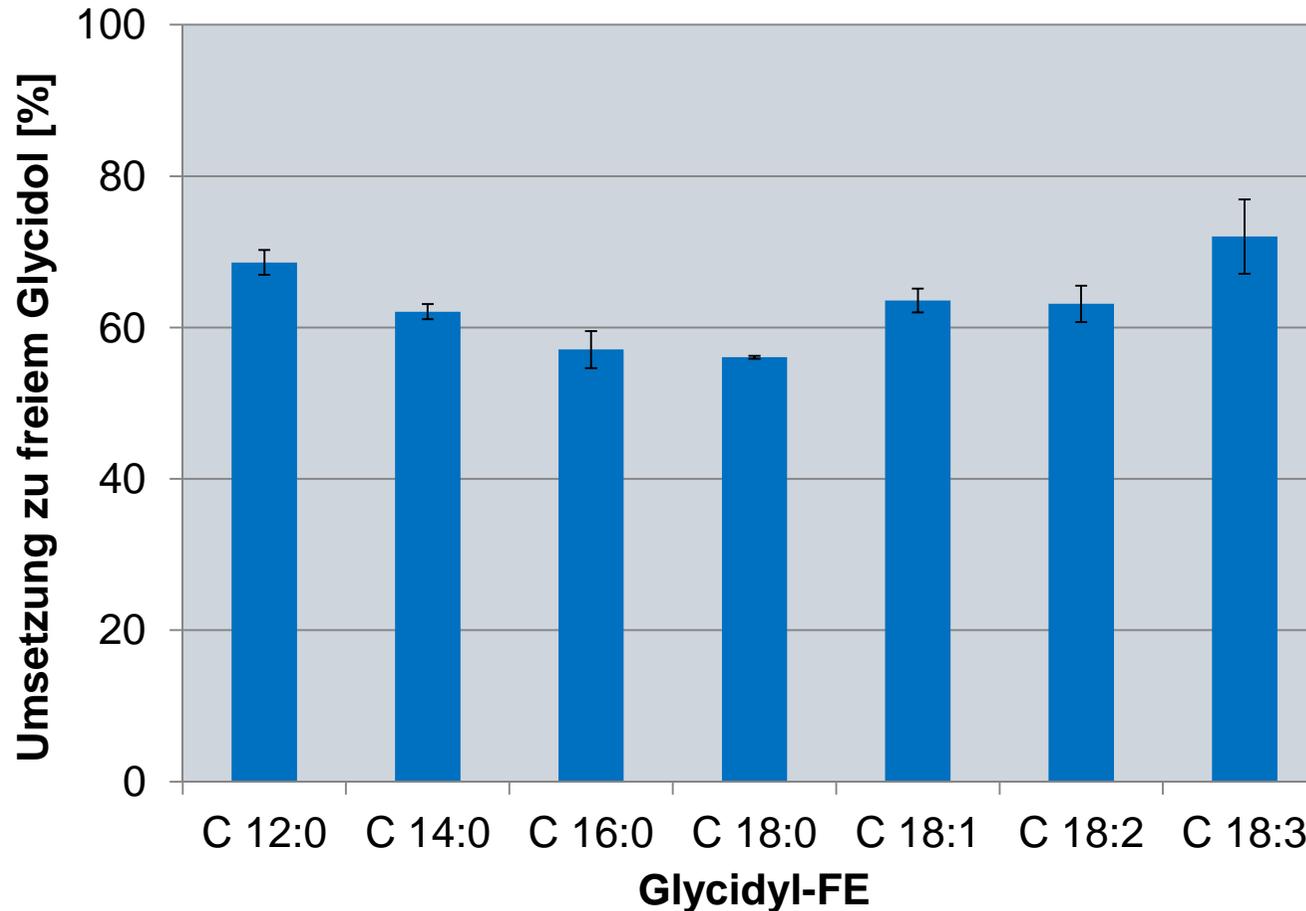
- als Funktion der Zeit in Olivenöl...



3-MCPD-1-palmitat und Glycidylstearat wurden als Modellverbindungen verwendet.

# Enzymatische Stabilität der MCPD- und Glycidyl-FE in Modellversuchen

- als Funktion der Fettsäure-Art



Die Proben wurden bei 37°C für 120 min inkubiert.

# Enzymatische Stabilität der MCPD- und Glycidyl-FE in Modellversuchen

- weitere Ergebnisse
  - Stabilität unabhängig von...
    - der Enzymmenge
    - der Ölmenge ( $\geq 50$  mg)
    - der Art des verwendeten Öls.

Stabilität in Abhängigkeit von der Struktur der MCPDs und der Art der Matrix ?



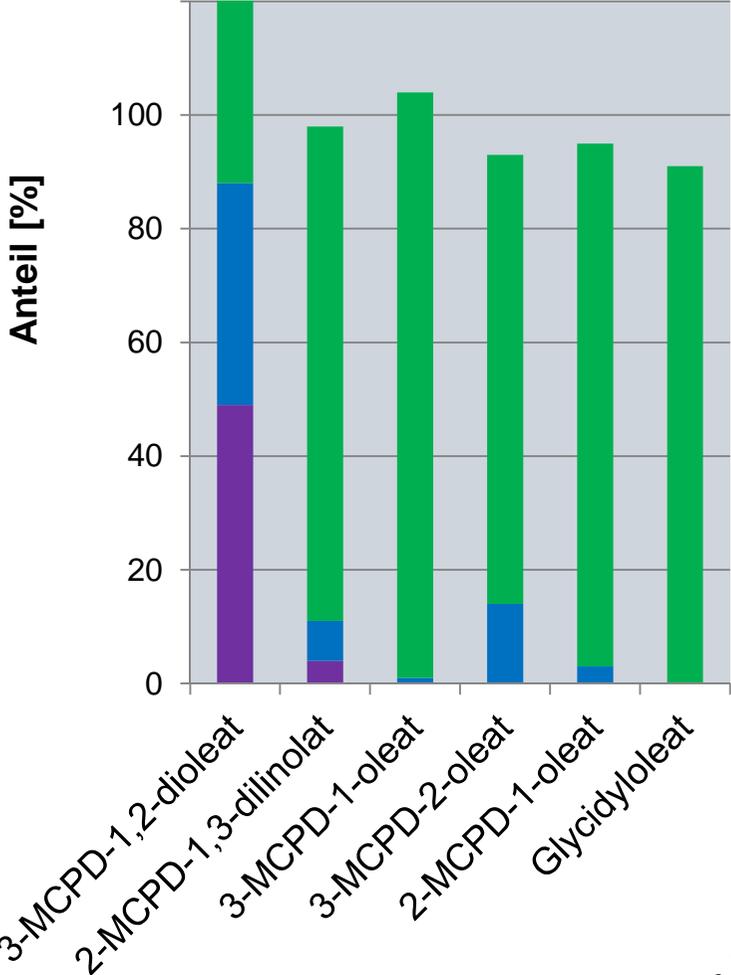
# Enzymatische Stabilität der MCPD- und Glycidyl-FE in Wasser (nach 2 h)

Ausgangssubstanz	Summe [%]	Diester [%]	Monoester [%]	freie Verbindung [%]
3-MCPD-1,2-dioleat	121	49	39	33
2-MCPD-1,3-dilinolat	97	4	7	87
3-MCPD-1-oleat	104	-	1	103
3-MCPD-2-oleat	93	-	14	79
2-MCPD-1-oleat	95	-	3	92
Glycidyloleat	91	-	< NG <sup>a</sup>	91

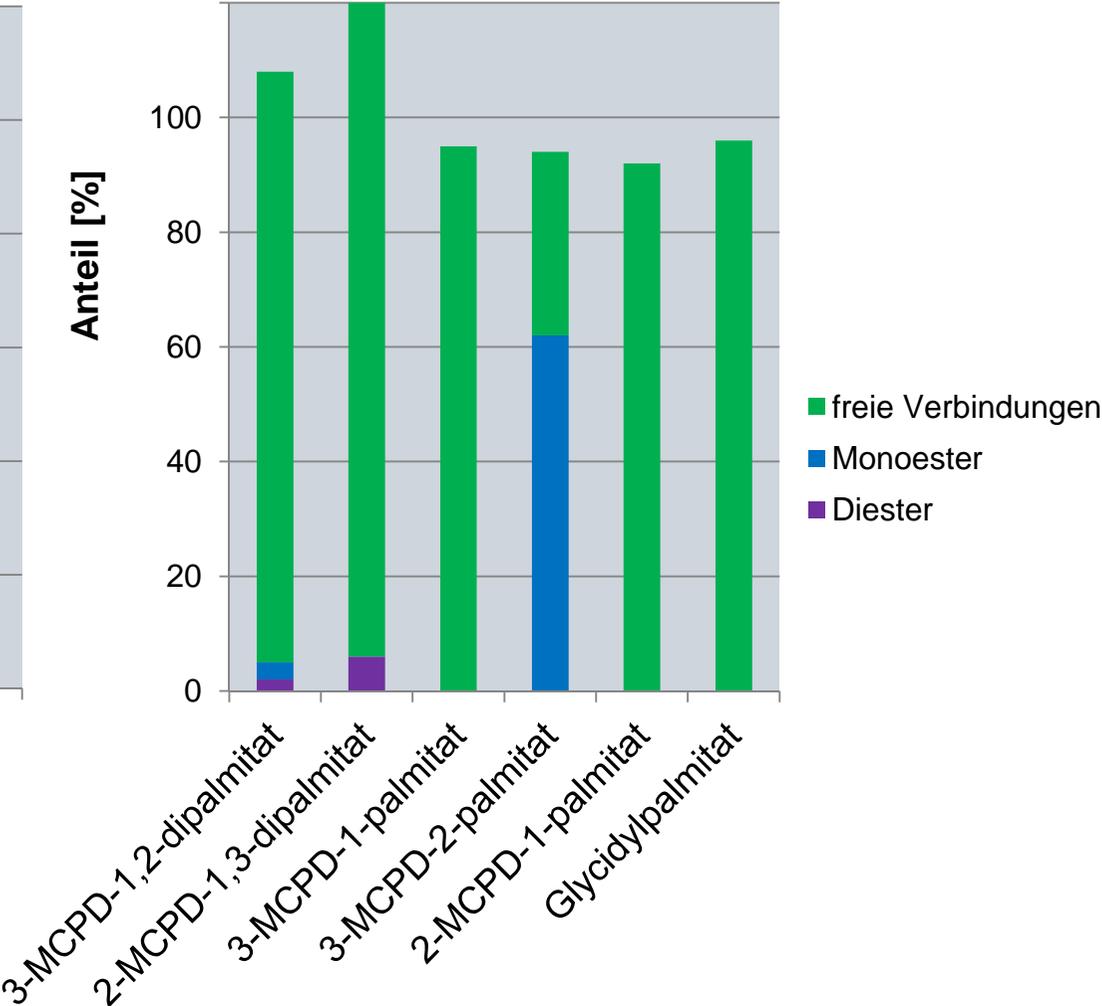
Ausgangssubstanz	Summe [%]	Diester [%]	Monoester [%]	freie Verbindung [%]
3-MCPD-1,2-dipalmitat	105	2	3	103
2-MCPD-1,3-dipalmitat	123	6	< NG <sup>a</sup>	117
3-MCPD-1-palmitat	95	-	< NG <sup>a</sup>	95
3-MCPD-2-palmitat	94	-	62	32
2-MCPD-1-palmitat	92	-	< NG <sup>a</sup>	92
Glycidylpalmitat	96	-	< NG <sup>a</sup>	96

# Enzymatische Stabilität der MCPD- und Glycidyl-FE in Wasser (nach 2 h)

**Oleat-Ester**

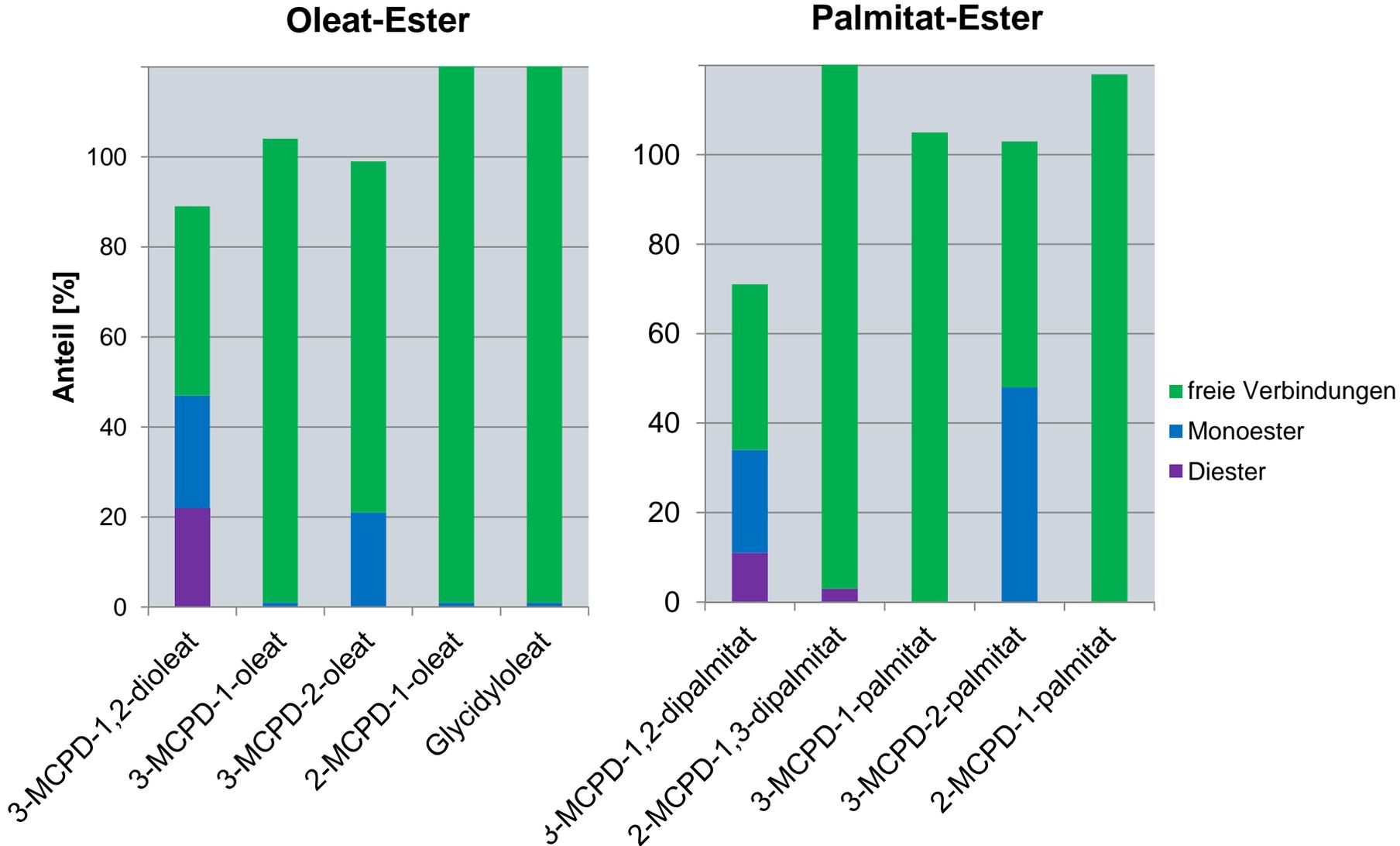


**Palmitat-Ester**

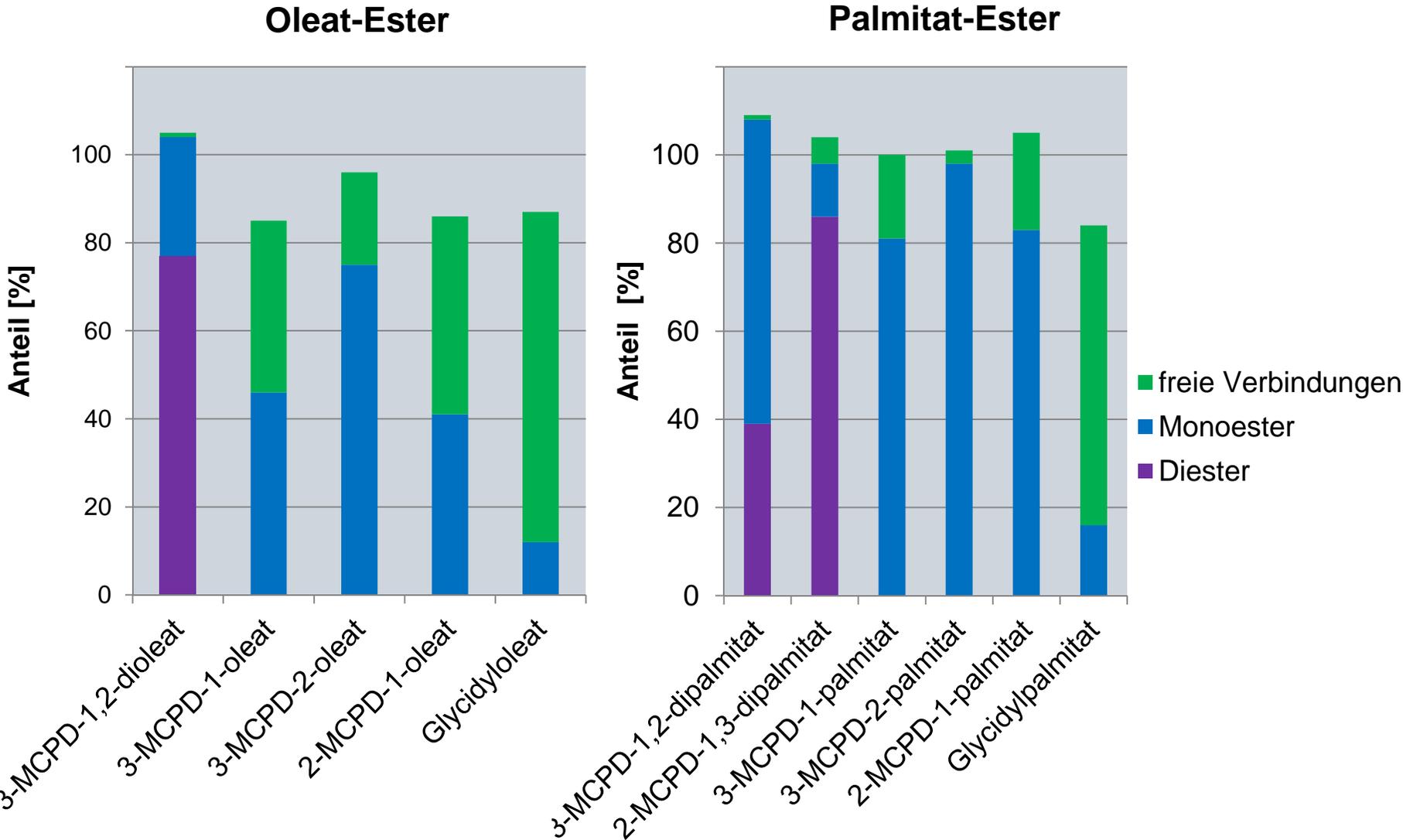


- freie Verbindungen
- Monoester
- Diester

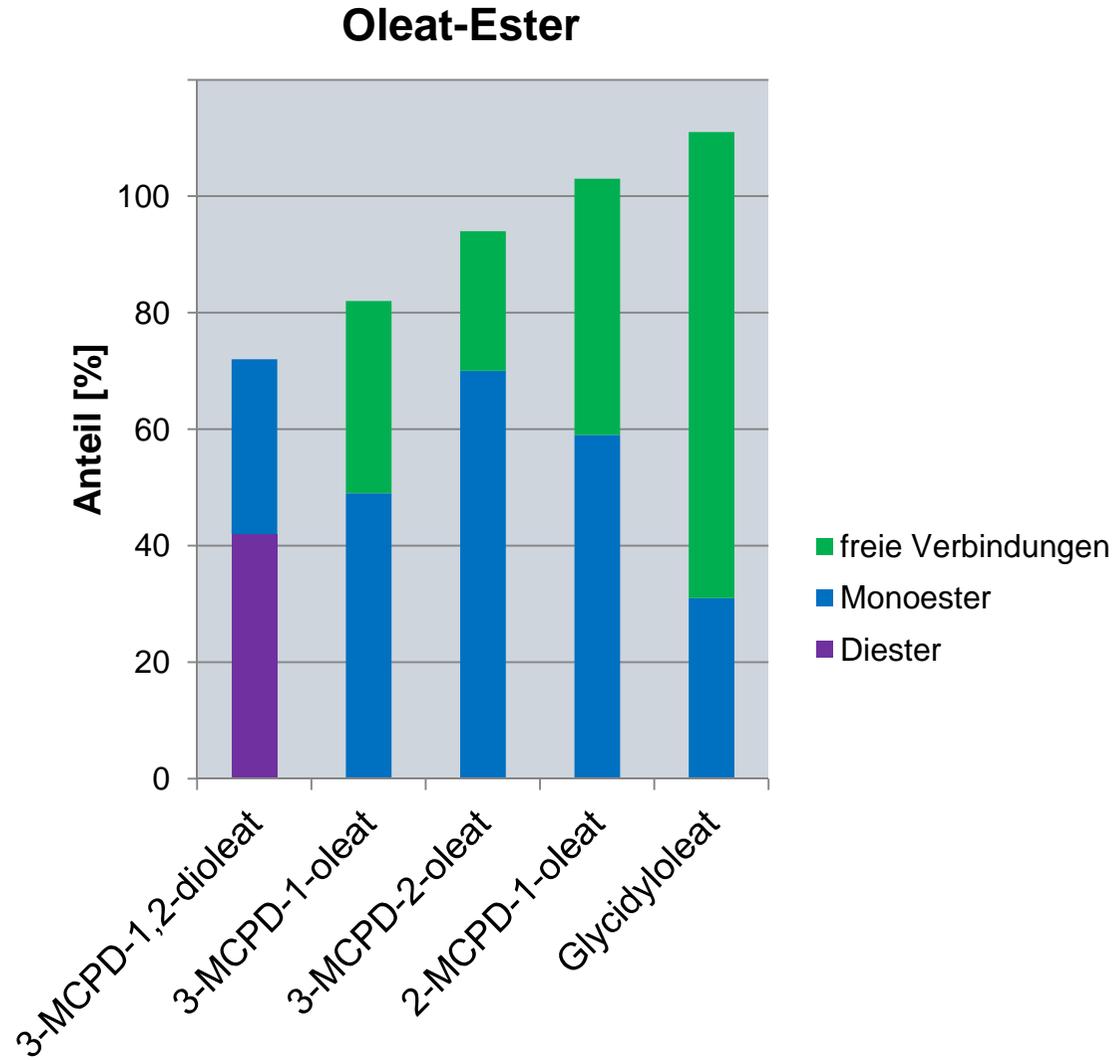
# Enzymatische Stabilität der MCPD- und Glycidyl-FE in Tridecan (nach 2 h)



# Enzymatische Stabilität der MCPD- und Glycidyl-FE in Olivenöl (nach 2 h)



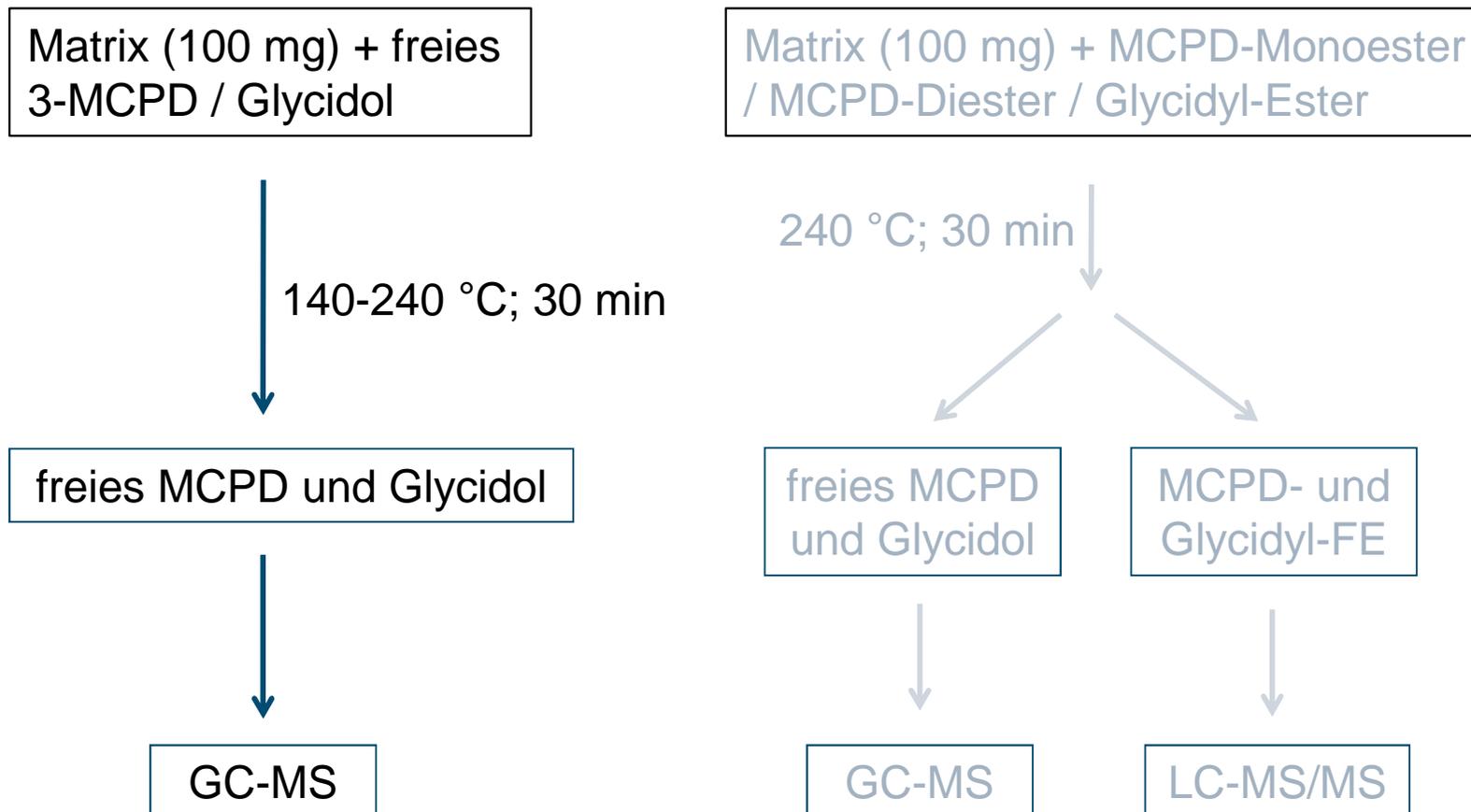
# Enzymatische Stabilität der MCPD- und Glycidyl-FE in Sonnenblumenöl (nach 2 h)



# Thermische Stabilität der Ester

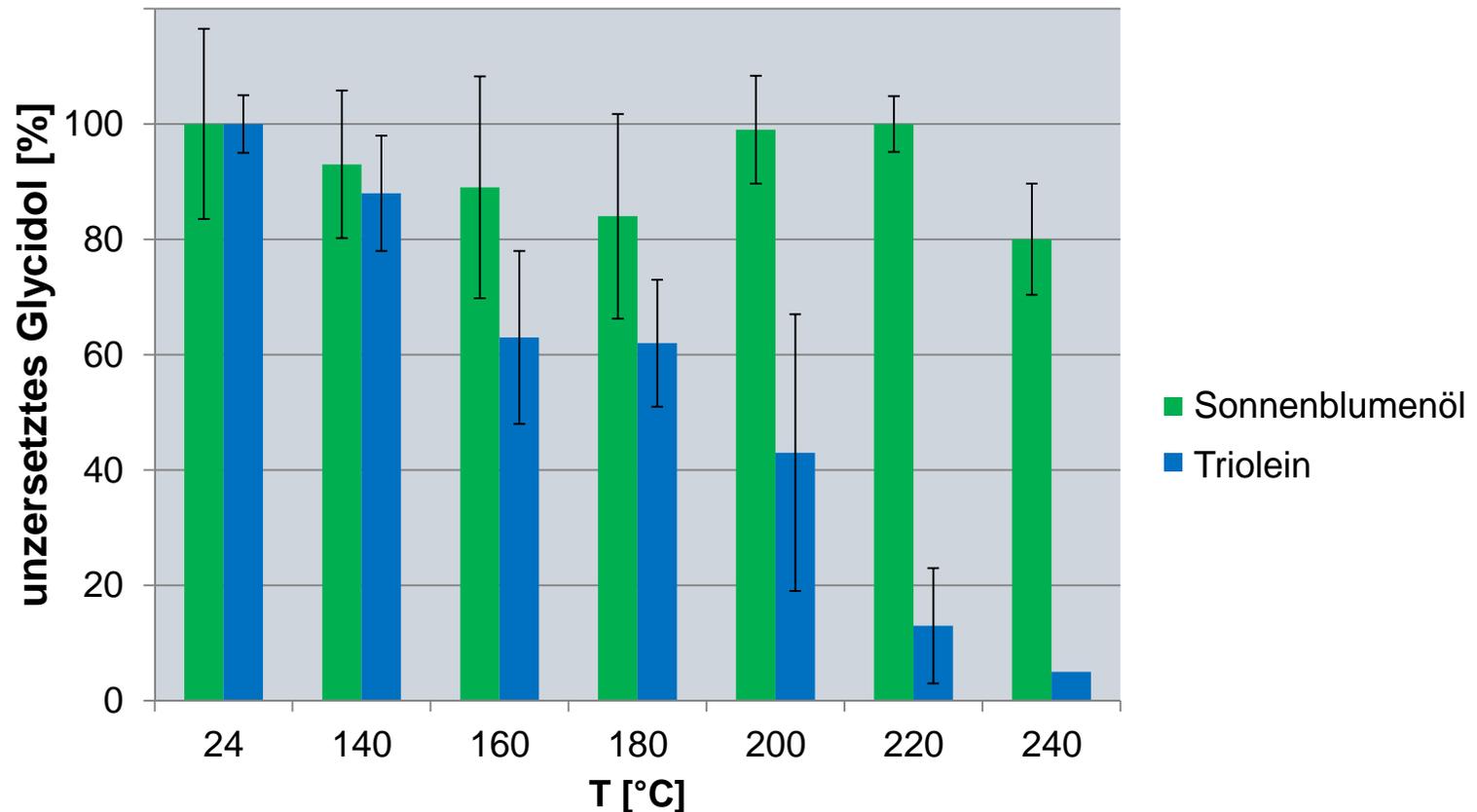
# Thermische Stabilität der MCPD- und Glycidyl-FE in Modellversuchen

- Versuchsaufbau
  - Erhitzung der Modellansätze mit Sonnenblumenöl bzw. einem Triglycerid als Matrix bei verschiedenen Temperaturen



# Thermische Stabilität von freiem MCPD- und Glycidol in Modellversuchen

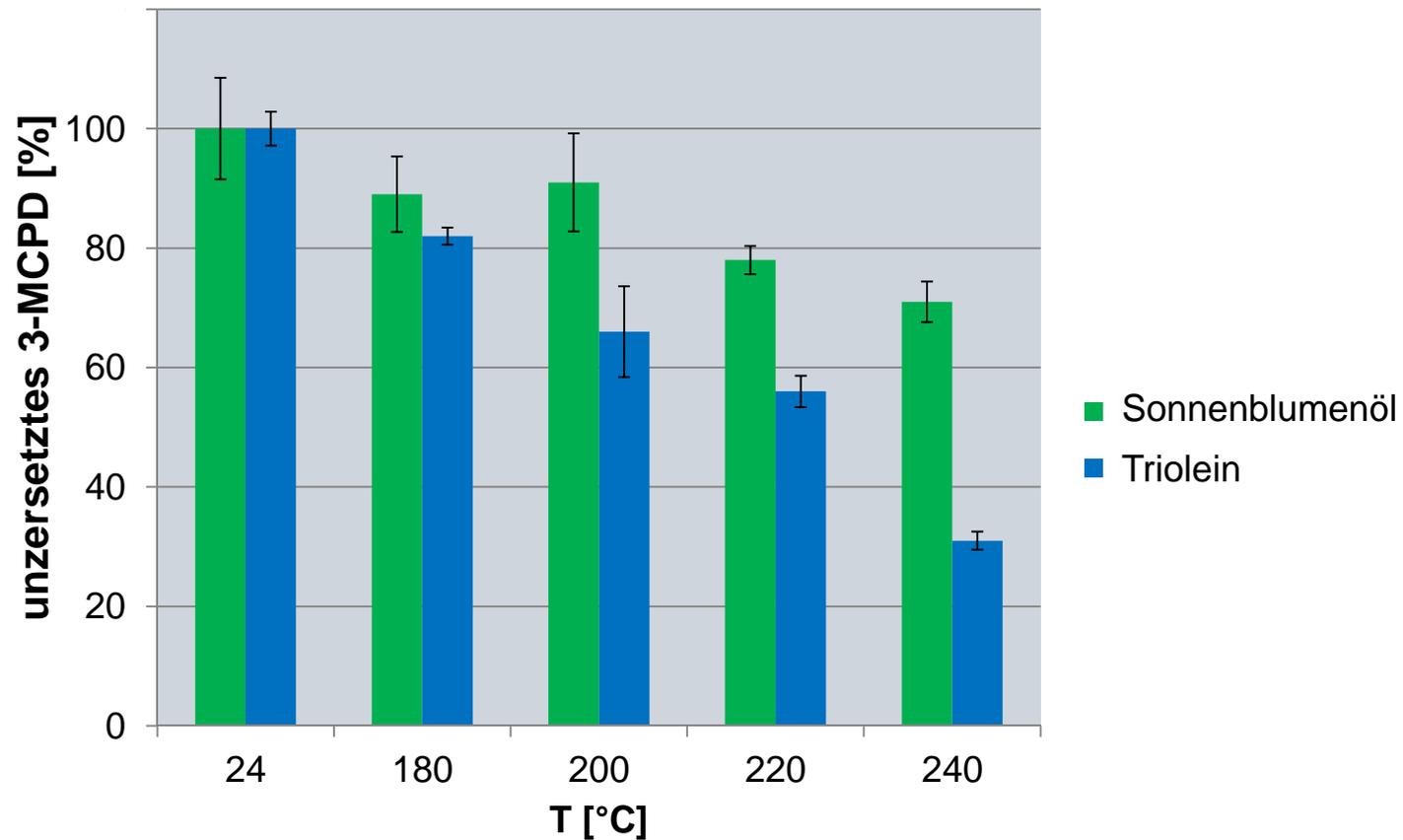
- Zersetzungstemperatur von Glycidol: 162°C



- Anstieg der Glycidol-Konzentration mit zunehmender Temperatur ( $\geq 180$  °C) in purem Sonnenblumenöl ohne Glycidol-Zugabe

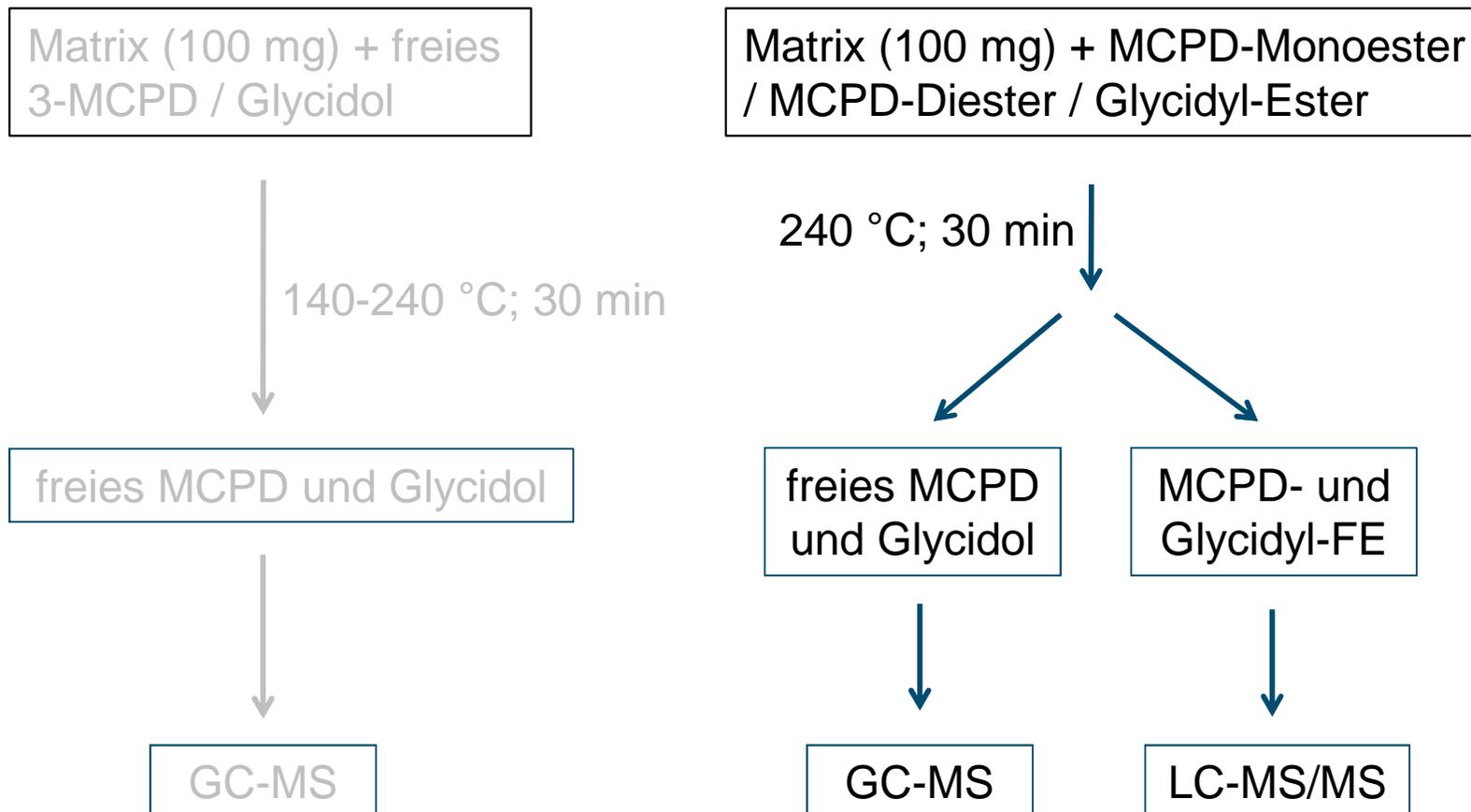
# Thermische Stabilität von freiem MCPD- und Glycidol in Modellversuchen

- Zersetzungstemperatur von 3-MCPD: 213°C



# Thermische Stabilität der MCPD- und Glycidyl-FE in Modellversuchen

- Versuchsaufbau
  - Erhitzung der Modellansätze mit Sonnenblumenöl bzw. einem Triglycerid als Matrix bei verschiedenen Temperaturen



# Thermische Stabilität der MCPD- und Glycidyl-FE in Modellversuchen

MCPD- und Glycidyl-FE	Umsetzung zu freiem MCPD bzw. Glycidol [%]
3-MCPD-1,2-dipalmitat	< NG
2-MCPD-1,3-dipalmitat	< NG
3-MCPD-1-palmitat	< NG
2-MCPD-1-palmitat	< NG
Glycidylpalmitat	< NG

Erhitzung in 100 mg  
Triolein bei 240 °C für  
30 min

Nachweisgrenzen (NG)

3-MCPD: 30 µg/kg

2-MCPD: 50 µg/kg

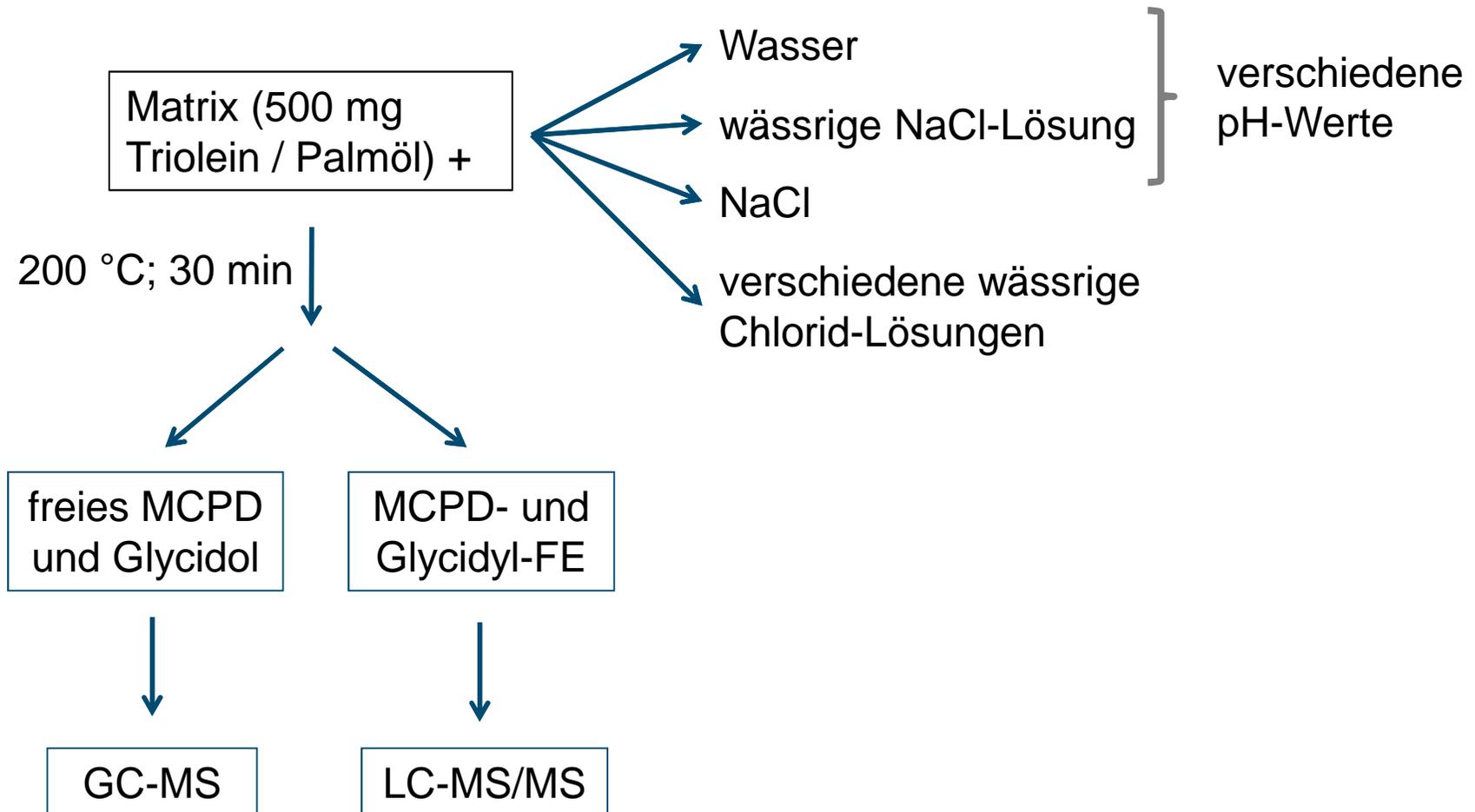
Glycidol: 10 µg/kg

MCPD- und Glycidyl-FE	Umsetzung zu freiem MCPD bzw. Glycidol [%]	Anteil an nicht umgesetzten MCPD- und Glycidyl-FE [%]
3-MCPD-1,2-dioleat	< NG	≤ 48
2-MCPD-1,3-dilinolat	< NG	≤ 73
3-MCPD-1-oleat	< NG	≤ 8
3-MCPD-2-oleat	< NG	≤ 14
2-MCPD-1-oleat	< NG	≤ 3
Glycidyloleat	< NG	≤ 66

# **Einfluss verschiedener Zusätze auf die Entstehung von MCPD und Glycidol**

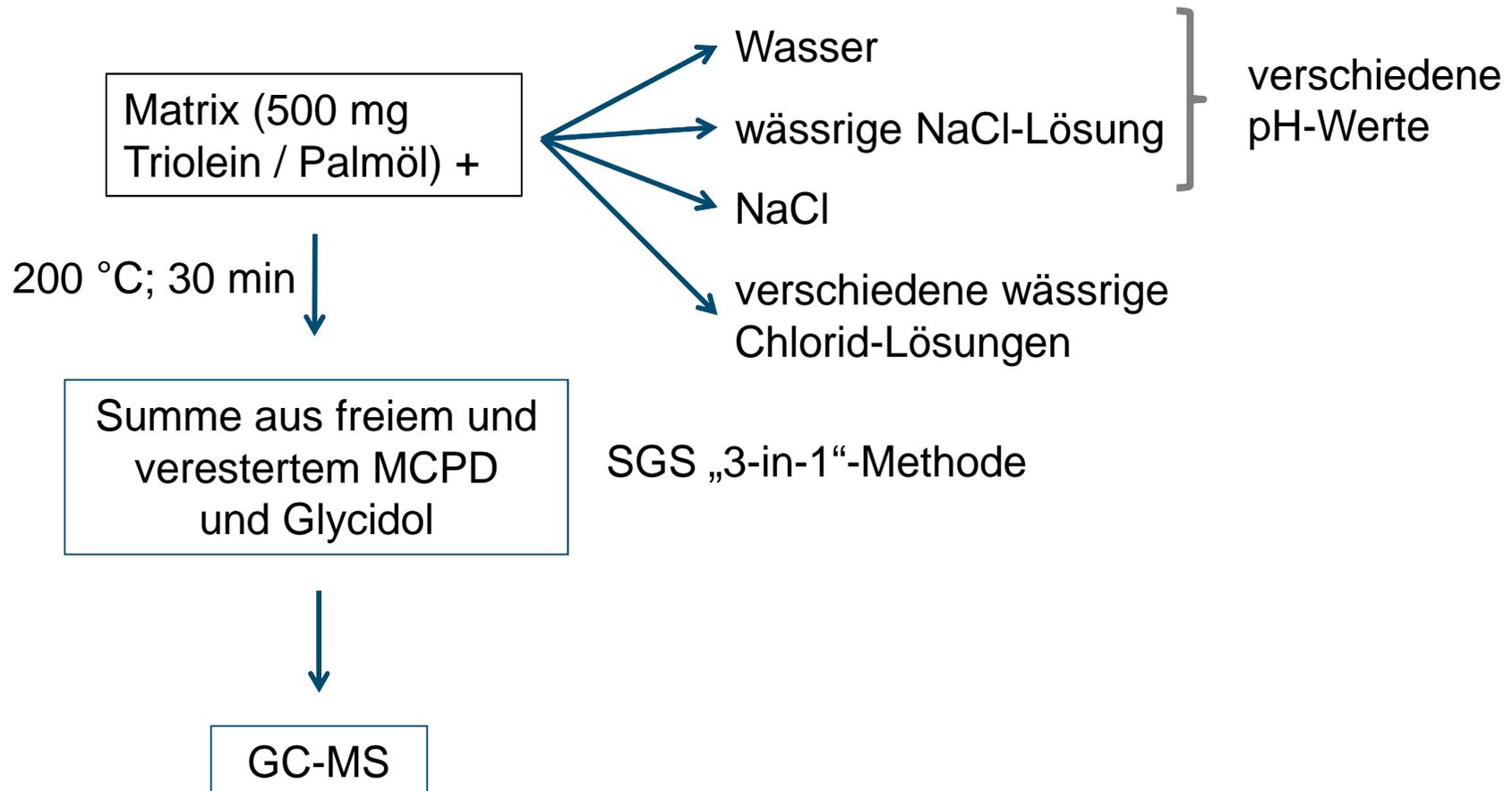
# Einfluss verschiedener Zusätze auf die Entstehung von MCPD und Glycidol

## □ Versuchsaufbau



# Einfluss verschiedener Zusätze auf die Entstehung von MCPD und Glycidol

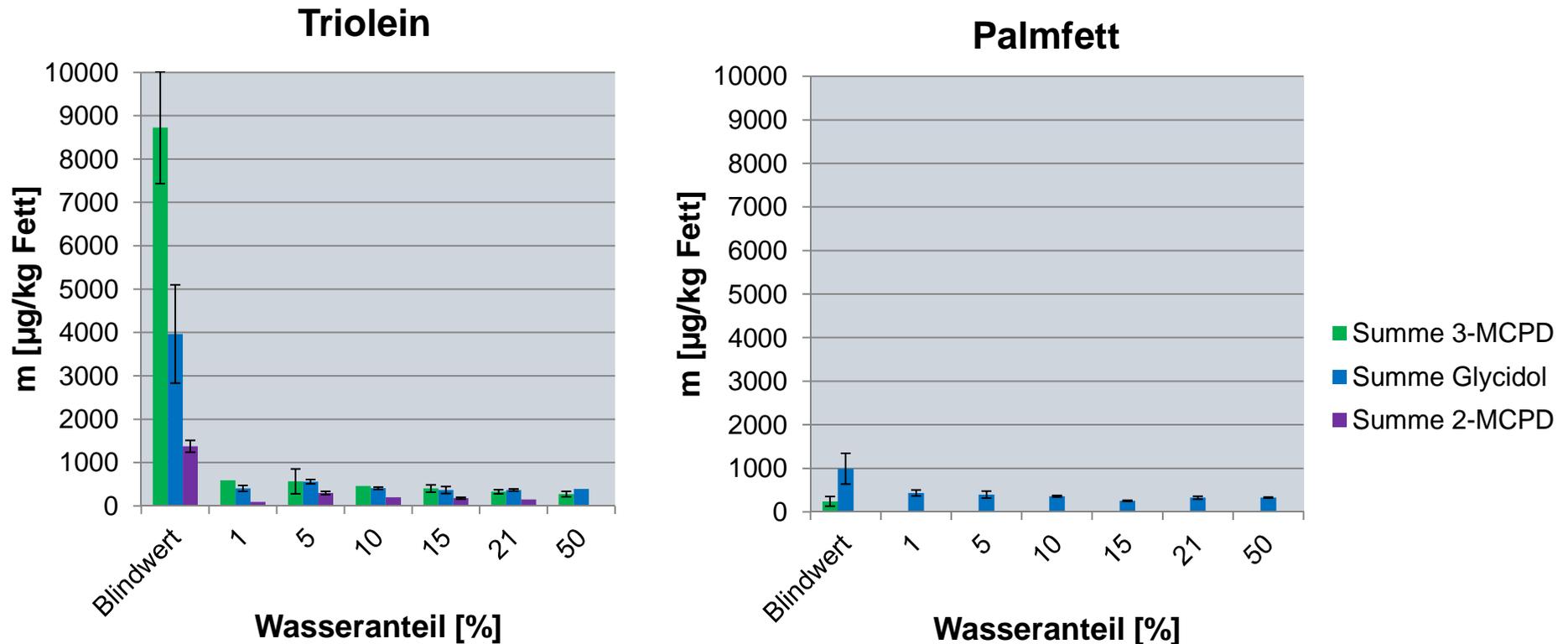
## □ Versuchsaufbau



→ Vorauswahl der Proben mit den deutlichsten Veränderungen

# Einfluss von Wasser auf die Entstehung von MCPD und Glycidol (1)

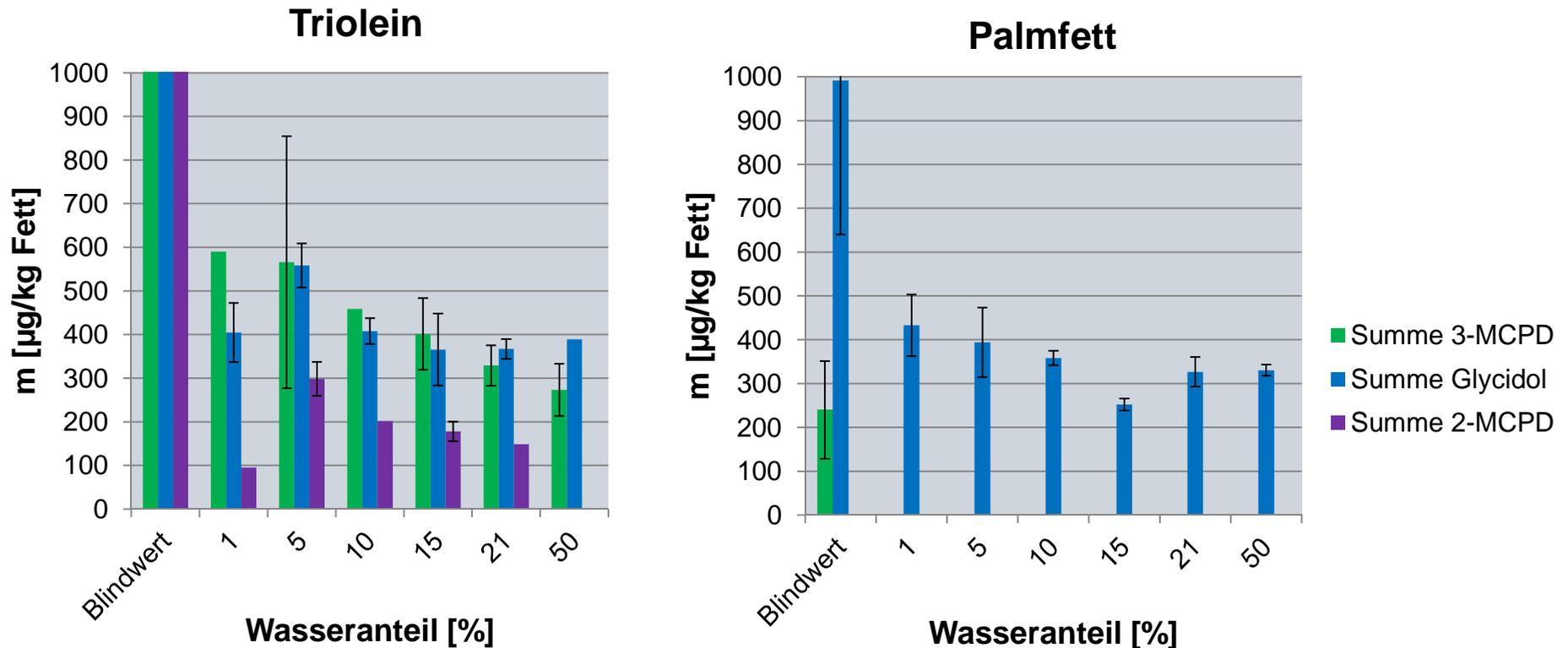
(bestimmt als Summe SGS „3-in-1“-Methode)



Bestimmungsgrenze 3-MCPD: 100 µg/kg 2-MCPD: 150 µg/kg Glycidol: 30 µg/kg

# Einfluss von Wasser auf die Entstehung von MCPD und Glycidol (2)

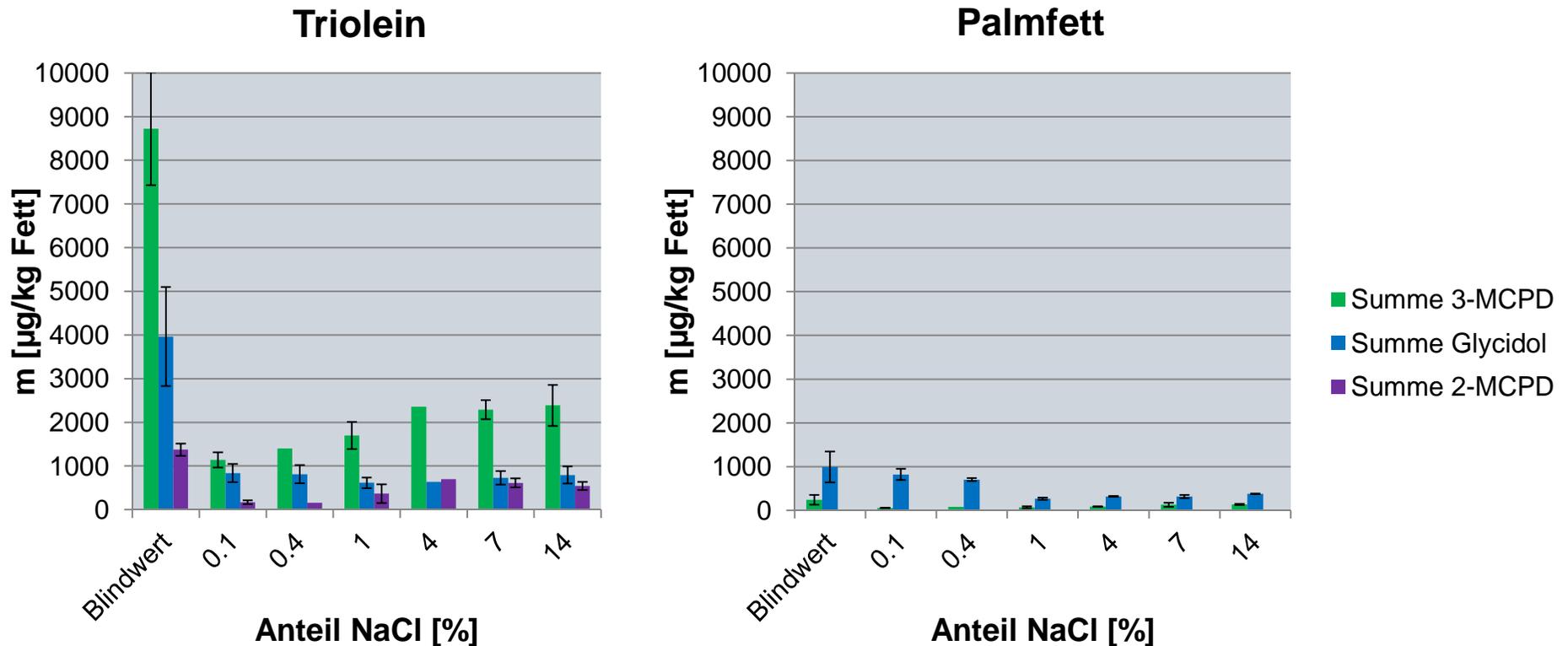
(bestimmt als Summe SGS „3-in-1“-Methode)



Bestimmungsgrenze 3-MCPD: 100 µg/kg 2-MCPD: 150 µg/kg Glycidol: 30 µg/kg

# Einfluss von wässriger NaCl-Lösung auf die Entstehung von MCPD und Glycidol (1)

(bestimmt als Summe SGS „3-in-1“-Methode)

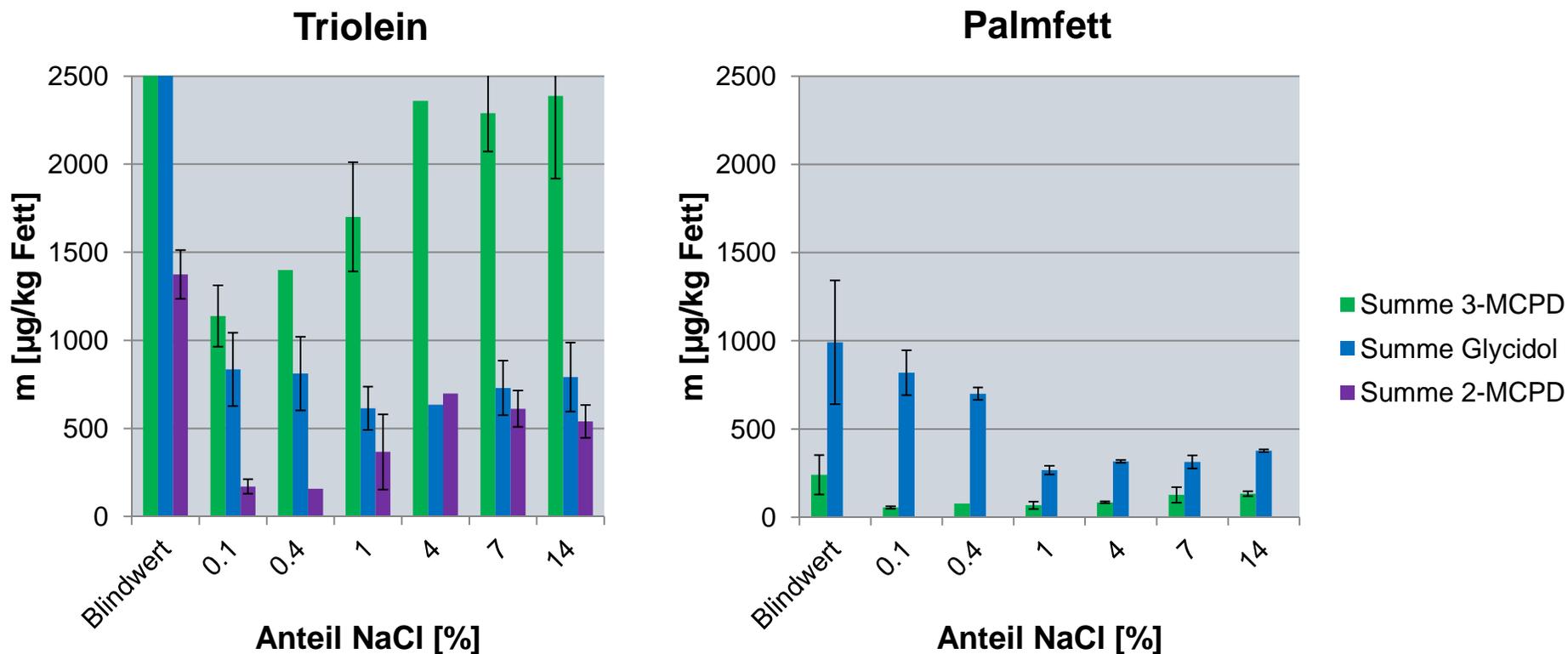


Wasseranteil ~30%

Bestimmungsgrenze 3-MCPD: 100 µg/kg 2-MCPD: 150 µg/kg Glycidol: 30 µg/kg

# Einfluss von wässriger NaCl-Lösung auf die Entstehung von MCPD und Glycidol (2)

(bestimmt als Summe SGS „3-in-1“-Methode)

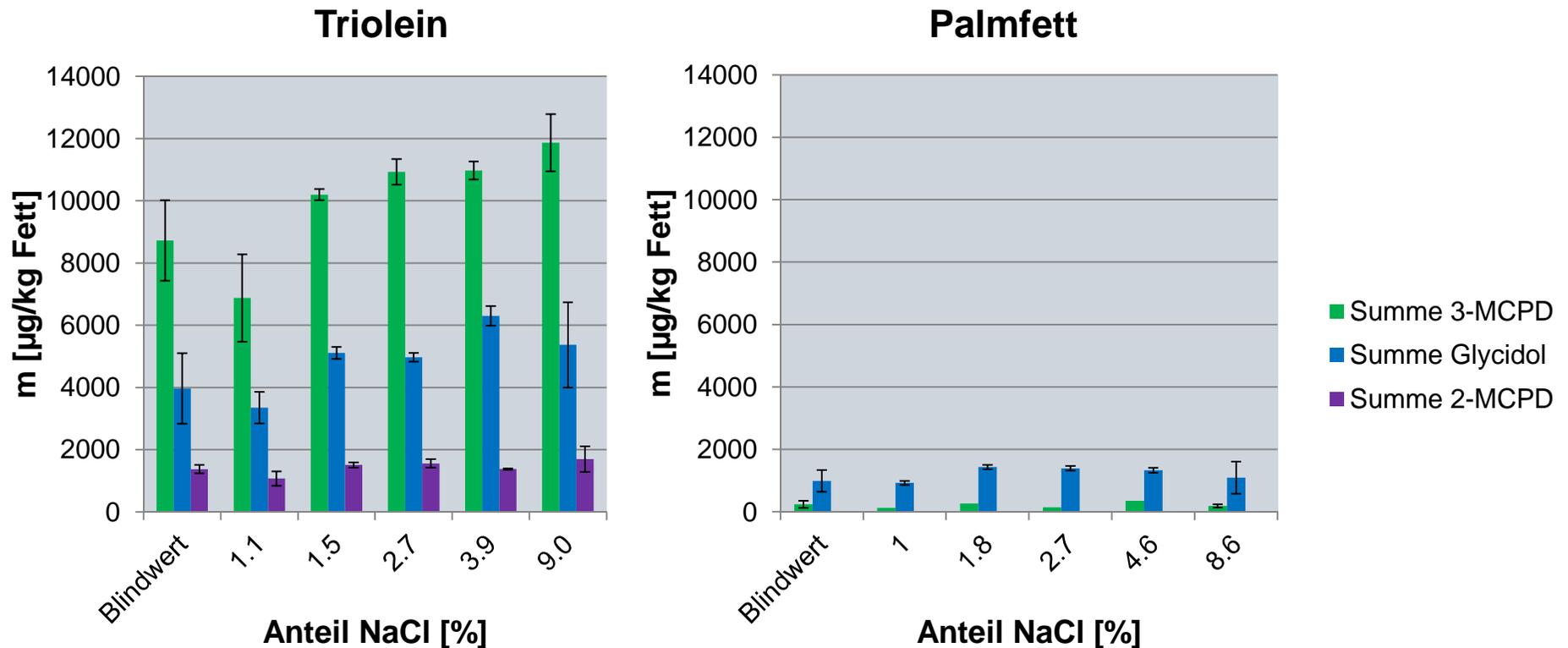


Wasseranteil ~30%

Bestimmungsgrenze 3-MCPD: 100 µg/kg 2-MCPD: 150 µg/kg Glycidol: 30 µg/kg

# Einfluss von purem NaCl auf die Entstehung von MCPD und Glycidol

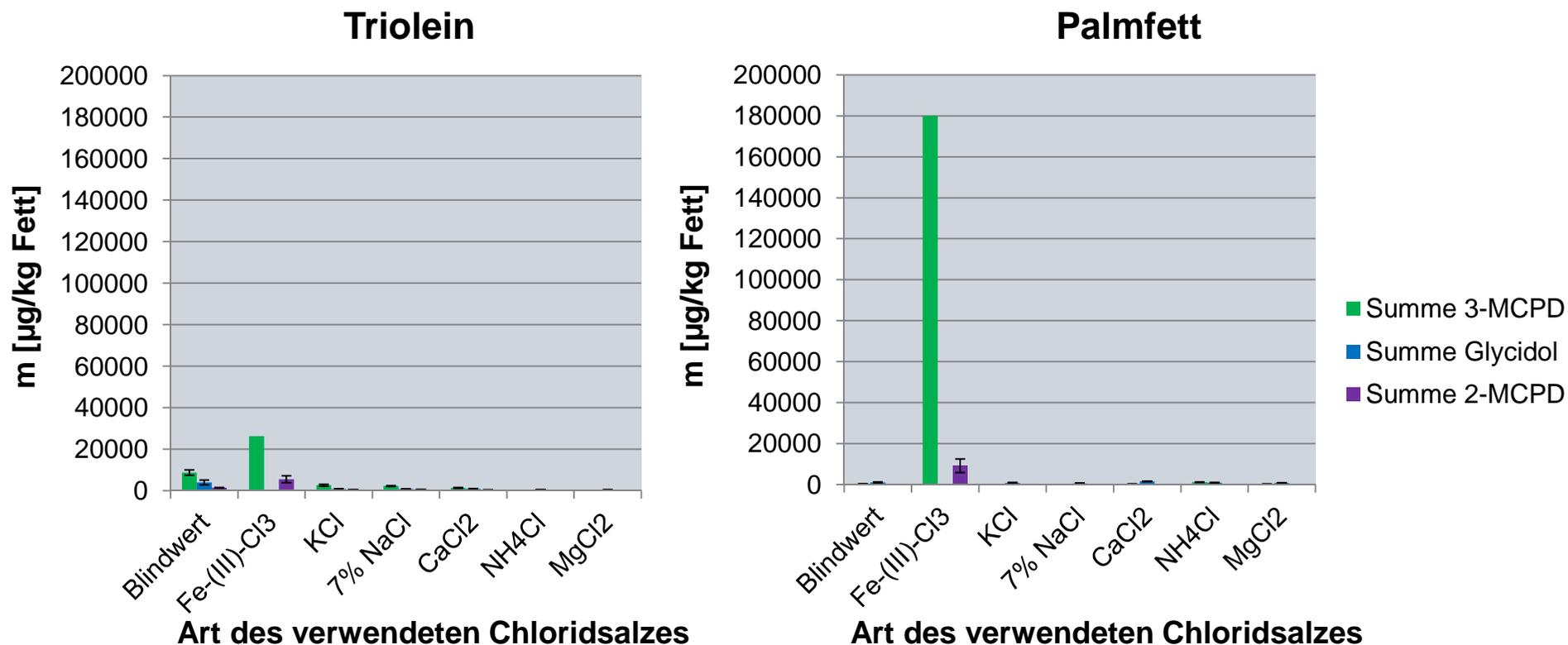
(bestimmt als Summe SGS „3-in-1“-Methode)



Bestimmungsgrenze 3-MCPD: 100 µg/kg 2-MCPD: 150 µg/kg Glycidol: 30 µg/kg

# Einfluss der Art des Chlorid-Salzes auf die Entstehung von MCPD und Glycidol (1)

(bestimmt als Summe SGS „3-in-1“-Methode)

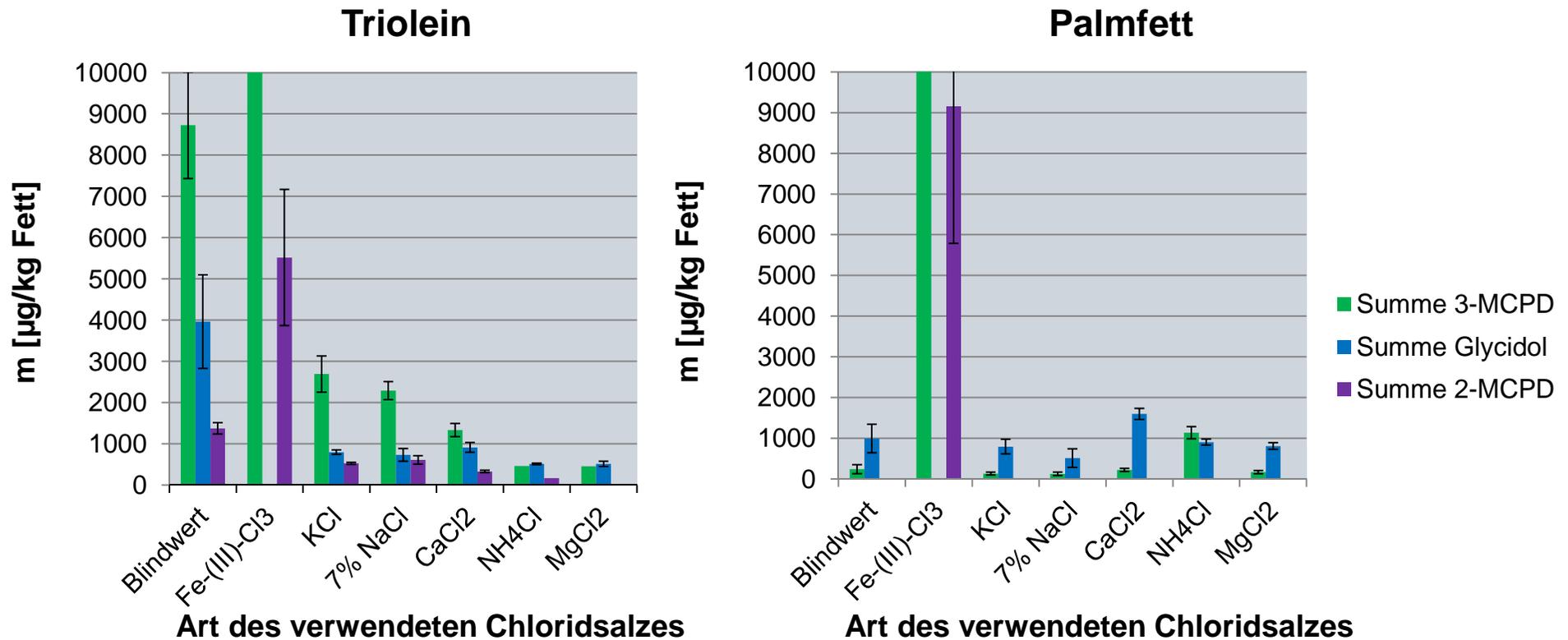


Wasseranteil ~30%

Bestimmungsgrenze 3-MCPD: 100 µg/kg 2-MCPD: 150 µg/kg Glycidol: 30 µg/kg

# Einfluss der Art des Chlorid-Salzes auf die Entstehung von MCPD und Glycidol (2)

(bestimmt als Summe SGS „3-in-1“-Methode)

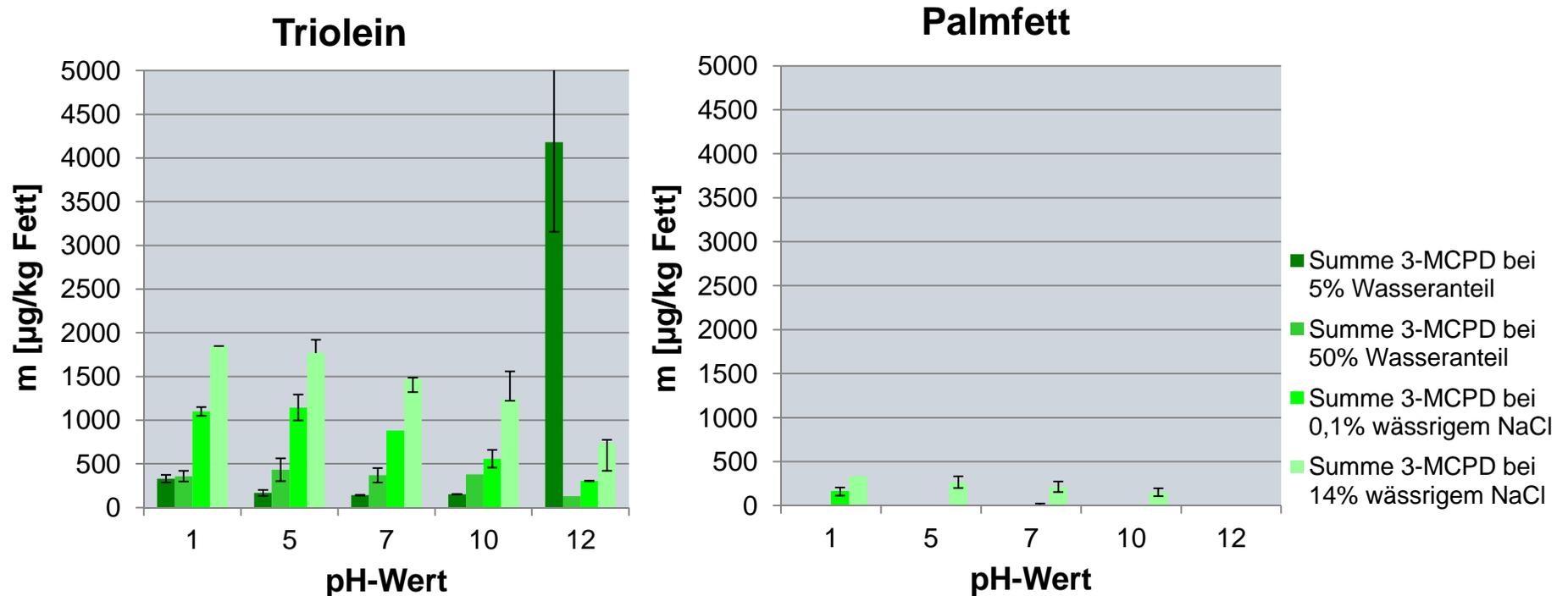


Wasseranteil ~30%

Bestimmungsgrenze 3-MCPD: 100 µg/kg 2-MCPD: 150 µg/kg Glycidol: 30 µg/kg

# Einfluss des pH-Wertes auf die Entstehung von 3-MCPD

(bestimmt als Summe SGS „3-in-1“-Methode)

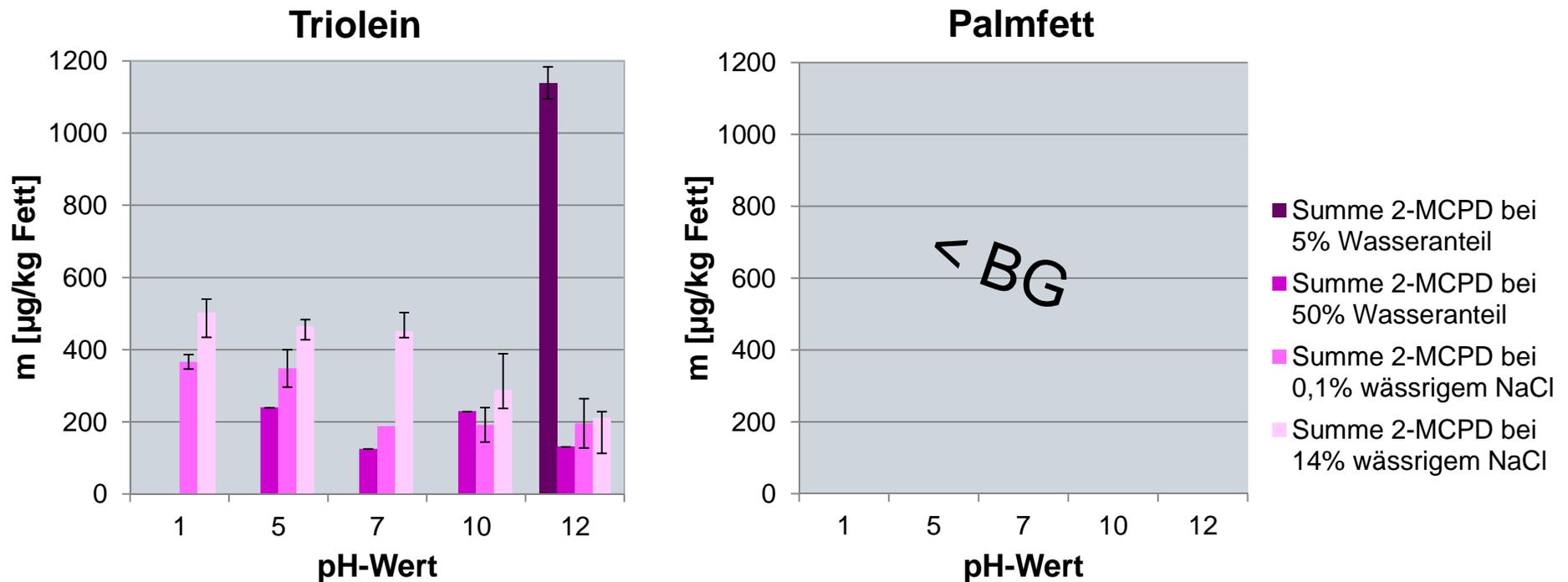


Wasseranteil bei NaCl-Lösungen ~30%

Bestimmungsgrenze 3-MCPD: 100 µg/kg

# Einfluss des pH-Wertes auf die Entstehung von 2-MCPD

(bestimmt als Summe SGS „3-in-1“-Methode)



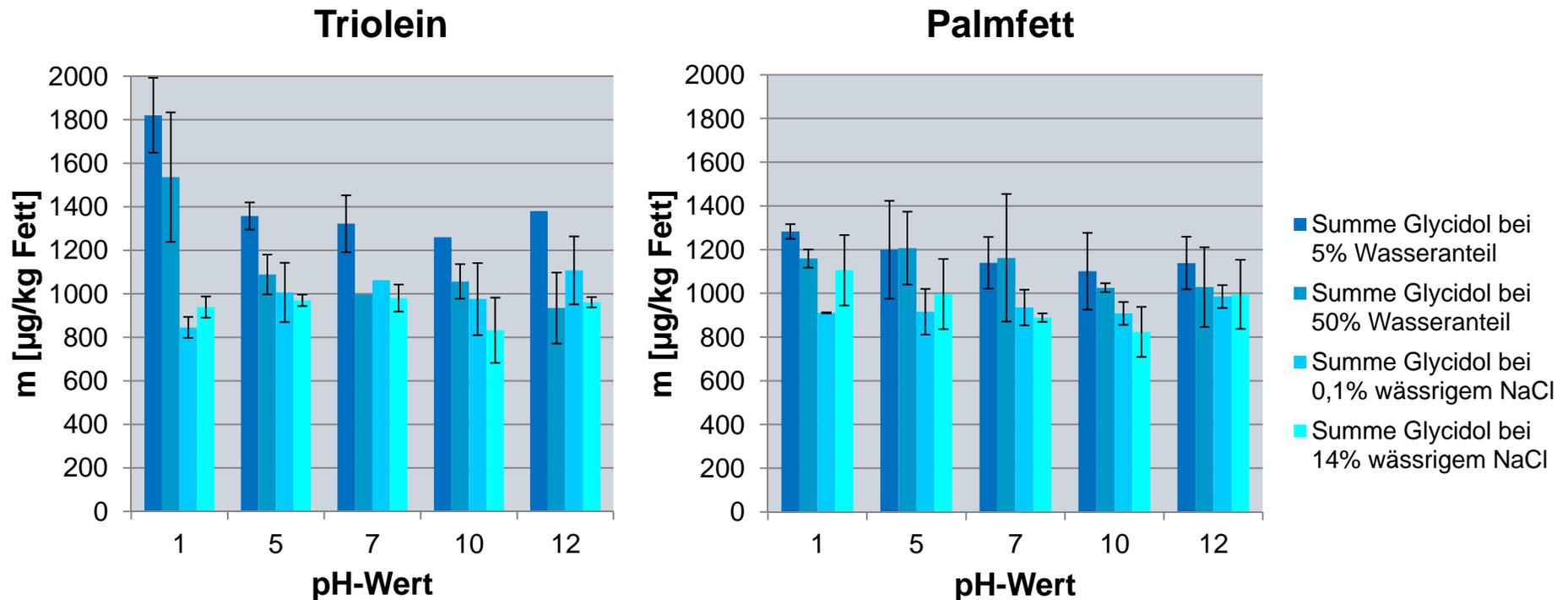
Wasseranteil bei NaCl-Lösungen ~30%

BG (Bestimmungsgrenze)

2-MCPD: 150 µg/kg

# Einfluss des pH-Wertes auf die Entstehung von Glycidol

(bestimmt als Summe SGS „3-in-1“-Methode)



Wasseranteil bei NaCl-Lösungen ~30%

Bestimmungsgrenze Glycidol: 30 µg/kg

- Entwicklung einer direkten Quantifizierungsmethode einzelner MCPD- und Glycidyl-FE mittels LC-MS/MS
  
- enzymatische Stabilität von MCPD- und Glycidyl-FE
  - höhere enzymatische Stabilität in Fetten und Ölen als in Wasser und Tridecan
  - unabhängig von der Enzymkonzentration, der Ölmenge (> 50 mg) und der Art des Öls
  - schwache Abhängigkeit von der Fettsäureart
  - abhängig von der Inkubationszeit und von der Art des MCPD-FE (entsprechend der Spezifität der Pankreas-Lipase)

- thermische Zersetzung von freiem MCPD und Glycidol
  - nimmt mit steigenden Temperaturen zu (in Konkurrenz mit weiterer Entstehung in Abhängigkeit von der Matrix)
  
- thermische Zersetzung von MCPD- und Glycidyl-FE
  - keine Zersetzung zu freiem MCPD und Glycidol, aber Abbau der Ester zu weiteren unbekanntem Produkten

# Zusammenfassung

- thermische Entstehung von MCPD und Glycidol in Modellsystemen unter Einfluss verschiedener Parameter

Wasser	NaCl	pH-Wert	Summe MCPD	Summe Glycidol
↑	-	-	↓	↔
↔	↑	-	↑	↔
-	↑	-	↑	↔
		↑	↓	↔

- Summe der 2-MCPDs geringer als die Summe der 3-MCPDs
- Fe-(III)-Chlorid stärkste Wirkung auf MCPD-Entstehung

- Abschluss der Untersuchungen zur Entstehung von MCPD- und Glycidyl-FE in Modellsystemen
  - Verteilung auf verschiedene FE
- Aufklärung der Bildungsmechanismen der MCPD- und Glycidyl-FE in Modellsystemen
- Anwendung und Verifizierung der entwickelten LC-MS/MS-Methode
  - Untersuchung von kommerziell erhältlichen Fetten und Ölen auf MCPD und Glycidyl-FE