



*Workshop: 3-MCPD & Co: Eine Bilanz nach acht Jahren Forschung*

## 8 Jahre nach den ersten Messungen – Haben wir jetzt valide Methoden ?

**SGS Germany GmbH / J. Kuhlmann**

SGS Germany GmbH  
Dr. Jan Kuhlmann  
Weidenbaumsweg 137  
D-21035 Hamburg  
phone.: +49 (0)40 88 309 423  
mobile: +49 (0)172 413 8446  
www.de.sgs.com  
Jan.Kuhlmann@sgs.com

**WHEN YOU NEED TO BE SURE**

**SGS**

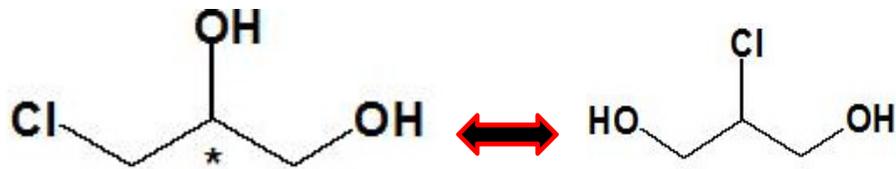
## Worum geht es ?

**Fettsäuregebundenes 2-/3-MCPD- & Glycidol:**

**Wie verlässlich sind die Analyseergebnisse!**

## 2-MCPD, 3-MCPD, Glycidol

### freie Analyten



#### 3-MCPD

(3-Chloropropan-1,2-diol)

#### 2-MCPD

(2-Chloropropan-1,3-diol)

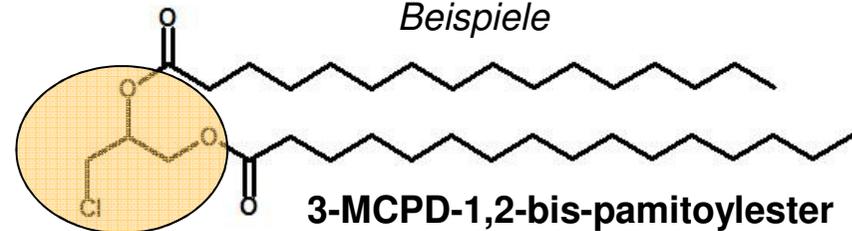


#### Glycidol

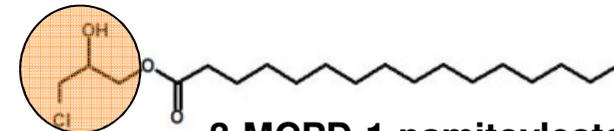
(2,3-Epoxi-1-propanol)

### (Fettsäure-) gebundene Analyten

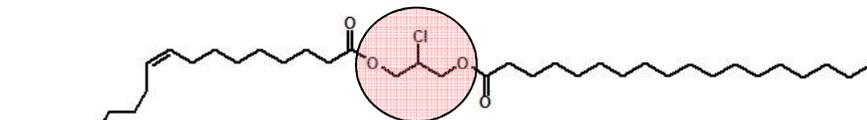
Beispiele



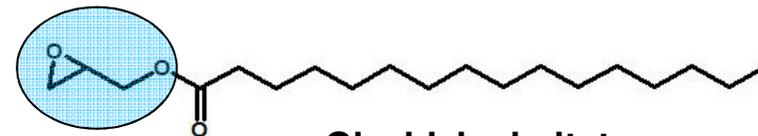
3-MCPD-1,2-bis-palmitolester



3-MCPD-1-palmitolester



2-MCPD-1-oleoyl-3-stearoyl ester



Glycidylpalmitat

## Hitzeinduzierte Bildung von Glycidyl- & MCPD-Estern

Monoglyceride / Diglyceride / Triglyceride

>> 200 ° C

≥ 200 ° C

+ X<sup>+</sup>, Cl<sup>-\*</sup>

\*natürliche Quellen  
z.B. FeCl<sub>x</sub>, chlorierte  
Phytosphingosine<sup>1)</sup>

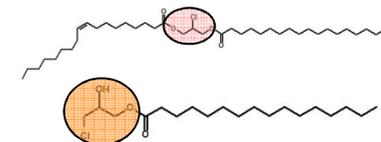
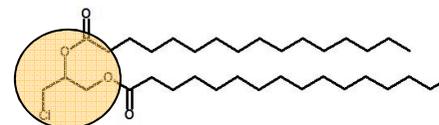
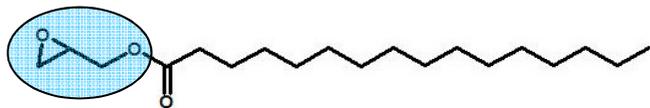
„gebundenes Glycidol“  
Glycidyl-Fettsäureester

➤ Monoester

„gebundenes MCPD“  
2- & 3-MCPD-Fettsäureester

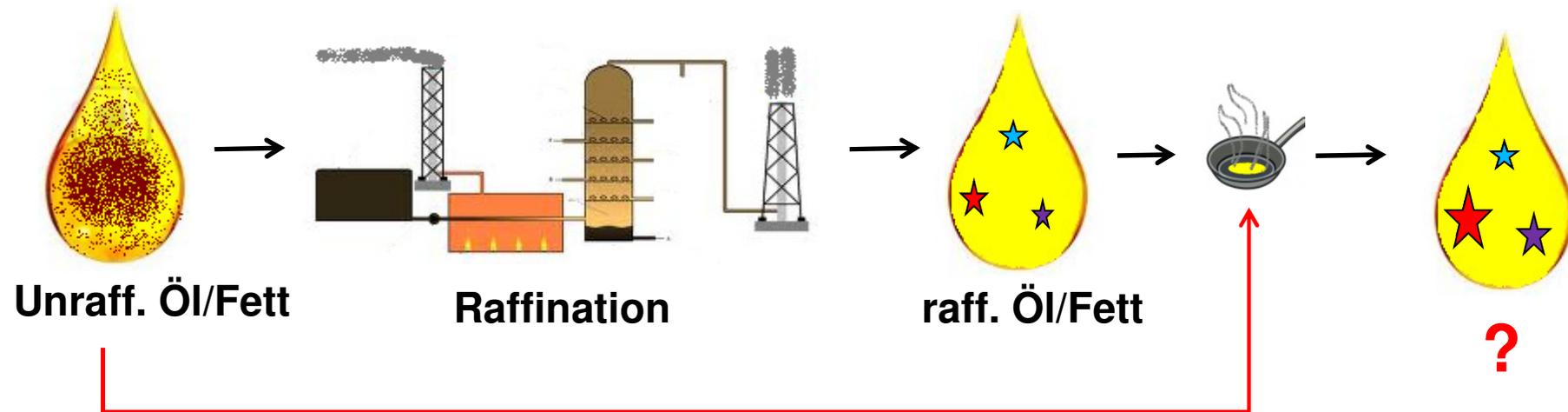
➤ 1-/2- Monoester

➤ 1,2-/1,3-Diester



1) K. Nagy et al.: Mass-defect filtering of isotope signatures to reveal the source of chlorinated palm oil contaminants; *Food Addit. Contam.* **2011**, 28, 1492–1500

### Prozessquellen für (fettsäure-) gebundenes MCPD & Glycidol



**Gebundenes MCPD & Glycidol werden überwiegend bei der Desodorierung ( $T > 200 \text{ }^\circ\text{C}$ ) gebildet.**

***Praktisch alle raffinierten Öle & Fette enthalten geb. MCPD & Glycidol***  
*(Bildungspotential abhängig von Ölsorte/qualität, Ausmaß der Bildung abhängig von Prozesssteuerung & ggf. Chlorideintrag)*

**Kann sich 3-MCPD ebenfalls beim Zubereiten von Lebensmitteln bilden ?**

## 3-MCPD & Glycidol – Toxikologie



**freies 3-MCPD:**  
*nicht-genotoxisches Karzinogen*  
**reproduktionstoxisch<sub>[1B]</sub>**  
**karzinogen<sub>[2]</sub>**  
 etc.

[Classification according to Regulation (EC) No 1272/2008 [EU-GHS/CLP]]

**geb. 3-MCPD:**  
**Bei der Verdauung wird der größte Anteil  
 3-MCPD aus der gebundenen Form freigesetzt<sup>[2,3]</sup>**



**2-MCPD:**

*Keine toxikologischen  
 Daten verfügbar !*

**Metabolismus und mögl. Effekte  
 wg. Chlorsubstitution an Position 2  
 anders als bei 3-MCPD.  
 Im Caco-II-Zellexperiment  
 schnellere Esterspaltung als bei 3-  
 MCPD-Estern<sup>[5]</sup>**

<sup>[2]</sup> EFSA (2011). Scientific report submitted to EFSA 'Comparison between 3-MCPD and its palmitic esters in a 90-day toxicological study' prepared by E. Barocelli, et al. University of Parma, Italy

<sup>[3]</sup> K. Abraham, K.E. Appel, E. Berger-Preiss, E. Apel, S. Gerling, H. Mielke, O. Creutzenberg, A. Lampen: Relative oral bioavailability of 3-MCPD from 3-MCPD fatty acid esters in rats. *Arch. Toxicol.* **2013**, 87 (4), 649-659

<sup>[4]</sup> K.E. Appel, K. Abraham, E. Berger-Preiss, T. Hansen, E. Apel, S. Schuchard, C. Vogt, N. Bakhya, O. Creutzenberg, A. Lampen: Relative oral bioavailability of glycidol from glycidyl fatty acid esters in rats. *Arch. Toxicol.* **2013**, 87(9), 1649-59

<sup>[5]</sup> K.E. Buhrke T, Frenzel F, Kuhlmann J, Lampen A; 2-Chloro-1,3-propanediol (2-MCPD) and its fatty acid esters: cytotoxicity, metabolism, and transport by human intestinal Caco-2 cells; *Arch. Toxicol.*, E-Pub ahead of print, 30 Oct **2014**, ISSN 1432-0738



**freies Glycidol:**  
*genotoxisches Karzinogen*  
**reproduktionstoxisch<sub>[1B]</sub>, karzinogen<sub>[1B]</sub>**  
**keimzellmutagen<sub>[2]</sub>**  
 etc.

[Classification according to Regulation (EC) No 1272/2008 [EU-GHS/CLP]]

**geb. Glycidol:**  
**Bei der Verdauung wird sämtliches  
 Glycidol aus der gebundenen Form freigesetzt<sup>[4]</sup>**



## Begriffserklärung “Validierung”

Validierung: „Nachweis, dass eine Methode zuverlässig innerhalb festgelegter Grenzen zum ~~erwarteten~~ **Ergebnis führt.**“

*aus: Qualitätssicherung in der analytischen Chemie, Universität Greifswald*

„Bestätigung durch Bereitstellung eines objektiven Nachweises, dass die Anforderungen für einen spezifischen beabsichtigten Gebrauch oder eine spezifische beabsichtigte Anwendung erfüllt worden sind“

**ISO 8402 (1994)**

*Ähnlicher Wortlaut in DIN EN ISO/IEC 17025*

## Wie verläuft eine Validierung?

### 1.) In-house Validierung

*liefert üblicherweise:*

**Linearität, Wiederholpräzision, Wiederfindung, LOD/LOQ, Messbereich, ...**

### 2.) “Offizielle” Validierung durch anerkannte Organisationen

*liefert üblicherweise:*

***Bewertung der Anwendbarkeit (Genauigkeit, Vergleichspräzision  $\approx$  Messunsicherheit  $\approx$  Robustheit)***

### 3.) Bestätigung der Validität durch Laborvergleichsuntersuchungen, wissenschaftliche Studien & Routineanwendung

*liefert üblicherweise :*

***Anwendungsbereich, Spezifität, Vergleichbarkeit, Richtigkeit -***

***aber auch Praxistauglichkeit (Aufwand, Kosten, Nachhaltigkeit, Sicherheitsaspekte usw.)***

## Wie war der Wissensstand vor 8 Jahren?

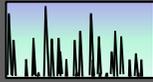
**1980-2007**

- **3-MCPD-Fettsäureester** wurden in Pflanzenproteinhydrolysaten (HVP), gepanschem Olivenöl, Ziegenmilch, diversen zusammengesetzten Lebensmitteln und in raffinierten Speiseölen und -fetten nachgewiesen.
- Sehr unterschiedliche direkte und indirekte analytische Verfahren wurden eingesetzt.  
*(Von Dünnschichtchromatographie bis zu enantioselektiver HR-GC-MS-CI)*
- **Die Empfindlichkeit, Präzision und Richtigkeit der Methoden war variabel.**

## Was haben wir in den letzten 8 Jahren gelernt?

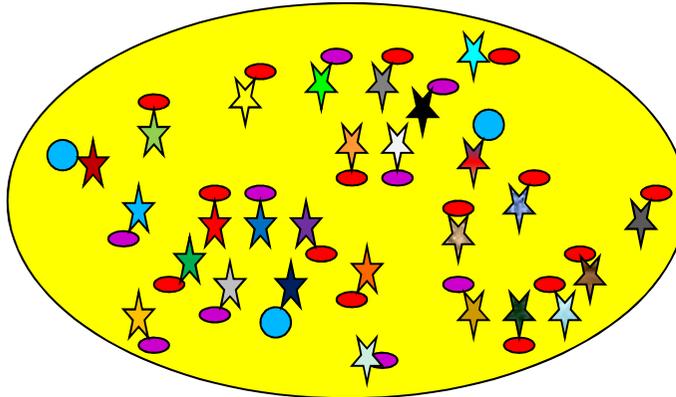
### 2007-2015

- Neben **3-MCPD-Fettsäureestern** wurden auch **2-MCPD-Fettsäureester** und **Glycidylester** als praktisch ubiquitäre Prozesskontaminanten in raffinierten Speiseölen und -fetten nachgewiesen.
- Glycidol und 3-MCPD können sich säure- und basekatalysiert ineinander umwandeln: Frühe Ergebnisse waren teilweise nicht spezifisch für 3-MCPD.
- *Direkte analytische Verfahren (Bestimmung der intakten Ester) haben Schwierigkeiten alle isomere MCPD-Ester zu separieren und können diese dann entsprechend nicht akkurat quantifizieren.*
- *Bei indirekten analytischen Verfahren (Bestimmung der frei gesetzten Kontaminanten) finden Analyttransformationen statt, die bei mangelnder Kontrolle die Präzision und Richtigkeit der Ergebnisse einschränken können.*



## Direkte Analytik zur Bestimmung der originären MCPD- & Glycidylester

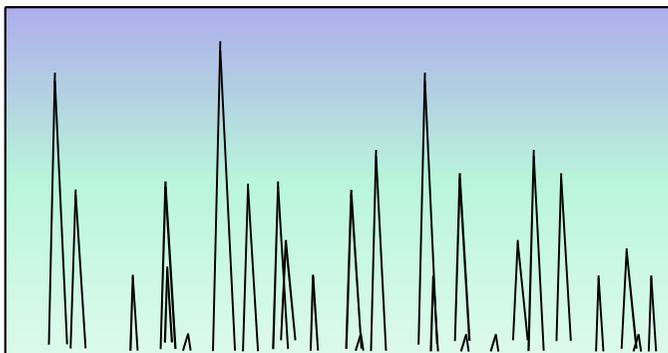
- Glycidol
- 3-MCPD
- 2-MCPD
- ☆ Fettsäure(n)



$$n \text{ Fettsäuren} = ((n^2 + 2n) + (2n + \sum_{i=1}^n (i - 1)) + n) \text{ Analyten}$$

3 Fettsäuren = 27 Analyten  
7 Fettsäuren = 105 Analyten

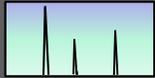
Matrixentfernung üblich



Chromatogram weist bis zu 27 MCPD- & Glycidylester aus (ohne iStds)!

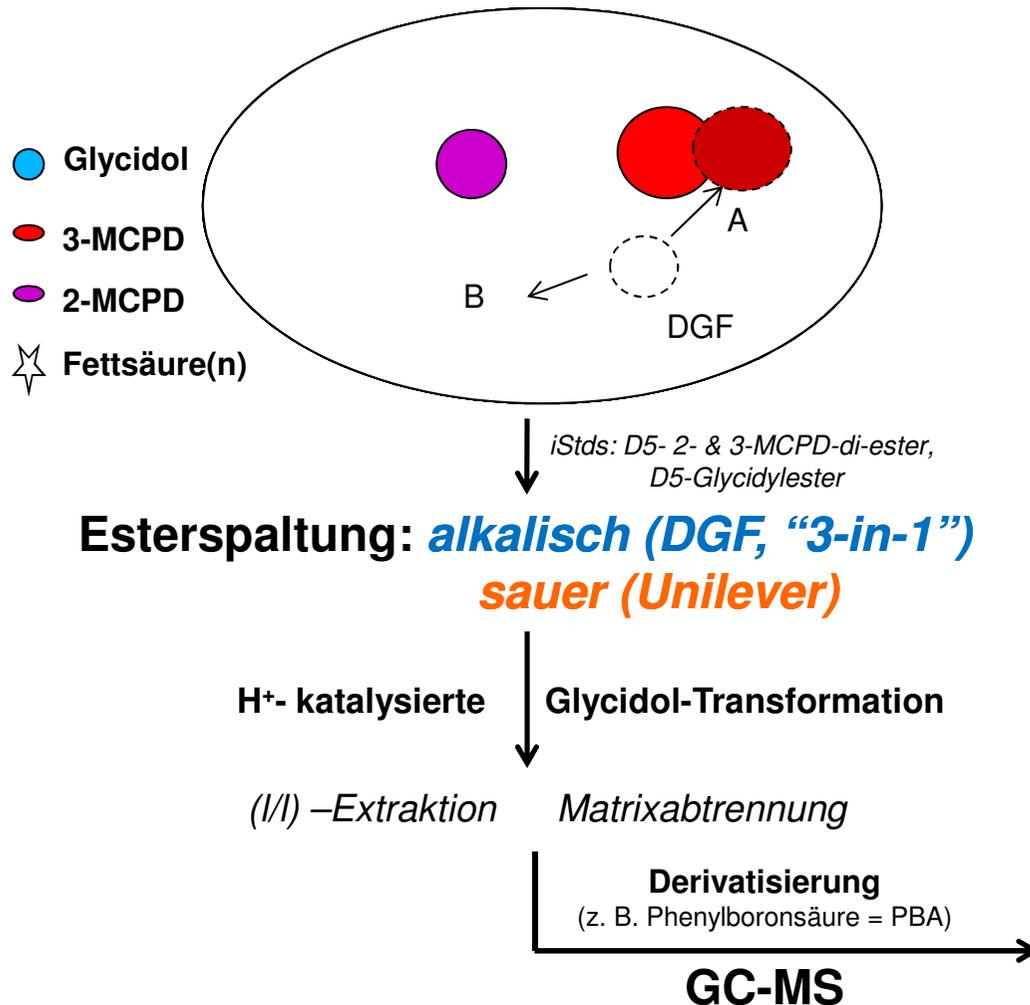
5 GE validiert	AOCS Cd 28-10 Masukawa et al. 2010/11	SPE <sup>2</sup>	LC-MS
GE	Blumhorst et al. 2011	Dilute & shoot	LC-MS
GE	Granvogl et al. 2011	SPE	LC-MS/MS <sup>2</sup>
GE	Hrncirik; Ermacora 2013	I,l-Extr. + NPLC	GC-MS
3-ME	Yamazaki 2013	SPE <sup>2</sup>	LC-MS <sup>2</sup>
GE ; 2-/3-ME	Dubois et al. 2011	SPE <sup>2</sup> / SPE	LC-MS <sup>2</sup> / TOF
GE; 3-ME	Haines et al. 2011	Dilute & shoot	LC-MS-TOF
GE ; 2-/3-ME	MacMahon et al. 2013	SPE <sup>2</sup> / SPE <sup>2</sup>	LC-MS <sup>2</sup>

GE: Glycidylester; ME: MCPD-Éster



## Indirekte Analytik

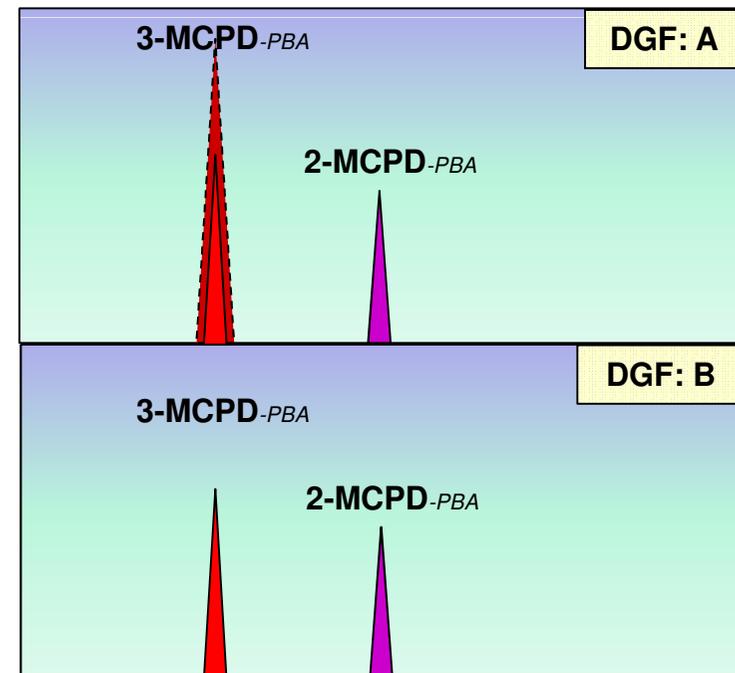
zur Bestimmung von gebundenem (ggf auch freiem) MCPD & Glycidol



3 Fettsäuren = 27 Analyten

7 Fettsäuren = 105 Analyten

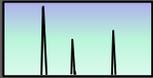
Nach Esterspaltung: 3 Analyten





## Übersicht: validierte indirekte Methoden

Methode	Analytspektrum
BfR „Methode 09“ <i>„Methode 22“ für Lebensmittel</i>	<b>2- &amp; 3-MCPD</b>
Divinova/„BfR Methode 08“	<b>2- &amp; 3-MCPD</b>
DGF C-VI 17 (10) <i>„Weißhaar-Methode“</i>	$\Sigma$ 3-MCPD + Glycidol
AOCS Cd 28-10	<b>Glycidylester</b>
DGF C-VI 18 (10) A,B AOCS Cd 29c-13 <i>„DGF-Methode“</i>	<b>A: <math>\Sigma</math> 3-MCPD + Glycidol</b> <b>B: 2- &amp; 3-MCPD</b> <b>A – B <math>\approx</math> Glycidol</b>
AOCS Cd 29b-13 <i>„SGS 3-in-1-Methode“</i>	<b>2- &amp; 3-MCPD</b> <b>Glycidol</b>
AOCS Cd 29a-13 <i>„Unilever-Methode“</i>	<b>2- &amp; 3-MCPD</b> <b>Glycidol</b>

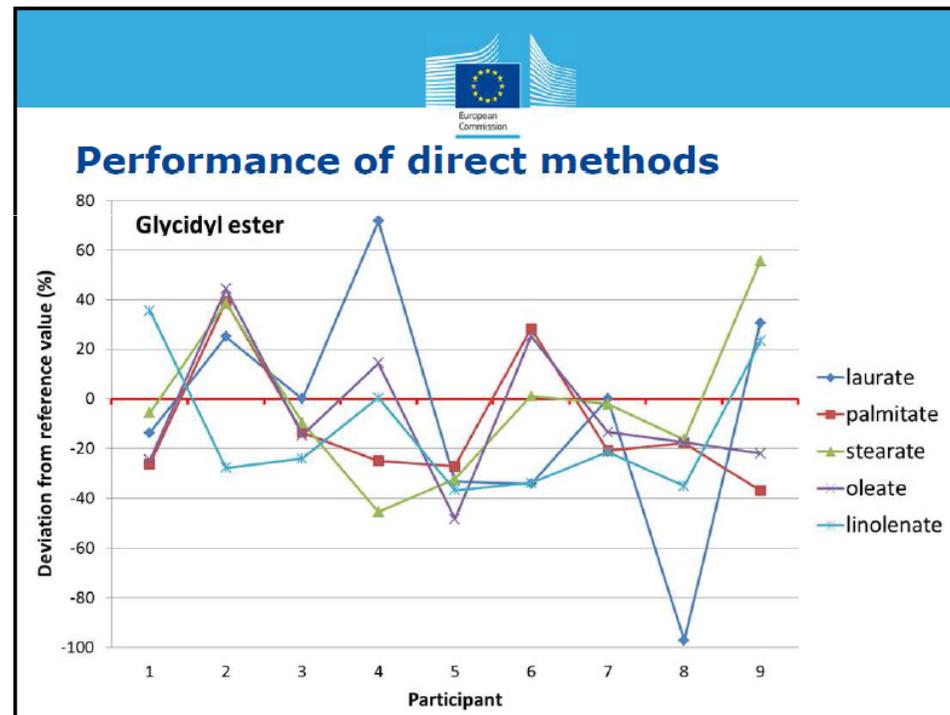


## Validierte Methoden in Vergleichsuntersuchungen

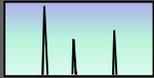
Europäische Kommission: IRMM Laborvergleichsuntersuchung 2013

T Wenzl, Oral presentation: *Do results for glycidyl and MCPD ester contents obtained by different methods agree?*  
AOCS Annual Meeting 2013 - Montreal-Canada

“Performance of direct and indirect methods for the determination of glycidyl esters comparable”



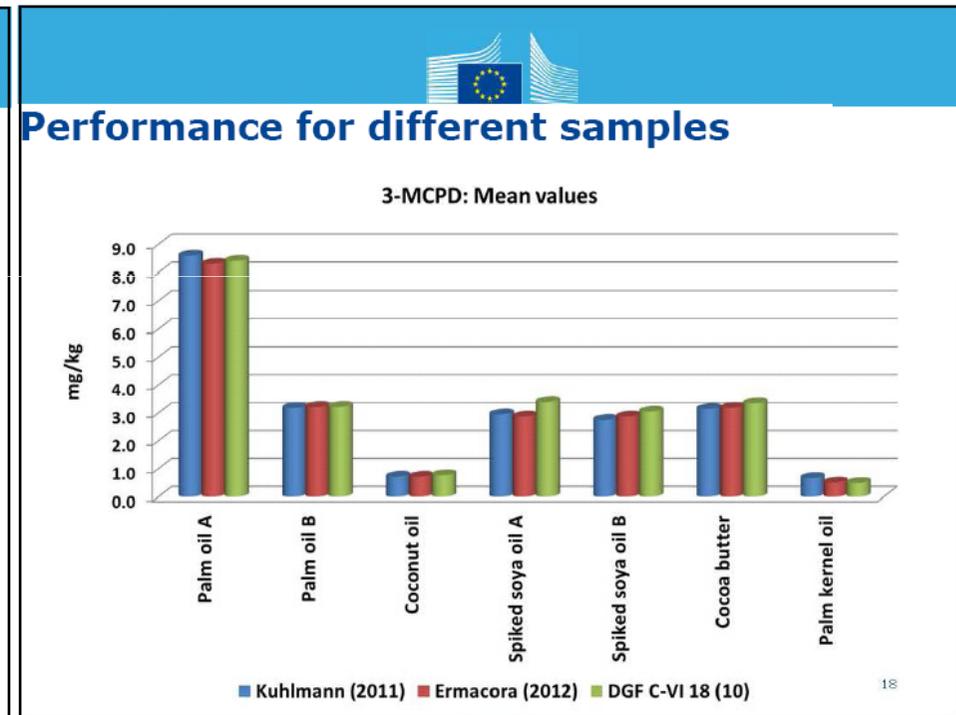
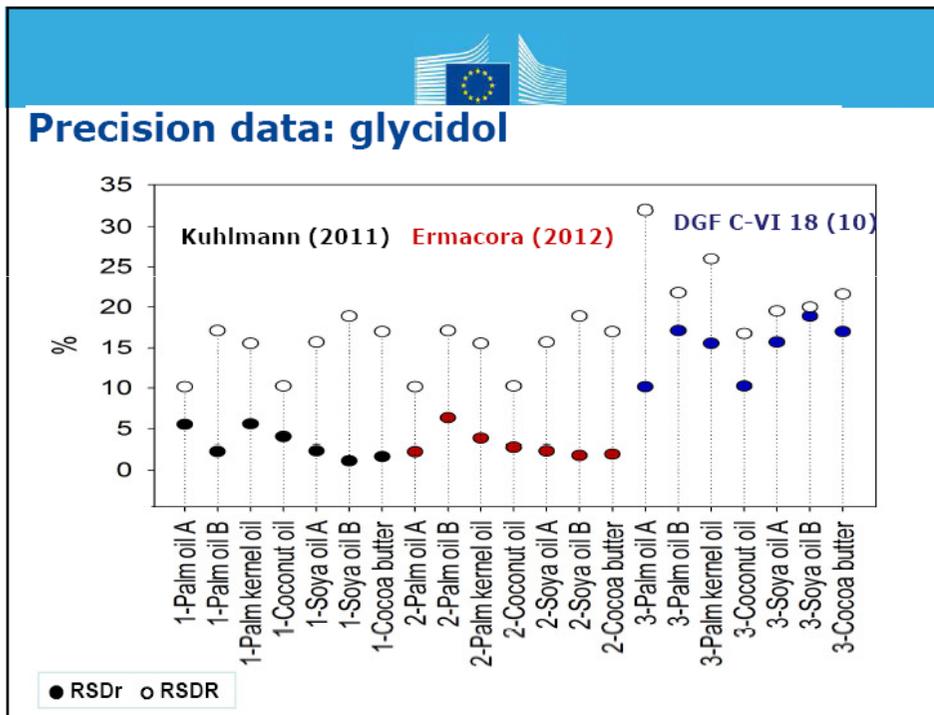
Die direkte Analytik war erfolgreich bei der Bestimmung des Gesamtglycidolgehaltes, nicht aber bei der Quantifizierung der einzelnen Ester!



## Validierte Methoden in Vergleichsuntersuchungen

Europäische Kommission: IRMM-Laborvergleichsuntersuchung 2013

T Wenzl, Oral presentation: *Do results for glycidyl and MCPD ester contents obtained by different methods agree?*  
AOCS Annual Meeting 2013 - Montreal-Canada



Study showed that there is a couple of methods suitable for the monitoring of MCPD esters and glycidyl esters in edible oils!



## Validierte Methoden in offenen Vergleichsuntersuchungen

<b>Fapas 2642 2014 vegetable oil</b>	<b>Geb. 3-MCPD</b>	<b>Geb. 2-MCPD</b>	<b>Geb. Glycidol</b>
„Assigned value“	0,579 mg/kg	-	0,583 mg/kg
Labore mit z-score $\leq  2 $	34 von 40 (85 %)	-	18 von 27 (67%)
Validierte Methoden	20 von 22 (91 %)	-	9 von 11 (81 %)
Andere	3 von 4	-	1 von 4
<b>DGF-LVU 20 2014 used frying fat</b>	<b>Geb. 3-MCPD</b>	<b>Geb. 2-MCPD</b>	<b>Geb. Glycidol</b>
median	0,365 mg/kg	0,233 mg/kg	0,590 mg/kg
Labore mit z-score $\leq  2 $	11 von 13 (85 %)	8 von 8 (100 %)	10 von 11 (91 %)
<b>DGF C-VI 18 (10)</b> = AOCS Cd 29-c BFR 09	9 von 11	6 von 6	9 von 9
„ <b>3-in-1</b> “ = AOCS Cd 29-b	1 von 1	1 von 1	0 von 1
„ <b>Unilever</b> “ = AOCS Cd 29-a	1 von 1	1 von 1	1 von 1

## “Verdeckte” Vergleichsuntersuchungen



**AAK**

raffinierte Öle zur Routineanalyse  
in 4 akkreditierte Labore gegeben

### Ergebnisse basierend auf den validierten Methoden

(AOCS Cd 29a,b,c-13 = Unilever/“3-in-1“/DGF sowie 1 x AOCS Cd 28-10)

Probe	Geb. 3-MCPD [mg/kg]	RSD [%]	Geb. Glycidol [mg/kg]	RSD [%]
6	4,53 – 4,70	1,9	0,70 – 2,76	57
5	4,60 – 4,88	3,8	1,60 – 2,77	28
10	0,31 – 0,37	8,9	0,17 – 0,51	63
3	0,18 – 0,28	25	0,55 – 0,65	16
4	0,13 – 0,52	84	0,41 – 1,05	48

Daten freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Annlouise Lomnitz, AAK Sweden

## Welche weiteren Anforderungen an die Analytik bestehen derzeit?

Auszug aus der EU Kommissionsempfehlung 2014-661

L 271/94	DE	Amtsblatt der Europäischen Union	12.9.2014
----------	----	----------------------------------	-----------

HAT FOLGENDE EMPFEHLUNG ABGEGEBEN:

(1) Die Mitgliedstaaten sollten unter aktiver Mitwirkung der Futter- und Lebensmittelunternehmer das Vorkommen von 2- und 3-MCPD, 2- und 3-MCPD-Fettsäureestern und Glycidyl-Fettsäureestern in Lebensmitteln überwachen, insbesondere in:

- Pflanzenölen und -fetten und daraus gewonnenen Lebensmitteln wie Margarine und ähnliche Erzeugnisse;
- Lebensmitteln für eine besondere Ernährung im Sinne der Richtlinie 2009/39/EG des Europäischen Parlaments und des Rates (<sup>1</sup>), die für Säuglinge und Kleinkinder bestimmt sind, einschließlich Säuglingsanfangsnahrung und Folgenahrung im Sinne der Richtlinie 2006/141/EG der Kommission (<sup>2</sup>) und diätetischen Lebensmitteln für besondere medizinische Zwecke im Sinne der Richtlinie 1999/21/EG der Kommission (<sup>3</sup>), die für Säuglinge bestimmt sind,
- feinen Backwaren, Brot und Brötchen,
- Dosenfleisch (geräuchert) und Dosenfisch (geräuchert),
- Knabbereien auf Kartoffel- oder Getreidebasis und sonstigen frittierten Kartoffelerzeugnissen,
- Lebensmitteln, die Pflanzenöle enthalten und Lebensmittel, die mit Pflanzenölen zubereitet/hergestellt werden

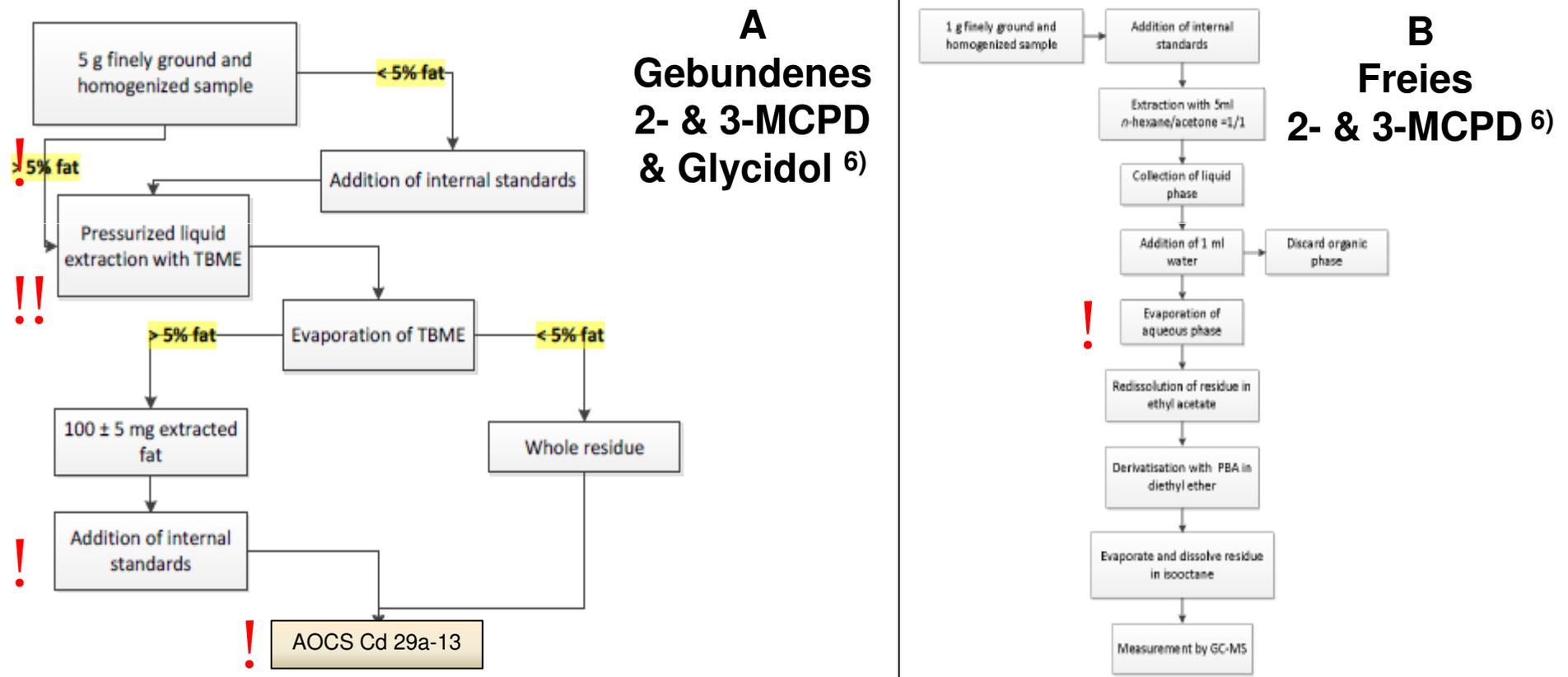
**Sind die validierten Methoden für die EU-relevanten Matrices einsetzbar?**

➤ **Nein!**

**Derzeit existiert keine offiziell validierte Methode mittels der das EFSA-Analytenspektrum und die geforderten Matrices abgedeckt werden könnten.**

### Wann sind validierte Methoden für andere Matrices verfügbar?

IRMM: "In-house-Validierung" freies 2- & 3-MCPD vs. gebundenes 2- & 3-MCPD & Glycidol in Lebensmitteln<sup>1)</sup>



6), A, B: EFSA supporting publication 2015: EN-779: Development and validation of analytical methods for the analysis of 3-MCPD (both in free and ester form) and glycidyl esters in various food matrices and performance of an ad-hoc survey on specific food groups in support to a scientific opinion on comprehensive risk assessment on the presence of 3-MCPD and glycidyl esters in food" T. Wenzel et al.

## Bewertung validierter Methoden: Schatten ....

- 1.) Immer noch kommt es in der Praxis (Auftragsanalytik) auch bei einfachen Matrices zu deutlich höheren Ergebnisschwankungsbreiten als in Laborvergleichsuntersuchungen.**
- 2.) Hinsichtlich der Analytik von komplex zusammengesetzten Lebensmitteln stehen wir noch am Anfang der Methodvalidierung.**
- 3.) Daß eine Methode erfolgreich implementiert/validiert wurde, bedeutet nicht zwangsläufig, daß sie in allen Fällen richtig angewendet wird und/oder praxistauglich ist.**
- 4.) Die aktuellen Methoden werden beständig weiterentwickelt und verbessert.**  
(⇒ mehr & bessere analytische Optionen – aber auch komplexe Methodenvielfalt)

## Bewertung validierter Methoden: ... und Licht

- 1.) Der Erkenntnisgewinn in den letzten 8 Jahren war enorm. Es wurde eine Vielzahl analytischer Methoden zur Bestimmung von MCPD und Glycidol in Ölen und Fetten vorgestellt. Optimierung der Prozesstechnik kann zu signifikanter Verminderung der Kontaminantengehalte führen.
- 2.) Praktisch alle validierten Methoden zur Bestimmung von gebundenem MCPD und Glycidol zeigen in Laborvergleichsuntersuchungen eine vergleichbare Eignung zur Untersuchung pflanzlicher Öle und Fette.
- 3.) Bei richtiger Anwendung und guter Qualitätssicherung sind die Ergebnisse verlässlich!



**SGS Germany GmbH**  
**Dr. Jan Kuhlmann**  
Weidenbaumsweg 137  
D-21035 Hamburg  
Tel.: +49 (0)40 88 309 423  
mobile: +49 (0)172 413 8446  
[www.de.sgs.com](http://www.de.sgs.com)  
[Jan.Kuhlmann@sgs.com](mailto:Jan.Kuhlmann@sgs.com)

*Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!*

WHEN YOU NEED TO BE SURE

