

Bestimmung von MCPD und Glycidyl Estern in Lebensmitteln

mit der CHRONECT Workstation MCPD und dem
Modul ISO 18363-1



Applikationsnote 1603

CHRONECT Workstation MCPD – Modul ISO 18363-1

Applikationsnote 1603

Einführung

3-Monochlor-1,2-propandiol (3-MCPD), 2-Monochlor-1,3-propandiol (2-MCPD) und Glycidol gehören zur Gruppe der herstellungsbedingten Kontaminanten in Lebensmitteln. MCPD-Fettsäureester können während der Raffination bei hohen Temperaturen in Anwesenheit chloridhaltiger Salze gebildet werden. Die Raffination ist jedoch ein notwendiger chemischer und physikalischer Veredelungsprozess bei der Herstellung vieler Öle. Erst durch diese Temperaturbehandlung können in der Weiterverarbeitung unerwünschte Geruchs- und Geschmacksstoffe sowie eventuell vorhandene Spuren toxischer Verbindungen wie Pestizide, Schwermetalle oder Mykotoxine entfernt werden. Die Analytik dieser Kontaminanten gewinnt aufgrund ihrer Karzinogenität immer mehr an Bedeutung.

Laborversuche mit Tieren haben gezeigt, dass bei einer anhaltenden erhöhten Aufnahme von freiem 3-MCPD ein gesteigertes Risiko für Krebserkrankungen besteht. Bereits im März 2016 wurde von der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) ein neuer Wert für die tolerierbare tägliche Aufnahmemenge von 0,8 µg/kg Körpergewicht für 3-MCPD abgeleitet. Für die Analytik der MCPD-Ester gibt es heute eine Vielzahl von Methoden, die sich in zwei Gruppen unterteilen lassen: die direkte Bestimmung mittels LC-MS/MS oder die indirekte durch GC-MS. Die direkte Analyse ist aufgrund der großen Anzahl von Estern sehr aufwendig, da jeder Ester einzeln bestimmt wird, sodass die indirekte Methode in der Routine häufigere Anwendung findet. Die manuelle Umsetzung ist jedoch mit einem hohen Zeitaufwand verbunden.

Axel Semrau hat daher die gängigen manuellen Methoden automatisiert und optimiert.

Automatisierte Methoden

Axel Semrau empfiehlt die DGF C-VI 18(10), ISO 18363-1 oder AOCS Cd 29c- 13 Methode als leistungsstärkste Methode in der Routine-Analytik und hat sie daher als Grundlage für die Automatisierung gewählt. Die Probenvorbereitung, wie sie in Abbildung 1 zu sehen ist, erfolgt vollautomatisch auf dem Sampler. Zeitgleich wurde ein Eindampfungsschritt eingespart, welcher erwie-senermaßen nicht in verbesserter Messgenauigkeit resultiert.

Ein weiterer Schritt wurde mit der selbst entwickelten Clean-Technology integriert und somit die Methode „DGF Fast & Clean“ entwickelt.

Eine Anwendung ist sowohl für 3-MCPD als auch für 2-MCPD möglich sowie zur Bestimmung des Glycidolgehaltes. Dabei werden die an Fettsäuren gebundenen Analyten zunächst in ihre jeweilige freie Form überführt. Die Freisetzung aus den Fettsäureestern geschieht durch Umesterung. Entsprechend der DGF-Methode werden zur Bestimmung des Glycidolgehaltes zwei Ansätze in der Probenvorbereitung benötigt (Abbildung 1). In Ansatz A wird die Umesterung durch Zugabe von Natriumchlorid gestoppt. Dabei reagieren MCPD-Fettsäureester und Glycidyl Ester beide zu freiem MCPD. In Ansatz B geschieht das Abstoppen der Reaktion mit einer chloridfreien Salzlösung (Natriumbromid). Hier reagieren nur die MCPD-Fettsäureester zu freiem MCPD. Das freie MCPD wird dann extrahiert und in einem weiteren Schritt derivatisiert.



Abbildung 1: Schematische Darstellung der Probenvorbereitung für die indirekte MCPD-Analytik mit der „DGF Fast & Clean“ von Axel Semrau - automatisiert mit der CHRONECT Workstation MCPD.

Anschließend erfolgt der von Axel Semrau entwickelte Reinigungsschritt, um das GC-MS zu schonen und längere Wartungsintervalle zu ermöglichen.

CHRONECT Workstation MCPD – Modul ISO 18363-1

Applikationsnote 1603

Danach erfolgt die Messung mittels GC-MS/MS. Die Differenz zwischen Ansatz A und B wird schließlich mit einem Transformationsfaktor (t) multipliziert, der experimentell bestimmt wurde. Daraus ergibt sich der Glycidolgehalt.

Geräteaufbau der „DGF Fast & Clean“

Der Geräteaufbau für die „DGF Fast & Clean“ Methode wird in Abbildung 2 schematisch dargestellt. Für die Automatisierung der Probenvorbereitung wählt Axel Semrau einen 160 cm CHRONECT Robotic DHR, da dieser ausreichend Platz für alle notwendigen Module bietet und leicht an alle anderen Methoden und weitere Applikationen angepasst werden kann. Eine Variante mit einem 120 cm CHRONECT Robotic RTC ist jedoch auch möglich. Der Dilutor wird mit zwei Lösemitteln ausgestattet (n -Hexan und Extraktionsmittel). Der CHRONECT Robotic Autosampler wurde für diese Applikation auf einem Bruker EVOQ GC-TQ mit 456 GC montiert, um die fertig vorbereiteten Proben direkt im Anschluss injizieren zu können. Die Installation kann aber auch mit Geräten anderer Hersteller erfolgen sowie auf bereits vorhandene GC-MS.

Damit sich das Derivatisierungsreagenz Phenylboronsäure nicht so schnell auf der analytischen Trennsäule und in der Ionenquelle des

Triple Quadrupols niederschlägt, wurde das GC-System zusätzlich mit einer Clean-Technology ausgestattet. Dies trägt zu einer längeren Standzeit des Triple-Quadrupols auch bei über 3000 Injektionen bei und sichert robuste Daten. Dabei wird mittels einer chemischen Reinigung das überschüssige Derivatisierungsreagenz entfernt und mittels physikalischer Reinigung ein Großteil der Matrix mittels Backflush entfernt. Die gesamte Steuerung des Systems erfolgt benutzerfreundlich durch die Software CHRONOS.

So werden auch komplexe Verfahren einfach in der Anwendung. Die CHRONECT-Lösungen von Axel Semrau werden im Applikationslabor vorinstalliert, getestet (Factory Acceptance Test) und direkt einsatzfertig beim Anwender installiert und erneut getestet (Site Acceptance Test). So ist die schnellstmögliche Aufnahme des routinemäßigen Messbetriebes sichergestellt.

Dank CHRONECT Robotic und CHRONOS können Arbeitsschritte verschachtelt durchgeführt werden (Abbildung 3). Mit der „DGF Fast & Clean“ Methode liegen so bereits nach ca. 48 Minuten die Messergebnisse einer Probe von Teil A und Teil B vor, wie Abbildung 3 zeigt. Andere Methoden benötigen bis zu 18 h für das erste Probenergebnis.

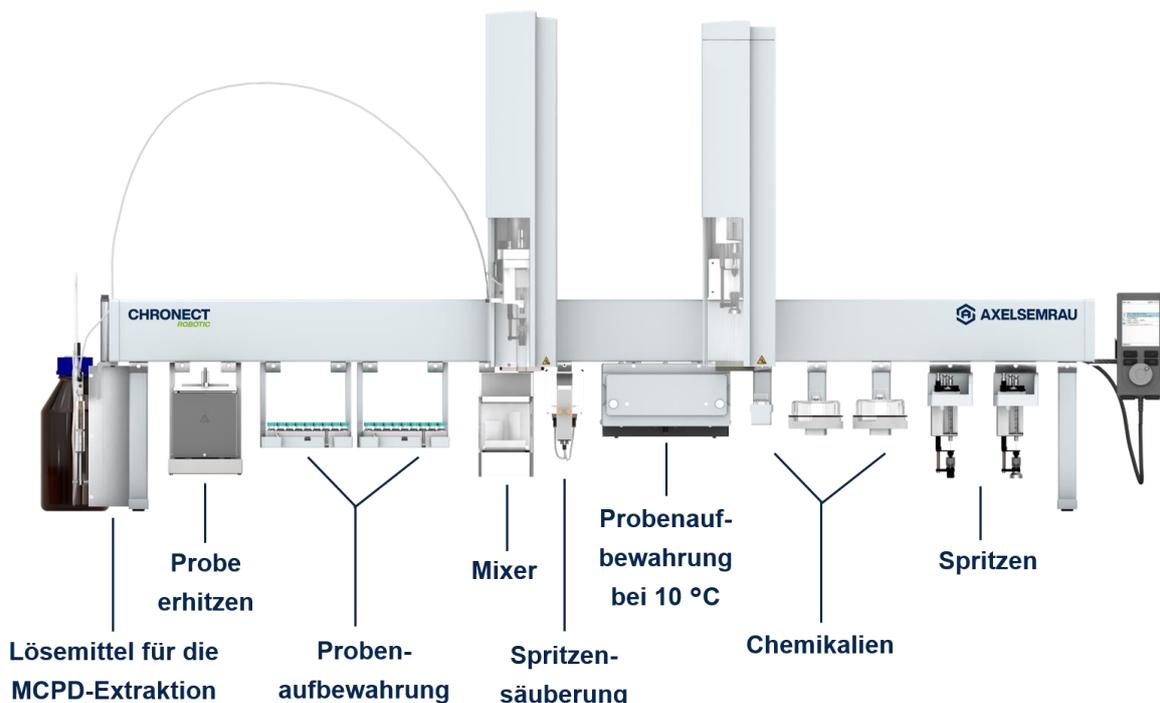


Abbildung 2: Schematischer Aufbau des CHRONECT Robotic DHR RSI/RTC mit Modulen.

CHRONECT Workstation MCPD – Modul ISO 18363-1

Applikationsnote 1603

Aufgrund verschachtelter Arbeitsschritte können so 36 Proben innerhalb von 24 Stunden gemessen werden (72 Probendurchläufe). Daher ermöglicht dieses System neben höchster Präzision eine signifikante Zeiteinsparung. Das erhaltene Ergebnis mit „DGF Fast & Clean“ ist dabei immer konform zur herkömmlichen DGF-Methode. Durch das modulare CHRONECT Robotic System können aber auch andere Methoden automatisiert und in den Laboralltag integriert werden. Beispielsweise kann die 3-in-1-Methode

(AOCS Cd 29b-13 bzw. ISO 18363-2) automatisiert werden. Dabei wird ein zusätzliches Kühltray für -22 °C eingepflegt. Für die Unilever-Methode (AOCS Cd 29a-13 bzw. ISO 18363-3) kann eine Zentrifuge und eine Eindampfeinheit ergänzt und eingebunden werden. Diese Methode ist damit ebenso wie Methode nach Zwagerman (Draft ISO 18363-4) leicht automatisierbar. Auch die ältere Weisshaar-Methode wurde bereits implementiert.

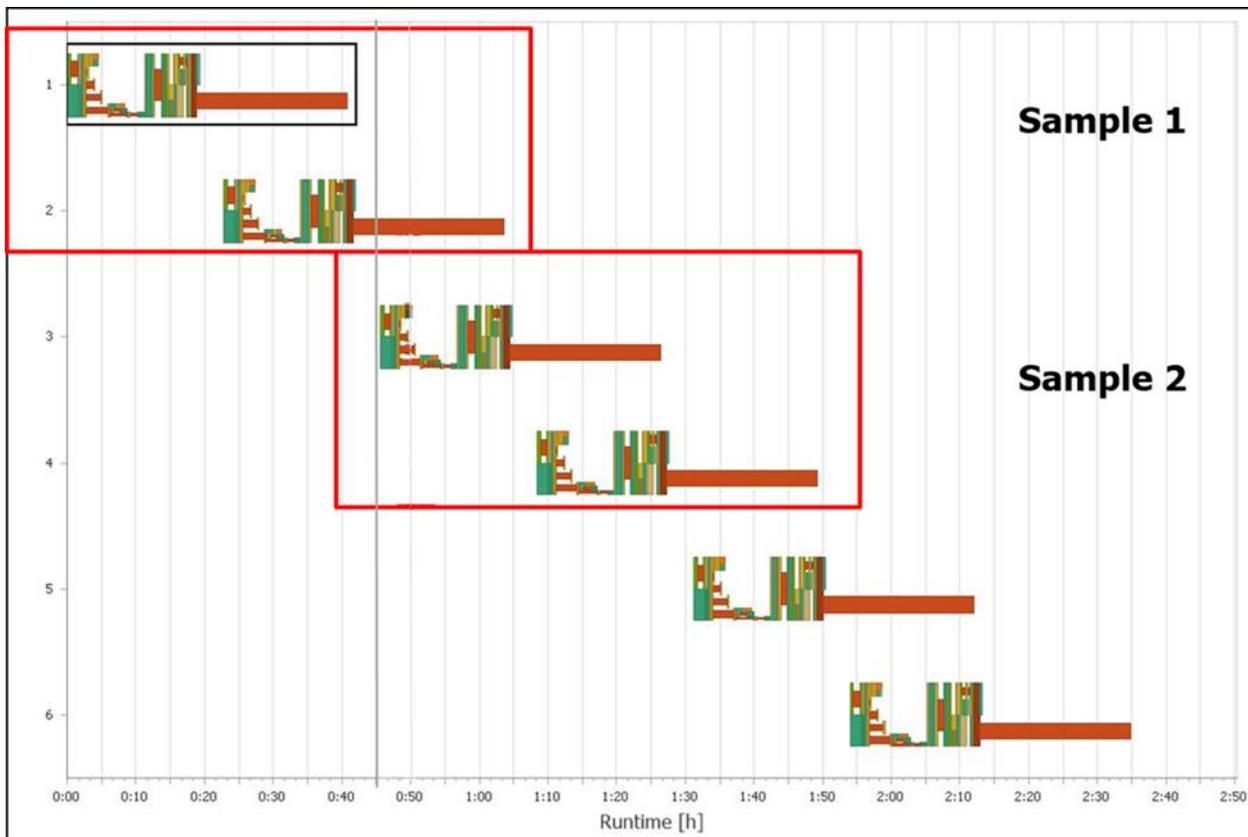


Abbildung 3: Ausschnitt Software-Plattform CHRONOS: Überlappende Arbeitsweise und Probenergebnis nach 48 Minuten.

Messparameter und Ergebnisse

Schauen wir uns die „DGF Fast & Clean“ genauer an. Die Komponenten 3-MCPD und 2-MCPD sowie ihre jeweiligen deuterierten Varianten wurden mittels Triple-Quadrupol-Technik detektiert. Hierfür wurde jeweils ein Ion zur Qualifizierung und eines zur Quantifizierung ausgewählt. Die entsprechenden Kollisionsenergien zur Fragmentierung der Mutter-Ionen nach dem ersten Quadrupol wurden experimentell ermittelt.

Wichtige Parameter für die jeweiligen Komponenten sind in Tabelle 1 dargestellt. Zur Validierung der Applikation wurde zunächst die Methode „DGF klassisch“ validiert. Dabei wird die Probe automatisiert exakt nach den Vorgaben in der DGF-Norm aufgearbeitet und injiziert (inklusive Abdampfen des Extraktionsmittels). Zur Validierung wurden *rac*-1,2-Bis-palmitoyl-3-chlorpropanediol und *rac*-1,3-Distearoyl-2-chlorpropanediol verwendet.

CHRONECT Workstation MCPD – Modul ISO 18363-1

Applikationsnote 1603

Tabelle 1: Messparameter des Triple-Quadrupols für die Detektion von 3-MCPD und 2-MCPD.

Injektor SSL, 1 µL Injektionsvolumen, Splitless (Split 1:30 nach 1 min)			
Temperatur [°C]	Heizrate [°C/min]	Haltezeit [min]	Total [min]
85,0		0,10	0,10
200,0	200,0	1,00	1,68
300,0	200,0	10,00	12,18
Druckregelung 1,5 mL/min Constant Flow, Backflush nach 8,5 min einschalten			
Trennsäule 2x Rxi-5 MS 15 m, 0,25 mm Innendurchmesser, 0,25 µm Film			
Ofenprogramm			
Temperatur [°C]	Heizrate [°C/min]	Haltezeit [min]	Total [min]
80,0		1,00	1,00
150,0	10,0	0,00	8,00
320,0	30,0	10,00	23,67
Detektor Transfer-Leitung 280 °C, CID-Gas Argon, MRM-Modus			
Name	Retentionszeit [min]	Precursor-Ion	Produkt-Ion
2-MCPD	7,71	198,00	104,00
		196,00	104,00
2-MCPD-d5	7,66	203,00	107,00
		201,00	93,00
3-MCPD	7,36	196,00	147,00
		196,00	91,00
3-MCPD-d5	7,32	201,00	150,00
		201,00	93,00

Tabelle 2: Wiederfindung (WF in %) und Reproduzierbarkeit (RP in %) der Methoden „DGF klassisch“ und „DGF Fast & Clean“ für Teil A und Teil B gemessen an vier aufeinander folgenden Tagen.

	„DGF klassisch“		„DGF Fast & Clean“	
	WF	RP	WF	RP
3-MCPD Teil A	102,6	3,9	91,6	7,7
3-MCPD Teil B	94,3	3,9	101,9	8,8

Die beiden Komponenten wurden in definierten Mengen nativem Olivenöl hinzugefügt und anschließend mit der CHRONECT Workstation MCPD aufgearbeitet. Natives Olivenöl eignet sich in diesem Fall als Blindwert-Matrix, da es kalt gepresst wird und somit keine MCPD-Ester enthalten sollte. Entsprechende Blindwert-Messungen bestätigten die Vermutung mit einem Blindwert von < 0,02 mg/kg Probe für 3-MCPD und 2-MCPD. Die Ergebnisse der Validierung sind in Tabelle 2 dargestellt.

Es ergab sich für 3-MCPD eine Nachweisgrenze von 0,011 mg/kg in hundert Prozent Fett mit einer Bestimmungsgrenze von 0,025 mg/kg in hundert Prozent Fett. Ergänzend wurde ein Referenzöl von FAPAS gemessen, dessen 3-MCPD- und 2-MCPD-Gehalte aus einem Ringversuch bekannt sind. Zusätzlich wurde die Methode „DGF Fast and Clean“ nach der *EU Commission regulation EU No836/2011* in der Routine komplett validiert. Die Ergebnisse dieser Validierung sind in Tabelle 3 zu sehen.

CHRONECT Workstation MCPD – Modul ISO 18363-1

Applikationsnote 1603

Tabelle 3: Ergebnisse der Validierung einer CHRONECT Workstation MCPD in einem Routine-Labor mit einem gesetzte LOQ von 0,05 mg/kg Fett.

Validierungsparameter	Validierungsdaten	Kriterium für Charakteristiken der Methode	Kriterien erfüllt
Systempräzision	2,9 %	< 10	✓
Kalibrierung 0,05 – 0,5 mg/kg 0,5 – 5,0 mg/kg	R ² : 0,9996 R ² : 0,9999	R ² > 0,99	✓
LOQ 0,05 mg/kg	Teil A 7,4 % Teil B 9,0 %	RSD < 20 % S/N 1:10	✓
Linearität 0,05 / 2,0 / 10 mg/kg	Teil A 4,2 % Teil B 3,9 %	R ² > 0,99	✓
Genauigkeit	Teil A 95 % Teil B 88 %	75 - 110 %	✓
Reproduzierbarkeit	Teil A 3,9 % Teil B 2,8 %	RSDr < 1,5 %	✓

Eine weiterführende Validierung der Methode ist der Vergleich der Messergebnisse mit denen einer Referenzprobe. Hierfür wurde ein Referenzöl von FAPAS verwendet, dessen Messwerte aus

einem Ringversuch stammen. In Tabelle 4 sind die Ergebnisse dieses Vergleichs dargestellt.

Tabelle 4: Gehalte eines Referenzöls von FAPAS (T2646QC) nach den Methoden „DGF klassisch“ und „DGF Fast & Clean“ sowie Realproben, die nur nach der Methode „DGF Fast & Clean“ bestimmt wurden. Im Vergleich mit Werten aus einem Kundenlabor mit manueller Probenvorbereitung.

Probe	Messung	3-MCPD [mg/kg]	2-MCPD [mg/kg]	Glycidol [mg/kg]
Referenzöl (FAPAS)	Manuell „DGF klassisch“	0,59	0,31	0,26
	„DGF klassisch“	0,49	0,30	0,23
	„DGF Fast & Clean“	0,50	0,38	0,36
Unbekanntes Speiseöl	Manuell „DGF klassisch“	0,78	0,39	0,64
	„DGF Fast & Clean“	0,80	0,58	0,73
Rapsöl	Manuell „DGF klassisch“	0,14	< 0,10	0,10
	„DGF Fast & Clean“	0,11	0,08	0,13
Sonnenblumenöl-HL	Manuell „DGF klassisch“	0,84	0,39	0,15
	„DGF Fast & Clean“	0,73	0,60	0,29
Sonnenblumenöl-HO	Manuell „DGF klassisch“	0,31	0,15	0,49
	„DGF Fast & Clean“	0,25	0,19	0,58

CHRONECT Workstation MCPD – Modul ISO 18363-1

Applikationsnote 1603

Bewertung der Ergebnisse

Die interne Validierung der Methoden (DGF klassisch und „DGF Fast & Clean“) erfolgte anhand dotierter Standards, um die Wiederfindung und die Reproduzierbarkeit des Gesamtverfahrens zu bestimmen. Für das MCPD wurde eine Reproduzierbarkeit von ca. 94 % festgestellt.

Bei der Methode „DGF Fast & Clean“ wurden Wiederfindungswerte im Bereich von 91 bis 116 % bestimmt. Die Methode „DGF klassisch“ liegt mit 93 – 96 % Reproduzierbarkeit etwas über der Methode „DGF Fast & Clean“ mit 87 – 92 %. Eine Verwendung der jeweiligen Methoden im Routinebetrieb wird bei beiden Varianten die Werte für die Reproduzierbarkeit im Vergleich zur manuellen Probenvorbereitung deutlich verbessern. Die hier durchgeführte Validierung beruht auf Messungen an vier aufeinander folgenden Tagen.

Die Validierung der Methode „DGF Fast & Clean“ nach der EU Commission (Tabelle 3) zeigt zusätzlich das Erreichen aller notwendigen Kriterien für den Einsatz dieser Methode in der Routine z.B. für die Freigabe-Analytik einer Produktionsraffinerie.

Betrachtet man die Reichweite der Werte aus dem Ringversuch für das Referenzöl FAPAS 2646 (3-MCPD 0,352 – 0,821 mg/kg) ist zu erkennen, dass es bei der Bestimmung von 3-MCPD signifikante Abweichungen zwischen Laboratorien von +/- 40 % zu geben scheint. Dabei ist zu beachten, dass die Werte aus dem Ringversuch mit verschiedenen manuellen Methoden ermittelt wurden (DGF, Unilever, 3-in-1). Eine Automatisierung würde hier mit Sicherheit zu geringeren Abweichungen der Werte führen.

Beispielchromatogramme

Das Chromatogramm in Abbildung 4 demonstriert, dass auch bei geringen Konzentrationen eine hohe Sensitivität und ein sauberer Peak gewährleistet sind. Als Beispiel wurden hier in Olivenöl 0,05 mg/kg 3-MCPD nachgewiesen. Die Chromatogramme in Abbildung 5 zeigen eine exzellente Reproduzierbarkeit der automatisierten Messung von 2- und 3-MCPD bei unterschiedlichen Konzentrationen.

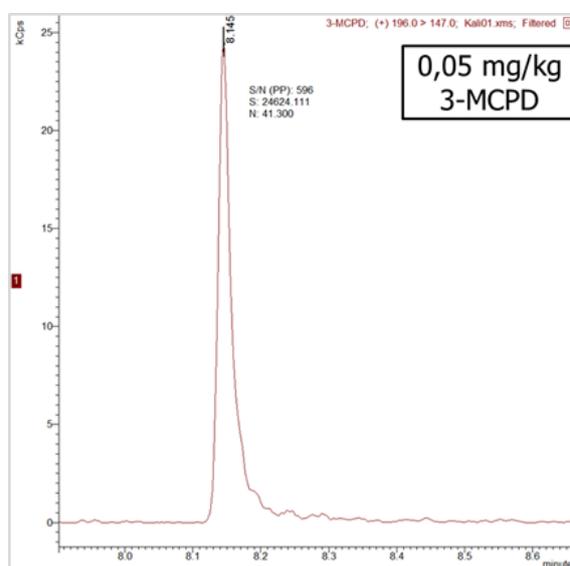


Abbildung 4: Chromatogramm der Messung von 0,05 mg/kg 3-MCPD in Olivenöl.

CHRONECT Workstation MCPD – Modul ISO 18363-1 Applikationsnote 1603

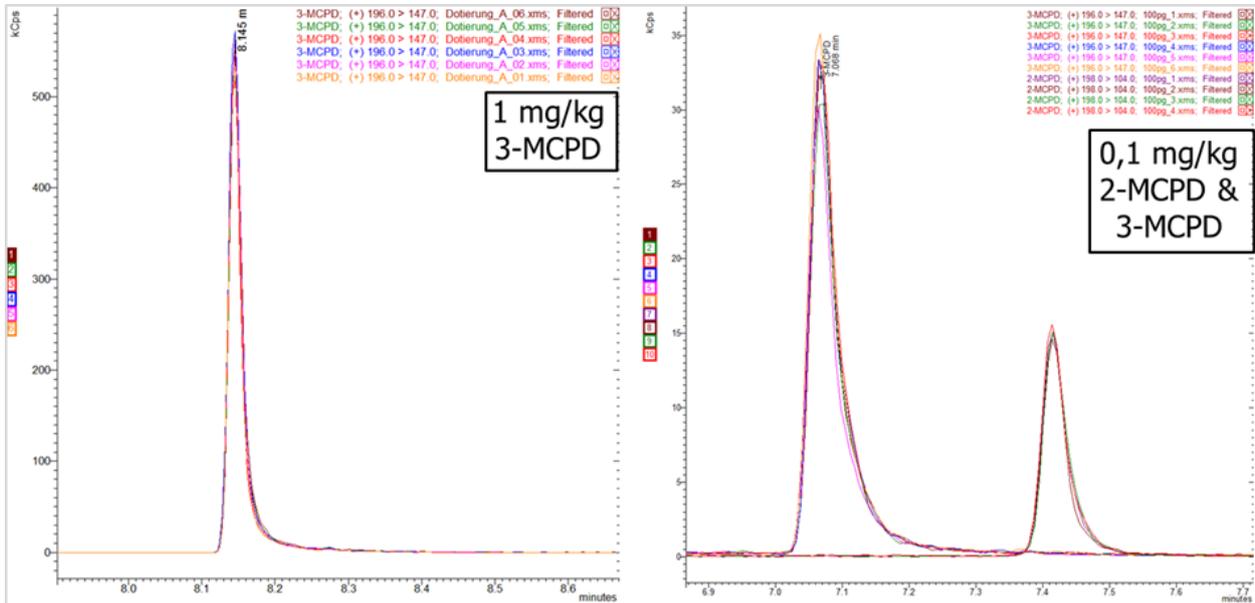


Abbildung 5: Chromatogramme der Messungen mehrerer Proben 2- bzw. 3-MCPD in unterschiedlichen Konzentrationen in Olivenöl.

Beispielmessungen

Abbildung 6 und Tabelle 5 zeigen eine exzellente Vergleichbarkeit der Methoden „DGF klassisch“, „DGF Fast & Clean“ und der 3-in-1-Methode. Dabei führt im Vergleich zur manuellen Probenvorbereitung gerade „DGF Fast & Clean“ zu einer erheblichen Zeitersparnis.

Mittlerweile sind mehr als 100 verschiedene Matrices mit der „DGF Fast & Clean“ erfolgreich in der Routine vermessen worden. Dies beinhaltet sowohl normale Öle und Fette als auch Extrakte von zusammengesetztem Lebensmittel wie in Abbildung 6 zu sehen. Um die Methode noch attraktiver für weitere Matrices zu machen, arbeiten wir kontinuierlich an Verbesserungen an der Methode. Dies wurde zuletzt umgesetzt bei der Anpassung der Methode für die Analyse von durchgehärteten Fetten. Dabei fließt aktiv die Rückmeldung von Anwendern ein.

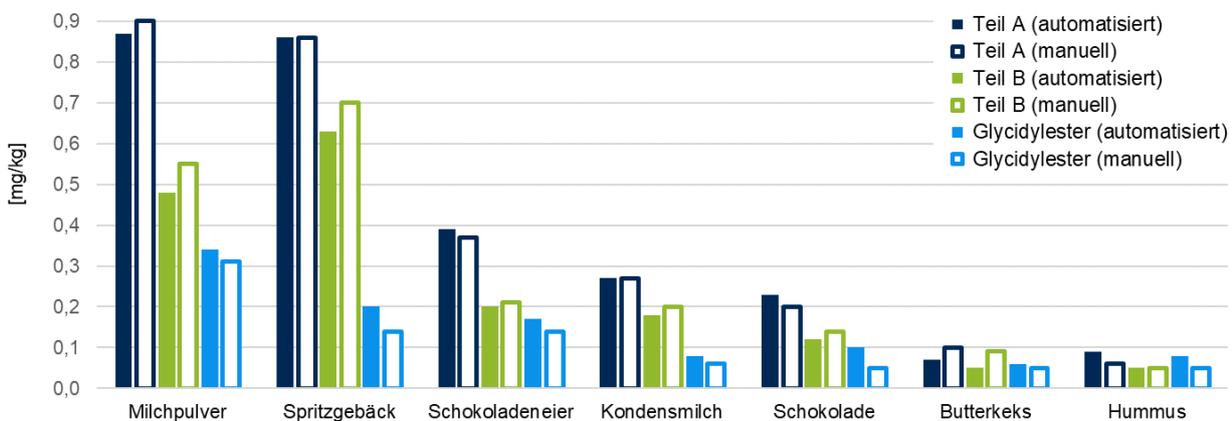


Abbildung 6: Ergebnisse einer Beispielmessung auf den 2-/3-MCPD- und Glycidolgehalt ausgewählter Lebensmittel.

CHRONECT Workstation MCPD – Modul ISO 18363-1

Applikationsnote 1603

Tabelle 5: Ergebnisse aus einer Ölmischung mit Sonnenblumen- und Rapsöl mit der „DGF Fast & Clean“ Methode im Vergleich zur manuellen DGF-Methode sowie zur 3-in-1-Methode.

	Ölmischung I		Ölmischung II	
	3-MCPD-Ester [mg/kg]	Glycidyl-Ester [mg/kg]	3-MCPD-Ester [mg/kg]	Glycidyl-Ester [mg/kg]
„DGF Fast & Clean“	0,14	0,05	0,11	< 0,05
DGF manuell	0,15	0,08	0,13	0,05
3-in-1-Methode	0,14	< 0,05	0,1	< 0,05

Zusammenfassung

2- und 3-MCPD sowie Glycidol sind als Kontaminanten in unseren Lebensmitteln enthalten. Aufgrund ihrer hohen Karzinogenität gewinnt ihre Analytik mehr und mehr an Bedeutung. Die stark wachsende Nachfrage erfordert eine Automatisierung der Analysemethoden, um Durchsatz und Reproduzierbarkeit erhöhen zu können.

Die hier gezeigte Umsetzung in Form der Methode „DGF Fast & Clean“ ermöglicht es, in kurzer Zeit, ca. 48 Minuten für eine Probe mit Teil A und Teil B, eine Aussage zu treffen. Axel Semrau empfiehlt „DGF Fast & Clean“ daher als leistungsstärkste Methode für die Routineanalytik von 3-MCPD, 2-MCPD und Glycidol.

Dank des modularen CHRONECT Robotic-Systems können aber auch andere Methoden vollständig automatisiert werden. Beispiele sind die ISO 18363-2, ISO 18363-3 und Draft ISO 18363-4 oder die Weisshaar-Methode.

CHRONECT Robotic, in diesem Fall ausgestattet mit entweder der Dual-Head-Technologie oder einem Single-Head und CHRONOS, ermöglicht die parallele Ausführung einzelner Arbeitsschritte. Daher kann das System auch im Dauereinsatz betrieben und Messungen zeitsparend durchgeführt werden.

Die von Axel Semrau entwickelte Clean-Technology führt zu einer exzellenten Robustheit des Systems, da das GC-MS geschont und Wartungsintervalle verlängert werden. Somit eignet sich die hier entwickelte vollautomatische Applikation exzellent für den Betrieb in der Routineanalytik, als Wareneingangskontrolle oder auch in der Online-Analytik. Sie führt zu exzellenten Ergebnissen in der Analytik von sowohl 2-MCPD als auch 3-MCPD und Glycidol.

Die CHRONECT Workstation
MCPD und das Modul ISO
18363-1 sind Entwicklungen
von Axel Semrau.

Technische Änderungen vorbehalten

Axel Semrau GmbH & Co. KG
Stefansbecke 42
45549 Sprockhövel
Tel.: 02339 / 12090
Fax: 02339 / 6030
www.axelsemrau.de
info@axelsemrau.de