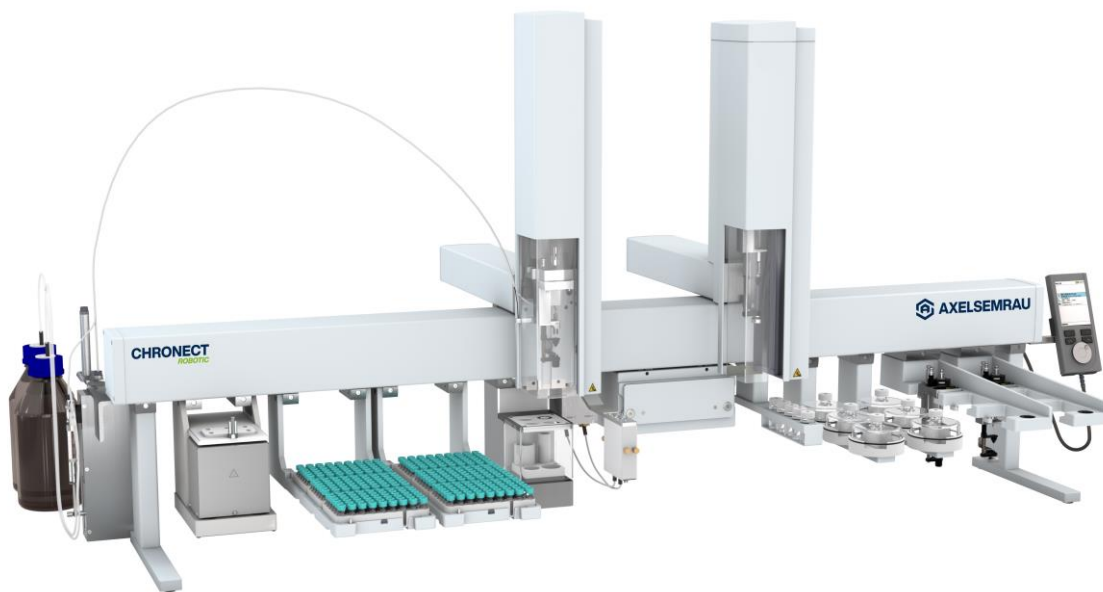


# Bestimmung von MCPD und Glycidyl Estern in Lebensmitteln

mit der CHRONECT Workstation MCPD und dem  
Modul Draft ISO 18363-4



**Applikationsnote 1904**

## CHRONECT Workstation MCPD – Draft ISO 18363-4 Applikationsnote 1904

### Einleitung

Die Bestimmung von 2-MCPD, 3-MCPD und Glycidol in Ölen, Fetten und fetthaltigen Lebensmitteln ist in den vergangenen Jahren zu einer wichtigen Analysemethode geworden. Glycidol ist als karzinogen eingestuft und 3-MCPD als möglicherweise karzinogen. Beide Komponenten entstehen unter anderem bei der Verarbeitung von Ölen und Fetten bei hohen Temperaturen. Vor allem im Bereich der Babynahrung und in fettreichen Lebensmitteln ist die Konzentration dieser Stoffe wichtig, da dort die tolerierbare tägliche Einnahmemenge leichter überschreitbar ist. Sei es als Routineanalytik eines Auftrags-/Handelslabors oder aber in einem Labor zur Freigabe von produzierten Ölen und Fetten – die MCPD- und Glycidol-Analytik wird zunehmend in lebensmittelrelevanten Laboratorien implementiert. Dabei gibt es einige unterschiedliche Methoden, die sich vor allem in den Reaktionsbedingungen und der Reaktionszeit unterscheiden. Sowohl das fettsäuregebundene 2-/3-MCPD als auch Glycidol werden im Zuge der Analytik jedoch bei allen Methoden von den Fettsäuren getrennt und anschließend mithilfe eines Derivatisierungsreagenzes in den Gaschromatographen injiziert. Die Reaktion der Umesterung läuft entweder im basischen oder sauren Medium, bei Raumtemperatur, 40 °C (nach ISO 18363-3, auch bekannt als Unilever-Methode oder AOCS Cd29a-13) oder aber bei -22 °C (nach ISO 18363-2, auch bekannt als 3-in-1-Methode oder AOCS Cd29b-13) ab. Bei der alkalischen Umesterung (Raumtemperatur) wird das entstehende freie 3-MCPD sehr schnell in Glycidol umgewandelt, was ohne Kompensation zu einem Fehlbefund führt.

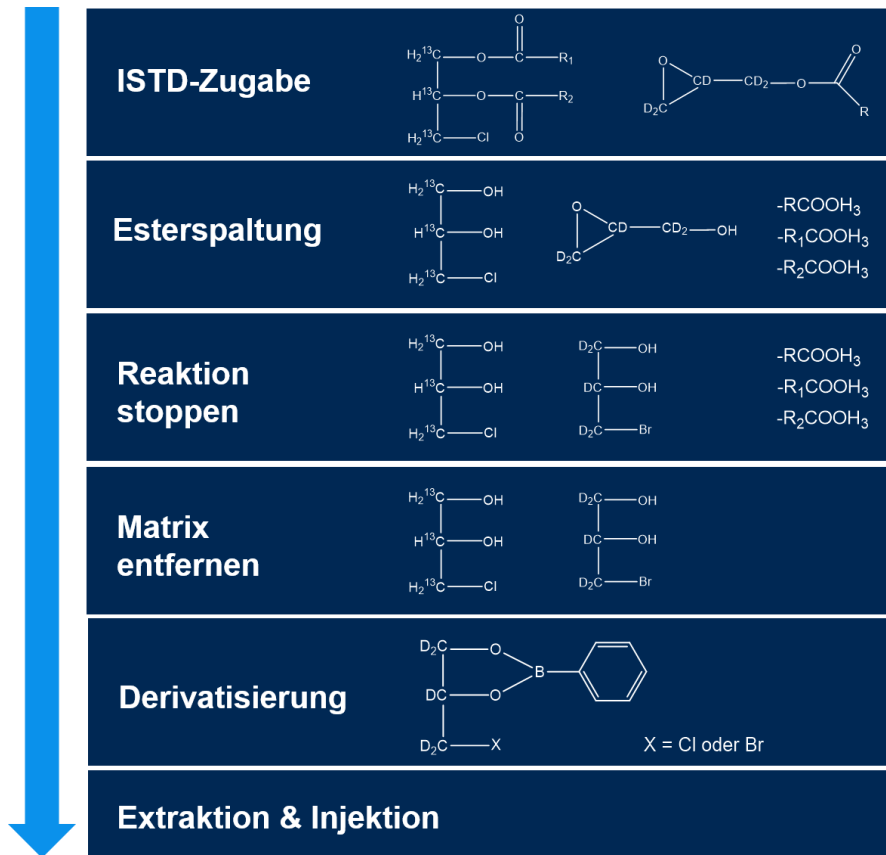
Bei einigen Methoden wird diese Umwandlung des Glycidols unterschiedlich kompensiert. Bei -25 °C wird sie kinetisch kontrolliert oder aber durch Zugabe eines anderen Halogenids (Natriumbromid) in einem zweiten Ansatz zurückgerechnet. Diese Herangehensweise, beschrieben in der ISO 18363-1-Methode (auch bekannt als DGF-Methode oder AOCS Cd29c-13), enthält demnach die Messunsicherheiten zweier Probenvorbereitungen. Eine Alternative stellt die Zugabe eines  $^{13}\text{C}_3$ -markierten 3-MCPD-Ester-Standards dar, womit die Konvertierung des 3-MCPD in einem Probenvorbereitungslauf direkt berücksichtigt werden kann. Jede Probe bedarf damit nur noch einer Probenvorbereitung (Assay). Diese modifizierte Methode wurde 2015 von Zwagerman *et al.* publiziert und stellt eine elegante

und robuste Alternative für die Prozesskontrolle dar. Sie befindet sich aktuell als Draft ISO 18363-4 im Normungsprozess. Wie bei den offiziellen Methoden der alkalischen Umesterung wird der Probe zuerst der interne Standard zugesetzt. Anschließend wird die Umesterung bei 10 °C gestartet. Nach Ablauf der Reaktion wird diese mit einer sauren Natriumbromid-Lösung gestoppt. Die Matrix wird in einem weiteren Schritt mit einem unpolaren Lösemittel (Hexan oder Heptan) entfernt. Anschließend wird das freie 2-MCPD, 3-MCPD und Glycidol (als 3-MBPD) mithilfe von Phenylboronsäure derivatisiert (Abbildung 1). Das entstandene Derivat wird mit *iso*-Oktan extrahiert und in ein weiteres Vial mit Natriumsulfat überführt. Die Lösung ist dann fertig für die Injektion in das GC-MS-System. Bei der Analyse wird das entstandene  $^{13}\text{C}_3$ -3-MBPD für die Quantifizierung der Rückreaktion von Glycidol zu 3-MCPD verwendet.

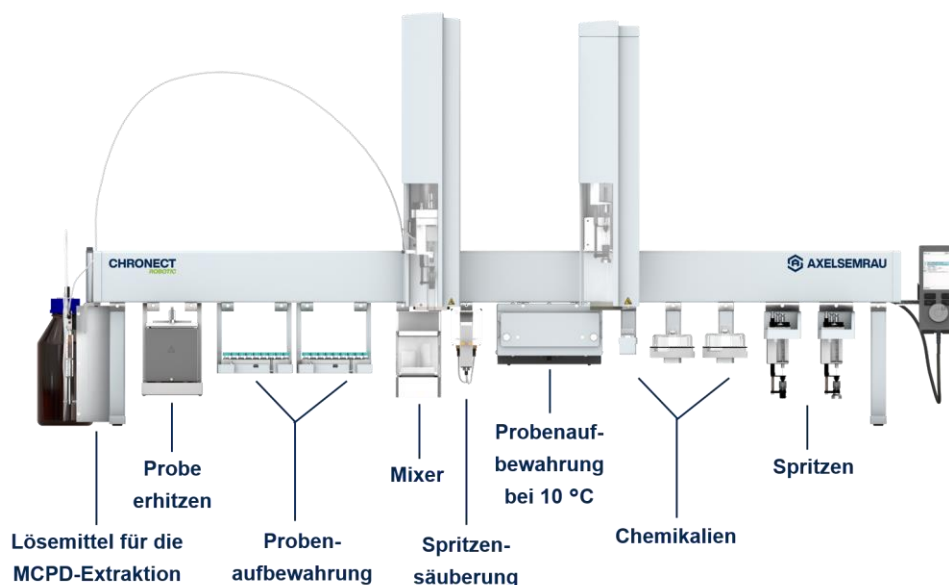
### Methode und Geräteaufbau

Die CHRONECT Workstation MCPD ist mit der Erweiterung Draft ISO 18363-4 ausgestattet, um die komplette Probenvorbereitung und die anschließende Analyse vollautomatisch durchzuführen. Der Anwender muss lediglich eine gewisse Menge Fett oder Öl (~100 mg) in ein 2 mL GC-Vial einwiegen und dieses in dem Autosampler platzieren. Die Umesterung, Matrixentfernung, Derivatisierung und Injektion (Abbildung 1) werden anschließend von dem Autosampler, gesteuert durch die Software CHRONOS, durchgeführt. Das Herzstück dieser Variante der MCPD-Analyse ist die Zugabe des  $^{13}\text{C}_3$ -markierten 3-MCPD-Esters, welcher im ersten Schritt automatisch von dem CHRONECT Robotic Autosampler dosiert wird. Dadurch werden etwaige Unterschiede durch verschiedene Matrices oder auch Hardware-Variationen kompensiert. Der Autosampler ist neben den Modulen zum Heizen und Mixen mit einer Schublade ausgestattet, welche eine Temperatur von 10 °C konstant hält. Hier wird die Umesterungsreaktion in einer kontrollierten Umgebung durchgeführt. Alle notwendigen Lösemittel und Reagenzien befinden sich in ausreichenden Mengen im Autosampler, sodass eine Sequenz über mehrere Tage laufen kann. Durch effizientes Überlappen von Arbeitsschritten liegt das Ergebnis der GC-MS-Analyse, inkl. Probenvorbereitung und Derivatisierung, in 48 Minuten vor.

CHRONECT Workstation MCPD – Draft ISO 18363-4  
 Applikationsnote 1904



**Abbildung 1:** Schematischer Ablauf der Reaktionen während der Probenvorbereitung anhand der beiden internen Standards.



**Abbildung 2:** Schematischer Aufbau des CHRONECT Robotic DHR RSI oder RTC mit Modulen für die MCPD-Analytik nach Draft ISO 18363-4.

# CHRONECT Workstation MCPD – Draft ISO 18363-4

## Applikationsnote 1904

### Ergebnisse

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

<b>Injektor</b> SSL, 1 µL Injektionsvolumen, Splitless (Split 1:20 nach 1 Minute)			
Temperatur [°C]	Heizrate [°C/min]	Haltezeit [min]	Total [min]
250,0	isotherm	15,00	15,00
<b>Druckregelung</b> 1,5 mL/min Constant Flow, Backflush nach 8 min einschalten			
<b>Trennsäule</b> 2x Rxi-5 MS 15 Meter, 0,25 mm Innendurchmesser, 0,25 µm Film			
<b>Ofenprogramm</b>			
Temperatur [°C]	Heizrate [°C/min]	Haltezeit [min]	Total [min]
70,0		2,00	2,00
200,0	20,0	0,00	8,50
300,0	40,0	4,00	15,00
<b>Detektor</b> Transfer-Leitung 280 °C, CID-Gas Argon, MRM-Modus			
Name	Precursor-Ion	Produkt-Ion	Modus
2-MCPD	198,00	104,00	Quantifier
	196,00	104,00	Qualifier
2-MCPD-d5	203,00	107,00	Quantifier
	201,00	93,00	Qualifier
3-MCPD	196,00	147,00	Quantifier
	196,00	91,00	Qualifier
3-MCPD-d5	201,00	150,00	Quantifier
	201,00	93,00	Qualifier
3-MBPD	245	150	Quantifier
	242	147	Qualifier
3-MBPD-d5	245	150	Quantifier
	247	150	Qualifier
3-MBPD-13C3	243	149	Quantifier
	**	**	Qualifier

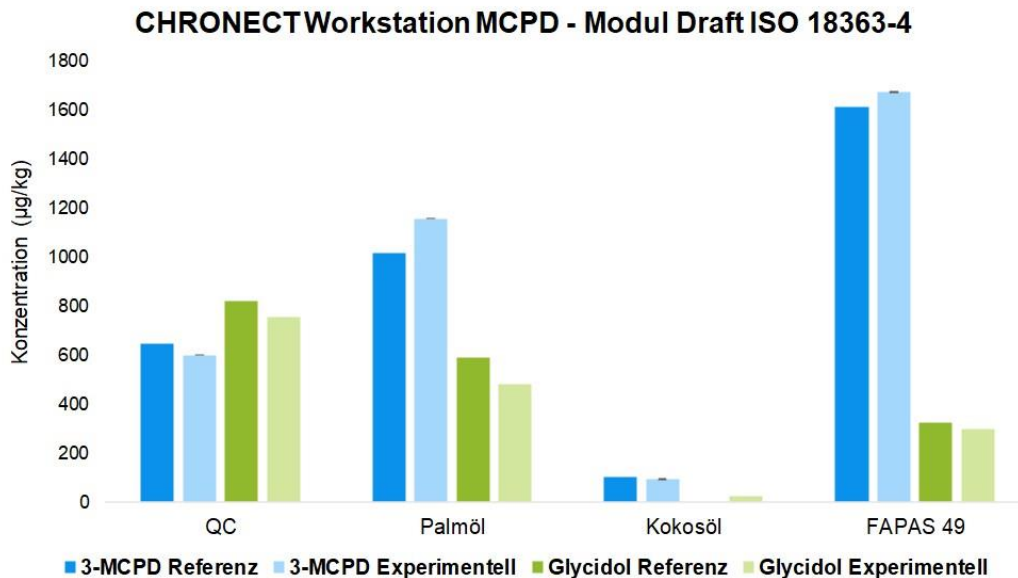
\*\* Nicht möglich aufgrund von Interferenzen mit dem Glycidol-d5 internen Standard.

**Tabelle 2:** Validierungsparameter aus Messungen mit dotierten Ölen und Referenzölen.

<b>Parameter</b>	<b>Soll</b>	<b>Ist</b>
Wiederfindung (%)	75 – 100	104
Reproduzierbarkeit (RSD %)	< 10	2,6
LOQ* (µg/kg)	< 50	32
LOD** (µg/kg)	≤ 10	10

\* Bestimmungsgrenze; \*\* Nachweisgrenze.

## CHRONECT Workstation MCPD – Draft ISO 18363-4 Applikationsnote 1904



**Abbildung 3:** Vergleichswerte verschiedener Referenzmaterialien der automatisierten Methode Draft ISO 18363-4.

### Bewertung der Ergebnisse

Die Validierung der Methoden erfolgte anhand dotierter Pflanzenöle und Referenzmaterialien, um die Wiederfindung und die Reproduzierbarkeit des Gesamtverfahrens zu bestimmen (Tabelle 2). Für die Wiederfindung wurde mit dotiertem Olivenöl und der Methode „Draft ISO 18363-4“ 104 % ermittelt (Tabelle 2). Für das freie 3-MCPD wurde eine Reproduzierbarkeit von 97,4 % festgestellt. Mit einem Blindwert < 10 µg/kg ergibt sich eine Bestimmungsgrenze für das Gesamtsystem von 32 µg/kg. Sofern ein kleinerer Blindwert erreicht wird, sind auch noch niedrigere Bestimmungsgrenzen < 25 µg/kg möglich. Hier beeinflussen vor allem die Menge des internen Standards und die generelle Sauberkeit aller verwendeten Chemikalien die Messung.

Die Messung der Referenzmaterialien (Abbildung 3) zeigt eine ähnliche Wiederfindung im Vergleich zu den theoretischen Werten (3-MCPD Experimentell und Glycidol Experimentell) die mit der 3-in-1-Methode ermittelt wurden, sowohl im hohen mg/kg-Bereich, als auch im niedrigen µg/kg-Bereich. Beide Methoden, Zwagerman und 3-in-1, folgen der alkalischen Umesterung, wobei im Fall der 3in1-Methode die Reaktion bei ~ -22 °C für 16 h abläuft.

Dank der verwendeten <sup>13</sup>C<sub>3</sub>-3-MCPD-Ester und d<sub>5</sub>-Glycidol-Ester als interne Standards für die Quantifizierung und Korrektur bedarf es lediglich

einer Messung, um den Gehalt von 3-MCPD, 2-MCPD und Glycidol zu bestimmen.

Mithilfe des „One-piece-Workflow“ erhält der Anwender so das Probenergebnis nach etwa 48 Minuten und kann mithilfe der Software CHRONOS während des GC-Laufs schon die nächste Probe vorbereiten. Eine effiziente Auslastung des GC-MS-Systems ist damit gewährleistet. Da die Ergebnisse für alle drei Analyten nach nur einer Probenanalyse vorliegen, entfällt außerdem der Einfluss mehrerer Messunsicherheiten.

Andere Methoden mit alkalischer Umesterung für die MCPD-Analytik benötigen pro Probe jeweils zwei Probenvorbereitungen und GC-MS-Messungen. Der zeitliche und experimentelle Aufwand ist dabei wesentlich höher als bei der von Zwagerman veröffentlichten Methode, kann jedoch durch den automatisierten Ansatz ausgeglichen werden.

### Zusammenfassung

Die automatische Bestimmung von 2-MCPD, 3-MCPD und Glycidol in Fetten und Ölen nach der Methode von Zwagerman *et al.* stellt eine elegante und effiziente Alternative zu den bisher offiziellen ISO Methoden 18363-1, ISO 18363-2 und ISO 18363-3 dar.

Die Ergebnisse sind sehr gut mit der offiziellen 3-in-1-Methode vergleichbar und zeigen nur geringe Abweichungen im niedrigen und höheren Konzent-

## CHRONECT Workstation MCPD – Draft ISO 18363-4 Applikationsnote 1904

rationsbereich. Bestimmungs- und Nachweisgrenzen sind ähnlich der offiziellen Methode (3-in-1), wobei der größte Einfluss lediglich der Blindwert aus den Lösungsmitteln und Reagenzien ist.

Die CHRONECT-Workstation  
MCPD – Modul Draft ISO  
18363-4 ist eine Entwicklung  
von Axel Semrau.

**Technische Änderungen vorbehalten**

Axel Semrau GmbH & Co. KG  
Stefansbecke 42  
45549 Sprockhövel  
Tel.: 02339 / 12090  
Fax: 02339 / 6030  
[www.axelsemrau.de](http://www.axelsemrau.de)  
[info@axelsemrau.de](mailto:info@axelsemrau.de)