

# 3-MCPD- und Glycidyl-Fettsäureester

## Die indirekten Methoden im Überblick

Anna Dingel und Reinhard Matissek

In den letzten fünf Jahren ist eine Vielzahl von verschiedenen Analysemethoden zur Quantifizierung von 3-MCPD- und Glycidyl-Fettsäureestern entwickelt worden. Der hier vorgestellte Überblick soll zur Übersichtlichkeit über die methodische Vielfalt der indirekten Untersuchungsverfahren beitragen und die Möglichkeit geben, für jede Fragestellung eine zielorientierte Methode wählen zu können.



Anna Dingel

### ›› Zur Person

Staatl. geprüfte Lebensmittelchemikerin, seit 2010 im LCI tätig als Fachbereichsleitung Gaschromatografie ‹‹

Das Vorkommen von 3-Monochlorpropan-diol-Fettsäureestern (3-MCPDE) wurde erstmals im Jahre 2004 in Lebensmitteln beschrieben [1]. In raffinierten Speisefetten und -ölen konnten 3-MCPDE Ende des Jahres 2006 erstmals nachgewiesen werden [2] und dies im Jahre 2007 durch detaillierte Messungen des CVUA Stuttgart bestätigt werden. Neben 3-MCPDE wurden im Jahr 2008 zusätzlich auch Glycidyl-Fettsäureester (GE) in Speisefetten und -ölen nachgewiesen. Eine Übersicht der Grundstrukturen ist in Abbildung 1 dargestellt. Durch Variation der veresterten Fettsäuren ergibt sich für die 3-MCPDE eine Vielzahl von möglichen Einzelverbindungen (Kongenere). Zum Beispiel liefern sechs verschiedene Fettsäuren eine theoretische Anzahl von 96 möglichen 3-MCPD-Mono- und -Diestern, einschließlich aller Stereoisomeren (s. Gleichung 1) [3].

$$X = 6 \times n + 4 \times \sum_{i=1}^n (i - 1) \quad \text{Gleichung 1}$$

Rechenmodell zur Anzahl möglicher 3-MCPDE-Kongenere mit: X = Anzahl möglicher 3-MCPDE, n = Anzahl der in Betracht kommenden Fettsäuren.

Bislang liegen noch keine ausreichenden toxikologischen Daten über 3-MCPDE vor.

Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) geht davon aus, dass im Verdauungstrakt sowohl 3-MCPD als auch Glycidol aus den Estern freigesetzt wird [4]. Die International Agency for Research on Cancer (IARC) hat freies 3-MCPD als mögliches Humankarzinom (IARC-Gruppe 2B) eingestuft [5]. Die duldbare tägliche Aufnahmemenge (Tolerable Daily Intake, TDI) liegt für freies 3-MCPD bei 2 µg/kg Körpergewicht. Glycidol wird von der IARC als wahrscheinlich krebserregend für den Menschen (IARC-Gruppe 2A) eingestuft [6], ein TDI wird daher nicht abgeleitet.

### Direkte vs. indirekte Methoden

Mittlerweile wurde eine Reihe von verschiedenen Analysemethoden zur Quantifizierung von 3-MCPDE entwickelt (Auswahl: [7–19]). Es wird zwischen sog. direkten und indirekten Analysemethoden unterschieden. *Direkte* Analysemethoden erfassen einzelne 3-MCPD-Ester-Kongenere mittels LC-MS/MS; hierbei ist für eine exakte Quantifizierung jedes möglichen Esterkongeners die entsprechende stabilisotopenmarkierte Standardsubstanz erforderlich. Die *indirekten* Analysemethoden liefern nach Spaltung der Fettsäureester und Freisetzung der gemeinsamen Komponente 3-MCPD bzw.

Glycidol Summenergebnisse der vielen verschiedenen Esterkongenere mittels GC-MS (meist angegeben als Äquivalente von 3-MCPD bzw. Gycidol). Inzwischen gibt es eine Fülle von Analysemethoden, die neben der Differenzierung zwischen 3-MCPDE und GE auch eine Quantifizierung des isomeren 2-MCPDE ermöglichen.

### Indirekte Analysemethoden

Alle indirekten Analysemethoden zur Bestimmung von 3-MCPDE unterliegen dem gleichen Grundprinzip: Nach Zugabe eines stabilisotopenmarkierten internen Standards (3-MCPD- $d_5$  oder 3-MCPDE- $d_5$ ) werden die Fettsäureester hydrolysiert und das 3-MCPD als gemeinsame Komponente aller Kongenere freigesetzt. Das freie 3-MCPD wird dann nach Extraktion der unverseifbaren Anteile derivatisiert und mittels GC-MS quantifiziert.

Die Unterschiede der beschriebenen zahlreichen Analysemethoden beruhen im Wesentlichen auf den verschiedenen Arten der Esterhydrolyse und den unterschiedlichen Derivatisierungsmöglichkeiten. Die Esterspaltung kann entweder im sauren oder alkalischen Milieu aber auch enzymatisch durchgeführt werden. Die häufig beschriebene alkalische Esterhydrolyse mit Natriummethylat setzt das 3-MCPD in sehr kurzer Zeit und bei Raumtemperatur aus seinen Estern frei. Die saure Hydrolyse kann bei 40 °C innerhalb von 16 Stunden durchgeführt werden. Neben der Umsetzung des freigesetzten 3-MCPD mit Phenylboronsäure (PBS) ist auch eine Derivatisierung mit Heptafluorbuttersäure-Anhydrid (HFBA) bzw. Heptafluorbutyrimidazol (HFBI) möglich. Das Grundschema der indirekten Methoden mit alkalischer Hydrolyse und PBS-Derivatisierung ist in Abbildung 2 dargestellt.

### Übersicht über indirekte Analysemethoden

Eine schematische Übersicht über die aktuell publizierten indirekten Analysemethoden und den damit erfassbaren Analyten zeigt Abbildung 3. Nach den

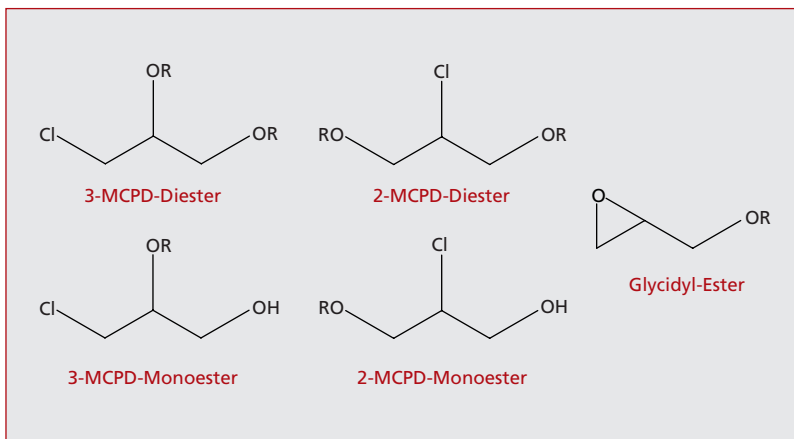


Abb. 1 Grundstrukturen

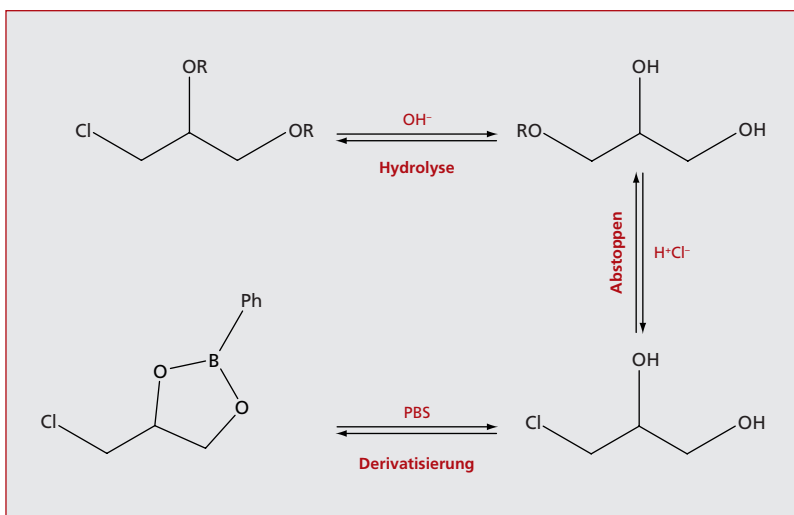
vorangestellten Nummern geordnet, werden im Folgenden die einzelnen Methoden näher erläutert.

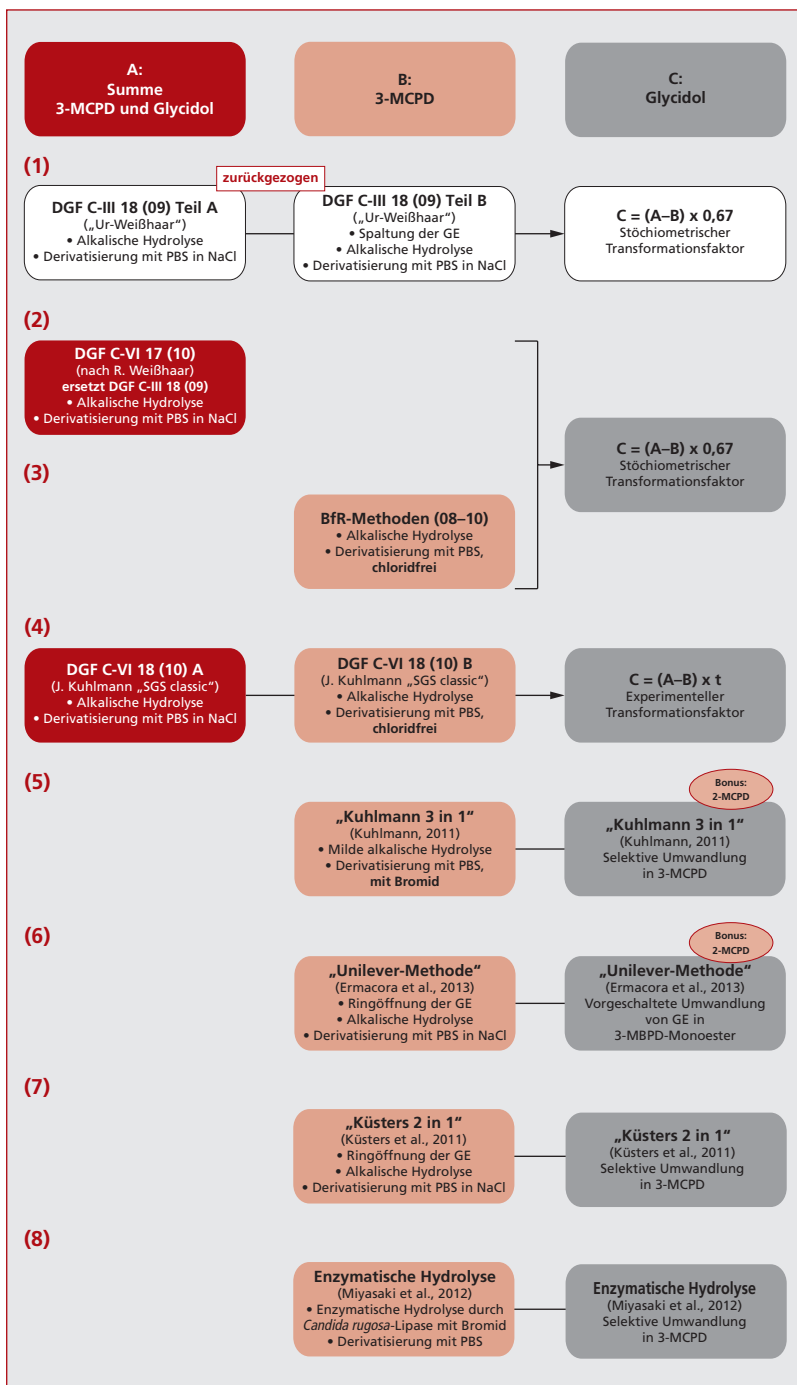
#### (1) Ur-Weisshaar-Methode

Die zunächst publizierte, unter dem Schlagwort „Ur-Weisshaar-Methode“ bekannte Analysemethode basierte auf einer alkalischen Hydrolyse mit Natriummethylat und anschließender Derivatisierung mit PBS in Natriumchlorid-Lösung [10]. Im Methodenvergleich zu parallel entwickelten anderen Analysemethoden konnte bereits zu Beginn des Jahres 2008 festgestellt werden, dass die Anwesenheit von Chloridionen in alkalisch hydrolysierten Reaktionsansätzen zu 3-MCPDE-Überbefunden führt [20].

Diese Überbefunde wurden nach kurzer Zeit als GE identifiziert [21]. Die Zugabe von chloridhaltigen Lösungen während der Aufarbeitung liefert zusätzliches

Abb. 2 Grundschema der indirekten Analyse: alkalische Esterspaltung mit Phenylboronsäure-Derivatisierung





**Abb. 3**  
Die Entwicklung der Analytik von 3-MCPDE, 2-MCPDE und GE im Überblick

3-MCPD durch eine nucleophile Ringöffnung am Epoxidring des Glycidols (s. Abb. 4). Im Folgenden stand nun die Differenzierung zwischen 3-MCPDE und GE im Blickpunkt der Methodenentwicklungs- und -optimierungsstrategien. Zwischenzeitlich sind Analysenansätze entwickelt und optimiert worden, die entweder eine indirekte Quantifizierung der GE über Differenzrechnung oder eine direkte Quantifizierung ermöglichen [16–19].

**(2) DGF C-VI 17 (10)**

Durch eine gezielte Vorbehandlung der Proben vor der alkalischen Hydrolyse mit einem Gemisch aus Schwefelsäure und Propanol sollten GE aus dem Reaktionsansatz entfernt werden und die Quantifizierung in den Proben über indirekte Differenzrechnung erfolgen. Die zunächst als Einheitsmethode C-III 18 (09) Teil A und B der Deutschen Gesellschaft für Fettwissenschaften (DGF) veröffentlichte Methode wurde aber Anfang 2011 zurückgezogen, da festgestellt wurde, dass die Zerstörung der GE in Vorfeld der Analyse nicht zuverlässig gelang, um sichere Analyseergebnisse zu gewährleisten. Teil A der Methode, ohne vorgeschaltete Eliminierung der GE, ist seither jedoch als evaluierte Einheitsmethode DGF C-VI 17 (10) veröffentlicht und liefert ein Summenergebnis von 3-MCPDE und GE [14].

**(3) BfR-Methoden**

Das BfR hat im Jahr 2009 im Rahmen einer Laborvergleichsuntersuchung drei verschiedene chloridfreie Methodenansätze vorgestellt, die ausschließlich 3-MCPDE erfassen [11–13]. Während eine der Methoden die saure Esterspaltung und die Verwendung von PBS als Derivatisierungsreagenz kombiniert [11], beruhen die beiden weiteren Methoden auf einer alkalischen Esterspaltung: einmal kombiniert mit PBS-Derivatisierung [12], im anderen Fall mit HFBA als Derivatisierungsreagenz [13]. Im Rahmen eines weiteren BfR-Ringversuches in den Jahren 2010 bis 2011 wurden die Methoden dahingehend optimiert, dass eine beschleunigte Fettextraktion mittels ASE (Accelerated Solvent Extraction) vorgeschaltet wurde und neben 3-MCPDE auch 2-MCPDE quantifiziert werden können.

**(4) Kuhlmann classic**

Als eine weitere Variante der indirekten Differenzierung zwischen 3-MCPDE und GE wurde im Jahr 2011 die Kuhlmann-classic-Methode als Einheitsmethode DGF C-VI 18 (10) publiziert [15]. Diese Methode basiert ebenso auf einem Zwei-Ansatz-Prin-

zip: In einem Reaktionsansatz (Ansatz A) erfolgt das Abstoppen der alkalischen Hydrolyse mit angesäuerter Natriumchlorid-Lösung, freigesetztes Glycidol reagiert unter diesen Bedingungen zu zusätzlichem 3-MCPD. Für Ansatz B erfolgt das Abstoppen mit angesäuerter, chloridfreier Salzlösung, das freigesetzte Glycidol bildet hier kein zusätzliches 3-MCPD. Zur Differenzrechnung wird ein experimentell ermittelter Transformationsfaktor herangezogen.

#### (5) Kuhlmann 3-in-1

Bei milden Bedingungen für die alkalische Esterhydrolyse (16 Stunden bei  $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) ist die simultane Quantifizierung von 3-MCPDE, 2-MCPDE und GE nach der Kuhlmann-3-in-1-Methode möglich. Durch Abstoppen der Hydrolyse mit angesäuerter Natriumbromid-Lösung wird freigesetztes Glycidol gezielt in 3-Monobrompropandiol (3-MBPD) umgesetzt (s. Abb. 5) und kann als solches auch unmittelbar quantifiziert werden. Die milden Bedingungen der Esterspaltungen reduzieren Isomerisierungsreaktionen von 3-MCPD zu Glycidol und ermöglichen so die Quantifizierung von allen drei Verbindungen in nur einem Reaktionsansatz [16].

#### (6) Unilever-Methode

Die gezielte Umsetzung von GE zu 3-MBPD nutzt in abgewandelter Form auch die *Unilever-Methode*. Noch vor der sauren Hydrolyse der Ester (Schwefelsäure/Methanol,  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 16 Stunden) werden die GE durch angesäuerte Natriumbromid-Lösung selektiv in 3-MBPD-Monoester umgewandelt. Eine nachgeschaltete saure Esterspaltung und Derivatisierung mit PBS ermöglicht auch hier die Quantifizierung von 2-MCPDE, 3-MCPDE und GE in einem Ansatz ohne Differenzrechnung [17].

#### (7) Küsters 2-in-1

Alternativ zur oben erwähnten Umsetzung der GE wird in der Küsters-2-in-1-Methode eine gezielte Ringöffnung und Umwandlung der GE in 3-Methoxypropan-1,2-diol-Ester (3-MPDE) beschrieben (s. a. Abb. 6). Durch Zugabe von Methanol/Schwefelsäure (100:1, v/v) wird der Epoxidring des GE regioselektiv geöffnet und in 3-MPDE umgewandelt. Nach alkalischer Esterhydrolyse und Derivatisierung mit PBS erfolgt die Quantifizierung gemeinsam mit 3-MCPD [18].

#### (8) Enzymatische Esterspaltung

Neben der alkalischen oder sauren Esterspaltung findet auch die enzymatische Hydrolyse der Fettsäureester Anwendung. Der Einsatz der *Candida rugosa*-Lipase bei gleichzeitiger Dosierung von Natriumbromid ermöglicht eine besonders schonende Freisetzung von 3-MCPD und Glycidol sowie die Umsetzung von Glycidol zu 3-MBPD innerhalb von 30 Minuten bei Raumtemperatur [19].

#### Fazit

Jede der hier vorgestellten Methoden hat im Rahmen der noch jungen analytischen Historie der 3-MCPDE bzw. GE ihre eigene Berechtigung. Durch fortwährende Neu- und Weiterentwicklungen und Gegenüberstellen verschiedener analytischer Ansätze konnte bisher eine ganze Reihe an Erkenntnissen gewonnen werden.

So wurde mittlerweile beschrieben, dass 3-MCPD im alkalischen Medium nicht ausreichend stabil ist und innerhalb weniger Minuten Abbaureaktionen zu beobachten sind [23]. Durch Verwendung von stabilisotopenmarkiertem 3-MCPDE im Gegensatz zu markiertem 3-MCPD können Störungen der Analyseergebnisse durch Neben- und Abbau-



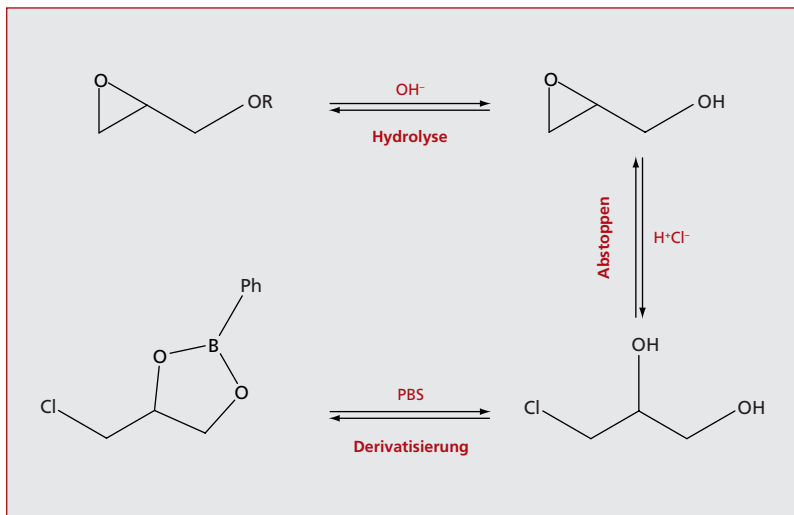
## 8 auf einen Streich!

**CarnoCheck®:**  
Simultane Identifizierung von  
acht Tierarten in Lebensmitteln

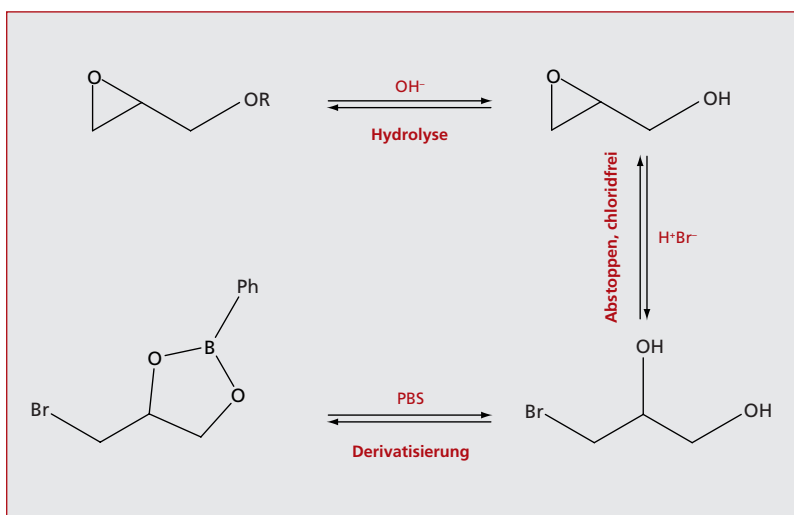


- Detaillierte Kontrolle von Lebensmitteln mit Fleischanteil
- DNA-Chip zur simultanen Identifizierung von 8 Tierarten: Rind, Schwein, Pferd, Esel, Pute, Huhn, Schaf und Ziege
- Nachweis aller 8 Tierarten in einer Analyse binnen 3 Stunden
- On-Chip-Kontrollen garantieren fehlerfreie Ergebnisse
- Nachweisgrenze zwischen 0,25 - 1%





**Abb. 4 Umsetzung von GE zu 3-MCPD bei Anwesenheit von Chloridionen im Reaktionsansatz**



**Abb. 5 Gezielte Umsetzung von GE zu 3-MBPD mit Bromidionen**

reaktionen minimiert werden. Diese Einflüsse werden auch durch Anwendung der sehr schonenden, aber zeitaufwendigen, sauren Esterspaltung ausgeschlossen [22]. Die ebenfalls sehr schonende enzymatische Hydrolyse wird bisher nur vereinzelt angewendet.

Allen neuerlich publizierten Methoden gemein ist die Derivatisierung mit Phenylboronsäure. Zwar ermöglicht eine Derivatisierung mit HFBA auch die Quantifizierung des isomeren 2-MCPD, streng wasserfreies Arbeiten erschwert jedoch die Anwendung.

Neben der Differenzierung und der simultanen Analyse von 3-MCPDE und GE ist auch die Quantifizierung der isomeren 2-MCPDE ein Vorzug der jüngsten Methodenentwicklungen. Durch Laborvergleichsuntersuchungen werden zurzeit die Differenzierungsmethoden DGF C-VI 18 (10), Kuhlmann-3-in-1-Methode und die Unilever-Methode offiziell getestet und validiert. ■

### Anschrift der Autoren

**Anna Dingel**

Anna.Dingel@lci-koeln.de

**Prof. Dr. Reinhard Matissek**

LCI, Lebensmittelchemisches Institut

des Bundesverbandes der

Deutschen Süßwarenindustrie e. V.

Adamsstr. 52–54

51063 Köln

www.lci-koeln.de



**Prof. Dr. Reinhard Matissek**

Institutsleiter und Direktor des LCI; apl. Professor am Institut für Lebensmittelchemie der TU Berlin; u. a. Vorstandsmitglied der Stiftung der Deutschen Kakao- und Schokoladenwirtschaft, Hamburg/Bonn, Mitglied in verschiedenen Kommissionen des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR) und Mitglied des Wissenschaftlichen Ausschusses des FEI

Literaturverweise und Abbildung 6 finden Sie unter [www.dlr-online.de](http://www.dlr-online.de)

→ DLR Plus

Passwort: Zentrifugationssäulen

### 3-MCPD- und Glycidyl-Fettsäureester

#### Die indirekten Methoden im Überblick

Anna Dingel und Reinhard Matissek

#### Literatur

- [1] *Svejkovská B, Novotný O, Divinová M, Relová Z, Doležal M, Velisek J*: Esters of 3-chloropropane-1,2-diol in foodstuffs. *Czech J Food Sci* **22**, 190–196 (2004).
- [2] *Zelinkova Z, Svejkovska B, Velisek J, Dolezal M*: Fatty acid esters of 3-chloropropane-1,2-diol in edible oils. *Food Addit Contam* **23**, 1290–1298 (2006).
- [3] Lebensmittelchemisches Institut des Bundesverbandes der Deutschen Süßwarenindustrie: Wie viele 3-MCPD-Ester gibt es? Ein Rechenmodell. [www.lci-koeln.de/deutsch/veroeffentlichungen/lci-focus/wieviele-3-mcpd-ester-gibt-es-ein-rechenmodell](http://www.lci-koeln.de/deutsch/veroeffentlichungen/lci-focus/wieviele-3-mcpd-ester-gibt-es-ein-rechenmodell) (letzter Zugriff: 09.01.2013).
- [4] *Bakhiya N, Abraham K, Gürtler R, Appel KE, Lampen A*: Toxicological assessment of 3-Chloropropane-1,2-diol and glycidol fatty acid esters in food. *Mol Nutr Food Res* **55**, 1–13 (2011).
- [5] International Agency for Research on Cancer: Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Vol. 101. Some Chemicals Present in Industrial and Consumer Products, Food and Drinking-water. [www.monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol101/index.php](http://www.monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol101/index.php) (letzter Zugriff: 09.01.2013).
- [6] International Agency for Research on Cancer: Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Vol. 77. Some industrial Chemicals. [www.monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol96/index.php](http://www.monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol96/index.php) (letzter Zugriff: 09.01.2013).
- [7] *Blumhorst M, Venkitasubramanian P, Collison M*: Direct Determination of Glycidyl Esters of Fatty Acids in vegetable Oils by LC-MS. *J Amer Oil Chem Soc* **88**, 1275–1283 (2011).
- [8] *Hori K, Koriyama N, Omori H, Kuriyama M, Arishima T, Tsumura K*: Simultaneous determination of 3-MCPD fatty acid esters and glycidol fatty acid esters in edible oils using liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *LWT – Food Sci Tech* **48**, 204–208 (2012).
- [9] *Masukawa Y, Shiro H, Kondo N, Kudo N*: Generalized Method to quantify glycidol fatty acid esters in edible oils. *J Amer Oil Chem Soc* **88**, 15–21 (2011).
- [10] *Weisshaar R*: Determination of total 3-Chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) in edible oils by cleavage of MCPD esters with sodium methoxide. *Eur J Lip Sci Tech* **110**, 183–186 (2008).
- [11] *Fry H, Woehrlin F, Preiss-Weigert A*: 2. Ringversuch zur Bestimmung von 3-MCPDEttsäureestern in Speisefetten und -ölen – Teil I. Methode\_82\_FC-008-01, Version 1 (2009).
- [12] *Fry H, Woehrlin F, Preiss-Weigert A*: 2. Ringversuch zur Bestimmung von 3-MCPDEttsäureestern in Speisefetten und -ölen – Teil I. Methode\_82\_FC-009-01, Version 1 (2009).
- [13] *Fry H, Woehrlin F, Preiss-Weigert A*: 2. Ringversuch zur Bestimmung von 3-MCPDEttsäureestern in Speisefetten und -ölen – Teil I. Methode\_82\_FC-010-01, Version 1 (2009).
- [14] Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaften: DGF Einheitsmethode C-VI 17 (10) Abteilung C 1. WVG Stuttgart (2010).
- [15] Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaften: DGF Einheitsmethode C-VI 18 (10) Abteilung C 1. WVG Stuttgart (2010).
- [16] *Kuhlmann J*: Determination of bound 2,3-epoxy-1-propanol (glycidol) and bound monochloropropanediol (MCPD) in refined oils. *Eur J Lip Sci Tech* **113**, 335–344 (2011).
- [17] *Ermacora A, Hrcirik K*: A novel Method for Simultaneous Monitoring of 2-MCPD, 3-MCPD and Glycidyl Esters in Oils and Fats. *J Amer Oil Chem Soc* **90**, 1–8 (2013).
- [18] *Küsters M, Bimber U, Reeser S, Gallitzendörfer R, Gerhartz M*: Simultaneous Determination of Glycidyl Esters and 3-Monochloropropan-1,2-diol (MCPD) Esters in Different Foodstuffs by GC-MS. *J Agric Food Chem* **59**, 6263–6270 (2011).
- [19] *Miyazaki K, Koyama K, Sasako H, Hirao T*: Indirect Method for Simultaneous Determinations of 3-Chloro-1,2-Propanediol Fatty Acid Esters and Glycidyl Fatty Acid Esters. *J Am Oil Chem Soc* **89**, 1403–1407 (2012).
- [20] Bundesinstitut für Risikobewertung: Ergebnisprotokoll 1. Sitzung der AG „Analytik von 3-MCPD Fettsäureestern in raffinierten und fetthaltigen Lebensmitteln“. Berlin (2008).
- [21] *Kuhlmann J*: Überbefunde bei der Bestimmung von 3-MCPD-Estern in Ölen & Fetten? Mögliche Ursachen und Konsequenzen. Vortrag. 2. Sitzung der AG „Analytik von 3-MCPD Fettsäureestern in raffinierten und fetthaltigen Lebensmitteln“. Bundesinstitut für Risikobewertung. Berlin (2008).
- [22] *Crews C, Chiodini A, Granvogel M, Hamlet C, Hrcirik K, Kuhlmann J, Lampen A, Scholz G, Weisshaar R, Wenzl T, Jasti PR, Seefelder W*: Analytical Approaches for MCPD esters and Glycidyl esters in food and biological samples: A review and future perspectives. *Food Addit Contam A* **30**, 11–45 (2013).
- [23] *Hrcirik K, Zelinkova Z, Ermacora A*: Critical factors of indirect determination of 3-chloropropane-1,2-diol esters. *Eur J Lipid Sci Technol* **113**, 361–367 (2011).

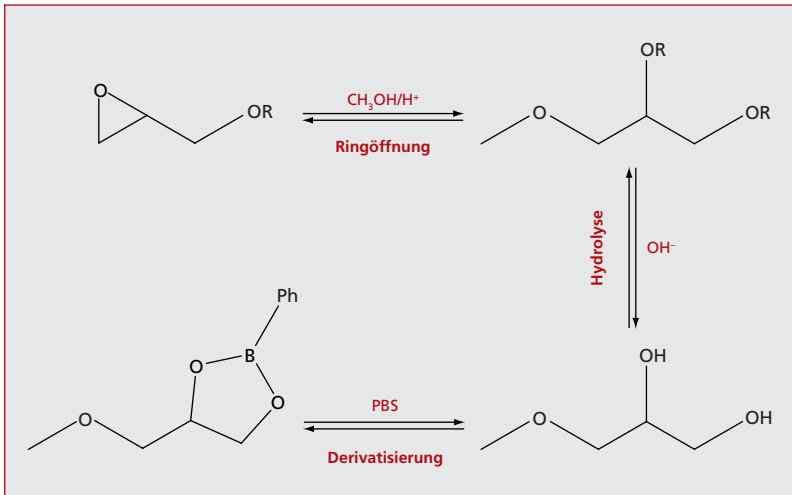


Abb. 6 Umsetzung von GE zu 3-MPDE