

Spurensuche: Mineralöl in Lebensmitteln

Eine Nachweismethode für DNA-reaktive Mineralölfractionen

Mit Mineralöl kontaminierte Lebensmittel waren in den vergangenen 15 Jahren regelmäßig Ursache für Schlagzeilen und Stellungnahmen der europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA = European Food Safety Authority). Ob ukrainisches Sonnenblumenöl im Jahr 2008, der Foodwatch-Report zu Babymilchpulver 2019 oder die jährlichen Warnungen vor dem Schoko-Nikolaus in der Vorweihnachtszeit [1, 2, 11]: Mineralölverunreinigungen finden sich mittlerweile überall. Aber wie gefährlich sind sie? Dieser Frage wurde im kooperativen Forschungsprojekt „MOSH MOAH – Reduktion von Mineralöl in Lebensmitteln“ nachgegangen.

Bereits 2012 gab es ein wissenschaftliches Gutachten der EFSA zu den unterschiedlichen Effekten und Wirkungen von Mineralölkontaminationen auf die menschliche Gesundheit [3]. Als Hauptexpositionsquellen wurden in dem Bericht Lebensmittelverpackungen und deren Additive sowie Schmiermittel hervorgehoben – heute wissen wir, dass die Kontaminationen verschiedenste Quellen im gesamten Produktionszyklus haben. Dabei unterscheidet man grundsätzlich zwischen unbeabsichtigten Verunreinigungen und erlaubter Einbringung z. B. durch Hilfsstoffe wie E905, also mikrokristallines Wachs. All diese führen in unterschiedlichem Maße dazu, dass Mineralöle (MOH = Mineral Oil Hydrocarbons) in Lebensmitteln enden und beim Verzehr vom Körper aufgenommen werden [3, 4, 5].

Trennung in MOSH und MOAH

MOH sind Mischungen von Substanzen, deren Ursprung im Rohöl liegt. Aufgrund ihrer komplexen und vielseitigen Zusammensetzung sind die einzelnen Komponenten bis heute aber kaum identifizierbar, wodurch eine substanzbasierte Risikobewertung schwierig ist. Eine grobe Trennung gelingt in MOSH (Mineral Oil Saturated Hydrocarbons) und MOAH (Mineral Oil Aromatic Hydrocarbons). Bei MOSH handelt es sich um aliphatische langkettige oder zyklische Kohlenwasserstoffe. Sie können sich zwar im menschlichen Körper bis zu einer gewissen Menge anreichern, ihnen werden jedoch keine schwerwiegenden gesundheitsbeeinträchtigenden Eigenschaften zugeordnet. MOAH hingegen sind aromatische

Verbindungen, die aufgrund der Vorkommnisse von polyaromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) mit 3–7 Ringen als potenziell mutagen und karzinogen eingestuft werden. In üblichen Mischungen liegt der MOAH-Anteil bei 15–30 % [3, 6].

Stetige Weiterentwicklung in der Analytik

Um die Sicherheit für Konsument*innen zu gewährleisten, ist es Aufgabe der Routineanalyse, die Sicherheitsbedenken in Lebensmitteln effektiv zu erkennen, um diese zu beheben. Der Mangel an standardisierten Methoden wird zwar langsam beseitigt (z. B. Update der EN16995:2022, JRC-Methode für MOAH in Babymilchnahrung), dennoch bleibt die Analytik herausfordernd [4, 15, 16]. Einerseits ist die Probenvorbereitung, die vor allem vom Fettgehalt der Lebensmittelmatrix abhängig ist, sehr komplex. Viele manuelle Aufreinigungsschritte sind nötig wie Verseifung, um Fett zu entfernen, ein Clean-up mit Aluminiumoxid, um natürlich vorkommende n-Alkane aus der MOSH-Fraktion zu eliminieren (Alox), oder Epoxidierung, um Olefine aus der MOAH-Fraktion zu beseitigen (Epox), sowie eine anschließende Anreicherung durch Lösungsmittelverdampfung.

Andererseits wird mittels der State-of-the-Art-Analysenmethode, der online gekoppelten HPLC-GC-FID (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Gaschromatographie-Flammenionisationsdetektion), nur eine Trennung der MOH in MOSH und MOAH und eine Bestimmung als Summenparameter bewerkstelligt. Dabei wird das nach der Probenvorbereitung erhaltene Extrakt zunächst mit Normalphasen-HPLC in die zwei Fraktionen (MOSH und MOAH) getrennt. Die gewonnenen Fraktionen werden danach online auf zwei idente GC-Säulen in einem Ofen transferiert, um MOSH und MOAH parallel in einem Lauf zu bestimmen, wobei man durch ein schnelles und steiles Ofenprogramm die Empfindlichkeit der Methode steigert, indem die komplexen Substanzgemische jeweils in einem großen, nicht aufgelösten Peak, dem sogenannten Mineralöl-Hump, konzentriert werden.

Zwei universale Flammenionisationsdetektoren ermöglichen im finalen Schritt die Integration der MOSH- und MOAH-Humps und die Bestimmung der jeweiligen Gehalte (Abb. 2) [7, 8]. Immense Erleichterung bei der Routineanalytik bieten die vielen Automatisierungsmöglichkeiten. Die wichtigsten Clean-up-Schritte wie Alox und Epox sind bereits seit Längerem auch automatisiert verfügbar und können individuell



■ Abb. 1: Schon 2012 gab ein wissenschaftliches Gutachten der EFSA als Hauptexpositionsquellen für Mineralölkontaminationen Lebensmittelverpackungen und deren Additive sowie Schmiermittel an. Viele weitere Quellen kamen seitdem hinzu.

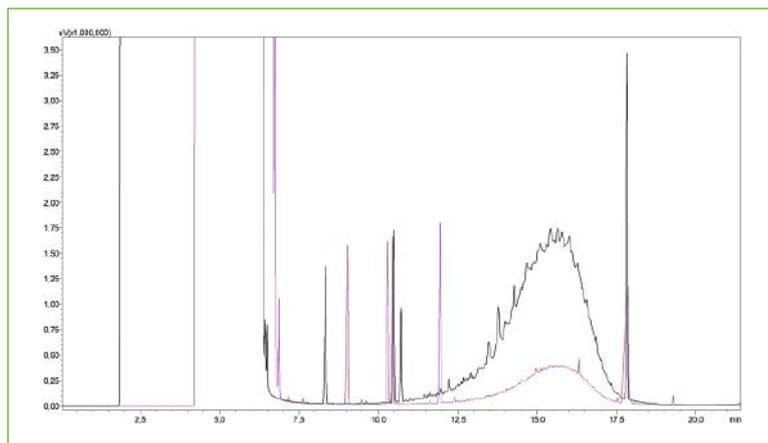
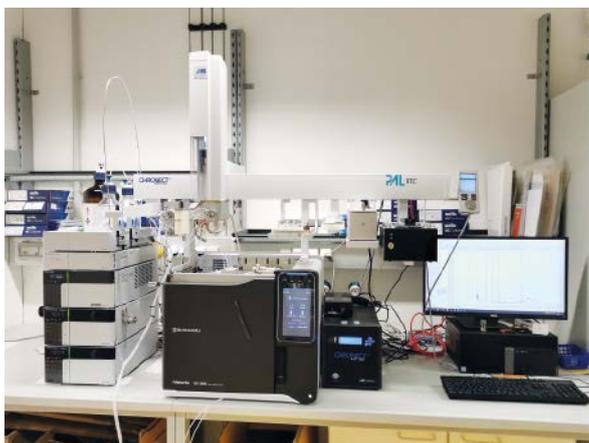


Abb. 2: Online gekoppelte HPLC-GC-FID (links) und Chromatogramm eines typischen Mineralöls (rechts, schwarz = MOSH, pink = MOAH).

für jede Probe direkt am System zugeschaltet werden, um entsprechend den standardisierten Methoden natürliche Interferenzen zu entfernen. Für Fette und Öle wurde vor Kurzem sogar eine vollständig automatisierte Aufarbeitung, die die Verseifung inkludiert, entwickelt [9].

Neue Grenzen

Als Reaktion auf MOAH-Befunde, die im Foodwatch-Report vom Dezember 2021 festgehalten wurden, wurde im April 2022 eine Stellungnahme des Ausschusses für Pflanzen, Tiere, Lebens- und Futtermittel (PAFF-Committee) der Europäischen Kommission publiziert [10, 11]. Darin sind maximale Quantifizierungslimits für die HPLC-GC-FID-Methode beschrieben, die von 0,5 mg MOAH/kg trockenes Lebensmittel über 1 mg MOAH/kg Lebensmittel mit einem Fettgehalt zwischen 4 % und 50 % bis zu 2 mg MOAH/kg für Lebensmittel mit einem Fettgehalt > 50 % reichen. Diese Quantifizierungsgrenzen werden zurzeit als allgemein gültige MOAH-Limits in der Europäischen Union interpretiert und Lebensmittel, die sie überschreiten, sollen vom Markt genommen werden.

Die Grenzen sind jedoch nicht toxikologisch begründet, sondern basieren lediglich auf der Sensitivität der aktuell verfügbaren LC-GC-FID-

Analysenmethode und dem Fettgehalt der Probe [10]. Auf toxikologischen Daten basierende Limits für die MOAH-Fraktion lassen sich aus dem TTC (Threshold of Toxicological Concern)-Konzept ableiten. Da angenommen wird, dass MOAH DNA-reaktive Eigenschaften besitzen, gilt ein viel geringerer täglicher Expositionsgrenzwert von 0,15 µg/Tag bzw. 0,15 µg/kg Lebensmittel für eine 60 kg schwere erwachsene Person [14]. Nur wenn nachgewiesen werden könnte, dass das Substanzgemisch der MOAH oder bestimmte Subfraktionen keine DNA-reaktiven Effekte aufweisen, könnte dieser Grenzwert um ein Vielfaches angehoben werden. Dazu ist eine stärker substanzbezogene Risikobewertung erforderlich und nicht nur die Bestimmung eines Summenparameters, wie dies bei der Verwendung der LC-GC-FID-Methodik der Fall ist.

2019 empfahl die EFSA daher, weitere Analysemethoden für mit MOAH kontaminierte Proben anzuwenden. Mit diesen sollte festgestellt werden, ob 3–7-PAKS in der Mischung vorhanden sind, die für den DNA-reaktiven Charakter der MOAH verantwortlich gemacht werden [5]. Die Methode der Wahl für diese Charakterisierung ist die umfassende zweidimensionale Gaschromatographie (GC×GC). Da jedoch mit dieser Methode immer noch Tausende Substanzen nachgewiesen werden können, ist eine Risikobewertung jeder einzelnen mit GC×GC

identifizierten Substanz nicht möglich. Alternativ könnte das gesamte MOAH-Gemisch – oder einzelne isolierte Subfraktionen mit bekannter Zusammensetzung – mithilfe von Bioassays auf DNA-reaktive Wirkungen untersucht werden.

Kombination von Methoden

In dem von der GLI Austria (Gemeinnützige Lebensmittelinitiative für Österreich) koordinierten Forschungsprojekt „MOSH MOAH – Reduktion von Mineralöl in Lebensmitteln“ hat sich ein kollektiver Ansatz als wegweisend herausgestellt. Der Technischen Universität Graz und dem Österreichischen Forschungsinstitut für Chemie und Technik (OFI), die als wissenschaftliche Partner das Forschungsvorhaben umgesetzt haben, ist es durch die Kombination von chemischer Analytik und gleichzeitiger toxikologischer Charakterisierung mit In-vitro-Tests gelungen, auf die zuvor gestellten Fragen Antworten zu generieren [12].

Ein essenzieller Bestandteil der Arbeiten war die weitere Subfraktionierung der MOAH in mono- und diaromatische bzw. tri- und polyaromatische Teilmengen und deren Isolierung und Charakterisierung, um mehr Einblicke in die Effekte der unterschiedlichen Komponenten der MOAH-Fraktion zu erhalten.

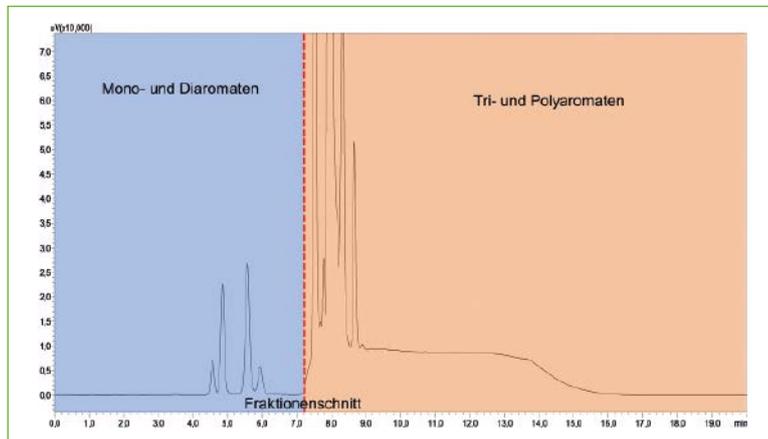
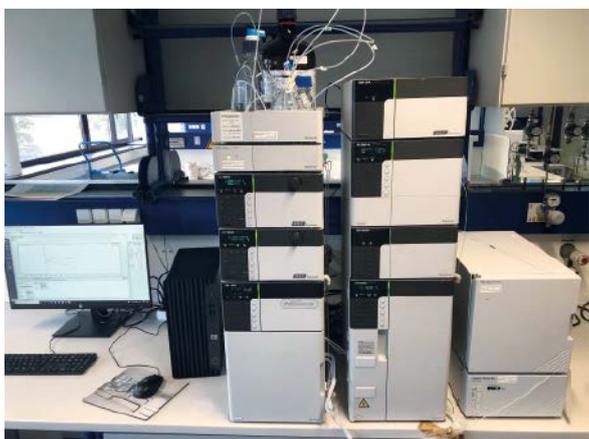


Abb. 3: Shimadzu Nexera LC-20AD mit Prominence RF-20AxS Fluoreszenzdetektor (FLD) und SPD-M20A Photodiodenarray-Detektor (DAD) zur Isolierung von mono- und diaromatischen sowie tri- und polyaromatischen Verbindungen aus den MOAH [13].

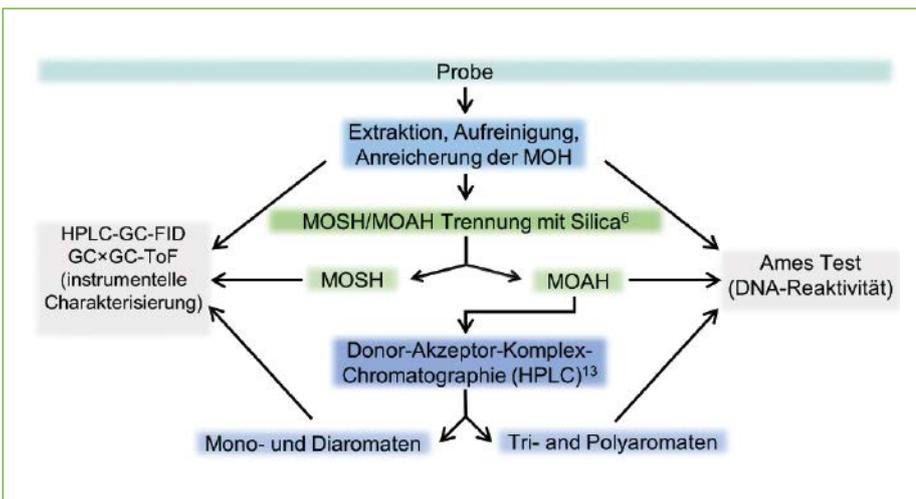


Abb. 4: Schematische Darstellung des experimentellen Versuchsaufbaus des Forschungsprojekts „MOSH MOAH“ [12].

Für die Isolierung wurde nach Koch et. al (2020) eine Donor-Akzeptor-Komplexchromatographie eingesetzt [13]. Dazu wurde eine Nexera LC-20AD (Abb. 3) mit einer Nucleosil Chiral 2,5-µm-Säule (250 × 4 mm, Macherynagel GmbH & Co. KG) und einem Prominence RF-20Axs Fluoreszenzdetektor (FLD) sowie einem SPD-M20A Photodiodenarray-Detektor (DAD) verwendet, welche die Trennung der gesamten MOAH-Fraktion in Mono- und Diaromaten sowie Tri- und Polyaromaten ermöglichte. Die getrennten Fraktionen wurden mittels Fraktionensammler gesammelt, angereichert und einer weiterführenden chromatographischen Methode, basierend auf GC×GC, zugeführt, um die unterschiedliche Zusammensetzung der Fraktionen zu evaluieren und die Präsenz bzw. Absenz von 3–7-PAKs nachzuweisen.

Um die DNA-Reaktivität der generierten Subfraktionen zu beurteilen, wurde anschließend

ein miniaturisierter Ames-Test eingesetzt. Dieser basiert auf Histidin-auxotrophen Salmonellen, die bei Exposition mit DNA-reaktiven Substanzen eine Mutation erfahren, wodurch ihre Histidin-Prototrophie wiederhergestellt wird und somit ein Wachstum auf Minimalmedium möglich ist. Abbildung 4 zeigt den finalen Versuchsablauf, der im Rahmen des Forschungsprojektes „MOSH MOAH“ umgesetzt wurde [12].

Erste Ergebnisse

Um aufzuzeigen, dass die erarbeitete kombinierte Analysenstrategie funktioniert, wurde ein Referenzmineralöl mit hohem MOAH-Gehalt getestet [12]. Erste Einblicke der instrumentellen Charakterisierung mittels GC×GC zeigten deutlich, dass Unterschiede in der Zusammensetzung zwischen der isolierten mono- und diaromati-

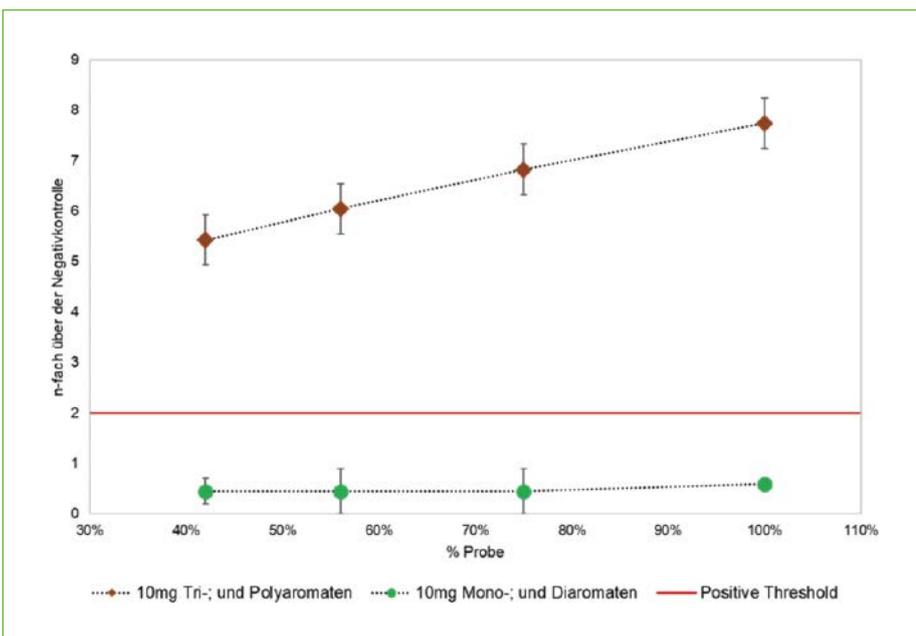


Abb. 5: Ames-Test-Resultate: Mono- und Diaromaten des getesteten Mineralöls sind nicht DNA-reaktiv im Ames-Test, während Tri- und Polyaromaten DNA-reaktiv sind [12].

schen und der tri- und polyaromatischen Fraktion erkennbar sind und dass die Auftrennung nach der Ringanzahl erfolgreich war.

Noch interessanter waren die Ergebnisse des Bioassays: Das getestete Referenzöl war im Ames-Test positiv, d.h., DNA-reaktive Effekte wurden festgestellt, genauso konnte dies auch für die MOAH und deren Tri- und Polyaromaten-Fraktion gezeigt werden. Im Gegensatz dazu blieben die MOSH- sowie die Mono- und Diaromaten-Fraktion der MOAH-Fraktion stets negativ und zeigten somit keine DNA-Reaktivität. In Abbildung 5 sind die Ergebnisse der fraktionierten Bestandteile auszugsweise dargestellt.

Nach diesem ersten Erfolg wurde die kombinierte Strategie auf weitere Proben angewendet, um fortlaufend toxikologische Daten von MOSH und vor allem von MOAH und den zugehörigen Subfraktionen zu erheben. Darunter waren etwa Food-Grade- und Non-Food-Grade-Schmieröle und -Fette sowie Verpackungsmaterialien. Der nachgewiesene Trend konnte dabei erneut bestätigt werden: In allen MOAH-Fractionen, die im Ames-Test positiv ausfielen, konnten auch aromatische Verbindungen mit mehr als drei Ringen mittels GC×GC nachgewiesen werden, während diese in Ames-negativen (nicht DNA-reaktiven) Proben nicht präsent waren. Mithilfe dieses kombinierten Ansatzes und des damit verbundenen Wissensaufbaus wird die Gefahrenidentifizierung und Risikobewertung von Proben, die mit MOAH kontaminiert sind, in Zukunft einfacher sein.

Verbesserung der Lebensmittelsicherheit

Im Rahmen des von der FFG (Österreichische Forschungsförderungsgesellschaft) unterstützten Forschungsvorhabens „MOSH MOAH – Reduktion von Mineralöl in Lebensmitteln“ hat das Projektkonsortium aktiv dazu beigetragen, Lösungen für die Problematik von Mineralölrückständen in Lebensmitteln zu finden. Bestehende Methoden wurden optimiert und neue Strategien entwickelt, um die Identifizierung von Eintragsquellen zu erleichtern, die Kontamination zu verringern und das damit verbundene Risiko stoffbezogener zu bewerten.

Die entstandenen Empfehlungen im Umgang mit MOSH und MOAH unterstützen die Verpackungs- und Lebensmittelbranche dabei, Mineralöl in Lebensmitteln nachhaltig zu reduzieren und die Sicherheit für Endkonsument*innen weiter zu erhöhen.

Autoren: Sanja Savić, Elisa Mayrhofer, Österreichisches Forschungsinstitut für Chemie und Technik (OFI), Team Mikrobiologie & Zellkultur Andrea Hochegger, Erich Leitner, Technische Universität Graz, Institut für Analytische Chemie und Lebensmittelchemie

Literatur

- [1] Biedermann M, Grob K. Comprehensive two-dimensional GC after HPLC pre-separation for the characterization of aromatic hydrocarbons of mineral oil origin in contaminated sunflower oil. *J Sep Sci.* 2009; <https://doi.org/10.1002/jssc.200900366>
- [2] Foodwatch. Project-report: International test of various canned baby milk products for their content of mineral oil hydrocarbons (MOSH/MOAH): A project of foodwatch international with foodwatch Germany, foodwatch Netherlands and foodwatch France; 2019.
- [3] EFSA Panel on food contact materials, enzymes, flavourings and processing aids (CEF). Scientific Opinion on Mineral Oil Hydrocarbons in Food. *EFSA (EFSA Journal).* 2012; <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2704>
- [4] Hochegger A, Moret S, Geurts L, Gude T, Leitner E, Mertens B, O'Hagan S, Poças F, Simat TJ, Purcaro G. Mineral oil risk assessment: Knowledge gaps and roadmap. Outcome of a multi-stakeholders workshop. *Trends in Food Science & Technology.* 2021; <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.021>
- [5] Arcella D, Baert K, Binaglia M. Rapid risk assessment on the possible risk for public health due to the contamination of infant formula and follow-on formula by mineral oil aromatic hydrocarbons (MOAH). *EFSA.* 2019; <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2019.en-1741>
- [6] Fiselier K, Grundböck F, Schön K, Kappenstein O, Pfaff K, Hutzler C, Luch A, Grob K. Development of a manual method for the determination of mineral oil in foods and paperboard. *J Chromatogr A.* 2013; <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.11.034>
- [7] Biedermann M, Grob K. On-line coupled high performance liquid chromatography-gas chromatography for the analysis of contamination by mineral oil. Part 1: method of analysis. *J Chromatogr A.* 2012; <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.05.095>
- Biedermann M, Grob K. On-line coupled high performance liquid chromatography-gas chromatography for the analysis of contamination by mineral oil. Part 2: migration from paperboard into dry foods: interpretation of chromatograms. *J Chromatogr A.* 2012; <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.05.096>
- [8] Nestola M. Automated workflow utilizing saponification and improved epoxidation for the sensitive determination of mineral oil saturated and aromatic hydrocarbons in edible oils and fats. *Journal of Chromatography A;* 2022.
- [9] Standing Committee on Plants, Animals, Food and Feed. SUMMARY REPORT: Mineral oil hydrocarbons in food: follow-up to the December 2021 Foodwatch report. 2022.
- [10] Foodwatch International. Toxic mineral oil in food - Laboratory tests 2021;2021. https://www.foodwatch.org/fileadmin/-INT/mineral_oil/documents/Foodwatch_Mineralo_I_Report_2021_ENGLISH_03A.pdf
- [11] Hochegger A, Wagenhofer R, Savić S, Mayrhofer E, Washüttl M, Leitner E. Combination of Multidimensional Instrumental Analysis and the Ames Test for the Toxicological Evaluation of Mineral Oil Aromatic Hydrocarbons. *J Agric Food Chem.* 2022; <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c05970>
- [12] Koch M, Becker E, Päch M, Kühn S, Kirchhoff E. Separation of the mineral oil aromatic hydrocarbons of three and more aromatic rings from those of one or two aromatic rings. *J Sep Sci.* 2020; <https://doi.org/10.002/jssc.201900833>
- [13] More SJ, Bampidis V, Benford D, Bragard C, Halldorsson TI, Hernández-Jerez, AF et al. Guidance on the use of the Threshold of Toxicological Concern approach in food safety assessment. *EFSA* 2019; 17 (6), <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5708>
- [14] Bratinova S, Robouch P, Beldi G, Senaldi C, Karasek L, Gonçalves C, Valzacchi S, Garcia-Ruiz S, Hoekstra E. Determination of MOAH in Infant Formula. *JRC IF 2022-05: the ring trial validation study.* Hg. v. Publications Office of the European Union. Joint Research Centre (European Commission). 2023. Luxembourg. <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/3220b5f8-d9ac-11ed-a05c-01aa75ed71a1/language-en, zuletzt geprüft am 10.05.2023>.
- [15] DGF method C-VI 22 (20) "Mineral oil constituents, MOSH and MOAH with online coupled LC-GC-FID method for low limits of determination" and Draft version for updating EN-16995:2017, September 2022-V4.
- [16] Funding: FFG-Projektnummer: 889732

WILEY-VCH



Georg Schwedt

Taschenatlas der Analytik

Vierte, überarbeitete und ergänzte Auflage



Titeldetailseite
ansetzen und
direkt bestellen!

wiley-vch.de/ISBN9783527348725

Kompakte Einführung Übersicht über Grundlagen und Anwendungen der Analytischen Chemie

Taschenatlas der Analytik

Georg Schwedt. 42,90 Euro. ISBN 978-3-527-34872-5

Der Taschenatlas bietet eine kompakte Einführung und Übersicht über Grundlagen und Anwendungen der analytischen Chemie. Dabei sind jeweils erläuternder Text und eine Farbtabelle auf einer Doppelseite gegenübergestellt. Das Buch enthält insgesamt 125 Farbtafeln, die die gesamte Breite der modernen Analytik in Chemie, Biowissenschaften und Teilen von Physik und Materialwissenschaften abdecken.

Für die vierte Auflage wurde der Taschenatlas erweitert und auf den aktuellen

Stand gebracht. Er enthält u. a. acht neue Farbtafeln zu aktuellen Themen wie Mikroextraktionstechniken, Radioimmunoassays, Superfluid-Chromatographie und die elektronenmikroskopische Untersuchung von Materialoberflächen.

Mit diesem Atlas sind die Grundlagen aller wichtigen analytischen Verfahren immer griffbereit – ideal zum raschen Nachlesen und für die Prüfungsvorbereitung.