

**Analytik und technologische Minimierungsansätze von
Monochlorpropandiol (MCPD), MCPD-Fettsäureestern und Glycidylestern
in frittierten und geräucherten Fischerzeugnissen und Fischölen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
Fachbereich Chemie
der Universität Hamburg
aus dem Institut für Lebensmittelchemie

vorgelegt von
Sybille Barbara Merkle

Hamburg, 2018

Datum der Disputation und Druckfreigabe: 11.01.2019

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 2014 bis September 2018 an der Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg, Fakultät Life Sciences, Food Science unter der wissenschaftlichen Betreuung von Herrn Prof. Dr. Fritsche (Max Rubner-Institut für Sicherheit und Qualität bei Milch und Fisch) / Frau Prof. Dr. Riehn (Fakultät Life Sciences, Hochschule für Angewandte Wissenschaften) und Herrn Prof. Dr. Sascha Rohn (Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hamburg) angefertigt.

Folgende Gutachter empfehlen die Annahme der Dissertation:

1. Gutachter: Prof. Dr. Bernward Bisping
2. Gutachter: Prof. Dr. Jan Fritsche

Wissenschaftliche Publikationen

Veröffentlichungen

Merkle, S., Giese, E., Dietz, N., Lösche, K., Fritsche, J. (2015). Entwicklung neuer transfettsäurearmer Siedefette. *Bäckereitechnologie: Forschung und Innovationen*, 1. Aufl., f2m foodmultimedia gmbh, 90-99.

Merkle, S., Giese, E., Dietz, N., Lösche, K., Fritsche, J. (2015). Development of new low-trans-fatty acid deep-frying fats. *Baking & biscuit*, Bd. 4, 94-98.

Merkle, S., Giese, E., Dietz, N., Lösche, K., Fritsche, J. (2015). Development of new low-trans-fatty acid deep-frying fats – part 2. *Baking & biscuit*, Bd. 6, 55-57.

Merkle, S., Kleeberg, K., Fritsche, J. (2015). Recent Developments and Applications of Solid Phase Microextraction (SPME) in Food and Environmental Analysis – A Review. *Chromatography*, 2, 293-381.

Merkle, S., Giese, E., Dietz, N., Lösche, K., Fritsche, J. (2016). Neue transfettsäurearme, pflanzliche Siedefette. *Bäckereitechnologie: Forschung und Innovationen*, 1. Aufl., f2m foodmultimedia gmbh, 54-59.

Merkle, S., Giese, E., Dietz, N., Lösche, K., Fritsche, J. (2016). Development and technofunctional-sensory characterization of virtually TFA free deep-frying fats for artisan bakery products. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 118, 1827-1838.

Beiträge zur kumulativen Dissertation

Karl, H., **Merkle, S.,** Kuhlmann, J., Fritsche, J. (2016). Development of analytical methods for the determination of free and ester bound 2-, 3-MCPD, and esterified glycidol in fishery products. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 118(3), 406-417.

Merkle, S., Giese, E., Rohn, S., Karl, H., Lehmann, I., Wohltmann, A., Fritsche, J. (2017). Impact of fish species and processing technology on minor fish oil components. *Food Control*, 73, 1379-1387.

Merkle, S., Ostermeyer, U., Rohn, S., Karl, H., Fritsche, J. (2018). Mitigation strategies for ester bound 2-/3-MCPD and esterified glycidol in pre-fried breaded and frozen fish products. *Food Chemistry*, 245, 196-204.

Merkle, S., Ostermeyer, U., Rohn, S., Karl, H., Fritsche, J. (2018). Formation of ester bound 2- and 3-MCPD and esterified glycidol in deep-fried and pickled herring products. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 120, 1700464.

Vorträge

Merkle, S., Karl, H., Kuhlmann, J., Fritsche, J. (2015). Minimizing free and ester bound 2-, 3-MCPD and esterified glycidol in fish fingers. *5th Trans-Atlantic Fisheries Technology conference (45th WEFTA meeting)*, Nantes, Frankreich.

Merkle, S., Ostermeyer, U., Karl, H., Kuhlmann, J., Fritsche, J. (2016). Minimierung der Bildung von 2-/3-MCPD Fettsäureestern und Glycidylestern bei der thermischen Behandlung von Fischprodukten. *Lebensmittelchemische Gesellschaft – Fachgruppe in der GDCh – Regionalverband Nord – Arbeitstagung*, Braunschweig.

Merkle, S., Ostermeyer, U., Karl, H., Kuhlmann, J., Fritsche, J. (2016). Strategies for the reduction of ester bound 2- and 3-MCPD and esterified glycidol in pre-fried fishery products. *14th Euro Fed Lipid Congress*, Ghent, Belgien.

Merkle, S., Giese, E., Rohn, S., Karl, H., Lehmann, I., Wohltmann, A., Fritsche, J. (2016). Content of minor components in fish oils of different fish species and processing technologies. *46th West European Fish Technologists' Association (WEFTA) conference*, Split, Kroatien.

Merkle, S., Giese, E., Fritsche, J. (2017). Development and technofunctional-sensory characterization of virtually TFA free deep-frying fats for bakery products. *16th Euro-Global Summit on Food & Beverages*, Amsterdam, Niederlande.

Merkle, S., Ostermeyer, U., Karl, H., Fritsche, J. (2017). Strategies for the Minimization of Free and Bound 3-MCPD and Glycidol in Fish Products. *DGF Symposium on MCPD Esters and Glycidyl Esters. Analytics, Toxicology, Risk Assessment, Mitigation – Where we are today?*, Berlin.

Merkle, S., Ostermeyer, U., Rohn, S., Karl, H., Fritsche, J. (2017). Effect of product- and process-based parameters on the formation of ester bound 2- and 3-MCPD and esterified glycidol in fried and pickled fish products. *47th West European Fish Technologists' Association (WEFTA) conference*, Dublin, Irland.

Merkle, S., Ostermeyer, U., Rohn, S., Karl, H., Fritsche, J. (2017). MCPD in frittierten Fischerzeugnissen – Neue Erkenntnisse. *XXI. Fortbildungsveranstaltung für die Fischindustrie, Groß- und Einzelhandel sowie Behörden*, Hamburg.

Poster

Petersen, K. D., **Merkle, S.**, Dietz, N., Schüring, M., Lösche, K., Fritsche, J. (2014). Siedefettoptimierung zur Herstellung von transfettsäurearmen Siedegebäcken unter besonderer Berücksichtigung von technofunktionell-sensorischen Parametern. *Jahrestagung des Regionalverbands Nord der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, "Food Science meets Authority"*, Hamburg.

Merkle, S., Karl, H., Fritsche, J. (2014). Development of an analytical method for the determination of 2- and 3-MCPD fatty acid esters in fish and fish products. *12th Euro Fed Lipid Congress "Oils, Fats and Lipids: From Lipodomics to Industrial Innovation"*, Montpellier, Frankreich.

Merkle, S., Petersen, K. D., Fritsche, J. (2014). Optimization of deep-frying fats for the production of bakery products with reduced content of trans-fatty acids. *12th Euro Fed Lipid Congress "Oils, Fats and Lipids: From Lipodomics to Industrial Innovation"*, Montpellier, Frankreich.

Merkle, S., Petersen, K. D., Fritsche, J. (2015). Entwicklung und technofunktionell-sensorische Charakterisierung transfettsäurearmer Siedefettblends für die Herstellung von Siedegebäcken. *Lebensmittelchemische Gesellschaft - Fachgruppe in der GDCh - Regionalverband Nord – Arbeitstagung*, Oldenburg.

Merkle, S., Karl, H., Kuhlmann, J., Fritsche, J. (2015). Methodenvergleich zur Bestimmung von 2-/3-MCPD-Fettsäureester in thermisch behandelten Fischerzeugnissen. *Lebensmittelchemische Gesellschaft – Fachgruppe in der GDCh – Regionalverband Nord – Arbeitstagung*, Oldenburg.

Thobe, J., **Merkle, S.**, Fritsche, J. (2015). Bestimmung von Acrolein in Siedefetten mittels HS-NTD-GC-MS. *Lebensmittelchemische Gesellschaft – Fachgruppe in der GDCh – Regionalverband Nord - Arbeitstagung*, Oldenburg.

Nottelmann, S., **Merkle, S.**, Fritsche, J. (2015). Analytisch-sensorische Charakterisierung von aromaaktiven Komponenten in Trinitario-Rohkakao aus standardisierten Inkubationsversuchen. *Lebensmittelchemische Gesellschaft – Fachgruppe in der GDCh – Regionalverband Nord – Arbeitstagung*, Oldenburg.

Dietz, N., Häberle, M., Lösche, K., Matullat, I., **Merkle, S.**, Fritsche, J. (2015). Way out of the TFA dilemma: health versus taste and functionality - sensory characterisation of virtually TFA-free deep-frying fats and their bakery products. *11th Pangborn Sensory Science Symposium*, Götheburg, Schweden.

Merkle, S., Karl, H., Kuhlmann, J., Fritsche, J. (2015). Vergleich validierter Methoden zur Bestimmung von freiem und gebundenem 2-/3-MCPD und Glycidylester sowie deren Anwendung bei Räucherfischen. *44. Deutscher Lebensmittelchemikertag*, Karlsruhe.

Merkle, S., Giese, E., Petersen, K. D., Fritsche, J. (2015). Entwicklung und Anwendung neuartiger transfettsäurearmer Siedefettblends für die Herstellung von Siedegebäcken. *44. Deutscher Lebensmittelchemikertag*, Karlsruhe.

Merkle, S., Karl, H., Kuhlmann, J., Fritsche, J. (2015). Method comparison and application for the determination of free and ester bound 2-/3-MCPD and esterified glycidol in fishery products. *13th Euro Fed Lipid Congress*, Florenz, Italien.

Merkle, S., Petersen, K. D., Dietz, N., Lösche, K., Fritsche, J. (2015). Development and technofunctional-sensory characterization of virtually TFA-free deep-frying fats for the production of bakery products. *13th Euro Fed Lipid Congress*, Florenz, Italien.

Merkle, S., Karl, H., Kuhlmann, J., Fritsche, J. (2015). Comparison of validated methods for the determination of ester bound 2-,3-MCPD and esterified glycidol in fishery products. *5th Trans-Atlantic Fisheries Technology conference (45th WEFTA meeting)*, Nantes, Frankreich.

Denizci, Z., **Merkle, S.,** Giese, E., Fritsche, J. (2016). Panelschulung zur instrumentell-sensorischen Analyse von TFA-armen Siedefetten mittels HS-SPME-GC-MS/O. *Lebensmittelchemische Gesellschaft – Fachgruppe in der GDCh – Regionalverband Nord – Arbeitstagung*, Braunschweig.

Merkle, S., Ostermeyer, U., Karl, H., Kuhlmann, J., Fritsche, J. (2016). Minimierung der 2-/3-MCPD ester und Glycidylester Gehalte in frittierten Fischprodukten. *45. Deutscher Lebensmittelchemikertag*, Freising-Weihenstephan.

Inhaltsverzeichnis

I	Abkürzungsverzeichnis	III
II	Abbildungsverzeichnis	V
III	Tabellenverzeichnis	VI
IV	Formelverzeichnis	VII
	Zusammenfassung	VIII
	Summary	IX
1	Einleitung	1
2	Theoretische Grundlagen	6
2.1	Chemische und physikalische Charakterisierung von MCPD, MCPD-E und G-E	6
2.2	Analytik	7
2.2.1	Analysenmethoden zur Bestimmung von MCPD	7
2.2.2	Analysenmethoden zur Bestimmung von MCPD-E und G-E in raffinierten Speiseölen und -fetten	9
2.2.3	Analysenmethoden zur Bestimmung von MCPD-E und G-E in Lebensmitteln	14
2.3	Bildungsmechanismen und Einflussfaktoren	16
2.3.1	Bildungsmechanismen von MCPD, MCPD-E und G-E	16
2.3.2	Bildung von MCPD bei der Lebensmittelverarbeitung	19
2.3.3	Bildung von MCPD-E und G-E bei der Lebensmittelverarbeitung	21
2.4	Minimierungsstrategien	28
2.4.1	Minimierung von MCPD bei der Lebensmittelverarbeitung	29
2.4.2	Minimierung von MCPD-E und G-E in raffinierten Speiseölen und -fetten und verarbeiteten Lebensmitteln	30
2.5	Herstellungsverfahren ausgewählter Fischerzeugnisse	33
2.5.1	Fischöle	33
2.5.2	Panierte und vorgebratene, tiefgekühlte Fischerzeugnisse	36
2.5.3	Bratfischerzeugnisse	39
2.5.4	Geräucherte Fischerzeugnisse	42
3	Zielsetzung	46
4	Kumulativer Teil der Dissertation	48
4.1	Publikation I: Entwicklung einer Analysenmethode zur Bestimmung von freiem und fettsäuregebundenem 2-, 3-MCPD und Glycidol in Fischereierzeugnissen	49
4.2	Publikation II: Einfluss verschiedener Fischarten und Verarbeitungstechnologien auf Fischölkomponenten	62
4.3	Publikation III: Minimierungsstrategien für fettsäuregebundenes 2- /3-MCPD und Glycidol in panierten und vorgebratenen, tiefgekühlten Fischerzeugnissen	72
4.4	Publikation IV: Bildung von fettsäuregebundenem 2- und 3-MCPD und Glycidol in Bratheringsprodukten	82
4.5	Weiterführende Ergebnisse	92

Inhaltsverzeichnis

4.5.1 Warenkorbanalysen	92
5 Zusammenfassende Diskussion	101
5.1 Analysenmethode zur Bestimmung von MCPD, MCPD-E und G-E in Fischerzeugnissen	101
5.1.1 Analyse von MCPD in Räucherfischerzeugnissen	101
5.1.2 Analyse von MCPD-E und G-E in Fischölen und (vor)-frittierten Fischerzeugnissen	102
5.2 Einflussfaktoren zur Bildung von MCPD-E und G-E in Fischölen und (vor)- frittierten Fischerzeugnissen	104
5.2.1 Einfluss der Temperatur auf die Bildung von MCPD-E und G-E in Fischölen und (vor)-frittierten Fischerzeugnissen	104
5.2.2 Einfluss der Zeit auf die Bildung von MCPD-E und G-E in Fischölen und (vor)- frittierten Fischerzeugnissen	106
5.2.3 Einfluss von Lipiden als Präkursoren für die Bildung von MCPD-E und G-E in Fischölen und (vor)-frittierten Fischerzeugnissen	108
5.2.4 Einfluss der Chloridquelle auf die Bildung von MCPD-E und G-E in Fischölen und (vor)-frittierten Fischerzeugnissen	110
5.3 Ansätze zur Minimierung von MCPD-E und G-E in Fischölen und (vor)-frittierten Fischerzeugnissen	112
5.3.1 Anwendung von Molekularfilter und physikalischen Filtern	112
5.3.2 Weitere Minimierungsansätze	115
5.4 Neue Ansätze zur betriebliche Qualitätsbewertung von frittierten Fischerzeugnissen	116
5.4.1 Korrelation von MCPD-E- und G-E- mit TPM-Gehalten	117
5.4.2 Korrelation von MCPD-E- und G-E-Gehalte mit Farbwerten	118
6 Schlussfolgerung	120
7 Literatur	122
8 Anhang	141
8.1 Supplementary Data – Publikation II	141
8.2 Supplementary Data – Publikation III	149
8.3 Klassifizierung der verwendeten Chemikalien nach der VO (EG) 1272/2008	150
Danksagung	153
Eidesstattliche Erklärung	155
Curriculum Vitae	156

I Abkürzungsverzeichnis

2-CPD	2-Chlorpropan-1,3-diol
3-CPD	3-Chlorpropan-1,2-diol
1,3-DCP	1,3-Dichlorpropan-2-ol
2,3-DCP	2,3-Dichlorpropan-1-ol
2-MCPD	2-Monochlorpropan-1,3-diol
3-MCPD	3-Monochlorpropan-1,2-diol
2-MCPD-E	2-MCPD-Fettsäureester
3-MCPD-E	3-MCPD-Fettsäureester
ALARA	As low as reasonably achievable
AOCS	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
ASE	Accelerated solvent extraction
BfR	<i>Bundesinstitut für Risikobewertung</i>
BG	Bestimmungsgrenze
BMD	Benchmark-Dosis
BMEL	Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft
BSTFA	N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid
CEN	<i>European Committee for Standardization</i>
COC	<i>UK Committee on Carcinogenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment</i>
CONTAM Panel	<i>Panel on Contaminants in the Food Chain</i>
CPO	Crude palm oil fraction (Rohe Palmölfraction)
DAG	Diacylglyceride
DGF	<i>Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft</i>
DHA	Docosahexaensäure
dl-PCB	Dioxin-like PCB (Dioxin-ähnliche PCB)
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
EPA	Eicosapentaensäure
EU	<i>Europäische Union</i>
EUMOFA	<i>Europäische Marktbeobachtungsstelle für Fischerei- und Aquakulturerzeugnisse</i>
FAO	<i>Food and agriculture organization of the united nations</i>
FEI	<i>Forschungskreis der Ernährungsindustrie</i>
FEDIOL	<i>Federation for European Oil and Proteinmeal Industry</i>
FIZ	<i>Fischinformationszentrum</i>
FSCJ	<i>Food Safety Commission of Japan</i>
G	Glycidol
GC	Gaschromatographie
GC-ECD	Gaschromatographie gekoppelt mit einem Elektroneneinfangdetektor
GC-MS	Gaschromatographie gekoppelt mit einem Massenspektrometer
GC-MS/MS	Gaschromatographie gekoppelt mit einem Tandem-Massenspektrometer
G-E	Glycidyl-Ester
HFB	Heptafluorbutyrat

I Abkürzungsverzeichnis

HFBA	Heptafluorobutyric acid (Heptafluorbuttersäure)
HPLC	High pressure liquid chromatography (Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie)
HS-GC-MS	Headspace GC-MS
HVP	Hydrolyzed vegetable protein (Hydrolysierte Pflanzenproteine)
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IFRPI	<i>International Food Research Policy Institute</i>
ILSI	<i>International Life Sciences Institut</i>
JECFA	<i>Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives</i>
JRC	<i>Joint Research Centre</i>
LC-MS	Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit einem Massenspektrometer
LOEL	Lowest observed effect level (Niedrigste Konzentration mit beobachteter Wirkung)
MAG	Monoacylglyceride
MBPD	Monobrompropandiol
MCPD-E	2- und 3-MCPD-E
MRM	Multiple reaction monitoring
MW	Mittelwert
n-3	Omega-3
n-6	Omega-6
ndl-PCB	Non-dioxin-like PCB (Nicht-Dioxinähnliche PCB)
PAK	Polyzyklische, aromatische Kohlenwasserstoffe
PBA	Phenylboronsäure
PCB	Polychlorierte Biphenyle
PCDD	Polychlorierte Dibenzo- <i>p</i> -Dioxine
PCDF	Polychlorierte Dibenzo-Furane
PLE	Pressurized Liquid Extraction
PMTDI	Provisional maximum tolerable daily intake (Vorläufige, maximal tolerierbare tägliche Aufnahme)
PUFA	Poly-unsaturated fatty acids (Mehrfach ungesättigte Fettsäuren)
RBD Palmöl	Raffiniertes, gebleichtes und deodorisiertes Palmöl
SCF	<i>Scientific Committee on Food of the European Commission</i>
SPE	Festphasenextraktion
STD	Standardabweichung
TAG	Triacylglyceride
TBAC	Tetra-n-butylammoniumchlorid
t-BME	tertiär-Butylmethylether
TDI	Tolerable daily intake (Tolerierbare tägliche Aufnahme)
TPM	Total polar material (Gesamtgehalt an polaren Komponenten)
WHO	<i>World health organization</i>

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: v.l.n.r.: 3-MCPD, (R)-3-MCPD, (S)-3-MCPD.....	6
Abbildung 2: 2-MCPD.....	6
Abbildung 3: Glycidol.....	7
Abbildung 4: v.l.n.r.: 3-MCPD-Monoester, 3-MCPD-Diester, 2-MCPD-Diester, G-E.....	7
Abbildung 5: Derivatisierungsprodukte 3-MCPD; (a) 3-Chlorpropan-1,2-diol-di(heptafluor)butyrat, (b) 4-Chlormethyl-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan, (c) 4-Chlormethyl-2-phenyl-1,3,2-dioxaborolan.....	9
Abbildung 6: Bildung von 3-MBPD aus Glycidylpalmitat.....	11
Abbildung 7: a) Grundschemata einer indirekten Methode. b) Schema "3-in-1 Methode" (nach Kuhlmann, 2010).....	11
Abbildung 8: Bildungswege MCPD-E (nach Destailats et al., 2012b).....	17
Abbildung 9: Einstellung von Plateaulevel für 3-MCPD-E-Gehalte (A) und G-E-Gehalte (B) in einem Modellversuch (Shimizu et al. 2013a).....	18
Abbildung 10: Postulierter Entstehungsmechanismus für 3-MCPD bei Räucherung (nach Kuntzer und Weißhaar, 2006).....	21
Abbildung 11: Gebildete 3-MCPD-E-Gehalte in Abhängigkeit einer Erhitzung des Modellsystems aus Triacylglyceriden (TAG) und Lindan für zwei Stunden bei 100-300 °C (Destailats et al., 2012b).....	26
Abbildung 12: 3-MCPD-E-Gehalte in einem Modellsystem aus rohem Rapsöl und NaCl- Lösung. a) Bei einer Erhitzungsdauer von 0-24 h bei 160 °C. b) Bei unterschiedlichen Erhitzungsperioden. Symbole mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) (Li et al., 2016).....	27
Abbildung 13: Herstellungsablauf von panierten und vorgebratenen, tiefgekühlten Fischerzeugnissen aus Filet (nach Tülsner & Koch, 2010).....	39
Abbildung 14: Herstellungsablauf von Bratfischerzeugnissen (nach Tülsner & Koch, 2010).	41
Abbildung 15: Funktionsschema des Altonaer Ofen.....	44
Abbildung 16: Herstellungsablauf von Räucherfischerzeugnisse (nach Tülsner & Koch, 2010).....	45
Abbildung 17: Vergleich der Analysenmethoden „Modifizierte AOCS-Methode Cd 29c (Ansatz B)“, „Modifizierte AOCS-Methode Cd 29b“ und „EFSA-Methode EN-770“ zur Bestimmung von MCPD-E und G-E in einem Fisch-Referenzmaterial aus 490 g Sprotte und 1250 g Fischstäbchen.....	103

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: MCPD-E- und G-E-Gehalte in verschiedenen Lebensmittelgruppen (EFSA, 2016).	22
Tabelle 2: Gehalte an 2-MCPD-E, 3-MCPD-E und G-E in panierten und tiefgekühlten Fischereierzeugnissen aus dem Handel. Die Gehalte wurden als Mittelwerte (MW) ± Standardabweichungen (STD) in µg/kg angegeben. Werte mit unterschiedlich hochgestellten Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) voneinander. Bestimmungsgrenze (BG) < 20 µg/kg. Medium bound: Werte $< BG$ werden durch halbe BG ersetzt.	93
Tabelle 3: Gehalte an 2-MCPD-E, 3-MCPD-E und G-E in (nicht-) pasteurisierten Bratfischerzeugnissen aus dem Handel. Die Gehalte wurden als Mittelwerte (MW) ± Standardabweichungen (STD) in µg/kg angegeben. Werte mit unterschiedlich hochgestellten Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) voneinander. Bestimmungsgrenze (BG) < 20 µg/kg. Medium bound: Werte $< BG$ werden durch halbe BG ersetzt.	96
Tabelle 4: Gehalte an 2-MCPD-E, 3-MCPD-E und G-E in Fischdauerkonserven aus dem Handel. Die Gehalte wurden als Mittelwerte (MW) ± Standardabweichungen (STD) in µg/kg angegeben. Werte mit unterschiedlich hochgestellten Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) voneinander. Bestimmungsgrenze (BG) < 20 µg/kg. Medium bound: Werte $< BG$ werden durch halbe BG ersetzt.	97
Tabelle 5: Untersuchte Räucherfischprodukte geordnet nach Art des Raucherzeugers.....	99
Tabelle 6: Gehalte an MCPD, MCPD-E und G-E in Räucherfischerzeugnissen – sortiert nach Raucherzeuger und Räucherfischkonserven aus dem Handel. Die Gehalte wurden als Mittelwerte (MW) ± Standardabweichungen (STD) in µg/kg angegeben. Werte mit unterschiedlich hochgestellten Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) voneinander. Bestimmungsgrenze (BG) < 10 µg/kg. Medium bound: Werte $< BG$ werden durch halbe BG ersetzt.	100
Tabelle 7: Vergleich der modifizierten AOCS-Methoden Cd 29b und 29c für die Bestimmung von MCPD-E in rohen und raffinierten Fischölen. Die Gehalte wurden als Mittelwerte ± Standardabweichungen in mg/kg angegeben. Werte mit unterschiedlich hochgestellten Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) voneinander. Die Bestimmungsgrenze (BG) liegt bei 0,02 mg/kg.	104
Tabelle 8: Vergleich der MCPD-E- und G-E-Gehalte in pasteurisierten und sterilisierten Bratheringsprodukten. *Die Gehalte wurden als Mittelwerte ± Standardabweichungen in µg/kg angegeben. Werte mit unterschiedlich hochgestellten Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) voneinander. Die Bestimmungsgrenze (BG) liegt bei 20 µg/kg.	110
Tabelle 9: Vergleich der MCPD-E- und G-E-Gehalte in Frittieröl (Rapsöl), die mit 9% Köstrolith 13 XP-cac Pulver, bzw. Granulat behandelt wurden. *Die Gehalte wurden als Mittelwerte ± Standardabweichungen in µg/kg angegeben. Werte mit unterschiedlich hochgestellten Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) voneinander. Die Bestimmungsgrenze (BG) liegt bei 20 µg/kg.....	114

IV Formelverzeichnis

Tabelle 10: Vergleich der MCPD-E- und G-E-Gehalte in panierten und vorgebratenen, tiefgekühlten Fischerzeugnissen, deren Panade 0,08% L-Cystein zugesetzt wurde. Die Gehalte wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichungen in $\mu\text{g}/\text{kg}$ angegeben. Werte mit unterschiedlich hochgestellten Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) voneinander. Die Bestimmungsgrenze (BG) liegt bei $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ 116

IV Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung Glycidol-Anteil (Dingel & Matissek, 2013).....	12
Formel 2: Berechnung stöchiometrischer Faktor (Matissek, 2011).....	12
Formel 3: Berechnung mit Transformationsfaktor (DGF, 2010).....	13

Zusammenfassung

Die Verbindungen 2-Monochlorpropan-1,3-diol und 3-Monochlorpropan-1,2-diol (2- bzw. 3-MCPD), Glycidol (G) und deren Fettsäureester (2- bzw. 3-MCPD-E und G-E) sind Prozesskontaminanten, die bei einem gleichzeitigen Vorkommen hoher Temperaturen, einer Chloridquelle und Glyceriden gebildet werden können. Offiziell validierte Analysemethoden existieren derzeit nur zur Bestimmung von 2- und 3-MCPD-E (MCPD-E) und G-E in raffinierten Speiseölen und -fetten, nicht jedoch für verarbeitete Lebensmittel. Die spezifischen Bildungswege und Mechanismen der Prozesskontaminanten während der Lebensmittelverarbeitung wurden bislang noch nicht vollständig aufgeklärt und die Erklärungen sind teilweise widersprüchlich. Minimierungsansätze für MCPD, MCPD-E und G-E bei der Lebensmittelverarbeitung wurden im Rahmen einzelner Studien veröffentlicht. Zur Bildung von MCPD, MCPD-E und G-E in Fischerzeugnissen gibt es ebenfalls nur wenige Daten. Es wurde jedoch sowohl die Bildung von MCPD beim Räuchern als auch die Bildung von MCPD-E und G-E beim Frittieren von Lebensmitteln in der Literatur beschrieben, welche als Kernprozesse für die Herstellung von Fischerzeugnissen mit hohem Beliebtheitsgrad in Deutschland angesehen werden.

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Einflussfaktoren zur Bildung dieser Prozesskontaminanten in frittierten Fischerzeugnissen und Fischöl zu untersuchen und mögliche Minimierungsstrategien abzuleiten.

Zur quantitativen Bestimmung der MCPD-E- und G-E-Gehalte in Fischerzeugnissen wurde am Max Rubner-Institut für Sicherheit und Qualität bei Milch und Fisch Kiel/Hamburg in Kooperation mit der SGS Germany GmbH, Hamburg eine Analysemethode basierend auf zwei der drei bislang offiziell validierten AOCS-Methoden (Cd 29b und 29c) zur Bestimmung von MCPD-E und G-E in Speiseölen und -fetten entwickelt.

Die Untersuchung der unterschiedlichen Fischerzeugnisse ergab, dass verschiedene Einflussfaktoren in variierendem Ausmaß für die Bildung von MCPD, MCPD-E und G-E in diesen Produkten verantwortlich sein können. Insbesondere wurden die Parameter Temperatur, Zeit, Lipidpräkursoren sowie die Chloridquelle analysiert. In allen Produktgruppen konnte ein Zusammenhang zwischen der Behandlungstemperatur und der Bildung von MCPD-E (Fischöle, Bratfischerzeugnisse und panierte und vorgebratene, tiefgekühlte Fischerzeugnisse) festgestellt werden. Im Zusammenhang mit der Frittieretemperatur wurde auch ein Einfluss von der Erhitzungsdauer des Frittieröls auf die Bildung von MCPD-E und G-E in (vor)-frittierten Fischerzeugnissen festgestellt. Darüber hinaus lässt sich schlussfolgern, dass vermutlich ein großer Anteil der MCPD-E in diesen Produkten durch die Fettaufnahme während des (Vor)-Frittierens bedingt wird. Der Einsatz von Molekularfiltern und physikalischen Filtern erwies sich bei allen Produktkategorien als effizienter Minimierungsansatz.

Zusammenfassend konnten in allen Versuchsreihen im Rahmen dieser Arbeit Korrelationen zwischen den Farb- und TPM-Werten und den MCPD-E-Gehalten beobachtet werden. Es wurde geschlussfolgert, dass durch Implementierung einer Schnell-Methode basierend auf den TPM-Gehalten unter definierten Bedingungen ein Rückschluss auf die MCPD-E-Gehalte im Frittieröl und damit in den entsprechenden Fischerzeugnissen möglich ist.

Summary

2-monochloropropane-1,3-diol (2-MCPD), 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD), glycidol and their fatty acid esters (2- and 3-MCPD-E and G-E) are food processing contaminants that may be formed during the heating of foods containing a chloride source in combination with glycerol. Officially validated analysis methods are only available for the determination of 2- and 3-MCPD-E and G-E in refined edible fats and oils, but not in processed foods. The specific formation pathways and mechanisms of these process contaminants during food processing are not fully understood and theories are partially contradictory. Mitigation approaches for the formation of MCPD, MCPD-E and G-E during food processing have been published in only a few studies. Moreover, data on the formation of MCPD, MCPD-E and G-E in fish products are lacking. The formation of MCPD during smoking and the formation of MCPD-E and G-E during frying have been described in literature. These are core processes in the manufacturing of popular fish products in Germany.

The aim of this work was to investigate the factors influencing the formation of these process contaminants in fried fish products and in fish oil and to derive possible mitigation strategies. In order to quantify MCPD-E and G-E in fish products, an analytical method was developed at the Max Rubner-Institut, Department of Safety and Quality of Milk and Fish Products, Kiel/Hamburg, in cooperation with SGS Germany GmbH, Hamburg. The analytical method was based on two of the three officially validated AOCS methods (Cd 29b and 29c) for the determination of MCPD-E and G-E in edible oils and fats.

The analysis of the various fish products showed that different influencing factors may be responsible for the formation of MCPD, MCPD-E and G-E to varying extents. A special focus was on the parameters temperature, time, lipid precursors and the chloride source. In all product categories, a correlation was found between the treatment temperature and the formation of MCPD-E (fish oils, fried fish products and breaded and pre-fried frozen fish products). Regarding the frying temperature, a correlation was also revealed between the duration of use of the oil, i.e. the duration of heating, and the formation of MCPD-E and G-E in (pre)-fried frozen fish products. Furthermore, it can be assumed that a large proportion of the MCPD-E enters these products as a result of the fat uptake during the (pre)-frying process. The application of molecular filters and physical filters has been identified as an efficient mitigation approach in all product categories.

All the test series conducted in this work showed a correlation between color and TPM values and MCPD-E contents. Consequently, under defined conditions, the determination of TPM values could be a rapid screening method for the estimation of MCPD-E contents in frying oil and the respective fish products.

1 Einleitung

Lebensmittelsicherheit kann als ein “flexibles Konzept”, basierend auf verschiedenen Definitionen, verstanden werden. Das Komitee der Vereinten Nationen für die Weltnahrungsmittelsicherheit definiert Lebensmittelsicherheit als Forderung, dass jederzeit alle Menschen physischen, sozialen und ökonomischen Zugang zu sicheren und nahrhaften Lebensmitteln haben sollen, um ihre Ernährungsbedürfnisse und Lebensmittelpräferenzen für ein aktives und gesundes Leben zu erfüllen (IFRPI, *International Food Research Policy Institute*, 2016). In den nächsten Jahrzehnten werden globale Faktoren, wie Klimaveränderungen, wachsende Weltbevölkerung, ansteigende Lebensmittelpreise und Umweltbelastungen, vermutlich bedeutende, bislang ungewisse Auswirkungen auf die Lebensmittelsicherheit haben (IFRPI, 2016). Krankheiten, die durch Lebensmittel ausgelöst werden, sind dabei ein vermeidbares gesellschaftliches Gesundheitsproblem. Sie stellen eine Belastung für das Gesundheitswesen dar und führen zu steigenden Kosten. Einige Gruppen, wie Kleinkinder und ältere Menschen, haben ein erhöhtes Risiko für solche Krankheiten. Prinzipiell jedoch sind alimentäre Erkrankungen allgegenwärtig (Healthy People, 2016). Kontaminanten können sowohl durch externe Quellen (Umweltkontaminanten) als auch während des Herstellungsprozesses (Prozesskontaminanten) in die Lebensmittel gelangen und ein Risiko für die Gesundheit der Verbraucher darstellen. Die Minimierung gesundheitsgefährdender Kontaminanten führt somit im Umkehrschluss zu einer erhöhten Lebensmittelsicherheit.

3-Monochlorpropan-1,2-diol (3-MCPD) stellt eine Prozesskontaminante dar. Das zeitgleiche Auftreten von hohen Temperaturen, einer Chloridquelle (Chloridionen oder organisch gebundenes Chlor) und Glycerol bzw. Glyceriden, stellt eine Möglichkeit zur Bildung von 3-MCPD dar (Svejkovská et al., 2004). 3-MCPD gehört zur chemischen Gruppe der Chlorpropanole, chlorierte Derivate von Glycerol, die eine oder zwei Chloratome in verschiedenen Konfigurationen am Glycerolmolekül binden. Eine Hydroxylgruppe des Glycerols wird dabei durch ein Chloratom ersetzt (Schlee et al., 2011).

Das Vorkommen von 3-MCPD in Lebensmitteln wurde erstmals von Velišek et al. (1978) während ihrer Studien zur Eignung von sauer hydrolysierten Pflanzenproteinen (HVP) als pikante, geschmacksverbessernde Zutat für Lebensmittel entdeckt. Es wurden mehrere Chlorpropanole in HVP und in nachfolgenden Studien in Modellsystemen identifiziert. Die als nicht flüchtig identifizierten Chlorpropanole waren 3-MCPD und 2-Monochlorpropan-1,3-diol (2-MCPD) (Velišek et al., 1978; Velišek et al., 1980; Davidek, 1980). Im Laufe der Jahre wurden Studien veröffentlicht, die zeigten, dass 3-MCPD nicht nur in HVP und Sojasauce (Crews et al., 2003; Macarthur et al., 2000; Nyman, Diachenko & Perfetti, 2003), sondern auch in vielen weiteren Lebensmitteln und Inhaltsstoffen nachweisbar ist (Breitling-Utzmann, 2003; Crews, Brereton & Davies, 2001; Crews et al., 2003; Hamlet, Jayaratne & Matthews, 2002; Mogol et al., 2014; Reece et al., 2005; Schallschmidt et al., 2012; Svejkovská et al., 2004). Die Vielfalt umfasst Lebensmittel, die in großen Mengen verzehrt werden, wie Brot, Nudeln, Fleisch, bis hin zu Kuchen und Keksen. Durch die Vielzahl der betroffenen Lebensmittel, in denen 3-MCPD enthalten ist, wird die Bedeutung, trotz der oft relativ geringen Gehalte in einzelnen Produkten, sehr groß. Die alimentäre Aufnahme der Prozesskontaminante 3-MCPD ist somit kaum vermeidbar. Erkenntnisse über die Entstehung

Einleitung

dieser Verbindung sind für deren Vermeidung und Reduktion in verschiedenen Lebensmittelgruppen von hoher Wichtigkeit (Baer, de la Calle & Taylor, 2010).

Im Zusammenhang mit der Verbindung 3-MCPD wurden bereits im Jahre 1980 Spuren von 3-MCPD-Fettsäureester (3-MCPD-E) in HVP identifiziert (Velíšek et al., 1980). Bis zum Jahre 2004 wurde dieser Entdeckung jedoch keine besondere Beachtung geschenkt (Svejkovská et al., 2004), bis 3-MCPD-E in höheren Konzentrationen in raffinierten Speiseölen und weiteren fetthaltigen Lebensmitteln analysiert wurden (Divinova et al., 2004; Hamlet & Sadd, 2004; JECFA, 2002). 3-MCPD-E sind Verbindungen des 3-MCPD, bei denen eine beziehungsweise beide Hydroxylgruppen mit einer langkettigen Fettsäure (meist C14-C18) verbunden sind (Schlee et al., 2011). Es gibt insgesamt sechs verschiedene mögliche Verbindungen für 3-MCPD-E, darunter vier Mono- und zwei Di-Ester. Werden zusätzlich die Variationsmöglichkeiten der verschiedenen veresterten Fettsäuren in Betracht gezogen, ergibt sich für die Anzahl möglicher 3-MCPD-E-Verbindungen eine Vielzahl an Kongeneren (Dingel & Matissek, 2015). Einen hohen Einfluss auf den 3-MCPD-E-Gehalt in raffinierten Speiseölen und -fetten zeigte insbesondere der Verfahrensprozess der Deodorisierung, bei dem hohe Temperaturen ($> 200\text{ }^{\circ}\text{C}$) angewandt werden (Chung & Chan, 2012).

Die Verbindung 2-MCPD ist ein konstitutionelles Isomer von 3-MCPD, welches zeitgleich unter ähnlichen Bedingungen bei der Herstellung von Lebensmitteln entstehen kann (Kuhlmann, 2011). Ebenso wie 3-MCPD kann auch 2-MCPD in einer mit Fettsäureestern gebundenen Form (2-MCPD-E) vorliegen.

Im Jahre 2008 wurde ein Ringversuch auf Grundlage der von Weißhaar im selben Jahr veröffentlichten Methode zur Bestimmung von 3-MCPD-E durchgeführt (Weißhaar, 2008). Den Teilnehmern wurde zusätzlich gestattet, in-house Methoden zu verwenden. Während der Durchführung dieses Ringversuches wurde festgestellt, dass zum Teil überhöhte 3-MCPD-E-Gehalte ermittelt werden, wenn die Analysenmethoden die Verwendung von Natriumchlorid (NaCl) beinhaltet. Diese Erkenntnis trug zur Identifizierung einer weiteren Verbindungsklasse, den Glycidyl-Fettsäureestern (G-E), bei (Kuhlmann, 2011; Weißhaar, 2008). Die Annahme, dass es sich bei den Verbindungen um G-E handelt (Kuhlmann, 2011), wurde im Jahre 2010 bestätigt (Weißhaar & Perz, 2010). G-E haben die Struktur eines Glycerols, bei dem sich über zwei Bindungsstellen eine Sauerstoffbrücke (Epoxid) ausbildet und über die dritte und freie Bindungsstelle eine Fettsäure bindet (Schlee et al., 2011).

In den letzten Jahrzehnten entwickelte sich eine steigende Besorgnis über die kanzerogenen Auswirkungen der Kontaminanten MCPD, MCPD-E und G-E.

Zunächst stellte das *European Commission's Scientific Committee on Food* (SCF) fest, dass der Anstieg an gutartigen Tumoren, der bei Langzeitkanzerogentests mittels 3-MCPD bei Ratten beobachtet wurde, das Ergebnis eines nicht-genotoxischen Mechanismus ist (SCF, 2001). Er entsteht entweder durch chronisches hormonelles Ungleichgewicht (Brustdrüsen Fibrome, Leydig-Zell-Tumore) oder durch anhaltende Zytotoxizität und chronische Hyperplasie (Nieren-Tumore). Dieser Befund wurde vom *UK Committee on Carcinogenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment* bestätigt (COC, 2000). Daraufhin wurde 3-MCPD im Jahre 2001 von der SCF als nicht-genotoxisches Karzinogen eingestuft (JECFA, 2002; SCF, 2001). Im Jahre 2004 führte das *Joint FAO/WHO (Food and*

Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization) *Expert Committee on Food Additives* (JECFA) eine Risikobewertung zum Vorkommen von 3-MCPD in Lebensmitteln durch, deren Herstellung auf der sauren Hydrolyse von Pflanzenproteinen basiert und hauptsächlich Sojasauce betraf. Die Herstellung erfolgt in der Regel durch Behandlung von Getreide, einschließlich eiweißhaltiger Ölsaaten, mit Salzsäure bei hohen Temperaturen und Druck. Da aufgrund der in-vivo Daten keine Genotoxizität festgestellt wurde, schlussfolgerte das *Committee*, dass MCPD-Neoplasmen bei Ratten durch einen Mechanismus bewirkt werden, der keine DNA-Schäden auslöst wofür ein Schwellenwert überschritten werden muss (JECFA, 2007). Eine vorläufige, maximal tolerierbare tägliche Aufnahme (PMTDI) von 2 µg/kg Körpergewicht wurde festgelegt. Diese basierte auf der niedrigsten Konzentration mit beobachteter Wirkung (LOEL) von 1,1 mg/kg Körpergewicht pro Tag für renale, tubuläre Hyperplasie und einem Sicherheitsfaktor von 500 (JECFA, 2007). Eine erste Stellungnahme zum Vorkommen von 3-MCPD und seinen Fettsäureestern in Lebensmitteln wurde vom *Bundesamt für Risikobewertung* (BfR) im Jahre 2009 veröffentlicht (BfR, 2009). Diese basierte auf dem 2007 veröffentlichten Review über 3-MCPD in Lebensmitteln, in dem aktuelle Erkenntnisse bezogen auf die Bioverfügbarkeit von 3-MCPD resultierend aus seinen Fettsäureestern veröffentlicht wurden (BfR, 2007). Essentielle Datenlücken wurden in der verwendeten Expositionsbewertung identifiziert. Diese entstanden aus der unvollständigen Information über 3-MCPD-E-Gehalte in Lebensmitteln und der Folge von Minimierungsstrategien, die in der Lebensmittelindustrie bereits eingeführt waren (BfR, 2009). Im Jahre 2012 veröffentlichte der *Codex Alimentarius* einen Verhaltenskodex zur Reduktion von 3-MCPD bei der Herstellung von HVP und daraus erzeugten Produkten. Im Jahre 2013 merkte die *International Agency for Research on Cancer* (IARC) an, dass es keinen Beweis dafür gebe, zu behaupten, 3-MCPD wäre nicht genotoxisch. Diese Schlussfolgerung basierte auf den zu jener Zeit verfügbaren in-vivo Daten (Robjohns et al., 2003). 3-MCPD wurde vom IARC als „mögliches Humankarzinogen“ in die IARC-Gruppe 2B eingestuft (IARC, 2012).

Mittels in-vitro Studien konnte gezeigt werden, dass 3-MCPD-E durch eine Lipase katalysierte Hydrolysereaktion 3-MCPD freisetzen können (Zelinková et al., 2006). Da bislang keine in-vivo Daten vorliegen, basiert die Risikobewertung von 3-MCPD-E auf der Annahme einer vollständigen Freisetzung von 3-MCPD (Hrnčířik, Zelinková & Ermacora, 2011). Neueste Studien bestätigen, dass die veresterte Form, genauso wie das freie 3-MCPD, nach dem Verzehr bestimmter Lebensmittel im Körper biologisch verfügbar ist (Abraham et al., 2013).

Eine Risikobewertung für 2-MCDP ist nach aktuellem Stand nicht möglich, da die Lücke an hierfür erforderlichen Daten zu groß ist (EFSA, *European Food Safety Authority*, 2016).

Die genotoxische, chemische Verbindung Glycidol, wurde vom IARC im Jahre 2000 in die Gruppe 2A als „wahrscheinliches Humankarzinogen“ eingestuft (IARC, 2000). Eine vorläufige Bewertung der G-E in raffinierten Pflanzenölen wurde vom BfR im Jahre 2009, basierend auf vorläufigen Befunden hoher Gehalte (mg/kg) in verschiedenen kommerziell erhältlichen, raffinierten Pflanzenölen, veröffentlicht (BfR, 2009). Eine vorläufige Abschätzung der potentiellen täglichen Aufnahme, im speziellen durch Margarine und bei Kleinkindern durch kommerzielle Säuglingsnahrung, die genotoxischen und karzinogenen Eigenschaften von Glycidol und die Wahrscheinlichkeit der hydrolytischen Umwandlung von

G-E zu bioverfügbarem Glycidol, führte das BfR zu dem Schluss, dass die aktuellen Aufnahmemengen für Säuglinge und andere Risikogruppen eine Gefahr für die menschliche Gesundheit darstellen könnten. Als essentielle Datenlücken wurden die analytische Methode zur Quantifizierung von Glycidol und deren Fettsäureester in Speiseölen und -fetten und die Bestimmung der Bioverfügbarkeit von Glycidol aus seinen Fettsäureestern identifiziert (BfR, 2009). Als Teil der Sicherheitsbeurteilung von Lebensmitteln, die Diacylglyceride (DAG) enthalten, führte die *Food Safety Commission of Japan* (FSCJ) eine Risikobewertung von Glycidol und G-E durch (FSCJ, 2015). Basierend auf dem verfügbaren Nachweis für die Genotoxizität von Glycidol, insbesondere der Glycidol-induzierten DNA-Schädigung und Genmutation, schloss der FSCJ, dass Glycidol ein genotoxisches Karzinogen sei. Der FSCJ bemerkte, dass die verfügbaren Daten für G-E eine schwächere Genotoxizität im Vergleich zu Glycidol zeigten und dass die Daten zur Karzinogenität begrenzt waren. Ein Benchmark-Dosis (BMD) Ansatz wurde durchgeführt und Expositionsgrenzbereiche (margins of exposure) von 17 800 und 10 900 für durchschnittliche und maximale Konsumenten wurden abgeleitet. Aufgrund der möglichen genotoxischen Karzinogenität wird jedoch empfohlen, die alimentäre Aufnahme nach dem ALARA Prinzip (as low as reasonably achievable) so gering wie möglich zu halten (FSCJ, 2015).

Durch verbesserte analytische Nachweisverfahren liegen seit 2013 erste valide Daten zu 3-MCPD-E in weiteren Lebensmitteln, wie insbesondere Cerealien, Kaffee, Säuglingsnahrung, Milchprodukten, Malz/Bier, geräucherten Fleisch- und Fischerzeugnissen, vor (EFSA, 2013). Der Überblick über 3-MCPD-E-Gehalte in den verschiedenen Lebensmittelgruppen, aus einer Datensammlung der Jahre 2009 bis 2011 generiert, wurde von der *European Food Safety Authority* (EFSA) veröffentlicht. Es wurden insgesamt 1 235 Lebensmittelproben aus unterschiedlichen Lebensmittelkategorien untersucht, wobei die Kategorie „fish and other seafood“ lediglich 48 Proben umfasste. Eine detaillierte Beschreibung dieser Fischerzeugnisse wurde nicht veröffentlicht. Die EFSA rief explizit, insbesondere für die Generierung von Daten aus bisher nicht ausreichend berücksichtigten Lebensmittelkategorien, wie zum Beispiel frittierte, gebackene oder auf andere Art und Weise thermisch behandelte, fetthaltige Lebensmittel auf (EFSA, 2013).

Im Jahre 2016 veröffentlichte die EFSA eine weitere Stellungnahme zu freiem und verestertem 2- und 3-MCPD und G-E in Lebensmitteln. Die EFSA stellte einen Überblick über 7 175 Gehaltsdaten dar. Die höchsten Gehalte an 2- und 3-MCPD-E (MCPD-E) und G-E wurden wiederum in raffiniertem Palmöl mit mittleren Durchschnittsgehalten von 2 912 µg/kg 3-MCPD-E, 1 565 µg/kg 2-MCPD-E und 3 955 µg/kg G-E identifiziert. Die Gehalte sonstiger Öle lagen bei 48-608 µg/kg 3-MCPD-E, 86-270 µg/kg 2-MCPD-E und 15-650 µg/kg G-E (EFSA, 2016). Unter anderen Lebensmittelgruppen wurden die höchsten mittleren Gehalte in „Kartoffelchips“ (216 µg/kg 3-MCPD-E, 135 µg/kg 2-MCPD-E und 110 µg/kg G-E), „Hot surface cooked pastries“ (247 µg/kg 3-MCPD-E, 123 µg/kg 2-MCPD-E und 137 µg/kg G-E), „Keksen“ (200 µg/kg 3-MCPD-E, 103 µg/kg 2-MCPD-E und 134 µg/kg G-E) und „Short crusts“ (154 µg/kg 3-MCPD-E, 79 µg/kg 2-MCPD-E und 149 µg/kg G-E) identifiziert.

Das Panel „*On Contaminants in the Food Chain*“ (CONTAM Panel) legte eine tolerierbare tägliche Aufnahmemenge (TDI) von 0,8 µg/kg für die Summe von 3-MCPD und 3-MCPD-E

fest (EFSA, 2016). Im Jahre 2018 wurde ein aktualisierter TDI von 2 µg/kg für die Summe aus 3-MCPD und 3-MCPD-E von der EFSA veröffentlicht (EFSA, 2018).

Raffinierte Speiseöle und -fette spielen auch eine große Rolle im Verarbeitungsprozess von weiteren Lebensmitteln, wie zum Beispiel thermisch behandelten Fischerzeugnissen. Auch im Rahmen des EFSA Reports (2016) wurde nur eine geringe Datenmenge, von 28 frittierten oder gebratenen Fischerzeugnissen und 60 geräucherte Fischproben veröffentlicht.

Im Jahre 2015 wurde ein Projekt der industriellen Gemeinschaftsforschung (AiF 18577 N) gestartet, welches durch den Forschungskreis der Ernährungsindustrie (FEI) unterstützt wurde. Ziel dieses Projektes war die Analyse und Minimierung von MCPD, MCPD-E und G-E in thermisch behandelten (frittierten) und geräucherten Fischerzeugnissen.

Ergebnisse aus diesem FEI-Projekt, sowie weiterführenden Untersuchungen zur Analyse und Identifizierung der Einflussparameter zur Bildung von MCPD, MCPD-E und G-E in Fischölen, panierten und vorgebratenen, tiefgekühlten Produkten, Bratfischen und geräucherten Fischprodukten, wurden als Fachartikel in renommierten Wissenschaftszeitschriften veröffentlicht. Im Zuge dessen wird die vorliegende Arbeit in Form einer kumulativen Dissertation präsentiert.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Chemische und physikalische Charakterisierung von MCPD, MCPD-E und G-E

Der IUPAC-Name von 3-MCPD ist 3-Chlorpropan-1,2-diol (3-CPD). Weitere Benennungen sind α -Chlorhydrin und Glycerol α -Monochlorhydrin. Die Summenformel lautet $C_3H_7ClO_2$, die Molmasse beträgt 110,5 g/mol. Bei Raumtemperatur ist 3-MCPD eine farblose bis hellgelbe, zähe und ölige Flüssigkeit mit einer Dichte von 1,32 g/cm³, einem Schmelzpunkt von -40 °C und einem Siedepunkt von 213 °C bei 760 mmHg. 3-MCPD ist hygroskopisch und gut löslich in Wasser und in organischen Lösemitteln mit mittlerer bis hoher Polarität, wie zum Beispiel Methanol, Ethanol, Chloroform und Ethylacetat. 3-MCPD ist ein chirales Molekül und existiert als eine Mischung der beiden Enantiomere (R)-(-)-3-Chlorpropan-1,2-diol [CAS Nummer 57090-45-6] und (S)-(+)-3-Chlorpropan-1,2-diol [CAS Nummer 60827-45-4] (Abbildung 1), die aus dem prochiralen L-Glycerol stammen. Die biologische Aktivität der Enantiomere unterscheidet sich (Velišek et al., 2002). Das (S)-3-MCPD hat zwar eine antifertile Wirkung, zeigte aber keine schädigende Wirkung auf Nieren, wie es beim (R)-3-MCPD der Fall ist (Porter & Jones, 1982). Überwiegend wird in der Literatur die racemische Mischung zur Charakterisierung von Eigenschaften zu Grunde gelegt. 3-MCPD reagiert leicht mit Säuren, Alkohol, Aldehyden, Aminoverbindungen, Ketonen und Thiolen (Velišek et al., 1991).

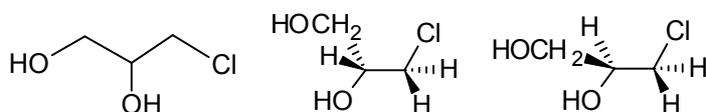


Abbildung 1: v.l.n.r.: 3-MCPD, (R)-3-MCPD, (S)-3-MCPD.

Der IUPAC-Name von 2-MCPD [CAS Nummer 497-04-1] ist 2-Chlorpropan-1,3-diol (2-CPD) (Abbildung 2). Weitere Benennungen sind β -Chlorhydrin und Glycerol β -Monochlorhydrin. Die Summenformel lautet $C_3H_7ClO_2$, die Molmasse beträgt ebenfalls 110,5 g/mol. 2-MCPD ist eine farblose bis hellgelbe, zähe und ölige Flüssigkeit mit hygroskopischen Eigenschaften, hat eine Dichte von 1,3 +/- 0,1 g/cm³ und einen Siedepunkt von 213 °C bei 760 mmHg. 2-MCPD reagiert in ähnlicher Weise mit denselben chemischen Verbindungen wie 3-MCPD (EFSA, 2016).

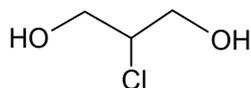


Abbildung 2: 2-MCPD.

Der IUPAC-Name von Glycidol ist Oxiranylmethanol [CAS Nummer 556-52-5]. Weitere Benennungen lauten 2,3-Epoxy-1-Propanol, 3-Hydroxypropylenoxid und 2-Hydroxymethyloxiran. Die Summenformel lautet $C_3H_6O_2$, die Molmasse beträgt 74,08 g/mol. Glycidol existiert als optisch aktives Isomer (R)-(+)-Glycidol [CAS Nummer 57044-25-4] und (S)-(-)-Glycidol [CAS Nummer 60456-23-7] (Abbildung 3). Glycidol ist bei Raumtemperatur eine farblose Flüssigkeit, löslich in Wasser und in den meisten polaren Lösungsmitteln (EFSA, 2016).

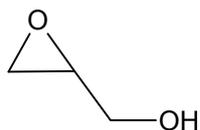


Abbildung 3: Glycidol.

3-MCPD, 2-MCPD und Glycidol können jeweils mit Fettsäuren, welche zum Beispiel natürlicherweise in pflanzlichen Speiseölen vorhanden sind, Ester bilden (Abbildung 4). 2- und 3-MCPD können jeweils Monoester bilden, indem eine der beiden Hydroxylgruppen verestert wird. Es können aber auch Diester gebildet werden, indem beide Hydroxylgruppen entweder mit derselben oder mit verschiedenen Fettsäuren verestert werden. Handelt es sich um verschiedene Fettsäuren, existieren sogenannte Stellungsisomere. Glycidol trägt nur eine Hydroxylgruppe, weshalb nur eine Bildung von Monoestern möglich ist (EFSA, 2016).

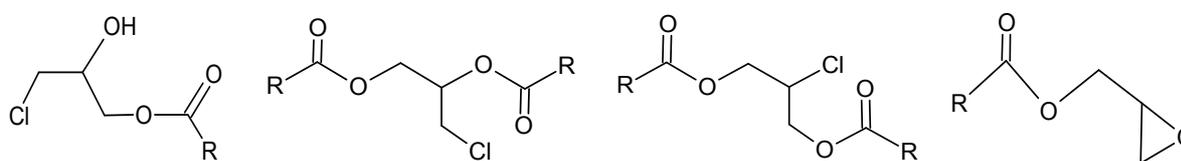


Abbildung 4: v.l.n.r.: 3-MCPD-Monoester, 3-MCPD-Diester, 2-MCPD-Diester, G-E.

R = Fettsäurerest.

Die veresterten Fettsäuren hängen von der Art des Öls ab. Zu den am häufigsten vorkommenden Fettsäuren zählen Laurinsäure (Dodecansäure C12:0), Myristinsäure (Tetradecansäure C14:0), Palmitinsäure (Hexadecansäure C16:0), Stearinsäure (Octadecansäure C18:0), Ölsäure (Octadecensäure C18:1), Linolsäure (Octadecadiensäure C18:2) und Linolensäure (Octadecatriensäure C18:3). Die chlorierten Ester werden jeweils in ähnlichen Verhältnissen gebildet, wie sie in den jeweiligen Ölsorten vorliegen. Einflüsse durch Flüchtigkeit und Bedingungen bei der Desodorierung können geringe Unterschiede hervorrufen (EFSA, 2016).

2- und 3-MCPD-E und G-E haben ähnliche Eigenschaften (z.B. Polarität und Löslichkeit) wie die entsprechend verknüpften Fettsäuren, mit geringfügig niedrigeren Schmelzpunkten. In nicht-polaren Lösungsmitteln sind sie löslich, in Wasser hingegen schlecht. Detaillierte Löslichkeitseigenschaften individueller MCPD-E und G-E wurden bisher nicht untersucht. Es wird jedoch angenommen, dass MCPD-Monoester in polaren Lösungsmitteln eine höhere Löslichkeit aufweisen als Diester und eine erhöhte Kettenlänge der Fettsäuren die Löslichkeit in polaren Lösungsmitteln verringert und die Löslichkeit in nicht polaren Lösungsmitteln erhöht (EFSA, 2016).

2.2 Analytik

2.2.1 Analysenmethoden zur Bestimmung von MCPD

Für die Analyse von freiem 3-MCPD ist eine empfindliche Analyse unter Beachtung einiger Besonderheiten notwendig (Wenzl, Lachenmeier & Gökmen, 2007). Da die Struktur keine chromophore Gruppe aufweist, ist die Anwendung einer Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) mit UV- oder Fluoreszenz-Detektion nicht möglich (Hamlet & Sadd, 2002). Eine Analyse mittels Gaschromatographie (GC) ist wegen des hohen

Siedepunktes und der starken Polarität des 3-MCPD-Moleküls zwar nicht direkt, aber derivatisiert möglich (Rodman & Ross, 1986). Zusammengefasst bedarf die Analyse von 3-MCPD durch Gaschromatographie einer der jeweiligen Matrix angepassten Probenvorbereitung und anschließender Derivatisierung der Komponenten. Die grundlegende Vorgehensweise der angewandten Methoden umfasst Festphasenextraktion, Derivatisierung und anschließende Analyse mittels Gaschromatographie, gekoppelt mit einem Massenspektrometer (GC-MS), (Hamlet et al., 2002b).

Die ersten analytischen Methoden zur Bestimmung von freiem 2- und 3-MCPD wurden von Van Bergen et al. (1992) für sauer hydrolysierte Pflanzenproteine entwickelt und angewandt. Diese umfasst eine Festphasenextraktion (SPE), wobei die flüchtigen und weniger polaren Chlorpropanole, wie 1,3-Dichlorpropan-2-ol (1,3-DCP) zuerst mittels einer Mischung aus Hexan und Diethylether entfernt werden. Anschließend wird das 3-MCPD mittels Diethylether eluiert. Es folgt eine Derivatisierung in Heptafluorbutyrat (HFB). Die daraus gebildeten Heptafluorbutyrat-Ether (Abbildung 5) werden durch GC gekoppelt mit einem Elektroneneinfangdetektor (GC-ECD) bestimmt (Van Bergen et al., 1992). Basierend auf dieser Methode wurden weitere, empfindlichere Methoden entwickelt. Die Diethylether-Extrakte wurden konzentriert und das 3-MCPD wurde vor der GC-MS Analyse zu Di-(HFB) derivatisiert. Zudem wurden deuterierte interne Standards eingeführt. 1998 wurden erstmals Lebensmittelproben, nach Entfernung des Fettanteils, mittels dieser Methode unter Verwendung einer GC, gekoppelt mit einem Tandem-Massenspektrometer (GC-MS/MS) bestimmt (Hamlet, 1998). Brereton et al. (2001) verwendeten stattdessen eine GC-MS Methode. Letztere wurde durch einen Ringversuch validiert, von der *Association of Official Analytical Chemists* (AOCS) und vom *European Committee for Standardization* (CEN, 2004) als offizielle Methode anerkannt und daraufhin weitreichend angewandt (Nyman et al., 2003; Leòn et al., 2008).

Später wurde herausgefunden, dass die Verwendung von Ethylacetat als alternatives Extraktionslösemittel für Diethylether bei der Bestimmung von 3-MCPD in Getreideerzeugnissen, wie Mehl und Brot, zu höheren Wiederfindungen führt (Hamlet, 1998; Rétho & Blanchard, 2005). Als alternative Derivatisierungsreagenzien wurden N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA) (Kissa, 1992; Cao et al., 2009; Racamonde et al., 2011) und Heptafluorbuttersäure (HFBA) (Chung, Hui & Cheng, 2002; Abu-El-Haj et al., 2007) vorgeschlagen. Die meist angewandte Methode beinhaltet eine kombinierte Extraktion und Derivatisierung mittels einer organischen Phenylboronsäure (PBA) Lösung (Abbildung 5) (Rodman & Ross, 1986; Pesselman & Feit, 1988). Mit 1,2- und 1,3-Diolen reagiert Borsäure zu zyklischen Dioxaborolan/Dioxaborinan-Derivaten (Pesselman & Feit, 1988). Nachteil dieser Methode ist, dass für eine quantitative Reaktion eine hohe Konzentration der PBA-Lösung notwendig ist, die gleichzeitig zu einer Verschmutzung der GC-Säule führen kann (Breitling-Utzmann et al., 2005). Die Methode wurde jedoch mit kleinen Anpassungen weitreichend angewandt (Ushijima et al., 1995; Breitling-Utzmann et al., 2003; Divinová et al., 2004). Die von Plantinga, Van Toorn & Van der Stegen (1991) entwickelte PBA-Methode wurde validiert und in Deutschland als offizielle Methode für 3-MCPD in Lebensmitteln in §64 LMBG aufgenommen. Die Entfernung der Fettphase durch Lösungsmittelextraktion vorab wurde von Divinová et al. (2004) empfohlen. Alternative Derivatisierungsansätze wurden basierend auf der Fähigkeit von Diolen, durch Reaktion mit Aceton zyklische Ketale

zu bilden, (Abbildung 5) vorgeschlagen (Meierhans et al., 1998; Dayrit, & Niñonuevo, 2004; Rétho & Blanchard, 2005; Becalski, Zhao & Sit, 2013).

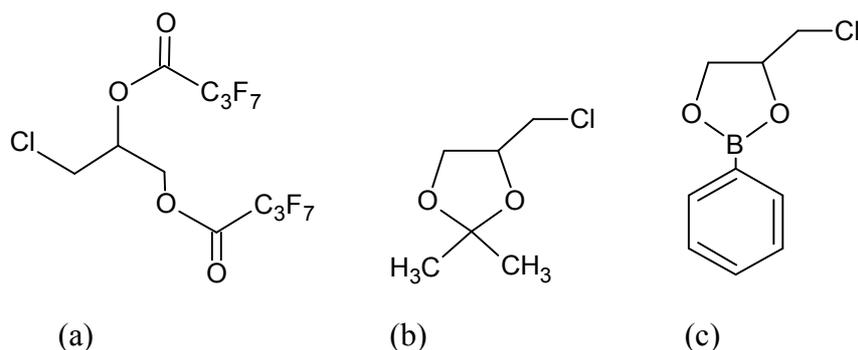


Abbildung 5: Derivatisierungsprodukte 3-MCPD;
(a) 3-Chlorpropan-1,2-diol-di(heptafluor)butyrat,
(b) 4-Chlormethyl-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan, (c) 4-Chlormethyl-2-phenyl-1,3,2-dioxaborolan.

Es gibt verschiedene Vor- und Nachteile der aufgeführten Analysenmethoden für freies 2- und 3-MCPD. MCPD-Isomere haben ein sehr geringes Molekulargewicht. Die Addition der relativ schweren HFB-Gruppen reduziert den Effekt des Hintergrundrauschens des MS durch Co-extrahierte Verbindungen. Das Reagenz ist jedoch sehr empfindlich gegenüber Feuchtigkeit und relativ instabil, was das Handling erschwert (Rétho & Blanchard, 2005).

2-MCPD kann mittels HFBA und BSTFA problemlos bestimmt werden, da die $-\text{OH}$ -Gruppen individuell derivatisiert werden. Boronat-Reagenzien können zwischen Paaren von $-\text{OH}$ -Gruppen reagieren, die nicht benachbart sind (Rétho & Blanchard, 2005). Die Quantifizierung von 2- und 3-MCPD wird durch Kalibriergeraden und einer Isotopenverdünnungsanalyse mit d_5 -markiertem 2- und 3-MCPD erreicht.

In der Routineanalytik werden für die Detektion von 3-MCPD hauptsächlich GC-MS/MS Apparaturen eingesetzt. Hamlet (1998) wandte eine Ionenfalle in einem „multiplex reaction monitoring“-Modus (MRM) an. Kuballa & Ruge (2004) verbesserten die Empfindlichkeit durch ein Tripel-Quadrupol-MS in einem „selected reaction monitoring“-Modus.

Die HFB-Methode wurde in HVP, Brühen und Suppen, Sojasaucen, Salami, Fisch, Käse, Getreideprodukte und Brot im Rahmen eines internationalen Ringversuchs für die Bestimmung von 3-MCPD validiert (Brereton et al., 2001).

Jira (2010) modifizierte die PBA-Methode für die Bestimmung von 3-MCPD in geräucherten Fleischerzeugnissen. Für die Bestimmung von 3- und 2-MCPD bei Keksen, Kartoffel-Chips, Getreideprodukten, Brot, Fleisch und Fisch wurde die Methode in-house validiert (Wenzl et al., 2015). Es wurden gute Übereinstimmungen der beiden Methoden untereinander gefunden. Bestimmungsgrenzen von 15 und 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ für 3- und 2-MCPD wurden festgelegt.

2.2.2 Analysenmethoden zur Bestimmung von MCPD-E und G-E in raffinierten Speiseölen und -fetten

Aufgrund ihrer strukturellen Vielfalt ist die Bestimmung von MCPD-E sehr komplex. Sowohl eine als auch beide freien Hydroxylgruppen des MCPD-Moleküls können mit Fettsäuren verestert sein. Zudem können alle natürlich vorkommenden Fettsäuren (Kapitel 2.1) eine Verbindung eingehen. So können sich etwa 100 verschiedene Ester bilden. Für G-E ist diese

Anzahl reduziert, da es nur eine Hydroxylgruppe gibt. Im Allgemeinen wird zwischen direkten und indirekten Analysemethoden unterschieden, wobei sich die Anwendung der indirekten Methoden in der Routineanalytik etabliert hat.

Durch die Anwendung direkter Analysemethoden zur Bestimmung von 3-MCPD-E können die einzelnen Kongenere ermittelt werden. Hierfür wird hauptsächlich Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit einem Massenspektrometer (LC-MS) angewandt, wobei entsprechende stabilisotopenmarkierte Standardsubstanzen erforderlich sind, um die individuellen Ester zu quantifizieren (Dingel & Matissek, 2013). Dabei werden Öle bzw. Fettextrakte von Lebensmitteln verdünnt und direkt, oder nach einem vorherigen Aufreinigungsschritt oder einer Fraktionierung in das LC-MS-System injiziert (McMahon et al., 2013). Diese Methode erwies sich als sehr anspruchsvoll im Hinblick auf die schlechte Löslichkeit der MCPD-E in Lösungsmitteln und dem schnellen Empfindlichkeitsverlust (Collison & Blumhorst, 2011; Haines et al., 2011; Pinkston & Stoffolano, 2011). Eine direkte Analysemethode zur Bestimmung von Glycidylester in Fetten und Ölen wurde bereits als offizielle AOCS Methode (AOCS/JOCS, 2012) anerkannt.

Indirekte Methoden liefern nach einer Spaltung der Ester und Freisetzung des freien MCPD im Vergleich zur direkten Methode Summenergebnisse der unterschiedlichen Kongenere (Dingel & Matissek, 2013). Sie haben jedoch den Vorteil, dass nur jeweils eine Standardsubstanz zur Quantifizierung notwendig ist. Zudem sind die Methoden sehr empfindlich mit entsprechend niedrigen Nachweisgrenzen, da nur ein Analyt bestimmt wird. Kuhlmann (2016) erzielte eine Bestimmungsgrenze von 10 µg/kg sowohl für MCPD-E, als auch für G-E. Zudem erfordern diese Methoden keine aufwändige Ausstattung und sind einfach durchzuführen (Crews, 2012). Ein Nachteil ist, dass die Probenaufarbeitung chemische Umwandlungsreaktionen der Analyten mit sich bringt, was zu Unsicherheiten in Bezug auf die Richtigkeit der MCPD-E- und G-E-Bestimmung im Rahmen dieser Methoden führt (Crews, 2012). Üblicherweise beinhalten indirekte Methoden, nach Zugabe eines stabilisotopenmarkierten, internen Standards, zunächst die Spaltung der Ester durch Hydrolyse (Razak et al., 2012). Anschließend wird das Reaktionsgemisch mittels verschiedener Reagenzien neutralisiert und ausgesalzen. Die extrahierten, freien Komponenten werden unter Verwendung unterschiedlicher Verbindungen derivatisiert und anschließend mittels GC-MS analysiert (Hrnčirík et al., 2011). Die Hydrolyse kann mittels Lipase-Enzymen hervorgerufen werden (Chung & Chan, 2012; Chung et al., 2013; Hamlet & Sadd, 2004). Die Anwendung von saurer (Divinová et al., 2004; Zelinková et al., 2006) oder alkalischer Hydrolyse (Küsters et al., 2011; Weißhaar, 2008) ist jedoch üblicher. G-E können unter denselben Bedingungen gespalten werden. Eine alternative Vorgehensweise ist die Bromierung zu Monobrompropandiol (MBPD) der G-E vor ihrer Spaltung (Abbildung 6).

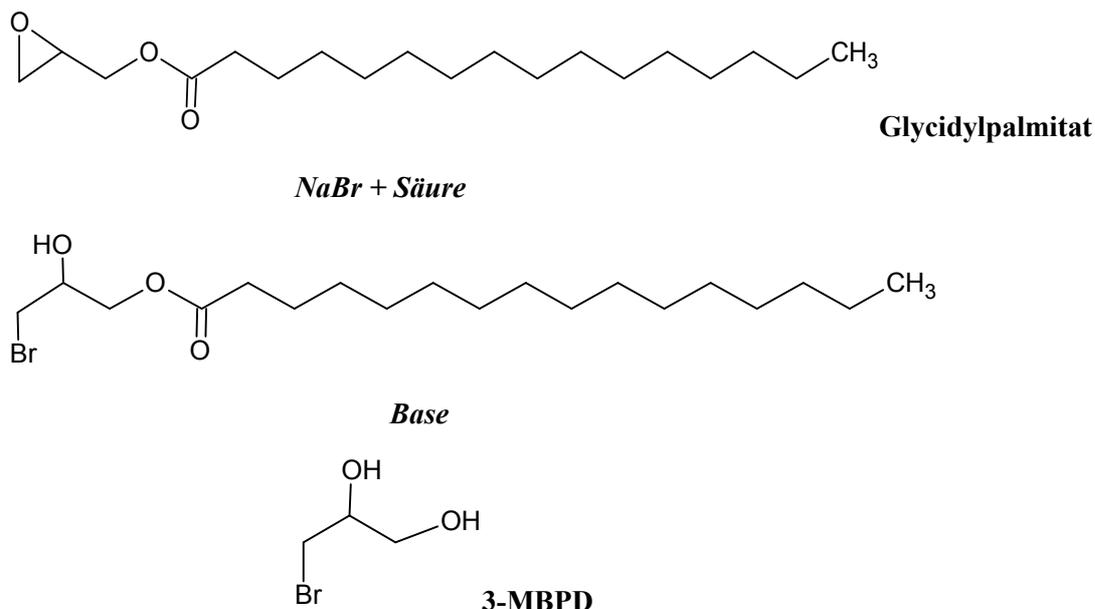


Abbildung 6: Bildung von 3-MBPD aus Glycidylpalmitat.

Neben der Variationsmöglichkeiten der Hydrolysereaktion können verschiedene Derivatisierungsreagenzien verwendet werden (vgl. Abbildung 5). Das Grundschemata der indirekten Methoden mittels der gängigen alkalischen Hydrolyse und einer PBA-Derivatisierung, ist in Abbildung 7a) dargestellt.

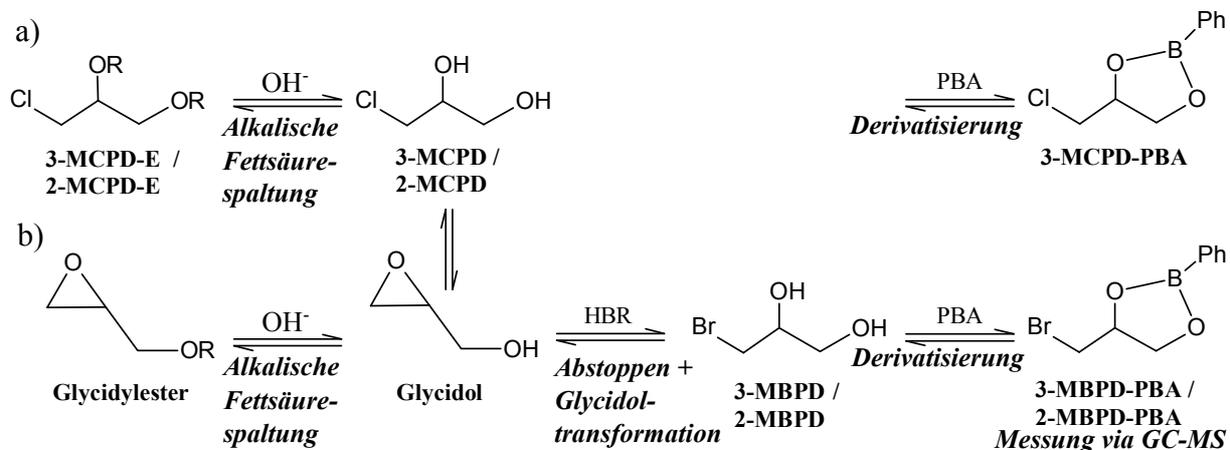


Abbildung 7: a) Grundschemata einer indirekten Methode. b) Schema "3-in-1 Methode" (nach Kuhlmann, 2010).

Im Jahre 2008 wurde ein Ansatz zur Bestimmung von 3-MCPD-E entwickelt, der heute als „Ur-Weißhaar-Methode“ bekannt ist. Die Methode basiert auf einer alkalischen Hydrolysereaktion mit Natriummethylat und einer Derivatisierung mit PBA in NaCl-Lösung (Weißhaar, 2008). Bereits im selben Jahr wurde jedoch festgestellt, dass das Vorhandensein von Chloridionen in Verbindung mit der alkalischen Hydrolysereaktion zu Überbefunden von 3-MCPD führte, die sich bald darauf auf die Anwesenheit von G-E zurückführen ließen (BfR, 2009; Kuhlmann, 2011). Durch Zugabe der chloridhaltigen Salzlösung während der Aufarbeitung ist eine nukleophile Ringöffnung am Epoxidring des Glycidols möglich. Die erste Einheitsmethode DGF-(Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft)-C-III 18 (09)

entstand aus dem Ansatz heraus, die G-E durch eine gezielte Vorbehandlung der Proben mittels einer Mischung aus Schwefelsäure und Propanol vor der alkalischen Hydrolyse zu eliminieren, wobei die Quantifizierung im Anschluss über eine indirekte Berechnung der Differenz erfolgt. Diese Methode wurde aufgrund von Unsicherheiten wieder zurückgezogen, da für einige Proben zu niedrige G-E-Werte identifiziert wurden. Der erste Teil dieser Methode, bei der die G-E nicht entfernt wurden, blieb als evaluierte Einheitsmethode DGF C-VI 17 (10) bestehen und dient der Ermittlung des Summenergebnisses aus 3-MCPD-E und G-E (DGF, 2010). Im selben Jahr wurde eine Methode zur gleichzeitigen Bestimmung von freiem 3-MCPD und 3-MCPD-E (inklusive G-E) durch Trennung der organischen und wässrigen Phase, nach Zugabe einer NaCl-Lösung und Tertiär-Butylmethylether (t-BME), veröffentlicht (Küsters et al., 2010).

Neben der DGF-Methode C-VI 17 (10) wurden zwei weitere Methoden, die eine alkalische Hydrolyse beinhalten und zur Bestimmung der 3-MCPD-E (ohne G-E) dienen, validiert. Die Aufarbeitung wurde hierbei chloridfrei durchgeführt. Unterschiede zwischen diesen beiden Methoden lagen in der Derivatisierung mittels PBA und HFBA (BfR, 2012). Die validierten DGF-Methoden wurden nach weiteren Ringversuchen durch Vorschaltung einer beschleunigten Fettextraktion mittels ASE (accelerated solvent extraction) optimiert. Zudem konnten, aufgrund der Verfügbarkeit des stabilisotopenmarkierten, internen Standards, auch 2-MCPD-E quantifiziert werden.

Durch Berechnung der Differenz lässt sich, wie oben beschrieben, bei Anwendung der DGF-Methode C-VI 17 (10) (Bestimmung von 3-MCPD-E und G-E) als Ansatz (A) und einer der beiden weiteren DGF-Methoden (Bestimmung von 3-MCPD-E) als Ansatz (B), der Anteil des Glycidols (C) berechnen. Dieser wird nach Anwendung folgender Formel (1) berechnet, wobei die Differenz der beiden Ansätze A und B mit einem stöchiometrischen Transformationsfaktor multipliziert wird (Dingel & Matissek, 2013). Der stöchiometrische Faktor wird aus dem Quotient der Molmassen der beiden Moleküle Glycidol und 3-MCPD berechnet, wie in Formel 2 dargestellt (Matissek, 2011).

Formel 1: Berechnung Glycidol-Anteil (Dingel & Matissek, 2013).

$$C = (A - B) * 0,67$$

Formel 2: Berechnung stöchiometrischer Faktor (Matissek, 2011).

$$\frac{M(\text{Glycidol})}{M(3\text{-MCPD})} = \frac{74 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}{110 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = 0,67$$

Eine weitere indirekte Methode wurde im Jahre 2011 als Einheitsmethode DGF C-VI 18 (10) oder auch „Kuhlmann Classic“ veröffentlicht. Diese Methode enthielt ebenfalls einen Ansatz (A), bei dem das Abstoppen der alkalischen Hydrolyse und das Abstoppen der Reaktion mit angesäuerter NaCl-Lösung sowohl eine Umwandlung der 3-MCPD-E als auch der G-E in freies 3-MCPD bewirkt. Ein zweiter Ansatz (B) beinhaltete eine Neutralisation mit angesäuerter, chloridfreier Salzlösung, wodurch die Umwandlung der G-E unterbunden wurde. Die Derivatisierung erfolgte in beiden Ansätzen mit PBA-Lösung. Im Unterschied zur oben beschriebenen Formel wurde hier zur Berechnung des Gehaltes an Glycidol (C) die Differenz aus Ansatz A und B mit einem experimentell ermittelten Transformationsfaktor multipliziert (Formel 3) (DGF, 2010).

Formel 3: Berechnung mit Transformationsfaktor (DGF, 2010).

$$C = (A - B) * t$$

Die DGF Methode C-VI 18 (10) wurde als offizielle AOCS-Methode (Cd 29c-13), zur Bestimmung von MCPD-E und G-E in Speiseölen und -fetten, anerkannt. Eine automatisierte Methode zur Probenaufarbeitung und Quantifizierung, basierend auf dieser AOCS-Methode, wurde bereits entwickelt (Zwagerman & Overman, 2016).

Der Nachteil der dargestellten Differenzmethoden liegt darin, dass sich durch die Durchführung zweier Ansätze die Messunsicherheit erhöht. Die Ergebnisunschärfe steigt somit für die Glycidyl-derivate proportional zum 3-MCPD / Glycidol-Verhältnis an.

Neben der Differenzmethode wurde eine weitere Methode zur gleichzeitigen Bestimmung von MCPD-E und G-E entwickelt, die „Kuhlmann 3-in-1-Methode“. Hierbei findet die alkalische Hydrolyse unter milden Bedingungen (-22 °C, 16 h) statt. Das Abstoppen der Reaktion mit angesäuerter Natriumbromidlösung bewirkt die gezielte Umwandlung des freigesetzten Glycidols in 3-MBPD, als welches es unmittelbar quantifiziert werden kann. Unter diesen milden Bedingungen werden Isomerisierungsreaktionen von 3-MCPD zu Glycidol verringert, wodurch eine simultane Quantifizierung aller drei Verbindungen in einem Reaktionsansatz möglich ist (Kuhlmann, 2011). Die Reaktionen, die diese Methode beinhaltet, können Abbildung 7 b) entnommen werden.

Die Quantifizierung der MCPD-E und G-E erfolgt mittels stabilisotopenmarkierten, internen Standards. Die beschriebene „3-in-1-Methode“ wurde ebenfalls als offizielle AOCS-Methode (Cd 29b-13) zur Bestimmung von MCPD-E und G-E in Speiseölen und -fetten anerkannt. Bei Analysenmethoden, die eine alkalische Hydrolyse beinhalten, ist es wichtig, die vorgeschriebene Dauer der Hydrolyse einzuhalten. Die Methoxid-Ionen, welche bei der alkalischen Variante für die Spaltung der 3-MCPD-E verantwortlich sind, sind stark nukleophil und können zum Abbau der 3-MCPD-Moleküle durch nukleophile Substitution führen (Hrnčirik et al., 2011). Aus diesem Grund ist der Einsatz von internen Standards unbedingt notwendig. Unsicherheiten der Analyseergebnisse durch Neben- und Abbaureaktionen werden dadurch reduziert (Baer et al., 2010).

Eine empfindlichere, indirekte Methode für die Bestimmung von fettsäuregebundenem 2,3-dichlor-1-propanol (2,3-DCP), 1,3-DCP, 2-MCPD, 3-MCPD und Glycidol in Öl wurde von Kuhlmann (2016) veröffentlicht. Diese Methode basiert, wie die „3-in-1-Methode“, auf einer milden alkalisch-katalysierten Hydrolyse und Freisetzung der Chlorhydrine und Glycidol sowie einer anschließenden Umwandlung von Glycidol in MBPD, entsprechend einer Modifizierung der offiziellen AOCS-Methode Cd 29b-13. Die Dichlorpropanole werden dabei durch eine Flüssigextraktion von den monohalogenierten Diolen und der Öl-Matrix abgetrennt und mittels einer headspace-GC-MS (HS-GC-MS) bestimmt. Die MCPD-Isomere und Glycidolderivate werden mit PBA derivatisiert und mittels GC-MS gemessen. Die Methode wurde in-house validiert. Die Nachweisgrenze liegt für alle Analyten bei $\leq 5 \mu\text{g}/\text{kg}$. Der Vorteil dieser Methode liegt in der hohen Empfindlichkeit, sowie in der gleichzeitigen Bestimmung von fünf Analyten (Kuhlmann, 2016).

Analysenmethoden, die auf saurer Hydrolyse basieren, sind in der Regel robust und zuverlässig anwendbar, die Probenaufbereitungsdauer ist im Allgemeinen jedoch länger. Darüber hinaus kann es während der sauren Hydrolyse unter Anwesenheit von Chlorid und Glycidol ebenfalls zu einer unerwünschten, zusätzlichen Bildung von 3- und 2-MCPD kommen. Als eine Möglichkeit, diese unerwünschte Reaktion zu reduzieren, wurde eine Säure-Vorbehandlung zur Zerstörung von Glycidol vorgeschlagen. Des Weiteren wurde ein Waschschritt der Fettphase mit Wasser beschrieben, um Chlorid zu entfernen (Hamlet et al., 2011; Chung et al., 2013).

Eine dritte, von der AOCS offiziell (Cd 29a-13) anerkannten Methode zur Bestimmung von MCPD-E und G-E in Speiseölen und -fetten wird umgangssprachlich als „Unilever-Methode“ bezeichnet. Sie beinhaltet eine saure Hydrolyse der 3-MCPD-E (Schwefelsäure/Methanol, 40 °C, 16 h). Vor der Hydrolyse werden die G-E dabei durch Zugabe einer angesäuerten Natriumbromidlösung selektiv in 3-MBPD umgewandelt und anschließend mit PBA derivatisiert (Ermacora & Hrnčirik, 2013). Die Quantifizierung erfordert ebenfalls isotopenmarkierte, interne Standards.

Die drei vorgestellten AOCS-Methoden wurden in einem internationalen Ringversuch, an dem 20 Teilnehmer aus acht verschiedenen Ländern teilnahmen, validiert. Während dieser Validierungsstudie repräsentierten die drei Methoden korrekte und vergleichbare Ergebnisse für die Bestimmung verschiedener Mono- und Di-Ester von 2-MCPD, 3-MCPD und Glycidol in raffinierten Speiseölen (AOCS, 2013a-c).

2.2.3 Analysenmethoden zur Bestimmung von MCPD-E und G-E in Lebensmitteln

Die Anwendung sowohl direkter, als auch indirekter Analysenmethoden in anderen Lebensmitteln, außer raffinierten Speiseölen und -fetten, beschränkt sich derzeit auf einige indirekte Methoden im Rahmen einzelner Studien (Becalski et al., 2013; Chung & Chan, 2012; Svejková et al., 2004; Zelinková, Doležal & Velíšek, 2009). Zelinková et al. (2009) bestimmten 3-MCPD-E in Säuglingsanfangsnahrung und Babynahrung.

Statistische Verfahrenskenngrößen, um MCPD-E und G-E in verarbeiteten Lebensmitteln zu bestimmen, wurden jedoch nur in Analysenmethoden, die Küsters et al. (2010, 2011) entwickelten, dargestellt. Vom BfR wurde daraufhin ein Leistungstest für Säuglingsanfangsnahrung, Mayonnaise und Aufstriche durchgeführt (Fry et al., 2013) der zeigte, dass ca. 75% der Ergebnisse für 3-MCPD-E und 78% für 2-MCPD-E zufriedenstellend waren (z-score < 2).

Die indirekten Methoden, die für Lebensmittel angewandt wurden, wiesen üblicherweise eine Bestimmungsgrenze von 15 µg/kg für freigesetztes MCPD aus den Estern für 2- und 3-MCPD auf Fettbasis auf. Für aus G-E freigesetztes Glycidol auf Fettbasis lag die Bestimmungsgrenze bei 30 µg/kg (EFSA, 2016).

Um zuverlässige Daten zum Vorkommen von gebundenem und freiem MCPD und Glycidol zur Verfügung stellen zu können, forderte die EFSA das *Joint Research Centre* (JRC) auf, eine geeignete Analysenmethode für Lebensmittel zu entwickeln. Die EFSA forderte Bestimmungsgrenzen für 3-MCPD-E und G-E unter 100 µg/kg auf die Fettbasis bezogen. Für 3-MCPD wurde eine Bestimmungsgrenze von 25 µg/kg in Lebensmitteln, bezogen auf das Gesamtgewicht, festgelegt.

Es wurden zwei Analysenmethoden entwickelt: Eine Methode zur Bestimmung von MCPD-E und G-E, eine zweite von freiem MCPD. Beide Methoden basieren auf einer Extraktion der Analyten von den Lebensmittelproben mittels organischen Lösungsmitteln und einer anschließenden Derivatisierung. Als Basis wurde die offizielle AOCS-Methode Cd 29a-13 zugrunde gelegt. Die Bestimmung der Analyten erfolgte mittels GC-MS in „selected ion monitoring“-Modus. Beide Analysenmethoden wurden in-house validiert. Die Methoden wurden für mehr als 600 verschiedene Lebensmittelproben angewandt. Enthalten waren die Produktgruppen Brot und Brötchen, feine Backwaren, geräucherter Fisch und Fleisch, gebratenes und gegrilltes Fleisch, Snacks auf Kartoffelbasis und Margarine (Wenzl et al., 2015).

Zur Extraktion von Fett aus den Lebensmitteln wurde die Durchführung einer ASE vor Anwendung der beschriebenen Analysenmethode empfohlen. Die Anschaffung und das Handling einer ASE sind in der Routineanalytik jedoch nicht immer wirtschaftlich. Zudem zeigte der Einsatz von reinem t-BME als Lösungsmittel eine schwache Effizienz und war für die Anwendung in Säuglingsanfangsnahrung nicht geeignet. Ein weiterer Schwachpunkt dieser Methode ist die Zugabe der internen Standards nach der Fettextraktion, was zu verfälschten Ergebnissen führen kann. Darüber hinaus wurde eine Überschätzung der G-E-Gehalte durch Anwendung dieser Methode festgestellt (Zelinková, Giri & Wenzl, 2017). Die Überschätzung basiert auf der Umwandlung von G-E zu MCPD-E in saurem Milieu. Es wurde gezeigt, dass der Gehalt an partiellen Acylglyceriden, hauptsächlich Monoacylglyceride (MAG), einen negativen Einfluss auf die Präzision der Methode hat. MAG reagiert mit Bromid in derselben Weise wie G-E, woraus sich zusätzliche MBPD-E bilden können. Der Gehalt an MAGs in Lebensmitteln ist für die Robustheit der Methoden kritisch, da diese hauptsächlich als Zusatzstoffe (z.B. Emulgatoren) in komplexen Lebensmittelmatrizes, wie Backwaren oder frittierten Produkten, auftreten können. Die beobachteten Überbefunde wurden durch eine direkte Bestimmung der G-E mittels LC-MS/MS (AOCS, 2015) bestätigt. Es wurde ein zusätzlicher Reinigungsschritt durch Festphasenextraktion empfohlen, um die MAGs vorab zu entfernen (Zelinková et al., 2017).

Eine darauf aufbauende, verbesserte Analysenmethode für die Bestimmung von MCPD-E und G-E in ölhaltigen Emulsionen wurde bereits entwickelt und besteht derzeit als Entwurf für eine vierte offizielle AOCS-Methode (AOCS, 2015; Ermacora & Hrnčičík, 2014a).

Gleichzeitig wurde eine auf der modifizierten offiziellen AOCS-Methode Cd 29b-13 (vgl. Kapitel 2.2.2) basierende Analysenmethode zur Bestimmung von sowohl freiem, als auch gebundenem MCPD und Glycidol entwickelt und in-house validiert. Zusätzlich zur AOCS-Methode beinhaltet diese Methode eine vorgeschaltete „Heat-Ultrasonic-Pressure“-unterstützte Lösungsmittelextraktion der Lebensmittel (Kuhlmann, 2017).

Aus dieser Darstellung der unterschiedlichen Analysenmethoden geht hervor, dass bisher keine dieser Methoden als offiziell validierte Methode zur Bestimmung von MCPD-E und G-E in anderen Lebensmitteln als raffinierte Speiseöle und -fette anerkannt wurde. Folglich existiert derzeit ebenso keine Methode zur Bestimmung von freiem oder gebundenem MCPD oder Glycidol in Fischerzeugnissen, einschließlich Fischölen. Garbalo-Rubio et al. (2017) publizierten eine Methode zur gleichzeitigen Bestimmung von 3-MCPD-E und G-E in winterisierten und nicht-winterisierten Fischölen. Die Methode basiert auf einer alkalischen Hydrolyse bei Raumtemperatur und einer Derivatisierung mit PBA bei 90 °C. Die

Bestimmung der Gehalte erfolgt mittels GC-MS/MS. Die Bestimmungsgrenze dieser Methode liegt bei 100 ng/g für 3-MCPD und 50 ng/g für Glycidol. Die Methodvalidierung erfolgte durch eine Laborvergleichsuntersuchung. Zur Quantifizierung von Glycidol wurde eine mathematische Gleichung entwickelt, um die partielle Umwandlung von 3-MCPD in Glycidol zu kompensieren.

2.3 Bildungsmechanismen und Einflussfaktoren

2.3.1 Bildungsmechanismen von MCPD, MCPD-E und G-E

Der Bildungsmechanismus von 3-MCPD verläuft bevorzugt bei Temperaturen ab 180 °C unter sauren Bedingungen in Form einer nukleophilen Substitution der Acylgruppe am Glycerol bzw. an einem Triacylglycerid (TAG) durch ein Chloridanion (Destailats et al., 2012b). Das Glycerol wird dabei an der primären und sekundären Hydroxylgruppe protoniert, woraus Acyloxoniumionen entstehen und mit endogenen oder exogenen Chloridionen reagieren können. Mittels dieses Reaktionsmechanismus können beide Enantiomere des 3-MCPD-Moleküls entstehen. Zusätzlich kann 2-MCPD gebildet werden, indem die Hydroxylgruppen der Acyloxoniumionen in der sekundären Position dissoziieren, wodurch Wasser und ein Carbokation freigesetzt werden (Hamlet et al., 2002b).

Das Verhältnis der Isomere (3-MCPD/2-MCPD) aus Glycerol ist das Ergebnis der nukleophilen Substitution der Hydroxylgruppen durch ein Chloridanion. Obwohl Glycerol in wässriger Salzsäure löslich ist und eine hohe Konzentration für die Reaktion zur Verfügung steht, ergibt die geringe Neigung der Hydroxylgruppen eine geringere Ausbeute an MCPD als zum Beispiel Triolein. Die isomere Verteilung der 3-MCPD und 2-MCPD (2:1) ist in Übereinstimmung mit der statistischen Substitution der zwei primären Methylengruppen (CH₂) und nur einer sekundären Methingruppe (Collier, Cromie & Davies, 1991). Im Vergleich dazu besitzt ein TAG wie Triolein eine geringe Löslichkeit in wässrigem Reaktionsmedium, reagiert aber mit wässriger Salzsäure zu einem höheren Anteil an MCPD. Zusätzlich ist die Regioselektivität mit einem 3-MCPD/2-MCPD-Verhältnis von ca. 10:1 größer. Diese Reaktion kann durch das Verfahren über partielle Glycerole (Diglycerole) mit den Estergruppen, die eine anchimerische Unterstützung durch die Bildung von cyclischen Alkyloxoniumionen als Zwischenprodukte darstellen, erklärt werden. Das Verhältnis von 3-MCPD zu 2-MCPD entsteht durch sterische und elektrische Effekte die sich aus der endständigen Estergruppe ergeben und die das nukleophile Chloridanion an das CH₂ Kohlenstoffatom leitet (Collier et al. 1991). Der aktuelle Wissensstand über die Faktoren, welche die Bildung von 3-MCPD-E und G-E beeinflussen, wurde von Craft et al. (2013) zusammengefasst. Die Bildungswege von MCPD-E wurden von einigen Forschergruppen untersucht (Hamlet, 2009; Hamlet et al., 2011; Jala et al., 2015; Stadler & Lineback 2008; Zhang et al., 2013). Detailliert wurden die wesentlichen vorgeschlagenen Bildungswege von Zhang et al. (2013), Hamlet et al. (2011) und Rahn & Yaylayan (2011b) beschrieben. Die möglichen Bildungswege sind in Abbildung 8 a) und b) dargestellt. Im Allgemeinen kann unter hohen Temperaturbedingungen und in Anwesenheit von Wasser ein TAG hydrolysiert werden, wodurch eine Mischung aus Diacylglyceridisomeren (1,2-DAG und 1,3-DAG oder Diacylglyceride) entsteht. Durch weitere Hydrolyse kann eine Mischung aus Monoacylglyceridisomeren (1-MAG und 2-MAG) entstehen. Die Acylglyceride reagieren

über das Zwischenprodukt Acyloxoniumkation (Abbildung 8 b) mittels einer nukleophilen Substitution eines Esters oder einer Hydroxylgruppe durch ein Chloridanion zu MCPD-E (Velišek et al., 2002). Alternativ konnte mittels Infrarotspektroskopie nachgewiesen werden, dass die thermische Behandlung von TAG in der Anwesenheit von Lewis-Säuren zur Bildung von zyklischen Acyloxoniumionen (Abbildung 8 a) führen kann, wonach eine nukleophile Ringöffnung durch ein Chloridanion folgt, was schließlich zur Bildung von MCPD-E führt (Rahn & Yaylayan, 2011a). Es wurde ebenfalls nachgewiesen, dass TAGs auch direkt als Substrat für die Bildung von MCPD-E agieren können (Destailats et al., 2012b).

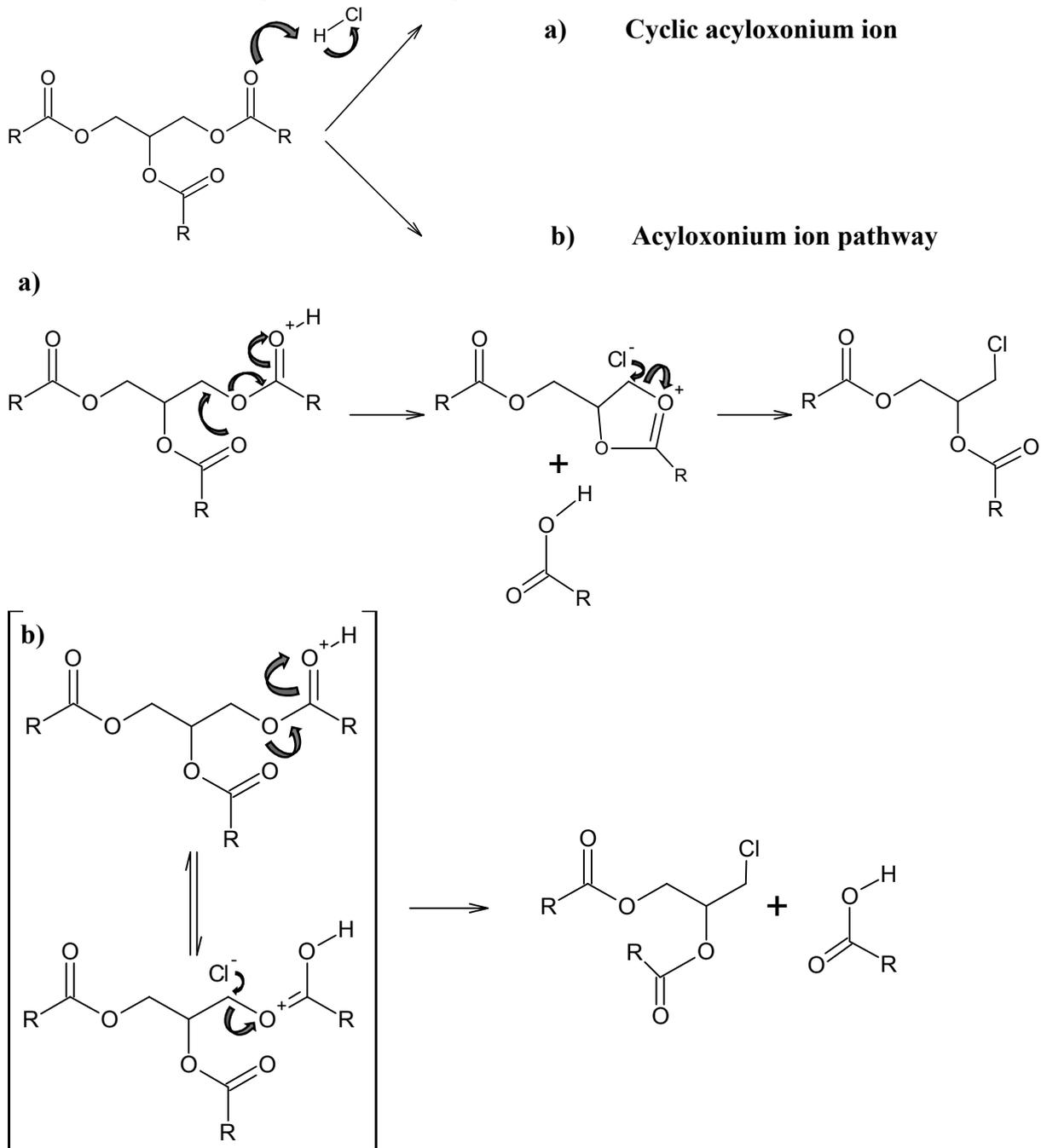


Abbildung 8: Bildungswege MCPD-E (nach Destailats et al., 2012b).

Im Gegensatz zu 3-MCPD-E findet die Bildung der G-E ohne Chlorid statt. Derzeit werden vier unterschiedliche Mechanismen zur Bildung von G-E, ausgehend von DAGs und MAGs,

vorgeschlagen. Alle Bildungswege beinhalten eine intramolekulare Umwandlung durch Ladungsverschiebung und unterscheiden sich abhängig von der Art der Zwischenprodukte oder der Abspaltungsgruppe. Zwei der vorgeschlagenen Mechanismen beinhalten reaktive Zwischenprodukte durch Entsäuerung von 1,2-DAGs oder Dehydrierung von MAGs (1-MAGs oder 2-MAGs). Die anderen beiden Bildungswege beinhalten eine direkte intermolekulare Umwandlung, gefolgt von einer Eliminierung der Fettsäuren der DAGs (1,2-DAGs oder 1,3-DAGs) oder von Wasser der 1-MAGs (Cheng et al., 2017).

Es wurde berichtet, dass sich sowohl bei der Bildung der 3-MCPD-E als auch der G-E jeweils nach ein bzw. zwei Stunden Erhitzung, abhängig vom Temperaturniveau, ein konstantes Konzentrationsniveau einstellt (Shimizu et al., 2013a). Shimizu et al. (2013a) erhitzen dafür pures Diolein bei Temperaturen von 180-240 °C unter Zugabe von Tetrabutylammoniumchlorid (0-50 mg/kg Öl) für vier Stunden.

Den größten Unterschied zwischen den beiden Bildungsmechanismen stellt die Notwendigkeit des Chlorids dar, welche vermutlich zu den unterschiedlichen Bildungsraten von MCPD-E und G-E führt. Aufgrund einer begrenzten Verfügbarkeit des Chlorids in diesem Modellversuch, stellte sich für den 3-MCPD-Gehalt bereits nach einer Stunde Erhitzung des Modellöls ein Gleichgewicht ein (Abbildung 9 A), während sich ein Plateaulevel für G-E-Gehalte erst zu einem späteren Zeitpunkt von ca. zwei Stunden (Abbildung 9 B) einstellte (Shimizu et al., 2013a). Der dominierende Abbaumechanismus von 3-MCPD-E, welcher wiederum zur Bildung von DAG oder TAG führen kann, stellt somit die Dechlorierung über eine nukleophile Substitution dar (Ermacora & Hrnčičik, 2014b).

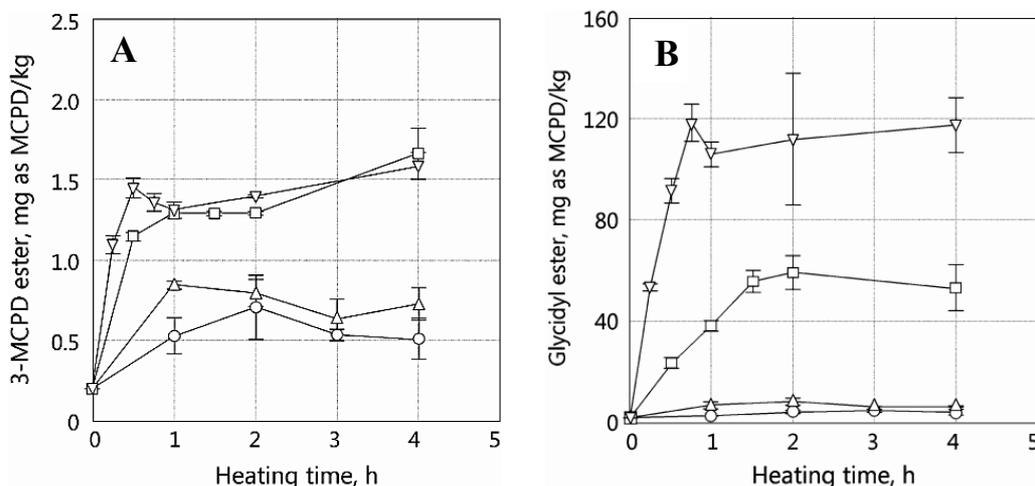


Abbildung 9: Einstellung von Plateaulevel für 3-MCPD-E-Gehalte (A) und G-E-Gehalte (B) in einem Modellversuch bei Temperaturen von 180 °C (Kreise), 200 °C (Dreiecke), 220 °C (Rechtecke) und 240 °C (Diamanten) (Shimizu et al. 2013a).

Abgesehen von den vier möglichen Bildungswegen, können G-E auch durch den Abbau von MCPD gebildet werden. Velíšek et al. (2002) diskutierten den Abbau von MCPD und ihrer Enantiomere in alkalischem Milieu basierend auf Glycidol als Zwischenprodukt, welches zu Glycerol hydrolysieren kann. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass 3-MCPD ca. zehnmals stabiler als 2-MCPD ist, welches unter alkalischen Bedingungen sehr schnell abgebaut werden kann (Dolezal & Velíšek, 1994). Somit ist das Potential von 2-MCPD Glycidol zu bilden höher als für 3-MCPD. In leicht saurem und neutralem Milieu beinhaltet die

Dehydrochlorierung benachbarter Gruppen in den MCPD-E die Eliminierung eines Chloridanions, woraus die Bildung eines Carbokation-Zwischenproduktes resultiert. Dabei agiert die Hydroxylgruppe der MCPD-Monoester als ein Nukleophil, was zur Bildung eines protonierten Epoxids und schließlich zur Bildung eines G-E durch die Eliminierung des Protons führt. Umgekehrt findet die Abbaureaktion von MCPD-E vorzugsweise in alkalischem Milieu statt (Velíšek et al., 2002) (vgl. Kapitel 2.2.2).

2.3.2 Bildung von MCPD bei der Lebensmittelverarbeitung

Bei der Herstellung von HVP wird die Bildung von MCPD durch die Verwendung von Salzsäure begünstigt (Collier et al., 1991). HVP werden üblicherweise durch Behandlung von Getreide, einschließlich eiweißhaltiger Ölsaaten, mit Salzsäure bei hohen Temperaturen und Druck hergestellt. Die Salzsäure reagiert mit Lipiden wie zum Beispiel TAG und Phospholipiden und mit partiellen Acylglyceriden (MAG/DAG) und Glycerol, welches durch die saure Hydrolyse der TAG entsteht (Collier et al., 1991). Das Glycerol wird dabei durch die Salzsäure an der primären und/oder sekundären Hydroxylgruppe protoniert um Acyloxoniumionen zu bilden. An der primären Position kann sich Wasser abspalten, wobei sich aus den entstehenden Hydroxyl-Acyloxoniumkationen 3-MCPD bilden kann. An der sekundären Position der Hydroxylgruppe können sich Acyloxoniumionen bilden, wobei sich Wasser abspaltet und sich ein Carbokation bildet, welches wiederum mit Chloridionen zu 2-MCPD reagiert (Collier et al., 1991; Hamlet, Sadd & Gray, 2003, 2004).

Die Bildung von 2- und 3-MCPD aus Glycerol und Acylglyceriden steigt dabei mit zunehmender Salzkonzentration und erreicht ein Maximum bei einem Wassergehalt von ca. 15%. Dabei wird eine größere Menge aus TAG als aus Glycerol gebildet. In Abwesenheit des zugefügten Wassers, findet keine vorherige Hydrolyse der Acylgruppe statt, wobei das 3-MCPD durch direkte Substitution der Hydroxylgruppe des Glycerols mittels Chloridionen gebildet wird (Hamlet et al., 2003).

3-MCPD kann auch durch Verarbeitungs- und Kochvorgänge, wie Backen oder Grillen, unter Anwesenheit von Lipiden und NaCl entstehen (Crews et al., 2001; Hamlet et al., 2002). Die durch hohe Temperaturen ausgelöste Hydrolyse der TAGs führt zur Bildung von Glycerol, welches mit Chloriden zu 3-MCPD reagiert (Calta et al., 2004). Die 3-MCPD-Bildung ist zusätzlich abhängig von weiteren verschiedenen Faktoren, wie Wasser, NaCl und verschiedenen Lipiden (Calta et al., 2004; Hamlet, 2009; Reece et al., 2005). In Modellsystemen bestehend aus möglichen Präkursoren, wie Glycerol/Triolein/Lecithin sowie NaCl (3,47%), und einem Wasseranteil von 0-20% untersuchten Calta et al. (2004) den Einfluss des Wassers auf die Bildung von 3-MCPD beim Erhitzen auf 200 °C für 30 min. Die höchsten 3-MCPD-Gehalte wurden in Anwesenheit von Glycerol und Lecithin bei einem Wassergehalt von 13-17% identifiziert. Calta et al. (2004) beobachteten, dass zur 3-MCPD-Bildung in wasserfreien Modellsystemen eine direkte nukleophile Substitution der Hydroxylgruppen des Glycerols wahrscheinlicher stattfindet als eine nukleophilen Substitution von Acylgruppen, wie TAGs oder Phospholipiden. In wasserhaltigen Modellsystemen sind beide Reaktionswege gleich wahrscheinlich. Es wurde ebenso in Modellstudien gezeigt, dass die Bildung von 3-MCPD bei Temperaturen über 160 °C signifikant ansteigt (Calta et al., 2004; Hamlet et al., 2003; Reece et al., 2005). Zudem zeigte

der pH-Wert einen Einfluss auf die Bildung von 3-MCPD in Modellsystemen (FAO, WHO, 2007; Hamlet et al., 2003; Reece et al., 2005).

Auch in verarbeiteten Getreideprodukten wie Backwaren wurden 3-MCPD Gehalte identifiziert. Es wurde gezeigt, dass Vorgänge, wie Backen, Rösten oder Toasten, einen Einfluss auf die Bildung von 3-MCPD haben (Crews et al., 2001, 2003; Hamlet et al., 2002, 2003, 2004; Hamlet & Sadd, 2004). Freies Glycerol, welches durch die Aktivität von Hefeenzyme gebildet wird, erwies sich als ein wesentlicher Präkursor (Hamlet et al., 2003, 2004). Die gebildeten Gehalte an 2- und 3-MCPD stiegen exponentiell mit der Temperatur bis zu einem Temperaturmaximum (ca. 220 °C), welches beim Backen erreicht wird. Niedrige Feuchtegehalte (1% bis 15%) führten zu einer 2- und 3-MCPD-Bildung mit Gehalten an 20% 2-MCPD in Bezug auf 3-MCPD-Gehalte (Hamlet et al., 2003, 2014). Beim Rösten von Gerste bei > 170 °C während der Malzherstellung wurde ebenfalls eine Bildung von 3-MCPD (0,3-0,4 mg/kg) festgestellt. Es wurde angenommen, dass das 3-MCPD während des Brauprozesses aus dem Malz extrahiert wird. In den meisten untersuchten Bieren war jedoch kein Verdünnungseffekt feststellbar (Hamlet et al., 2002). Kaffeebohnen enthalten ähnliche Konzentrationen an Fett und Chlorid wie die Gerste, bilden jedoch unter ähnlichen Bedingungen beim Erhitzen kein 3-MCPD (Doležal et al., 2005).

In einigen Studien zeigte sich, dass die 3-MCPD-Gehalte während der haushaltstechnischen Zubereitung von Lebensmitteln zunehmen. Dieser Einfluss wurde hauptsächlich beim Toasten von Brot beobachtet (Breitling-Utzmann et al., 2003, 2005; Crews et al., 2001; Hamlet & Sadd, 2004). Der Anstieg der Gehalte an 3-MCPD in Brot war dabei deutlich in Vollkorn-Mehltypen (0,5 mg/kg) zu sehen (Breitling-Utzmann et al., 2003). Es wurde gezeigt, dass häusliches Grillen die 3-MCPD-Gehalte in Käse erhöht, wohingegen die Zubereitung in der Mikrowelle geringere Gehalte bewirkt (Crews et al., 2001). Das Braten oder Grillen von Käse in Zusammenhang mit Burgern aus Rind bewirkten geringere 3-MCPD-Gehalte (Crews et al., 2001).

Ein weiterer Bildungsmechanismus von 3-MCPD wurde bei der Herstellung von geräucherten Fleisch- und Fischerzeugnissen postuliert (Abbildung 10). Ausgehend von Cellulose, ein Hauptbestandteil des bei der Räucherung eingesetzten Holzes, entsteht durch dessen Pyrolyse Glucose (Spaltung von Sacchariden). Daraus bildet sich 3-Hydroxyaceton, welches dann in einer Keto-Enol-Tautomerie vorliegt. Durch elektrophile Addition von Chlorwasserstoff (HCl) an der Enol-Form kann sich 3-MCPD bilden. Lipide scheinen bei diesem Bildungsmechanismus also keine Rolle zu spielen (Kuntzer, 2006). Beim Räuchern von Würstchen bei 28 °C wurden sowohl im Rauch als auch im Produkt selbst hohe 3-MCPD-Gehalte gefunden. Im Holz selbst lagen die 3-MCPD unterhalb der Nachweisgrenze (Kuntzer, 2006). Beim Räuchern von Heringen wurde eine Abhängigkeit der 3-MCPD Gehalte von der Salzkonzentration in der Salzlake sowie von der Räucherdauer beobachtet (Reece et al., 2005).

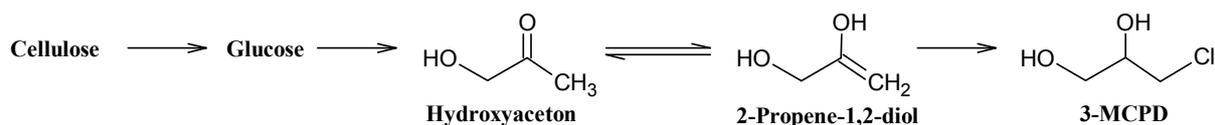


Abbildung 10: Postulierter Entstehungsmechanismus für 3-MCPD bei Räucherung (nach Kuntzer und Weißhaar, 2006).

3-MCPD kann in kleinen Mengen auch durch bestimmte Kohlenhydrate (Collier et al., 1991), den Süßstoff Sucralose (Rahn & Yaylayan, 2010) und durch Epichlorhydrin, welches bei der Herstellung von Papierbeschichtungen verwendet wird, gebildet werden (Bodén et al., 1997).

2.3.3 Bildung von MCPD-E und G-E bei der Lebensmittelverarbeitung

Zur Entstehung von MCPD-E und G-E bei raffinierten Speiseölen und -fetten trägt maßgeblich der Deodorisierungsschritt bei (Chung & Chan, 2012). Neben dieser Produktgruppe berichtete Kuhlmann (2011) und Jędrkiewicz et al. (2016) von hohen Gehalten an MCPD-E in Fischölen. Kuhlmann (2011) analysierte MCPD-E in kommerziell erhältlichen Nahrungsergänzungsmitteln, die Lachsöl enthielten. Die Gehalte von 3-MCPD-E lagen zwischen 0,7-13 mg/kg, während die 2-MCPD-E-Gehalte zwischen 0,1-2,3 mg/kg variierten. Jędrkiewicz et al. (2016) fanden 3-MCPD-E-Gehalte zwischen 1,5-5,5 mg/kg in Fischölproben. Die Proben enthielten drei gekapselte Fischöle und zwei nicht gekapselte Proben aus dem Einzelhandel in Polen. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Verpackungsformen identifiziert. Aufgrund der nicht repräsentativen Probenzahl (n = 5) lassen sich jedoch keine wissenschaftlich basierten Rückschlüsse ziehen. Jędrkiewicz et al. (2016) mutmaßten, dass die hohen Gehalte der Proben auf den Raffinationsschritt bei der Herstellung der kommerziellen Fischöle zurückzuführen sind. Zudem zeigte sich, dass die 2-MCPD-E-Gehalte um ca. 88% geringer waren als die 3-MCPD-E-Gehalte (Jędrkiewicz et al., 2016; Kuhlmann, 2011). Es wurde angenommen, dass die Spezifität des Rohmaterials für dieses spezielle 2- und 3-MCPD-Verhältnis verantwortlich ist. Das Fischmuskelgewebe enthält Enzyme (Peroxydasen, Lipoxydasen), die potentiell für die Lipidoxidation verantwortlich sind und zur Bildung eines Fehlgeschmacks im Fischöl führen können. Um diese Enzyme zu deaktivieren, werden den Fischölen üblicherweise Säuren (Essigsäure oder Phosphorsäure) zugefügt (Jędrkiewicz et al., 2016). Collier et al. (1991) zeigten, dass die Anwesenheit von Säuren das Verhältnis von 2- und 3-MCPD-E beeinflussen kann (Kapitel 2.3.1). Svejková et al. (2004) publizierten zum ersten Mal das Vorkommen von 3-MCPD-E in Lebensmitteln. Es wurden erhöhte Gehalte in verarbeiteten, hitzebehandelten Lebensmitteln pflanzlichen Ursprungs berichtet. Zudem wurden Gehalte an 3-MCPD-E in einem eingelegten Heringsprodukt gefunden (0,28 mg/kg).

Im Rahmen des EFSA-Reports (2016) wurden 225 Datensätze von frittierten, gebratenen oder gegrillten Fleisch- oder Fischprodukten sowie 387 Daten für geräucherte Fleisch- oder Fischprodukte publiziert. Eine Übersicht über die MCPD-E- und G-E-Gehalte in diesen Produkten kann Tabelle 1 entnommen werden.

Tabelle 1: MCPD-E- und G-E-Gehalte in verschiedenen Lebensmittelgruppen (EFSA, 2016).

Lebensmittelgruppe	N	Mittelwert (Min-Max) [µg/kg]		
		3-MCPD-E	2-MCPD-E	G-E
Frittierte, gebratene oder geröstete Fleisch- oder Fischprodukte	75	30 (26-34)	10 (7-14)	38 (38-39)
Frittierter oder gebratener Fisch	28	42 (42-43)	14 (13-15)	30
Frittiertes oder geröstetes Fleisch	47	23 (17-29)	8,38 (3-13)	43 (42-44)
Geräucherte Fleisch- oder Fischprodukte	129	21 (15-28)	6,2 (0,5-11)	17 (15-19)
Geräucherte Fleischprodukte	69	24 (17-30)	6,2 (0,2-12)	27 (24-30)
Geräucherter Fisch	60	18 (12-24)	6,1 (0,8-11)	5,8 (4,7-6,8)
Snacks und Kartoffelprodukte	70	130 (123-137)	79 (75-84)	58 (58-59)

In mehreren Publikationen wurde der Einfluss der raffinierten Speiseöle und -fette auf eine mögliche Absorption während der Verarbeitung verschiedener Lebensmittel untersucht (Arisseto et al., 2017; Dingel & Matissek, 2015; Hamlet et al., 2014). Hamlet et al. (2014) untersuchten verschiedene kommerzielle Produkte (Käse, Salami, Bratfett und Kartoffelerzeugnisse). Es stellte sich heraus, dass hohe G-E-Gehalte ausschließlich in den Kartoffelprodukten analysiert wurden, was darauf zurückzuführen sein könnte, dass diese Produkte, im Gegensatz zu den restlichen, in raffinierten Speisefetten frittiert wurden.

Dingel & Matissek (2015) untersuchten die endogene Bildung von 3-MCPD-E und G-E während des Frittierens von Kartoffelchips. Die Chips wurden für 100-200 s bei 160-180 °C frittiert. Die Erhitzungsdauer des Frittierfettes betrug 24 h. Die Analyse von 3-MCPD-E- und G-E-Gehalten in den Frittierfetten (High-oleic Sonnenblumenöl) sowie in den entsprechenden Kartoffelchips zeigte keine signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$). Es wurde geschlossen, dass die 3-MCPD-E- und G-E-Gehalte als ein carry-over Effekt der Frittierfette angesehen werden können. Eine endogene Bildung wurde ausgeschlossen (Dingel & Matissek, 2015). Diese Hypothese wurde von Arisseto et al. (2017) durch Frittierversuche für 2-9 min bei 160-190 °C mit unterschiedlichen Produkten (Bananen, Kartoffel, Maniok, Zwiebeln, Knoblauch, Maismehl, Reis und Fleisch) bestätigt.

2.3.3.1 Einfluss von Lipiden als Präkursoren

MCPD-E werden während des Desodorierungsschrittes bei der Speiseölraffination entweder ausgehend von partiellen Acylglyceriden (Freudenstein, Weking & Matthäus, 2013; Hamlet et al., 2011; Hrnčirik & Ermacora, 2010; Matthäus et al., 2012; Shimizu et al., 2012a; Svejková, Doležal, & Velíšek, 2006) oder von TAG (Destailats et al., 2012a) gebildet. Zelinková et al. (2006) regten an, dass es eine Korrelation zwischen dem Gehalt an DAG in raffinierten Speiseölen und ihren MCPD-E-Gehalten geben könnte. Diese Aussage basierte darauf, dass die höchsten MCPD-E-Gehalte in Ölen, die aus Fruchtmark hergestellt wurden, gefunden wurden. Der Gehalt an DAG in Ölen aus frischem Fruchtmark wie Olive oder Palm ist üblicherweise gering (1-3%) (Hamlet et al., 2011). In Ölen, deren Früchte von schlechter Qualität sind sowie in unsachgemäß gelagerten und transportierten Ölen, steigt die Menge an DAG insbesondere der 1,3-DAG. Der Gehalt an partiellen Acylglyceriden ist in Saatölen vergleichsweise geringer (Hamlet et al., 2011). Es wurde jedoch keine eindeutige Korrelation zwischen der Menge an MCPD-E, die im Öl gebildet wird und der Menge an partiellen Acylglyceriden identifiziert (Hrnčirik & van Duijn, 2011; Matthäus et al. 2011). Obwohl

DAGs prinzipiell mit Chlorid während der Raffination zur Bildung von 3-MCPD-E reagieren können, werden sie basierend auf diesen Erkenntnissen nicht als kritische Präkursoren angesehen (Dijkstra & Segers, 2007). Des Weiteren werden Lipide, wie MAGs, Phospholipide und Glykolipide, während des Entschleimungsprozesses der Öle, weitestgehend entfernt und sind deshalb in späteren Prozessen, wie der Desodorierung, nicht mehr vorhanden (Dijkstra & Segers, 2007). Schurz (2010) stellte die Hypothese auf, dass die Verwendung von Säure bei der Entschleimung die Bildung von 3-MCPD-E-Präkursoren aktivieren kann (Säurehydrolyse von TAG). Zulkurnain et al. (2012) und Haines et al. (2011) zeigten darüber hinaus, dass die Verwendung von Aktivkohle die Gehalte an 3-MCPD-E im Öl erhöht. Diese Erkenntnis erfordert weitere Untersuchungen (Zulkurnain et al., 2012).

Da der Anteil der TAG in raffinierten Ölen, die aus Nüssen, Samen oder dem Fruchtkern stammen, bis zu 90-95% ausmachen kann, wurden diese Lipide als die kritischsten Präkursoren für die Bildung von MCPD-E während der Desodorierung identifiziert (Destailats et al., 2012b). Destailats et al. (2012b) bestätigten diese Hypothese durch in-vitro Versuche. Unter kontrollierten Bedingungen konnte gezeigt werden, dass TAGs, anstelle von DAGs, bevorzugt mit Chlor reagieren, um 3-MCPD-E zu bilden (Destailats et al., 2012b).

G-E werden hauptsächlich durch DAGs während des Erhitzens von pflanzlichen Ölen bei Temperaturen über 200 °C gebildet (Craft et al., 2012b; Destailats et al., 2012a; Hrnčičík & van Duijn, 2011; Masukawa et al., 2010). Diese Bedingungen herrschen während der Desodorierung bei der chemischen oder physikalischen Raffination. Deshalb kommen G-E hauptsächlich in Palmöl vor, welches einen sehr hohen DAG-Gehalt von bis zu 4-12% aufweisen kann. Die Bildungsrate und der Gehalt steht in Beziehung zur Desodorierungszeit und Temperatur (Craft et al., 2012b; Hrnčičík & van Duijn, 2011; Weißhaar & Perz, 2010) und ist unabhängig von der Bildung der MCPD-E. G-E können auch durch die Dehydrierung von MAG gebildet werden (Craft et al., 2012b). Die Gehalte an MAG sind üblicherweise jedoch gering und werden während der Desodorierung reduziert, weshalb sie keine signifikanten Präkursoren für die G-E-Bildung darstellen (Craft et al., 2012b).

Der Umwandlungsmechanismus von G-E in DAGs oder MAGs in raffinierten Speiseölen unter hohen Temperaturen ist bisher nicht vollständig geklärt. Es zeigte sich, dass die Ringöffnung von G-E unter sauren Bedingungen stattfindet, was zur Bildung von DAGs und MAGs führen kann (Shimizu et al., 2012b). Demzufolge ist es möglich, dass sich G-E während des Erhitzens und unter Anwesenheit von freien Fettsäuren auch wieder zu DAGs und MAGs zurückbilden können. Diese Hypothese wurde noch nicht wissenschaftlich belegt. Rahn & Yaylayan (2011b) und Shimizu et al. (2013b) belegten jedoch, dass G-E als mögliche Präkursoren für 3-MCPD-Monoester dienen können, die in Speiseölen allerdings nur in geringen Mengen vorkommen (Zelinková et al., 2006) (vgl. Kapitel 2.3.1).

Freudenstein et al. (2013) zeigte anhand von Modellsystemen bestehend aus verschiedenen Präkursoren, wie DAGs, MAGs, Lecithin und Chlorverbindungen, bei einer Erhitzung auf 240 °C für zwei Stunden, dass sowohl die Gehalte an 3-MCPD-E als auch G-E durch erhöhte Konzentrationen an MAGs und DAGs anstiegen. Lecithin zeigte keinen Einfluss auf die Entstehung von MCPD-E und G-E.

Es lässt sich zusammenfassend darstellen, dass TAG als ausschlaggebende Präkursoren für die Bildung von MCPD-E angesehen werden (Destailats et al., 2012b), während die Bildung

von G-E hauptsächlich durch DAG-Präkursoren stattfindet (Craft et al., 2012b; Destailats et al., 2012a; Hrnčičík & van Duijn, 2011, Masukawa et al., 2010). Prinzipiell wurde auch ein Anstieg von sowohl 3-MCPD-E als auch G-E bei Vorhandensein erhöhter MAG-Konzentrationen beobachtet (Freudenstein et al., 2013).

2.3.3.2 Einfluss der Chloridquelle und -konzentration

Um die Chloridquelle zu identifizieren, die bei der Bildung von MCPD-E während der Raffination eine Rolle spielt, untersuchten Franke et al. (2009) und Hrnčičík & van Duijn (2011) die Gehalte an Chloridionen in Ölen vor und nach der Desodorierung. Die Chloridionen zeigten keinen Einfluss auf die Bildung der MCPD-E. Pudiel et al. (2011) untersuchten, ob das Chlorid, welches für die Bildung von MCPD-E verantwortlich ist, aus dem Wasserdampf, der während der Desodorierung angewandt wird, stammt. Auch dieser Ansatz war nicht erfolgreich. Nagy et al. (2011) konnten letztendlich zeigen, dass sowohl anorganische als auch organische Chlorverbindungen in partiell raffinierten Speiseölen vorkommen (ppm Bereich). Darüber hinaus wurde berichtet, dass der thermische Abbau natürlich vorkommender organischer Chlorverbindungen in rohem Palmöl mit der Bildung von 3-MCPD-Diestern, während der thermischen Behandlung des Öls korreliert. Des Weiteren konnten Nagy et al. (2011) zeigen, dass Chlorwasserstoff die bedeutendste Quelle der reaktiven Chloridquellen für die Bildung von MCPD-E darstellt. Zusätzlich zu den natürlichen chlorhaltigen Pflanzeninhaltsstoffen kann anorganisches Chlorid (Magnesium-, Calcium-, Eisen[II]- und Eisen[III]-chlorid) als Bestandteil von anorganischen Düngemitteln die Bildung von MCPD-E erhöhen (Nagy et al., 2011).

Freudenstein et al. (2013) untersuchten den Einfluss der Chloridquelle unter simulierten Desodorierungsbedingungen, bestehend aus verschiedenen Präkursoren (DAG/MAG) und Chlorverbindungen, wie tetra-n-butylammoniumchlorid (TBAC) und NaCl. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Gehalte an 3-MCPD-E unter Erhitzen der Modellsysteme auf 240 °C für zwei Stunden durch TBAC und NaCl anstiegen. Die Verwendung des lipophilen TBAC führte zusätzlich zur Bildung von G-E (Freudenstein et al., 2013). Die Bildung von G-E basiert vermutlich auf einer Umwandlungsreaktion von MCPD-E in G-E (Freudenstein et al., 2013) (vgl. Kapitel 2.3.1).

Aus den Untersuchungen von Nagy et al. (2011) und Freudenstein et al. (2013) kann geschlossen werden, dass Chlorid-Präkursoren, die zur Bildung von MCPD-E führen, sowohl in anorganischer als auch in organischer Form vorliegen und natürlicherweise im Speiseöl vorkommen können. Auch Destailats et al. (2012b) bestätigten die Bildung von MCPD-E in Modellsystemen aus TAG und organischen sowie anorganischen Chlorverbindungen unter thermischer Behandlung (> 200 °C). Als organische Chlorverbindung verwendeten Destailats et al. (2012b) Lindan (Hexachlorcyclohexan), welches als Pestizid angewandt wird. Als anorganische Verbindung wurde Eisen[II]-chlorid eingesetzt. Zudem bestätigten Destailats et al. (2012b), dass HCl, welches durch den Abbau der Chlorverbindungen durch thermische Behandlung freigesetzt wird, mit TAG zu 3-MCPD-E reagieren kann. Die zwei postulierten Bildungswege beinhalten eine radikalische Addition und eine nukleophile Substitution (vgl. Abbildung 8 a) und b)).

Nagy et al. (2011) bestimmten durch Analyse mittels hochauflösender Massenspektrometrie die charakteristische isotopische Masse der Chlorverbindungen in rohem Palmöl. Die

strukturelle Ähnlichkeit der organischen Chlorverbindungen mit den Lipiden und ihr Vorkommen im Fruchtfleisch von Palmöl führten zu der Annahme, dass diese endogen in den Palmölfrüchten gebildet werden können (Nagy et al., 2011).

Tiong et al. (2018) bestätigten, dass natürlich vorkommende organische Chlorverbindungen einen wesentlichen Beitrag zur Bildung von 3-MCPD-E leisten. Durch hochauflösende Massenspektrometrie konnten die organischen Chlorverbindungen in rohem Palmöl in unterschiedliche Klassen eingeteilt werden. Es wurde nachgewiesen, dass es sich bei den organischen Chlorverbindungen in Palmöl um Bestandteile von Wachsestern, Fettsäuren, Diacylglyceride und Sphingolipide handelt, die während der Reifung von Palmöl in dessen Fruchtfleisch endogen gebildet werden. Mittels Massenfragmentierung und Profilierung während einer Hochtemperatur-Vakuumdestillation (260 °C, 90 min) bestimmten Tiong et al. (2018) die jeweilige Abbaurate der Chlorverbindungen unter Freisetzung von HCl. Organische Chlorverbindungen in Form von Sphingolipiden zeigten dabei die größte Abbaurate. Eine kontrollierte Zugabe dieser Verbindungen wies darüber hinaus eine lineare Korrelation mit einer 3-MCPD-E-Bildung auf. Zusätzlich zu Palmöl konnten organische Chlorverbindungen auch in weiteren Speiseölen (Soja-, Raps-, Sonnenblumen-, Maiskeim-, Kokos- und Olivenöle) identifiziert werden (Tiong et al., 2018).

In Modellstudien zur haushaltstechnischen Verarbeitung von Speiseölen und -fetten untersuchten Li et al. (2016) den Einfluss verschiedener Konzentrationen an NaCl-Lösungen (0, 72, 144, 216, 288 und 360 g/L), von denen jeweils 1 mL mit 10 mL rohem Rapsöl vermischt wurden. Die Modellsysteme wurden jeweils für eine Stunde bei 160 °C erhitzt. Mit ansteigender Konzentration von 72-144 g/L NaCl, stiegen auch die 3-MCPD-E-Gehalte deutlich an. Ab 144 g/L wurden keine signifikanten Unterschiede mehr festgestellt. Li et al. (2016) vermuteten, dass dieser Effekt auf einer Sättigung beziehungsweise Unlösbarkeit von NaCl im Öl basiert. Freudenstein et al. (2013) bestätigten diesen Effekt. Zhou et al. (2014) untersuchten ebenfalls den Einfluss von NaCl auf die Bildung von 3-MCPD-E während des Frittierens. Dazu wurden 755-764 g Palmöl, 1-10 g NaCl und 135 g Wasser gemischt und in einer Fritteuse für vier Stunden auf 160 °C erhitzt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der variierenden NaCl-Konzentrationen festgestellt werden (Zhou et al., 2014). In einer Studie von Wong et al. (2017) zeigten die Gehalte in Kartoffelchips während des Frittierens bei 160-180 °C für 2,5 min einen Anstieg an 3-MCPD-E (signifikant) und G-E (nicht signifikant) in Abhängigkeit einer zunehmenden NaCl-Konzentration (1-5%).

2.3.3.3 Einfluss der Temperatur

Destailats et al. (2012b) zeigten in Modellsystemen aus der organischen Chlorverbindung Lindan (Hexachlorcyclohexan) und einem TAG (Triheptadecanoin), dass 3-MCPD-E unter einer Erhitzungsdauer von zwei Stunden bereits bei Temperaturen ab 180-200 °C gebildet werden können. Die Kinetik der 3-MCPD-E-Bildung unter diesen Bedingungen ist beispielhaft in Abbildung 11 dargestellt. Deshalb ist die Bildung von MCPD-E sowohl während der chemischen (> 240 °C), als auch der physikalischen Raffination (260-270 °C) möglich (Dijkstra & Segers, 2007).

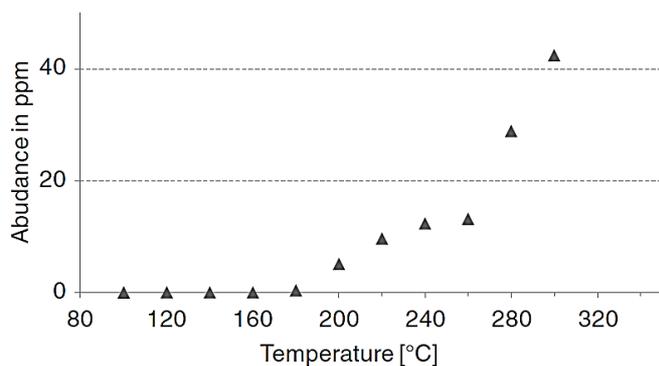


Abbildung 11: Gebildete 3-MCPD-E-Gehalte in Abhängigkeit einer Erhitzung des Modellsystems aus Triacylglyceriden (TAG) und Lindan für zwei Stunden bei 100-300 °C (Destailats et al., 2012b).

Es wird derzeit kontrovers diskutiert, ob der Gehalt an G-E durch thermische Abbaureaktionen bei bestimmten Temperaturen und Reaktionszeiten abnehmen kann. Pudiel et al. (2011) berichteten, dass der G-E-Gehalt in Speiseöl mit zunehmender Erhitzung > 250 °C zunahm. Bei Temperaturen bis zu 290 °C nahmen die G-E-Gehalte innerhalb von zwei Stunden ab, was schließlich als Folge der G-E-Zersetzung betrachtet wurde. G-E wurden in Deodorisierungs-Destillaten (Craft et al., 2012b) nachgewiesen und es wurde festgestellt, dass G-E-Gehalte innerhalb von zwei Stunden bei 200 °C in DAG-Modellsystemen abgenommen hatten (Cheng et al., 2017). Bei Desodorierungstemperaturen von 230 °C jedoch stiegen die G-E-Gehalte innerhalb von fünf Stunden an (Hrnčičík & van Duijn, 2011).

In einigen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen der Bildung von 3-MCPD-E und ansteigenden Temperaturen in Modellstudien bei der haushaltstechnischen Verarbeitung von Speiseölen und -fetten gezeigt (Calta et al., 2004; Hamlet et al., 2014). Li et al. (2016) untersuchten den Einfluss der Temperatur in einem Modellsystem aus rohem Rapsöl vermengt mit 1 mL NaCl-Lösung (216 g/L). Die Mischung wurde bei verschiedenen Temperaturen (70-250 °C) jeweils für eine Stunde erhitzt. Li et al. (2016) zeigten, dass die Gehalte an 3-MCPD-E ab einer Temperatur von 160-220 °C signifikant ($p < 0.05$) anstiegen, wobei die höchsten Gehalte bei 220 °C gebildet wurden. Im Temperaturbereich von 220 °C bis 250 °C sank der Gehalt an 3-MCPD-E signifikant. Diese Beobachtung wurde darauf zurückgeführt, dass die Bildung und Zersetzung von 3-MCPD-E während der thermischen Einwirkung vermutlich einer Gleichgewichtsreaktion unterliegen (vgl. Kapitel 2.3.1) (Crews et al., 2002; Ermacora & Hrnčičík, 2014b; Svejková et al., 2006). Wong et al. (2017) verglichen den Einfluss zweier unterschiedlicher Temperaturen (160 °C und 180 °C) beim Frittieren von Kartoffelchips in Palmöl. Während der gesamten Erhitzungsdauer von fünf Tagen wurden signifikant höhere 3-MCPD-E-Gehalte bei 180 °C im Vergleich zu 160 °C bestimmt. Interessanterweise waren die G-E-Gehalte bei einer Temperatur von 160 °C höher als bei 180 °C. Die Abnahme der G-E in Abhängigkeit von der Temperatur während des Frittierens von Kartoffelchips in Palmöl wurde durch eine Studie von Aniołowska & Kita (2016) bestätigt. Zhou et al. (2014) konnten unter simuliertem Frittieren eines Modellsystems aus Palmöl, 5% NaCl und 15% Wasser bei 100-200 °C für vier Stunden bereits nach zwei Stunden signifikant ($p < 0,05$) geringere 3-MCPD-E-Gehalte bei einer Temperatur von 200 °C im Vergleich zu 100 °C beobachten. Mogol et al. (2014) wiederum stellten beim Backen von Keksen einen Zusammenhang zwischen der Bildung von 2- und 3-MCPD-E und

ansteigenden Temperaturen fest. Bei der haushaltstechnischen Verarbeitung von Speiseölen wurde ein genereller Zusammenhang zwischen ansteigenden MCPD-E-Gehalten und Temperaturen ab 100 °C identifiziert (Calta et al., 2004; Hamlet et al., 2014, Li et al., 2016; Wong et al., 2017; Zhou et al., 2014). Es wurde postuliert, dass die Bildung und Zersetzung von 3-MCPD-E während einer thermischen Behandlung ab 220 °C vermutlich einer Gleichgewichtsreaktion unterliegen (Crews et al., 2002; Ermacora & Hrnčířík, 2014b; Li et al., 2016; Svejková et al., 2006). Ebenso wurde für die Bildungs- und Abbaurate von G-E das Vorhandensein einer Gleichgewichtsreaktion postuliert (Aniołowska & Kita, 2016; Hrnčířík & van Duijn, 2011; Wong et al., 2017).

2.3.3.4 Einfluss der Zeit

In Modellstudien untersuchten Li et al. (2016) den Einfluss der Erhitzungszeit bei der thermischen Behandlung von Speiseölen und -fetten. Hierfür wurden 10 mL rohes Rapsöl mit 1 mL NaCl-Lösung (216 g/L) vermischt und bei 160 °C für unterschiedliche Zeiten (0,25-24 h) erhitzt (Abbildung 12 a). Weiterhin wurde der Einfluss von unterschiedlichen Erhitzungsperioden untersucht. Dazu wurde dasselbe Modellsystem für insgesamt acht Stunden, zweimal vier Stunden, viermal zwei Stunden sowie achtmal einer Stunde erhitzt (Abbildung 12 b). Innerhalb einer Erhitzungsdauer von 24 h stiegen die Gehalte an 3-MCPD-E zuerst signifikant an und erreichten bei acht Stunden ihr Maximum. Bis zu 16 h Erhitzungsdauer nahmen die 3-MCPD-E-Gehalte signifikant ab und blieben danach konstant. Li et al. (2016) vermuteten, dass diese Beobachtung auf einer Gleichgewichtsreaktion der Bildung und Abnahme der 3-MCPD-E basiert (vgl. Kapitel 2.3.1). Beim Vergleich der unterschiedlichen Erhitzungsperioden, konnten signifikant höhere 3-MCPD-E-Gehalte bei einer kontinuierlichen Erhitzung von acht Stunden im Vergleich zu den intervallbasierten Erhitzungsperioden identifiziert werden (Li et al., 2016).

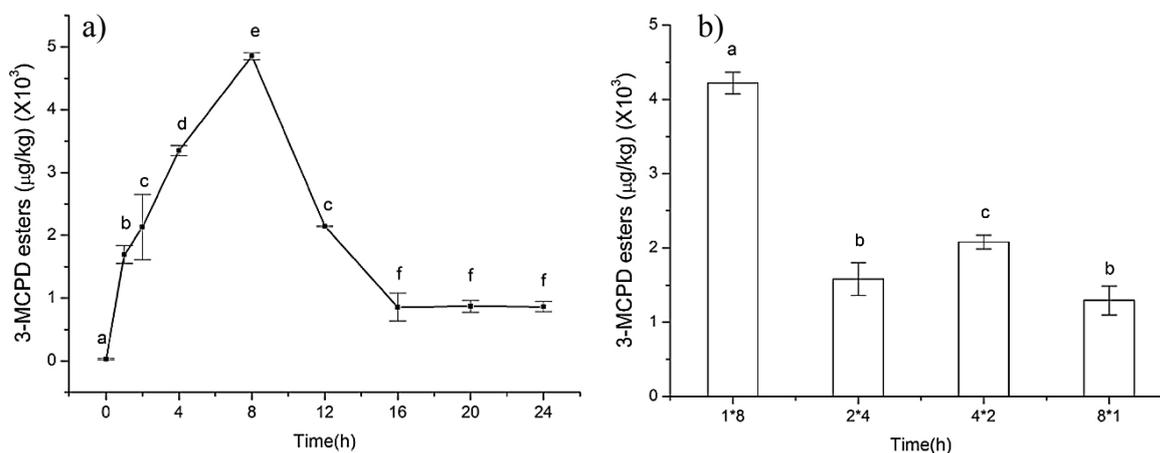


Abbildung 12: 3-MCPD-E-Gehalte in einem Modellsystem aus rohem Rapsöl und NaCl-Lösung. a) Bei einer Erhitzungsdauer von 0-24 h bei 160 °C. b) Bei unterschiedlichen Erhitzungsperioden. Symbole mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) (Li et al., 2016).

Zhou et al. (2014) untersuchten den Einfluss verschiedener Erhitzungszeiten beim Frittieren unter Verwendung eines Modellsystems aus Palmöl, 5% NaCl und 3% Wasser bei 160 °C für 1-30 h. Die 3-MCPD-E-Gehalte stiegen ebenfalls bis zu einem Maximum bei 16 h an, wonach

sie signifikant ($p < 0,05$) abnehmen. In einem weiteren Modellsystem, welches bei 140 °C für drei Stunden, ohne Zugabe von NaCl und Wasser, erhitzt wurde, zeigte sich eine Reduktion der 3-MCPD-E-Gehalte bereits nach zwei Stunden (Zhou et al., 2014).

In einer weiteren Studie von Wong et al. (2017) wurde der Einfluss der Erhitzungszeit beim Frittieren von Kartoffelchips in Palmöl untersucht. Bei unterschiedlichen Temperaturen von 160-180 °C und einer variierenden NaCl-Konzentration von 1-5% wurden die Kartoffelchips jeweils 2,5 min, fünfmal täglich, für insgesamt fünf Tage, ohne Wiederauffüllung des Frittierfettes erhitzt. Auch bei dieser Studie bestätigte sich die Abnahme der 3-MCPD-E in Abhängigkeit von der Erhitzungsdauer des Frittierfettes. Die G-E-Gehalte zeigten hingegen eine tendenzielle Zunahme (Wong et al., 2017). Aniołowska & Kita (2016) zeigten wiederum eine Abnahme der G-E während des Erhitzens von Palmöl bei 150-180 °C für 1-40 h.

In verschiedenen Modellstudien wurde somit nachgewiesen, dass sowohl MCPD-E- als auch G-E-Gehalte nach Erreichen einer bestimmten thermischen Behandlungszeit tendenziell abnehmen (Li et al., 2016, Wong et al., 2017; Zhou et al., 2014).

2.3.3.5 Einfluss des pH-Wertes

Li et al. (2016) untersuchten den Einfluss der Temperatur in einem Modellsystem aus nativem Rapsöl (10 mL) vermischt mit 0,5 mL NaCl-Lösung (216 g/L) und verwendeten dazu Pufferlösungen mit unterschiedlichem pH-Wert (pH 4-8). Das Modellsystem wurde bei 160 °C eine Stunde lang erhitzt. Es wurde beobachtet, dass die 3-MCPD-E-Gehalte mit steigendem pH-Wert signifikant ($p < 0,05$) abnahmen. Daraus wurde postuliert, dass die Bildung von 3-MCPD-E unter sauren Bedingungen begünstigt abläuft, da Chloridionen in saurem Milieu einen starken Ionisierungsgrad aufweisen.

Šmidrkal et al. (2011) und Ramli et al. (2015) zeigten ebenfalls, dass die Bildung von 3-MCPD-E vom pH-Wert abhängig ist. Velíšek et al. (2003) zeigten darüber hinaus, dass sowohl die Zugabe von Natriumcarbonat, als auch Hydrogencarbonat zu einer Mischung aus Glycerol und NaCl die Bildung von 3-MCPD minimiert. Die reduzierte Bildung von 3-MCPD-E und G-E durch Zugabe von Natriumcarbonat wurde auch von Freudenstein et al. (2013) bestätigt.

2.3.3.6 Einfluss des Wassergehaltes

Zhou et al. (2014) untersuchten den Einfluss des Wassergehalts beim Frittieren auf die Bildung von 3-MCPD-E unter Verwendung eines Modellsystems aus Palmöl (765-846 g), 45 g NaCl und 9-90 g Wasser bei 160 °C für vier Stunden. Es wurde eine erhöhte 3-MCPD-E-Bildung von über 130% bei einer Wasserzugabe von 90 g (2,95 mg/kg 3-MCPD-E) im Vergleich zu 63 g (1,26 mg/kg 3-MCPD-E) beobachtet.

2.4 Minimierungsstrategien

Die MCPD-, MCPD-E- sowie G-E-Gehalte in Lebensmitteln zu reduzieren, erfordert eine Modifizierung der Lebensmittel beziehungsweise deren Herstellungsprozesse. Aufgrund der Komplexität der Bildungsmechanismen der Prozesskontaminanten, erfordert diese Anpassung einen großen Versuchsumfang verschiedener Parameter und kann für unterschiedliche

Produktgruppen und Inhaltsstoffe sehr verschieden sein. Im Allgemeinen können sich sowohl MCPD- als auch MCPD-E- und G-E-Gehalte bei der Verarbeitung von verschiedenen Lebensmitteln abhängig von den Bedingungen stark ändern. Die Gehalte ergeben sich somit aus der Einstellung eines Gleichgewichtes zwischen Bildung und Zersetzung der Komponenten (vgl. Kapitel 2.3). Im Folgenden werden verschiedene bereits durchgeführte Minimierungsstrategien von MCPD, MCPD-E und G-E in verschiedenen Lebensmittelmatrizen diskutiert.

2.4.1 Minimierung von MCPD bei der Lebensmittelverarbeitung

Aufgrund der ersten Befunde hoher 3-MCPD-Gehalte in HVP begannen Lebensmittelhersteller im Jahre 1990 mit der Entwicklung von Minimierungsstrategien von 3-MCPD in kommerziellen, würzigen Produkten und Sojasaucen (Faesi & Nielsen, 1992; Hirsbrunner & Weymuth, 1992). Es wurden Schritte eingeleitet, die sowohl die Bildung reduzieren als auch die Gehalte senken, um innerhalb der Grenzen zu liegen, die in einigen Ländern gesetzlich festgelegt wurden. In der EU wurde ein Grenzwert von 20 µg/kg 3-MCPD für flüssiges HVP und Sojasauce basierend auf einem 40%-igen Trockengehalt festgelegt (Commission Regulation (EC) 1881/2006) (European Commission, 2006). Die FAO (2012) empfiehlt drei Methoden zur Reduktion von 3-MCPD in HVP. Diese beinhalten eine sorgfältige Überprüfung der sauren Hydrolyse, eine alkalische Behandlung nach der sauren Hydrolyse sowie die Substitution von HCl durch Schwefelsäure (H₂SO₄). Weiterhin kann ein enzymatischer Entfernungsprozess eingeführt werden. Die enzymatische Entfernung von 3-MCPD aus HVP wurde bisher jedoch nur in Pilotstudien nachgewiesen (Bornscheuer & Hesseler, 2010). Die Durchführung einer alkalischen Hydrolyse, anstatt einer sauren Hydrolyse der Pflanzenproteine, kann die Bildung von 3-MCPD komplett unterdrücken (Hall, 1946). Alkalisches HVP weist jedoch ein unakzeptables Geschmacksprofil und einen unausgeglichene Aminosäuregehalt im Vergleich zu saurem HVP auf (Reineccius, 2016).

Für weitere Lebensmittel, außer HVP, wurden bislang keine konkreten Minimierungsstrategien empfohlen. Im Allgemeinen können die folgenden Ansätze als grobe Richtlinien zur Implementierung von Minimierungsmaßnahmen angesehen werden (Reece et al., 2005; Stadler & Lineback, 2008):

- Erhöhung des pH-Wertes bei Lebensmitteln mit hohem Feuchtegehalt
- Verringerung der Prozesstemperatur und des Salzgehaltes in Lebensmitteln
- Vermeidung von Behandlungen, die ein Verhältnis von geringem Wasseranteil und hohen Temperaturen beinhalten
- Einschränkung der Bildung von Glycerol in Lebensmitteln während der Herstellung und Lagerung
- Vermeidung der Verwendung von partiellen Acylglyceriden und Zusatzstoffen
- Überprüfung der Reinheit von Lebensmittelzusätzen
- Inaktivierung von Lipasen / Esterasen
- Screening von Lebensmittelkontaktmaterialien auf 3-MCPD-Präkursoren

Generell sind kinetische Modelle, welche die verschiedenen Prozessparameter (pH-Wert, Feuchtigkeit, Zeit und Temperatur) berücksichtigen, für die Entwicklung von potentiellen

Minimierungsstrategien von 3-MCPD eine empfehlenswerte Vorgehensweise (Hamlet et al., 2003; Stadler & Lineback, 2008). Eine weitere Option zur Reduktion von 3-MCPD stellt der Einsatz von Mikroorganismen, Zellextrakten oder aufgereinigten Enzymen mit dehalogenierenden Eigenschaften dar. Diese Effekte wurden bislang jedoch nur in Modellstudien nachgewiesen (Stadler & Lineback, 2008).

Ein weiterer Ansatz, der von Reece et al. (2005) und Velíšek et al. (2003) vorgeschlagen wurde, basiert auf der Instabilität von 3-MCPD in neutralem oder alkalischem pH-Milieu. Es wurden verschiedene, gebräuchliche Lebensmittelzusatzstoffe getestet, um die Gehalte an 3-MCPD in unterschiedlichen Lebensmitteln zu untersuchen. Beim Vergleich zwischen Natriumcarbonat und Natriumhydrogencarbonat sowie den Reduktionsmitteln Glutathion und Cystein konnten als aktivster Inhibitor Natriumbicarbonat, gefolgt von Natriumcarbonat, Cystein und letztendlich Glutathion identifiziert werden (Reece et al., 2005). Bei der Reaktion von 3-MCPD mit Natriumcarbonat oder Natriumbicarbonat entsteht Glycerol als Endprodukt (Reece et al., 2005; Velíšek et al., 2003). Zudem wurde postuliert, dass die Reaktion von 3-MCPD mit L-Cystein in neutralem Milieu überwiegend zur Bildung von S-(2,3-Dihydroxypropyl)Cystein führt (Velíšek et al., 2003).

Bei Laborexperimenten mit frisch hergestellten Rauchkondensaten wurden bereits einige Minimierungsansätze durchgeführt (Kuntzer, 2006). Hierbei wurden Buchenholzspäne auf unterschiedliche Weise vorbehandelt. Durch Extraktion mit kochendem Wasser konnte eine Reduktion erzielt werden, was auf das Herauswaschen von Chloridionen aus den Pellets zurückgeführt wurde. Ein Zusatz von 20% Calciumcarbonat (CaCO_3) Pulver zu den Holzpellets führte ebenfalls zu einer signifikanten ($p < 0,05$) Abnahme an 3-MCPD im Rauch (Kuntzer, 2006).

2.4.2 Minimierung von MCPD-E und G-E in raffinierten Speiseölen und -fetten und verarbeiteten Lebensmitteln

Der Befund hoher Gehalte an MCPD-E und G-E in raffinierten Speiseölen und -fetten beschleunigte die Entwicklung von Minimierungsstrategien in dieser Produktklasse (Bornscheuer & Hesseler, 2010; Craft et al., 2013; Craft & Nagy, 2012; Matthäus et al., 2011; Strijowski, Heinz & Franke, 2011; Zulkurnain et al., 2013).

Darüber hinaus wurde im März 2018 ein Höchstwert von 1 mg/kg für G-E-Gehalte in Pflanzenölen und Fetten festgelegt (VO (EU) 2018/290) (European Commission, 2018). Weiterhin wurden Höchstwerte für Säuglingsanfangsnahrung und Folgenahrung festgelegt. Für Säuglingsanfangsnahrung wurde ein G-E-Gehalt von 0,075 mg/kg, für Folgenahrung entsprechend 0,010 mg/kg definiert.

Unter Betrachtung der gesamten Herstellungskette sollten drei essentielle Ansatzpunkte für die Minimierung von 3-MCPD-E und G-E in Speiseölen betrachtet werden: (1) Die Reduktion oder Vermeidung von Präkursoren im Rohmaterial vor der Verarbeitung sowie die Selektion von geeignetem Rohmaterial für die Herstellung von Speiseölen und -fetten (Matthäus et al., 2011); (2) Eine Veränderung der Ölextraktion – insbesondere bei der Raffination sowie die Einführung zusätzlicher Raffinationsvorgänge in den Prozess (Pudel et

al., 2011); (3) Die Reduktion von MCPD-Estern im raffiniertem Öl durch geeignete Absorptionsmaterialien oder enzymatische Behandlung (Strijowski et al., 2011).

Aufgrund der hohen 3-MCPD-E-Gehalte in Palmöl wurden diesbezüglich die meisten Studien durchgeführt. Zur Herstellung von Palmöl werden die geernteten, reifen Palmfrüchte in die Ölmühlen transportiert und anschließend sterilisiert. Danach folgt die Klärung, Trennung und Trocknung der rohen Palmölfraction (CPO). Die Optimierung der verschiedenen Prozessschritte hinsichtlich der Reduktion der MCPD-Prozesskontaminanten wurde in verschiedenen Publikationen veröffentlicht (Craft & Nagy, 2012; Craft et al., 2012a, 2012b). Eine Möglichkeit stellt das Waschen der Palmfrucht-Pulpa dar, um polare, chlorierte Präkursoren zu entfernen. Des Weiteren sollten die Früchte nicht beschädigt werden, da zerquetschte Früchte die Lipaseaktivität steigern können, wodurch ein erhöhter Gehalt an freien Fettsäuren und DAGs gebildet werden kann, der wiederum zur gesteigerten Bildung von MCPD-E führen kann (FEDIOL, *Federation for European Oil and Proteinmeal Industry*, 2015). Für den Sterilisationsschritt, der unter anderem dazu dient, Enzyme zu deaktivieren, wurde das Einstellen von Temperaturen unter 120 °C empfohlen.

Der erste Schritt der Raffination ist die Entschleimung durch Zufügen von Wasser oder Säure. Schurz (2010) stellte die Hypothese auf, dass die Verwendung von Carbonsäuren bei der Entschleimung die Bildung von 3-MCPD-E-Präkursoren begünstigen kann. Ramli et al. (2011) hingegen zeigten, dass die Bildung der 3-MCPD-E durch Behandlung mit geringen Mengen an Phosphorsäure abnimmt. Diese Beobachtung wurde durch Pudel et al. (2011) bestätigt, die zudem eine Reduktion der G-E-Gehalte feststellen konnten. Da keine Korrelation zwischen der Bildung von 3-MCPD-E oder G-E mit dem Gehalt an Phospholipiden festgestellt wurde, wurde die Reduktion anderer Präkursoren angenommen. Bei der Neutralisation im Rahmen der chemischen Raffination wurden zwei verschiedene Effekte identifiziert, die einen Einfluss auf die Bildung von 3-MCPD-E und G-E haben können. Nach der Neutralisation von rohem Palmöl mit Kaliumhydroxid zeigten die Proben 45% weniger 3-MCPD-E-Gehalt als unbehandelte Proben. Der Einsatz von Natronlauge zeigte eine Reduktion von 35% (Pudel et al., 2011). Freudenstein et al. (2013) zeigten, dass freie Fettsäuren, wie Laurin- und Palmitinsäure, nur einen geringen Effekt auf die 3-MCPD-E und G-E Bildung haben. Da Fettsäuren jedoch zur Reduzierung des pH-Wertes führen, wird empfohlen, grundsätzlich einen Neutralisationsschritt vor der Desodorierung vorzunehmen. Die Art der Bleicherde (neutral oder sauer) hat ebenfalls einen Einfluss auf den pH-Wert des Öles. Ramli et al. (2011) zeigten eine positive Korrelation zwischen dem 3-MCPD-E-Gehalt in raffinierten Ölen und dem Säuregrad der Bleicherde. Deshalb wird die Verwendung einer neutralen oder einer säureaktivierten Bleicherde zur Reduktion von 3-MCPD-E empfohlen. Pudel et al. (2011) zeigten allerdings eine tendenzielle Reduktion der 3-MCPD-E während des Bleichens. Zudem konnte der Effekt einer aktivierten Bleicherde nicht bestätigt werden (Pudel et al., 2011). Im Gegensatz dazu wurde beschrieben, dass eine höhere Konzentration an aktivierter Bleicherde die Fähigkeit habe, einige 3-MCPD-E-Präkursoren aus dem Öl zu absorbieren (Schurz, 2010). Letztere Erkenntnis wurde auch von Matthäus et al. (2011) bestätigt. Ein besonders wichtiger Faktor für die Bildung von 3-MCPD-E und G-E ist die Desodorierungstemperatur. Matthäus et al. (2011) zeigten, dass die G-E-Gehalte in Abhängigkeit von der Temperatur, insbesondere ab 240 °C, deutlich anstiegen. Die 3-MCPD-

E-Gehalte zeigten bei Temperaturen zwischen 180-270 °C und einer Erhitzungsdauer von ein bis vier Stunden jedoch keine Änderungen. Eine Temperaturreduktion führt somit zur Minimierung der G-E-Gehalte, nicht jedoch der 3-MCPD-E-Gehalte (Matthäus et al., 2011). Hrnčičík & van Duijn (2011) bestätigten diese Beobachtung. Da die Verringerung der Temperatur zwar zur Reduktion von G-E, gleichzeitig jedoch zu einer Veränderung der gewohnten sensorischen Eigenschaften führt (Craft et al., 2012b), wurde als Alternative eine schonende Desodorierungsmethode unter Anwendung einer zweistufigen Desodorierung vorgeschlagen (Matthäus, 2011). Diese Prozessführung findet bereits industrielle Anwendung, mit dem Ziel die Bildung von Transfettsäuren zu verhindern und die Gehalte an Vitamin E-aktiver Substanzen im Öl zu erhalten. (Gibon et al., 2009; Gibon, De Greyt & Kellens, 2007). Es konnte eine Reduktion von bis zu 80% 3-MCPD-E und G-E durch Anwendung der zweistufigen Desodorierung erzielt werden (Matthäus et al., 2011). Eine weitere Möglichkeit zur Temperaturreduktion bietet die Kurzwegdestillation (Unnithan, 1999). Durch eine schonende Entsäuerung bei niedrigen Temperaturen und kurzen Verweilzeiten werden die 3-MCPD-E- und G-E-Gehalte ebenfalls signifikant um 80-90% gesenkt.

Neben den Strategien zur Reduktion der 3-MCPD-E- und G-E-Gehalte in raffinierten Ölen durch Selektion der Rohware oder im Rahmen der Raffination, ist ein interessanter Ansatzpunkt zur Minimierung von MCPD-E und G-E auch das Zufügen von Additiven, die entweder die Bildung verhindern, die Kontaminanten zerstören oder mit anderen Präkursoren konkurrieren können (Matthäus et al., 2011).

Eine Vielzahl an Untersuchungen wurde zur Nachbehandlung von Ölen, insbesondere Frittierfetten, mit Adsorptionsmedien zur Abtrennung polarer Substanzen, wie DAGs oder oxidierten Substanzen, durchgeführt (Maskan & Bagci, 2003; McNeill, Kakuda & Kamel, 1986; Yates & Caldwell, 1992). Strijowski et al. (2011) untersuchten 15 verschiedene anorganische und organische Adsorptionsmaterialien auf ihre Eignung zur Reduktion von 3-MCPD-E und G-E im Öl. Es wurde gezeigt, dass der Zusatz verschiedener Hilfsstoffe, wie Diacetin, Zitronensäure, Oxalsäure oder eines Zeoliths, zu einer Reduktion der 3-MCPD-E und G-E im Öl führte. Dazu wurde Palmöl geschmolzen, in ein Becherglas gefüllt und auf einer Heizplatte auf 60-120 °C gebracht. Nach Zugabe des entsprechenden Adsorptionsmittels in variierenden Konzentrationen (1-10%) wurde die Mischung für 15-60 min weiter erhitzt und anschließend mittels Zentrifugation getrennt. Zwei der untersuchten Adsorptionsmittel (ein Magnesiumsilikat und ein Zeolith) zeigten eine signifikante Reduktion insbesondere der G-E-Gehalte aus Palmöl. Im Vergleich zu Magnesiumsilikat entfaltete das calcinierte Zeolith nach Zugabe zum Öl bei einer Temperatur von 60 °C sofort seine volle Reduktionswirkung (Strijowski et al., 2011).

Kyselka et al. (2018) veröffentlichten einen weiteren vielversprechenden Ansatz zur Reduktion von 3-MCPD-E und G-E in raffiniertem, gebleichtem und desodoriertem (RBD) Palmöl. Sie untersuchten den Einfluss einer Palmölhydrierung- und Nassfraktionierung auf die Minimierung von 3-MCPD-E und G-E. Die fraktionierten Palmstearine wiesen signifikant niedrigere Gehalte an 3-MCPD-E (71-74%) und G-E (21-26%) im Vergleich zum RBD Palmöl auf. In den Oleinfraktionen hingegen, wurden die höchsten MCPD-E, G-E und polare Komponenten identifiziert (Kyselka et al., 2018). Eine umfassende Hydrierung führte ebenfalls zu einer schnellen Abnahme von 3-MCPD-E (51-70%) in hoch schmelzenden

Palmöl-Komponenten. Die Reduktion von Glycidylestern (1-42%) scheint abhängig von der Art des Nickelkatalysators zu sein. Eine Kombination aus 22% Nickel und Raneynickel wurde hierbei als optimal angesehen. Die Abbauprodukte dieser katalytischen Reaktion waren nachweislich nicht karzinogene und nicht genotoxische Produkte, die unter Hydrogenolyse und Sauerstoffreduzierung gebildet wurden (Kyselka et al., 2018).

Ein Überblick über die Minimierungsstrategien, die auf unterschiedlichen Stufen des Raffinationsprozesses angewandt werden können, um MCPD-E und G-E zu reduzieren, wurde durch den FEDIOL veröffentlicht (FEDIOL, 2015). Bislang wurden nur für ausgewählte Lebensmittelgruppen, im Rahmen einzelner Studien, Minimierungsansätze für MCPD-E und G-E durchgeführt (Dingel & Matissek, 2015; Mogol et al., 2014).

Mogol et al. (2014) zeigten, dass die Reduktion des Salzgehaltes von Keksen die Gehalte an 3-MCPD-E und 2-MCPD-E bis zu 57,5% bzw. 85,5%, senkte. Wurden die Kekse ohne Salz gebacken, konnte gar keine Bildung von MCPD-E analysiert werden. Zudem wirkte sich eine Reduktion der Temperatur auf eine abnehmende Bildung der MCPD-E positiv aus. Darüber hinaus wurde auf die Auswahl und Verwendung eines geeigneten, MCPD-armen raffinierten Öles hingewiesen (Mogol et al., 2014). Auch Dingel & Matissek (2015) verwiesen auf die Wichtigkeit der Auswahl eines geeigneten Öles beim Frittieren von Kartoffelchips. Die Verwendung von hoch ölsäurehaltigem Sonnenblumenöl stellte sich als qualitativ hochwertig heraus und führte zu keiner Bildung von 3-MCPD-E oder G-E während des Frittierversuchs (Dingel & Matissek, 2015).

2.5 Herstellungsverfahren ausgewählter Fischerzeugnisse

2.5.1 Fischöle

Eine Gruppe mehrfach ungesättigter Fettsäuren (PUFA), sogenannte essentielle Fettsäuren, können vom menschlichen Körper nicht bzw. nur in geringen Mengen synthetisiert werden. Darunter fallen die sogenannten Omega-3 (n-3)- und Omega-6 (n-6)-Fettsäuren. Da n-3- und n-6-PUFA für die menschliche Gesundheit erforderlich sind, müssen sie über die Nahrung aufgenommen werden (JECFA, 2001). Insbesondere wurde die positive Auswirkung der n-3-PUFA auf kardiovaskuläre Risikofaktoren umfassend untersucht (Eltweri et al., 2016; Endo & Ariat, 2016; MacLean et al., 2006; Psota, Gebauer & Kris-Etherton, 2006). Eine durchschnittliche Aufnahmemenge von 250-500 mg Eicosapentaensäure (EPA) und Docosapentaensäure (DHA) täglich zeigte eine deutliche Verringerung der Mortalität in Bezug auf koronare Herzkrankheiten (EFSA, 2011). Weiterhin wird eine Zufuhr an DHA während der Schwangerschaft und Stillzeit empfohlen (EFSA, 2011). Eine ausreichende Einnahme an DHA zeigte letztlich eine positive Wirkung auf das Erhalten der normalen Gehirn- und Sehfunktion (EFSA, 2011). Meeresorganismen (Fisch, Meeresfrüchte, Algen usw.), deren Versorgung aus marinem Phytoplankton als Primärproduzent von n-3-PUFA besteht, stellen die bedeutendste, natürliche Quelle für n-3-PUFA dar. In vergangenen Jahren wurde eine Menge an Studien über den marinen Lipidstoffwechsel veröffentlicht, welche in einem Review von Bergé & Barnathan (2005) zusammengefasst wurden. Bergé & Barnathan (2005) schlussfolgerten, dass PUFA in marinen Ölen üblicherweise in Form von TAG gefunden werden. Hohe Gehalte an EPA und DHA wurden in einigen Fischarten gefunden. Darunter fallen Sardinen, Makrelen, Heringe, Sardellen, Menhaden, Dorschleber und Lachs

(Khoomrung et al., 2014). Die Lipidfraktion von Süßwasserfischen enthält jedoch keine nennenswerten Gehalte an EPA oder DHA (Strobel, Jahreis & Kuhnt, 2012) und einige häufig verzehrten Fische, wie Alaska-Seelachs, Seelachs, Kabeljau oder Scholle, enthalten nur sehr wenig Fett (Souci, Fachmann & Kraut, 2008). Eine gute Möglichkeit die Zufuhr von DHA und EPA zu erhöhen, sind eingekapselte Fischöle oder n-3-PUFA-Konzentrate, die aus Fischölen hergestellt werden (Ward & Singh, 2005). In der Vergangenheit wurden jedoch oftmals erhebliche Unterschiede zwischen den auf Verpackungen angegebenen und analysierten EPA- und DHA-Gehalten festgestellt (Albert et al., 2015; Lise Halvorsen & Blumhoff, 2011; Opperman, Marais & Benadé, 2011).

Im Allgemeinen beinhaltet der traditionelle Herstellungsprozess von Fischöl zwei Stufen: Die Ölextraktion aus dem Rohmaterial und die Raffination. Neuere Verfahren zur Herstellung von Omega-3-Konzentraten für die Nahrungsmittel- und pharmazeutische Industrie stellen enzymatische Methoden oder die Verwendung von überkritischen Fluiden dar (Rubio-Rodríguez et al., 2010). Der gebräuchlichste industrielle Herstellungsprozess von rohem Fischöl aus frischem Fisch ist das Nasspressen (FAO, 1986). Der Prozess enthält zur Abtrennung des Öls aus den Mizellen verschiedene Schritte, wie zum Beispiel das Kochen des Rohmaterials, Pressen und Filtrieren oder Zentrifugieren. Traditionell werden zur Fischölgewinnung meist Fischarten mit einem hohen Fettanteil, wie Hering, Thunfisch, Sardine und Lachs, genutzt. Bei geringeren Fettgehalten ist die Anwendung schwieriger (Rubio-Rodríguez et al., 2009).

Eine alternative Methode zur Fischölextraktion stellt die Verwendung von überkritischen Fluiden dar. Diese haben eine gute Lösungskraft und günstige Transporteigenschaften (Brunner, 2013). Darüber hinaus kann die Lösungsfähigkeit, abhängig von Druck und Temperatur, darauf abgestimmt werden, gezielt verschiedene Substanzen aus dem Rohmaterial heraus zu lösen. Somit ist es möglich, das Fischöl zu fraktionieren und freie Fettsäuren zu separieren, um Konzentrate mit verschiedenen Komponenten in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht oder Sättigungsgrad zu erhalten (Rubio-Rodríguez et al., 2010). Die Verwendung von Enzymen in industriellen Prozessen stellt ebenfalls eine Alternative zur traditionellen Extraktionsmethode dar, da sie sowohl einfacher als auch günstiger und energiesparend ist.

Das aus der Extraktion gewonnene Fischöl ist eine Mischung aus verschiedenen Komponenten, wie freie Fettsäuren, Glyceride, Phospholipide, Sterine, Farbstoffe, Tocopherole, aber auch toxischer Substanzen, wie Dioxine oder polychlorierte Biphenyle (PCB) (Cheryan, 1998). Für den Erhalt genusstauglicher Öle ist es deshalb notwendig, einen anschließenden Raffinationsprozess durchzuführen, bei dem nicht-TAGs, Farbstoffe, Geruchsstoffe und toxische Komponenten entfernt werden (Young, 1986). Die konventionelle industrielle Raffination wird üblicherweise mittels chemischer Methoden durchgeführt, die verschiedene Schritte, wie die Entschleimung zur Abtrennung der Phospholipide, die Neutralisation oder Entsäuerung zur Entfernung der freien Fettsäuren und die Absenkung des Säuregrades, enthalten.

Des Weiteren dienen das Bleichen zur Absorption von Farbstoffen oder Kontaminanten und die Desodorierung zur Entfernung von Geruchsstoffen. Eine physikalische Adsorption wurde zur Entfernung von Dioxinen und PCBs aus der Fisch-Matrix vorgeschlagen (Maes et al., 2005; Oterhals et al., 2007). Den wichtigsten Schritt der Raffination stellt die Desodorierung

dar, die unter anderem dazu dient, den Fischgeruch zu reduzieren, der die sensorische Qualität und Anwendung in der Lebensmittelindustrie einschränkt.

Die traditionelle Desodorierung basiert auf der Anwendung hoher Temperaturen ($> 200\text{ °C}$) (Čmolík & Pokorný, 2000). Diese Methode wird auch bei Fischöl angewandt, obwohl in verschiedenen Studien gezeigt wurde, dass Temperaturen $> 180\text{ °C}$ zu einer Reduktion der PUFA-Gehalte führen (Fournier et al., 2006).

Es existieren alternative Methoden basierend auf Vakuum-Dampfdestillation bei niedrigen Temperaturen (Chang, Bao & Pelura, 1989). Kawashima, Iwakiri, and Honda (2006) publizierten eine Kombination einer Extraktion mit überkritischem Kohlendioxid (CO_2) mit einer Adsorption mittels Aktivkohle, um PCBs, polychlorierte Dibenzo-*p*-Dioxine (PCDDs) und polychlorierte Dibenzo-Furane (PCDFs) aus dem Fischöl zu entfernen. Dabei dienten die Verwendung von überkritischem CO_2 zur Reduktion der PCBs und die Adsorption zur Entfernung der PCDD/Fs. Ortiz et al. (2011) zeigten jedoch, dass sowohl nicht-Dioxinähnliche PCBs (ndl-PCBs) als auch Dioxine und dioxin-ähnliche PCBs (dl-PCBs) dieselben Nischen der Aktivkohlefilter passieren. Dioxine und dl-PCBs scheinen dabei eine höhere Affinität bezüglich der Aktivkohle aufzuweisen, als ndl-PCBs, wodurch insbesondere deren Konzentration in den Fischölen besonderer Überwachung bei der Produktion bedarf (Ortiz et al., 2011). Sie zeigten weiterhin, dass die Entfernung von PCBs (dl-PCBs) effizienter verläuft, als von Mono-ortho-PCBs, was vermutlich auf deren planaren Strukturen basiert, die die Retention auf der Oberfläche der Adsorbentien einfacher macht. Es wurden geringere Adsorptionsraten für Mono-ortho-PCBs identifiziert (Ortiz et al., 2011). Ähnliche Ergebnisse wurden in weiteren Studien erörtert (Carvajal & Mozuraityte, 2016; Fernández-González et al., 2014; Kawashima et al., 2006; Maes et al., 2005; Oterhals et al., 2007).

Die Umweltkontaminanten Dibenzo-*p*-Dioxine, Dibenzo-Furane, dl-PCBs sowie ndl-PCBs, sind toxisch, bioakkumulierend und stellen ein Risiko für die menschliche Gesundheit dar (JECFA, 2001). Für Öle, aus Meerestieren (Fischkörper, Fischleber und andere Öle von marinen Organismen, die für den menschlichen Verzehr bestimmt sind) gelten nach der Verordnung der Europäischen Kommission (EC) Nr. 1259/2011 Höchstwerte für die Summe der Dioxine (WHO-PCDD/F-TEQ) von $1,75\text{ pg/g}$ Fett für Lebensmittel und 5 pg/g Fett für die Futtermittelproduktion (European Commission, 2011). Die Höchstwerte für die Summe der Dioxine und dl-PCB (WHO-PCDD/F-PCB-TEQ) liegen nach der Verordnung der Europäischen Kommission (EC) Nr. 277/2012 bei $6,0\text{ pg/g}$ Fett für Lebensmittel und 20 pg/g Fett für Futtermittel. Für ndl-PCBs, liegen die Höchstwerte bei 200 ng/g Fett für Lebensmittel und 175 ng/g Fett für Futtermittel (European Commission, 2011, 2012).

Obwohl Fischöl eine natürliche Quelle für Omega-3 ist, benötigt die Verwendung als wirksame Verbindung in der Pharmakologie oder funktioneller Inhaltsstoff in der Nahrungsmittelindustrie eine Aufkonzentrierung in eine chemische Form, die sich im menschlichen Organismus einfach verstoffwechselt und gleichzeitig eine gute oxidative Stabilität aufweist. Es konnte nachgewiesen werden, dass Omega-3-Fettsäuren durch den menschlichen Organismus besser aufgenommen werden können, wenn sie als Acylglyceride vorliegen, anstelle von Estern (Lawson & Hughes, 1988). Zudem wurde in einigen Studien gezeigt, dass die Veresterung an der sn-2-Position eine stabilere Verbindung darstellt, als eine

Esterbindung an der sn-1,3-Position (Wijesundera et al., 2008). Mishra, Temelli & Oraikul (1993) und Shahidi & Wanasundara (1998) publizierten eine Zusammenfassung über die traditionellen Aufreinigungsmethoden von Omega-3-Fettsäuren. Diese umfassten die Chromatographie, Vakuum- oder Molekulardestillation, Kristallation bei niedriger Temperatur, Harnstoff-Komplexbildung sowie neue Prozesse inklusive der überkritischen Flüssigkeitsfraktionierung (Gironi & Maschietti, 2006; Perretti et al., 2007) oder enzymatische Methoden (Lin, Chen & Chang, 2006; Liu et al., 2006).

Zur zusätzlichen Verhinderung der Oxidation von Fischölen, werden häufig Antioxidationsmitteln eingesetzt (Jacobsen et al., 2008; Kamal-Eldin & Yanishlieva, 2002). Eine weitere, übliche Methode ist die Verkapselung oder Mikroverkapselung mit einem geeigneten Beschichtungsmaterial (Matsuno & Adachi, 1993).

2.5.2 Panierte und vorgebratene, tiefgekühlte Fischerzeugnisse

Fisch und Meeresfrüchte sind aufgrund ihrer Nährstoffzusammensetzung bedeutende Nahrungsmittel mit einer weltweit wachsenden Nachfrage. Die EU ist, hinsichtlich der Wertschöpfung, die weltweit führende Handelsmacht für Fisch- und Aquakulturerzeugnisse. Im Jahre 2015 betrug das Handelsvolumen 49,3 Milliarden Euro und 13,8 Millionen Tonnen, wobei die in die Europäische Union (EU) importierten Produkte überwiegend tiefgefrorene- oder Fertiggerichte beinhalten. Es ist ein positiver Trend im Fischkonsum in allen Mitgliedsstaaten der EU zu verzeichnen, wobei der Pro-Kopf-Konsum an Fischerzeugnissen in der EU im Jahre 2014 bei 25,5 kg lag (EUMOFA, *Europäische Marktbeobachtungsstelle für Fischerei- und Aquakulturerzeugnisse*, 2016). In Deutschland sind die umsatzstärksten Produkte Konserven und Marinaden mit 28%, gefolgt von Tiefkühlerzeugnissen mit 26%. Im Tiefkühlsektor ist eine steigende Nachfrage nach Convenience-Produkten, wie panierten und vorgebratenen, tiefgekühlten Fischprodukten, zu verzeichnen. Die Gesamtproduktionsmenge an tiefgekühlten Fischerzeugnissen in Deutschland im Jahre 2015 betrug 208 667 Tonnen Produktgewicht (FIZ, *Fischinformationszentrum*, 2016). Zu dieser Gruppe zählen unter anderem auch Fischstäbchen.

Laut den *Leitsätzen für Fische, Krebs- und Weichtiere und Erzeugnissen daraus* (2011) gehören Fischstäbchen zu den tiefgefrorenen Fischerzeugnissen (BMEL, *Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft*, 2011). Sie werden definiert als „panierte Fischportionen länglicher Form in der Regel vorgebraten, aus Blöcken von praktisch grätenfreien Fischfilets (auch in Streifen geschnitten und/oder mit bis zu 25 Prozent zerkleinertem Fischfleisch), bei denen das Gewicht des einzelnen panierten Fischstäbchens in der Regel 30 g beträgt“ (BMEL, 2011, S. 8). Zudem ist geregelt, dass der eingewogene Fischanteil mindestens 65 Prozent der Nennfüllmenge betragen muss (BMEL, 2011). Fischstäbchen sollen „praktisch grätenfrei“ sein, (BMEL, 2011, S. 6). Neben den *Leitsätzen für Fische, Krebs- und Weichtiere und Erzeugnisse daraus* gelten für die Herstellung von Fischstäbchen auch die Anforderungen des Codex Alimentarius (*Standard for quick frozen fish sticks (fish fingers), fish portions and fish fillets – breaded or in batter, Codex Stan 166 – 1989*). Dieser Standard besagt, dass ein Fischstäbchen inklusive der Panade nicht weniger als 20 g aber nicht mehr als 50 g wiegen darf und so geformt sein muss, dass die Länge nicht kleiner sein darf als dreimal das Maß der Breite. Zudem wird vorgeschrieben, dass kein Fischstäbchen unter 10 mm dick sein darf

(Codex Alimentarius Commission, 1989). In diesem Standard wird zudem festgehalten, dass nicht mehr als eine Gräte pro kg Fischfilet enthalten sein darf. Eine solche Gräte ist ≥ 10 mm lang oder ≥ 1 mm dick. Gräten, die ≤ 5 mm lang sind, werden nicht weiter betrachtet, solange ihr Durchmesser weniger als 2 mm beträgt oder diese leicht mit dem Fingernagel zerteilt werden können und folglich keine direkte Gesundheitsgefährdung darstellen (Codex Alimentarius Commission, 1989).

Abbildung 13 stellt den Herstellungsablauf von panierten Fischstäbchen aus Filet dar (Tülsner & Koch, 2010). Für Fileterzeugnisse werden vorrangig Magerfische, wie Alaska Seelachs (*Gadus chalcogrammus*), Kabeljau (*Gadus morhua*) und Seehecht (*Merluccius* spp.) verwendet (Schubring, 1999; Krüger, 2004). Laut des Standards des Codex Alimentarius können dafür Fischfilets, gehacktes Fischfilet oder Mischungen von Spezies verwendet werden, die generell essbar sein müssen (Codex Alimentarius Commission, 1989). Die Filets werden in der Regel direkt auf See oder erst an Land durch den sogenannten „V-Schnitt“ von den Stehgräten befreit, welches sowohl maschinell als auch von Hand durchgeführt werden kann. Die daraus erhaltenen Fischfilets werden anschließend zu sogenannten Mix-Blöcken tiefgefroren (Codex Alimentarius Commission, 1989). Die Tiefkühl-Blöcke weisen ein ungefähres Gewicht von 7,5 kg auf (Schubring, 1999). Wichtig sind dabei eine exakte Maßgenauigkeit, ebene Flächen und saubere Kanten, damit beim späteren Schneideprozess möglichst wenige Verschnitte zu verzeichnen sind (Tülsner & Koch, 2010). Im Folgenden werden die Blöcke in die Form der für Fischstäbchen üblichen Maße zersägt und paniert (Schubring, 1999). In der Regel durchlaufen die Fischstäbchen im kontinuierlichen Prozessstrom auf Förderbändern zunächst die Nasspanierung, eine mit flüssigem Mehlteig gefüllte Wanne. Die Nasspanierung bewirkt, dass das im nächsten Schritt hinzugefügte Paniermehl, die sogenannte Trockenpanade, optimaler an der Oberfläche des Fischstäbchens haften kann (Krüger, 2004). Die Panierung wird auch beschrieben als die „Umhüllung des Guts mit trockenen Mischungen oder dickflüssigen Zubereitungen aus verschiedenen Mehlen und Mahlprodukten, mit Semmelmehlen, Milch- und Eiprodukten und weiteren Zusätzen“ (Tülsner & Koch 2010). Während die Trockenpanade hauptsächlich aus Paniermehl und Gewürzen besteht, ist die Nasspanade überwiegend aus den Zutaten Mehl, Stärke und Wasser zusammengesetzt. Zusätzlich wird der Panade üblicherweise ein nicht unerheblicher Salzgehalt von etwa 3,5-4% NaCl zugefügt. Das Zufügen von weiteren erlaubten Zusätzen ist im Codex Alimentarius geregelt (Codex Alimentarius Commission, 1989). Im nächsten Schritt werden die Fischstäbchen bei Temperaturen zwischen 160-200 °C vorfrittiert (Tülsner & Koch, 2010). Die Ausbildung von charakteristischen Produkteigenschaften ist vor allem auf die Produktoberfläche beschränkt. Die Fischstäbchen werden somit beim Vor-Frittieren nur erwärmt, ohne dass der Kern auftaut (Krüger, 2004). Dazu genügen Frittierzeiten von bis zu einer Minute (Tülsner & Koch, 2010). Beim Frittieren und Braten entsteht die Ausbildung gewünschter, charakteristischer sensorischer Eigenschaften. Wichtigste Zielgrößen eines solchen Prozesses sind die Ausprägung des typischen Bratgeschmacks, eine gewünschte Braunfärbung sowie eine Krustenbildung (Tülsner & Koch, 2010). Zuletzt werden die Fischstäbchen erneut eingefroren, um die Haltbarkeit bis zum Verzehr zu gewährleisten und für den weiteren Vertrieb in Faltschachteln verpackt. Vor dem Verzehr müssen die Fischstäbchen durch Braten oder anderweitiges Erhitzen, wie Frittieren, endgültig zubereitet werden. Erst dann sind sie für den Konsumenten genießbar (Tülsner & Koch, 2010).

Der Frittierprozess stellt somit den Kernprozess dar bei der Herstellung von panierten und vorgebratenen, tiefgekühlten Fischerzeugnissen, wie Fischstäbchen. Im Allgemeinen wird Frittieren als das Eintauchen und Kochen von Lebensmitteln in heißem Öl verstanden. Dies beinhaltet den Hitze- und Massentransfer sowie komplexe Wechselwirkungen zwischen dem Lebensmittel und dem Frittiermedium (Saguy, 1995). Die Ölaufnahme der Lebensmittel wird dabei durch eine Vielzahl an Faktoren beeinflusst, deren Einfluss in verschiedenen Studien diskutiert und publiziert wurde (Saguy & Dana, 2003). Pérez-Palacios et al. (2014) zeigten, dass panierte und tiefgekühlte Fischerzeugnisse während des Frittierens bei 180 °C für vier Minuten eine Fettaufnahme von etwa 2% und einen Wasserverlust von ca. 7% aufwiesen.

Eine Vielzahl an Reaktionen bewirkt ebenso ein Spektrum an physikalischen und chemischen Veränderungen während des Frittierens im Öl. Unter Anwesenheit von Sauerstoff, Feuchtigkeit und hohen Temperaturen, können hauptsächlich drei verschiedene, das Öl beeinträchtigende Reaktionen auftreten. Diese beinhalten die Hydrolyse, die Oxidation sowie eine thermische Veränderung mittels Sauerstoff und Hitze (Nawar, 2000).

Die Hydrolyse zeigt ebenfalls eine negative Auswirkung auf die Ölqualität (Fujisaki et al., 2001). Wasser dient gleichzeitig jedoch auch als physikalische Barriere für das Öl und verhindert den Kontakt zwischen Sauerstoff und Öl. Ebenso hat die Ölaufnahme der Lebensmittel sowohl einen positiven als auch negativen Effekt. Sie bewirkt eine simultane Absorption und Entfernung der Abbauprodukte, wie polare Komponenten, Polymere, freie Fettsäuren oder TAG. Da der Fettverderb jedoch nicht umkehrbar ist, muss es Ziel der Prozessführung sein, den optimalen Status für die Herstellung des Lebensmittels möglichst lange zu erhalten (DGF, 2011). Die Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaften veröffentlichte deshalb 2011 eine Empfehlung für optimales Frittieren. Dabei wird unter anderem beschrieben, dass die Temperatur der Fritteuse 180 °C nicht überschreiten und vorzugsweise im Bereich zwischen 160-175 °C liegen sollte. Zudem soll auf das Salzen und Würzen der Lebensmittel vor dem Frittieren verzichtet werden, da Salz die Migration des Wassers aus dem Inneren an die Oberfläche des Lebensmittels und damit die Bildung von toxischen Substanzen fördert. Darüber hinaus wird empfohlen, das Frittiermedium nach dem Frittierprozess durch einen temperaturbeständigen Filter zu filtrieren, um Lebensmittelrückstände, wie angekohlte Brösel, zu entfernen, da ihre Anwesenheit zu einer Beschleunigung des Fettverderbs führen kann. Durch die Filtration wird das Frittiermedium zwar nicht regeneriert, der Fettverderb kann sich jedoch um ca. 10-20% verzögern (DGF, 2011). Zur Beurteilung der Fettqualität wurde von der DGF überdies ein Richtwert für den Anteil an polaren Komponenten (total polar material, TPM) von 24% festgelegt. Dieser Wert soll den Punkt festlegen, an dem das Frittieröl nicht weiter verwendet werden sollte (DGF, 2013).

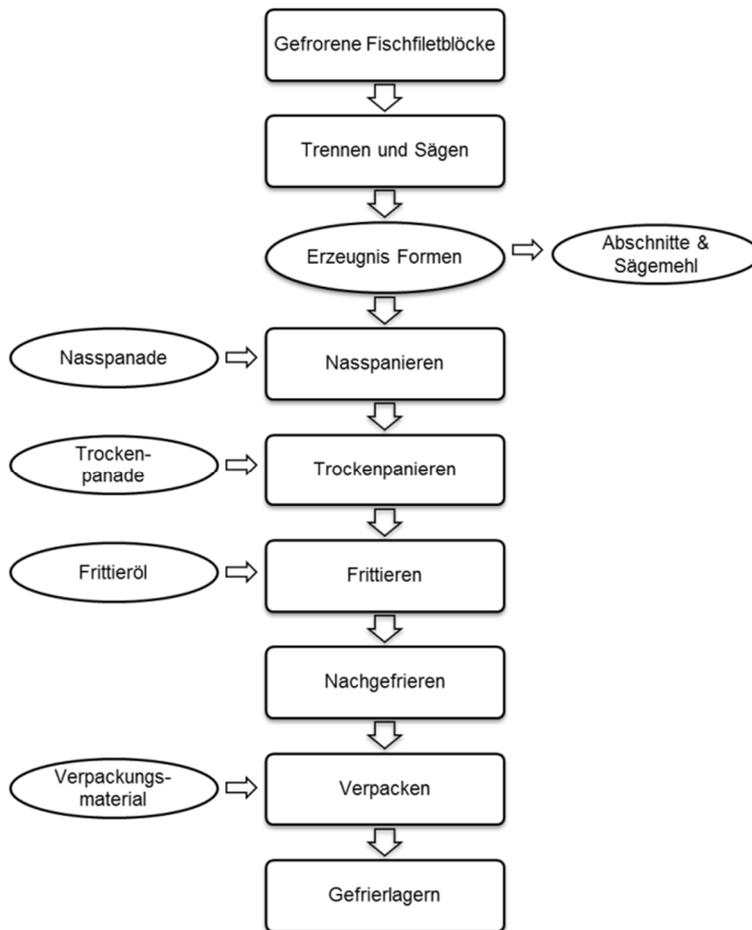


Abbildung 13: Herstellungsablauf von panierten und vorgebratenen, tiefgekühlten Fischerzeugnissen aus Filet (nach Tülsner & Koch, 2010).

2.5.3 Bratfischerzeugnisse

Mit 28% sind Fischdauerkonserven und Marinaden in Deutschland die umsatzstärksten Fischerzeugnisse (FIZ, 2016). Zu dieser Produktklasse gehören unter anderem eingelegte Bratheringsprodukte in Essigaufguss, Saucen oder Öl. Im Jahre 2015 importierte Deutschland 38 777 Tonnen konservierte und marinierte Heringsprodukte aus anderen europäischen Ländern.

Laut den *Leitsätzen für Fische, Krebs- und Weichtiere und Erzeugnissen daraus* (2011), gehören Bratfischerzeugnisse zu der Gruppe der „Brat- und Backfischwaren“. Nach Definition der Leitsätze sind Bratfischwaren „Erzeugnisse aus verschiedenen vorbereiteten Frischfischen, tiefgefrorenen Fischen oder Fischteilen, die mit oder ohne Panierung durch Braten, Backen, Rösten oder Grillen gar gemacht sind. Sie werden auch mit oder ohne pflanzliche Beigaben in Essigaufguss, Soßen (Saucen, Tunken) oder Öl eingelegt, auch unter Verwendung von Konservierungsstoffen“. Unter den Begriffen „Braten und Backen“ werden dabei Verfahren verstanden, „bei denen unter Anwendung von hohen Temperaturen eine Wärmeübertragung durch heißes Speiseöl oder -fett erfolgt. Braten und Backen sind hier gleichbedeutende Begriffe“, während unter „Panieren“ „das Umhüllen des Fisches mit einer Schicht aus Bratmehl, Paniermehl, Semmelbrösel oder Teigen daraus vor dem Braten“, verstanden wird (BMEL, 2011, S. 24).

In den Leitsätzen wird zudem beschrieben, dass das Abtropfgewicht des Fischerzeugnisses, bezogen auf die Nennfüllmenge, bei Erzeugnissen in Aufguss sowie bei Erzeugnissen in Soßen mindestens 50% betragen soll. Für den pH-Wert wird für Erzeugnisse in Essigaufguss ein Wert kleiner als 4,8 vorgeschrieben (BMEL, 2011).

Zur Verlängerung ihrer Haltbarkeit können Bratfischerzeugnisse pasteurisiert werden, wodurch ihre Haltbarkeit „ohne besondere Kühllhaltung für mindestens 6 Monate durch ausreichende Hitzebehandlung bei Temperaturen unter 100 °C, jedoch mindestens 60 °C Kerntemperatur, in gasdicht verschlossenen Packungen oder Behältnissen erreicht wird“. Als Dauerkonserven wird die Haltbarkeit sogar „ohne besondere Kühllhaltung für mindestens ein Jahr durch ausreichende Hitzebehandlung in gasdicht verschlossenen Packungen oder Behältnissen erreicht“, wobei das Gewicht des gebratenen Herings mindestens 60% betragen muss (BMEL, 2011).

Der allgemeine Herstellungsprozess der Bratfischerzeugnisse ist Abbildung 14 zu entnehmen. Für die Herstellung dieser Produkte werden die Fischfilets oder ganze, ausgenommene Fische nach ihrer Anlieferung zuerst gewaschen, leicht vorgesalzen, paniert und anschließend frittiert. Rohstoffe können grundsätzlich alle See- und Süßwasserfische und Teile davon sein, welche in geeigneter Qualität zur Verfügung stehen (Tülsner & Koch, 2010). In Deutschland jedoch werden überwiegend Heringe und in geringerem Ausmaß Makrelen oder Aale verwendet (Tülsner & Koch, 2010). Die üblichen Frittierzeiten variieren zwischen 3-15 min bei einer entsprechenden Temperaturspanne von 140-200 °C. Die unterschiedlichen Behandlungsparameter führen letztendlich zu verschiedenen Produktstabilitäten (Tülsner & Koch, 2010). Nach dem Frittieren werden die Produkte auf etwa 20 °C abgekühlt, bevor der Aufguss zugegeben wird. Erfolgt die Zugabe des Aufgusses, solange die Erzeugnisse noch zu warm sind, tritt das Bratfett leicht aus und bildet eine unansehnliche Schicht (Tülsner & Koch, 2010).

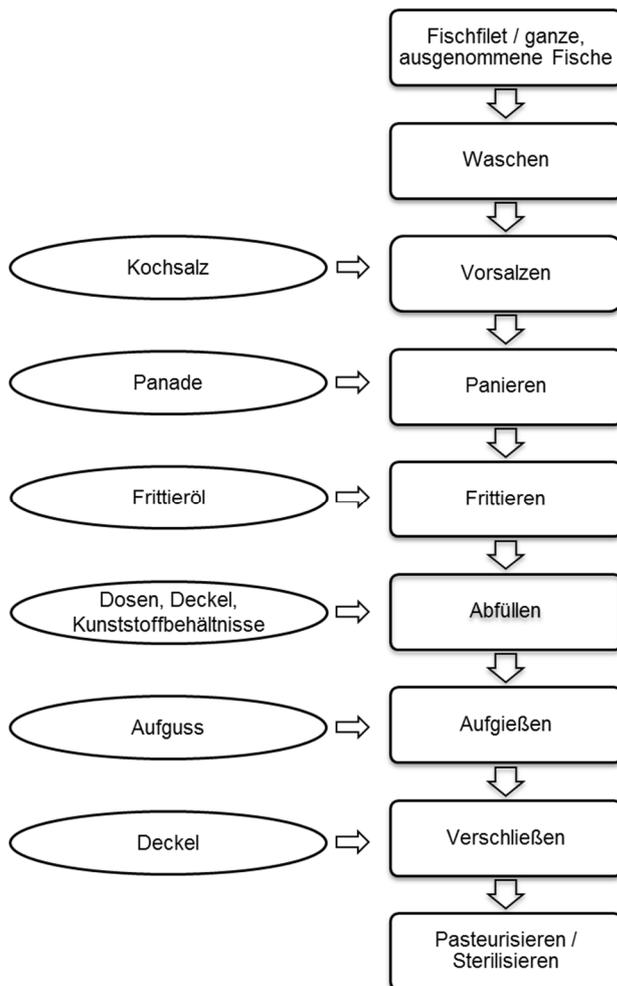


Abbildung 14: Herstellungsablauf von Bratfischerzeugnissen (nach Tülsner & Koch, 2010).

Der Aufguss wird zubereitet aus „unterschiedlichen Mengen Trinkwasser und wahlweise Essig, Säuerungsmitteln“ (BMEL, 2011, S. 4) und üblicherweise ca. 3% Salz und anderen würzenden Stoffen. Die Salzkonzentration im Endprodukt liegt bei etwa 1,5-2%. Nach dem Aufgießen wird die wässrige Lösung teilweise vom frittierten Erzeugnis aufgenommen. Der aufgenommene Anteil ist von verschiedenen Einflussgrößen des Rohstoffes und des Frittierprozesses abhängig und wird im Allgemeinen mit 20% angesetzt. In betrieblichen Vorschriften sollte hierfür eine entsprechende Differenz zwischen Fisch Ein- und Auswaage kalkuliert werden. Zusätzlich steigt der pH-Wert der Essiglösung durch die Zugabe des Aufgusses. Der Essig wird von Aminogruppen des Fischgewebes gebunden und durch die wässrige Phase des Fisches verdünnt. Ein höherer Fischanteil bedingt somit einen höher konzentrierten Aufguss. Es wird grundsätzlich davon ausgegangen, dass der Aufgussansatz etwa die doppelte Essigkonzentration haben muss, wie sie im Enderzeugnis gewünscht wird. Das Salz wird im Fisch nicht gebunden, ein Konzentrationsausgleich zwischen Aufguss und wässriger Phase des Fisches findet jedoch statt. Dieser Ausgleich ist nach etwa 24 h abgeschlossen. Bei pasteurisierten Produkten erfolgt eine anschließende Hitzebehandlung bei 95-98 °C für etwa 45 min in einem Autoklav (Tülsner & Koch, 2010).

Der Kernprozess dieser Produktklasse liegt, ebenso wie bei den panierten und vorgebratenen, tiefgekühlten Fischerzeugnissen, beim Frittieren. Dieser wurde bereits unter Kapitel 2.5.2 ausführlich beschrieben.

2.5.4 Geräucherte Fischerzeugnisse

Das Räuchern von Lebensmitteln, wie Fleisch, Fisch oder Käse, ist ein sehr altes Zubereitungs- und Konservierungsverfahren. Dabei wird das Trocknen über dem Feuer mit dem Einlegen in Salz kombiniert. Bis in jüngste Zeit erfolgte das Räuchern rein empirisch. Durch verschiedene örtliche und traditionelle Gegebenheiten sowie bestimmte Verbrauchergewohnheiten unterschieden sich die Vorstellungen des Aromas und der Färbung von Räucherwaren stark. Die heute gewöhnlichen Räucherverfahren dienen dabei in erster Linie der Aromatisierung und Farbgebung und nur nachrangig der Konservierung. Die Herstellung traditioneller Räucherprodukte geschieht überwiegend auf handwerklicher Basis in Klein- und Mittelbetrieben. Im Weltmaßstab werden ca. 2% der Fische als Räuchererzeugnisse verzehrt (Tülsner & Koch, 2010). Im Jahre 2015 stellten Fischverarbeitungsbetriebe in Deutschland rund 27 590 Tonnen Räucherwaren her. Ein Anstieg von ca. 3 900 t im Vergleich zum vorigen Jahr konnte verzeichnet werden. Mit 13% Pro-Kopf-Verbrauch liegen die Räucherfischerzeugnisse im Mittelfeld der Produktbereiche nach den Konserven und Marinaden (28%), Tiefkühlfisch (26%) und Krebs- und Weichtieren (14%) (FIZ, 2016).

Laut den Leitsätzen für Fische, Krebs- und Weichtiere und Erzeugnisse daraus (2011), sind Räucherfische „Erzeugnisse aus verschiedenen vorbereiteten Frischfischen, tiefgefrorenen Fischen oder Fischteilen, gesalzenen oder zur Geschmacksgebung vorgesalzenen Fischen oder Fischteilen, die durch Behandeln mit frisch entwickeltem Rauch hergestellt werden“ (BMEL, 2011). Es wird dabei hauptsächlich unterschieden zwischen heißgeräucherten Fischen, die „mit frisch entwickeltem Rauch und einer Wärmeeinwirkung von über 60 °C im Kern“ hergestellt werden sowie kaltgeräucherten Fischen, welche „mit frisch entwickeltem Rauch bei einer Wärmeeinwirkung von unter 30 °C“ (BMEL, 2011, S. 12) hergestellt werden. Die Dauer der Räucherung ist dabei stark von der Art und Größe der Fische abhängig und beträgt für die Heißräucherung üblicherweise 1,5-3 h, wohingegen bei der Kalträucherung ca. 6-12 h bis zu mehreren Tagen möglich sind (Tülsner & Koch, 2010). Abbildung 16 zeigt den generellen Herstellungsprozess von heiß- und kaltgeräucherten Fischerzeugnissen im Überblick.

In Deutschland werden hauptsächlich Heringe, Sprotten, Makrelen, Aale, Forellen, Lachs, Dornhai oder Stör heißgeräuchert. Einer Kalträucherung werden üblicherweise Lachsfilets unterzogen, die dann oft in Scheiben geschnitten im Handel angeboten werden (BMEL, 2011).

Für die zum Räuchern eingesetzten Holzarten ist gemäß §3 Abs. 3 der Aromenverordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 2. Mai 2006 (BGBl. I S. 1127), die zuletzt durch Artikel 3 der Verordnung vom 5. Juli 2017 (BGBl. I S. 2272) geändert worden ist, in Deutschland die Verwendung von „naturbelassenen Hölzern und Zweigen, Heidekraut und Nadelholzsamenständen, auch unter Mitverwendung von Gewürzen“ zugelassen. Es werden Räucherspäne in unterschiedlichen Spangrößen verwendet, wobei hauptsächlich Laubhölzer, wie Buche, Erle, Weide, Birke, Ahorn und Hickory, eingesetzt werden. Auch Holz von Obstbäumen (Apfel oder Kirsche) ist geeignet. Oftmals werden verschiedene Holzsorten gemischt. Holz, das für das Räuchern verwendet wird, bezeichnet man als Smok (Tülsner & Koch, 2010).

Es liegt allein in der Tradition begründet, dass Räucherrauch zur Behandlung von Lebensmitteln verwendet werden darf. Rauch enthält mehrere tausend Stoffe, von denen etwa 350 identifiziert wurden. 90% der Substanzen kommen in der Partikelphase und 10% in der Gasphase vor. Die Vielfalt dieser Komponenten ist für das angestrebte Aroma von Bedeutung. Der Holzrauch ist jedoch nachgewiesen belastet mit toxischen und gesundheitlich bedenklichen Stoffen, welche in Abhängigkeit der Raucherzeugung gebildet werden können. Besondere Bedeutung haben dabei krebserregende Stoffe, wie polyzyklische, aromatische Kohlenwasserstoffe (PAKs), für welche Benzo(a)pyren als Markersubstanz im Räucherrauch genutzt wird (Tülsner & Koch, 2010). In der VO (EG) Nr. 1881/2006 wurde ein Höchstgehalt von 5 µg/kg Benzo(a)pyren im Muskelfleisch von geräucherten Fischen und Fischereierzeugnissen wurde festgelegt (European Commission, 2006).

Die traditionelle Räucherung erfolgt hauptsächlich durch das Einbringen von Glimmrauch in die Räucherammer. Das verwendete Smokmaterial wird unter gedrosselter Luftzufuhr verglimmt, wobei offene Flammen vermieden werden. Die Verglimmung erfolgt entweder durch ein entfachtetes Feuer, einen elektrischen Heizdraht oder durch eine Gasflamme. Die thermische Zersetzung der Holzbestandteile findet in der Glüh- oder Glimmzone statt. Sie beginnt bei etwa 150 °C mit der Freisetzung von CO₂ und Kohlenstoffmonoxid (CO). Bei 250-280 °C setzen die Verschwelung und Rauchbildung durch die Bildung von Kohlenwasserstoffen ein. In Abhängigkeit der ansteigenden Temperaturen werden Hemicellulosen (200-260 °C), Cellulosen (260-310 °C) und Lignin (380-500 °C) pyrolysiert. Die komplexe Folgereaktion der entstandenen Rauchkomponenten untereinander und in Anwesenheit von Sauerstoff führt zu den gewünschten Eigenschaften des Räucherrauches, weshalb der Temperatur eine zentrale Bedeutung zukommt. Angaben zu den günstigsten Temperaturen zur Erzielung einer optimalen Rauchqualität variieren stark zwischen < 500 bis < 650 °C. Da bei höheren Temperaturen die Bildung von krebserregenden Stoffen sowie der Anteil unerwünschter niedermolekularer Säuren und Aldehyde steigen, besteht das Hauptproblem der Raucherzeugung in der Regulierung der Glimmtemperatur. Eine weitere Möglichkeit der Raucherzeugung stellen Reibrauchgeneratoren dar. Dabei werden Holzstücke gegen einen Rotor gepresst, wobei durch Reibungsenergie Rauch entsteht. Es werden Temperaturen von etwa 400 °C erzeugt (Tülsner & Koch, 2010). Darüber hinaus wird durch Verwendung spezieller Rauchkondensate (Flüssigrauch) versucht, den Räucherprozess zu ersetzen und somit eine beschleunigte Verarbeitung zu erreichen. In Deutschland und Skandinavien ist dies nur mit besonderer Genehmigung zugelassen, während in anderen EU-Ländern ein Grenzwert von 3,4-Benz(a)pyren nicht überschritten werden darf. Der Flüssigrauch kann durch Sprühen als Aerosol, Tauchen oder Berieseln zugeführt werden. Zur Herstellung des Flüssigrauches wird das Holz unter Ausschluss von Sauerstoff erhitzt. Die Rauchgase kondensieren in Lösungsmitteln, wie Wasser, pflanzlichen Ölen, Ethanol oder Ester. Der Flüssigrauch beinhaltet somit über 400 chemische Verbindungen, wobei die Zusammensetzung vom Lösungsmittel, der Holzart und der Pyrolysetemperatur abhängig ist. Bei wässrigen Präparaten scheidet sich bei der Lagerung teerige Phase inklusive der PAKs ab, wodurch ein niedrigerer Gehalt an PAKs zu verzeichnen ist (Tülsner & Koch, 2010).

Eine moderne Räucheranlage setzt sich aus der Räucherammer und dem Rauchgenerator zusammen. In der Kammer findet schließlich die eigentliche Rauchbehandlung, Trocknung

und thermische Garung statt. Sie wird nach ihrer Bauform in Kammer-, Turm- und Tunnelanlagen unterschieden, wobei die programmierbare, diskontinuierliche Kammeranlage, die sich sowohl für Heiß- als auch Kalträucherung eignet, die üblichste Form darstellt. Als Urtyp der Räucheranlagen werden die sogenannten Altonaer Ofen bezeichnet, bei denen das Holzfeuer und die Verschwelung in der Kammer gleichzeitig der Erzeugung von Rauch und Wärme dienen (Abbildung 15). Die Steuerung erfolgt dabei durch Zufuhr von Holzspänen und insbesondere Luft über Klappen. Altonaer Ofen sind für Heiß- und Kalträucherung geeignet (Tülsner & Koch, 2010).

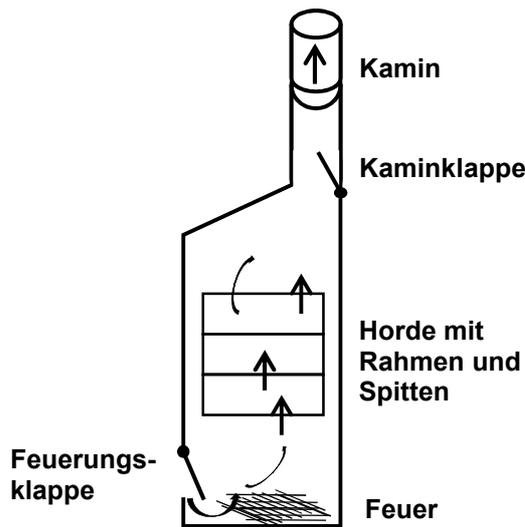


Abbildung 15: Funktionsschema des Altonaer Ofen.

Zur Rauchaufnahme wird das Räuchergut traditionell auf Eisenstäbe (Spitten) aufgezogen, die in Rahmen oder Hordenwagen eingehängt in die Räucher- kammer eingebracht werden. Durch Kondensation erfolgt das Eindringen der Rauchsubstanzen in das Produkt. Die Aufnahme im Produkt ist dabei abhängig von der Rauchkonzentration, der Dauer der Behandlung sowie der (trocken, feucht, salzig, fettig) Oberflächenbeschaffenheit des Räuchergutes (Tülsner & Koch, 2010).

Das Kalträuchern erfolgt in Intervallen bzw. Räucherphasen, wobei eine Phase bei der traditionellen Räucherung durch die Zeit der Verglimmung von definiertem Smokmaterial vorgegeben wird. Die Heißräucherung entspricht im Prinzip einer thermischen Garung der Rohstoffe. Bei der vorgeschriebenen Mindesttemperatur von 60 °C im Fischkern, denaturiert das Eiweiß nahezu vollständig. Im ersten Schritt werden die Fische bei 30-60 °C getrocknet, was zur Festigung ihrer Oberfläche (Haut) dient. Es folgt die Garung der Fische bei 70-110 °C Ofentemperatur. Der eigentliche Räuchervorgang beginnt bei Erreichen der Kerntemperatur von 60 °C. Die anschließende Rauchaufnahme bei gleichbleibender Temperatur bewirkt die Farb- und Aromagebung. Nach Kühlung bei < 20 °C und Festigung des Gewebes kann die Verpackung der Räucherfischerzeugnisse erfolgen (Tülsner & Koch, 2010).

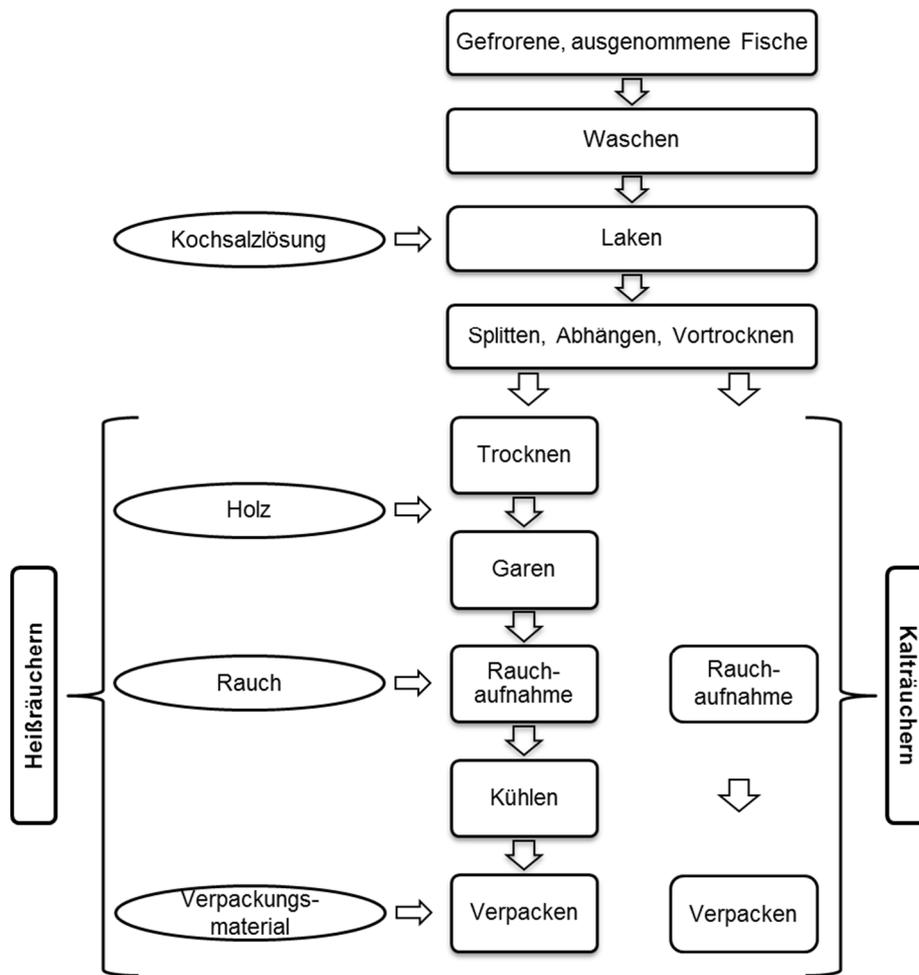


Abbildung 16: Herstellungsablauf von Räucherfischerzeugnissen (nach Tülsner & Koch, 2010).

Fische werden meist zunächst gesalzen, bevor sie einer Kalt- oder Heißräucherung unterzogen werden. Das Salz dient nicht nur als Geschmacksgeber, sondern auch der Festigung des Fischfleisches und der Senkung des Anfangskeimgehaltes. Es sind unterschiedliche Salzungsarten, wie Trocken- und Nasssalzung, im Einsatz. Die Salzgehalte der Laken, das Verhältnis von Fisch zu Lake sowie die Dauer und Temperatur der Salzung sind in den Betrieben sehr unterschiedlich. Die Salzgehalte der Produkte sind aber nicht nur von der Salzungsart abhängig, sondern auch von der Größe und dem Fettgehalt der Fische, Verwendung frischer oder aufgetauter Rohware und dem Status der Totenstarre. Durch den Wasserverlust während des Trocknens und Räucherns kommt es zu einer weiteren Erhöhung der Salzgehalte im Fischfleisch (Manthey-Karl, 2008). Kaltgeräucherte Fische auf dem deutschen Markt enthalten mehr Salz als heißgeräucherte Erzeugnisse (Manthey-Karl, 2008). Typische Salzgehalte für heißgeräucherte Forellen liegen bei 1-2%, bei kaltgeräuchertem Lachs bei ca. 3% (Manthey-Karl, 2008; Oehlenschläger, 2007).

3 Zielsetzung

2- und 3-MCPD, Glycidol und deren Fettsäureester sind Prozesskontaminanten, welche durch die Zusammenwirkung von hohen Temperaturen, einer Chloridquelle und Speiseölen und -fetten in Lebensmitteln gebildet werden können. Die detaillierten Bildungswege und Einflussfaktoren auf die Prozesskontaminanten bei der Verarbeitung von Lebensmitteln wurden noch nicht vollständig aufgeklärt und die Ergebnisse sind teilweise widersprüchlich. Minimierungsansätze für MCPD, MCPD-E und G-E bei der Lebensmittelverarbeitung wurden nur im Rahmen einzelner Studien veröffentlicht. Des Weiteren wurden offiziell von der AOCS validierte Methoden bislang nur für die Bestimmung von MCPD-E und G-E in raffinierten Speiseölen und -fetten, nicht aber für weitere Lebensmittel anerkannt. Für Fischerzeugnisse wurden nur wenige Studien zur Bildung von MCPD, MCPD-E und G-E veröffentlicht. Es wurde jedoch sowohl die Bildung von MCPD in Räucherrauch als auch die Bildung von MCPD-E und G-E in (vor)-frittieren und gebratenen Produkten in der Literatur beschrieben. Räuchern, (Vor)-Frittieren und Braten können als Kernprozesse für die Herstellung einiger Fischerzeugnisse mit hohem Beliebtheitsgrad in Deutschland (z.B. Bratheringe oder Fischstäbchen) angesehen werden.

Das grundlegende Ziel dieser Arbeit bestand deshalb darin, die Einflussfaktoren zur Bildung von MCPD-E und G-E in verschiedenen, thermisch behandelten Fischerzeugnissen zu untersuchen und mögliche prozess- und produktbasierte Minimierungsstrategien für diese Produktgruppen abzuleiten. Dabei sollten die Kategorien Fischöle, panierte und vorgebratene, tiefgekühlte Fischerzeugnisse und Bratfischerzeugnisse betrachtet werden. Als Grundlage für die vorliegende Arbeit wurde am Max Rubner-Institut für Sicherheit und Qualität bei Milch und Fisch Kiel/Hamburg in Kooperation mit der SGS Germany GmbH in Hamburg eine in-house validierte Analysenmethode zur Bestimmung von MCPD, MCPD-E und G-E in Fischerzeugnissen entwickelt.

Der traditionelle Herstellungsprozess von Fischöl beinhaltet eine Ölextraktion aus dem Rohmaterial sowie einen Raffinationsschritt, welcher unter anderem zur Entfernung von Kontaminanten, wie polychlorierte Dibenzo-*p*-Dioxine (PCDDs) und polychlorierte Dibenzofurane (PCDFs) sowie polychlorierte Biphenyle (PCBs), dient. Der Desodorierungsschritt wird im Hinblick auf die Speiseölraffination als kritischer Faktor für die Bildung von MCPD-E und G-E angesehen. Das Ziel des ersten Teiles dieser Arbeit bestand deshalb darin, einen Überblick über die MCPD-E- und G-E-Gehalte in rohen, im Vergleich zu raffinierten Fischölen darzustellen, um somit den Einfluss der Raffination auf die Bildung der Prozesskontaminanten zu untersuchen. Um eine möglichst breite Aussagekraft zu generieren, sollten Warenkorbproben verschiedener Fischöle aus unterschiedlichen Fischarten und Fanggebieten, sowie sowohl Zuchtfische aus Aquakulturen als auch Wildfische analysiert werden. Zusätzlich sollten die Gehalte an PCDD/Fs und PCBs in den unterschiedlichen Fischölen aufgezeigt und der mögliche Einfluss eines Aktivkohlefilters auf deren Reduktion während des Verarbeitungsprozesses diskutiert werden. Daten zu Fettsäuremustern der unterschiedlichen Fischarten wurden vom Max Rubner-Institut für Sicherheit und Qualität bei Milch und Fisch in Kiel/Hamburg zur Verfügung gestellt und sollten in Zusammenhang mit den erwähnten Prozesskontaminanten bewertet werden.

Zielsetzung

Ein weiteres Ziel war es, mögliche Einflussfaktoren auf die Bildung von MCPD-E und G-E während der Herstellung von panierten und vorgebratenen, tiefgekühlten Fischerzeugnissen zu untersuchen. Es sollten dabei verschiedene produkt- und prozessbasierte Parameter identifiziert werden. Detailliert sollte der Einfluss des Gehaltes an NaCl sowie an Mono- und Diacylglyceriden (MAG/DAG) in der Panade betrachtet werden. Zudem sollte der Einfluss der Erhitzungsdauer des Frittieröls, der Frittierdauer sowie der Frittier Temperatur untersucht werden. In einem zweiten Schritt sollten verschiedene Strategien zur Minimierung von MCPD-E und G-E in diesen Fischerzeugnissen angewandt werden. Als Minimierungsansätze sollten, basierend auf den in der Literatur beschriebenen Reduktionsmöglichkeiten, der Einsatz verschiedener Adsorptionsmittel im Frittieröl, eine Filtration des Frittieröls nach dem Frittierprozess sowie eine Supplementierung der Panade mit L-Cystein, durchgeführt werden. Es galt zudem, begleitend zu den MCPD-E- und G-E-Gehalten, den Anteil der polaren Komponenten (TPM) in den Frittierölen sowie die Farbveränderung der Frittieröle während der Erhitzungsdauer des Frittieröls in einem Langzeitversuch zu analysieren, um einen möglichen Zusammenhang zwischen den verschiedenen Parametern zu untersuchen. Auch bei der Produktklasse der Bratfischerzeugnisse sollte der Einfluss der NaCl-Konzentration in der Panade und in der Marinade, sowie die Erhitzungsdauer des Frittieröls auf die MCPD-E- und G-E-Gehalte untersucht werden. Zudem sollte der Einfluss des Pasteurisationsprozesses überprüft werden.

Um einen umfassenden Überblick der aktuellen MCPD-, MCPD-E- und G-E-Gehalte in kommerziellen Produkten und Daten für eine mögliche Risikoeinschätzung dieser Produktgruppen zu generieren, wurde eine Warenkorbanalyse durchgeführt. Es wurden Handelsproben von panierten und vorgebratenen, tiefgekühlten Fischerzeugnissen, Bratfischerzeugnissen und geräucherten Fischerzeugnissen untersucht.

4 Kumulativer Teil der Dissertation

Im Folgenden sind die Ergebnisse in Form von wissenschaftlichen Veröffentlichungen kumulativ dargestellt. Diese sind vollständig und entsprechen in ihrer Darstellung den Originalartikeln in den Fachzeitschriften *European Journal of Lipid Science and Technology*, *Food Control* und *Food Chemistry*.

Alle Beteiligten werden namentlich, unabhängig vom Status (extern, Student, wissenschaftlicher Mitarbeiter, Professor), genannt.

Die Publikationen beinhalten die Entwicklung einer in-house validierten Methode zur Bestimmung von freiem und gebundenem 2- und 3-MCPD sowie G-E in Fischerzeugnissen, welche schließlich zur Analyse der Gehalte in verschiedenen thermisch behandelten Fischerzeugnissen eingesetzt wurde. Des Weiteren wurde der Einfluss verschiedener produkt- und prozessbasierter Parameter bei der Herstellung von panierten und vorgebratenen, tiefgekühlten Fischerzeugnissen, Bratfischerzeugnissen und Fischölen identifiziert. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden mögliche Minimierungsstrategien für diese Produktkategorien abgeleitet und auf ihre Wirksamkeit überprüft.

4.1 Publikation I: Entwicklung einer Analysenmethode zur Bestimmung von freiem und fettsäuregebundenem 2-, 3-MCPD und Glycidol in Fischereierzeugnissen

Horst Karl (HK), Sybille Merkle (SM), Jan Kuhlmann (JK), Jan Fritsche (JF): Development of analytical methods for the determination of free and ester bound 2-, 3-MCPD, and esterified glycidol in fishery products. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2016, 118(3), 406-417.

Impact Factor: 1,953 (2016)

Die in diesem Kapitel aufgeführte Publikation dient als Grundlage für die vorliegende Dissertation. Die Arbeit wurde am Max Rubner-Institut für Sicherheit und Qualität bei Milch und Fisch Kiel/Hamburg in Kooperation mit der SGS Germany GmbH in Hamburg durchgeführt.

Ziel dieser Arbeit war es, eine Analysenmethode zur Bestimmung von MCPD, MCPD-E und G-E in Fisch und Fischereierzeugnissen zu entwickeln. Zur Analyse von MCPD-E und G-E in der Fisch-Matrix wurden zwei der drei bislang offiziell validierten AOCS-Methoden zur Bestimmung von MCPD-E und G-E in Speiseölen und -fetten zu Grunde gelegt. Die AOCS-Methoden Cd 29b und 29c werden als indirekte Analysenmethoden bezeichnet und beinhalten eine alkalische Esterhydrolyse, eine Derivatisierung mit PBA und eine Bestimmung mittels GC-MS (Kapitel 2.2.2). Für die Analyse von MCPD-E und G-E in Fischmatrices wurden diese modifiziert und auf ihre Eignung zur Quantifizierung von MCPD-E und G-E in Fischerzeugnissen getestet und verglichen.

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate von 3-MCPD-E und G-E wurde ein Referenzmaterial bestehend aus rohem Seelachs (*Pollachius virens*), 10% Rapsöl, 210 mg/kg G-E-Standard und 156 mg/kg 3-MCPD-E-Standard hergestellt und sechsmal analysiert. Ein zweites „produktnahes“ Referenzmaterial wurde aus einem Homogenat aus panierten und vorgebratenen, tiefgekühlten Fischstäbchen hergestellt.

Die Analyse von freiem MCPD wurde in wässrigen Extrakten der Fischerzeugnisse untersucht. Die Methode basierte auf der Modifizierung einer von Jira (2010) und Küsters (2010) entwickelten Analysenmethode. Die Linearität der Methode wurde durch Anreicherung von neun verschiedenen Konzentrationen (1-500 µg/kg) an 3-MCPD in zerkleinertem Kabeljau (*Gadus morhua*) bestimmt.

Darüber hinaus wurde im Rahmen dieser Veröffentlichung ein erstes Screening hinsichtlich verschiedener geräucherter und frittierter Fischerzeugnisse durchgeführt.

Eigenanteil: 20%

Research Article

Development of analytical methods for the determination of free and ester bound 2-, 3-MCPD, and esterified glycidol in fishery products

Horst Karl¹, Sybille Merkle², Jan Kuhlmann³ and Jan Fritsche²¹ Department of Safety and Quality of Milk and Fish Products, Max Rubner-Institut, Hamburg, Germany² University of Applied Sciences Hamburg, Nutrition & Food Science, Hamburg, Germany³ SGS Germany GmbH, Hamburg, Germany

In the present study, existing official methods for oils were modified in order to analyze free and bound MCPD and bound glycidol in fish. Free 3-MCPD was determined in aqueous extracts of fishery products. DGF standard methods C-VI-17(10) and C-VI-18(10) and the 3 in 1 method were modified and tested to quantify ester-bound 2- and 3-MCPD and glycidyl esters. The different methods were validated using spiked fish mince and a naturally contaminated reference material consisting of homogenized smoked sprat and fish sticks. The methods showed good agreement. Assay B of the modified DGF method C-VI-18(10) and the adapted 3 in 1 method allow a quantitative determination of bound 2- and 3-MCPD in fishery products. In addition, glycidyl esters can be quantified applying the 3 in 1 method. The screening of various fishery products showed that smoked fish may contain considerable amounts of free 3-MCPD. Concentrations ranged between 8 and 388 µg/kg wet weight (ww). Only traces of free 3-MCPD were found in all other fishery products. Fish sticks and fried fish products are potential sources of 3- and 2-MCPD esters, but large variation were observed. Bound 3-MCPD ranged between 45 and 377 µg/kg ww, bound 2-MCPD between 9 and 116 µg/kg ww.

Practical applications: The European Food Safety Authority (EFSA) is calling for occurrence data of 2-MCPD, 3-MCPD, 2-MCPD ester, 3-MCPD ester, and glycidyl ester in foods including fishery products. At present, there is no official method for the determination of these food processing contaminants in fish and fishery products. Therefore, the approach of this study was to establish analytical methods for the quantification of free and bound MCPD and bound glycidol in fish, based on the modification of existing methods for edible oils. The adapted methods allow a sensitive quantitative determination of the target analytes in various fishery products.

Keywords: Analytical method / Fish sticks / Food / Food quality / Free and bound 2,3-monochloropropane-1,2-diol / Glycidyl ester / Organic contaminant / Smoked fish

Received: March 5, 2015 / Revised: April 8, 2015 / Accepted: May 19, 2015

DOI: 10.1002/ejlt.201400573

Correspondence: Dr. Horst Karl, Department of Safety and Quality of Milk and Fish Products, Max Rubner-Institut, Federal Research Institute of Nutrition and Food, Palmallee 9, 22767 Hamburg, Germany
E-mail: horst.karl@mri.bund.de
Fax: +49-40-38905262

Abbreviations: 3-MCPD, 3-monochloropropane-1,2-diol; 2-MCPD, 2-monochloropropane-1,3-diol; 3-MCPD-ester-d₅, 3-chloropropanediol-1,2-bis-palmitoyl ester-d₅; 2-MCPD-ester-d₅, 2-chloropropanediol-1,3-bis-palmitoyl ester-d₅; EFSA, the European Food Safety Authority; PBA, phenylboronic acid; Tf, transformation ratio

1 Introduction

3-Monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) is a food processing contaminant that might be formed by heating foods containing chloride or a chloride source together with glycerol or glycerol derivatives like lipids. It can also be formed during the wood smoking of fish and meat [1]. The IARC has classified 3-MCPD as a possible human carcinogen (group 2B) [2]. Investigations have shown that 3-MCPD in food is occurring not only in free form, but in

refined oils and fats also as mono- or di-esters of fatty acids [3, 4]. Further identified analogous compounds that are supposed to be generated during the deodorization of edible oils are glycidyl esters [5] and 2-monochloropropane-1,3-diol (2-MCPD) esters [6]. Recent studies have shown that during digestion, glycidyl esters are cleaved completely causing a release of the glycidol moiety [7]. Glycidol is a highly reactive epoxide that has been classified as genotoxic compound which is probably carcinogenic to humans [8]. From the toxicological perspective, nothing much is known about eventually occurring impacts on human health by 2-MCPD or 2-MCPD esters. 3-MCPD esters and free 3-MCPD have been detected in various heat-treated food items including roasted coffee, baked and roasted bread, bakery products, smoked, grilled or fried meat, fish, cheese, and vegetable products [9–12]. 2- and 3-MCPD esters (bound MCPD) together with glycidyl esters (bound glycidol) were determined as a commonly occurring set of contaminants in a broad variety of refined oils [6]. Various analytical procedures for the determination of free or bound 3-MCPD or glycidyl esters have been published in the last decades [13–15]. The majority of methods for the determination of MCPD-esters and glycidyl esters in fats are based on the alkaline catalyzed transesterification with methanolic sodium hydroxide or sodium methoxide, followed by derivatization of the released 2- and 3-MCPD with phenylboronic acid (PBA) and determination via GC-MS. In case of the DGF standard method C-VI 17 (10), the presence of NaCl during sample preparation causes the almost complete transformation of ester released glycidol into 3-MCPD, what disallows a differentiation of 3-MCPD esters and glycidyl esters [16].

In consequence, the DGF standard method C-VI 18 (10) has been established in 2010 [16]. This modified method consists of two parts. The first part (A) allows the determination of the sum of ester bound 3-MCPD and ester bound glycidol whereas the second part (B) is applied for the determination of ester-bound 3-MCPD only. Both assays are based on the release of the target analytes MCPD and glycidol from the ester bound form by an alkaline catalyzed alcoholysis at room temperature. In part A, an acidified sodium chloride solution is used for reaction stop and subsequent conversion of glycidol into induced 3-MCPD. This means that glycidol contributes to the finally determined 3-MCPD proportionally. In part B, the reaction stop is achieved by addition of an acidified chloride free salt solution in purpose to prevent the conversion of glycidol into 3-MCPD. The glycidol content of a sample can be calculated from the difference of both assays when the transformation ratio (Tf) from glycidol to 3-MCPD has been determined.

The determination of 2-MCPD was not included in both original DGF methods. By applying a response factor, Sato *et al.* used successfully 3-chloropropanediol-1,2-*bis*-palmitoyl ester- d_5 as internal standard for the quantification of

bound 2-MCPD [2, 17]. Due to the commercially availability nowadays, the use of isotopic labeled 2-MCPD fatty acid esters might serve even better for the determination of bound 2-MCPD in part B of the method. More recently, the standard DGF C-VI 18 (10) has also been validated by the AOCS and has become the Official AOCS Method Cd 29c-13. Another approach that is based on a specifically mild alkaline ester cleavage was introduced as so called SGS 3-in-1 method. Within this method, the released glycidol is converted into stable 3-MBPD that allows the parallel determination of bound glycidol and bound 2- and 3-MCPD. The mild cleaving conditions prevent the undesired transformation of released 3-MCPD into induced glycidol that is observed under DGF cleaving conditions at room temperature [6]. This method has been validated by the AOCS and became the Official AOCS Method Cd 29b-13.

The most recent approach with respect to method development of MCPDs was published by Ermacora & Hrnčirik in 2013. The authors adopted the transformation of glycidol into 3-MBPD but implemented it prior to the ester cleavage. The resulting 3-MBPD mono-esters as well as the fatty acid esters of 2- and 3-MCPD are subsequently cleaved by acidic catalyzed alcoholysis [18]. This so called Unilever Method has been validated by the AOCS and became the Official AOCS Method Cd 29a-13. During the AOCS method validation study, the three foregoing methods provided true and comparable results when different mono- and di-esters of 2-MCPD, 3-MCPD, and glycidol were analyzed in refined edible oils [19]. Nevertheless, it has to be stated, that due to the sample preparation procedures by the DGF and SGS methods, free analytes being present in the samples would contribute to the results but the results do not allow one to distinguish between free and bound analytes. However, the Unilever Method is assumed to exclude the free analytes so that the results would represent the bound analytes only.

So far, the number of validated methods for the separate determination of MCPD esters and glycidyl esters within one single analytical procedure is restricted to edible oils and fats [16, 19–21]. Recently no official method exists for the simultaneous determination of fatty acid bound 2- and 3-MCPD and bound glycidol in other foods. Recommended methods for the determination of free 3-MCPD are based on common extraction and purification techniques, followed by derivatization and GC-MS determination [13].

Consequently, neither for fish nor fish products any official analytical method exists to determine free 2- and 3-MCPD, MCPD esters, and glycidyl esters. Furthermore, only limited data on the occurrence of these contaminants in fish and fish products are published [22] and the EFSA is actually calling for additional occurrence data in foods including fishery products [23]. According to the EU recommendation, laboratories should report following analytes separately: 2-MCPD, 3-MCPD, 2-MCPD ester, 3-MCPD ester, and glycidyl ester. The variety of fish products

on the German market ranges from battered and fried deep frozen white fish sticks, deep fried and marinated herring and mackerel products, which are heat preserved in cans or jars to hot and cold smoked fish products [24]. Also canned smoked herring and mackerel fillets or smoked sprat in oil are available in the market. All products can be assumed to be a potential source for 3-MCPD and analogous compounds.

The aim of this study was to modify and to validate existing official methods for the quantification of free and ester bound 2-, 3-MCPD, and esterified glycidol in fishery products. The investigation also presents the first results on the occurrence of these process contaminants in typical fish products of the German market.

2 Materials and methods

2.1 Materials

Samples were procured from various wholesalers, fish mongers, and supermarkets between 2012 and 2014. Details on the samples (in total 94) are given in Table 1. At least five raw fish sticks from each package were pooled to yield one sample. Preserved fried and marinated herring and mackerel fillets were separated from the liquid and the meat content of each can or jar was pooled. Eight to twelve marinated and fried herring balls yielded one sample, Matjes fillets and canned smoked products were analyzed without oil, smoked products were bought packed under modified atmosphere or as fresh smoked product and the edible part was analyzed. Five to sixteen smoked sprat, 1–2 mackerel fillets or whole fish, and whole packages of sliced smoked salmon or trout fillets yielded one sample each.

Samples were either stored in a frozen storage chamber at -25°C until analysis or fresh homogenized and analyzed.

2.2 Analytical procedures

2.2.1 Chemicals and solvents

3-Chloropropane-1,2-diol- d_5 (1 mg/mL methanol) (LGC Standards, Wesel, Germany)

3-Chloropropanediol-1,2-*bis*-palmitoyl ester- d_5 = 3-MCPD-ester- d_5 (TRC, North York, Canada, Supplier Biozol, München, Germany)

2-Chloropropanediol-1,3-*bis*-palmitoyl ester- d_5 = 2-MCPD-ester- d_5 (TRC, North York, Canada, Supplier Biozol, München, Germany)

Glycidyl stearate (TRC, North York, Canada, Supplier Biozol, München, Germany)

Phenylboronic acid (PBA) (Fluka, Buchs, Germany)

Derivatization reagent (2.5 g PBA in 19 mL acetone + 1 mL water)

Solution I: Sodium methanolate (0.5 mol/L methanol) Sigma–Aldrich.

Solution II: Sodium chloride solution (20%, $p = 200$ g/L deionized water)

Solution III: Stop reagent—NaCl: 30 mL NaCl solution (20%) + 1 mL glacial acetic acid

Solution IV: Stop-reagent— $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 30 mL $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ solution (40%) + 1 mL glacial acetic acid

Solution V: *t*-BME-solvent mixture: 8 mL *tert*-butylmethylether (*t*-BME) + 2 mL ethyl acetate

Solution VI: Sodium hydroxide (6 g/L methanol)

Solution VII: Acidified sodium bromide solution: Weigh 600 g sodium bromide in a 1 L screw cap glass volumetric flask, add deionized water up to the 1 L mark. Acidify the mixture with 3 mL of *ortho*-phosphoric acid (85%), seal tightly and shake (vortex) until the solution is clear. Three milliliters of this solution must neutralize 2 mL of 0.6% sodium hydroxide solution (solution VI) and adjust the

Table 1. Information on samples

Product	No. of pooled samples	Samples per pool	Fish species	Product information
Fish sticks	11	5–15	Alaska pollock, Pangasius, Pacific salmon	Raw and battered
Preserved fried fish fillets	6	4	Herring, mackerel	Marinated and heat preserved
Preserved fried herring balls	4	6–10	Herring	Marinated and heat preserved
Salted herring fillets	5	3–6	Herring	Matjes + Matjes nordischer Art
Canned smoked products	12	Meat content of can or jar	Herring, mackerel	Sterilized in oil or creme
Smoked products traditional kiln	17	1–11, edible part	Cod roe, mackerel, salmon, sprat, trout	Fresh smoked, MAP packed
Smoked products modern kiln	25	1–16, edible part	Herring, mackerel, salmon, sprat, trout	Fresh smoked, MAP packed
Untreated raw fish	14	Edible part without skin	Cod, herring, mackerel, salmon, sprat, trout	Fresh or deep frozen

pH-value to the acidic range (pH 3–1). Store the solution in a freezer at -22 to -25°C .

Solution VIII: Saturated solution of phenylboronic acid (PBA) in diethyl ether: Add approximately 200 mg PBA to 10 mL diethyl ether in a screw cap vial. Shake well, allow non-dissolved PBA to settle and remain as precipitate. For derivatization purposes, use only the clear supernatant.

All other reagents and solvents were of analytical purity.

2.2.2 Solutions of standards

Standard solution I: 3-MCPD- d_5 : 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NaCl-solution (20%)

Standard solution II: 3-MCPD-ester- d_5 : 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ *iso*-octane (=0.37 μg free 3-MCPD/mL)

Standard solution III: 2-MCPD-ester- d_5 : 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ *iso*-octane/ethyl acetate 1:1 v:v (=0.37 μg free 2-MCPD/mL)

Mixed standard solution IV: 2-MCPD-ester- d_5 + 3-MCPD-ester- d_5 : each 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ *iso*-octane/ethyl acetate 1:1 v:v

Standard solution V: 2-MCPD- d_5 2.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in methanol (=2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 2-MCPD)

Standard solution VI: 3-MCPD- d_5 10.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in methanol (=10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 3-MCPD)

Standard solution VII: glycidyl oleate- d_5 11.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in toluene (=5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ glycidol)

Standard solution VIII: 2-MCPD-1,3-distearate- d_5 14.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in toluene (=2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 2-MCPD)

Standard solution IX: 3-MCPD-1,2-dioleate- d_5 58.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in toluene (=10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 3-MCPD)

3 Methods

3.1 Determination of free 3-MCPD, modified method of Jira [14] and Küsters *et al.* [25]

3.1.1 Extraction from fish matrix

Ten grams of fish sample is weighed into a 100 mL screw capped centrifuge tube, 200 μL standard solution I and 30 mL sodium chloride solution (20% w/v) is added. The mixture is homogenized for 1 min by means of an Ultra Turrax. To enable filtration of the mixture, the tube is heated for 15 min at 90°C in a water bath (denaturation of gel forming proteins) and centrifuged at 4300 rpm. The supernatant aqueous solution is filtrated. In case of oily fish samples like smoked mackerel or halibut, the aqueous aliquot is extracted with 4 mL of *n*-hexane before derivatization to remove fat residues. The organic phase is discarded. An aliquot of 8 mL of the aqueous phase is used for derivatization.

3.2 Determination of ester-bound 2- and 3-MCPD (2-, 3-MCPD esters) and glycidol (glycidyl esters) according to the modified DGF standard methods C-VI 17 (10) and C-VI 18 (10) [16]

3.2.1 Extraction from fish matrix (modified DGF method)

2.5–10 g of fish sample, corresponding to approximately 200 mg lipid, is weighed into a 50 mL screw capped centrifuge tube. Assay A is spiked with 1 mL standard solution II and Assay B with 1 mL of the mixed standard solution IV.

After adding 25 mL sodium chloride solution (20% w/v) and 10 mL *t*-BME solvent mixture, both assays are vortexed for 1 min and shaken another 1 min by hand and centrifuged 10 min at 10°C and 5000 rpm. In case of smoked products with very high amounts of free 3-MCPD, it is recommended to separate the organic phase of smoked fish samples and extract it with another 20 mL sodium chloride solution (20% w/v) to remove residual free 3-MCPD.

3.2.2 Ester cleavage and clean up (modified DGF method)

A 5 mL aliquot of the upper organic phase of each assay is transferred into a screw cap vial, 400 μL sodium methanolate is added and the mixtures are vortexed 1 min.

Assay A: the reaction time is 10 min and the reaction is stopped by adding 3 mL of the stop reagent-NaCl and 3 mL of *n*-hexane.

Assay B: the reaction time is 2.5 min and the reaction is stopped by adding 3 mL of the stop-reagent $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and 3 mL of *n*-hexane.

Both assays are shaken vigorously and allowed to remain for phase separation.

The upper organic phase is discharged using Pasteur pipettes and the aqueous phase is extracted with another 3 mL *n*-hexane which is discharged again. The aqueous phase is used for the derivatization step.

3.2.3 General derivatization procedure with PBA (modified DGF method)

Three hundred microliters of the derivatization reagent PBA solution is added to the aqueous aliquot in a screw capped tube, vortexed for 30 s and heated for 30 min at 90°C in a water bath. After cooling to room temperature, 2.5 mL *n*-hexane is added and mixed for 1 min. When phase separation has taken place, 1 mL of the upper *n*-hexane phase is transferred into a screw cap vial, evaporated to dryness using a gentle stream of nitrogen and the soluble fraction is redissolved in 300 μL *iso*-octane. After remaining at RT for approximately 15 min, part of the clear solution is transferred to a new vial for GCMS analysis.

Remarks: The *n*-hexane phase of the aqueous aliquot of the free 3-MCPD extraction often had a gel-like structure after phase separation. The problem might be solved by transferring the *n*-hexane gel by means of a Pasteur pipette to a 2 mL Eppendorf tube and adding of 400 mg Na₂SO₄. The mixture is shaken and centrifuged 5 min at 14 000 rpm. The upper *n*-hexane phase is transferred to a new vial and evaporated to dryness.

3.2.4 GC-MS determination (modified DGF method)

A Varian Saturn 2200 GC-iontrap-MS System and an Optic 2 split/splitless PTV injector were used. Separation of analytes was performed on a Varian factor four VF-5 ms column (50 m, id: 0.25 mm, film thickness: 0.25 μm). Carrier gas was helium 5.7 with a constant flow of 1.0 mL/min. Injection volume: 2 μL. GC oven program: 50°C (1 min), 40°C/min to 140°C, 2°C/min to 160°C, 40°C/min to 320°C (5 min). PTV program: 69°C (2s) to 200°C in 60 s to 300°C. Transfer line: 280°C, EI-modus 70 eV, mass range: 120–210 amu, total ion monitoring.

3.2.5 Quantification masses

3-MCPD: 146, 147, 196 3-MCPD-d₅: 149, 150, 201
2-MCPD: 196, 198 2-MCPD-d₅: 201, 203

3.2.6 Quantification (modified DGF method)

Free 3-MCPD was quantified via isotope labeled standards by multiplying the ratio of signal areas of 3-MCPD and 3-MCPD-d₅ with the spiking amount of free 3-MCPD-d₅.

Bound 3-MCPD and bound 2-MCPD were quantified from assay B applying the analog calculation via spiking amounts of 3-MCPD-ester-d₅ and 2-MCPD-ester-d₅, respectively. For the quantification of bound 3-MCPD using (NH₄)₂SO₄ as stop reagent, an isotope effect factor must be generated to correct the differences in peak areas of equal amounts of 3-MCPD-d₅ and 3-MCPD, whereas the peak areas of 2-MCPD and 2-MCPD-d₅ were identical.

In assay A, the peak area of 3-MCPD represents the combined amount of bound 3-MCPD and of transformed glycidol and 2-MCPD, respectively, if 2-MCPD is present in the sample. The quantification was carried out via 3-MCPD-d₅.

3.3 Determination of ester-bound 2- and 3-MCPD (2-, 3-MCPD esters) and glycidol (glycidyl esters) according to the modified SGS 3-in-1 method for heterogeneous foods

3.3.1 Sample preparation (modified 3-in-1 method)

Weigh two 500 ± 0.5 mg aliquots of the homogenized sample into two screw cap vials, ca. 8 mL capacity. To assay A, add 200 μL 2-MCPD-d₅ standard working solution V and

100 μL 3-MCPD-d₅ standard working solution VI. To assay A, pipette 100 μL glycidyl-d₅ ester standard working solution VII. To assay B, transfer 200 μL 2-MCPD-d₅-bis-ester standard working solution VIII and 100 μL 3-MCPD-d₅-bis-ester standard working solution IX. To each sample, add 2.5 mL diethyl ether and supersonicate the mixtures for 15 min.

3.3.2 Ester cleavage, glycidol transformation, and matrix removal (modified 3-in-1 method)

Place both assays for a minimum of 15 min in a freezer to cool down to –22 to –25°C. To each assay, add 2 mL methanolic sodium hydroxide solution (solution VI) that has been kept at –22 to –25°C. Take measures that the samples do not warm up significantly. To complete the ester cleavage, seal the vials, shake (vortex) for a few seconds and keep for at least 16 h at –22 to –25°C. Stop the reactions with 3 mL acidified sodium bromide solution (solution VII) kept at –22 to –25°C.

Briefly shake (vortex) the mixtures and place under a gentle stream of nitrogen to reduce the volume of the organic phase to approximately 500 μL. To both assays, add 2 mL *iso*-hexane, seal the vials, and shake vigorously (vortex). Leave the mixtures at RT for approximately 5–10 min to complete the transformation of glycidol into MBPD. Remove the organic phase by Pasteur pipette. Wash the aqueous phase in each assay twice with 2 mL *iso*-hexane. Using new Pasteur pipettes, extract each assay three times with 2 mL of 3:2 v:v mixture of diethyl ether/ethyl acetate or in case of matrix-rich samples with 2 mL of diethyl ether. Take care that the pipette does not touch the aqueous phase. For each assay A and B, combine the organic extracts in a new screw cap vial containing a small amount of anhydrous sodium sulfate. If the drying agent gets sticky, transfer the solution into a new screw cap vial with fresh sodium sulfate.

3.3.3 Derivatization (modified 3-in-1 method)

Add 100 μL of the derivatization reagent (solution VIII) to both organic extracts to achieve derivatization. If the derivatization reaction results in a small analyte signal response, increase the amount of derivatization agent until the signal to noise ratio in the corresponding chromatogram does not increase. The maximum amount of derivatization reagent that can be used is limited by the individual capacity of the gas chromatographic–mass spectrometric system to exclude excess PBA. To complete the derivatization reaction and to remove excess reagent, evaporate to dryness both assays using a gentle stream of nitrogen. Re-dissolve soluble fractions in approximately 300–500 μL *iso*-octane and vigorously shake (vortex) the mixture for a few seconds. For GC/MS measurement, transfer a portion of each solution into a 200 μL micro-insert.

3.3.4 GC-MS determination (modified 3-in-1 method)

A HP 7890A GC system with 5975C mass selective detector and a Gerstel split/splitless PTV injection system were used. Separation of the analytes was performed on a Resteck Rxi[®] 17 GC column (30 m, id: 0.25 μ m, film thickness: 0.25 μ m with 2.4 m pre-column: Agilent J&W GC column, HP-5MS, id: 0.32 mm, film thickness: 0.25 μ m) Carrier gas was helium 4.6 with a constant flow of 1.4 mL/min. Two-microliter sample was injected in pulsed splitless mode (injection pulse pressure: 25 psi), purge flow: 3 mL/min; 50 mL/min after 1 min. PTV temperature program: 80°C, with 10°C/s to 165°C, 10 min isothermal, with 10°C/s to 320°C, 10 min isothermal. GC oven temperature program: 100°C, isothermal 0.5 min, with 5°C/min to 165°C, isothermal 6.5 min with 20°C/min to 210°C, isothermal 7.48 min. 280°C was the temperature of the transfer-line, 230°C the temperature of the ion source, 150°C the temperature of the quadrupole. The mass selective detector was used for selected ion monitoring, focussing on the ions with a mass to charge (m/z) ratio of:

$m/z = 147$ (target) $m/z = 146, 196, 198$ (qualifiers) for 3-MCPD,

$m/z = 150$ (target) $m/z = 149, 201, 203$ (qualifiers) for 3-MCPD-d₅,

$m/z = 196$ (target) $m/z = 198$ (qualifier) for 2-MCPD,

$m/z = 201$ (target) $m/z = 203$ (qualifier) for 2-MCPD-d₅,

$m/z = 240$ (target) $m/z = 242$ (qualifier) for 3-MBPD (glycidol transformation product),

$m/z = 245$ (target) $m/z = 247$ (qualifier) for 3-MBPD-d₅ (glycidol-d₅ transformation product).

3.3.5 Quantification (modified 3-in-1 method)

Briefly 2-MCPD, 3-MCPD, and glycidol were quantified by multiplying the ratio of signal areas of the analytes and corresponding isotopic labeled internal standards with the spiking amounts of 2-MCPD-d₅, 3-MCPD-d₅, and glycidol-d₅. The combination of results from both assays allows a quantitative control of the undesired transformation of 3-MCPD via glycidol into 3-MBPD. Furthermore, the ester cleavage efficiency can be quantified. The specific quantitation procedure has been published earlier [6, 20].

4 Results and discussion

4.1 Part 1: Determination of target analytes in fishery products by different methods

Figure 1 gives an overview on the modified work-up procedures and target analytes (free 3-MCPD, 2-, 3-MCPD esters, and glycidyl esters) which were determined in fishery products.

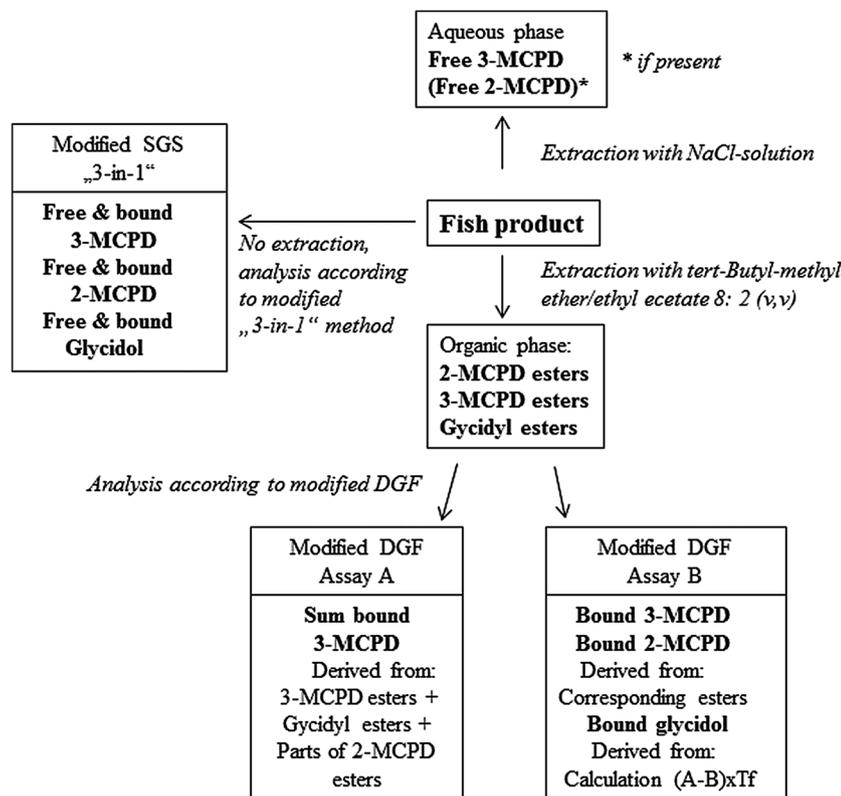


Figure 1. Analytical strategies for the quantification and screening of free and ester bound 2-, 3-MCPD, and esterified glycidol in fishery products.

The different analytical procedures were evaluated for linearity and recovery with different fish matrices. Furthermore an inter-laboratory comparison analysis was performed using the modified DGF method C-VI 18 (10) and the modified SGS 3-in-1 method (AOCS Method Cd 29b-13) in order to validate the determination of bound 2- and 3-MCPD and bound glycidol in naturally contaminated fish matrices.

4.2 Quality assurance

4.2.1 Validation of the determination of free 3-MCPD

To evaluate the linearity of the method, raw cod mince (*Gadus morhua*) was spiked with nine different amounts of free 3-MCPD from 1.0 up to 500 μg 3-MCPD per kg fish mince. The concentration of 3-MCPD-d₅ was 1 μg per 10 g of sample for all concentration levels. Each spiking level was analyzed five times. The coefficient of determination (R^2) was 0.9973. The mean variation coefficient was 12.3%. At low spiking levels of 1 and 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, the variation coefficients increased to 40 and 60%. Thus the practical limit of quantification was set to 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ fish matrix.

To test the accuracy of the method, an internal reference material was analyzed five times. The internal reference material was provided by the former Analytical Division of the Federal Research Institute of Nutrition and Food, Kulmbach, Germany and consisted of a canned sausage spiked with free 3-MCPD at a level of 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The mean recovery was $90.4 \pm 3.9\%$.

Extractions tests of free 3-MCPD from smoked sprat with NaCl (20% w/v) solution, with an aqueous NH_4SO_4 solution (40% w/v) and with water were showing similar extraction efficiencies (results not shown). All results presented in this paper are based on the extraction with 20% NaCl solution.

4.2.2 Validation of the determination of 2-MCPD esters and 3-MCPD esters and glycidyl esters

To determine the recovery of bound 3-MCPD and glycidyl ester in fish matrix, an internal reference material was produced consisting of raw saithe muscle (*Pollachius virens*), 10% rape oil, glycidyl stearate ($\equiv 210 \mu\text{g}$ glycidol/kg) and 3-chloropropanediol-1,2-bis-palmitoyl ester ($\equiv 156 \mu\text{g}$ 3-MCPD/kg) (TRC, North York, Canada, Supplier Biozol, München, Germany). The reference material was analyzed six times using the modified DGF method and analyzed as well by a second laboratory using the SGS 3-in-1 method adapted for heterogeneous foods.

Modified DFG method: The mean recovery of the sum of 3-MCPD derived from the glycidyl ester and 3-MCPD ester as determined by assay A was 93.1%. Assay B determined only 3-MCPD from the palmitoyl ester. The recovery was 103%.

SGS method: Recovery bound 3-MCPD 96.7%, recovery bound glycidol: 114%.

A second inter-laboratory study was performed with homogenized battered raw fish fingers to validate the determination of bound 2- and 3-MCPD in naturally contaminated fish matrices. The results are compiled in Table 2. The glycidol and free 3-MCPD contents of the fish fingers were below detection limit. No significant differences were found in the determination of 3-MCPD and 2-MCPD when applying Assay B and the modified SGS 3-in-1 method. In assay A, higher amounts of 3-MCPD and lower contents of 2-MCPD were found. Under the reaction conditions of assay A, some 2-MCPD was obviously converted into 3-MCPD as no glycidol was present. This explains as well the relative high standard deviation of the 2-MCPD determination by assay A of the modified DGF method (Table 2).

Table 2. Interlaboratory comparison of the determination of 3-MCPD ester, 2-MCPD ester, and glycidyl ester in homogenated fish fingers

	Esterified 3-MCPD ($\mu\text{g}/\text{kg}$ ww)			Esterified 2-MCPD ($\mu\text{g}/\text{kg}$ ww)			Esterified glycidol ($\mu\text{g}/\text{kg}$ ww)
	DGF assay A Σ bound 3-MCPD and glycidol, Lab 1	DGF assay B bound 3-MCPD, Lab 1	SGS method bound 3-MCPD, Lab 2	DGF assay A bound 2-MCPD, Lab 1	DGF assay B bound 2-MCPD, Lab 1	SGS method free and bound 2-MCPD, Lab 2	SGS method, Lab 2
No. samples	9	8	10	8	5	10	10
Mean	299 ^a	247 ^b	260 ^b	58 ^c	97 ^d	100 ^d	<LOQ
SD	26.4	26.4	15	13	6.3	6	
RSD %	8.8	10.7	5.6	22.9	6.5	5.6	

Super scripts with different letters in a line show significant differences (t -test < 0.05); LOQ $< 20 \mu\text{g}/\text{kg}$ ww; ww = wet weight.

4.2.3 Formation of 3-MCPD from 2-MCPD applying assay A of the modified DGF-method

In DGF method C-VI 18 (10) A, the alkaline treatment is limited from 3.5 to 5.5 min in order to prevent an over proportional transformation of released MCPD into glycidol. 3-MCPD is instable under alkaline treatment and previous studies have shown that under conditions of the DGF method, approximately 35% of free 3-MCPD is converted into glycidol after 5 min of alkaline treatment [6]. This undesired reaction might be accepted, as glycidol will react almost exclusively back to 3-MCPD in the following part of sample preparation. 2-MCPD is known to be more alkaline-resistant as 3-MCPD [26, 27]. But its eventually occurring conversion into glycidol and subsequent treatment with acidified chloride solution for reaction stopping would cause 3-MCPD formation. Hereby, 2-MCPD contents in samples could cause systematic overestimation of 3-MCPD. By almost doubling the time of alkaline treatment, it seemed to be necessary to investigate if the analyte distribution changes significantly by this method variation.

To determine the undesired formation of 3-MCPD from 2-MCPD by sample treatment in the assay A of the modified DGF method, saithe minced samples were spiked with equal amounts of 2-MCPD-1,3-distearate- d_5 and 3-MCPD-1,2-distearate. The latter was added as internal standard in purpose to quantify the formation of 3-MCPD- d_5 by applying assay A of the modified DGF method. To consider the time dependency of this reaction, 3.5, 5, and 10 min of alkaline treatment were applied. Assay B was run as reference analysis.

Under the reaction conditions of assay A of the modified DGF method, 2-MCPD- d_5 ester was converted on average to 20.5% into 3-MCPD- d_5 . A reduction of the time of the alkaline treatment yielded less formation of 3-MCPD- d_5 . No 3-MCPD- d_5 was detected when applying assay B (Table 3). The value obtained by assay B is defined as the true amount of 3-MCPD and the difference between assay A and B is considered as amount of glycidol derived from glycidyl esters. However, when 2-MCPD esters are present in the sample, the conversion of 2-MCPD to 3-MCPD has

to be considered in the calculation of the amount of glycidol in case of assay A.

4.3 Part 2: MCPD in fishery products

The investigation of 3-MCPD and its derivatives in fishery products on the German market was divided into several steps. During the first part of this study all fishery products were analyzed for free 3-MCPD, the identical samples were separately screened for the sum of bound 3-MCPD + glycidol and the amount of 2-MCPD esters were semi quantified. In the last part of the study, selected fishery products were quantified for 3-MCPD esters and 2-MCPD esters.

4.3.1 Free 3-MCPD in fishery products

To get an overview on the contaminant level of free 3-MCPD in fishery products, all samples listed in Table 1 were examined. The results are compiled in detail in Table 4 and illustrated in Fig. 2. Virtually, no free 3-MCPD was found in the raw fish samples investigated, which included several marine and farmed species. Only traces of free 3-MCPD were detected in fish sticks, fried, and heat-preserved herring and mackerel products like pasteurized fried herring fillets in vinegar marinade and in salted herring products of Matjes type. Smoked fish products can contain considerable amounts of free 3-MCPD, depending on the product and smoking process applied. It is known from studies of Kuntzer and Weißhaar that 3-MCPD is generated in wood smoke and that the smoking process is a major source of 3-MCPD contamination of smoked meat products. More recently Jira confirmed these observations. Smoked fish products from modern smoking kilns with external smoke generator had a moderate mean level of 36 μg free 3-MCPD/kg in the edible part, ranging between 8 and 74 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ww. Free 3-MCPD was even detectable in canned products with smoked fillets, although these products are commonly very lightly smoked.

Smoked products from traditional kilns (so called Altonaer Öfen) were significantly contaminated, but the 3-MCPD level ranged widely between 19.5 μg and 388 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ww.

Table 3. Formation of 3-MCPD- d_5 from 2-MCPD-distearate- d_5 -ester during work up of spiked saithe mince ($n = 4$, mean)

Procedure	Initial 2-MCPD- d_5 -ester ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	3-MCPD- d_5 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Conversion 2-MCPD- $d_5 \rightarrow$ 3-MCPD- d_5 (%)
Assay A			
10 min	25	5.1	20.5 \pm 10
5 min	25	1.2	4.6 \pm 1.6
3.5 min	25	1.1	4.3 \pm 1.8
Assay B			
2.5 min	25	0	0

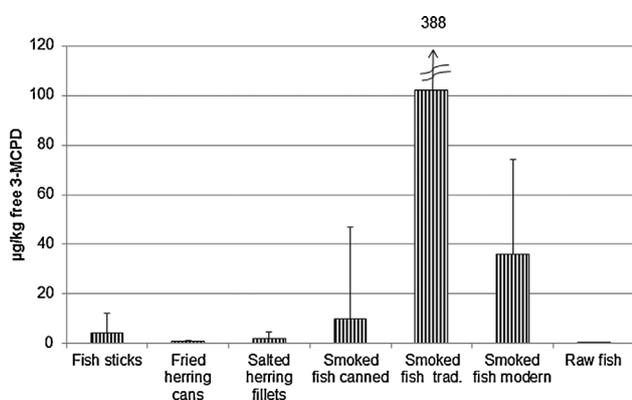
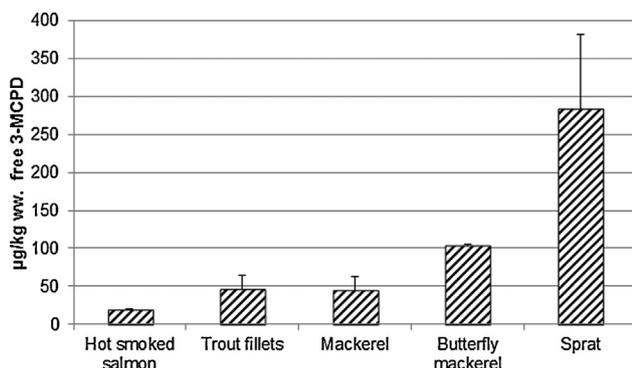
Table 4. Contents of free 3-MCPD, sum of bound MCPD ester^a and 2-MCPD ester in fishery products (μg 3-MCPD/kg ww, mean \pm SD, min–max)

Product		No samples	Free 3-MCPD	Total MCPD ^a	Estimated bound 2-MCPD
Raw fish sticks	$X \pm s$ (min–max)	11	4.1 ± 5.0^b (1.0–13)	232.2 ± 139.1 (41–548)	70 (24–201)
Canned fried fish fillets	$X \pm s$ (min–max)	6	1.0 ± 0.3^c (0.8–1.4)	132.0 ± 89	54 (11–179)
Canned fried herring balls	$X \pm s$ (min–max)	4	2.1 ± 3.1 (nd – 6.5)	180.1 ± 278.5 (42–662)	82 (nd – 239)
Salted herring fillets	$X \pm s$ (min–max)	5	2.0 ± 2.0 (0.6–4.5)	6.4 ± 14 (nd – 32)	nd
Canned smoked products	$X \pm s$ (min–max)	12	9.7 ± 12.2 (1–47)	30.9 ± 17.2 (nd – 62.5)	1.5 (nd – 12)
Smoked products, traditional kiln	$X \pm s$ (min–max)	17	102.1 ± 105 (19.5–388)	45.0 ± 39.4 (0–131.5)	2 (nd – 30)
Smoked products, modern kiln	$X \pm s$ (min–max)	25	35.9 ± 21.8 (8.4–73.9)	11.6 ± 11.5 (0–37.0)	nd
Untreated raw fish	$X \pm s$ (min–max)	14	nd	nd	nd

nd = not detected.

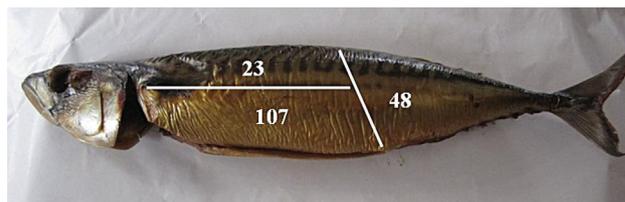
^aSum of bound 3-MCPD + glycidyl + part of bound 2-MCPD.^b $n = 8$.^c $n = 3$.

Highest amounts were found in hot smoked sprat and butterfly type mackerel products. Both products have a relatively large surface which might enable 3-MCPD more easily to migrate into the edible part (Fig. 3).

**Figure 2.** Free 3-MCPD in fishery products (mean + maximum).**Figure 3.** Free 3-MCPD content of smoked fish products from traditional kilns (mean + maximum).

To study the uptake of 3-MCPD in smoked fish products, the distribution in the edible part of whole gutted mackerel (Fig. 4) and sprat was analyzed. The uptake of free 3-MCPD via wood smoke obviously occurs by diffusion through the skin and the open body cavity. This results in different concentrations in the edible part of mackerel, depending on the thickness of the flesh. For mackerel, lowest concentrations were found in the thick loin meat followed by the tail meat. Both parts were completely covered by skin which was removed before analysis. Relatively high amounts were found in the belly flap meat which indicates that the wood smoke and thus the 3-MCPD also enters through the open body cavity (Fig. 4).

Sprat was chosen because of the small size of the fish and the way of consumption. Average weight of single smoked sprat ranged between 7 and 12 g. Smoked sprat are consumed after removal of guts, head, and tail but with skin on. This time skin and fillets were analyzed separately to see if the removal of the skin can reduce the 3-MCPD content. Identical high concentrations of 375–580 $\mu\text{g}/\text{kg}$ free 3-MCPD were found in the skin and fillet meat of different batches of smoked sprat from traditional kilns. Due to the small size and the thin skin the 3-MCPD obviously equally distributes in the product during the smoking process.

**Figure 4.** Distribution of free 3-MCPD ($\mu\text{g}/\text{kg}$ ww) in different meat parts of gutted hot smoked mackerel from traditional kiln.

4.3.2 Screening of sum of bound 3-MCPD and 2-MCPD in fishery products

The aim of the screening was to select the product groups of interest for further investigations into the exact concentrations of bound 3- and 2-MCPD and glycidyl ester. The results are compiled in Table 4.

Assay A of the modified DGF standard method was used as fast and robust screening method to estimate the total amount of 3-MCPD esters and glycidyl esters in fishery products, including the part of 3-MCPD which was formed from 2-MCPD in the presence of larger amounts 2-MCPD esters, collectively referred as total MCPD. The method also allowed a semi-quantitative estimation of 2-MCPD concentrations released from 2-MCPD esters. A response factor of 1.4 which corrected the amount of 3-MCPD formed during work up was used to calculate the true value of 2-MCPD in the sample.

The sum of bound MCPD and 2-MCPD was predominantly present in fish sticks and fried fish products. Salted and smoked products contained relatively low amounts of sum bound MCPD and no or only traces of 2-MCPD.

The screening indicated that smoked fish products are mainly contaminated with free 3-MCPD whereas fried and battered fish products are potential sources for 3- and 2-MCPD esters. It also shows that large variations in contaminant levels were observed in all groups.

Based on these preliminary monitoring results, the DGF method was further modified to determine the exact amounts of 2- and 3-MCPD ester in fishery products.

4.3.3 Comparison of the screening method and quantitative determination of 3- and 2-MCPD ester

To compare the results of the screening method with the quantitative determination of 3- and 2-MCPD ester, several heat-treated fried fish products and deep frozen fish sticks were analyzed by assays A and B of the modified DGF method, respectively. The results are summarized in Table 5. Assay A overestimated the concentration of bound 3-MCPD in fish sticks by approximately 25%, which corresponds to the amount of 3-MCPD formed during work up from 2-MCPD. The differences between assays A and B of some fried herring

products were greater than the 3-MCPD formed during work up. On the other hand, all 2-MCPD concentrations determined by assay B did not differ from the estimated ones (see Table 4).

According to these preliminary results, 3- and 2-MCPD ester concentrations of raw deep frozen fish sticks calculated as 3-MCPD ranged between 174 and 281 μg 3-MCPD/kg ww and 95–116 μg 2-MCPD/kg ww. Concentrations in heat preserved fried marinated herring fillets showed a large variation. Bound 3-MCPD ranged between 34 μg and 295 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 2-MCPD between 9 μg and 124 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ww.

5 Conclusions

Existing official methods were adapted in order to analyze free and bound 3-MCPD and analogous compounds (glycidol and glycidylesters) in fishery products. A fast and reliable method for the determination of free 3-MCPD was set up and applied to analyze various fishery products. The DGF standard methods C-VI 17 (10) and C-VI 18 (10) were modified and tested to determine 3-MCPD ester and analogous compounds in fishery products.

The modified assay A might be used as fast screening method, e.g., for the evaluation of mitigation experiments to determine the sum of bound 3-MCPD and glycidyl ester in fishery products and allows a semi-quantitative determination of 2-MCPD esters. In the presence of 2-MCPD esters, part of the 2-MCPD ester was converted into additional 3-MCPD and have to be taken into account when interpreting data obtained from assay A.

A quantitative analysis of 3- and 2-MCPD esters in fishery products might be achieved by applying the modified assay B of the DGF method C-VI 18 (10). The amount of glycidol might only be estimated with high uncertainty from the difference of the 3-MCPD values of assays A and B, especially when 2-MCPD esters are present in the sample.

The modified 3-in-1 method allows a quantitative determination of 2- and 3-MCPD esters as well as glycidyl esters in fishery products, but in the presence of free 2- and 3-MCPD, the sum of free and bound MCPDs will be analyzed.

Table 5. Comparison of sum bound MCPD and 3- and 2-MCPD ester in fried fishery products (μg 3-MCPD/kg ww, min–max values)

Product	Pooled samples	Sum bound MCPD ($\mu\text{g}/\text{kg}$ ww)	Bound 3-MCPD ($\mu\text{g}/\text{kg}$ ww)	Bound 2-MCPD ($\mu\text{g}/\text{kg}$ ww)	Glycidol ($\mu\text{g}/\text{kg}$ ww)
Fish sticks	3	267–377	174–281	95–116	<LOQ
Fried herring fillets, marinated	4	45–402	34–295	9–124	<LOQ-58

LOQ < 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

To fulfill the requirements of the EFSA with respect to reporting the amounts of 2-MCPD, 3-MCPD, 2-MCPD ester, 3-MCPD ester, and glycidyl ester in fishery products separately, a combination of a preliminary extraction step of free MCPDs combined with 3-in-1 method is recommended.

The provided screening data indicate that smoked fish products are mainly contaminated with free 3-MCPD. Pre-fried and battered fish products like fish sticks or canned fried and marinated fish fillets are potential sources for 3- and 2-MCPD esters. It also shows that large variations in contaminant levels occur in all groups which indicate that concentrations of 3-MCPD, 2/3-MCPD fatty acid esters, and glycidyl esters depend on the type of fish product and the manufacturing process applied.

Further investigations are necessary to understand which conditions at different process stages are responsible for the formation of 3-MCPD and related compounds in fishery products.

The authors have declared no conflict of interest.

References

- [1] Kuntzer, J., Weißhaar, R., The smoking process—A potent source of 3-chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) in meat products. *DLR* 2006, 102, 397–400.
- [2] Zelinkova, Z., Svejtkovska, B., Velisek, J., Dolezal, M., Fatty acid esters of 3-chloropropane-1,2-diol in edible oils. *Food Addit. Contam.* 2006, 23, 1290–1298.
- [3] Seefelder, W., Varga, N., Studer, A., Williamson, G., et al., Esters of 3-chloro-1,2-propanediol (3-MCPD) in vegetable oils: Significance in the formation of 3-MCPD. *Food Addit. Contam. A*. 2008, 25, 391–400.
- [4] IARC: 3-Monochloro-1,2-propanediol. Some chemicals present in industrial and consumer products, food and drinking-water. IARC Monographs. 2012, 349–374.
- [5] Weisshaar, R., Perz, R., Fatty acid esters of glycidol in refined fats and oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2010, 112, 158–165.
- [6] Kuhlmann, J., Determination of bound 2,3-epoxy-1-propanol (glycidol) and bound monochloropropanediol (MCPD) in refined oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2011, 113, 335–344.
- [7] Appel, K. E., Abraham, K., Berger-Preiss, E., Hansen, T., et al., Relative oral bioavailability of glycidol from glycidyl fatty acid esters in rats. *Arch. Toxicol.* 2013, 87, 1649–1659.
- [8] IARC: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, some industrial chemicals, IARC Monographs. 2000, 469–486.
- [9] Svejtkovska, B., Novotny, O., Divinova, V., Reblova, Z., et al., Esters of 3-chloropropane-1,2-diol in foodstuffs. *Czech. J. Food Sci.* 2004, 22, 190–196.
- [10] Reece, P., Report No. FD 04/12, FSA Project No. C 0301 7, 18, 19; The Origin and Formation of 3-MCPD and Formation of 3-MCPD in Food Ingredients (2005). Web. 21 Sept 2010.
- [11] Mogol, B. A., Pye, C., Anderson, W., Crews, C., Gökmen, V., Formation of Monopropane-1,2-diol and its esters in biscuits during baking. *J. Agric. Food Chem.* 2014, 62, 7297–7301.
- [12] Schallschmidt, K., Hitzel, A., Pöhlmann, M., Schwägele, F., et al., Determination of 3-MCPD in grilled meat using pressurized liquid extraction and gas chromatography—High resolution mass spectrometry. *J. Verbr. Lebensm.* 2012, 7, 203–210.
- [13] Divinova, V., Svejtkovska, B., Dolezal, M., Velisek, J., Determination of free and bound 3-chloropropane-1,2-diol by gas chromatography with mass spectrometric detection using deuterated 3-chloropropane-1,2-diol as internal standard. *Czech. J. Food Sci.* 2004, 22, 182–189.
- [14] Jira, W., 3-Monochloropropan-1,2-diol (3-MCPD) in geräucherten Fleischerzeugnissen. *Mitteilungsblatt Fleischforschung* Kulmbach. 2010, 49, 89–96.
- [15] Crews, C., Chiodini, A., Granvogel, M., Hamlet, C., et al., Analytical approaches for MCPD esters and glycidyl esters in food and biological samples: A review and future perspectives. *Food Addit. Contam.* 2013, 14, 11–45.
- [16] DGF: DGF-Einheitsmethoden C-VI 18 (10). Standard Method C-VI 18 (10) Fatt-acid-bound 3-chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) and 2,3-epoxypropane-1-ol (glycidol). Determination in oils and fats by GC/MS (Differential measurement). Deutsche Einheitsmethoden zur Untersuchung von Fetten, Fettprodukten, Tensiden und verwandten Stoffen, 2011.
- [17] Sato, H., Kaze, N., Yamanoto, H., Watanabe, Y., 2-Monochloro-1,3-propanediol (2-MCPD) dynamics in DGF standard methods and quantification of 2-MCPD. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2013, 90, 1121–1130.
- [18] Ermacora, A., Hrnčirik, K., A novel method for simultaneous monitoring of 2-MCPD, 3-MCPD and glycidyl esters in oils and fats. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2013, 90, 1–8.
- [19] AOCS: Official Method Cd 29a-13 Approved 2013. 2- and 3-MCPD Fatty Acid Esters and Glycidol Fatty Acid Esters in Edible Oils and Fats by Acid Transesterification, in: *Official Methods and Recommended Practices of the AOCS*, 2013a.
- [20] AOCS: Official Method Cd 29b-13 Approved 2013. Determination of Bound Monochloropropanediol (MCPD) and Bound 2,3-epoxy-1-propanol (glycidol-) by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS), in: *Official Methods and Recommended Practices of the AOCS*, 2013b.
- [21] AOCS: Official Method Cd 29c-13 Approved 2013. Fatty-acid-bound 3-chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) and 2,3-epoxy-propane-1-ol (glycidol). Determination in Oils and Fats by GC/MS (Differential Measurement), in: *Official Methods and Recommended Practices of the AOCS*, 2013c.
- [22] EFSA, Analysis of occurrence of 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) in food in Europe in the years 2009–2011 and preliminary exposure assessment. *EFSA J.* 2013, 11.
- [23] E. Commission: Commission Recommendation of 10 September 2014 on the monitoring of the presence of 2 and 3-monochloropropane-1,2-diol (2 and 3-MCPD), 2- and 3-MCPD fatty acid esters and glycidyl fatty acid esters in food. Official Journal of the European Union L271. 2014, 93–95.
- [24] BMEL: Leitsätze für Fische, Krebs und Weichtiere und Erzeugnisse daraus. Neufassung vom 27. November 2002 (Beilage Nr. 46 b zum BAnz. vom 7. März 2003, GMBI. Nr. 8–10 S. 157 vom 20. Februar 2003), zuletzt geändert durch Bekanntmachung vom 30. Mai 2011 (Beilage zum BAnz.

- Nr. 111a vom 27.07.2011, GMBI Nr. 24 S. 480 ff vom 27.07.2011, 2011.
- [25] Küsters, M., Bimber, U., Reeser, S., Gallitzendörfer, R., Gerhartz, M., Simultaneous determination and differentiation of glycidyl esters and 3-Monochloropropane-1,2-diol (MCPD) esters in different foodstuffs by GC-MS. *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59, 6263–6270.
- [26] Dolezal, M., Velisek, J., Kinetics of 2-chloro-1,3-propanediol in model systems and in protein hydrolysates. *Potravinárske Vedy.* 1995, 2, 85–91.
- [27] Hamlet, CG., Sadd, PA., Crews, C., Velisek, J., Baxter, DE., Occurrence of 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) and related compounds in foods: A review. *Food Addit. Contam.* 2002, 19, 619–631.

4.2 Publikation II: Einfluss verschiedener Fischarten und Verarbeitungstechnologien auf Fischölkomponenten

Sybille Merkle (SM), Editha Giese (EG), Sascha Rohn (SR), Horst Karl (HK), Ines Lehmann (IL), Andreas Wohltmann (AW), Jan Fritsche (JF): Impact of fish species and processing technology on minor fish oil components. *Food Control*, 2017, 73, 1379-1387.

Impact Factor: 3,496 (2017)

In der zweiten Publikation wurde ein Überblick über die MCPD-E- und G-E-Gehalte in verschiedenen Fischölen ermittelt und dargestellt.

Das Ziel dieser Veröffentlichung bestand darin, den Einfluss der Raffination von Fischölen auf die Bildung von MCPD-E und G-E zu untersuchen. Dazu wurden die MCPD-E- und G-E-Gehalte in rohen Fischölen mit Gehalten in raffinierten Fischölen verglichen. Fischöle verschiedener Fischarten und Fanggebiete wurden untersucht, wobei sowohl Zuchtfische als auch Fische aus Aquakulturen einbezogen wurden.

Darüber hinaus wurden die PCDD/F- und PCB-Gehalte in unterschiedlichen Fischölen untersucht, wobei der Einfluss eines Aktivkohlefilters auf die Reduktion der Gehalte dargestellt wurde.

Im Zusammenhang mit den untersuchten Prozesskontaminanten wurden Daten zu Fettsäuremustern der unterschiedlichen Fischarten diskutiert. Diese wurden vom Max Rubner-Institut für Sicherheit und Qualität bei Milch und Fisch in Kiel/Hamburg zur Verfügung gestellt.

Eigenanteil: 20%



Impact of fish species and processing technology on minor fish oil components



Sybille Merkle ^a, Editha Giese ^a, Sascha Rohn ^b, Horst Karl ^c, Ines Lehmann ^c,
Andreas Wohltmann ^d, Jan Fritsche ^{a, c, *}

^a Faculty of Life Sciences, Food Science, Hamburg University of Applied Sciences, Ulmenliet 20, 21033, Hamburg, Germany

^b University of Hamburg, Hamburg School of Food Science, Grindelallee 117, 20146, Hamburg, Germany

^c Department of Safety and Quality of Milk and Fish Products, Max Rubner-Institut, Federal Research Institute of Nutrition and Food, Hermann-Weigmann-Str. 1, 24103, Kiel, Germany

^d LIPROMAR GmbH, Cuxhaven, Neufelder Straße 44, 27472, Cuxhaven, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 July 2016

Received in revised form

24 October 2016

Accepted 1 November 2016

Available online 4 November 2016

Keywords:

Contaminants

DHA

Dioxins

EPA

Fish oil refining

MCPD ester

n-3 PUFA

PCB

Chemical compounds studied in this article:

N-3 polyunsaturated fatty acid (PubChem

CID: 56842239)

eicosapentaenoic acid (PubChem CID:

446284)

docosahexaenoic acid (PubChem CID:

445580)

dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans

(PubChem CID: 90112383)

polychlorinated biphenyls (PubChem CID:

42128)

2-MCPD (PubChem CID: 10337)

3-MCPD (PubChem CID: 7290)

glycidol (PubChem CID: 5460455)

ABSTRACT

Fish and fish oil are an important source of essential dietary components such as polyunsaturated long chain fatty acids like eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. Refining of crude fish oil is necessary to remove environmental contaminants e.g., dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, dioxin-like polychlorinated biphenyls, and non-dioxin-like polychlorinated biphenyls for reaching legal limits, ensuring a pleasant taste and for enhancing shelf-life. However, during the deodorization of crude fish oil, process contaminants such as 2- and 3-monochloropropane-diol esters and glycidyl esters may be formed. The aim of the present study was to provide a comprehensive overview on the content of selected environmental and process contaminants in raw and processed fish oils deriving from different fish species. In crude fish oils extracted from farmed fish, the contents of environmental contaminants were well below the legal limits for food grade fish oil. In contrast, fish oils extracted from captured fish did not meet the requirements for human consumption.

When applying filtration over active carbon, a reduction in the content of dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and dioxin-like polychlorinated biphenyls was achieved. 2- and 3-monochloropropane-diol ester and glycidyl ester contents were considerably higher in the refined compared to the crude fish oils investigated. Additionally, the comparison of analyzed and labeled contents of polyunsaturated long chain fatty acids showed a satisfying compliance.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Fish and fish oils are important foods as they meet many nutritional needs of humans. Epidemiological and experimental evidence has shown that n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFA), especially eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5 n-3) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6 n-3), are among the main components

* Corresponding author. Department of Safety and Quality of Milk and Fish Products, Max Rubner-Institut, Federal Research Institute of Nutrition and Food, Hermann-Weigmann-Str. 1, 24103, Kiel, Germany.

E-mail address: jan.fritsche@mri.bund.de (J. Fritsche).

Abbreviations

2-MCPD	2-monochloropropane-1,3-diol
3-MCPD	3-monochloropropane-1,2-diol
AOCS	American Oil Chemists' Society
DHA	docosahexaenoic acid
PCDD/Fs	dibenzo- <i>p</i> -dioxins, dibenzofurans
dl-PCBs	dioxin-like polychlorinated biphenyls
EPA	eicosapentaenoic acid
EFSA	European Food Safety Authority
FAME	fatty acid methyl esters
IARC	International Agency for Research on Cancer
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
ndl-PCBs	non-dioxin-like PCBs
n-3 PUFA	n-3 polyunsaturated fatty acids
SCF	Scientific Committee on Food
WHO-TEQs	World Health Organization toxic equivalents
WHO-TEFs	World Health Organization toxic equivalency factors

responsible for the health benefits resulting from fish consumption (Gogus & Smith, 2010). In particular, beneficial effects of n-3 PUFA on cardiovascular risk factors have been investigated extensively (Eltweri et al., 2016; Endo & Arita, 2016; MacLean et al., 2006; Psota, Gebauer, & Kris-Etherton, 2006) and an average intake of EPA and DHA in a range of 250–500 mg daily has been shown to decrease the mortality risk of coronary heart disease (Tetens, 2012). Moreover, an increased intake of DHA during pregnancy and lactation as well as for older infants is suggested (Tetens, 2012). An adequate intake of DHA has been found effective in maintaining normal brain and visual function (Tatens, 2011). High contents of EPA and DHA are present in several fish species such as sardine, mackerel, herring, anchovy, menhaden, cod liver, or salmon (Khoomrung, Raber, Laoteng, & Francesconi, 2014). However, the lipid fraction of freshwater fish (e.g., tilapia, pangasius, carp) does not contain reasonable contents of EPA or DHA (Strobel, Jahreis, & Kuhnt, 2012) and fillets of frequently consumed marine fish such as saithe, Alaska pollock, cod, or plaice have very low lipid contents (Souci, Fachmann, & Kraut, 2008). Moreover, the EPA and DHA contents labeled on commercial fish oils often differ considerably from analytical values (Albert et al., 2015; Halvorsen & Blomhoff, 2011; Opperman, Marais, & Benadé, 2011; Souci et al., 2008).

To increase the intake of DHA and EPA encapsulated fish oil or n-3 PUFA concentrates produced from fish oil are a practical alternative for ecological reasons. (Ward & Singh, 2005).

To obtain fish oil for human consumption, essential processing steps including oil extraction, refining, purification, and enrichment are applied. Refining in general comprises the gum conditioning, neutralization, washing, drying, bleaching, filtration, and deodorization (Young, 1986). Main aims of the refining process are e.g., the removal of undesirable taste and odor and the removal of environmental pollutants such as dibenzo-*p*-dioxins, dibenzofurans (PCDD/Fs), dioxin-like polychlorinated biphenyls (dl-PCBs), and non-dioxin-like PCBs (ndl-PCBs). These toxic and bioaccumulating contaminants are suspected to bear a significant risk for human health (JECFA, 2001). Removing these environmental contaminants can be achieved during bleaching with activated carbon or silica covering adsorptive properties (Ortiz et al., 2011; Usydus, Szlinder-Richert, Polak-Juszczak, Malessa-Ciećwierz, & Dobrzański, 2009).

However, some of the refining steps such as the deodorization may have side effects leading to a change of the minor component composition of fish oil. In general, deodorization is applied to remove free fatty acids, flavor volatiles, and oxidation products. During this process, which uses the principle of steam distillation under vacuum, comparatively high temperatures (250–270 °C) are applied (Young, 1986). The simultaneous presence of a chloride ion source together with glycerol or glycerol derivatives like lipids may induce the formation of 2-monochloropropane-1,3-diol (2-MCPD) esters, 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) esters, and glycidyl esters (Kuhlmann, 2011; Zelinková, Svejtková, Velíšek, & Doležal, 2006). The International Agency for Research on Cancer (IARC) has classified 3-MCPD as a “possible human carcinogen (group 2B)” (IARC, 2012). Glycidol is even a genotoxic compound and has been categorized as “probably carcinogenic to humans (group 2A)” (IARC, 2000). The formation of these process contaminants in refined oils is influenced by oil composition as well as oil treatment during the refining process (Ermacorá & Hrnčirik, 2014). A lot of research has been done to minimize the contents of 2- and 3-MCPD esters and glycidyl esters in refined plant oils (Matthäus, Pudel, Fehling, Vosmann, & Freudenstein, 2011). However, up to now, only specific data are published on the occurrence of 2- and 3-MCPD esters and glycidyl esters in fish oils (Commission, 2014; Jędrkiewicz, Glowacz, Gromadzka, & Namieśnik, 2016). Comprehensive reviews providing an overview are not available. As a result, the European Food Safety Authority (EFSA) called for additional data on food including fishery products (EFSA, 2013, 2016).

Minor components of fish oil and especially fatty acid composition are traditionally determined by means of gas chromatography (fatty acid methyl esters, FAME). NMR spectrometry has also been applied in the determination of fatty acid profiles including DHA in edible oils (Aursand, Rainuzzo, & Grasdalen, 1993; Barison et al., 2010; Guillén & Ruiz, 2003; Hatzakis, Agiomyrigianaki, Kostidis, & Dais, 2011; Igarashi et al., 2000; Knothe & Kenar, 2004; Miyake, Yokomizo, & Matsuzaki, 1998; Sacchi, Medina, Aubourg, Addeo, & Paolillo, 1993; Shiao & Shiao, 1989; Tyl, Brecker, & Wagner, 2008; Zverev, Prudnikov, Vityuk, Dzhoiev, & Panyushkin, 2001). This technology does not require a derivatization of the fatty acids and provides extensive additional information apart from the fatty acid composition that can be obtained from a single spectrum within a very short time period (Barison et al., 2010).

The aim of the present study was to provide a comprehensive overview on the contents of selected environmental (PCDD/F, dl-PCBs and ndl-PCBs) as well as process contaminants (2- and 3-MCPD esters and glycidyl esters) in fish oils of different species deriving from different fishing areas (North East Atlantic, North Pacific, North Sea, German aquaculture, northern European aquaculture, Barents Sea). Additionally, the influence of different processing technologies has been evaluated. For a comparison, n-3 PUFA contents were measured by means of gas chromatography and ¹H NMR spectrometry and assessed with regard to legal compliance.

2. Materials and methods

2.1. Samples

Crude and partly refined fish oil samples were obtained from Bioceval GmbH & Co. KG and Lipomar GmbH (51 samples). These oils were extracted from raw materials by centrifugation at 70–85 °C on a commercial fish oil production line. Some fish oils (from cod liver, wild salmon) were subsequently partly refined by filtration at 70 °C through a mobile filtration system (MOBICON 2000 FG, Desotec activated carbon nv-s.a.) loaded with 900 kg

activated carbon (Organosorb 10-AA, particle size 0.425–1.7 mm). Commercial fish oil supplements were purchased from various wholesalers and supermarkets between 2011 and 2015 (nine samples). The content of at least one package of capsules was pooled to yield one sample. Encapsulated fish oils were collected from the capsules by a sterile needle. Samples were stored in a refrigerator at 4 °C until analysis or were freshly homogenized and directly analyzed.

The samples, 60 in total, included 44 crude fish oils (one mixed marine fish oil and 43 pure fish oils of a particular species), seven partly refined pure fish oils, eight refined commercial fish oils (four salmon and marine fish oil mixes and four marine fish oils) and one highly purified marine fish oil. This highly purified fish oil is the only sample where PUFA have been concentrated during production, usually done by double transesterification (to ethyl esters and subsequently to triglycerides).

2- and 3-MCPD esters, glycidyl esters and n-3 PUFA were analyzed in crude mackerel and sprat oil, two of the refined marine fish oils and all refined salmon and marine fish oils as well as in the highly purified marine fish oil sample. In the sturgeon, catfish, fish mix, plaice, sand eel and the two refined marine fish oils, only 2- and 3-MCPD esters and glycidyl esters were determined whereas in the partly refined cod liver and wild salmon oil, only PCDD/F, dl-PCBs and ndl-PCBs were analyzed. Herring, cod liver, salmon and wild salmon oil were subjected to all of the above-mentioned analyses. Detailed information on the individual fish oils can be found in the supplementary data (Appendix 1).

2.2. Chemicals and solvents

2-Chloro-1,3-propanediol- d_5 (2-MCPD- d_5), 3-Chloro-1,2-propanediol- d_5 (3-MCPD- d_5), Glycidyl Stearate- d_5 (glycidyl ester- d_5), rac 1,2-Bis-palmitoyl-3-chloropropanediol- d_5 (3-MCPD-ester- d_5) and 1,3-Distearoyl-2-chloropropanediol- d_5 (2-MCPD-ester- d_5) were purchased from Toronto Research Chemicals Inc. (North York, Canada). All other reagents and solvents were of analytical purity.

A standard solution FAME Mix Supelco 37 and methanolic potassium hydroxide solution (approx. 25% methanol) were obtained from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany). n-Hexane and sodium hydrogen sulfate monohydrate for analysis were purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Sulfuric acid 95% was obtained from Th. Geyer GmbH (Renningen, Germany). Chloroform- d_1 , 99.8% + 0.03% TMS was obtained from Deutero GmbH (Kastellaun, Germany).

A mixture of fatty acids in the range of 14:0–22:6 n-3 was used as an individual standard.

2.3. Determination of 2- and 3-MCPD esters and glycidyl esters

The contents of 2- and 3-MCPD esters and glycidyl esters were measured using GC-MS after sample preparation and derivatization according to the two modified *American Oil Chemists' Society* (AOCS) methods Cd 29b-13 and Cd 29c-13 for fishery products (Karl, Merkle, Kuhlmann, & Fritsche, 2016). 2-MCPD, 3-MCPD, and glycidol were quantified by multiplying the ratio of the signal areas of the analytes and the corresponding isotopic labeled internal standards 2-MCPD- d_5 , 3-MCPD- d_5 , and glycidol- d_5 . The specific quantitation procedure of the different analytes 2- and 3-MCPD esters and glycidyl esters has also been published elsewhere (AOCS, 2013; Kuhlmann, 2011).

2.4. Determination of PCDD/F, dl- and ndl-PCBs

The contents of PCDD/F, dl- and ndl-PCBs were analyzed according to the analytical method described in Commission

Regulation (EC) No. 589/2014 and Commission Regulation (EC) No. 152/2009 by accredited commercial laboratories and according to the method described in detail by Karl, Ruoff, and Blüthgen (2002) and Karl and Ruoff (2007). The *World Health Organization* toxic equivalents (WHO-TEQs) including WHO-PCDD/F-TEQs and WHO-PCB-TEQs were calculated using toxic equivalency factors (WHO-TEFs) published in 2006 (Van den Berg et al., 2006). LOQ of ndl-PCBs was 0.2 µg/kg. LOQ of dioxins as well as of dl-PCBs varied between individual congeners and, to a lesser extent, within a particular congener when comparing different analyses in the range allowed in regulation EC 589/2014.

2.5. Fatty acid composition by means of GC-FID

After alkaline transesterification the contents of EPA and DHA and other fatty acids were measured by GC-FID. Fatty acid methyl esters (FAME) were obtained from the extracted lipids by transesterification with methanolic potassium hydroxide according to the DGF method C VI 11d (DGF, 1998). Determination of fatty acid composition and quantification was carried out according to DGF method C VI 10a by GC-FID (DGF, 2000). Fatty acids in the range of 14:0 to 22:6n-3 were identified by comparing the retention times with a standard FAME mixture. The results are expressed as FAME %.

2.6. Fatty acid composition by means of ^1H NMR spectrometry

In addition to the aforementioned method, ^1H NMR spectrometry was used to determine DHA in selected samples. The samples were weighed into a reaction tube and deuterated chloroform containing the reference compound tetramethylsilane was added. After mixing, the sample was filled into an NMR tube. The samples were analyzed by ^1H NMR spectrometry (Avance III HD 400 MHz, 5 mm BBI Probe, Bruker, Karlsruhe, Germany) in a two-dimensional (J-resolved, 4 scans) and a one-dimensional (^1H -ZG-NMR, 16 scans) experiment. Based on the spectra of the ZG-NMR experiment, the DHA content of the total fat was determined. The molar contents were calculated according to the method of Igarashi et al. (2000) which was validated by the *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) (Igarashi et al., 2002). The molar DHA content was calculated as percentage DHA content (Eq. (1)).

$$\text{DHA content [mol\%]} = ((A_{\text{DHA}}/2)/(A_{\text{mIn}} + (A_{\text{DHA}}/2))) * 100 \quad (1)$$

with A_{DHA} being the signal area of the C_2, C_3 -methylene protons of DHA, determined in the region 2.37–2.41 ppm and A_{mIn} being the signal area of the triplet of the C_2 -methylene protons of all other fatty acids, determined by deconvolution in the region 2.28–2.34 ppm (according to Igarashi et al. (2000)). The spectra of the J-resolved NMR experiment were used to verify signal assignment. A series of six measurements was performed to determine precision and repeatability.

2.7. Statistical analysis

Significant differences were tested between the PCDD/F, dl-PCB, ndl-PCB as well as between the n-3 PUFA, EPA, and DHA contents in the crude and partly refined fish oil samples. Furthermore, significant differences between the 2- and 3-MCPD ester and glycidyl ester contents in the crude and refined fish oil samples were determined. For this purpose an ANOVA followed by post hoc *t*-test according to Tukey and Bonferroni were calculated. A significance level of $\alpha = 0.05$ was applied.

3. Results and discussion

3.1. Contents of PCDD/F, dl-PCB, ndl-PCB in crude fish oils

Table 1 shows the contents of dibenzo-*p*-dioxins, dibenzofurans, and polychlorinated biphenyls in crude fish oil samples. For oils derived from marine animals (fish body oil, fish liver oil, and oils of other marine organisms intended for human consumption), the maximum levels for the sum of dioxins (WHO-PCDD/F-TEQ) according to the Commission Regulation (EC) No. 1259/2011 were 1.75 pg/g fat for food use and 5 pg/g fat when used for feed production. The maximum levels for the sum of dioxin and dl-PCB (WHO-PCDD/F-PCB-TEQ) according to the Commission Regulation (EC) No. 277/2012 were 6.0 pg/g fat and 20 pg/g fat for food and feed use, respectively. For ndl-PCBs, the maximum levels were 200 ng/g fat (food) and 175 ng/g fat (feed) (Commission, 2011; 2012).

Analysis of crude fish oils showed that all oils extracted from farmed fish are well below the limits for food (salmon) and feed grade fish oil (sturgeon: sum of dioxin: 1.21 pg/g WHO-TEQ fat; sum of dioxin and dl-PCBs: 3.85 pg/g WHO-TEQ fat, ndl-PCBs: 76.70 ng/g and catfish: sum of dioxin: 0.58 pg/g WHO-TEQ fat; sum of dioxin and dl-PCBs: 2.55 pg/g WHO-TEQ fat, ndl-PCBs: 23.40 ng/g WHO-TEQ).

In contrast, fish oils extracted from captured marine fish species did not meet the requirements for human consumption. In particular, the wild salmon and the cod liver samples did not meet the levels regarding the sum of dioxin and dl-PCB. Dioxin loads were considerably higher in cod liver oils from various regions in the North East Atlantic (sum of dioxin and dl-PCB: 29.24 pg/g WHO-TEQ fat, ndl-PCB: 216 ng/g WHO-TEQ fat) than those extracted from cod fished in the Barents Sea. However, even in the latter the sum of dioxin and dl-PCB was consistently too high (Table 1).

These data confirmed recent values presented by Karl et al. (2016) and indicate a worldwide distribution of these persistent organic pollutants, with a gradual decline of contents correlating

with the distance from industrialized areas. The low content of dioxin loads in farmed fish can be explained by the fact that dioxins accumulate in all parts of the food chain, which in fish aquaculture is controlled by legal regulations for fish feeds. Some of the crude fish oils from wild marine species even exceeded limits for feed grade fish oil. This was in particular the case in plaice oil (sum of dioxin: 25.57 pg/g WHO-TEQ fat; sum of dioxin and dl-PCB: 56.34 pg/g WHO-TEQ fat, ndl-PCB: 118 ng/g WHO-TEQ) and other fish species captured close to Western European coastal regions.

3.2. Contents of PCDD/F, dl-PCB, ndl-PCB in partly refined fish oils

Partial refining by filtration of crude fish oil through activated carbon resulted in a reduction of dioxins and dl-PCBs (Table 1). The median value of the sum of dioxin and dl-PCB in partly refined cod liver oil (Barents Sea) was reduced by 93% compared to the crude cod liver oil (Barents Sea). On the contrary, the median value of the sum of ndl-PCB in partly refined cod liver oil (Barents Sea) increased by 12% compared to the crude cod liver oil (Barents Sea). In practice, the sum of ndl-PCB increased with increasing volumes of the filtrated fish oil. This is probably due to the fact that ndl-PCB as well as dioxins and dl-PCBs pass through the same niches of the activated carbon filter. Dioxins and dl-PCBs seem to have a higher affinity towards activated carbon than ndl-PCBs. As a consequence, filtration needs monitoring of the refined fish oils by the manufacturers to fulfill the legal requirements concerning maximum permissible values of ndl-PCB (Ortiz et al., 2011).

Ortiz et al. (2011) reported about the investigation of different solid adsorbents being used to remove environmental contaminants from fish oil. They concluded that carbon-based adsorbents, in particular activated carbon, showed high elimination ratios for PCDD/F and dl-PCB (Ortiz et al., 2011). These authors also showed that removal of non-ortho PCB (dl-PCB) was more efficient than the elimination of mono-ortho-PCB. The higher non-ortho PCB elimination rates could be due to their planar structures, which make

Table 1
Contents of dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans, dl-PCBs and ndl-PCBs in the investigated crude and partly refined fish oil samples. Values in the same column that do not share a common superscript letter are significantly different ($p < 0.05$).

			Sum of dioxin [WHO-PCDD/F-TEQ] [pg/g fat]	Sum of dioxin and dl-PCB [WHO-PCDD/F-PCB-TEQ] [pg/g fat]	Sum of ndl-PCBs [ng/g fat]
Maximum levels (food grade)			1.75	6.0	200
Maximum levels (feed quality)			5	20	175
Fish oil sample	No. of pooled samples				
Crude herring	n = 5	$\bar{X} \pm s$	8.15 ± 2.91 ^a	17.02 ± 5.57 ^a	82.90 ± 37.79 ^a
		median	8.82	18.53	82.00
		range	4.64–12.20	8.21–23.09	33.50–137.00
Crude cod liver (Barents Sea)	n = 3	$\bar{X} \pm s$	2.94 ± 1.21 ^{ab}	20.72 ± 8.82 ^a	93.20 ± 38.21 ^{ab}
		median	3.58	24.06	94.00
		range	1.54–3.70	10.72–27.38	54.60–131.00
Partly refined cod liver (Barents Sea)	n = 2	median	0.13	1.75	105.15
		range	0.13–0.14	0.88–2.62	33.30–177.00
Partly refined cod liver (North East Atlantic)	n = 2	median	0.14	1.50	123.50
		range	0.10–0.17	0.49–2.50	114.00–133.00
Crude salmon	n = 4	$\bar{X} \pm s$	0.67 ± 0.22	2.70 ± 0.68 ^b	19.68 ± 4.26 ^c
		median	0.58	2.39 ^{ac}	19.55
		range	0.53–0.99	2.31–3.72	15.80–23.80
Crude wild salmon	n = 3	$\bar{X} \pm s$	2.18 ± 0.42 ^{bc}	6.00 ± 0.53 ^{abc}	29.97 ± 2.67 ^{acd}
		median	2.32	6.04	31.20
		range	1.71–2.50	5.45–6.50	26.90–31.80
Partly refined wild salmon	n = 2	median	0.82	3.13	40.40
		range	0.12–1.51	1.27–4.99	31.00–49.80

Table 2

Contents of 2- and 3-MCPD esters and glycidyl esters according to the AOCS method Cd 29b-13 in the investigated crude and refined fish oil samples. Each sample was measured in duplicate. Data are given as 2- and 3-MCPD and glycidol in mg kg⁻¹ fat. Values in the same column that do not share a common superscript letter are significantly different ($p < 0.05$). *LOQ <0.01 mg kg⁻¹

Fish oil sample	No. of pooled samples		3-MCPD-FE [mg/kg]	2-MCPD-FE [mg/kg]	G-FE [mg/kg]
<i>Crude fish oil sample</i>					
Extracted from farmed fish*	n = 5	$\bar{X} \pm s$	0.02 ± 0.005 ^a	<LOQ	0.09 ± 0.044 ^{df}
		median	0.02	<LOQ	0.11
		range	<LOQ–0.02	<LOQ–0.01	0.01–0.13
Extracted from captured marine fish species**	n = 11	$\bar{X} \pm s$	0.01 ± 0.012 ^a	<LOQ	0.06 ± 0.045 ^d
		median	0.01	<LOQ	0.04
		range	<LOQ–0.05	<LOQ–0.02	0.02–0.15
<i>Refined fish oil sample</i>					
Extracted from marine fish species	n = 4	$\bar{X} \pm s$	1.32 ± 1.077 ^b	0.17 ± 0.139 ^c	0.47 ± 0.370 ^e
		median	1.10	0.13	0.45
		range	0.24–2.84	0.04–0.38	0.12–0.90
Extracted from salmon and marine fish species	n = 4	$\bar{X} \pm s$	0.55 ± 0.388 ^b	0.06 ± 0.047 ^c	0.29 ± 0.399 ^{ef}
		median	0.47	0.04	0.09
		range	0.16–1.12	0.01–0.12	0.06–1.00

*Salmon, sturgeon, catfish.

**Herring, cod liver, blue whiting, mackerel, sprat, fish oil mix, plaice, sand eel, sardine, tuna.

their retention on the surface of the adsorbent materials easier. For mono-ortho PCB, much lower adsorption rates were obtained (Ortiz et al., 2011). Similar results were obtained in other studies (Carvajal & Mozuraityte, 2016; Fernández-González, Yebra-Pimentel, Martínez-Carballo, & Simal-Gándara, 2014; Kawashima, Iwakiri, & Honda, 2006; Maes et al., 2005; Oterhals, Solvang, Nortvedt, & Berntssen, 2007).

3.3. Contents of 2- and 3-MCPD esters and glycidyl esters in crude fish oils

The results of the measurements according to both described methods (modified AOCS methods Cd 29b-13 and Cd 29c-13) showed no significant differences. Therefore only the results of the modified AOCS method Cd 29b-13 are shown in this paper.

The contents of 2- and 3-MCPD esters and glycidyl esters in crude fish oil samples of food grade quality extracted from farmed fish (salmon, sturgeon, and catfish) as well as crude fish oil samples extracted from captured marine fish species (herring, cod liver, blue whiting, mackerel, sprat, plaice, sand eel, sardine, tuna, and different fish oil mixes) were very low (Table 2). This was also valid for samples extracted from raw materials used for feed production. Thus, raw material quality had no significant influence on the formation of 2-/3-MCPD esters. The Scientific Committee on Food (SCF) and the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) defined a tolerable daily intake level of 2 µg/kg body weight. A maximum concentration level of 0.02 mg/kg has been specified for the presence of 3-MCPD in hydrolyzed vegetable proteins and soy sauce according to Commission Regulation (EC) No. 466/2001. At present, no maximum concentration has been laid down for other food products.

3.4. Contents of 2- and 3-MCPD esters and glycidyl esters in refined fish oils

Contents of 2- and 3-MCPD esters were significantly higher in the investigated refined fish oils than in the crude fish oil samples (Table 2). The glycidyl ester contents of the fish oil samples extracted from refined salmon and marine fish species and from crude farmed fish showed no significant differences. There were no significant differences either between the different refined fish oil samples investigated. The analyzed highly purified fish oil sample showed the highest content of glycidyl esters (2.24 mg/kg).

Similar results were obtained by Kuhlmann (2011) and by Jędrkiewicz et al. (2016). Kuhlmann analyzed the 2- and 3-MCPD ester contents in commercially available dietary supplements containing salmon oil. The contents of 3-MCPD esters were in the range of 0.7–13 mg/kg, while the estimated contents of 2-MCPD esters were in the range of 0.1–2.3 mg/kg (Kuhlmann, 2011). The contents of 3-MCPD esters in fish oil supplements determined by Jędrkiewicz et al. (2016) were in the range of 1.5–5.5 mg/kg. The samples comprised three capsulated fish oil samples and two not encapsulated samples available on the retail market in Poland (Jędrkiewicz et al., 2016). Based on this data, it can be assumed that the process contaminants 2- and 3-MCPD esters and glycidyl esters are formed during the refining process of fish oils. This is in agreement with earlier observations describing that during the refining process of edible fats and oils several factors induce the formation of 2-MCPD esters, 3-MCPD esters, and glycidyl esters (Kuhlmann, 2011; Matthäus et al., 2011).

Another effect observed in our study showed that the contents of 2-MCPD esters were lower than the 3-MCPD ester contents in all analyzed samples. The 2-MCPD ester contents in all investigated crude and refined fish oil samples were more than 88% lower than 3-MCPD ester contents.

This effect was also found by Jędrkiewicz et al. (2016). They stated that the majority of the investigated fish oil capsules contained 2-MCPD esters in a content less than 13% of the 3-MCPD ester content. Jędrkiewicz et al. (2016) suggested that the high specificity of the raw material is responsible for this specific ratio of 2- and 3-MCPD esters. They stated that fish muscle tissue comprises endogenous enzymes (peroxidases, lipoxygenases) being potentially responsible for lipid oxidation and therefore leading to the formation of off-flavor in the fish oil. In order to deactivate these enzymes, acids (acetic or phosphoric acid) are usually added in a pretreatment step of the raw material (Jędrkiewicz et al., 2016). Collier, Cromie, and Davies (1991) proposed that the presence of these acids may affect the ratio of 2- and 3-MCPD esters.

Indications for a possible reduction of PCDD/F and dl-PCBs in fish oil by means of activated carbon filtration during the bleaching process have been already pointed out above (section 3.2). For 2- and 3-MCPD esters and glycidyl esters, the bleaching as well as the prior degumming process have already been described as steps that could potentially influence their formation to a small extent during refining (Matthäus et al., 2011). Partial acylglycerols, phospholipids, carotenoids, and other lipophilic compounds have been identified

as precursors for the formation of 2- and 3-MCPD esters and glycidyl esters (Collier et al., 1991; Hamlet, Sadd, & Gray, 2004; Rahn & Yaylayan, 2011). Also, chloride ions or chlorine containing compounds are essential precursors (Weißhaar & Perz, 2010). It has been proven that, when acid is used during the degumming process of palm oil and acid activated bleaching earth is applied, the corresponding precursors for 3-MCPD esters are formed (Ramli et al., 2011). Zulkurnain et al. (2012) and Haines et al. (2011) even described an increase of 3-MCPD esters during bleaching comprising activated carbon filtration.

On the other hand, several studies demonstrated that a modification of the degumming and bleaching process conditions could prevent the formation of 3-MCPD esters. Matthäus et al. (2011) showed that an additional washing step during water degumming resulted in a reduction of inorganic chlorine. Furthermore, it was supposed that application of a high dosage of activated clay in combination with silicate (e.g., magnesium silicate, calcium silicate and aluminum silicate) as filter aid (Schurz, 2010) or natural bleaching clay during the bleaching process (Ramli et al., 2011) can reduce precursor compounds. Moreover, Strijowski, Heinz, and Franke (2011) suggested an adaptation of the adsorption material dosage in the post refining process. They found that a treatment of palm oil with synthetic magnesium silicate or zeolite after the refining process was able to reduce the content of glycidyl esters (Strijowski et al., 2011).

3.5. Fatty acid composition of crude and (partly) refined fish oils

The contents of n-3 PUFA in the crude fish oils as well as in the partly refined fish oil samples varied between 12.8 and 34.0% of the total fatty acid content (Table 3). Fish oil extracted from captured fish varied also within species, which confirms earlier reports (Moffat & McGill, 1993) and might be the result of seasonal changes in the fish diets. In this context, fish oil from salmon aquaculture displayed no seasonality because of the constant quality of salmon feeds. However, as a result of the increasing proportion of plant oils

in the fish feed, EPA and DHA contents decreased considerably during the last decade (Sprague, Dick, & Tocher, 2016). Accordingly, salmon oil had the lowest EPA/DHA contents of the analyzed marine crude fish oils in the present study (Table 3).

With regard to the production of refined fish oils as used in fish oil capsules, the contents of EPA and n-3 PUFA were considerably higher than the contents in the crude and the partly refined fish oils (Table 4). The contents in the investigated refined fish oils were in the range of 24.7–34.5% for n-3 PUFA and 10.9–18.1% for EPA in particular. The DHA contents of 7.8–12.2% in refined fish oils were comparable to the contents in some of the crude fish oil samples (Table 5). The highest content of n-3 PUFA was found in the highly purified fish oil (EPA: 31.8%, DHA: 22.4%, and n-3 PUFA: 60.6%). This sample was labeled as an n-3 PUFA concentrate from highly purified marine fish oil explaining to some extent its high values.

Most of the refined and the highly purified fish oils are labeled as a mixture of salmon oil and marine fish oil. In most cases, it can be assumed that the term “marine fish oil” refers to refined anchovy oil as the main component because this is one of the few crude fish oils providing 30% EPA and DHA. Furthermore, this fish oil is available in large volumes from the South American anchovy fishery industry (FAO, 2014). In general, the contents of EPA and DHA in refined fish oils are comparable to the results of other studies, where the fatty acid composition of commercially available fish oil capsules was determined (Carvalho, Bastos, Noffs, & Pastore, 2000; Ward & Singh, 2005).

When comparing the analyzed and labeled contents of EPA, DHA, and n-3 PUFA, an acceptable compliance can be found. The analyzed contents were similar to or to a certain extent higher than the labeled contents. Thus, results of the present study did not confirm frequent deviations from labeled contents as found in earlier reports (Albert et al., 2015; Halvorsen & Blomhoff, 2011; Opperman et al., 2011).

In addition to FAME GC-FID measurements, selected samples were analyzed by ¹H NMR spectrometry in order to determine DHA contents. A representative ¹H NMR spectrum of fish oil covering the

Table 3
Contents of n-3 PUFA, EPA and DHA [FAME %] of the total fat in the selected crude and partly refined fish oil samples. Values in the same column that do not share a common superscript letter are significantly different ($p < 0.05$).

Fish oil sample	No. of pooled samples		EPA [% fat]	DHA [% fat]	n-3 PUFA [% fat]
Crude herring	n = 3	$\bar{X} \pm s$	7.1 ± 1.57 ^a	7.4 ± 0.21 ^a	19.9 ± 1.73 ^a
		median	7.2	7.3	19.7
		range	5.4–8.6	7.2–7.6	18.3–21.7
Cod liver*	n = 6	$\bar{X} \pm s$	8.4 ± 0.57 ^{ab}	11.3 ± 0.81 ^b	23.8 ± 1.23 ^b
		median	8.4	11.3	24.2
		range	7.7–9.4	10.1–12.4	21.6–24.8
Crude salmon	n = 8	$\bar{X} \pm s$	3.7 ± 1.74 ^{ac}	5.2 ± 2.45 ^{ac}	15.9 ± 4.28 ^{ac}
		median	2.8	4.1	14.0
		range	2.7–7.3	3.8–10.9	12.8–25.6
Wild salmon*	n = 3	$\bar{X} \pm s$	5.6 ± 1.49 ^{cdef}	4.9 ± 0.83 ^c	15.3 ± 1.32 ^{ac}
		median	4.8	5.0	14.8
		range	4.8–7.4	4.0–5.6	14.2–16.7
Mackerel	n = 3	$\bar{X} \pm s$	7.0 ± 0.25 ^{acd}	10.4 ± 1.07 ^{bd}	24.6 ± 1.70 ^{bd}
		median	7.0	10.9	25.6
		range	6.8–7.3	9.2–11.2	22.7–25.6
Sprat	n = 4	$\bar{X} \pm s$	8.3 ± 0.21 ^{abc}	11.5 ± 0.88 ^{bd}	24.6 ± 1.26 ^{bd}
		median	8.3	11.6	24.3
		range	8.1–8.5	10.3–12.4	23.7–26.4
Sardine	n = 5	$\bar{X} \pm s$	11.0 ± 3.09 ^{abde}	11.8 ± 1.51 ^{bd}	27.3 ± 3.81 ^{bde}
		median	9.7	11.5	25.0
		range	7.7–14.9	10.2–14.3	24.4–32.4
Tuna	n = 3	$\bar{X} \pm s$	6.7 ± 1.20 ^{acdf}	23.7 ± 2.06	32.9 ± 1.32 ^e
		median	7.2	22.8	33.3
		range	5.4–7.6	22.2–26.0	31.4–34.0

*Includes crude as well as refined fish oil samples.

Table 4

Contents of n-3 PUFA, EPA and DHA [FAME %] of the total fat in the selected refined fish oil samples.

Refined fish oil sample	No. of pooled samples		Analyzed content			Labeled content		
			EPA [% fat]	DHA [% fat]	n-3 PUFA [% fat]	EPA [% fat]	DHA [% fat]	n-3 PUFA [% fat]
Extracted from marine fish oil species	n = 2	median	17.6	11.1	33.9	16.0	10.0	26.0
		range	17.1–18.1	10.9–11.2	33.3–34.5			
Extracted from salmon and marine fish oil species	n = 4	$\bar{X} \pm s$	15.4 ± 3.01	10.2 ± 1.85	31.3 ± 4.48	14.3 ± 2.95	9.8 ± 1.45	28.1 ± 4.90
		median	16.6	10.5	32.9	14.2	9.2	27.0
		range	10.9–17.3	7.8–12.2	24.7–34.5	10.8–18.0	9.0–12.0	23.4–35.0

signals relevant for DHA determination is provided as supplementary data (Appendix 2). In most cases, the results were comparable to the GC-FID method. Only the highly purified marine fish oil showed a significant deviation. This sample exhibited unidentified signals overlapping with the relevant signals of DHA and other fatty acids. This may explain why the method of Igarashi et al. (2000) used to quantify DHA did not work for this highly purified fish oil sample.

Both, ^1H and ^{13}C NMR spectrometry have been applied to determine fatty acids in edible oils (Aursand et al., 1993; Barison et al., 2010; Sacchi et al., 1993). ^1H NMR spectrometry is the preferred technique because of its higher sensitivity due to the higher natural abundance of ^1H nuclei compared to ^{13}C nuclei (Barison et al., 2010). In the literature, several calculation methods have been described for determining the fatty acid composition of edible oils using ^1H NMR spectrometry (Barison et al., 2010; Guillén & Ruiz, 2003; Igarashi et al., 2000; Knothe & Kenar, 2004; Miyake et al., 1998; Sacchi et al., 1993). Several studies found that the contents of DHA and total n-3 PUFA determined in fish oils as estimated by ^1H NMR spectrometry correlate well with GC-FID results (Aursand et al., 1993; Igarashi et al., 2000; Sacchi et al., 1993; Tyl et al., 2008).

4. Conclusion

The present study provided a comprehensive overview on the contents of selected environmental and process contaminants in fish oils of different fish species and processing technologies.

In contrast to fish oils extracted from farmed fish, the oil extracted from captured marine fish did in none of the investigated fish species meet requirements for human consumption regarding the sum of dioxin and dl-PCB. The data revealed that during the bleaching process in standard refinement procedures the adsorptive properties of activated carbon cause a reduction in the contents of PCDD/Fs and dl-PCB.

2- and 3-MCPD ester and glycidyl ester contents were considerably higher in the investigated refined fish oils compared to the crude fish oil samples. Based on literature data it would be interesting to find out if contents of 2- and 3-MCPD esters and glycidyl esters in fish oils could be reduced by modifying the refining process or by subsequent treatment of fish oils with adsorbent

Table 5Contents of DHA [mol %] in the selected refined fish oil samples measured by GC and ^1H NMR spectrometry.

Fish oil sample	DHA content _{NMR} [mol%]	DHA content _{GC} [mol %]
Marine fish A	11.2	11.2
Marine fish B	10.7	10.9
Salmon and marine fish A	10.8	10.8
Salmon and marine fish C	12.1	12.2
Highly purified marine fish	32.9	22.4

materials. More research is necessary in order to optimize the processing conditions of fish oil refining with respect to 2- and 3-MCPD esters and glycidyl esters.

The analyses did not confirm frequent deviations from labeled n-3 PUFA contents as stated in earlier reports.

^1H NMR spectrometry can be regarded as a promising method to determine the DHA content of fish oil that does not require an internal standard for quantification purposes. Furthermore, it allows the determination of a large number of additional compounds and parameters relevant for example for authenticity checks of fish oil. Despite these advantages of NMR spectrometry, the GC-based method is still considered the standard method with regard to fatty acid quantification. More research is required to understand deviating DHA contents in highly purified marine fish oil samples measured by GC and ^1H NMR spectrometry.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or non-profit sectors.

Declaration of interest

Authors declare that there is no conflict of interest and have approved the final manuscript.

Acknowledgements

We would like to thank Bodo von Holten for providing various samples of crude fish oils and Eurofins Analytik GmbH for providing the resources for the NMR analyses.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.11.003>.

References

- Albert, B. B., Derrai, J. G. B., Cameron-Smith, D., Hofman, P. L., Tumanov, S., Villas-Boas, S. G., et al. (2015). Fish oil supplements in New Zealand are highly oxidised and do not meet label content of n-3 PUFA. *Scientific Reports*, 5, 7928. <http://dx.doi.org/10.1038/srep07928>.
- AOCS. (2013). *Official method Cd 29b-13 approved 2013. Determination of bound monochloropropanediol- (MCPD) - and bound 2,3-epoxy-1-propanol (glycidol-) by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). Official methods and recommended practices of the AOCS (6 ed.)* (Reprinted from: 3).
- Aursand, M., Rainuzzo, J. R., & Grasdalen, H. (1993). Quantitative high-resolution ^{13}C and ^1H nuclear magnetic resonance of $\omega 3$ fatty acids from white muscle of atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 70(10), 971–981. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02543023>.
- Barison, A., Pereira da Silva, C. W., Campos, F. R., Simonelli, F., Lenz, C. A., & Ferreira, A. G. (2010). A simple methodology for the determination of fatty acid composition in edible oils through ^1H NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 48(8), 642–650. <http://dx.doi.org/10.1002/mrc.2629>.
- Carvajal, A. K., & Mozuraityte, R. (2016). Fish oils: production and properties. In F. P. Cabellero B, & F. Toldrà (Eds.), *Encyclopedia of food and health* (pp.

- 693–698). Waltham: Elsevier.
- Carvalho, P. D. O., Bastos, D., Noffs, M., & Pastore, G. (2000). Fatty acid composition of commercial fish oil capsules. *Lecta*, 18(1), 27–31.
- Collier, P. D., Cromie, D. D. O., & Davies, A. P. (1991). Mechanism of formation of chloropropanols present in protein hydrolysates. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 68(10), 785–790. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02662173>.
- Commission, E. (2011). Commission Regulation (EU) No 1259/2011 of 2 December 2011 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for dioxins, dioxin-like PCBs and non dioxin-like PCBs in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L50, 18–23.
- Commission, E. (2012). Commission Regulation (EC) No. 277/2012 of 28 March 2012 amending Annexes I and II to Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council as regards maximum levels and action thresholds for dioxins and polychlorinated biphenyls. *Official Journal of the European Union*, L77, 1–13.
- Commission, E. (2014). Commission Recommendation of 10 September 2014 on the monitoring of the presence of 2 and 3-monochloropropane-1,2-diol (2 and 3-MCPD), 2- and 3-MCPD fatty acid esters and glycidyl fatty acid esters in food. *Official Journal of the European Union*, L271, 93–95.
- DGF. (1998). *DGF-einheitsmethode C-VI-11 d. Fettsäuremethylester (Alkalische Umesterung)*. Stuttgart (Germany): Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
- DGF. (2000). *DGF-Einheitsmethode C-VI-10 a. Gaschromatographie: Analyse der Fettsäuren und Fettsäureverteilung*. Stuttgart (Germany): Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
- EFSA. (2013). Analysis of occurrence of 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) in food in Europe in the years 2009–2011 and preliminary exposure assessment. *EFSA Journal*, 11(9).
- EFSA. (2016). Scientific opinion on the risks for human health related to the presence of 2- and 3-monochloropropanediol (MCPD), and their fatty acid esters, and glycidyl fatty acid esters in food. *EFSA Journal*, 14, 4426.
- Eltweri, A. M., Thomas, A. L., Metcalfe, M., Calder, P. C., Dennison, A. R., & Bowrey, D. J. (2016). Potential applications of fish oils rich in omega-3 polyunsaturated fatty acids in the management of gastrointestinal cancer. *Clinical Nutrition*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clnu.2016.01.007>.
- Endo, J., & Arita, M. (2016). Cardioprotective mechanism of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Journal of Cardiology*, 67(1), 22–27. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jicc.2015.08.002>.
- Ermacor, A., & Hrnčirik, K. (2014). Influence of oil composition on the formation of fatty acid esters of 2-chloropropane-1,3-diol (2-MCPD) and 3-chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) under conditions simulating oil refining. *Food Chemistry*, 161, 383–389. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.130>.
- FAO. (2014). *The state of world fisheries and aquaculture. Opportunities and challenges*. Rome (Italy): Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Fernández-González, R., Yebra-Pimentel, I., Martínez-Carballo, E., & Simal-Gándara, J. (2014). Decontamination solutions for polychlorinated biphenyls (PCBs) in raw fish oils from environmentally contaminated sea fishes. *Science of The Total Environment*, 468–469, 1007–1013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.09.036>.
- Gogus, U., & Smith, C. (2010). n-3 Omega fatty acids: a review of current knowledge. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(3), 417–436. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02151.x>.
- Guillén, M. D., & Ruiz, A. (2003). Rapid simultaneous determination by proton NMR of unsaturation and composition of acyl groups in vegetable oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105(11), 688–696. <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.200300866>.
- Haines, T. D., Adlaf, K. J., Pierceall, R. M., Lee, I., Venkatasubramanian, P., & Collison, M. W. (2011). Direct determination of MCPD fatty acid esters and glycidyl fatty acid esters in vegetable oils by LC–TOFMS. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88(1), 1–14. <http://dx.doi.org/10.1007/s11746-010-1732-5>.
- Halvorsen, B. L., & Blomhoff, R. (2011). Determination of lipid oxidation products in vegetable oils and marine omega-3 supplements. *Food & Nutrition Research*, 55, 5792. <http://dx.doi.org/10.3402/fnr.v55i0.5792>.
- Hamlet, C. G., Sudd, P. A., & Gray, D. A. (2004). Generation of monochloropropanediols (MCPDs) in model dough systems. 2. Unleavened doughs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(7), 2067–2072. <http://dx.doi.org/10.1021/jf035078o>.
- Hatzakis, E., Agiomyrgianaki, A., Kostidis, S., & Dais, P. (2011). High-Resolution NMR Spectroscopy: An alternative fast tool for qualitative and quantitative analysis of diacylglycerol (DAG) oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88(11), 1695–1708. <http://dx.doi.org/10.1007/s11746-011-1848-2>.
- IARC. (2000). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, some industrial chemicals. *IARC Monographs*, 77, 469–486.
- IARC. (2012). 3-Monochloro-1,2-propanediol. Some chemicals present in industrial and consumer products, food and drinking-water. *IARC Monographs*, 101, 349–374.
- Igarashi, T., Aursand, M., Hirata, Y., Gribbestad, I. S., Wada, S., & Nonaka, M. (2000). Nondestructive quantitative determination of docosahexaenoic acid and n-3 fatty acids in fish oils by high-resolution 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77(7), 737–748. <http://dx.doi.org/10.1007/s11746-000-0119-0>.
- Igarashi, T., Aursand, M., Sacchi, R., Paolillo, L., Nonaka, M., & Wada, S. (2002). Determination of docosahexaenoic acid and n-3 fatty acids in refined fish oils by 1H-NMR spectroscopy: IUPAC interlaboratory study. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85(6), 1341–1354.
- JECFA. (2001). *Evaluation of certain food additives and contaminants: Fifty-seventh report of the Joint FAO/WHO Expert committee on food Additives*. Retrieved from Rome (Italy): Joint FAO/WHO Expert Committees on Food Additives.
- Jędrkiewicz, R., Glowacz, A., Gromadzka, J., & Namieśnik, J. (2016). Determination of 3-MCPD and 2-MCPD esters in edible oils, fish oils and lipid fractions of margarines available on Polish market. *Food Control*, 59, 487–492. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.05.039>.
- Karl, H., Merkle, S., Kuhlmann, J., & Fritsche, J. (2016). Development of analytical methods for the determination of free and ester bound 2-, 3-MCPD, and esterified glycidol in fishery products. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 118(3), 406–417. <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.201400573>.
- Karl, H., & Ruoff, U. (2007). Dioxins, dioxin-like PCBs and chloroorganic contaminants in herring, *Clupea harengus*, from different fishing grounds of the Baltic Sea. *Chemosphere*, 67(9), S90–S95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.05.121>.
- Karl, H., Ruoff, U., & Blüthgen, A. (2002). Levels of dioxins in fish and fishery products on the German market. *Chemosphere*, 49(7), 765–773. [http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00399-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00399-5).
- Kawashima, A., Iwakiri, R., & Honda, K. (2006). Experimental study on the removal of dioxins and coplanar polychlorinated biphenyls (PCBs) from fish oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26), 10294–10299. <http://dx.doi.org/10.1021/jf061962d>.
- Khoomring, S., Raber, G., Laoteng, K., & Francesconi, K. A. (2014). Identification and characterization of fish oil supplements based on fatty acid analysis combined with a hierarchical clustering algorithm. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116(7), 795–804. <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.201300369>.
- Knothe, G., & Kenar, J. A. (2004). Determination of the fatty acid profile by 1H-NMR spectroscopy. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 106(2), 88–96. <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.200300880>.
- Kuhlmann, J. (2011). Determination of bound 2,3-epoxy-1-propanol (glycidol) and bound monochloropropanediol (MCPD) in refined oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(3), 335–344. <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.201000313>.
- MacLean, C. H., Newberry, S. J., Mojica, W. A., Khanna, P., Issa, A. M., Suttrop, M. J., et al. (2006). Effects of omega-3 fatty acids on cancer risk: A systematic review. *JAMA*, 295(4), 403–415. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.295.4.403>.
- Maes, J., De Meulenaer, B., Van Heerswynghe, P., De Greyt, W., Eppe, G., De Pauw, E., et al. (2005). Removal of dioxins and PCB from fish oil by activated carbon and its influence on the nutritional quality of the oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 82(8), 593–597. <http://dx.doi.org/10.1007/s11746-005-1114-1>.
- Matthäus, B., Pudel, F., Fehling, P., Vosmann, K., & Freudenstein, A. (2011). Strategies for the reduction of 3-MCPD esters and related compounds in vegetable oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(3), 380–386. <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.201000300>.
- Miyake, Y., Yokomizo, K., & Matsuzaki, N. (1998). Determination of unsaturated fatty acid composition by high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(9), 1091–1094. <http://dx.doi.org/10.1007/s11746-998-0118-4>.
- Moffat, C. F., & McGill, A. S. (1993). Variability of the composition of fish oils: Significance for the diet. *Proceedings of the Nutrition Society*, 52(03), 441–456. <http://dx.doi.org/10.1079/PNS19930085>.
- Opperman, M., Marais, D. W., & Benadé, A. S. (2011). Analysis of omega-3 fatty acid content of South African fish oil supplements. *Cardiovasc J Afr*, 22(6), 324–329.
- Ortiz, X., Carabellido, L., Martí, M., Martí, R., Tomás, X., & Diaz-Ferrero, J. (2011). Elimination of persistent organic pollutants from fish oil with solid adsorbents. *Chemosphere*, 82(9), 1301–1307.
- Oterhals, A., Solvang, M., Nortvedt, R., & Berntssen, M. H. (2007). Optimization of activated carbon-based decontamination of fish oil by response surface methodology. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(7), 691–705.
- Psota, T. K., Gebauer, S. K., & Kris-Etherton, P. (2006). Dietary omega-3 fatty acid intake and cardiovascular risk. *The American journal of cardiology*, 98(4), 3–18.
- Rahn, A. K. K., & Yaylayan, V. A. (2011). What do we know about the molecular mechanism of 3-MCPD ester formation? *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(3), 323–329.
- Ramli, M. R., Siew, W. L., Ibrahim, N. A., Hussein, R., Kuntom, A., Razak, R. A. A., et al. (2011). Effects of degumming and bleaching on 3-MCPD esters formation during physical refining. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88(11), 1839–1844.
- Sacchi, R., Medina, I., Aubourg, S. P., Addeo, F., & Paolillo, L. (1993). Proton nuclear magnetic resonance rapid and structure-specific determination of omega-3 polyunsaturated fatty acids in fish lipids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 70(3), 225–228.
- Schurz, K. (2010). Method for reducing the 3-MCPD content in refined vegetable oils. Patent Cooperation Treaty Application (WO10063450).
- Shiao, T.-Y., & Shiao, M.-S. (1989). Determination of fatty-acid compositions of triacylglycerols by high-resolution NMR-spectroscopy. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 30(3), 191–199.
- Souci, S. W., Fachmann, W., & Kraut, H. (2008). *Food composition and nutrition tables* (7 ed.). Medpharm Scientific Publishers.
- Sprague, M., Dick, J. R., & Tocher, D. R. (2016). Impact of sustainable feeds on omega-3 long-chain fatty acid levels in farmed Atlantic salmon, 2006–2015. *Scientific Reports*, 6.
- Strijowski, U., Heinz, V., & Franke, K. (2011). Removal of 3-MCPD esters and related substances after refining by adsorbent material. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(3), 387–392.
- Strobel, C., Jahreis, G., & Kuhnt, K. (2012). Survey of n-3 and n-6 polyunsaturated

- fatty acids in fish and fish products. *Lipids in health and disease*, 11(1), 1.
- Tatens, I. (2011). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to docosahexaenoic acid (DHA), eicosapentaenoic acid (EPA) and brain, eye and nerve development (ID 501, 513, 540), maintenance of normal brain function (ID 497, 501, 510, 513, 519, 521, 534, 540, 688, 1323, 1360, 4294), maintenance of normal vision (ID 508, 510, 513, 519, 529, 540, 688, 2905, 4294), maintenance of normal cardiac function (ID 510, 688, 1360), “maternal health; pregnancy and nursing” (ID 514), “to fulfil increased omega-3 fatty acids need during pregnancy” (ID 539), “skin and digestive tract epithelial cells maintenance” (ID 525), enhancement of mood (ID 536), “membranes cell structure” (ID 4295), “anti-inflammatory action” (ID 4688) and maintenance of normal blood LDL-cholesterol concentrations (ID 4719) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*, 9, 2078.
- Tatens, I. (2012). EFSA panel on dietetic products, nutrition and allergies (NDA); scientific opinion related to the tolerable upper intake level of eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA) and docosapentaenoic acid (DPA). *EFSA Journal*, 10(7), 2817.
- Tyl, C. E., Brecker, L., & Wagner, K. H. (2008). 1H NMR spectroscopy as tool to follow changes in the fatty acids of fish oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110(2), 141–148.
- Usydus, Z., Szlinder-Richert, J., Polak-Juszczak, L., Malesa-Ciećwierz, M., & Dobrzański, Z. (2009). Study on the raw fish oil purification from PCDD/F and dl-PCB-industrial tests. *Chemosphere*, 74(11), 1495–1501.
- Van den Berg, M., Birnbaum, L. S., Denison, M., De Vito, M., Farland, W., Feeley, M., et al. (2006). The 2005 World Health Organization reevaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicological sciences*, 93(2), 223–241.
- Ward, O. P., & Singh, A. (2005). Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production. *Process Biochemistry*, 40(12), 3627–3652.
- Weiřhaar, R., & Perz, R. (2010). Fatty acid esters of glycidol in refined fats and oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(2), 158–165.
- Young, F. (1986). *Refining and hydrogenation of fish oil*.
- Zelinková, Z., Svejková, B., Velíšek, J., & Dolezal, M. (2006). Fatty acid esters of 3-chloropropane-1, 2-diol in edible oils. *Food additives and contaminants*, 23(12), 1290–1298.
- Zulkurnain, M., Lai, O. M., Latip, R. A., Nehdi, I. A., Ling, T. C., & Tan, C. P. (2012). The effects of physical refining on the formation of 3-monochloropropane-1, 2-diol esters in relation to palm oil minor components. *Food Chemistry*, 135(2), 799–805.
- Zverev, L., Prudnikov, S., Vityuk, B. Y., Dzhioev, T., & Panyushkin, V. (2001). Determination of the main fatty acids in sunflower-seed oil by a nuclear magnetic relaxation technique. *Journal of Analytical Chemistry*, 56(11), 1029–1031.

4.3 Publikation III: Minimierungsstrategien für fettsäuregebundenes 2- /3-MCPD und Glycidol in panierten und vorgebratenen, tiefgekühlten Fischerzeugnissen

Sybille Merkle (SM), Ute Ostermeyer (UO), Sascha Rohn (SR), Horst Karl (HK), Jan Fritsche (JF): Mitigation strategies for ester bound 2-/3-MCPD and esterified glycidol in pre-fried breaded and frozen fish products. *Food Chemistry*, 2018, 245, 196-204.

Impact Factor: 4,529 (2017)

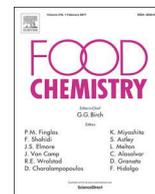
Gegenstand der dritten Publikation war die Produktklasse der panierten und vorgebratenen, tiefgekühlten Fischerzeugnisse. Der Kernprozess bei der industriellen Herstellung dieser Produkte stellt das Vor-Frittieren in raffinierten Speiseölen dar. Es wurde angenommen, dass bei gleichzeitiger Anwesenheit einer salzhaltigen Matrix, wie sie zum Beispiel in der Panade dieser Fischerzeugnisse vorkommt, sowie hohen Temperaturen und Lipiden beim Vor-Frittieren eine Bildung von MCPD-E und G-E möglich ist.

Das Ziel dieser Arbeit lag deshalb darin, die bedeutendsten Einflussfaktoren auf die Bildung von MCPD-E und G-E bei der Herstellung von panierten und vorgebratenen, tiefgekühlten Fischerzeugnissen zu identifizieren. Hierfür wurden verschiedene produkt- und prozessbasierte Parameter untersucht. Sie umfassten den Einfluss verschiedener Konzentrationen an NaCl sowie des Emulgators MAG/DAG in der Nasspanade der Produkte. Weiterhin wurde der Einfluss der Erhitzungsdauer des Frittieröls, der Frittierdauer und der Temperatur geprüft.

In einem zweiten Teil dieser Publikation wurden potentielle Minimierungsstrategien für MCPD-E und G-E in panierten und vorgebratenen, tiefgekühlten Fischerzeugnissen dargestellt und diskutiert. Hierfür wurden Langzeit-Frittierversuche über einen Zeitraum von zehn Tagen durchgeführt. Die Reduktionsansätze umfassten die Zugabe von Adsorptionsmittel zum Frittieröl, die Filtration des Frittieröls nach dem Frittier-Vorgang sowie den Zusatz von L-Cystein zur Nasspanade der Produkte.

Zusätzlich zu der Analyse der MCPD-E- und G-E-Gehalte wurden die TPM-Gehalte und Farbintensitäten der Frittieröle analysiert. Ein möglicher Zusammenhang zwischen den Schnellmethoden zur Analyse der Fettqualität beim Frittieren sowie den MCPD-E- und G-E-Gehalten wurde untersucht, um Screening-Methoden ableiten zu können.

Eigenanteil: 35%



Mitigation strategies for ester bound 2-/3-MCPD and esterified glycidol in pre-fried breaded and frozen fish products



Sybille Merkle^a, Ute Ostermeyer^b, Sascha Rohn^c, Horst Karl^b, Jan Fritsche^{b,*}

^a Faculty of Life Sciences, Food Science, Hamburg University of Applied Sciences, Ulmenliet 20, 21033 Hamburg, Germany

^b Department of Safety and Quality of Milk and Fish Products, Max Rubner-Institut, Federal Research Institute for Nutrition and Food, Hermann-Weigmann-Str 1, 24103 Kiel, Germany

^c University of Hamburg, Hamburg School of Food Science, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany

ARTICLE INFO

Chemical compounds studied in this article:

2-MCPD (PubChem CID: 10337)

3-MCPD (PubChem CID: 7290)

glycidol (PubChem CID: 5460455)

Keywords:

MCPD ester

Glycidyl ester

Fish fingers

Pre-frying oil

Adsorbent material

ABSTRACT

Pre-frying of chloride-containing raw materials (e.g., breaded frozen fish products) can lead to the formation of fatty acid esters of 2-monochloropropane-1,3-diol, 3-monochloropropane-1,2-diol (MCPD-E), and glycidol (G-E). The aim of the present study was to identify relevant parameters for the formation of these process contaminants during the pre-frying. Secondly, several mitigation approaches have been investigated.

The major proportion of the MCPD-E and G-E in the fish products resulted from the pre-frying oil absorbed, while the temperature and the heating period of the pre-frying oil showed the strongest impact. A significant reduction of the MCPD-E content in the pre-frying oil was achieved by filtering-off solid breaded particles. Additionally, the G-E content decreased resulting from the use of adsorbent materials. Moreover, the analyses of total polar material and the color intensity of the pre-frying oil are suggested as screening methods for estimating the MCPD-E and G-E contents in the fish products.

1. Introduction

Fish and seafood are important foodstuffs with growing global demand as they meet many nutritional needs of humans. The European Union (EU) is the leading trader of fishery and aquaculture products in the world with regard to value. In 2015, the trade flow was in total 49.3 billion EUR and 13.8 million tons, while the main products imported in the EU are frozen or prepared meals. The per capita fish consumption in the EU was 25.5 kg in 2014. A general positive trend in fish consumption can be observed in all member states of the EU (EUMOFA, 2016). In Germany, the best-selling fish products are preserves and marinades (28% market share) as well as frozen fish (26% market share). Moreover, there is a rising demand in convenience products such as pre-fried breaded and frozen fish products (e.g., fish fingers). The total production volume of frozen fish products in Germany in the year 2015 amounted 208,667 tons product weight (FIZ, 2016).

The main steps of industrial fish finger production represent the

breeding and short pre-frying of fish portions in refined edible oils. Meanwhile, the raw fish core remains frozen. The breeding usually contains 3.5–4.0% sodium chloride (NaCl). Thus, pre-fried breaded and frozen fish products are intrinsically predestined for the formation of fatty acid esters of 2-monochloropropane-1,3-diol (2-MCPD-E), 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD-E), and glycidol (G-E) during the pre-frying (Svejkovská et al., 2004). 3-Monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) is a processing contaminant belonging to the group of chloropropanols. Investigations have shown that 3-MCPD in food is occurring not only in its free form, but also as mono- or di-esters of fatty acids in refined oils and fats (Svejkovská et al., 2004; Zelinková, Velíšek, & Doležal, 2006). Further identified analogous compounds that are supposed to be generated during the deodorization of edible oils are G-E (Weißenhaar & Perz, 2010) and 2-MCPD-E (Kuhlmann, 2011). Recent studies showed that 2- and 3-MCPD-E (MCPD-E) as well as G-E are cleaved completely in the gastrointestinal tract, causing a release of free 2-monochloropropane-1,3-diol (2-MCPD), 3-MCPD, and glycidol,

Abbreviations: 2-MCPD, 2-monochloropropane-1,3-diol; 2-MCPD-E, fatty acid esters of 2-monochloropropane-1,3-diol; 3-MCPD, 3-monochloropropane-1,2-diol; 3-MCPD-E, fatty acid esters of 3-monochloropropane-1,2-diol; AOCS, American Oil Chemists' Society; DAG, diacylglyceride; DGF, German Society for Fat Science; EFSA, European Food Safety Authority; EU, European Union; EUMOFA, European Market Observatory for Fisheries and Aquaculture Products; FEDIOL, Federation representing the European Vegetable Oil and Proteinmeal Industry in Europe; G-E, fatty acid esters of glycidol; IARC, International Agency for Research on Cancer; JECFA, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives; LOQ, limit of quantification; MAG, monoacylglyceride; NaCl, sodium chloride; n.c., no correlation; n.a., not analyzed; RO, rapeseed oil; SCF, Scientific Committee on Food; SO, sunflower oil; TS, test series; TAG, triacylglyceride; TDI, tolerable daily intake; TPM, total polar material

* Corresponding author.

E-mail addresses: Sybille.Merkle@haw-hamburg.de (S. Merkle), Ute.Ostermeyer@mri.bund.de (U. Ostermeyer), Rohn@chemie.uni-hamburg.de (S. Rohn), Horst.Karl@mri.bund.de (H. Karl), Jan.Fritsche@mri.bund.de (J. Fritsche).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.076>

Received 26 June 2017; Received in revised form 7 September 2017; Accepted 12 October 2017

Available online 14 October 2017

0308-8146/ © 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

respectively (Abraham et al., 2013). The *International Agency for Research on Cancer* (IARC) has classified 3-MCPD as a “possible human carcinogen” (group 2B) and glycidol as “probably carcinogenic to humans” (group 2A) (IARC, 2000, 2012). From the toxicological perspective, only limited information is available about possible impacts on human health by 2-MCPD or 2-MCPD-E (EFSA, 2016).

The *Scientific Committee on Food* (SCF) and the *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA) have established a tolerable daily intake (TDI) of 2 µg/kg body weight for free 3-MCPD (JECFA, 2002, 2007). In 2016, the *European Food Safety Authority* (EFSA) published a collection of 7.175 data for free and esterified 2- and 3-MCPD and glycidyl esters in food (EFSA, 2016). The Panel on Contaminants in the Food Chain concluded that a TDI of 0.8 µg/kg body weight would be suitable for free and esterified 3-MCPD (EFSA, 2016).

During refining of crude oils, the deodorization process at high temperatures (250–270 °C) is supposed to have the major impact on the formation of MCPD-E and G-E (Destailats, Craft, Sandoz, & Nagy, 2012). Mono- and diacylglycerides (MAG/DAG) as well as triacylglycerides (TAG) are considered as responsible lipid precursors for the formation of MCPD-E and G-E (Destailats, Craft, Dubois, & Nagy, 2012; Freudenstein, Weking, & Matthäus, 2013). Moreover, in model studies it was shown that the NaCl concentration, the water content, and the pH-value can have an additional impact on the formation of MCPD-E and G-E in refined edible oils (Freudenstein et al., 2013; Li et al., 2016; Zhou, Jin, Wang, & Xu, 2014). Findings of elevated MCPD-E and G-E concentrations in refined vegetable oils/fats and foodstuffs accelerated the development of several mitigation strategies (i.e., Matthäus, Pudiel, Fehling, Vosmann, & Freudenstein, 2011; Strijowski, Heinz, & Franke, 2011; Zulkurnain, Lai, Tan, Abdul Latip, & Tan, 2013) and research on their formation mechanisms (i.e., Craft & Nagy, 2012; Freudenstein et al., 2013; Li et al., 2016; Shimizu, Weitkamp, Vosmann, & Matthäus, 2013). Recently, the Federation representing the *European Vegetable Oil and Proteinmeal Industry* (FEDIOL) published a review on mitigation strategies which can be applied at different stages of the oil refining process to reduce MCPD-E and G-E (FEDIOL, 2015). One mitigation strategy includes the application of adsorbent materials, which are able to remove MCPD-E and G-E from the refined oils and fats, subsequently. Nine different inorganic adsorbent materials in a concentration of 10% in the oil were tested in order to remove 3-MCPD-E and G-E from refined palm oil (Strijowski et al., 2011). Two of these materials, a calcinated zeolite powder (< 1% water) and a synthetic magnesium silicate, were most successful to reduce the contents of G-E up to 40% (Strijowski et al., 2011). 3-MCPD-E was reduced by the zeolite to a smaller extent. Zeolite, an aluminium silicate, serves as a molecular sieve composed of microporous solids (Worch, 2012). No adverse effects were detected for this material with respect to sensory properties and oxidative stability of the palm oil after the treatment (Strijowski et al., 2011).

Several studies on the formation of MCPD-E and G-E during deep-fat frying processes are published (i.e., Aniołowska & Kita, 2016; Ariseto et al., 2017; Calta et al., 2004; Dingel & Matissek, 2015; Hamlet et al., 2014; Wong et al., 2017). Influence factors such as temperature, time, and the NaCl content in fried products were investigated (Aniołowska & Kita, 2016; Wong et al., 2017; Zhou et al., 2014). Only few mitigation studies for MCPD-E and G-E in food groups, other than edible oils and fats, have been carried out, so far. The positive influence of the reduction of NaCl and temperature during baking of biscuits was shown (Dingel & Matissek, 2015; Mogol, Pye, Anderson, Crews, & Gökmen, 2014). However, for free MCPD Velíšek, Calta, Crews, Hasnip, and Doležal (2003) showed that L-cysteine reduced MCPD formation in a model mixture, containing NaCl and glycerol. The amino acid L-cysteine either occurs naturally in food or is commonly used as a food additive e.g., as baking ingredient. It was stated that the reaction of 3-MCPD with L-cysteine in neutral media leads predominantly to the formation of S-(2,3-dihydroxypropyl)cysteine. Reactions of 3-MCPD with L-cysteine and other thiols may explain, at least

partly, the absence of 3-MCPD (Velíšek et al., 2003).

Up to now, no studies regarding the pre-frying process of pre-fried breaded and frozen fish products were published. Only limited data are available on the occurrence of MCPD-E and G-E in fish and fish products (EFSA, 2013, 2016). As pre-fried breaded and frozen fish products are preferred foodstuffs especially by children, they should be carefully monitored regarding their nutritional quality.

The aim of this study was to assess influence factors responsible for the formation of MCPD-E and G-E during the pre-frying process of breaded frozen fish products. For that purpose product- (content of NaCl and of MAG/DAG in the breading) and process-based parameters (heating period, pre-frying time and temperature) were investigated. Secondly, several mitigation approaches including the application of a calcinated zeolite powder in the pre-frying oil as well as the supplementation of L-cysteine to the breading of the fish products were conducted. A further potential mitigation approach was based on recommendations for deep-frying procedures (Rossell, 2001). During pre-frying solid particles of the breading release from the fish product, accumulate in the pre-frying oil and remain there for the entire heating period (Rossell, 2001). Therefore, the effect of filtering-off solid breading particles from the pre-frying oil was investigated in order to assess that approach with respect to potentially decreased contents of MCPD-E and G-E in pre-fried breaded and frozen fish products.

Due to possible transformation reactions of MCPD-E and G-E, their analysis methods are carefully to handle and therefore, often time-consuming (EFSA, 2016). The analysis of total polar material (TPM) and color are comparatively fast and simple methods for estimating fat degradation. Consequently, correlations of TPM and color with MCPD-E and G-E contents in the pre-frying oils were investigated, in order to establish fast screening methods for the estimation of the MCPD-E and G-E contents in pre-frying oils used for the industrial processing of pre-fried breaded and frozen fish products.

2. Material and methods

2.1. Material and methods for investigating the effects of process- and product-based parameters in pre-fried breaded and frozen fish products

In total 11 test series (TS) were performed to identify different influence factors responsible for the formation of MCPD-E and G-E in pre-fried breaded and frozen fish products (Table 1). For TS 1.1–1.8, comprising the investigation of the pre-frying oil, salinity of the breading, pre-frying time and temperature with regard to the heating period of the pre-frying oil, fish fingers in form of pre-fried breaded and frozen fish fillet portions were prepared. The fish fingers were produced according to a standard industrial recipe containing double-frozen Alaska pollock fillet (65% per fish finger) and the breading (35% per

Table 1
Parameter settings in the test series (TS) 1.1–1.11 intended for investigating the effects of process- and product-based parameters. SO means sunflower oil, RO means rapeseed oil.

Test series	Pre-frying oil	Temperature [°C]	Time [s]	NaCl [% in wet breading]	MAG/DAG [% in wet breading]	Heating period [h]
1.1	SO	185	25	0.16	–	1, 4, 7
1.2	SO	185	40	0.16	–	1, 4, 7
1.3	SO	185	25	1.50	–	1, 4, 7
1.4	SO	185	40	1.50	–	1, 4, 7
1.5	SO	200	25	0.16	–	1, 4, 7
1.6	SO	200	40	0.16	–	1, 4, 7
1.7	SO	200	25	15.00	–	1, 4, 7
1.8	SO	200	40	15.00	–	1, 4, 7
1.9	RO	195	34	3.90	–	1, 4, 7
1.10	RO	195	34	3.90	3	1, 4, 7
1.11	RO	195	34	3.90	5	1, 4, 7

Table 2
Parameter settings in the test series (TS) 2.1–2.6 intended for conducting the mitigation trials. All TS were performed using rapeseed oil (RO). Pre-frying temperature and time was 195 °C and 34 s for each TS, respectively.

Test series	NaCl [% in wet breadings]	Adsorbent material [% in pre-frying oil]	Physical filtration of the pre-frying oil after each pre-frying process	L-cysteine [% in dry breadings]	Heating period [h]
2.1	1.9	-	-	-	0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60
2.2	1.9	9	-	-	0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60
2.3	1.9	-	-	-	0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60
2.4	1.9	-	yes	-	0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60
2.5	-	-	-	-	0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60
2.6	-	-	-	0.08	0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60

fish finger), while the latter included 12% wet breadings (flour, starch and water), 14% dry breadings (without spices) and water. The NaCl content of the wet breadings was 0.16%, 1.5%, and 15%, respectively. A concentration of 15% NaCl in the wet breadings did not meet customer expectation (3.5–4.0%) anymore. Nevertheless, the latter test series were carried out as a worst-case scenario. TS 1.1–1.8 were performed using sunflower oil (SO). For the respective test series same oil batches were taken to guarantee comparable initial contents of MCPD-E and G-E in the pre-frying oil.

To investigate the effect of MAG/DAG in TS 1.9–1.11, fish fingers were produced containing NaCl in a concentration of 3.9% and a mixture of MAG/DAG (emulsifier E471, Troox International GmbH) of 0%, 3%, and 5% in the wet breadings, respectively. Test series 1.9–1.11 were conducted using rapeseed oil (RO). Rapeseed oil was used in addition to sunflower oil, because both oils are used usually as pre-frying oils in industrial pre-frying practice.

The production of the fish fingers followed a practical conventional manufacturing process. At first the pre-frying oil was heated to the desired temperature (185–200 °C). When the target temperature was reached, it was maintained for 1 h before the respective pre-frying process was started. The wet breadings were prepared by means of a rotor-stator homogenizer. The adjustment of the viscosity (15 s) was carried out in a ford cup (6 mm). 20 g frozen fish portions were sawed just before they were manually placed on the conveyor belt. The fish fingers were coated with a defined amount of wet and dry breadings before they entered the deep-frying tank. The speed of the conveyor belt was adjusted depending on the pre-frying time (25–40 s). After pre-frying, the pre-fried fish fingers were collected on a plate, where they were cooled to room temperature. In each test series, the first and the last produced 25 fish fingers were homogenized by means of a knife-mill (Grindomix GM200, Retsch GmbH, Haan, Germany), collected in a plastic bag and stored at –24 °C until analysis. Additionally, 100 mL pre-frying oil was sampled in glass bottles after each pre-frying process and stored at room temperature until analysis.

In TS 1.1–1.8, a total of 150 fish fingers were pre-fried under equal conditions for each pre-frying process by means of a lab-scale fryer containing a deep-frying tank with a filling capacity of 50 L pre-frying oil. The temperature of the oil and the NaCl concentration in the wet breadings were identical in each two similar conducted test series (TS 1.1+1.2, TS 1.3+1.4, TS 1.5+1.6 as well as TS 1.7+1.8). In TS 1.9–1.11, a total of 90 fish fingers were pre-fried by means of a gastro deep-fryer, containing a deep-frying tank with a filling capacity of 30 L pre-frying oil. The pre-frying temperature and time was adjusted at 195 °C and 34 s, respectively.

The test duration was 8 h a day (1 h for heating, up to 7 h heating period of the pre-frying oil). The pre-frying of fish fingers was performed after 1, 4, and 7 h, respectively. The parameter settings of TS 1.1–1.11 are shown in Table 1.

The effects of the different influence factors were evaluated by comparing the MCPD-E and G-E contents in the fish fingers and the respective pre-frying oils before and after each pre-frying process.

2.2. Material and methods for mitigation trials

Mitigation strategies aimed at studying the effect of an addition of pulverized zeolite adsorbent material to the pre-frying oil, as well as supplementing the breadings with L-cysteine. Additionally, the effect of filtering-off solid breadings particles from the pre-frying oil on the MCPD-E and G-E content was investigated.

For conducting the mitigation trials of adding an adsorbent material (TS 2.1+2.2) and physical filtration of the pre-frying oil (TS 2.3+2.4), commercial not pre-fried breaded and frozen fish portions were used. For the third mitigation trial, the breadings were supplemented with 0.08% L-cysteine (TS 2.5+2.6). The wet and dry breadings were prepared according to the standard recipe (Section 2.1), but without NaCl. Test series 2.1–2.6 were conducted using rapeseed oil. In TS 2.2 the pre-

frying oil was blended with 9% Köstrolith 13 XP-cac, a calcinated zeolite powder (Chemiewerk Bad Köstritz GmbH, Bad Köstritz, Germany). In TS 2.4 the pre-frying oil was filtered through a paper filter with a pore size of 20 µm after each pre-frying process.

Test series 2.1–2.6 were performed by means of two household fryers (electric fryer RCTF-13DH, Royal Catering, Zielona Góra, Poland) containing deep-frying tanks with a filling capacity of eight liters pre-frying oil, respectively. Six fish portions were pre-fried per pre-frying procedure by means of a basket. The duration per TS was 60 h with a heating period of the pre-frying oil of 6 h per day. One pre-frying procedure was performed each day.

After pre-frying, all fish portions were homogenized by means of a knife-mill and deep frozen at -24°C until analysis. Additionally, 100 mL pre-frying oil was sampled in glass bottles after each pre-frying process and stored at room temperature until analysis. The parameter settings of TS 2.1–2.6 are shown in Table 2.

2.3. Determination of MCPD-E and G-E

The determination of MCPD-E and G-E in the breaded and pre-fried frozen fish products as well as in the corresponding pre-frying oils, were conducted according to the modified *American Oil Chemists' Society* (AOCS) method Cd 29b-13 (Karl, Merkle, Kuhlmann, & Fritsche, 2016). For the analysis of MCPD-E and G-E, a sample amount of 0.5 g of the homogenized fish product or the pre-frying oil was taken. After addition of the isotopic labeled internal standards 2-MCPD- d_5 and 3-MCPD- d_5 to an assay A and 2-MCPD- d_5 ester, 3-MCPD- d_5 ester and glycidyl- d_5 ester to an assay B, the homogenates were extracted using diethyl ether and sonicated for 15 min. The following alkaline hydrolysis was conducted by adding methanolic sodium hydroxide solution and keeping the mixtures at -22 to -25°C for 16 h. By adding an acidified sodium bromide solution, the ester cleavage reaction was stopped, whereby the released glycidol was transformed to 3-MBPD. After washing the samples with hexane (three times) and a mixture of diethyl ether/ethyl acetate, a phenylboronic acid solution was added to achieve derivatization and the samples were analyzed by GC-MS (Karl et al., 2016). A HP 7890A GC system with 5975C mass selective detector, a Gerstel split/splitless PTV injection system, and a Restek Rxi117 GC column (30 m, id: 0.25 mm, film thickness: 0.25 µm with pre-column: Agilent J & W GC column, HP-5MS, 2.4 m, id: 0.32 mm, film thickness: 0.25 µm) were used. Carrier gas was helium 4.6 with a constant flow of 1.4 mL/min. Two microliters sample were injected in pulsed splitless mode (injection pulse pressure: 25 psi), purge flow: 3 mL/min; 50 mL/min after 1 min. PTV temperature program: 80°C , with 10°C/s to 165°C , 10 min isothermal, with 10°C/s to 320°C , 10 min isothermal. GC oven temperature program: 100°C , isothermal 0.5 min, with 5°C/min to 165°C , isothermal 6.5 min with 20°C/min to 210°C , isothermal 7.48 min. The temperature of the transfer-line was 280°C , the temperature of the ion source was 230°C , and the temperature of the quadrupole was 150°C .

The quantification was carried out according to the modified AOCS method Cd 29b-13 (Karl et al., 2016). 2-MCPD, 3-MCPD, and glycidol were quantified by multiplying the ratio of the signal areas of the analytes and the corresponding isotopic labeled internal standards 2-MCPD- d_5 , 3-MCPD- d_5 and glycidol- d_5 (AOCS, 2013; Kuhlmann, 2011). The limit of quantification (LOQ) for this method was $20\ \mu\text{g/kg}$ 2- and 3-MCPD-E and G-E, for both pre-frying oils, fish products with regard to their fat content and wet weight of the fish products (Karl et al., 2016). A continuous investigation of an internal reference material consisting of smoked sprat (1/3) and fish fingers (2/3) was carried out.

2.4. Color measurement

There is no official validated method for analyzing the color intensity of pre-frying oil. During pre-frying, the color of the pre-frying oil turned brownish. Brown pigments occurring in the Maillard reaction

are determined by spectrophotometric measurement at 420 nm (Dissaraphong, Benjakul, Visessanguan, & Kishimura, 2006). Based on these facts, the absorbance of undiluted or in heptane 1:10 (w/w) diluted pre-frying oil samples were measured spectrophotometrically at 420 nm (blank value heptane, 1 cm cuvettes), in order to determine the color intensity.

2.5. Determination of total polar material

The total polar material (TPM) values in the pre-frying oils were gravimetrically determined by the German Society for Fat Science (DGF) standard method C-III 3e (06) (DGF, 2013). For the analysis, a solution of 1.0 g pre-frying oil in toluene was given onto a micro silica gel column. The non-polar compounds were eluted with a mixture of isooctane/di-isopropyl ether (85:15, v:v), evaporated, and weighed. The difference between the weight of the sample and the non-polar fraction corresponds to the total polar material.

2.6. Fat content

The fat content of the fish products was determined according to a modified method according to Smedes (Karl et al., 2012). The homogenized fish sample was extracted with a mixture of cyclohexane and isopropyl alcohol. After addition of water, the fat-containing organic phase was separated, evaporated, dried, and weighed.

2.7. Statistical evaluation

The data are presented as means \pm standard deviations. Each analytical measurement was conducted in twice (color intensity, TPM, and fat content) or fourfold (MCPD-E and G-E). For this purpose an ANOVA followed by post hoc *t*-test according to Tukey and Bonferroni was calculated using the XLSTAT 2011.2.02 software. A significance level of $\alpha = 0.05$ was applied. ANOVA was applied for testing significant differences of 3-MCPD-E, 2-MCPD-E, and G-E, respectively, between the TS 1.1–1.11, TS 2.1+2.2, TS 2.3+2.4, and 2.5+2.6 in both, the fish products and pre-frying oils. Regression analysis (*r* values) was designated using Microsoft Excel 2010. Correlations of 3-MCPD-E, 2-MCPD-E, and G-E contents in the pre-frying oils with the absorbance at 420 nm (TS 1.1–1.11) as well as the TPM values (TS 1.1–2.4) at heating periods of the pre-frying oil of 1, 4, and 7 h (TS 1.1–1.11) or 1, 6, and 30 h (TS 2.1–2.4) were analyzed.

3. Results and discussion

3.1. Effect of the pre-frying oil on the formation of MCPD-E and G-E in fish fingers

Table 3 shows the average contents of 3-MCPD-E, 2-MCPD-E, and G-E in the fish fingers with regard to their fat content as well as the contents in the pre-frying oils sampled during test series 1.1–1.11. When referring to the MCPD-E and G-E contents in the fat of the fish fingers, they showed hardly any significant differences ($p < 0.05$) compared to the MCPD-E and G-E contents in the pre-frying oils (Table 3). Moreover, high correlations ($r = 0.92$ – 1.00) were found between MCPD-E contents in fish fingers with regard to their fat content and MCPD-E in the pre-frying oil. In Appendix A, this correlation in TS 1.3+1.4 (185°C , 1.5% NaCl concentration in the wet breading) is shown exemplarily. Considering these results, it is reasonably suggested that the MCPD-E and G-E content in fish fingers reflects mainly the MCPD-E and G-E content of the pre-frying oil.

A comparable investigation was conducted by Dingel and Matissek (2015). They examined whether 3-MCPD-E or G-E could be endogenously formed during the deep-frying process of potato crisps. The samples were fried at 160 – 188°C for 100 – 200 s, reaching a heating period of the deep-frying oil of 24 h. They determined the 3-MCPD-E

Table 3
 Content of MCPD-E and G-E in fish fingers with regard to their fat content, and in the corresponding pre-frying oils (Test series 1.1–1.11) as well as absorbance at 420 nm and TPM values [%] of the pre-frying oils. ^aValues are represented as means of fourfold analyses ± relative standard deviation. Significant differences were calculated for 3-MCPD-E, 2-MCPD-E and G-E between different TS, respectively. Values in the same column and in the same line that do share a common superscript letter are not significantly different ($p < 0.05$).

Test series (TS)	Heating period [h]	Fat content in fish fingers [%]	Absorbance (420 nm)	TPM [%]	2-MCPD-E ^a		3-MCPD-E ^a		2-MCPD-E ^a		G-E ^a	
					[µg/kg fat in fish fingers]	[µg/kg pre-frying oil]	[µg/kg fat in fish fingers]	[µg/kg pre-frying oil]	[µg/kg fat in fish fingers]	[µg/kg pre-frying oil]	[µg/kg fat in fish fingers]	[µg/kg pre-frying oil]
TS 1.1 + 1.2 (Sunflower oil, 185 °C, 0.16% NaCl)	1	8.5	0.17	2.8	413 ± 89.2 ^a	439 ± 83.9 ^a	125 ± 66.4 ^{kl}	122 ± 51.9 ^k	423 ± 98.7 ^{wx}	407 ± 39.3 ^w		
	4	8.6	0.18	2.5	475 ± 23.7 ^{ab}	452 ± 19.4 ^b	126 ± 23.7 ^k	131 ± 59.3 ^k	339 ± 57.2 ^w	355 ± 5.0 ^v		
	7	8.0	0.29	6.6	901 ± 115.8 ^c	912 ± 68.2 ^c	204 ± 73.0 ^{klm}	123 ± 6.6 ^k	364 ± 18.0 ^w	334 ± 4.0 ^{wx}		
TS 1.3 + 1.4 (Sunflower oil, 185 °C, 1.5% NaCl)	1	7.2	0.17	4.5	502 ± 44.4 ^b	609 ± 116.2 ^b	160 ± 10.0 ^l	187 ± 24.7 ^l	393 ± 28.3 ^x	348 ± 3.9 ^{wx}		
	4	6.7	0.23	6.3	1001 ± 52.7 ^c	941 ± 37.2 ^c	262 ± 24.1 ^m	237 ± 13.4 ^m	384 ± 48.6 ^x	324 ± 5.7 ^{yx}		
	7	6.8	0.34	12.2	1776 ± 74.6 ^d	1329 ± 14.1 ^m	468 ± 24.0 ^o	360 ± 4.7 ^d	393 ± 28.3 ^x	329 ± 2.6 ^z		
TS 1.5 + 1.6 (Sunflower oil, 200 °C, 0.16% NaCl)	1	8.9	0.16	4.6	508 ± 65.2 ^{abc}	411 ± 3.8 ^a	201 ± 54.8 ^l	146 ± 0.7 ^l	346 ± 91.4 ^w	425 ± 80.4 ^w		
	4	8.1	0.26	7.0	2049 ± 121.6 ^k	1390 ± 24.6 ⁿ	603 ± 32.3 ^a	420 ± 2.1 ^e	405 ± 49.6 ^{wx}	389 ± 1.3 ^w		
	7	7.5	0.61	12.4	4050 ± 271.0 ^l	3037 ± 49.2 ^l	1355 ± 125.0 ^b	1052 ± 0.4 ^f	480 ± 87.7 ^{wx}	350 ± 7.7 ^w		
TS 1.7 + 1.8 (Sunflower oil, 200 °C, 15% NaCl)	1	8.2	0.15	2.7	639 ± 111.6 ^c	611 ± 25.8 ^{bc}	158 ± 30.1 ^k	160 ± 49.3 ^k	429 ± 75.3 ^{wx}	374 ± 2.1 ^w		
	4	8.4	0.19	8.0	1695 ± 81.4 ^d	1590 ± 50.5 ^d	491 ± 81.4 ^o	358 ± 84.2 ^o	491 ± 66.5 ^{yz}	355 ± 7.1 ^w		
	7	8.3	0.29	9.5	2491 ± 216.6 ^l	2828 ± 207.6 ^l	1093 ± 70.9 ^p	1069 ± 55.5 ^p	578 ± 29.6 ^{yz}	392 ± 15.7 ^{wz}		
TS 1.9 (Rapeseed oil, 195 °C, 3.9% NaCl, 0% MAG/DAG)	1	7.7	0.03	1.0	264 ± 17.9 ^f	174 ± 9.4 ^o	128 ± 17.2 ⁿ	100 ± 0.1 ^q	118 ± 15.3 ^b	82 ± 16.9 ^l		
	4	7.7	0.05	2.9	463 ± 22.9 ^g	363 ± 17.4 ^j	200 ± 11.4 ⁿ	175 ± 0.0 ⁿ	127 ± 6.2 ^b	118 ± 1.0 ^b		
	7	7.7	0.07	6.7	391 ± 52.8 ^g	320 ± 19.3 ^g	196 ± 12.9 ^{nr}	180 ± 2.8 ^r	144 ± 34.8 ^{bc}	143 ± 0.4 ^e		
TS 1.10 (Rapeseed oil, 195 °C, 3.9% NaCl, 3% MAG/DAG)	1	7.9	0.02	1.4	290 ± 33.4 ^f	255 ± 12.0 ^f	119 ± 1.9 ^s	116 ± 0.5 ^s	112 ± 1.1 ^{bc}	97 ± 2.6		
	4	7.9	0.03	4.0	506 ± 49.2 ^{gh}	436 ± 43.5 ^h	194 ± 2.8 ⁿ	175 ± 0.2 ^g	135 ± 19.5 ^{bk}	110 ± 0.2 ^k		
	7	7.9	0.05	7.1	589 ± 49.3 ^h	553 ± 53.4 ^h	231 ± 7.3 ^t	242 ± 7.2 ^t	122 ± 8.1 ^{bc}	127 ± 0.5 ^l		
TS 1.11 (Rapeseed oil, 195 °C, 3.9% NaCl, 5% MAG/DAG)	1	8.5	0.02	1.1	295 ± 17.7 ^f	222 ± 12.4 ^p	129 ± 1.8 ^c	109 ± 0.2 ^h	101 ± 7.3 ^c	77 ± 0.5 ^d		
	4	8.5	0.04	5.3	425 ± 30.5 ^{gl}	370 ± 33.9 ^l	168 ± 5.7 ^u	152 ± 2.4 ^u	105 ± 1.9 ^c	113 ± 3.8 ^k		
	7	8.5	0.07	7.6	513 ± 28.0 ^h	475 ± 58.0 ^h	208 ± 2.1 ^v	223 ± 61.6 ^v	117 ± 2.1 ^{nm}	118 ± 1.2 ^m		

and G-E contents in both, the deep-frying oils (high oleic sunflower oil) and the corresponding potato crisps and identified no significant differences ($p < 0.05$). Therefore they concluded that 3-MCPD-E and G-E were a result of carry over effect and no endogenous formation occurred during deep-frying of potato crisps (Dingel & Matissek, 2015). Arisseto et al. (2017) confirmed this hypothesis by deep-frying experiments using different foodstuffs (banana, potato, cassava, onion, garlic, corn flour, rice, and meat) at 160–190 °C for 2–9 min, depending on the product.

During pre-frying, heat is transferred from the oil to the breaded frozen fish product (fish finger), water is evaporated from the product and oil is absorbed. In fact, a remarkable part of approximately 8% of the pre-frying oil is taken up by the fish fingers (Table 3). Due to the fact that MCPD-E and G-E may occur in relatively high amounts in refined edible oil, the MCPD-E and G-E content of the pre-frying oil might greatly influence the content of MCPD-E and G-E in fish fingers.

Significant higher MCPD-E and G-E contents ($p < 0.05$) in the fish fingers with regard to their fat content compared to the contents in the pre-frying oil could be observed in TS 1.3+1.4 (185 °C, 1.5% NaCl concentration in the wet breading) after a heating period of seven hours. A similar result was observed in TS 1.5+1.6 (200 °C, 0.16% NaCl concentration in the wet breading) after heating periods of four and seven hours, respectively. These results suggest that the pre-frying temperature in combination with the heating period of the pre-frying oil have a strong effect on the formation of MCPD-E and G-E in fish fingers.

3.2. Effect of process- and product-based parameters on the formation of MCPD-E and G-E in fish fingers

The effect of relevant process- and product-based parameters including the content of NaCl and of MAG/DAG in the wet breading, the pre-frying time and temperature in combination with the heating period of the pre-frying oil were examined. At the beginning of each test series (before the pre-frying process), the MCPD-E and G-E contents of the fish fingers were below the limit of quantification ($< 20 \mu\text{g}/\text{kg}$). Therefore, it can be assumed that fish fingers contained negligible contents of MCPD-E and G-E prior to their processing.

Concerning the pre-frying temperature, significant differences in MCPD-E contents ($p < 0.05$) were measured in TS 1.1+1.2 (185 °C) and 1.5+1.6 (200 °C) after heating the pre-frying oil for four and seven hours (Table 3). Based on these experiments, it is reasonably assumed that there is a considerable effect of the pre-frying temperature and the heating period of the pre-frying oil on the formation of MCPD-E in fish fingers. The effect of the heating period of the pre-frying oil on the formation of MCPD-E could be observed for all test series 1.1–1.11. With exception of TS 1.1+1.2, there was a significant increase ($p < 0.05$) of both 2- and 3-MCPD-E between heating periods of one and seven hours.

Many studies have shown a positive correlation between the formation of 3-MCPD-E and increased temperature in edible oils and fats (Li et al., 2016; Zhou et al., 2014) and other foods (Calta et al., 2004; Hamlet et al., 2014; Mogol et al., 2014). It was reported that the formation of 3-MCPD-E and G-E is based on different formation reactions comprising a chloride source and partial acylglycerides. 3-MCPD-E were suggested to be formed at temperatures above 180 °C by nucleophilic substitution whereby triacylglycerides are assumed to be predominant precursors (Destailats, Craft, Sandoz, et al., 2012). G-E are formed from mono- and diacylglycerides to a higher degree at temperatures above 200 °C (Destailats, Craft, Dubois, et al., 2012). Due to the applied pre-frying temperatures (185–200 °C) in the present study, hardly any significant increase of the G-E contents in all test series was observed (Table 3). The contents of G-E in fish fingers varied between 339 and 480 $\mu\text{g}/\text{kg}$ fat in fish fingers in all TS (1.1–1.8) with the exception of TS 7 (429–578 $\mu\text{g}/\text{kg}$ fat in fish fingers).

Moreover, comparing 2- and 3-MCPD-E contents in Table 3, it was

observed that the 2-MCPD-E contents were markedly lower than the 3-MCPD-E contents in all test series. Calta et al. (2004) studied the formation of 3-MCPD in model systems consisting of glycerol, triolein, soy lecithin and NaCl. They also observed that under defined test conditions (200 °C, 30 min) approximately six time lower 2-MCPD contents were formed compared to 3-MCPD.

To evaluate the effect of the NaCl on the formation of MCPD-E and G-E in fish fingers, test series with different NaCl concentration were conducted. Significantly higher contents ($p < 0.05$) were identified for MCPD-E after heating periods of four and seven hours in TS 1.3+1.4 compared to TS 1.1+1.2 (Table 3). Based on these results, an effect of the NaCl on the formation of MCPD-E in fish fingers was suggested. However, hardly any effect was observed comparing TS 1.5+1.6 (0.16% NaCl) and 1.7+1.8 (15% NaCl) (Table 3). In summary, no consistent effect of NaCl concentration on the formation of MCPD-E and G-E was found under the examined conditions.

The effect of NaCl on the formation of MCPD-E in food was also investigated by other researchers (Calta et al., 2004; Freudenstein et al., 2013; Hamlet et al., 2014; Kuhlmann, 2011; Li et al., 2016; Mogol et al., 2014; Shimizu et al., 2013; Wong et al., 2017). Wong et al. (2017) recently investigated the influence of four different NaCl concentrations (0%, 1%, 3%, and 5%) in deep-fried potato chips. They observed that higher concentrations of NaCl lead to significantly higher ($p < 0.05$) 3-MCPD-E contents in the potato chips. However, several researchers (Calta et al., 2004; Freudenstein et al., 2013; Li et al., 2016) suggested a limited dose-response of 3-MCPD-E and G-E formation and NaCl content in deep-fried foods probably due to the poor solubility of NaCl in oils. This might explain the similar MCPD-E contents of the pre-frying oil of TS 1.5+1.6 and of TS 1.7+1.8.

Comparing the results of test series differing in their pre-frying time of 25 s and 40 s (TS 1.1+1.2, 1.3+1.4 and 1.5+1.6), no significant differences were observed for either MCPD-E or G-E. This is probably due to the short pre-frying time of the pre-frying process (data not shown).

The effect of mono- and diacylglycerides (emulsifier E471) on the formation of MCPD-E and G-E was investigated in TS 1.9–1.11 (Table 3) comprising MAG/DAG concentrations of 0% (TS 9), 3% (TS 10) and 5% (TS 11) emulsifier in the wet breading, respectively. After seven hours heating period of the pre-frying oil, a significant increase ($p < 0.05$) in 3-MCPD-E contents in both TS 1.10 and 1.11 compared to TS 1.9 was observed (Table 3). However, there were no significant differences ($p < 0.05$) between TS 1.10 and 1.11. Therefore it was suggested that the MAG/DAG concentrations of 3% and 5% in the wet breading led only to a moderate increase of 3-MCPD-E contents in the fish products. Correlations between MAG/DAG and 3-MCPD-E as well as G-E in model oil systems were also identified by several studies (Destailats, Craft, Dubois, et al., 2012; Freudenstein et al., 2013; Hamlet et al., 2014; Matthäus et al., 2011). Freudenstein et al. (2013) investigated the influence of MAG and DAG in model palm oil under heating the mixture to 240 °C for 2 h. Both, 3-MCPD-E and G-E contents were found to increase after adding MAG and DAG to the oil. Moreover, they observed a high correlation between MAG/DAG and 3-MCPD-E contents ($r = 0.9960$).

3.3. Mitigation trials of MCPD-E and G-E

Based on the results that the major proportion of MCPD-E and G-E content in fish fingers was absorbed from the pre-frying oil (Section 3.1), mitigation trials were applied with regard to the reduction of the process contaminants in the pre-frying oil during the pre-frying process.

3.3.1. Addition of an adsorbent material to the pre-frying oil

In pre-tests, two different calcinated zeolites (Köstrolith 13 XP-cac powder, Köstrolith granular) with different concentrations including 4% and 9%, respectively, were compared regarding their reduction potential for MCPD-E and G-E in pre-frying oils. The application of

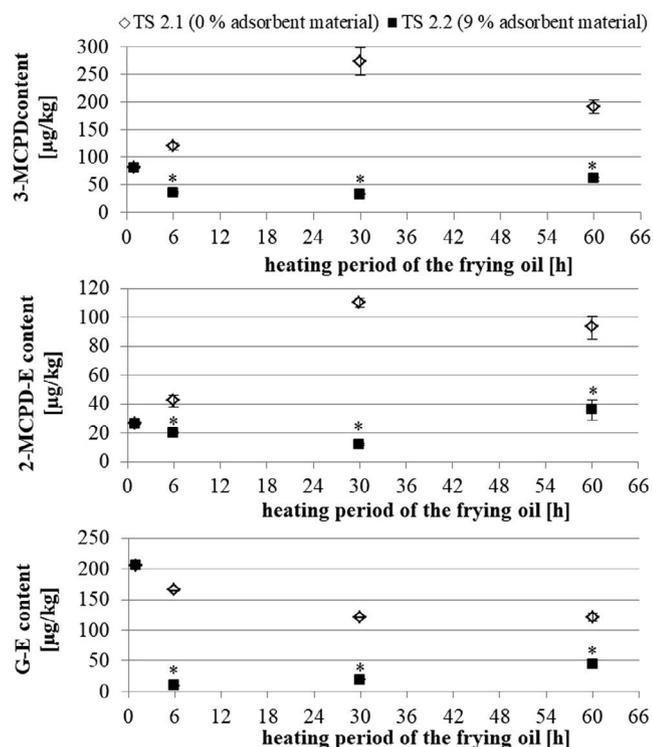


Fig. 1. Comparison of MCPD-E and G-E contents in the pre-frying oil (RO) used in test series (TS) 2.1 (untreated pre-frying oil) and 2.2 (pre-frying oil which was blended with 9% Köstrolith 13 XP-cac powder) depending on the heating period of the pre-frying oil. Values are represented as means of fourfold analyses \pm relative standard deviation. Significant differences were calculated for 3-MCPD-E, 2-MCPD-E and G-E at different heating periods, respectively. Values marked with an asterisk are significantly different ($p < 0.05$).

Köstrolith 13 XP-cac powder in a concentration of 9% achieved the highest mitigation potential for MCPD-E and G-E (data not shown). A strong dependency on the concentration, comparing 2%, 4%, 6%, 8%, and 10%, was also observed by Strijowski et al. (2011). Furthermore, they observed an independency of reduction properties of the zeolite considering a temperature range of 60–120 °C.

Fig. 1 displays the MCPD-E and G-E contents in the untreated pre-frying oil (TS 2.1) compared to contents in the pre-frying oil which was blended with 9% Köstrolith 13 XP-cac powder (TS 2.2) and heated for 60 h at 195 °C. A significant reduction ($p < 0.05$) of both, MCPD-E and G-E could be observed after a heating period of the pre-frying oil of six hours, already.

The application of calcinated zeolites might be a practical approach to minimize the MCPD-E and G-E content in pre-fried breaded and frozen fish products. However, the adsorbent material needs to be removed from the pre-frying oil which might require additional equipment investments.

3.3.2. Filtration of the pre-frying oil

In a preliminary test, six different filter types were tested, while a paper filter with a pore size of 20 μm achieved the best results in order to remove the solid breaded particles from the pre-frying oil (data not shown).

Fig. 2 shows MCPD-E and G-E contents in the untreated pre-frying oil (TS 2.3) compared to contents in the pre-frying oil which was filtered after each pre-frying process (TS 2.4). A significant reduction ($p < 0.05$) of the MCPD-E content of the pre-frying oil was observed after 18 h. However, filtering-off the solid breaded particles revealed only a negligible effect on the G-E content of the pre-frying oil (Fig. 2). Therefore, filtering-off breaded particles from the pre-frying oil might be a practical solution in order to minimize the MCPD-E content (not G-

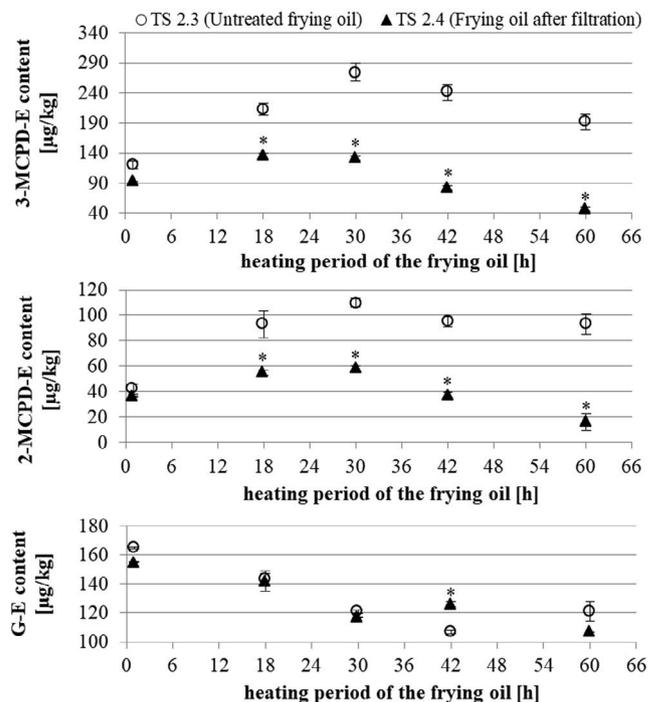


Fig. 2. Comparison of 2- and 3-MCPD-E and G-E contents in the pre-frying oil (RO) used in test series (TS) 2.3 (untreated pre-frying oil) and 2.4 (pre-frying oil which was filtered after each pre-frying process) depending on the heating period of the pre-frying oil. Values are represented as means of fourfold analyses \pm relative standard deviation. Significant differences were calculated for 3-MCPD-E, 2-MCPD-E and G-E at different heating periods, respectively. Values marked with an asterisk are significantly different ($p < 0.05$).

E) during the processing of pre-fried breaded and frozen fish products.

The MCPD-E contents measured in the samples derived from TS 2.1–2.4 showed significant decreases ($p < 0.05$) after a heating period of the pre-frying oil of 18 h. Li et al. (2016) studied the effect of the long-time heating (24 h) on the formation of 3-MCPD-E in model systems at temperatures of 70–250 °C, simulating thermal processing of edible oil (Li et al., 2016). They suggested that the formation and decomposition of 3-MCPD-E during long-time heating of edible oil follows an equilibrium reaction.

3.3.3. Supplementation of the breading with L-cysteine

Preliminary tests investigating different concentrations of L-cysteine (0.02%, 0.04%, and 0.08% of the breading) showed that the addition of 0.08% L-cysteine revealed a significant reduction ($p < 0.05$) of 3-MCPD after a heating period of seven hours at 195 °C (data not shown).

In the long-time pre-frying trial of 60 h, the supplementation of the breading with 0.08% L-cysteine (TS 2.6) however showed no significant reduction of the MCPD-E and G-E content in the pre-frying oil compared to no added L-cysteine (TS 2.5). In contrast, after 30 h heating period of the pre-frying oil, the respective oils showed significantly higher 3-MCPD-E contents ($p < 0.05$) in the supplemented compared to the not-supplemented fish portions. Therefore, the application of L-cysteine to the breading of pre-fried fish products is of limited use with respect of minimizing the MCPD-E and G-E contents.

3.4. Correlation of color and TPM values with MCPD-E and G-E contents in the pre-frying oil

The measurement of total polar material (TPM) and the color of pre-frying oils are relatively simple and suitable methods for the assessment of the pre-frying oil quality. Correlations between these both parameters and the MCPD-E or G-E contents were examined in order to establish fast screening methods for the estimation of the MCPD-E and

Table 4

Correlation of the 2- and 3-MCPD-E and G-E contents in the pre-frying oils with the absorbance at 420 nm (Test series 1.1–1.11) as well as the TPM values (Test series 1.1–2.4) at heating periods of the pre-frying oil of 1, 4, and 7 h (Test series 1.1–1.11) or 1, 6, and 30 h (TS 2.1–2.4). n.c. means no correlation ($r < 0.6$), n.a. means not analyzed.

Test series (TS)	Correlation (r) of MCPD-E and G-E in the pre-frying oil [$\mu\text{g}/\text{kg}$] with the absorbance value (420 nm)			Correlation (r) of MCPD-E and G-E in the pre-frying oil [$\mu\text{g}/\text{kg}$] with the TPM value [%]		
	3-MCPD-E	2-MCPD-E	G-E	3-MCPD-E	2-MCPD-E	G-E
TS 1.1 + 1.2	1.00	n.c.	n.c.	1.00	n.c.	n.c.
TS 1.3 + 1.4	0.99	1.00	n.c.	0.97	1.00	n.c.
TS 1.5 + 1.6	0.99	1.00	n.c.	1.00	1.00	n.c.
TS 1.7 + 1.8	0.98	1.00	n.c.	0.93	0.81	n.c.
TS 1.9	0.82	0.94	0.81	0.60	0.79	0.96
TS 1.10	0.99	1.00	1.00	0.99	1.00	1.00
TS 1.11	0.97	1.00	0.85	1.00	0.95	0.97
TS 2.1	n.a.	n.a.	n.a.	0.99	0.99	0.95
TS 2.2	n.a.	n.a.	n.a.	−0.73	n.c.	n.c.
TS 2.3	n.a.	n.a.	n.a.	0.99	0.97	−1.00
TS 2.4	n.a.	n.a.	n.a.	0.83	0.92	−0.98

G-E contents in pre-frying oils and consequently in the fish products.

The absorbance at 420 nm and TPM values [%] in the pre-frying oils are shown in Table 3. Table 4 displays the correlation of the 2- and 3-MCPD-E and G-E contents of the pre-frying oils and the absorbance values at 420 nm (TS 1.1–1.11) as well as the TPM values (1.1–2.4), respectively. As expected, the absorbance of the pre-frying oils increased with increasing heating periods of the pre-frying oil. The increase in absorbance was significantly lower ($p < 0.05$) at a pre-frying temperature of 185 °C (TS 1.1–1.4) compared to 200 °C (TS 1.5–1.8) (Table 3). Between the 3-MCPD-E contents and the absorbance values a high correlation ($r = 0.82$ – 1.00) was identified (TS 1.1–1.11). With exception of TS 1.1+1.2, 2-MCPD-E contents also revealed a high correlation with the absorbance values ($r = 0.94$ – 1.00). Correlations with G-E contents could only be observed for TS 1.9–1.11 ($r = 0.81$ – 1.00).

The measurement of polar compounds of the pre-frying oil, mainly formed by hydrolysis and polymerization, is linked to the degree of pre-frying oil degradation during heating (Matissek, 2016). In general, the TPM guidance value of 24% indicates the point at which a fat should no longer be used for pre-frying as it would cause smoke formation and may lead to severe off-taste as a result of oil degradation (DGF, 2013).

Table 3 shows that the TPM values [%] increased as expected with the heating period of the pre-frying oil and varied between 6.3 and 12.4% after seven hours. High correlation coefficients ($r = 0.60$ – 1.00) were observed between the 3-MCPD-E contents and TPM values (Table 4). The 2-MCPD-E contents also showed good correlations with the TPM values in TS 1.3–1.8 ($r = 0.79$ – 1.00). Reasonable correlations between the G-E contents of the pre-frying oil and the TPM values were only observed for TS 1.9–1.11 ($r = 0.96$ – 1.00).

With regard to the mitigation trials (TS 2.1–2.6), reasonable correlations between the MCPD-E and G-E contents and the TPM values of the pre-frying oils were only identified within a heating period of 30 h. After 30 h the MCPD-E and G-E contents showed high variations probably due to equilibrium reactions (Figs. 1 and 2). Based on these results, it is suggested that both, the measurement of TPM values and the color analysis of the pre-frying oils are promising screening tools to estimate the 2- and 3-MCPD-E contents in pre-frying oils used for the processing of fish products.

4. Conclusion

Comprehensive pre-frying experiments revealed the pre-frying temperature and the heating period of the pre-frying oil as the most

relevant parameters with regard to the MCPD-E contents in pre-fried breaded and frozen fish products, while the G-E contents remained constant during the pre-frying over time. As a result, these both essential process-parameters should be monitored critically during industrial pre-frying processes of breaded and frozen fish products.

It is suggested that the major portion of MCPD-E and G-E content of fish fingers was absorbed from the pre-frying oil. Therefore, practical recommendations to mitigate the MCPD-E and G-E contents in the pre-frying oil and consequently in pre-fried breaded and frozen fish products require additional processing steps during the pre-frying process. For instance, the application of an adsorbent material or the removal of solid particles of the breaded is helpful in order to minimize the MCPD-E and G-E contents in the pre-frying oil and subsequently in the investigated fish products.

Furthermore, TPM and color analysis of pre-frying oils are recommended screening methods for estimating MCPD-E and G-E contents in pre-frying oils during the industrial processing of pre-fried breaded and frozen fish products.

Funding

This research project was supported by the German Ministry of Economics and Energy (via AiF) and the FEI (Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V., Bonn). Project AiF 18577N.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We would like to thank the Bundesverband der deutschen Fischindustrie und des Fischgroßhandels e.V. and the members of the Verband der ölsaatenverarbeitenden Industrie in Deutschland e.V. (OVID), Berlin, Germany, for their technical support and the fruitful discussions. Furthermore, we would like to thank FRoSTA Tiefkühlkost GmbH, iglo GmbH Tiefkühlkost, and Cargill GmbH for providing the lab-scale fryer and raw materials. We are grateful to the Federal Research Institute for Nutrition and Food, Department of Safety and Quality of Cereals, Max Rubner-Institut, Detmold, Germany, for providing the gastro-fryer. We would like to thank SGS Germany GmbH, especially Dr. Jan Kuhlmann, for providing technical equipment for analyzing the MCPD-E and G-E contents. We are thankful to I. Bagge, K.U. Scholibo (Max Rubner-Institut, Hamburg), V. Borell du Vernay; B. Gedai, M. Harathi, K. Lütke, K. Nitsche, J. Roubal, W. Wiebers, and Y. Wu (HAW Hamburg) for their technical support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.076>.

References

- Abraham, K., Appel, K. E., Berger-Preiss, E., Apel, E., Gerling, S., Mielke, H., ... Lampen, A. (2013). Relative oral bioavailability of 3-MCPD from 3-MCPD fatty acid esters in rats. *Archives of Technology*, 87(4), 649–659. <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-012-0970-8>.
- Aniolowska, M., & Kita, A. (2016). The effect of frying on glycidyl esters content in palm oil. *Food Chemistry*, 203, 95–103. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.028>.
- AOCS (2013). *Official Method Cd 29b-13 Approved 2013. Determination of bound monochloropropanediol- (MCPD) – and bound 2,3-epoxy-1-propanol (glycidol-) by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) Official Methods and Recommended Practices of the AOCS (6th ed.)*.
- Arisseto, A. P., Marcolino, P. F. C., Augusti, A. C., Scaranelo, G. R., Berbari, S. A. G., Miguel, A. M. R. O., ... Vicente, E. (2017). Contamination of Fried Foods by 3-Monochloropropane-1,2-diol fatty acid esters during frying. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 94, 449–455. <http://dx.doi.org/10.1007/s11746-017-2951-9>.

- Calta, P., Velišek, J., Doležal, M., Hasnip, S., Crews, C., & Réblová, Z. (2004). Formation of 3-chloropropane-1,2-diol in systems simulating processed foods. *European Food Research and Technology*, 218(6), 501–506. <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-003-0865-2>.
- Craft, B. D., & Nagy, K. (2012). Mitigation of MCPD-ester and glycidyl-ester levels during the production of refined palm oil. *Lipid Technology*, 24(7), 155–157. <http://dx.doi.org/10.1002/lite.201200207>.
- Destailats, F., Craft, B. D., Dubois, M., & Nagy, K. (2012). Glycidyl esters in refined palm (*Elaeis guineensis*) oil and related fractions. Part I: Formation mechanism. *Food Chemistry*, 131(4), 1391–1398.
- Destailats, F., Craft, B. D., Sandoz, L., & Nagy, K. (2012). Formation mechanisms of Monochloropropanediol (MCPD) fatty acid diesters in refined palm (*Elaeis guineensis*) oil and related fractions. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 29(1), 29–37. <http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2011.633493>.
- DGF (2013). *Standard Method C-III 3e (06): Polar compounds content in frying oils – Rapid method with micro silica gel columns*. Stuttgart, Germany: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
- Dingel, A., & Matissek, R. (2015). Esters of 3-monochloropropane-1,2-diol and glycidol: No formation by deep frying during large-scale production of potato crisps. *European Food Research and Technology*, 241(5), 719–723. <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-015-2491-1>.
- Dissaraphong, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Kishimura, H. (2013). The influence of storage conditions of tuna viscera before fermentation on the chemical, physical and microbiological changes in fish sauce during fermentation. *Bioresource Technology*, 97(16), 2032–2040. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2005.10.007DGF>.
- EFSA (2013). Analysis of occurrence of 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) in food in Europe in the years 2009–2011 and preliminary exposure assessment. *EFSA Journal*, 11(9), 3381.
- EFSA (2016). Risks for human health related to the presence of 3- and 2-monochloropropanediol (MCPD), and their fatty acid esters, and glycidyl fatty acid esters in food. *EFSA Journal*, 14(5), 4426. <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4426>.
- EUMOPA. *The EU fish market*. (2016). <https://www.eumofa.eu/de/> Accessed 30.03.2017.
- FEDIOL. *MCPD esters and glycidyl esters. Review of mitigation measures. Revision 2015*. (2015). <http://www.fediol.be/data/FEDIOL%20Review%20of%20Mitigation%20Measures%20MCPD%20Esters%20and%20Glycidyl%20Esters%20-%2024%20June%202015.pdf> Accessed 24.05.2017.
- FIZ. *Fisch Wirtschaft. Daten und Fakten 2016. Fisch-Informationszentrum e.V.* (2016). http://www.fischinfo.de/images/broschuere/pdf/FIZ_DF_2016.pdf Accessed 22.05.2017.
- Freudenstein, A., Weking, J., & Matthäus, B. (2013). Influence of precursors on the formation of 3-MCPD and glycidyl esters in a model oil under simulated deodorization conditions. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115(3), 286–294. <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.201200226>.
- Hamlet, C. G., Asuncion, L., Velišek, J., Doležal, M., Zelinková, Z., Crews, C. et al. Pye, C. (2014). Investigation of the formation of 3-chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) from mono- and di-esters of its fatty acids in foods (FS231006, FS231074, FS231075).
- IARC (2000). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, some industrial chemicals. *IARC Monographs*, 77, 469–486.
- IARC (2012). 3-monochloro-1,2-propanediol. Some chemicals present in industrial and consumer products, food and drinking-water. *IARC Monographs*, 101, 349–374.
- JECFA (2002). 3-Chloro-1,2-propanediol. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. *WHO Food Additives Series*, 48, 401–432 WHO, Geneva.
- JECFA (2007). 3-Chloro-1,2-propanediol (addendum). Safety evaluation of certain food additives and contaminants. *WHO Food Additives Series*, 58, 239–267 WHO, Geneva.
- Karl, H., Merkle, S., Kuhlmann, J., & Fritsche, J. (2016). Development of analytical methods for the determination of free and ester bound 2-, 3-MCPD, and esterified glycidol in fishery products. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 118(3), 406–417. <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.201400573>.
- Karl, H., Oehlenschläger, J., Bekaert, K., Bergé, J.-P., Cadun, A., Duflos, G., ... Timm-Heinrich, M. (2012). WEFTA interlaboratory comparison on total lipid determination in fishery products using the Smedes method. *Journal of AOAC International*, 95, 489–493.
- Kuhlmann, J. (2011). Determination of bound 2,3-epoxy-1-propanol (glycidol) and bound monochloropropanediol (MCPD) in refined oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(3), 335–344. <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.201000313>.
- Li, C., Zhou, Y., Zhu, J., Wang, S., Nie, S., & Xie, M. (2016). Formation of 3-chloropropane-1,2-diol esters in model systems simulating thermal processing of edible oil. *LWT – Food Science and Technology*, 69, 586–592. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.02.012>.
- Matissek, R. (2016). *Lipide Lebensmittelchemie*. Berlin, Heidelberg: Springer, Berlin Heidelberg 91–129.
- Matthäus, B., Pudel, F., Fehling, P., Vosmann, K., & Freudenstein, A. (2011). Strategies for the reduction of 3-MCPD esters and related compounds in vegetable oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(3), 380–386. <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.201000300>.
- Mogol, B. A., Pye, C., Anderson, W., Crews, C., & Gökmen, V. (2014). Formation of Monochloropropane-1,2-diol and its esters in biscuits during baking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 7297–7301.
- Rossell, J. (2001). *Frying: Improving quality*, Vol. 56. Woodhead Publishing.
- Shimizu, M., Weitkamp, P., Vosmann, K., & Matthäus, B. (2013). Influence of chloride and glycidyl-ester on the generation of 3-MCPD- and glycidyl-esters. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115(7), 735–739. <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.201200310>.
- Strijowski, U., Heinz, V., & Franke, K. (2011). Removal of 3-MCPD esters and related substances after refining by adsorbent material. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(3), 387–392.
- Svejkovská, B., Novotny, O., Divinova, V., Reblova, Z., Doležal, M., & Velišek, J. (2004). Esters of 3-chloropropane-1, 2-diol in foodstuffs. *Czech Journal of Food Sciences*, 22(5), 190–196.
- Velišek, J., Calta, P., Crews, C., Hasnip, S., & Doležal, M. (2003). 3-Chloropropane-1, 2-diol in models simulating processed foods: Precursors and agents causing its decomposition. *Czech Journal of Food Sciences*, 21(5), 153–161.
- Weißhaar, R., & Perz, R. (2010). Fatty acid esters of glycidol in refined fats and oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(2), 158–165.
- Wong, Y. H., Muhamad, H., Abas, F., Lai, O. M., Nyam, K. L., & Tan, C. P. (2017). Effects of temperature and NaCl on the formation of 3-MCPD esters and glycidyl esters in refined, bleached and deodorized palm olein during deep-fat frying of potato chips. *Food Chemistry*, 219, 126–130. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.130>.
- Worch, E. (2012). *Adsorbents and adsorbent characterization*. Göttingen: Hubert & Co., GmbH & Co. KG.
- Zelinková, Z. S. B., Velišek, J., & Doležal, M. (2006). Fatty acid esters of 3-chloropropane-1,2-diol in edible oils. *Food Additives Contaminants*, 23(12), 1290–1298.
- Zhou, H., Jin, Q., Wang, X., & Xu, X. (2014). Effects of temperature and water content on the formation of 3-chloropropane-1,2-diol fatty acid esters in palm oil under conditions simulating deep fat frying. *European Food Research and Technology*, 238(3), 495–501. <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-013-2126-3>.
- Zulkurnain, M., Lai, O. M., Tan, S. C., Abdul Latip, R., & Tan, C. P. (2013). Optimization of palm oil physical refining process for reduction of 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) ester formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(13), 3341–3349. <http://dx.doi.org/10.1021/jf4009185>.

4.4 Publikation IV: Bildung von fettsäuregebundenem 2- und 3-MCPD und Glycidol in Bratheringsprodukten

Sybille Merkle (SM), Ute Ostermeyer (UO), Sascha Rohn (SR), Horst Karl (HK), Jan Fritsche (JF): Formation of ester bound 2- and 3-MCPD and esterified glycidol in deep-fried and pickled herring products. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2018, 120, 1700464.

Impact Factor: 2,145 (2017)

Auch bei der Herstellung von Bratfischerzeugnissen spielt der Frittierprozess eine große Rolle. Zusätzlich können diese Produkte jedoch nach dem Frittieren unter Anwendung hoher Temperaturen pasteurisiert werden. Es wurde deshalb angenommen, dass beide Prozesse einen Einfluss auf die Bildung von MCPD-E und G-E in diesen Produkten haben können.

Im Rahmen der in diesem Kapitel aufgeführten Publikation wurden somit Einflussfaktoren auf die Bildung von MCPD-E und G-E in Bratheringsprodukten untersucht. Wie für die Produktklasse der vorfrittierten, panierten und tiefgekühlten Fischerzeugnisse (Publikation III), wurden verschiedene prozess- und produktbasierte Parameter identifiziert. Sie umfassten unterschiedliche NaCl-Konzentration in der Panade, die Zugabe von Marinade, die Erhitzungsdauer des Frittieröls sowie die thermische Einwirkung beim Frittieren und Pasteurisieren der Produkte.

Auch im Rahmen dieser Untersuchungen wurden die TPM-Gehalte und Farbintensitäten der Frittieröle analysiert und eine mögliche Korrelation mit den MCPD-E- und G-E-Gehalten analysiert.

Eigenanteil: 35%

Formation of Ester Bound 2- and 3-MCPD and Esterified Glycidol in Deep-Fried and Pickled Herring Products

Sybillie Merkle, Ute Ostermeyer, Sascha Rohn, Horst Karl, and Jan Fritsche*

In Germany, the best-selling fish products are canned and marinated fish products including deep-fried and pickled herring products. During processing, pre-salted herring fillets are breaded, deep-fried, and covered by an aqueous marinade containing vinegar and sodium chloride. For shelf-life extension, the packaged fish can be pasteurized. Due to the co-occurrence of sodium chloride and glycerol derivatives such as tri- or diacylglycerides, the deep-frying and pasteurization procedure may lead to the formation of fatty acid esters of 2-monochloropropane-1,3-diol and 3-monochloropropane-1,2-diol (MCPD-E) and of glycidol (G-E). Various product as well as process dependent parameters on the formation of MCPD-E and G-E in deep-fried and pickled herring products are studied. The frying-life of the oil has the strongest effect on the formation of MCPD-E in herring products. 3-MCPD-E contents increases from 341 ± 48 to $1133 \pm 194 \mu\text{g kg}^{-1}$ lipid in the products after 9 days frying-life of the oil. Moreover, it is shown that the major proportion of MCPD-E in these products originates from the deep-frying oil. The analyses of total polar material and spectrophotometric measurement of the absorption at 420 nm of the deep-frying oil are identified as suitable screening methods for estimating MCPD-E contents in deep-fried and pickled herring products.

Practical Applications: Canned and marinated fish products are the best-selling fish products (28% market share) on the German market. Up to now, no studies regarding the deep-frying procedure of pickled herring products are published. Deep-frying has shown to be a process leading to MCPD-E and G-E in fish products mainly affected by intake of deep-frying oil. The knowledge about the effect of process and product based parameters on the formation of MCPD-E and G-E in deep-fried and pickled herring products may be of particular interest for the fish-processing industry in order to manage that quality issue. Moreover, methods for the assessment of the deep-frying oil quality such as the analysis of the total polar material (TPM) and the spectrophotometric measurement of the absorption at 420 nm deemed suitable screening methods for estimating the MCPD-E contents in deep-fried and pickled herring products.

1. Introduction

Fatty acid esters of 2-monochloropropane-1,3-diol (2-MCPD-E), 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD-E), and glycidol (G-E) are considered as process contaminants of public health concern. The highest levels of 2- and 3-MCPD-E (MCPD-E) and G-E are formed during the refining of vegetable oils at high temperatures as a reaction of lipids with chlorides.^[1–3] Moreover, various processed foods are major sources of MCPD-E and G-E for humans.^[1] Worthy of note, 3-MCPD has been classified as a “possible human carcinogen” in group 2B by the International Agency for Research on Cancer (IARC).^[4] Abraham et al.^[5] proved a complete release of free 3-MCPD from 3-MCPD-E in the gastrointestinal tract. Glycidol has been classified as “probably carcinogenic to humans” in group 2A.^[6] The toxicological assessment of 2-MCPD-E is still insufficient. For free 3-MCPD, a provisional maximum tolerable daily intake of $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ body weight was established by the Scientific Committee on Food and the Joint FAO/WHO Committee on Food Additives (JECFA).^[7,8] In 2016 the European Food Safety Authority (EFSA) proposed a lower tolerable daily intake (TDI) of $0.8 \mu\text{g kg}^{-1}$ body weight for free and ester bound 3-MCPD, whereas the JECFA established a TDI of $4 \mu\text{g kg}^{-1}$ body weight.^[1] In 2018, the EFSA published an updated group tolerable daily intake level of $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ body weight for free and ester bound 3-MCPD.^[9] Due to the high

S. Merkle
Faculty of Life Sciences, Food Science
Hamburg University of Applied Sciences
Ulmenliet 20, Hamburg 21033, Germany

Dr. U. Ostermeyer, Dr. H. Karl, Prof. J. Fritsche
Department of Safety and Quality of Milk and Fish Products
Max Rubner-Institut
Federal Research Institute for Nutrition and Food
Hermann-Weigmann-Str. 1, Kiel 24103, Germany
E-mail: jan.fritsche@mri.bund.de

Prof. S. Rohn
Hamburg School of Food Science
Institute of Food Chemistry
University of Hamburg
Grindelallee 117, Hamburg 20146, Germany

DOI: 10.1002/ejlt.201700464

contents of the process contaminants in some refined vegetable oils and fats effective mitigation strategies have been developed.^[10–14] Furthermore, the formation mechanisms in these foods were extensively studied.^[2,15–19] Mono- and diacylglycerides as well as triacylglycerides are regarded as precursors responsible for the formation of MCPD-E and G-E.^[16,20] It was shown that the sodium chloride (NaCl) concentration, the water content, and the pH-value have significant impact on the formation of MCPD-E and G-E in refined edible oils.^[16,21,22]

Canned and marinated fish products are the best-selling fish products (28% market share) on the German market followed by frozen fish (26% market share).^[23] Canned and marinated fish products include deep-fried and pickled herring products. Germany imported 38 777 tons of canned and marinated herring products from other European countries in 2015.^[23] For their production, herring fillets are thawed and washed, lightly salted, breaded, and deep-fried. The usual deep-frying conditions for commercial products are temperatures at about 170–180 °C and deep-frying times between 3 and 15 min. During deep-frying herring fillets have a core and external temperature of approximately 65 and 90 °C, respectively. The salt concentration in deep-fried products is approximately 0.9%. The products are packed in flexible polyethylene (PE) pouches, jars, or cans and covered by a marinade containing diluted vinegar (approx. 2%) and NaCl (approx. 3.2%) as well as onions and other flavoring ingredients. The deep-fried and pickled herring fillets may be pasteurized (≈95 °C) resulting in a preserved fish product with a shelf-life of up to three years. Due to the simultaneous presence of NaCl (in wet

breadings and marinades) and deep-frying oil, both deep-frying and pasteurization may be predestined processing steps leading to the formation of MCPD-E and G-E. Several studies were published regarding to the formation of MCPD-E and G-E in deep-fried food.^[24–30] Deep-frying temperature and time as well as the NaCl content in the deep-fried products were investigated with respect to their effect on the formation of MCPD-E and G-E.^[22,24,30] However, hardly any data determined in fish and fish products have been published so far.^[1,31,32] To the best of our knowledge no scientific studies regarding the industrial deep-frying process of pickled herring products were published.

The objective of this research project was to study the effect of NaCl concentration in breadings on the formation of MCPD-E and G-E during the manufacturing of deep-fried and pickled herring products. Secondly, the effect of process based parameters including frying-life of the oil and pasteurization time on the formation of MCPD-E and G-E were investigated. Finally, fast and simple methods for the assessment of frying oil quality for example, total polar material (TPM) and light absorption at 420 nm were studied in order to identify suitable screening methods for estimating the MCPD-E and G-E content in deep-fried and pickled herring products.

2. Experimental Section

An overview of all test series (TS) performed is shown in Figure 1.

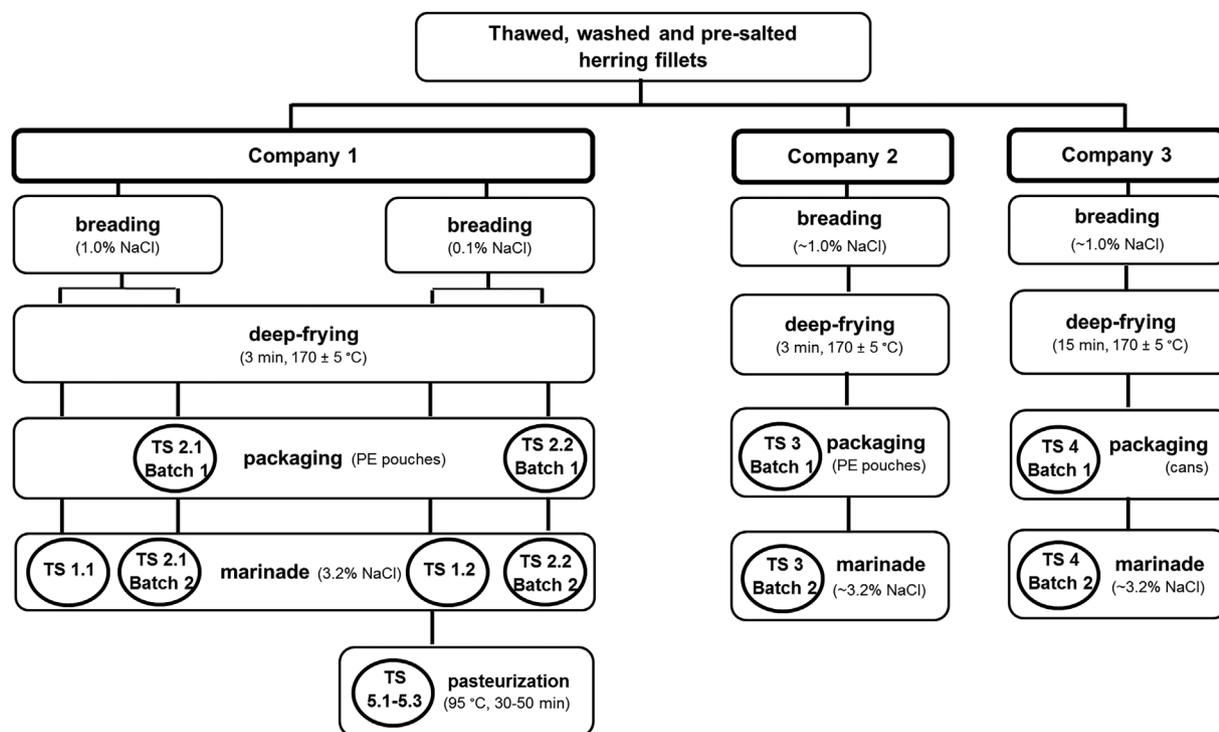


Figure 1. Overview of the deep-frying trial design of the test series (TS) performed with deep-fried and pickled herring fillets.

2.1. Deep-Frying Procedure

In total, six TS (1.1–4) were designed to identify the effect of NaCl concentration in breadings and marinades on the formation of MCPD-E and G-E in deep-fried and pickled herring products. In addition, the effect of the frying-life of the oil was investigated (Table 1). According to a common recipe of the fish processing industry frozen herring fillets were thawed, washed, salted (approx. 0.9% NaCl), and breaded. The final product contained 11% wet breading with 1.0% NaCl and 7% wheat flour as a dry-coating (TS 1.1). Additionally, salt reduced products were prepared containing only 0.1% NaCl in the wet breading (TS 1.2). Deep-frying was carried out at an industrial scale with a continuous deep-fryer containing a deep-frying tank with a filling capacity of 2000 L oil. Fully refined rapeseed oil was taken for each individual test series (TS 1.1–4). For TS 1.1 and 1.2 rapeseed oil batches with similar 3-MCPE-E ($42 \pm 5 \mu\text{g kg}^{-1}$ deep-frying oil), 2-MCPD-E ($21 \pm 2 \mu\text{g kg}^{-1}$ deep-frying oil) and G-E ($142 \pm 8 \mu\text{g kg}^{-1}$ deep-frying oil) content were used. Each day approximately 250 L deep-frying oil from the same batches were refilled. Sample preparation comprised the following steps. At first, the deep-frying oil was heated to the set temperature of $170 \pm 5^\circ\text{C}$. The deep-frying time of the breaded herring fillets was set for 3 min. After deep-frying the herring products (60%) were placed in flexible PE pouches and covered with a commercial marinade (40%) containing diluted vinegar (2% acetic acid) and NaCl (3.2%). In total, 2600 kg deep-fried and pickled herring products were produced each day. The deep-frying experiment was designed for a period of 9 days in total. The deep-frying oil was heated for 8 h per day. Twenty portions of the deep-fried and pickled herring products (200 g drained weight per portion) were collected each day, the edible parts were homogenized by means of a knife-mill (Grindomix GM200, Retsch GmbH, Haan, Germany) and stored in a plastic bag at -24°C until analysis. Deep-frying oil (100 mL) was sampled in glass bottles and stored at room temperature. Deep-frying oils were analyzed from day 0–9, while the herring products were analyzed from day 0, 1, 5, and 9, respectively.

In a second trial, the effect of the addition of the marinade on the contents of MCPD-E and G-E was investigated. For that purpose, samples of TS 2.1 and 2.2 were collected before (Batch 1) and after (Batch 2) filling the marinade into the flexible PE

pouches. Additionally, the MCPD-E and G-E content of deep-fried and pickled herring fillets, which were produced in two other companies were investigated (TS 3 + 4) for comparison reasons. The products of TS 3 were manufactured at a deep-frying temperature of 170°C for 3 min. The products of TS 4 were manufactured at a deep-frying temperature of 170°C for 15 min. Herring products and deep-frying oil samples were collected after one and two days (TS 3) and after five days (TS 4), respectively.

Moreover TS 2–4 were conducted in order to confirm the results of TS 1.1 and 1.2 regarding the effect of the NaCl concentration in the wet breading and the frying-life of the oil on the formation of MCPD-E and G-E during deep-frying of pickled herring fillets.

2.2. Pasteurization Procedure

Three trials were performed to investigate the effect of different pasteurization times (30, 40, and 50 min) on the formation of MCPD-E and G-E. TS 5.1, 5.2, and 5.3 were performed by means of a laboratory autoclave (DX-45, Systec GmbH, Linden, Germany) at 95°C (Table 2). For pasteurization deep-fried and pickled herring products from TS 2.2 Batch 2 (Figure 1) were used.

2.3. Determination of MCPD-E and G-E

Approximately 0.5 g of the homogenized fish and the deep-frying oil were taken for the analysis of MCPD-E and G-E. After sample extraction and derivatization the contents of 2- and 3-MCPD-E and G-E were analyzed by GC-MS according to the modified American Oil Chemists' Society (AOCS) method Cd 29b-13.^[33,34] The corresponding isotopic labeled compounds 2-MCPD- d_5 , 3-MCPD- d_5 , and glycidol- d_5 were used as internal standards. The limit of quantification (LOQ) for this method is $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ (2- and 3-MCPD-E and G-E), for both deep-frying oils and fish products.^[33] A monthly repeated investigation of an internal reference material consisting of smoked sprat (1/3) and fish fingers (2/3) was carried out for quality control purpose. Each sample was analyzed four times for its MCPD-E and G-E content.

Table 1. Parameter settings for investigating the effect of sodium chloride (NaCl) concentrations of the wet breading and marinade as well as the frying-life of the oil on the formation of MCPD-E and G-E in the deep-fried and pickled herring products (TS 1–4).

Test series	Deep-frying			NaCl [%]				Batch 1	Batch 2
	Temperature [$^\circ\text{C}$]	Time [min]	Frying-life of the oil [days]	Raw herring	Wet breading	Marinade	Final product		
1.1	170 ± 5	3	1–9	0.9	1.0	3.2	1.5	n.a.	With marinade
1.2	170 ± 5	3	1–9	0.9	0.1	3.2	1.5	n.a.	With marinade
2.1	170 ± 5	3	1–2	0.9	1.0	3.2	1.5	Without marinade	With marinade
2.2	170 ± 5	3	1–2	0.9	0.1	3.2	1.5	Without marinade	With marinade
3	170 ± 5	3	1–2	≈ 1.0	≈ 1.0	≈ 3.2	2.0	Without marinade	With marinade
4	170 ± 5	15	5	1.0	≈ 1.0	≈ 3.2	1.5	Without marinade	With marinade

All test series were performed using rapeseed oil. n.a., not applicable.

Table 2. Effect of the pasteurization time on the formation of MCPD-E and G-E in the deep-fried and pickled herring products (TS 5.1–5.3).

Test series	Deep-frying		Frying-life of the oil [days]	NaCl [%]		Pasteurization		3-MCPD-E [$\mu\text{g kg}^{-1}$] ^{a)}		2-MCPD-E [$\mu\text{g kg}^{-1}$] ^{a)}		G-E [$\mu\text{g kg}^{-1}$] ^{a)}	
	Temperature [°C]	Time [min]		Raw herring	Final product	Temperature [°C]	Time [min]	Before pasteurization	After pasteurization	Before pasteurization	After pasteurization	Before pasteurization	After pasteurization
5.1	170 ± 5	3	1	0.9	1.5	95	30	37 ± 10 ^d	34 ± 5 ^d	<LOQ	<LOQ	63 ± 18 ^e	55 ± 12 ^e
5.2	170 ± 5	3	1	0.9	1.5	95	40	37 ± 10 ^d	31 ± 9 ^d	<LOQ	<LOQ	63 ± 18 ^e	80 ± 4 ^e
5.3	170 ± 5	3	1	0.9	1.5	95	50	37 ± 10 ^d	46 ± 9 ^d	<LOQ	<LOQ	63 ± 18 ^e	84 ± 11 ^e

^{a)} Values are represented as means of four fold analyses ± relative standard deviation. Values in the same column and in the same line that do not share a common superscript letter are significantly different ($p < 0.05$). LOQ, limit of quantification ($< 20 \mu\text{g kg}^{-1}$).

2.4. Color Measurement

During deep-frying the color of the oils turns brownish. The brown pigments formed during the Maillard reaction can be determined by spectrophotometric measurements.^[35] For this purpose, the deep-frying oil samples were diluted with heptane (1:10, w/w) and the absorbance of these dilutions were measured at 420 nm (blank value heptane, 1 cm cuvettes) in a Varian Cary 50Bio UV-Visible spectrophotometer.

2.5. Determination of Total Polar Material

The total polar material (TPM) values in the deep-frying oils were determined gravimetrically according to the DGF standard method C-III 3e (06), which is a rapid procedure applying a micro silica gel column.^[36]

2.6. Determination of Lipid Content

The lipid content of the fish products was determined according to a modified method of Smedes.^[37]

2.7. Statistical Evaluation

The data are presented as means ± standard deviations. Each analytical measurement was conducted in twice (color measurement, TPM and lipid content) or fourfold (MCPD-E and G-E). Significant differences were tested between 2-MCPD-E, 3-MCPD-E, and G-E in all fish products and deep-frying oil samples. For this purpose, an ANOVA followed by post hoc *t*-test according to Tukey and Bonferroni was calculated using the XLSTAT 2011.2.02 software. A significance level of $\alpha = 0.05$ was applied.

3. Results and Discussion

3.1. Comparison of MCPD-E and G-E Contents in Deep-Fried Herring Products and Oil

Table 3 shows the MCPD-E and G-E contents of the deep-fried and pickled herring products, the total lipid content of the samples, and the MCPD-E and G-E contents of the deep-frying oil derived from TS 1.1 and 1.2. The raw materials (herring fillets, wet bread, and wheat flour) contained only negligible contents of MCPD-E and G-E ($< 20 \mu\text{g kg}^{-1}$) prior to the processing. After 9 days frying-life of the oil the contents of 3-MCPD-E in TS 1.1 and 1.2 increased from 341 ± 48 and 126 ± 11 , up to 1133 ± 194 and $1378 \pm 254 \mu\text{g kg}^{-1}$ lipid in the deep-fried and pickled herring, respectively. Strong correlations ($r > 0.93$) between the MCPD-E contents of the fish products and the deep-frying oils were observed. Based on these correlations it is suggested that the largest quantities of 2- and 3-MCPD-E in deep-fried and pickled herring products originated from the absorbed deep-frying oil. This is probably due to the low core and external temperature of approximately

Table 3. MCPD-E and G-E contents of deep-fried and pickled herring products (DPHP) and of deep-frying oils (TS 1).

Test series	Frying-life of the oil [days]	Lipid content [% in DPHP]	3-MCPD-E ^{a)}			2-MCPD-E ^{a)}			G-E ^{a)}				
			[µg/kg DPHP]	[µg/kg lipid in DPHP]	[µg/kg deep-frying oil]	Correlation [r]	[µg/kg DPHP]	[µg/kg lipid in DPHP]	[µg/kg deep-frying oil]	Correlation [r]	[µg/kg DPHP]	[µg/kg lipid in DPHP]	[µg/kg deep-frying oil]
1.1 (1.0% NaCl in wet bread)	1	13.8	47 ± 7 ^a	341 ± 48 ^b	505 ± 50 ^d	0.93	10 ± 2 ^m	76 ± 11 ^u	240 ± 17 ^w	0.94	81 ± 3 ^u	584 ± 19 ^k	100 ± 6 ^P
	5	14.6	58 ± 9 ^a	398 ± 63 ^b	645 ± 38 ^f	22 ± 4 ^c	154 ± 30 ^e	501 ± 19 ^j	501 ± 19 ^j	89 ± 4 ^u	613 ± 24 ^k	119 ± 34 ^P	
	9	15.6	177 ± 30 ^b	1133 ± 194 ^d	4052 ± 403 ^l	75 ± 13 ^d	481 ± 85 ^j	1766 ± 163 ^o	1766 ± 163 ^o	74 ± 2 ^d	477 ± 13 ^l	152 ± 56 ^P	
1.2 (0.1% NaCl in wet bread)	1	16.2	20 ± 2 ^b	126 ± 11 ^P	299 ± 15 ^s	0.95	5 ± 1 ⁿ	32 ± 4 ^v	104 ± 5 ^P	0.99	43 ± 3 ^f	268 ± 2 ^l	109 ± 5 ^P
	5	16.4	62 ± 4 ^a	381 ± 22 ^g	1776 ± 76 ^t	30 ± 5 ^c	181 ± 31 ^e	694 ± 27 ^x	694 ± 27 ^x	36 ± 12 ^{ef}	221 ± 74 ^{el}	89 ± 23 ^P	
	9	15.7	216 ± 40 ^b	1378 ± 254 ⁱ	4212 ± 130 ^j	87 ± 3 ^d	552 ± 16 ^l	1602 ± 67 ^o	1602 ± 67 ^o	29 ± 15 ^f	183 ± 98 ^l	80 ± 16 ^P	

Values are represented as means of fourfold analyses ± relative standard deviation.

^{a)} Values in the same column and in the same line that do not share a common superscript letter are significantly different ($p < 0.05$). r = correlation coefficient.

65 and 90 °C in the fish during deep-frying, respectively. At this temperature a significant formation of MCPD-E and G-E is negligible. Therefore, it is assumed that the formation of the MCPD-E and G-E takes place in the deep-frying oil at temperatures of 170 °C and is taken up by the herring fillets. However, the MCPD-E content of the lipid fraction of the herring products of both test series was lower than in the deep-frying oil. This might be due to a dilution effect occurring during the lipid extraction procedure of the deep-fried herrings resulting in a complex lipid mixture consisting of fish oil and deep-frying oil. Herring is a fish species with high lipid content, including a high amount of unsaturated fatty acids.^[38] Merkle et al.^[39] previously showed that MCPD-E is formed during thermal treatment of crude fish oils. Thus it is suggested that the lipid content of the herring fillets increase the potential for the formation of MCPD-E. Belkova et al.^[40] conducted a frying study of potato crisps at 165 °C for 105–135 s in rapeseed oil over a frying-life of the oil of 17 h. They observed a slight increase of 3-MCPD-E after each addition of raw potato slices into the deep-frying oil. The authors assumed this might be due to lipid and chloride content in the raw potato slices.^[40] The lipid content of herring is much higher than of the potato slices. This could be one explanation for higher formation of MCPD-E in fish products than in potato slices for example.

No meaningful correlation regarding the G-E contents of the products and the deep-frying oil was observed (data not shown). Moreover, significant higher ($p < 0.05$) G-E contents were measured in the lipid fraction of deep-fried and pickled herring products compared to the deep-frying oils. This finding might be an indication for an in situ formation of 3-monobromopropane-1,2-diol during the analysis of the deep-fried herring products. Recently, Zelinková et al.^[41] suggested an overestimation of G-E in acidic media during indirect analytical methods. Further studies are necessary to prove the reasons of this potential overestimation.

The different fate of the MCPD-E and G-E content of deep-fried and pickled herring during deep-frying might be due to different reaction kinetics of 3-MCPD-E and G-E. The formation of 3-MCPD-E was suggested at temperatures above 180 °C by nucleophilic substitution.^[42] However, G-E are formed from mono- and diacylglycerides to a higher degree at temperatures above 200 °C.^[20] The deep-frying temperatures of 170 °C applied in this study might probably be the reason for similar G-E contents in deep-fried and pickled herring products (Table 3).

Dingel and Matissek^[28] investigated whether 3-MCPD-E or G-E might be endogenously formed during the deep-frying process of potato crisps. In a one-day trial potato crisps were deep-fried at 160–188 °C for 100–200 s. Comparing the 3-MCPD-E and G-E contents of high-oleic sunflower oil and the potato crisps no significant differences ($p < 0.05$) were found. The authors concluded that the 3-MCPD-E and G-E content of the potato crisps was due to a carry-over effect from the deep-frying oil. An endogenous formation was excluded.^[28] These results were confirmed by Ariseto et al.^[25] They conducted deep-frying experiments with banana, potato, cassava, onion, garlic, corn flour, rice, and meat and two types of oil with different 3-MCPD-E contents. Deep-frying with corn oil with non-significant levels of 3-MCPD-E ($< 0.05 \text{ mg kg}^{-1}$) revealed no 3-MCPD-E contents in these

deep-fried products. The deep-frying oil with high 3-MCPD-E contents (1.64 mg kg^{-1}) revealed a reasonable correlation ($r=0.83$) between the 3-MCPD-E contents in the deep-fried products and the fat uptake^[25].

In the present study also no endogenous formation of MCPD-E and G-E in the fish products was observed. However it is assumed that the high lipid content of the herring fillet could have an effect on a higher formation potential of MCPD-E in the deep-frying oil. A further essential difference between the food fried by Dingel and Matissek^[28] and Arisseto et al.^[25] and the deep-fried herring products investigated in the present study is the wet breading. During deep-frying solid particles of the breading release from the fish product, accumulate in the deep-frying oil and remain there for the entire frying-life of the oil.^[43] This fact was shown to increase MCPD-E and G-E contents during pre-frying of breaded and frozen fish products. Merkle et al.^[32] studied the effect of filtering-off solid breading particles from the pre-frying oil in order to assess that approach with respect to potentially decreased contents of MCPD-E and G-E in pre-fried breaded and frozen fish products. A significant reduction ($p < 0.05$) of the MCPD-E content of the pre-frying oil was observed.

3.2. Effect of the Frying-Life of the Oil

As shown in Table 3 the 2- and 3-MCPD-E contents of the deep-fried products significantly increased ($p < 0.05$) over the 9 day frying-life of the oil. Based on these results it is reasonable to conclude that the frying-life of the oil has the strongest effect on the MCPD-E content in the herring products. However, no significant increase of G-E content was observed neither in the deep-frying oil nor in the herring products until day 5 (Table 3). Surprisingly, there was a significant decrease observed between the G-E content in the high salt herring products sampled on day 9 (Table 3). The MCPD-E content of the frying oil followed a similar trend as noticed in the deep-fried herring products, whereas the G-E content remained relatively constant during the entire frying-life of the oils. Therefore, it is suggested that there is only a negligible effect of the frying-life of the oil on the G-E content of deep-fried herring products.

Some researchers reported that the formation and decomposition of 3-MCPD-E and G-E during long-time heating of edible oil followed an equilibrium reaction.^[21,42,44] In a model system simulating thermal processing of edible oil for 24 h at temperatures of 70–250 °C the 3-MCPD-E content remained rather constant after a heating time of 16 h.^[21] However, it was stated that the equilibrium of 3-MCPD-E was achieved at an earlier stage than for G-E.^[44] In a model study heating pure diolein with tetrabutylammonium chloride at 240 °C for 4 h a plateau level of 3-MCPD-E was reached after 1 h. In the same study, an equilibrium of G-E formation was already observed after 2 h.^[44] This might explain the only slightly variable G-E contents in the herring products.

3.3. Effect of NaCl in the Wet Breading

Table 3 (TS 1.1 and 1.2) and Table 4 (TS 2.1 and 2.2) depict the average contents of MCPD-E and G-E in deep-fried and pickled

herring products. For assessing the effect of the NaCl concentration in the wet breading test series 1.1 and 2.1 (1.0% NaCl in the wet breading) as well as 1.2 and 2.1 (0.1% NaCl in the wet breading) were compared.

After one day of frying-life products of TS 1.1 showed significantly higher 2- and 3-MCPD-E contents as compared to TS 1.2. After frying-life of five days onwards, however, no significant differences were observed anymore. Additionally, no significant different 2- and 3-MCPD-E contents were observed between products of TS 2.1 and 2.2. Based on these results it is reasonable to conclude that the NaCl concentration in the wet breading might only have a negligible effect on the formation of MCPD-E in deep-frying oils.

Several studies were published concerning the effect of NaCl on the formation of MCPD-E and G-E in foods.^[16,17,21,26,29,30,45] Wong et al.^[30] showed an increase of both, 3-MCPD-E and G-E contents during the deep-frying of potato crisps (160–180 °C) with increasing NaCl content (0–5%). After five days frying-life of the oil the 3-MCPD-E content in potato crisps with 5% NaCl was 2.5 times higher than in products without NaCl. Some researchers suggested a limited dose-response of 3-MCPD-E formation and NaCl concentration probably due to the poor solubility of NaCl in oils.^[16,21,26]

3.4. Effect of the Marinade

Table 4 shows the MCPD-E and G-E contents of deep-fried and pickled herring fillets of TS 2–4. In all test series lower MCPD-E and G-E contents were analyzed in the marinated, deep-fried herring products (Batch 2) compared to the products without marinade (Batch 1). Significant higher MCPD-E contents in TS 4 compared to the other test series might be due to the longer deep-frying time and frying-life of the oil (Table 1). The decrease of the MCPD-E and G-E contents after adding the marinade to the deep-fried herring fillets might be due to a dilution effect. This dilution is probably caused by the water uptake of the deep-fried herring from the marinade. Analysis of the separated marinade resulted in MCPD-E and G-E contents of <LOQ (data not shown). When comparing TS 2.1, 2.2, and 3 at day 1 and after day 2 an increased MCPD-E content was observed depending on the frying-life of the oil (Table 4). This was valid for the herring products with and without contact to marinade. The G-E content, however, showed no significant differences during the frying-life of the oil in TS 2.1 and 2.2. In TS 3 the G-E content even decreased by approximately 60% from day 1 to day 2. This might be probably due to the equilibrium reactions of G-E during heating procedures.^[21,42,44]

3.5. Effect of Pasteurization Time

As shown in Table 2, there were no significant differences observed between the products pasteurized for 30, 40, and 50 min, respectively (TS 5.1–5.3). Based on these results it is justifiable to conclude that common pasteurization conditions for the production of deep-fried and pickled herring products has only a negligible effect on the MCPD-E and G-E content of these products.

Table 4. Effect of the marinades on the contents of MCPD-E and G-E in the deep-fried and pickled herring products (DPHP) (TS 2–4).

Test series	Frying-life of the oil [days]	3-MCPD-E ^{a)} [$\mu\text{g}/\text{kg}$ DPHP]		2-MCPD-E ^{a)} [$\mu\text{g}/\text{kg}$ DPHP]		G-E ^{b)} [$\mu\text{g}/\text{kg}$ DPHP]	
		Batch 1 (without marinade)	Batch 2 (with marinade)	Batch 1 (without marinade)	Batch 2 (with marinade)	Batch 1 (without marinade)	Batch 2 (with marinade)
2.1 (1.0% NaCl in wet breading)	1	54 ± 9 ^{ab}	37 ± 10 ^a	<LOQ	<LOQ	76 ± 10 ⁱ	63 ± 18 ⁱ
	2	108 ± 6 ^c	72 ± 16 ^{bc}	30 ± 3 ^g	<LOQ	80 ± 28 ^{lm}	47 ± 7 ⁱ
2.2 (0.1% NaCl in wet breading)	1	74 ± 13 ^{bd}	50 ± 16 ^{bc}	<LOQ	<LOQ	56 ± 2 ^{ln}	37 ± 1 ⁱ
	2	101 ± 16 ^{cd}	68 ± 18 ^{bc}	29 ± 6 ^g	20 ± 6 ^g	74 ± 17 ⁱ	51 ± 3 ⁱ
3 (≈1.0% NaCl in wet breading)	1	78 ± 7 ^d	44 ± 6 ^a	20 ± 1 ^h	<LOQ	123 ± 11 ^m	47 ± 2 ⁱ
	2	102 ± 12 ^{ce}	80 ± 15 ^e	40 ± 1 ⁱ	25 ± 1 ^g	44 ± 2 ⁿ	<LOQ
4 (≈1.0% NaCl in wet breading)	5	211 ± 9 ^f	181 ± 20 ^f	140 ± 2 ^j	107 ± 16 ^k	39 ± 6 ⁿ	42 ± 14 ⁿ

^{a)} Values are represented as means of fourfold analyses ± relative standard deviation. Values in the same column and in the same line that do not share a common superscript letter are significantly different ($p < 0.05$). LOQ, limit of quantification ($< 20 \mu\text{g kg}^{-1}$).

3.6. Correlation of Color and TPM Values with MCPD-E Contents in the Deep-Frying Oil

The fresh deep-frying oil showed a TPM value of 0.3%. The polar compounds in the deep-frying oils increased continuously within the 9 days frying-life of the oil up to 28.4% and 27.1% in TS 1.1 and 1.2, respectively (Figure 2a). Strong correlation coefficients ($r > 0.96$) were established for the 2- and 3-MCPD-E contents and the TPM values of the deep-frying oils in both test series 1.1 and 1.2. On the other hand, no meaningful correlation was observed for the G-E contents in the deep-frying oils and the TPM values. The color intensity of the deep-frying oils was investigated by analyzing their absorbance at a wavelength of 420 nm. The degree of brown coloration and hence absorbance of the deep-frying oils increased with increasing frying-life of the oil. In Figure 2b the correlation ($r > 0.93$) between the 2- and 3-MCPD-E content and the absorbance of the deep-frying oil in TS 1.1 and 1.2. were depicted. As observed in TS 1.1 and 1.2, no meaningful correlation was evident for the G-E content in the deep-frying oil and the color intensity of the oils. As expected a correlation between the color intensity and the TPM values of the deep-frying oils was observed in deep-frying oils of TS 1.1 ($r = 0.99$) and TS 1.2 ($r = 0.97$).

Merkle et al.^[32] observed a high correlation between the absorbance and TPM values and the MCPD-E contents of the deep-frying oil. The present work confirmed the suitability of absorbance/color and TPM values as screening methods for estimating the MCPD-E contents in pre-frying oils used for the industrial processing of deep-fried products. For that reason we

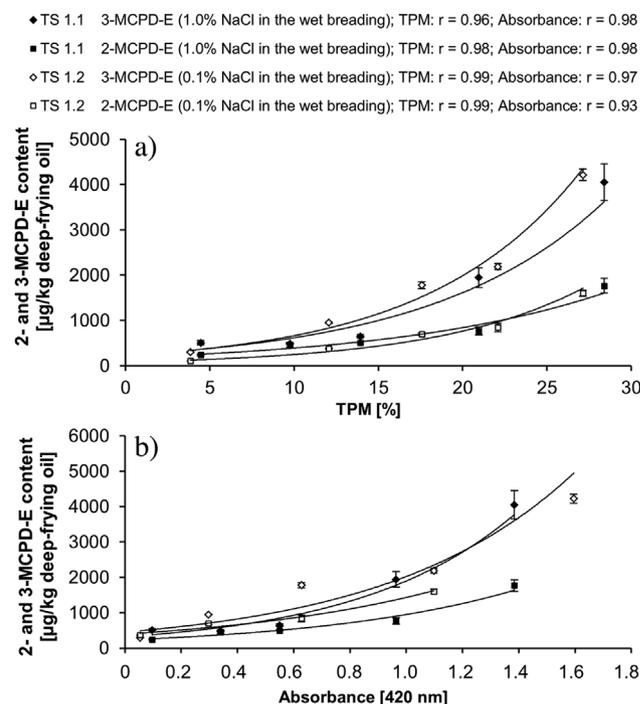


Figure 2. Correlation of 2- and 3-MCPD-E contents in deep-frying oils with a) TPM values and b) absorbance values at 420 nm. r = correlation coefficient.

conclude that color and TPM values are suitable indicators for estimating the MCPD-E content in deep-fried fish products. However, more research is warranted to fully substantiate these recommendations and to include additional fish products.

4. Conclusions

In deep-frying of breaded and pickled herring products the frying-life of the oil revealed the strongest effect on the formation of MCPD-E in the deep-frying oil and consequently in deep-fried herring products, while the G-E contents remained rather constant during the deep-frying process. Therefore, the frying-life of the oil should be carefully monitored during industrial deep-frying processes in order to prevent MCPD-E formation. It is suggested that the major proportion of MCPD-E in deep-fried and pickled herring products originates from the absorbed deep-frying oil. However it can be assumed that the relative high lipid content of the herring fillet as well as solid breading particles releasing during deep-frying may effect a higher formation of MCPD-E during the deep-frying process. After adding the marinade to the deep-fried herring fillets lower MCPD-E and G-E contents were analyzed in the products. This finding may be of interest for the fish processing industry, because there is no need to analyze the MCPD-E and G-E of the raw fish or intermediate fish products, but only the marinated herring products (edible parts). The analysis of color intensity and TPM values of the applied deep-frying oils is recommended as fast screening methods for estimating the MCPD-E contents in deep-fried and pickled herring products.

Abbreviations

2-MCPD, 2-monochloropropane-1,3-diol; 2-MCPD-E, fatty acid esters of 2-monochloropropane-1,3-diol; 3-MCPD, 3-monochloropropane-1,2-diol; 3-MCPD-E fatty acid esters of 3-monochloropropane-1,2-diol; AOCS, American Oil Chemists Society; DGF, German Society for Lipid Science; DPHP, deep-fried and pickled herring products; EFSA, European Food Safety Authority; G-E, fatty acid esters of glycidol; IARC, International Agency for Research on Cancer, JECFA, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives; LOQ, limit of quantification; NaCl, sodium chloride; n.a., not applicable; PE, polyethylene; r, correlation coefficient; TS, test series; TPM, total polar material.

Acknowledgements

The authors thank the Federal Association of the German Fish Processing Industry and Fish Wholesalers e.V. and the Association of Oilseed-Processing Industries in Germany (OVID) for providing the various raw materials, for their technical support, and the fruitful discussions. Furthermore, the authors thank Friesenkroner Feinkost Heinrich Schwarz & Sohn GmbH & Co. KG, Hawesta Feinkost Hans Westphal GmbH & Co. KG, and Anker GmbH Fisch- und Feinkostfabrik for providing the continuous deep-fryer, the industrial autoclave, and raw materials. The authors thank SGS Germany GmbH, especially Dr. Jan Kuhlmann, for providing technical equipment for analyzing MCPD-E and G-E contents. The authors are thankful to I. Bagge, K.U. Scholibo (Max Rubner-Institut Hamburg), V. Borell du Vernay, C. Lang, and Y. Wu (HAW Hamburg) for their technical support. This research project was supported by the German Ministry of Economics and Energy (via AiF) and the FEI (Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V., Bonn). Project AiF 18577 N.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Keywords

deep-frying oils, glycidyl esters, herring products, MCPD esters, pasteurization

Received: November 3, 2017

Revised: March 6, 2018

Published online:

- [1] EFSA: Risks for human health related to the presence of 3- and 2-monochloropropanediol (MCPD), and their fatty acid esters, and glycidyl fatty acid esters in food *EFSA J.* **2016**, *14*, 4426.
- [2] K. Franke, U. Strijowski, G. Fleck, F. Pudel, *LWT-Food Sci. Technol.* **2009**, *42*, 1751.
- [3] S. K. Hrncirik, G. van Duijn, An initial study on the formation of 3-MCPD esters during oil refining. *Eur. J. Lipid Sci Technol.* **2011**, *113*, 374.
- [4] IARC: 3-Monochloro-1,2-propanediol. Some Chemicals Present in Industrial and Consumer Products, Food and Drinking-water. *IARC Monographs* **2012**, 349.
- [5] K. Abraham, K. E. Appel, E. Berger-Preiss, E. Apel, S. Gerling, H. Mielke, O. Creutzenberg, A. Lampen, *Arch. Toxicol.* **2013**, *87*, 649.
- [6] IARC: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, some industrial chemicals. *IARC Monographs* **2000**, 469.
- [7] JECFA: 3-Chloro-1,2-propanediol. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. *WHO Food Addit.* **2002**, *48*, 401.
- [8] JECFA: 3-Chloro-1,2-propanediol. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. *WHO Food Addit.* **2007**, *58*, 239.
- [9] EFSA: Update of the risk assessment on 3-monochloropropane diol and its fatty acid esters. *EFSA J.* **2018**, *16*, 5083.
- [10] B. D. Craft, A. Chiodini, J. Garst, M. Granvogl, *Food Addit. Contam. A* **2013**, *30*, 46.
- [11] B. D. Craft, K. Nagy, *Lipid Technol.* **2012**, *24*, 155.
- [12] B. Matthäus, F. Pudel, P. Fehling, K. Vosmann, A. Freudenstein, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2011**, *113*, 380.
- [13] U. Strijowski, V. Heinz, K. Franke, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2011**, *113*, 387.
- [14] M. Zulkurnain, O. M. Lai, S. C. Tan, R. Abdul Latip, C. P. Tan, *J. Agri. Food Chem.* **2013**, *61*, 3341.
- [15] B. D. Craft, K. Nagy, L. Sandoz, F. Destailats, *Food Addit. Contam. A* **2012**, *29*, 354.
- [16] A. Freudenstein, J. Weking, B. Matthäus, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2013**, *115*, 286.
- [17] M. Shimizu, P. Weitkamp, K. Vosmann, B. Matthäus, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2013**, *115*, 735.
- [18] M. Zulkurnain, O. M. Lai, R. A. Latip, I. A. Nehdi, T. C. Ling, C. P. Tan, *Food Chem.* **2012**, *135*, 799.
- [19] K. Hori, N. Hori-Koriyama, K. Tsumura, E. Fukusaki, T. Bamba, *J. Biosci. Bioeng.* **2016**, *122*, 246.
- [20] F. Destailats, B. D. Craft, M. Dubois, K. Nagy, *Food Chem.* **2012**, *131*, 1391.
- [21] C. Li, Y. Zhou, J. Zhu, S. Wang, S. Nie, M. Xie, *LWT—Food Sci. Technol.* **2016**, *69*, 586.
- [22] H. Zhou, Q. Jin, X. Wang, X. Xu, *Eur. Food Res. Technol.* **2014**, *238*, 495.

- [23] FIZ: Fisch Wirtschaft. Daten und Fakten 2016., Fisch-Informationszentrum e.V. 2016. http://www.fischinfo.de/images/broschueren/pdf/FIZ_DF_2016.pdf Accessed on 22.05.2017.
- [24] M. Aniołowska, A. Kita, *Food Chem.* **2016**, *203*, 95.
- [25] A. P. Ariseto, P. F. C. Marcolino, A. C. Augusti, G. R. Scaranelo, S. A. G. Berbari, A. M. R. O. Miguel, M. A. Morgano, E. Vicente, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2017**, *94*, 449.
- [26] P. Calta, J. Velíšek, M. Doležal, S. Hasnip, C. Crews, Z. Réblová, *Eur. Food Res. Technol.* **2004**, *218*, 501.
- [27] C. Crews, P. Brereton, A. Davies, *Food Addit. Contam.* **2001**, *18*, 271.
- [28] A. Dingel, R. Matissek, *Eur. Food Res. Technol.* **2015**, *241*, 719.
- [29] C. G. Hamlet, L. Asuncion, J. Velíšek, M. Dolezal, Z. Zelinková, C. Crews, W. Anderson, C. Pye, **2014**.
- [30] Y. H. Wong, H. Muhamad, F. Abas, O. M. Lai, K. L. Nyam, C. P. Tan, *Food Chem.* **2017**, *219*, 126.
- [31] EFSA: Analysis of occurrence of 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) in food in Europe in the years 2009–2011 and preliminary exposure assessment. *EFSA J.* **2013**, *11*, 3381.
- [32] S. Merkle, U. Ostermeyer, S. Rohn, H. Karl, J. Fritsche, *Food Chem.* **2018**, *245*, 196.
- [33] H. Karl, S. Merkle, J. Kuhlmann, J. Fritsche, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2016**, *118*, 406.
- [34] AOCS: Official Method Cd 29b-13 Approved 2013. Determination of Bound Monochloropropanediol (MCPD) and Bound 2,3-epoxy-1-propanol (glycidol-) by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS), in: *Official Methods and Recommended Practices of the AOCS*, 2013.
- [35] S. Dissaraphong, S. Benjakul, W. Visessanguan, H. Kishimura, *Bioresour. Technol.* **2006**, *97*, 2032.
- [36] DGF: DGF- Standard Methods C-III 3e (06): Polar compounds content in frying oils—Rapid method with micro silica gel columns. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, Germany **2013**.
- [37] H. Karl, J. Oehlenschläger, K. Bekaert, J.-P. Bergé, A. Cadun, G. Duflos, B. M. Poli, M. Tejada, S. Testi, M Timm-Heinrich, *J. AOAC Int.* **2012**, *95*, 489.
- [38] S. Khoomrung, G. Raber, K. Laoteng, K. A. Francesconi, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2014**, *116*, 795.
- [39] S. Merkle, E. Giese, S. Rohn, H. Karl, I. Lehmann, A. Wohltmann, J. Fritsche, *Food Control* **2017**, *73*, 1379.
- [40] B. Belkova, J. Hradecky, K. Hurkova, V. Forstova, L. Vaclavik, J. Hajslova, *Food Chem.* **2018**, *241*, 51.
- [41] Z. Zelinková, A. Giri, T. Wenzl, *Food Control* **2017**, *77*, 65.
- [42] F. Destailats, B. D. Craft, L. Sandoz, K Nagy, *Food Addit. Contam. A* **2012**, *29*, 29.
- [43] J. Rossell, *Frying: Improving Quality. (Vol. 56)*, Woodhead Publishing, **2011**.
- [44] B. Svejtkovska, M. Dolezal, J. Velisek, *Czech J. Food Sci.* **2006**, *24*, 172.
- [45] J. Kuhlmann, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2011**, *113*, 335.

4.5 Weiterführende Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Einflussfaktoren zur Bildung von MCPD, MCPD-E und G-E in verschiedenen thermisch behandelten Fischerzeugnissen zu untersuchen und mögliche Minimierungsstrategien für diese Produktgruppen abzuleiten.

Darüber hinaus wurde eine umfassende Warenkorbanalyse durchgeführt, wobei die Produktgruppen panierte und vorgebratene, tiefgekühlte Fischerzeugnisse, Bratfischerzeugnisse und geräucherte Fischerzeugnisse betrachtet wurden. Die Daten der Warenkorbanalyse sind darüber hinaus in Planung, veröffentlicht zu werden.

4.5.1 Warenkorbanalysen

Die Warenkorbproben ($n = 247$) wurden sowohl vom Einzel- oder Großhandel als auch direkt vom Hersteller bezogen. Es wurden durchschnittlich ca. 500 g des Fischproduktes aus mehreren Verpackungen mit der gleichen Chargennummer als Untersuchungsmaterial eingesetzt. Bei loser Ware wurden mehrere Fische verwendet. Der essbare Anteil der Fischproben wurde homogenisiert und dann in Plastikbeuteln möglichst luftarm abgefüllt und bei -24 °C bis zur Analyse tiefgefroren. Mittels einer regelmäßigen Analyse eines Referenzmaterials (490 g Sprotten und 1250 g Fischstäbchen) über den gesamten Versuchszeitraum konnte nachgewiesen werden, dass die Gehalte an MCPD-E und G-E bei einer Lagertemperatur von -24 °C stabil nachweisbar waren.

In den Tabellen 2-4 wurde für die Berechnung des Medians und des Mittelwertes (MW) bei Proben mit Gehalten unterhalb der Bestimmungsgrenze (BG) mit dem halben BG-Wert (medium bound) gerechnet. Die BG für freies 2-/3-MCPD wurde auf $10\text{ }\mu\text{g/kg}$ essbarem Anteil und für MCPD-Ester und Glycidylester auf $20\text{ }\mu\text{g/kg}$ essbarem Anteil festgelegt. Für den Fall, dass die Gehalte aller Proben einer Produktgruppe unterhalb der Bestimmungsgrenze lagen, erfolgte nur die Angabe $< \text{BG}$.

4.5.1.1 *Panierte (und vorgebratene), tiefgekühlte Fischerzeugnisse*

Es wurde bereits in Voruntersuchungen festgestellt, dass die MCPD-Gehalte in panierten und vorgebratenen, tiefgekühlten Fischerzeugnissen unterhalb der Bestimmungsgrenze ($< 20\text{ }\mu\text{g/kg}$) lagen (Karl et al., 2016). Die MCPD-Gehalte wurden deshalb in dieser Produktgruppe nicht untersucht. Die MCPD-E- und G-E-Gehalte dieser Produktkategorie können Tabelle 2 entnommen werden.

Tabelle 2: Gehalte an 2-MCPD-E, 3-MCPD-E und G-E in panierten und tiefgekühlten Fischereierzeugnissen aus dem Handel. Die Gehalte wurden als Mittelwerte (MW) ± Standardabweichungen (STD) in µg/kg angegeben. Werte mit unterschiedlich hochgestellten Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) voneinander. Bestimmungsgrenze (BG) < 20 µg/kg. Medium bound: Werte < BG werden durch halbe BG ersetzt.

Produkt	3-MCPD-E [µg/kg]		2-MCPD-E [µg/kg]		G-E [µg/kg]	
	MW ± STD (Min – Max)	Median	MW ± STD (Min – Max)	Median	MW ± STD (Min – Max)	Median
Ungebraten						
Fischstäbchen (n = 1)	< BG	-	< BG	-	< BG	-
Fischfrikadellen (n = 2)	< BG	-	< BG	-	< BG	-
Fischfilets in Panade (n = 5)	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
Vor-frittiert						
Fisch(-)stäbchen (n = 22)	262 ± 179 ^a (< BG-683)	213	115 ± 107 ^c (< BG-490)	85	17 ± 14 ^d (< BG-60)	< BG
Fischfilets in Panade (n = 14)	175 ± 201 ^a (20-792)	115	76 ± 101 ^c (< BG-369)	45	15 ± 12 ^d (< BG-49)	< BG
Tintenfischringe (n = 4)	266 ± 203 ^a (< BG-476)	288	59 ± 57 ^c (< BG-141)	43	< BG	< BG
Gebraten						
Fischfrikadellen (n = 4)	33 ± 16 ^b (< BG-45)	39	< BG	< BG	36 ± 42 ^d (< BG-97)	18

Insgesamt wurden 21 Fischstäbchenproben (Fischanteil $\geq 65\%$) sowie zwei Fischstäbchenproben (Fischanteil $\leq 50\%$) von 12 verschiedenen Herstellern im Handel gekauft und untersucht. Der Fischanteil bestand überwiegend aus Alaska Seelachs. Sechs Produkte waren aus Lachs, Seelachs, Pangasius oder Kabeljau hergestellt. Neben Paniermehl enthielten die Produkte in der Panade hauptsächlich noch Raps- und/oder Sonnenblumenöl, Weizenmehl, Salz und Gewürze. In der Regel werden Fischstäbchen in vor-frittierte Form im Handel angeboten. Eines der Produkte wurde jedoch als ungebraten deklariert. Gemäß den Nährwertangaben auf den Verpackungen lag der Fettgehalt aller vor-frittierten Fischstäbchen zwischen 7-19% (Median 8,5% Fett). Die Handelsprobe mit nicht vor-frittierten Fischstäbchen war mit 0,9% deutlich fettärmer, was darauf rückschließen lässt, dass während des Vor-Frittierens Frittieröl vom Fischstäbchen aufgenommen wird (vgl. Kapitel 2.5.2). Der Kochsalzgehalt der Produkte schwankte gemäß den Herstellerangaben zwischen 0,4-1,2% (Median 0,9% NaCl). Bis auf eine Ausnahme waren in allen vor-frittierten Fischstäbchenproben sowohl 3-MCPD-E als auch 2-MCPD-E nachweisbar. Die Gehalte an 3-MCPD-E waren dabei signifikant ($p < 0,05$) größer als die der 2-MCPD-E (vgl. Tabelle 2). G-E waren in diesen Proben überwiegend nicht quantifizierbar. Nur einzelne Produkte wiesen Gehalte bis zu 60 µg/kg auf.

Neben den Fischstäbchenproben wurden 29 weitere panierte und tiefgekühlte Handelsprodukte von 12 verschiedenen Herstellern untersucht. Der Fischanteil dieser Produkte schwankte zwischen 40-68%. Als Zutaten zur Panade wurden hauptsächlich

Weizenmehl, Sonnenblumen- / Raps- / Palmöl, Stärke, Salz, Backtriebmittel, Gewürze und Kräuter deklariert. 19 dieser Produkte enthielten Filets oder aus Blöcken geschnittene Portionsfilets aus Alaska Seelachs, Kabeljau, Seelachs, Pazifische Scholle oder Scholle. 14 dieser Produkte waren vor-frittiert und enthielten Fettgehalte zwischen 4,5-20,7%. Die fünf ungebratenen Produkte enthielten mit 0,2-0,7% deutlich weniger Fett (Mittelwert 0,5%). Die NaCl-Gehalte lagen sowohl bei den vor-frittierten wie bei den ungebratenen Produkten bei ca. 1% und gleichen darin den Fischstäbchenproben. Die Gehalte an MCPD-E in diesen Produkten schwankten stark. Die Gehalte an 3-MCPD-E lagen, wie bei den Fischstäbchenproben, bis auf ein Produkt signifikant ($p < 0,05$) über den Gehalten an 2-MCPD-E. G-E konnten auch in diesen Proben überwiegend nicht quantitativ ($< BG$) bestimmt werden. Nur einzelne Produkte wiesen G-E-Gehalte auf (vgl. Tabelle 2). Die Tintenfischringe hatten bezogen auf das Gesamterzeugnis einen Tintenfischanteil von 40-50%. Die vier untersuchten Produkte waren vor-frittiert. Gemäß den Nährwertangaben lagen der Fettgehalt zwischen 4,1-12,4% (Median 10,5% Fett) und der Salzgehalt zwischen 1,6-2,8% (Median 1,7% NaCl). In keinem Tintenfischprodukt war G-E quantifizierbar ($< BG$). Die Gehalte an 3-MCPD-E und die stets signifikant ($p < 0,05$) niedrigeren Gehalte an 2-MCPD-E schwankten deutlich (vgl. Tabelle 2). Die untersuchten Frikadellen bestanden zu 50-60% aus zerkleinertem Fleisch einer oder mehrerer Fischarten, das geformt, paniert und gebraten wurde. Zwei der Produkte waren zum sofortigen Verbrauch gedacht. Von einem Hersteller wurden die Frikadellen ungebraten im Handel angeboten. Dies führte auch hier wieder zu sehr unterschiedlichen Fettgehalten der Produkte (7,8-10% gegenüber 1,8% Fett) bei etwa gleichem Kochsalzgehalt. In keiner der gebratenen Fischfrikadellen war die Menge an 2-MCPD-E quantitativ bestimmbar. Die 3-MCPD-E-Gehalte waren ebenfalls niedrig.

Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte belegt werden, dass MCPD-E und G-E erst beim Frittieren gebildet werden. In Produkten, die nicht vor-frittiert in den Handel gebracht wurden, lagen die Gehalte an 2- und 3-MCPD-E sowie an G-E jeweils unterhalb der Bestimmungsgrenze ($< 20 \mu\text{g}/\text{kg}$).

Zwischen den unterschiedlichen, vor-frittierten Produkten (Fischstäbchen, Fischfilets in Panade und Tintenfischringe) wurden beim Vergleich der jeweiligen MCPD-E- und G-E-Gehalte untereinander keine signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$) gefunden. Die Gehalte innerhalb einer Kategorie variierten sehr stark. Zudem konnte kein Hinweis auf eine Abhängigkeit zwischen NaCl- oder Fettgehalten und MCPD-E- oder G-E-Gehalte festgestellt werden. Die große Schwankungsbreite der MCPD-E-Gehalte in allen Proben ist vermutlich hauptsächlich darauf zurückzuführen, dass die Produkte stichprobenartig im Handel eingekauft wurden und sowohl deren exakte Herstellungstemperatur als auch die Erhitzungsdauer sowie der Einsatz der verschiedenen Frittieröle nicht bekannt war. Sowohl die Rohwaren (Frittieröle) als auch die aufgeführten Prozessparameter der Prozesse verschiedener Hersteller, führen vermutlich zu diesen unterschiedlichen Gehalten. Es wurde nachgewiesen, dass diese Faktoren einen signifikanten Einfluss ($p < 0,05$) auf die Bildung von MCPD-E während des Vor-Frittierens haben (Merkle et al., 2018a).

Die 3-MCPD-E-Gehalte waren in allen untersuchten Proben dieser Produktkategorie deutlich höher als die 2-MCPD-E-Gehalte. Dies bestätigten die Unterschiede der 3- und 2-MCPD-E-Gehalte in den durchgeführten Untersuchungen von panierten und vorgebratenen, tiefgekühlten Fischerzeugnissen im Rahmen dieser Arbeit (Merkle et al., 2018a) und ist in

Einklang mit den postulierten Bildungsverhältnissen von 3-MCPD-E und 2-MCPD-E über (partielle) Glyceride (vgl. Kapitel 2.3.1). G-E waren in diesen Proben überwiegend nicht, beziehungsweise nur in geringen Mengen quantifizierbar. Auch im Rahmen weiterer Untersuchungen wurde keine Bildung der G-E-Gehalte in panierten und vorgebratenen, tiefgekühlten Fischerzeugnissen gefunden (Merkle et al., 2018a). Dieses Ergebnis basiert vermutlich auf der üblicherweise verwendeten, industriellen Vor-Frittieremperatur (180-200 °C) und der kurzen Zeit (20-40 s), unter deren Voraussetzungen noch keine ansteigende Bildung von G-E in den Produkten zu erwarten ist (vgl. Kapitel 2.3.3.3).

4.5.1.2 Bratfischerzeugnisse

Es wurden insgesamt 40 verschiedene Bratfischerzeugnisse von 22 Herstellern untersucht. Alle Bratfischerzeugnisse enthielten Hering als Rohstoff. Das Fischgewicht dieser Erzeugnisse muss mindestens 50% betragen (BMEL, 2011). Als Zutaten für die Panade wurden im Wesentlichen Weizenmehl, Stärke und Salz verwendet. Laut Zutatenverzeichnis kam bei allen Bratheringsprodukten Rapsöl als Frittieröl zum Einsatz. Insgesamt 14 Erzeugnisse wurden nicht im Glas oder Kunststoffbehälter als zu kühlendes Produkt mit kurzer Haltbarkeit, sondern in einer Konservendose als pasteurisiertes Produkt angeboten.

In Tabelle 3 sind die in den Bratfischprodukten gefundenen Gehalte an MCPD-E und G-E zusammengestellt. Da bei den Produkten in Aufguss für gewöhnlich nur der Bratfisch verzehrt wird, wurde auch nur dieser untersucht. Freies MCPD war in den Produkten nicht quantifizierbar. Die MCPD-E-Gehalte in den untersuchten Erzeugnissen variierten stark, wobei es sich bei den hohen Gehalten von 602 bzw. 808 µg/kg 3-MCPD-E in den pasteurisierten und nicht pasteurisierten Bratfischprodukten um Ausreißer handelt (vgl. Tabelle 3). Die starke Variation der MCPD-E-Gehalte in diesen Proben entstand vermutlich ebenfalls, wie bei den panierten und vorgebratenen, tiefgekühlten Fischerzeugnissen, dadurch, dass die Produkte stichprobenartig im Handel eingekauft wurden und die essentiellen Einflussfaktoren, wie die exakte Temperatur, die Erhitzungsdauer sowie der Einsatz der verschiedenen Frittieröle zum Zeitpunkt der Herstellung nicht bekannt waren. Auch während der Herstellung von Bratfischerzeugnissen wurde bestätigt, dass die Erhitzungsdauer einen signifikanten Einfluss ($p < 0,05$) auf die Bildung von MCPD-E während des Frittiervorgangs darstellt (Merkle et al., 2018b). Es konnte ebenfalls keine Abhängigkeit hinsichtlich der NaCl- oder Fettgehalte und der MCPD-E- oder G-E-Gehalte identifiziert werden. Alle Produkte enthielten signifikant ($p < 0,05$) mehr 3-MCPD-E als 2-MCPD-E. Dies bestätigten die 3- und 2-MCPD-E-Gehalte in den durchgeführten Untersuchungen von Bratfischerzeugnissen im Rahmen dieser Arbeit (Merkle et al., 2018b). Es steht im Einklang mit den postulierten Bildungs-Verhältnissen von 3-MCPD-E und 2-MCPD-E über (partielle) Glyceride (vgl. Kapitel 2.3.1). Die Gehalte an G-E lagen bei 50% der Produkte unterhalb der Bestimmungsgrenze. Auch im Rahmen weiterer Untersuchungen konnte keine Bildung der G-E-Gehalte in Bratfischerzeugnissen identifiziert werden (Merkle et al., 2018b). Dieses Ergebnis basiert vermutlich auf der üblicherweise verwendeten, industriellen Frittieremperatur (170-180 °C), und der kurzen Zeit (3-15 min) unter deren Voraussetzung noch keine ansteigende Bildung von G-E in diesen Produkten zu erwarten ist (vgl. Kapitel 2.3.3.3). Es wurden keine signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den pasteurisierten und nicht pasteurisierten Bratfischerzeugnissen gefunden. Auch diese Erkenntnis wurde durch

eigene Versuche bestätigt (Merkle et al., 2018b) und basiert vermutlich auf einer zu geringen Pasteurisationstemperatur (95-98 °C), die keine zusätzliche Bildung von MCPD-E bedingt (vgl. Kapitel 5.2.1).

Tabelle 3: Gehalte an 2-MCPD-E, 3-MCPD-E und G-E in (nicht-) pasteurisierten Bratfischerzeugnissen aus dem Handel. Die Gehalte wurden als Mittelwerte (MW) ± Standardabweichungen (STD) in µg/kg angegeben. Werte mit unterschiedlich hochgestellten Buchstaben unterscheiden sich signifikant (p < 0,05) voneinander. Bestimmungsgrenze (BG) < 20 µg/kg. Medium bound: Werte < BG werden durch halbe BG ersetzt.

Produkt	3-MCPD-E [µg/kg]		2-MCPD-E [µg/kg]		G-E [µg/kg]	
	MW ± STD (Min – Max)	Median	MW ± STD (Min – Max)	Median	MW ± STD (Min – Max)	Median
<i>Bratfischerzeugnisse pasteurisiert</i>						
Brathering (n = 14)	167 ± 185 ^a (< BG-602)	89	51 ± 57 ^b (< BG-143)	19	56 ± 58 ^b (< BG-187)	38
<i>Bratfischerzeugnisse nicht pasteurisiert</i>						
Brathering (n = 26)	185 ± 208 ^a (< BG-808)	101	85 ± 127 ^b (< BG-555)	35	46 ± 86 ^b (< BG-332)	< BG

4.5.1.3 Fischdauerkonserven

Als Fischdauerkonserven werden insbesondere Fischerzeugnisse in eigenem Saft und/oder Aufguss, Öl, Saucen oder Cremes bezeichnet. Die Leitsätze für Fische, Krebs- und Weichtiere und Erzeugnisse daraus legen für die einzelnen Produkte unterschiedlich hohe Mindestmengen für den Fischanteil fest. Die 45 untersuchten Fischdauerkonserven von 25 verschiedenen Herstellern enthielten überwiegend Thunfisch (42%) oder Sardinen (24%). Die anderen Produkte waren aus Makrelen, Heringen, Sprotten, Sardellen, Kabeljauleber oder Krebsfleisch hergestellt. 60% der Proben waren in Öl und 20% in Wasser bzw. Aufguss eingelegt. Von diesen Proben wurde nur der Fischanteil (nach dem Abtropfen) untersucht. Die Produkte in einer Sauce hingegen werden normalerweise vollständig verzehrt und sind deshalb auch vollständig homogenisiert und analysiert worden. Die in den Konserven gefundenen Gehalte an MCPD-E und G-E sind in Tabelle 4 aufgeführt. Auch hier fällt auf, dass die Gehalte innerhalb einer Produktgruppe sehr unterschiedlich waren. Es gab insgesamt keine signifikanten (p < 0,05) Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Produktgruppen innerhalb der Fischdauerkonserven. Es ist anzunehmen, dass die großen Schwankungen innerhalb der untersuchten Proben dieser Produktklasse, wie bereits in Kapitel 4.5.1.1 und 4.5.1.2 beschrieben, auf Parameter wie die Behandlungstemperatur und Erhitzungsdauer zurückzuführen sind. Bei den hohen Gehalten von 685 bzw. 269 µg/kg 3-MCPD-E in den Fischdauerkonserven in Sonnenblumenöl und Olivenöl handelt es sich um Ausreißer (vgl. Tabelle 4).

Tabelle 4: Gehalte an 2-MCPD-E, 3-MCPD-E und G-E in Fischdauerkonserven aus dem Handel. Die Gehalte wurden als Mittelwerte (MW) ± Standardabweichungen (STD) in µg/kg angegeben. Werte mit unterschiedlich hochgestellten Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) voneinander. Bestimmungsgrenze (BG) < 20 µg/kg. Medium bound: Werte < BG werden durch halbe BG ersetzt.

Produkt	3-MCPD-E [µg/kg]		2-MCPD-E [µg/kg]		G-E [µg/kg]	
	MW ± STD (Min – Max)	Median	MW ± STD (Min – Max)	Median	MW ± STD (Min – Max)	Median
<i>Fischdauerkonserven</i>						
In Sonnenblumenöl (n = 15)	109 ± 171 ^a (< BG-685)	60	40 ± 75 ^a (< BG-297)	< BG	48 ± 42 ^a (< BG-131)	35
In Rapsöl (n = 2)	(24-50)	-	<BG	-	(36-64)	-
In Olivenöl (n = 10)	71 ± 87 ^a (< BG-269)	40	27 ± 24 ^a (< BG-69)	22	51 ± 39 ^a (< BG-117)	52
In Sauce / Creme (n = 7)	15 ± 14 ^a (< BG-46)	< BG	< BG	< BG	43 ± 57 ^a (< BG-141)	< BG
In Wasser/Aufguss/ eigenem Saft (n = 9)	78 ± 101 ^a (< BG-275)	37	11 ± 4 ^a (< BG-24)	< BG	31 ± 37 ^a (< BG-108)	< BG
Fischcremes (n = 2)	(< BG-149)	-	(< BG-55)	-	< BG	-

Insgesamt wurden keine signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den MCPD-E-Gehalten in den Produktgruppen Fischstäbchen, weitere panierte und tiefgekühlte Fischprodukte und Bratfischerzeugnisse identifiziert. Ein signifikant niedrigerer ($p < 0,05$) 2-MCPD-E- und 3-MCPD-E-Gehalt wurde jedoch bei den Fischdauerkonserven analysiert. Dies basiert vermutlich darauf, dass die Herstellung von Fischdauerkonserven nicht zwingend eine thermische Behandlung der Fischerzeugnisse in Form eines (Vor)-Frittierprozesses beinhaltet. Dieser ist, im Wesentlichen für die Bildung der MCPD-E in panierten und vorgebratenen, tiefgekühlten Fischerzeugnissen und Bratfischerzeugnissen verantwortlich (Merkle et al., 2018a, 2018b). Ein Unterschied wurde zwischen panierten, vorgebratenen und tiefgekühlten Fischerzeugnissen und Bratfischerzeugnissen sowie Fischdauerkonserven hinsichtlich ihrer G-E-Gehalte gefunden. Während die G-E-Gehalte in Fischstäbchenproben und weiteren panierten und tiefgekühlten Produkten nahezu alle unterhalb der Bestimmungsgrenze lagen, wiesen die Bratfischerzeugnisse sowie die Fischdauerkonserven signifikant ($p < 0,05$) höhere G-E-Gehalte auf. Auch weitere Untersuchungen von Bratfischerzeugnissen bestätigten erhöhte G-E-Gehalte im Vergleich zu panierten und vorgebratenen, tiefgekühlten Fischerzeugnissen (Merkle et al., 2018b). Eine mögliche Ursache hierfür ist eine Überschätzung der G-E-Gehalte in diesen Produkten aufgrund der angewandten Analysemethoden. Es konnte nachgewiesen werden, dass der Gehalt an partiellen Acylglyceriden, wie MAG, einen negativen Einfluss auf die Präzision der Analysemethoden darstellen kann (Zelinková et al., 2017). Hohe MAG-Gehalte in Lebensmitteln stellen dadurch einen kritischen Faktor für die Robustheit der Methode dar (vgl. Kapitel 5.2.3).

4.5.1.4 Räucherfischerzeugnisse

Die untersuchten Räucherfischprodukte sind in Tabelle 5 (nach Raucherzeugung sortiert) zusammengestellt. Bei den 80 geräucherten Produkten, die von 31 verschiedenen Herstellern

stammten, handelte es sich um Erzeugnisse aus Aal, Bachsaibling, Buttermakrele, Dornhai, Forelle, Hering, Kabeljau, Karpfen, Lachs, Makrele, Schwarzer Heilbutt, Sprotte, Stör, Thunfisch sowie Garnele. Zur Untersuchung kamen die üblicherweise zum Räuchern verwendeten Fischarten, die als Ganzfisch, Filet, Scheiben, Stremel, Locke, Stück, Happen oder Rollmops gehandelt werden. Gemäß den Angaben auf dem Produkt bzw. Aussagen im Geschäft oder im Internet konnte einem Großteil der Produkte eine bestimmte Raucherzeugungsart zugeordnet werden, nur im Falle der Angabe „unbekannt“ war dies nicht möglich. Als zur Raucherzeugung verwendete Holzart wurden meist Buche, aber auch Erle, Wacholder, „heimische Hölzer“ oder Edelhölzer angegeben. Die Gehalte an freiem MCPD, MCPD-E und G-E in den Räucherfischwaren können Tabelle 6 entnommen werden. Räucherfischprodukte enthalten hauptsächlich freies 3-MCPD. Die höchsten 3-MCPD-Gehalte wurden in Räucheraal und geräucherten Sprotten gefunden (vgl. Tabelle 6). Diese Erzeugnisse stammten ausschließlich aus Altonaer Öfen. Es wurde angenommen, dass sich 3-MCPD während der Räucherung aus dem Holz (Cellulose) bildet und über den Rauch auf die Produkte übertragen wird (Kuntzer, 2006) (vgl. Kapitel 2.3.2). Altonaer Öfen stellen eine traditionelle Räucheranlage dar. Das Holzfeuer und die Verschmelzung in der Kammer dienen dabei gleichzeitig für die Erzeugung des Rauches und der Wärme (direktes Räuchern). Beim indirekten Räuchern erfolgt das Einbringen von Glimm- oder Reibrauch durch einen externen Rauchgenerator (Tülsner & Koch, 2010) (vgl. Kapitel 2.5.4). Für die Reduktion von PAK-Gehalten wurde die Verwendung eines externen Rauchgenerators im Vergleich zum direkten Räuchern bereits empfohlen (Codex Alimentarius Commission, 2009). Aus den Untersuchungsbefunden lässt sich ableiten, dass auch zur Reduktion der 3-MCPD-Gehalte in den Räucherfischerzeugnissen ein externer Rauchgenerator einer direkten Raucherzeugung vorzuziehen ist. In den mit Flüssigrauch hergestellten Produkten lagen nahezu alle Werte unterhalb der Bestimmungsgrenze. Allerdings muss hier hinzugefügt werden, dass diese Produkte ausschließlich von einem Hersteller stammten. Zur Herstellung von Flüssigrauch wird Holz unter Ausschluss von Sauerstoff erhitzt und die Rauchgase in geeigneten Lösungsmitteln kondensiert (Tülsner & Koch, 2010). Dadurch enthält Flüssigrauch unter anderem auch einen reduzierten Gehalten an PAKs (Tülsner & Koch, 2010) (vgl. Kapitel 2.5.4). Die Gehalte an freiem 2-MCPD lagen bei allen untersuchten Räucherwaren unter der Bestimmungsgrenze von 10 µg/kg essbarem Anteil. Abgesehen von einer Warenkorbprobe galt dies auch für die Gehalte an 2-MCPD-E.

In nur ca. 10% der Proben konnten 3-MCPD-E quantifiziert werden. Die Gehalte an G-E lagen zwischen < BG-119 µg/kg. Die vorkommenden MCPD-E- und G-E-Gehalte in diesen Produkten lassen sich aufgrund der vorhandenen Datenlage nicht erklären.

4.5.1.5 Räucherfischkonserven

Die 32 Räucherfischkonserven von 12 Herstellern enthielten überwiegend geräucherten Hering, Lachs, Makrele oder Sprotten, die in eigenem Saft und Pflanzenöl, nur in Pflanzenöl, in Tomatencreme oder als Fischcreme im Handel angeboten wurden. Zur Räucherung wurde nach den Angaben der Hersteller ausschließlich Buchenholz verwendet. Die Art der Raucherzeugung ist nicht bekannt (Tabelle 5). Die in den Räucherfischkonserven gefundenen Gehalte an MCPD-E und G-E können unter Umständen dem zugesetzten Speiseöl

entstammen (Tabelle 6). Die Gehalte an 2-MCPD lagen nur bei zwei Proben knapp über der Bestimmungsgrenze. Für die MCPD-E- und G-E-Gehalte in den Räucherfischkonserven wurden keine signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$) im Vergleich zu der Produktgruppe Räucherfischerzeugnisse gefunden. Die 3-MCPD-Gehalte hingegen sind zwar ähnlich der Räucherfischerzeugnisse, die mittels Glimm-, Reib-, oder Flüssigrauch hergestellt wurden, liegen jedoch signifikant ($p < 0,05$) unterhalb der Produkte, die im Altonaer Ofen geräuchert wurden. Freies 2-MCPD spielt in allen geräucherten Produkten keine bedeutende Rolle.

Tabelle 5: Untersuchte Räucherfischprodukte geordnet nach Art des Raucherzeugers.

Altonaer Ofen	Aal (ganz, Stremel), Buttermakrele, Forelle (ganz, Filet), Schwarzer Heilbutt (Stücke), Karpfen (Stücke), Lachs (Locken, Stremel, Filet in Scheiben geschnitten), Makrele (Fleckmakrele), Sprotten (ganz), Stör (Stremel)
Glimmrauch	Bachsaibling (Filet), Buttermakrele, Hering (Bückling, Rollmops), Garnele, Lachs (Filet in Scheiben geschnitten, Schnecken), Makrele (ganz, Filet), Schwarzer Heilbutt (Mittel- & Endstücke)
Reibrauch	Forelle (ganz, Filet), Lachs (Filet in Scheiben geschnitten, Stremel)
Flüssigrauch	Kabeljau (Filet), Lachs (Tranchen, Filet geschnitten), Schwarzer Heilbutt (Würfel, Filet geschnitten), Thunfisch (Filet)
Unbekannt	Dornhai (Schillerlocken), Forelle (ganz, Filet), Lachs (Filet in Scheiben geschnitten, Stremel), Makrele (Filet), Schwarzer Heilbutt Sprotten

Kumulativer Teil der Dissertation

Tabelle 6: Gehalte an MCPD, MCPD-E und G-E in Räucherfischerzeugnissen – sortiert nach Raucherzeuger und Räucherfischkonserven aus dem Handel. Die Gehalte wurden als Mittelwerte (MW) ± Standardabweichungen (STD) in µg/kg angegeben. Werte mit unterschiedlich hochgestellten Buchstaben unterscheiden sich signifikant (p < 0,05) voneinander. Bestimmungsgrenze (BG) < 10 µg/kg. Medium bound: Werte < BG werden durch halbe BG ersetzt.

Raucherzeuger	3-MCPD [µg/kg]		2-MCPD [µg/kg]		3-MCPD-E [µg/kg]		2-MCPD-E [µg/kg]		G-E [µg/kg]	
	MW ± STD (Min – Max)	Median	MW ± STD (Min – Max)	Median	MW ± STD (Min – Max)	Median	MW ± STD (Min – Max)	Median	MW ± STD (Min – Max)	Median
Räucherfischerzeugnisse										
Altonaer Ofen (n = 34)	55 ± 51 ^{ab} (< BG-251)	40	< BG	< BG	8 ± 12 ^c (< BG-67)	< BG	< BG	< BG	23 ± 27 ^d (< BG-119)	< BG
Glimmrauch (n = 13)	18 ± 7 ^{ad} (11-29)	18	< BG	< BG	16 ± 13 ^{cd} (< BG-34)	< BG	< BG	< BG	16 ± 17 ^d (< BG-43)	< BG
Reibrauch (n = 5)	9 ± 3 ^b (< BG-13)	9	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
Flüssigrauch (n = 10)	6 ± 1 ^c (< BG-8)	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	13 ± 22 ^d (< BG-68)	< BG
Unbekannt (n = 20)	23 ± 22 ^d (< BG-70)	15	< BG	< BG	14 ± 34 ^{de} (< BG-164)	< BG	< BG	7 ± 10 ^d (< BG-54)	12 ± 17 ^d (< BG-69)	< BG
Räucherfischkonserven										
Aufguss / Eigener Saft (n = 4)	17 ± 13 ^{ab} (< BG-34)	14	< BG	< BG	10 ± 0 ^g	10	10 ± 0 ^g	10	39 ± 24 ^{ij} (10-64)	42
Fischcreme mit Rapsöl (n = 5)	24 ± 17 ^{ad} (< BG-50)	20	8 ± 4 ^f (< BG-12)	< BG	66 ± 58 ^{bd} (10-147)	77	29 ± 20 ^h (10-56)	30	10 ± 0 ^g	10
Raps- / Sonnenblumenöl (n = 10)	< BG	< BG	< BG	< BG	19 ± 18 ^{bc} (10-68)	10	12 ± 5 ^h (10-26)	10	45 ± 31 ⁱ (10-98)	46
Rapsöl und eigener Saft (n = 10)	10 ± 9 ^{ac} (< BG-34)	7	< BG	< BG	11 ± 3 ^{cc} (10-20)	10	10 ± 0 ^g	10	42 ± 38 ⁱ (10-98)	26
Tomatencreme und Rapsöl (n = 2)	8 ± 4 (< BG-10)	8	< BG	< BG	15 ± 7 (10-20)	15	10 ± 0 ^g	10	19 ± 12 ⁱ (10-27)	19

5 Zusammenfassende Diskussion

5.1 Analysenmethode zur Bestimmung von MCPD, MCPD-E und G-E in Fischerzeugnissen

Die ersten Analysen zur Bestimmung von MCPD, MCPD-E und G-E in Fischerzeugnissen zeigten, dass freies 3-MCPD hauptsächlich (8-388 µg/kg) in geräucherten Fischerzeugnissen nachweisbar war, während MCPD-E überwiegend (9-377 µg/kg) in Fischstäbchen und frittierten Fischerzeugnissen identifiziert werden konnten (Karl et al., 2016). Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den Ergebnissen des EFSA-Reports (EFSA, 2016), bei dem wesentlich geringere Gehalte an MCPD-E und G-E in geräuchertem, im Vergleich zu frittiertem oder gebratenem Fisch identifiziert wurden (Tabelle 1). Im unbehandelten Fisch wurden keine MCPD-, MCPD-E- oder G-E-Gehalte nachgewiesen (Karl et al., 2016). In kommerziell erhältlichen Nahrungsergänzungsmitteln, in denen Lachsöl enthalten war, fand Kuhlmann (2011) MCPD-E-Gehalte zwischen 0,1-13 mg/kg. Jędrkiewicz et al. (2016) identifizierte 3-MCPD-E-Gehalte zwischen 1,5-5,5 mg/kg in Fischöl.

Aufgrund dieser vorherigen Erkenntnisse, wurden die Analysen im Rahmen dieser Arbeit für die Bestimmung von MCPD in Räucherfischerzeugnisse und von MCPD-E sowie G-E in (vor)-frittierten Fischerzeugnissen und Fischölen durchgeführt. Die dafür verwendeten Analysemethoden wurden am Max Rubner-Institut für Sicherheit und Qualität bei Milch und Fisch in Kooperation mit der SGS Germany GmbH in Hamburg in-house validiert und veröffentlicht (Karl et al., 2016). Die im Rahmen dieser Kooperation erhobenen MCPD-(E)- und G-E Daten wurden dem BVL zur Verfügung gestellt, um somit letztendlich auch der EFSA für zukünftige Risikobewertungen zur Verfügung zu stehen.

5.1.1 Analyse von MCPD in Räucherfischerzeugnissen

Zur Bestimmung von MCPD in geräucherten Fleischerzeugnissen modifizierte Jira (2010) die PBA-Methode, basierend auf der offiziellen Methode zur Bestimmung von 3-MCPD in Lebensmitteln (Plantinga et al., 1991). Wenzl et al. (2015) führte eine in-house Validierung für die PBA-Methode zur Bestimmung von 2- und 3-MCPD, unter anderem für Fleisch- und Fischerzeugnisse, durch. Basierend auf der evaluierten Einheitsmethode DGF C-VI 17 (10) entwickelte Küsters et al. (2010) eine Methode zur gleichzeitigen Bestimmung von 3-MCPD und 3-MCPD-E. Diese Methoden dienten als Grundlage zur Entwicklung der Methode für die Bestimmung von MCPD in geräucherten Fischerzeugnissen, welche letztendlich eine modifizierte Methode auf Basis der von Jira (2010) und Küsters (2010) veröffentlichten Methoden darstellt und im Rahmen dieser Arbeit zur Analyse von freiem MCPD angewandt wurde (Karl et al., 2016). Nach Einwaage (10 g) der zu untersuchenden Fischprobe und Zugabe der internen Standards (3-MCPD-d₅) wird eine 20%-ige NaCl-Lösung hinzugegeben. Die Mischung wird bei 90 °C für 15 min denaturiert, zentrifugiert und mit *n*-Hexan extrahiert. Die wässrige Phase wird nach Verwerfen der organischen Phase, schließlich mit PBA derivatisiert (30 min bei 90 °C) und mittels GC-MS analysiert. Die Linearität der Methode wurde durch Anreicherung verschiedener Konzentrationen an 3-MCPD in zerkleinertem Kabeljau (*Gadus morhua*) bestimmt. Das Bestimmtheitsmaß (R²) lag bei 0,9973, der mittlere

Variationskoeffizient bei 12,3% und als Bestimmungsgrenze wurden 10 µg/kg im Produkt festgelegt.

5.1.2 Analyse von MCPD-E und G-E in Fischölen und (vor)-frittierten Fischerzeugnissen

Die Analyse der MCPD-E und G-E in (vor)-frittierten Fischerzeugnissen und Fischölen wurde mittels einer modifizierten AOCS-Methode Cd 29b-13 („3-in-1-Methode“ nach Kuhlmann) durchgeführt (vgl. Kapitel 2.2.2) (Karl et al., 2016). Nach Einwaage der Proben (500 mg) und Zugabe der deuterierten internen Standards werden die Homogenate mit Diethylether für 15 min extrahiert und anschließend die alkalische Hydrolyse unter Kühlung bei -22 bis -25 °C für 16 h durchgeführt. Die Hydrolysereaktion wird durch Zugabe einer Natriumbromidlösung abgestoppt, wobei das freigesetzte Glycidol in 3-MCPD umgewandelt wird und nach der Derivatisierung mit PBA bestimmt werden kann (Karl et al., 2016). Die Einhaltung der Temperaturen und Zeiten ist bei dieser Methode essentiell, um einen Abbau oder eine Umwandlung der 3-MCPD-Moleküle durch nukleophile Substitution zu verhindern (Hrnčířik et al., 2011). Zur Bestimmung der Wiederfindungsraten von 3-MCPD-E und G-E, wurde ein Referenzmaterial, bestehend aus rohem Seelachs (*Pollachius virens*), 10% Rapsöl, 210 mg/kg G-E-Standard und 156 mg/kg 3-MCPD-E-Standard, hergestellt und sechsmal analysiert. Die Wiederfindungsrate für 3-MCPD-E lag bei 96,7%, für G-E bei 114%. Die Bestimmungsgrenze dieser Methode liegt bei 20 µg/kg. Ein zweites „produktnahes“ Referenzmaterial wurde aus einem Homogenat aus panierten und vorgebratenen, tiefgekühlten Fischstäbchen hergestellt.

Zusätzlich zur modifizierten AOCS-Methode Cd 29b-13 wurde eine modifizierte AOCS-Methode Cd 29c-13 für die Bestimmung von MCPD-E und G-E in Fischerzeugnissen, entwickelt (vgl. Kapitel 2.2.2) (Karl et al., 2016). Ansatz A dieser Methode, der zur Bestimmung von MCPD dient, erlaubt jedoch nur eine semiquantitative Bestimmung der 2-MCPD-E, da festgestellt wurde, dass diese während der Aufarbeitung teilweise in zusätzliches 3-MCPD umgewandelt werden können. Unter definierten Reaktionsbedingungen wurde festgestellt, dass ca. 20,5% des 2-MCPD-d₅ in 3-MCPD-d₅ umgewandelt wurde, wobei eine Reduktion der Dauer der alkalischen Hydrolyse zu einer verminderten Umwandlung führte (Karl et al., 2016). Ansatz B zeigte jedoch eine gute Übereinstimmung der MCPD-E-Gehalte mit der modifizierten AOCS-Methode Cd 29b-13 beim Vergleich der Ergebnisse der Untersuchung eines „produktnahes“ Referenzmaterials aus panierten und vorgebratenen, tiefgekühlten Fischerzeugnissen (Karl et al., 2016). Die G-E-Gehalte lassen sich nur unter Annahme eines hohen Unsicherheitsfaktors durch Differenz der 3-MCPD-Werte aus Ansatz A und B bestimmen (vgl. Formel 3), insbesondere wenn 2-MCPD-E ebenso in der Probe vorhanden sind. Die Anwendung der modifizierten AOCS-Methode Cd 29b-13 erlaubt eine quantitative Bestimmung der MCPD-E- und G-E-Gehalte in Fischerzeugnissen. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass bei dieser Methode unter Umständen die Gehalte an freiem MCPD mitbestimmt werden und so eine Summe aus MCPD und MCPD-E ermittelt wird (Karl et al., 2016). Basierend auf der AOCS-Methode Cd 29b-13 wurde bereits eine empfindlichere Methode (Nachweisgrenze ≤ 5 µg/kg) für die Bestimmung von 2,3-DCP, 1,3-DCP, 2-MCPD, 3-MCPD und Glycidol in Öl veröffentlicht (Kuhlmann, 2016). Ebenso wurde für die Bestimmung von MCPD-E und G-E in Lebensmitteln, das Vorschalten einer

„Heat-Ultrasonic-Pressure“ unterstützten Lösungsmittelextraktion vorgeschlagen (Kuhlmann, 2017).

Nach Aufforderung des JRC durch die EFSA, eine geeignete Analysenmethode für Lebensmittel zu entwickeln, wurden zwei Analysenmethoden auf Basis der AOCS-Methode Cd 29a-13 veröffentlicht. Wenzl et al. (2015) führte eine in-house-Validierung unter Verwendung verschiedener Lebensmittel, inklusive geräuchertem Fisch, durch (vgl. Kapitel 2.2.2). Da eine modifizierte Version dieser Methode (Zelinková et al., 2017) derzeit als Entwurf für eine vierte offizielle AOCS-Methode besteht (AOCS, 2015; Ermacora & Hrnčířík, 2014a), wurde ein Vergleich zwischen den entwickelten modifizierten AOCS-Methoden Cd 29b und 29c für Fischerzeugnisse (Karl et al., 2016) sowie des Methodenentwurfs nach Wenzl et al. (2015) unter Verwendung eines eigens hergestellten Referenzmaterials durchgeführt. Hierfür wurden 490 g Sprotten (essbares Muskelfleisch) und 1 250 g Fischstäbchen (aufgetaut, nicht frittiert) mit der Messermühle Grindomix GM200 (Fa. Retsch) zerkleinert und in einem Becherglas und einem Handrührgerät homogenisiert. Das Homogenat wurde in kleineren Mengen (je ca. 40 g) in Plastiktüten bei -24 °C eingefroren. Für eine Untersuchung wurden die tiefgekühlten, abgefüllten Homogenate nach kurzer Antauzeit (5 min) abgewogen und entsprechend analysiert. Die Durchführung der Qualitätssicherung umfasste die Untersuchung des Referenzmaterials mittels der drei aufgeführten Methoden zur Bestimmung von MCPD, MCPD-E und G-E. Für die Analyse der Proben mittels der EFSA-Methode EN-779 (Wenzl et al., 2015) wurden 5 g der Proben eingewogen. Die Aufarbeitungsschritte umfassen eine vorgeschaltete Probenextraktion mittels Pressurized Liquid Extraction (PLE). Der extrahierte Fettanteil wurde nach Aufarbeitung und Derivatisierung mittels GC-MS analysiert. Die Bestimmung der MCPD-, MCPD-E- und G-E-Gehalte erfolgte gemäß der EFSA-Methode EN-779 (EFSA, 2015). Es wurden jeweils 15 Proben des Referenzmaterials unter Durchführung der einzelnen Methoden analysiert. Die Ergebnisse dieses Methodenvergleichs zeigt Abbildung 17.

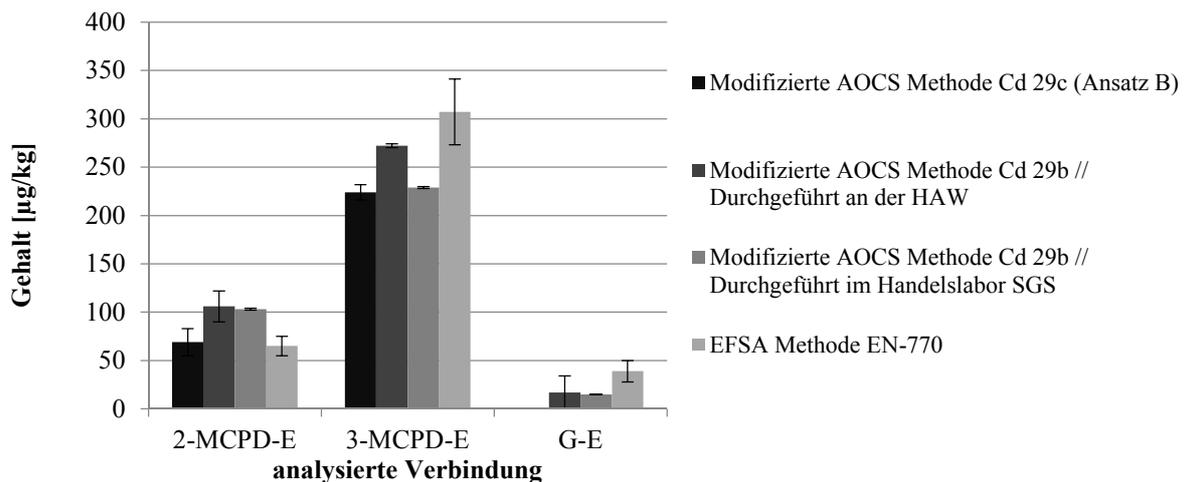


Abbildung 17: Vergleich der Analysenmethoden „Modifizierte AOCS-Methode Cd 29c (Ansatz B)“, „Modifizierte AOCS-Methode Cd 29b“ und „EFSA-Methode EN-770“ zur Bestimmung von MCPD-E und G-E in einem Fisch-Referenzmaterial aus 490 g Sprotte und 1250 g Fischstäbchen.

Die Abbildung verdeutlicht, dass es keine signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen der Anwendung der einzelnen Methoden gibt. Da die Bestimmung der G-E mittels der

modifizierten DGF-Methode C-VI 18 (10) nicht quantitativ möglich ist, wurde sie im Rahmen dieser Arbeit nur als Screening-Methode eingesetzt. Zur Quantifizierung der MCPD-E- und G-E-Gehalte wurde die modifizierte AOCS-Methode Cd 29b verwendet.

Für die Bestimmung der MCPD-E- und G-E-Gehalte in Fischölen sollte ebenfalls die modifizierte AOCS-Methode Cd 29b angewandt werden. Die beiden modifizierten AOCS-Methoden Cd 29b und 29c wurden zur Analyse der MCPD-E-Gehalte in Fischölen verglichen (Tabelle 7). Es konnte festgestellt werden, dass zwischen den beiden Methoden keine signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$) auftraten.

Tabelle 7: Vergleich der modifizierten AOCS-Methoden Cd 29b und 29c für die Bestimmung von MCPD-E in rohen und raffinierten Fischölen. Die Gehalte wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichungen in mg/kg angegeben. Werte mit unterschiedlich hochgestellten Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) voneinander. Die Bestimmungsgrenze (BG) liegt bei 0,02 mg/kg.

	3-MCPD-E [mg/kg]		2-MCPD-E* [mg/kg]	
	Modifizierte AOCS-Methode			
	Cd 29b	Cd 29c	Cd 29b	Cd 29c
Raffinierte Fischöle				
Extrahiert von diversen Fischarten (n = 3)	2,23 \pm 0,85 ^a	2,10 \pm 0,91 ^a	0,28 \pm 0,13 ^b	0,35 \pm 0,09 ^b
Extrahiert von Lachs und anderen Fischarten (n = 3)	0,63 \pm 0,48 ^c	0,70 \pm 0,31 ^c	0,06 \pm 0,05 ^d	0,06 \pm 0,04 ^d
Rohe Fischöle				
Extrahiert von Zuchtfisch* (n = 4)	< BG	< BG	< BG	< BG
Extrahiert von Wildfischen** (n = 9)	0,02 \pm 0,01 ^e	0,02 \pm 0,01 ^e	< BG	< BG

*Lachs, Stör, Wels

**Hering, Dorschleber, Blauer Wittling, Makrele, Sprotte, Fischöl Mischung, Scholle, Sandaal, Sardine, Thunfisch

5.2 Einflussfaktoren zur Bildung von MCPD-E und G-E in Fischölen und (vor-)frittierten Fischerzeugnissen

Die Untersuchung der verschiedenen Fischerzeugnisse welche Fischöle, panierte und vorgebratene, tiefgekühlte Fischerzeugnisse sowie Bratfischerzeugnisse einbezogen, ergab die Erkenntnis, dass unterschiedliche Einflussfaktoren in variierendem Ausmaß für die Bildung von MCPD-E und G-E in diesen Produkten verantwortlich sind. Dabei zeigten insbesondere die Temperatur, Zeit, Lipidkomponenten sowie die Chloridquelle einen essentiellen Einfluss. Im folgenden Kapitel sollen diese Parameter im Hinblick auf die verschiedenen Produktkategorien übergreifend diskutiert werden.

5.2.1 Einfluss der Temperatur auf die Bildung von MCPD-E und G-E in Fischölen und (vor-)frittierten Fischerzeugnissen

In allen untersuchten Produktgruppen (Fischöle, Bratfischerzeugnisse und panierte und vorgebratene, tiefgekühlte Fischerzeugnisse) konnte ein Zusammenhang zwischen der Behandlungstemperatur und der Bildung von MCPD-E festgestellt werden.

Bei der Speiseölraffination wurde die Desodorierung, bei der hohe Temperaturen eine große Rolle spielen (230-270 °C), als Kernprozess zur MCPD-E- und G-E-Bildung identifiziert (Franke et al., 2009, Ramli et al., 2011) (vgl. Kapitel 2.3.3). In Anlehnung an diese Erkenntnis

wurde der Unterschied zwischen rohen und raffinierten Fischölen untersucht. Bei der Desodorierung von Fischölen können Temperaturen von $> 200\text{ °C}$ erreicht werden (Čmolík & Pokorný, 2000) (vgl. Kapitel 2.5.1). MCPD-E (Destailats et al., 2012b) und auch G-E (Hrnčirik & van Duijn, 2011) können nachweislich bei diesen Temperaturen gebildet werden (vgl. Kapitel 2.3.3.3).

In rohen Fischölen lagen sowohl in Extrakten aus Zuchtfischen wie auch aus Wildfischen nahezu alle MCPD-E- und G-E-Gehalte unterhalb der Bestimmungsgrenze ($< 0,02\text{ mg/kg}$) (vgl. Tabelle 7) (Merkle et al., 2017). Dies zeigt, dass sich kein Rückschluss auf die Art des Fischrohöles ziehen lässt und die MCPD-E-Gehalte erst durch den Prozess der Fischölraffination gebildet werden. Bei den G-E-Gehalten zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Fischart (Merkle et al., 2017). In allen rohen Fischölen wurden signifikant höhere ($p < 0,05$) G-E-Gehalte als MCPD-E-Gehalte gefunden (Merkle et al., 2017). Dieser Befund spiegelte sich in einigen Studien bezüglich roher Speiseöle, in denen G-E in höheren Anteilen als MCPD-E identifiziert wurden (Matthäus et al., 2011; MacMahon et al., 2013; Qi et al., 2015). In den Fischölen, welche aus Zucht- wie auch aus Wildfischen extrahiert und anschließend raffiniert wurden, konnten signifikant höhere ($p < 0,05$) Gehalte als in den rohen Fischölen festgestellt werden. Dadurch konnte der Einfluss der Hitzebehandlung während der Raffination auf die Bildung von MCPD-E eindeutig nachgewiesen werden. Zwischen den verschiedenen Fischarten gab es keine signifikanten Unterschiede. Die höchsten G-E-Gehalte wurden in einer hoch aufgereinigten Fischölprobe identifiziert ($2,24\text{ mg/kg}$). Die 3-MCPD-E- ($0,16\text{-}2,84\text{ mg/kg}$) und 2-MCPD-E- ($0,01\text{-}0,38\text{ mg/kg}$) Gehalte lagen in ähnlichen Bereichen wie die von Kuhlmann (2011) und Jędrkiewicz et al. (2016) identifizierten Gehalte in Fischölproben (Merkle et al., 2017). Die 2-MCPD-E-Gehalte waren um ca. 88% niedriger als die 3-MCPD-E-Gehalte, was ebenfalls von Jędrkiewicz et al. (2016) in früheren Studien bestätigt wurde (Merkle et al., 2017). Sowohl die 2- und 3-MCPD-E- als auch die G-E- ($0,06\text{-}1,0\text{ mg/kg}$) Gehalte zeigten auch bezüglich der raffinierten Speiseöle vergleichbare beziehungsweise zum Teil sogar höhere Werte. Die EFSA berichtete von Werten für 3-MCPD-E zwischen $0,05\text{-}0,61\text{ mg/kg}$, für 2-MCPD-E zwischen $0,09\text{-}0,27\text{ mg/kg}$ und für G-E zwischen $0,015\text{-}0,65\text{ mg/kg}$ (EFSA, 2016).

Auch für die zweite untersuchte Produktgruppe der panierten und vorgebratenen, tiefgekühlten Fischerzeugnisse wurde ein Zusammenhang zwischen der thermischen Behandlung der Produkte (Frittieren) und der Bildung von MCPD-E festgestellt. Es konnten signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der MCPD-E-Gehalte zwischen Versuchsreihen, die bei 185 °C im Vergleich zu 200 °C durchgeführt wurden, beobachtet werden. Die G-E-Gehalte zeigten keine signifikanten Unterschiede bezüglich verschiedener Temperaturen (Merkle et al., 2018a). Die nicht signifikante ($p < 0,05$) G-E-Bildung in dieser Produktklasse konnte auch durch die Ergebnisse der Warenkorbanalyse bestätigt werden (vgl. Kapitel 4.5.1.1). Durch in-vitro-Studien konnte gezeigt werden, dass 3-MCPD-E bereits ab Temperaturen von $180\text{-}200\text{ °C}$ gebildet werden können (Destailats et al. 2012b). Ein Anstieg von G-E wurde hingegen innerhalb von fünf Stunden erst ab einer Temperatur von 230 °C bei der Desodorierung von Speiseölen festgestellt, wobei beobachtet wurde, dass mit ansteigender Temperatur und Dauer die Zersetzungsrate der G-E zunimmt (Hrnčirik und van Duijn, 2011). Da im Rahmen der Frittierstudien dieser Arbeit ausschließlich Temperaturen bis 200 °C im Zusammenhang mit

einer relativ kurzen Frittierzeit (wenige Sekunden) angewandt wurden, könnte dies eine Erklärung für die unveränderten G-E-Gehalte sein. Bei der Raffination der Fischöle hingegen spielen Temperaturen $> 200\text{ °C}$ eine große Rolle, was wiederum die Bildung der G-E in den Fischölen im Unterschied zu den (vor)-frittierten Fischprodukten erklärt. In einigen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen der Bildung von 3-MCPD-E und ansteigenden Temperaturen in Modellstudien bei der haushaltstechnischen Verarbeitung von Speiseölen und Fetten gezeigt (Calta et al., 2004; Hamlet et al., 2014) (vgl. Kapitel 2.3.3). Li et al. (2016) zeigten einen Anstieg an 3-MCPD-E zwischen $160\text{--}220\text{ °C}$ beim Erhitzen von Modellsystemen aus Rapsöl und einer NaCl-Lösung. Erst ab $220\text{--}250\text{ °C}$ wurde eine Reduktion der 3-MCPD-E-Gehalte festgestellt. Auch Wong et al. (2017) wies höhere 3-MCPD-E-Gehalte beim Frittieren von Kartoffelchips in Palmöl bei 180 °C im Vergleich zu 160 °C nach, während sich für die G-E-Gehalte dieser Effekt nicht bestätigen lies. Im Gegenteil dazu zeigten Wong et al. (2017) und Aniołowska & Kita (2016) sogar eine Abnahme der G-E-Gehalte in Abhängigkeit von der Temperatur während des Frittierens. Bratfischerzeugnisse können im Gegensatz zu panierten und vorgebratenen, tiefgekühlten Fischerzeugnissen einer zusätzlichen thermischen Behandlung durch Pasteurisation ($95\text{--}98\text{ °C}$) unterzogen werden. Diese zeigte jedoch keinen Einfluss auf die Bildung der MCPD-E und G-E in den Produkten (Merkle et al., 2018b). Auch im Rahmen der Warenkorbuntersuchungen wurden keine signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$) der MCPD-E-Gehalte zwischen den pasteurisierten und nicht pasteurisierten Bratfischerzeugnissen gefunden (vgl. Kapitel 4.5.1.2).

Sowohl für panierte und vorgebratene, tiefgekühlte Fischerzeugnisse als auch für Bratfischerzeugnisse konnte, wie bereits für die Fischöle, festgestellt werden, dass die 2-MCPD-E-Gehalte stets geringer als die 3-MCPD-E-Gehalte waren (Merkle et al., 2018a, 2018b). Dies wurde von Calta et al. (2004) beim Erhitzen eines Modellsystems aus Glycerol, Triolein, Sojalecithin und NaCl bei 200 °C für 30 min bestätigt und entspricht dem postulierten Bildungsverhältnis von 3-MCPD und 2-MCPD durch partielle Glycerole (Collier, Cromie & Davies, 1991) (vgl. Kapitel 2.3.1).

5.2.2 Einfluss der Zeit auf die Bildung von MCPD-E und G-E in Fischölen und (vor)-frittierten Fischerzeugnissen

Im Zusammenhang mit der Frittieretemperatur wurde vor allem eine Abhängigkeit von der Erhitzungsdauer des Frittieröls für die Bildung sowie den Abbau der MCPD-E- und G-E-Gehalte in panierten und vorgebratenen, tiefgekühlten Fischerzeugnissen, aber auch für Bratfischerzeugnisse festgestellt (Merkle et al., 2018a, 2018b).

Während der Kurzzeitversuche (bezogen auf die Erhitzungsdauer des Frittieröls) der panierten und vorgebratenen, tiefgekühlten Fischerzeugnisse (1-7 h) sowie der Bratfischprodukte (1-16 h), konnte in allen Testreihen dieser Arbeit ein Zusammenhang zwischen der Bildung von MCPD-E-Gehalten und der Zeit beobachtet werden (Merkle et al., 2018a, 2018b). Während der Langzeitversuche der panierten und vorgebratenen, tiefgekühlten Fischerzeugnisse (0-60 h) wurde jedoch ab einer Erhitzungsdauer des Frittieröls von 18 h eine signifikante ($p < 0,05$) Abnahme der MCPD-E-Gehalte in den Frittierölen festgestellt, während die G-E-Gehalte relativ konstant blieben. Bei den Bratfischerzeugnissen hingegen

wuchsen die MCPD-E-Gehalte in Abhängigkeit der Erhitzungsdauer des Frittieröls über einen Zeitraum von 1-72 h stetig an (Merkle et al., 2018a, 2018b).

Li et al. (2016) konnten in Modellstudien aus Rapsöl und NaCl bei einer Erhitzung auf 160 °C für 24 h ebenfalls zuerst einen Anstieg der 3-MCPD-E-Gehalte bis zu einer achtstündigen Erhitzungsdauer und anschließend eine Reduktion der Gehalte beobachten. Zhou et al. (2014) bestätigten einen Anstieg von 3-MCPD-E-Gehalten in einem Modellsystem aus Palmöl, NaCl und Wasser bei einer Erhitzung auf 160 °C nach 16 h, wonach eine Abnahme bis zu einer Erhitzungsdauer von 30 h folgte. Wong et al. (2017) sowie Aniołowska & Kita (2016) zeigten darüber hinaus eine stetige Abnahme der 3-MCPD-E in Abhängigkeit von der Erhitzungsdauer beim Frittieren von Kartoffelchips bei 180 °C für 40 h. Es wurde vermutet, dass diese Beobachtung auf einer Gleichgewichtsreaktion zwischen der Bildung und dem Abbau der 3-MCPD-E basiert (Li et al., 2016). Hrnčičík & van Duijn (2011) sowie Shimizu et al. (2012a) zeigten, dass die Reaktionsmechanismen von 3-MCPD-E unter Anwesenheit von Chlorid nach einer relativ kurzen Zeit beendet sind, während für G-E konstante Level während einer Erhitzungsperiode festgestellt wurden. Shimizu et al. (2013a) bestätigte ebenfalls, dass sich sowohl für G-E als auch 3-MCPD-E in Abhängigkeit vom Temperaturniveau ein Gleichgewicht, welches sich aufgrund der unterschiedlichen Bildungsmechanismen nach unterschiedlicher Zeit festigt, einstellt (vgl. Kapitel 2.3.3). Darüber hinaus wird derzeit angenommen, dass der Abbau der MCPD-E während des Frittierprozesses vermutlich aufgrund des Wassereintrags durch das Frittiergut (Hydrolyse) sowie die eintretende Fettoxidation zunehmen kann (vgl. Kapitel 2.5.2). Erklärungsansatz hierfür ist eine nukleophile Substitution durch Wasser oder eine freie Fettsäure unter Bildung von DAG oder TAG (Ermacora & Hrnčičík, 2014b). Aus diesen Erkenntnissen wurde für die vorliegenden Ergebnisse aus den Frittierstudien der panierten und vorgebratenen, tiefgekühlten Fischerzeugnissen sowie der Bratfischerzeugnisse geschlussfolgert, dass die Bildung und der Abbau der MCPD-E- und G-E-Gehalte auf Gleichgewichtsreaktionen beruht. Im Vergleich zum Frittierprozess zeigte die Dauer der Pasteurisation von Bratfischerzeugnissen keinen signifikanten Einfluss ($p < 0,05$) auf die Bildung oder den Abbau von MCPD-E oder G-E in den Produkten (Merkle et al., 2018b).

Bei der Untersuchung des Einflusses der Raffination auf die MCPD-E- und G-E-Gehalte in kommerziellen Fischölen, konnte die Prozessdauer der Deodorisierungsverfahren nicht berücksichtigt werden (Merkle et al., 2017). Ähnlich wie beim Frittierprozess befinden sich die 3-MCPD-E- und G-E-Gehalte jedoch auch während der Desodorierung von Speiseölen in einer ständigen Gleichgewichtsreaktion zwischen Abbau und Bildung (Craft et al., 2012b; Hrnčičík & van Duijn, 2011; Weißhaar & Perz, 2010). Es kann somit davon ausgegangen werden, dass die Bildung der MCPD-E und G-E auch bei der Raffination der Fischöle sowohl abhängig von der Temperatur als auch von der Zeit ist.

Bei allen untersuchten kommerziellen Produkten im Rahmen der Warenkorbuntersuchungen (vgl. Kapitel 4.5) wurde festgestellt, dass zum Teil erhebliche Schwankungen der MCPD-E- und G-E-Gehalte (panierte und vorgebratene, tiefgekühlte Fischerzeugnisse und Bratfischerzeugnisse, sowie -Konserven) innerhalb einer Produktgruppe auftraten.

5.2.3 Einfluss von Lipiden als Präkursoren für die Bildung von MCPD-E und G-E in Fischölen und (vor)-frittierten Fischerzeugnissen

Zur Herstellung von raffinierten Fischölen in Form von n-3-PUFA-Konzentraten werden vorzugsweise Fischspezies mit einem hohen Fettgehalt verwendet. Darunter fallen zum Beispiel Heringe, Lachs, Sprotten, Makrelen oder Thunfische (Khoormung et al., 2014). Ein Grund für die Entstehung der vergleichsweise hohen MCPD-E- und G-E-Gehalte in raffinierten Fischölen kann somit darin begründet liegen, dass die Fischarten, die zur Herstellung verwendet werden, meist aufgrund der hohen Fettgehalte auch hohe Gehalte an ungesättigten Fettsäuren enthalten (Khoormung et al., 2014). Mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA) kommen üblicherweise in Form von TAGs vor (Bergé & Barnathan, 2005). Unter kontrollierten Bedingungen wurde gezeigt, dass sich MCPD-E hauptsächlich aus TAGs bilden (Destailats et al., 2012b). G-E hingegen werden hauptsächlich von DAGs gebildet (Craft et al., 2012b, Destailats et al., 2012a; Hrnčirik & van Duijn, 2011; Masukawa et al., 2010).

Für die panierten und vorgebratenen, tiefgekühlten Fischerzeugnisse werden hingegen hauptsächlich Magerfische, wie Alaska Seelachs (*Theragra chalcogramma*), Kabeljau (*Gadus morhua*) und Seehecht (*Merluccius spp.*) verwendet (Schubring, 1999; Krüger, 2004). Zudem bleibt der Kern während dieses Herstellungsprozess beim Vorfrittieren gefroren (Krüger, 2004). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass das Fett im Fischanteil bei dieser Produktgruppe keinen Anteil als Präkursor für die Bildung von MCPD-E und G-E darstellt. Es wurde jedoch untersucht, ob die Zugabe einer Mischung aus MAG und DAG als Emulgator (E471) in der Panade, einen Einfluss auf die Bildung der MCPD-E oder G-E in diesen Produkten hat. Dafür wurden Produkte mit dem Emulgator in einer Konzentration von 3% und 5% sowie eine Kontrollprobe (0% Emulgator) zum Vergleich, nach dem Frittierprozess (195 °C für 34 s) auf MCPD-E- und G-E-Gehalte analysiert (Merkle et al., 2018a). Nach einer Erhitzungsdauer des Frittieröls von sieben Stunden wurde eine signifikante Erhöhung ($p < 0,05$) der 3-MCPD-E-Gehalte in den beiden Produkten, die den Emulgator enthielten, im Vergleich zur Kontrollprobe identifiziert (Merkle et al., 2018a). Es konnte somit nachgewiesen werden, dass die Zugabe eines Emulgators (E471) zur Panade die Bildung von 3-MCPD-E in Abhängigkeit von der Erhitzungsdauer des Frittieröls fördert. Eine Erhöhung der G-E-Gehalte wurde, vermutlich aufgrund der vorherrschenden Temperaturbedingungen (180-200 °C), nicht beobachtet (vgl. Kapitel 5.2.1). Darüber hinaus wurde festgestellt, dass sowohl die MCPD-E- als auch die G-E-Gehalte in den panierten und vorgebratenen, tiefgekühlten Fischerzeugnissen bezogen auf ihren Fettgehalt nahezu keine signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$), verglichen mit den Gehalten in den entsprechenden Frittierölen, aufwiesen. Es wurden hohe Korrelationen ($r = 0,92-1,00$) zwischen den MCPD-E-Gehalten in den Produkten in Bezug auf ihren Fettgehalt und den MCPD-E-Gehalten im Frittieröl gefunden. Aufgrund dieser Ergebnisse kann abgeleitet werden, dass die MCPD-E und G-E in diesen Produkten hauptsächlich aus den Frittierölen stammen (Merkle et al., 2018a). Fakt ist, dass diese Produkte während des Frittierens, durch den Prozess des Hitze- und Massentransfers, ca. 8% Frittieröl aufnehmen und gleichzeitig Wasser verlieren (vgl. Kapitel 2.5.2). Es wurde bereits in einigen Veröffentlichungen postuliert, dass eine endogene Bildung der MCPD-E- und G-E-Gehalte in verschiedenen frittierten Lebensmitteln ausgeschlossen und vielmehr eine exogene

Bildung durch das Frittieröl angenommen wird (Arisseto et al., 2017; Dingel & Matissek, 2015; Hamlet et al., 2014). Hamlet et al. (2014) stellten diesen Effekt bei verschiedenen Lebensmitteln, wie Käse, Salami, Bratfett und Kartoffelerzeugnissen, fest. Dingel & Matissek (2015) bestätigten den carry-over Effekt der MCPD-E- und G-E-Gehalte aus dem Frittieröl während des Frittierens von Kartoffelchips bei 160-180 °C für 100-200 s. In verschiedenen weiteren Produkten wie Bananen, Kartoffel, Maniok, Zwiebeln, Knoblauch, Maismehl, Reis und Fleisch konnte der exogene Eintrag der MCPD-E- und G-E-Gehalte auf das Frittiergut ebenfalls nachgewiesen werden (Arisseto et al., 2017) (vgl. Kapitel 2.3.3). Auch bei der Untersuchung verschiedener kommerzieller Fischstäbchenproben und weiteren panierten und tiefgekühlten Fischprodukten im Rahmen der Warenkorbuntersuchung wurde festgestellt, dass die Verwendung verschiedener Frittieröle vermutlich einen großen Einfluss auf die stark variierenden MCPD-E-Gehalte in den Produkten hat (vgl. Kapitel 4.5).

Zur Herstellung von Bratfischerzeugnissen können grundsätzlich alle See- und Süßwasserfische und Teile davon als Rohstoffe genutzt werden (Tülsner & Koch, 2010). Hauptsächlich werden in Deutschland jedoch Fettfische, wie Heringe und in geringerem Ausmaß Makrelen oder Aale, verwendet (Tülsner & Koch, 2010). Ein erheblicher Unterschied zu den vorherig genannten panierten und vorgebratenen, tiefgekühlten Fischerzeugnissen stellt die signifikant längere Frittierzeit der Bratfischerzeugnisse dar. Nach einer Verweildauer von bis zu 15 min bei 140-200 °C im Frittierbecken, weist der Fisch eine Kerntemperatur von mindestens 60 °C auf (Tülsner & Koch, 2010; BMEL, 2011). Es wurde beobachtet, dass zwischen den MCPD-E-Gehalten in den Bratfischerzeugnissen bezogen auf ihren Fettgehalt und den entsprechenden Gehalten im Frittieröl hohe Korrelationen ($r = 0,93-0,99$) herrschen. Für G-E konnten jedoch keine Korrelationen bezüglich der Gehalte in den Produkten und dem Frittieröl identifiziert werden. Im Unterschied zu den Gehalten in den panierten und vorgebratenen, tiefgekühlten Produkten, waren die G-E-Gehalte in den Bratfischerzeugnissen bezogen auf ihren Fettgehalt jedoch signifikant höher ($p < 0,05$) als in den Frittierölen (Merkle et al., 2018b). Darüber hinaus wurden auch im Rahmen der Warenkorbuntersuchung im Vergleich zur Gruppe der panierten und vorgebratenen, tiefgekühlten Fischerzeugnissen signifikant höhere ($p < 0,05$) G-E-Gehalte in Bratfischerzeugnissen gefunden (vgl. Kapitel 4.5.1). Zusätzlich zum Einfluss der Pasteurisation wurde in weiterführenden Untersuchungen der Unterschied zwischen der Pasteurisation (95 °C für 30-40 min) und der Sterilisation (121 °C für 10-30 min) von Bratheringsprodukten getestet (Tabelle 8). Dabei wurde festgestellt, dass zumindest bei Vergleich der Pasteurisation und Sterilisation nach 30 min ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den G-E-Gehalten, nicht jedoch den MCPD-E-Gehalten in den Produkten auftrat.

Tabelle 8: Vergleich der MCPD-E- und G-E-Gehalte in pasteurisierten und sterilisierten Bratheringsprodukten. *Die Gehalte wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichungen in $\mu\text{g}/\text{kg}$ angegeben. Werte mit unterschiedlich hochgestellten Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) voneinander. Die Bestimmungsgrenze (BG) liegt bei $20 \mu\text{g}/\text{kg}$.

Versuchsreihen	3-MCPD-E* [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	2-MCPD-E* [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	G-E* [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
Pasteurisation, 30 min	$34 \pm 5,4^{\text{ac}}$	< BG	$55 \pm 12^{\text{e}}$
Pasteurisation, 35 min	$31 \pm 9^{\text{ac}}$	< BG	$80 \pm 4,1^{\text{e}}$
Pasteurisation, 40 min	$46 \pm 8,7^{\text{a}}$	< BG	$84 \pm 11^{\text{ef}}$
Sterilisation, 10 min	$44 \pm 10,3^{\text{acd}}$	< BG	$75 \pm 9,7^{\text{e}}$
Sterilisation, 15 min	$63 \pm 13,9^{\text{abd}}$	< BG	$107 \pm 15,0^{\text{fg}}$
Sterilisation, 20 min	$42 \pm 4,6^{\text{ad}}$	< BG	$80 \pm 12,9^{\text{ef}}$
Sterilisation, 25 min	$39 \pm 8,3^{\text{acd}}$	< BG	$132 \pm 5,6^{\text{g}}$
Sterilisation, 30 min	$40 \pm 10,6^{\text{acd}}$	< BG	$112 \pm 17,4^{\text{fg}}$

Eine denkbare Ursache für erhöhte G-E-Gehalte in Bratfischerzeugnissen könnte in einer möglichen Umwandlung von MAG zu MBPD-E während der Probenaufarbeitung (vgl. Kapitel 2.2.3) liegen. Zelinková et al. (2017) stellten eine Überschätzung der G-E-Gehalte durch Anwendung der Methode von Wenzl et al. (2015) fest, welche für die Analyse in Lebensmittelmatrices auf Basis der AOCS-Methode Cd 29a-13 entwickelt wurde. Es wurde gezeigt, dass der Gehalt an partiellen Acylglyceriden wie insbesondere MAG einen negativen Einfluss auf die Methodenpräzision ausübt. Dies wird damit begründet, dass MAG in saurem Milieu mit Bromid in derselben Weise wie G-E reagieren können, wodurch zusätzliche MBPD-E gebildet werden. Somit stellt der MAG-Gehalt in Lebensmitteln einen kritischen Faktor für die Robustheit der Methode dar (Zelinková et al., 2017). Um diese Hypothese zu bestätigen, wären jedoch weitere Untersuchungen notwendig.

5.2.4 Einfluss der Chloridquelle auf die Bildung von MCPD-E und G-E in Fischölen und (vor)-frittierten Fischerzeugnissen

Panierte und vorgebratene, tiefgekühlte Fischerzeugnisse wie Fischstäbchen werden während ihres Herstellungsprozesses zunächst nass- und anschließend trocken paniert (vgl. Kapitel 2.5.2). Die Trockenpanade enthält hauptsächlich Paniermehl und Gewürze, während sich die Nasspanade in der Regel aus Mehl, Stärke, Wasser sowie circa 3,5-4% NaCl zusammensetzt. Das Endprodukt enthält schließlich 1,0-1,2% NaCl. Der Einfluss variierender NaCl-Konzentrationen auf die Bildung von MCPD-E und G-E in Fischstäbchen wurde untersucht (Merkle et al., 2018a). Dabei wurden signifikant höhere ($p < 0,05$) MCPD-E-Gehalte in Produkten, die 1,5% NaCl in der Nasspanade enthielten, im Vergleich zu Produkten denen nur 0,16% NaCl zugegeben wurde, gefunden (Merkle et al., 2018a). Im Widerspruch dazu wurden jedoch kaum Unterschiede zwischen Produkten mit 15% NaCl im Vergleich zu 0,16% NaCl in der Nasspanade identifiziert (Merkle et al., 2018a). Daraus wurde geschlussfolgert, dass kein konsistenter Einfluss der Chloridquelle bei diesen Produkten zu beobachten war. Auch in den entsprechenden Warenkorbproben konnte kein Zusammenhang zwischen dem NaCl-Gehalt in den untersuchten Proben und deren MCPD-E- oder G-E-Gehalte festgestellt werden (vgl. Kapitel 4.5.1.1).

Verschiedene Modellstudien zur haushaltstechnischen Verarbeitung von Speiseölen und -fetten zeigten ebenfalls zum Teil widersprüchliche Erkenntnisse bezüglich des Einflusses der Chloridquelle auf die Bildung von MCPD-E und G-E bei der thermischen Verarbeitung von Lebensmitteln (vgl. Kapitel 2.3.3). So konnte Wong et al. (2017) beim Frittieren von Kartoffelchips (160-180 °C für 2,5 min) einen signifikanten ($p < 0,05$) Anstieg an 3-MCPD-E-Gehalten und einen (nicht signifikanten) Anstieg der G-E-Gehalte in Bezug auf eine zunehmende NaCl-Konzentration (1-5%) in den Produkten beobachten. Zhou et al. (2014) wiederum konnten in einem Modellsystem bei dem Palmöl und NaCl auf 160 °C für 4 h erhitzt wurden, keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration zeigen. Li et al. (2016) stellten jedoch den Effekt der NaCl-Konzentration unter einen weiteren Aspekt. Nach Erhitzen von Modellsystemen aus Rapsöl und NaCl wurde gezeigt, dass die 3-MCPD-E-Gehalte zunächst mit ansteigender NaCl-Konzentration zunahm, sich ab einer bestimmten Menge jedoch nicht mehr signifikant ($p < 0,05$) veränderten. Li et al. (2016) stellten die Hypothese auf, dass dieser Effekt durch einer Sättigung der Öle durch NaCl hervorgerufen wird. Dies könnte schließlich auch eine Erklärung für die inkonsistenten Ergebnisse beim Frittieren der Fischstäbchen sein (Merkle et al., 2018a).

Für die Herstellung von Bratfischerzeugnissen werden Fischfilets gewaschen, leicht vorgesalzen (0,8-1,0% NaCl), paniert (0,9-1,0% NaCl) und anschließend frittiert (vgl. Kapitel 2.5.3). Zuletzt wird der Aufguss, bestehend aus Trinkwasser, Essig, Säuerungsmitteln (BMEL, 2011) und üblicherweise ca. 3% NaCl und weiteren Gewürzen, zugegeben. Im Endprodukt beträgt die NaCl-Konzentration schließlich ca. 1,5-2%. Auch für Bratheringsprodukte wurde der Einfluss der Chloridquelle auf die Bildung von MCPD-E und G-E untersucht, wobei Produkte mit 0,5-1,0% NaCl und 0,1% NaCl in der Nasspanade verglichen wurden. Nach 5-9 Tagen Erhitzungsdauer des Frittieröls wurden wie bereits bei den Fischstäbchen beobachtet (Merkle et al., 2018a), keine signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den MCPD-E-Gehalten in den Produkten, bezogen auf ihren Fettgehalt, identifiziert. Die G-E-Gehalte waren in den Bratheringsprodukten mit höherer NaCl-Konzentration, über die gesamte Erhitzungsdauer des Frittieröls von neun Tagen, signifikant höher ($p < 0,05$) als die G-E-Gehalte in den Produkten mit niedrigerer NaCl-Konzentration. Somit wurde eine Abhängigkeit der G-E-Gehalte von der Chloridquelle in Bratfischerzeugnissen beobachtet (Merkle et al., 2018a). Die untersuchten kommerziellen Bratfischerzeugnisse lassen jedoch nicht auf einen Zusammenhang zwischen der NaCl-Konzentration und MCPD-E- oder G-E-Gehalten schließen (vgl. Kapitel 4.5.1.2). Es wurde ebenso festgestellt, dass die NaCl-Konzentration in den Endprodukten der beiden Versuchsreihen (viel/wenig NaCl) gleich waren (ca. 1,5%) (Merkle et al., 2018b). Dies ist auf den Konzentrationsausgleich zwischen dem Aufguss und der wässrigen Phase des Fisches zurückzuführen, da das Salz im Fischanteil nicht gebunden vorliegt (vgl. Kapitel 2.5.3). Dieser Ausgleich ist nach ca. 24 h abgeschlossen (Tülsner & Koch, 2010). Aufgrund der hohen NaCl-Konzentration (3,0-3,3%) im Aufguss sowie dessen sauren pH-Wertes von 4,5 wurde ein Einfluss des Aufgusses auf die Bildung von MCPD-E und G-E in den Bratheringsprodukten jedoch nicht ausgeschlossen (vgl. Kapitel 2.3.3.5). In Produkten mit Aufguss im Vergleich zu Produkten ohne Aufguss wurden jedoch sowohl geringere MCPD-E- als auch G-E-Gehalte gefunden. Diese Beobachtung kann durch einen Verdünnungseffekt durch Zugabe des Aufgusses zum Brathering erklärt werden. Da die

Untersuchung der MCPD-E- und G-E-Gehalte im Aufguss zu Werten kleiner als die Bestimmungsgrenze führte, konnte bestätigt werden, dass der Verdünnungseffekt auf eine Wasseraufnahme des Bratherings zurückzuführen ist (Merkle et al., 2018b).

Trotz des nur geringen identifizierten Einflusses der Chloridquelle auf die beiden Produktklassen panierte und vorgebratene, tiefgekühlte Fischerzeugnisse und Bratfischerzeugnisse, sollten die Empfehlungen der DGF (2011) bezüglich des Verzichts auf Salzen und Würzen der Lebensmittel vor dem Frittieren beachtet werden (vgl. Kapitel 2.5.2).

Der Einfluss der Chloridquelle auf die Bildung von MCPD-E und G-E bei der Raffination von Fischölen wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Es wurde jedoch gezeigt, dass sowohl anorganische, als auch organische Chlorverbindungen in ppm-Gehalten in partiellen, raffinierten Speiseölen vorkommen und ein Zusammenhang zwischen der Chloridquelle und der Bildung von 3-MCPD-E bei der Desodorierung besteht (Nagy et al., 2011). Tiong et al. (2018) wiesen nach, dass natürlich vorkommende organische Chlorverbindungen einen essentiellen Beitrag zur 3-MCPD-E-Bildung leisten. Untersuchungen zeigten, dass sich diese während der Reifung von Palmöl im Fruchtfleisch endogen bilden und während einer Hochtemperatur-Vakuumdestillation (260 °C, 90 min) unter Freisetzung von HCl abgebaut werden. Auch in weiteren Speiseölen (Soja-, Raps-, Sonnenblumen-, Maiskeim-, Kokos- und Olivenöle) wurden organische Chlorverbindungen identifiziert (Tiong et al., 2018) (vgl. Kapitel 2.3.3.2). Auch in einem Modellsystem aus verschiedenen Lipidpräkursoren, einem Emulgator und Wasser konnte ein Zusammenhang zwischen einer ansteigenden NaCl-Konzentration und der Bildung von 3-MCPD-E beim Erhitzen (200 °C für 30 min) beobachtet werden (Calta et al., 2004). Aufgrund des natürlichen Salzgehaltes in Fischen, ist ein Einfluss der Chloridquelle auf die Bildung der Kontaminanten somit nicht ausgeschlossen.

5.3 Ansätze zur Minimierung von MCPD-E und G-E in Fischölen und (vor-)frittierten Fischerzeugnissen

Abgeleitet aus den erörterten Einflussfaktoren in Kapitel 5.2, wurden Minimierungsansätze für MCPD-E und G-E bei den verschiedenen Herstellungsprozessen der Produktkategorien Fischöle, panierte und vorgebratene, tiefgekühlte Fischerzeugnisse sowie Bratfischerzeugnisse untersucht und im folgenden Kapitel umfassend diskutiert.

5.3.1 Anwendung von Molekularfilter und physikalischen Filter

Der Einsatz von Molekularfilter und physikalischen Filtern erwies sich in verschiedener Weise bei allen Produktkategorien als effizienter Minimierungsansatz.

Bei der Herstellung von Fischölen erfolgt nach der Extraktion zunächst die Entschleimung zur Abtrennung der Phospholipide (Čmolík & Pokorný, 2000). Bei der Speiseölraffination wurde jedoch keine direkte Korrelation zwischen der Bildung von 3-MCPD-E oder G-E mit dem Gehalt an Phospholipiden festgestellt, weshalb die Priorität auf die Reduktion anderer Präkursoren gelegt wurde (Pudel et al., 2011) (vgl. Kapitel 2.4.2). Matthäus et al. (2011) zeigten einen positiven Einfluss eines zusätzlichen Waschschrattes der Speiseöle während der Entschleimung zur Entfernung von anorganischem Chlorid. Im Rahmen der chemischen Raffination, welche sich als einzige Möglichkeit bei Fischölen darstellt, zeigten Pudel et al.

(2011) durch den Einsatz von Kaliumhydroxid oder Natronlauge eine Reduktion der 3-MCPD-E-Gehalte um 35-45% im Speiseöl (vgl. Kapitel 2.5.1). Der Neutralisationsschritt dient außerdem dazu, freie Fettsäuren, die zu einer Absenkung des pH-Wertes und somit möglicherweise zu einer erhöhten MCPD-E- und G-E-Bildung führen können, zu entfernen (Freudenstein et al., 2013). Diese Ansätze wären für die Minimierung der MCPD-E- und G-E-Gehalte während der Fischölraffination ebenfalls denkbar.

Weiterhin wurde beschrieben, dass aktivierte Bleicherden, wie Magnesiumsilikat, Calciumsilikat oder Aluminiumsilikat, die Fähigkeit aufweisen, 3-MCPD-E-Präkursoren aus dem Öl zu absorbieren (Matthäus et al., 2011; Schurz, 2010). Kawashima et al. (2006) beschrieben eine Kombination aus einer Extraktion mit überkritischem CO₂ und einer Adsorption mittels Aktivkohle, um PCBs und PCDD/Fs aus dem Fischöl zu entfernen (vgl. Kapitel 2.5.1). Es wurde nachgewiesen, dass die partielle Raffination durch Filtration des rohen Fischöles durch einen Aktivkohlefilter zur Reduktion von Dioxinen und dl-PCBs, führt (Merkle et al., 2017). Die Summe aus Dioxinen und dl-PCBs in partiell raffiniertem Dorschleberöl (Barentssee) konnte dadurch im Vergleich zum rohen Öl um 93% reduziert werden. Eine Reduktion der ndl-PCBs war jedoch nicht möglich (Merkle et al., 2017). Auch Ortiz et al. (2011) berichteten über eine erfolgreiche Reduktion von PCDD/Fs und dl-PCBs durch einen Aktivkohlefilter, was durch einige Studien bestätigt wurde (Carvajal & Mozuraityte, 2016; Fernández-González et al., 2014; Kawashima et al., 2006; Maes et al., 2005; Oterhals et al., 2007). Zulkurnain et al. (2012) und Haines et al. (2011) beschrieben im Gegensatz zur Reduktion der PCDD/Fs und dl-PCBs während der Aktivkohlebehandlung einen Anstieg der 3-MCPD-E in Speiseölen. Prinzipiell ist die Bildung der 3-MCPD-E und G-E in den Raffinationsschritten, welche vor der Desodorierung stattfinden, nahezu vernachlässigbar (Matthäus et al., 2011). Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass die MCPD-E- und G-E-Gehalte in den rohen Fischölen über alle Fischspezies hinweg ebenfalls sehr niedrig sind (Merkle et al., 2017). Eine Auswirkung der Anwendung des Aktivkohlefilters auf die Bildung von MCPD-E und G-E in Fischölen wurde deshalb nicht als relevante Möglichkeit zur Reduktion der Kontaminanten in Betracht gezogen.

Den größten Einfluss auf die Bildung von 3-MCPD-E und G-E bei der Raffination stellt die Desodorierungstemperatur dar (Matthäus et al., 2011). Durch eine Temperaturreduktion während der Speiseölraffination konnten hauptsächlich G-E-Gehalte reduziert werden, nicht jedoch 3-MCPD-E-Gehalte (Hrnčirík & van Duijn, 2011; Matthäus et al., 2011). Als Alternative wurde die Anwendung einer zweistufigen Desodorierung oder eine Kurzweg-Destillation vorgeschlagen (Matthäus et al., 2011). Bei der Fischölraffination wurden ohnehin, aufgrund der Erhaltung der PUFA-Gehalte, Alternativen vorgeschlagen, wie die Anwendung einer Vakuum-Dampfdestillation bei niedrigen Temperaturen sowie einer Nachbehandlung mittels einer Kieselgelsäule (Chang et al., 1989). Weiterhin wurden Technologien mittels überkritischen Fluiden im Zusammenhang mit Membranen sowie enzymatische Prozesse empfohlen (Bhosle & Subramanian, 2005; Čmolík & Pokorný, 2000), die allerdings keine große industrielle Bedeutung haben.

Nach kritischer Betrachtung sollte das Hauptaugenmerkmal, im Hinblick auf eine effiziente Minimierung von MCPD-E und G-E in Fischölen, auf die Verringerung der Temperatur durch alternative Prozesse gelegt werden. Der Einsatz von Molekularfiltern wie Aktivkohlefilter

spielen aufgrund der geringen Gehalte in rohem Fischöl nur eine untergeordnete Rolle für die Reduktion von MCPD-E und G-E.

Eine Vielzahl an Untersuchungen wurde auch zur Nachbehandlung mit Adsorptionsmedien, zur Abtrennung polarer Substanzen, wie DAGs oder oxidierten Substanzen, von Ölen, insbesondere im Bereich der Frittieröle durchgeführt (Maskan & Bagci, 2003; McNeill et al., 1986; Yates & Caldwell, 1992). Auf Basis dieser Kenntnisse wurde dieser Aspekt als weiterer interessanter Ansatzpunkt zur Reduktion der MCPD-E- und G-E-Gehalte in raffinierten Ölen untersucht. Es wurden 15 verschiedene anorganische und organische Adsorptionsmaterialien zur Eignung der Minimierung von MCPD-E und G-E in raffinierten Speiseölen getestet (Strijowski et al., 2011) (vgl. Kapitel 2.4.2). Zwei dieser Adsorptionsmittel, worunter ein Magnesiumsilikat und ein Zeolith waren, zeigten eine signifikante Reduktion (40%) der G-E aus dem Palmöl. 3-MCPD-E-Gehalte wurden in geringerem Ausmaße reduziert (Strijowski et al., 2011). Zeolith, ein Aluminiumsilikat, dient dabei als molekulares Sieb, welches aus mikroporösen Feststoffen besteht (Worch, 2012). Es wurden keine negativen Effekte bezüglich sensorischer Eigenschaften oder der oxidativen Stabilität des Palmöls identifiziert (Strijowski et al., 2011).

Diese Untersuchung wurde als Ausgangspunkt für einen Minimierungsansatz zur Reduktion der MCPD-E- und G-E-Gehalte in Frittierölen verwendet. In Voruntersuchungen wurden zwei verschiedene, calcinierte Zeolithe (Köstrolith 13 XP-cac Pulver und Granulat) in verschiedenen Konzentrationen (4% und 9%) bezüglich ihres Einflusses auf MCPD-E und G-E in Frittierölen verglichen. Eine signifikante Reduktion ($p < 0,05$) der MCPD-E- und G-E-Gehalte wurde unter Anwendung von 9% Köstrolithpulver nach sieben Stunden Erhitzungsdauer des Frittieröls erzielt (Tabelle 9).

Tabelle 9: Vergleich der MCPD-E- und G-E-Gehalte in Frittieröl (Rapsöl), die mit 9% Köstrolith 13 XP-cac Pulver, bzw. Granulat behandelt wurden. *Die Gehalte wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichungen in $\mu\text{g}/\text{kg}$ angegeben. Werte mit unterschiedlich hochgestellten Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) voneinander. Die Bestimmungsgrenze (BG) liegt bei $20 \mu\text{g}/\text{kg}$.

Köstrolith 13 XP-cac (9%)	Erhitzungsdauer des Frittieröls [h]	3-MCPD-E* [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	2-MCPD-E* [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	G-E* [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
Pulver	1	$58 \pm 1,0^a$	$33 \pm 1,0^c$	$24 \pm 1,0^e$
Granulat	1	$93 \pm 1,5^b$	$47 \pm 5,7^d$	$184 \pm 6,2^f$
Pulver	4	$56 \pm 0,3^a$	$32 \pm 1,2^c$	$23 \pm 0,4^e$
Granulat	4	$90 \pm 0,2^b$	$39 \pm 2,8^d$	$175 \pm 2,4^f$
Pulver	7	< BG	< BG	< BG
Granulat	7	$107 \pm 2,0$	$44 \pm 1,0^d$	$152 \pm 2,4$
Pulver	10	< BG	< BG	< BG
Granulat	10	$132 \pm 0,2$	$74 \pm 0,5$	$121 \pm 3,1$

Auch Strijowski et al. (2011) berichtete über eine Abhängigkeit der Reduktionsfähigkeit der Zeolithe von den eingesetzten Konzentrationen. In einer Langzeitstudie, wurde der Einfluss von 9% Köstrolith 13 XP-cac Pulver auf die Bildung von MCPD-E und G-E im Frittieröl beim Frittieren von Fischstäbchen untersucht. Dazu wurde das Öl (Rapsöl) bei $195 \text{ }^\circ\text{C}$ 60 h lang erhitzt (Erhitzungsdauer des Frittieröls). Es konnte eine signifikante Reduktion ($p < 0,05$)

sowohl der MCPD-E- als auch der G-E-Gehalte bereits nach einer Erhitzungsdauer von sechs Stunden beobachtet werden (Merkle et al., 2018a). Daraus wurde geschlossen, dass calciniertes Zeolith sich als Reduktionsmittel für MCPD-E und G-E in Frittierölen, die zum Vor-Frittieren von panierten, tiefgekühlten Fischerzeugnissen eingesetzt werden, eignet. Für die industrielle Umsetzbarkeit ist es jedoch notwendig, das Adsorbtionsmittel nach seiner entfalteten Wirkung wieder aus dem Prozess zu entfernen, wozu weiteres technisches Equipment notwendig ist.

Da sich für die Produktgruppe panierte und vorgebratene, tiefgekühlte Fischerzeugnisse herausgestellt hat, dass der größte Anteil der MCPD-E- und G-E-Gehalte über das Frittieröl, exogen, in die Produkte eingetragen wird (vgl. Kapitel 5.2.3), wurde ein weiterer Ansatz zur Minimierung der MCPD-E- und G-E-Gehalte im Frittieröl untersucht (Merkle et al., 2018a). Es wurde beobachtet, dass sich während des Frittierens Feststoffpartikel von der Panade (Panadenteilchen) lösen, die sich im Frittieröl bzw. am Boden und Rand des Frittierbeckens sammeln. Solange das Frittieröl nicht getauscht wird und das Becken keiner Reinigung unterzogen wird, verweilen die Partikel im heißen Frittieröl. Die Prozessbedingungen der Hitzeeinwirkung auf die, über einen längeren Zeitraum, in Öl schwimmenden Panadenteilchen, sind prädestiniert für eine zusätzliche MCPD-E- und G-E-Bildung. Da die Panadenteilchen NaCl enthalten, wurde angenommen, dass sich sowohl im Frittieröl als auch in den Panadenteilchen selbst MCPD-E und G-E bilden und somit wieder auf das Endprodukt übertragen werden können. Auf Basis dieser Überlegung sollte der Einfluss der abfallenden Panadenteilchen auf die Bildung der Kontaminanten während des Frittierprozesses untersucht werden. Die Panadenteilchen wurden dafür nach jedem Frittierprozess aus dem Frittieröl gefiltert und die MCPD-E- und G-E-Gehalte wurden im Vergleich zu einer Kontrollversuchsreihe, die ohne Filtration durchgeführt wurde, analysiert (Merkle et al., 2018a). In einem Vorversuch wurden verschiedene Filtermaterialien auf ihre Effizienz bezüglich einer MCPD-E- und G-E-Reduktion getestet. Dabei konnten die besten Ergebnisse mit einem Papierfilter mit einer Porengröße von 20 µm erzielt werden. In einem Langzeitversuch (60 h) konnte gezeigt werden, dass nach 18 h Erhitzungsdauer des Frittieröls eine signifikante Reduktion ($p < 0,05$) der MCPD-E-Gehalte im Frittieröl auftrat. Über den gesamten Zeitraum wurde jedoch keine signifikante Änderung der G-E-Gehalte im Frittieröl identifiziert (Merkle et al., 2018a). Daraus konnte geschlossen werden, dass das Herausfiltern der Panadenteilchen aus dem Frittieröl einen effizienten Minimierungsansatz für MCPD-E im Frittieröl darstellt.

5.3.2 Weitere Minimierungsansätze

Ein Minimierungsansatz für MCPD, der auf der Instabilität von 3-MCPD in neutralem oder alkalischen Milieu beruht, wurde von Reece et al. (2005) und Velíšek et al. (2003) vorgeschlagen. Sie testeten den Einsatz verschiedener Lebensmittelzusatzstoffe wie Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, Glutathion und Cystein. Velíšek et al. (2003) stellten die Hypothese auf, dass die Reaktion von 3-MCPD mit L-Cystein in neutralem Milieu überwiegend zur Bildung von S-(2,3-Dihydroxypropyl)Cystein führt und 3-MCPD somit abgebaut wird (vgl. Kapitel 2.4.1). Die Aminosäure L-Cystein kommt natürlicherweise in Lebensmitteln wie Milch oder Hefe vor und kann darüber hinaus als Zusatzstoff zur

Erweichung und Verstärkung des Weizenklebers und dadurch zur Vergrößerung des Volumens zum Beispiel in Backwaren eingesetzt werden (Huber, 1996). In Vorversuchen wurden verschiedene Konzentrationen an L-Cystein (0,02%, 0,04% und 0,08%) der Panade von panierten und vorgebratenen, tiefgekühlten Fischerzeugnissen zugegeben. Es konnte gezeigt werden, dass der Zusatz von 0,08% L-Cystein eine signifikante Reduktion ($p < 0,05$) der MCPD-E-Gehalte, nach einer Erhitzungsdauer des Frittieröls von sieben Stunden und einer Vor-Frittieretemperatur von 195 °C, bewirkte (Tabelle 10). Hier sind weitere Versuche allerdings noch durchzuführen, um das Minimierungspotential durch L-Cystein abschließend bewerten zu können.

Tabelle 10: Vergleich der MCPD-E- und G-E-Gehalte in panierten und vorgebratenen, tiefgekühlten Fischerzeugnissen, deren Panade 0,08% L-Cystein zugesetzt wurde. Die Gehalte wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichungen in $\mu\text{g}/\text{kg}$ angegeben. Werte mit unterschiedlich hochgestellten Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) voneinander. Die Bestimmungsgrenze (BG) liegt bei 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Paniertes und vorgebratenes, tiefgekühltes Fischerzeugnis	Erhitzungsdauer des Frittieröls [Tage]	3-MCPD-E [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	2-MCPD-E [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	G-E [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
Ohne L-Cystein in der Panade	1	< BG	< BG	< BG
0,08% L-Cystein in der Panade	1	< BG	< BG	< BG
Ohne L-Cystein in der Panade	4	35 \pm 10,1 ^a	< BG	< BG
0,08% L-Cystein in der Panade	4	36 \pm 1,9 ^a	< BG	< BG
Ohne L-Cystein in der Panade	7	102 \pm 2,1	32 \pm 2,8	< BG
0,08% L-Cystein in der Panade	7	58 \pm 9,7	23 \pm 0,7	< BG

In einem Langzeitversuch (60 h) zeigte die Supplementierung der Panade mit 0,08% L-Cystein dagegen keine signifikanten Änderungen der MCPD-E- und G-E-Gehalte im Vergleich zu einer Kontrollversuchsreihe ohne die Zugabe von L-Cystein (Merkle et al., 2018a).

5.4 Neue Ansätze zur betriebliche Qualitätsbewertung von frittierten Fischerzeugnissen

Wie in den Kapiteln 5.2-5.3 dargestellt wurde, erfordert die Minimierung der MCPD-, MCPD-E- und G-E-Gehalte in Fischerzeugnissen wie Fischöle, panierte und vorgebratene, tiefgekühlte Fischerzeugnisse und Bratfischerzeugnisse unterschiedliche Modifizierungen der Produkt-Inhaltsstoffe sowie eine Änderung der entsprechenden Herstellungsprozesse. Da die untersuchten Prozesskontaminanten in der Regel sehr instabil in den verschiedenen Produktmatrizen sind, sollte die Ermittlung der Gehalte zu einer bestimmten Zeit unter definierten Bedingungen eher als eine Nettosumme aus der Einstellung der Gleichgewichte zwischen Bildung und Abbau der MCPD, MCPD-E und G-E verstanden werden (vgl. Kapitel 2.3). Um einen umfassenden Überblick über die Gehalte in den verschiedenen Erzeugnissen zu gewinnen, ist es deshalb notwendig, die verschiedenen Parameter der Herstellungsprozesse regelmäßig zu monitoren und Qualitätskontrollen durchzuführen.

Der Desodorierungsprozess zeigte den größten Einfluss auf die Bildung der MCPD-E und G-E während der Fischölraffination (Merkle et al., 2017). Für eine Reduktion der

Kontaminanten in Fischöl sollte somit sowohl die Temperatur als auch die Dauer der Desodorierung überwacht werden. Auch bei den Frittierprozessen zeigte das Zusammenspiel zwischen Temperaturerhöhung und Erhitzungsdauer des Frittieröls den größten positiven Effekt auf die Bildung von MCPD-E und G-E, sowohl in den frittierten Produkten (panierte und vorgebratene, tiefgekühlte Fischerzeugnisse und Bratfischerzeugnisse) als auch in den entsprechenden Frittierölen (Merkle et al., 2018a, 2018b). Eine ständige Kontrolle dieser Prozessparameter sollte deshalb im Rahmen der Herstellungsprozesse dieser Produkte gewährleistet sein, um die MCPD-E- und G-E-Gehalte so gering wie möglich zu halten.

Weitere Qualitätsparameter für die thermische Behandlung von Speiseölen und -fetten, worunter unter anderem die Bestimmung des Anteils an polaren Komponenten (TPM) sowie der Farbewerte von Frittierölen fällt, wurden bereits veröffentlicht (DGF, 2011). Begleitend zur Analyse der MCPD-E- und G-E-Gehalte wurden diese Qualitätsparameter im Frittieröl bestimmt. Der Zusammenhang dieser Parameter mit den MCPD-E- und G-E-Gehalten im Rahmen dieser Arbeit wird im folgenden Kapitel 5.4.1 dargestellt. Darüber hinaus soll ein Überblick über den möglichen Zusammenhang der MCPD-E und G-E mit weiteren für die untersuchten Produktgruppen relevanten Prozesskontaminanten aufgezeigt werden.

5.4.1 Korrelation von MCPD-E- und G-E- mit TPM-Gehalten

Durch Prozesse, wie die Hydrolyse oder Oxidation, können eine Vielzahl an Polymerisationsprodukten entstehen, welche zum Fettverderb führen können (Nawar, 2000) (vgl. Kapitel 2.5.2). Zur Beurteilung der Fettqualität wurde von der DGF ein Richtwert für den Anteil der polaren Komponenten (TPM) von 24% im Frittieröl festgelegt (DGF, 2013). Um die Qualität der verwendeten Öle in den Frittierstudien im Rahmen dieser Arbeit zu überwachen, wurde der TPM-Gehalt der Öle, parallel zu den MCPD-E- und G-E-Gehalten, bestimmt. Dazu wurde die DGF-Standard-Methode C-III 3e (06) unter Einsatz einer Mikro-Kieselgelsäule angewandt (DGF, 2013).

Auch Aniołowska & Kita (2016) untersuchten in ihrer Frittierstudie, parallel zu den G-E-Gehalten, den Anstieg der TPM-Werte in den Frittierölen (Palmöl). Dabei wurde ein nahezu linearer Zusammenhang zwischen der Erhitzungsdauer des Frittieröls (40 h) und den TPM-Gehalten festgestellt. Bei einer Frittieretemperatur von 150 °C wurde ein TPM-Wert von 18% erreicht, während bei einer Temperatur von 180 °C 23% polare Anteile analysiert wurden (Aniołowska & Kita, 2016). In einer weiteren Frittierstudie wurden sogar höhere TPM-Gehalte (25%) nach kürzerer Zeit (20 h) erreicht (Man et al., 1999).

Während der Kurzzeit-Frittierstudien der panierten und vorgebratenen, tiefgekühlten Fischerzeugnissen (1-7 h) wurde ein leichter Anstieg der TPM-Werte der Frittieröle in Abhängigkeit von der Erhitzungsdauer des Frittieröls festgestellt. Die TPM-Werte nach 7 h Erhitzungsdauer des Frittieröls variierten dabei zwischen 6,3% und 12,4%. Es wurden zudem hohe Korrelationskoeffizienten ($r = 0,60-1,00$) zwischen den 3-MCPD-E-Gehalten und den TPM-Werten beobachtet. Die 2-MCPD-E-Gehalte zeigten ebenfalls eine gute Korrelation mit den TPM-Werten ($r = 0,79-1,00$). Für die G-E-Gehalte wurden nur in einigen Versuchsreihen Korrelationen nachgewiesen ($r = 0,96-1,00$) (Merkle et al., 2018a). Während der Langzeitstudien (60 h) wurden Korrelationen zwischen den MCPD-E- und G-E-Gehalten und den TPM-Werten nur bis zu einer Erhitzungsdauer des Frittieröls von 30 h identifiziert. Zhang

et al. (2013) postulierten einen durch freie Radikale vermittelten Bildungsmechanismus über die Bildung von zyklischen Acyloxoniumionen von 3-MCPD (vgl. Abbildung 8a) und stellte ebenfalls eine Beziehung zwischen MCPD-Estern und der Öloxidation fest. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass Eisen[II]-Ionen im Zusammenhang mit der Öloxidation, die Bildung von freien Radikalen begünstigt und somit zu einer erhöhten Bildung von MCPD-E beitragen (Zhang et al., 2015) (vgl. Kapitel 2.3.3).

Aufgrund der vorherrschenden Gleichgewichtsreaktionen zwischen der Bildung und dem Abbau der MCPD-E- und G-E-Gehalte in den Frittierölen wurden zum Teil negative Korrelationen zwischen G-E- und den TPM-Werten beobachtet (Merkle et al., 2018a). Aniołowska & Kita (2016) identifizierten ebenfalls eine negative Korrelation zwischen G-E-Gehalten und TPM-Werten im Frittieröl beim Frittieren von Kartoffelchips über einen Zeitraum von 40 h.

Bei den Langzeitstudien der Bratheringsprodukte (1-2 Tage) stiegen die TPM-Gehalte von einem Anfangsgehalt von 0,3% der frischen Frittieröle auf bis zu 27,1-28,4% nach neun Tagen, womit sie den DGF-Richtwert von 24% deutlich überschritten. Über den gesamten Zeitraum der Erhitzungsdauer des Frittieröls von neun Tagen konnten hohe Korrelationen ($r = 0,96-0,99$) zwischen den 2- und 3-MCPD-E-Gehalten und den TPM-Werten der Frittieröle festgestellt werden. Für die G-E-Gehalte wurden keine Korrelationen identifiziert (Merkle et al., 2018b).

Zusammenfassend konnten für alle Versuchsreihen im Rahmen dieser Arbeit Korrelationen zwischen den TPM-Werten und den MCPD-E-Gehalten (bis zu 30 h Erhitzungsdauer des Frittieröls) beobachtet werden. Auf Basis dieser Erkenntnisse wurde geschlussfolgert, dass unter definierten Bedingungen durch Messung der TPM-Gehalte ein Rückschluss auf die MCPD-E-Gehalte im Frittieröl möglich wäre (Merkle et al., 2018a, 2018b). Die Bestimmung von TPM-Werten im Frittieröl basiert auf einer schnellen und einfach handhabbaren Routineanalytik und könnte somit als einfache Screening-Methode für eine schnelle Abschätzung von MCPD-E-Gehalten in Frittierölen eingesetzt werden.

Darüber hinaus wurden bereits Studien veröffentlicht, die belegen, dass das Hinzufügen von natürlichen Antioxidantien (wie z.B. α -Tocopherolen, lipophile Tee-Polyphenolen und Rosmarinextrakten) sowie synthetischen Antioxidantien (wie z.B. Butylhydroxytoluol und tert.-Butylhydrochinon) die Bildung von 3-MCPD-E reduzieren können (Chang et al., 2015; Zhang et al., 2016).

5.4.2 Korrelation von MCPD-E- und G-E-Gehalte mit Farbwerten

Während des Frittierens über eine gewisse Zeit, verändert sich die Farbe der Öle und wird nachweisbar dunkler (braun) (Farhoosh, Kenari & Poorazrang, 2009). Die Dunkelfärbung des Frittieröls basiert auf der Bildung von Polymeren aus ungesättigten Carbonylverbindungen und unpolaren Verbindungen in Lebensmitteln, die sich im Öl lösen (Yaghmur et al., 2001). Für die Farbmessung von Ölen gibt es verschiedene photometrische Methoden. Zur Messung von braunen Pigmenten, die durch die Maillard-Reaktion entstehen, wurde eine spektrophotometrische Methode bei einer Wellenlänge von 420 nm angewandt (Dissaraphong et al., 2006). Auf Basis dieser Methode wurden die (mit Heptan verdünnten) Frittierölproben ebenfalls spektrophotometrisch bei 420 nm gemessen, um deren Farbintensität zu bestimmen.

Während der Kurzzeitstudien der panierten und vorgebratenen, tiefgekühlten Fischerzeugnisse (1-7 h) wurde ein Anstieg der Absorptionswerte bei 420 nm von 0,02-0,17 (nach einer Stunde) bis 0,07-0,61 (nach sieben Stunden) beobachtet. Dabei wurde beobachtet, dass die Absorptionswerte bei höheren Frittiertemperaturen ebenfalls signifikant höher sind ($p < 0,05$). Der Zusammenhang zwischen unterschiedlichen Frittiertemperaturen (150-180 °C) wurde auch in einer Frittierstudie von Aniołowska & Kita (2016) beim Frittieren von Kartoffelchips für 40 h Erhitzungsdauer des Frittieröls gefunden. Wie für die TPM-Werte, konnte eine hohe Korrelation zwischen den 3-MCPD-E-Gehalten und den Absorptionswerten festgestellt werden ($r = 0,82-1,00$). Mit einer Ausnahme wurden zudem auch hohe Korrelationen bezüglich der 2-MCPD-E-Gehalte festgestellt ($r = 0,94-1,00$). Für die G-E-Gehalte wurden wiederum nur in einigen Versuchsreihen Korrelationen nachgewiesen ($r = 0,81-1,00$) (Merkle et al., 2018a). Die Absorptionswerte der Frittieröle, die bei den Langzeitstudien der Bratheringsprodukte (1-2 Tage) eingesetzt wurden, stiegen von einem Anfangsgehalt von 0,01-0,02 der frischen Frittieröle auf bis zu 1,38-1,60 nach neun Tagen. Es wurde eine hohe Korrelation ($r = 0,93-0,98$) der MCPD-E- und der Absorptionswerte über den gesamten Zeitraum der Erhitzungsdauer des Frittieröls von neun Tagen festgestellt. Für die G-E-Gehalte wurden ebenfalls keine Korrelationen identifiziert (Merkle et al., 2018b). Wie bereits in Kapitel 5.4.1 für die Korrelationen zwischen TPM-Werten und MCPD-E-Gehalten festgestellt wurde, existiert ein ähnlicher Zusammenhang zwischen der Farbintensität der Frittieröle (gemessen als Absorptionswerte bei 420 nm) und den MCPD-E-Gehalten (Merkle et al., 2018a, 2018b). Auch die spektrophotometrische Analyse zur Bestimmung der Absorptionswerte der Frittieröle ist eine sehr einfache und schnelle Methode, die somit ebenfalls dazu geeignet scheint, MCPD-E-Gehalte im Frittieröl abzuschätzen.

6 Schlussfolgerung

Zur Analyse der MCPD-E und G-E wurde die modifizierte AOCS-Methode Cd 29b-13 angewandt (Karl et al., 2016). Diese Methode erlaubt eine quantitative Bestimmung der MCPD-E und G-E-Gehalte in Fischerzeugnissen. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass bei der Analyse der MCPD-E-Gehalte teilweise freies MCPD mitbestimmt wird (Karl et al., 2016). Auf Basis dieser Erkenntnis wurde bereits eine empfindlichere Methode (Nachweisgrenze $\leq 5 \mu\text{g}/\text{kg}$) für die Bestimmung von 2,3-DCP, 1,3-DCP, 2-MCPD, 3-MCPD und Glycidol in Öl veröffentlicht (Kuhlmann, 2016). Diese Methode basiert ebenfalls auf der AOCS-Methode Cd 29b-13, enthält jedoch eine „Heat-Ultrasonic-Pressure“ unterstützte Lösungsmittelextraktion (Kuhlmann, 2017). Zudem gab es eine Aufforderung des JRC durch die EFSA eine geeignete Analysenmethode für MCPD-E und G-E in Lebensmitteln zu entwickeln (Wenzl et al., 2015). Diese Methode basiert auf der AOCS-Methode Cd 29a-13 und wurde bereits, unter anderem für geräucherten Fisch, in-house-validiert (vgl. Kapitel 2.2.3). Zelinková et al. (2017) stellten jedoch fest, dass unter Anwendung dieser Methode teilweise G-E-Gehalte überschätzt wurden. Sie postulierten, dass der Gehalt an partiellen Acylglyceriden wie insbesondere MAG einen negativen Einfluss auf die Methodenpräzision darstellt (Zelinková et al., 2017). Um eine Risikobewertung für die Aufnahme von MCPD, MCPD-E und G-E in Lebensmitteln durchzuführen, ist eine zeitnahe Festlegung einer offiziellen Analysenmethode zur Anwendung in Lebensmitteln absolut notwendig.

Prozessbasierte Einflüsse auf die Bildung und den Abbau von MCPD, MCPD-E und G-E in Lebensmitteln wurde bislang erst in wenigen Studien veröffentlicht. Hinsichtlich des Einflusses verschiedener Zeiten und Temperaturen auf die Bildung von MCPD-E oder G-E während des Frittierens von Lebensmitteln ist eine kontroverse Datenlage vorhanden, die auch durch die Ergebnisse dieser Arbeit widerspiegelt wurde. Es konnte bestätigt werden, dass in Kurzzeitstudien die MCPD-E-Gehalte in Abhängigkeit der Zeit und Temperatur tendenziell zunahmten, während sie in längeren Frittierstudien nach einer gewissen Erhitzungsdauer des Frittieröls abgebaut wurden. Ein Anstieg an MCPD-E-Gehalten wurde bereits ab Temperaturen von $100 \text{ }^\circ\text{C}$ identifiziert (Zhou et al., 2014). Diese Erkenntnis sollte auch hinsichtlich der Lebensmittelverarbeitung bei niedrigeren Temperaturen ($< 170 \text{ }^\circ\text{C}$) beachtet und weiter untersucht werden. Im Allgemeinen wird für die Bildungs- und Abbauraten von MCPD-E und G-E das Vorhandensein einer Gleichgewichtsreaktion postuliert, die sich unterschiedlich schnell einstellen kann. Auch bei allen untersuchten kommerziellen Produkten im Rahmen der Warenkorbuntersuchungen wurde festgestellt, dass zum Teil erhebliche Schwankungen der MCPD- (Räucherfischerzeugnisse und -konserven), MCPD-E- und G-E-Gehalte (panierte und vorgebratene, tiefgekühlte Fischerzeugnisse und Bratfischerzeugnisse, sowie -Konserven) innerhalb einer Produktgruppe auftraten. Die in dieser Arbeit eindeutig identifizierte Abhängigkeit der Gehalte sowohl von der Prozesstemperatur als auch von der Zeit, könnte eine Erklärung für die großen Gehaltsvariationen der kommerziellen Produkte sein. Die Ergebnisse dieser Arbeit beziehen sich im Wesentlichen auf die industrielle Herstellung der verschiedenen untersuchten Fischerzeugnisse. Einen nicht zu vernachlässigenden Aspekt stellt jedoch auch die haushaltstechnische Weiterverarbeitung der Produkte dar. Diese sollte hinsichtlich verschiedener Einflussfaktoren, wie der Brat- oder Frittierzeit und -dauer sowie das Salzen der Produkte und die Auswahl eines

Schlussfolgerung

geeigneten Frittieröls, in weiteren Studien untersucht werden. In allen bis dato veröffentlichten Frittierstudien wurde postuliert, dass eine endogene Bildung von MCPD-E und G-E in verschiedenen frittierten Lebensmitteln ausgeschlossen und vielmehr eine Aufnahme der Gehalte über das Frittieröl angenommen wird. Für die MCPD-E wurde dies auch durch die Ergebnisse in dieser Arbeit bestätigt. Eine Ausnahme stellten die G-E-Gehalte in Bratfischerzeugnissen dar. Die hohen G-E-Gehalte könnten auf einer Überschätzung aufgrund einer möglichen Umwandlung während der Analysenmethode basieren (Zelinková et al., 2017), was weitere systematische Studien erfordert.

Da sich in dieser Arbeit zeigte, dass hohe Temperaturen während der Desodorierung den größten Einfluss auf die Bildung von MCPD-E und G-E in Fischöl hat, sollten weiterführende Studien das Hauptaugenmerk auf eine Temperaturreduktion durch alternative Prozesse legen. Hinsichtlich der Erhaltung der wertvollen PUFA im Fischöl könnten die Anwendung einer Vakuum-Dampfdestillation bei niedrigen Temperaturen oder eine Nachbehandlung mittels einer Kieselgelsäule mögliche Alternativen darstellen. Darüber hinaus wäre eine nachträgliche Behandlung der Fischöle mit geeigneten Adsorptionsmitteln denkbar. Diese zeigte sich bei der Anwendung in Frittierölen, die zum Frittieren von panierten, tiefgekühlten Fischerzeugnissen eingesetzt werden, als sehr geeignetes Reduktionsmittel sowohl für MCPD-E als auch für G-E. Für eine industrielle Umsetzung und um eine sensorische Beeinträchtigung zu vermeiden, ist es jedoch notwendig, das Adsorptionsmittel nach seiner entfalteten Wirkung und ohne Kontakt zu den Lebensmitteln wieder aus dem Prozess zu entfernen, wozu weiteres technisches Equipment notwendig ist. Die praktische Umsetzung muss individuell in der fischverarbeitenden Industrie geprüft und etabliert werden.

Speziell für panierte und (vor-)frittierte Fischerzeugnisse stellt die Filtration des Frittieröls zudem eine geeignete Lösung zur Reduktion von MCPD-E-Gehalten dar. Für die industrielle Anwendung ist jedoch auch bei diesem Ansatz ein up-scaling der technologischen Umsetzung notwendig. Generell sollten die Empfehlungen der DGF (2011) für optimales Frittieren eingehalten werden, in denen unter anderem beschrieben wird, eine Temperatur der Fritteuse von 180 °C nicht zu überschreiten.

Im Allgemeinen zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit auf, dass die MCPD, MCPD-E- und G-E-Gehalte in unterschiedlichen Produktkategorien und in Abhängigkeit verschiedener prozess- und produktbasierter Parameter stark variieren können. Auf Basis dieser Erkenntnis ist es für die fischverarbeitende Industrie essentiell, ihre Herstellungsprozesse individuell zu analysieren und ein Screening der Ist-Gehalte an MCPD, MCPD-E oder G-E durchzuführen, um die Entstehung der Prozesskontaminanten während der Herstellung einschätzen zu können. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein Zusammenhang zwischen den TPM- und Farbwerten, die als Qualitätsparameter für die thermische Behandlung von Frittierölen dienen (DGF, 2011) und den MCPD-E-Gehalten gefunden werden. Die Bestimmung von TPM- und Farbwerten im Frittieröl basiert auf einer schnellen und einfach handhabbaren Routineanalytik und könnte somit als einfache Screening-Methode für eine schnelle Abschätzung von MCPD-E-Gehalten in Frittierölen eingesetzt werden. Die Implementierung dieser Screening-Methode in der fischverarbeitenden Industrie muss individuell stattfinden, da sowohl die MCPD-E-Gehalte, als auch die Qualitätsparameter des Frittieröls, wie bereits gezeigt wurde, von unterschiedlichen Faktoren abhängig sein können.

7 Literatur

- Abraham, K., Appel, K. E., Berger-Preiss, E., Apel, E., Gerling, S., Mielke, H. & Lampen, A. (2013). Relative oral bioavailability of 3-MCPD from 3-MCPD fatty acid esters in rats. *Archives of Toxicology*, 87(4), 649-659.
- Abu-El-Haj, S., Bogusz, M. J., Ibrahim, Z., Hassan, H. & Al Tufail, M. (2007). Rapid and simple determination of chloropropanols (3-MCPD and 1,3-DCP) in food products using isotope dilution GC-MS. *Food Control*, 18, 81-90.
- Albert, B. B., Derraik, J. G. B., Cameron-Smith, D., Hofman, P. L., Tumanov, S., Villas-Boas, S. G., & Cutfield, W. S. (2015). Fish oil supplements in New Zealand are highly oxidised and do not meet label content of n-3 PUFA. *Scientific Reports*, 5, 7928.
- Aniolowska, M., and Kita, A. (2016). The effect of frying on glycidyl esters content in palm oil. *Food Chemistry*, 203, 95-103.
- AOCS (American Oil Chemists Society). (2015). Analysis of 2- and 3-MCPD fatty acid esters and glycidyl fatty acid esters in oil-based emulsions. AOCS Draft Method Cd 30-15. Online verfügbar unter URL: <https://www.aocs.org/attain-lab-services/methods/methods/method-detail?productId=87372595>. [Zugriffsdatum: 07.07.2018]
- AOCS (American Oil Chemists Society). (2013a). Official Method Cd 29a-13. 2- and 3-MCPD Fatty Acid Esters and Glycidol Fatty Acid Esters in Edible Oils and Fats by Acid Transesterification, in: Official Methods and Recommended Practices of the AOCS. Online verfügbar unter URL: <https://aocs.personifycloud.com/PersonifyEBusiness/Default.aspx?TabID=251&productId=118272>. [Zugriffsdatum: 07.07.2018]
- AOCS (American Oil Chemists Society). (2013b). Official Method Cd 29b-13. Determination of Bound Monochloropropanediol (MCPD) and Bound 2,3- epoxy-1-propanol (glycidol-) by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS), in: Official Methods and Recommended Practices of the AOCS. Online verfügbar unter URL: <https://aocs.personifycloud.com/PersonifyEbusiness/Store/ProductDetails.aspx?productId=118273>. [Zugriffsdatum: 07.07.2018]
- AOCS (American Oil Chemists Society). (2013c). Official Method Cd 29c-13. Fatty acid-bound 3-chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) and 2,3-epoxi-propane-1-ol (glycidol). Determination in Oils and Fats by GC/MS (Differential Measurement), in: Official Methods and Recommended Practices of the AOCS. Online verfügbar unter URL: <https://aocs.personifycloud.com/PersonifyEbusiness/Store/ProductDetails.aspx?productId=118275>. [Zugriffsdatum: 07.07.2018]
- AOCS / JOCS (American Oil Chemists' Society / Japan Oil Chemists' Society). (2012). Glycidyl fatty acid esters in edible oils. Joint AOCS/JOCS Official Method Cd 28-10. Online im verfügbar unter URL: <https://aocs.personifycloud.com/PersonifyEbusiness/Store/ProductDetails.aspx?productId=111541>. [Zugriffsdatum: 07.07.2018]
- Arisseto, A. P., Marcolino, P. F. C., Augusti, A. C., Scaranelo, G. R., Berbari, S. A. G., Miguel, A. M. R. O. & Vicente, E. (2017). Contamination of Fried Foods by 3-Monochloropropane-1,2-diol Fatty Acid Esters During Frying. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 94(3), 449-455.

- Baer, I., de la Calle, B., & Taylor, P. (2010). 3-MCPD in food other than soy sauce or hydrolysed vegetable protein (HVP). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(1), 443-456.
- Becalski, A., Zhao, T., & Sit, D. (2013). Cyclohexanone/sulfonated polymer catalyst: a new simple derivatizing procedure for GC-MS determination of 2- and 3-monochloropropanediols. *Food and Energy Security*, 2(2), 157-165.
- Bergé, J. P., and Barnathan, G. (2005). Fatty acids from lipids of marine organisms: molecular biodiversity, roles as biomarkers, biologically active compounds, and economical aspects *Marine Biotechnology I* (pp. 49-125): Springer.
- BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung). (2007). Säuglingsanfangs- und Folgenahrung kann gesundheitlich bedenkliche 3-MCPD-Fettsäureester enthalten. Stellungnahme Nr. 047/2007. Online verfügbar unter URL: https://www.bfr.bund.de/cm/343/saeuglingsanfangs_und_folgenahrung_kann_gesundheitlich_bedenkliche_3_mcpd_fettsaeureester_enthalten.pdf. [Zugriffsdatum: 07.07.2018]
- BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung). (2009). Erste Einschätzung zur Bewertung der in raffinierten pflanzlichen Fetten nachgewiesenen Gehalte von Glycidol-Fettsäureestern. Stellungnahme Nr. 007/2009. Online verfügbar unter URL: https://www.bfr.bund.de/cm/343/erste_einschaetzung_von_glycidol_fettsaeureestern.pdf. [Zugriffsdatum: 07.07.2018]
- BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung). (2012). Collaborative Study for the Determination of 3-MCPD-Fatty Acid Esters in Edible Fats and Oils. Second Collaborative Study – Part I. Method Validation and Proficiency Test. Online verfügbar unter URL: <https://www.bfr.bund.de/cm/350/collaborative-study-for-the-determination-of-3-mcpd-fatty-acid-esters-in-edible-fats-and-oils.pdf>. [Zugriffsdatum: 07.07.2018]
- Bhosle, B., & Subramanian, R. (2005). New approaches in deacidification of edible oils – a review. *Journal of Food Engineering*, 69(4), 481-494.
- Bodén, L., Lundgren, M., Stensiö, K.-E., & Gorzynski, M. (1997). Determination of 1,3-dichloro-2-propanol and 3-chloro-1,2-propanediol in papers treated with polyamidoamine-epichlorohydrin wet-strength resins by gas chromatography-mass spectrometry using selective ion monitoring. *Journal of Chromatography A*, 788(1), 195-203.
- Bornscheuer, U. T., & Hesseler, M. (2010). Enzymatic removal of 3-monochloro-1,2-propanediol (3-MCPD) and its esters from oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(5), 552-556.
- Breitling-Utzmann, C., Köbler, H., Herbolzheimer, D., & Maier, A. (2003). 3-MCPD: occurrence in bread crust and various food groups as well as formation in toast. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 99(7), 280-285.
- Breitling-Utzmann, C.M., Hrenn, H., Haase, N.U., & Unbehend, G. M. (2005). Influence of dough ingredients on 3-chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) formation in toast. *Food Additives and Contaminants*, 22, 97-103.

- Brereton, P., Kelly, J., Crews, C., Honour, S., Wood, R., & Davies, A. (2001). Determination of 3-chloro-1,2-propanediol in foods and food ingredients by gas chromatography with mass spectrometric detection: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 84(2), 455-465.
- Brunner, G. (2013). Gas extraction: an introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation processes (Vol. 4): Springer Science & Business Media.
- BMEL (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft). (2011). Leitsätze für Fische, Krebs- Leitsätze für Fische, Krebs- und Weichtiere und Erzeugnisse daraus. Online verfügbar unter https://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/Ernaehrung/Lebensmittelbuch/LeitsaetzeFische.pdf?__blob=publicationFile. [Zugriffsdatum: 07.07.2018]
- Calta, P., Velíšek, J., Doležal, M., Hasnip, S., Crews, C., & Réblová, Z. (2004). Formation of 3-chloropropane-1,2-diol in systems simulating processed foods. *European Food Research and Technology*, 218(6), 501-506.
- Cao, X., Song, G., Gao, Y., Zhao, J., Zhang, M., Wu, W., & Hu, Y. (2009). A novel derivatization method coupled with GC-MS for the simultaneous determination of chloropropanols. *Chromatographia*, 70, 661-664.
- Carvajal, A.K., & Mozuraityte, R. (2016). Fish Oils: Production and Properties. In F. P. Cabellero B, Toldrà F (Ed.), *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 693-698). Waltham: Elsevier.
- CEN (European Committee for Standardization). (2004). EN 14573 Foodstuffs – Determination of 3-monochloropropane-1,2-diol by GC/MS. Online verfügbar unter URL: https://www.nen.nl/pdfpreview/preview_94821.pdf. [Zugriffsdatum: 07.07.2018]
- Chang, S. S., Bao, Y., & Pelura, T. J. (1989). *U.S. Patent No. 4,874,629*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Chang, L., Jia, H., Shen, M., Wang, Y., Nie, S., Chen, Y., Zhou, Y., Wang, Y., & Xie, M. (2015). Antioxidants Inhibit Formation of 3-Monochloropropane-1,2-diol Esters in Model Reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(44), 9850-9854.
- Cheng, W. W., Liu, G. Q., Wang, L. Q., & Liu, Z. S. (2017). Glycidyl Fatty Acid Esters in Refined Edible Oils: A Review on Formation, Occurrence, Analysis, and Elimination Methods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(2), 263-281.
- Cheryan, M. (1998). Ultrafiltration and Microfiltration Handbook: CRC press.
- Chung, S. W., & Chan, B. T. (2012). Simultaneous determination of 2- and 3-Monochloropropan-1,3-diol esters in foods by enzymatic hydrolysis and GC-MS detection. *Chromatographia*, 75(17-18), 1049-1056.
- Chung, S. W. C., Chan, B. T. P., Chung, H. Y., Xiao, Y., & Ho, Y. Y. (2013). Occurrence of bound 3-monochloropropan-1,2-diol content in commonly consumed foods in Hong Kong analysed by enzymatic hydrolysis and GC-MS detection. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 30, 1248-1254.

- Chung, W. C., Hui, K. Y., & Cheng, S. C. (2002). Sensitive method for the determination of 1,3-dichloropropan-2-ol and 3-chloropropane-1,2-diol in soy sauce by capillary gas chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 952, 185-192.
- Čmolík, J., & Pokorný, J. (2000). Physical refining of edible oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 102(7), 472-486.
- COC (UK Committee on Carcinogenicity of chemicals in food, consumer products and environment). (2000). Online verfügbar unter URL: http://cot.food.gov.uk/sites/default/files/cot/cotcomcocrep_coc.pdf. [Zugriffsdatum: 07.07.2018]
- Codex Alimentarius Commission. (1989). Codex STAN 166. Standard for quick frozen fish sticks (fish fingers), fish portions and fish fillets – breaded or in batter. Online verfügbar unter URL: http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/jp/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCODEX%2BSTAN%2B166-1989%252FCXS_166e.pdf. [Zugriffsdatum: 07.07.2018]
- Codex Alimentarius Commission. (2009). CAC/RCP 68. Code of practice for the reduction of contamination of food with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) from smoking and direct drying processes. Online verfügbar unter URL: http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCAC%2BRCP%2B68-2009%252FCXP_068e.pdf. [Zugriffsdatum: 07.07.2018]
- Collier, P. D., Cromie, D. D. O., & Davies, A. P. (1991). Mechanism of formation of chloropropanols present in protein hydrolysates. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 68(10), 785-790.
- Collison, M. W. & Blumhorst, M. (2011). Advances in LC-MS analysis of glycidyl esters. Publikation presented at: 102nd AOCS Annual Meeting & Expo; 1-4 May 2011; Cincinnati, Ohio, USA.
- Craft, B., Chiodini, A., Garst, J., & Granvogl, M. (2013). Fatty acid esters of monochloropropanediol (MCPD) and glycidol in refined edible oils. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30(1), 46-51.
- Craft, B. D., & Nagy, K. (2012). Mitigation of MCPD-ester and glycidyl-ester levels during the production of refined palm oil. *Lipid Technology*, 24(7), 155-157.
- Craft, B. D., Nagy, K., Sandoz, L., & Destailats, F. (2012a). Factors impacting the formation of Monochloropropanediol (MCPD) fatty acid diesters during palm (*Elaeis guineensis*) oil production. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 29(3), 354-361.
- Craft, B. D., Nagy, K., Seefelder, W., Dubois, M., & Destailats, F. (2012b). Glycidyl esters in refined palm (*Elaeis guineensis*) oil and related fractions. Part II: practical recommendations for effective mitigation. *Food Chemistry*, 132(1), 73-79.
- Crews, C., Brereton, P., & Davies, A. (2001). The effects of domestic cooking on the levels of 3-monochloropropanediol in foods. *Food Additives & Contaminants*, 18(4), 271-280.

- Crews, C., Hasnip, S., Chapman, S., Hough, P., Potter, N., Todd, J., & Matthews, W. (2003). Survey of chloropropanols in soy sauces and related products purchased in the UK in 2000 and 2002. *Food Additives and Contaminants*, 20(10), 916-922.
- Crews, C., Hough, P., Breerton, P., Harvey, D., Macarthur, R., & Matthews, W. (2002). Survey of 3 monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) in selected food groups, 1999-2000. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 19(1), 22-27.
- Crews, C. (2012). MCPD & glycidyl esters in food products: summary report of a workshop held in November 2011 in Brussels. In *MCPD and glycidyl esters in food products: summary report of a workshop held in November 2011 in Brussels*. ILSI Europe.
- Davidek, J., Velišek, J., Kubelka, V., Janiček, G., & Šimicová, Z. (1980). Glycerol chlorohydrins and their esters as products of the hydrolysis of tripalmitin, tristearin and triolein with hydrochloric acid. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 171(1), 14-17.
- Dayrit, F. M., & Niñonuevo, M. R. (2004). Development of an analytical method for 3-monochloropropane-1,2-diol in soy sauce using 4-heptanone as derivatizing agent. *Food Additives and Contaminants*, 21, 204-209.
- Destailats, F., Craft, B. D., Dubois, M., & Nagy, K. (2012a). Glycidyl esters in refined palm (*Elaeis guineensis*) oil and related fractions. Part I: Formation mechanism. *Food Chemistry*, 131(4), 1391-1398.
- Destailats, F., Craft, B.D., Sandoz, L., & Nagy, K. (2012b). Formation mechanisms of Monochloropropanediol (MCPD) fatty acid diesters in refined palm (*Elaeis guineensis*) oil and related fractions. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 29(1), 29-37.
- DGF (Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft) (2010). Einheitsmethode C-VI 17 (10). Abteilung C1. WVG Stuttgart, Germany, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
- DGF (Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft). (2011). Optimal Frittieren – Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Fettwissenschaft. Online verfügbar unter URL: http://www.dgfett.de/material/frittierempfehlungen_dgf.pdf. [Zugriffsdatum: 07.07.2018]
- DGF (Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft). (2013). DGF- Standard Method C-III 3e (06): Polar compounds content in frying oils – Rapid method with micro silica gel columns. Stuttgart, Germany, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
- Dijkstra, A., & Segers, J. (2007). Production and refining of oils and fats. *The lipid handbook*, 143-262.
- Dingel, A., & Matissek, R. (2013). 3-MCPD- und Glycidyl-Fettsäureester. Die indirekten Methoden im Überblick. *Lebensmittelanalytik. DLR Spezial*, 118-121.
- Dingel, A., & Matissek, R. (2015). Esters of 3-monochloropropane-1,2-diol and glycidol: no formation by deep frying during large-scale production of potato crisps. *European Food Research and Technology*, 241(5), 719-723.
- Dissaraphong, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Kishimura, H. (2006). The influence of storage conditions of tuna viscera before fermentation on the chemical, physical and microbiological changes in fish sauce during fermentation. *Bioresource Technology*, 97(16), 2032-2040.

- Divinová, V., Svejtkovská, B., Doležal, M., & Velišek, J. (2004). Determination of free and bound 3-chloropropane-1,2-diol by gas chromatography with mass spectrometric detection using deuterated 3-chloropropane-1,2-diol as internal standard. *Czech Journal of Food Sciences*, 22(5), 182-189.
- Doležal, M., Chaloupská, M., Divinová, V., Svejtkovská, B., & Velišek, J. (2005). Occurrence of 3-chloropropane-1,2-diol and its esters in coffee. *European Food Research and Technology*, 221(3), 221-225.
- Doležal, M. & Velišek, J. (1994). Kinetics of 2-chloro-1,3-propanediol degradation in model systems and in protein hydrolysates. *Potravinarske Vedy-UZPI (Czech Republic)*, 13.
- EFSA (European Food Safety Authority). (2011). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to docosahexaenoic acid (DHA), eicosapentaenoic acid (EPA) and brain, eye and nerve development (ID 501, 513, 540), maintenance of normal brain function (ID 497, 501, 510, 513, 519, 521, 534, 540, 688, 1323, 1360, 4294), maintenance of normal vision (ID 508, 510, 513, 519, 529, 540, 688, 2905, 4294), maintenance of normal cardiac function (ID 510, 688, 1360), “maternal health; pregnancy and nursing” (ID 514), “to fulfil increased omega-3 fatty acids need during pregnancy” (ID 539), “skin and digestive tract epithelial cells maintenance” (ID 525), enhancement of mood (ID 536), “membranes cell structure” (ID 4295), “anti-inflammatory action” (ID 4688) and maintenance of normal blood LDL-cholesterol concentrations (ID 4719) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*, 9(4), 2078.
- EFSA (European Food Safety Authority). (2013). Analysis of occurrence of 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) in food in Europe in the years 2009-2011 and preliminary exposure assessment. *EFSA Journal*, 11, 3381.
- EFSA (European Food Safety Authority). (2016). Risks for human health related to the presence of 3- and 2-monochloropropanediol (MCPD), and their fatty acid esters, and glycidyl fatty acid esters in food. *EFSA Journal*, 14(5).
- EFSA (European Food Safety Authority). (2018). Update of the risk assessment on 3-monochloropropane diol and its fatty acid esters. *EFSA Journal*, 16, 5083.
- Eltweri, A. M., Thomas, A. L., Metcalfe, M., Calder, P. C., Dennison, A. R., & Bowrey, D. J. (2016). Potential applications of fish oils rich in omega-3 polyunsaturated fatty acids in the management of gastrointestinal cancer. *Clinical Nutrition*, 36(1), 65-78.
- Endo, J., & Arita, M. (2016). Cardioprotective mechanism of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Journal of Cardiology*, 67(1), 22-27.
- Ermacora A., & Hrnčířík, K. (2013). A Novel Method for Simultaneous Monitoring of 2-MCPD, 3-MCPD and Glycidyl Esters in Oils and Fats. *Journal of American Oil Chemists` Society*, 90(1), 1-8.
- Ermacora, A., & Hrnčířík, K. (2014a). Development of an analytical method for the simultaneous analysis of MCPD esters and glycidyl esters in oil-based foodstuffs. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 31, 985-994.
- Ermacora, A., & Hrnčířík, K. (2014b). Study on the thermal degradation of 3-MCPD esters in model systems simulating deodorization of vegetable oils. *Food Chemistry*, 150, 158-163.

- EUMOFA (Europäische Marktbeobachtungsstelle für Fischerei- und Aquakulturerzeugnisse) (2016). The EU fish market. Online verfügbar unter: <https://www.eumofa.eu/documents/20178/77960/The+EU+fish+market+-+2016+Edition.pdf>. [Zugriffsdatum: 28. Juni 2018]
- European Commission. (2006). Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, 364, 5-24.
- European Commission. (2011). Commission Regulation (EU) No 1259/2011 of 2 December 2011 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for dioxins, dioxin-like PCBs and non dioxin-like PCBs in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, 320, 18-23.
- European Commission. (2012). Commission Regulation (EC) No 277/2012 of 28 March 2012 amending Annexes I and II to Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council as regards maximum levels and action thresholds for dioxins and polychlorinated biphenyls. *Official Journal of the European Union*, 91, 1-7.
- European Commission. (2018). Commission Regulation (EU) 2018/290 of 26 February 2018 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of glycidyl fatty acid esters in vegetable oils and fats, infant formula, follow-on formula and foods for special medical purposes intended for infants and young children. *Official Journal of the European Union*, 55, 29.
- Fasi, R., & Nielsen, M. A. (1992). *U.S. Patent No. 5,151,503*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- FAO (Food and agriculture organization of the united nations). (1986). The production of fish meal and oil. *FAO Fisheries Technical Paper*, 142.
- FAO (Food and agriculture organization of the united nations). (2012). Reduction of 3-monochloropropane-1, 2-diol (3-MCPD) during the production of acid-hydrolyzed vegetable protein (Acid-HVPs) and products that contain acid-HVPs. In: Prevention and reduction of food and feed contamination. Rom: World Health Organization, 148-54.
- FAO / WHO (Food and agriculture organization of the United Nations / World health organization). (2007). Discussion on chloropropanols derived from the manufacture of acid-HVP and the heat processing of food. In: *Proc 1st Session of Codex Committee on Contaminants in Foods*. Peking.
- Farhoosh, R., Kenari, R. E., & Poorazrang, H. (2009). Frying stability of canola oil blended with palm olein, olive, and corn oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86(1), 71-76.
- FEDIOL (Federation for European Oil and Proteinmeal Industry). (2015): MCPD Esters and Glycidyl Esters. Review of Mitigation Measures. Ref. 15SAF108. Revision 2015. Online verfügbar unter URL: <http://www.fediol.be/web/contaminants/1011306087/list1187970133/fl.html>. [Zugriffsdatum: 07.07.2018]

- Fernández-González, R., Yebra-Pimentel, I., Martínez-Carballo, E., & Simal-Gándara, J. (2014). Decontamination solutions for polychlorinated biphenyls (PCBs) in raw fish oils from environmentally contaminated sea fishes. *Science of The Total Environment*, 468, 1007-1013..
- FIZ (Fischinformationszentrum). (2016). Fischwirtschaft. Daten und Fakten 2016. Online verfügbar unter: http://epub.sub.uni-hamburg.de/epub/volltexte/2017/69761/pdf/FIZ_DF_2016.pdf. [Zugriffsdatum: 28.06.2018]
- Fournier, V., Destailats, F., Juanéda, P., Dionisi, F., Lambelet, P., Sébédio, J. L., & Berdeaux, O. (2006). Thermal degradation of long-chain polyunsaturated fatty acids during deodorization of fish oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108(1), 33-42.
- Franke, K., Strijowski, U., Fleck, G., & Pudel, F. (2009). Influence of chemical refining process and oil type on bound 3-chloro-1,2-propanediol contents in palm oil and rapeseed oil. *LWT - Food Science and Technology*, 42(10), 1751-1754.
- Freudenstein, A., Weking, J., & Matthäus, B. (2013). Influence of precursors on the formation of 3-MCPD and glycidyl esters in a model oil under simulated deodorization conditions. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115(3), 286-294.
- Fry, H., Schödel, C., These, A., & Preiß-Weigert, A. (2013). Collaborative study for the determination of 3-MCPD- and 2-MCPD-fatty acid esters in fat containing foods. Federal Institute for Risk Assessment (BfR): Berlin, Germany.
- FSCJ (Food Safety Commission of Japan). (2015). *Considerations on glycidol and its fatty acid esters in foods. Risk assessment report – Novel Foods and Food Additives FS/185/2015*. Online verfügbar unter URL: http://www.fsc.go.jp/english/evaluationreports/others/abstract_dag_26-52.pdf. [Zugriffsdatum: 07.07.2018].
- Fujisaki, M., Mohri, S., Endo, Y., & Fujimoto, K. (2001). Deterioration of high-oleic safflower oil heated in low oxygen atmospheres with water-spray. *Journal of Oleo Science*, 50(2), 97-101.
- Garballo-Rubio, A., Soto-Chinchilla, J., Moreno, A., & Zafra-Gómez, A. (2017). A novel method for the determination of glycidyl and 3-monochloropropanediol esters in fish oil by gas chromatography tandem mass spectrometry. *Talanta*, 165, 267-273.
- Gibon, V., Ayala, J.V., Dijckmans, P., Maes, J., & De Greyt, W. (2009). Future prospects for palm oil refining and modifications. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 16(4-6), 193-200.
- Gibon, V., De Greyt, W., & Kellens, M. (2007). Palm oil refining. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(4), 315-335.
- Gironi, F., & Maschietti, M. (2006). Separation of fish oils ethyl esters by means of supercritical carbon dioxide: thermodynamic analysis and process modelling. *Chemical Engineering Science*, 61(15), 5114-5126.
- Haines, T. D., Adlaf, K. J., Pierceall, R. M., Lee, I., Venkitasubramanian, P., & Collison, M. W. (2011). Direct Determination of MCPD Fatty Acid Esters and Glycidyl Fatty Acid Esters in Vegetable Oils by LC–TOFMS. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88(1), 1-14.

- Hall, L. A. (1946). Protein hydrolysates; flavor ingredients for foods. *Food Industries*, 18, 681-4.
- Hamlet, C., Jayaratne, S., & Matthews, W. (2002). 3-Monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) in food ingredients from UK food producers and ingredient suppliers. *Food Additives & Contaminants*, 19(1), 15-21.
- Hamlet, C., & Sadd, P. (2002). Kinetics of 3-chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) degradation in high temperature model systems. *European Food Research and Technology*, 215(1), 46-50.
- Hamlet, C., & Sadd, P. (2004). Chloropropanols and their esters in cereal products. *Czech Journal of Food Sciences*, 22, 259-262.
- Hamlet, C., Sadd, P., Crews, C., Velíšek, J., & Baxter, D. (2002b). Occurrence of 3-chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) and related compounds in foods: a review. *Food Additives & Contaminants*, 19(7), 619-631.
- Hamlet, C. G. (1998). Analytical methods for the determination of 3-chloro-1,2-propandiol and 2-chloro-1,3-propandiol in hydrolysed vegetable protein, seasonings and food products using gas chromatography/ion trap tandem mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants*, 15(4), 451-465.
- Hamlet, C. G. (2009). 12 Chloropropanols and their Fatty Acid Esters. *Bioactive compounds in foods*, 323.
- Hamlet, C. G., Asuncion, L., Velíšek, J., Doležal, M., Zelinková, Z., & Crews, C. (2011). Formation and occurrence of esters of 3-chloropropane-1,2-diol (3-CPD) in foods: What we know and what we assume. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(3), 279-303.
- Hamlet, C. G., Asuncion, L., Velíšek, J., Doležal, M., Zelinková, Z., Crews, C., & Pye, C. (2014). Investigation of the formation of 3-chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) from mono- and di-esters of its fatty acids in foods (FS231006, FS231074, FS231075). Online verfügbar unter URL: https://www.food.gov.uk/sites/default/files/media/document/C04072_Final%20report_July%202014_151014.pdf [Zugriffsdatum: 18.07.2018]
- Hamlet, C. G., Sadd, P. A., & Gray, D. A. (2003). Influence of composition, moisture, pH and temperature on the formation and decay kinetics of monochloropropanediols in wheat flour dough. *European Food Research and Technology*, 216(2), 122-128.
- Hamlet, C. G., Sadd, P. A., & Gray, D.A. (2004). Generation of Monochloropropanediols (MCPDs) in Model Dough Systems. 2. Unleavened Doughs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(7), 2067-2072.
- Healthy People. (2016). Food Safety. Online verfügbar unter URL: <https://healthypeople.gov/2020/topics-objectives/topic/food-safety>. [Zugriffsdatum: 02.08.2017]
- Hirsbrunner, P., & Weymuth, H. (1992). U.S. Patent No. 5,079,019. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Hrncirik, K., & Ermacora, A. (2010, November). Formation of 3-MCPD esters in vegetable oils: lab-scale refining study. In *8th EuroFed Lipid Congress* (pp. 21-24).

- Hrnčířík, K., & van Duijn, G. (2011). An initial study on the formation of 3-MCPD esters during oil refining. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(3), 374-379.
- Hrnčířík, K., Zelinkova, Z., & Ermacora, A. (2011). Critical factors of indirect determination of 3-chloropropane-1,2-diol esters. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(3), 361-367.
- Huber, H. (1996). *Backmittel und Backgrundstoffe-der große Nutznießer ist der Verbraucher*. Backmittelinstitut.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). (2000). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, some industrial chemicals. *IARC Monographs*, 77, 469-486.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). (2012). 3-Monochloro-1,2-propanediol. Some Chemicals Present in Industrial and Consumer Products, Food and Drinking-water. *IARC Monographs 101*, 349-374.
- IFRPI (International Food Research Policy Institute) (2016). Topic Food Security. Online verfügbar unter URL: <http://www.ifpri.org/topic/food-security>. [Zugriffsdatum: 02.08.2017]
- Jacobsen, C., Let, M. B., Nielsen, N. S., & Meyer, A.S. (2008). Antioxidant strategies for preventing oxidative flavour deterioration of foods enriched with n-3 polyunsaturated lipids: a comparative evaluation. *Trends in Food Science & Technology*, 19(2), 76-93.
- Jala, R.C.R., Zhang, X., Huang, H., Gao, B., Yu, L., & Xu, X. (2015). 3-MCPD fatty acid esters: chemistry, safety, and technological approaches for their reductions. In L. Yu, S. Wang, B-G Sun, (eds.). *Food Safety Chemistry: toxicant Occurrence, Analysis and Mitigation*. CRC Press.
- JECFA. (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). Meeting, & World Health Organization. (2001). Evaluation of certain food additives and contaminants: *fifty-seventh report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*. WHO Technical Report Series (No 901). World Health Organization.
- JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). Meeting, & World Health Organization. (2002). 3-Chloro-1,2-propanediol. Safety evaluation of certain food additives and contaminants: *seventy-seventh report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (Vol. 48). World Health Organization.
- JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). Meeting, & World Health Organization. (2007). 3-Chloro-1,2-propanediol (addendum). Safety evaluation of certain food additives and contaminants: *seventy-seventh report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (Vol. 58). World Health Organization.
- Jędrkiewicz, R., Głowacz, A., Gromadzka, J., & Namieśnik, J. (2016). Determination of 3-MCPD and 2-MCPD esters in edible oils, fish oils and lipid fractions of margarines available on Polish market. *Food Control*, 59, 487-492.
- Jira, W. (2010). 3-Monochlorpropan-1,2-diol (3-MCPD) in geräucherten Fleischerzeugnissen. *Mitteilungsblatt Fleischforschung*, 89-96.

- Kamal-Eldin, A., and Yanishlieva, N.V. (2002). N-3 fatty acids for human nutrition: stability considerations. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(12), 825-836.
- Karl, H., Merkle, S., Kuhlmann, J., Fritsche, J. (2016). Development of analytical methods for the determination of free and ester bound 2-, 3-MCPD, and esterified glycidol in fishery products. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 118(3), 406-417.
- Kawashima, A., Iwakiri, R., & Honda, K. (2006). Experimental Study on the Removal of Dioxins and Coplanar Polychlorinated Biphenyls (PCBs) from Fish Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26), 10294-10299.
- Khoomrung, S., Raber, G., Laoteng, K., & Francesconi, K.A. (2014). Identification and characterization of fish oil supplements based on fatty acid analysis combined with a hierarchical clustering algorithm. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116(7), 795-804.
- Kissa, E. (1992). Determination of 3-chloropropanediol and related dioxolanes by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 605, 134-138.
- Krüger, K. E. (2004): Fisch. In: Heiss, R. (Hg.): Fisch. Biotechnologische, chemische, mechanische und thermische Verfahren der Lebensmittelverarbeitung. 6. Aufl. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 86-99.
- Kuballa, T., & Ruge, W. (2004). Analysis and detection of 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) in food by GC/MS/MS. *Varian GC/MS Application Note*, 73, 1-2.
- Kuhlmann, J. (2010). Ein neues analytisches Verfahren zur Bestimmung von Glycidyl- und MCPD-Fettsäureestern mittels GC-MS. [Powerpoint slides]. Online verfügbar unter URL: <https://docplayer.org/28021624-Ein-neues-analytisches-verfahren-zur-bestimmung-fettsaeureestern-mittels-gc-ms.html>. [Zugriffsdatum: 07.07.2018]
- Kuhlmann, J. (2011). Determination of bound 2,3-epoxy-1-propanol (glycidol) and bound monochloropropanediol (MCPD) in refined oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(3), 335-344.
- Kuhlmann J. (2016). Analysis and occurrence of dichloropropanol fatty acid esters and related process-induced contaminants in edible oils and fats. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 118(3), 82-395.
- Kuhlmann, J. (2017). Overview on Prevalent Analytical Methods for Fats, Oils, and Compound Foodstuffs – What are the Advantages and Drawbacks? [Powerpoint slides]. Online verfügbar unter URL: <http://www.dgfett.de/meetings/archiv/berlin2017/index.php>. [Zugriffsdatum: 07.07.2018]
- Kuntzer, J., & Weisshaar, R. (2006). The smoking process-: A potent source of 3-chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) in meat products. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 102(9), 397-400.
- Küstern, M., Bimber, U., Ossenbrüggen, A., Reeser, S., Gallitzendörfer, R., & Gerhartz, M. (2010). Rapid and simple micromethod for the simultaneous determination of 3-MCPD and 3-MCPD esters in different foodstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(11), 6570-6577.

- Küsters, M., Bimber, U., Reeser, S., Gallitzendörfer, R., & Gerhartz, M. (2011). Simultaneous determination and differentiation of glycidyl esters and 3-monochloropropane-1,2-diol (MCPD) esters in different foodstuffs by GC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(11), 6263-6270
- Kyselka, J., Matějková, K., Šmidrkal, J., Berčíková, M., Pešek, E., Bělková, B., Pešek, E., Bělková, B., Ilko, V., Doležal, M., & Filip, V. (2018). Elimination of 3-MCPD fatty acid esters and glycidyl esters during palm oil hydrogenation and wet fractionation. *European Food Research and Technology*, 1-9.
- Lawson, L. D., & Hughes, B. G. (1988). Human absorption of fish oil fatty acids as triacylglycerols, free acids, or ethyl esters. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 152(1), 328-335.
- León, N., Yusà, V., Pardo, O., & Pastor, A. (2008). Determination of 3-MCPD by GC-MS/MS with PTV-LV injector used for a survey of Spanish foodstuffs. *Talanta*, 75(3), 824-831.
- Li, C., Zhou, Y., Zhu, J., Wang, S., Nie, S., & Xie, M. (2016). Formation of 3-chloropropane-1,2-diol esters in model systems simulating thermal processing of edible oil. *LWT - Food Science and Technology*, 69, 586-592.
- Lin, T. J., Chen, S. W., & Chang, A. C. (2006). Enrichment of n-3 PUFA contents on Triacylglycerides of fish oil by lipase-catalyzed trans-esterification under supercritical conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 29(1), 27-34.
- Lise Halvorsen, B., & Blomhoff, R. (2011). Determination of lipid oxidation products in vegetable oils and marine omega-3 supplements. *Food & Nutrition Research*, 55 (1), 5792
- Liu, S., Zhang, C., Hong, P., & Ji, H. (2006). Concentration of docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA) of tuna oil by urea complexation: optimization of process parameters. *Journal of Food Engineering*, 73(3), 203-209.
- Macarthur, R., Crews, C., Davies, A., Brereton, P., Hough, P., & Harvey, D. (2000). 3-Monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) in soy sauces and similar products available from retail outlets in the UK. *Food Additives & Contaminants*, 17(11), 903-906.
- MacLean, C. H., Newberry, S. J., Mojica, W. A., Khanna, P., Issa, A. M., Suttorp, M. J., & Morton, S. C. (2006). Effects of omega-3 fatty acids on cancer risk: a systematic review. *Jama*, 295(4), 403-415.
- MacMahon, S., Mazzola, E., Begley, T. H., & Diachenko, G. W. (2013). Analysis of processing contaminants in edible oils. Part 1. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the direct detection of 3-monochloropropanediol monoesters and glycidyl esters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(20), 4737-4747.
- Maes, J., De Meulenaer, B., Van Heerswynghe, P., De Greyt, W., Eppe, G., De Pauw, E., & Huyghebaert, A. (2005). Removal of dioxins and PCB from fish oil by activated carbon and its influence on the nutritional quality of the oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 82(8), 593-597.
- Man, Y. C., Liu, J., Jamilah, B., & Rahman, R. A. (1999). Quality changes of refined-bleached-deodorized (RBD) Palm olein, soybean oil and their blends during deep-fat frying. *Journal of Food Lipids*, 6(3), 181-193.

- Manthey-Karl, M. (2008). Forellen räuchern. Herstellung, Qualität, Hygiene- worauf kommt es an? Frankfurt am Main: DLG-Verlags-GmbH.
- Maskan, M., & Bagci, H. (2003). Effect of different adsorbents on purification of used sunflower seed oil utilized for frying. *European Food Research and Technology*, 217(3), 215-218.
- Masukawa, Y., Shiro, H., Nakamura, S., Kondo, N., Jin, N., Suzuki, N., & Kudo, N. (2010). A new analytical method for the quantification of glycidol fatty acid esters in edible oils. *Journal of Oleo Science*, 59(2), 81-88.
- Matissek, R. (2011). Analytik von 3-MCPD- und Glycidyl-Fettsäureestern. Eine komplizierte Geschichte? [Powerpoint slides]. Online verfügbar unter URL: <https://docplayer.org/59673998-Analytik-von-3-mcpd-und-glycidyl-fettsaeureestern-eine-komplizierte-geschichte.html>. [Zugriffsdatum: 07.07.2018]
- Matsuno, R., & Adachi, S. (1993). Lipid encapsulation technology-techniques and applications to food. *Trends in Food Science & Technology*, 4(8), 256-261.
- Matthäus, B., Freudenstein, A., Vosmann, K., Pudel, F., & Rudolph, T. (2012). Deodorization for edible oils Investigate the influences on the formation related by 3-MCPD fatty acid esters and connections. Hamburg: Behrs Verlag GmbH & Co.
- Matthäus, B., Pudel, F., Fehling, P., Vosmann, K., & Freudenstein, A. (2011). Strategies for the reduction of 3-MCPD esters and related compounds in vegetable oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(3), 380-386.
- McNeill, J., Kakuda, Y., & Kamel, B. (1986). Improving the quality of used frying oils by treatment with activated carbon and silica. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 63(12), 1564-1567.
- Meierhans D. C., Bruehlmann S., Meili J. & Taeschler C. (1998). Sensitive method for the determination of 3-chloropropane-1,2-diol and 2-chloropropane-1,3-diol by capillary gas chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 802, 325-333.
- Merkle, S., Giese, E., Rohn, S., Karl, H., Lehmann, I., Wohltmann, A., Fritsche, J. (2017). Impact of fish species and processing technology on minor fish oil components. *Food Control*, 73, 1379-1387.
- Merkle, S., Ostermeyer, U., Rohn, S., Karl, H., Fritsche, J. (2018a). Mitigation strategies for ester bound 2-/3-MCPD and esterified glycidol in pre-fried breaded and frozen fish products. *Food Chemistry*, 245, 196-204.
- Merkle, S., Ostermeyer, U., Rohn, S., Karl, H., Fritsche, J. (2018b). Formation of ester bound 2- and 3-MCPD and esterified glycidol in deep-fried and pickled herring products. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 120, 1700464.
- Mishra, V., Temelli, F., & Ooraikul, B. (1993). Extraction and purification of ω -3 fatty acids with an emphasis on supercritical fluid extraction – A review. *Food Research International*, 26(3), 217-226.
- Mogol, B. E. A., Pye, C. L., Anderson, W., Crews, C., & Gökmen, V. (2014). Formation of monochloropropane-1,2-diol and its esters in biscuits during baking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(29), 7297-7301.

- Nagy, K., Sandoz, L., Craft, B. D., & Destailats, F. (2011). Mass-defect filtering of isotope signatures to reveal the source of chlorinated palm oil contaminants. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 28(11), 1492-1500.
- Nawar, W. W. (2000). Lipids. In O. R. Fennema (Ed.), *Food chemistry*, 3. Auflage. New York: Marcel Dekker. 225-319.
- Nyman, P., Diachenko, G., & Perfetti, G. (2003). Survey of chloropropanols in soy sauces and related products. *Food Additives and Contaminants*, 20(10), 909-915.
- Oehlenschläger, J. (2007). Wasser-, Salz- und Fettgehalte in handelsüblichen 200-g-Fertigpackungen von vakuumverpacktem kalt geräuchertem Atlantischen Lachs (*Salmo salar*). *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 103(12), 569-573.
- Opperman, M., Marais, D.W., & Benadé, A.S. (2011). Analysis of omega-3 fatty acid content of South African fish oil supplements. *Cardiovascular Journal of Africa*, 22(6), 324-329.
- Ortiz, X., Carabellido, L., Martí, M., Martí, R., Tomás, X., & Díaz-Ferrero, J. (2011). Elimination of persistent organic pollutants from fish oil with solid adsorbents. *Chemosphere*, 82(9), 1301-1307.
- Oterhals, Å., Solvang, M., Nortvedt, R., & Berntssen, M. H. (2007). Optimization of activated carbon-based decontamination of fish oil by response surface methodology. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(7), 691-705.
- Pérez-Palacios, T., Petisca, C., Casal, S., & Ferreira, I. M. (2014). Changes in chemical composition of frozen coated fish products during deep-frying. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 65(2), 212-218.
- Perretti, G., Motori, A., Bravi, E., Favati, F., Montanari, L., & Fantozzi, P. (2007). Supercritical carbon dioxide fractionation of fish oil fatty acid ethyl esters. *The Journal of Supercritical Fluids*, 40(3), 349-353.
- Pesselman, R. L., & Feit M. J. (1988). Determination of residual epichlorohydrin and 3-chloropropanediol in water by gas chromatography with electron-capture detection. *Journal of Chromatography A*, 439, 448-452.
- Pinkston, J. D., Stoffolano, P. J., & Lin, P. Y. (2011). Update on the development of a sensitive, accurate, and user-friendly method for the direct determination of 3-MCPD esters. In *102nd AOCS Annual Meeting & Expo*.
- Plantinga, W. J., Van Toorn, W.G., & Van der Stegen, G. H. D. (1991). Determination of 3-chloropropane-1,2-diol in liquid hydrolysed vegetable proteins by capillary gas chromatography with Same ionisation detection. *Journal of Chromatography*, 555, 311-314.
- Porter, K.E., & Jones, A.R. (1982). The effect of the isomers of α -chlorohydrin and racemic β -chlorolactate on the rat kidney. *Chemico-Biological Interactions*, 41(1), 95-104.
- Psota, T.K., Gebauer, S.K., & Kris-Etherton, P. (2006). Dietary omega-3 fatty acid intake and cardiovascular risk. *The American Journal of Cardiology*, 98(4), 3-18.
- Pudel, F., Benecke, P., Fehling, P., Freudenstein, A., Matthäus, B., & Schwaf, A. (2011). On the necessity of edible oil refining and possible sources of 3-MCPD and glycidyl esters. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(3), 368-373

- Qi, S., Chen, H., Liu, Y., Wang, W., Shen, L., & Wang, Y. (2015). Evaluation of glycidyl fatty acid ester levels in camellia oil with different refining degrees. *International Journal of Food Properties*, 18(5), 978-985.
- Racamonde, I., González, P., Lorenzo, R. A., & Carro, A. M. (2011). Determination of chloropropanols in foods by one-step extraction and derivatization using pressurized liquid extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218(39), 6878-6883.
- Rahn, A., & Yaylayan, V. A. (2010). Thermal degradation of sucralose and its potential in generating chloropropanols in the presence of glycerol. *Food Chemistry*, 118(1), 56-61.
- Rahn, A. K. K., & Yaylayan, V. A. (2011a). Monitoring cyclic acyloxonium ion formation in palmitin systems using infrared spectroscopy and isotope labelling technique. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(3), 330-334.
- Rahn, A. K. K., & Yaylayan, V. A. (2011b). What do we know about the molecular mechanism of 3-MCPD ester formation? *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(3), 323-329.
- Ramli, M. R., Siew, W. L., Ibrahim, N. A., Hussein, R., Kuntom, A., Razak, R. A. A., & Nesaretnam, K. (2011). Effects of degumming and bleaching on 3-MCPD esters formation during physical refining. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88(11), 1839-1844.
- Ramli, M. R., Siew, W. L., Ibrahim, N. A., Kuntom, A., & Abd. Razak, R. A. (2015). Other factors to consider in the formation of chloropropanol fatty esters in oil processes. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 32(6), 817-824.
- Razak, R. A. A., Kuntom, A., Siew, W. L., Ibrahim, N. A., Ramli, M. R., Hussein, R., & Nesaretnam, K. (2012). Detection and monitoring of 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) esters in cooking oils. *Food Control*, 25(1), 355-360.
- Reece, P., Crews, C., Hasnip, S., Hamlet, C., Sadd, P., Baxter, D., & Doležal, M. (2005). The origin and formation of 3-MCPD in foods and food ingredients. *FSA Project C*, 3017, 18.
- Reineccius, G. (2016). *Flavor chemistry and technology*: CRC press.
- Rétho, C. & Blanchard, F. (2005). Determination of 3-chloropropane-1,2-diol as its 1,3-dioxolane derivative at the microgram kg⁻¹ level: application to a wide range of foods. *Food Additives and Contaminants*, 22, 1189-1197.
- Robjohns, S., Marshall, R., Fellows, M., & Kowalczyk, G. (2003). In vivo genotoxicity studies with 3-monochloropropane-1,2-diol. *Mutagenesis*, 18(5), 401-404.
- Rodman, L. E., & Ross, R. D. (1986). Gas-liquid chromatography of 3-chloropropanediol. *Journal of Chromatography A*, 369, 97-103.
- Rubio-Rodríguez, N., Beltrán, S., Jaime, I., Sara, M., Sanz, M.T., & Carballido, J.R. (2010). Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: a review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(1), 1-12.

- Rubio-Rodríguez, N., De-Diego, S., Beltrán, S., Jaime, I., Sanz, M. T., & Rovira, J. (2009). SFE of fish oil from fish by-products: a comparison with other production processes. In *9th International Symposium on Supercritical Fluids 2009. New trends on supercritical*.
- Saguy, I.S. (1995). Oil uptake during deep-fat frying: factors and mechanism. *Food Technol.*, *49*, 142-145.
- Saguy, I.S., & Dana, D. (2003). Integrated approach to deep fat frying: engineering, nutrition, health and consumer aspects. *Journal of Food Engineering*, *56*(2), 143-152.
- SCF (2001). Opinion on 3-monochloro-propane-1,2-diol (3-MCPD), Updating the SCF opinion of 1994 adopted on 30 May 2001. European Commission, Brussels. Online verfügbar unter URL: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out91_en.pdf. [Zugriffsdatum: 15.10.2010]
- Schallschmidt, K., Hitzel, A., Pöhlmann, M., Schwägele, F., Speer, K., & Jira, W. (2012). Determination of 3-MCPD in grilled meat using pressurized liquid extraction and gas chromatography–high resolution mass spectrometry. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, *7*(3), 203-210.
- Schlee, U. C., Ruge, W., Kuballa, T., & Lachenmeier, D. W. (2011). 3-Monochlor-1,2-propandiol in Lebensmitteln. Aktueller Wissensstand und Untersuchungsergebnisse. *Deutsche Lebensmittel Rundschau*, In press.
- Schubring, R. (1999). Qualitätsvergleich zwischen panierten Filetportionen aus einfach- und doppelgefrorenen TK-Blöcken. *Informationen für die Fischwirtschaft aus der Fischereiforschung*, *46*(3), 51-56.
- Schurz, K. (2010). Method for reducing the 3-MCPD content in refined vegetable oils. *Patent Cooperation Treaty Application (WO10063450)*.
- Shahidi, F., & Wanasundara, U.N. (1998). Omega-3 fatty acid concentrates: nutritional aspects and production technologies. *Trends in Food Science & Technology*, *9*(6), 230-240.
- Shimizu, M., Moriwaki, J., Shiiba, D., Nohara, H., Kudo, N., & Katsuragi, Y. (2012b). Elimination of glycidyl palmitate in diolein by treatment with activated bleaching earth. *Journal of Oleo Science*, *61*(1), 23-28.
- Shimizu, M., Vosmann, K., & Matthäus, B. (2012a). Generation of 3-monochloro-1,2-propanediol and related materials from tri-, di-, and monoolein at deodorization temperature. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *114*(11), 1268-1273.
- Shimizu, M., Weitkamp, P., Vosmann, K., & Matthäus, B. (2013a). Temperature dependency when generating glycidyl and 3-MCPD esters from diolein. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *90*(10), 1449-1454.
- Shimizu, M., Weitkamp, P., Vosmann, K., & Matthäus, B. (2013b). Influence of chloride and glycidyl-ester on the generation of 3-MCPD- and glycidyl-esters. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *115*, 735-9.
- Šmidrkal, J., Ilko, V., Filip, V., Doležal, M., Zelinková, Z., Kyselka, J., & Velíšek, J. (2011). Formation of acylglycerol chloro derivatives in vegetable oils and mitigation strategy. *Czech Journal of Food Sciences*, *29*(4), 448-456.

- Souci, S. W., Fachmann, W. & Kraut, H. (2008). *Food Composition and Nutrition Tables*. 7 Aufl. Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers.
- Stadler, R. H., & Lineback, D. R. (2008). *Process-induced food toxicants: occurrence, formation, mitigation, and health risks*: John Wiley & Sons.
- Strijowski, U., Heinz, V., & Franke, K. (2011). Removal of 3-MCPD esters and related substances after refining by adsorbent material. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(3), 387-392.
- Strobel, C., Jahreis, G., & Kuhnt, K. (2012). Survey of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids in fish and fish products. *Lipids in health and disease*, 11(1), 144.
- Svejkovská, B., Doležal, M., & Velišek, J. (2006). Formation and decomposition of 3-chloropropane-1,2-diol esters in models simulating processed foods. *Czech Journal of Food Sciences*, 24(4), 172.
- Svejkovská, B., Novotny, O., Divinova, V., Reblova, Z., Doležal, M., & Velišek, J. (2004). Esters of 3-chloropropane-1,2-diol in foodstuffs. *Czech Journal of Food Sciences*, 22(5), 190-196.
- Tiong, S. H., Saparin, N., Teh, H. F., Ng, T. L. M., Md. Zain, M. Z. B., Neoh, B. K., Noor, A. M., Tan, C. P., Lai, O., & Appleton, D. R. (2018). Natural Organochlorines as Precursors of 3-Monochloropropanediol Esters in Vegetable Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(4), 999-1007.
- Tülsner, M., & Koch, M. (2010): *Technologie der Fischverarbeitung*. Hamburg, Behrs Verlag GmbH & Co.
- Unnithan, U. R. (1999). *U.S. Patent No. 5,932,261*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Ushijima, K., Deguchi, Y., Kikukawa, K., Nomur, A. T., & Adachi, T. J. (1995). Analysis for residual 3-chloro-1,2-propanediol in seasonings after derivatization with phenylboronic acid. *Food Hygiene and Safety Science*, 36, 360-364.
- Van Bergen, C. A., Collier, P. D., Cromie, D. D. O., Lucas, R. A., Preston, H. D., & Sissons, D. J. (1992). Determination of chloropropanols in protein hydrolysates. *Journal of Chromatography A*, 589(1-2), 109-119.
- Velišek, J., Calta, P., Crews, C., Hasnip, S., & Doležal, M. (2003). 3-Chloropropane-1,2-diol in models simulating processed foods: precursors and agents causing its decomposition. *Czech Journal of Food Sciences*, 21(5), 153-161.
- Velišek, J., Davidek, J., Hajšlová, J., Kubelka, V., Janíček, G., & Mánková, B. (1978). Chlorohydrins in protein hydrolysates. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 167(4), 241-244.
- Velišek, J., Davidek, J., Kubelka, V., Janicek, G., Svobodova, Z., & Simicova, Z. (1980). New chlorine-containing organic compounds in protein hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28(6), 1142-1144.
- Velišek, J., Davidek, T., Davidek, J., Kubelka, V., & Viden, I. (1991). 3-Chloro-1,2-propanediol Derived Amino Acids in Protein Hydrolysates. *Journal of Food Science*, 56(1), 139-142.

- Velíšek, J., Doležal, M., Crews, C., & Dvorak, T. (2002). Optical isomers of chloropropanediols: mechanisms of their formation and decomposition in protein hydrolysates. *Czech Journal of Food Sciences*, 20(5), 161-170.
- Ward, O.P., & Singh, A. (2005). Omega-3/6 fatty acids: alternative sources of production. *Process Biochemistry*, 40(12), 3627-3652.
- Weißhaar, R. (2008). Determination of total 3-chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) in edible oils by cleavage of MCPD esters with sodium methoxide. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110(2), 183-186.
- Weißhaar, R., & Perz, R. (2010). Fatty acid esters of glycidol in refined fats and oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(2), 158-165.
- Wenzl, T., Lachenmeier, D. W., & Gökmen, V. (2007). Analysis of heat-induced contaminants (acrylamide, chloropropanols and furan) in carbohydrate-rich food. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389(1), 119.
- Wenzl, T., Samaras, V., Giri, A., Buttinger, G., Karasek, L., & Zelinkova, Z. (2015). 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. *EFSA Supporting Publications*, 12(3), 779E.
- Wijesundera, C., Ceccato, C., Watkins, P., Fagan, P., Fraser, B., Thienthong, N., & Perlmutter, P. (2008). Docosahexaenoic acid is more stable to oxidation when located at the sn-2 position of triacylglycerol compared to sn-1 (3). *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85(6), 543-548.
- Wong, Y.H., Muhamad, H., Abas, F., Lai, O.M., Nyam, K.L., & Tan, C.P. (2017). Effects of temperature and NaCl on the formation of 3-MCPD esters and glycidyl esters in refined, bleached and deodorized palm olein during deep-fat frying of potato chips. *Food Chemistry*, 219, 126-130.
- Worch, E. (2012). Adsorption technology in water treatment: fundamentals, processes, and modeling. Walter de Gruyter.
- Yaghmur, A., Aserin, A., Mizrahi, Y., Nerd, A., & Garti, N. (2001). Evaluation of argan oil for deep-fat frying. *LWT-Food Science and Technology*, 34(3), 124-130.
- Yates, R., & Caldwell, J. (1992). Adsorptive capacity of active filter aids for used cooking oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 69(9), 894-897.
- Young, F. (1986). Refining and hydrogenation of fish oil. *Fish Oil Bulletin*, 17.
- Zelinková, Z., Doležal, M., & Velíšek, J. (2009). 3-Chloropropane-1,2-diol fatty acid esters in potato products. *Czech Journal of Food Sciences*, 27, 421-S424.
- Zelinková, Z., Giri, A., & Wenzl, T. (2017). Assessment of critical steps of a GC/MS based indirect analytical method for the determination of fatty acid esters of monochloropropanediols (MCPDEs) and of glycidol (GEs). *Food Control*, 77, 65-75.
- Zelinková, Z., Svejková, B., Velíšek, J., & Doležal, M. (2006). Fatty acid esters of 3-chloropropane-1,2-diol in edible oils. *Food Additives and Contaminants*, 23(12), 1290-1298.

- Zhang, X., Gao, B., Qin, F., Shi, H., Jiang, Y., Xu, X., & Yu, L. (2013). Free radical mediated formation of 3-monochloropropanediol (3-MCPD) fatty acid diesters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(10), 2548-2555.
- Zhang, Z., Gao, B., Zhang, X., Jiang, Y., Xu, X., & Yu, L. (2015). Formation of 3-monochloro-1,2-propanediol (3-MCPD) di- and monoesters from tristearoylglycerol (TSG) and the potential catalytic effect of Fe²⁺ and Fe³⁺. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*(6), 1839-1848.
- Zhang, H., Jin, P., Zhang, M., Cheong, L. Z., Hu, P., Zhao, Y., Yu, L., Wang, Y., Jiang, Y., & Xu, X. (2016). Mitigation of 3-monochloro-1,2-propanediol ester formation by radical scavengers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*(29), 5887-5892.
- Zhou, H., Jin, Q., Wang, X., & Xu, X. (2014). Effects of temperature and water content on the formation of 3-chloropropane-1,2-diol fatty acid esters in palm oil under conditions simulating deep fat frying. *European Food Research and Technology*, *238*(3), 495-501.
- Zulkurnain, M., Lai, O. M., Latip, R. A., Nehdi, I. A., Ling, T. C., & Tan, C. P. (2012). The effects of physical refining on the formation of 3-monochloropropane-1, 2-diol esters in relation to palm oil minor components. *Food Chemistry*, *135*(2), 799-805.
- Zulkurnain, M., Lai, O. M., Tan, S. C., Abdul Latip, R., & Tan, C. P. (2013). Optimization of Palm Oil Physical Refining Process for Reduction of 3-Monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) Ester Formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(13), 3341-3349.
- Zwagerman, R., & Overman, P. (2016). A novel method for the automatic sample preparation and analysis of 3-MCPD-, 2-MCPD-, and glycidylesters in edible oils and fats. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *118*(7), 997-1006.

8 Anhang

8.1 Supplementary Data – Publikation II

Impact of fish species and processing technology on minor fish oil components. *Food Control*, 2017, 73, 1379-1387.

Sybille Merkle (SM), Editha Giese (EG), Sascha Rohn (SR), Horst Karl (HK), Ines Lehmann (IL), Andreas Wohltmann (AW), Jan Fritsche (JF)

Appendix 1. Crude and refined fish oil samples compared in this study. Samples from separate batches of each product were pooled for each analysis. f.g. = food grade, f.q. = feed quality

Fish oil Sample	Product information	Origin	Labelled EPA [%]	Labelled DHA [%]	No. of pooled samples	Performed Analysis
- Crude fish oils -						
Herring	Crude herring fish oil for the food processing industry	Atlantic herring (<i>Clupea harengus</i>) from North East Atlantic, f.g. fresh whole fish	6-10	4-6	5	- PCDD/F, dioxin-like PCBs, non-dioxin-like PCBs - 2-/3-MCPD esters and glycidyl esters - n-3 PUFA, EPA and DHA
Cod liver	Crude cod liver fish oil for the food processing industry	Cod (<i>Gadus morhua</i>) from North East Atlantic, f.g. deep frozen (various fishing areas) or fresh liver (Barent Sea, Norwegian Sea)	7-15	7-15	6	- PCDD/F, dioxin-like PCBs, non-dioxin-like PCBs - 2-/3-MCPD esters and glycidyl esters - n-3 PUFA, EPA and DHA
Salmon	Crude salmon oil	Atlantic salmon (<i>Salmo salar</i>) from Northern European aquaculture, f.g. fresh by-products (heads, backbones, cuttings)	2-6	2-6	8	- PCDD/F, dioxin-like PCBs, non-dioxin-like PCBs - 2-/3-MCPD esters and glycidyl esters - n-3 PUFA, EPA and DHA
Wild salmon	Crude wild salmon fish oil for the food processing	Sockeye salmon (<i>Oncorhynchus nerka</i>) captured in North Pacific, f.g	4-6	4-6	3	- PCDD/F, dioxin-like PCBs, non-dioxin-like

Anhang

	industry	fresh by-products (backbones, cuttings)				PCBs - n-3 PUFA, EPA and DHA
Blue whiting		Blue whiting (<i>Micromesistius poutassou</i>) from North East Atlantic, Cat3 frozen whole fish	-	-	1	- 2-/3-MCPD esters and glycidyl esters
Mackerel	Crude mackerel fish oil for the food processing industry	Mackerel (<i>Scomber scombrus</i>) from North Atlantic, f.g. fresh by- products (head, bones, intestines)	4-8	8-10	3	- 2-/3-MCPD esters and glycidyl esters - n-3 PUFA, EPA and DHA - 2-/3-MCPD esters and glycidyl esters
Sprat		Sprat (<i>Sprattus sprattus</i>) from North East Atlantic, Cat3 fresh whole fish	-	-	4	- n-3 PUFA, EPA and DHA
Sturgeon		Sturgeon (<i>Acipenser sp.</i>) from German aquaculture, Cat3 fresh by-products	-	-	1	- 2-/3-MCPD esters and glycidyl esters
Catfish		Catfish (<i>Clarias gariepinus</i>) from German aquaculture, Cat3 fresh by-products	-	-	1	- 2-/3-MCPD esters and glycidyl esters
Fish oil mix	Fish oil for the feed industry	Fish oil from various Cat3 fresh fish by-products	-	-	1	- 2-/3-MCPD esters and glycidyl esters
Plaice fish		Plaice (<i>Pleuronectes platessa</i>) from North Sea, Cat3 fresh by-products (head, backbone, tail, bowels)	-	-	1	- 2-/3-MCPD esters and glycidyl esters
Sand eel		Sand eel (<i>Ammodytes tobianus</i>) from North Sea, Cat3 fresh whole fish	-	-	2	- 2-/3-MCPD esters and glycidyl esters
Sardine		Sardine (<i>Sardina pilchardus</i>) from North East Atlantic, f.g. heads, deep frozen	-	-	5	- 2-/3-MCPD esters and glycidyl esters - n-3 PUFA, EPA and DHA

Anhang

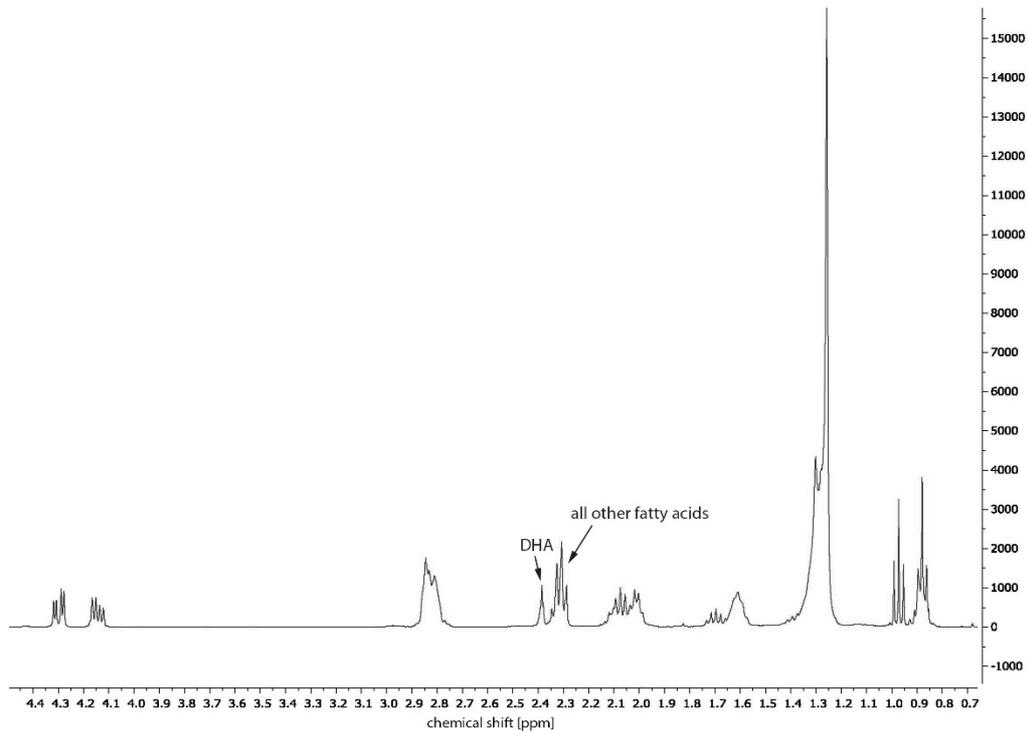
Tuna		Yellow fin tuna (<i>Thunnus albacares</i>), captured in the Pacific, Cat3 excess oil which is formed during cooking of tuna at the production of canned tuna products	-	-	3	- 2-/3-MCPD esters and glycidyl esters - n-3 PUFA, EPA and DHA
- Partly refined fish oils -						
Cod liver	Crude cod liver oil, filtrated through activated carbon	Cod (<i>Gadus morhua</i>) from North East Atlantic, f.g. deep frozen (various fishing areas) or fresh liver (Barent Sea, Norwegian Sea)	8-9	10-13	4	- PCDD/F, dioxin-like PCBs, non-dioxin-like PCBs
Wild salmon	Crude wild salmon oil, filtrated through activated carbon, stabilized with 0.4% rosemary extract (0.04% carnosol plus carnosic acid)	Sockeye salmon (<i>Oncorhynchus nerka</i>) captured in North Pacific, f.g. fresh by-products (backbones, cuttings)	4-6	4-6	3	- PCDD/F, dioxin-like PCBs, non-dioxin-like PCBs
- Refined fish oils -						
Marine fish A	Omega 3 capsules, 1000 mg fish oil concentrate plus vitamin E (alpha-Tocopherol-acetat, 0.4 %); dietary supplement	Mixed marine fish oil	16	10	1	- 2-/3-MCPD esters and glycidyl esters - n-3 PUFA, EPA and DHA
Marine fish B	Omega-3 capsules, 1000 mg concentrate - highly dosed plus vitamin E (D-alpha Tocopherol, 0.4 %); dietary supplement	Marine fish oil	16	10	1	- 2-/3-MCPD esters and glycidyl esters - n-3 PUFA, EPA and DHA
Marine fish C	Omega-3 marine fish oil 1000 plus vitamin E (D,L-alpha-	Marine fish oil (68.7 %)	18	12	1	- 2-/3-MCPD esters and glycidyl esters

Anhang

Marine fish D	Tocopherol, 1.2 %), dietary supplement Omega-3 marine fish oil 1000 plus vitamin E (D,L-alpha-Tocopherol, 1.2 %), dietary supplement	Marine fish oil (68.7 %)	18	12	1	- 2-/3-MCPD esters and glycidyl esters
Salmon and marine fish A	Omega-3 salmon oil 1000; highly dosed: rich in concentrated omega-3 fatty acids, plus vitamin E (alpha-Tocopherol-acetat, 1.5 %), dietary supplement	Salmon ($\geq 50\%$) and marine fish oil in the oil part (68.3 %)	18	12	1	- 2-/3-MCPD esters and glycidyl esters - n-3 PUFA, EPA and DHA
Salmon and marine fish B	Omega-3 capsules; 1500 mg plus vitamin E (D,L-alpha-Tocopherylacetat, 0.108 %),	Marine fish and salmon oil (at least 60 %) in the fish oil part (72 %)	10.8	9	1	- 2-/3-MCPD esters and glycidyl esters - n-3 PUFA, EPA and DHA
Salmon and marine fish C	Premium Omega-3 fish oil plus vitamin E (D,L-alpha-Tocopherol-acetat, 1.2 %), dietary supplement	73 % fish and salmon oil	14.04	9.36	1	- 2-/3-MCPD esters and glycidyl esters - n-3 PUFA, EPA and DHA
Salmon and marine fish D	Omega-3 capsules 1500 mg plus vitamin E (D-alpha-Tocopherol, 1.08 %), dietary supplement	Salmon and fish oil	14.9	9	1	- 2-/3-MCPD esters and glycidyl esters - n-3 PUFA, EPA and DHA
- Highly purified fish oil -						
Highly purified marine fish	Omega-3 concentrate plus vitamin E (alpha-Tocopherol-acetat, 1.54 %), dietary supplement	Highly purified marine fish oils (68.1 %)	33	22	1	- 2-/3-MCPD esters and glycidyl esters - n-3 PUFA, EPA and DHA

Anhang

Appendix 2. 400 MHz ^1H -NMR spectrum of a fish oil capsule showing the chemical shift region relevant for DHA determination.



Anhang

Appendix 3. Average composition of selected fatty acid methyl esters (FAME) in refined fish oils [FAME %].

Fatty acid	Fish oil sample	FA(%)						
		Marine fish A	Salmon and marine fish A	Salmon and marine fish B	Salmon and marine fish C	Highly purified marine fish	Marine fish B	Salmon and marine fish D
Myristic acid		7.7	6.2	5.3	7.6	0.5	6.7	6.7
Palmitic acid		15.7	16.2	13.5	15.6	3.0	15.1	15.7
Palmitoleic acid / Hexadecanoic acid		8.8	8.2	6.2	8.5	1.2	7.9	8.6
Stearic acid		3.1	3.2	2.9	3.0	2.9	3.2	3.1
n-7/9 Oleic acid		12.3	10.9	22.3	11.5	8.3	10.9	12.0
n-6 Linoleic acid		1.6	1.5	5.7	1.1	1.3	1.4	1.4
n-3 alpha-linolenic acid		1.1	1.3	2.6	1.0	0.7	1.2	1.2
Stearidonic acid		2.4	3.4	2.2	2.6	1.9	2.9	3.2
Eicosenoic acid		0.6	1.3	2.6	0.7	2.0	1.4	1.5
n-6 Arachidonic acid		1.0	0.9	0.6	0.9	2.0	1.3	0.9
n-3 EPA		17.1	17.1	10.9	17.3	31.8	18.1	16.2
Cetoleic / Erucic acid		-	0.9	2.2	0.4	1.6	1.4	1.5
n-3 DPA		1.8	1.5	1.4	1.8	4.0	1.7	1.5
n-3 DHA		11.2	10.8	7.8	12.2	22.4	10.9	10.1
EPA+DHA		28.3	27.9	18.7	29.4	54.2	29.0	26.3
∑n-6		2.6	2.4	6.3	2.1	3.2	2.6	2.3
∑n-3		33.3	33.8	24.7	34.5	60.7	34.5	32.0
n3:n6 ratio		12.6	14.0	3.9	16.8	18.8	13.3	13.9
∑saturated fatty acid		26.5	25.6	21.7	26.2	6.5	25.0	25.5
∑monounsaturated fatty acid		21.7	21.2	33.3	21.1	13.0	21.5	23.6
∑polyunsaturated fatty acid		36.3	36.4	31.2	36.8	64.1	37.3	34.5

Anhang

Appendix 4. Average composition of selected fatty acid methyl esters (FAME) in crude fish oils [FAME %].

Fish oil sample	Crude herring						Cod liver					
	FA(%)	1	2	3	1	2	3	4	5	6		
Fatty acid												
Myristic acid	C14:0	7.6	7.7	8.1	4.1	4.02	4.3	3.8	4.2	4.2		
Palmitic acid	C16:0	-	12.0	12.7	10.2	10.6	14.5	9.8	11.1	10.6		
Palmitoleic acid / Hexadecanoic acid	C16:1	5.0	3.7	5.4	9.6	9.5	8.7	10.1	9.7	9.8		
Stearic acid	C18:0	1.2	1.1	1.1	1.7	2.2	2.6	1.7	2.2	2.2		
n-7/9 Oleic acid	C18:1	11.1	9.1	6.5	19.2	21.9	20.9	18.0	20.3	23.1		
n-6 Linoleic acid	C18:2	2.6	2.1	1.4	1.9	1.9	1.6	2.0	1.9	2.1		
n-3 alpha-linolenic acid	C18:3	0.2	1.5	1.1	1.0	0.7	0.8	0.7	0.7	0.9		
n-3 Octadecatetraenic acid	C18:4	3.5	3.1	3.3	3.1	2.5	1.9	2.2	2.1	2.4		
Eicosenoic acid	C20:1	12.5	13.2	12.9	10.6	12.0	9.8	13.3	13.2	12.9		
n-6 Arachidonic acid	C20:4	0.4	0.6	0.6	0.3	0.4	0.6	0.6	0.6	0.4		
n-3 EPA	C20:5	8.6	5.4	7.2	9.4	8.1	8.5	8.4	7.7	8.4		
Cetoleic / Erucic acid	C22:1	22.0	1.0	21.7	3.6	-	5.5	6.3	6.9	7.1		
n-3 DPA	C22:5	2.0	0.7	0.8	0.8	1.0	1.2	1.1	1.0	1.1		
n-3 DHA	C22:6	7.2	7.6	7.3	10.7	11.1	12.4	11.4	10.1	11.8		
EPA+DHA		15.7	13.0	14.5	20.0	19.2	20.9	19.8	17.8	20.2		
∑n-6		3.1	2.7	1.9	2.3	2.3	2.2	2.6	2.5	2.5		
∑n-3		20.4	18.3	19.7	24.9	23.4	24.8	-	21.6	24.5		
n3:n6 ratio		6.7	6.7	10.2	11.0	10.0	11.3	-	8.8	9.8		
∑saturated fatty acid		20.6	20.9	21.8	16.1	16.8	21.4	15.3	17.6	16.9		
∑monounsaturated fatty acid		50.6	27.0	46.5	43.0	43.4	45.0	47.7	50.1	52.9		
∑polyunsaturated fatty acid		23.4	21.0	21.7	27.2	25.7	27.0	26.4	24.0	27.0		

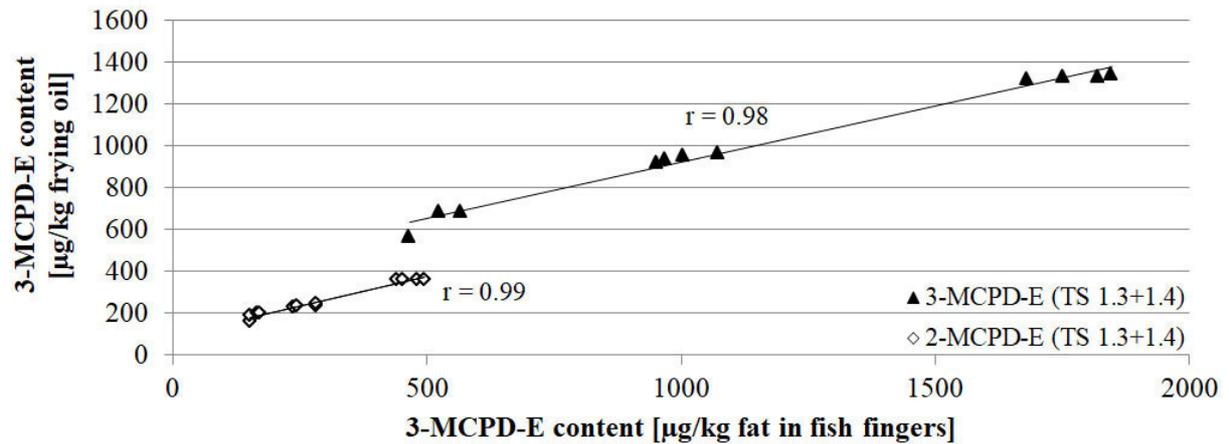
Anhang

Fatty acid	Fish oil sample																			
	Crude salmon				Wild salmon				Mackerel				Sprat							
FA (%)	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Myristic acid	2.3	2.3	2.3	6.7	4.3	2.5	2.4	2.4	3.4	3.4	3.3	3.4	7.0	5.8	6.7	4.6	4.3	6.4	4.2	4.2
Palmitic acid	9.1	9.1	9.2	12.9	11.9	9.4	9.4	10.4	12.6	11.8	11.8	15.8	13.3	11.8	12.9	13.5	14.5	17.6	13.8	13.8
Palmitoleic acid / Hexadecanoic acid	2.9	2.9	2.8	3.9	4.9	3.0	2.9	2.8	4.7	4.6	4.6	5.5	4.1	3.2	3.9	8.4	8.7	4.9	8.4	8.4
Stearic acid	2.6	2.6	2.6	2.3	2.5	2.6	2.6	2.9	2.4	2.4	2.4	2.1	2.2	2.1	2.3	2.4	2.6	2.2	2.2	2.5
n-7/9 Oleic acid	42.9	42.9	43.3	14.8	31.3	41.5	42.9	42.9	30.9	31.7	31.7	20.8	13.5	12.0	13.6	20.9	20.9	20.4	20.0	20.0
n-6 Linoleic acid	13.7	13.5	13.5	2.0	9.0	13.0	13.4	12.4	6.2	6.8	6.8	1.5	1.7	2.3	2.1	1.6	1.6	3.2	1.5	1.5
n-3 alpha-linolenic acid	5.3	5.1	5.5	1.9	3.5	5.0	5.1	4.0	3.4	2.7	2.7	0.7	1.4	1.7	1.9	0.8	0.8	3.3	0.8	0.8
n-3 Octadecatetraenic acid	0.7	0.7	0.7	4.2	1.4	0.8	0.7	0.6	8.8	1.0	1.3	1.3	4.1	4.1	4.2	2.1	1.9	3.8	1.8	1.8
Eicosenoic acid	4.4	4.6	4.2	10.0	4.8	4.8	4.3	4.9	11.5	11.0	12.1	12.1	8.4	9.8	10.1	7.9	9.8	3.5	9.4	9.4
n-6 Arachidonic acid	0.3	0.3	0.3	0.4	0.4	0.3	0.3	0.8	0.3	0.3	0.3	-	0.4	1.1	0.4	0.5	0.6	0.5	0.6	0.6
n-3 EPA	2.8	2.8	2.8	7.3	5.6	2.9	2.7	2.7	4.8	4.8	4.8	7.4	7.0	6.8	7.3	8.5	8.5	8.1	8.1	8.1
Cetoleic / Erucic acid	3.8	3.9	3.5	16.8	-	4.4	3.8	3.2	9.6	9.2	9.2	10.6	3.2	1.0	16.8	2.7	5.5	-	5.2	5.2
n-3 DPA	1.3	1.3	1.3	1.3	2.0	1.3	1.3	1.3	1.3	1.4	1.4	1.8	1.0	1.3	1.3	0.9	1.2	0.9	1.2	1.2
n-3 DHA	3.9	3.9	3.8	10.9	6.1	4.4	4.1	4.2	4.0	5.0	5.0	5.6	9.2	11.2	10.9	11.3	12.4	10.3	11.9	11.9
EPA+DHA	6.7	6.7	6.6	18.2	11.7	7.3	6.8	6.8	8.7	9.8	9.8	13.0	16.2	17.9	18.2	19.8	20.9	18.4	20.0	20.0
∑n-6	13.9	13.8	13.8	2.5	9.4	13.3	13.7	13.2	6.5	7.1	7.1	1.5	2.0	3.4	2.5	2.1	2.2	3.7	2.1	2.1
∑n-3	14.0	13.9	14.1	25.6	18.6	14.5	13.8	12.8	22.2	14.9	16.7	16.7	22.6	25.1	25.6	23.7	24.8	26.4	23.8	23.8
n3:n6 ratio	1.0	1.0	1.0	10.4	2.0	1.1	1.0	1.0	3.4	2.1	10.9	11.2	7.3	10.4	11.6	11.6	11.3	7.1	11.2	11.2
∑saturated fatty acid	14.0	14.0	14.1	21.9	18.8	15.5	15.4	15.7	18.4	17.5	21.4	21.4	22.5	19.6	21.9	20.5	21.4	26.2	20.5	20.5
∑monounsaturated fatty acid	54.0	54.3	53.9	45.5	41.1	54.1	54.3	53.8	56.7	56.5	49.0	29.2	26.0	44.5	39.9	44.9	28.9	43.0	43.0	43.0
∑polyunsaturated fatty acid	27.9	27.7	27.9	28.0	28.0	29.7	29.9	26.0	28.7	22.0	18.3	24.7	28.5	28.0	25.7	27.0	30.1	25.9	25.9	25.9

8.2 Supplementary Data – Publikation III

Mitigation strategies for ester bound 2-/3-MCPD and esterified glycidol in pre-fried breaded and frozen fish products. *Food Chemistry*, 2018, 245, 196-204.

Sybillie Merkle (SM), Ute Ostermeyer (UO), Sascha Rohn (SR), Horst Karl (HK), Jan Fritsche (JF)



Appendix A. Correlation between MCPD-E contents in fish fingers with regard to their fat content and MCPD-E in the pre-frying oil in test series (TS) 1.3+1.4 (185 °C, 1.5% NaCl concentration in the wet breading) depending on the heating period of the pre-frying oil of 1 h, 4 h and 7 h. r = correlation coefficient.

8.3 Klassifizierung der verwendeten Chemikalien nach der VO (EG) 1272/2008

Chemischer Name (IUPAC)	CAS-Nummer	H-Sätze	Piktogramme, Signalworte	P-Sätze
2-Chloropropan-1,3-diol-d ₅	342611-01-2	H290 H300 H312 H330 H315 H318 H319 H360 H372	GHS05 GHS06 GHS08 Gefahr	P201, P260, P280, P302+ P352, P304+ P340, P305 + P351+P338, P308+P310
3-Chloropropan-1,2-diol-d ₅	342611-01-2	H290 H300 H312 H330 H315 H318 H319 H360 H372	GHS05 GHS06 GHS08 Gefahr	P201, P260, P280, P302+ P352, P304+ P340, P305+ P351+P338, P308+P310
Rac 1,2-Bis-palmitoyl-3-chloropropandiol-d ₅	1185057-55-9	H315 H317 H319	GHS07 Achtung	P280, P305 + P351 + P338
Rac 1,2-Dioleoyl-3-chloropropandiol-d ₅	1246833-00-0	H315 H317 H319	GHS07 Achtung	P280, P305 + P351 + P338
Rac 1,3-Bis-palmitoyl-2-chloropropandiol-d ₅	1185057-55-9	H315 H317 H319	GHS07 Achtung	P280, P305 + P351 + P338
1,3-Distearoyl-2-chloropropandiol-d ₅	1329796-49-7	H315 H317 H319	GHS07 Achtung	P280, P305 + P351 + P338
Aceton, 99,5% (Propan-2-on) ¹	67-64-1	H225 H319 H336	GHS02 GHS07 Gefahr	P210, P240, P305+P351+ P338, P403+ P233
Ammoniumsulfat, 99%	7783-20-2	Kein Gefahrstoff nach VO (EG) 1272/2008		
Chloroform (Trichloromethan) ¹	67-66-3	H351 H302 H373** H373** H315	GHS07 GHS08 Gefahr	P261, P281, P305+P351+ P338, P311
Diethylether, 99,5% (Ethoxyethan) ¹	60-29-7	H224 H302 H336	GHS02 GHS07 Gefahr	P210, P240, P403+P235
Cyclohexan ¹	110-82-7	H225 H304 H315 H336 H400 H410	GHS02 GHS08 GHS07 GHS09 Gefahr	P210, P240, P273, P301+ P330+P331, P302+P352, P403+P233
Essigsäure, 99,9% (Ethansäure) ¹	64-19-7	H226 H314	GHS02 GHS05 Gefahr	P210, P280, P301+P330+ P331, P305+ P351+P338, P308+P310

Anhang

Ethylacetat, 99,9% (Ethylethanoat) ¹	141-78-6	H225 H319 H336	GHS02 GHS07 Gefahr	P210, P233, P240, P305+ P351+P338, P403+P235
Glycidyl stearat-d ₅	1346598-19-3	H315 H317 H319	GHS07 Achtung	P280, P305 + P351 + P338
1,2-Dioleoyl-rac-glycerol-1,1,2,3,3-d ₅	2442-61-7	H315 H317 H319	GHS07 Achtung	P280, P305 + P351 + P338
n-Heptan ¹	142-82-5	H225 H304 H315 H336 H400 H410	GHS02 GHS08 GHS07 GHS09 Gefahr	P210, P240, P273, P301+ P330+P331, P302+P352, P403+P233
n-Hexan ¹	110-54-3	H225 H361F*** H304 H373** H315 H336 H411	GHS02 GHS08 GHS07 GHS09 Gefahr	P210, P240, P273, P301+ P310, P331, P302+P352, P403+P235
Isooctan, 99,5% (2,2,4-Trimethylpentan) ¹	26635-64-3	H225 H304 H315 H336 H400 H410	GHS02 GHS08 GHS07 GHS09 Gefahr	-
Isopropanol (Propan-2-ol) ¹	67-63-0	H225 H319 H336	GHS02 GHS07 Gefahr	P210, P233, P240, P305+ P351+P338, P403+P235
L-Cystein, 99%	52-90-4	Kein Gefahrstoff nach VO (EG) 1272/2008		
Methanol, 99,9% ¹	67-56-1	H225 H331 H311 H301 H370**	GHS02 GHS06 GHS08 Gefahr	P210, P233, P280, P302+ P352, P304+ P340, P308+ P310, P403+ P235
Natriumbromid, 99%	7647-15-6	Kein Gefahrstoff nach VO (EG) 1272/2008		
Natriumchlorid	7647-14-5	Kein Gefahrstoff nach VO (EG) 1272/2008		
Natriumhydrogensulfat	10034-88-5	H318	GHS05 Gefahr	P280, P305+P351+ P338
Natriumsulfat	7757-82-6	Kein Gefahrstoff nach VO (EG) 1272/2008		
Natriumhydroxid ¹	1310-73-2	H314	GHS05 Gefahr	P280, P301+P330+ P331, P305+ P351+ P338, P308+ P310
Ortho-Phosphorsäure, 85% ¹	7664-38-2	H314	GHS05 Gefahr	P280, P301+ P330+ P331, P305+P351+ P338, P309+ P310
Phenylboronsäure	98-80-6	H302	GHS07 Achtung	-
Stickstoff	7727-37-9	H280	GSH04 Achtung	P403

Anhang

tert-Butylmethylether (2-methoxy-2-methylpropane) ¹	1634-04-4	H225 H315	GHS02 GHS07 Gefahr	P210, P233, P240, P302+ P352, P403+ P235
Tetramethylsilan	75-76-3	H224	GHS02 Gefahr	P210
Toluol, 99,5% (Methylbenzen) ¹	108-88-3	H225 H361d*** H304 H373** H315 H336	GHS02 GHS08 GHS07 Gefahr	P210, P240, P301+P310+ P330, P302+ P352, P314, P403+P233
Zeolith	1318-02-1	Kein Gefahrstoff nach VO (EG) 1272/2008		

¹Harmonisierte Einstufung nach Anhang VI der VO (EG) 1272/2008

Danksagung

In den letzten Jahren, während meiner Promotion, standen viele Menschen an meiner Seite und stärkten mich, ob fachlich oder persönlich, bei dieser Herausforderung. Insbesondere möchte ich mich bei den nachfolgenden Personen von ganzem Herzen bedanken.

In erster Linie gilt mein herzlicher Dank **Herrn Prof. Dr. Jan Fritsche** (Max Rubner-Institut für Sicherheit und Qualität bei Milch und Fisch Hamburg/Kiel), dem ich die Erarbeitung und Überlassung des spannenden und hochaktuellen Themas dieser Promotion zu verdanken habe. Ich danke Ihm für die hervorragende Betreuung, inklusive der vielen wertvollen und wegweisenden Impulse und Motivationen, Diskussionen und Ratschläge sowie für das stetige mir entgegengebrachte Vertrauen.

Herrn Prof. Dr. Sascha Rohn (Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hamburg) danke ich ebenso für die verlässliche Betreuung, die konstruktiven Ratschläge sowie für die Möglichkeit, meine Dissertation am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hamburg im Fachbereich Chemie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften, erstellen zu dürfen.

Ebenfalls möchte ich mich für die fachliche und persönliche Unterstützung bei **Frau Prof. Dr. Riehn** (Fakultät Life Sciences, Hochschule für Angewandte Wissenschaften, Hamburg) herzlich bedanken.

Bei **Prof. Dr. Bernward Bisping** möchte ich mich außerordentlich für die bereitwillige Übernahme des Gutachtens bedanken.

Allen Projekt- und Kooperationspartnern danke ich für das erfolgreiche Mitwirken an diesem Forschungsvorhaben:

Ein besonderer Dank gilt dem gesamten **Max Rubner-Institut für Sicherheit und Qualität bei Milch und Fisch Hamburg/Kiel** für die große Hilfsbereitschaft und die herzliche Atmosphäre. Besonders möchte ich mich bei **Herrn Dr. Horst Karl** und **Frau Dr. Ute Ostermeyer** bedanken, die mich beide in den vergangenen Jahren sowohl fachlich als auch persönlich gestärkt, motiviert und jederzeit unterstützt haben und mir – ob Leid ob Freud – tatkräftig zur Seite gestanden haben. Den **technischen Angestellten I. Bagge, I. Delgado Blas, K.U. Scholibo und I. Lehmann** danke ich insbesondere für die fachspezifische Unterstützung der Analysenarbeit.

Ebenso gilt mein Dank dem **Max Rubner-Institut für Sicherheit und Qualität bei Getreide in Detmold** für die Nutzung des Technikums und insbesondere **Herrn Dr. Matthäus** und **Herrn Dr. Haase** für die große Hilfsbereitschaft.

Allen Mitarbeitern des Arbeitsbereiches Chemie und des ernährungswissenschaftlichen und Lebensmitteltechnologischen Labors der **Hochschule für Angewandte Wissenschaften in Hamburg**, die mit Rat und Tat zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, danke ich für ihre stete Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima. Allen voran gilt mein Dank den **studentischen Hilfskräften**, die mich im Labor tatkräftig unterstützt haben.

Bei der **SGS Germany GmbH** in Hamburg bedanke ich mich herzlichst für die reibungslose Kooperation im Rahmen des Projektes. Insbesondere bedanke ich mich hier bei **Herrn Dr. Jan Kuhlmann** für die persönliche Unterstützung und Bereitstellung des technischen

Danksagung

Equipments zur MCPD-E- und G-E-Analytik und der Ressourcen, sowie rege Diskussionen und das Experten-Know-how bezüglich der MCPD, MCPD-E- und G-E-Analytik.

Herrn Dr. Wohltmann (Lipromar GmbH) danke ich ebenfalls für die große Unterstützung und Hilfsbereitschaft sowie die Zurverfügungstellung der Daten zur Analyse der PCDD/F- und PCB-Gehalte in Fischölen.

Für die Unterstützung des Projektes bedanke ich mich beim **Bundesverband der deutschen Fischindustrie und des Fischgroßhandels e.V.** sowie den Mitgliedern des Verbands der ölsaatenverarbeitenden Industrie in Deutschland e.V. (**OVID**) und allen **Mitgliedern des Projektbegleitenden Ausschusses** des FEI-Projekts (AiF 18577 N).

Insbesondere danke ich für die Bereitstellung des Technikums und weiterer Ressourcen der **Anker GmbH Fisch- und Feinkost, Cargill GmbH, Friesenkrone Feinkost Heinrich Schwarz & Sohn GmbH & Co. KG, FRoSTA Tiefkühlkost GmbH, Hawesta Feinkost Hans Westphal GmbH & Co. KG** und der **iglo GmbH Tiefkühlkost**.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine beiden Mitstreiterinnen **Khanitta Ratprakhon** und **Editha Giese**, die jegliche meiner Hoch- und Tiefzeiten mit großem Mitgefühl geteilt haben.

Meiner **Familie** und meinen **Freunden** danke ich für die seelische Unterstützung, die warmen Worte und ihren Glauben an mich.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.

Hamburg, 08. September 2018

Sybille Barbara Merkle

Curriculum Vitae

PERSÖNLICHES

Name **SYBILLE MERKLE**
Geburtsdatum / -ort: 15. Januar 1988 / Ulm
Staatsangehörigkeit: Deutsch



WISSENSCHAFTLICHER WERDEGANG

- Sept. 2014 – dato **Universität Hamburg / Fachbereich Chemie**
Promotion am Institut für Lebensmittelchemie,
Arbeitskreis Prof. Dr. Sascha Rohn
Angestrebter Abschluss: Dr. rer. nat.
- Sept. 2011 – März 2014 **Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg /
Studiengang Food Science**
Abschluss: Master of Science (M. Sc.)
Master-Thesis am Max Rubner-Institut, Hamburg:
*„Entwicklung einer Analysenmethode zur Bestimmung von
3-MCPD-Ester und Glycidylester in Fisch und Fischerzeugnissen“*
- Sept. 2007 – Aug. 2011 **Hochschule Albstadt – Sigmaringen /
Studiengang Lebensmittel, Ernährung und Hygiene**
Abschluss: Bachelor of Science (B. Sc.)
Bachelor-Thesis bei der Cateringfirma Vinzenz Service GmbH,
Sigmaringen: *„Entwicklung eines nährwertoptimierten Speiseplans
auf Grundlage der Qualitätsstandards der DGE“*
- Sept. 2004 – Juni 2007 **Valckenburgschule Ulm, Berufliches Gymnasium /
Vertiefungsfach Ernährungslehre mit Chemie**
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

BERUFLICHER WERDEGANG

- Feb. 2018 – dato **Greenland Seafood Wilhelmshaven GmbH**
Quality Coordinator Complaints & Spezifikationen
mit Schwerpunkt 3-MCPD
- Nov 2013 – Nov. 2017 **Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg /
Fakultät Life Science / Department Ökotrophologie**
Wissenschaftliche Mitarbeiterin
Drittmittelprojekt in Kooperation mit dem Max Rubner-Institut,
Hamburg: *„Minimierung von 2- und 3-MCPD, Glycidol sowie
deren Fettsäureester in geräucherten und thermisch behandelten
Fischerzeugnissen“*
Drittmittelprojekt in Kooperation mit dem Technologie-Transfer-
Zentrum Bremerhaven: *„Charakterisierung und Optimierung
transfettsäurearmer pflanzlicher Siedefette anhand
technofunktionell-sensorischer Parameter“*