

Erweiterung der Routine-Analytik zur Bestimmung von aromatischen Mineralölkohlenwasserstoffen (MOAH) mittels online gekoppelter HPLC-GC-FID um die selektive Sub-Fraktionierung zur Bestimmung von MOAH mit 1-2 und ≥ 3 aromatischen Ringen

M. Eckardt^a, M. Lommatzsch^a, S. Säger^a, J. Holzapfel^b, T.J. Simat^b

^a Labor Lommatzsch & Säger GmbH; Gottfried-Hagen Str. 60-62; D-51105 Köln – www.mosh-moah.de –

^b Technische Universität Dresden; Bergstraße 66; D-01062 Dresden

Hintergrund

Das analytische Routineverfahren zur Bestimmung von Mineralölkohlenwasserstoffen als Kontamination in Lebensmitteln und Lebensmittelkontaktmaterialien mittels online gekoppelter HPLC-GC-FID ermöglicht die Unterscheidung gesättigter (*mineral oil saturated hydrocarbons*, MOSH) und aromatischer Kohlenwasserstoffe (*mineral oil aromatic hydrocarbons*, MOAH) durch integrierte Fraktionierung über eine Normalphasen-Kieselgel-Trennung. Aus toxikologischer Sicht werden beide Fraktionen derzeit unterschiedlich bewertet: Während die Exposition gegenüber MOSH als weitgehend unkritisch eingestuft wird, kann eine Gesundheitsgefährdung durch MOAH derzeit nicht ausgeschlossen werden [1]. Dabei stehen insbesondere MOAH mit 3 oder mehr konjugierten aromatischen Ringen (≥ 3 Ring MOAH) aufgrund ihrer strukturellen Analogie zu polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) im Verdacht der Genotoxizität und Kanzerogenität. Eine analytische Unterscheidung und Quantifizierung von MOAH hinsichtlich der Anzahl aromatischer Ringe ist derzeit nur mittels zeit- und kostenintensiver zweidimensionaler Gaschromatographie (GCxGC-MS/FID) möglich [2].

In der vorgestellten Studie wird eine routinetaugliche Erweiterung des etablierten MOSH/MOAH-Verfahrens mittels online gekoppelter HPLC-GC-FID um die automatisierte, selektive Sub-Fraktionierung von MOAH in 1-2 Ring (**Mono- & Di-Aromaten Fraktion, MDAF**) und ≥ 3 Ring MOAH (**Tri- und Poly-Aromaten Fraktion, TPAF**) durch die Integration einer zweiten, selektiveren stationären HPLC-Normalphase vorgestellt. Das entwickelte System wurde erfolgreich an petrochemischen Mineralölprodukten sowie (kontaminierten) Lebensmitteln (Reis, Säuglingsnahrung) erprobt und die Resultate qualitativ und quantitativ mit der GCxGC-MS/FID-Referenzmethode verglichen [3].

Einbindung der selektiven Aromaten-Trennung in das HPLC-GC-FID-System

Im Rahmen der Studie wurden verschiedene stationäre LC-Phasen auf ihre Eignung zur MOAH-Trennung gemäß der Anzahl aromatischer Ringe getestet (u.a. Nucleosil Chiral-2, ChromSpher Pi, Chromegabond DNAP, RingSep). Die π -Donor-Akzeptor-Säulen Chiral-2 und RingSep zeigten die besten Ergebnisse hinsichtlich der Trennung zwischen 1-2 und mehrkernigen alkylierten Aromaten. Aufgrund ihrer Verfügbarkeit in der gewünschten Dimension wurde die RingSep-Säule basierend auf 2,4-dinitro-1-propylbenzol-modifiziertem Kieselgel für die Implementierung in das bestehende LC-GC-Setup gewählt (Fig. 1).

Zur automatisierten Implementierung werden 2 zusätzliche Schaltventile benötigt [3]. Nach der klassischen Kieselgel-Elution von MOSH wird die RingSep-Säule zugeschaltet, der Dichlormethan-Anteil im Eluenten in zwei Schritten erhöht (Gradient 1 & 2) und MOAH durch die selektive RingSep-Phase in MDAF und TPAF sub-fraktioniert.

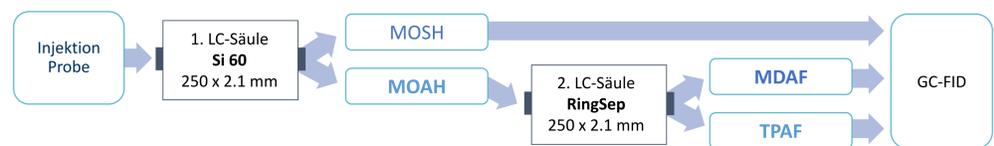


Fig. 1: Schema der Einbindung der zusätzlichen LC-Trennsäule (RingSep) in ein bestehendes Routine-Setup zur Bestimmung von MOSH & MOAH mittels HPLC-GC-FID.

Interne Standards

Interne Standards (IS) dienen zur Absicherung der Fraktionierfenster und Funktionskontrolle der Analytik sowie zur Quantifizierung der MOAH. Neben den **klassischen IS** der MOSH/MOAH-Bestimmung wurden sechs **neue IS** für die MDAF/TPAF-Erweiterung eingeführt (Fig. 2).

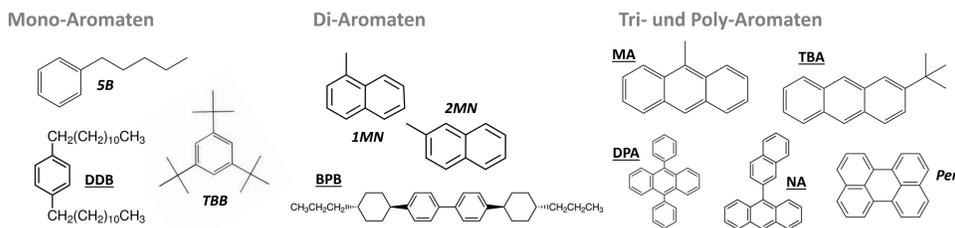


Fig. 2: IS zur Verifizierung und Quantifizierung: n-Pentylbenzen (5B), Didodecylbenzen (DDB), Tri-tert-butylbenzen (TBB), 1-Methylnaphthalen (1MN), 2-Methylnaphthalen (2MN), 4,4'-Bis(trans-4-propylcyclohexyl) biphenyl (BPB), 9-Methylantracen (MA), 2-(Tert-butyl)-anthracen (TBA), 9,10-Diphenylantracen (DPA), 9-(2-naphthyl)-anthracen (NA) und Perylen (Per).

Überprüfung der Fraktionierfenster

Die UV-aktiven MOAH-Standards ermöglichen die routinemäßige Verifizierung der korrekten Fraktionierfenster in der HPLC-Trennung von MDAF und TPAF (Fig. 3).

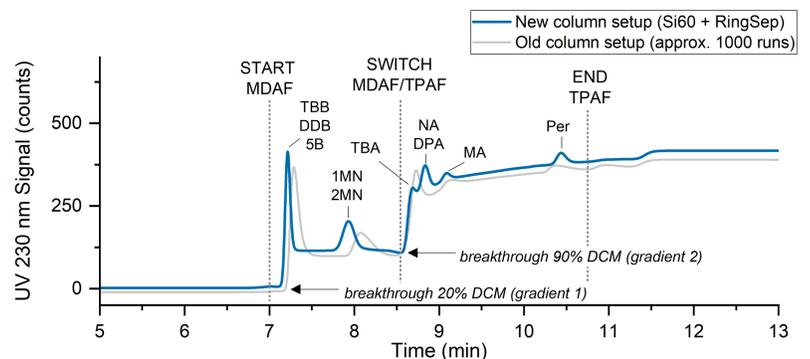


Fig. 3: UV-Chromatogramm der IS zur Überwachung der Fraktionierfenster mit frischem Säulen-Setup (blau) und demselben Setup nach etwa 1000 Probenläufen (grau).

Anwendung MDAF/TPAF

Die erweiterte MOAH-Fraktionierung in MDAF und TPAF wurde an Mineralölen und kontaminierten Lebensmitteln erprobt (Fig. 4) und quantitative Ergebnisse mit publizierten GCxGC-Messergebnissen derselben Proben des Kantonalen Labors Zürich verglichen (Tab. 1). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass falsch-positive Zuweisungen (Überschätzung ≥ 3 Ring MOAH mittels GCxGC-FID-Analytik) durch teilhydrierte MOAH und schwefelhaltige Aromaten mittels erweiterter Ringkern-Trennung via MDAF/TPAF vermieden werden können.

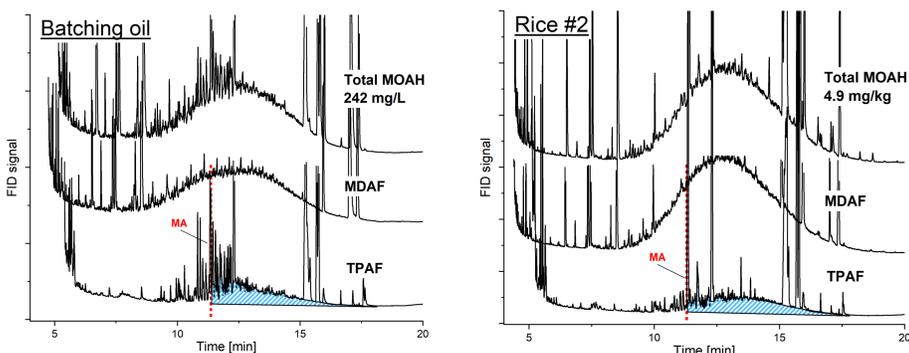


Fig. 4: LC-GC-FID-Chromatogramme eines Batching-Öls (links) und einer kontaminierten Reisprobe (rechts). Die blau-schraffierten Flächen entsprechen dem TPAF-Anteil, der die ≥ 3 Ring MOAH repräsentiert.

Tab. 1: Ergebnisse der MOAH-Analyse kontaminierter Reisproben. Linke Spalten: Publierte Referenzwerte ermittelt via GCxGC-Methode [2]. Rechte Spalten: Ergebnisse ermittelt via LC-GC-FID mit MDAF/TPAF-Erweiterung.

Rice Sample No.	Reference GCxGC-FID results by Biedermann et al. [2]				Present work results LC-GC-FID with RingSep			
	Total MOAH [mg/kg]	Total MOAH 1- 2.5 ring [mg/kg]	Total MOAH ≥ 3 ring [mg/kg]	Proportion ≥ 3 ring to total MOAH [%]	Total MOAH [mg/kg]	MDAF + TPAF (R _t < MA) [mg/kg]	TPAF (R _t \geq MA) [mg/kg]	Proportion TPAF (R _t \geq MA) to total MOAH [%]
2	5.5	4.2	1.30	24	4.9	4.3	0.58	12
3	1.0	0.87	0.10	10	0.58	0.52	0.06	10
7	3.8	3.7	0.09	2	3.6	3.5	0.09	2
9	4.2	4.0	0.22	5	3.8	3.7	0.20	5
10	3.4	3.1	0.25	7	2.7	2.4	0.19	7

Verifizierung mittels GCxGC-MS

Die Richtigkeit der entwickelten MOAH-Subfraktionierung konnte mittels GCxGC-Referenzanalytik gezeigt werden (Fig. 5 & 6 – die durchgezogene rote Linie kennzeichnet die Grenze zwischen 2- und 3-Ring-Aromaten). Das Elutionsverhalten kritischer Substanzklassen (teilhydrierte MOAH, „2,5-Ring-MOAH“ wie Fluorene, S-Heteroaromaten) wird in Fig. 6 demonstriert.

Falsch-Elution innerhalb der TPAF wurde für Naphthalene, Fluorene/Acenaphthylene sowie Dibenzothiophene mit jeweils bis zu vier Methylgruppen ermittelt. Um dies zu berücksichtigen, wurde der IS **MA als LC-GC-FID-Integrationsgrenze** für TPAF etabliert (Fig. 4).

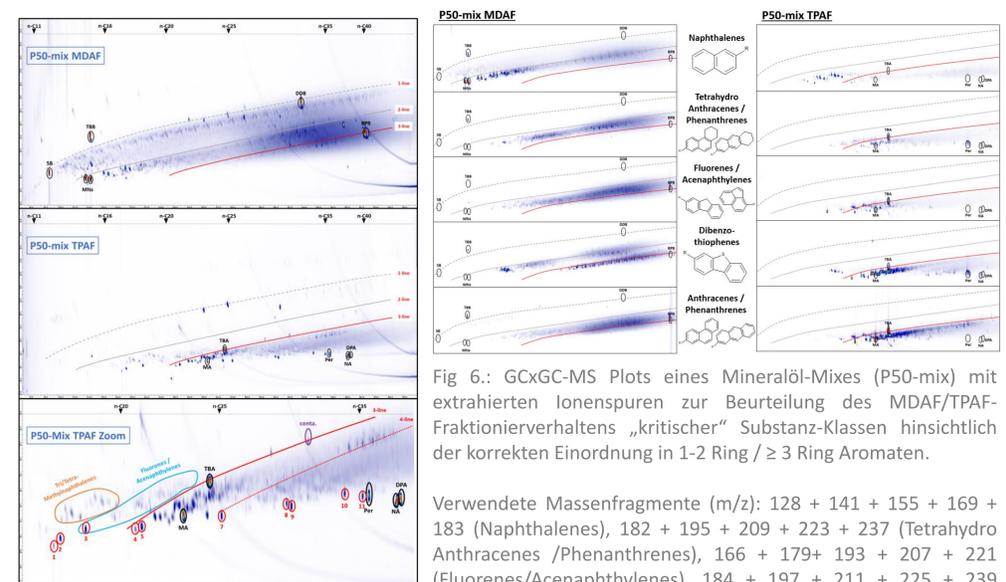


Fig. 5: GCxGC-MS Plots eines Mineralöl-Mixes (P50-mix) nach MDAF/TPAF-Fraktionierung.

Fig. 6: GCxGC-MS Plots eines Mineralöl-Mixes (P50-mix) mit extrahierten Ionenspektren zur Beurteilung des MDAF/TPAF-Fraktionierungsverhaltens „kritischer“ Substanz-Klassen hinsichtlich der korrekten Einordnung in 1-2 Ring / ≥ 3 Ring Aromaten.

Verwendete Massenfragmente (m/z): 128 + 141 + 155 + 169 + 183 (Naphthalenes), 182 + 195 + 209 + 223 + 237 (Tetrahydro Anthracenes /Phenanthrenes), 166 + 179+ 193 + 207 + 221 (Fluorenes/Acenaphthylenes), 184 + 197 + 211 + 225 + 239 (Dibenzothiophenes) und 178 + 191 + 205 + 219 + 233 (Anthracenes /Phenanthrenes).



[1] EFSA, «Scientific Opinion on Mineral oil Hydrocarbons in Food», EFSA Journal 10 2012, 2704.
 [2] M. Biedermann et al., «Quantification of mineral oil aromatic hydrocarbons by number of aromatic rings via comprehensive two-dimensional gas chromatography: First results in food» Journal of Chromatography Open 2022, 2:100072.
 [3] M. Lommatzsch et al., «Advanced separation of mineral oil aromatic hydrocarbons (MOAH) by number of aromatic rings (< 3 / ≥ 3 ring) for an automatable implementation in routine on-line coupled liquid chromatography-gas chromatography-flame ionisation detection (LC-GC-FID).», submitted for publication.