



Gemeinnützige
Lebensmittelinitiative
für Österreich

MOSH MOAH

Reduktion von Mineralöl in Lebensmitteln
2019-2023

DISSEMINATIONSPAPIER

gefördertes Projekt der



in Zusammenarbeit mit



Staudinger
& Partner



1. Kurzfassung

Das Vorhandensein von Mineralölverunreinigungen (MO) in Lebensmitteln ist seit den Arbeiten von Koni Grob aus den frühen 90-iger Jahren bekannt [1]. Dennoch ist die Thematik erst viel später in den Mittelpunkt der breiten Bevölkerung gedrungen und führte in den letzten Jahren immer wieder zu großen Diskussionen und Skandalen: 2008 erlangte das Thema durch die Kontamination von ukrainischem Sonnenblumenöl erstmals großes mediales Interesse [2, 3]. Seitdem vergeht kein Jahr ohne entsprechende Meldungen - ob Nudeln, Reis, Schokolade, Butter, Speiseöle oder sogar Babymilchpulver - kein Lebensmittel bleibt verschont [4, 5]. Wie gefährlich sind sie aber wirklich und was kann man dagegen tun? Mit dieser Frage beschäftigte sich das von der GLi initiierte und von der FFG unterstützte, kooperative Forschungsprojekt „MOSH MOAH – Reduktion von Mineralöl in Lebensmitteln“ in den letzten 4 Jahren und legte dabei seine Schwerpunkte auf Quellen, Ursachen und Sicherheit bei der Produktion am Standort „Österreich“, aber auch auf internationale Zusammenarbeit mit Expertengremien bei der Entwicklung der Analytik und der Risikobewertung. Vieles hat sich auf dem Gebiet getan:

1.1. Highlights und Neuerungen aus den letzten Jahren

- **Entwurf der EFSA Neubewertung von MOSH und MOAH 2023 [6]**

Seit der EFSA Evaluierung im Jahr 2012 wurden MOSH und MOAH als kritisch für die menschliche Gesundheit eingestuft [7]. Während die MOAH Fraktion nachweislich genotoxisch sein kann und deshalb nicht in Lebensmitteln vorkommen soll, wurde über die Effekte der MOSH und die Interpretation der vorhandenen Daten lange diskutiert. Der Entwurf zur Neubewertung bringt schließlich folgendes Ergebnis: MOSH wird nicht länger als kritisch für die menschliche Gesundheit eingestuft. Für MOAH bleibt die Einstufung aufrecht, es sind jedoch weitere Daten zu den Effekten von MOAH Substanzen mit unterschiedlicher Anzahl von Ringen nötig, um hier eine bessere Risikoevaluierung zu ermöglichen.

- **JRC Guideline:**

Diese Guideline zur Analyse von Mineralölkohlenwasserstoffen in Lebensmitteln wurde erstmals 2019 publiziert und wurde 2023 aktualisiert [8, 9]. Sie gibt klare Anforderungen an die zu erreichenden Performanceparameter (z.B. Bestimmungsgrenzen, Laborpräzision, Wiederfindung, ...) und die einheitliche Berichterstattung (z.B. Analyse von C₁₀-C₅₀ in Lebensmitteln) und Empfehlungen, wie das Vorgehen bei einer gut durchgeführten Analytik aussehen soll (d.h. welche Probenvorbereitungsmodule wann nötig sind). Sie ist zwar keine standardisierte

Methode oder Arbeitsanweisung, dennoch ist das Arbeiten nach JRC Guideline Voraussetzung, um verlässliche Ergebnisse nach aktuellem Wissensstand zu liefern. Die in der JRC Richtlinie angegebenen Bestimmungsgrenzen wurden im April 2022 in einer Stellungnahme des Ausschusses für Pflanzen, Tiere, Lebens- und Futtermittel (PAFF Komitee) der Europäischen Kommission als „**inoffizielle Limits**“ für MOAH festgelegt. Denn: wenn der MOAH Gehalt eines Lebensmittels diese Quantifizierungsgrenzen überschreitet, soll es vom Markt genommen werden. Entsprechend der neuen Risikobewertung durch die EFSA gibt es keine MOSH Limits und es ist auch nicht geplant, solche einzuführen. [10]

- **Update der EN16995:2022:**

Für lange Zeit war die EN16995:2017 für die Bestimmung von MOSH/MOAH in Speisefetten-, und Ölen die einzige genormte Methode. [11] Schon immer stand sie aber unter Kritik, weil der geeignete Anwendungsbereich bei >10mg/kg MOSH bzw. MOAH lag und somit weit weniger sensitiv als nötig war (gefordert Bestimmungsgrenzen im Bereich von 0.5 – 2 mg/kg). Die Methode wurde daher überarbeitet und in einem internationalen Ringversuch validiert. Sie erwies sich als geeignet für MOAH Gehalte ab 2 mg/kg und für MOSH Gehalte ab 3 mg/kg. [12] Frühere Versuche im kleinere (nationalen) Rahmen zeigten, dass mit der Methode für gut arbeitende Labore auch Bestimmungsgrenzen von 1 mg/kg erzielt werden können. [13]

- **JRC-Methode für MOAH in Babymilchnahrung 2022:**

Auch für Babymilchnahrung gibt es eine standardisierte Arbeitsvorschrift, die im Rahmen eines internationalen Ringversuches validiert wurde. Die Methode erwies sich als geeignet für MOAH Gehalte ab 1 mg/kg. MOSH kann prinzipiell ebenfalls mit der Methode bestimmt werden, da sie aber als nicht relevant für die menschliche Gesundheit eingestuft wurde, wurden in der Methodvalidierung die entsprechenden Parameter nur für MOAH erfasst. [14]

- **Automatisierung**

MOSH/MOAH Analytik ist sehr arbeits-, zeit-, und ressourcenintensiv. Um hier entsprechend entgegenwirken zu können, gibt es diverse Automatisierungsmöglichkeiten, wie z.B. das automatisierte Aluminiumoxid Clean-Up, Epoxidierung oder (Teil)-automatisierte Auswertung. [15–18] Voraussetzung für eine erfolgreiche Anwendung und Umsetzung ist immer gut trainiertes Personal bzw. Analytiker. Dann haben sich die Automatisierungen auch im Rahmen der Ringversuche zur Methodvalidierung als geeignet erwiesen und liefern vergleichbare Ergebnisse; sie könne also routinemäßig eingesetzt werden.

- **Weitere chromatographische Methoden**

Der Blick „unter“ den Mineralölkump wird immer wichtiger. Dabei stößt allerdings die LC-GC-FID Kopplung an ihre Grenzen. Weiterführende chromatographische Methoden, wie z.B. zweidimensionale Chromatographie, sind notwendig, um positive oder unklare Befunde abzuklären, zur Identifizierung von möglichen Kontaminationsquellen oder auch zur Beurteilung des toxikologischen Risikopotentials. [6, 19–21]

- **Risikobewertung der MOAH**

Während MOSH nicht mehr als kritisch für die menschliche Gesundheit gilt, bleibt die Einstufung der MOAH aufrecht. Sie gilt nach wie vor als potenziell mutagen bzw. kanzerogen, obwohl nur bestimmte Substanzen bzw. Substanzklassen, die im komplexen Gemisch vorhanden sind, dafür verantwortlich sein dürften. [6, 7] Im Projekt wurde eine Strategie entwickelt, um diese Unterschiede im ersten Schritt bestätigen zu können und sie im zweiten Schritt zukünftig routinemäßig in Lebensmitteln identifizieren zu können. [20]

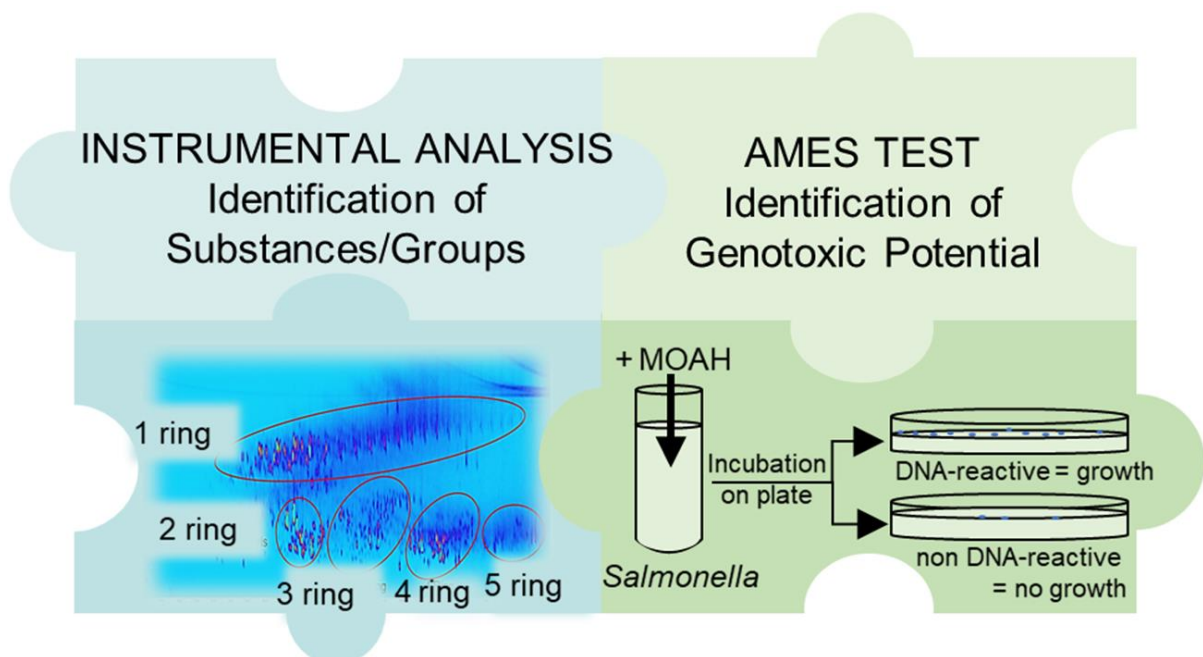


Abbildung 1: Projektstrategie zur genotoxischen Risikobewertung von MOAH [20]

Inhaltsverzeichnis

1. Kurzfassung.....	2
1.1. Highlights und Neuerungen aus den letzten Jahren	2
2. Ausgangslage bei Projektbeginn 2019.....	6
3. Projektziele	9
4. Projektstruktur.....	12
5. Projektergebnisse	13
5.1. Phase 1	13
5.1.1. Verbesserung der Probenvorbereitungsverfahren.....	13
5.1.2. Risikoevaluierung im Produktionsbetrieb	21
5.2. Phase 2.....	22
5.2.1. Analysenmethodenentwicklung und -optimierung zur Beurteilung der Genotoxizität 22	
5.2.2. Entwicklung und Validierung Genotoxizitäts-Tests.....	25
5.3. Phase 3.....	34
5.3.1. Genotoxische Risikobewertung an Realproben.....	34
6. Fazit – aktueller Wissenstand	37

2. Ausgangslage bei Projektbeginn 2019

Mineralölkohlenwasserstoffen (Mineral Oil Hydrocarbons, MOH) sind Mischungen beziehungsweise Fraktionen von tausenden Substanzen aus der Erdöldestillation. Aufgrund ihrer komplexen und vielseitigen Zusammensetzung sind die einzelnen Komponenten bis heute kaum identifiziert und daher die toxikologische Bewertung noch nicht befriedigend abgeschlossen. Eine grobe Trennung gelingt jedoch routinemäßig in gesättigte (Mineral Oil Saturated Hydrocarbons; MOSH) und aromatische (Mineral Oil Aromatic Hydrocarbons, MOAH) Kohlenwasserstoffe, denen wiederum unterschiedliche Effekte auf die menschliche Gesundheit zugewiesen werden. In Rohöl liegt der MOAH Anteil bei 15-30 %. [3, 7, 22] Gefunden werden in Lebensmitteln aber meist keine Rohölrückstände, sondern Teilfraktionen, die aus unterschiedlichen Quellen stammen können. [19] Für lange Zeit galt als Hauptkontaminationsquelle die Migration aus der verwendeten Verpackung, vor allem, wenn sie aus Papier und Karton aus Sekundärfasern besteht. [7] Obwohl die Migration durch den Einsatz von entweder Frischfaserkarton oder durch Verwendung sogenannter funktioneller Barrieren deutlich reduziert werden konnte, sind die Mineralölkonzentration nicht wie erwartet zurückgegangen, schon gar nicht auf „null“. Heute weiß man, dass Mineralölprodukte in unserem täglichen Leben überall vorkommen und daher leicht aus den verschiedensten Quellen entlang der Produktion in ein Lebensmittel eingebracht werden können. Und: man unterscheidet grundsätzlich zwischen unbeabsichtigten Verunreinigungen (der „Kontamination“) und erlaubter Verwendung z.B. als Hilfsstoffe wie E905 - dabei handelt es sich um mikrokristallines Wachs, das zum Beispiel als Wachsummantelung bei Käse oder zur Beschichtung von Butterpapier verwendet wird. [19, 23]

Unabhängig von der Quelle werden MOH aber durch die Nahrung aufgenommen und teilweise vom Körper verstoffwechselt. Im Jahr 2012 gab es bereits ein wissenschaftliches Gutachten der europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (European Food Safety Authority, EFSA) zu den unterschiedlichen Effekten und Wirkungen von Mineralölkontaminationen auf die menschliche Gesundheit: Bei MOSH handelt es sich um aliphatische langkettige oder zyklische Kohlenwasserstoffe. Ihr Vorkommen in Lebensmitteln wurde als kritisch eingestuft, weil sie sich im Körper anreichern können und dies in einem bestimmten Rattenstamm zu einer Granulombildung und in weitere Folge zu entzündlichen Reaktionen geführt hat. MOAH hingegen sind aromatische Verbindungen, die aufgrund der Vorkommnisse von polyaromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) mit 3-7 Ringen als potenziell krebserregend eingestuft wurden. Ein Entwurf zur Neubewertung von MOSH und MOAH durch die EFSA ist seit Anfang 2023 verfügbar. In diesem Entwurf wird MOSH nicht mehr als kritisch eingestuft, da die auftretenden Effekten in den Ratten nicht beim Menschen nachgewiesen werden

konnten. Für MOAH bleibt hingegen die Einstufung potenziell mutagen und kanzerogen zu sein aufrecht; hier ist eine weitere Unterscheidung der präsenten Verbindungen nach Anzahl der Ringe notwendig, da mehrere Studien zeigen, dass die für die Effekte relevanten Substanzen mehr als drei aromatische Ringe haben müssen. [7]

Um die Sicherheit für Konsument*innen zu gewährleisten, bedarf es einer entsprechenden analytischen Absicherung. Dafür gibt es eine anerkannte Analysenmethode, basierend auf der online gekoppelten HPLC-GC-FID (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Gaschromatographie-Flammenionisationsdetektor). [24, 25] Diese wird sowohl von staatlichen als auch privaten Analysenlaboren eingesetzt. Die Vorteile dieser Methode sind die Erhöhung der Empfindlichkeit durch „large volume injection“ und der nahezu gleiche Response der verschiedenen Verbindungsklassen im FID, wodurch eine Quantifizierung von Substanzklassen unterschiedlicher Siedebereiche und Strukturen ermöglicht wird. Das Resultat sind jedoch chromatographisch nicht aufgelöste Mineralölpeaks (sogenannte „unresolved humps“ oder „Mineralölhump“) bestehend aus unbekanntem Verbindungen, aus denen man den Gesamtgehalt bestimmen kann, jedoch keine weitere Information über die genaue Zusammensetzung des Humps erhält. Problematisch ist dabei die Identifizierung von falsch positiven Befunden z.B. durch

- Auftreten von bzw. Interferenzen mit natürlich vorkommenden Kohlenwasserstoffen oder Olefinen aus dem Lebensmittel
- im Lebensmittel rechtlich zugelassenen Stoffe (mikrokristalline Wachse, Paraffinüberzüge etc.)
- Interferenzen mit Verbindungen/Verbindungsklassen aus Kunststoffen (z.B.: POSH (Poly Olefin Saturated Hydrocarbons))
- Verschleppung der MOSH Fraktion in den Elutionsbereich der MOAH Fraktion bei der LC Trennung und Vortäuschen zu hoher MOAH Werte.

Diese ist durch die Verwendung des unspezifische FID's schwierig. Dazu kommt die große analytische Herausforderung beim Umgang mit der Matrix „Lebensmittel“ und dass es lange keine standardisierten Methoden hinsichtlich Probenvorbereitung und Datenauswertung gab. Dadurch kam es immer wieder zu großen Diskrepanzen bei Analyseergebnissen und entsprechenden Diskussionen, was immer wieder zu massiver Verunsicherung sowohl beim Verbraucher als auch beim Produzenten führte. [26–28] Weiters wird die Problematik vergrößert, da die mittels LC-GC-FID Kopplung gewonnene Information über die Kontamination gering ist; bestimmt werden lediglich die Gesamtgehalte, es werden also eine Vielzahl unterschiedlicher Komponenten als entweder MOSH oder MOAH zusammengefasst,

ohne dass routinemäßig einzelne Komponenten identifiziert oder quantifiziert werden. Eine toxikologische Beurteilung rein aus dem Gesamtgehalt ist nicht möglich und die Ergebnisse haben daher geringe Aussagekraft über die tatsächliche gesundheitliche Relevanz. [7, 19]

Dennoch wurden seitens NGOs und Konsument/innenvertretungen Aufforderungen nach gesetzlich bindenden Höchstgehalten laut, um das Risiko möglicher negativer gesundheitlicher Auswirkungen zu minimieren. [29–31] Seitens des Handels werden mitunter auch gänzliche Freiheit von Mineralölkontamination gefordert. Dementsprechend besteht enormer Druck auf österreichische, sowie auch europäische Lebensmittelhersteller allgemein, den Eintrag von Mineralölverunreinigungen in Lebensmitteln möglichst rasch und effektiv zu minimieren. Den Anforderungen kann aber nicht ohne weiteres nachgekommen werden, da die Ursachen und Eintragsquellen abhängig vom Lebensmittel selbst sind, d.h. etwa von den verwendeten Rohprodukten, den Produktions-, und Verarbeitungsschritten und der Verpackung und Lagerung des fertigen Lebensmittels und diese für eine breiten Produkt- bzw. Produktionsbereich noch zu wenig verstanden und aufgeklärt sind. Die Aussagekraft analytischer Ergebnisse hinsichtlich des Gesamtgehaltes von MOSH/MOAH ist in diesem Sinne auch hier unzureichend. Dies zeigt sich, nachdem viele Lebensmittelhersteller bereits auf verbesserte Verpackungslösungen umgestellt haben, um so den Eintrag von MOSH und MOAH zu minimiert. Die Hoffnungen und die Erwartungen, dass durch diese Maßnahmen die Mineralölbelastungen in den verpackten Produkten auf Null zurückgehen, wurde leider nicht erfüllt. [31, 32] Über den anderweitigen Eintrag entlang des Produktions- und Verarbeitungsprozess ist in Österreich bisher wenig bekannt; hier begrenzt sich das Know-How vorwiegend auf Wissen aus der Literatur, zu einer ganzheitlichen Ursachenforschung und anschließenden einheitlichen Umsetzung der Erkenntnisse innerhalb der österreichischen Branche ist es bislang noch nicht gekommen.

In der seitens der europäischen Kommission veröffentlichten Empfehlung von 2017/84 wird sowohl auf das Fehlen einer EU-Referenzmethode als auch auf die mangelhafte Datenlage hingewiesen. Deshalb empfiehlt die Kommission den Mitgliedsländern, in Kooperation mit Lebensmittel und Verpackungsherstellern, ein Monitoring für die kommenden Jahre sowie Anstrengungen zur Etablierung einer Analysenmethode zu unternehmen. [33] Es gibt einige wenige Labore im Ausland, welche sich bereits seit Jahren intensiv mit der Analytik befassen und folglich eine Methode etabliert haben, welche bis dato zur Analytik von Mineralölverunreinigungen in Lebensmitteln herangezogen wird. In Österreich ist die Etablierung einer solchen Methode bislang nicht erfolgt.

Fazit:

Aus EU-weiten und internationalen Empfehlungen und wissenschaftlichen Publikationen ist bereits einiges zu Mineralölverunreinigungen in Lebensmitteln bekannt. Dennoch gibt es aber einen großen Wissensmangel im Bereich von standardisierten Methoden mit geeigneter Bestimmungsgrenze und tatsächlicher Relevanz für die menschliche Gesundheit. Dies führt zu großen Unsicherheiten am Lebensmittelmarkt und wird zusätzlich noch durch eine emotionale, verunsichernde und verängstigende Berichterstattung geschürt, welche u.a. eine Tatenlosigkeit der Lebensmittelbranche sowie des Gesetzgebers suggeriert.

In Österreich gibt es zwar erste Erkenntnisse zu Recycling-Karton, welche auch schon direkt am österreichischen Markt erprobt und umgesetzt werden konnten, zu anderen prozessbezogenen Vermeidungsstrategien hingegen gab es bislang keinen einheitlichen Tenor in Österreich. Diese Situation trifft ebenso auf die Analysenmethode in Österreich zu. Analysenverfahren werden im Moment ausschließlich in anderen Ländern der EU entwickelt und das damit einhergehende Verständnis und Know-how für die Problematik wird ebenso dort generiert und gepflegt. Deshalb ist es nun v.a. auch in Anbetracht der 2017 veröffentlichten Empfehlung seitens der Kommission zur Methodenentwicklung und zum Monitoring der Lebensmittel höchste Zeit, auch in Österreich aktiv zu werden, um etwaigen weiteren mediale sowie gesetzlichen Entwicklungen gewappnet zu sein.

3. Projektziele

Basierend auf der Ausgangslage, wurden folgende Projektziele definiert:

3.1. Entwicklung und Verbesserung der Probenvorbereitungsverfahren

Es fehlen klare „Probenvorbereitungsmodule“ die exakte „Rezepte“ zur Aufarbeitung für einen breiten Lebensmittelbereich (von trockenen Lebensmitteln mit einem Fettgehalt <4% bis zum reinen Speisefette/Öl; vom unbehandelten Rohprodukten bis zum hochverarbeiteten „Fertigprodukt“) vorgeben. Wissen soll hier für den Standort „Österreich“ generiert, Anschluss an den Stand-der-Technik gefunden und aktiv international zusammengearbeitet werden, um entsprechende standardisierte Methoden für die Probenvorbereitung zu entwickeln.

3.2. Risikoevaluierung im Produktionsbetrieb

Alle am Projekt beteiligten Branchenvertreter haben auf Grund der vielfältigen Matrix „Lebensmittel“ unterschiedliche Probleme und Schwierigkeiten: Bei Schokoladeproduzenten sind es bis dato vorwiegend mineralölgetränkte Jutesäcke, die zu einer Kontamination führen. In der Fleisch- und Käsebranche sind es zugelassene,

lebensmitteltaugliche Stoffe (Paraffineüberzüge bei Käse, Wursthüllen die mit epoxidierten Speiseölen oder Weißölfractionen behandelt werden), die zu einem Problem bei vorwiegend unraffinierten und damit hochwertigen Speiseölen durch den lipophilen Charakter der Rohstoffe zu einem Anreicherungseffekt von MO führen. Gewürze sind aufgrund der komplexen Zusammensetzung immer eine Problematrix: Hier kann ein Teil der Verbindungen nicht im Zuge der Standardaufarbeitung abgetrennt werden (hier vorwiegend terpenoide Strukturen), die zu massiven falsch positiven Ergebnissen führen können. Erzeuger von getrockneten Nudeln sind ein klassischer Anwender von recyceltem Karton, einer klassischen Mineralölkontaminationsquelle, wobei es verstärkt durch die Lagerdauer zu Kontaminationen kommen kann. Daher muss individuell auf Risikofaktoren eingegangen, Eintragungsquellen identifiziert und Vermeidungsstrategien erstellt werden. Um den Anforderungen des Handels, sowie der Medien und Konsument/innenvertretungen nachzukommen, sind österreichische Lebensmittelbetriebe gezwungen, ihre Proben bei ausländischen Laboren testen zu lassen, was zu einem Wissensabfluss weg von Österreich beiträgt. Momentan ist also sowohl die Analytikkompetenz, als auch das prozessbezogene Know-how zur Vermeidung und Minimierung vorwiegend im Ausland angesiedelt, wodurch etwaige Bemühungen seitens der österreichischen Lebensmittelhersteller deutlich erschwert werden. In Erwägung der oben angeführten Gründe zielt dieses Projekt sowohl auf die Etablierung einer für Lebensmittel adäquaten Analytik am österreichischen Markt, als auch auf die Entwicklung von Strategien zur Minimierung und Vermeidung von Mineralölkontamination in Lebensmitteln ab. Für die Betriebe bedarf es einer grundsätzlichen Unterscheidung, ob ihr Produkt durch ressourcenbezogene Eintragungsquellen oder durch einen mangelhaften Produktionsprozess kontaminiert wird. Produktionsbezogen kann eine Analyse der spezifischen betrieblichen Gegebenheiten in den Bereichen Hygiene, Umfeld, Handling, Prozessierungsschritte und Lagerung Abhilfe schaffen. Weiters soll ein Screening der Rohprodukte helfen die ressourcenbezogenen Eintragungsquellen zu identifizieren und zu minimieren.

3.3. Analysenmethodenentwicklung und –optimierung zur Beurteilung der Genotoxizität

Die aktuelle Routineanalytik erlaubt nur die Bestimmung des Gesamtgehaltes an MOSH und MOAH ohne weitere Information über Herkunft und Zusammensetzung. Das Projekt soll durch die Etablierung einer GCxGC basierten Analysenmethode, die eine detaillierte Untersuchung der genauen Zusammensetzung erlaubt, einerseits falsch positive Befunde identifizieren und andererseits die Unterscheidung zwischen genotoxischen Mineralölbestandteilen und gesundheitlich unbedenklichen Verunreinigungen

ermöglichen. Dies soll die Sicherheit der Produkte, sowohl für Hersteller als auch für Konsumenten garantieren.

3.4. Entwicklung und Validierung Genotoxizitätstests

Derzeit ist ein Rückschluss von Analyseergebnissen auf eine toxikologische Wirkung noch sehr schwierig bis unmöglich. Klassische Toxizitätsmodelle gehen von der Evaluierung von Einzelsubstanzen oder von Mischungen mit überschaubaren Komponenten aus. Dies ist in der Mineralölthematik nicht gegeben. Wir sprechen hier von Substanzen bis zu einer Kettenlänge von C50 (nach aktuellem Analytikprotokoll) und unterschiedlichen Strukturen (verzweigte und unverzweigte Ketten, gesättigte und ungesättigte Ringstrukturen etc...). Für eine toxikologische Einschätzung ist es besonders wichtig, genotoxische Substanzen zu erfassen. Diese Substanzgruppe kann teilweise bereits in sehr geringen Konzentrationen zu Mutationen im Erbgut und dadurch langfristig zu Krebs führen. Der Schwellenwert, ab dem eine unbekannte Substanz als kritisch eingestuft werden muss, ist für genotoxische Substanzen gemäß EFSA und WHO um einen Faktor 600 geringer als für nicht genotoxische Verbindung. Eine Unterscheidung zwischen genotoxischen und nicht genotoxischen Fraktionen ist für die Risikobewertung daher entscheidend. Im Projekt sollen isolierte Mineralölfractionen aus der chemischen Analytik mit einer optimierten Version eines akzeptierten in-vitro Tests auf genotoxische Wirkung untersucht werden. Die Ergebnisse sollen in eine Datenbank einfließen, die bei künftigen Analysen bereits direkt auf Basis der in der chemischen Analytik identifizierten Substanzgruppen Rückschlüsse auf eine mögliche Genotoxizität erlaubt. Die Aussagekraft der chemischen Analyseergebnisse für die Sicherheitsbewertung soll dadurch wesentlich verbessert werden.

3.5. Genotoxische Risikobewertung an Realproben

Der Fokus soll hier insbesondere auf der Eignung der Methode für ein breites Spektrum unterschiedlicher Matrices liegen. In einem Proof-of-Concept sollen gezielt sowohl unkritische Mineralölfractionen als auch kritische Mineralölbestandteile mit krebserregenden, genotoxischen Substanzen getestet werden. Anschließend wird evaluiert, ob sie unter realen Bedingungen in unterschiedlichen Lebensmitteln detektiert und unterschieden werden können.

3.6. Mitarbeit an zielführenden gesetzlichen Grenzwerten und Wissensaufbau

Aus den durch diese Arbeiten entstehenden Ergebnissen, Daten und Erkenntnissen sollen schließlich Leitlinien und Handlungsempfehlungen für die gesamte Lebensmittelbranche entstehen. Darüber hinaus wird angestrebt, die Methodik der entwickelten Analytik in die europaweite Entwicklung einer EU-Referenzmethode einfließen zu lassen.

4. Projektstruktur

Die Projektziele in dem von der FFG geförderten Projekt „MOSH MOAH“ wurden in 3 Phasen bearbeitet (Tabelle 1). Phase 1 beschäftigt sich mit den Problemen in der Routineanalytik, sowie der Minimierung von Kontaminationen in den Produkten des Projektkonsortiums. Phase 2 fokussiert anschließend auf die Beurteilung der Genotoxizität der MOAH. Phase 3 stellt den Proof of Concept dar, mit dem Ziel kritische Proben in der Routineanalytik möglichst einfach und schnell identifizieren und beurteilen zu können.

Die 10 teilnehmenden lebensmittelverarbeitenden Betriebe und Gerätehersteller wurden dabei von den Projektdienstleistern TU Graz, August Staudinger & Partner GmbH und dem Österreichischen Forschungsinstitut für Chemie und Technik (OFI) durchgängig betreut.

Tabelle 1: Übersicht Projektstruktur

Phase 1	Phase2	Phase3
<ul style="list-style-type: none"> ○ Entwicklung von Probenvorbereitungsverfahren bzw. Module für verschiedene Matrices. ○ Probenscreening ○ Evaluierung Eintragungsquellen in den Produktionsbetrieben 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Aufbau einer GCxGC basierten Methode zur Verifizierung und Charakterisierung von MOAH in Lebensmittel- und Lebensmittelkontaktmaterialproben ○ Implementierung einer Methode zur Fraktionierung hochreiner MOSH und MOAH Subfraktionen ○ Aufbau und Validierung AMES Test zur Bewertung der Genotoxizität und Beurteilung der separierten MOAH-Fraktionen 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Proof of Concept

5. Projektergebnisse

5.1. Phase 1

5.1.1. Verbesserung der Probenvorbereitungsverfahren

Durch die aktive Zusammenarbeit in verschiedenen Gremien zur Entwicklung und Standardisierung von Methoden, spiegeln die Arbeiten und Entwicklungen im Projekt auch jene auf internationaler Ebene dar. Deshalb wird in diesem Kapitel auf die größten Entwicklungsschritte der letzten Jahre und den aktuellen Wissenstand bzw. „Best-Practice“ in der Mineralölanalytik allgemein eingegangen und auf individuelle Projektdetails verzichtet.

In der Empfehlung (EU) 2017/84 über die Überwachung von Mineralölkohlenwasserstoffen in Lebensmitteln und Materialien und Gegenständen, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen weist die europäische Kommission darauf hin, dass es zur Analyse von MOH keine einheitlichen Leitlinien zur Beprobungs-, und Analysemethoden gibt. Das Referenzlaboratorium der Europäischen Union für Lebensmittelkontaktmaterialien (EU-RL), sollte eine entsprechende Leitlinie erarbeiten und gemeinsam mit den Mitgliedstaaten Analysenkompetenz aufbauen. [33]

Infolgedessen, wurde im Jahr 2019 von der Gemeinsamen Forschungsstelle der Europäischen Kommission (Joint Research Center, JRC), die „Guidance on sampling, analysis and data reporting for the monitoring of mineral oil hydrocarbons in food and food contact materials“ veröffentlicht. [9] Die Richtlinie verweist auf aktuelle analytische Ansätze laut publizierter Fachliteratur und stellt generelle Leistungsanforderungen an die durchführenden analytischen Labore sowie an die Berichterlegung, um eine Generierung von vergleichbaren Daten zu ermöglichen. Ein Update der Richtlinie wurde Anfang 2023 veröffentlicht. [8] Die wichtigsten Punkte aus beiden Richtlinien seien kurz zusammengefasst:

- Probennahme: für zuverlässige analytische Ergebnisse ist die richtige Probennahme essenziell. Es ist vor allem darauf zu achten, dass die Proben nicht kontaminiert werden. Dies kann z.B. durch den/die Probennehmer*in durch kosmetische Produkte wie Handcremes passieren, aber auch durch Werkzeuge zur Probennahme und vor allem durch die verwendete Verpackung bei Lagerung und Versand der Proben. Gezogene Proben sollen deswegen in gereinigten Glas-, oder PET Gefäßen mit Glasverschluss oder Verschluss mit PTFE Beschichtung gelagert und versandt werden. Auch Alufolie kann als geeignetes Verpackungsmaterial

verwendet werden, z.B. für Papier und Karton oder vorverpackte Lebensmittel. Behälter aus Polyolefinen (PE oder PP) sind NICHT geeignet, da sie gesättigte, oligomerische Kohlenwasserstoffe (POH) an die Probe abgeben können, die mit der Analyse interferieren. Außerdem sollte der Kontakt mit Papier oder Karton aus Sekundärfasern, sowie Klebeband bzw. Klebestreifen, Etiketten oder ähnlichem vermieden werden. Die Beschriftung erfolgt idealerweise außen z.B. mit Permanentmarker und sollte eine eindeutige Identifizierung der Probe ermöglichen.

- Zielanalyten sind Mineralölkohlenwasserstoffe (MOH, unterteilt in MOSH und MOAH) die aus rohem Erdölstammen oder von Kohle, Gas oder Biomasse durch Fischer-Tropsch Synthese gewonnen werden. Es handelt sich dabei um komplexe Mischungen, die nicht in ihre Einzelsubstanzen getrennt werden können. Bestimmt wird stattdessen der Gesamtgehalt an MOSH und MOAH, wobei hierfür die Methode der Wahl die online-gekoppelte HPLC-GC-FID ist (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Gaschromatographie-Flammenionisationsdetektor, Abbildung 2). [24, 25]

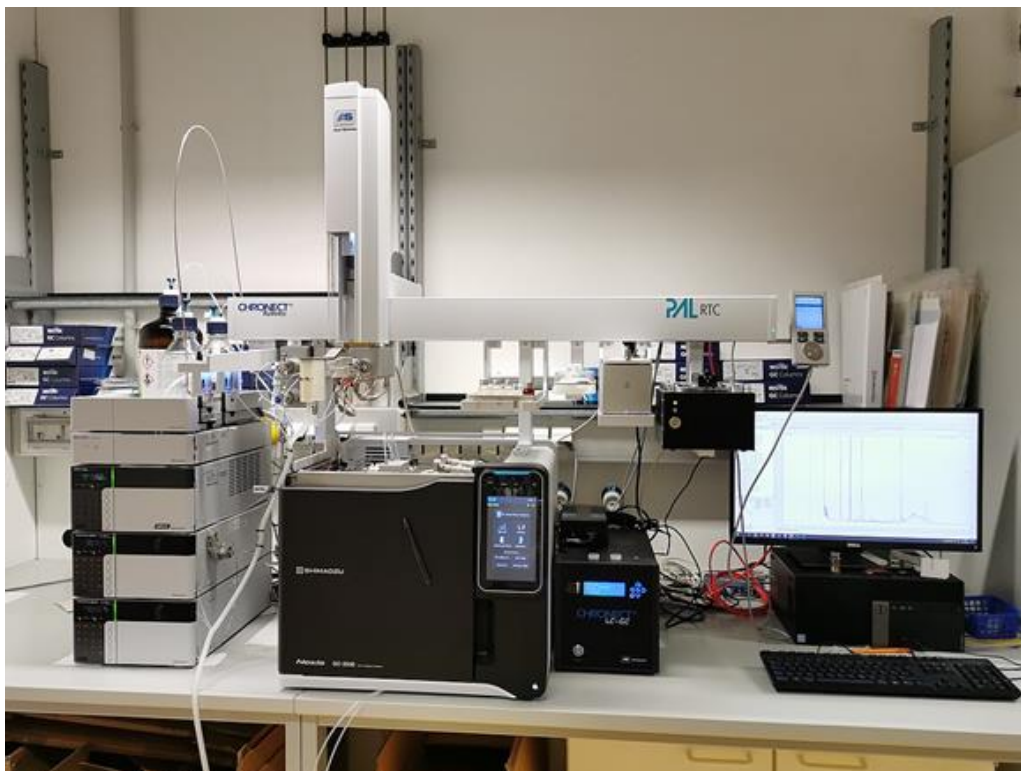


Abbildung 2: online gekoppelte HPLC-GC-FID

Dabei wird nach erfolgter Probenvorbereitung angepasst an die jeweilige Matrix, das erhaltene Extrakt mit Normalphasen-HPLC in MOSH und MOAH getrennt. Die getrennten Fraktionen werden danach online auf zwei idente GC-Säulen in einem

Ofen transferiert, um MOSH und MOAH parallel in einem Lauf zu bestimmen, wobei man durch ein schnelles und steiles Ofenprogramm die Empfindlichkeit der Methode steigert, indem die komplexen Substanzgemische jeweils in einem großen, nicht aufgelösten Peak, dem sogenannten Mineralölhump, konzentriert werden. Ein Beispiel dafür zeigt Abbildung 3.

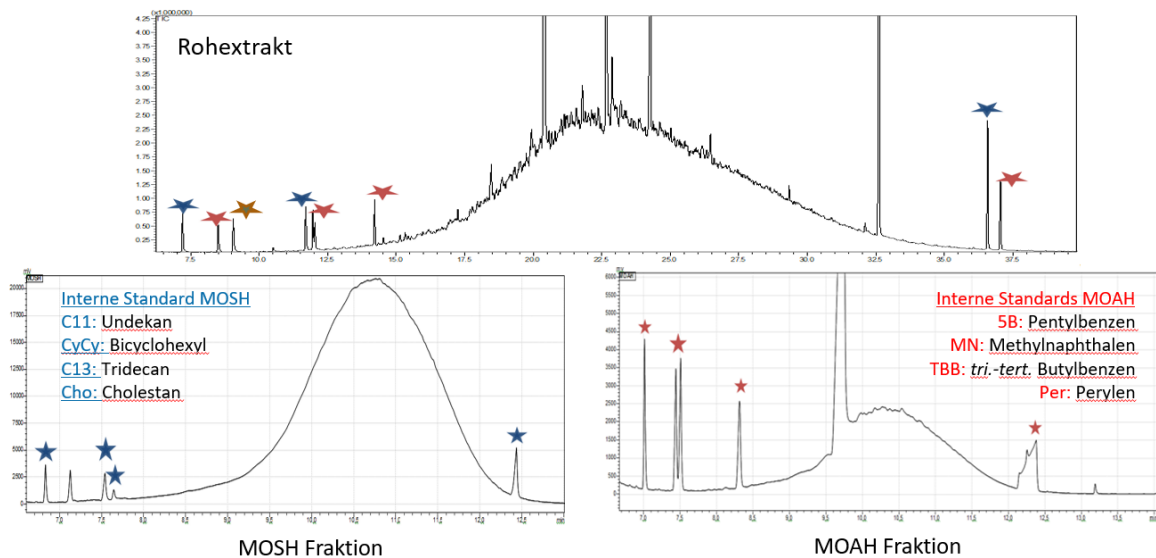


Abbildung 3: Typischer Mineralölhump, der mittels LC in MOSH und MOAH getrennt wird.

Zwei universale Flammenionisationsdetektoren erlauben im finalen Schritt die die Bestimmung der jeweiligen Gesamtgehalte. Dafür wird der entstehende MOSH bzw. MOAH Hump des GC-FID Signales im Elutionsbereich zwischen den n-Alkane C10 und C50 integriert, nachdem alle Interferenzen durch geeignete Probenvorbereitung möglichst entfernt bzw. verbleibende aufsitzende Einzelpeaks, sowie der Analysenblindwert abgezogen wurden und das Ergebnis in Milligramm pro Kilogramm Lebensmitteln angegeben. Ein Beispiel zeigt Abbildung 4. Weitere Unterteilungen des gesamten Elutionsbereiches (sogenannte „C-Fractionen“) sind über die Retentionszeiten der n-Alkane möglich und können Hinweise auf den Ursprung der Kontamination geben. Eine genaue Beschreibung von Aussehen und Lage des Humps ist aber laut Update der Richtlinie 2023 der Unterteilung in C-Fractionen vorzuziehen.

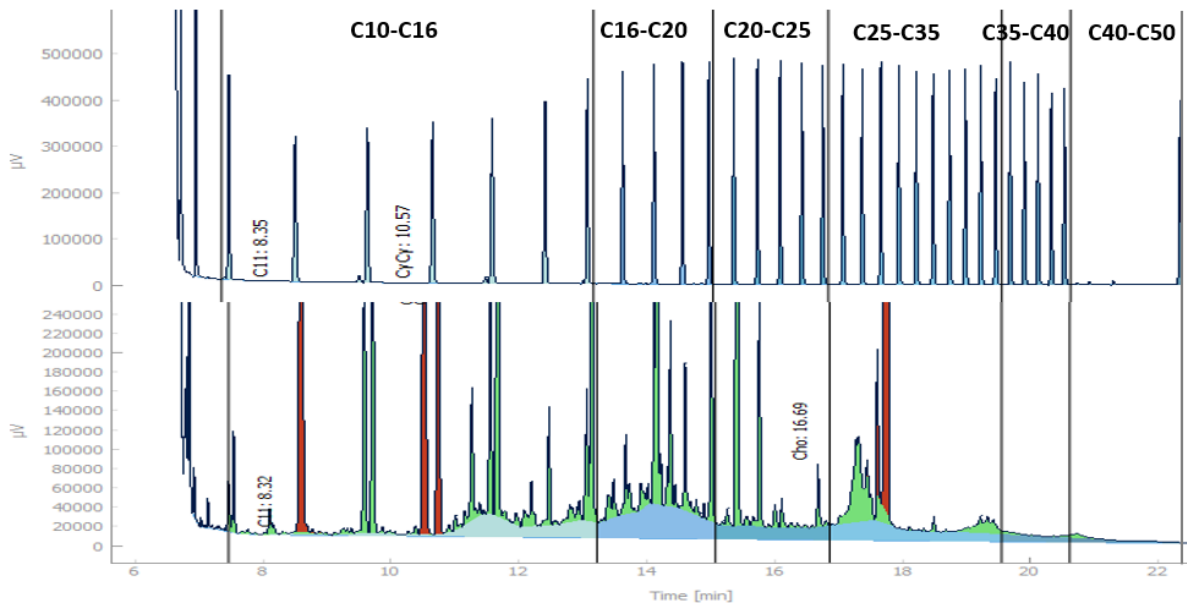


Abbildung 4: Beispiel für die Auswertung: n-Alkan Mix (oben) von C10 bis C40 + C50 zur Bestimmung der Retentionszeiten und Schnittfenster („C-Fractionen“). Die Schnittfenster werden in das Chromatogramm der Probe übertragen. Im Chromatogramm der Probe (unten) werden die internen Standards identifiziert und integriert (rot), aufsitzende Peaks abgezogen (grün) und der korrigierte Mineralölhump (blau) nach Anpassung der Basislinie integriert.

Um die Eignung bzw. den Zustand des Analysensystems zu überprüfen, gibt es klar festgesetzte Regeln, wie z.B. die Verhältnisse der Flächen der Verifizierungsstandards zueinander, die Verhältnisse von C10 und C50 zu C20, die Wiederfindung eines verdünnten Mineralöls mit bekannter Zusammensetzung oder die Höhe des Säulenblutens im Vergleich zum Mineralölhump. Sollten die vorgegebenen Ziele hier nicht erreicht werden, ist das System für eine Messung nicht geeignet und entsprechende Schritte zur Verbesserung der Leistung müssen vorgenommen werden.

- Zu den Nachteilen der beschriebenen Technik zählt die Verwendung des FIDs als Detektor. Es handelt sich dabei um einen universellen Detektor, das heißt er reagiert praktisch identisch auf alle in der Probe vorhandenen Kohlenwasserstoffe und erleichtert somit die Quantifizierung. Dies ist aber gleichzeitig sein größter Nachteil, denn die mangelnde Selektivität kann zu falsch positiven Befunden führen. Nicht zu den MOH zählen nämlich solche Kohlenwasserstoffe, die natürlich in Lebensmittel vorkommen, wie ungeradzahlige n-Alkane von C₂₁ bis C₃₅ in der MOSH, die typischerweise auf dem Hump sitzen, oder Olefine terpenischen Ursprungs wie Squalene oder Karotinoide in der MOAH. Auch die bereits erwähnten POH aus Polyolefinen („Plastikverpackung“) und synthetische

Isoparaffine (Polyalphaolefine, PAO; z.B. Schmiermittel) zählen nicht zu den MOH. Die Präsenz der genannten Interferenzen ist durch die typischen gebildeten Muster im Chromatogramm ersichtlich – die Unterscheidung muss bei der Datenauswertung und Interpretation durch den Analytiker erfolgen. Wo eine klare Abtrennung nicht möglich ist, muss die Präsenz dieser Interferenzen jedenfalls im Bericht klar kommuniziert werden.

- Um die beschriebenen Interferenzen vor allem natürlichen Ursprungs möglichst vor der Messung zu entfernen ist eine geeignete Probenvorbereitung, angepasst an die jeweilige Matrix nötig. Um die natürlich, ungeradzahlige n-Alkane der MOSH zu entfernen kann ein clean-up mit Aluminiumoxid durchgeführt werden. Verzweigte oder zyklische Alkane der MOSH passieren das Aluminiumoxid, während Paraffine (unverzweigte Alkane) zurückgehalten werden. Wichtig ist, dass diese zusätzlichen Schritte *nur wenn unbedingt nötig* angewendet werden (das ist der Fall, wenn ihre Konzentration so hoch ist, dass sie selbst unaufgelöste Humps bilden, die nicht vom Mineralölhump unterschieden werden können), da die zusätzliche Probenmanipulation zu Kontaminationen oder aber auch Verlusten führen kann. Dies ist z.B. der Fall, wenn die Probe Wachse enthält (Paraffine mit Kettenlänge >C25), da diese ebenfalls entfernt werden würden.

Bei Interferenzen durch natürliche Olefine in der MOAH ist momentan die Epoxidierung dieser die Methode der Wahl. Die Präsenz solcher Olefine führt oft zu falsch positiven Befunden, ein Hinweis darauf kann ein MOAH Gehalt sein, der größer als der MOSH Gehalt ist.

Um schwierige, fettreiche Matrices besser analysieren zu können, ist eine Verseifung der Fette mit anschließender Extraktion der MOH empfohlen. Aber auch für Matrices mit niedrigerem Fettgehalt oder wässrigem Anteil bietet die Verseifung Vorteile: sie erlaubt eine größere Anreicherung und damit niedrigere Bestimmungsgrenzen.

- Wo Befunde nicht eindeutig sind, soll eine Abklärung erfolgen – z.B. durch weiterführende chromatographische Methoden wie 2D comprehensive GC (GCxGC-MS).
- Das Vorgehen bei der Analyse ist im sogenannten „JRC Decision Tree“ einem Entscheidungsbaum, der mögliche Wege vorgibt zusammengefasst. Wichtig ist zu erwähnen, dass die JRC Richtlinie eben nur mögliche Wege und mindest-Performance-Anforderungen wiedergibt, aber keine standardisierte Arbeitsvorschrift oder Methode ist.

- Die mindest-Anforderungen an die Analyse sind die zu erreichenden Bestimmungsgrenzen (LOQ), die Wiederfindung und die Laborpräzision (Tabelle 2). Je nach Matrix bzw. Fettgehalt der Matrix ist die Analyse herausfordernder und es werden Unterteilungen in drei Lebensmittelkategorien vorgenommen:

Tabelle 2: Mindest-Anforderungen an die Analytik laut JRC Richtlinie

Kategorie	Beispiele	LOQ [mg/kg]	Wiederfindung [%]	Laborpräzision [%]
< 4 % Fett	Brot, Getreide, Nudeln	0.5	80-110	15
≥ 4% und ≤ 50% Fett	Backwaren, Süßigkeiten, Schokolade/Kakao, Fleisch-, Fischprodukte	1	80-110	20
> 50% Fett	Fette, Öle	2	80-110	20
Papier und Karton	-	10	80-110	10

Wie aus Tabelle 2 ersichtlich ist, sind Abweichungen zwischen Ergebnissen im Bereich von 20% in der Mineralölanalytik auf Grund der Komplexität erlaubt. Dies sollte bei Vergleich und Interpretation von Analyseergebnissen berücksichtigt werden.

Die in der **JRC** Richtlinie angegebenen **Bestimmungsgrenzen** wurden im April 2022 in einer Stellungnahme des Ausschusses für Pflanzen, Tiere, Lebens- und Futtermittel (PAFF Komitee) der Europäischen Kommission als „**inoffizielle Limits**“ für **MOAH** festgelegt. [10] Denn: wenn der MOAH Gehalt eines Lebensmittels diese Quantifizierungsgrenzen überschreitet, soll es vom Markt genommen werden. Die Grenzen sind nicht toxikologisch begründet, sondern basieren auf der Sensitivität der aktuell verfügbaren LC-GC-FID Analysenmethode und dem Fettgehalt der Probe.

Neben der JRC Richtlinie gab es von unterschiedlichen Seiten Bemühungen zur Vereinheitlichung und Standardisierung der Analysenmethoden. Aus diesen Bemühungen entstanden eine Methode für Speisefette und Öle und eine für MOAH in Babymilchpulver.

- Für Fette und Öle ist es durch die internationale Zusammenarbeit von 13 Laboren im „ThinkTank MOSH/MOAH“ gelungen, die Anwendbarkeit der EN 16995:2017 so weit zu verbessern, dass die Bestimmungsgrenzen von Gehalten >10 mg/kg auf 1 mg/kg MOSH bzw. MOAH gesenkt werden konnte. Publiziert wurde die Methode vorerst auf nationaler Ebene in Deutschland im Dezember 2020 als „Einheitsmethode der DGF C-VI 22 (20) Mineralölbestandteile, gesättigte Kohlenwasserstoffe (MOSH) und aromatische Kohlenwasserstoffe (MOAH) mit online gekoppelter LC-GC-FID - Methode für niedrige Bestimmungsgrenzen.“ [13]

In weiterer Folge wurde durch die Zusammenarbeit von CEN und DGF die publizierte Methode in mehreren Ringversuchen auf europäischer Ebene weiter evaluiert und standardisiert, mit dem Ziel, sie als internationale Norm zu etablieren und somit die EN16995:2017 abzulösen. Die Methode ist mittlerweile an den entsprechenden Instituten eingereicht und die Entwürfe (EN16995:2022) wurden den an den Ringversuchen teilnehmenden/analysierenden Laboren zur Verfügung gestellt. Die Validierung ergab Bestimmungsgrenzen für MOSH von 3 mg/kg und für MOAH von 2 mg/kg. Sie ist also zur Analyse und Kontrolle der geltenden Limits geeignet. [12]

- Methode für MOAH in Babynahrung: in Reaktion auf Bericht über MOAH in Babynahrung organisierte das JRC mit Anfang 2020 Laborvergleichsstudien für die Erstellung einer Standard-operation-Procedure zur Bestimmung von MOAH in Babymilchpulver. Auch diese Bemühungen waren erfolgreich und die finale Methode zeigte sich geeignet für MOAH Gehalte ab 1mg/kg und ist nun online auf der JRC-Webseite publiziert. [14]

Gemeinsam haben die publizierten Methoden, dass Experten in der Mineralölanalytik gemeinsam daran gearbeitet haben, um den momentanen Best-Practice widerzuspiegeln. Die Methoden wurden so weit wie möglich aufeinander abgestimmt, um die Probenvorbereitung und Analyse zu erleichtern. Außerdem wurden die verfügbaren Möglichkeiten der Automatisierung mitevaluiert und können -soweit vorhanden- eingesetzt werden. Eine weitere Gemeinsamkeit ist – wie auch die JRC Richtlinie fordert- die Überprüfung der Systemeignung. Hier werden in allen Methoden klare Regeln und Ziele festgelegt, die für die Analyse gelten bzw. erreicht werden müssen, damit Ergebnisse verlässlich und vergleichbar sind. Zur Kontrolle der durchführenden Laboratorien stehen heute Referenzmaterialien zur Verfügung, außerdem werden regelmäßige Ringversuche angeboten, z.B. [34–37].

Immer mehr an Bedeutung – auch in der Routineanalytik -gewinnen die kurz erwähnten Verifizierungsmethoden, basierend z.B. auf GCxGC-MS. Während diese zu Projektbeginn noch eher selten eingesetzt wurden, werden sie heute als wichtiges Tool zur Bestätigung von

Befunden und zur Charakterisierung der präsenten Substanzgruppen gesehen. Mehr dazu unter 5.3.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die Analytik sich in den letzten Jahren immens weiterentwickelt hat und dies auch noch immer tut. Sie ist und bleibt aber herausfordernd – zunehmende Automatisierung der nötigen Probenvorbereitungsschritte um natürliche Interferenzen zu entfernen (z.B. der Verseifung gegen Fett, Aluminiumoxid-Clean Up gegen Alkane in der MOSH oder Epoxidierung gegen Olefine in der MOAH) verringern aber den Arbeits- und Zeitaufwand immens und verhelfen gleichzeitig zu vergleichbaren Ergebnissen.

Weitere Projektergebnisse – Schnellmethode für Verpackungsmaterialien:

Neben der „traditionellen“ Analyse von MOSH und MOAH auf der online gekoppelten HPLC-GC-FID wurde erstmals versucht die Proben zusätzlich mit einem „Schnelltest“ zu vermessen, um

- a) eine Kontamination der LC-GC Anlage zu vermeiden und
- b) eine Schnellabschätzung eines positiven Mineralölbefundes zu erhalten.

Dazu werden die Proben ohne weitere Vorbereitung in ein Glasvial eingewogen mit Hilfe der Head Space-Solid Phase Microextraction (HS-SPME) bei 80°C, 120°C und 160°C extrahiert und am GC-MS direkt vermessen. Der Vorteil dieser Methodik ist, dass sie einen schnellen Überblick über die Zusammensetzung der Probe ermöglicht, also z.B. die vorhandenen Kontaminationen bzw. Interferenzen. Auf der anderen Seite ist man allerdings auf Grund der Probenmatrix limitiert und die Quantifizierung ist aus den gewonnenen Daten nicht möglich. Es wurden drei unterschiedliche Anreicherungstemperaturen verwendet, um den gesamten Fraktionsbereich bestmöglich abzubilden, da die HS-SPME durch die Flüchtigkeit der Verbindungen limitiert ist.

Die Methode ermöglicht eine schnelle und einfache Abschätzung des Mineralölgehalt von z.B. Lebensmittelkontaktmaterialien und trockenen, nicht fettigen Lebensmitteln, mit einem Ergebnis innerhalb von ca. 30min. Für komplexe Matrices mit einem hohen Fett und/oder Wassergehalt kann sie nicht eingesetzt werden. Es ist aber wichtig die Limitierungen hinsichtlich der Flüchtigkeit von Mineralölkomponenten und der Matrix aufzuzeigen.

5.1.2. Risikoevaluierung im Produktionsbetrieb

Die Firmen aus den variierenden Bereichen der Lebensmittelbranche zeigten erhebliche Unterschiede hinsichtlich ihrer Prozesse, Qualitätsmanagement, Produkte, Hygieneverfahren etc. Im Zuge von vor Ort Risikoevaluierungen konnte das Risikobewusstsein bezüglich der Mineralölthematik geschärft werden. Bei den Betriebsrundgängen wurden kritische Parameter evaluiert und Proben zur Bestimmung des MOSH /MOAH Gehaltes an unterschiedlichen Stellen bzw. von unterschiedlichen Produkten gezogen. Mit der erhaltenen Information wurden anschließend MOSH/MOAH Eintragsquellen sowie Verbreitungswege definiert und je nach Risikostufe priorisiert. Beispielsweise wurde festgestellt, dass neben Rohwaren eine große Risikogruppe Maschinenöle darstellten, da schwer zugängliche Stellen weniger Reinigung erfuhren und dadurch eine Kontamination der Folgeprodukte erfolgte. In diesen Fällen wurden die Reinigungsprozesse verbessert oder die Maschinenanordnung geändert, um die Eintragsquelle zu eliminieren oder auf ein Minimum zu reduzieren.

Mit dieser Vorgehensweise konnten den Firmen betriebsspezifische Kontaminationsvermeidungsstrategien bereitgestellt werden. Sie erhielten individuelle Handlungsanweisungen, um das Risiko von Kontaminationen durch innerbetriebliche Prozesse zu vermeiden.

Einen Überblick über die im Projekt ermittelten/gefundenen Kontaminationen gibt Tabelle 3. Es wurden in den 4 Jahren rund 200 Proben der teilnehmenden, hauptsächlich österreichischen, Betriebe analysiert. Die Proben reichten von Nudeln, als trockenes nicht fettiges Lebensmittel, zu Schokolade, Backwaren oder verschiedenen Fertigprodukten wie Tiefkühlasagne oder Gulasch, zu reinen Speisefetten bzw. Ölen. Zur statischen Auswertung wurden die Proben entsprechend des Fettgehaltes und den dafür geltenden Limits zusammengefasst.

Tabelle 3: Übersicht über den Kontaminationsbereich der analysierten Proben aus vorwiegend österreichischen Produktionsbetrieben.

Kategorie (MOAH-Limit)	#	MOSH (mg/kg)				MOAH (mg/kg)				
		von	bis	Median	Mittelwert	von	bis	Median	Mittelwert	>Limit
≤ 4% Fett (0.5 mg/kg)	55	<0.5	89	1.1	5.33	<0.5	4.5	<0.5	0.65	4
4% - 50 % Fett (1 mg/kg)	78	<0.5	60	3.1	9.4	<0.5	17	<0.5	1.14	24
> 50 % Fett (2 mg/kg)	72	<0.5	55	8	11	<0.5	6	<0.5	0.75	7

Im Vergleich der Daten über den Projektzeitraum (nicht im Detail ausgeführt) erkennt man, dass zu Beginn des Projektes die höchsten Kontaminationen gefunden wurden. Durch die Identifizierung von Eintragungsquellen konnten diese Schritt für Schritt reduziert werden, sodass sich sowohl MOSH als auch MOAH Levels deutlich reduzierten (Vergleich gefundene Höchstlevels mit Median und/oder Mittelwert über Projektzeitraum in Tabelle 3). Für MOAH konnte am häufigsten <Nachweisgrenze ermittelt werden. Die MOAH am häufigsten nicht nachgewiesen werden konnte.

Dies zeigt u.a. den Erfolg der gesetzten Maßnahmen – Eintragungsquellen konnten erfolgreich identifiziert und die Gehalte effektiv reduziert werden.

5.2. Phase 2

5.2.1. Analysenmethodenentwicklung und -optimierung zur Beurteilung der Genotoxizität

Um einen Blick „unter“ den Mineralölhump zu ermöglichen sind weiterführende chromatographische Methoden notwendig. Die Methode der Wahl für diesen Blick in den Hump ist die 2D comprehensive GCxGC. Im Projekt wurde dafür ein GCxGC-ToFMS verwendet. Hierbei handelt es sich um ein "reines" Messsystem, die Probenvorbereitung muss zuvor wie unter 5.1 beschrieben erfolgen und die Mineralölfraktion in MOSH und MOAH getrennt werden (Anmerkung: Kombinationen wie LC-GCxGC-ToFMS sind ebenfalls verfügbar und möglich). Eine Analysenmethode für MOSH und MOAH Fraktionen wurde entwickelt, wobei bei der Auswahl der Säulenkombinationen und Methodenparameter vor allem die hohe und reproduzierbare Sensitivität für hochsiedende Fraktionen im Kettelängenbereich von C40-C50 berücksichtigt werden muss. Durch die Entwicklung und Implementierung von substanzspezifischen Massenfiltern können die entstehenden, komplexen Chromatogramme von einer geschulten Person relativ einfach und schnell (teil)-automatisiert interpretiert und ausgewertet werden.

Abbildung 5 zeigt, wie eindrucksvoll ein Chromatogramm ist, das mit einer solchen weiterführenden, analytischen Methode generieren werden kann. In diesem Chromatogramm einer Mineralölkontamination kann man rund 15 000 Substanzen identifizieren. Doch was hilft einem diese Information?

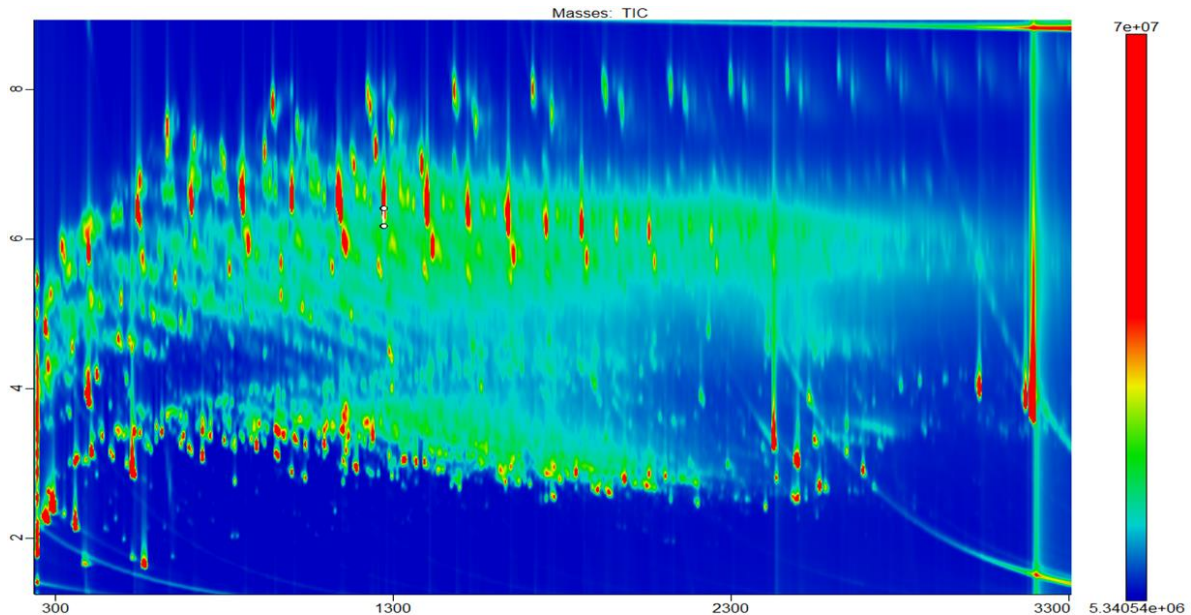


Abbildung 5: GCxGC Chromatogramm einer typischen Mineralölkontamination.

Weiterführende Chromatographische Methoden werden prinzipiell aus drei Gründen eingesetzt:

1. Um positive MOAH Befunde zu bestätigen bzw. falsch positive Befunde zum Beispiel durch natürliche Interferenzen zu vermeiden.

Falsch positive Befunde werden z.B. häufig durch Terpene ausgelöst. Dies sind ungesättigte Kohlenwasserstoffe natürlichen (hauptsächlich pflanzlichen) Ursprungs, die mehr als 30 000 Verbindungen beinhalten. Darunter findet man Alkohole, Aldehyde oder auch Ketone. Manche Terpene, wie z.B. Squalene können zwar durch Epoxidierung entfernt werden, Rückstände können aber falsch positive Befunde auslösen. Andere Terpenklassen werden durch den momentanen Stand der Technik in der Probenvorbereitung, trotz der Anwendung von z.B. Verseifung, Silica Clean-Up oder Epoxidierung nur unzureichend entfernt und bilden interferierende Humps vor allem in der MOAH Fraktion.

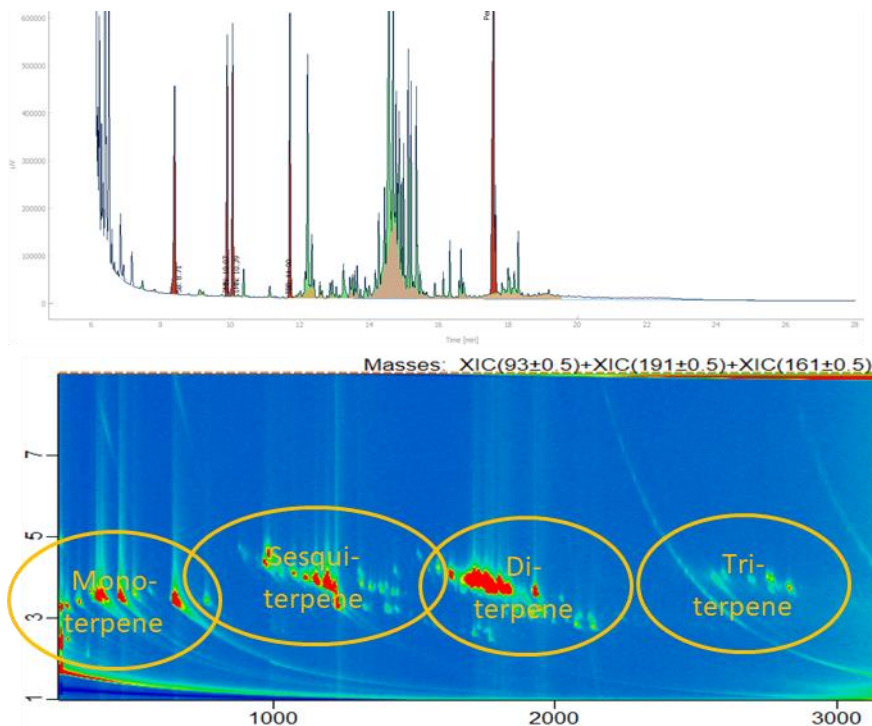


Abbildung 6: Beispiel für Terpene in der MOAH Fraktion: Humpbildung in der LC-GC-FID simuliert MOAH (oben), mittels GCxGC können aber natürlichen Interferenzen identifiziert werden (unten).

2. Um Kontaminationsquellen zu identifizieren

Durch den Vergleich der Fingerprints der GCxGC Chromatogramme eines Endproduktes mit den Rohprodukten, Schmiermitteln aus der Produktion oder der Verpackung lassen sich Kontaminationsquellen häufig einfach und schnell identifizieren und Schritte gegen die Kontamination können in die Wege geleitet werden. Somit spielte die GCxGC bei der Risikoevaluierung in den Produktionsbetrieben eine wichtige Rolle und trug maßgebend zur Reduktion von Kontaminationen bei. Außerdem konnte durch die Implementierung des Systems in „Phase 1“ gezeigt werden, dass GCxGC durchaus für die Anwendung in der Routineanalytik geeignet ist und der Mehraufwand viele Vorteile mit sich bringt.

3. Zur besseren Charakterisierung von Mineralölfractionen in ihre einzelnen Substanzklassen zur toxikologischen Risikobewertung.

Auch in Phase 2 des Projektes spielte GCxGC eine tragende Rolle. Das System wurde benutzt, um einen tieferen Blick in die MOAH Fraktion zu werfen und sie anhand der Anzahl der aromatischen Ringe zu klassifizieren.

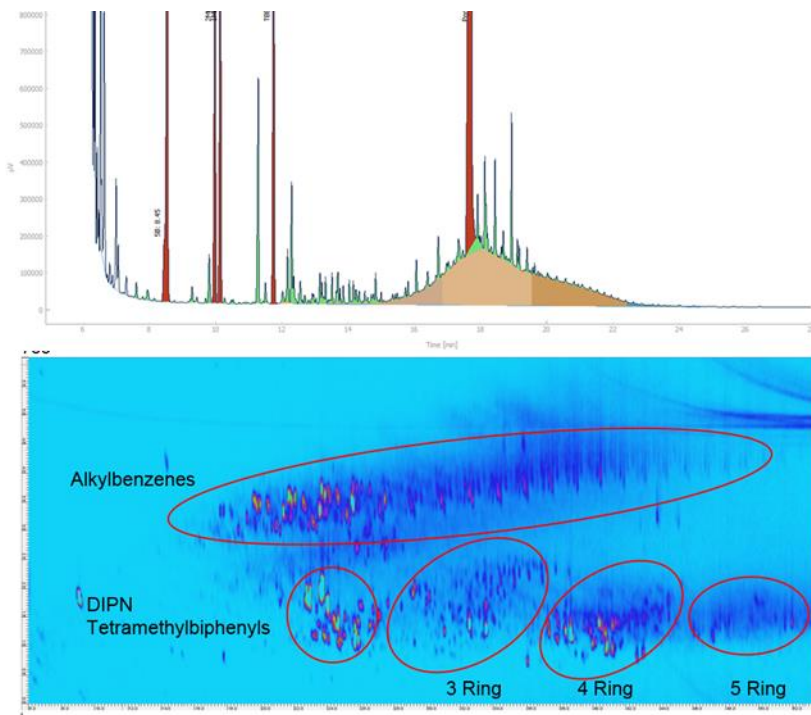





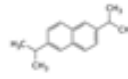
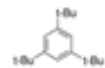



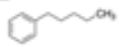

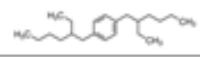
Abbildung 7: Beispiel für die Klassifizierung von MOAH nach Anzahl der aromatischen Ringe

Dies ist notwendig, da Substanzen mit mehr als 3 aromatischen Ringen für das genotoxische Potential der MOAH verantwortlich sein sollen, während Substanzen mit nur einem oder zwei aromatischen Ringen nicht mutagen oder kanzerogen sein sollen. Das heißt, dass nicht die gesamte MOAH in einen Topf geworfen werden kann; es könnte Zusammensetzungen geben, die entweder gar keine entsprechenden Effekte aufweisen oder bei denen nur bestimmte Teilfraktionen dies tun. Um dies zu beweisen oder zu widerlegen, wurde im Projekt noch ein Schritt weiter gegangen: die Substanzen wurden nicht nur mittels GCxGC klassifiziert, sondern mittels LC, unter der Anwendung von Donor-Akzeptor-Komplexchromatographie, tatsächlich entsprechend fraktioniert und isoliert. Die isolierten Fraktionen wurden im nächsten Schritt Genotoxizitätstests unterzogen.

5.2.2. Entwicklung und Validierung Genotoxizitäts-Tests

In einem ersten Schritt wurden auf Basis von Literaturdaten und bestehenden Analysendaten genotoxische Substanzen in der MOAH Fraktion von Mineralölen identifiziert. Dafür wurde eine Liste an potenziell genotoxischen Substanzen in MOAHs mittels zwei verschiedener *in-silico* Tools (Tox-Tree 3.1.0; Vega Hub 1.1.5) hinsichtlich einer möglichen genotoxischen Aktivität bewertet. Fokus lag dabei auf direkt-DNA reaktiven, genotoxischen Substanzen, die

bereits in geringsten Konzentrationen gesundheitsschädlich sein können.

Substance		ToxTree	VEGA	Ref.	Substance		ToxTree	VEGA	Ref.
1-Methylnaphthalene		-	-	1	N-octadecylbenzene		-	-	2
2-Methylnaphthalene		-	-	1	2,6-Diisopropyl-naphthalene		-	-	3
1,3,5-tri-tert-butylbenzene		-	-	1	Chrysene		+	+	4
Perylene		+	+	1	Methylanthracene		+	+	4
Pentylbenzene		-	-	1	Pyrene		+	+	4
1,4-Bis(2-ethylhexyl)benzene		-	-	2					

1. BfR: Bestimmung von Kohlenwasserstoffen aus Mineralöl (MOSH und MOAH) oder Kunststoffen (POSH, PAO)

2. Biedermann, M., & Grob, K. (2012). On-line coupled high performance liquid chromatography-gas chromatography for the analysis of contamination by mineral oil.

3. Moret, et. al (2013). Optimization of PLE for rapid determination of MOSH and MOAH in cardboard and paper intended for food contact

4. BfR (2012): Determination of hydrocarbons from mineral oil (MOSH & MOAH) or plastics (POSH & PAO) in packaging materials and dry foodstuffs by solid phase extraction and GC-FID

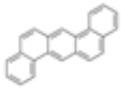

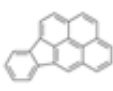
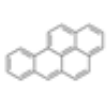
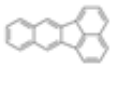
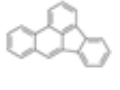
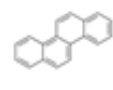


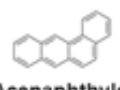
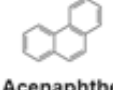
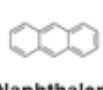
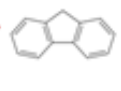



Dibenz[a,h]anthracene Toxtree: + VEGA: + 	Benzo[ghi]perylene Toxtree: + VEGA: + 	Indeno[1,2,3]pyrene Toxtree: + VEGA: + 	Benzo[a]pyrene Toxtree: + VEGA: + 
Benzo[k]fluoranthene Toxtree: + VEGA: + 	Benzo[b]fluoranthene Toxtree: + VEGA: + 	Chrysene Toxtree: + VEGA: + 	Fluoranthene Toxtree: + VEGA: + 
Pyrene Toxtree: + VEGA: + 	Benz[a]anthracene Toxtree: + VEGA: + 	Phenanthrene Toxtree: + VEGA: + 	Anthracene Toxtree: + VEGA: + 
Fluorene Toxtree: + VEGA: - 	Acenaphthylene Toxtree: - VEGA: + 	Acenaphthene Toxtree: - VEGA: - 	Naphthalene Toxtree: - VEGA: - 

Abbildung 8: In-silico Bewertung von ausgewählten, repräsentativen MOAH, sowie der „PAH16“ der amerikanischen Umweltschutzorganisation EPA.

Ein Teil der Substanzen wurde zur Bestätigung mit dem Ames Test analysiert. Die *in-silico* Einstufungen von Benzo[a]pyren, Benz[a]anthracen, Perylen, Pyren und Chrysen wurden mit dem Ames-Test bestätigt. 2-Methyl-Anthracene, wurde zwar mittels *in-silico* Tools als positiv eingestuft, im Ames-Test konnte jedoch keine genotoxische Wirkung gezeigt werden.

Als Modellsubstanz für Entwicklungs- und Validierungsschritte wurde Benzo[a]pyren ausgewählt. Als Reinstanz gemessen zeigte Benzo[a]pyren nach Aktivierung durch die S9-Fraktion von Rattenleberenzymen eine eindeutige mutagene Wirkung im Ames-Test.

In einem nächsten Schritt wurden beispielhafte Öle bzw. MOAH Fraktionen im Bioassay analysiert. Um eine Analyse zu ermöglichen erfolgte dafür eine Extraktion mit dem Bioassay-kompatiblen Lösemittel Dimethylsulfoxid (DMSO). Die Extraktionsmethode wurde dabei so

optimiert, dass mit möglichst geringer Lösemittelmenge eine möglichst gute Extraktion der Modells substanz Benzo[a]pyren gelingt und eine möglichst hohe Endkonzentration dieser mutagenen Substanzen im Bioassay erzielt werden kann. Wie in Abbildung 9 ersichtlich kann durch Reduktion der Menge an Extraktionsmittel auf ein Verhältnis von 1 zu 1 im Vergleich zur Probe ein maximales Signal im Bioassay und damit die höchstmögliche Empfindlichkeit erreicht werden (A). Wenn bei gleicher Lösemittelmenge mit einer zweistufigen Extraktion gearbeitet wird, kann die Empfindlichkeit noch einmal etwas verbessert werden, ein dreistufiger Prozess stellt keinen wesentlichen Vorteil mehr da (B).

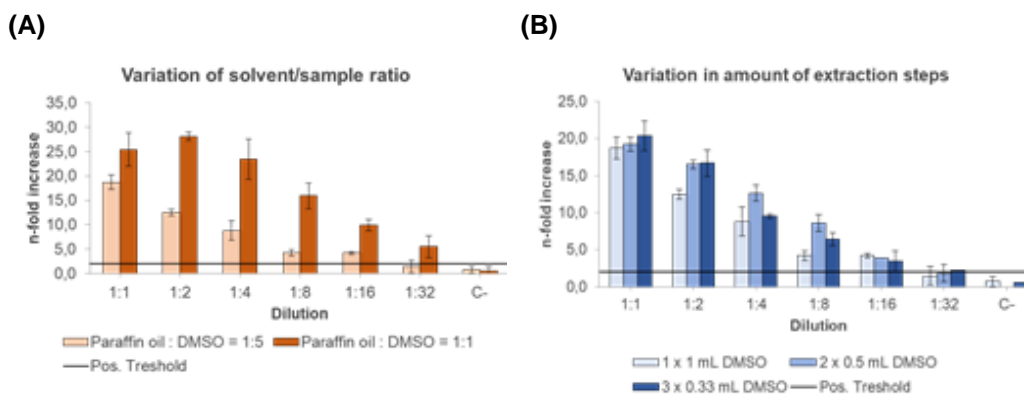


Abbildung 9: Einfluss von Variationen bei dem Lösemittel/Proben Verhältnis (A) und der Anzahl der Extraktionsschritte (B) auf das Signal im Ames-Test.

Um die Extraktionseffizienz für die Modells substanz Benzo[a]pyren zu bestimmen, wurde ein nicht genotoxisches Paraffinöl mit Benzo[a]pyren dotiert. Dieses wurde im nächsten Schritt mit der etablierten Extraktionsmethode extrahiert. Danach wurde der hergestellte Extrakt sowie eine Benzo[a]pyren Lösung, die der Konzentration einer 100%igen Extraktionseffizienz entspricht, im Ames-Test bestimmt.

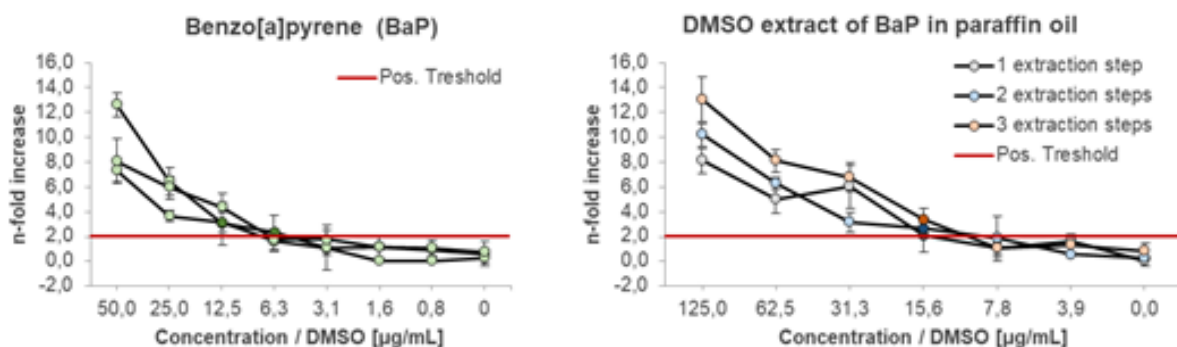


Abbildung 10: Bestimmung der biologischen Extraktionseffizienz von Benzo[a]pyren aus Paraffinöl als Modell für eine Mineralölprobe.

Basierend auf den Ergebnissen der Optimierungsversuche wurden drei verschiedene Mineralöl Proben analysiert. Um die Funktion des Tests zu überprüfen, wurden die drei Mineralöl-Proben in einem zusätzlichen Schritt mit bekannten Mengen an einer mutagenen Referenzsubstanz dotiert und die dotierten Proben im Vergleich gemessen. Das Referenzöl Nr. 1 ist eine Positivkontrolle aus der amerikanischen Norm ASTM E1687-19 und sollte in jedem Fall nachweisbare Mengen an genotoxischen Mineralölbestandteilen enthalten. Weiters wurde ein Rohöl, sowie eine daraus aufbereitete MOAH-Fraktion getestet. Wie aus den Ergebnissen in Abbildung 11 ersichtlich, konnte in allen drei Ölen eine eindeutige genotoxische Wirkung nachgewiesen werden.

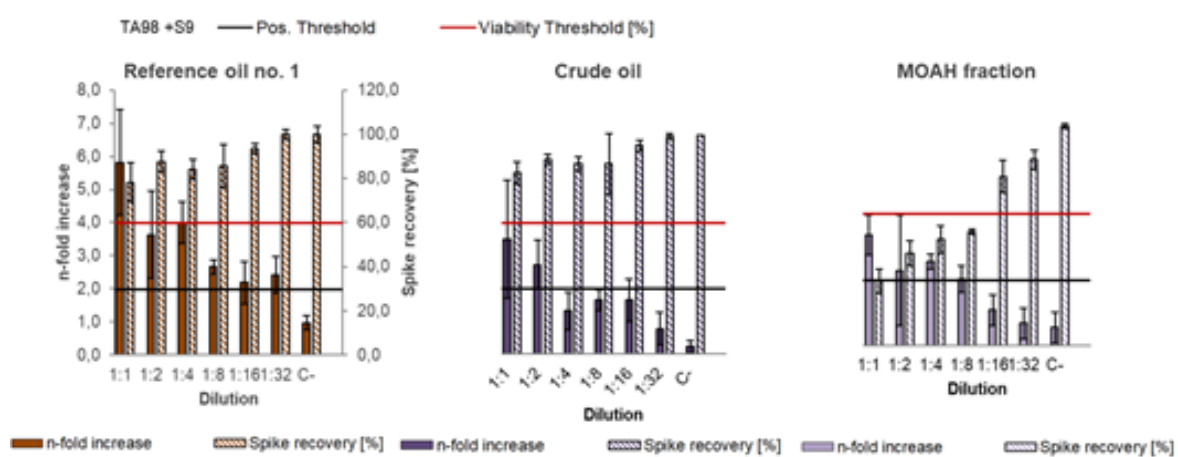


Abbildung 11: Analysenergebnisse von Referenzöl Nr. 1, Rohöl und aufgereinigter MOAH Fraktion im Ames Assay.

Im Rahmen von Validierungsversuchen sollte sichergestellt werden, wie reproduzierbar geringe Mengen an genotoxischen Bestandteilen einer MOAH Fraktion mit dem Ames-Test detektiert werden können. Außerdem sollte anhand der Modellsubstanz Benzo[a]pyren die biologische Nachweisgrenze bestimmt werden. Dafür wurde in mind. 6 unabhängigen Experimenten eine Verdünnungsreihe von Benzo[a]pyren in zwei verschiedenen komplexen Probenmatrizes und im Vergleich im reinen Lösemittel DMSO analysiert.

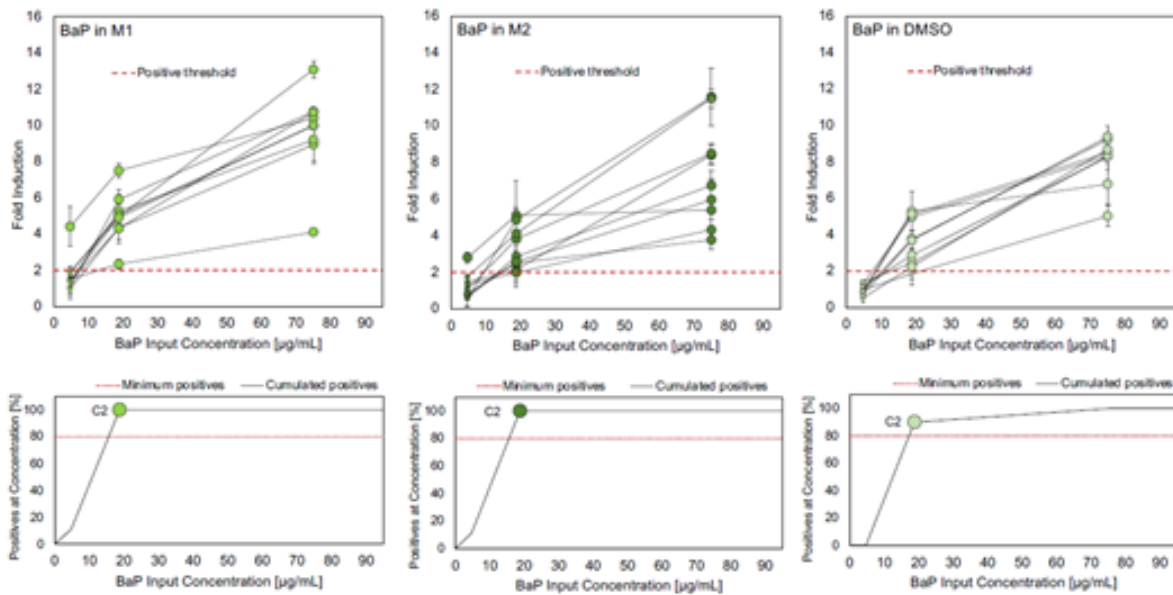


Abbildung 12: Validierung Ames-Test: Reproduzierbarkeit und Nachweisgrenze: Benzo[a]pyren als Modell für genotoxische polyaromatische Kohlenwasserstoffe in der MOAH Fraktion wurde in verschiedenen Konzentrationen in komplexe Probenmatrices dotiert und die biologische Nachweisgrenze wurde in mind. sechs unabhängigen Experimenten bestimmt.

Die Modellsubstanz Benzo[a]pyren konnte ab einer Konzentration von 0.75 µg/mL bezogen auf das Bioassay-Medium bzw. 18.8 µg/mL bezogen auf das Lösemittel verlässlich nachgewiesen werden. Die Reproduzierbarkeit über sechs unabhängige Versuche, jeweils in Dreifachbestimmung und von zwei unterschiedlichen Technikern war zufriedenstellend.

Folglich steht eine Bioassay-Methode zur Verfügung mit der DNA-reaktive, genotoxische Substanzen in Mineralölfractionen detektiert werden können. Die größte Herausforderung stellte die Reduktion des Probenbedarfs dar, da nur sehr geringe Probenmengen zur Verfügung stehen. Durch Miniaturisierung des Ames Tests (Durchführung in 384-Well Platten statt in Petrischalen) und der Verbesserung der Extraktionsmethode, sowie durch die Fokussierung auf den besonders empfindlichen Bakterienstamm TA98, konnte der Probenbedarf insgesamt um einen Faktor 100 reduziert werden.

Dies gelang einerseits, durch den Fokus auf den in der Literatur für die Mineralölanalytik dominierenden Stamm TA98 in der Kondition +S9, wodurch sich der Gesamtbedarf um den Faktor 4 verringern ließ. Die erhobenen Literaturdaten konnten durch OFI interne Messungen bestätigt werden. Abbildung 13 zeigt Ames MPF Ergebnisse zu fünf Mineralölproben, jeweils gemessen in zwei bakteriellen Stämmen in An- und Abwesenheit von metabolischen Leberenzymen.

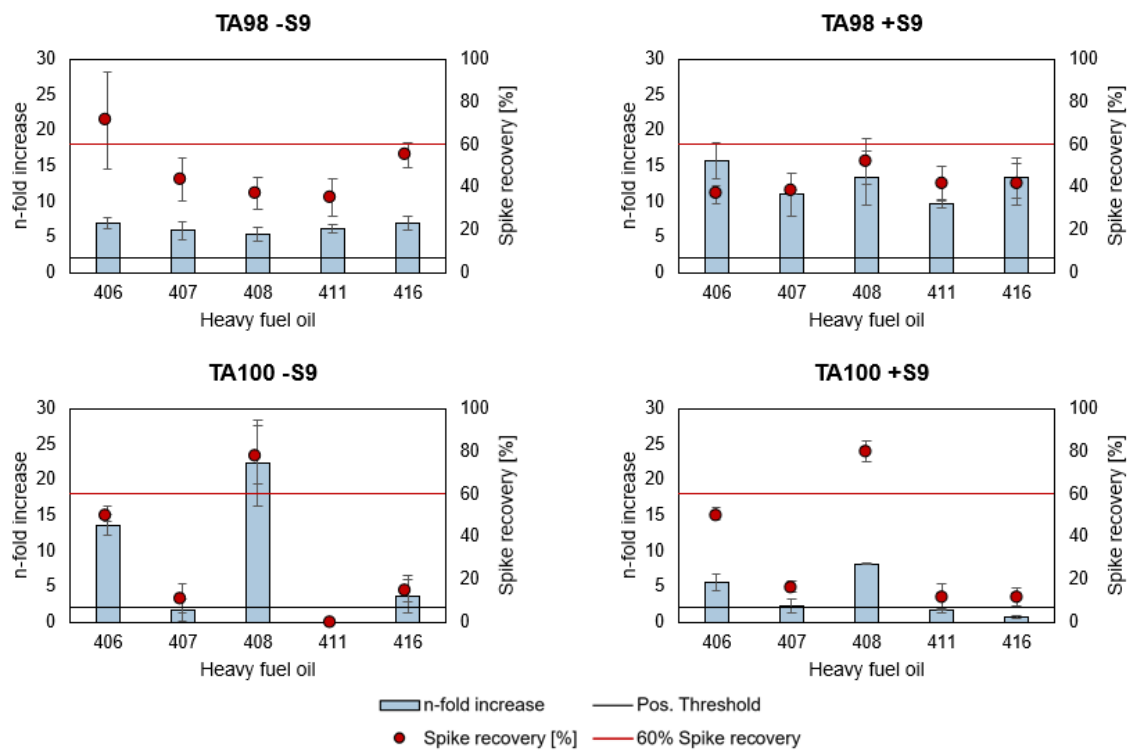


Abbildung 13: Ermittlung von DNA-reaktiven Effekten in Schwerölproben mittels Ames MPF. Blaue Balken zeigen die Stärke der ermittelt Mutagenität an. Rote Punkte geben an, ob es durch die Zugabe von Mineralölproben zu relevanten Inhibierungen kommt.

Während im Stamm TA100 (- und + S9) nur teilweise *in-vitro* Mutagenität detektiert werden konnte, zeigte sich im Stamm TA98 bei allen Proben ein positiver Effekt. Ein deutlicher Unterschied zeigte sich zudem durch Zugabe von S9. Während die mutagenen Effekte in TA98 -S9 nur gering waren, gab es eine deutliche Erhöhung der Effekte nach S9 Zugabe. Die Bedingung TA98 +S9 wurde daher für weitere Versuche ausgewählt.

Anschließend konnte gezeigt werden, dass bereits 10 mg reine MOAH Fraktion extrahiert in 250 µL DMSO zu einem reproduzierbar positiven Ergebnis führen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt. Statt 1 g wird nun eine Menge von 10 mg benötigt. Das entspricht einer Verbesserung um einen Faktor 100.

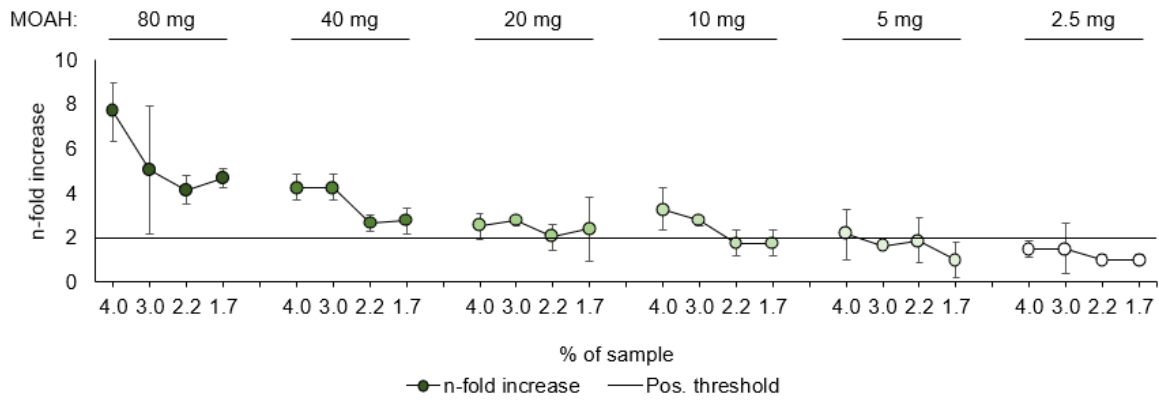


Abbildung 14: Kontinuierliche Reduktion der MOAH Probenmenge pro 250 µL DMSO für den Stamm TA98+S9, die Angaben auf der x-Achse beziehen sich auf die Mengen im Exposure Medium des Ames Tests und sind zu Vergleichszwecken mit 25 zu multiplizieren, um den Verdünnungsgrad der Probe zu erhalten: 100% - 75% - 56% - 42%.

Um die Extraktionseffizienz noch weiter zu verbessern, wurde im Folgenden das Extraktionsverhältnis konstant bei 10 mg /250 µL DMSO gehalten. Abgewandelt wurden hingegen die anderen Konditionen wie Dauer, Temperatur und Schütteln während der Extraktion. In Abbildung 15 sind die Ergebnisse der Vergleichsmessungen dargestellt. Zu erkennen ist, dass durchgehendes Erhitzen bei 60°C die beste Signalverstärkung erzielt hat. Aus Praktikabilitätsgründen wurde die Extraktion über Nacht angestellt und die Messung im Ames Test am Folgetag durchgeführt.

Extraction conditions: 10 mg MOAH / 250 µL DMSO

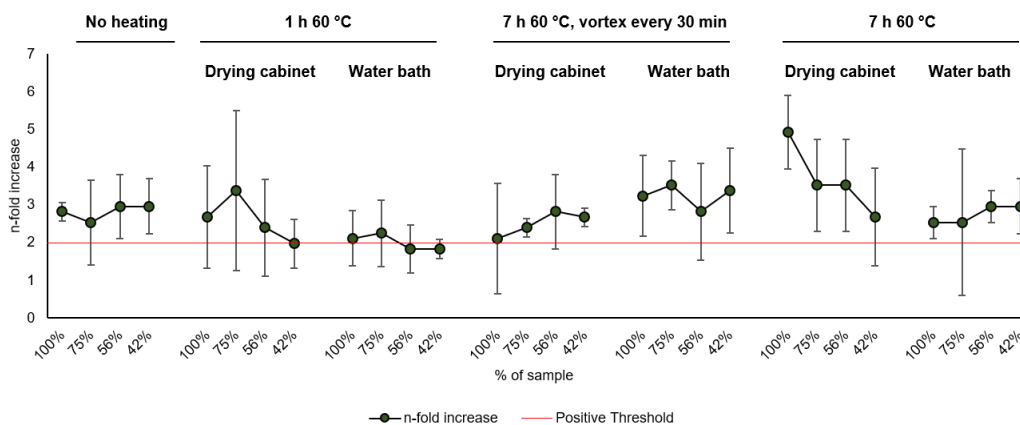


Abbildung 15: Vergleich unterschiedlicher Extraktionsmethoden der MOAH Fraktion, von links nach rechts; ohne Erhitzen; 1h bei 60°C; 7h bei 60°C und alle 30 Minuten vortexen und 7h durchgehend bei 60°C. Zusätzlich wurden unterschiedliche Wärmequellen verglichen nämlich Trockenschrank und Wasserbad. Zu erkennen ist, dass das durchgehende Erhitzen bei 60°C im Trockenschrank die beste Signalverstärkung erzielt hat.

Mit der nun verringerten Probenmenge und der optimierten Probenvorbereitung für den Ames Test wurde im nächsten Schritt eine Validierung durchgeführt. Als Probe wurde dazu eine MOAH Fraktion aus dem Referenzöl Nr. 1 herangezogen, die 30% Tri- und Polyaromaten und 70% Mono- und Diaromaten enthält. 6 unabhängige Doppelbestimmungen wurden über einen Zeitraum von 3 Monaten gemessen. Obwohl das Extraktionsverhältnis auf 10 mg/250 µL bereits erfolgreich gesenkt werden konnte, wurde zusätzlich dazu parallel auch eine Validierung für ein noch geringeres Verhältnis von 5 mg/250 µL durchgeführt. Dies soll sicherstellen, dass auch andere zusammen gesetzte MOAH Fraktionen mit einer geringeren Menge an DNA-reaktiven Stoffen noch verlässlich detektiert werden können. Von jedem Extraktionsverhältnis wurden wie vorher jeweils 4 Verdünnungsstufen gemessen, um einen Dose Response Effekt zu erhalten; 100% - 75% - 56% - 42%.

Die Ergebnisse der Validierung sind in Abbildung 16 und Abbildung 17 dargestellt.

In der Abbildung 16 ist die Validierung als „Heat Map“ zu sehen, wobei negative Ergebnisse violett und positive gelb gekennzeichnet sind. Als Negativprobe wurde ein MOAH freies Öl, Paraffinöl, herangezogen. Da dieses nur aus MOSH besteht, zeigt es keinen positiven Effekt im Ames Test. Die Positivrate, berechnet als positive Ergebnisse bezogen auf die Gesamtzahl der Messungen, war 0%, d.h. in allen Tests wurde reproduzierbar ein negatives Ergebnis ermittelt. Dieser Effekt konnte sowohl für 5mg/250 µL, als auch für die doppelte Menge von 10 mg/250 µL gezeigt werden.

Rechts in Abbildung 16 sind die Ergebnisse der Messungen der MOAH Fraktionen zu erkennen. Während ein Extraktionsverhältnis von 10 mg/250 µL wie erwartet ein reproduzierbar stabil positives Ergebnis lieferte (Positivrate (PR) von 91% über alle Verdünnungsstufen gerechnet), lieferten auch die Proben mit nur 5 mg/250 µL eine eindeutig positive Einstufung mit einer PR von 77%. Erkennbar ist außerdem, dass beide Extraktionsverhältnisse in ihrer unverdünnten Stufe durchgehend positive Ames-Ergebnisse erzielten.

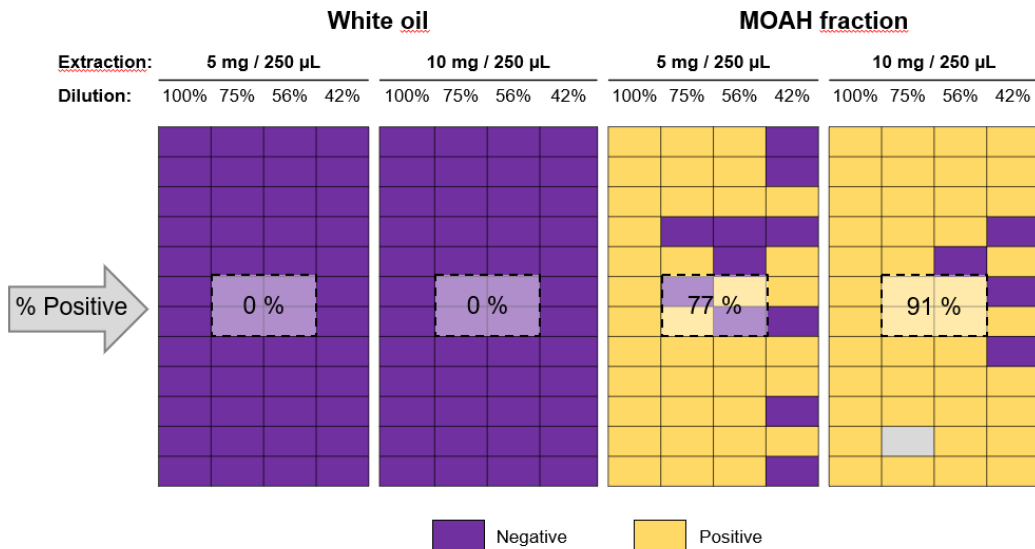


Abbildung 16: „Heat Map“ der Validierungsdaten, links ist die Negativkontrolle (White oil) zu sehen, die mit einer Positivrate von 0% erfolgreich durchgehend negativ gemessen wurde. Auf der rechten Seite sind die Ergebnisse der MOAH Fraktion in zwei Extraktionsverhältnissen 5 mg/250 µL und 10 mg/250 µL dargestellt.

Die zweite Darstellung ist in Abbildung 17 zu sehen und zeigt die Ergebnisse als Boxplots. Auch hier ist gut zu sehen, dass das Paraffinöl durchgehend negativ bewertet wurde und die MOAH Fraktionen im Verhältnis 10 mg/250 µL insgesamt stärkere Effekte im Ames Test erzielten verglichen mit Fraktionen, die mit 5 mg/250 µL extrahiert wurden. Im unteren Teil der Grafik sind auch die relativen Standardabweichungen gelistet. Als Ziel waren <50% relative Standardabweichung gesetzt und tatsächlich erreicht wurden < 37%.

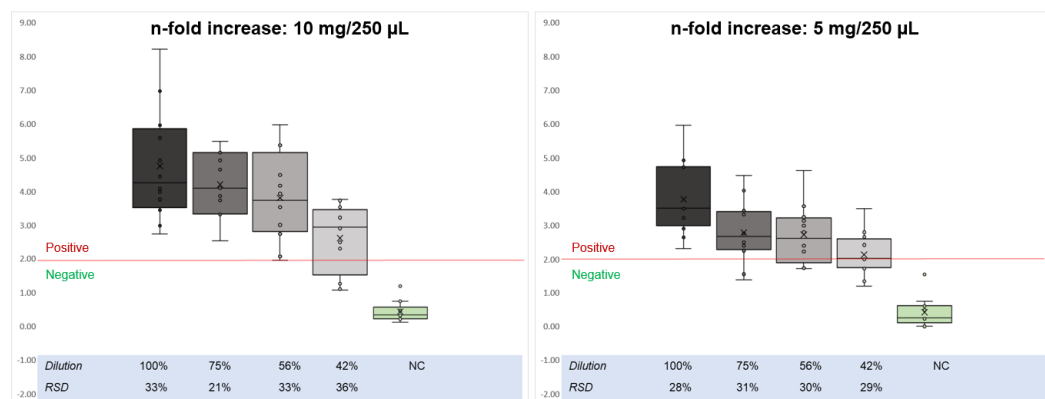


Abbildung 17: Darstellung der Validierungsergebnisse als Boxplot

5.3. Phase 3

5.3.1. Genotoxische Risikobewertung an Realproben

Durch die Einführung einer LC-FLD Methode, war es möglich die MOAH nach Anzahl der aromatischen Ringe in Unterfraktionen zu trennen. Um diesen Vorgang besser zu visualisieren, sei als Beispiel für die Trennung, Isolierung und Anreicherung der relevanten MOAH Fraktionen das rezyklierte Lebensmittelkontaktmaterial gezeigt.

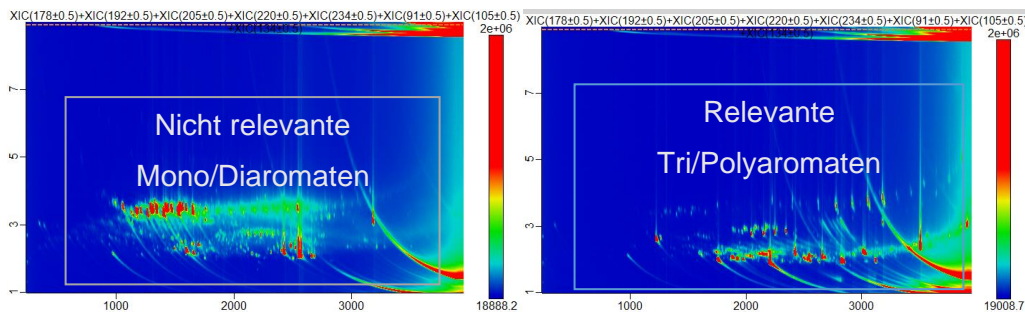


Abbildung 18: Beispiel der Trennung von MOAH in relevante/nicht relevante Subfraktionen.

Bevor die Methode auf weitere Realprobe angewendet wird, wurde ein „Proof of concept“ mit einem Referenzmineralöl durchgeführt. Die getrennten Unterfraktionen wurden mittels GCxGC-ToF charakterisiert und einem Ames MPF Test unterzogen. Wie zuvor beschrieben wurden dazu DMSO Extrakte aus beiden Fraktionen hergestellt. Als Testbedingung wurde wie zuvor erläutert der Stamm TA98 in Anwesenheit metabolischer Enzyme gewählt.

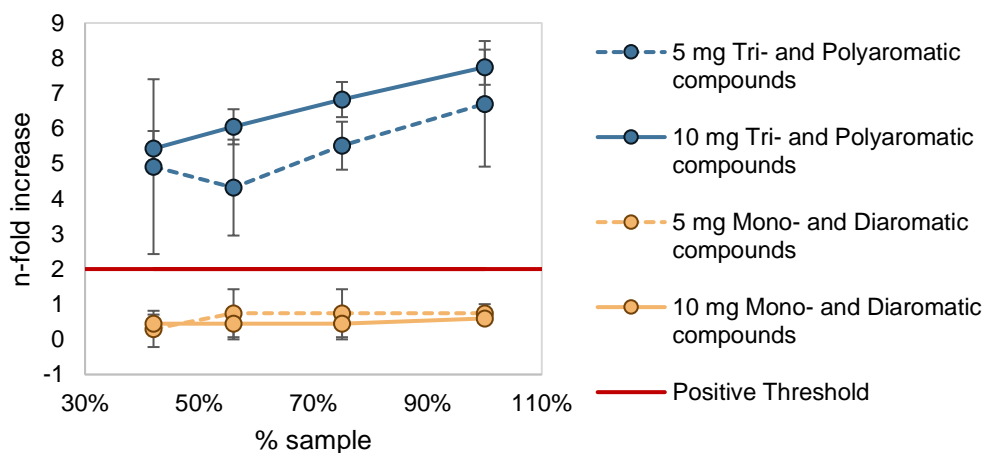


Abbildung 19: Analyse von mono- und di- sowie tri- und polyaromatischen MOAH Fraktionen im Ames MPF Test nach DMSO Extraktion.

Es konnte gezeigt werden, dass mono- und diaromatische MOAH Verbindungen im Ames MPF Test negativ sind, tri- und polyaromatische hingegen positiv. In weiterer Folge wurde die entwickelte Methodik auf Lebensmittelkontaktmaterialien und Lebensmittel selbst angewendet, um eine Risikobewertung zu ermöglichen.

Folgend konnte dieser Effekt auch für reale Proben gezeigt werden. Dafür wurde stets die in vorherigen Arbeitspaketen getroffene Optimierung angewandt und im Stamm TA98+S9 getestet. Zusätzlich konnte die Zusammensetzung der Fraktionen durch GCxGC-ToF weiter aufgeschlüsselt werden (z.B. Methylierungsgrad). Diese Informationen wurden folgend stets in die Evaluierung mit einbezogen.

Das Probenscreening hatte das Ziel die Übereinstimmung der Vorhersagen von unterschiedlichen Methoden (Ames Test und chemische Analytik) zu vergleichen und zu evaluieren, ob durch die in den vergangenen Projektjahren generierten Daten ein Lerneffekt etabliert wurde und eine Vorhersage des Ames Test Ergebnisses (= der DNA-Reaktivität einer Probe) nur durch Anwendung der chemischen Analytik (=Identifizierung der relevanten Substanzklassen in der GCxGC) möglich ist. Abbildung 20 zeigt die Gegenüberstellung der Resultate aus Ames Test und chemischer Analytik für eine Ames negative und eine Ames positive Probe. Es lässt sich postulieren, dass nur ein positiver MOAH Befund in der LC-GC Analyse kein Hinweis auf DNA-Reaktivität ist. Diese ist an die Präsenz von 3 oder mehr aromatischen Ringen geknüpft, welche mittels GCxGC identifiziert werden können.

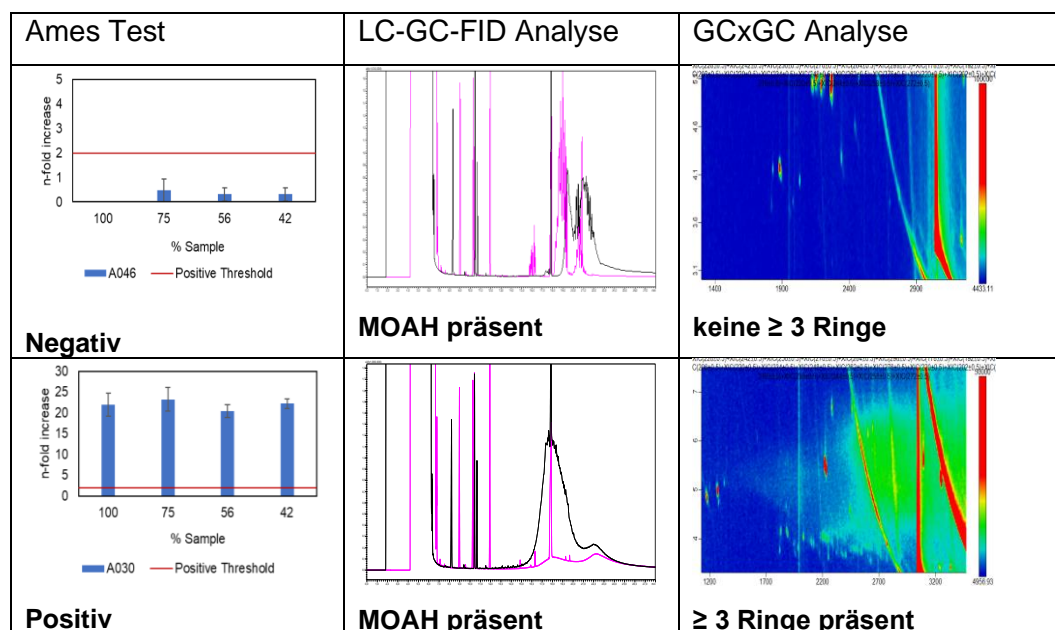


Abbildung 20: Vergleich von Ames Test, LC-GC Analyse und GCxGC Klassifizierung für eine nicht DNA-reaktive (Ames negativ) und eine DNA-reaktive (Ames positive) Probe.

Insgesamt 14 reale Öl-Proben wurden analysiert und individuell bewertet. Ursprünglich war dabei geplant Mineralölfractionen aus realen Lebensmitteln zu testen. Allerdings wurde hier ein eigentlich großer Erfolg des Projektes zum Nachteil - die teilnehmenden lebensmittelproduzierenden Betriebe konnten Aufgrund der fruchtbaren (Zusammen-) Arbeiten während des Projektes ihre MOAH Gehalte so weit reduzieren, dass in keiner Probe ausreichende Mengen an MOAH nachgewiesen werden konnte, um ohne unverhältnismäßigen Aufwand ausreichende Mengen einer MOAH Fraktion für den Bioassay aufzutrennen. Der Fokus wurde daher – nach Rücksprache und Einverständnis mit dem gesamten Konsortium - weg von den Lebensmitteln selbst und hin zu potenziellen Eintragungsquellen der Projektpartner geschwenkt. Diesbezüglich gab es Einsendungen von Ölen, die in der Maschinerie verwendet werden (z.B. Weißöl, Schmierfett, Edelstahlpflege sowie Getriebe/Mehrzweck-, Prozess- und Kompressoröle für die Lebensmittel- und/oder Pharmaindustrie). Alle dabei untersuchten Öle wiesen im reinen hochkonzentrierten Zustand keine DNA reaktiven Effekte auf, wodurch auch im Falle von Kotaminationen das Gefahrenpotential als gering eingestuft werden kann. Es wurden aber auch Worst-Case Proben mit kritischen Ölen untersucht, die zum Teil sehr wohl eine mutagene Aktivität zeigten. Bei diesen DNA-reaktiven Proben handelt es sich um ein Hochleistungs-Motoröl für Benzin- und Dieselmotoren in PKWs und leichten Nutzfahrzeugen sowie ein Hochleistungs-Sägeketten-Haftöl.

Dabei konnte gezeigt werden, dass eine sehr hohe Übereinstimmung zwischen den Ames Ergebnissen und den Vorhersagen aufgrund der chemischen Analyse bewerkstelligt werden konnte. Die Ergebnisse der verschiedenen Endpunkte waren durchgehend deckend und sind vielversprechend: in Zukunft sollte es möglich sein, mit schnellerer chemischer Analyse auch bereits bekannte mutagene Effekte beziehungsweise Verunreinigungen zu erkennen und korrekt zu bewerten, ohne zusätzlich einen Ames Test durchführen zu müssen. Dies stellt einen immensen Gewinn hinsichtlich benötigter Analysenzeit und Ressourcen dar.

Die etablierte Methode wurde weiters angewendet um Lebensmittelverpackungs-relevante Materialien zu prüfen (rezyklierte Polyolefine und rezyklierte Papiere). Diese Materialien zeigten tatsächlich DNA-reaktive Effekte im Ames Test und teils (bei rezyklierten Polyolefinen) konnten sogar relevante Mengen an Ames positiven ≥ 3 Ring-MOAH isoliert werden. Trotzdem wiesen die Ergebnisse darauf hin, dass die (teils starken) DNA-Reaktivitäten dieser Proben nicht oder nur zu einem geringen Teil durch Mineralöl-Kombinationen erklärbar waren. Die (Haupt-) Ursache für die mutagenen Effekte bleibt unbekannt und bedarf weiterer Forschung. Ein Mineralöl-Kontext konnte durch das entwickelte Verfahren aber als sehr unwahrscheinlich eingestuft werden.

Zusammenfassend liegt mit Ende des Projektes eine Methode zur Evaluierung von mutagenen Effekten vor, die auf Mineralölfractionen (die MOAH) abgestimmt ist und auf diese optimiert wurde. Die Probenvorbereitung ist divers aufgestellt, sodass eine flexible Testung unterschiedlicher Fraktionen möglich ist. Zuletzt zeigt die Methode Kompatibilität zwischen Bioassay und chemischer Analyse und ist somit in der Lage DNA-Reaktivität mit präsenten und identifizierten Substanzklassen zu verknüpfen. Das sind hervorragende Ergebnisse, die – unseres Wissens - momentan einzigartig sind. Sie bilden eine exzellente Grundlage, um das in diesem Projekt verfolgte Prinzip, der Kombination aus Bioassay und instrumenteller Analytik, auch zukünftig auf andere komplexe Fragestellungen anwenden zu können.

Die Ergebnisse sind auch für die toxikologische Bewertung von Mineralölverunreinigungen von hoher Bedeutung. Von hoher toxikologischer Relevanz sind bei Mineralölverunreinigungen vor allem aromatischen Fraktionen mit drei oder mehr aromatischen Ringen, für die im Projekt eine DNA-reaktive, mutagene Wirkung nachweisbar war. Aromatische Mineralölverbindungen mit weniger aromatischen Ringen, zeigten keine mutagene Wirkung. Für eine toxikologische Bewertung auf Basis des Threshold of Toxicological Concerns Konzept der EFSA macht dies einen sehr großen Unterschied, für Mineralölfractionen ohne DNA-reaktiver, mutagener Wirkung können 600-fach höhere toxikologische Grenzwerte angenommen werden als für kritische Fraktionen mit mutagener Wirkung¹.

6. Fazit – aktueller Wissenstand

Im Bereich der Mineralölkontaminationen hat sich in den letzten Jahren vieles getan: Viele Kontaminationsquellen im gesamten Produktionsprozess wurden identifiziert, die anfänglichen zum Teil hohen Gehalte (bis zu mehreren Gramm pro Kilogramm) im Lebensmittel auf wenige Milligramm reduziert. In der Analytik wurden standardisierte Methoden mit entsprechender Nachweisempfindlichkeit entwickelt.

Bisher war es aber schwierig von detektierten Mineralöl Kontaminationen auf mögliche Gesundheitsgefahren rückzuschließen. Im Rahmen dieses Projekts konnten dabei erstmals eine umfassende Charakterisierung mittels chemischer Analytik mit toxikologischen Tests der identifizierten Fraktionen kombiniert werden. Dadurch konnte gezeigt werden, dass nur bestimmte aromatische Mineralölfractionen ein mutagenes Potential zeigen, aromatische Mineralölkontaminationen mit drei oder mehr aromatischen

¹ EFSA Scientific Committee, et al. "Guidance on the use of the Threshold of Toxicological Concern approach in food safety assessment." *EFSA Journal* 17.6 (2019): e05708.

Ringen. Das ermöglicht eine deutlich differenziertere Beurteilung von detektierten Mineralölverunreinigungen in Lebensmitteln. Im Rahmen eines Screenings verschiedenster Maschinenöle, die nach Einschätzung der Industriepartner in diesem Projekt ein reales Kontaminationsrisiko für Lebensmittel darstellen, konnte gezeigt werden, dass keines dieser Öle als kritisch eingestuft werden muss, da keine DNA-reaktiven, mutagenen MOAH Fraktionen detektiert werden konnten.

Die im Projekt entstandene Publikation [20] wurde bereits von regulatorischer Seite aufgegriffen. Sie dient sowohl in der aktuellen Stellungnahme der EFSA [6] und in einem Leitfaden des JRC der europäischen Kommission [37] als eine Referenz dafür, dass bei Mineralölverunreinigungen vor allem bestimmte aromatische Fraktionen von hoher toxikologischer Relevanz sind. Nicht aromatische, gesättigte Mineralölfractionen (MOSH) wurden bei der Neubewertung der EFSA als unbedenklich eingestuft. Für die als krebserregend geltende MOAH gibt es erstmals Grenzwerte.

Das österreichische Projekt „MOSH MOAH – Reduktion von Mineralöl in Lebensmitteln“ hat aktiv dazu beigetragen, Lösungen für die Problematik von Mineralölrückständen in Lebensmitteln entlang der gesamten Produktionskette zu finden.

Ziel des vorliegenden Projektes war es die Eintragungsquellen für MOSH und MOAH in Lebensmittel zu typisieren, Methoden der Detektion zu entwickeln und zu verbessern, eine Risikoeinschätzung hinsichtlich des genotoxischen Potentials der typisierten Verbindungen durchzuführen sowie Empfehlungen und Leitlinien im Umgang mit MOSH/MOAH auszuarbeiten.

Die Zielsetzungen konnten erfolgreich erreicht werden.

Highlights:

- Probenvorbereitungsverfahren für viele Matrices im Routinebetrieb wurden entwickelt und in effektiver Zusammenarbeit mit der wissenschaftlichen Community und öffentlichen Stellen/Behörden bis zu validierten und standardisierten Methoden gebracht.
- Die Eignung von GCxGC-ToF als weiterführende, chromatographische Methode zur routinemäßigen Anwendung bei der Verifizierung und Charakterisierung von Proben und zur Einstufung des genotoxischen Potentials wurde bewiesen. „Best-Practice“-Leitlinien wurden verfasst und der entsprechenden Community zur Verfügung gestellt.

- Identifizierung und Separierung hochreiner MOAH Fraktionen und Sub-Fractionen aus Mineralöl und Lebensmittelkontaktmaterialien zur Bewertung des genotoxischen Gefahrenpotentials der gesamten Fraktionen und der Sub-Fractionen getrennt nach Ringanzahl mittels AMES Test und Korrelation der Ergebnisse mit in der chemischer Analytik identifiziert Substanzgruppen.
- Validierung der entwickelten, kombinierten Methode aus AMES Test und chemischer Analytik zur Beurteilung der Genotoxizität bei positiven MOAH Befunden.
- Die in diesem Projekt entstandene wissenschaftliche Publikation wurde in einem aktuellen Leitfaden des Joint Research Centers der Europäischen Kommission sowie in einer Stellungnahme der europäischen Gesundheitsbehörde EFSA aufgegriffen. Sie dient dort jeweils als ein wissenschaftlicher Beleg dafür, dass nur bestimmte Mineralölfractionen von hoher toxikologischer Bedeutung sind.

KONTAKT

Gemeinnützige Lebensmittelinitiative

Steyrtalstraße 8. 4523 Neuzeug

Tel.: 0732/908 515

References

1. Grob K, Biedermann M, Caramaschi A, Pacciarelli B. LC-GC analysis of the aromatics in a mineral oil fraction: Batching oil for jute bags. *J. High Resol. Chromatogr.* 1991; <https://doi.org/10.1002/jhrc.1240140109>
2. Could the Ukrainian sunflower oil contaminated with mineral oil wake up sleeping dogs? *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2008; <https://doi.org/10.1002/ejlt.200800234>
3. Biedermann M, Grob K. Comprehensive two-dimensional GC after HPLC pre-separation for the characterization of aromatic hydrocarbons of mineral oil origin in contaminated sunflower oil. *J Sep Sci.* 2009; <https://doi.org/10.1002/jssc.200900366>
4. Foodwatch. Project-report: International test of various canned baby milk products for their content of mineral oil hydrocarbons (MOSH/MOAH): A project of foodwatch international with foodwatch Germany, foodwatch Netherlands and foodwatch France; 2019.
5. Foodwatch. Toxische Mineralöle in Lebensmitteln - Labortests 2021; 2021.
6. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), Dieter Schrenk, Margherita Bignami, Laurent Bodin, James Kevin Chipman, Jesús del Mazo, Bettina Grasl-Kraupp, Christer Hogstrand, Laurentius (Ron) Hoogenboom, Jean-Charles Leblanc, Carlo Stefano Nebbia, Elsa Nielsen, Evangelia Ntzani, Annette Petersen, Salomon Sand, Tanja Schwerdtle, Christiane Vleminckx, Heather Wallace, José Angel Gomez Ruiz, Olaf Mosbach-Schulz, Marco Binaglia and James Kevin Chipman. Update of the risk assessment of mineral oil hydrocarbons (MOH) in food -Draft; 2023.
7. EFSA Panel on food contact materials, enzymes, flavourings and processing aids (CEF). Scientific Opinion on Mineral Oil Hydrocarbons in Food. *EFSA (EFSA Journal)*. 2012; <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2704>
8. S. Bratinova, P. Robouch, E. Hoekstra. Guidance on sampling, analysis and data reporting for the monitoring of mineral oil hydrocarbons in food and food contact materials - 2nd Edition. JRC133174. Joint Research Centre. 2023. <https://data.europa.eu/doi/10.2760/963728> [Titel anhand dieser DOI in Citavi-Projekt übernehmen].
9. Bratinova S, Hoekstra E. Guidance on sampling, analysis and data reporting for the monitoring of mineral oil hydrocarbons in food and food contact materials. EUR. Scientific and technical research series, vol. 29666. Luxembourg: Publications Office of the European Union; 2019.
10. Standing Committee on Plants, Animals, Food and Feed. SUMMARY REPORT: Mineral oil hydrocarbons in food: follow-up to the December 2021 Foodwatch report. 2022.

11. CEN-EN 16995:2017: Foodstuffs - vegetable oils and foodstuff on basis of vegetable oils - determination of mineral oil saturated hydrocarbons (MOSH) and mineral oil aromatic hydrocarbons (MOAH) with on-line HPLC-GC-FID analysis (2017); 1699.
12. Draft version for updating CEN-EN 16995:2017: Vegetable oils - Determination of mineral oil saturated hydrocarbons (MOSH) and aromatic hydrocarbons (MOAH) with online coupled HPLC-GC-FID analysis - Method for low limit of quantification (2022); 2022.
13. Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft, editor. Deutsche Einheitsmethoden zur Untersuchung von Fetten, Fettprodukten, Tensiden und verwandten Stoffen. Gesamtwerk mit 26. Aktualisierungslieferung zur 2. Auflage, 2020. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 2020.
14. Bratinova S., Robouch P., Beldi G., Senaldi C., Karasek L., Gonçalves C., Valzacchi S., Garcia-Ruiz S., Hoekstra E. Determination of MOAH in Infant Formula: JRC IF 2022-05 : the ring trial validation study. Joint Research Centre (European Commission). 2023. <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/3220b5f8-d9ac-11ed-a05c-01aa75ed71a1/language-en>. Accessed 10 May 2023.
15. Fiselier K, Fiorini D, Grob K. Activated aluminum oxide selectively retaining long chain n-alkanes: Part II. Integration into an on-line high performance liquid chromatography-liquid chromatography-gas chromatography-flame ionization detection method to remove plant paraffins for the determination of mineral paraffins in foods and environmental samples. *Anal Chim Acta*. 2009; <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.12.011>
16. Fiselier K, Fiorini D, Grob K. Activated aluminum oxide selectively retaining long chain n-alkanes. Part I, description of the retention properties. *Anal Chim Acta*. 2009; <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.12.007>
17. Nestola M, Schmidt TC. Determination of mineral oil aromatic hydrocarbons in edible oils and fats by online liquid chromatography-gas chromatography-flame ionization detection - Evaluation of automated removal strategies for biogenic olefins. *J Chromatogr A*. 2017; <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.05.035>
18. Nestola M. Automated workflow utilizing saponification and improved epoxidation for the sensitive determination of mineral oil saturated and aromatic hydrocarbons in edible oils and fats. *J Chromatogr A*. 2022; <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463523>
19. Hochegger A, Moret S, Geurts L, Gude T, Leitner E, Mertens B, O'Hagan S, Poças F, Simat TJ, Purcaro G. Mineral oil risk assessment: Knowledge gaps and roadmap. Outcome of a multi-stakeholders workshop. *Trends in Food Science & Technology*. 2021; <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.021>

20. Hochegger A, Wagenhofer R, Savić S, Mayrhofer E, Washüttl M, Leitner E. Combination of Multidimensional Instrumental Analysis and the Ames Test for the Toxicological Evaluation of Mineral Oil Aromatic Hydrocarbons. *J Agric Food Chem.* 2022; <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c05970>
21. Arcella D, Baert K, Binaglia M. Rapid risk assessment on the possible risk for public health due to the contamination of infant formula and follow-on formula by mineral oil aromatic hydrocarbons (MOAH). *EFS3.* 2019; <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2019.en-1741>
22. Biedermann M, Fiselier K, Grob K. Aromatic hydrocarbons of mineral oil origin in foods: method for determining the total concentration and first results. *J Agric Food Chem.* 2009; <https://doi.org/10.1021/jf901375e>
23. Bund für Lebensmittelrecht und Lebensmittelkunde e. V. (BLL). TOOLBOX zur Vermeidung von Einträgen unerwünschter Mineralölkohlenwasserstoffe in Lebensmittel. 2017. <https://www.lebensmittelverband.de/de/lebensmittel/verpackung/mineraloeluebergaenge/toolbox-vermeidung-mosh-moah>. Accessed 2 Jun 2023.
24. Biedermann M, Grob K. On-line coupled high performance liquid chromatography-gas chromatography for the analysis of contamination by mineral oil. Part 2: migration from paperboard into dry foods: interpretation of chromatograms. *J Chromatogr A.* 2012; <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.05.096>
25. Biedermann M, Grob K. On-line coupled high performance liquid chromatography-gas chromatography for the analysis of contamination by mineral oil. Part 1: method of analysis. *J Chromatogr A.* 2012; <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.05.095>
26. Biedermann M, McCombie G, Grob K, Kappenstein O, Hutzler C, Pfaff K, Luch A. FID or MS for mineral oil analysis? *J Consum Prot Food Saf.* 2017; <https://doi.org/10.1007/s00003-017-1127-8>
27. Bratinova S, Hoekstra E, Emons H, Hutzler C, Kappenstein O, Biedermann M, McCombie G. The reliability of MOSH/MOAH data: a comment on a recently published article. *J Consum Prot Food Saf.* 2020; <https://doi.org/10.1007/s00003-020-01287-w>
28. Koster S, Varela J, Stadler RH, Moulin J, Cruz-Hernandez C, Hielscher J, Lesueur C, Rož J, Simian H. Mineral oil hydrocarbons in foods: is the data reliable? *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2020; <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1678770>
29. FW AT. Mineralöl in Lebensmitteln. 2023. <https://www.foodwatch.org/at/informieren/mineraloel>. Accessed 2 Jun 2023.
30. Reichardt A. Mineralöle – versteckte Gefahr in unseren Verpackungen. *Berliner Morgenpost.* 2017.

31. Gaisch-faustmann H. Mineralöl in der Schokolade: So reagiert Hofer. Kleine Zeitung. 2017.
32. Dr. Sieglinde Stähle. „Mineralöl“ aus der Sicht der Lebensmittelwirtschaft: Mineralöl im Fokus des gesundheitlichen Verbraucherschutzes. 17. BfR-Forum Verbraucherschutz. Berlin; 2017.
33. European Commission. EMPFEHLUNG (EU) 2017/84 DER KOMMISSION vom 16. Januar 2017 über die Überwachung von Mineralölkohlenwasserstoffen in Lebensmitteln und Materialien und Gegenständen, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen. EFS2. 2017; <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2704>
34. European Commission. Joint Research Centre. Determination of MOSH and MOAH in muesli and paperboard: proficiency test report JRC FCM 20/01: Publications Office; 2021.
35. Goncalves C, Karasek L, Bratinova S, Robouch P, Beldi G, Senaldi C, Valzacchi S, Hoekstra E. Determination of MOSH/MOAH in Shell SN500 mineral oil: JRC IF 2021-03 : the third interlaboratory comparison. EUR, vol. 30990. Luxembourg: Publications Office of the European Union; 2022.
36. Robouch P, Bratinova S, Goncalves C, Karasek L, Beldi G, Senaldi C, Valzacchi S, Hoekstra E. Mineral oil in infant formulas: Guidelines for integrating chromatogram. EUR, vol. 31101. Luxembourg: Publications Office of the European Union; 2022.
37. European Commission. Joint Research Centre. Determination of MOSH and MOAH in edible oil: proficiency test report JRC FCM 22/01: Publications Office; 2023.