

Analyse des MCPD et glycidol dans les produits alimentaires avec la station de travail CHRONECT MCPD et le module ISO 18363-1



Note d'application 147

Introduction

Les 3-Monochloro-1,2-propanediol (3-MCPD), 2-monochloro-1,3-propanediol (2-MCPD) et glycidol appartiennent au groupe des contaminants issus de la fabrication des aliments. Les esters gras MCPD peuvent être produits pendant le raffinage à haute température en présence de sels de chlorure. Le raffinage est un procédé chimique et physique nécessaire à la production de nombreuses huiles. C'est grâce à ce traitement à haute température que les odeurs et les goûts indésirables ainsi que les traces de composés toxiques comme les pesticides, les métaux lourds ou les mycotoxines peuvent être éliminés dans la suite du procédé. L'analyse des 3-Monochloro-1,2-propanediol (3-MCPD), 2-monochloro-1,3-propanediol (2-MCPD) et glycidol est devenue de plus en plus importante en raison de leur cancérogénicité.

Les tests sur les animaux ont montré qu'il y a un risque accru de cancer avec des apports élevés en 3-MCPD libre. Depuis mars 2016, une nouvelle limite d'apport journalier de 0.8 µg/kg de poids de l'individu a été établie par l'European Food Safety Authority (EFSA). Plusieurs méthodes sont disponibles actuellement pour l'analyse des esters MCPD. Ces méthodes peuvent être divisées en deux groupes : analyse directe par LC-MS/MS ou indirecte par GC-MS. L'analyse directe demande beaucoup de travail en raison du grand nombre d'esters et chaque ester est analysé séparément. En raison de cela, la méthode indirecte est le plus souvent utilisée en routine. En revanche l'implémentation manuelle de cette méthode requiert du temps. La société Axel Semrau a donc automatisé et optimisé les méthodes manuelles les plus communes.

Méthodes automatisées

La méthode DGF C-VI 18(10), ISO 18363-1 ou AOCS Cd 29c-13 est recommandée, car c'est la méthode la plus performante pour les analyses de routine. Elle a donc servi de base pour l'automatisation. La préparation d'échantillon montrée sur la figure 1, est totalement automatisée sur le passeur d'échantillon. De plus, une étape d'évaporation a été éliminée après démonstration qu'elle n'améliorait pas les performances de la méthode. La technologie « Clean Technology » a permis d'optimiser d'avantage la méthode et celle-ci a été nommée « DGF Fast & Clean ».

Une application possible est l'analyse des 3-MCPD et 2-MCPD et l'analyse de la teneur en glycidol. Les analytes sont dans un premier temps convertis dans leur forme libre. Le relargage à partir des acides gras est réalisé par transestérification. D'après la méthode DGF, deux approches sont nécessaires dans la préparation d'échantillon pour l'analyse de la teneur en glycidol. Dans l'approche A, la transestérification est stoppée par l'ajout de chlorure de sodium. Dans le processus, les esters d'acides gras MCPD et les esters glycidiques réagissent pour former le MCPD libre. Dans l'approche B, la réaction est stoppée par l'ajout d'une solution de bromure de sodium. Dans ce cas, seuls les esters d'acide gras MCPD réagissent pour former le MCPD libre. Le MCPD libre est ensuite extrait et dérivatisé lors d'une étape ultérieure.



Figure 1 : Préparation des échantillons pour l'analyse indirecte de MCPD avec la méthode « DGF fast & Clean » automatisée avec la station de travail CHRONECT MCPD

Ensuite, l'étape de lavage est effectuée afin de protéger le GC-MS et d'allonger les intervalles de maintenance, suivie de l'analyse par GC MS/MS. La différence entre l'approche A et B est multipliée par un facteur (t) qui a été déterminé expérimentalement, et ceci permet de calculer la teneur en glycidol.

Configuration de l'appareil pour la méthode « DGF Fast & Clean »

La configuration de l'appareil pour la méthode « DGF Fast & Clean » est montrée en figure 2. Pour l'automatisation de la préparation d'échantillon, un robot de 160 cm CHRONECT Robotic DHR a été choisi car il offre la place suffisante pour l'ensemble des modules nécessaires et peut être adapté facilement pour toutes les autres méthodes d'analyse des MCPD et applications futures. Une variante avec un robot de 120 cm est également possible. Le dilueur est équipé de deux solvants (n-hexane et agent d'extraction). Pour cette application, le passeur CHRONECT Robotic peut également être monté sur un GC-MS existant.

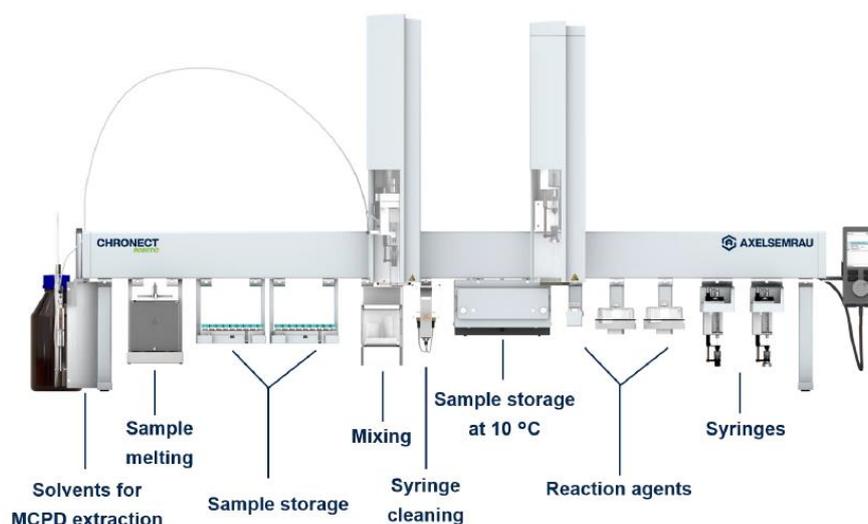


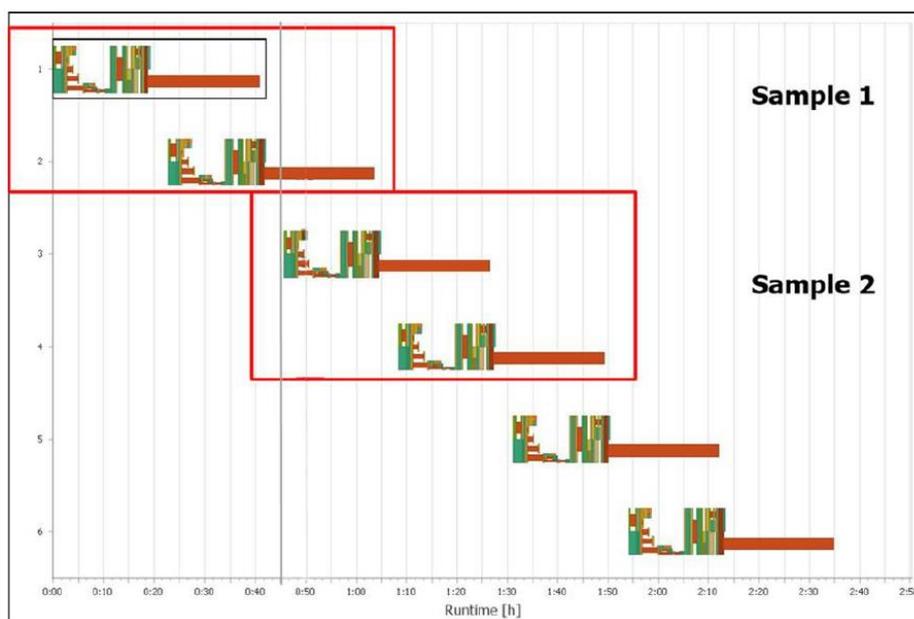
Figure 2 : configuration du passeur automatisé CHRONECT Robotic DHR RSI/RTC avec les modules

Grâce au passeur CHRONECT Robotic et au logiciel CHRONOS, les étapes peuvent être groupées, comme montré sur la figure 3. Avec la méthode « DGF Fast & Clean », les résultats des approches A et B sont disponibles en 48 minutes. Les autres méthodes demandent jusqu'à 18 heures avant d'avoir le premier résultat.

Afin d'empêcher la précipitation du réactif de dérivation (acide phenyl-boronique) dans la colonne de chromatographie et dans la source du triple quadropole, le système GC a été équipé de la « Clean technology ». Cette technologie participe grandement à l'augmentation de la durée de vie du triple quadropole, qui peut aller au-delà des 3000 injections et garanti des données fiables. Le lavage chimique enlève l'excès du réactif de dérivation et le nettoyage physique supprime une grande partie de la matrice de l'échantillon par lavage à contrecourant. L'ensemble du système est contrôlé par le logiciel CHRONOS ce qui rend les procédures complexes facilement utilisables. Les solutions CHRONECT sont préinstallées chez le fournisseur, testées lors d'un test d'acceptation (FAT), puis installées chez l'utilisateur. Elles sont ensuite testées une nouvelle fois lors d'un test d'acceptation sur site (SAT). Cette procédure garanti la mise en service la plus rapide possible.

Grâce aux étapes de travail imbriquées, 36 échantillons peuvent être analysés en 24 heures, ce qui correspond à 72 analyses (approches A et B). En plus d'une précision élevée, le système permet également des économies de temps substantielles. Les résultats obtenus avec la méthode « DGF Fast & Clean » sont conformes à la méthode DGF traditionnelle. De plus, le système CHRONECT Robotic permet l'automatisation d'autres méthodes et leur implémentation dans le laboratoire.

Par exemple, la méthode 3 en 1 AOCS Cd 29b-13 ou ISO 18363-2 peut être automatisée. Dans ce cas, un tiroir réfrigéré additionnel est intégré à l'appareil. Pour la méthode Unilever (AOCS Cd 29a-13 ou ISO 18363-3), une centrifugeuse et une unité d'évaporation peuvent être intégrées.



Paramètres de mesure et résultats

Dans la méthode « DGF Fast & Clean », les composés 3-MCPD et 2-MCPD et leurs dérivés deutérés respectifs sont détectés à l'aide d'un triple quadropôle. Dans ce cas, un ion est utilisé pour la qualification et un autre pour la quantification. Les énergies de collision correspondantes pour la fragmentation de l'ion parent sont déterminées expérimentalement. Cette méthode ainsi que la méthode Zwagerman (Draft ISO 18363-4), peuvent donc être facilement automatisées. La méthode Weisshaar a également été implémentée.

Les paramètres importants pour chaque composant du système sont récapitulés dans le tableau 1. Afin de valider l'application, la méthode DGF classique a d'abord été traitée. Dans ce cas, l'échantillon est préparé et injecté automatiquement, en accord stricte avec les spécifications de la norme DGF, y compris l'évaporation de l'agent d'extraction. Lors de la validation le rac-1,2-bis-pal-mitoyl-3-chloropropanediol et le rac-1,3-dis-tearoyl-2-chloropropanediol ont été utilisés.

Tableau 1 : paramètres de mesure du triple quadropôle pour la détection des 3-MCPD et 2-MCPD

Injector			
SSL, 1 µL injection volume, splitless (split 1:30 after 1 min)			
Temperature [°C]	Heating rate [°C/min]	Hold time [min]	Total [min]
85.0		0.10	0.10
200.0	200.0	1.00	1.68
300.0	200.0	10.00	12.18
Pressure regulation			
1.5 mL/min constant flow, backflush on after 8.5 min			
Analytical column			
2x Rxi-5 MS 15 m, 0.25 mm inner diameter, 0.25 µm film			
Oven program			
Temperature [°C]	Heating rate [°C/min]	Hold time [min]	Total [min]
80.0		1.00	1.00
150.0	10.0	0.00	8.00
320.0	30.0	10.00	23.67
Detector			
Transfer line 280 °C, CID gas argon, MRM mode			
Name	Retention time [min]	Precursor ion	Product ion
2-MCPD	7.71	198.00	104.00
		196.00	104.00
2-MCPD-d5	7.66	203.00	107.00
		201.00	93.00
3-MCPD	7.36	196.00	147.00
		196.00	91.00
3-MCPD-d5	7.32	201.00	150.00
		201.00	93.00

Tableau 2 : rendement (RC en %) et reproductibilité (RP en %) des méthodes DGF classique et « DGF Fast & Clean » pour les parties A et B mesurées pendant 4 jours consécutifs.

	„DGF classic“		„DGF Fast & Clean“	
	RC	RP	RC	RP
3-MCPD Part A	102.6	3.9	91.6	7.7
3-MCPD Part B	94.3	3.9	101.9	8.8

De l'huile d'olive vierge a été dopée avec les deux composés en quantités connues, puis des échantillons ont été traités avec la station de travail CHRONECT MCPD. L'huile d'olive vierge

est adaptée pour une matrice de blanc dans ce cas, car elle est pressée à froid et ne devrait pas contenir d'esters MCPD. Les mesures de blanc correspondantes ont confirmé cette hypothèse, avec une valeur inférieure à 0.02 mg/kg d'échantillon pour le 3-MCPD et le 2-MCPD. Les résultats de la validation sont montrés dans le tableau 2.

Une limite de détection de 0.011 mg/kg dans de la graisse 100% a été obtenue pour le 3-MCPD, et la limite de quantification est de 0.025 mg/kg. De plus, une huile de référence de FAPAS a été mesurée, avec des teneurs en 3-MCPD et 2-MCPD connues. Par la suite, la méthode « DGF Fast & Clean » a été intégralement validée en routine en accord avec la réglementation de la Commission de l'Union européenne EU No836/2011. Les résultats de cette validation sont montrés dans le tableau 3.

Tableau 3 : résultats de la validation d'une station de travail CHRONECT MCPD dans un laboratoire d'analyses de routine avec une limite de quantification de 0.05 mg/kg de graisse.

Validation parameter	Validation data	Criterion for characteristics of the method	Criteria met
System precision	2.9 %	< 10 %	✓
Calibration 0.05 – 0.5 mg/kg 0.5 – 5.0 mg/kg	R ² : 0.9996 R ² : 0.9999	R ² > 0.99	✓
LOQ 0.05 mg/kg	Part A 7.4 % Part B 9.0 %	RSD < 20 % S/N 1:10	✓
Linearity 0.05 / 2.0 / 10 mg/kg	Part A 4.2 % Part B 3.9 %	R ² > 0.99	✓
Accuracy	Part A 95 % Part B 88 %	75 - 110 %	✓
Reproducibility	Part A 3.9 % Part B 2.8 %	RSDr < 1.5 %	✓

Pour la suite de la validation, les résultats ont ensuite été comparés avec ceux d'un échantillon de référence. Dans ce cas, une huile de référence FAPAS a été utilisée. Le tableau 4 montre le résultat de cette comparaison.

Tableau 4 : composition d'une huile de référence FAPAS (T2646QC) d'après les méthodes DGF classique et « DGF Fast 1 Clean » et d'échantillons avec la méthode « DGF Fast & Clean ». Comparaison avec les résultats d'un laboratoire client issus d'une préparation manuelle.

Sample	Measurement	3-MCPD [mg/kg]	2-MCPD [mg/kg]	Glycidol [mg/kg]
Reference oil (FAPAS)	Manual „DGF klassisch“	0.59	0.31	0.26
	„DGF classic “	0.49	0.30	0.23
	„DGF Fast & Clean“	0.50	0.38	0.36
Unknown edible oil	Manual „DGF classic“	0.78	0.39	0.64
	„DGF Fast & Clean“	0.80	0.58	0.73
Rapeseed oil	Manual „DGF classic“	0.14	< 0.10	0.10
	„DGF Fast & Clean“	0.11	0.08	0.13
Sunflower oil-HL	Manual „DGF classic“	0.84	0.39	0.15
	„DGF Fast & Clean“	0.73	0.60	0.29
Sunflower oil-HO	Manual „DGF classic“	0.31	0.15	0.49
	„DGF Fast & Clean“	0.25	0.19	0.58

La validation des méthodes DGF classique et « DGF Fast & Clean » a été réalisée avec des standards dopés afin de déterminer le rendement et la reproductibilité de la procédure dans son ensemble. Pour la méthode « DGF Fast & Clean », des rendements compris entre 91 et 116% ont été atteints. La reproductibilité de la méthode DGF classique comprise entre 93 et 96% est légèrement meilleure que celle la méthode « DGF Fast & Clean » qui est de 87 – 92%. Comparé à la préparation manuelle, ces deux méthodes représentent une amélioration importante de la reproductibilité dans le cadre d'analyses de routine. La validation montrée ici est basée sur des mesures réalisées sur quatre jours consécutifs.

La validation de la méthode « DGF Fast & Clean » en accord avec la Commission européenne montrée dans le tableau 3, prouve que l'ensemble des critères sont remplis pour une utilisation en routine, par exemple pour l'analyse libératoire d'une production. Les valeurs de la comparaison inter laboratoire de l'analyse de l'huile de référence FAPAS 2646 (3-MCPD 0.352 – 0.821 mg/kg) montrent des différences importantes entre les laboratoires d'environ +/- 40% pour le dosage du 3-MCPD. Ces valeurs proviennent d'analyses réalisées avec différentes méthodes manuelles (DGF, Unilever, 3 en 1). L'automatisation permettrait certainement de réduire ces différences de résultat.

Exemple de chromatogrammes

Le chromatogramme de la figure 4 montre qu'une sensibilité élevée et un pic clairement défini sont garantis même à faible concentration. Par exemple, une concentration de 0.05 mg/kg 3-MCPD a été détectée dans de l'huile d'olive. Les chromatogrammes montrés en figure 5 permettent de voir l'excellente reproductibilité de l'analyse automatisée des 2-MCPD et 3-MCPD à différentes concentrations.

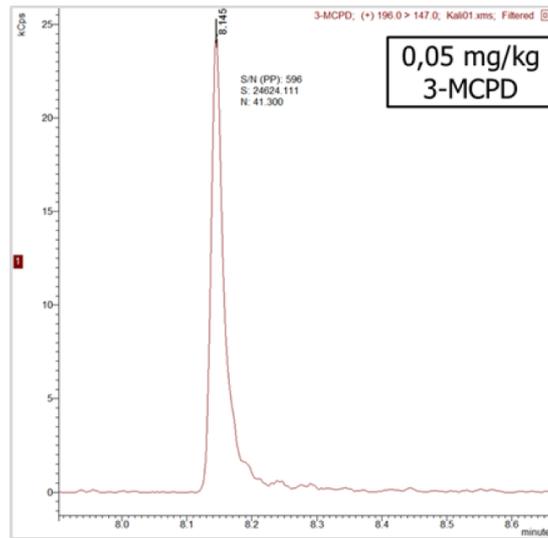


Figure 4 : chromatogramme de la mesure du 3-MCPD à 0.05 mg/kg dans l'huile d'olive

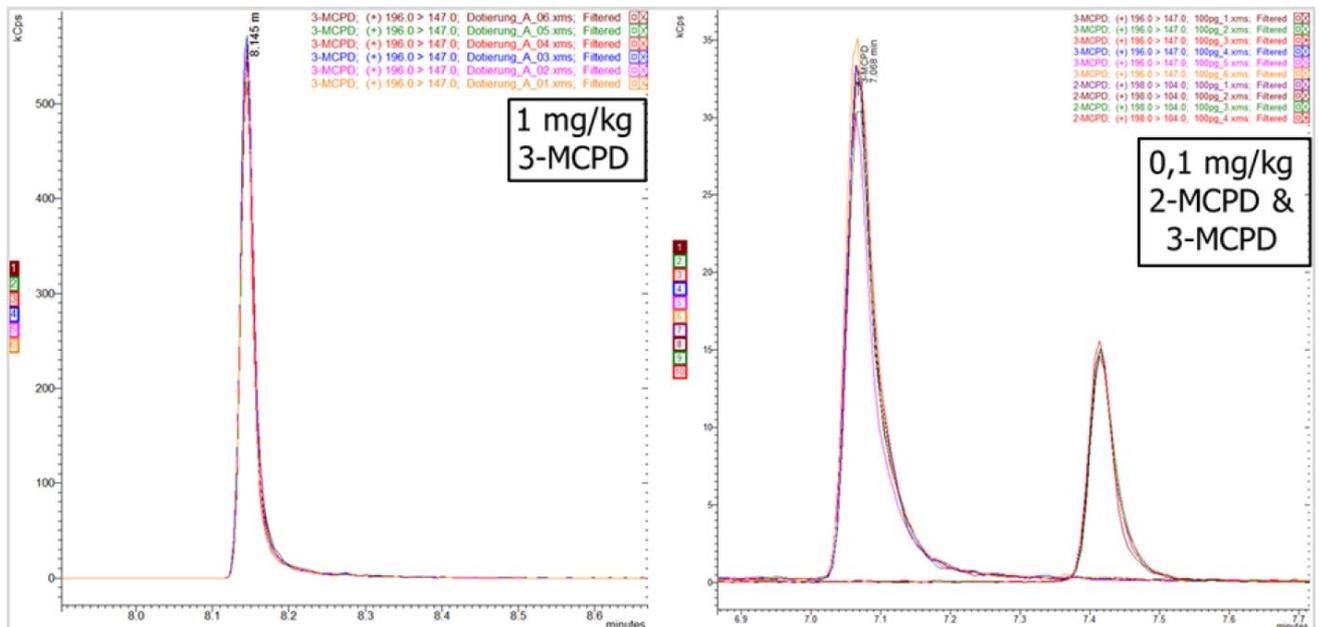


Figure 5 : chromatogrammes des analyses de plusieurs échantillons d'huile d'olive à différentes concentrations de 2-MCPD ou 3-MCPD

Exemple de quantification

Les figures 6 et tableau 5 montrent une excellente comparabilité des méthodes DGF classiques, « DGF Fast & Clean » et 3 en 1. Comparée à la préparation manuelle, la méthode « DGF Fast & Clean » permet des économies de temps substantielles. Plus de 100 matrices ont été analysées avec succès en routine avec la méthode « DGF Fast & Clean ». Parmi ces matrices, on trouve les huiles et graisses classiques, ainsi que les extraits de produits listés en figure 6. La méthode est en constante amélioration dans le but de la rendre compatible avec toujours plus de matrices. La méthode a récemment été adaptée pour l'analyse des graisses durcies. Les retours des utilisateurs sont activement pris en compte pour l'amélioration de la méthode.

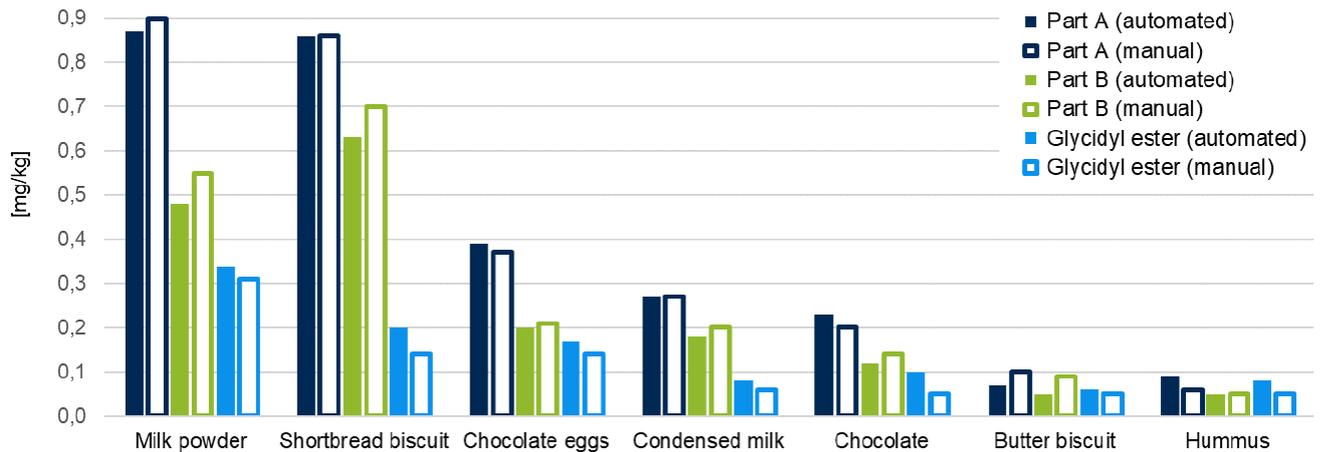


Figure 6 : résultats d'une analyses de la teneur en glycidol, 2 et 3-MCPD dans plusieurs produits alimentaires

Tableau 5 : Comparaison entre les résultats obtenus par les méthodes « DGF Fast & Clean », DGF manuelle et la méthode 3 en 1 pour un mélange d'huile de tournesol et de colza.

	Oil mixture I		Oil mixture II	
	3-MCPD ester [mg/kg]	Glycidyl ester [mg/kg]	3-MCPD ester [mg/kg]	Glycidyl ester [mg/kg]
“DGF Fast & Clean”	0.14	0.05	0.11	< 0.05
DGF manual	0.15	0.08	0.13	0.05
3-in-1 method	0.14	< 0.05	0.1	< 0.05

Résumé

Les 2-MCPD et 3-MCPD ainsi que le glycidol sont des contaminant présents dans nos aliments. En raison de leur cancérogénicité, il est crucial de pouvoir les analyser. La demande croissante rend nécessaire une automatisation des méthodes d'analyse afin d'augmenter les performances et la cadence.

L'implémentation de la méthode « DGF Fast & Clean » montrée ici permet d'avoir un premier résultat en seulement 48 minutes pour un échantillon analysé avec les parties A et B. Cette méthode est donc indiquée pour l'analyse de routine des 3-MCPD, 2-MCPD et glycidol.

Grace au système CHRONECT Robotique modulaire, d'autres méthodes peuvent également être complètement automatisées, comme les méthodes ISO 18363-2, ISO 18363-3 et Draft ISO 18363-4 ou encore la méthode Weisshaar. Que le système soit équipé de la technologie « Dual-Head » ou « Single-Head », ce qui signifie que le robot passeur d'échantillon possède une ou deux têtes, et grâce au logiciel CHRONOS, des étapes du procédé peuvent être réalisées en parallèle. Le système est donc capable de fonctionner en continu et de réduire le temps d'analyse.

La « Clean-Technology » développée par Axel Semrau a permis au système d'être extrêmement robuste, car le GC-MS est protégé et les intervalles de maintenance ont pu être

allongés. De ce fait, les applications automatisées développées ici sont parfaitement adaptées à un usage en routine, comme le contrôle qualité d'entrée ou les analyses en ligne sur un procédé de fabrication. Ceci se traduisant par des résultats d'une excellente qualité pour l'analyse des 3-MCPD, 2-MCPD et glycidol.