

VI. NEUE UNTERSUCHUNGSMETHODEN UND PROJEKTE

Phthalatbestimmung in Alkohol und Süßwaren

Eine Risikoabschätzung für Menschen und Umwelt ist an eine zuverlässige Methode zur quantitativen Bestimmung geknüpft. Am CVUA Karlsruhe wurde eine Methode zur Bestimmung von Phthalaten entwickelt und validiert.

Vor allem in nicht-registriertem Alkohol können Phthalate als Vergällungsmittel vorkommen, in Süßwaren durch Migration aus dem Verpackungsmaterial (siehe Kap. 2). In der Literatur werden für die Phthalatextraktion aus verschiedenen Lebensmittelgruppen unterschiedliche Verfahren beschrieben. Zum Teil fehlt dabei eine vollständige statistische Absicherung. Ziel war daher die Entwicklung und Validierung einer Methode zur quantitativen Bestimmung von Phthalaten in Alkohol und Süßwaren mittels GC-MS.

CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN

Dimethylphthalat (DMP), Diethylphthalat (DEP), Diallylphthalat (DAP), Di-iso-butylphthalat (DIBP), Di-n-butylphthalat (DBP), Diethylhexyladipat (DEHA), Butylbenzylphthalat (BBP), Di(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP), Diheptylphthalat (DHP) und Di-n-octylphthalat (DNOP) sowie die Lösungsmittel Cyclohexan, Ethanol (EtOH), Ethylacetat, n-Hexan und 1,1,2-Trichlortrifluorethan wurden von Merck (Darmstadt) bezogen. Der interne Standard 3,4,5,6-d₄-DEHP (d₄-DEHP) wurde selbst synthetisiert. Es wurde eine Phthalat-Stammlösung mit einer Endkonzentration von 1 g/l in Cyclohexan/Ethylacetat (1:1, v:v) hergestellt. Aus dieser Lösung wurde eine Phthalat-Standardlösung mit einer Endkonzentration von 50 mg/l in Cyclohexan/Ethylacetat (1:1, v:v) gewonnen. Durch Verdünnung dieser Lösung wurden die Kalibrierlösungen mit Endkonzentrationen von 0,5 bis 20,0 mg/l hergestellt. Die Konzentration des inneren Standards in den einzelnen Kalibrierlösungen betrug ca. 7,5 mg/l.

Die Reinheit der verwendeten Lösungsmittel Cyclohexan, EtOH, Ethylacetat, n-Hexan und 1,1,2-Trichlortrifluorethan wurde regelmäßig durch Messung im GC-MS überprüft. Zur Vermeidung von Phthalatkontaminationen wurden alle verwendeten Glasgeräte mit Aceton gespült und im Trockenschrank bei 220°C für mindestens fünf Stunden ausgeheizt.

GC-MS-METHODE

Für die GC-MS-Analysen wurde der Gaschromatograph Trace GC in Verbindung mit dem Massenspektrometer Polaris Q und einem CTC-Combi-Pal-Probengeber verwendet (Thermo Finnigan, Bremen). Datenaufnahme und -auswertung erfolgten mit der Standardsoftware des Herstellers. Als Trennsäule diente eine VF-Xms Säule (29,3 m, 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke, Varian, Darmstadt). Als Trägergas wurde Helium mit einer Flussrate von 1 ml/min verwendet, injiziert wurden jeweils 1 µl in den Split/splitless-Injektor (splitless für 1,5 min). GC-Temperaturprogramm: Starttemperatur 100°C, 1 min, 5°C/min auf 270°C, 10°C/min auf 320°C, 10 min. Die Temperaturen für Injektor, Ionenquelle und Transferline betragen 250°C, 225°C und 280°C. Die Fragmentierung

erfolgte durch Elektronenstoßionisation mit einer Ionisierungsenergie von 70 eV, die massenspektrometrische Detektion erfolgte im Fullscan Modus (m/z 40–300). Für die Quantifizierung wurde das Peakflächen-Verhältnis des jeweiligen Phthalates zu internem Standard d4-DEHP als Funktion der Substanzkonzentration berechnet.

OPTIMIERTE EXTRAKTIONSMETHODEN

Phthalate können aus Lebensmitteln mit einer einfachen Flüssig-Flüssig-Extraktion bestimmt werden

Für Alkohol/Spirituosen werden 0,1 ml Probe in ein Reagenzglas mit Schliff pipettiert, mit 0,1 ml ISTD-Standardlösung und 1 ml 1,1,2-Trichlortrifluorethan versetzt und eine Minute mittels Reagenzglasschüttler ausgeschüttelt. Anschließend wird das 2-Phasengemisch fünf Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert. Die Lösungsmittelphase (untere Phase) wird abgezogen, die Probe erneut mit 1 ml 1,1,2-Trichlortrifluorethan versetzt und wie oben beschrieben behandelt. Die zweite 1,1,2-Trichlortrifluorethanphase wird mit der ersten vereinigt, in ein GC-Samplergläschen überführt und im GC-MS gemessen. Feste, nicht pulverförmige oder kristalline Proben werden tiefgefroren und mittels Universalmühle homogenisiert. Feste, pulverförmige Proben werden vor ihrer Verwendung gut durchmischt. Zur weiteren Probenvorbereitung werden etwa 10 g homogenisierte Probe in einen 50-ml-Messkolben eingewogen und in EtOH 60% unter Behandlung im Ultraschallbad für fünfzehn Minuten gelöst. Anschließend wird zur Marke mit EtOH 60% aufgefüllt und die Lösung fünf Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert, um ungelöste Probenbestandteile abzutrennen.

ERGEBNIS DER METHODENVALIDIERUNG

Die Ergebnisse der Bestimmung der Linearität, der Präzision sowie der Wiederfindungsraten zeigen, dass die Methode zur Bestimmung von Phthalaten und DEHA in Alkohol, Süßwaren und Zucker genau und reproduzierbar ist.

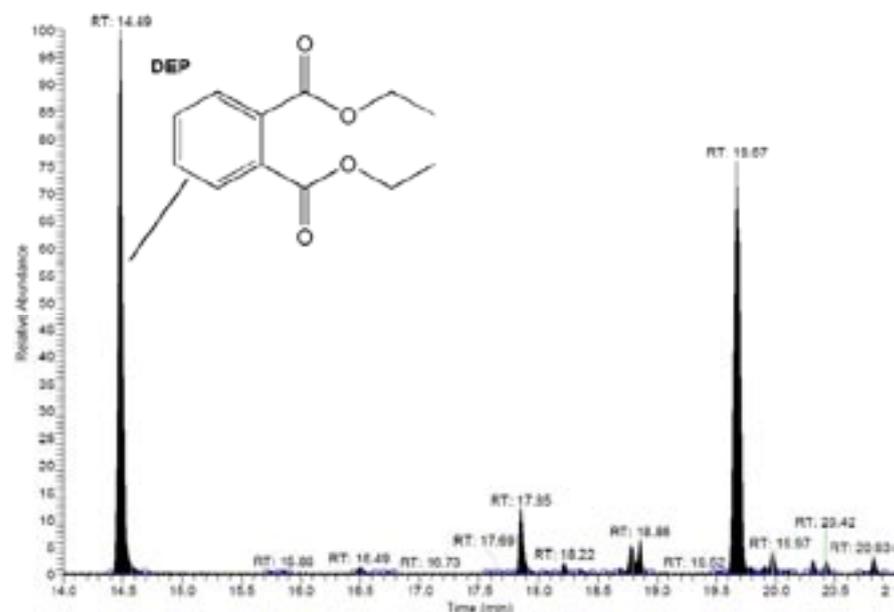


Abbildung: Chromatogramm eines nicht-registrierten Alkohols aus Litauen, der trotz der Vergällung mit Diethylphthalat in dem baltischen Land für den menschlichen Verzehr in den Verkehr gebracht wurde

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sind sehr niedrig und liegen in einem für die Probenmessung ausreichenden Bereich. Weitere Details zu Methodenoptimierung und Validierung sind unseren Originalarbeiten zu entnehmen.

Literatur

- Leitz J., Kuballa T., Rehm J., Lachenmeier D.W. Chemical analysis and risk assessment of diethyl phthalate in alcoholic beverages with special regard to unrecorded alcohol. PLoS One 2009; 4: e8127.
- Leitz J., Kuballa T., Jähnel J., Lachenmeier D.W. Entwicklung einer schnellen und einfach durchführbaren Methode zur Bestimmung von Phthalaten in Zucker und Süßwaren. Deutsche Lebensmittel-Rundschau 2009; 105: 702-706

Acetaldehydbestimmung in Lebensmitteln mittels Headspace-Gaschromatographie

Das Internationale Krebsforschungszentrum IARC der WHO klassifizierte Acetaldehyd bislang generell als „möglicherweise krebserregend für den Menschen“ (Gruppe 2B). Bei Aufnahme über alkoholhaltige Getränke erfolgte jedoch im Oktober 2009 die Hochstufung in Gruppe 1 („krebserregend für den Menschen“).

Acetaldehyd (Ethanal, C₂H₄O) ist eine leichtflüchtige, geruchsaktive Substanz, die in fermentativ hergestellten Lebensmitteln (z.B. Joghurt, Bier) von den eingesetzten Mikroorganismen sowie im Zuge der Fruchtreifung genuin in Obst und Gemüse gebildet wird. Weiterhin wird Acetaldehyd auch in größeren Mengen als Aromastoff eingesetzt und besitzt als solcher den GRAS-Status („generally recognized as safe“). Zudem wird Ethanol im menschlichen Organismus obligatorisch über die Zwischenstufe Acetaldehyd zu Essigsäure metabolisiert.

Die Bestimmung von Acetaldehyd erfolgte mittels Headspace-GC/FID (Gaschromatographie/Flammenionisationsdetektor). Hierzu konnten flüssige und halb feste Proben direkt, feste Lebensmittel nach vorhergehender Zerkleinerung und Homogenisierung in einem handelsüblichen Mixer eingesetzt werden. Die Proben wurden mit künstlichem Magensaft (Simulated Gastric Fluid nach USP 32) gemischt bzw. in diesem suspendiert, wodurch adsorptiv gebundener Acetaldehyd freigesetzt wurde.

Infolge ausgeprägter, nicht kompensierbarer Matrix-Effekte wurde für die Quantifizierung das Verfahren der Standardaddition angewendet, welches präzise und gut reproduzierbare Resultate lieferte [Verfahrensvariationskoeffizient (V_{x0}) ≤ 3 %; Nachweisgrenze (LOD, limit of detection) = 0,05 µg Acetaldehyd im Headspace-Vial; Bestimmungsgrenze (LOQ, limit of quantitation) = 0,18 µg Acetaldehyd im Headspace-Vial; Angabe von LOD und LOQ jeweils im Bezug auf eine ideale Matrix und auf ein Vial-Füllvolumen von 5 ml]. Da es sich hierbei allerdings um eine Extrapolationsmethode handelt, weisen die Analyseergebnisse naturgemäß einen relativ großen Vertrauensbereich auf. Die mit unterschiedlichen Acetaldehyd-Mengen aufgestockten Probelösungen wurden zunächst unter kontinuierlichem Schütteln für 1 h auf 37 °C erwärmt (CombiPal-Probengeber in Headspace-Ausführung, CTC Analytics, Zwingen/Schweiz), anschließend wurde ein Aliquot aus dem Dampfraum in den Gaschromatographen (Agilent 6890N GC, Agilent Technologies, Santa Clara/USA) injiziert (Splitless-Modus, Injektortemperatur: 140 °C) und auf einer polaren Polyethylenglykol-Phase

Headspace-Gaschromatographie erlaubt die empfindliche und selektive Bestimmung von Acetaldehyd

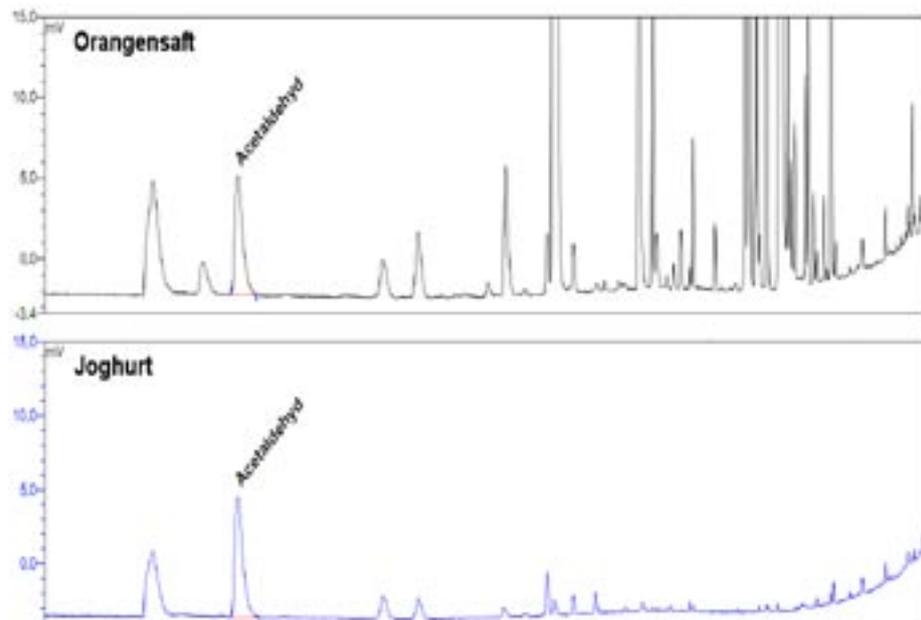


Abbildung: Gaschromatogramm eines Orangendirektsafts (oben; Acetaldehyd-Gehalt: $5,9 \pm 0,3$ mg/kg) und eines Joghurts (unten; $12,3 \pm 0,4$ mg/kg).

(DBWAX®: 58,0 m Länge; 0,32 mm i.D.; 0,50 µm Filmdicke; Agilent Technologies, Santa Clara/USA) getrennt. Als Trägergas dient Helium mit einer konstanten Flussrate von 2,0 ml/min, die Elution erfolgt isotherm bei 30 °C (Retentionszeit von Acetaldehyd: $5,94 \pm 0,04$ min).

Die am CVUA Karlsruhe untersuchten Proben ($n = 120$) stimmten in ihrem Acetaldehyd-Gehalt teilweise sehr gut mit den publizierten Werten überein [z.B. Äpfel: $0,97 \pm 0,80$ mg/kg; publiziert: 0,2–2,2 mg/kg), teilweise ergaben sich jedoch auch erhebliche Diskrepanzen (z.B. Orangensaft: $3,86 \pm 2,88$ mg/kg; publiziert: 0,7–192 mg/l). Mit 17,0 mg/kg wurde die höchste Acetaldehyd-Konzentration in einem Joghurt nachgewiesen (publizierter Maximalgehalt in Joghurt: 76 mg/kg). Basierend auf den generierten Daten und unter Annahme üblicher Verzehrsmengen liegt die Acetaldehyd-Belastung in Deutschland für Nicht-Trinker und -Raucher deutlich unter 0,1 mg/kg Körpergewicht/Tag (Männer: 0,042 mg/kg KG; Frauen: 0,044 mg/kg KG/d), wohingegen ein dem Bundesdurchschnitt entsprechender Alkohol- und Zigarettenkonsum mit einer erheblichen Zunahme der Acetaldehyd-Exposition einhergeht.

Verbesserte Probenaufreinigung mit automatischer Parallelverdampfung zur Bestimmung von Ethylcarbamat in Spirituosen

Die Analyse der krebserregenden Kontaminante Ethylcarbamat in alkoholhaltigen Getränken ist sehr zeitaufwändig und somit teuer. Am CVUA Karlsruhe wurde das bestehende Verfahren durch moderne Gerätetechnik optimiert.

Aufgrund von möglichen Matrixstörungen ist vor der gaschromatographisch-massenspektrometrischen Messung eine Probenaufreinigung über Kieselgursäulen (Extrelut) notwendig. Der limitierende Schritt hierbei ist die Rotationsverdampfung des organischen Eluats. Die Durchführung erfolgt bisher manuell

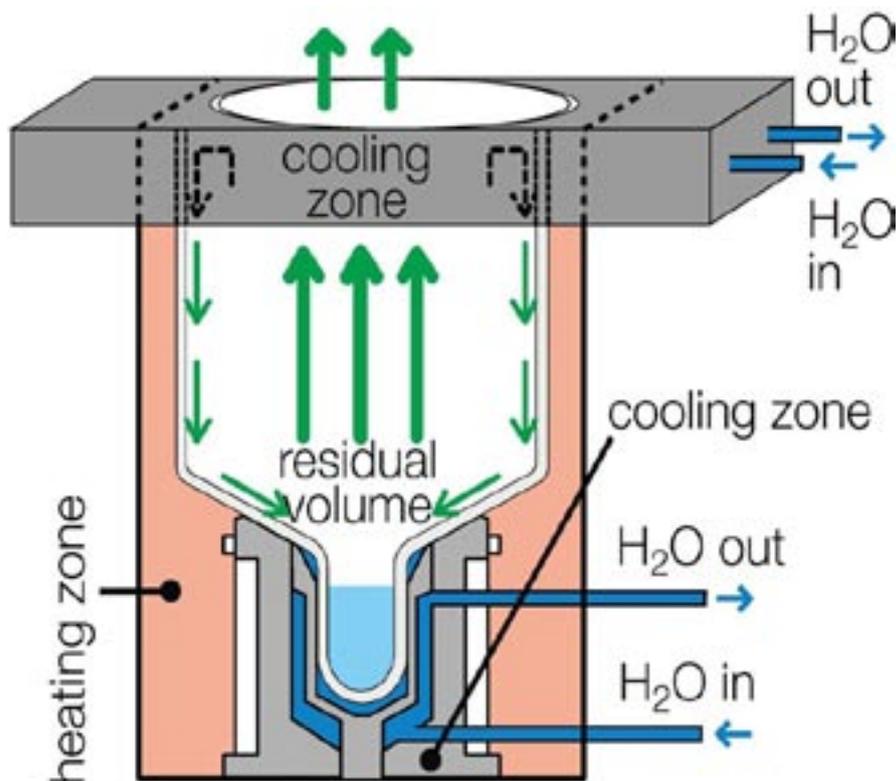


Abbildung: Prinzip der automatischen Verdampfung auf ein definiertes Restvolumen. Durch die gekühlte Zone an der Unterseite der Ausstülpung des Probenglases wird der Verdampfungsprozess gestoppt, sobald der Flüssigkeitsspiegel die Kühlzone erreicht. Die Analyten werden gleichzeitig vor thermischer Zersetzung geschützt (Abbildung: Büchi Labortechnik, Essen)

und dauert etwa 20 bis 30 min pro Probe. Am CVUA Karlsruhe wurde die Anwendung eines Parallelverdampfungsgeräts erstmals für die Ethylcarbamatanalytik entwickelt, mit dem 12 Proben gleichzeitig auf ein bestimmtes Restvolumen eingedampft werden können, ohne dass ein manuelles Eingreifen erforderlich ist. Eine wesentlich effizientere und kostengünstigere Bestimmung ist somit möglich.

Die Methodvalidierung zeigte keine Unterschiede zwischen der vollautomatischen Parallelverdampfung und der manuellen Methode. Die Anwendbarkeit wurde durch Analyse von authentischen Spirituosenproben aus Deutschland, Kanada und Brasilien belegt. Bei den brasilianischen Cachaças konnte interessanterweise eine relative große Tendenz zur Ethylcarbamatkontamination festgestellt werden (56% der Proben hatten Gehalte oberhalb 0.15 mg/l, dem brasilianischen Grenzwert). Auf Grund der möglichen gesundheitlichen Relevanz sollte diese Produktgruppe weiteren Untersuchungen unterzogen werden.

Literatur

- Lachenmeier DW, Kuballa T, Lima MCP, Nóbrega ICC, Kerr-Corrêa F, Kanteres F, Rehm J: Ethyl carbamate analysis in German fruit spirits and Brazilian sugarcane spirits (cachaça): Improved sample cleanup with automated parallel evaporation. Deut Lebensm Rundsch 2009, 105:507-512.

Anwendung der Nahinfrarotspektroskopie (NIR) bei der Untersuchung von Fleischerzeugnissen

Die Nahinfrarotspektroskopie (NIR) erlaubt ein sehr schnelles Screening von Fleischerzeugnissen wie Wurstwaren auf ihre Zusammensetzung. Es wurden vergleichende Untersuchungen mit klassischen Methoden durchgeführt und Kriterien ermittelt, die eine Einordnung der Proben in „sicher nicht zu beanstanden“ und „möglicherweise zu beanstanden“ erlaubt.

NIR kann aufwändige chemischen Analysen ersetzen

Mit dem beschafften NIR-Spektrometer können in Fleischwaren die Hauptbestandteile Eiweiß (Protein), Fett, Wasser und Bindegewebe untersucht werden. Ein wesentlicher Vorteil der Methodik besteht darin, dass diese Parameter nach einer Homogenisierung der Proben ohne weitere Vorbereitung mittels Infrarotstrahlung vermessen werden können. Aus dem erhaltenen Spektrum lassen sich durch Auswertung mit einer Datenbank (Kalibration) die genannten Bestandteile berechnen. In die Datenbank sind die Ergebnisse zahlreicher nasschemischer Untersuchungen mit den dazugehörigen Spektren eingegangen. Die NIR-Analyse dauert nur wenige Sekunden und liefert dann neben den Grundparametern auch weitere hieraus zu berechnende Größen, die vor allem bei der Beurteilung von Wurstwaren relevant sind, wie bindegewebeisweißfreies Fleischeiweiß (BEFFE) und der Anteil von bindegewebeisweißfreiem Fleischeiweiß im Fleischeiweiß (relatives BEFFE). Allerdings ist die Analytik mittels Nahinfrarotspektroskopie (NIR) keine amtlich anerkannte Methode für alle diese Parameter und hat je nach Parameter unterschiedlich große Abweichungen zu den amtlichen Methoden. Somit sind Proben, die bei dieser Analytik auffallen, anschließend in Bezug auf die möglichen Beanstandungsgründe weiterhin mit den klassischen chemischen Methoden nachzuuntersuchen.

Methodisch wurde so vorgegangen, dass zunächst alle Proben mittels NIR und den bewährten Routinemethoden parallel untersucht wurden. Aus den Ergebnissen wurden dann die Differenzen zwischen den NIR-Werten und den wahren Werten für jede Probe und jeden Analyten ermittelt. Aus diesen Einzeldifferenzen wurden dann die mittleren Abweichungen für unterschiedliche Produktgruppen berechnet, aus denen anschließend die Abweichungen von den nach der allgemeinen Verkehrsauffassung erforderlichen Werten bestimmt werden, die bei einer Analyse mit dem NIR-Spektrometer überschritten sein müssen, damit die Probe als unverdächtig anzusehen ist und nicht mehr chemisch auf diese Parameter untersucht werden muss. Diese Sicherheitsspannen wurden so gewählt, dass jeweils die doppelte Standardabweichung von dem Mittelwert zugrunde gelegt wurde. Mit dieser Abweichung sollten dann mindestens 95 % der zu beanstandenden Proben als „verdächtig“ erkannt werden. 2010 wurden mit der NIR insgesamt 298 Proben routinemäßig untersucht.

Tabelle: Untersuchte Fleisch- und Wurstwaren mittels NIR

	Gesamtprobenzahl	Nach NIR-Ergebnis zu beanstanden	nicht zu beanstanden
Brühwurst	124	69 (55 %)	
Rohwurst	57	23 (60 %)	
Frisches Fleisch/ Fleischzubereitungen	117	52 (44 %)	

Somit konnte bei diesen Produktgruppen bereits im letzten Jahr ein erheblicher Teil der chemischen Untersuchungen eingespart werden, es ist beabsichtigt bei ausreichender Datenlage diese Kalkulation bei weiteren Produktgruppen durchzuführen.

Sudanfarbstoffe in Chilisaucen

Sudanfarbstoffe werden als Schönungsmittel in Paprika- und Chilierzugnissen verwendet. In der Europäischen Union sind sie jedoch nicht als Zusatzstoffe zugelassen, da es nach oraler Aufnahme zur Abspaltung von Amininen kommen kann, die zum Teil als kanzerogen (IARC, Kategorie 2) eingestuft sind. Sudan I ist als kanzerogen und mutagen jeweils in Kategorie 3 eingeordnet.

Für die Extraktion von Sudanfarbstoffen und anderen fettlöslichen künstlichen Farbstoffen aus Lebensmitteln wurden in den bisher veröffentlichten Methoden meist Aceton/Acetonitril (Extraktionsmittel) genannt, um diese Farbstoffe aus dem Lebensmittel herauszulösen. Bei Chilisoßen können mit Aceton/Acetonitril aufgrund der schlechten Löslichkeit einige der Sudanfarbstoffe jedoch kaum herausgelöst werden. Der hohe Wasseranteil in Chilisoßen führt quasi zu einer Verdünnung des Extraktionsmittels und die Lösekraft reicht nicht mehr aus, um alle Sudanfarbstoffe vollständig zu erfassen (zwischen weniger als 20% für Sudan IV, Sudanrot B und Sudanrot VII B und 70% für Toluidinrot und Sudan Orange G).

Konventionelle Lösungsmittel können zu deutlichen Unterbefunden führen

Für die Entwicklung der nachfolgend beschriebenen Methode zur Bestimmung von Sudanfarbstoffen in Chilisäuren wurden Sudan I, Sudan IV und Toluidinrot ausgewählt. Sudan I ist aufgrund seiner chemischen Struktur am Besten, Sudan IV am Schlechtesten mit dem bisher verwendeten Extraktionsmittel löslich. Toluidinrot liegt dazwischen. Ziel war eine vollständige Extraktion aller Sudanfarbstoffe in einem Arbeitsgang und eine reproduzierbare und einfache Routinemethode. Zur Methodenentwicklung wurde zunächst ein Lösungsmitteversuch mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln für die drei genannten Analyten durchgeführt. Ethylacetat stellt das optimale Lösungsmittel für alle drei Analyten dar, während die bisher verwendeten Lösungsmittel Aceton und Acetonitril nur ein mäßig gutes Lösungsverhalten aufweisen. Mit diesem Lösungsmittel wurde anfänglich eine Flüssig-Flüssig-Extraktion durchgeführt, diese jedoch um den Lösungsmittelverbrauch zu reduzieren und eine größere Phasengrenzenoberfläche zu erreichen, durch eine Solid Supported Liquid Extraction (SLE) mit modifizierter Diatomeenerde (Isolute HM-N®) ersetzt und anschließend letztere Methode etabliert. Die Auswertung erfolgte über externen Standard (ESTD) und internen Standard (ISTD) mit deuterierten Referenzsubstanzen von Sudan I und Sudan IV. Hierbei ergab sich folgende Vorgehensweise:

Ethylacetat ist das optimale Lösungsmittel bei der Extraktion von Sudanfarbstoffen aus Chilisoße

- Verdünnung der Probe mit Wasser und Zugabe des ISTD
- Aufgabe der Probe auf eine Isolute HM-N® Säule
- Extraktion mit Ethylacetat nach einer Einwirkzeit von 10 min
- Einengen des Lösungsmittels, Aufnahme des Rückstands in Aceton/Acetonitril (10:80)
- Messung mit HPLC-MS/MS

Tabelle: Kenndaten der Validierung von Sudan I, Sudan IV und Toluidinrot

Substanz	Nachweisgrenze [µg/kg]	Bestimmungsgrenze [µg/kg]	Mittelwert ± Stabw [µg/kg]	Wiederfindung [%]	Auswertung über
Sudan I	10	30	46,8±0,7	90,7±1,2	ISTD
Sudan IV	10	30	828,7±57,7	122,6±8,5	ISTD
Toluidinrot	10	30	315,8±25,5	89,7±7,2	ESTD

Neue Methode erfolgreich in LVU erprobt

Um die Eignung der Methode und die Messunsicherheit zu testen, wurde eine Probe mit bekanntem Gehalt an Sudan I und IV sowie Toluidinrot analysiert (genaue Ergebnisse siehe Tabelle). Aus diesen Ergebnissen ist ersichtlich, dass die quantitative Extraktion und die Bestimmung von unzulässigen fettlöslichen Farbstoffen wie den Sudanfarbstoffen mit dieser neuen Methode relativ einfach und mit wenig zeitaufwändiger Probenvorbereitung möglich ist. Auch in einer nach der Validierung durchgeführten Laborvergleichsuntersuchung mit Tabascoße erbrachte das CVUA Karlsruhe für die Farbstoffe Pararot und Sudan I sehr gute Ergebnisse.



Abbildung: Auswahl untersuchter Chilisoßen

Die Wahl des Extraktionsmittels und die Anpassung des Extraktionsmittels an die Probenmatrix ist beim Nachweis nicht zugelassener fettlöslicher künstlicher Farbstoffe von entscheidender Bedeutung für die jeweilige Fragestellung. Die Übertragung einer Validierung von einer Matrix auf eine andere ist auch bei ähnlichen Matrices somit grundsätzlich abzulehnen und eine alleinige Bestimmung der üblichen Verfahrenskenndaten ohne Optimierung der Extraktionsbedingungen nicht ausreichend.

Literatur

1. Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Farbstoffe Sudan I bis IV in Lebensmitteln, Stellungnahme des BfR vom 19. November 2003.
2. C. Sproll, W. Ruge, N. Strichow, D. Attig und G. Marx, Quantitative Analyse von Sudanfarbstoffen mittels HPLC-DAD und HPLC-MS/MS in unterschiedlichen Lebensmittelmatrices, Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 101. Jahrgang, Heft 11, S. 481-484, 2005
3. Mahler, J. Wiedenhöfer, W. Ruge und C. Sproll, Die Bestimmung von Sudanfarbstoffen in Chilisauzen – Bedeutung der Matrixvalidierung in der Farbstoffanalytik, Lebensmittelchemie 63, 143-144, 2009

Melaminanalytik in Babynahrung

Auch bei gut etablierten Methoden können bei geringfügiger Matrixänderung böse Überraschungen auftreten. Im Rahmen einer Diplomarbeit wurde die Aufreinigung von Probenextrakten zur Melaminbestimmung mit Hilfe eines Pipettierroboters automatisiert. Bei der Analytik von Säuglingsnahrung fiel auf, dass Säuglingsnahrung nicht gleich Säuglingsnahrung ist. Für hypoallergene Säuglingsnahrung muss die Aufarbeitung modifiziert werden, um Melamin nachweisen zu können.

Im Jahresbericht 2008 wurde über die Untersuchungstätigkeit anlässlich des Melamin-Skandal in China berichtet. In China waren gehäuft Fälle von Niereninsuffizienz bei Säuglingen aufgetreten. Als Ursache wurde Melamin-verunreinigtes Milchpulver identifiziert. Melamin wurde dem Milchpulver zugesetzt, um einen höheren Eiweißgehalt vorzutäuschen. Es erhöht den Gesamtstickstoffgehalt, der zur Berechnung des Eiweißgehaltes dient. Bereits im Jahr davor tauchte in den Vereinigten Staaten von Amerika mit Melamin verunreinigtes Hunde- und Katzenfutter auf. Auch Futtermittel werden nach ihrem Proteingehalt beurteilt. Hier konnte Melamin in der „Zutat“ Weizengluten, das aus China stammte, nachgewiesen werden.

Im Winter 2008/2009 zog das Problem weltweit immer größere Kreise und es wurden zahlreiche positive Befunde in Lebensmitteln ermittelt (Backtriebmittel, Eipulver, Milchpulver, milchpulverhaltige Lebensmittel wie Bonbons und Backwaren, milchpulverhaltige Kaffeegetränke, Fischfutter). Bis auf eine Reihe von positiven Befunden in Hirschhornsalz und milchpulverhaltigen Bonbons war Deutschland glücklicherweise kaum betroffen. Dennoch wurden vor allem sensible Produkte wie Säuglingsnahrung im Auge behalten. Um in Fällen wie diesem der dramatischen Probenflut aus nahezu allen Fachbereichen zukünftig besser gerecht werden zu können, wurde die Probenaufarbeitung über Festphasenextraktion im Rahmen einer Diplomarbeit exemplarisch anhand der Melamin-Analytik automatisiert und optimiert. Dabei fiel auf, dass die Aufreinigung über Festphasenextraktion (Kationen-Austausch-SPE), die bei vielen Probenmatrices, wie Backwaren und auch normaler Säuglingsnahrung, völlig problemlos verlief, bei hypoallergener Säuglingsnahrung nicht zu verwertbaren Ergebnissen führte. Zugesetztes Melamin wurde nicht wiedergefunden. Hypoallergene Säuglingsnahrung unterscheidet sich von herkömmlicher durch die Art der Proteinquelle. Verwendet werden hier Proteinhydrolysate (teilabgebautes Molkenprotein). Naheliegend war, dass dieses Molkenproteinhydrolysat zur Störung der Analytik führt. Um diese Hypothese zu belegen wurde Molkenprotein einer Säurehydrolyse unterzogen (6 N HCl bei 110 °C). Da der Hydrolysegrad der Molkenproteine in den Proben nicht bekannt war, wurden einzelne Ansätze mit unterschiedlich langen Hydrolysezeiten aufgeschlossen. Die Ansätze wurden so hergestellt, dass die Proteingehalte in der Endlösung etwa dem Gehalt in den Probenextrakten von hypoallergener Säuglingsnahrung entsprach. Nach Melaminzusatz wurde mit der etablierten Methode aufgearbeitet. Die Ergebnisse sind in der Abbildung dargestellt.

Eine hohe Probenbelastung ist mit einem hohen Automatisierungsgrad zu bewältigen

Vom zugesetzten Standard wurden noch Spuren im Ansatz mit der geringsten Hydrolysezeit (30 min) wiedergefunden. In allen weiteren hydrolysierten Ansätze war das zugesetzte Melamin nicht mehr nachweisbar. Zur Beseitigung der vermeintlichen Störmatrix wurden verschiedene in der Lebensmittelanalytik etablierte Methoden zur Matrixfällung an hypoallergener Säuglingsnahrung ausgetestet, um diese zu beseitigen. Keines der Verfahren führte zum Erfolg.

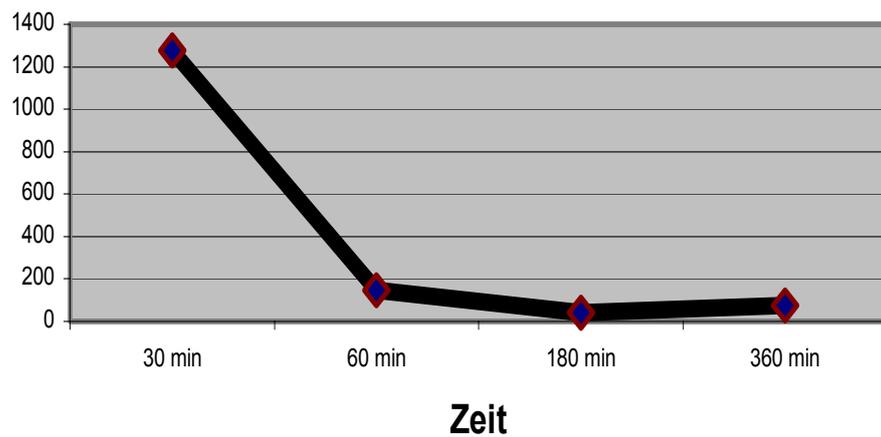


Abbildung: Peakflächen des zugesetzten Standards bei verschiedenen Hydrolysezeiten

Hypoallergene Babynahrung kann Ionenaustauscher-SPE-Säulen überladen

Des Rätsels Lösung lag schließlich in der Verdünnung des Probenextraktes vor der SPE-Aufarbeitung. Probenextrakte mit hydrolysiertem Molkeneiweiß enthalten eine deutlich größere Anzahl kurzkettiger Peptidbruchstücke bzw. Aminosäuren und damit eine viel höhere Ionenfracht. Diese führt zu einer Überladung der Ionenaustauscher-SPE-Säule. Melamin-Moleküle werden an den „Bindungs-Stellen“ von der Übermacht anderer Ionen verdrängt und können bei der Aufarbeitung nicht isoliert werden. Bereits ab einer Verdünnung des Probenextraktes um den Faktor fünf konnten nahezu 100% des zugesetzten Melamins wiedergefunden werden.

Dieses Beispiel unterstreicht die enorme Wichtigkeit der matrixbezogenen Validierung von Analyseverfahren. Durch die Miniaturisierung können zukünftig erhebliche Mengen Lösemittel bei der Aufarbeitung eingespart werden.

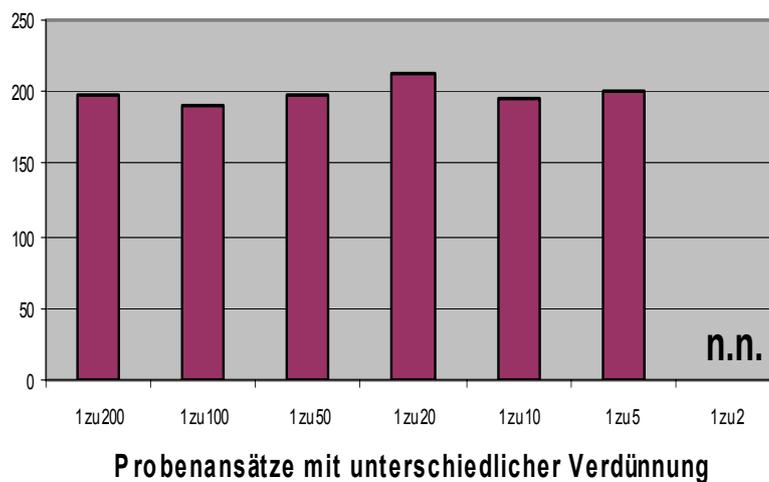


Abbildung: Wiederfindungsraten bei verschiedenen Verdünnungen, Melamin-Zusatz 200 mg

Natamycin in Wein

In Europa traten im Jahr 2009 Fälle von natamycinhaltigen Import-Weinen aus Argentinien auf. Auch nach Deutschland importierte Weine waren betroffen. Bisher war Natamycin ein Analysenparameter, der mit der Überwachung von zulässigen Höchstmengen in Rohwürsten und Hartkäse verknüpft war. Das Antimykotikum darf für diese Lebensmittelgruppe als Oberflächenbehandlungsmittel eingesetzt werden, um unerwünschten Pilzbefall zu vermeiden.

Bei Einhaltung der zulässigen Höchstmengen und Entfernung der Käserinde vor dem Verzehr, ist es nahezu auszuschließen, dass der Verbraucher unerwünscht Natamycin über Lebensmittel aufnimmt. Natamycin wird kritisch beurteilt, da ein unkontrollierter Verzehr ein mögliches Resistenz-Risiko birgt. Natamycin wird im humanmedizinischen Bereich als Mittel gegen Pilzinfektionen z.B. am Auge eingesetzt. Im europäischen Raum ist die Verwendung von Natamycin in Lebensmitteln auf die nicht-verzehrten Oberflächen von Rohwürsten und Hartkäse beschränkt und für andere Lebensmittelgruppen nicht zulässig.

Am CVUA Karlsruhe wurde eine bereits etablierte Methode mittels HPLC-UV/VIS aus dem Bereich „Lebensmittel tierischer Herkunft“ auf die Matrix Wein angepasst. Kritisch kann die Messung am HPLC-UV/VIS deshalb sein, weil Wein im Gegensatz zu Käse eine sehr auffällige und signalintensive Begleitmatrix mit sich bringt.

Dennoch können alle Störsubstanzen weitgehend und gut abgetrennt werden und Natamycin aufgrund seines charakteristischen Spektrums mit einer Nachweisgrenze von 10 µg/L Wein empfindlich nachgewiesen werden. Eine Absicherung mittels LC-MS ist grundsätzlich empfehlenswert und bei einigen Proben auch unbedingt nötig.

Bundesweit wurde mittlerweile ein Eingreifwert von 5 µg Natamycin pro Liter Wein festgelegt, ab dem Vollzugsmaßnahmen eingeleitet werden. Natamycin ist kein stabiler Analyt. Aus der Literatur ist bekannt, dass er sich bei Einwirkung von Licht und auch bei der Einwirkung von Säure und Lauge zersetzt. Er ist in methanolischen Lösungen unter Kühlung und Lichtschutz sehr gut haltbar, aber in wässrigen Lösungen oder am Licht findet ein Abbau statt. Auch im sauren Milieu von Wein ist ein Abbau zu erwarten. Schon bei der ersten Messung von Aufstockversuchen zur Etablierung einer niedrigeren Nachweisgrenze wurde ein deutlicher Natamycinabbau festgestellt. Zur Charakterisierung des

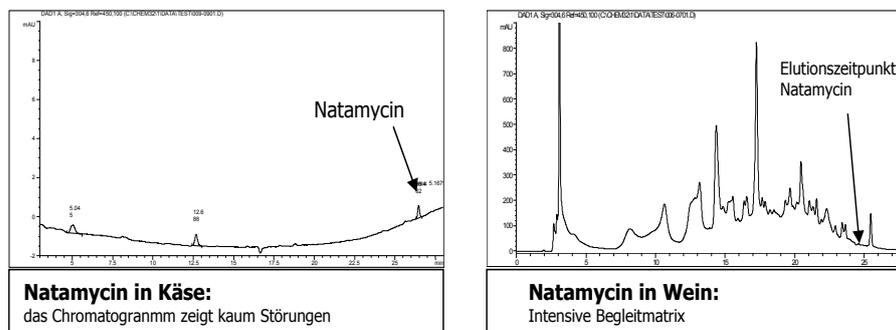


Abbildung: HPLC-UV/VIS-Chromatogramme von Käse- und Weinextrakten

Natamycinabbau in Wein wurden Weisswein, Rotwein und eine Modellweinflösung (10 ml Ethanol, 1 g Glycerin, 0,4 g Weinsäure auf 100 ml dest. Wasser, pH=2,4) mit Natamycin versetzt und bei Raumtemperatur gelagert. Dabei wurde festgestellt, dass ein statistisch signifikanter Abbau von 14 % (P=95%, n=5) bereits innerhalb der ersten zwei Tage (Zusatzversuch: Natamycin 200 µg/l in Weißwein) erfolgt. Innerhalb einer Woche sind etwa 50% der zugesetzten Menge abgebaut (Zusatzversuch mit 100 µg/L=0,1 mg/L Natamycin). Der Abbau verläuft in Weisswein, Rotwein und Modellweinflösung ähnlich schnell und lässt sich auch nicht durch lichtgeschützte Lagerung oder Zusatz von Ascorbinsäure als Oxidationsschutz beeinflussen. Er ist im Wein in erster Linie säureinduziert. Aus der pharmazeutischen Literatur ist bekannt, dass als Zersetzungsprodukt zunächst ein Aminosucker (Mucosamin) aus Natamycin abgespalten wird und eine Reihe von Abbauprodukten entstehen, bei denen der Makrolid-Grundkörper von Natamycin noch erhalten bleibt.

Erstmals wurden auch Abbauprodukte von Natamycin in Wein nachgewiesen

Diese Abbauprodukte konnten bei einem Aufstockversuch mit 20.000 µg Natamycin/L festgestellt werden und waren nach sechs Wochen vollständig abgebaut. Weder Natamycin noch der Natamycingrundkörper waren nach dieser Zeitspanne in der aufgestockten Probe nachweisbar. Dies kann als Indiz dafür interpretiert werden, dass auch die mögliche antimykotische Wirkung der Abbauprodukte nicht mehr gegeben ist. Der abgespaltene Aminosucker Mucosamin bleibt erhalten und kann auch nach dem vollständigen Abbau von Natamycin noch mittels LC-MS nachgewiesen werden.

Vor dem Hintergrund des schnellen Natamycinabbaus sowie teilweiser unterschiedlicher Nachweis- und Bestimmungsgrenzen verschiedener Labore könnte sich bei dem bundesweiten sehr niedrigen Eingriffswert von 5 µg/L die Frage stellen, warum eine Probe zu beanstanden ist, bei der der eigentliche Beanstandungsgrund bereits nicht mehr nachweisbar ist. Rechtlich ist dies sicher keine Frage. Eine unerlaubte önologische Behandlung wurde nachgewiesen. Damit ist das Verkehrsverbot begründet, auch wenn Natamycin möglicherweise bereits abgebaut ist, wenn die Weinflasche den Konsumenten erreicht hat. Dies würde auch gelten, wenn Abbauprodukte von Natamycin nachgewiesen werden könnten. Zu beachten ist natürlich auch, dass zur toxikologischen Bedeutung der Abbauprodukte keine Daten vorliegen und im Zweifel immer zugunsten des Verbrauchers und des Verbraucherschutzes zu handeln ist. Hinzu kommt, dass auf Natamycin bei einer guten weinkellerischen Hygiene verzichtet werden kann.

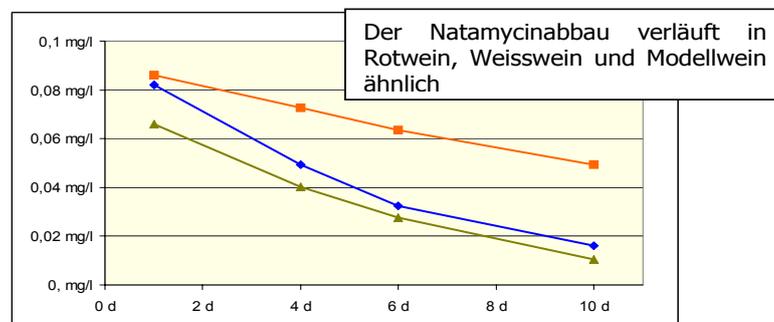


Abbildung: Natamycin-Abbau in Rotwein, Weißwein und Modellwein

Trotzdem erscheint insbesondere vor dem Hintergrund des schnellen und vollständigen Abbaus von Natamycin eine Eingreifgrenze, die sich an der Nachweisgrenze der empfindlichsten verfügbaren Methodik orientiert, fragwürdig. Letztlich sollte diese Entscheidung eher aus toxikologischer als aus messtechnischer Sicht getroffen werden. Womöglich wäre der Einsatz der robusten, preiswerteren, jedoch weniger empfindlichen HPLC-UV/VIS-Methode dienlicher als die Orientierung am technisch machbaren. Derzeit wird der bisherige Eingreifwert von 5 µg/l seitens der zuständigen Behörden einer Überprüfung unterzogen.

Nachweis von Methicillin-resistentsenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Lebensmitteln tierischer Herkunft

Immer häufiger wird MRSA aus Lebensmitteln tierischen Ursprungs nachgewiesen. Um über ein zuverlässiges Verfahren zu verfügen wurde eine Methode bestehend aus kulturellem Nachweis und der Real-Time PCR etabliert.

Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) sind weltweit als bedeutende Erreger sogenannter nosokomialer Infektionen – im Krankenhaus erworben – bei Mensch und Tier verbreitet. Darüber hinaus wird in zunehmendem Maße die Besiedlung klinisch gesunder Nutztiere mit MRSA beschrieben. Diese Keime zeichnen sich durch Resistenzen gegenüber einer Reihe von Antibiotika aus und sind in der Lage schwer therapierbare Wundinfektionen, Entzündungen der Atemwege und Septikämien zu verursachen. Die Übertragung von MRSA durch Lebensmittel tierischer Herkunft auf Menschen ist bislang nicht hinreichend erforscht. Als mögliche Übertragungswege werden der Verzehr sowie der Kontakt mit kontaminierten Lebensmitteln diskutiert. Von der Isolierung der Erreger aus Lebensmitteln wird mit steigender Häufigkeit berichtet. So wurden hohe Prävalenzen an MRSA insbesondere in rohem Geflügelfleisch festgestellt. Aber auch in rohem Kalb-, Rind-, Schweine-, Schaf- und Wildfleisch sowie in Kuhmilch und Käse konnten die Erreger nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurden MRSA in den vergangenen Jahren in zahlreichen Ländern wie etwa Niederlande, Belgien, Kanada, Spanien und Deutschland bei klinisch gesunden Schweinen nachgewiesen. Auch bei Untersuchungen in Deutschland wurde bei Schweinen wie auch bei beruflich exponierten Personen eine Besiedlung mit MRSA festgestellt. Aufgrund dieser Erkenntnisse über die Verbreitung von

Antibiotika-resistente Infektionen sind ein immer größeres Problem



Abbildung: MRSA auf chromogenem Agar

MRSA in Lebensmitteln verschiedener Tierarten misst das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) der Klärung der Frage, in welchem Ausmaß in Deutschland vermarktete Lebensmittel tierischer Herkunft mit diesen Erregern belastet sein können, eine hohe Bedeutung bei. Demzufolge wurde die Untersuchung von Lebensmitteln auf MRSA in den Zoonosen-Stichprobenplan für 2009 aufgenommen.

Darüber hinaus wurde im CVUA Karlsruhe ein breites Spektrum von insgesamt 292 Lebensmittelproben auf MRSA untersucht. Neben der Überprüfung von rohem Fleisch wurde ein besonderer Schwerpunkt auf die Untersuchung von Rohmilch und Rohmilchkäse gelegt.

Für den Nachweis von MRSA aus Lebensmitteln wurden 25 g Probe in 225 ml Müller-Hinton Bouillon mit 6,5 % NaCl homogenisiert. Diese Voranreicherung wurde aerob bei einer Temperatur von +37°C für 16–20 Stunden bebrütet.

Anschließend erfolgte eine Selektivanreicherung, bei der 1 ml der Voranreicherung in 9 ml Trypton-Soja-Bouillon mit 3,5 mg/l Cefoxitin und 75 mg/l Aztreonam überpipettiert und bei +37°C für 16–20 Stunden bebrütet wurde. Zur Isolierung wurde die bebrütete Selektivanreicherung auf chromogenen MRSA-Selektivagar ausgestrichen und bei +37°C für 24 Stunden bebrütet. Fünf verdächtige Kolonien wurden ausgewählt und auf RPF (Rabbit Plasma Fibrino-

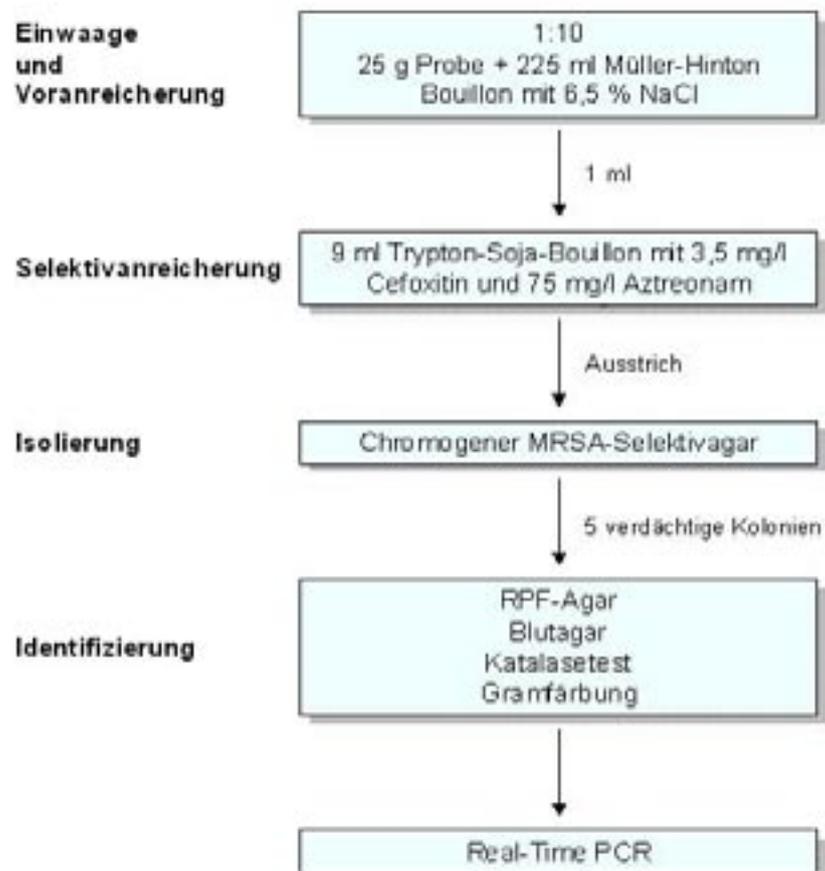


Abbildung: Kultureller Nachweis von MRSA und Bestätigung der Isolate mit Real-Time PCR

gen)-Agar sowie zur Beurteilung der Hämolyse auf Blutagar für 24–48 Stunden bei +37°C subkultiviert. Die weitere Bestätigung erfolgte mittels Gramfärbung und Katalasetest.

Durch den alleinigen Einsatz der aufgeführten Bestätigungsreaktionen ist lediglich die Zuordnung der Isolate zur Spezies *Staphylococcus aureus* möglich. Die Einstufung als MRSA basiert bei dem kulturellen Nachweisverfahren ausschließlich auf der Beurteilung der für den jeweiligen MRSA-Selektivagar typischen Koloniemorphologie und korreliert somit direkt mit dessen Sensitivität und Spezifität.

Zur abschließenden Bestätigung der Isolate wurde eine Real-Time-PCR durchgeführt. Dazu wurde ein kommerzielles System verwendet (SureClin® PATHOGEN MRSA PLUS V, Congen), welches DNA-Abschnitte einer *Staphylococcus aureus*-Sequenz und einer *mecA*-Sequenz amplifiziert.

Im Rahmen der laborinternen Validierung wurde die Eignung und Leistungsfähigkeit des neuen Verfahrens bestimmt. Zur Bestimmung der Nachweisgrenze des kulturellen Verfahrens wurden vier Lebensmittelmatrizes (rohes Fleisch, kurzgereifte Rohwurst, Rohmilch, Rohmilchkäse) mit Keimgehalten von ca. 10⁰, 10¹ und 10² KbE MRSA pro 25 g Lebensmittel beimpft. Die Bestimmung der Nachweisgrenze der Real-Time-PCR mit Reinkulturen erfolgte über den Nachweis von vier MRSA-Referenzstämmen mit Keimgehalten im Bereich von 10¹, 10² und 10³ KbE/ml. Für das kulturelle Verfahren wurde bei rohem Fleisch und Rohwurst eine Nachweisgrenze im Bereich von 10⁰ KbE/25g, bei Rohmilch im Bereich von 10¹-10² KbE/25ml und bei Rohmilchkäse im Bereich von 10² KbE/25g ermittelt. Für die Real-Time-PCR wurde eine Nachweisgrenze von 5 KbE/Ansatz bestimmt.

Mit dem kombinierten Verfahren aus kulturellen und molekularbiologischen Methoden wurden 292 Lebensmittelproben tierischer Herkunft untersucht, darunter 195 Proben rohes Fleisch, 67 Proben Rohmilch und 30 Proben Käse.

Tabelle: Übersicht der untersuchten 292 Lebensmittelproben und Anzahl der positiven Ergebnisse

Probe	Anzahl	MRSA positiv
Schweinefleisch	61	6
Rindfleisch	40	14
Hackfleisch (gemischt)	18	1
Putenfleisch	38	12
Wildfleisch	38	0
Rohmilch	67	2
Käse	30	0

Ein mehrstufiges Verfahren zur Bestimmung von Methicillin-resistentem *Staphylococcus aureus* wurde entwickelt

Der Nachweis von MRSA verlief bei 33 der 195 untersuchten Rohfleischproben positiv. Dies entspricht einer Kontaminationsrate von 16,9 %. Im einzelnen konnten MRSA aus zwölf Proben Puten- (31,6 %), 14 Proben Rind- (35 %), sechs Proben Schweinefleisch (9,8 %) sowie einer Probe Hackfleisch gemischt (5,5 %) isoliert werden. In Wildfleisch wurden MRSA nicht nachgewiesen. Innerhalb der 67 untersuchten Rohmilchproben verlief der MRSA-Nachweis zwei mal positiv (2,9 %). Dagegen wurden MRSA in Käse nicht festgestellt. Bezogen auf die Gesamtprobenzahl konnte eine Kontaminationsrate von 11,9 % ermittelt werden.

Das im Rahmen der Untersuchungen eingesetzte kulturelle Verfahren in Kombination mit der Real-Time-PCR zur Bestätigung der Isolate erwies sich zum Nachweis von MRSA in Lebensmitteln als geeignet. Verglichen mit rohem Fleisch und Rohwurst wurde für Rohmilch und Rohmilchkäse eine höhere Nachweisgrenze ermittelt. Analog konnte bei diesen Lebensmittelmatrizes ein Wachstum von taxonomisch eng mit MRSA verwandten Begleitkeimen festgestellt werden.

Im Rahmen der hier dargestellten Studien konnten MRSA in rohem Puten-, Rind- und Schweinefleisch sowie in Rohmilch nachgewiesen werden, was auch eine weite Verbreitung der Erreger in Lebensmitteln tierischen Ursprungs verdeutlicht.

Literatur

- Anonymus (2008): Entscheidung der Kommission vom 20. Dezember 2007 über eine Finanzhilfe der Gemeinschaft für eine Erhebung in den Mitgliedstaaten über die Prävalenz von Salmonella spp. und Methicillin resistenten Staphylococcus aureus in Zuchtschweinebeständen. Amtsblatt der Europäischen Union. L14/10 vom 17.01.2008.
- Khanna, T., R. Friendship, C. Dewey, J. S. Weese (2008): Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus colonization in pigs and pig farmers. Vet. Microbiol. 30, 298-303.
- Meemken, D., C. Cuny, W. Witte, U. Eichler, R. Staudt, T. Blaha (2008): Zum Vorkommen von MRSA bei Schweinen und bei Menschen mit beruflicher Exposition zum Schwein - Erste Ergebnisse einer Studie in Nordwestdeutschland. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 115, 132-139.
- Normanno, G., M. Corrente, G. La Sandra, A. Dambrosio, N. C. Quaglia, A. Parisi, G. Greco, A. L. Bellacicco, S. Virgilio, G. V. Celano (2007): Methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. Int. J. Food Microbiol. 117, 219-222.
- RKI (2005): cMRSA: Heteroreistenzphänotyp erfordert besondere diagnostische Aufmerksamkeit. Epidemio. Bull. 50, 466-467.
- Van Belkum, A., D. C. Melles, J. K. Peeters, W. B. Van Leeuwen, E. Van Duijkeren, X. W. Huijsdens, E. Spalburg, A. J. De Neeling, H. A. Verbrugh (2008): Methicillin-Resistant and -Susceptible Staphylococcus aureus Sequence Type 398 in Pigs and Humans. Emerg. Infect. Dis. 14, 479-483
- Wieler, L. H. (2008): MRSA - Ein Problem keineswegs nur in der Humanmedizin! Dtsch.Tierärztebl. 7, 900-903.