



Lebensmittelsicherheit

Fischverzehr ohne Folgen

Tiere und tierische Erzeugnisse, die der Ernährung dienen, sind auf gesundheitsschädliche Kontaminationen zu untersuchen, bevor sie in den Verkehr gebracht werden. Laboratorien sind gut beraten, den Arbeitsaufwand durch eine intelligente Automatisierung der Probenvorbereitung zu reduzieren. Wie das effizient und gesetzeskonform gelingt, haben chinesische Wissenschaftler vorgemacht, und zwar bei der automatisierten HPLC-Bestimmung von Sulfonamiden und deren Metaboliten in Lachs.

Von Guido Deussing.



Fisch ist gesund und in Teilen der Welt ein Hauptnahrungsmittel. Die Konsequenz bewusster Ernährungsweise und des Bevölkerungswachstums: Der Fischkonsum ist in den letzten Jahrzehnten weltweit erheblich gestiegen. Natürliche Fanggrün-

de sind inzwischen in weiten Teilen erschöpft; Mutter Natur kommt kaum nach mit der Aufzucht in Freiheit geborener Fische und Schalentiere. Dem globalen Hunger nach Meeresfrüchten wird mit Kulturen begegnet, in denen die aquatischen Nutztiere in Unterwassermastbetrieben kontrolliert zur Schlachtreife geführt werden.

Nebenwirkungen der Massentierhaltung

Die Haltung von Lebewesen dicht an dicht, die mittel- und unmittelbar der menschlichen Ernährung dienen, birgt für Erzeuger, Lebensmittelhändler und auch Verbraucher einen großen Nutzen. Doch die Tierhaltung auf engstem Raum verspricht nicht allein Gewinnmaximierung bei vergleichsweise günstigen Ein- beziehungsweise Verkaufspreisen, sondern birgt auch das Risiko rasch sich ausbreitender, epidemischer Krankheiten, die ganze Bestände dahinraffen können, wenn nicht medikamentös gegengesteuert wird, zum Beispiel mit synthetisch hergestellten Sulfonamid-Präparaten. Sulfonamide sind chemische Verbindungen, die ihrer Wirkung wegen in der Human- und Tiermedizin als Antibiotika eingesetzt werden.

Während ihre antibiotische Wirkung unzweifelhaft und erwünscht ist, machen es die zytotoxischen Eigenschaften der Verbindungen sowie weitere, an dieser Stelle nicht genannte Aspekte erforderlich, Aquakulturen auf Sulfonamid-Rückstände und deren Metaboliten zu untersuchen. Reichern sie sich im Wasser an, können sie sich auch im Gewebe von Fischen und Fischereierzeugnissen akkumulieren. Auf diese Weise wird der Verbraucher, der am Ende der Nahrungskette steht, unausweichlich Leidtragender des Problems, und zwar dann, wenn kontaminierter Fisch auf seinem Teller landet.

Kontrolle tierischer Lebensmittel

Um mögliche gesundheitsbeeinträchtigende Nebenwirkungen für den Verbraucher ausschließen oder zumindest auf ein akzeptables Maß minimieren zu können, sind Fische und Fischereierzeugnisse aus Aquakulturen auf Rückstände von Tierarzneimitteln wie Sulfonamide sowie deren Metaboliten zu untersuchen. Welche Verfahren zur Anwendung kommen und welche Leistungs-

parameter dabei einzuhalten sind, darüber gibt der Gesetzgeber in der Richtlinie 2002/657/EG [1] Auskunft. Sein Ziel ist es vorrangig, für Sicherheit zu sorgen und im Interesse des Verbrauchers eine mögliche Kontamination mit gesundheitsschädlichen Stoffen unter Einsatz spezifischer und empfindlicher Messmethoden nachzuweisen respektive auszuschließen.

Ähnlich sehen es die Betreiber von Lebensmitteluntersuchungslaboratorien, die allerdings nachvollziehbarerweise auch die Wirtschaftlichkeit ihrer Analytik im Blick zu halten haben. Die anscheinend unausweichlich zunehmende Zahl an Proben, womöglich noch gekoppelt an strengere Gesetzesvorgaben, lässt sich effizient vermutlich nur in ganz seltenen Fällen mit herkömmlichen manuellen Methoden bewerkstelligen. Wer sich ein ausgewogenes Kosten-Nutzen-Verhältnis verspricht, kommt mittelfristig nicht an einer Automatisierung seiner Analytik vorbei.

Wie dabei vorzugehen ist und welche Wirkung man erzielen kann, kommt die geeignete Technologie zum Einsatz, darüber berichten Wei Jia, Lin Shi und Xiaogang Chu von der Universität für Wissenschaft und Technik in Xi'an, der Hauptstadt der zentralchinesischen Provinz Shaanxi, im Fachjournal *Food Chemistry* [2]. Die Autoren beschreiben darin die Entwicklung und Etablierung einer Analysenmethode für das „Non-Target“-Screening von Sulfonamiden und deren Metaboliten unter Einsatz eines automatisierten online gekoppelten Extraktionsverfahrens auf QuEChERS-Basis mit darauffolgender Ultra-Hochleistungsflüssigchromatographie mit hochauflösender Elektrosprayionisierungs-Quadrupol-Orbitrap-Massenspektrometrie (UHPLC Q-Orbitrap).

Schwächen aktueller Vorgehensweisen

Die charakteristische Fragmentierung und genaue Massenbestimmung mittels Hochleistungsmassenspektrometrie sei ein leistungsstarkes Instrument zur Aufklärung der Molekularstrukturen neuer Tierarzneimittel sowie deren Metaboliten, schreiben Jia et al. in ihrer Arbeit. Die meisten MS-Methoden zur selektiven Bestimmung von Veterinärarzneimittelrückständen basierten auf dem datenabhängigen Aufnahmefokus (DDA) und der Beobachtung hochspezifischer Fragmentierungsprodukte. Ungeachtet ihrer hervorragenden Selektivität und Empfindlichkeit stieße diese Vorgehensweise jedoch an Grenzen. So ermögliche sie es laut Jia et al. nicht, nach potenziellen Transformationsprodukten, Metaboliten und neuen Verbindungen zu suchen, die eine höhere Toxizität aufweisen können als ihre Stammverbindungen.

Überdies erforderten die meisten bestehenden Methoden für die Analyse exogener Verbindungen wie Tierarzneimittel und Pestizide zeitraubende Vorbereitungsschritte wie SPE, QuEChERS oder SLE sowie eine Aufkonzentrierung der Analyten, was von großer Relevanz ist. In Ermangelung tauglicher und effizienter Methoden, machten sich Wei Jia und Kollegen daran,

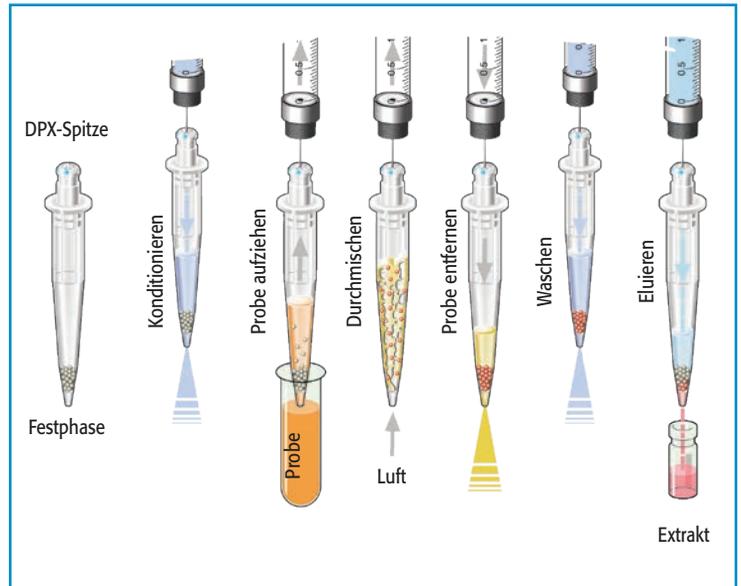
eine neue Vorgehensweise zu entwickeln, die allen Anforderungen gerecht wird, die man an eine Non-Target-Analyse und der Identifizierung von Unbekannten und Metaboliten in Fisch stellt.

Fokus auf die technischen Details

Entwickelt, getestet und etabliert wurde die von Jia et al. beschriebene Methode auf einem Ultimate-3000-UH-PLC-System (Dionex), das an ein Hybrid-Q-Orbitrap-Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific) mit Elektrosprayionisierungsquelle gekoppelt war. Die Probenvorbereitung und Probenaufgabe erfolgten vollständig automatisiert auf einem online gekoppelten MultiPurposeSampler (GERSTEL-MPS) in der Dual-Head-Version. Einzig die Fischproben – 89 Lachse kamen tiefgefroren zur Untersuchung – mussten von Hand filetiert und homogenisiert werden. Ein Gramm jeder Probe wurde in jeweils ein separates 10-mL-Zentrifugenröhrchen überführt, das dann auf dem MPS-Auto-sampler für die weiteren Schritte der Probenvorbereitung bis zur Probenaufgabe platziert wurde. Alle weiteren Aufgaben wurden sodann vollständig automatisiert vom MPS übernommen und ausgeführt.

Die Ausstattung des MPS war entsprechend opulent. Tierische Proben, vor allem, wenn es sich um Muskelgewebe handelt, sind komplex und matrixreich. Die Behandlung einer solchen Probe umfasst in der Regel aufwendige Extraktions- und Aufreinigungsschritte, bevor sie hinreichend sauber und matrixbefreit zur Analyse kommen kann, ohne Chromatographie und Detektion nachhaltig negativ zu beeinflussen. Folgerichtig war der MPS mit einer Zentrifuge ausgestattet; leicht verderbliche Proben ließen sich dunkel und kühl lagern, generell mit den erforderlichen Reagenzlösungen und Standards in unterschiedlichen Konzentrationen (ohne Spritzenwechsel) versetzen, schütteln und extrahieren, und zwar unbeobachtet vom Laborpersonal.

Für den Clean-up-Schritt, der sich an der QuEChERS-Methodik orientiert [3], wählten Jia et al. die Disposable-Pipette-Extraction (GERSTEL-DPX), bei der die Probe in eine spezielle DPX-Spitze aufgezogen wird, in der das Extraktionsmedium locker einliegt [4]. Die Quantifizierung der Analyse erfolgte unter Einsatz deuterierter Standards, deren Dosierung ebenfalls der MPS automatisiert ausführte. Sämtliche Schritte der Probenvorbereitung und Analyse lassen sich im Detail der Publikation von Jia et al. [2] entnehmen. Von der finalen Lösung pipettierte der MPS 200 µL in ein Mini-Uniprep-Vial; der Roboter gab 300 µL Methanol und 500 µL einer 8-mM-Ammoniumfor-



DPX-Schemazeichnung

miat-Lösung hinzu, vermischte alles und injizierte davon schließlich 5 µL in das angeschlossene UHPLC-Q-Orbitrap-System.

Erfolgreiche Trennung und Ergebnisbetrachtung

Der Vollständigkeit halber: Die Trennung der Analyten erfolgte auf einer Reversed-Phase-Säule (Hypersil Gold aQ C18, 100 mm x 2,1 mm x 1,9 µm), die mit einer Vorsäule vergleichbarer Phase (Accucore aQ C18, 10 mm x 2,1 mm x 1,9 µm; beide Säulen von Thermo Fisher Scientific) verbunden war. Verwendet wurde ein Eluentengradient, bestehend aus mit Ameisensäure und Ammoniumformiat versetztem Wasser

(Eluent A) und Methanol (B). Die Säulentemperatur betrug 40 °C. Die Elektrosprayquelle arbeitete im positiven Ionisierungsmodus (weitere Angaben zum System: siehe [2]).

Mit der beschriebenen Systemkombination wurden verschiedene Messungen durchgeführt, unter anderem eine Full-Scan-Analyse der Proben im Massenbereich 100 bis 900 m/z. Überdies wurden unterschiedliche Fragmentierungsvorgänge beziehungsweise konkrete Massenübergänge aufgezeichnet, die nachhaltig zum Ergebnis der hier beschriebenen Arbeit beigetragen haben.

Die erzielten Leistungsmerkmale stimmten überein mit den Anforderungen der Richtlinien, die in der Entscheidung der Europäischen Kommission 2002/657/EG festgelegt worden waren. „Vier Verbindungen wurden in Lachsproben unterschiedlicher



Herkunft identifiziert und bestätigt, die im Rahmen des Überwachungsprogramms genommen wurden“, schreiben Jia et al. Die am häufigsten in den Lachsproben vorhandenen Sulfonamide waren Sulfadiazin und sein Acetylierungsmetabolit; drei Prozent der untersuchten Lachsproben wurden positiv auf Sulfadiazin-Sulfonamide getestet.

Was wurde erreicht?

Die Autoren verfolgten bei ihrem Vorhaben zwei Ziele: 1. die Non-Target-Analyse von Sulfonamiden und Metaboliten in Lebensmittelproben durch die Kopplung einer effizienten Probenvorbereitung mit der Hochleistungsflüssigchromatographie und Hochleistungs-massenspektrometrie. Die Auswertung der Daten erfolgte

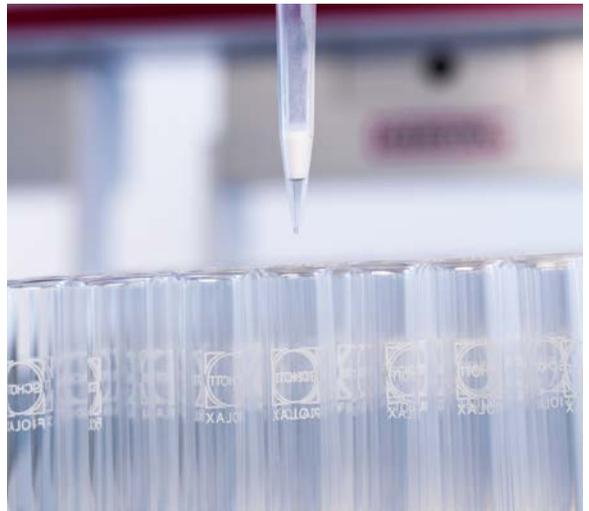


Foto: GERSTEL / Wolfram Schroll

Detailaufnahme der Disposable-Pipette-Extraction-Option (DPX) eines GERSTEL-MultiPurposeSamplers (MPS).

unter Einsatz von Datenbanken zwecks Ermittlung charakteristischer Strukturfragmente. 2. die Bestätigung der Analyten und die strukturelle Charakterisierung von unbekanntem Analyten auf der Basis verfügbarer Referenzstandards. Alle Ziele wurden erreicht. Validiert wurde ihre Methode gemäß EU-Kommissionsentscheid 2002/675/EG. Obendrein sprachen alle statistischen Parameter für ihre Praxistauglichkeit: „Das analytische Potenzial der Non-Target-Analyse mit Fragmentierung ermöglicht die Verwendung von Verdachtsspektren aus Datenbanken und charakteristischer Strukturfragmente zur Identifizierung unterschiedlicher, nicht im Fokus der Methode liegender Verbindungen. Das verwendete Analysensystem, insbesondere die mittels GERSTEL-MPS weitgehend automatisierte Probenvorbereitung, in Verbindung mit der generischen Analysenmethode erweist sich als vielversprechendes analytisches Instrument für Non-Target-Screening-Analysen“, schreiben Jia et al. in ihrer Zusammenfassung.

Referenzen

- [1] 2002/657/EG: Entscheidung der Kommission vom 12. August 2002 zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen, <http://bit.ly/2Ffemb5>
- [2] Wei Jia, Lin Shi, Xiaogang Chu, Untargeted screening of sulfonamides and their metabolites in salmon using liquid chromatography coupled to quadrupole Orbitrap mass spectrometry, *Food Chemistry* 239 (2018) 427-433, <http://bit.ly/2Fj1ErQ>
- [3] Paula Payá, Michelangelo Anastassiades, Dorothea Mack, Irina Sigalova, Bünyamin Tasdelen, José Oliva, Alberto Barba, Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389 (2007) 1697-1714, <http://bit.ly/2NaRDnl>
- [4] <http://www.gerstel.de/de/automatisierte-dpx.htm>



istock / Raghu_Ramaswamy

Qualle à la carte

Anders als in Asien begegnen den Menschen der westlichen Welt Quallen eher selten als Menüvorschlag auf der Speisekarte, allenfalls beim Baden im Meer, wo sie zuhauf vorkommen und eher Angst und Ekel statt Appetit und Heißhunger erregen. Das liegt – von der Gefährlichkeit einiger Quallenarten einmal abgesehen – nicht zuletzt an der gelartigen Beschaffenheit der wirbellosen Tiere, die sich beim herkömmlichen Kochen oder Braten in ein schleimiges Etwas verwandeln. Mit Blick auf den weltweit zunehmenden Bedarf an proteinreicher Nahrung bei einem gleichzeitig schwindenden Fischangebot, haben sich Wissenschaftler des Max-Planck-Instituts für Polymerforschung in Mainz angesehen, wie man in Asien Quallen zubereitet. Dort werden die Tiere über Monate in einer Mischung aus Kochsalz (Natriumchlorid) und Tonerdesalz (Alaun) eingelegt, was zu einer knackigen, essbaren Textur der Gelmasse (Mesogloea) führt, die allerdings unbehandelt für den Menschen ungenießbar ist. Die Forscher nahmen die chemischen Abläufe im Salz unter die Lupe und entwickelten einen Weg, den Veränderungsprozess, den die Qualle durchläuft, zu beschleunigen. Hierbei richteten sie ihr Augenmerk auf die Löslichkeit der einzelnen chemischen Bestandteile der Qualle, wozu Kollagen und Elastin gehören, die auch in der menschlichen Haut vorkommen, sowie Mucoproteine und polare Polysaccharide. Ergebnis ihrer Analyse: Statt die Quallen mit Salz zu behandeln, legten sie sie in Ethanol ein. Dabei erzeugten Pedersen und Vilgis in nur zwei Tagen eine gummiartig bis knusprige, essbare Textur, die aus gastronomischer Sicht ein interessantes Mundgefühl verspricht, schreiben die Forscher. GD

Referenz

Mie T. Pedersen, Thomas A. Vilgis, Soft matter physics meets the culinary arts: From polymers to jellyfish. *International Journal of Gastronomy and Food Science* 16 (2019), <http://bit.ly/2W0YiD5>



Foto: istock/bigtunaonline