

Massenspektrometrie:

eine neue Technik zum Nachweis von Lebensmittelbetrug in Fleisch- und Wurstwaren?

Stefan Wittke Hochschule Bremerhaven; Mikko Hofsommer GfL Gesellschaft für Lebensmittel-Forschung mbH, Berlin

Massenspektrometrie? Eine Technologie, welche in der medizinischen Diagnostik und Wirkstoffsuche mittlerweile eine Routineanwendung ist, spielt in der Lebensmittelüberwachung bislang nur eine untergeordnete Rolle. Um diesen „Dornröschenschlaf“ zu beenden wurde 2019 eine Arbeitsgruppe nach §64 LFGB am Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit gegründet. Diese hat zum Ziel, die massenspektrometrische Proteinanalyse in der amtlichen Lebensmittelüberwachung für Lebensmittelallergene und -betrug zu etablieren [1]. Und es zeigen sich erste Erfolge. Erst kürzlich wurde eine Methode zum Nachweis von Transglutaminase in restrukturiertem Fleisch entwickelt [2] und in einem Ringversuch mit Laboren aus staatlichen, akademischen und privaten Einrichtungen validiert [3].

Hoffnung machen auch zahlreiche Untersuchungsansätze in der Forschung. Xiong et al. identifizierten spezifische Peptide zum Nachweis und der Differenzierung der engl. Walnuss und verwandter Spezies [4]. Ähnliches machten Perner et al. für die Haselnuss [5]. Ruhland et al. beschreiben eine LC-MS/MS-Methode, welche spezifische Proteine / Peptide für versch. Nusspezies detektiert und für den Bereich der Allergenanalytik als auch des Lebensmittelbetrugs, z.B. in Nussnougatcremes, interessant ist [6].

Lasch et al. widmen sich der allgemeinen Unterscheidung von Fischarten (z.B. Rotbarsch, Pangasius, Steinbutt, Rotzunge, Seezunge etc.) um die Substitution von teuren Fischarten durch kostengünstigere zu erkennen [7]. Noch spezifischer sind ein Ansatz von Fiorino et al. welcher die Unterscheidung von Zucht- und Wildlachs ermöglichen soll [8], während Brümmer et al. eine LC-MS/MS-Nachweismethode für verschiedene Thunfischspezies entwickelten [9]. Aber auch an Fleisch- und Wurstwaren wird

geforscht. So untersuchten Stader et al. Beimengungen von Plasmaproteinen tierischen Ursprungs in Wurstwaren [10].

Doch was ist überhaupt diese LC-MS/MS oder lang ausgeschriebenen „Kopplung der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit der Tandem Massenspektrometrie“?

Der Schlüssel zur LC-MS/MS waren sogenannte sanfte Ionisationsverfahren (z.B. die Elektrospray-Ionisation bei Atmosphärendruck). Diese ermöglichen die online-Kopplung einer modernen chromatografischen Trenntechnik wie der rp-HPLC mit einem Massenspektrometer (Abbildung 1). Kurz gesagt, dient die rp-HPLC dazu, die Proben vorzutrennen. Im Elektrospray werden anschließend die (positiv) geladenen Probenmoleküle

(z.B. Proteine, Peptide) in einem Inertgasstrom „getrocknet“ und mittels eines elektrischen Feldes in das Massenspektrometer überführt. Dort werden dann die m/z-Verhältnisse (Masse zu Ladung) bestimmt, aus denen die Molekülmasse berechnet werden kann. Dabei erlaubt die Verbindung von sehr hoher Sensitivität (ng-pg/L Bereich) mit exzellenter Selektivität durch Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) einen präzisen und eindeutigen Nachweis von Zielsubstanzen. Die MS/MS Technologie mit Hilfe von Tandem-Massenspektrometern (z.B. triple Quads, QToF, etc) basiert auf folgenden Schritten:

- Selektion der Masse des gewünschten Analyten im ersten Quadrupol,
- Fragmentierung des Analyten in einer Kollisionszelle („Quadrupol“) z.B. durch CID (collision induced dissoziation),



Abb. 1: Verwendetes LC-MS/MS-System bestehend aus (von links nach rechts) Probentray (gekühlt), Injektor, Säule mit Säulenofen (jeweils markiert mit grünem Kreis), Elektrospray-Interface (rot) und Massenspektrometer (blau). Das verwendete Massenspektrometer ist ein triple-ToF 4600 (ABSciex, Darmstadt, Deutschland) mit CID-Technologie als Fragmentierungstechnologie und einem Flugzeitmassenspektrometer (time of flight, ToF) zur Bestimmung der Molekülmassen © S. Wittke

- gezielte Auswahl und Detektion der Masse eines oder mehrerer Fragmentationen (z.B. dritter Quadrupol oder time of flight MS (ToF)).

Und was wird unter Lebensmittelbetrug verstanden?

Gemäß Definition der EU [11]

„...handelt es sich um „jede mutmaßliche vorsätzliche Handlung von Unternehmen oder Einzelpersonen mit dem Ziel, Käufer zu täuschen und sich daraus einen ungerechtfertigten Vorteil zu verschaffen, unter Verstoß gegen die in Artikel 1 Absatz 2 der Verordnung (EU) 2017/625 (Rechtsvorschriften zur Lebensmittelkette) genannten Vorschriften“.

Das zeigt den Bedarf an Techniken zum Nachweis von (nicht-deklarierten) Inhaltsstoffen (Food Fraud) oder zur Bestimmung der Herkunft von Lebensmitteln. Die Anforderungen an die Analytik können, aufgrund der komplexen Matrix, der Herkunft aus verschiedenen Quellen, der Zusammensetzung (z.B. Proteine, Lipide, Kohlenhydrate, Salze) oder dem Grad der Prozessierung sehr hoch sein. Zugleich muss gewährleistet sein, dass die Lebensmittelüberwachung die Methoden auch einsetzen kann (techn. Voraussetzungen) bzw. darf (regulative Vorgaben). Letzteres regelt die EU-Kontrollverordnung VO (EU) 2017/625 [12].

Separatorenfleisch (MSM, regulatorisch)

Nach der Verordnung (EG) Nr. 853/2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs ist MSM ein Produkt, das durch Ablösung des an fleischtragenden Knochen nach dem Entbeinen bzw. an den Geflügelschlachtkörpern haftenden Fleisches auf maschinelle Weise gewonnen wird [13]. Entscheidend ist, dass die Struktur der Muskelfasern aufgelöst oder verändert wird. Unter Berücksichtigung von Art. 7 in Verbindung mit Anhang VI der Lebensmittelinformations-VO (EU) 1169/2011 ist Separatorenfleisch von Geflügel oder Schwein erlaubt, die Verwendung in Lebensmittelzubereitungen aber kennzeichnungspflichtig [14]. Immer wieder gibt es auch Diskussionen darum, ab wann von „Separatorenfleisch“ zu sprechen ist. Hierzu gab es erst kürzlich ein Urteil vom OVG Lüneburg (08.06.2022; 14 LB 2/22). Zusammengefasst wurde festge-

stellt, dass es sich bei Hähnchen-Gabelbeinfleisch welches mit einer Baader-Maschine gewonnen wird, um Separatorenfleisch gemäß der Europäischen Bestimmungen handelt [15]. Ähnlich verhält es sich bei der Gewinnung von Verarbeitungsfleisch von ganzen Kehlköpfen mit Anteilen an Trachea mit der für die Separatorenfleischgewinnung üblichen Technologie. Hierzu gab es unterschiedliche Einschätzungen des gewonnenen „Verarbeitungsfleisches“ durch Überwachungsbehörden und den Hersteller bezüglich der Deklaration.

„...In diesem Fall wird „Fleisch“ auf maschinelle Weise von Knorpeln gewonnen. Der Hersteller geht daher davon aus, dass es sich nicht um Separatorenfleisch handelt, da Separatorenfleisch definitionsgemäß vom Knochen gewonnen wird...“.

Vom ALTS (Arbeitskreis der auf dem Gebiet der Lebensmittelhygiene und der Lebensmittel tierischer Herkunft tätigen Sachverständigen; 2022/89/27 Maschinelle Restfleischgewinnung von Kehlkopf und Trachea) wurde daraufhin beschlossen [16]:

„...Fleisch, das auf dieselbe Art und Weise wie Separatorenfleisch statt von Knochen von Kehlkopf und Trachea gewonnen wurde, darf auf Grund der enthaltenen Knorpelanteile nicht zu Fleischerzeugnissen verarbeitet werden (vgl. Anhang III Abschnitt VI Nr. 1 Buchst. c) der VO (EG) Nr. 853/2004).

Doch wie wird Separatorenfleisch hergestellt und wie erfolgt der Nachweis von dessen Verwendung?

Das Prinzip des Separators ist im Grunde immer gleich. Die in einen Trichter eingegebenen Knochen werden mittels einer massiven Stahlschnecke in den Zylinder der Maschine gezogen. Der Zylinder verengt sich und die Knochen werden zerkleinert. Dann werden die Knochen gegen ein Sieb gedrückt. Ist der Druck hoch genug, wird die weichere Masse aus dem Sieb gedrückt, während die Knochen den „einfacheren“ Weg wählen, dort ist die Schnecke etwas größer. Der Druck ist variabel einstellbar. Wird ein Druck unter 100 Bar eingestellt, handelt es sich um einem Niederdruckseparator [17]. Da aber in jedem Fall abgesiebt wird, werden Veränderungen an der Fleischstruktur gemäß VO (EG) Nr. 853/2004 auftreten. Bereits 2014 schätzte LIMA, ein Her-

steller von Separatoren, dass jährlich mehr als 1.500.000 Tonnen Separatorenfleisch auf LIMA Separatoren verarbeitet werden [18]. Der Nachweis von MSM erfolgt in der Lebensmittelüberwachung mikroskopisch (Knochenfragmente) oder über erhöhte Kalziumgehalte, die durch Knochensplitter entstehen [19-21]. Wie von Branchenexperten betont wird, sind diese Methoden allerdings nicht zuverlässig [22].

Nachweis von Hühnerseparatorenfleisch mittels LS-MS/MS

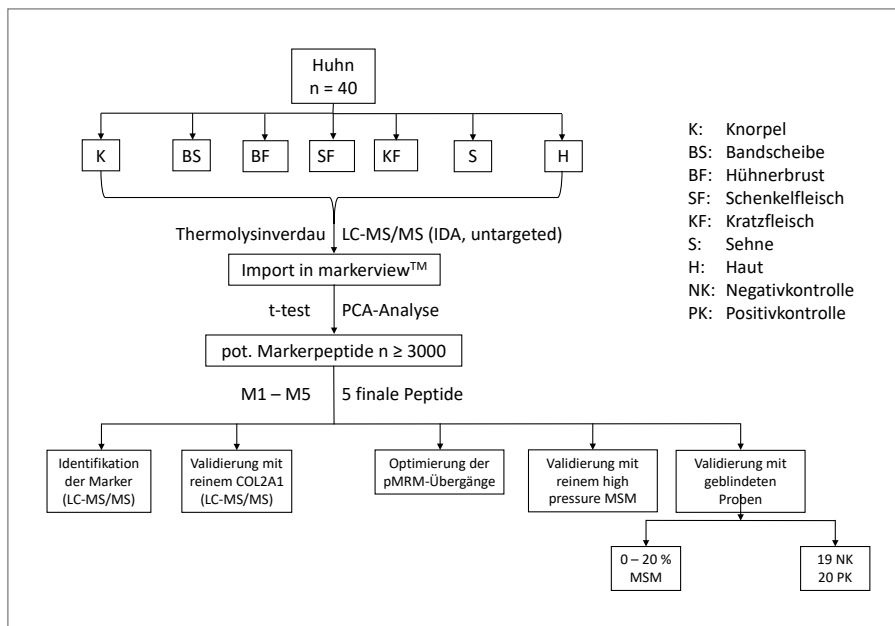
Arbeitshypothese:

Separatorenfleisch vom Huhn sollte produktionsbedingt neben Fleisch und Fett auch Sehnen, Knochenmark, Knorpel, Bandscheiben und ggf. Knochensplitter enthalten. Zudem ist davon auszugehen, dass sich die Proteinzusammensetzung der versch. Gewebetypen vom Huhn unterscheidet. Z.B. enthalten Knorpel und Bandscheiben Kollagen II [23], Sehne und Hühnerhaut enthalten vor allem Kollagen I [24].

Damit müsste im Erfolgsfall gelten:

- der Gehalt an typischen Knorpel- und Bandscheibenproteinen sollte in Separatorenfleisch erhöht sein,
- erhöhte Gehalte an Knorpel- und Bandscheibenproteinen in Lebensmitteln könnten ein Hinweis auf die Verwendung von Separatorenfleisch sein.

Weil bei der Entwicklung der LC-MS/MS-Methode zum Nachweis von Separatorenfleisch vom Huhn keine Zielsubstanz bekannt war, wurde zunächst ein nicht-zielgerichteter Ansatz verfolgt (Abbildung 1). Typenreine Gewebe (Abbildung 1) von bisher 40 Hühnern wurden mit Thermolysin enzymatisch verdaut und mittels LC-MS/MS analysiert. Durch Vergleich der Peptidverteilung in den versch. Gewebetypen [25] mit MarkerView™ (Version 1.1, AB Sciex, Darmstadt, Deutschland), ergaben sich > 3000 Peptide, die für eine Differenzierung der Gewebetypen und speziell den Nachweis von Knorpel/Bandscheiben-typischen Peptiden in Lebensmitteln in Frage kommen [26]. Die am stärksten diskriminierenden Peptide (M1 - M5) können über Ihre Fragmentierungsmuster mittels LC-MS/MS identifiziert und dem Kollagen 2 alpha 1 (COL2a1) zugeordnet werden. Mit Col2a1 als Zielsubstanz wurde die Methodik validiert [26, 27].



- K: Knorpel
- BS: Bandscheibe
- BF: Hühnerbrust
- SF: Schenkelfleisch
- KF: Kratzfleisch
- S: Sehne
- H: Haut
- NK: Negativkontrolle
- PK: Positivkontrolle

Die finalen Bewertungskriterien wurden vom MSM-Gehalt von 10 % abgeleitet, d.h. es wurde akzeptiert, dass ein MSM-Gehalt von 5 % negativ evaluiert wird. Damit muss das Signal jedes einzelnen Fragmentions eine Signalintensität ≥ 50 erreichen ($SNR \geq 10$), um als bestimmt zu gelten. Erst wenn mind. drei von vier Fragmentionen diese Kriterien erfüllen, gilt das Vorläuferion (Markerpeptid) als erfolgreich detektiert.

Auf Basis dieser Vorgaben wurden final weitere 39 Realproben verblindet untersucht. Die Negativkontrollen (NK) stammten von Metzgern aus versch. Regionen in Deutschland. D.h. es wurden ausschließlich NK verwendet, die nachweislich MSM-negativ sind, aus der „normalen“ Wurstherstellung stammen und damit die Anforderungen der EU-Kontrollverordnung VO (EU) 2017/625 [12] hinsichtlich der rechtlichen, wissenschaftlichen und analytischen Validität erfüllen. Zwei der Negativkontrollen wurden zusätzlich vor der Produktion mit frei erwerbbaarem Collagenhydrolysat versetzt, um den Einfluss auf die Klassifikation zu testen. Negativkontrollen vom Schwein wurden untersucht um sicherzustellen, dass dessen Kollagene die Selektivität nicht beeinträchtigen.

Die Positivkontrollen stammen sämtlich aus industrieller Produktion und sind als positiv für Hühnerseparatorenfleisch gekennzeichnet (EU-Kontrollverordnung VO (EU) 2017/625 erfüllt). Diese 39 Realproben wurden korrekt klassifiziert, sodass inkl. der

Abb. 2: Studie zum MSM mit Markerauswahl und Validierung gemäß Anhang III der EU-Kontrollverordnung VO (EU) 2017/625

Die Selektivität der Fragmentionen wurde durch den Vergleich mit reinem COL2a1 bestätigt. Abbildung 3 zeigt beispielhaft das bisher unveröffentlichte annotierte Fragmentenspektrum für M1 ($m/z = 564,2778$; $z = 3$) aus dem Knorpelgewebe des Huhns, welches den Marker M1 über die annotierte Primärsequenz der Aminosäuren als Fragment aus Col2A1 ausweist.

Als Nachweisgrenze wurde definiert, dass COL2a1 nachgewiesen ist, wenn je mind. drei von 4 Fragmentionen für M1 - 5 detek-

tiert werden ($SNR \geq 3$; für M1 mit Kreisen markiert). Für die Bestimmungsgrenze gilt ein $SNR \geq 10$. Die Zweckmäßigkeit dieser Vorgehensweise wurde mit reinem Hochdruck-Hühnerseparatorenfleisch und zusätzlich verblindet durch mit steigenden Mengen an MSM versetzte Proben (0 - 20 %) untersucht. Es wurden bewusst Mengen an MSM gewählt, die am unteren Bereich typischer MSM-Zugaben (10 - 90 %) liegen. Die Matrix beeinträchtigte die Detektion der Markerpeptide nicht und der gewählte Konzentrationsbereich war adäquat.

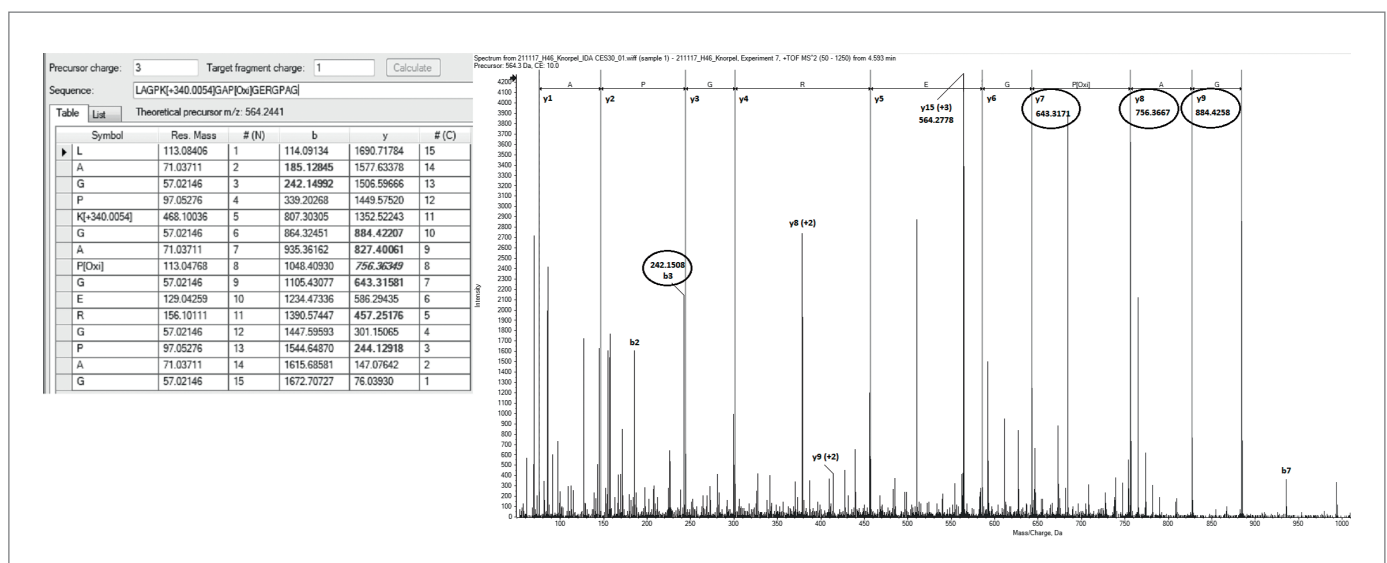


Abb. 3: Fragmentationenspektrum (MSMS) des Markerpeptides M1 (bisher unveröffentlichte Daten). Gezeigt ist das Spektrum für M1 (564.2778 m/z ; $z = 3$). Damit sind jetzt vier von fünf Fragmentenspektren auch durch Datenbankrecherche eindeutig dem Col2a1 zugeordnet. Die Tabelle zeigt die gebildeten b-/y-Ionen. Mit den Kreisen sind die ausgewählten Fragmentionen hervorgehoben, welche zur Identifikation des Markers M1 im targeted-Modus (pMRM) eingesetzt werden [26]

Proben mit steigendem MSM-Gehalt (0 – 20%) die Gesamtpräzision der Methodik 98% beträgt [26].

Schlussfolgerung

Erhöhte Anteile an COL2a1 wurden in reinem MSM vom Huhn nachgewiesen. Zudem konnten fünf Markerpeptide vom COL2a1 erfolgreich in einer geblindeten Studie zum Nachweis und zum Ausschluss der Verwendung von MSM bei der Wurstproduktion verwendet werden. Damit wurde die eingangs formulierte Arbeitshypothese bestätigt und die Methode zum Nachweis von Hühnerseparatorenfleisch mittels LC-MS/MS erfolgreich entwickelt und validiert. Die in der Überschrift gestellte Frage, „Massenspektrometrie: eine neue Technik zum Nachweis von Lebensmittelbetrug in Fleisch und Wurstwaren?“ ist somit mit ja zu beantworten. Die entwickelte Methode ist bislang eine „in-house“-Lösung. Erste Experimente lassen allerdings vermuten, dass der Assay erfolgreich auf triple-Quad-Systeme (QQQ) übertragen werden kann. Dieses wäre ein wichtiger Schritt, weil QQQ-Systeme bei der Lebensmittelüberwachung im Gegensatz zu „hochauflösenden“ QTOF-Systemen oftmals verfügbar sind.

Ausblick

Die LC-MS/MS-Methodik wird derzeit für den Nachweis von Putenseparatorenfleisch entwickelt. Auch in diesem Fall wird eine geblindete Studie die Validität der Methodologie beweisen müssen. Ebenso ist die Anwendung auf Separatorenfleisch vom Schwein derzeit in der Entwicklung.

Danksagung

Die Forschung zum MSM wurde gefördert vom BMWi, Zentrales Innovationsprogramm für kleine und mittlere Unternehmen (ZIM), Förderkennzeichen KK5 125601BM0

Literatur

- [1] Stoyke M. et al.. German Government Official Methods Board Points the Way Forward: Launch of a New Working Group for Mass Spectrometry for Protein Analysis to Detect Food Fraud and Food Allergens *Journal of AOAC International* Vol. 102, no. 5, 2019
- [2] Jira W, Schwägele F (2017) A sensitive high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the detection of microbial transglutaminase in different types of restructured meat. *Food Chem* 221:1970–1978. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.030>.
- [3] Jira W. et al.. Inter-laboratory Validation of an HPLC-MS/MS Method for the Detection of Microbial Transglutaminase in Meat and Meat Products *Food Analytical Methods* <https://doi.org/10.1007/s12161-022-02289-0>.
- [4] Xiong et al.. Selection of Tree Nut Allergen Peptide Markers: A Need for Improved Protein Sequence Databases. *Journal of AOAC International* Vol. 102, no. 5, 2019.
- [5] Perner et al.. Investigation of Reduced ELISA Recovery of Almond and Hazelnut Traces from Roasted Nut Samples by SDS-PAGE and Mass Spectrometry *Journal of AOAC International* Vol. 102, no. 5, 2019
- [6] M. Ruhland, R. Klinger. Food Fraud: A Simple and Efficient LC-MS/MS Approach for Peptide-Based Food Authentication *Journal of AOAC International* Vol. 102, no. 5, 2019.
- [7] Lasch P, Uhlig S, Uhlig C, Wilhelm C, Bergmann N, Wittke S. Development and in-house validation of an LC-MS and LC-MS/MS assay for the determination of food fraud for different fish species. 2019. *Journal of AOAC International*. <https://doi.org/10.5740/jaoac.int.19-0061>
- [8] Fiorino et al.. Mass Spectrometry-Based Untargeted Proteomics for the Assessment of Food Authenticity: The Case of Farmed Versus Wild-Type Salmon *Journal of AOAC International* Vol. 102, no. x, 2019
- [9] Brümmer I. et al.. Authentizität von Lebensmitteln - „Echter“ Thunfisch Isobares Labeling als Methode zur Identifizierung von Markerpeptiden zum Authentizitätsnachweis. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 114 (4): 156-163 (2018)
- [10] C. Stader, M. Judas, W. Jira. A rapid UHPLC-MS/MS screening method for the detection of the addition of porcine blood plasma to emulsion-type pork sausages. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2019) 411:6697 – 6709.
- [11] https://food.ec.europa.eu/safety/agri-food-fraud/food-fraud-what-does-it-mean_en; letzter Zugriff 09.11.2022
- [12] <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX:02017R0625-20170407&from=DE>. Letzter Zugriff 09.11.2022
- [13] <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:139:0055:205:DE:PDF>; letzter Zugriff 09.11.2022
- [14] <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:304:0018:063:de:PDF>; letzter Zugriff 09.11.2022.
- [15] <https://www.rechtsprechung.niedersachsen.de/jportal/portal/page/bsndprod.psm?doc.id=MWRE220006500&st=null&showdoccase=1>; letzter Zugriff 09.11.2022
- [16] 89. Arbeitstagung des ALTS. *J Consum Pro Food Saf* (2021), <https://doi.org/10.1007/s00003-022-01400-01>
- [17] https://www.lgl.bayern.de/lebensmittel/warengruppen/wc_07_fleischerzeugnisse/et_separatorenfleisch.htm, letzter Zugriff 10.11.2022
- [18] <https://msp-magazine.com/lima-a-world-of-separation/>, letzter Zugriff 10.11.2022
- [19] Tremlova B, Sarha P, Pospiech M, Buchtova H, Randulova Z (2006) Histologische Untersuchung verschiedener Arten von Separatorenfleisch. *Arch Lebensmittelhyg* 57:85–91
- [20] Mohamed MA, Zahran DA, Kasem GMA, Emara MMT, Mansour NM (2016) Detection of mechanically recovered poultry meat (MRPM) in traditional Egyptian luncheon (emulsion type sausage). *Pol J Food Nutr Sci* 66(1):17–23. <https://doi.org/10.1515/pjfn-2015-0013>
- [21] Langen M, Horn D (2020) *Bildatlas Histologie Fleisch und Fleischerzeugnisse: Befunde beurteilen - Ergebnisse sicher bewerten*, 1st edn. Behrs Verlag, Hamburg
- [22] Stanislawski, *Fleischwirtschaft*, Juli 2022
- [23] <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=COL2A1&keywords=col2a1>; letzter Zugriff 23.07.2022
- [24] <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=COL1A2>; letzter Zugriff 23.07.2022.
- [25] Uhlig s. et al.. Valid machine learning algorithms for multiparameter methods. *Accred Qual Assur* DOI 10.1007/s00769-019-01384-w
- [26] Wilhelm et al. Detection of Mechanically Separated Meat from Chicken in Sausages and Cold Meat by Targeted LC-MS/MS Analysis. *Food Analytical Methods*, <https://doi.org/10.1007/s12161-022-02231-4>
- [27] S. Wittke, M. Hofsommer; *Zukunft oder Gegenwart? LC-MS/MS von Proteinen zum Erkennen von Lebensmittelbetrug; LABO*, 09.2022; <https://www.labo.de/spektroskopie/lc-ms-ms-von-proteinen-zum-erkennen-von-lebensmittelbetrug.htm>