

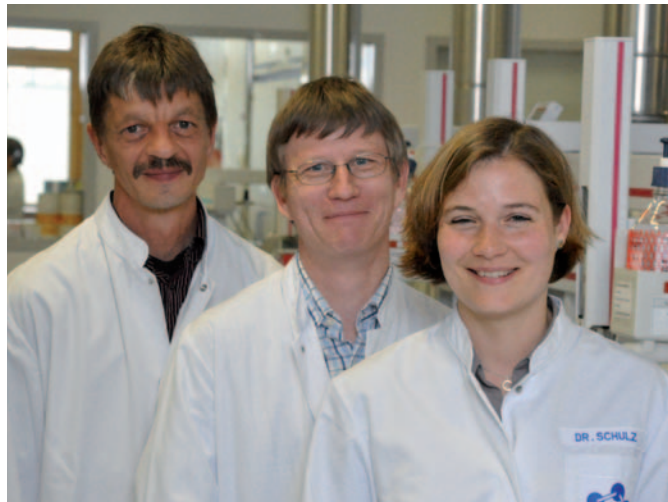
PAK-Analytik am Puls der Zeit

Gemäß der seit dem 1. September 2012 geltenden Änderung der EU-Kontaminanten-Verordnung bedarf es zum Nachweis polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe (PAK) in Lebensmitteln der Bestimmung vier spezifischer PAK-Verbindungen. Einem Gutachten der European Food Safety Authority (EFSA) zufolge genügt Benzo[a]pyren allein nicht als Marker für das Vorkommen von PAK in Lebensmitteln. Die Eurofins WEJ Contaminants GmbH, ein in Hamburg ansässiges Labor der Eurofins-Gruppe, hat sich frühzeitig Gedanken gemacht, wie sich die PAK-Analytik mittels GC/MS wirksam optimieren beziehungsweise weitestgehend automatisieren lässt. Der Schlüssel zum Erfolg fand sich in der automatisierten Festphasenextraktion.

Eine Schwalbe macht noch keinen Sommer, heißt es im Volksmund. Bei polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) galt das Gegenteil: Wenn Benzo[a]pyren, die wohl bekannteste PAK-Verbindung, in einem Lebensmittel gefunden wurde, konnte man davon ausgehen, dass weitere Vertreter dieser Schadstoffgruppe in der Lebensmittelmatrix stecken. Denn das ist ihre Eigenart: „PAK treten stets als Gemisch vieler hundert Einzelverbindungen auf“ [1].

Als Kontaminanten, also unerwünschte Stoffe, gelangen PAK zum einen über Kontakt mit Luft, Boden oder Wasser in Lebensmittel oder aber entstehen im Zuge der Weiterverarbeitung, etwa durch Räuchern, Grillen, Rösten, Braten oder Backen, sowie im Verlauf von Konservierungsmaßnah-

men wie Darren oder Trocknen, wenn das Lebensmittel unmittelbar mit der Flamme oder dem entstehenden Rauch(gas) in Berührung kommt [2].



Erfolgreich durch Weitsicht (v. r.): Dr. Claudia Schulz, Business Unit Manager, Ansgar Ruthenschror, Forschung & Entwicklung, und Holger Fritz, Laborleiter.

cherheit (EFSA) 2008 in Auftrag gegeben hat, ist Benzo[a]pyren entgegen aller bisherigen Auffassung kein geeigneter Marker für das Vorkommen polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe in Lebensmitteln. Vielmehr eignet sich ein System insbesondere aus vier spezifischen PAK-Verbindungen am besten als Indikator. Folglich wurde die der Bestimmung von PAK-Höchstgehalten zugrunde liegende EU-Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 überarbeitet und durch die Änderungsverordnung (EU) Nr. 835/2011 ergänzt. Seit September 2012 fungieren neben einem Einzelgrenzwert für Benzo[a]pyren auch ein Summengrenzwert für Benzo[a]pyren, Benz[a]anthracen, Benzo[b]fluoranthren und Chrysen, die sogenannten PAK4, als spezifische Marker für die PAK-Belastung von Lebensmitteln. [2]

PAKs auf einen Blick

„Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) sind eine Gruppe organischer Verbindungen (mit zwei oder mehreren kondensierten aromatischen Ringen) mit mehreren hundert chemischen Verbindungen. Sie entstehen bei der unvollständigen Verbrennung organischer Materialien. PAKs sind Bestandteil fossiler Brennstoffe wie Kohle und Mineralöl und gelangen durch Abgase zum Beispiel von Kraftfahrzeugen, Einzelfeuerungsanlagen und Heizungen in die Umwelt.“ [2] Weltweit werden zwei Gruppen von PAKs in Lebensmitteln systematisch erfasst: die 16 EPA-PAK, welche durch die US-amerikanische Umweltbehörde (Environmental Protection Agency, EPA) gelistet wurden, und zum anderen die 15+1-Prioritäts-PAKs, welche von der EFSA als relevant eingestuft wurden.

Alles halb so wild, könnte man meinen, schließlich besitzen PAK für den Menschen nur eine geringe akute Toxizität (sie steigt mit dem Molekulargewicht beziehungsweise der Anzahl der aromatischen Ringschlüsse). Jedoch könnte die Langzeitwirkung einiger Familienmitglieder (siehe Kasten: PAKs auf einen Blick) nicht drastischer sein: Sie beeinträchtigen die Fertilität, wirken mutagen und können Krebs auslösen. Die International Agency for Research on Cancer (IARC) stuft Belastungen mit PAK-Gemischen in die Gefahrengruppe 1 („nachweislich kanzerogen“) ein, während alle Einzelsubstanzen maximal Gruppe 2A zugeordnet werden („wahrscheinlich kanzerogen“). [3]

Gemäß eines Gutachtens, welches das wissenschaftliche Gremium für Kontaminanten in der Lebensmittelkette bei der Europäischen Behörde für Lebensmittelsi-

Motivation zu handeln und zu wandeln

In Anbetracht von Umweltverschmutzung und Klimawandel, schwindender Ressourcen und steigender Preise ist der bedenkenlose Umgang mit finanziellen wie materiellen Ressourcen alles andere als zeitgemäß. Ein globaler Prozess des Umdenkens hat begonnen, Ökonomie und Ökologie nicht als Gegensätze, sondern gemeinsame Basis nachhaltigen Wirtschaftens zu begreifen.

Dies gilt im großen chemischen Produktionsbetrieb wie im Auftragslabor. Wer Analysenverfahren minimiert und automatisiert, so die Theorie, steigert die Effektivität seiner Mitarbeiter, spart Lösemittel und Geld, schont die Umwelt, erhöht den Probandendurchsatz und erzielt obendrein bessere

Resultate. Die Praxis liefert den Beweis für die Richtigkeit dieser Denkweise. Wer im Wettbewerb die Nase vorn haben möchte, braucht überzeugende Argumente und die richtigen Lösungen.

Auf der Suche nach der besten Lösung

An einer solchen Lösung für ihre PAK-Analytik war auch die Eurofins WEJ Contaminants interessiert: „Bis 2008/2009 setzten wir im Zuge des GC/MS-Nachweises von PAK in Ölen und anderen Lebensmittelmatrices bei der Probenaufreinigung auf die Gelpermeationschromatographie (GPC)“, berichtet Dr. Claudia Schulz, Business Unit Managerin von Eurofins WEJ Contaminants. Dies sei eine probate Lösung gewesen, die zufriedenstellende Resultate geliefert habe, sich allerdings auch sehr arbeits- und lösemittelintensiv gestaltete. „Unser Ziel war es“, ergänzt Ansgar Ruthenschör, Chemieingenieur im Bereich Forschung und Entwicklung, „die manuellen Probenvorbereitungsschritte nach Möglichkeit zu eliminieren und die Analyse weitestgehend zu automatisieren.“ Unter anderem habe man über eine Miniaturisierung der GPC nachgedacht, berichtet Holger Fritz, der Leiter der Abteilung „Organische Kontaminanten“, was den bis dahin erforderlichen immensen Lösemiteleinsetz und die damit verbundenen Kosten hätte senken können. Es wurden Tests vorgenommen, die jedoch ab einem bestimmten Punkt nicht mehr weiterverfolgt wurden angesichts der weitaus attraktiveren Alternative der Festphasenextraktion (SPE), „die interessante Mehrwerte im Zuge einer vollständigen Automatisierung bot“, betont Dr. Claudia Schulz.

Die Überlegung, eine SPE-GC/MS-Methode zum Nachweis von PAK aus Ölen und anderen Lebensmittelmatrices zu entwickeln und zu etablieren, wurde laut Ansgar Ruthenschör von einem Beitrag im Journal of Chromatography A [7] ausgelöst. Darin beschrieben wurde der Einsatz einer Polystyroldivinylbenzol-Phase zur SPE-Aufreinigung der Proben nach vorangegangener Pressurized Liquid Extraction (PLE) beziehungs-

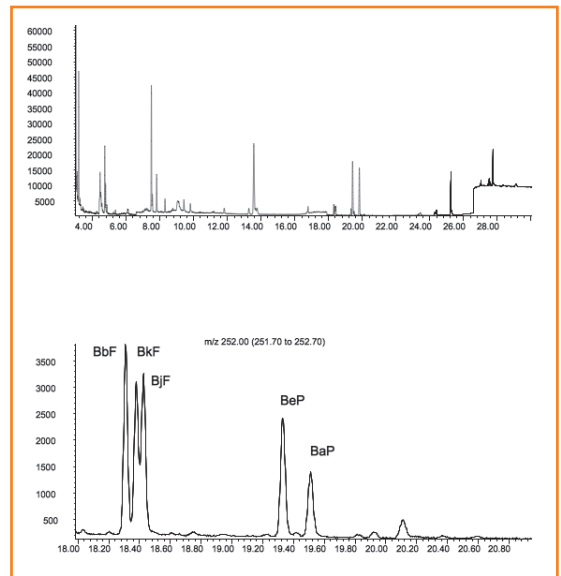
weise Accelerated Solvent Extraction (ASE) mit Cyclohexan als Extraktionsmittel. Der Startpunkt war markiert. Als weitere SPE-Phase testete Ansgar Ruthenschör Kieselgel gemäß einer Empfehlung der EU-Verordnung zum Nachweis von Raucharomen [(EG) Nr. 2065/2003], verfolgte diesen Ansatz jedoch in letzter Konsequenz nicht weiter. Nachdem vorbereitende Tests im Forschungslabor der Eurofins WEJ Contaminants GmbH mit der Polystyroldivinylbenzol-Phase zu vielversprechenden Ergebnissen geführt hatten, ging es daran, eine Möglichkeit der Automatisierung zu finden und den Transfer der manuellen SPE-Methode auf eine Maschine zu realisieren.

Teamarbeit mit Kompetenz und Weitblick

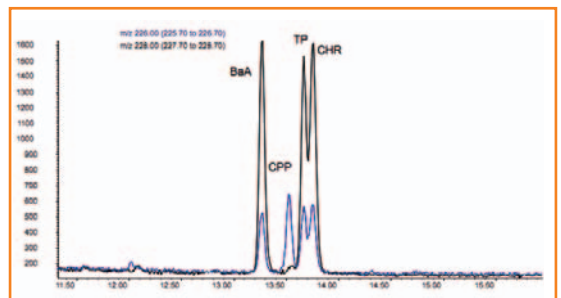
„An dieser Stelle traten wir auf den Plan“, berichtet Michael Gröger, GERSTEL-Vertriebsleiter, der die

Eurofins und Eurofins WEJ Contaminants GmbH

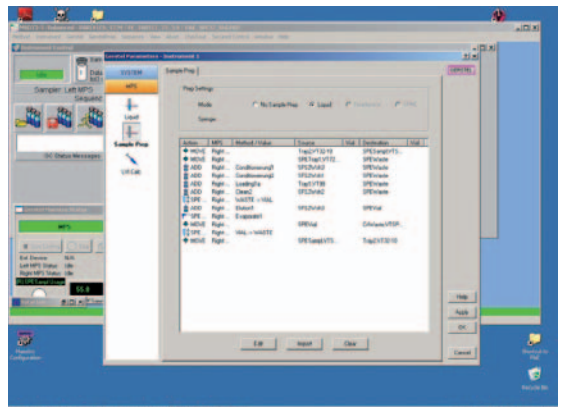
Eurofins ist eine führende internationale Unternehmensgruppe im Bereich Laboranalytik und bietet ein einzigartiges Spektrum von Prüf- und Serviceleistungen für Unternehmen aus den Bereichen Lebensmittel, Pharma, Umwelt und Konsumgüter an. In 32 Ländern sind mehr als 12.000 Mitarbeiter bei Eurofins beschäftigt. 170 Laboren unterhält die Unternehmensgruppe weltweit. Gegründet 1987 mit 10 Mitarbeitern zur Vermarktung der SNIF-NMR-Technologie, einer patentierten Methode zum Nachweis von Herkunft und Reinheit von Lebensmitteln, feiert die Gruppe aktuell ihr 25-jähriges Bestehen. 40 Eurofins-Standorte befinden sich allein in Deutschland. Einer davon liegt verkehrsgünstig im Hamburger Süden im Stadtteil Harburg, mit Nähe zu Hafen und Autobahnen. Hier ist unter anderem die Eurofins WEJ Contaminants mit ihren Kompetenzzentren für organische und anorganische Kontaminanten, Mykotoxine und Tierarzneimittelrückstände ansässig. [6]



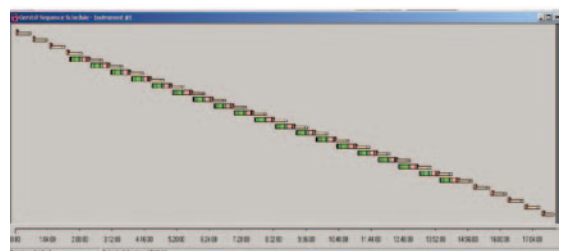
Referenzprobe, Matrix „Lebensmittelöl“ mit einem Gehalt von ca. 0,8 µg/kg je Analyt. Die Abbildung oben zeigt das gesamte Chromatogramm als TIC (Totalionenchromatogramm), die untere die Massenspur m/z 252 für Benzo[b]fluoranthen (BbF), Benzo[k]fluoranthen (BkF), Benzo[j]fluoranthen (BjF), Benzo[e]pyren (BeP), Benzo[a]pyren (BaP) und Perylen.



Darstellung der Spuren m/z 226 und 228 für Benzo[a]anthracen (BaA), Cyclopenta[cd]pyren (CPP), Triphenylen (TP) und Chrysen (CHR).



Prep-Methode im Anhang der GC-Methode (MAESTRO-Software), entstanden durch die Erweiterung der Software zwecks Anhängen von Proben in der laufenden Sequenz.



Scheduler-Übersicht der Verschachtelung von GC- und Prep-Methode.



Wichtiges Bindeglied zwischen Anwender und Gerätehersteller: GERSTEL-Vertriebsleiter Michael Gröger (2. v. r.) zu Besuch im GC-Labor der Eurofins WEJ Contaminants GmbH in Hamburg.

Substanz	Speiseöl			Fisch		
	r [ppb]	RSD [%]	Richtigkeit [%]	r [ppb]	RSD [%]	Richtigkeit [%]
Phenanthren	0,3	25	90	7,3	9,4	110
Fluoranthren	0,5	31	106	3,8	11	100
Pyren	0,6	27	91	4,9	13	97
Benzo[a]anthracen	0,4	5,1	102	4,3	11	110
Chrysen	0,4	4,2	95	3,5	9,1	102
Benzo[b]fluoranthren	0,4	5,2	115	3,7	11	104
Benzo[k]fluoranthren	0,3	5,5	113	1,3	19	99
Benzo[a]pyren	0,4	7,7	93	2,0	11	109
Indeno[1,2,3-c,d]pyren	0,3	8,0	87	1,4	8,9	92
Dibenzo[a,h]anthracen	0,3	11	120	1,4	10	109
Benzo[g,h,i]perylene	0,4	8,5	100	1,5	9,3	94
Benzo[e]pyren	0,7	12	106	1,9	4,4	96
Perylen	0,8	18	96	2,0	4,0	99
Anthanthren	0,5	4,0	83	2,1	5,3	106
Dibenzo[a,l]pyren	0,7	8,8	99	2,3	4,7	109
Cyclopenta[c,d]pyren	0,9	3,3	124	2,6	9,5	85
Methylchrysen	0,8	11	101	2,3	3,3	105
Benzo[c]fluoren	0,8	12	99	2,5	21	108

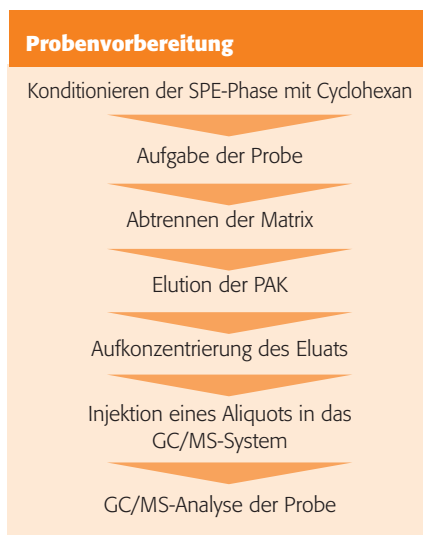
Für die PAK-Analyse mit der von Eurofins eingesetzten neuen SPE-MPS-GC/MS-Methode erzielte statistische Parameter.

Type	Method	Temp	Vol	Volume	Data File	Sample Name	Misc Info	Barcode
1	Sample	PREL_VTR0.M	Trav_VTR0	32	90.0	init		0,5
2	Sample	PARLYIC0_12.M	Trav_VT32-10	2	90.0	BLKOSTD-APV01417		1,00
3	Sample	PARLYIC0_12.M	Trav_VT32-10	3	90.0	REP05D-APV01159		1,64
4	Sample	PARLYIC0_12.M	Trav_VT32-10	4	90.0	049479-APV012		1,81
5	Sample	PARLYIC0_12.M	Trav_VT32-10	5	90.0	045325-APV014		1,57
6	Sample	PARLYIC0_12.M	Trav_VT32-10	6	90.0	050680-APV012		1,69
7	Sample	PARLYIC0_12.M	Trav_VT32-10	7	90.0	050681-APV012		1,01
8	Sample	PARLYIC0_12.M	Trav_VT32-10	8	90.0	051439-APV011		1,77
9	Sample	PARLYIC0_12.M	Trav_VT32-10	9	90.0	051440-APV011		1,68
10	Sample	PARLYIC0_12.M	Trav_VT32-10	10	90.0	051441-APV011		1,74
11	Sample	PARLYIC0_12.M	Trav_VT32-10	11	90.0	051442-APV011		1,59
12	Sample	PARLYIC0_12.M	Trav_VT32-10	12	90.0	051779-APV011		1,83
13	Sample	PARLYIC0_12.M	Trav_VT32-10	13	90.0	051778-APV011		1,63
14	Sample	PARLYIC0_12.M	Trav_VT32-10	14	90.0	051403-APV011		1,65
15	Sample	PARLYIC0_12.M	Trav_VT32-10	15	90.0	051435-APV011		1,69
16	Sample	PARLYIC0_12.M	Trav_VT32-10	16	90.0	051436-APV011		1,62
17	Sample	PARLYIC0_12.M	Trav_VT32-10	17	90.0	051437-APV011		1,58
18	Sample	PARLYIC0_12.M	Trav_VT32-10	18	90.0	051438-APV011		1,68
19	Sample	PARLYIC0_12.M	Trav_VT32-10	19	90.0	051431-APV011		1,52
20	Sample	PARLYIC0_12.M	Trav_VT32-10	20	90.0	051432-APV011		1,87
21	Sample	PARLYIC0_12.M	Trav_VT32-10	21	90.0	051433-APV011		1,82
22	Sample	PARLYIC0_12.M	Trav_VT32-10	22	90.0	051434-APV011		1,78
23	Sample	PARLYIC0_12.M	Trav_VT32-10	23	90.0	051400-APV011		1,67
24	Sample	PARLYIC0_12.M	Trav_VT32-10	24	90.0	051401-APV011		1,68
25	Sample	PARLYIC0_12.M	Trav_VT32-10	25	90.0	051513-APV011		1,75
26	Keyword	DataPath				F:\msdche...		

Sequenztafel für die Kombi-Methode „GC und Probenvorbereitung“.

Weichen für die spätere intensive Kooperation des Unternehmens mit Eurofins stellte. Da zunächst vorrangig anwendungsspezifische Fragen zu klären waren, wurde Dr. Oliver Lerch aus der GERSTEL-Applikationsabteilung mit ins Boot geholt. Das Anforderungsprofil von Eurofins, Öl- und Lebensmittelmatrices im großen Stil umfangreich aufzureinigen, Extrakte zu ziehen und Aliquote davon unmittelbar, sprich: direkt im Anschluss in ein GC/MS-System zu injizieren, brachte die Dual-Rail-Variante des GERSTEL-MultiPurposeSamplers (MPS-PrepStation) auf die Poleposition. Die ersten, von Ansgar Ruthenschör und Dr. Oliver Lerch bei GERSTEL durchgeführten Tests verliefen bereits annähernd wie gewünscht.

Mehrere Tage „feilten“ Ansgar Ruthenschör und Oliver Lerch im GERSTEL-Applikationslabor an der Methode, bis schließlich ein „Proof of Concept“ erarbeitet war. Die weitere Optimierung und Implementierung in die Laborroutine bei Eurofins wurde schließlich von Ansgar Ruthenschör vorangetrieben. Über eine geraume Zeitspanne überprüfte der Chemieingenieur die SPE-Parameter unter Einsatz der Polystyroldivinylbenzol-Phase. Dann schließlich war es so weit, die Methode ließ sich auf die DualRail-Variante des GERSTEL-MPS transferieren und im Detail unter Praxisbedingungen auf Herz und Nieren testen. Die Entwicklungsarbeit förderte sieben Schritte zutage, die vom MPS auszuführen waren:



Entsprechend wurden die Methodenparameter in eine Prep-Sequenzliste der MAESTRO-Steuersoftware übertragen, was sich wegen der vergleichsweise einfachen Handhabung der Steuersoftware bequem und ohne großen Aufwand realisieren ließ. Ein weiteres Plus der Methode ist die zeitliche Verschachtelung (PrepAhead-Funktion) von Probenvorbereitung und Analyse. Schon bevor eine Probe den Prozess vollständig durchlaufen hat, geht die nächste Probe

an den Start. Hieraus ergeben sich geringere Durchlaufzeiten, laut Dr. Claudia Schulz eine wesentliche Kundenanforderung.

Erfolgreiche Teilnahme an Ringversuchen

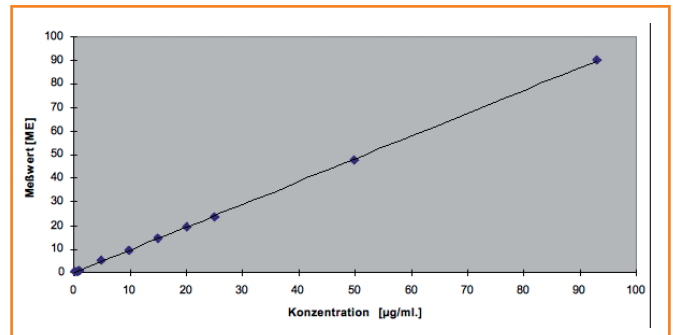
Ob das automatisierte MPS-GC/MS-System die Eurofins-Anforderungen erfüllt hat und sich in der Praxis bewähren konnte, wurde im Zuge von Vergleichsmessungen untersucht. Ansgar Ruthenschrör: „Gegenübergestellt erwiesen sich die Ergebnisse der GPC und des neuen automatisierten SPE-GC/MS-Systems überzeugend vergleichbar; die Methode hatte ihre Feuertaufe bestanden – auch unter Einsatz praxisrelevanter Öl- und Lebensmittelproben.“ Erreicht wurde in der Regel eine Bestimmungsgrenze (Limit of Quantification, LoQ) $< 0,5 \mu\text{g}/\text{kg}$; für die später eluierenden, höher siedenden PAK wie die Dibenzpyrene $< 1 \mu\text{g}/\text{kg}$. Methodenlinearität, Wiederhol- und Vergleichspräzision überzeugten durch sehr zufriedenstellende Ergebnisse. „Die Richtigkeit der Methode stand außer Frage aufgrund unserer erfolgreichen Teilnahme an Ringversuchen sowie die Gegenprüfung durch die Analyse dotierter Proben“, berichtet Dr. Claudia Schulz.

Alle Beteiligten von Eurofins und



GERSTEL betonen unisono die hohe Effektivität der Zusammenarbeit, insbesondere die Kombination der applikativen Kompetenz aufseiten des Kunden und des gerätetechnischen Know-hows aufseiten der GERSTEL-Experten. Die Idee zur beschriebenen automatisierten SPE-GC/MS-Methode zum Nachweis von PAK wurde von den Eurofins-Experten ausbaldowert, manuell getestet und für gut befunden; deren Automatisierung

und gerätetechnische Umsetzung wiederum übernahmen die Applikationsspezialisten von GERSTEL mit beherzter Unterstützung von GERSTEL-Service-Ingenieur Michael Witte, „der uns nimmermüde stets mit Rat und Tat zur



Linearität der gesamten Methode einschließlich der MPS-Aufarbeitung für Benzo[a]pyren.

Quellen- und Querverweise

- [1] Umweltbundesamt: Chemikalienpolitik und Schadstoffe, REACH. Häufige Fragen zu: PAK. (www.umweltbundesamt.de/chemikalien/pak/index.htm)
- [2] Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit: EU-weiter Verbraucherschutz vor Umweltkontaminanten in Lebensmitteln (www.bmu.de/gesundheits_und_umwelt/lebensmittelsicherheit/verbraucherschutz_eu/doc/41907.php)
- [3] Helmholtz Zentrum München, Human-Biomonitoring: Polizyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK), (www.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/infostelle-humanbiomonitoring/pdf/PAK1.pdf)
- [4] Guido Deußing: Alles eine Frage der Methode. PAK effizienter analysieren und nachweisen. GERSTEL Aktuell 28 (2008) 12-15
- [5] Eurofins WEJ Contaminants (www.eurofins.de/lebensmittel/labore/eurofins-wej-contaminants/uber-eurofins-wej-contaminants/historie.aspx)
- [6] Eurofins Deutschland: Übersicht über das analytische Leistungsspektrum der Eurofins-Gruppe in Deutschland (www.eurofins.de/de-de.aspx)
- [7] Veyrand, B., Brosseau, A., Sarcher, L., Varlet, V., Monteau, F., Marchand, P., Andre, F., Le Bizec, B.: Innovative method for determination of 19 polycyclic aromatic hydrocarbons in food and oil samples using gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry based on an isotope dilution approach. Journal of Chromatography A, 1149 (2007) 333-344

Seite stand“, betont Ansgar Ruthenschrör. Am Rande bemerkt: Die Begegnung auf Augenhöhe gleichberechtigter Partner, wie sie sich im oben geschilderten Fall zugetragen hat, zog weitreichende Konsequenzen nach sich. Unter anderem habe der Wunsch von Eurofins, Proben auch im Zuge einer laufenden, komplexen SPE/GC-Sequenz ohne Unterbrechung nachtragen zu können, zur Entwicklung der sogenannten Preplets geführt, die heute fester Bestandteil der MAESTRO-Software sind, betont Dr. Oliver Lerch (siehe dazu S. 27).

Apropos...

Eurofins WEJ Contaminants und GERSTEL arbeiten nach wie vor eng und fruchtbar zusammen: Inzwischen betreibt das Hamburger Unternehmen drei GERSTEL-GC/MS-Komplettsysteme zur PAK-Analyse.