

# Ei der Daus!

Der Lebensmittelskandal um den illegalen Einsatz des Insektizids Fipronil in Geflügelbetrieben macht einmal mehr deutlich, dass Vertrauen gut, analytische Kontrolle aber besser ist. Wir stellen Ihnen hier eine effizient automatisierte Methode zum Nachweis von Fipronil mittels GC/MS oder LC/MS vor.

Von Guido Deußing

Soll überprüft werden, ob ein Lebensmittel den Anforderungen des Verbraucherschutzes genügt, braucht es eine wirksame Analytik, mit der sich relevante Analyten empfindlich, richtig und reproduzierbar bestimmen lassen. Die Analytik sollte eine gewisse applikative Flexibilität bieten, um auf aktuelle Fragestellungen reagieren zu können, und sie sollte idealerweise kostengünstig sein. Nicht zuletzt erweist es sich, wie im Fall skandalträchtiger Lebensmittelverunreinigungen, als erheblich, ob sich größere Probenzahlen ohne Schwierigkeiten untersuchen und vermessen lassen.

Unter diesem Vorzeichen hat die TeLA GmbH, ein akkreditiertes Auftragslabor für Lebensmittel- und Umweltanalytik, eine Chromatographie-basierte Analysenmethode zum Nachweis des Insektizids Fipronil aus Eiern und Geflügelfleisch entwickelt. Als Grundlage für den Nachweis von Pestizidrückständen in Lebensmitteln diente dem Applikationsteam um Franziska Chmelka und Dr. Norbert Helle die von Anastassiades *et al.* entwickelte QuEChERS-Clean-

up-Methode [1]. Gegenüber anderen Verfahren bietet die QuEChERS-Methode einige Mehrwerte, berichtet Franziska Chmelka: „Der Verbrauch teils toxischer Lösungsmittel ist geringer, ebenso der manuelle Arbeitsaufwand. Nicht zuletzt lässt sich die Probe rasch aufarbeiten und es wird ein breites Spektrum an Pestiziden mit hoher Präzision erfasst.“

## Betrachtung der klassischen QuEChERS-Methode

Um die klassische QuEChERS-Methode den Erfordernissen anzupassen, nahmen Chmelka *et al.* die Automatisierung des in aller Regel arbeits- und zeitaufwendigen Clean-up-Prozesses in Angriff. Die manuelle Arbeitsweise umfasst folgende Arbeits- und Zwischenschritte:

10 g homogenisierte Probe werden mit 10 mL Acetonitril versetzt und extrahiert. Anschließend werden Magnesiumsulfat und Natriumchlorid hinzudosiert. Die Probe wird geschüttelt und zentrifugiert. Die Salzzugabe ermöglicht die Trennung der Acetonitril- und Wasserphase (untere Phase). Ein Aliquot des Überstandes wird entnommen, mit Magnesiumsulfat und einem geeigneten Sorbens versetzt (was den dispersiven Charakter dieser SPE-Methode erklärt), um extrahierte Matrixbestandteile selektiv zu entfernen. Der Extrakt wird geschüttelt und zentrifugiert und der Überstand kann zur chromatographischen Untersuchung – entweder mittels GC/MS oder LC/MS – eingesetzt werden.

Allerdings hat sich herausgestellt, dass für diverse Matrices eine Variation des Verfahrens im Sinne eines speziellen Aufreinigungsschrittes, etwa mit Aktivkohle oder modifiziertem Kieselgel, un-



Foto: istock / Tsekhmister

erlässlich ist. Somit ist häufig ein zweiter Clean-up-Schritt notwendig [1].

## Automatisierung steigert Effizienz und Produktivität

„Wir haben für die Automatisierung der QuEChERS-Schritte keine dispersive Festphasenextraktion (SPE) durchgeführt, sondern kommerziell erhältliche QuEChERS-spezifisch gepackte SPE-Kartuschen verwendet, die wir in Zusammenarbeit mit der Firma Macherey-Nagel und GERSTEL entwickelt haben“, bemerkt Dr. Norbert Helle. Das Sorbensbett dieser Fertigungskartuschen besteht laut dem Applikationsexperten aus einer Kombination unterschiedlicher Adsorbentien. Versehen sind die kommerziell verfügbaren QuEChERS-SPE-Kartuschen mit speziellen Transportadaptern für die automatisierte Handhabung und Mobilisierung mit dem von der TeLA genutzten Multi-PurposeSampler (GERSTEL-MPS).

In Vorbereitung auf die automatisierte Bearbeitung durch den Autosampler werden zehn Gramm Probe in ein 50-mL-Zentrifugenglas eingewogen und mit 30 mL Acetonitril sowie dem internen Standard versetzt. Die Probe wird geschüttelt und zentrifugiert; aus dem Überstand werden 10 mL in ein Probenvial pipettiert, das auf dem MPS platziert wird. Alle weiteren Arbeitsschritte verlaufen automatisiert.

## Die Arbeit des Autosamplers

Franziska Chmelka beschreibt den Ablauf der Probenvorbereitung mit dem MPS: „Zunächst entnimmt der Autosampler 7 mL Probenlösung und gibt sie auf die erste SPE-Kartusche. Der Extrakt wird in einem leeren Vial aufgefangen und zwischengelagert, die Kartusche wird verworfen. Dann entnimmt der MPS 3,5 mL Extrakt und dosiert sie auf eine zweite SPE-Kartusche. Der von Matrix befreite Extrakt wird in einem 10-mL-Vial aufgefangen und der MPS überführt ein Aliquot in ein 2-mL-Vial, das in der angeschlossenen Eindampfstation (<sup>m</sup>VAP) bis zur Trockene eingedampft wird. Für die Rekonstitution des Rückstands wählt der MPS in Abhängigkeit von der nachfolgenden Analyse das geeignete Lösemittel: Hexan, sofern es sich um eine GC-Messung

handelt, ein Acetonitril-Wasser-Gemisch, wenn die HPLC zur Anwendung kommt. Für beide Messungen lassen sich Proben auch simultan vorbereiten.“

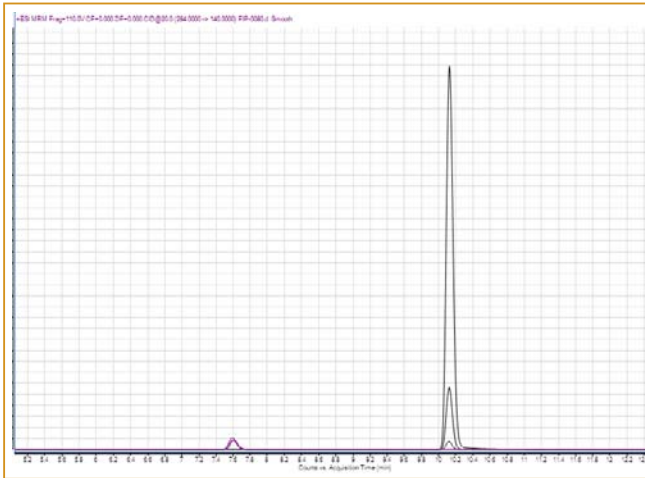
Für die Vermessung der dotierten Proben mit der HPLC-MS/MS nutzten Chmelka und Kollegen ein Agilent 6470-Triple-Quadrupol-Massenspektrometer. Die Trennung der Analyten erfolgte auf einer RP-Säule der Marke Bluebird (100 x 2 mm) von Macherey-Nagel. Für die Fipronil-Analytik zeichne sich diese Phase insbesondere durch ihre sehr gute Stabilität sowie durch bemerkenswert schmale Peaks aus, sagt Franziska Chmelka. Für die gewählte Variante habe Fipronil eine theoretische Bodenzahl von 120.000 aufgewiesen. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten, bestehend aus Acetonitril und Wasser. Wie die Lebensmitteltechnologin berichtet, benötigt das verwendete Massenspektrometer – im

Automatisierte Probenvorbereitung									
	ISTD Metazachlor-d6			Fipronil					
	Soll µg/kg	Ist µg/kg	WDF %	Soll µg/kg	Ist µg/kg	Mittelwert µg/kg	Wiederfindung %	relative Standardabweichung %	relative Standardabweichung %
Ei Level 0	50	50	100	0	0				
Ei Level 1a		50	100	10	10,2	10,3	103		
Ei Level 1b		51	102		10,4				
Ei Level 2a		50	100	100	100	100,8	101	2,49	2,5
Ei Level 2b		51	102		103				
Ei Level 2c		48	96		97				
Ei Level 2d		49	98		101				
Ei Level 2e		51	102		103				
Ei Level 2f		51	102		103				
Ei Level 3a		51	102	1.000	1021	1023,5	102		
Ei Level 3b	51	102	1026						

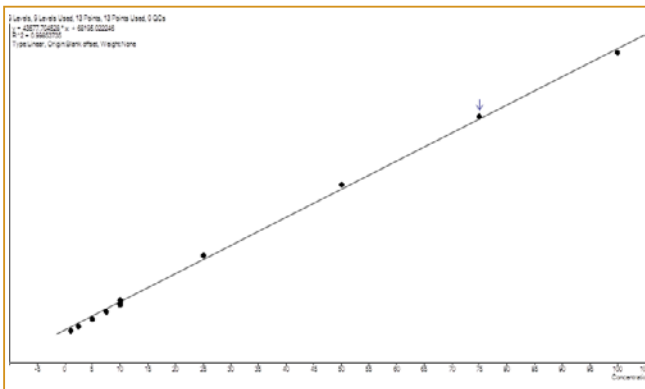
Manuelle Probenvorbereitung									
	ISTD Metazachlor-d6			Fipronil					
	Soll µg/kg	Ist µg/kg	WDF %	Soll µg/kg	Ist µg/kg	Mittelwert µg/kg	Wiederfindung %	relative Standardabweichung %	relative Standardabweichung %
Ei Level 0	50	46	92	0	0				
Ei Level 1a		51	102	10	10,4	10	100		
Ei Level 1b		49	98		9,6				
Ei Level 2a		48	96	100	96	95,8	95,8	4,44	4,6
Ei Level 2b		47	94		94				
Ei Level 2c		51	102		103				
Ei Level 2d		49	98		95				
Ei Level 2e		46	92		91				
Ei Level 2f		46	92		91				
Ei Level 3a		44	88	1.000	915	922	92,2		
Ei Level 3b	45	90	929						

## Fipronil

Das Insektizid Fipronil wird zur Schädlingsbekämpfung u. a. gegen Flöhe, Läuse, Zecken, Schaben, Milben und Ameisen eingesetzt. Es wirkt als Kontaktgift: Beim Schädling gelangt Fipronil über das Exoskelett in dessen Zentralnervensystem. Dort hemmt es den ligandengesteuerten GABA-Rezeptor und damit das Einstromen von Chloridionen. Bei Nutztieren darf es nicht angewendet werden. Fipronil ist in der EU außerdem als Wirkstoff für Pflanzenschutzmittel genehmigt. In Deutschland sind allerdings keine Pflanzenschutzmittel mit Fipronil zugelassen.



Zwei Eiprobe, dotiert mit 50 µg/kg Metazachlor-d6 (RT: 7.6min) sowie zehn beziehungsweise 100 und 1.000 µg/kg Fipronil (RT: 10.1 min)



Die Vermessung externer Standards ergab eine ausgezeichnete Linearität zwischen 1 ng/mL und 50 ng/mL. Bei Standardlösungen mit Konzentrationen über 50 ng/mL kommt es bereits partiell zu Sättigungseffekten.

Abbildungen: TeLA GmbH

Gegensatz zu anderen Systemen – keine Pufferung des Eluentengemisches. Für die GC-MS/MS-Analytik wiederum nutzte das TeLA-Applikationsteam ein Agilent 7010-Triple-Quadrupol-Massenspektrometer. Als stationäre Phase diente eine Optima 5-MS (60 m x 0,25 mm x 0,25 µm) von Macherey-Nagel.

Franziska Chmelka: „Um die Verlässlichkeit der Methode zu testen, haben wir unbelasteten Eiprobe drei verschiedene Mengen an Fipronil zugesetzt und diese Probe mehrmals manuell sowie automatisiert aufgereinigt. Daraus haben wir die Wiederfindungen sowie Standardabweichungen bestimmt. Als internen Standard verwendeten wir Metazachlor-d6 aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zum Fipronil. Jeder Probe wurden 50 µg/kg Metazachlor-d6 zugesetzt. Die zugesetzten Mengen an Fipronil lagen bei 10, 100 und 1.000 µg/kg.“

Sowohl die manuelle als auch die automatisierte Probenvorbereitung ergaben sehr gute Wiederfindungen, berichtet Dr. Norbert Helle. Bei der automatisierten Aufreinigung hätten sie zwischen 101 und 103 Prozent gelegen, ohne dass eine Korrektur durch den internen Standard vonnöten gewesen wäre. Für die manuelle Aufreinigung habe die Wiederfindung zwischen 92 und 100 Prozent gelegen und auch hier bedurfte es keiner Korrektur durch den internen Standard. Die Betrachtung der Standardabweichung ergab in puncto Wiederholbarkeit einen leichten Vorteil der automatisierten Probenvorbereitung gegenüber der manuellen Aufreinigung. Ohne weitere Schritte (Aufkonzentrieren) erreichen beide Verfahren Bestimmungsgrenzen unter 1 µg/kg. Durch Aufkonzentrierung (automatisch in das GERSTEL-MPS-System zu integrieren) ist eine noch größere Empfindlichkeit der Methode realisierbar. „Dies kann vor allem zur Beurteilung verarbeiteter Produkte, die Ei enthalten, von Bedeutung sein“, schildert Dr. Helle.

## GC-MS/MS versus HPLC-MS/MS

„Der Vergleich zwischen der HPLC-MS/MS- und der GC-MS/MS-Methode zeigte, dass beide Verfahren gleichermaßen geeignet sind zur empfindlichen Detektion von Fipronil-Rückständen in den Matrices Ei und Hühnerfleisch“, sagt Franziska Chmelka; Bestimmungsgrenze wie auch Wiederholbarkeit seien bei der HPLC-MS/MS- etwas besser als bei der GC-MS/MS-Methode gewesen. Das gaschromatographische Verfahren erfordere zudem die Verwendung eines internen Standards zur Berechnung der Gehalte.

## Referenz

- [1] Michelangelo Anastassiades, Steven J. Lehotay, Darinka Stajnbauer, Frank J. Schenk, Fast Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning, „Dispersive Solid-Phase Extraction“ for the Determination of Pesticide Residues in Produce, Journal of AOAC International 86 (2003) 412-431

Für die Vermessung der dotierten Proben mit der HPLC-MS/MS nutzten Chmelka und Kollegen ein Triple-Quadrupol-Massenspektrometer von Agilent Technologies; Probenvorbereitung und Probenaufgabe verliefen automatisiert unter Einsatz eines online-gekoppelten GERSTEL-MultiPurposeSamplers (MPS).



Foto: Guido Deußing