

MALDI-TOF MS zur Quantifizierung des Schweine- und Rinderanteils in Hackfleisch

Hankele, S., Brett, A., Männig, A., Hiller, E., Rau, J.

ekkehard.hiller@cvuas.bwl.de

Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart, Schaflandstraße 3/2, 70736 Fellbach

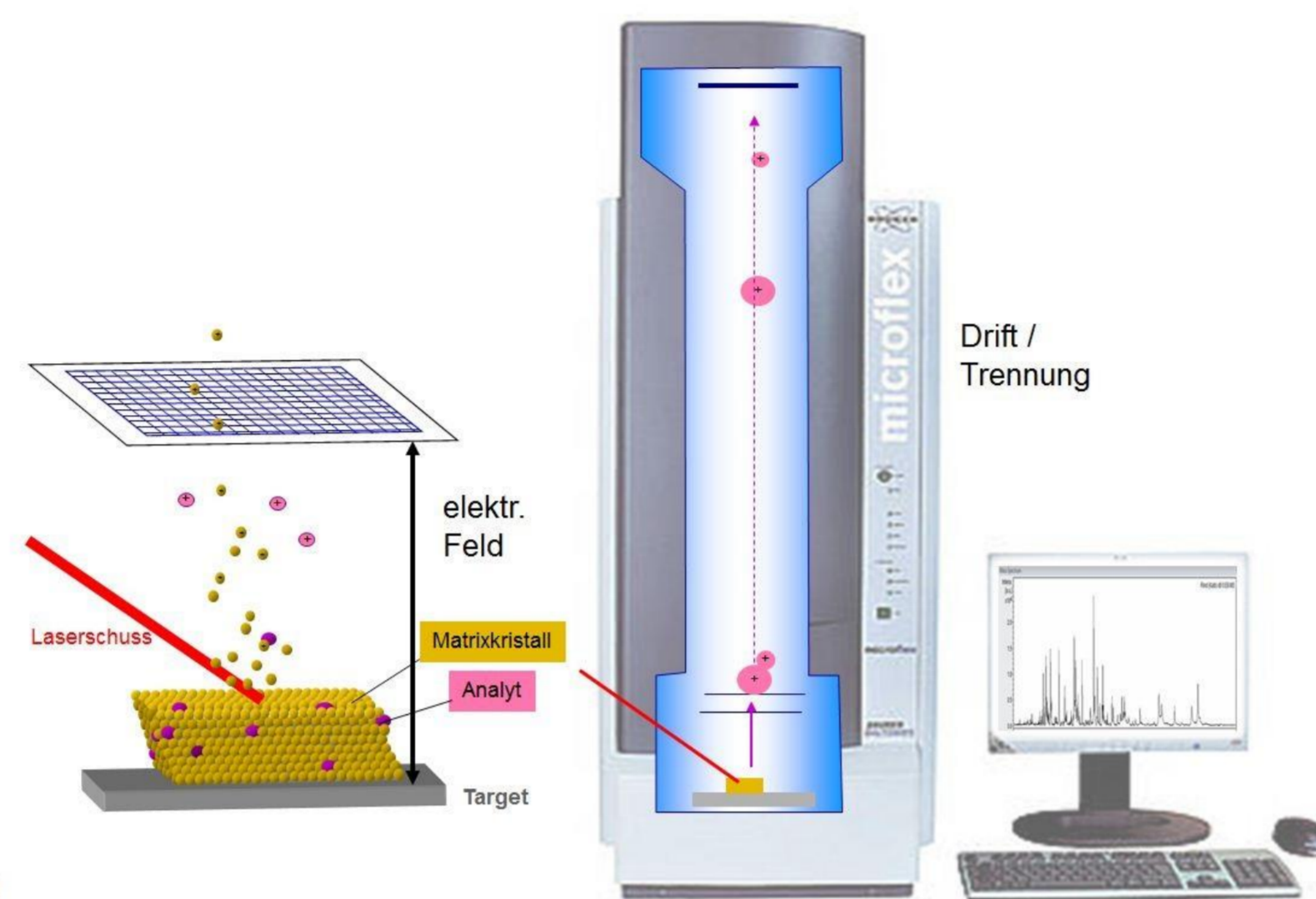
Chemisches und
Veterinäruntersuchungsamt
Stuttgart

EINLEITUNG

Der Schutz des Verbrauchers vor falsch deklarierten Lebensmitteln ist ein wichtiges Ziel der amtlichen Lebensmittelüberwachung. Bei Fleisch sind neben der Angabe der Tierart die quantitativen Angaben wertbestimmender Anteile von Bedeutung. Hier spielen neben finanziellen Schäden auch ethische und religiöse Aspekte eine Rolle.

Eine bereits etablierte Methode zur Speziesidentifizierung bei Mikroorganismen ist die Massenspektrometrie (MS) [1,2,3]. Die MALDI-TOF MS kombiniert eine Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation (MALDI) mit einem Flugzeitanalysator (time-of-flight, TOF) zur MS. Damit können große Biopolymere, wie z.B. Proteine aus Mikroorganismen, aber auch aus Fisch oder Fleisch, schonend analysiert werden.

Eine routinetaugliche Methode für die Tierartidentifizierung aus rohem Muskelfleisch wurde bereits erstellt [4]. Die darauf folgende Herausforderung war die Übertragung der Methodik auf Proben mit gemischtem Fleisch von verschiedenen Tierarten sowie die Quantifizierung der einzelnen Anteile.



REFERENZPROBEN / PROBENVORBEREITUNG

Als Referenz wurde rohes Muskelfleisch von Nutztieren verwendet. Dieses wurde gekuttert und in definierten Mengen vermischt.

Um die größere Inhomogenität im Hackfleisch auszugleichen, wurde die Probenvorbereitung ausgehend von Post & Dikler 2010 [1] optimiert:

1 g gemischtes Hackfleisch in
4 ml OS (50% Acetonitril, 47,5%
H₂O und 2,5% Trifluoressigsäure)

1 min mit Vortexmischer extrahieren
und anschließend zentrifugieren

Extrakt 1:10 mit OS verdünnen

30 s mit Vortexmischer extrahieren
und anschließend zentrifugieren

1 µl Überstand auf das Stahltarget

Trocknen und Überschichten mit
1 µl HCCA Matrixlösung

Kristallisation und MS-Messung

AUSWERTUNG DER SPEKTREN

Anhand definierter Mischungen aus Schweine- und Rindfleisch wurde eine Methode zur Quantifizierung der enthaltenen Anteile erstellt. Es ergaben sich nacheinander zwei Ansätze mit jeweils unterschiedlicher Herangehensweise. Die Validierung erfolgte durch die Prüfung der Übertragbarkeit auf unabhängige Proben.

Der **erste Ansatz** nutzt bereits in der Datenbank vorhandene MSP (main spectra). Diese MSP enthalten jeweils nur Informationen über die Peakposition, die Häufigkeit und die Intensität von Massen einer einzigen Probe. Aus vielen einzelnen MSP aus Schweine- und Rindfleisch wurden Gemeinsamkeiten in sogenannten Super-MSP zusammengefasst.

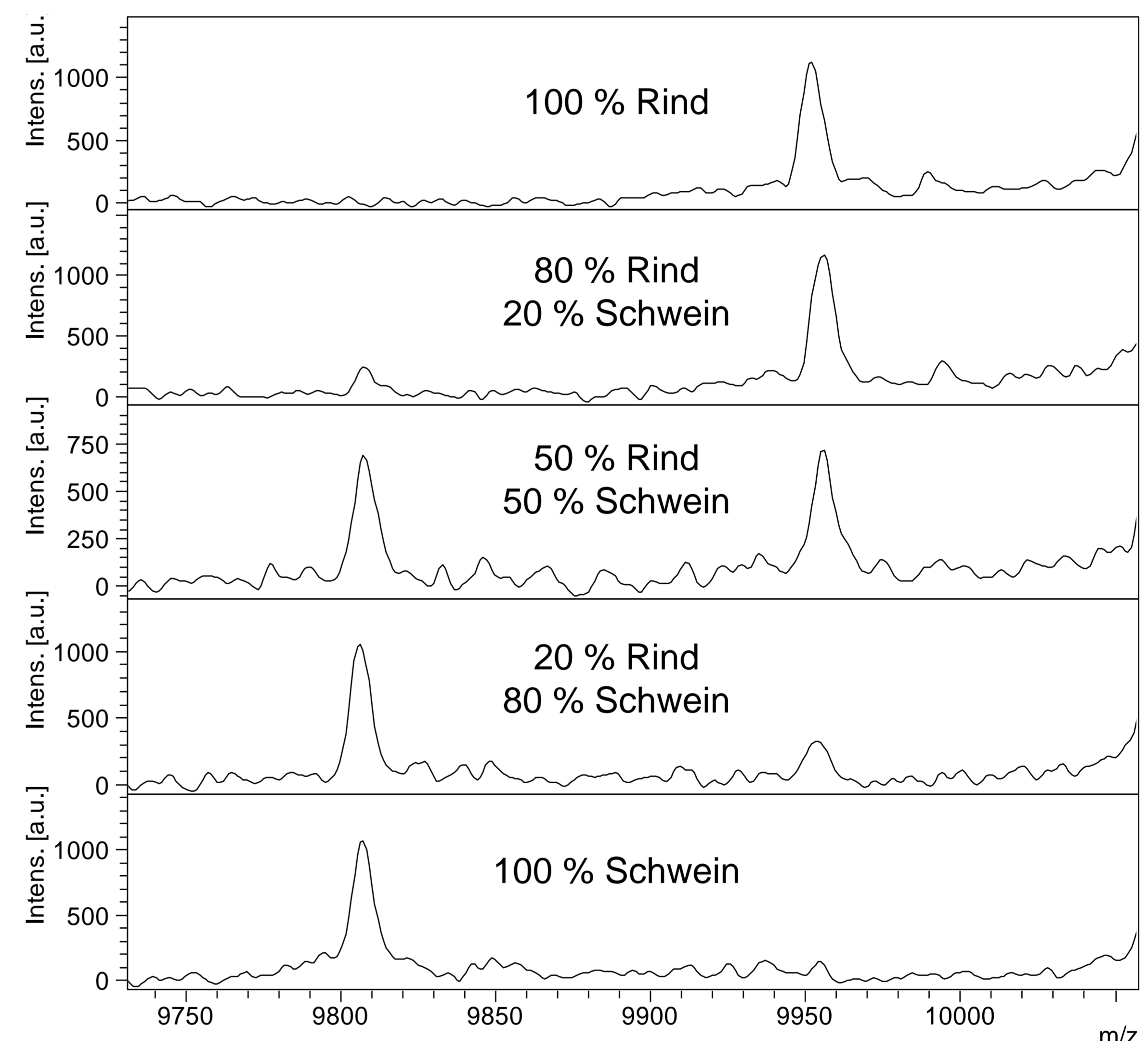
Die im Bereich von 2-20 kDa aufgenommenen Rohspektren der Proben wurden mithilfe dieser Super-MSPs identifiziert und das Ergebnis von der Biotyper Software (Bruker) in gewohnter Weise als Score-Wert ausgegeben.

Anhand des Quotienten sowie der Differenz der beiden Score-Werte konnte eine Unterteilung in drei Mischungsklassen erfolgen. Mithilfe dieser Methode erhält man direkt und schnell ein Ergebnis, jedoch hängen diese Ergebnisse stark von der Datenbank ab, aus der die Super-MSP erstellt werden.

	≤ 20 % Rind (1. Hit Schwein)	30 – 50 % Rind	≥ 60 % Rind (1. Hit Rind)
Quotient	≥ 1,17	< 1,17	≥ 1,17
Differenz	≥ 0,27	< 0,27	≥ 0,27

Validierung	n	Korrekte Zuordnung	Falsche Zuordnung
≤ 20 % Rind	18	77,8 %	22,2 %
30 - 50 % Rind	6	50 %	50 %
≥ 60 % Rind	18	83,3 %	16,7 %

Aufgrund dieser unzureichenden Validierungsergebnisse wurde ein **zweiter Ansatz** der Datenauswertung verfolgt. Dieser ergibt sich aus den Signalverhältnissen einzelner Peaks der Rohspektren. Besonders geeignet sind hierfür die Peaks bei einer Masse von 9 808 Da und 9 955 Da, die jeweils spezifisch für Schwein bzw. Rind sind. Die Signalintensitäten verhalten sich proportional zum entsprechenden Fleischanteil, weshalb der Quotient beider Intensitäten Aufschluss über das Mischungsverhältnis einer unbekannt Probe geben kann. Bei einem Quotienten unter 0,4 enthält das Fleisch mindestens 80 % Rind, eine Mischung mit jeweils gleichen Anteilen hat einen Wert von 0,5 bis 1,4 und bei mindestens 80 % Schwein liegt der Quotient über 1,5.



Validierung	n	Korrekte Zuordnung	Keine Zuordnung
≤ 20 % Rind	34	97,1 %	2,9 %
50 % Rind	6	100 %	0 %
≥ 80 % Rind	31	100 %	0 %

FAZIT

Die Inhomogenität gemischter Hackfleischproben konnte anhand der optimierten Aufarbeitung kompensiert werden. Für die bisher untersuchten und im Lebensmittelbereich üblichen Fleischmischungen aus Schwein und Rind konnte eine Unterteilung in drei Gruppen erreicht werden.

AUSBLICK

Mithilfe größerer Testserien kann dieses Verfahren weiter verfeinert werden, um die Genauigkeit der quantitativen Aussage zu erhöhen. Weitere Ziele sehen auch eine Erhöhung der Sensitivität vor, um noch kleinere Zugaben von Fleisch einer anderen Tierart detektieren zu können.



LITERATUR

- [1] Post A, Dikler S (2010). FACSS 2010, 583
- [2] Stephan R *et al.* (2014). Food Control 46: 6–9
- [3] Flaudrops C *et al.* (2015). J. Food Comp. Anal. 41: 104-112
- [4] Stoll P., Rau J. (2015). Lebensmittelchemie 70: 74-75

