

Entwicklung einer einfachen und schnellen Analyse- methode für Kohlenmonoxid in Fisch und Durchführung orientierender Untersuchungen

Development of an easy and fast method for carbon monoxide detection in fish and realisation of preliminary investigations

Thorsten Haase¹; Harald Heyer¹; Reinhard Schubring²

¹ Dräger Safety AG & Co. KGaA, Revalstr. 1, 23560 Lübeck, Germany;

² Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Forschungsbereich Fischqualität, Palmaille 9, 22767 Ham-
burg, Germany

reinhard.schubring@bfel.de

Fische, wie Thun, Tilapia oder Schwertfisch, um nur einige Vertreter dieser Arten zu nennen, zeichnen sich durch ausgeprägte Eigenfärbung des Fleisches aus. Durch Behandlung mit CO-haltigen Gasmischungen, fälschlicherweise als *tasteless smoke* oder *clear smoke* bezeichnet, vor dem Gefrieren gelingt es, die frische Rotfärbung des Fleisches auch nach dem Auftauen zu stabilisieren und so dem Verbraucher nicht vorhandene Frische zu suggerieren. Da Kohlenmonoxid in der EU ein nicht zugelassener Zusatzstoff ist, ist diese Praxis nicht erlaubt. Trotz eindeutiger Rechtslage versuchen Produzenten und Importeure immer wieder, derartig behandelte Erzeugnisse auf den Markt zu bringen. Da die Untersuchungsbehörden im Falle einer gerichtlichen Auseinandersetzung den Nachweis zu erbringen haben, dass eine Behandlung des Fisches mit CO stattgefunden hat, sind entsprechende Nachweismethoden erforderlich. Die derzeit praktizierte Methode erfordert einen nicht unerheblichen apparativen und materiellen Aufwand, um CO im Fischfleisch gaschromatographisch nach katalytischer Umwandlung in Methan nachzuweisen. Das Ziel eigener Untersuchungen bestand daher darin, CO auf direktem Wege mittels geeigneter Sensoren nachzuweisen. Es werden die apparativen Voraussetzungen und Ergebnisse orientierender Untersuchungen zum CO-Nachweis in Fischmuskulatur dargestellt.

Abstract

Development of an easy and fast method for carbon monoxide detection in fish and realisation of preliminary investigations

Treatment with gases containing CO, misleadingly called "tasteless smoke" or "clear smoke", prior to freezing of fish like tuna, tilapia and swordfish (to name only a few of these species that are characterised by an intensive coloration of flesh) stabilise the fresh red colour of muscle also after thawing and suggest consumers non-existing freshness. In the European Union, carbon monoxide is excluded from being a permitted additive and therefore this handling is not allowed. Notwithstanding of the clear legal position, producers and traders are trying to establish CO treated fish on the market. In the case of taking legal measures the food control laboratories have to provide evidence that fish has been treated by CO and therefore a respective method is necessary. The method of determination of carbon monoxide in fish flesh presently applied requires considerable material and mechanistic effort to detect CO by GC after catalytic transformation into methane. The aim of our work was a direct detection of CO using suitable sensor technology. Mechanistic requirements and results of preliminary investigations to detect carbon monoxide in fish flesh will be described.

Einleitung

Die Behandlung dunkelfleischiger Fischarten, wie z. B. Thun, Schwertfisch oder Tilapia, mit Kohlenmonoxid oder dieses enthaltende Gasmischungen (z. B. gefilterter Rauch) vor dem Tiefgefrieren zielt darauf ab, unerwünschte Farbveränderungen von rot (Oxyhämoglobin oder Oxymyoglobin) nach braun (Methämoglobin oder Metmyoglobin), die sich bei längerer Gefrierlagerung und insbesondere nach dem Auftauen ergeben, durch die Bildung von Carboxyhämoglobin oder Carboxymyoglobin zu verhindern oder zu minimieren. In der Europäischen Union und in anderen Staaten der Welt sind derartige Praktiken, die dazu dienen können, minderwertige Qualität zu schönen und die Verbraucher in die Irre zu führen, aufgrund geltenden Lebensmittelrechts nicht erlaubt. Die Aspekte der Verwendung von Kohlenmonoxid bei Fisch- und Fleischerzeugnissen sowie der Applikation von „tasteless smoke“ und Kohlenmonoxid bei Fisch wurden kürzlich ausführlich behandelt (Stenzel und Feldhusen 2004; Schubring 2004). Dass sich einige

Hersteller und Importeure durch die geltenden Gesetze offensichtlich nicht abschrecken lassen und versuchen, mit CO behandelte Erzeugnisse auf den Markt zu bringen, ergibt sich aus aktuellen Schnellwarnungen der Europäischen Kommission (Schnellwarnungen RASFF Lebensmittelsicherheit / Listen 98, 100, 101, 102, 105, 120, 124, 125, 129, 130, 131, 134, 135, 141). Diese Aufzählung aus dem Zeitraum Mai bis Juli 2005 erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit, sondern soll nur die Aktualität dieser Problematik verdeutlichen. Dabei kommen die Schnellwarnungen aus allen Teilen Europas. In der entsprechenden Auseinandersetzung der Überwachungsbehörden mit den Inverkehrbringern ist der gerichtsfeste Nachweis vorzulegen, dass eine CO-Behandlung stattgefunden hat. Da eine verbale Beschreibung der Farbe bzw. von Farbunterschieden von behandelten und nicht behandelten Fischen oder eine instrumentelle Farbmessung mangels fehlender Grenzwerte dazu nicht ausreichen, ist die exakte Bestimmung des CO-Gehalts im Fischfleisch erforderlich.

National (Feldhusen et al., 2004) und international (Jonker et al. 2001) orientieren sich die dazu angewandten Nachweismethoden an dem von Ishiwata et al. (1996) beschriebenen Verfahren, das davon ausgeht, dass bei einer behandelten Fischprobe CO an Hämoglobin und Myoglobin als Carboxyhämoglobin bzw. Carboxymyoglobin gebunden ist.

Dabei wird wie folgt verfahren: Das Fischfleisch wird mit der doppelten Menge an Wasser unter Eiskühlung homogenisiert und anschließend für 10 min bei 3000 rpm und 10 °C zentrifugiert. 50 ml des Überstandes werden mit 5 Tropfen n-Oktanol, 5 ml Wasser und 20 ml 20 %ige Schwefelsäure im 100 ml Glas verschlossen und 2 min kräftig geschüttelt, nach 10 min ruhen wird 1 min vor der Head-Space-Messung nochmals geschüttelt. Mittels eines Methanizers wird das CO in Methan überführt und per GC-FID detektiert. Die Wiederfindungsrate dieser Analysenmethode liegt bei $85 \pm 12\%$. Die Nachweisgrenze dieser Methode wurde mit $2 \mu\text{g}/\text{kg}$ ($12,5 \text{ ng}$ absolut) Fisch ermittelt (Ishiwata et al. 1996).

Eine weitere Möglichkeit des CO-Nachweises besteht in der von Rehbein (Feldhusen et al. 2004) für Fischmuskel adaptierten Methode von Beutler und West (1984), bei der der relative Anteil des CO-Hämproteins als prozentualer Anteil des Gesamthämproteins ermittelt wird. Die am häufigsten angewandte Methode nach Ishiwata et al. (1996) setzt das Vorhandensein einer funktionsfähigen GC-Apparatur (in den meistens Untersuchungslaboratorien verfügbar) voraus, die jedoch mit einem geeigneten Modul zur Umwandlung von CO in Methan (Nickelkatalysator) komplettiert werden muss, was mit einem nicht unerheblichen finanziellen Aufwand verbunden ist. Daher war es das Ziel der hier vorgestellten Arbeiten mit Hilfe der Sensortechnik eine kostengünstigere und schnellere Methode zu entwickeln.

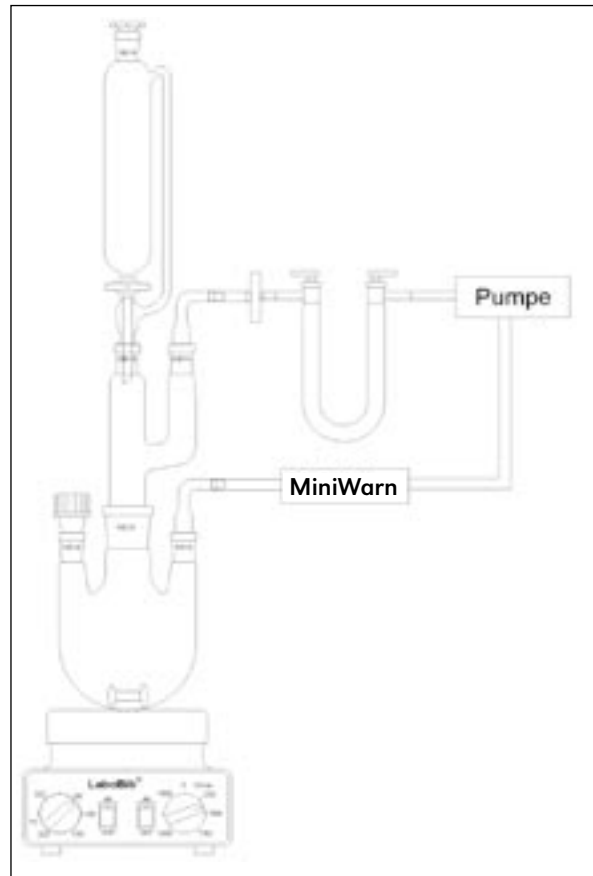


Abbildung 1: Apparatur zur Bestimmung von CO in Fisch - Schematic diagram of the equipment for detection of CO in fish.

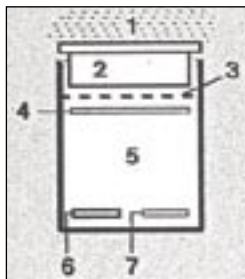


Abbildung 2: Apparatur zur Bestimmung von CO in Fisch im Original - Picture of the equipment for the detection of CO

Prinzip der neuen Methode

Die Versuchapparatur ist in Abbildungen 1 (schematisch) und 2 (Foto) zu sehen. Sie besteht aus einem 250 ml 3-Halskolben (2 × NS 14,5; 1 × NS 29) und einem Claisenaufsatz mit Tropftrichter. Auf einem Schliff ist für die Kalibrationen ein Septum angebracht über welches mit einer GC-Spritze CO dosiert werden kann. Über die anderen beiden Anschlüsse ist ein Kreislauf angeschlossen, der aus einem Partikelfilter, einem Kohlefilter, der Pumpe und dem Gasmessgerät *MiniWarn* besteht. Der Partikelfilter verhindert das Eindringen feinsten Schwefelsäuretröpfchen in den Kreislauf, was den Sensor schont. Der Kohlefilter, hier in Form eines U-Rohres, verhindert, dass andere Substanzen in den Kreislauf gelangen.

Es wird ein elektrochemisch arbeitender Sensor (Dräger-Sensor® XS R CO – 68 10 25) verwendet dessen Messprinzip (Abbildung 3) nachfolgend kurz beschrieben ist (Dräger Safety AG & Co. KGaA 2001).

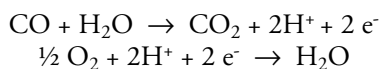


Funktionsprinzip

- 1 Messgas
- 2 Selektivfilter
- 3 Membran
- 4 Messelektrode \hat{U}
- 5 Elektrolyt \hat{U}
- 6 Referenzelektrode
- 7 Gegenelektrode

Abbildung 3: Prinzipskizze des elektrochemischen CO-Sensors – *Schematic diagram of the electrochemical sensor.*

Die elektrochemischen DrägerSensoren XS R CO sind elektrochemische Messwandler zur Messung des Partialdrucks des jeweiligen Gases unter atmosphärischen Bedingungen. Das zu überwachende Gas diffundiert durch eine Membran in den flüssigen Elektrolyt des Sensors. In dem Elektrolyten befindet sich eine Messelektrode, eine Gegenelektrode und eine Referenzelektrode. Eine elektronische Potentiostatschaltung sorgt dafür, dass zwischen Messelektrode und Referenzelektrode stets eine konstante elektrische Spannung herrscht. Die Spannung, der Elektrolyt und das Elektrodenmaterial sind so gewählt, dass das zu überwachende Gas an der Messelektrode elektrochemisch umgewandelt wird. Die bei der Reaktion fließenden Elektronen e^- sind ein Maß für die Gaskonzentration. An der Gegenelektrode findet gleichzeitig eine elektrochemische Reaktion mit Sauerstoff aus der Umgebungsluft statt. Nachstehend ist die elektrochemische Reaktionsformel für den DrägerSensor XS R CO aufgeführt:



Der Sensor besitzt zu einigen Substanzen Querempfindlichkeiten, so dass diese ebenfalls mit dem Sensor erfasst werden können, wodurch eine Verfälschung des Ergeb-

nisses hervorgerufen werden könnte. Das Selektivfilter beseitigt jedoch bestehende Querempfindlichkeiten durch Begleitgase weitestgehend. Die angeschlossene Pumpe hat eine Fördermenge von 2,2 Liter/min.

Vorversuche

Erste Messungen mit Reingas haben gezeigt, dass die Empfindlichkeit des Sensors für die Problemstellung ausreichend ist. In Abbildung 4 ist die Wiederholbarkeit bei einer Dotierung von 50 μL CO aufgeführt. Es werden transiente Signale mit Hilfe der Software *Gas-Vision* aufgenommen. Eine Auswertung der Maxima ergibt eine Abweichung von 4,25 %. In Abbildung 5 sind verschiedene Dotierungen über den gesamten Messbereich des Sensors, der sich von 2 - 2000 ppm erstreckt, aufgetragen.

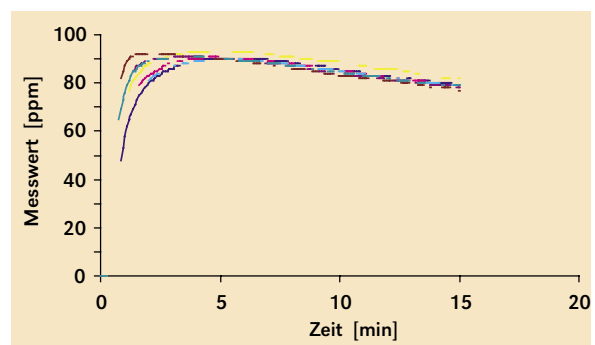


Abbildung 4: Reproduzierbarkeit bei 50 μL Dotierung – *Reproducibility of endowment with 50 μL .*

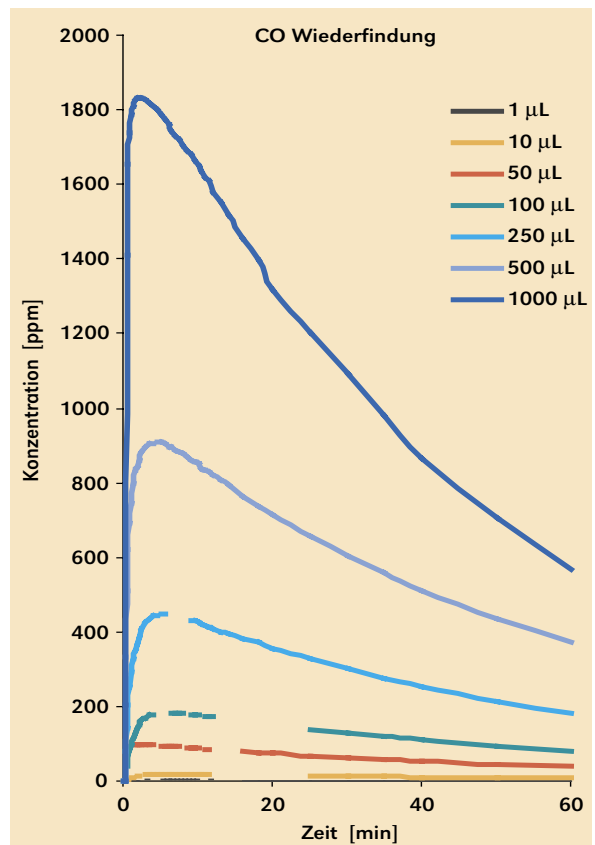


Abbildung 5: Transiente Messsignale der einzelnen Dotierungen – *Transient measurement signals of single endowments*

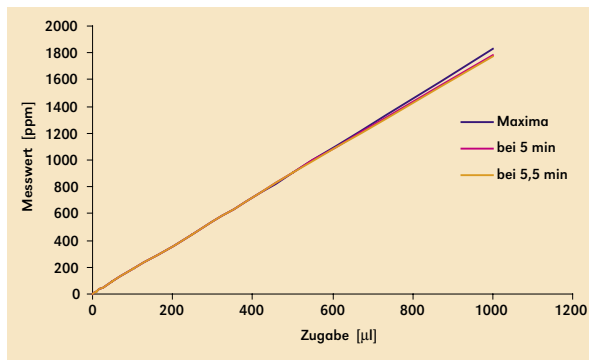


Abbildung 6: Linearitätstest, aufgetragen sind die Zugabe von CO gegen die angezeigten Sensormesswerte – *Checking of linearity, CO addition is plotted against sensor signals.*

In Abbildung 6 sind zum einen die Maxima der Messkurven gegen die Dotierung dargestellt, zum anderen sind die Messwerte bei 5 min und bei 5,5 min aufgetragen. Es ist ersichtlich, dass bis zur Dotierung von 500 µl eine hohe Linearität besteht, danach treten minimale Abweichungen auf, was eventuell auf die Art der Spritze zurückzuführen ist. Bis 500 µl wurde eine gasdichte GC-Spritze benutzt, während bei 1000 µl eine Einwegspritze mit Lür-Adapter verwendet wurde.

Erforderliche Geräte und Chemikalien:

- MiniWarn mit DrägerSensor® XS R CO – Bestell-Nr. 68 10 258, Dräger-Safety, Lübeck
- Software: Gas Vision 5.6.4, Dräger-Safety, Lübeck
- AB-Kohle, K1126, gegen saure Gase + SO₂, Dräger-Safety, Lübeck
- Schwefelsäure, 95-98 %, Katalog-Nr. 1.00713, Merck, Darmstadt

Messungen an Fisch

Der verwendete Fisch, Gelbflossen-Thun (*Thunnus albacares*), wurde auf dem Hamburger Fischmarkt gekauft, die Filets in kleine Würfel zerteilt und zur Hälfte mit Kohlenmonoxid für ca. 3 Stunden behandelt. Dieses führte zu visuell erkennbaren Farbunterschieden (Abbildung 7).



Abbildung 7: Unbehandelter (links) und CO-behandelter (rechts) Thunfisch im Vergleich – *Comparison of untreated (left-hand side) and CO treated tuna (right-hand side).*

Tabelle 1: Messprotokoll - *Measurement report.*

Probenname	Einwaage Fisch [g]	Einwaage Wasser [g]	Gesamteinwaage [g]	Messwert-Max [ppm]
Unbehandelt1	61,45	59,60	121,05	6
Unbehandelt2	61,80	59,26	121,06	8
Behandelt1	59,41	64,52	123,93	98
Behandelt2	59,89	63,96	123,85	136
Behandelt3	59,81	63,87	123,68	138

Im Einzelnen wurde danach wie folgt verfahren: In den 250 ml 3-Halsrundkolben wurden ca. 60 g zerkleinertes Fischfleisch eingewogen (+/-0,01 g) und mit der gleichen Menge an Wasser versetzt. Nach dem Verschließen der Apparatur wurde die Probe mit Hilfe des Magnetrührers homogenisiert. Im Anschluss wurden 40 ml 20 %ige Schwefelsäure hinzugefügt. Durch die Pumpe wurde das freigesetzte CO am Sensor vorbeigeführt. Tabelle 1 zeigt die Versuchsdaten mit den erzielten Ergebnissen.

In Abbildung 8 sind Messungen an unbehandeltem und mit CO-behandeltem Fisch dargestellt. Bei der ersten Messung (Probe 1B) wurde der Fisch über einen Trichter mit Hilfe eines Glasstabes in den Kolben gepresst, wobei sich das zerkleinerte Fischfleisch zu einer Wurst verdichtete, die beim anschließenden Rühren im Kolben nicht

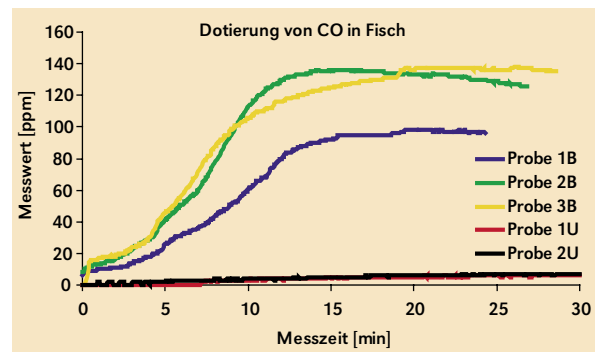


Abbildung 8: CO-Bestimmung im behandelten Fisch (1B, 2B, 3B) und unbehandeltem Fisch (1U, 2U) – *Determination of CO in treated (1B, 2B, 3B) and untreated fish (1U, 2U).*

vollständig zerfiel. Bei den weiteren Messungen wurde der Fisch in kleinen Portionen mittels eines Löffelspatels direkt in den Rundkolben gegeben. Erst nachdem durch das Rühren mit Wasser ein weitgehend homogener Brei entstanden war, wurde die Schwefelsäure hinzugegeben. Dadurch konnte bei annähernd gleicher Einwaage bei den letzten beiden Proben ein gleicher Maximalwert erreicht werden (Probe 2B und 3B, Abbildung 8,).

Schlussfolgerungen

Die ersten Versuche zur Anwendung der konzipierten Methode zum einfachen und schnellen Nachweis von Kohlenmonoxid in Fisch zeigten deren Praktikabilität. Der Nachweis von CO gelingt schnell und reproduzierbar. Die Unterschiede der Messergebnisse von unbehandeltem und mit CO behandeltem Fischfleisch sind signifikant und gestatten einen eindeutigen Nachweis des behandelten Materials. Die Methode ist im Vergleich

zur bisher beschriebenen einfach, schnell und preiswert. Zur Optimierung der Methode sind die Untersuchungen solcher Einflussfaktoren, wie Pumpenleistung, Temperatur und Verhältnis von Fisch zu Schwefelsäure bei gleichzeitiger Variation der Säurekonzentration, durchzuführen sowie Abhängigkeiten der ermittelten CO-Gehalte von der Dauer der Tiefgefrierlagerung bzw. von Gefrier-Auftau-Zyklen zu untersuchen. Es sollte weiterhin versucht werden aufzuklären, warum sich die Absolutwerte an CO, die sich mit der von Ishiwata et al. (1996) beschriebenen Methode ermitteln lassen, z. T. merklich höher liegen (Feldhusen et al. 2004), als die mit dem hier beschriebenen Verfahren festgestellten.

Zitierte Literatur

- Beutler, E.; West, C., 1984: Simplified determination of carboxyhemoglobin. *Clin. Chem.* 30: 871–874.
- DrägerSafety AG & Co. kgaA (2001): DrägerSensor® XS R CO – 68 10 258, Datenblatt, 90 23 604 – GA 4624.313 de/en, 4. Ausgabe, September 2001.
- Europäische Kommission: Schnellwarnungen RASFF Lebensmittelsicherheit – Liste 98/ 20.05.2005.
- Europäische Kommission: Schnellwarnungen RASFF Lebensmittelsicherheit – Liste 100/ 30.05.2005.
- Europäische Kommission: Schnellwarnungen RASFF Lebensmittelsicherheit – Liste 101/ 31.05.2005.
- Europäische Kommission: Schnellwarnungen RASFF Lebensmittelsicherheit – Liste 102/ 31.05.2005.
- Europäische Kommission: Schnellwarnungen RASFF Lebensmittelsicherheit – Liste 105/ 06.06.2005.
- Europäische Kommission: Schnellwarnungen RASFF Lebensmittelsicherheit – Liste 120/ 11.07.2005.
- Europäische Kommission: Schnellwarnungen RASFF Lebensmittelsicherheit – Liste 124/ 11.07.2005.
- Europäische Kommission: Schnellwarnungen RASFF Lebensmittelsicherheit – Liste 125/ 11.07.2005.
- Europäische Kommission: Schnellwarnungen RASFF Lebensmittelsicherheit – Liste 129/ 11.07.2005.
- Europäische Kommission: Schnellwarnungen RASFF Lebensmittelsicherheit – Liste 130/ 14.07.2005.
- Europäische Kommission: Schnellwarnungen RASFF Lebensmittelsicherheit – Liste 131/ 14.07.2005.
- Europäische Kommission: Schnellwarnungen RASFF Lebensmittelsicherheit – Liste 134/ 15.07.2005.
- Europäische Kommission: Schnellwarnungen RASFF Lebensmittelsicherheit – Liste 135/ 18.07.2005.
- Europäische Kommission: Schnellwarnungen RASFF Lebensmittelsicherheit – Liste 141/ 26.07.2005.
- Feldhusen, F.; Rehbein, H.; Kruse, R., 2004: Treatment of tuna products with carbon monoxide; principles of assessment and actual analytical aspects. In: Rehbein, H.; Karl, H.; Manthey-Karl, M.; Oehlenschläger, J.; Schubring, R.(eds.) Proceedings of the WEFTA Conference 2004 12-15 September Lübeck, Germany. Hamburg, German Federal Centre for Nutrition and Food, Department for Fish Quality, 187–191.
- Ishiwata, H.; Takeda, Y.; Kawasaki, Y.; Yoshida, R.; Sugita, T.; Sakamoto, S.; Yamada, T., 1996: Concentration of carbon monoxide in commercial fish flesh and in fish flesh exposed to carbon monoxide gas for color fixing. *J. Food Hyg. Soc. Japan* 37: 83–90.
- Jonker, K. M.; Geertsen, J. A. M.; Bos, H. P. G. M., 2001: Untersuchung auf Kohlenmonoxid in Thunfisch. Keuringsdienst van Waaren Oost, SANCO-2003-02727-00-00-DE-TRA-00 (NL).
- Schubring, R., 2004: Applikation von "tasteless smoke" und Kohlenmonoxid bei Fisch - Technologiefolgenabschätzung. *Arch. Lebensmittelhyg.* 55: 85–93.
- Stenzel, W.-R.; Feldhusen, F., 2004: Aspekte der Verwendung von Kohlenmonoxid bei Fleisch- und Fischerzeugnissen. *Fleischwirtschaft* 84 (9): 131–136.