

Herstellung von Referenzmaterialien für internationale Laborvergleichsuntersuchungen

Production of reference materials for international interlaboratory comparisons

W. JIRA und K.-H. SCHWIND

Zusammenfassung

Die Verordnung (EG) Nr. 882/2004 sieht die Benennung von Gemeinschaftsreferenzlaboratorien (CRLs) und Nationalen Referenzlaboratorien (NRLs) vor. Die CRLs sollen insbesondere Laborvergleichsuntersuchungen durchführen. Am Max Rubner-Institut (MRI) in Kulmbach wurden die für die EU-weiten Laborvergleichsuntersuchungen benötigten Referenzmaterialien für die CRLs für Dioxine (PCDD/F) und Polychlorierte Biphenyle (PCB) und Polycyclische Aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) hergestellt. Als Referenzmaterialien für Dioxine und PCB wurden Brühwurstvollkonserven mit Schweinefleisch (geringere Dioxin- und PCB-Gehalte) und Rindfleisch (höhere Dioxin- und PCB-Gehalte) hergestellt (jeweils 1000 Dosen je 50 g), deren Homogenität durch Fettbestimmung von 24 zufällig ausgewählten Proben überprüft wurde. Als Referenzmaterialien mit den 15+1 EU-PAK als Zielanalyten wurden verschiedene Wurst- und Fischmaterialien hergestellt. Im Rahmen der Produktion der Wurstmaterialien wurden vier Chargen Brühwurstvollkonserven mit PAK-dotiertem Olivenöl angefertigt. PAK-Homogenitätsuntersuchungen von 10 zufällig ausgewählten Dosen ergaben nur geringe prozentuale Standardabweichungen für die einzelnen PAK-Verbindungen im Bereich von ca. 5 %. Beim Fischmaterial wurde ein Brühwurst-ähnliches, schnittfestes Produkt hergestellt. Hierbei wurden drei Chargen mit dotiertem Öl und eine Charge mit „natürlich“ kontaminiertem Öl produziert, welches durch Ölextraktion eines Primära Rauchkondensat-Abfallproduktes gewonnen wurde. Von den vier Chargen wurden jeweils 10 Fettbestimmungen (Fettgehalte etwa 20 %) durchgeführt, die sehr geringe Variationskoeffizienten für die unterschiedlichen Chargen im Bereich von 0,13 bis 0,21 ergaben.

Summary

Regulation (EC) No 882/2004 is the legal basis for the nomination of community reference laboratories (CRLs) and national reference laboratories (NRLs). The CRLs are particularly responsible for the organisation of interlaboratory comparisons. At the Max Rubner-Institut (MRI) in Kulmbach reference materials required for interlaboratory comparisons for the CRLs for dioxins (PCDD/Fs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) were produced. As reference materials for dioxins and PCBs fully-preserved boiled sausages of pork meat (lower contents of dioxins and PCBs) and beef (higher contents of dioxins and PCBs) were manufactured (1000 cans per 50 g each). Homogeneity of samples was checked by determining the fat contents of 24 randomly selected samples. As reference materials with the 15+1 EU priority PAHs as analyte molecules meat and fish materials were produced. Within the fabrication of meat materials four batches of fully-preserved boiled sausages using olive oil spiked with PAHs were produced. In order to check the homogeneity of PAHs in these materials 10 randomly selected samples were analysed. The relative standard deviation for the single PAH compounds was in the range of 5 %. A fish containing boiled sausage like, sliceable material was produced. Three fish containing batches were produced with spiked olive oil and one batch with "naturally" contaminated oil, which resulted from extraction of a waste product of primary smoke condensate production. To check the homogeneity of the four fish materials 10 samples were analysed with respect to their fat contents (about 20 %), which showed good variation coefficients for the various batches in the range of 0.13 to 0.21.

Schlüsselwörter Dioxine – PCB – PAK – Referenzmaterialien – CRL – NRL

Key Words dioxins – PCB – PAH – reference materials – CRL – NRL

Die Verordnung (EG) Nr. 882/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 sieht im Hinblick auf eine Überprüfung der Einhaltung des Lebens- und Futtermittelrechts in der Europäischen Union die Benennung von Gemeinschaftsreferenzlaboratorien (community reference laboratories; CRLs) und Nationalen Referenzlaboratorien (NRLs) vor. Die CRLs sollen unter anderem die NRLs über Analysemethoden informieren, Laborvergleichsuntersuchungen unter Teilnahme der jeweiligen NRLs durchführen, die Koordinierung der praktischen Regelungen für die Anwendung neuer Analyseverfahren übernehmen und die NRLs über analytische Fortschritte informieren. Darüber hinaus sollen die CRLs Weiterbildungskurse für NRLs durchführen und wissenschaftliche und technische Unterstützung für die EU-Kommission in Fällen leisten, in denen Mitgliedsstaaten Widerspruch gegen Analysenergebnisse einlegen. Die Aufgaben der NRLs bestehen im Wesentlichen in einer engen Zusammenarbeit mit dem zuständigen CRL, der Koordination der Tätigkeit der amtlichen Laboratorien und der Durchführung von vergleichenden Tests zwischen den amtlichen nationalen Laboratorien. Die NRLs sollen ferner sicherstellen, dass die vom CRL gelieferten Informationen an die amtlichen nationalen Laboratorien weitergeleitet werden.

Für die von den CRLs durchzuführenden Laborvergleichsuntersuchungen unter Teilnahme der NRLs werden Referenzmaterialien benötigt. Dies erfordert die Bereitstellung von homogenem und stabilem Probenmaterial für alle teilnehmenden NRLs, um die analytische Leistungsfähigkeit der Laboratorien dokumentieren zu können und gegebenenfalls methodische und laborspezifische Schwächen aufzudecken. Eine konkrete Benennung der CRLs für die verschiedenen Rückstände und Kontaminanten erfolgte in der Verordnung (EG) Nr. 776/2006 der Kommission vom 23. Mai 2006. In dieser Verordnung wurden als „Gemeinschaftsreferenzlaboratorien für Futtermittel und Lebensmittel“ unter anderem als CRL für Dioxine und PCB das Chemische und Veterinäruntersuchungsamt (CVUA) Freiburg und als

CRL für Polycyclische Aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) die Gemeinsame Forschungsstelle der Kommission in Geel, Belgien benannt. Höchstgehalte für Dioxine, PCB und PAK in Lebensmitteln sind in der Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 der Kommission vom 19. Dezember 2006 („Kontaminantenverordnung“) festgesetzt. Hier gelten im Bereich der Dioxine und PCB Höchstgehalte für Dioxine und für die Summe aus Dioxinen und dioxinähnlichen PCB auf Basis von sogenannten Toxizitätsäquivalenten (VAN DEN BERG *et al.*, 1998), die sich aus insgesamt 7 Polychlorierten Dibenz-p-dioxinen (PCDD), 10 Polychlorierten Dibenzofuranen (PCDF) und 12 dioxinähnlichen PCB-Verbindungen errechnen. Dabei gelten für die Tierarten Rinder/Schafe, Geflügel und Schwein unterschiedliche Höchstgehalte, die für Dioxine (WHO-PCDD/F-TEQ) bei Rindern und Schafen 3,0 ng/kg Fett, bei Geflügel 2,0 ng/kg Fett und bei Schweinen 1,0 ng/kg Fett betragen. Für Dioxine und dioxinähnliche PCB gelten folgende Summenhöchstgehalte (WHO-PCDD/F-PCB-TEQ): Rinder und Schafe 4,5 ng/kg Fett, Geflügel 4,0 ng/kg Fett und Schweine 1,5 ng/kg Fett. Neben den Höchstgehalten für Dioxine und die Summe aus Dioxinen und dioxinähnlichen PCB existieren gemäß der Empfehlung der Kommission 2006/88/EG auch freiwillig anzuwendende Auslösewerte für Dioxine und für dioxinähnliche PCB, die unterhalb der Höchstgehalte liegen und als Frühwarnsystem dienen (BVL, 2009). Auslösewerte sind ein Instrument, um Kontaminationsquellen zu identifizieren und diese so weit wie möglich einzuschränken oder zu beseitigen, bevor eine Überschreitung des Höchstgehaltes in Lebensmitteln eintritt. Da Dioxine und dioxinähnliche PCB aus unterschiedlichen Quellen stammen, wurden jeweils getrennte Auslösewerte festgelegt. Diese liegen für Dioxine (WHO-PCDD/F-TEQ) im Fleisch von Wiederkäuern (Rinder, Schafe) bei 1,5 ng/kg Fett, für Geflügel bei 1,5 ng/kg Fett und für Schwein bei 0,6 ng/kg Fett. Die Auslösewerte für dioxinähnliche PCB (WHO-PCB-TEQ) liegen in Wiederkäuern (Rinder, Schafe) bei 1,0 ng/kg Fett, für Geflügel bei 1,5 ng/kg Fett und für Schwein bei 0,5 ng/kg Fett.

Für PAK sieht die Kontaminantenverordnung Höchstgehalte für Benzo[a]pyren (BaP) in verschiedenen Lebensmittelgruppen vor. Für geräuchertes Fleisch und geräucherte Fleischerzeugnisse bzw. Muskelfleisch von geräucherten Fischen und geräucherten Fischereierzeugnissen beträgt dieser Höchstgehalt 5 µg/kg Frischmasse (FM). Darüber hinaus empfiehlt die Kommission eine genauere Ermittlung der Mengen von 15 PAK-Verbindungen, die vom Scientific Committee on Food (SCF) als prioritär eingestuft wurden (15 SCF-PAK), um die Eignung von Benzo[a]pyren als Marker für die verschiedenen Lebensmittelgruppen überprüfen zu können (2005/108/EG). Dabei handelt es sich um die PAK-Verbindungen Benzo[a]anthracen (BaA), Chrysen (CHR), Cyclopenta[c,d]pyren (CPP), 5-Methyl-chrysen (5MC), Benzo[b]fluoranthren (BbF), Benzo[k]fluoranthren (BkF), Benzo[j]fluoranthren (BjF), Benzo[a]pyren (BaP), Dibenz[a,h]anthracen (DhA), Indeno[1,2,3-cd]pyren (IcP), Benzo[ghi]perylen (BgP), Dibenz[a,i]pyren (DiP), Dibenz[a,e]pyren (DeP), Dibenz[a,i]pyren (DiP) und Dibenz[a,h]pyren (DhP). Die Europäische Lebensmittelbehörde (European Food Safety Authority – EFSA) empfiehlt zudem, das vom Joint FAO/WHO Experts Committee on Food Additives (JECFA) als besonders relevant eingeschätzte Benzo[c]fluoren (BcL) analytisch mit zu erfassen (JECFA/64/SC).

Herstellung von Referenzmaterialien für Dioxine und PCB

Die Europäische Kommission geht davon aus, dass über 90 % der Aufnahme des Menschen an Dioxinen und dioxinähnlichen PCB über die Lebensmittel erfolgt. Innerhalb der Gruppe der Lebensmittel liefern vom Tier stammende Lebensmittel mit einem Anteil von etwa 80 % den größten Beitrag (2006/13/EG). Eine wichtige Eintragsquelle stellen dabei Futtermittel dar, da zahlreichen Studien gezeigt haben, dass ein Transfer (Carry-over) von Dioxinen und PCB vom Futtermittel in Gewebe von landwirtschaftlichen Nutztieren stattfindet. Aufgrund dieser Tatsache wurde bei der Herstellung von Referenzmaterialien für Dioxine und PCB in Fleisch auf eine Dotierung des Materials mit Stan-

dardverbindungen bewusst verzichtet und lediglich auf durch Umwelteinflüsse belastetes Fleisch zurückgegriffen, um ein möglichst realistisches und praxisnahes Material zur Verfügung stellen zu können. Die Vorauswahl des verwendeten Fleisches erfolgte aufgrund der Kenntnis der aktuellen Belastungssituation von Dioxinen und PCB in Fleisch aus den Resultaten des Forschungsprojektes „Statuserhebung zu Dioxinen und PCB in Futter- und vom Tier stammenden Lebensmitteln“, das am Max Rubner-Institut (MRI) in Kulmbach im Auftrag des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) durchgeführt wurde. Im Rahmen dieses Projektes wurden insgesamt 165 Fleischproben (55 Schweinefleischproben, 49 Geflügelproben, 57 Rindfleischproben und 4 Schafproben) hinsichtlich ihrer Gehalte an dioxinähnlichen PCB untersucht. Die Verteilung des WHO-PCB-TEQ [ng/kg] dieser 165 Proben ist in Abbildung 1 in der Box-Whiskers-Darstellung aufgezeigt.

Aus der Grafik ist deutlich zu ersehen, dass Schweinefleisch am geringsten und Rindfleisch in der Regel stärker mit dioxinähnlichen PCB belastet ist. Einen nicht unerheblichen Grund hierfür scheint das Schlachttalter dieser Tiere darzustellen. Fleischrinder sind bei Schlachtung etwa 20 Monate alt, Schweine etwa 6 Monate. Geflügelfleisch nimmt eine Mittelstellung ein. Der Median (50-Perzentil) des WHO-PCB-TEQ beträgt für Schweinefleisch 0,06 ng/kg Fett und liegt damit etwa um den Faktor 10 unter dem Auslösewert von 0,5 ng/kg Fett. Dieser Auslösewert wurde nur von einigen wenigen Extremwerten überschritten. Für Geflügelfleisch betrug der Median des WHO-PCB-TEQ 0,11 ng/kg Fett und lag damit mehr als den Faktor 10 unter dem PCB-Auslösewert von 1,5 ng/kg Fett, der nur von einer einzigen Probe überschritten wurde. Rindfleisch (inklusive Kalbfleisch) wies im Median einen WHO-PCB-TEQ von 0,9 ng/kg Fett auf. Somit lag der Median des WHO-PCB-TEQ nur knapp unter dem PCB-Auslösewert von 1 ng/kg Fett. Das Maximum (ohne Ausreißer und Extremwerte) lag mit einem Wert von 6,1 ng/kg etwa einen Faktor von 6 über

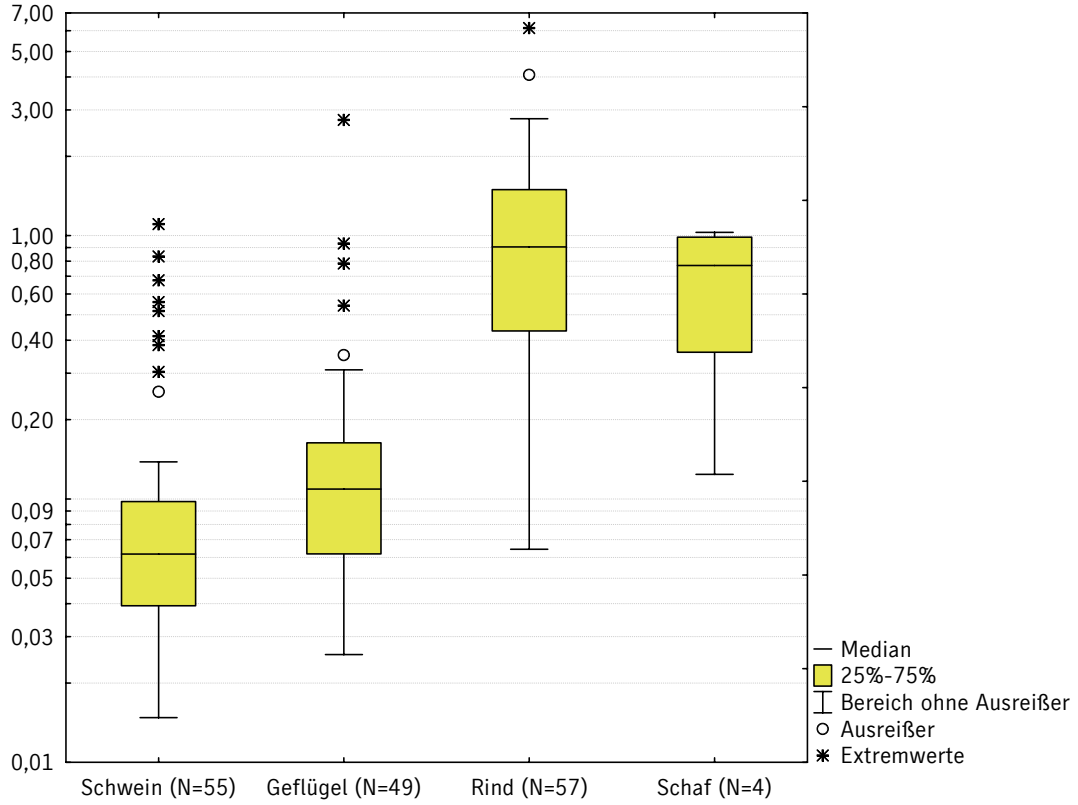


Abb. 1: WHO-PCB-TEQ [ng/kg Fett] in verschiedenen Fleischarten (N = 165)

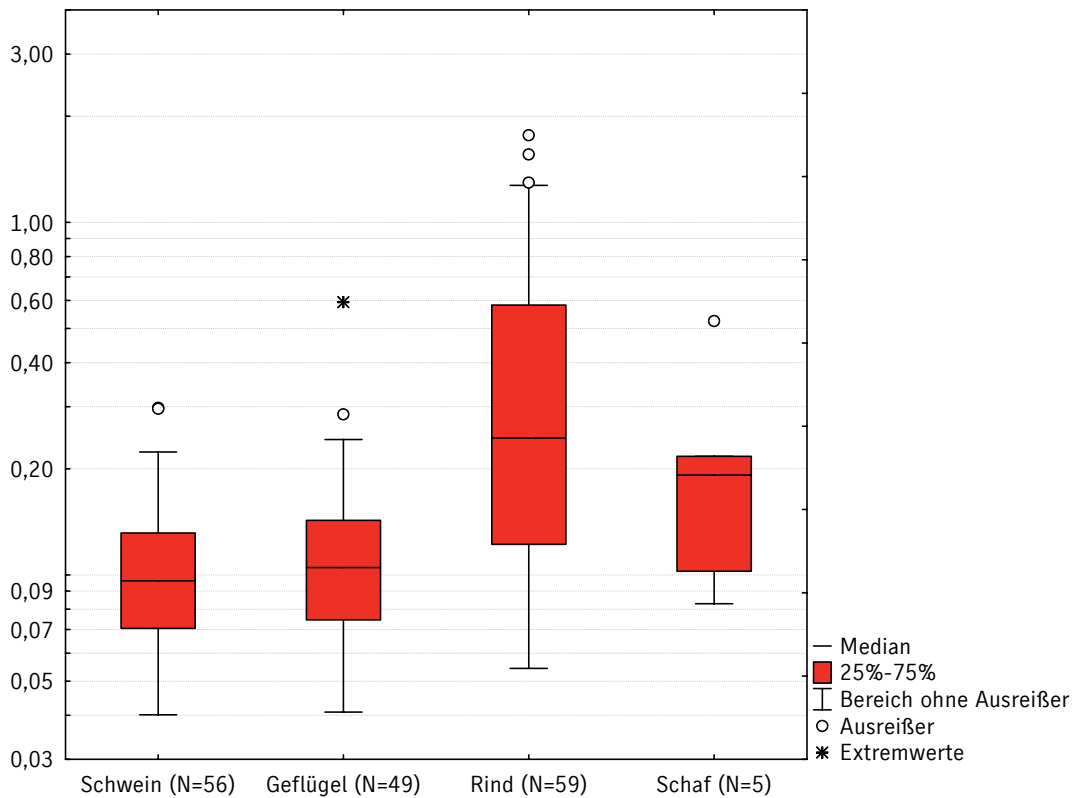


Abb. 2: WHO-PCDD/F-TEQ [ng/kg Fett] in verschiedenen Fleischarten (N = 169)

dem Auslösewert. Die vier untersuchten Schaffleischproben deuten darauf hin, dass Schaffleisch bezüglich des WHO-PCB-TEQ ein ähnliches Kontaminationsniveau aufweisen wie Rindfleischproben.

Ferner wurden 169 verschiedene Fleischproben (Schwein, Geflügel, Rind und Schaf) hinsichtlich ihrer Gehalte an den 17 WHO-PCDD/F untersucht. Die Verteilung des WHO-PCDD/F-TEQ [ng/kg Fett] dieser 169 Proben ist in Abbildung 2 aufgezeigt.

Der Median des WHO-PCDD/F-TEQ lag bei Schweinefleisch (0,1 ng/kg Fett) und Geflügelfleisch (0,11 ng/kg Fett) etwa auf gleichem Niveau. Das Fleisch der Wiederkäuer Rind (Median 0,24 ng/kg Fett) und Schaf (Median 0,19 ng/kg Fett) wies signifikant höhere Dioxingehalte auf. Die Maximalwerte (ohne Ausreißer und Extremwerte) lag bei Schweinefleisch und Geflügelfleisch bei etwa 0,2 ng/kg Fett und für Rindfleisch bei ca. 1 ng/kg Fett. Die Höchstgehalte für Schweinefleisch (1 ng/kg Fett), Geflügelfleisch (2 ng/kg Fett) und Rindfleisch (3 ng/kg Fett) wurden bei allen drei Fleischarten nicht überschritten. Die 5 untersuchten Schaffleischproben lagen im Median bei etwa 0,2 ng WHO-PCDD/F-TEQ und damit etwa im Bereich von Rindfleisch.

Aufgrund der Erkenntnisse aus der Stuserhebung und der Berücksichtigung von bedeutenden Faktoren wie z.B. Alter der Tiere, Standort und Umwelteinflüsse, die großen Einfluss auf die Dioxin- und PCB-Gehalte in Fleisch haben, wurden definierte Fleischproben vorausgewählt, deren PCDD/F- und PCB-Gehalte mittels GC/MS untersucht und die gewünschten Gehalte an WHO-PCDD/F-PCB-TEQ durch geeignete Fleischauswahl nach den Vorgaben des CRL eingestellt, wobei als relevante Konzentrationsbereiche prinzipiell Gehalte im Bereich der Höchstgehalte bzw. Auslösewerte für Dioxine und PCB in Betracht kommen. Als Referenzmaterialien für Dioxine und PCB wurden Brühwurst-Vollkonserven in zwei unterschiedlichen Kontaminationsniveaus angefertigt, wobei ein Referenzmaterial mit Schweinefleisch (geringere Dioxin- und PCB-Gehalte) und ein Material mit Rindfleisch

(höhere Dioxin- und PCB-Gehalte) hergestellt wurden. Da es sich bei Dioxinen und PCB um lipophile Substanzen handelt, die sich zum überwiegenden Teil im Fettgewebe befinden, ist bei gleichen Fettgehalten in den verschiedenen Dosen bzw. nur geringen Abweichungen in den Fettgehalten auch von einer Homogenität der Dioxine und PCB auszugehen. Daher wurden zur Kontrolle der Homogenität der beiden Chargen die im Vergleich zur Dioxin-/PCB-Analytik deutlich einfacher durchzuführenden Untersuchungen zur Fetthomogenität gemacht. Je Charge wurden hierfür jeweils 24 zufällig ausgewählte Proben untersucht. Dabei ergaben sich Fettgehalte von ca. 15 % für das Schweinefleischmaterial und von ca. 24 % für das Rindfleischergebnis. Die Fettgehalte schwankten dabei beim Schweinefleischmaterial zwischen 14,8 % und 15,4 %, beim Rindfleischmaterial zwischen 24,0 % und 24,7 %. Diese geringen Schwankungen sind ein Beleg dafür, dass in den unterschiedlichen Dosen sehr ähnliche Fettgehalte vorliegen. Ein Ringversuch unter Beteiligung der verschiedenen NRL wurde bereits durchgeführt und wird derzeit noch ausgewertet.

Herstellung von Referenzmaterialien für PAK

Da PAK – im Gegensatz zu Dioxinen und PCB – im tierischen Organismus schnell metabolisiert und anschließend ausgeschieden werden, ist unprozessiertes Fleisch prinzipiell nicht mit PAK belastet. Sieht man von dem nur in sehr vereinzelt Fällen relevanten Eintragspfad über Gewürze ab, so gelangen PAK als sogenannte „Prozesskontaminanten“ erst durch Räucherung in das Fleisch. Daher kann bei der Herstellung von Fleisch bzw. Fleischerzeugnissen als PAK-Referenzmaterialien nicht auf unprozessiertes Fleisch zurückgegriffen werden. PAK müssen entweder durch Räucherung oder Dotierung von PAK-Standardverbindungen eingebracht werden. Auf Wunsch des CRL wurden ausschließlich dotierte Fleisch-Referenzmaterialien produziert, und zwar insgesamt vier Chargen zu je 1000 Dosen als Brühwurst-Vollkonserven, die nach folgender Rezeptur hergestellt wurden: 25 %

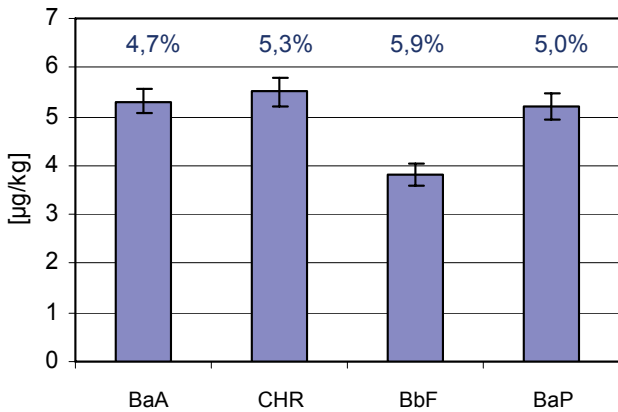


Abb. 3: Gehalte an BaA, CHR, BbF und BaP in dotierten Brühwurst-Vollkonserven (N = 10)

Schweinefleisch, 25 % Rindfleisch, 25 % Eis und 25 % dotiertes Olivenöl sowie Nitritpökelsalz, Phosphat und Ascorbat. Auf den Zusatz von Gewürzen wurde bewusst verzichtet, da diese wie bereits erwähnt ebenfalls eine PAK-Eintragsquelle darstellen können. Das Olivenöl wurde mit Standardverbindungen der 15+1 von der EU als prioritär eingestuftes PAK dotiert, wobei für die verschiedenen Chargen jeweils unterschiedliche Konzentrationen der einzelnen PAK-Verbindungen eingesetzt wurden. Zur Überprüfung der Homogenität der einzelnen Chargen wurden zunächst die Gehalte an Fett, Wasser, Protein und Asche in jeweils zehn zufällig ausgewählten Proben untersucht. Dabei ergaben sich mittlere Gehalte von 28 % Fett, 60 % Wasser, 10 % Protein und 2 %

Asche. Die prozentualen Standardabweichungen waren für alle vier Chargen erfreulich niedrig und lagen für Fett im Bereich von 1-2 %. Darüber hinaus wurden aus einer der Chargen zufällig 10 Dosen ausgewählt, die auf ihre PAK-Gehalte untersucht wurden. Exemplarisch zeigt Abbildung 3 die Gehalte der PAK-Verbindungen BaA, CHR, BbF und BaP. Die Summengehalte dieser vier PAK-Verbindungen werden derzeit von der Europäischen Lebensmittelbehörde (EFSA, 2008) als zuverlässigere Indikatoren für das Vorkommen kanzerogener PAK in Lebensmitteln angesehen als das bislang als Leitsubstanz verwendete BaP.

Die Gehalte der einzelnen PAK lagen im Bereich von ca. 4-6 µg/kg. Die prozentualen Standardabweichungen lagen für die vier PAK-Verbindungen BaA, CHR, BbF und BaP zwischen 4,7 % und 5,9 % und damit im Bereich der prozentualen Standardabweichung, die sich durch wiederholte Aufarbeitung und Messung ein und derselben Dose ergibt, das heißt also, die prozentualen Standardabweichungen liegen im Bereich der Messunsicherheit. Demzufolge kann von einer guten Homogenität der erzeugten Fleisch-Referenzmaterialien ausgegangen werden. Im Jahr 2008 wurde vom Institut für Referenzmaterialien und -messungen (Institute for Reference Materials and Measurements; IRMM) als CRL für PAK der EU-weite Ringversuch „PAK in Fleischerzeugnissen“

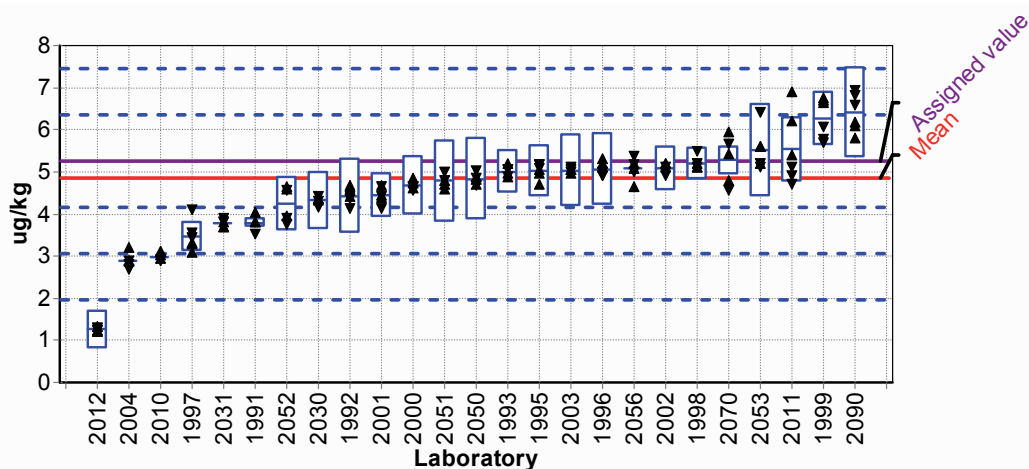


Abb. 4: Resultate der verschiedenen Laboratorien beim Ringversuch „PAK in Fleischerzeugnissen“ (Beispiel: Benzo[a]pyren) (Quelle: EUROPEAN COMMISSION, 2009)

durchgeführt (EUROPEAN COMMISSION, 2009). Teilnehmer dieses Ringversuch waren insgesamt 25 NRLs für PAK. Als Untersuchungsmaterial wurden Dosen aus einer der insgesamt vier Chargen Fleisch-Referenzmaterial, die am MRI Kulmbach hergestellt wurden, zur Verfügung gestellt. Das Material sollte an zwei unterschiedlichen Tagen jeweils anhand von Dreifachbestimmungen analysiert werden. Als Beispiel für die Ergebnisse des Ringversuchs sind in Abbildung 4 die Resultate der verschiedenen Laboratorien (N=25) für die PAK-Leitsubstanz Benzo[a]pyren zu sehen. Die jeweils 3 Einzelmessungen an Tag 1 und Tag 2 sind jeweils durch Dreiecke gekennzeichnet (Tag 1:▲ und Tag 2:▼). Der aus den insgesamt 6 Messungen resultierende Mittelwert ist durch einen blauen Strich, der sich inmitten der Boxen befindet, kenntlich gemacht. Der obere und untere Rand der blauen Box symbolisieren die angegebene Messunsicherheit. Der gespikete Gehalt (Benzo[a]pyren: 5,3 µg/kg; violette Linie) im Fleischerzeugnis wurde als Maßstab für die Evaluierung der Analyseergebnisse herangezogen. Die rote Linie repräsentiert den Mittelwert (4,8 µg/kg) der von den 25 Laboratorien gefundenen Gehalte, der etwa 10 % unter der gespikten Konzentration lag. Die blau gestrichelten Linien oberhalb bzw. unterhalb der violetten Linie bezeichnen die prozentualen Standardabweichungen ± 20,2 %, 40,4 % und 60,6 %.

Von den insgesamt 25 Laboratorien konnten 22 Laboratorien akzeptable Analyseergebnisse (Z-Score zwischen -2 und +2) für BaP abliefern, bei drei Laboratorien (Labor 2012, 2004 und 2010) waren die Ergebnisse aufgrund deutlich zu niedriger Gehalte nicht zufriedenstellend (Z-Score < -2). Die Ringversuchsergebnisse zeigen, dass auch bei NRL durchaus analytische Defizite bestehen können und belegen die Notwendigkeit der Durchführung von Ringversuchen und damit auch den dringenden Bedarf an Referenzmaterialien für verschiedene Matrices.

Bei dem Fisch-Referenzmaterial wurde aus 80 % frischem, ungeräuchertem

Lachs, 8 % Olivenöl, 8 % Wasser und 4 % Emulgatormischung ein Brühwurst-ähnliches, schnittfestes Produkt hergestellt. Hierbei wurden drei Chargen mit dotiertem Öl und eine Charge mit „natürlich“ kontaminiertem Öl hergestellt. Letzteres wurde durch Ölextraktion eines Nebenproduktes, das bei der Herstellung von Primärrauchkondensat anfällt, hergestellt. Dieses teerartige Abfallprodukt zeichnet sich durch schwarze Farbe, extreme Viskosität und hohe PAK-Gehalte aus. Zur Extraktion wurde das Abfallprodukt (ca. 20 %) in Olivenöl unter Erwärmen auf etwa 80 °C für mehrere Stunden gerührt. Nach Abfiltrieren unlöslicher Bestandteile ergab sich ein bräunlich verfärbtes Öl mit hohen PAK-Gehalten. Der Benzo[a]pyren-Gehalt dieses Öles lag mit 34 µg/kg deutlich über dem in der Kontaminantenverordnung festgelegten Höchstgehalt für Speiseöle von 2 µg/kg. Das extrahierte Öl wurde mit Olivenöl auf die vom CRL geforderten PAK-Gehalte verdünnt und hieraus dann das Fischmaterial hergestellt. Der Vorteil dieser „natürlich kontaminierten“ PAK-Referenzmaterialien besteht darin, dass einerseits typische Stoffe, die beim Räuchern entstehen (z. B. Phenole und Carbonylverbindungen) in der Matrix vorhanden sind. Andererseits sind bei den PAK eine Vielzahl an Verbindungen vorhanden, nicht nur die 15+1 EU-PAK. Es liegt also ein PAK-Kontaminationsmuster vor, welches dem einer Räucherung ähnlich ist. Da man davon ausgeht, dass insgesamt etwa 660 PAK-Verbindungen (SANDERS und WISE, 1997) existieren, stellt ein derartiges Referenzmaterial wesentlich höhere Anforderungen an die chromatographische Trennleistung der Analysemethoden als dies bei der Untersuchung von gespikten Referenzmaterialien der Fall ist. Abbildung 5 zeigt am Beispiel der PAK mit einem Molekulargewicht 252 das Chromatogramm des mit kontaminiertem Olivenöl hergestellten Fisch-Referenzmaterials. Man sieht, dass neben der Trennung der Isomere BbF, BkF, BjF und BaP, die zur Gruppe der 15+1 EU-PAK zählen, auch eine Abtrennung der PAK-Verbindungen Benzo[a]fluoranthren, Benzo[e]pyren und Perylen gewährleistet werden muss.

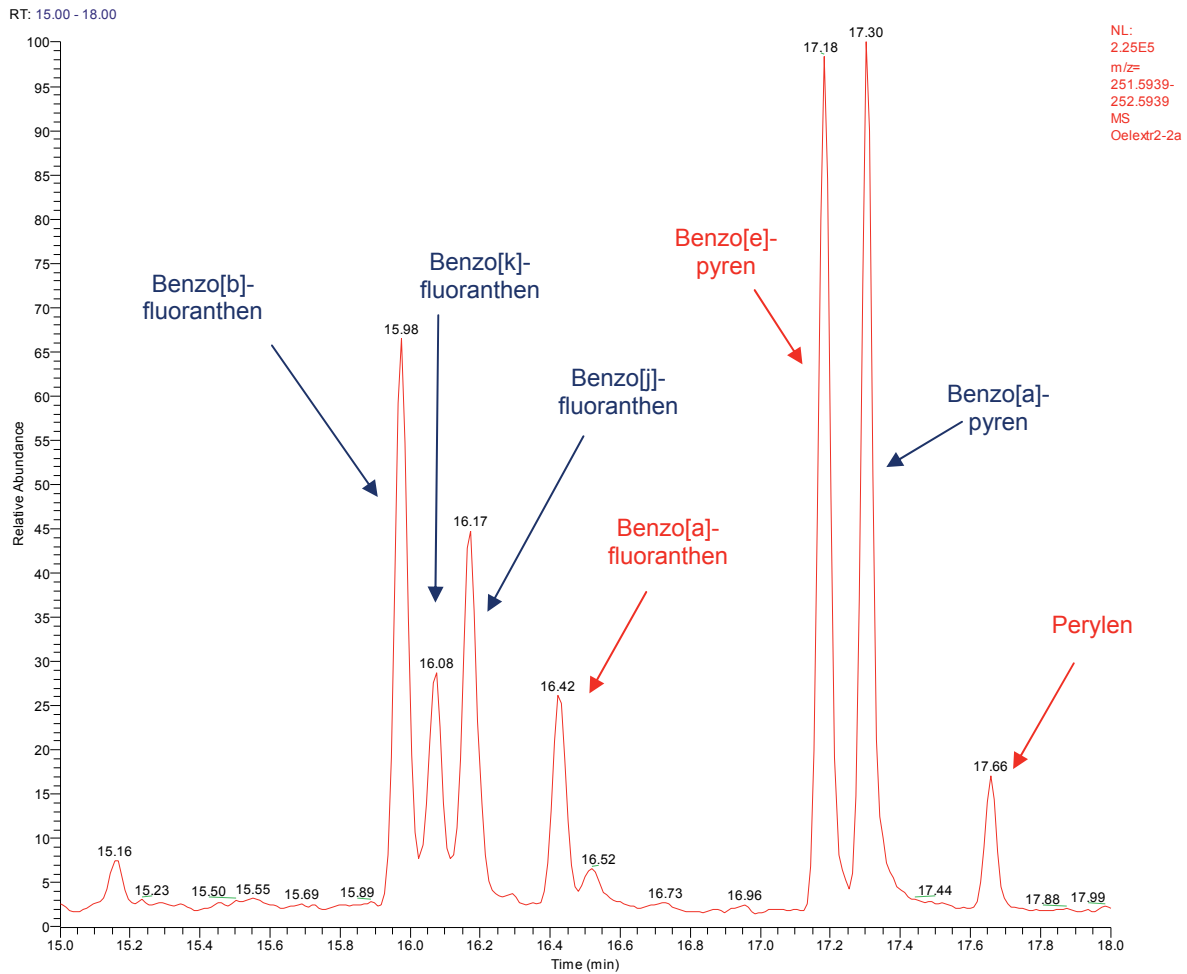


Abb. 5: Chromatogramm des mit kontaminierten Olivenöl hergestellten Fisch-Referenzmaterials (m/z = 252)

Diese deutlich höheren Anforderungen an die chromatographische Trennleistung bei „natürlich kontaminierten“ Referenzmaterialien gelten umso mehr für PAK mit einem Molekulargewicht von 302, da insgesamt 85 verschiedene PAK innerhalb der insgesamt 660 PAK-Verbindungen dieses Molekulargewicht aufweisen. Bestimmungen der Gehalte von 23 PAK-Isomeren mit einem Molekulargewicht von 302 in Standardreferenzmaterialien von Umweltproben haben ergeben, dass eine gaschromatographische Trennung dieser 23 Verbindungen nicht möglich ist (SCHUBERT *et al.*, 2003).

Zur Untersuchung der Homogenität der vier Chargen Fisch-Referenzmaterialien wurden jeweils 10 Fettbestimmungen von zufällig ausgewählten Proben durchgeführt. Die ermittelten Fettgehalte lagen

für alle vier Materialien bei etwa 20 %. Dabei ergaben sich sehr geringe Variationskoeffizienten, die für die unterschiedlichen Chargen im Bereich von 0,13 bis 0,21 lagen. Der EU-weite Ringversuch „PAK in Fischprodukten“ des CRL soll im Jahr 2009 stattfinden (CRL PAK, 2009).

Fazit

Aufgrund des Vorhandenseins von Technikum und vielfältiger analytischer Möglichkeiten im Bereich Rückstandsanalytik und Molekularbiologie besteht am MRI Kulmbach eine exzellente Möglichkeit zur Herstellung verschiedenster Referenzmaterialien für die Matrices „Fleisch“ und „Fisch“ für unterschiedliche Kontaminanten und Rückstände, Allergene sowie Tier- und Pflanzenarten.

Literatur

BVL, 2009: http://www.bvl.bund.de/nn_781904/DE/01__Lebensmittel/03__UnerwStoffeUndOrganismen/06__DioxineUndAndere/dioxineUndAndere__node.html__nnn=true

CRL PAK, 2009: http://irimm.jrc.ec.europa.eu/html/CRLs/crl_pah/interlaboratory_comparisons/index.htm

EFSA, 2008: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food – Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. The EFSA Journal 724, 1-114.

Empfehlung der Kommission vom 4. Februar 2005 über die genauere Ermittlung der Mengen von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen in bestimmten Lebensmitteln (2005/108/EG).

Empfehlung der Kommission vom 6. Februar 2006 zur Reduzierung des Anteils von Dioxinen, Furanen und PCB in Futtermitteln und Lebensmitteln (2006/88/EG).

European Commission, 2009: Report on the third inter-laboratory comparison organised by the Community reference laboratory for polycyclic aromatic hydrocarbons, ISBN: 978-92-79-11732-9, Joint Research Centre.

JECFA (2005). Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Summary and conclusion. Sixty-fourth meeting, Rome, 8-17 February, JECFA/64/SC. http://www.who.int/ipcs/food/jecfa/summaries/summary_report_64_final.pdf

Richtlinie 2006/13/EG der Kommission vom 3. Februar 2006 zur Änderung der Anhänge I und II der Richtlinie 2002/32/EG des Europäischen Parlaments und des Rates über unerwünschte Stoffe in Futtermitteln in Bezug auf Dioxine und dioxinähnliche PCB. Amtsblatt der Europäischen Union L 32: 44-53.

Sanders LC, Wise, SA, Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Index. NIST Special Publication 922. National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg 1997, <http://ois.nist.gov/pah/pages/index.pdf>.

SCF, Scientific Committee on Food (2002): Opinion of the Scientific Committee on Food on the Risks to Human Health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food (expressed on 4 December 2002). http://europa.eu.int/comm/food/food/chemicalsafety/contaminants/out153_en.pdf.

Schubert P, Schantz MM, Sander LC, Wise SA (2003). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons with molecular weight 300 and 302 in environmental-matrix standard reference materials by gas chromatography/mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 75 (2), 234-246.

Van den Berg M, Birnbaum L, Bosveld ATC, Brunstrom B, Cook P, Feeley M, Giesy JP, Hanberg A, Hasegawa R, Kennedy SW, Kubiak T, Larsen JC, van Leeuwen FXR, Liem AKD, Nolt C, Peterson RE, Poellinger L, Safe S, Schrenk D, Tillitt D, Tysklind M, Younes M, Waern F, Zacharewski T (1998). Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environmental Health Perspectives* 106 (12), 775-791.

Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 der Kommission vom 19. Dezember 2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln. Amtsblatt der Europäischen Union L 364: 5-24.

Verordnung (EG) Nr. 776/2006 der Kommission vom 23. Mai 2006 zur Änderung von Anhang VII der Verordnung (EG) Nr. 882/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich der Gemeinschaftsreferenzlaboratorien. Amtsblatt der Europäischen Union L 136: 3-8.

Verordnung (EG) Nr. 882/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates über amtliche Kontrollen zur Überprüfung der Einhaltung des Lebens- und Futtermittelrechts sowie der Bestimmungen über Tiergesundheit und Tierschutz vom 29. April 2004. Amtsblatt der Europäischen Union L 165: 1-141.

