

Moderne Lebensmittelanalytik unter die Lupe genommen

Einsatz spektroskopischer und chromatographischer Methoden



Spektroskopie umfasst eine Klasse experimenteller Verfahren, die untersuchen, wie eine Probe Energie in Form von Lichtquanten aufnehmen oder abgeben kann. Jedes Spektrum, egal welcher Art, entsteht dabei durch Wechselwirkung der zu untersuchenden Materie mit elektromagnetischer Strahlung, wobei die Wellenlängenbereiche von Radiowellen bis zur Gammastrahlung reichen. Materie kann Energie aufnehmen (Strahlungsabsorption) oder Energie abgeben (Strahlungsemission), wobei sich deren eigener energetischer Zustand entsprechend ändert. Ziel der Spektroskopie ist es, aus dem erzielten Spektrum Rückschlüsse auf die Probe zu ziehen, zum Beispiel auf deren innere Struktur, stoffliche Zusammensetzung oder Dynamik. Die Massenspektrometrie, die im strengen Sinne keine spektroskopische Methode darstellt, soll hier mit behandelt werden.

Kernresonanzspektroskopie (NMR, nuclear magnetic resonance, kernmagnetische Resonanz)

Mit Hilfe der NMR-Spektroskopie lassen sich Übergänge von Atomkernen zwischen Zuständen mit verschiedener Orientierung ihrer magnetischen Momente (die proportional zum Eigendrehimpuls sind, der von der Kernspinzahl oder vereinfacht vom Kernspin abhängt) in einem äußeren Magnetfeld beobachten. Das für Übergänge zwischen den energetisch unterschiedlichen Orientierungen erforderliche Energiequantum ist abhängig von (i) dem äußeren Magnetfeld und (ii) der Wechselwirkung der Elektronenhülle des eigenen Atoms und den Elektronen des gesamten Moleküls. Die erhaltenen Signale werden teilweise weiter aufgespalten durch die Wechselwirkungen nichtäquivalenter Kerne untereinander. Da die exakte Lage der Resonanzlinien und ihre Feinstruktur also durch die chemische Umgebung der Kerne beeinflusst werden, hat die Kernresonanzspektroskopie größte Bedeutung als analytisches Werkzeug in der Chemie und Biologie und vielen anderen Gebieten.

Hauptanwendung der NMR-Spektroskopie in der Lebensmittelchemie ist zweifelsohne noch immer die Strukturaufklärung von organischen Verbindungen, jedoch wird die NMR-Spektroskopie zunehmend auch für rein analytische Zwe-

cke, wie z.B. die Herkunftsbestimmung oder die Authentizitätsüberprüfung von Lebensmitteln, eingesetzt. Für die Strukturaufklärung organischer Moleküle wird die zweidimensionale NMR-Spektroskopie routinemäßig verwendet, auch die dreidimensionale NMR-Spektroskopie findet häufig Anwendung, v.a. im Bereich der Proteinchemie. Bei Anwendung inverser Experimente, die seit Ende der 1970er Jahre als Variante der heteronuclearen Korrelationsexperimente eingesetzt werden und heute den Standard darstellen, werden in H,X (v.a. H,C)-Korrelationsexperimenten die Protonen detektiert, was zu einem Empfindlichkeitsgewinn, einhergehend mit einer drastisch reduzierten Messzeit, führt. Ein weiterer Gewinn an Empfindlichkeit wird seit Anfang der 2000er Jahre durch die Verwendung so genannter CryoProbes erreicht. Hierbei wird das Signal/Rausch Verhältnis durch Absenkung der Temperatur der Empfängerspulen um den Faktor drei bis vier erhöht. Dadurch wird die Messzeit bis zu einem Faktor von 16 verkürzt, bzw. die benötigte Probenkonzentration kann um den Faktor vier reduziert werden. Ebenso wird durch die Erhöhung der magnetischen Feldstärken in den modernen NMR-Geräten (bis zu 21,1 Tesla, was einer Protonenmessfrequenz von 900 MHz entspricht) die Empfindlichkeit erhöht. Auch geringe Probenmengen sollten daher Lebensmittelchemiker nicht davon abschrecken,

► Prof. Dr. Markus Fischer, Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung Lebensmittelchemie, Universität Hamburg

► Dr. Mirko Bunzel, Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung Lebensmittelchemie, Universität Hamburg

die Strukturen ihrer Analyten mittels NMR zu beschreiben und nicht nur auf häufig mehrdeutige Ergebnisse aus der Massenspektrometrie zurückzugreifen.

Der Einsatz der NMR-Spektroskopie zur Überprüfung der Authentizität und Herkunft wurde z.B. in der Analytik von pflanzlichen Ölen, von Kaffee, Fruchtsäften, Wein und Bier beschrieben [1,2]. Herkunfts- bzw. Authentizitätsbestimmungen werden häufig mittels SNIF (site-specific fractionation NMR) durchgeführt, mit der die interne Deuteriumverteilung bestimmt werden kann [3]. Diese Bestimmung ist für die Authentizitätsprüfung von Bedeutung, da die Deuteriumverteilung organischer Moleküle nicht statistisch erfolgt; für verschiedene Lebensmittelinhaltsstoffe lässt sie sich bis zu einem bestimmten Grad anhand des jeweiligen Biosynthesewegs vorher-sagen.

Massenspektrometrie (MS, mass spectrometry)

Grundsätzlich ist die Massenspektrometrie eine Methode zur Trennung und Messung von Ionen unterschiedlicher Masse. Dabei wird die zu untersuchende Probe in das Massenspektrometer eingebracht, verdampft und ionisiert. Für die Ionisierung können verschiedene physikalische oder chemische Techniken verwendet werden. Je nach Verfahren kommt es zu einer mehr oder weniger starken Fragmentierung der zu analysierenden Moleküle. Die entstandenen charakteristischen Molekülbruchstücke lassen sich auf verschiedene Arten nach ihrer Masse zu Ladungsverhältnis (m/z) auftrennen und detektieren. Bei einem durch diese Methode erhaltenen Massenspektrum wird, im Gegensatz zu optischen Spektren, die Wellenlänge durch die Größe m/z ersetzt und die Intensität des auf einen Detektor fallenden Ionenstrahls konzentration-proportional aufgenommen. Der Ionisierungsgrad ist hierbei ausschlaggebend für die Nachweisempfindlichkeit des Massenspektrometers.

Beschränkte sich der Einsatz der MS in der Lebensmittelanalytik früher nur auf die EI (electron impact, Elektronenstoßionisation)-MS, typischerweise gekoppelt an einen Gaschromatographen, so werden inzwischen auch HPLC (high performance liquid chromatography)-MS Kopplungen routinemäßig betrieben. Bei der EI wird die flüssige Probe in einer Ionenquelle verdampft, in der sie dann mit einem Strahl thermischer Elektronen der kinetischen Energie von 70–100 eV (typischerweise 70 eV) beschossen wird. Die Elektronenstoßionisation ist zu den harten Ionisationsmethoden zu zählen, wobei überschüssige Energie hierbei auf zunächst gebildete einfach geladene Molekülionen abgegeben wird, d.h. es kommt hier zu einer nahezu vollständigen Fragmentierung der untersuchten Substanz. Für polare Verbindungen wird hier schon seit längerem die Elektrosprayionisation (ESI, electrospray ionization) als Ionenquelle bzw. Interface eingesetzt, aber auch für unpolare Verbindungen gibt es mittlerweile Mög-

lichkeiten zur Ionisierung. Im Gegensatz zur EI stellt die ESI eine weiche Ionisationsmethode dar, bei der die untersuchten Substanzen nicht bzw. nur geringfügig fragmentiert werden. Es werden vor allem die für eine Molmassebestimmung gewünschten Molekülionen wie z.B. $M \rightarrow [M+nH]^+$ mit $n \geq 1$ erzeugt. Neben der chemischen Ionisierung bei Atmosphärendruck (APCI, atmospheric pressure chemical ionization) wird auch die Photoionisation bei Atmosphärendruck eingesetzt (APPI, atmospheric pressure photoionization) [4]. Als Alternative zur APCI und APPI zur Ionisierung von unpolaren Verbindungen bietet sich die HPLC-Elektrochemie-MS an. Hierbei wird eine coulometrische Zelle zwischen Trennsäule und das MS-Interface integriert. Mit Hilfe dieser Methodik lassen sich zum Beispiel polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe detektieren [5]. Auf dem Gebiet der Lebensmittelanalytik kommen als Massenanalysatoren in der HPLC-MS typischerweise Ionenfallen (Trap) oder Quadrupole (Q), seltener Time-of-Flight-Analysatoren (TOF) oder Hybrid-Massenspektrometer (Q-TOF, Q-Trap) zum Einsatz. Viele Methoden in der Lebensmittelanalytik, die auf der HPLC mit UV-Detektion beruhen, werden derzeit auf die HPLC-MS und vor allem auf die HPLC-MS/MS (Triple-Quadrupole) umgestellt, um hier von der höheren Selektivität und Empfindlichkeit zu profitieren. Die höhere Selektivität lässt häufig auch einen geringeren Aufwand in der Probenvorbereitung zu. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass Matrixeffekte die Ionisierung und somit die Quantifizierung stark beeinflussen können, so dass in diesen Fällen idealerweise mit stabilisotopenmarkierten Standardsubstanzen gearbeitet werden sollte. Die HPLC-MS/MS wird heute sehr stark bei der Entwicklung von Multimethoden zum Beispiel auf den Gebieten der Mykotoxin- [6], Pflanzenschutzmittel- [7] und Tierarzneimittelanalytik eingesetzt.

Chromatographie

Unter Chromatographie versteht man generell die ständig wiederholte Einstellung eines Gleichgewichtes zwischen einer ruhenden (stationären) Phase und einer bewegten (mobilen) Phase. Das Gleichgewicht bildet sich auf Grund verschiedener physikalisch-chemischer Effekte aus. Eine Klassifizierung kann anhand der zu Grunde liegenden Trennmechanismen, der verwendeten apparativen Aufbauten und der Art der stationären und mobilen Phasen erfolgen.

Gaschromatographie (GC, gas chromatography)

Bei der Gaschromatographie erfolgt die Auftrennung eines Stoffgemisches aufgrund der unterschiedlichen Siedepunkte der Einzelsubstanzen

und der Wechselwirkung des zu analysierenden Stoffes mit der stationären Phase. Die mobile Phase ist ein Gas.

Die Anwendung der Gaschromatographie in der Lebensmittelanalytik ist extrem vielfältig und beschränkt sich nicht nur auf die Analyse von leichtflüchtigen Substanzen (z.B. Alkoholen, Estern und Aldehyden), sondern auch auf schwerer flüchtige Verbindungen (z.B. Zucker, Sterine, langkettige Fettsäuren etc.), die jedoch zur Überführung in die Gasphase entsprechend derivatisiert werden müssen. Neben den klassischen stationären Phasen auf Silicon- oder Polyethylenglycol-basis spielen auch chirale stationäre Phasen, z.B. zur Bestimmung chiraler Aromastoffe im Rahmen der Authentizitätsüberprüfung [8] oder aber auch zur Bestimmung der Konfiguration von Monosacchariden, eine große Rolle. Hierbei haben sich vor allem stationäre Phasen auf Basis von modifizierten Cyclodextrinen, die über geeignete Abstandshalter (Spacer) an die stationäre Phase gebunden sind, bewährt. Andere klassische chirale Phasen beruhen auf der Verwendung von Aminosäure-Derivaten (z.B. Chirasil-Val-Phasen). Neue Ansätze zur Verkürzung der Analysenzeit, z.B. in der Analytik der Fettsäuremethylester, bieten die (Ultra-)Fast-GC oder High-Speed-GC [9]. Dabei erfolgt die Trennung an meist kurzen Säulen (z.B. 5 m) mit geringem Innendurchmesser (z.B. 0,1 mm). Für die Fast-GC spielen die Heizrate des Ofens ($> 1^\circ\text{C}/\text{min.}$) und der Detektor (muss hohe Aufnahme-raten zulassen) eine entscheidende Rolle. Auf diese Art und Weise kann die Analysenzeit bis zu 20fach verkürzt werden. Weitere neue Perspektiven bietet vor allem die Kombination der Probenvorbereitung, z.B. die SBSE (stir bar sorptive extraction), mit der GC. Bei der SBSE erfolgt eine Verteilung der Analyten zwischen der zu extrahierenden Probelösung und einem speziellen Magnetührstäbchen, das mit einer Glashülle ummantelt ist, die wiederum mit Polydimethylsiloxan beschichtet ist. Die Thermo-desorption der Analyten von dem Magnetührstäbchen erfolgt in einem speziellen, dem Gaschromatographen angegliederten Thermodesorptionssystem.

Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC, high performance liquid chromatography)

Neben der GC ist die Flüssigchromatographie, i. B. die HPLC, bei der als mobile Phase eine Flüssigkeit dient, die wohl am häufigsten eingesetzte Trennmethode in der Lebensmittelanalytik, wobei Trennungen auf Normalphasen in den Hintergrund treten und die meisten Trennungen auf Umkehrphasen (zumeist C8- und C18-Phasen, aber auch Anwendung von Spezialphasen, z.B. C30-Phasen) durchgeführt werden, soweit die Polarität der Analyten dies zulässt. Neben neueren Entwicklungen bezüglich der Umkehr-

phasen, z.B. der Einführung von Phenyl-Hexyl-Phasen, die sich hervorragend zur Trennung phenolischer Verbindungen eignen, und von Umkehrphasen, die mit 100% wässrigen Eluenten betrieben werden können, ohne dass die Phase kollabiert, war die Einführung der monolithischen Säulen von Bedeutung. Diese Säulen basieren zumeist nach wie vor auf Kieselgel, jedoch handelt es sich hier um monolithische Kieselgelstäbe und nicht um pulverförmiges Material. Die Kieselgelstäbe enthalten größere Durchgangsporen (ca. 2 µm) und um Größenordnungen kleinere Mesoporen (13 nm) als aktive Oberfläche auf dem Kieselgelgerüst. Aufgrund des geringeren Säulendrucks können höhere Flussraten angewendet werden, resultierend in kürzeren Trennzeiten. Applikationen in der Lebensmittelanalytik, z.B. in der Mykotoxinanalytik oder in der Analytik phenolischer Verbindungen aus Wein, wurden beschrieben [10]. Die Analysenzeit wird ebenfalls verkürzt mit einer neuen Variation der HPLC, der UPLC (ultra performance liquid chromatography). Hierbei werden Säulen verwendet, die mit 1,7 µm kleinen Partikeln gepackt sind, die jedoch auch einen entsprechen hohen Druck aufbauen. Inwieweit sich die UPLC im Allgemeinen und in der Lebensmittelanalytik im Speziellen [11] durchsetzt, bleibt jedoch abzuwarten, benötigt sie doch auch spezielle Pumpen, da bei Drücken bis 1000 bar gearbeitet wird.

Schlusswort

Analytische Methoden bilden die Grundlage zur Einhaltung von Spezifikationen, Qualitätsmaßstäben und rechtlicher Vorgaben im Bereich der Nahrungsmittel. Moderne analytische Methoden in der Lebensmittelanalytik basieren auf unterschiedlichen physikalischen oder chemischen Messprinzipien aber auch auf der Verwendung biologischer Materialien, wie Enzymen oder Antikörpern. Hochauflösende spektroskopische und chromatographische Techniken werden in der modernen Lebensmittelanalytik bevorzugt zum Nachweis von niedermolekularen Lebensmittelinhaltsstoffen eingesetzt. Makromolekulare Eigenschaften hingegen, wie gentechnische Veränderungen oder auch mikrobielle Kontaminationen, können am einfachsten auf DNA-Ebene, mit Hilfe molekularbiologischer Verfahren, wie „Polymerase-Kettenreaktion (PCR)“ und „DNA-Chip-Technologie“ nachgewiesen werden. Auch immunologische Verfahren, bei denen mittels einer Antigen/Antikörper Reaktion die Anwesenheit einer Substanz gemessen wird, gehören seit vielen Jahren zum Standardrepertoire der Lebensmittelanalytik und werden zum direkten Nachweis von Allergenen in Lebensmitteln angewendet.

Literatur

[1] Mannina, L.; Patumi, M.; Proietti, N.; Bassi, D.; Segre, A.L.: *J. Agric. Food Chem.* 49, 2687–2696 (2001).

- [2] Duarte, I.; Barros, A.; Belton, P.S.; Righelato, R.; Spraul, M.; Humpfer, E.; Gil, A.M.: *J. Agric. Food Chem.* 50, 2475–2481 (2002).
- [3] Ogrinc, N.; Kosir, I.J.; Spangenberg, J.E.; Kidric, J.: *Anal. Bioanal. Chem.* 376, 424–430 (2003).
- [4] Robb, D.B.; Covey, T.R.; Bruins, A.P.: *Anal. Chem.* 72, 3653–3659 (2000).
- [5] van Leeuwen, S.M.; Hayen, H.; Karst, U.: *Anal. Bioanal. Chem.* 378, 917–925 (2004).
- [6] Kloetzel, M.; Lauber, U.; Humpl, H.-U.: *Mol. Nutr. Food Res.* 50, 261–269 (2006).
- [7] Pico, Y.; Blasco, C.; Font, G.: *Mass Spectrom. Rev.* 23, 45–85 (2003).
- [8] Mosandl, A.: *J. Chromatogr. Sci.* 42, 440–449 (2004).
- [9] Lehotay, S.J.; Hajslova, J.: *Trac - Trends Anal. Chem.* 21, 686–697 (2002).
- [10] Cabrera, K.: *J. Sep. Sci.* 27, 843–852 (2004).
- [11] Leandro, C.C.; Hancock, P.; Fussell, R.J.; Keely, B.J.: *J. Chromatogr. A* 1103, 94–101 (2006).

► KONTAKT

Prof. Dr. Markus Fischer
Dr. Mirko Bunzel
 Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie
 Abteilung Lebensmittelchemie
 Universität Hamburg
 Tel.: 040/42838-4359
 Fax: 040/42838-4342
 markus.fischer@chemie.uni-hamburg.de
 www.chemie.uni-hamburg.de/lc/