

HPLC-MS/MS-Tierartnachweis in Fleischerzeugnissen anhand von Myoglobin-Markerpeptiden

Quelle: Analytical Chemistry 87 (2015), 10315-10322

Im Jahr 2013 hat der Pferdefleisch-Skandal in der Öffentlichkeit großes Aufsehen erregt und den Bedarf an Analysemethoden zum Tierartnachweis in Fleischerzeugnissen deutlich gemacht. Neben ökonomischen Aspekten ist der Tierartnachweis auch aus ethischen und religiösen Aspekten von Bedeutung. Bezüglich des Tierartnachweises sind neben immunologischen Methoden wie ELISA-Tests insbesondere DNA-basierte Verfahren (Polymerasekettenreaktion, PCR) am weitesten verbreitet, die eine simultane Bestimmung verschiedener Tierarten in einer Probe ermöglichen.

Neben ELISA und PCR sind in jüngster Zeit auch erste Methoden zum massenspektrometrischen Tierartnachweis in Fleischerzeugnissen entwickelt worden. Dabei werden die Fleischproteine extrahiert, enzymatisch verdaut und die resultierenden Peptide mit tierartspezifischer Aminosäuresequenz mit sehr selektiven und sensitiven HPLC-MS/MS-Messungen detektiert. Als Zielprotein für den Nachweis der Tierart wurde Myoglobin verwendet, da dieses Protein im Muskelfleisch vieler Tierarten in relativ hoher Menge (etwa 1 % bezogen auf Trockenmasse) vorkommt, Spezies-spezifische Unterschiede in der Aminosäuresequenz aufweist und zudem hitzestabil ist. Die Untersuchungen beschränkten sich dabei auf die Tierarten Rind, Schwein, Pferd und Lamm. Geflügelfleisch mit deutlich reduzierten Myoglobingehalten wurde nicht mit in die Untersuchungen einbezogen.

Für die Untersuchungen wurden zunächst die Myoglobine der Tierarten Rind, Schwein, Pferd und Lamm mit einer speziellen Auswertesoftware virtuell mit Trypsin verdaut. Ausgewählt wurden charakteristische Markerpeptide, die keine fehlenden Spaltstellen aufweisen und aus 6 bis 25 Aminosäuren bestehen. Für die Untersuchung der Fleischerzeugnisse wurden die Proben zunächst mit einem Extraktionspuffer (0,3 M KCl und 0,3 M Phosphatpuffer, pH 6,5) bei Raumtemperatur für zwei Stunden extrahiert, anschließend zentrifugiert und der Überstand zur Trockne eingeengt. Die getrockneten Fleischproben wurden in 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat gelöst und für 30 Minuten auf 95 °C erhitzt und anschließend abgekühlt. Aufgrund der relativ hohen Widerstandsfähigkeit von Myoglobin gegen Trypsin wurde der Verdau in Anwesenheit von Harnstoff (0,5 M) durchgeführt (bei 37 °C über Nacht). Da Myoglobin keine Disulfidbrücken aufweist, konnte auf eine Reduzierung und anschließende Alkylierung der Cysteine verzichtet werden. Vor der HPLC-MS/MS-Messung auf einer RP18-Säule wurden die Proben mittels Festphasenextraktion entsalzt. Für jedes Markerpeptid wurden jeweils vier Massenübergänge gemessen.

Aufgrund ihrer potenziellen Relevanz im Blick auf möglichen Lebensmittelbetrug wurden die drei Fleischmischungen Pferd in Rind, Rind in Lamm und Schwein in Lamm hergestellt. Es konnten jeweils Beimischungen von 1 % nachgewiesen werden, wobei keine genauen Nachweisgrenzen bestimmt wurden. Es gilt jedoch zu beachten, dass Myoglobin von Rind identische Aminosäuresequenzen aufweist zu Bison (*Bison bison*) und Yak (*Bos mutus*), Pferd zu Zebra (*Equus quagga*) und Esel (*Equus asinus*) sowie Tibetantilope (*Pantholops hodgsonii*) zu Lamm. Auf der Ebene der ermittelten tryptischen Markerpeptide konnten zudem weitere Homologien wie beispielsweise zu Rotwild (*Cervus elaphus*), Ziege (*Capra hircus*), Wasserbüffel (*Bubalus bubalis*), Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) und Hund (*Canis familiaris*) festgestellt werden.

Die Autoren spekulieren, dass die Analysenzeit dieses bislang deutlich zeitaufwendigeren Nachweisverfahrens auf etwa zwei Stunden reduziert werden könnte.