



Lebensmittel- und Umweltanalytik

## Fischzuchten im Pharmastress

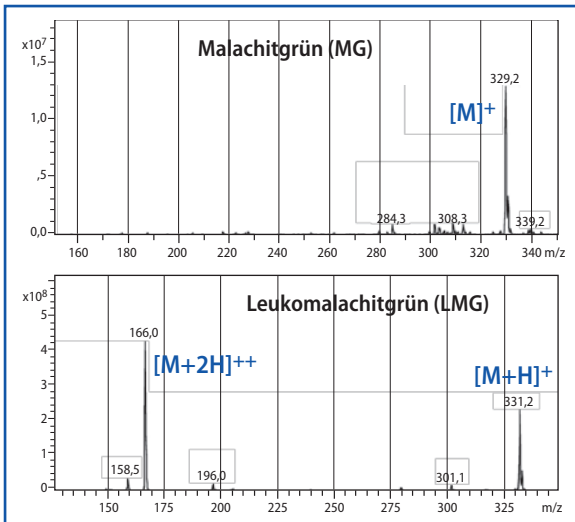
Bei der Untersuchung von Fischereierzeugnissen aus Aquakulturen wurde vermehrt Malachitgrün (MG) gefunden. Der Einsatz dieses Wirkstoffs ist in der Fischzucht verboten. MG steht im Verdacht, Krebs zu erregen. Experten sprechen von alarmierenden Zuständen und fordern mehr Kontrollen.

*Von Guido Deußing*

**W**ill man die weltweite Nachfrage nach Speisefisch und anderen Fischereierzeugnissen auf absehbare Zeit zufriedenstellend decken können, sind wir auf Fischzuchten angewiesen. Aufgrund der Überfischung der Weltmeere und den stagnierenden Fangquoten wildlebender Fische bilden Aquakulturen einen wichtigen Eckpfeiler in der Gewinnung von Nahrungsmitteln. Nicht nur in Asien, auch in Europa boomt das Geschäft mit der Massentierhaltung unter Wasser. Aquakulturen besitzen einen hohen wirtschaftlichen Stellenwert.

Und die Erträge sollen sicher sein. Um das Risiko eines Ausbruchs von Krankheiten im Fischbestand zu minimie-

ren, das in der Massentierhaltung per se erhöht ist, behandeln Aquafarmer ihre Zuchten mit Antibiotika und anderen Medikamenten. Nicht alle Wirkstoffe, die eingesetzt werden, sind möglicherweise legal. Bestimmte Wirkstoffe, hierzu zählt Malachitgrün, besitzen nämlich ein potenziell für den Menschen gesundheitsgefährdendes Risiko. In der Europäischen Union (EU) ist der Einsatz von Malachitgrün (MG) seit vielen Jahren verboten. Dennoch stoßen Untersuchungsämter und Lebensmittel laboratorien bei der Kontrolle von Fischereierzeugnissen aus Fischzuchten immer wieder auf Rückstände der gesundheitsschädlichen Verbindung.



Massenspektren für Leukomalachitgrün und Malachitgrün.

## Wirksam, aber gefährlich

Malachitgrün (MG), eine zu den Triphenylmethanfarbstoffen zählende synthetische organische Verbindung, wird mit dem Fischfutter verabreicht oder direkt ins Wasser der Fischanlage gegeben. Es steht allerdings auch zu vermuten, dass in für Fischzuchten verwendeten Teichen und Seen sedimentierte Wirkstoffrückstände kontinuierlich ins Wasser diffundieren und den Fischbestand kontaminieren. Hierin sehen Experten ein nicht zu unterschätzendes Problem.

MG ist bekannt dafür, effektiv Parasiten wie Pilze und Bakterien zu bekämpfen, die Fische und Fischeier befallen. Im Fischorganismus wird Malachitgrün zu Leukomalachitgrün (LMG) reduziert und im Gewebe eingelagert. Ungeachtet seiner Wirksamkeit gegen Schadkeime: Malachitgrün steht im Verdacht, krebserregend und erbgutschädigend zu sein, was seinem therapeutisch motivierten Einsatz in der Behandlung von für den Verzehr vorgesehener Fische und Fischereierzeugnisse diametral gegenübersteht.

## Nulltoleranz für Malachitgrün

Für die Europäische Union (EU) gilt in puncto des Einsatzes von MG eine Nulltoleranzgrenze: „In Fischen und Fischereierzeugnissen, die für den Verzehr bestimmt sind, darf Malachitgrün einschließlich seiner Leukoform nicht nachweisbar sein“, sagt Franziska Chmelka, diplomierte Lebensmitteltechnologin und Geschäftsführerin der TeLA GmbH, einem in Geestland bei Bremerhaven ansässigen Auftragslabor für Lebensmittel- und Umwelanalytik, das sich unter anderem auf die Untersuchung von Fisch und Fischereierzeugnissen spezialisiert hat.

Übergänge und Bedingungen am LC-TripleQuad.

Compound Group	Compound Name	ISTD?	Precursor Ion	MS1 Res	Product Ion	MS2 Res	Dwell	Fragmentor	Collision Energy	Cell Accelerator Voltage	Polarity
	Leukomalachitgruen	<input type="checkbox"/>	331.2	Unit	239.2	Unit	50	380	28	7	Positive
	Leukomalachitgruen	<input type="checkbox"/>	331.2	Unit	223.1	Unit	50	380	45	7	Positive
	Malachitgruen	<input type="checkbox"/>	329.2	Unit	208	Unit	50	380	40	7	Positive
	Malachitgruen	<input type="checkbox"/>	329.2	Unit	165	Unit	50	380	72	7	Positive
	Leukomalachitgruen	<input type="checkbox"/>	166.1	Unit	196.1	Unit	50	380	12	7	Positive
	Leukomalachitgruen	<input type="checkbox"/>	166.1	Unit	158.1	Unit	50	380	5	7	Positive
	Leukomalachitgruen	<input type="checkbox"/>	166.1	Unit	112.1	Unit	50	380	20	7	Positive

Da es jedoch grundsätzlich schwer praktikabel sei, die Einhaltung der Umsetzung einer Nulltoleranzforderung zu kontrollieren, sagt Franziska Chmelka, sei bereits im Jahr 2003 innerhalb der EU ein Grenzwert, neudeutsch „Minimum Residue Performance Level“ (MRPL) genannt, von 2,0 µg/kg festgelegt worden. Diesen Grenzwert zu erreichen, weiß die Expertin, erfordere den Einsatz einer leistungsfähigen Analysetechnik. Sinnvoll sei es, eine Bestimmungsgrenze deutlich unterhalb von 2,0 µg/kg zu erreichen.

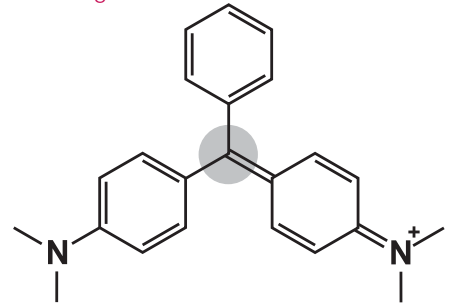
## Produktiver Nachweis dank Automatisierung

Üblicherweise werden MG und LMG mittels LC/MS nachgewiesen. Um großen Probenzahlen gewachsen zu sein und in vielerlei Hinsicht nachhaltig zu arbeiten, legt die TeLA GmbH einen hohen Wert auf Automatisierung. Etwa in puncto Probenvorbereitung, die insbesondere bei hochkomplexen Lebensmittelproben wie Fisch erforderlich ist, um die Analyten aus der Probenmatrix zu extrahieren. „Als Lebensmitteluntersuchungslabor, das einen Schwerpunkt auf die Analyse von Fischereierzeugnissen setzt“, sagt Dr. Norbert Helle, Lebensmittelchemiker und geschäftsführender Gesellschafter der TeLA GmbH, „legen wir Wert auf Produktivität und bestmögliche Reproduzierbarkeit.“ Bei der Entwicklung der Methode zum Nachweis von MG und LMG habe daher im Fokus gestanden, den gesamten Analysenverlauf einschließlich der Probenvorbereitung, genauer gesagt die Extraktion und Anreicherung der Analyten mittels Festphasenextraktion (SPE), zu automatisieren.

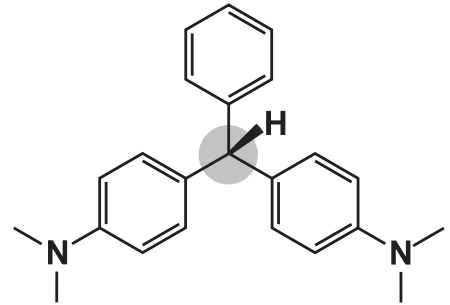
## MG sicher, sensitiv und effizient nachweisen

Laut Franziska Chmelka gestaltet sich die Analyse von MG und LMG wie folgt: Eine Fischfiletprobe wird homogenisiert, mit einer Acetonitril-Wasser-Lösung (pH 4)

Malachitgrün



Leukomalachitgrün



Chemische Struktur von Malachitgrün und Leukomalachitgrün



Quelle: iStock / cassinga

Fischzucht im Nordatlantik.

extrahiert und zentrifugiert. Der flüssige Überstand wird entnommen und gesammelt. Zweimal wird der Extraktionsvorgang wiederholt. Die Aufreinigung der Probe erfolgt mittels Festphasenextraktion (SPE) automatisiert unter Einsatz des GERSTEL-MultiPurposeSamplers (MPS).

Integriert war der MPS in ein Agilent 1290 LC/MS-TripleQuad-System, bestehend aus Binärpumpe, Säulenofen und einem 6495 Triple Quadrupol-MS. Das LC/QQQ-MS wurde mit Elektrosprayionisierung im (ESI) Positiv-Ionen-Modus verwendet. Für die Erzeugung des Elektrosprays wird eine Agilent-Jetstream-Quelle eingesetzt, die in der Praxis eine gute Reproduzierbarkeit auch bei langen Messreihen gewährleistet.

Das für alle Analysen verwendete Injektionsvolumen betrug 5 µL. Die Trennungen erfolgten auf einer Säule von Macherey-Nagel (Nucleodur PFP, 250 x 2 mm, 5 µm) mit einer Flussrate von 0,2 mL/min im Gradientenmodus (Eluat A: 0,1 % Ameisensäure, Eluat B: Acetonitril). Die Säule war auf 50 °C temperiert. Die Systemsteuerung, einschließlich Probenvorbereitung, LC/MS-Analyse und Datenbearbeitung, erfolgte Software-gestützt vermittels der GERSTEL-MAESTRO-Software, die angebunden an die Mass-Hunter-Software von Agilent Technologies ist. Von den getesteten Festphasen habe sich bezüglich der Wiederfindung insbesondere die C18 Hydra Kartusche der Firma Macherey-Nagel als geeignet erwiesen, sagt Franziska Chmelka. Verwendet wurden 3-mL-Kartuschen mit 500 mg Sorbens.



© iStock / AlexRaths

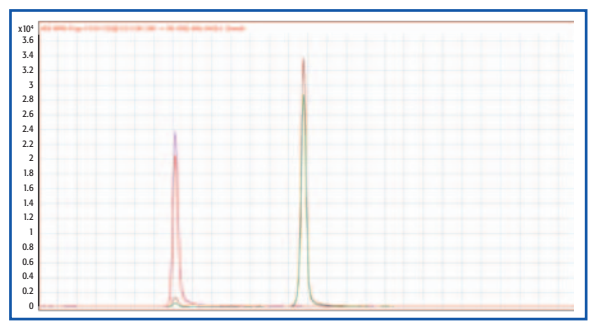
### Exzellente Resultate

„Malachitgrün (MG) und sein Metabolit Leukomalachitgrün (LMG) lassen sich mittels Elektrosprayionisierung

(ESI) im Positiv-Ionen-Modus leicht ionisieren“, schildert Franziska Chmelka. Im Gegensatz zu MG bilde LMG ein doppelt geladenes Ion ( $m/z$  166) zusätzlich zum einfach geladenen molekularen Ion  $[M+H]^+$ , wie die Lebensmitteltechnologin und Applikationsexpertin sagt. Während der Fragmentierung im Triple-Quad (QQQ) bilde das MG-Vorläufer-Ion die Produkte  $m/z$  208 und  $m/z$  165, während der doppelt geladene LMG-Vorläufer in zwei Fragmente zerfalle, die nur noch einfach geladen sind ( $m/z$  196 und  $m/z$  112). Die Übergänge ließen sich nutzen, um LMG und MG äußerst sensitiv zu bestimmen.

Franziska Chmelka fasst ihre Bestimmung von Malachitgrün und Leukomalachitgrün wie folgt zusammen: „Unter Verwendung beider Übergänge ließen sich Bestimmungsgrenzen von 0,1 µg/kg für MG und 0,01 µg/kg für LMG verwirklichen. Die automatisierte SPE in direkter Kopplung mit dem LC/MS-System garantiert hohe Wiederfindung zwischen 80 und 90 Prozent und eine ausgezeichnete Reproduzierbarkeit der Probenvorbereitungsschritte und der gesamten Analyse. Zudem erfordert die automatisierte Probenvorbereitung nur etwa 50 Prozent der Zeit, die für die manuelle Vorgehensweise zu veranschlagen gewesen wäre.“

Auf den Punkt gebracht: Das oben beschriebene automatisierte MPS-(SPE)-LC/QQQ-MS-System ermöglicht es laut der Experten der TeLA GmbH, die Probe automatisiert aufzureinigen und den resultierenden Extrakt direkt zu analysieren. Die Methode ließe sich leicht den individuellen Erfordernissen entsprechend per Mausklick aus einem übersichtlichen Menü zusammenstellen. Aufgrund ihrer besseren Praxistauglichkeit habe man eine konventionelle Chromatographie statt eines UHPLC-Verfahrens vorgezogen. Dank der Aufreinigung hätten sich störende Matrixbestandteile gut aus dem Extrakt entfernen lassen, was zu einer erheblich besseren MS-Response und niedrigeren Detektionslimits geführt habe. Ihre Methode, sagt Franziska Chmelka, sei robust und stabil (RSDs 3,4 – 5,3 %) und garantiere eine gute Wiederfindung (81,0 – 92,1 %).



Chromatogramm von Malachitgrün und Leukomalachitgrün.

