
**Charakterisierung der Wiederholbarkeit, Vergleichbarkeit
und analytischen Sicherheit des neu entwickelten Referenzverfahrens zum Nachweis von spezifiziertem Risikomaterial (SRM) in Fleischerzeugnissen / Tiermehlen durch
Ringtests**

**Zentrum für Veterinary Public Health
Institut für Lebensmittelhygiene
und
Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen
Veterinärmedizinische Fakultät
Universität Leipzig
Leipzig, 22.09.2008**

**Schlussbericht zum Forschungsvorhaben
05HS050**

**Bundesministerium für Verbraucherschutz,
Ernährung und Landwirtschaft**

Charakterisierung der Wiederholbarkeit, Vergleichbarkeit und analytischen Sicherheit des neu entwickelten Referenzverfahrens zum Nachweis von spezifiziertem Risikomaterial (SRM) in Fleischzeugnissen / Tiermehlen durch Ringtests

Kurztitel: Validierung des SRM-Referenzverfahrens durch Ringtests

Zuwendungsempfänger/

Ausführende Stellen:

**Universität Leipzig, Veterinärmedizinische Fakultät
Zentrum für Veterinary Public Health
Institut für Lebensmittelhygiene
An den Tierkliniken 1
04301 Leipzig
Prof. Dr. Ernst Lücker, Projektleiter
Tel.: 0341-97-38222, Fax: -38249**

**Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen
An den Tierkliniken 1
04103 Leipzig
Prof. Dr. Uwe Truyen
Tel.: 0341-97-38150, Fax: -38198**

**Forschungsprojekt Nr. 514-33.24/05HS050
Laufzeit: 01.01.2007 – 30.09.2008
Berichtszeitraum: 01.01.2007 – 30.09.2008**

Mitarbeiter und Autoren

Dr. med. vet. Christian Krex (Projektverantwortlicher)

Dipl. chem. Franziska Hartmann (wissenschaftliche Mitarbeiterin)

Tierärztin Maria Grießbach (wissenschaftliche Mitarbeiterin)

Dr. Wolfgang Biedermann (wissenschaftlicher Mitarbeiter)

Professor Dr. Uwe Truyen (Antragsteller, Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen)

Professor Dr. Ernst Lücker (Projektleiter und Antragsteller, Lebensmittelhygiene)

Danksagung

Für die wertvolle wissenschaftliche Assistenz bedanken wir uns bei Frau Lia Kieker (Probenvorbereitung), Frau Dana Rüter (Probenvorbereitung) und Herrn Heiko Wellner (ELISA).

Inhaltsverzeichnis

1 Ziele und Aufgabenstellung des Projekts	1
2 Planung und Ablauf des Projekts	3
2.1 Standardmaterialien.....	3
2.1.1 Herstellung	3
2.1.2 Validierung	4
2.2 Ringtests.....	5
2.3 ZNS-Datenbank	6
2.4 Meilensteine.....	6
3 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde	8
3.1 Erfahrungen aus dem Vorprojekt (03HS011)	8
3.2 Standard Operating Procedure (SOP) zur Bestimmung von ZNS in Fleischerzeugnissen und Tiermehlen.....	9
3.2.1 Chemikalien	9
3.2.2 Probenvorbereitung.....	11
3.2.3 Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS)	13
3.2.4 Auswertung	15
4 Ergebnisse	23
4.1 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse.....	23
4.1.1 Identifikation geeigneter Laboratorien, Verbreitung der Wahrnehmung des Verfahrens (Meilenstein 1).....	23
4.1.2 Vorversuch zu den eigentlichen Ringtests - Vorbereitung der Laboratorien (Meilenstein 2)	27
4.1.3 Optimierung und Anpassung der SOP an Praxisbedingungen (Meilenstein 3).....	31
4.1.4 Erste Validierung und Charakterisierung des Verfahrens auf qualitativer Basis (Ringtest 1, Meilenstein 4)	49
4.1.5 Zweite Validierung und Charakterisierung des Verfahrens auf quantitativer Basis (Ringtest 2).....	76
4.1.6 Validierung der Homogenität der Verteilung von ZNS in den Standardmaterialien als Beitrag zur Absicherung der Ergebnisse der Ringtests (Meilenstein 5)	93

4.1.7 Optimierung der Grundlage zur Identifizierung von ZNS-Spezies, -Alter und Quantifizierung (Meilenstein 6)	100
4.1.7.1 Quantifizierte Fettsäuregehalte im ZNS von Schwein, Schaf, Ziege und Geflügel	100
4.1.7.2 Optimierung der Differenzierung des ZNS der Tierarten Rind, Schaf, Schwein und Geflügel	103
4.1.7.3 Optimierung der Altersbestimmung des ZNS	106
4.2 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse	116
5 Zusammenfassung	118
6 Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen	122
6.1 Geplante Ziele	122
6.2 Erreichte Ziele	124
6.3 Vergleich der geplanten und erreichten Ziele, weitergehende Fragestellungen	125
7 Literaturverzeichnis	126
A Anhang	128
A.1 Zusammenstellung der Abbildungen des Vorversuchs	129
A.2 Zusammenstellung der Tabellen und Abbildungen des ersten Ringtests	135
A.3 Zusammenstellung der Tabellen und Abbildungen des zweiten Ringtests	148
A.4 Nachweis von spezifiziertem Risikomaterial in Fleischerzeugnissen und Tiermehlen - Methodenbeschreibung	162
A.4.1 Anwendungsbereich	162
A.4.2 Prinzip	162
A.4.3 Chemikalien und Geräte	162
A.4.4 Kalibration	164
A.4.5 Probenaufarbeitung	165
A.4.6 GC-MS-Analyse	169
A.4.7 Auswertung	171
A.5 Publikationen im Berichtszeitraum	174

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Balkenplan zum Projektangebot „Validierung des SRM-Referenzverfahrens durch Ringtests“	7
Tabelle 2: Detektionsparameter der FAME im SIM-Modus	15
Tabelle 3: Parameter langkettiger FAME zur Integration in SCAN-Modus.	17
Tabelle 4: C24:1 ω 9c / C24:1 ω 7c im Hirn von Rind, Schaf und Schwein	18
Tabelle 5: C24:1 ω 9c-OH / C24:1 ω 7c-OH im Hirn von Rind, Schaf und Schwein.....	20
Tabelle 6: Parameter für die Zuordnung von Spezies und Alter bei ZNS-positiven Proben	22
Tabelle 7: Teilnehmerliste	24
Tabelle 8: Übersicht der Ergebnismeldungen, Gesamter Projektzeitraum.....	27
Tabelle 9: An die Teilnehmer des Vorversuchs gesendetes Material	28
Tabelle 10: Klassifizierung der ZNS positiven und negativen Proben im Vorversuch	30
Tabelle 11: Klassifizierung der Tierarten im Vorversuch.....	31
Tabelle 12: Grenzwerte der Qualitätsregelkarte (mit Aceton in der SPE) und Messwerte (ohne Aceton in der SPE) der quantifizierten Fettsäuren (C24:0, C24:0-OH, C24:1 ω 9 und C24:1 ω 7).....	32
Tabelle 13: Probenplan des ersten Ringtests	50
Tabelle 14: Formular zur Ergebnismeldung	51
Tabelle 15: Differenzierung der Primärproben zwischen ZNS positiv/negativ (Cut-Off 0,2% ZNS) (n=14 Laboratorien).....	52
Tabelle 16: Differenzierung der Sekundärproben zwischen ZNS positiv/negativ (Cut-Off 0,2% ZNS) (n=6 Laboratorien).....	53
Tabelle 17: Differenzierung der Primärproben zwischen Wiederkäuer (WDK) und Nicht-Wiederkäuer (kein WDK) (n=14 Laboratorien)	54
Tabelle 18: Differenzierung der Sekundärproben zwischen Wiederkäuer (WDK) und Nicht-Wiederkäuer (kein WDK) (n=6 Laboratorien)	56
Tabelle 19: Tierartdifferenzierung der Tierarten Rind, Schaf, Geflügel und Schwein in den Primärproben (n=14 Laboratorien)	57
Tabelle 20: Tierartdifferenzierung der Tierarten Rind, Schaf, Geflügel und Schwein in den Sekundärproben (n=6 Laboratorien)	58
Tabelle 21: Kontingenztafel zur Tierartdifferenzierung der Primärproben aller Teilnehmer (n=14).....	59

Tabelle 22: Kontingenztabelle zur Tierartdifferenzierung der Sekundärproben, Ergebnisse der freiwillig teilnehmenden Laboraorien Nr. 1, 5, 10, 14, 17, 18 (n=6).....	59
Tabelle 23: Bestimmung des Tieralters in Monaten der Tierart Rind in den Primärproben (n=14 Laboratorien).....	60
Tabelle 24: Bestimmung des Tieralters im Monaten der Tierart Rind in den Sekundärproben (n=6 Laboratorien).....	62
Tabelle 25: Parameter zur Bestimmung des Tieralters beim Schaf	63
Tabelle 26: Bestimmung der Alterskategorie der Tierart Schaf (größer/kleiner 12 Monate) in den Primärproben (n=14 Laboratorien).....	64
Tabelle 27: Bestimmung der Alterskategorie der Tierart Schaf (größer/kleiner 12 Monate) in den Sekundärproben (n=6 Laboratorien).....	65
Tabelle 28: Differenzierung der Proben hinsichtlich des SRM-Status in den Primärproben (n=14 Laboratorien).....	66
Tabelle 29: Differenzierung der Proben hinsichtlich des SRM-Status in den Sekundärproben (n=6 Laboratorien).....	67
Tabelle 30: Kontingenztabelle zur SRM / non-SRM Differenzierung der Primärproben aller Teilnehmer (n=14).....	68
Tabelle 31: Kontingenztabelle zur SRM / non-SRM Differenzierung der Sekundärproben, Ergebnisse der freiwillig teilnehmenden Laboraorien Nr. 1, 5, 10, 14, 17, 18 (n=6).....	68
Tabelle 32: Festlegung der analysierten Mekomalsniveaus nach DIN ISO 5725-2:2002	70
Tabelle 33: Statistische Kenngrößen für die Ermittlung des ZNS-Gehaltes in Prozent (Merkmal 25-32) und des Tieralters in Monaten (Merkmal 33-34) beim Rind basierend auf Tabelle 70.....	73
Tabelle 34: Probenplan des zweiten Ringtests	77
Tabelle 35: Differenzierung der Proben im zweiten Ringtest zwischen ZNS positiv/negativ (Cut-Off 0,2% ZNS) (n=13 Laboratorien)	78
Tabelle 36: Differenzierung der Proben des zweiten Ringtests zwischen Wiederkäuer (WDK) und Nicht-Wiederkäuer (kein WDK) (n=13 Laboratorien).....	79
Tabelle 37: Tierartdifferenzierung der Tierarten Rind, Schaf und Schwein in den Proben des zweiten Ringtests (n=13 Laboratorien).....	80
Tabelle 38: Kontingenztabelle zur Tierartdiffenenzierung der Proben aller Teilnehmer am zweiten Ringtest (n=13)	81

Tabelle 39: Bestimmung des Tieralters in Monaten der Tierart Rind, zweiter Ringtest (n=13 Laboratorien)	82
Tabelle 40: Bestimmung der Alterskategorie der Tierart Schaf (größer/kleiner 12 Monate), zweiter Ringtest (n=13 Laboratorien).....	83
Tabelle 41: Differenzierung der Proben hinsichtlich des SRM-Status, zweiter Ringtest (n=13 Laboratorien)	84
Tabelle 42: Kontingenztabelle zur SRM / non-SRM Differenzierung Proben im zweiten Ringtest (n=13 Teilnehmer)	85
Tabelle 43: Kontingenztabelle zur SRM / non-SRM Differenzierung Proben im zweiten Ringtest unter Ausschluss von Teilnehmer 3 (n=12 Teilnehmer).....	85
Tabelle 44: Festlegung der analysierten Merkmalsniveaus für den zweiten Ringtest nach DIN ISO 5725-2:2002	86
Tabelle 45: Statistische Auswertung der Merkmale 31-40 (ZNS-Gehalt) des zweiten Ringtests nach DIN ISO 5725-2:2002	92
Tabelle 46: Hierarchien für die mehrfaktorielle Varianzanalyse zur GFAP-Verteilungsuntersuchung	95
Tabelle 47: Ergebnisse der Verteilungsuntersuchung mit dem GFAP-ELISA.....	99
Tabelle 48: Gehalte der FAME C24:0, C24:1 ω 9 und C24:1 ω 7 sowie C24:0-OH im Gehirn von Schweinen der Altersklassen 10 Tage, 2 Monate und 5 Monate.	100
Tabelle 49: Gehalte der FAME C24:0, C24:1 ω 9 und C24:1 ω 7 sowie C24:0-OH im Gehirn von Enten (9 Monate, n=9), Gänsen (9 Monate), Hühnern (13 und 21 Wochen), Puten (16 und 21 Wochen).....	101
Tabelle 50: Gehalte der FAME C24:0, C24:1 ω 9 und C24:1 ω 7 sowie C24:0-OH im Gehirn der Ziege.	102
Tabelle 51: Statistische Kenngrößen des FS-Verhältnisses C24:1 ω 9-OH/C24:1 ω 7-OH für die Tierarten Rind (n=24), Schaf (n=14), Ziege (n=6);Schwein (n=40), Geflügel (n=54).....	104
Tabelle 52: Statistische Kenngrößen des FS-Verhältnisses C24:1 ω 9/C24:1 ω 7 für die Tierarten Rind (n=24), Schaf (n=14), Ziege (n=6);Schwein (n=40), Geflügel (n=54).....	104
Tabelle 53: Statistische Kenngrößen des FS-Verhältnisses (C24:1 ω 9/C24:1 ω 7)/(C24:1 ω 9-OH/C24:1 ω 7-OH) für die Tierarten Rind (n=24), Schaf (n=14), Ziege (n=6);Schwein (n=40), Geflügel (n=54).....	104

Tabelle 54: Mittlere Verhältniswerte und Schwankungsbreiten des FS-Verhältnisses C24:1 ω 9-OH/C25:0-OH für die Tierarten Rind (n=24), Schaf (n=14), Ziege (n=6);Schwein (n=40), Geflügel (n=54).....	106
Tabelle 55: Bezeichnung der 66 Verhältnisse.....	109
Tabelle 56: Funktionen der Verhältnisse C24:0-OH/C25:0-OH (V35) und C24:1 ω -7-OH/C25:0-OH (V42) für die Altersschätzung beim Rind.....	109
Tabelle 57: Vergleich des auf den Verhältnissen V35 und V42 berechneten Alters sowie der jeweiligen Ist-/Sollwertdifferenz von Ringtestproben mit Zusatz von Rinder-ZNS .	111
Tabelle 58: Proben vom ZNS Schaf für die Berechnung des Korrelationskoeffizienten und der Funktion für die Altersvorhersage.....	112
Tabelle 59: Korrelationskoeffizienten für die Stärke des Zusammenhangs zwischen dem Alter der Schafe (n=11) und der analysierten Fettsäuren (n=12).	113
Tabelle 60: Funktionen für die Altersberechnung der Fettsäureverhältnisse, die einen Korrelationskoeffizienten >0,9 bei der Tierart Schaf aufweisen.....	113
Tabelle 61: Vergleich des auf den Verhältnissen V39, V42, V45,V61 und V62 berechneten Alters sowie der jeweiligen Ist-/Sollwertdifferenz von Ringtestproben mit Zusatz von Schaf-ZNS	114
Tabelle 62: Festlegung der analysierten Merkmalsniveaus für den ersten Ringtest nach DIN ISO 5725-2:2002	138
Tabelle 63: Ursprungsdaten der Primärproben des ersten Ringtests für das Verhältnis V1 (C24:1 ω 9 / C24:1 ω 7) nach DIN ISO 5725	138
Tabelle 64: Ursprungsdaten der Primärproben des ersten Ringtests für das Verhältnis V2 (C24:1 ω 9-OH / C24:1 ω 7-OH) nach DIN ISO 5725	139
Tabelle 65: Ursprungsdaten der Primärproben des ersten Ringtests für das Verhältnis V3 (C24:1 ω 9-OH / C25:0-OH) nach DIN ISO 5725.....	140
Tabelle 66: Ursprungsdaten der Primärproben des ersten Ringtests für den von den Versuchsteilnehmern ermittelten ZNS-Gehalt in Prozent (Merkmal 25-32) und das Tialter in Monaten (Merkmal 33-34) beim Rind nach DIN ISO 5725.....	141
Tabelle 67: Arithmetische Mittelwerte des Verhältnisses V1 (C24:1 ω 9 / C24:1 ω 7) aus Tabelle 63.....	142

Tabelle 68: Arithmetische Mittelwerte des Verhältnisses V2 (C24:1 ω 9-OH / C24:1 ω 7-OH) aus Tabelle 64	142
Tabelle 69: Arithmetische Mittelwerte des Verhältnisses V3 (C24:1 ω 9-OH / C25:0-OH) aus Tabelle 65	143
Tabelle 70: Arithmetische Mittelwerte des ermittelten ZNS-Gehaltes (Merkmal 25-32) und des Tialters in Monaten (Merkmal 33,34) der Spezies Rind aus Tabelle 66	143
Tabelle 71: Wiederholstandardabweichungen des Verhältnisses V1 (C24:1 ω 9 / C24:1 ω 7) aus Tabelle 63	144
Tabelle 72: Wiederholstandardabweichungen des Verhältnisses V2 (C24:1 ω 9-OH / C24:1 ω 7-OH) aus Tabelle 64	144
Tabelle 73: Wiederholstandardabweichungen des Verhältnisses V3 (C24:1 ω 9-OH / C25:0-OH) aus Tabelle 65	145
Tabelle 74: Wiederholstandardabweichungen des ermittelten ZNS-Gehaltes (Merkmal 25-32) und des Tialters in Monaten (Merkmal 33,34) der Spezies Rind aus Tabelle 66	145
Tabelle 75: Festlegung der analysierten Mekkalsniveaus für den zweiten Ringtest nach DIN ISO 5725-2:2002	151
Tabelle 76: Ursprungsdaten der Primärproben des zweiten Ringtests für das Verhältnis V1 (C24:1 ω 9 / C24:1 ω 7) nach DIN ISO 5725	151
Tabelle 77: Ursprungsdaten der Primärproben des zweiten Ringtests für das Verhältnis V2 (C24:1 ω 9-OH / C24:1 ω 7-OH) nach DIN ISO 5725	152
Tabelle 78: Ursprungsdaten der Primärproben des zweiten Ringtests für das Verhältnis V3 (C24:1 ω 9-OH / C25:0-OH) nach DIN ISO 5725	153
Tabelle 79: Ursprungsdaten der Primärproben des zweiten Ringtests für den von den Versuchsteilnehmern ermittelten ZNS-Gehalt in Prozent (Merkmal 31-40) und das Tialter in Monaten (Merkmal 41-44) beim Rind nach DIN ISO 5725	154
Tabelle 80: Arithmetische Mittelwerte des Verhältnisses V1 (C24:1 ω 9 / C24:1 ω 7) aus Tabelle 76	155
Tabelle 81: Arithmetische Mittelwerte des Verhältnisses V2 (C24:1 ω 9-OH / C24:1 ω 7-OH) aus Tabelle 77	155
Tabelle 82: Arithmetische Mittelwerte des Verhältnisses V3 (C24:1 ω 9-OH / C25:0-OH) aus Tabelle 78	156
Tabelle 83: Arithmetische Mittelwerte des ermittelten ZNS-Gehaltes (Merkmal 31-40) und des Tialters in Monaten (Merkmal 41-44) der Spezies Rind aus Tabelle 79	156

Tabelle 84: Wiederholstandardabweichungen des Verhältnisses V1 (C24:1 ω 9 / C24:1 ω 7) aus Tabelle 76.....	157
Tabelle 85: Wiederholstandardabweichungen des Verhältnisses V2 (C24:1 ω 9-OH / C24:1 ω 7-OH) aus Tabelle 77	157
Tabelle 86: Wiederholstandardabweichungen des Verhältnisses V3 (C24:1 ω 9-OH / C25:0-OH) aus Tabelle 78.....	158
Tabelle 87: Wiederholstandardabweichungen des ermittelten ZNS-Gehaltes (Merkmal 31-40) und des Tialters in Monaten (Merkmal 41-44) der Spezies Rind aus Tabelle 79	158
Tabelle 88: Retentionszeiten und SIM-Massen der Fettsäuremethylester (* IS)	170
Tabelle 89: Parameter zur Bestimmung des Alters der Tierart Schaf	173
Tabelle 90: Beispiel für Grenzwerte des ZNS-Gehaltes für die Probe RV-BW 1	173

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ausschnitt aus dem SIM-Chromatogramm der FAME C24:1.....	18
Abbildung 2: C24:1 ω 9c/ C24:1 ω 7c im Hirn von Rind, Schaf und Schwein.....	19
Abbildung 3: C24:1 ω 9c-OH / C24:1 ω 7c-OH im Hirn von Rind, Schaf und Schwein	21
Abbildung 4: Beispieldiagramm der GC/MS Kalibration mit Cerebronsäure als Cerebronsäure-methylester (Vorversuch, Labor 10)	29
Abbildung 5: Beispiel für eine Qualitätsregelkarte der wiederholten Messung der Fläche des Internen Standards.....	30
Abbildung 6: Vergleich der Gehalte an C24:1 ω 9 und C24:0-OH bei Elution mit 3 ml Aceton + 8 ml Methanol und 8 ml Methanol.....	33
Abbildung 7: Qualitätsregelkarten der quantifizierten Fettsäuren (C24:1 ω 9, C24:1 ω 7, C24:0 und C24:0-OH) für die Methanoleinsätze (7-5 ml).....	34
Abbildung 8: Qualitätsregelkarten der quantifizierten Fettsäuren (C24:1 ω 9, C24:1 ω 7, C24:0 und C24:0-OH) für die Methanoleinsätze (4-1,5 ml).....	35
Abbildung 9: Vergleich der FAME-Gehalte von C24:1 ω 9 und C24:0-OH bei Einsatz von 3 ml Aceton+ 8 ml Methanol und 6 ml Methanol während der Elutionsphase (n=3).....	36
Abbildung 10: Vergleich der SPE-Kartuschen der Firmen Supelco und Phenomenex für die Elution der FAME mit 3 ml Aceton und 8 ml Methanol sowie für die Elution mit 6 ml Methanol.....	37
Abbildung 11: Ermittlung der optimalen Elutionsmenge für die FAME bei Verwendung von SPE-Kartuschen der Herstellers Phenomenex.....	38
Abbildung 12: Vergleich der Gehalte an FAME C24:1 ω 9 und C24:0-OH bei einer Methylierungs-dauer von 16 h bei 60 °C (n=1) und bei 1 h, 1,5 h sowie 2 h bei einer Temperatur von 90 °C (n=4).....	39
Abbildung 13: Vergleich der Gehalt an FAME C24:1 ω 9 und C24:0-OH der klass. Methylierung (60 °C, 16 h) mit Methylierungstemperaturen von 70-90 °C bei einer Methylierungsdauer von 1,5 h (n=3).....	40
Abbildung 14: Darstellung der auf den internen Standard normierten Peakflächen der ω 7- und ω 9-Hydroxytetracosensäure sowie der Cerebronsäure bei Verwendung unterschiedlicher Silylierungsmittel (Zusatz von 1 %TMCS).....	41

Abbildung 15: Darstellung der auf den internen Standard normierten Peakflächen der ω 7- und ω 9-Hydroxytetracosensäure sowie der Cerebronsäure bei Verwendung unterschiedlicher Lösungsmittel während der Silylierung.	43
Abbildung 16: Darstellung der auf den internen Standard normierten Peakflächen der Cerebronsäure und der ω 9-Hydroxytetracosensäure bei verschiedenen Zeiten bei Raumtemperatur (RT), bei einer Zeitdauer von 5 min bei 100 °C sowie unter Anwendung der konventionellen SOP.	44
Abbildung 17: Kalibrationsgerade der Matrixkalibration für die Cerebronsäure C24:0-OH.....	46
Abbildung 18: Fließschema zur Tierartdifferenzierung (WdK: Wiederkäuer).....	48
Abbildung 19: Relative Anzahl der Fehlklassifizierung bei der Differenzierung ZNS-positiver Proben in Wiederkäuer und Nicht-Wiederkäuer (14 Teilnehmer, 10 Proben).	55
Abbildung 20: Beispieldiagramm der Kalibration anhand des ZNS-Gehaltes aus der Brühwurstmatrix.....	69
Abbildung 21: Darstellung der Ursprungsdaten (Tabelle 66) für den ermittelten ZNS-Gehalt (Merkmal 25-32) und Tialter beim Rind (Merkmal 33-34).....	72
Abbildung 22: Statistische Verteilung der Messwerte der am ersten Ringtest beteiligten Laboratorien (n=14) hinsichtlich des ZNS-Gehaltes unterschiedlicher Tierarten und Alter	74
Abbildung 23: Statistische Verteilung der Messwerte der am ersten Ringtest beteiligten Laboratorien (n=14) hinsichtlich des Tialters Rind (5 Monate und 35 Monate).....	75
Abbildung 24: Darstellung der Ursprungsdaten (Tabelle 79) für den ermittelten ZNS-Gehalt (Merkmal 31-40) und Tialter beim Rind (Merkmal 41-44).....	89
Abbildung 25: Statistische Verteilung der Messwerte der am zweiten Ringtest beteiligten Laboratorien (n=13) hinsichtlich des ZNS-Gehaltes unterschiedlicher Tierarten und Alter	90
Abbildung 26: Statistische Verteilung der Messwerte der am zweiten Ringtest beteiligten Laboratorien (n=13) hinsichtlich des Tialters Rind (5 Monate und 35 Monate).....	91
Abbildung 27: Immunhistochemische Darstellung von Neurofilament (NF) in ZNS-Standardmaterial	94

Abbildung 28: Verteilung der Einzelmessungen in der Übersicht (Box-Whisker-Plot) getrennt nach Modell und ZNS-Gehalten	96
Abbildung 29: Ergebnisse der GFAP-Verteilungsuntersuchungen für Standardmaterial (D1..4) mit 1 % ZNS im Makromodell	97
Abbildung 30: Ergebnisse der GFAP-Verteilungsuntersuchungen für Standardmaterial (D1..4) mit 3 % ZNS im Makromodell	98
Abbildung 31: Vergleich der FAME eines Schweinegehirns und eines Putengehirns	101
Abbildung 32: Schematische Darstellung der einstufigen und zweistufigen Tierartdifferenzierung	105
Abbildung 33: Funktion zur Berechnung des Tieralters des ZNS vom Rind basierend auf dem Verhältnis C24:1 ω 9-OH/C24:1 ω 7-OH.	108
Abbildung 34: Funktion für die Berechnung des Tieralters beim Rind basierend auf dem Verhältnis C24:0-OH/C25:0-OH.....	110
Abbildung 35: Funktion für die Berechnung des Tieralters beim Rind basierend auf dem Verhältnis C24:1 ω 7-OH/C25:0-OH.....	110
Abbildung 36: Kalibrationskurven der am Vorversuch beteiligten Laboratorien für die Cerebronsäure	131
Abbildung 37: Qualitätsregelkarten der beteiligten Laboratorien für die wiederholte Messung der Fläche des Internen Standards im Gaschromatogramm (IS: Interner Standard).....	134
Abbildung 38: Kalibrationskurven für die ZNS Bestimmung aus der Brühwurstmatrix (Standards mit 0%, 0,5%, 1%, 3% ZNS, Schwein, 6 Monate) der am ersten Ringtest beteiligten Laboratorien (n=15)	137
Abbildung 39: Aufsteigende Reihung der erzielten Messwerte jedes Teilnehmers für die Merkmalsniveaus 25-32 (ZNS-Gehalt) und 33-34 (Tieralter) entsprechend Tabelle 32.....	147
Abbildung 40: Kalibrationskurven für die ZNS Bestimmung aus der Brühwurstmatrix (Standards mit 0%, 0,5%, 1%, 3% ZNS, Schwein, 6 Monate) der am zweiten Ringtest beteiligten Laboratorien (n=14)	150
Abbildung 41: Aufsteigende Reihung der erzielten Messwerte jedes Teilnehmers für die Merkmalsniveaus 31-40 (ZNS-Gehalt) und 41-44 (Tieralter) entsprechend Tabelle 83.....	161

Abkürzungsverzeichnis

° C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
amu	Atomic mass unit
ANOVA	analysis of variance
bar	statischer Druck (ca. 1 Atmosphäre)
BfEL	Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Landwirtschaft
BMELV	Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
BSA	N,O-Bis(trimethylsilyl)-acetamid
BSE	bovine spongiforme Enzephalopathie
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyltrifluoro)-acetamid
C	Konzentration
Cut-Off	Grenzkonzentration negativ/positiv
D1...D4	Dosen 1 bis 4 mit Brühwurstproben
DMF	Dimethylformamid
E	Einwaage
ECL	equivalent chain length
EG	Europäische Gemeinschaft
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FAME	Fatty acide methyl ester
FS	Fettsäure
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
GC/MS	Gaschromatographie/Massenspektrometrie
Gefl.	Geflügel
GFAP	Gliafaserprotein
h	Stunde
HMDS	Hexamethyldisilazan
ID	Innendurchmesser
K1...K2	ZNS-Gehalt der Proben
kg	Kilogramm
LC	Liquide Chromatography
LFBG	Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetz- buch

m	Gesamtmittelwert
m	Steigung der Geraden
M	Tieralter in Monaten
m/z	Massenzahl
M1	Makromodell
M2	Mikromodell
Max	Maximum
mg	Milligramm
Min	Minimum
min	Minute
ml	Milliliter
MRI	Max-Rubner-Institut
MW	Mittelwert
n.b.	nicht bearbeitet
neg	negative Probe
NF	Neurofilament
non SRM	kein spezifisches Risikomaterial
OD	Optical Density
OEG	obere Eingriffsgrenze
OWG	obere Warngrenze
p	Anzahl der Labore
P1...P4	Proben 1 bis 4
PLS-DA	Partial least square-discriminant analysis
pos	positive Probe
PP	Polypropylen
Q	Peakfläche
Q^2_{cum}	Vorhersagefähigkeit
r	Korrelationskoeffizient
R^2	Bestimmtheitsmaß
rpm	rounds per minute
RSD	relative Standardabweichung
RT	Retention time
RV	Ringversuch
S1...S4	Stellen 1 bis 4
s^2	Varianz

SCAN	Abtastmodus im Massenspektrometer
Schw.	Schwein
sec	Sekunde
SIM	single ion monitoring
SOP	standard operation procedure
SPE	Solid Phase Extraction
s_R	Vergleichsstandardabweichung
s_r	Wiederholstandardabweichung
SRM	spezifiziertes Risikomaterial
STD	Standardabweichung
TIC	Total Ionen Chromatogram
TMCS	Trimethylchlorsilan
TMSIM	Trimethylsilylimidazol
TSE	transmissible spongiforme Enzephalopathie
UEG	untere Eingriffsgrenze
UWG	untere Warngrenze
V 1.....n	Verhältnis der Flächen der FAME im Chromatogramm
v/v	Volumenverhältnis
WdK	Wiederkäuer
WDK	Wiederkäuer
x	Wert auf der Abszisse
y	Wert auf der Ordinate
ZNS	Zentralnervensystem
σ	Standardabweichung
ϵ	Dielektrizitätskonstante
Σ	Gesamtstandardabweichung bzw. Gesamtvarianz

1 Ziele und Aufgabenstellung des Projekts

Im Forschungsprojekt wurde ein potentiell Referenzverfahren für den Nachweis von Geweben des zentralen Nervensystems (ZNS) als spezifiziertes Risikomaterial (SRM) in Fleischerzeugnissen und Tiermehlen in externen Ringtests validiert. Nachfolgend werden diese Gewebe, zur Vereinfachung der Darstellungsweise, einheitlich als SRM bezeichnet.

Dieses Referenzverfahren soll einen Beitrag zur Vermeidung eines humanen TSE-/BSE-Expositionsrisikos über die Nahrungskette leisten sowie zur Kontrolle bestehender gemeinschaftsrechtlicher Kennzeichnungsvorschriften dienen. Die bislang zur Verfügung stehenden Verfahren für den ZNS-Nachweis basieren auf immunochemischen oder molekularbiologischen Prinzipien. Sie erfassen nur Gewebe des zentralen Nervensystems (ZNS) im Allgemeinen, ohne eine Information über Tierart und Alter der Tiere und sind daher nicht geeignet für den Nachweis von SRM im Sinne der rechtlichen Definition (Verordnung 999/2001/EG). Nach dieser Definition werden Angaben von Tierart und Alter des Tieres, von dem das ZNS stammt, benötigt. Zudem sind dabei falsch-negative Ergebnisse oder zumindest fehlerhafte Quantifizierungen infolge technologischer Einwirkungen (Hitze) auf die verwendeten Marker bei der Herstellung von Fleischerzeugnissen und Tiermehlen zu erwarten. Für die Anwendung der herkömmlichen Verfahren in der Lebensmittelüberwachung ergibt sich folglich eine nicht unerhebliche Rechtsunsicherheit.

In dem im Jahre 2005 abgeschlossenen BMELV-Forschungsvorhaben 514-33.34/03HS011 „Entwicklung eines Referenzverfahrens zum Nachweis von spezifiziertem Risikomaterial (SRM) in Fleischerzeugnissen/Tiermehlen“ (Lücker et. al, 2005) wurde ein Verfahren entwickelt und teilweise optimiert, welches mit Hilfe ZNS-typischer Fettsäuren die Erfassung von ZNS-Gewebe in Fleischerzeugnissen und Tiermehlen, die Zuordnung des erfassten ZNS zu einer Tierart sowie die Einordnung in eine Alterskategorie und die abschließende Quantifizierung des erfassten ZNS ermöglicht. Die analysierten Biomarker erwiesen sich als ausgesprochen hitzestabil bis zu Temperaturen, die lebensmittel- und futtermitteltechnologisch nicht erreicht werden. Dieses GC/MS-Verfahren wurde in mehreren internen Ringtests validiert. Darüber hinaus wurde ein externer Blindversuch in Zusammenarbeit mit der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Landwirtschaft (BFEL) Standort Kulmbach durchgeführt. Im Ergebnis dieses Versuches an 72 unbekanntenen Proben wurden sämtliche positiven und negativen Proben erkannt. Alle positiven Proben wurden unter Berücksichtigung des SRM-Status den entsprechenden ZNS-Spezies und ZNS-Alter zugeordnet. Das Ergebnis war im Gegensatz zu den immunochemischen Nachweisverfahren auch bei stark (115°C, 25 min) bis sehr stark (133°C, 40 min) erhitzten Proben eindeutig.

Im Ergebnis des vorliegenden Projekts soll das Verfahren nach externer Validierung in der Lebensmittelüberwachung etabliert werden und durch seine hohe Sensitivität, Spezifität

(Tierart und Alter) und Stabilität zukünftig als Referenzverfahren in der Lebensmittelüberwachung dienen. Damit könnten in Zukunft die Ergebnisse unter Anwendung des kostengünstigeren ZNS-Nachweises mit immunchemischen Schnellverfahren überprüfbar und kontrollierbar gestaltet werden.

Die wissenschaftlichen und technischen Arbeitsziele zur Validierung des GC/MS-Referenzverfahrens für den Nachweis von ZNS in Fleischerzeugnissen und Tiermehlen umfassen:

- die Identifikation geeigneter Laboratorien für die Ringtests;
- die Herstellung von Standardmaterialien mit definierten ZNS-Zusätzen unter kontrollierten Bedingungen und in Anlehnung an herkömmliche Technologien für Fleischerzeugnisse bzw. Futtermittel;
- die Kontrolle der Standardmaterialien auf Homogenität und ZNS-Gehalt;
- den Transfer der Standard Operating Procedure (SOP) des GC/MS-Referenzverfahrens in diese Laboratorien und deren Etablierung;
- die Durchführung eines Vorlaufs zu den eigentlichen Ringtests, um die SOP zu überprüfen, die Laboratorien auf die Durchführung der eigentlichen Ringtests vorzubereiten und die SOP ggf. auf spezifische Besonderheiten und Bedingungen außerhalb des eigenen Labors anzupassen;
- einen ersten Ringtest zur Charakterisierung der spezifischen Parameter des GC/MS-Verfahrens hinsichtlich der Identifikation von ZNS (einschließlich der Überprüfung des Cutoff-Wertes), der Identifikation der Tierart und der Alterskategorie;
- einen zweiten Ringtest zur Validierung des Verfahrens, insbesondere im Hinblick auf die Quantifizierung des ZNS bei positiven Ergebnissen und Festlegung der Wiederholbarkeit und Vergleichbarkeit;
- Die Erweiterung der ZNS-Datenbank zur Optimierung der multifaktoriellen Auswertung analytischer GC/MS-Ergebnisse für die Identifizierung von ZNS-Spezies und -alter sowie zur Quantifizierung von ZNS-Gehalten bei positiven Proben.

2 Planung und Ablauf des Projekts

Im Forschungsvorhaben sollte das GC/MS-Referenzverfahren für den Nachweis von spezifiziertem Risikomaterial (SRM) laborübergreifend einer international anerkannten Verfahrensvalidierung unterworfen werden. Dieser Teil des geplanten Forschungsvorhabens untergliederte sich in mehrere Teilschritte (Ringtests) mit erforderlichen Optimierungsphasen. Für die Ringtests war eine möglichst umfangreiche und flächendeckende Teilnahme von Laboratorien aus der Lebensmittelüberwachung in Deutschland angestrebt. Diese garantiert zum einen die Verlässlichkeit der statistischen Ergebnisse und bietet zudem eine Chance, das GC/MS-Referenzverfahren in der Lebensmittelüberwachung zu etablieren.

Parallel zu der Verfahrensvalidierung und -etablierung sollte die verfügbare ZNS-Datenbank für die Identifizierung von ZNS-Spezies und ZNS-Alter in eigenen Untersuchungen erweitert werden. Weiterhin sollte das Standardmaterial mittels flankierender immunchemischer Verfahren qualitativ charakterisiert und kontrolliert werden.

Die Bearbeitung der Teilprojekte erfolgte teilweise parallel, da eine Zusammenführung der Ergebnisse erst zum Ende des Forschungsvorhabens erforderlich war.

2.1 Standardmaterialien

2.1.1 Herstellung

Für die Durchführung der Ringtests waren Standardmaterialien von Fleischerzeugnissen und/oder Tiermehlen (Standards) exakt definierter Zusammensetzung erforderlich. Ihre Herstellung und Zusammensetzung sollte an dem im vorausgehenden Forschungsvorhaben durchgeführten Blindversuch ausgerichtet werden. Die Herstellungsbedingungen waren exakt zu kontrollieren und zu standardisieren. Insbesondere war eine hinreichende Feinzerkleinerung des Grundmaterials und homogene Verteilung des Analyten unabdingbare Voraussetzung für die Verwertbarkeit der Ergebnisse der Ringtests. ZNS als Analyt bringt dabei infolge seiner eigenen emulgatorischen Eigenschaften günstige Voraussetzungen mit. Feinzerkleinerung und homogene Verteilung von Zutaten werden am besten mit der Brühwursttechnologie erzielt. Die Herstellung musste sich dabei weitgehend an realen Technologien orientieren, um die Interpretation der Ergebnisse der Ringtests für Feldbedingungen zu ermöglichen. Weiterhin waren unterschiedliche Zusätze von ZNS verschiedener Tierarten und Altersgruppen erforderlich. Relevante und im vorangegangenen Forschungsvorhaben (Lücker et. al, 2005) einbezogene Tierarten waren Rind, Schaf und Schwein. Im vorliegenden Projekt sollte ebenfalls ZNS von Geflügel untersucht werden, um Verwechslungen mit dem ZNS anderer Tierarten ausschließen zu können. Die Auswahl der ZNS-Gehalte der Stan-

Standardmaterialien sollte möglichst abgestuft erfolgen. Zusätzlich zu negativen (ZNS-freien) Kontroll-Standards, sollten Proben für die Ringtests bereitgestellt werden, deren ZNS-Gehalte oberhalb des Cutoff-Wertes von 0,2% ZNS bis zu höheren Gehalten mit noch technologischer Relevanz (ca. 3 % ZNS) liegen. Die Standardmaterialien wurden zwei unterschiedlich intensiven Temperaturprogrammen unterworfen, einer starken Erhitzung (110°C, Vollkonserve) und einer Erhitzung unter Tiermehlbedingungen (133 °C, Tropenkonserve).

Für die Herstellung der Standardmaterialien wurde am 10.05.2007 ein Unterauftrag an das Max Rubner Institut Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel (MRI), Standort Kulmbach, erteilt. Hierbei wurde seitens der Bundesforschungsanstalt bereits der gesamte Probenumfang von ca. 1400 Proben für Ringtests 1 und 2 sowie für die Homogenitätsuntersuchungen hergestellt. Die Proben wurden am 15.08.2007 bereitgestellt und bis zum Versand an die ausgewählten Teilnehmer bei 4°C gelagert.

Für die Kalibration und zur Überprüfung der Homogenität wurden Brühwurststandards mit 0%; 0,5%; 1% und 3% ZNS-Zusatz vom Schwein (6 Monate, 110°C) angefertigt.

Die Messproben wurden nach einem festgelegten Probenschlüssel anonymisiert. Zur Analyse standen bereit:

- Proben ohne ZNS-Zusatz (Nullproben)

- Proben mit ZNS-Zusatz vom :
 - Rind 3 Altersklassen, 2 Erhitzungsstufen (Vollkonserve, Tropenkonserve), Konzentrationen 0,5%, 1%, 3%
 - Schwein 2 Altersklassen, 2 Erhitzungsstufen (Vollkonserve, Tropenkonserve), Konzentrationen 0,5%, 1%, 3%
 - Schaf 2 Altersklassen, 2 Erhitzungsstufen (Vollkonserve, Tropenkonserve), Konzentrationen 0,5%, 1%, 3%
 - Geflügel 2 Altersklassen, 2 Erhitzungsstufen (Vollkonserve, Tropenkonserve), Konzentration 2%

Die Grundmatrix entsprach jeweils der Tierart des eingesetzten ZNS.

2.1.2 Validierung

Da die Qualität der Ergebnisse von Ringtests unabdingbar von der Qualität der Standardmaterialien bestimmt wird, waren Validierungsprozesse erforderlich. Hierzu waren zum einen die hinreichende Homogenität der Verteilung des Analyten ZNS und zum anderen die ZNS-Gehalte mit unabhängigen analytischen Verfahren zu kontrollieren. Es sollte die ZNS-Verteilung in den Standardmaterialien quantifizierend mit Hilfe des GFAP-ELISA in Mikro-

analysen und hierarchisch strukturierten Modellen varianzanalytisch erfasst werden. Dieser analytische Ansatz sollte gleichzeitig methodisch von der GC/MS unabhängige Ergebnisse zu den in den Standardmaterialien konventionell erfassbaren ZNS-Gehalten liefern.

Zusätzlich waren für die Überprüfung einer hinreichenden Homogenität des Analyten ZNS immunhistologische Untersuchungen mit dem Marker Neurofilament, Computer-gestützter bildanalytischer Erfassung und varianzanalytischer Auswertungen vorgesehen.

Die geplanten Arbeiten zur Validierung der Standardmaterialien erfolgten beim Auftragnehmer des Forschungsprojektes.

2.2 Ringtests

Für die Ringtests war im Forschungsprojekt ein dreistufiges Vorgehen geplant:

- 1) Vorversuch zur Einarbeitung der Laboratorien in die Methode (Vorlauf zu den Ringtests)
- 2) Erster Ringtest mit vornehmlich qualitativen Merkmalen (Tierart und -alter) und
- 3) Zweiter Ringtest mit vornehmlich quantitativem Charakter (ZNS-Gehalt).

In diesen drei Abschnitten wurde der Schwierigkeitsgrad der analytischen Aufgabenstellung (Kenntnis/Unkenntnis der Größenordnung der zugesetzten ZNS-Gehalte, hohe bzw. niedrige ZNS-Gehalte) sukzessiv angehoben. Damit war im Laufe der Ringtests ein Lern- und Korrekturprozess für die teilnehmenden Laboratorien möglich und erwünscht.

Im Vorlauf erfolgte die Auswahl geeigneter erscheinender Laboratorien auf Grund angefragter und zurückgemeldeter Kriterien hinsichtlich Laborausstattung, Kenntnissen und Erfahrungen in der GC/MS- und der Fettsäureanalytik, analytischer Praxis, Teilnahme an Ringtests zur ZNS-Problematik. Im Vorversuch sollte die Zusammensetzung eines Teils der Standardmaterialien hinsichtlich der Größenordnung der zugesetzten ZNS-Gehalte den teilnehmenden Laboratorien bekannt gegeben werden. Dies sollte dem methodologischen Transfer sowie der Etablierung des im vorhergehenden BMELV-Forschungsvorhaben entwickelten Verfahrens (Lücker et. al, 2005) in den jeweiligen Laboratorien dienen. Gleichzeitig sollten analytische Probleme kommuniziert, Korrekturen vor Ort durchgeführt und gegebenenfalls Modifikationen sowie eine Optimierung der SOP umgesetzt werden. Insgesamt soll ein derartiger Vorlauf mit einem ausrichtenden Ringtest garantieren, dass das eigentliche Validierungsverfahren in den folgenden Ringtests mit höchster Effizienz abläuft und die erarbeiteten Ergebnisse der tatsächlich erreichbaren Qualität entsprechen.

Im folgenden ersten Ringtest mit vornehmlich qualitativem Schwerpunkt wurden vollständig anonymisierte Standardmaterialien an die Teilnehmer versandt.

Es sollten die folgenden Parameter des GC/MS-Verfahrens überprüft werden:

- Differenzierung zwischen ZNS-positiven und ZNS-negativen Proben,
- Identifizierung der ZNS-Spezies (Tierart) bei den ZNS-positiven Proben,
- Identifizierung des Tialters bei der Spezies Rind bzw. der Alterskategorie bei der Spezies Schaf
- Differenzierung zwischen SRM und nicht SRM haltigen Proben

Im abschließenden zweiten Ringtest sollten der quantitative Parameter (ZNS-Gehalt) und zusätzlich die zuvor erwähnten qualitativen Parameter erhoben werden.

2.3 ZNS-Datenbank

Im vorhergehenden Forschungsprojekt war zum einen ZNS von Geflügel nicht in die Untersuchungen eingeschlossen. Zum anderen ergaben sich Probleme bei der Beschaffung von Gehirnen einiger Spezies (insbesondere Schaf und Ziege) und somit eine unvollständige Datenbasis. Folglich ergaben sich Unsicherheiten bei der Identifizierung von Tierart und Alter des ZNS bei diesen Tierarten. Für die erfolgreiche Validierung des GC/MS-Referenzverfahrens war dem zufolge eine entsprechende Erweiterung der bislang erarbeiteten Datenbank von ZNS-typischen Fettsäuren unabdingbar. Hierzu wurden im Forschungsprojekt, parallel zu der geplanten eigentlichen Validierungsstudie, die Fettsäuremuster des ZNS weiterer Tierarten (Geflügel, Schaf, Ziege) verschiedener Alterskategorien mittels GC/MS ermittelt und der Datenbank hinzugefügt.

2.4 Meilensteine

Folgende Meilensteine waren geplant und wurden im Laufe des Forschungsvorhabens erreicht:

1. Die Identifizierung der für die Ringtests und die Validierung des GC/MS-Referenzverfahrens geeigneten Laboratorien. Es wurde dabei eine hinreichende Anzahl von Laboratorien, möglichst 20, mindestens jedoch zehn, für eine sichere statistische Aussage angestrebt (Zeitpunkt: Ende März 2007).
2. Etablierung des GC/MS-Referenzverfahrens zum ZNS-Nachweis in einer größeren Zahl von Laboratorien (Zeitpunkt: Ende Juni 2007).
3. Optimierung und Anpassung der SOP an Praxisbedingungen - soweit erforderlich - jeweils im Anschluss an den Vorversuch und die beiden Ringtests (Zeitpunkt: Ende August 2007, Ende Januar 2008 und Ende Juni 2008).
4. Erster Ringtest mit Validierung und Charakterisierung des Verfahrens auf qualitativer Basis (Tierart und -alter des ZNS) (Zeitpunkt: Ende November 2007).

5. Zweiter Ringtest mit Validierung der ZNS-Gehalte von SRM und der Homogenität der Verteilung von ZNS in den Standardmaterialien als Beitrag zur Absicherung der Ergebnisse der Ringtests (Zeitpunkt: Ende Februar 2008).
6. Erweiterung der ZNS-Datenbank als Grundlage für die Identifizierung von ZNS-Spezies, ZNS-Alter und ZNS-Quantifizierung (Zeitpunkt: Ende Mai 2008).

Eine Übersicht des Projektablaufs gibt der in Tabelle 1 dargestellte Balkenplan.

Tabelle 1: Balkenplan zum Projektangebot „Validierung des SRM-Referenzverfahrens durch Ringtests“

		Inhalt									
		Umfra-ge und Auswahl geeigneter Labo-ratorien	Herstellung von Standardmaterial (Kulmbach)	Homogenitätsprüfung	Vorlauf zur Anpassung SOP und Aus-wahl tatsächlich geeigneter Laboratorien	Rücklauf der Ergebnisse, Auswertung	Rückkopplung und ggf. Anpassung/Korrektur SOP	Ringtest 1: qualitativer ZNS-Nachweis, Identifizierung Tierart und Alter	Ringtest 2: Cutoff, ZNS-Quantifizierung, Tierart und Alter	Erweiterung ZNS-Datenbank, Herstel-lung und Untersuchung interner Stan-dards	Gesamtauswertung
Monat	1	■									
	2	■	■								
	3	■	■	■							
	4			■	■						
	5				■						
	6				■						
	7		■			■					
	8		■	■			■				
	9			■				■			
	10							■			
	11							■			
	12		■			■					
	13		■	■			■				
	14			■					■		
	15								■		
	16								■		
	17					■				■	
	18						■				■

Im Ergebnis dieses Projektes soll auf der Basis der Gesamtauswertung ein in Ringtests validiertes Referenzverfahren für den Nachweis von ZNS als SRM in Fleischerzeugnissen und Tiermehlen zur Verfügung stehen.

3 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

3.1 Erfahrungen aus dem Vorprojekt (03HS011)

Im vorliegenden Forschungsprojekt wird an die eigenen Vorarbeiten zur Entwicklung eines GC/MS-Referenzverfahrens für den tierart- und altersspezifischen Nachweis von ZNS in Fleischerzeugnissen und Tiermehlen (Lücker et. al, 2005) angeknüpft.

Das Verfahren basiert auf der Erfassung und Quantifizierung bestimmter Fettsäuren aus dem ZNS mittels Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC-MS). Es umfasst die folgende komplexe Analysenstrategie:

1. Identifizierung von ZNS-positiven Proben über die Cerebronsäuregehalte;
2. Identifizierung der Tierart und Klassifizierung des Alters des ZNS anhand der Isomenverhältnisse
 - a) der Tetracosensäure und
 - b) der Hydroxytetracosensäure;
3. Quantifizierung der ZNS-Gehalte über den Cerebronsäuregehalt mit einer tierart- sowie altersspezifischen Kalibration (ZNS-Datenbank).

Für die Identifizierung ZNS-positiver Proben wurden Grenzwerte (Cut-off, 99,9% statistische Sicherheit) bestimmt. Der berechnete Grenzwert liegt für das ZNS adulter Rinder bei 0,2% ZNS in Fleischerzeugnissen. Im externen Blindversuch wurden seinerzeit ab dem erfassbaren ZNS-Gehalt von 0,2% sämtliche der vollständig anonymisiert untersuchten Proben (n=72) richtig klassifiziert. Die unterschiedlichen Erhitzungsstufen (Erhitzungsbedingungen entsprechend Kesselkonserven, Vollkonserven und Tiermehl) hatten einen signifikanten jedoch keinen relevanten Einfluss auf die Fettsäuregehalte. Zudem zeigten die komplexen Lipide, welche die im Verfahren als ZNS-Marker verwendeten Fettsäuren enthalten, eine außerordentlich hohe Hitze- und Lagerungs-Stabilität. Sie überstanden Erhitzungen unter den Bedingungen der Tiermehlherstellung (133 °C, 3 bar, 20 min) und darüber. Damit stand erstmals ein Verfahren zur Verfügung, das auch die Überwachung von Tiermehlen hinsichtlich ZNS erlaubt. Es zeigte sich sogar eine Tendenz zur besseren Erfassbarkeit von ZNS mit zunehmender Erhitzung. Die Zusammensetzung der Rohmaterialien hinsichtlich Tierart und Alter hatte keinen Einfluss auf die Analysenergebnisse. Die Quantifizierung erfasste den ZNS-Gehalt im Bereich von 0,5 bis 3% ZNS mit für die Einschätzung des humanen Expositionsrisikos nur unerheblichen Abweichungen.

Die Erfassung von ZNS-positiven Proben, Identifizierung von Tierart und Alter des ZNS sowie die Quantifizierung des ZNS-Gehaltes wurde im Forschungsprojekt 514-33.34/03HS011 weiterhin in mehreren internen Blindversuchen überprüft und gesichert. Mit dem entwickelten

analytischen GC/MS-Verfahren konnte - erstmals in der Geschichte der Lebensmittelüberwachung - eine Aussage über das Alter des erfassten ZNS-Gewebes getroffen werden. Bei außergewöhnlicher Stabilität der Markersubstanzen und hinreichender Reproduzierbarkeit konnte seinerzeit das Ziel des Forschungsprojektes, die Entwicklung eines Referenzverfahrens für den Nachweis von ZNS in Fleischerzeugnissen und Tiermehlen, als erreicht angesehen werden.

Eine entsprechende Arbeitsvorschrift (standard operation procedure, SOP) wurde erarbeitet und diente als Ausgangspunkt für das derzeitige Projekt.

3.2 Standard Operating Procedure (SOP) zur Bestimmung von ZNS in Fleischerzeugnissen und Tiermehlen

Die im Folgenden aufgeführte SOP diente als Ausgangspunkt für das vorliegende Projekt. Sie wurde im Verlauf des im Jahre 2005 abgeschlossenen BMELV-Forschungsvorhabens 514-33.34/03 HS 011 entwickelt und war die Grundlage für den Vorversuch zu den eigentlichen Ringversuchen.

Der Meilenstein 3 des laufenden Projektes beinhaltet die Korrektur und Anpassung der SOP unter Beachtung von konstruktiver Kritik und Vorschlägen der Ringtestteilnehmer sowie eigener Erfahrungen. Die Optimierung der Methode sowie eine grundsätzliche Änderung bei der Auswertung der Ergebnisse sollten zu einem praxisangepassten Verfahren führen. Diese überarbeitete SOP diente als Grundlage für die Durchführung und Auswertung der eigentlichen Ringtests 1 und 2.

Die endgültige SOP hinsichtlich Durchführung der Analyse und Auswertung der Ergebnisse ist im Anhang A.5 zu diesem Bericht beigefügt.

3.2.1 Chemikalien

Fettsäuremethylester-Standards

15 cis-Tetracosensäuremethylester, C24:1 ω 9c	Larodan, Malmö, Schweden
Docosahexaensäuremethylester, C22:6 ω 3,6,9,12,15,18	Larodan, Malmö, Schweden
Tetracosansäuremethylester, C24:0	Larodan, Malmö, Schweden
α -Hydroxy-Tetracosansäuremethylester, C24:0-OH	Larodan, Malmö, Schweden

Interner Standard

Docosansäure, deuteriert, C22:0 2,2-D2	Larodan, Malmö, Schweden
--	--------------------------

Chemikalien des Analysenverfahrens

2-Methylpropanol p.a.	Riedel de Haen, Seelze
Aceton p.a.	Merck, Darmstadt
Helium 6.0 für Gaschromatographie	Dräger, Lübeck
Hexamethyldisilazan (HMDS) p.a.	Merck, Darmstadt
Iso-Octan p.a.	Merck, Darmstadt
Methanol p.a.	Merck, Darmstadt
Methanolische Salzsäure, 3N p.a.	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid p.a.	Merck, Darmstadt
Natriumsulfat, wasserfrei p.a.	Merck, Darmstadt
<i>n</i> -Hexan p.a.	Merck, Darmstadt
Pyridin p.a.	Merck, Darmstadt
Seesand, gewaschen	Merck, Darmstadt
Toluol p.a.	Merck, Darmstadt
Trimethylchlorsilan (TMCS) p.a.	Merck, Darmstadt

Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte

Analysenwaage ST 200 (200 g ± 0,1 mg)	Ströhlein, Kaarst
Einmalspritzen, 5 ml, ohne Kolben, mit Adapter Gaschromatograph 6890N mit Quadrupol- Massenspektrometer 5973N	Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA
Glaskolbenpipette, graduiert, 2 ml, 5 ml	
Hamiltonspritzen 10µl, 50µl Kammförmige Ausblasvorrichtung zum Abdampfen des Lösungsmittels im Stickstoffstrom (eigene Kon- struktion)	Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA
Kapillarsäule HP-5MS, 60 m x 0,32 mm x 0,25 µm	
Mörser (Achat) 12 cm Ø, mit Pistill	
Pasteurpipetten, Glas, 2 ml	
Pasteurpipetten, PE-LD 1 ml, 3 ml, graduiert Rundscheiben aus Aluminiumfolie, 80 mm Durchmes- ser	
SPE Kartuschenadapter	
Spitzkolben, 25 ml, NS 14,5	

Supelclean LC-Si SPE Tubes 3 ml, 500 mg Silicagel	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Supelco Visiprep™ DL	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trockenschrank, heiz- und regelbar	Binder, Tuttlingen
Überkopfschüttler Reax 2	Heidolph, Kehlheim
Vakuumrotationsverdampfer LABOROTA 4000	Heidolph, Kehlheim
Vials 1,5 ml, 10 ml	
Vortexer REAX top	Heidolph, Kehlheim
Wasserbad, heiz- und regelbar	Heidolph, Kehlheim
Zentrifuge Universal 32	Hettich, Tuttlingen
Zentrifugengläser, Glas, 11 mm Ø, 7 ml, mit Schraubdeckel	
Zentrifugenröhrchen PP, 15 ml, mit Schraubdeckel	
Zentrifugenröhrchen, PP, 15 ml ohne Deckel	

3.2.2 Probenvorbereitung

3.2.2.1 Probeneinwaage

Einwaage von ZNS-Gewebe

ZNS-Gewebe wurde in einer Menge von 20 mg \pm 1 mg eingewogen. Die Einwaage von ZNS-Gewebe erfolgte zusammen mit Na₂SO₄ und Seesand. Zuerst wurden 450 – 500 mg des homogenen ZNS eingewogen und ca. 4 g Na₂SO₄ zugewogen. Mit Seesand wurde auf die 10-fache Menge der ZNS-Einwaage aufgefüllt. Die gesamte Menge wurde in einen Mörser überführt und mit dem Pistill zerkleinert. Anschließend wurden 200 mg \pm 10 mg des homogenen Gemisches in ein Zentrifugenröhrchen eingewogen. Die Einwaage an ZNS betrug damit 10 % der Gemischeinwaage, also etwa 20 mg.

Einwaage von Muskulatur-, Organ- und Fleischerzeugnisproben

Muskulatur, Organe und Fleischerzeugnisse wurden analog in einer Menge von 300 - 400 mg eingewogen und die Einwaage notiert. Zuerst wurden 700 – 800 mg der Muskulatur, den Organen bzw. Fleischerzeugnissen eingewogen und ca. 5 g Na₂SO₄ zugewogen. Mit Seesand wurde auf die 10-fache Menge der Proben-Einwaage aufgefüllt. Die gesamte Menge wurde in einen Mörser überführt und mit dem Pistill zerkleinert. Anschließend wurden 3 – 4 g des homogenen Gemisches in ein Zentrifugenröhrchen eingewogen. Die Einwaage an

Muskulatur, Organen bzw. Fleischerzeugnissen betrug damit 10 % der Gemisch-einwaage, also 300 bis 400 mg.

3.2.2.2 Extraktion der Gesamtlipide

Die Extraktion der Gesamtlipide erfolgte bei Raumtemperatur in Zentrifugenröhrchen mit Methanol und *n*-Hexan (50:50, v/v), wobei zunächst die Probe mit 2,5 ml Methanol benetzt wurde und danach 2,5 ml *n*-Hexan hinzu gegeben wurden. Zur Extraktion wurden die Zentrifugenröhrchen eine Stunde im Überkopfschüttler geschüttelt. Anschließend wurden 3 ml gesättigte NaCl-Lösung hinzu gegeben, 2 x 10 sec gevortext und 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Die obere Phase (erster Rohextrakt) wurde entnommen und in das Vorratsgefäß der Festphasenextraktion pipettiert. Anschließend erfolgte eine zweite Extraktion mit 3 ml *n*-Hexan mit einer Verweildauer von 5 min im Überkopfschüttler. Nach einem weiteren 5-minütigen Zentrifugieren bei 2000 rpm wurde erneut die obere Phase (zweiter Rohextrakt) entnommen und in das Vorratsgefäß der Festphasenextraktion pipettiert.

3.2.2.3 Anreicherung komplexer Lipide mittels Festphasenextraktion

Zur Anreicherung der komplexen Lipide wurde die Festphasenextraktion (solid phase extraction, SPE) verwendet. Dazu wurden Supelclean™ LC-Si SPE Tubes ca. 5 mm hoch mit körnigem Na₂SO₄, wasserfrei, überschichtet und mit 1 ml *n*-Hexan benetzt. Als Vorratsgefäße für den Rohextrakt dienten die Zylinder von 5 ml PP-Spritzen.

Der Rohextrakt wurde in die Vorratsgefäße pipettiert und ohne Vakuum über die Kartuschen gegeben. Nachdem der gesamte Rohextrakt die Kartusche passiert hatte, wurden 5 ml *n*-Hexan/2-Methylpropanol 90:10 (v/v) in die Vorratsgefäße gegeben. Das Eluat wurde verworfen und neue Zentrifugenröhrchen in die Apparatur eingesetzt.

Zunächst wurden 3 ml Aceton und anschließend 8 ml Methanol in die Vorratsgefäße gegeben und langsam durchlaufen gelassen. Durch Anlegen von Vakuum wurden die SPE Tubes trocken gesaugt. Das vereinigte Aceton- und Methanol-Eluat stellte den gereinigten Extrakt der komplexen Lipide dar. Diesem Reinextrakt wurden mittels einer Hamiltonspritze 10 µl des internen Standards C22:0 2,2-D2 in Form des Methylesters (1 mg/ml iso-Octan) zugegeben.

3.2.2.4 Derivatisierung der Fettsäuren

Derivatisierung zu Fettsäuremethylestern (FAME)

Der mit dem internen Standard versetzte Reinextrakt wurde in einen Spitzkolben aus Glas, 25 ml, überführt und im Rotationsverdampfer bis fast zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde erst mit 1 ml Methanol und anschließend mit 3 ml *n*-Hexan unter Verwendung

eines Vortexers ausgespült und in ein kleines, dicht verschließbares Reagenzglas überführt. Die Lösungsmittel wurden anschließend in einem 50 °C heißen Wasserbad unter Stickstoffstrom abgedampft. Die Methylierung der komplex gebundenen Fettsäuren erfolgte nach der Zugabe von 1 ml 3 N methanolischer Salzsäure über Nacht (16 h) im Trockenschrank bei 60 °C. Die Proben mit den veresterten Fettsäuren wurden auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Gewinnung der FAME nach der Methylierung erfolgte durch Zugabe von 2 ml *n*-Hexan sowie 2 ml gesättigter NaCl-Lösung. Die Proben wurden 2 x 10 sec gevortext und 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Die untere Phase aus NaCl-Lösung, Methanol und Salzsäure wurde abgesaugt und verworfen. Es wurden nochmals 2 ml NaCl-Lösung zugegeben, 2 x 10 sec gevortext und 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert, um die Salzsäure vollständig aus der oberen Phase mit den FAME zu entfernen. Die obere Phase wurde nach dem Zentrifugieren mit einer Pasteurpipette entnommen und in ein mit ca. 100 mg körnigem Na₂SO₄, wasserfrei, gefülltes und verschließbares Reagenzglas überführt. Das Lösungsmittel, *n*-Hexan, wurde in einem 50 °C heißen Wasserbad unter Stickstoffstrom abgedampft.

Silylierung der Hydroxyfettsäuren zu Trimethylsilylethern

Zur Silylierung der hydroxylierten Fettsäuren wurden den eingedampften FAME 0,5 ml des Silylierungsreagenzes Pyridin/HMDS/TMCS 10:3:1 (v/v/v) zugegeben, das Reagenzglas verschlossen und 5 min bei Raumtemperatur aufbewahrt. Abschließend wurden 0,5 ml *n*-Hexan zugegeben und die Mischung 10 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Der klare Überstand wurde für die gaschromatographische Untersuchung mittels einer Pasteurpipette entnommen und in ein 1,5 ml Vial gefüllt.

3.2.3 Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS)

Die gaschromatographischen Analysen wurden unter Verwendung des Gaschromatographen 6890N (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) in Verbindung mit einem Quadrupol-Massenspektrometer 5973N (Agilent) durchgeführt.

Gaschromatographische Parameter:

60 m Säule HP-5MS (Polydimethylsiloxan mit 5 % Phenyl 0,32 mm ID, 0,25 µm Filmdicke)

Splitlos Betrieb

Injektortemperatur: 280 °C (Split 1:15 nach 1 min)

Probenmenge: 1 µl

Trägergas: Helium (constant flow 1,5 ml/min, $v = 32$ cm/s)

Temperaturprogramm:

90 °C (1 min)

20 °C/min bis 140 °C

2 °C/min bis 295 °C

4 min isotherm (300°C)

solvent delay: 5 min

Massenspektrometrische Parameter:

EI-Modus, 70 eV

SCAN-Modus (Massenzahl 35 bis 550 amu)

SIM-Modus

Transfer line 280 °C

Ionenquelle 250 °C

Für die Auswertung der Chromatogramme wurde der Computer Vectra P 2074 A (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) mit dem Programm Agilent ChemStation G 1701 CA verwendet.

Die Flächenintegration war leider nicht automatisierbar, sondern musste wegen der oftmals geringen Größe und der unvollständigen Trennung der maßgeblichen Peaks manuell durchgeführt werden.

Im Falle nicht vollständig getrennter, teilweise überlappender Peaks wurde für die Flächenintegration prinzipiell eine Aufteilung durch Fällen des Lots am Minimum zwischen den Peaks erreicht.

SIM-Chromatogramme der FAME

Zur Aufnahme von Chromatogrammen im SIM-Modus (single ion monitoring) wurden für die Detektion der FAME spezifische Massen programmiert. Tabelle 2 zeigt die Detektionsparameter der FAME ZNS-spezifischer Fettsäuren sowie des Internen Standards C22:0 2,2 D2.

Tabelle 2: Detektionsparameter der FAME im SIM-Modus

m/z Massenzahl, RT Retentionzeit, ECL equivalent chain length für die Kapillartrennsäule HP 5 ((5 % Phenyl)-methylpolysiloxan)

FAME	Molmasse	Start	RT [min]	ECL	Ionen [m/z]
C22:6	342	5,0	18,3	21,39	79, 91
C22:0 2,2-	354	18,6	19,0	22,00	76, 145
C24:1 ω 9c	380	21,0	22,0	23,79	348
C24:1 ω 7c	380	21,0	22,1	23,85	348
C24:0	382	22,4	22,4	24,00	74, 143, 339,
C24:0-	470	25,0	26,4	25,84	73, 411, 455

SCAN-Chromatogramme der FAME

Zur Aufnahme der Chromatogramme im SCAN-Modus wurden über den gesamten Zeitraum der Analyse alle Ionen der Massen 35 bis 550 im Massenspektrometer detektiert.

3.2.4 Auswertung

3.2.4.1 Auswertung der SIM-Chromatogramme

Kalibration

Die Kalibration der gaschromatographischen Analyse erfolgte mit Kalibrationslösungen der FAME C22:6, C24:1 ω 9c, C24:0 und C24:0-OH in Konzentrationen, die in Fleischerzeugnissen mit ZNS-Zusatz zu erwarten sind.

Herstellung der Kalibrationslösungen:

Aus den Stammlösungen der FAME C22:6, C24:1 ω 9c, C24:0 und C24:0-OH (1mg/ml Toluol) wurden fünf Kalibrationslösungen in den Konzentrationen 0, 10, 20, 30 und 40 μ g/ml hergestellt. Anschließend wurde den vier FAME-Gemischen und der Leerprobe je 10 μ l interner Standard mittels einer 10 μ l Hamiltonspritze zugegeben. Zur Silylierung des FAME C24:0-OH wurde zu den Gemischen 0,5 ml des Silylierungsreagenz pipettiert. Nach 5 min Reaktionszeit wurden die Lösungen mit *n*-Hexan auf 1 ml aufgefüllt und 10 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Der klare Überstand wurde abschließend in ein Vial überführt und gaschromatographisch analysiert.

Ermittlung der Kalibrationsfunktionen:

Die GC-MS-Analyse der Kalibrationslösungen erfolgte im SIM-Modus. Die Integration der Peakflächen wurde manuell durchgeführt. Für die Erstellung der Kalibrationsgeraden wurden die Quotienten (Q) aus der Fläche des entsprechenden FAME und der Fläche des internen

Standards berechnet. Die graphische Darstellung erfolgte als Punktdiagramm ($x = Q$, $y = g$ FAME) mit Darstellung der Funktionsgleichung ($y = mx$) und dem Korrelationskoeffizienten in der Tabellenkalkulationssoftware EXCEL.

Die Kalibration wurde wöchentlich wiederholt, wobei der Korrelationskoeffizient der Kalibrationsgeraden $> 0,97$ sein sollte.

Kalibrationsfunktionen zur Quantifizierung der FAME

Anhand der Kalibrationsfunktionen für die vier FAME C22:6, C24:1 ω 9c, C24:0 und C24:0-OH und unter Einbeziehung der Probeneinwaage wurde die Konzentration der Fettsäuremethylester nach folgender Formel berechnet:

$$C = m \cdot Q / E$$

C = Konzentration der Fettsäuren als FAME in der Probe [μ g FAME / g Probe]

m = Steigung der Kalibrationsfunktion [μ g FAME / Q]

Q = Peakfläche FAME / Peakfläche interner Standard

E = Einwaage an Probenmaterial [g]

Zur Quantifizierung des ZNS wurde nur die Kalibrationsfunktion der FAME C24:0 verwendet.

3.2.4.2 Auswertung der SCAN-Chromatogramme mittels Ionensextraktion

Für die Auswertung weiterer langkettiger Fettsäuren wurden die SCAN-Chromatogramme der FAME verwendet. Dazu wurde für jeden FAME der spezifische Massenpeak ermittelt, welcher im Massenspektrum des FAME die höchste Intensität aufweist. Tabelle 3 enthält eine Zusammenstellung der untersuchten FAME mit ihren spezifischen Massen (m/z) und den dazu gehörigen ECL-Werten (equivalent chain length - äquivalente Kettenlänge), bezogen auf die Kettenlänge der gesättigten Fettsäuren sowie auf die verwendete Kapillartrennsäule HP 5 ((5 % Phenyl)-methylpolysiloxan).

Tabelle 3: Parameter langkettiger FAME zur Integration in SCAN-Modus.

m/z Massenzahl des intensivsten Peaks im Massenspektrum, ECL equivalent chain length für die Kapillartrennsäule HP 5 ((5 % Phenyl)-methylpolysiloxan).

FAME	C22:0	C23:0	C24:0	C25:0	C26:0		
m/z	354	368	382	396	410		
ECL	22,00	23,00	24,00	25,00	26,00		
FAME	C22:1 ω 9	C22:1 ω 7	C24:1 ω 9	C24:1 ω 7	C26:1 ω 9	C26:1 ω 7	
m/z	320	320	348	348	376	376	
ECL	21,79	21,85	23,79	23,85	25,79	25,86	
FAME	C22:0-OH	C23:0-OH	C24:0-OH	C25:0-OH	C26:0-OH		
m/z	383	397	411	425	439		
ECL	23,86	24,84	25,84	26,83	27,83		
FAME	C22:1 ω 9-OH	C22:1 ω 7-OH	C24:1 ω 9-OH	C24:1 ω 7-OH	C26:1 ω 9-OH	C26:1 ω 7-OH	
m/z	381	381	409	409	437	437	
ECL	23,64	23,73	25,63	25,72	27,64	27,71	

Die Ermittlung der Peakflächen der FAME erfolgte durch Ionenextraktion mit den spezifischen Massen (m/z) aus dem Totalionenchromatogramm (TIC) zur entsprechenden Retentionszeit. Der identifizierte Peak wurde integriert und die Peakfläche berechnet. So wurde für jeden FAME eine Peakfläche proportional zur vorhandenen Menge erhalten.

3.2.4.3 Identifizierung von Tierart und Alter (ZNS-Spezies, ZNS-Alter)

Bestimmung der Tierart

Zur Differenzierung der Tierarten Rind, Schaf und Schwein wurden sowohl die SIM-Chromatogramme als auch die SCAN-Chromatogramme ausgewertet. Aus den SIM-Chromatogrammen wurde ausschließlich das Verhältnis der Fettsäuren C24:1 ω 9c / C24:1 ω 7c für die Tierartdifferenzierung herangezogen. Als zweites Kriterium für die Bestimmung der Tierart wurde aus den SCAN-Chromatogrammen das Fettsäureverhältnis C24:1 ω 9c-OH / C24:1 ω 7c-OH ermittelt.

SIM-Analysen

Die Chromatogramme der FAME C24:1 ω 9c (ω 9c-Tetracosensäure, Nervensäure) und C24:1 ω 7c (ω 7c-Tetracosensäure) der Tierarten Rind, Schaf und Schwein zeigen tierartspezifische Unterschiede in der Signalhöhe der FAME (Abbildung 1).

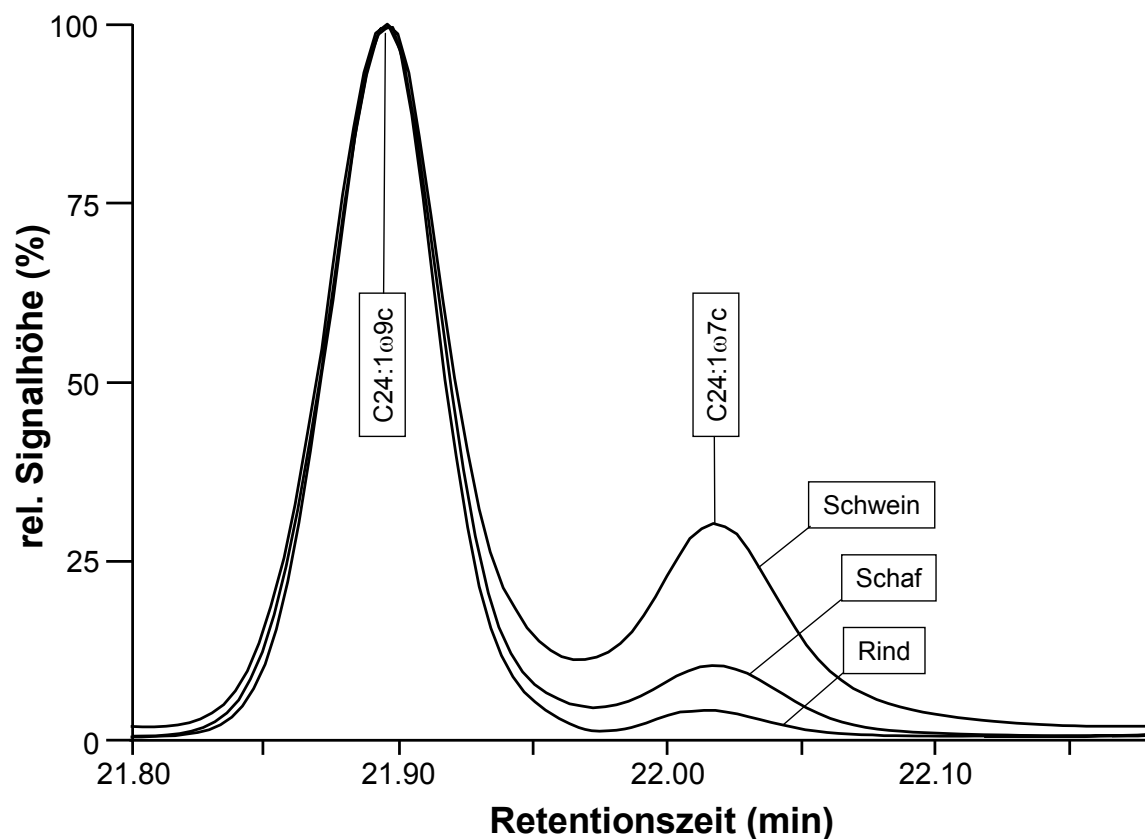


Abbildung 1: Ausschnitt aus dem SIM-Chromatogramm der FAME C24:1.

Wird die Signalthöhe des Peaks des FAME C24:1 ω 9c der drei Tierarten zu 100 % gesetzt, so zeigen die Signalthöhen der Peaks des FAME C24:1 ω 7c jeder Tierart voneinander abweichende Signalthöhen. Auf Grundlage dessen wurde aus den integrierten Flächen der SIM-Chromatogramme das Flächenverhältnis der Fettsäure C24:1 ω 9c zur Fettsäure C24:1 ω 7c gebildet. Die statistischen Parameter sind in Tabelle 4 für die Tierarten Rind, Schaf und Schwein unterschiedlicher Altersstufen zusammengestellt.

Tabelle 4: C24:1 ω 9c / C24:1 ω 7c im Hirn von Rind, Schaf und Schwein

dargestellt als Mittelwert (MW), Standardabweichung (STD), relative Standardabweichung (rel. STD), Median, Minimum (Min) und Maximum (Max) von Daten aus den SIM-Chromatogrammen.

	Rind	Rind	Rind	Rind	Schaf	Schwein	Schwein	Schwein
Alter	1-12 M. n=19	13-24 M. n=8	25-36 M. n=10	>36 M. n=5	11-15 M. n=12	3 M. n=9	6 M. n=10	15 M. n=4
MW	10,8	15,9	20,3	23,4	7,8	2,7	3,1	3,9
STD	2,4	3,1	2,9	2,9	1,7	0,2	0,3	0,1
rel. STD	21,9	19,7	14,2	12,4	22,1	7,3	8,9	2,6
Median	11,2	15,2	20,5	22,6	8,0	2,7	3,1	3,9
Minimum	6,9	12,6	15,8	20,6	5,3	2,4	2,7	2,7
Maximum	16,1	23,0	24,4	27,6	10,0	3,0	3,5	4,0

Eine graphische Darstellung der tierartsspezifischen Fettsäureverhältnisse C24:1 ω 9c / C24:1 ω 7c mit Angabe der Mittelwerte und der Standardabweichungen zeigt die Abbildung 2.

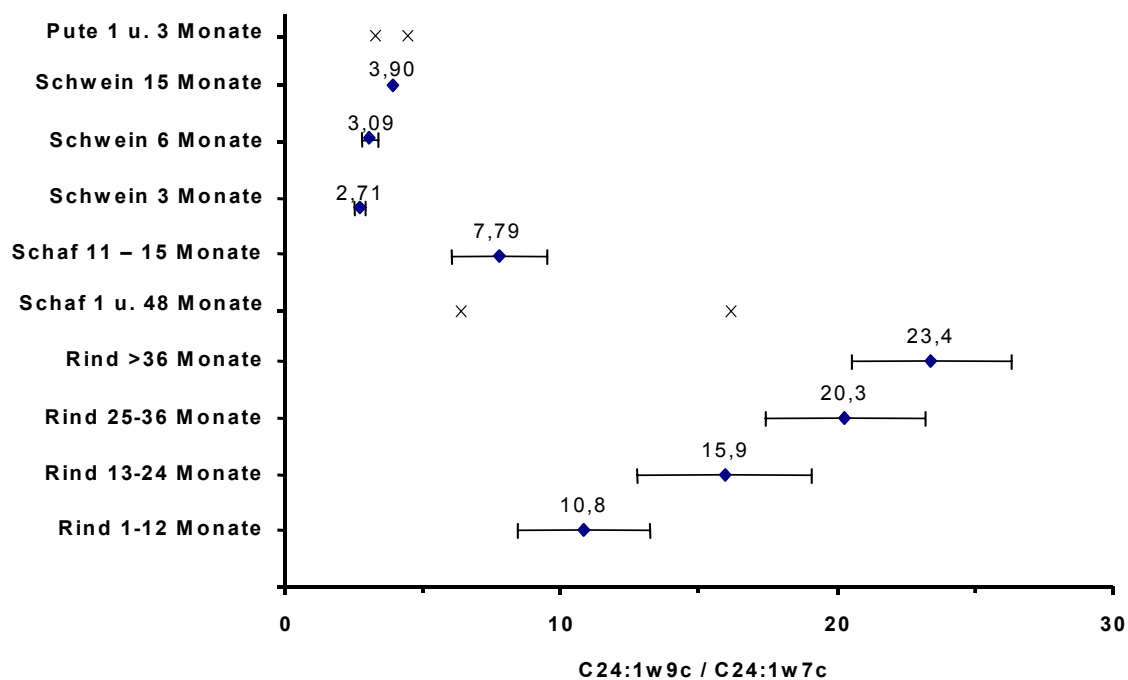


Abbildung 2: C24:1 ω 9c / C24:1 ω 7c im Hirn von Rind, Schaf und Schwein

als Mittelwerte und Standardabweichungen der Tierarten Rind (1-12 Monate, n=19; 13-24 Monate, n=8; 25-36 Monate, n=10; >36 Monate, n=5), Schaf (n=12) und Schwein (3 Monate, n=9; 6 Monate, n=10; 15 Monate, n=4) aus den SIM-Chromatogrammen.

Ein sehr niedriges Verhältnis der beiden Fettsäuren mit Mittelwerten von 2,71 bis 3,90 ist im Hirn von Schweinen zu beobachten, wobei das höhere Fettsäureverhältnis in der älteren Gruppe zu verzeichnen ist. Eine Überschneidung der Fettsäureverhältnisse mit den Verhältnissen von Rind oder Schaf tritt nicht auf.

Für das Fettsäureverhältnis C24:1 ω 9c / C24:1 ω 7c in Rinderhirn besteht ein weiter Bereich der Mittelwerte von 10,8 bis 23,4 in den vier untersuchten Altersgruppen. Damit deutet sich bereits hier eine altersabhängige Struktur des Fettsäuremusters im ZNS von Rindern an.

Beim Schaf liegt das Fettsäureverhältnis bei den Tieren der Altersgruppe 11 bis 15 Monate mit $7,79 \pm 1,72$ oberhalb dessen vom Schwein, so dass eine eindeutige Abgrenzung zum Schwein möglich ist. In diesen Bereich fällt auch das Verhältnis für das ZNS eines einen Monat alten Schafes mit $6,2 \pm 0,5$. Für das ZNS eines 48 Monate alten Schafs wurde in früheren Arbeiten ein Verhältnis von $16,1 \pm 1,6$ ermittelt. Auch hier besteht eine Überschneidung mit dem Fettsäureverhältnis von Kälbergehirn, so dass bei alleiniger Anwendung des Verhältnisses der Tetracosensäureisomere keine Unterscheidung zwischen Gehirn von Schafen und Kälbern vorgenommen werden kann.

SCAN-Analysen

Das Fettsäureverhältnis C24:1 ω 9-OH / C24:1 ω 7-OH soll besonders hervorgehoben werden (Tabelle 5), da nur dieses Verhältnis eine Trennung von Kalb und Schaf zulässt. Im Kälbergehirn liegt ein Verhältnis von $4,64 \pm 0,91$ vor, während im Gehirn der Schafe ein Verhältnis von $9,54 \pm 2,38$ ermittelt wurde (Tabelle 5). Zusätzlich unterstützt dieses Verhältnis auch die Differenzierung zwischen Schaf und Schwein.

Tabelle 5: C24:1 ω 9c-OH / C24:1 ω 7c-OH im Hirn von Rind, Schaf und Schwein

dargestellt als Mittelwert (MW), Standardabweichung (STD), relative Standardabweichung (rel. STD), Median, Minimum (Min) und Maximum (Max) von Daten aus den SCAN-Chromatogrammen.

	Rind	Rind	Rind	Rind	Schaf	Schwein	Schwein
Alter	1-12 M. n=19	13-24 M. n=8	25-36 M. n=10	>36 M. n=5	11-15 M. n=12	3 M. n=9	6 M. n=10
MW	4,6	6,2	7,8	8,9	9,5	1,5	1,7
STD	0,9	1,3	1,4	1,7	2,4	0,1	0,2
rel. STD	19,6	21,3	17,5	19,3	25,0	7,7	11,4
Median	4,9	6,0	7,4	8,3	10,2	1,5	1,7
Min	2,9	5,1	6,1	7,2	5,9	1,3	1,4
Max	6,3	9,4	9,8	11,2	12,7	1,7	1,9

Bestimmung des Tieralters

Bei der Bestimmung der Tierart aus den Fettsäureverhältnissen C24:1 ω 9c/ C24:1 ω 7c (Nervonsäure) und C24:1 ω 9c-OH / C24:1 ω 7c-OH (Hydroxy-Nervonsäure) hatte sich bereits angedeutet, dass sich diese Verhältnisse bei jeder Tierart spezifisch in Abhängigkeit vom Alter ändern (siehe Abbildung 3 und Tabelle 5). Mit zunehmendem Alter erhöht sich signifikant der Anteil der ω 9-Fettsäuren im Vergleich zu den ω 7-Fettsäuren, so dass ein größerer Wert dieses Verhältnisses mit zunehmendem Alter der Tiere resultiert.

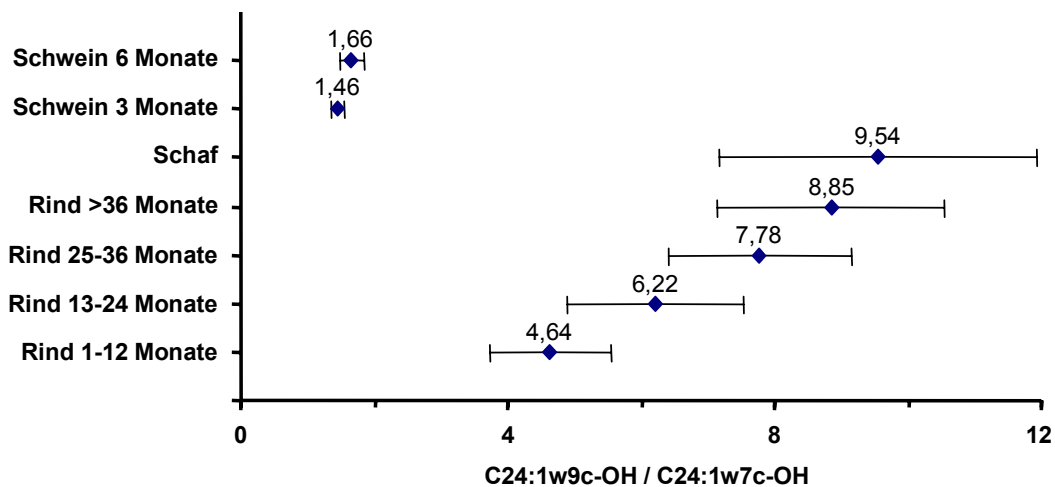


Abbildung 3: C24:1ω9c-OH / C24:1ω7c-OH im Hirn von Rind, Schaf und Schwein

als Mittelwerte und Standardabweichungen der Tierarten Rind (1-12 Monate, n=19; 13-24 Monate, n=8; 25-36 Monate, n=10; >36 Monate, n=5), Schaf (n=12) und Schwein (3 Monate, n=9; 6 Monate, n=10) aus den SCAN-Chromatogrammen.

Hinsichtlich der Methodik der Bestimmung der Konzentration der Fettsäuren C24:1ω9-OH und C24:1ω7-OH ist festzustellen, dass diese bei den gewählten Trennbedingungen als silylierte FAME auch im SIM-Chromatogramm mit der Massenzahl m/z 409 ohne Überlagerung mit anderen FAME unmittelbar vor dem Peak des silylierten FAME der Cerebronsäure (m/z 411) erscheinen. Damit ist auch eine weniger aufwendige Auswertung dieses Fettsäureverhältnisses aus dem SIM-Chromatogramm möglich und eine Aufnahme des SCAN-Chromatogrammes und die zusätzliche Auswertung dieses Chromatogramms kann unterbleiben (Zeitersparnis). Sinnvoller erscheint es jedoch, die SIM-Methode so zu programmieren, dass die m/z 409 und damit die Konzentration der Hydroxytetracosensäureisomeren zu der entsprechenden Retentionszeit erfasst werden. Aus diesen Überlegungen heraus wurde die massenspektrometrische Methode zu Beginn des Vorversuchs auf eine Retentionszeit-spezifische SIM-Methode umgestellt.

Werden Tetracosensäureisomere und Hydroxytetracosensäureisomere gemeinsam in die Bewertung zur Bestimmung des Tieralters herangezogen, dann ergibt sich die in Tabelle 6 angegebene Regel. Diese wurde auch als Grundlage für die Auswertung der Ergebnisse im externen Blindversuch im vorgelagerten Projekt Nr. 514-33.34/03HS011 herangezogen.

Tabelle 6: Parameter für die Zuordnung von Spezies und Alter bei ZNS-positiven Proben

Tierart und Alter (Monate)	C24:1ω9/ω7	C24:1ω9/ω7-OH
Rind, > 36 Monate	>22	>7
Rind, 25-36 Monate	>18	>6
Rind, 12-24 Monate	>14	>4
Rind, < 12 Monate	<14	<4
Schaf, > 12 Monate	>12	>10
Lamm, < 12 Monate	<12	7..10
Schwein (Geflügel)	<4	<2

4 Ergebnisse

4.1 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

4.1.1 Identifikation geeigneter Laboratorien, Verbreitung der Wahrnehmung des Verfahrens (Meilenstein 1)

Geeignete Laboratorien für die Ringtests wurden mittels des Adressbuchs für Lebensmittelüberwachung und -untersuchung (Leye et al. 2007), der Liste Akkreditierter Stellen im Bereich Lebensmittel und Lebensmittelanalytik des Deutschen Akkreditierungs Rates (Deutscher Akkreditierungs Rat 2007) und des Internets recherchiert. An 99 Einrichtungen und Institute wurden Informationen zum Stand der Forschung zum ZNS-Nachweis mittels GC-MS übermittelt. Verbunden damit war die Anfrage, ob Interesse an der Teilnahme von Ringtests zur Validierung des SRM-Referenzverfahrens besteht. Es konnten zahlreiche positive Antworten verzeichnet werden, insgesamt hatten sich 21 Laboratorien bereit erklärt, am Ringtest teilzunehmen. Von 37 der angeschriebenen Laboratorien wurde keine Rückmeldung erhalten. 41 Laboratorien erklärten sich nicht zur Teilnahme bereit. Teilnehmer 21 konnte aus internen Gründen nur die Teilnahme zum Ringtest zusagen, aber nicht zum Vorversuch.

Tabelle 7 enthält eine Zusammenstellung aller am Ringtest beteiligten Laboratorien. Die teilnehmenden Labore wurden sowohl für die Ringtests als auch für den vorliegenden Bericht vollständig anonymisiert. Die in der Auswertung verwendeten Labornummern spiegeln nicht die Reihenfolge der in Tabelle 7 aufgeführten Teilnehmer wider. Jedem einzelnen Teilnehmer des Ringtests wurde für eine eventuelle laborinterne Auswertung ausschließlich die eigene, auch für den vorliegenden Bericht gültige, Labornummer mitgeteilt.

Tabelle 7: Teilnehmerliste

Institut	Ansprechpartner	Telefon u. Fax	E-Mail	Gerätehersteller
Institut Warenprüfung und Qualitätskontrolle, Laborgemeinschaft Dr. G. Appelt Täubchenweg 28 04317 Leipzig	Dr. Sabine Bergmann	Tel.: 0341/6496633 Fax: 0341/6496699	sabine.bergmann@wqlpz.de	Agilent
Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung - UFZ, Department Analytik / Organische Analytik Permoserstr. 15 04318 Leipzig	Dr. Monika Möder	Tel.: 0341/2352657 Fax: 0341/2352625	monika.moeder@ufz.de	Agilent
Berliner Betrieb für Zentrale Gesundheitliche Aufgaben, Institut für Lebensmittel, Arzneimittel und Tierseuchen Invalidenstraße 60 10557 Berlin	Herr Biederbick	Tel.: 030/39784-604 Fax: 030/39784-400	Biederbick@bbges.de	Agilent
Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern Thierfelder Str. 18 18059 Rostock	Dr. Matthias Denker	Tel.: 0381/4035-321 Fax: 0381/4035343	matthias.denker@lalff.mvnet.de	Agilent
Landeslabor Schleswig-Holstein, Lebensmittel und Veterinäruntersuchungsamt; Max-Eyth-Straße 5; 24537 Neumünster	Dr. Ingrid Burmeister Ute Nülle	Tel.: 04321/904-673,-674 Fax: 04321/904-619	Ute.Nülle@lvua-sh.de	Agilent
Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAUES), Veterinärinstitut Oldenburg Philosophenweg 38 26124 Oldenburg	Dr. Oliver Christof	Tel.: 0441/9713-612 Fax: 0441/9713-818	oliver.christof@laues.niedersachsen.de	Agilent
Chemisches Labor Dr. Wirts und Partner Sachverständigen GmbH; Rutenbergstraße 59; 30559 Hannover	Dr. Ing. L. Havlik	Tel.: 0511/950798-0 Fax: 0511/950798-29	Havlik@wirts.de	Agilent
Chemisches Untersuchungsamt der Stadt Bielefeld; Oststr. 55; 33604 Bielefeld	Dr. Brockmann	Tel.: 0521/513-002 Fax: 0521/513-386	rainer.brockmann@bielefeld.de	Schimadzu
Hessisches Landeslabor Druseltalstr. 67 34131 Kassel	Herr Dittmar	Tel.: 0561/3101136 Fax: 0561/3101242	Frank.Dittmar@lhl.hessen	Agilent
Wessling Laboratorien GmbH Oststr. 7 48341 Altenbergen	Mathias Mundt	Tel.: 02505/89-622 Fax: 02505/89-620	matthias.mundt@wessling.de	Agilent
Chemisches Untersuchungsinstitut der Stadt Leverkusen Düsseldorfer Str. 153 51379 Leverkusen	Herr Schneider	Tel.: 0214/406-3261 Fax: 0214/406-3262	Cui@stadt.leverkusen.de	Shimadzu
Staatliches Veterinäruntersuchungsamt Arnsberg Zur Taubeneiche 10-12 59821 Arnsberg	Dr. Just	Tel.: 02931 / 809-239 Fax: 02931 / 809-290	paul.just@suva-arnsberg.nrw.de	Waters

Fortsetzung Tabelle 7: Teilnehmerliste

Institut	Ansprechpartner	Telefon u. Fax	E-Mail	Gerätehersteller
Hessisches Landeslabor Kurfürstenstr. 6 65203 Wiesbaden	Herr Thiele	Tel.: 0611/7608-520 Fax: 0611/713515	harald.thiele @lhl.hessen.de	Agilent
Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart Schaflandstr. 3/2 70736 Fellbach	Dr. J. Kuntzer	Tel.: 0711/3426-1226 Fax: 0711/588176	joachim.kuntzer @cvuas.bwl.de	Agilent
Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Sigmaringen Hedingerstr. 2/1 72488 Sigmaringen	Frau Eversberg Herr Klein	Tel.: 07571/732-762/629 Fax: 07571/732-614	inge.eversberg @cvuasig.bwl.de	Agilent
Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Karlsruhe Weißbürger Str. 3 76187 Karlsruhe	Dr. Manfred Möllers	Tel.: 0721/926-5478 Fax: 0721/926-3549	Manfred.Moellers @Cvuaka.bwl.de	Agilent
Chemisches Labor Dr. Merten GmbH Röderstraße 8 – 10 79104 Freiburg	Dipl. LM-Ing. Rainer Hofmann	Tel.: 0761/278031 Fax: 0761/289928	Hofmann @labormerten.de	Schimadzu
Bayr. Landesuntersuchungsamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Dienststelle Oberschleißheim Veterinärstraße 2 85764 Oberschleißheim	Dr. Andreas Miller	Tel.: 089 /31560-358/526) Fax: 089 /31560-427	andreas.miller @lgl.bayern.de	Thermo
Labor Dr. Scheller GmbH Am Mittleren Moos 48 86167 Augsburg	Christian Bremer	Tel.: 0821/450733-0 Fax: 0821/450733-6	ch-bremer@labor-dr-scheller.de	Agilent
Bayr. Landesuntersuchungsamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit Eggenreuther Weg 43 91058 Erlangen	Dr. Holger Knapp	Tel.: 09131/764-232 Fax: 09131/764-401	holger.knapp @lgl.bayern.de	Fisons
BLS-Analytik GmbH & Co. KG, Labor für Lebensmitteluntersuchungen und Umweltanalytik Columbiastrasse 14 97688 Bad Kissingen	Herr Baum	Tel.: 0971/785580 Fax: 0971/7855825	bls-analytik @t-online.de	Fisons

Im Verlauf des gesamten Ringtests kam es aus unterschiedlichen Gründen zur Absage verschiedener Teilnehmer, die aber zu keinem Zeitpunkt eine Gefährdung des Vorhabens darstellten. Tabelle 8 enthält eine Auflistung der am jeweiligen Versuchsabschnitt beteiligten Laboratorien.

Zusammenfassend wurde für den Vorversuch an 20 Laboratorien Material zur Einarbeitung versandt. Bis zur planmäßigen Ergebnismeldung entschieden sich die Laboratorien 4 und 9 zu einer Absage. Die Laboratorien 8, 13 und 20 konnten keine Ergebnisse innerhalb der vorgegebenen Zeit liefern. Es blieben somit für die Auswertung des Vorversuchs 15 Teilnehmer.

Für den ersten Ringtest wurde an 19 Teilnehmer Material versendet, von denen Labor 6, 13 und 20 im weiteren Verlauf die Teilnahme absagten und Labor 16 aus personellen Gründen keine Ergebnisse innerhalb der vorgegebenen Zeit liefern konnte. Es wurde vereinbart, dass Labor 16 den ersten und zweiten Ringtest zusammen bearbeiten kann.

Der abschließende zweite Ringtest war mit mindestens zehn Teilnehmern geplant. Aufgrund der guten Zusammenarbeit und des vorhandenen Interesses wurde die Teilnehmerzahl auf 14 erweitert. Bei Teilnehmer 15 ergaben sich technische/personelle Schwierigkeiten, die eine Bearbeitung der Proben im vorgegebenen Zeitraum nicht mehr zugelassen haben. Teilnehmer 16 konnte aus ähnlichen Gründen für den ersten Ringtest keine und für den zweiten Ringtest nur unvollständige Ergebnisse liefern und wurde daher von der Auswertung beider Ringtests ausgeschlossen. Im Labor 14 erklärten sich zwei Mitarbeiter unabhängig voneinander zur Aufarbeitung der Proben bereit, die anschließende Messung erfolgte am gleichen Gerät. Seitens der Versuchsleitung wurde entschieden, die Ergebnisse beider Mitarbeiter von Teilnehmer 14 mit in die Auswertung einzubeziehen, da nicht die Gaschromatographie selbst, sondern die Aufarbeitung als kritischer Punkt der Methode angesehen wird. Für den zweiten Ringtest werden diese von nun an als Teilnehmer 14a und 14b bezeichnet. Somit standen für die Auswertung des zweiten Ringtests Ergebnisse von 13 Teilnehmern in 12 Laboratorien zur Verfügung.

Tabelle 8: Übersicht der Ergebnismeldungen, Gesamter Projektzeitraum

Labor	Ergebnismeldung		
	Vorversuch	erster Ringtest	zweiter Ringtest
1	x	x	x
2	x	x	x
3	x	x	x
4	Abs.	-	-
5	x	x	x
6	x	Abs.	-
7	x	x	x
8	-	x	x
9	Abs.	-	-
10	x	x	x
11	x	x	x
12	x	x	Abs.
13	-	Abs.	-
14	x	x	x (a/b)
15	x	x	Abs.
16	x	-	unvollständig
17	x	x	x
18	x	x	x
19	x	x	Abs.
20	-	Abs.	-
21	n.t.	x	x

x – Ergebnisse zurückgemeldet

a/b – Analyse wurde unabhängig von zwei Mitarbeitern durchgeführt

“-“ – keine Ergebnisse gemeldet

n.t. – nicht teilgenommen

Abs. – Absage der Teilnahme ab genanntem Projektabschnitt

4.1.2 Vorversuch zu den eigentlichen Ringtests - Vorbereitung der Laboratorien (Meilenstein 2)

Der Vorversuch zu den eigentlichen Ringtests hatte die Ziele, die SOP zu überprüfen und gegebenenfalls anzupassen sowie die Laboratorien auf die Durchführung der eigentlichen Ringtests vorzubereiten. Zu diesem Zweck erhielten die Teilnehmer drei Brühwurststandards mit Zusatz an ZNS vom Schwein (3 %) bzw. Rind (1 % und 3 %) sowie eine Probe ohne ZNS-Zusatz. Darüber hinaus wurden ein Standardgemisch (fatty acid methyl ester, FAME-Mix) der Fettsäuremethylester: Nervonsäure (15cis-Tetracosensäure, C24:1 ω 9), Cerebronsäure (2-Hydroxytetracosensäure, C24:0-OH) und deuterierte Docosansäure (C22:0-2,2 D2)

und bereits aufgearbeitete ZNS-Extrakte (Hirnproben) vom Schwein und Rind für die erleichterte Identifikation von Peaks im Chromatogramm den Teilnehmern zugesendet. Weiterhin wurden den Paketen Kalibrationslösungen (0, 10, 20, 30 und 40 ng/µl Cerebronsäure), Verbrauchsmaterial, sowie Dokumente für die Durchführung und Auswertung beigelegt (Tabelle 9).

Tabelle 9: An die Teilnehmer des Vorversuchs gesendetes Material

Material	Menge/Volumen
Brühwurststandards 0%, 1%, 2%, 3% ZNS-Zusatz)	4 Stück
Hirnextrakte Schwein und Rind	2 Stück
Standardlösung (FAME-MIX)	1 ml
Interner Standard (IS) C22:0 2,2 D2	1 ml
Kalibrationslösungen (0/10/20/30/40 ng/µl Cerebronsäure)	5 x 1 ml
Reagenzröhrchen	6 Stück
Zentrifugenröhrchen	12 Stück
Vials	12 Stück
Wägschälchen	10 Stück
Anschreiben	1 Stück
Auswertungsbogen	1 Stück
Daten-CD	1 Stück
SOP	1 Stück

Über die Fa. Sigma-Aldrich erhielten alle Teilnehmer auf Kosten des Ausrichters des Ringtests Kartuschen sowie methanolische Salzsäure und ein Silylierungsreagenz (Hexamethyldisilazan/ Trimethylchlorsilan) zugesandt. Im Vorversuch hatten die Teilnehmer Gelegenheit, sich mit Hilfe des FAME-Mix und der bereits aufgearbeiteten Hirnproben mit den Zielanalyten, deren Massenspektren und Retentionsverhalten im Chromatogramm vertraut zu machen. Dies war insbesondere für die Trennung der nahe beieinanderliegenden Peaks der Stellungsisomeren der Nervonsäure bzw. der Hydroxynervonsäure (C24:1-OH) von Bedeutung.

Die Kalibrationslösungen von Cerebronsäuremethylester ermöglichten eine Kalibration über Standardlösungen für die Quantifizierung des ZNS-Gehaltes in den Brühwurststandards (Abbildung 4). Zusätzlich erfolgt die Kategorisierung in ZNS-positiv bzw. ZNS-negativ anhand des Cut-Off (0,2 % ZNS entspricht 2,43 mg/kg Cerebronsäure).

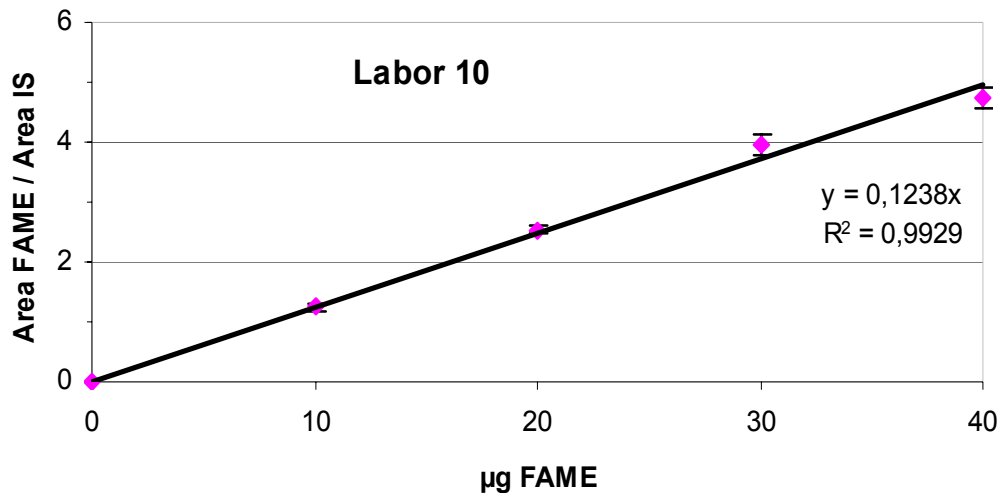


Abbildung 4: Beispieldiagramm der GC/MS Kalibration mit Cerebronsäure als Cerebronsäuremethylester (Vorversuch, Labor 10)

Rauten: Mittelwerte (n=3), Fehlerbalken (σ), sowie Regressionsgerade mit $y=0,1238x$

Ziel dieses Vorversuchs war die Differenzierung ZNS-positiver und -negativer Proben und Bestimmung der Tierart des ZNS durch die Teilnehmer verbunden mit einer Einarbeitung in das Verfahren.

Aufgabenstellung war die Doppelbestimmung der vier anonymisierten Proben basierend auf der ursprünglichen SOP und die Zusendung der Rohdaten. Die Auswertung erfolgte am Institut für Lebensmittelhygiene. Vier Ringtestteilnehmer hatten die Extrakte zweimal am Gaschromatographen analysiert, somit standen 19 Ergebnisse für die Auswertung zur Verfügung.

Zunächst wurden die rückgemeldeten Ergebnisse einer Qualitätskontrolle anhand des Internen Standards unterzogen. Hierfür wurden die Messwerte zusammen mit dem Mittelwert, der oberen und unteren Warngrenze (OWG/UWG, $MW \pm 2\sigma$) und der oberen und unteren Eingriffsgrenze (OEG/UEG, $MW \pm 3\sigma$) in einem Diagramm aufgetragen und auf Ausreißer untersucht. Abbildung 5 stellt ein Beispiel für eine derartige Qualitätsregelkarte dar. Die Ergebnisse aller Versuchsteilnehmer sind im Anhang zu diesem Bericht enthalten. Neben der Geraden, die den Mittelwert aus allen Messungen darstellt, sind die oberen/unteren Warn- (kurz gestrichelte Linie) und Eingriffsgrenzen (lang gestrichelte Linie) angeführt.

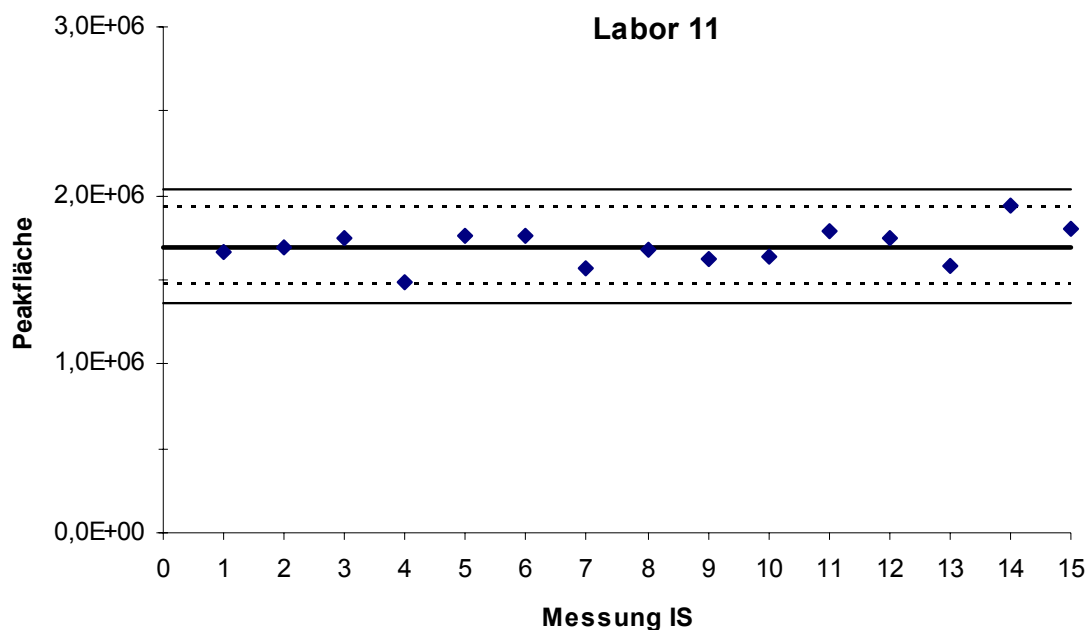


Abbildung 5: Beispiel für eine Qualitätsregelkarte der wiederholten Messung der Fläche des Internen Standards

Linie (dick): Mittelwert; kurz gestrichelt: OWG/UWG; Linie (fein): OEG/UEG; IS: Interner Standard

Die Auswertung hinsichtlich der Einstufung der Proben in ZNS-positiv bzw. ZNS-negativ ergab, dass sämtliche Proben des Vorversuchs von allen Teilnehmern korrekt eingestuft wurden (Tabelle 10).

Tabelle 10: Klassifizierung der ZNS positiven und negativen Proben im Vorversuch

		ZNS-positiv	ZNS-negativ	Gesamt
ZNS-positiv	Anzahl	57	0	57
	% von ZNS-positiv	100%	0%	100%
ZNS-negativ	Anzahl	0	19	19
	% von ZNS-negativ	0%	100%	0%
Gesamt	Anzahl	57	19	76
	% von Gesamt	75%	25%	100%

Bei der Tierartbestimmung, der zweiten Aufgabe der Versuchsteilnehmer beim Vorversuch, traten einzelne Probleme auf. Die Ergebnisse von Teilnehmer 1 konnten, trotz korrekter Einteilung in die Kategorien ZNS positiv/negativ, aufgrund falscher bzw. fehlender Rohdaten nicht zur Tierartbestimmung genutzt werden. Die Unterscheidung zwischen den SRM relevanten Tierarten (Rind und Schaf) und der nicht SRM relevanten Tierart (Schwein) wurde von dem restlichen gewerteten Teilnehmern (n=14) zu 100 % richtig vorgenommen. Hinsicht-

lich der Zuordnung der positiven Proben zu einer Tierart wurde die Tierart Schwein zu 100 % korrekt zugeordnet und die Tierart Rind zu 76,47 % richtig zugeordnet. Jedoch konnten sieben weitere Proben zur Klasse der Wiederkäuer (3 Schaf und 4 WDK) gezählt und somit für die abschließende Bewertung als SRM richtig eigeordnet werden (Tabelle 11).

Tabelle 11: Klassifizierung der Tierarten im Vorversuch

		Rind	Schwein	Schaf	WDK	n.a.	Gesamt
Rind	Anzahl	26	0	3	4	1	34
	% von ZNS-positiv	76,47 %	0%	8,82 %	11,76 %	2,94%	100 %
Schwein	Anzahl	0	17	0	0	0	17
	% von ZNS-negativ	0%	100 %	0%	0%	0%	100 %
Gesamt	Anzahl	26	17	3	4	1	51
	% von Gesamt	50,98 %	33,33 %	5,88 %	7,84 %	1,96 %	100 %

n.a. – nicht auswertbar

4.1.3 Optimierung und Anpassung der SOP an Praxisbedingungen (Meilenstein 3)

Für die Durchführung des Vorversuches wurde die Standard Operation Procedure der im Projekt 03HS011 entwickelten Methode gewählt. Die einzelnen Schritte sowie die exakten Analysenparameter wurden bereits im Abschnitt 3.2 ausführlich beschrieben. Die Basismethode wies jedoch einige Möglichkeiten auf, Zeit sowie Chemikalien zu sparen. Mehrere Ringtestteilnehmer teilten dem Projektnehmer im Laufe des Vorversuchs hilfreiche Anregungen für Verbesserungsmöglichkeiten mit. Die häufigsten Kritikpunkte waren dabei der erhebliche Zeitaufwand von zwei Arbeitstagen für die Probenvorbereitung, die Komplexität der Aufarbeitung mit ihren zahlreichen Schritten und die Beeinträchtigung des gaschromatographischen Systems (insbesondere GC-Injektionsspritze und Kapillarsäule) durch Nebenprodukte, welche bei der Silylierungsreaktion entstehenden.

Daraus ergaben sich folgende Aufgabenstellungen für die Optimierung der bestehenden Methode:

- Reduktion der Lösungsmittelmenge bei der Solid Phase Extraktion (SPE)
- Reduktion der Zeitdauer der Methylierung mit dem Ziel, den Gesamttablauf der Probenvorbereitung auf einen Tag zu verkürzen;
- Verwendung eines alternativen Silylierungsmittels, um Kapillarsäulenschäden und Verstopfung der GC-Spritze zu vermeiden;
- Entwicklung einer Matrix-Kalibration, um extraktions- sowie matrixbedingte Schwankungen, auszugleichen.

4.1.3.1 Reduktion des Lösungsmitelesinsatzes während der Festphasenextraktion (SPE)

Die Optimierungsarbeiten für die Reduktion des Lösungsmitelesinsatzes während der SPE konzentrierten sich insbesondere auf den Verzicht des Elutionsmittels Aceton sowie die Reduktion der Menge des Eluenten Methanol. Ausgangspunkt war die Tatsache, dass Methanol über eine größere Polarität (Dielektrizitätskonstante $\epsilon_r = 33,7$) als Aceton ($\epsilon_r = 21,4$) verfügt. Die Polarität korreliert mit der Elutionskraft des Lösungsmittels für Verbindungen mit polaren Gruppen auf unpolaren Festphasen. Es wurde daher getestet, ob bei der Elution der komplexen Lipide auf Aceton verzichtet werden kann. In einem Vorversuch wurden Proben der Brühwurststandards mit 1 % (Sa1), 2 % (Sa2) sowie 3 % (Sa3) ZNS-Zusatz aufgearbeitet. Da Aceton in der ursprünglichen Methode als Lösungsvermittler zwischen *n*-Hexan und Methanol diente, war es notwendig das Sorbent nach erfolgtem Waschschrift mittels *n*-Hexan/2-Methylpropanol durch Anlegen eines Vakuums zu trocknen.

Die Grenzen für die Qualitätsregelkarten wurden aus der Dreifachmessung des jeweiligen Brühwurststandards errechnet. Die quantifizierten Fettsäure-Gehalte, die in allen drei Brühwurststandards ohne Acetonelution gemessen wurden, lagen innerhalb der Warn Grenzen der Qualitätsregelkarten. Die einzige Ausnahme bildete die C24:1 ω 9 im Sa1, hier wurde die obere Warn Grenze ($mw+3\sigma$) überschritten (Tabelle 12).

Tabelle 12: Grenzwerte der Qualitätsregelkarte (mit Aceton in der SPE) und Messwerte (ohne Aceton in der SPE) der quantifizierten Fettsäuren (C24:0, C24:0-OH, C24.1 ω 9 und C24:1 ω 7).

		Sa1		Sa 2		Sa 3	
		C24:1 ω 9 (mg/kg)	C24:0-OH (mg/kg)	C24:1 ω 9 (mg/kg)	C24:0-OH (mg/kg)	C24:1 ω 9 (mg/kg)	C24:0-OH (mg/kg)
Grenzwerte mit Aceton (n=3)	MW	22,9	4,4	56,5	10,1	90,0	15,9
	MW+2 σ	23,7	5,2	66,1	10,8	100,3	17,2
	MW+3 σ	24,1	5,7	70,9	11,1	105,4	17,8
	MW-2 σ	22,1	3,6	47,0	9,4	79,8	14,6
	MW-3 σ	21,7	3,2	42,2	9,1	74,6	14,0
Messwert ohne Aceton (n=1)		24,4	4,2	58,8	10,3	85,9	14,3

Zur statistischen Absicherung dieser im Vorversuch erhaltenen Ergebnisse wurden Dreifachmessungen von Proben mit und ohne Zusatz von Aceton während der Elution durchgeführt (Abbildung 6). In dieser Abbildung werden stellvertretend für die nichthydroxylierten Fettsäuren die Ergebnisse der Nervonsäure C24:1 ω 9 und für die hydroxylierten Fettsäuren die Cerebronsäure C24:0-OH dargestellt. Vergleichbare Ergebnisse wurden bei allen anderen nichthydroxylierten und hydroxylierten Fettsäuren beobachtet. Die Dreifachmessungen bestätigten das Ergebnis des Vorversuchs. Der Verzicht auf Aceton hat keinen Einfluß auf die Quantität der eluierten Analyten. Es konnte sogar ein leicht erhöhter Fettsäuregehalt (aller Fettsäuren) im Eluat bei der ausschließlich mit Methanol durchgeführten Elution ermittelt werden. Hierbei sei erwähnt, dass diese erhöhten Ausbeuten jedoch nicht signifikant sind, wie die p-Werte für die Cerebronsäure ($p=0,065$, gepaarter t-Test) und die Nervonsäure ($p=0,153$, gepaarter t-Test) zeigen.

Die für die einzelnen Fettsäuren beobachteten Ergebnisse können entsprechend auch auf die Fettsäureverhältnisse, die für die Bestimmung von Spezies sowie Tieralter des verarbeiteten ZNS von Bedeutung sind, übertragen werden.

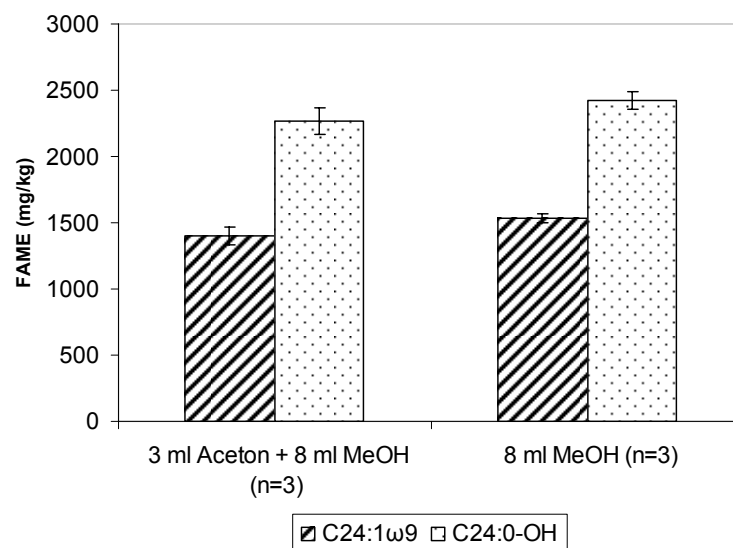


Abbildung 6: Vergleich der Gehalte an C24:1 ω 9 und C24:0-OH bei Elution mit 3 ml Aceton + 8 ml Methanol und 8 ml Methanol.

In einem weiteren Versuch wurde getestet ob sich das Elutionsvolumen von Methanol (bisher 8 ml) ohne Analytverluste verringern lässt.

Die Fa. Phneomenex gibt in ihrem SPE- Reference Manual & Users Guide als Mindestelutionsvolumen für die Normal-Phasen-SPE-Kartuschen das zwei bis vierfache Bettvolumen an (Anonym 2006). Das Bettvolumen einer gängigen SPE-Kartusche mit Silicagel beträgt laut Hennion und Pichon (1994) 600 µl/500 mg. Folglich entspricht das zwei bis vierfache Bettvolumen einer Elutionsmenge an Methanol von 1,2-2,4 ml. In den Untersuchungen wurden Elutionsmengen von 7 bis 1,5ml Methanol getestet.

Für die Auswertung kamen Qualitätsregelkarten zum Einsatz. Hierbei stellen die Werte, die nach dem Einsatz von 8 ml Methanol gewonnen wurden, die Grenzen der aufgestellten Qualitätsregelkarten (Obere- und Untere Warngrenze bzw. Eingriffsgrenze) dar. Darin eingetragen wurden die gemittelten Messwerte der methanolreduzierten SPE-Läufe (Abbildung 7 und Abbildung 8).

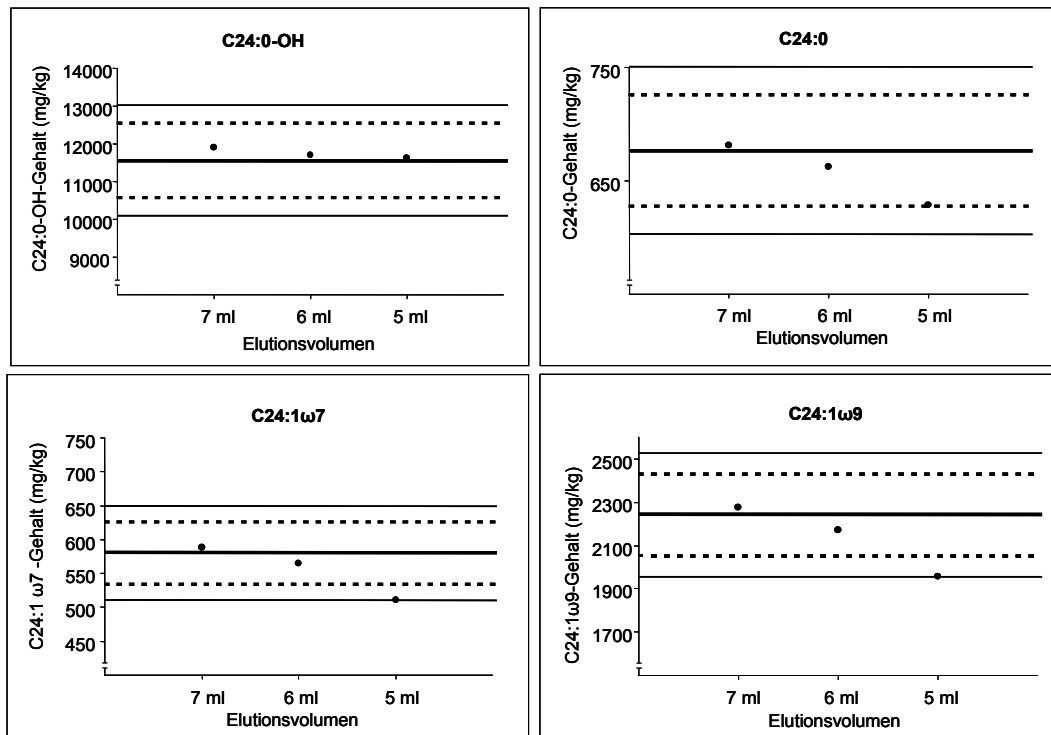


Abbildung 7: Qualitätsregelkarten der quantifizierten Fettsäuren (C24:1ω9, C24:1ω7, C24:0 und C24:0-OH) für die Methanoleinsätze (7-5 ml).

Linie (dick): Mittelwert; kurz gestrichelt: OWG/UWG; Linie (fein): OEG/UEG

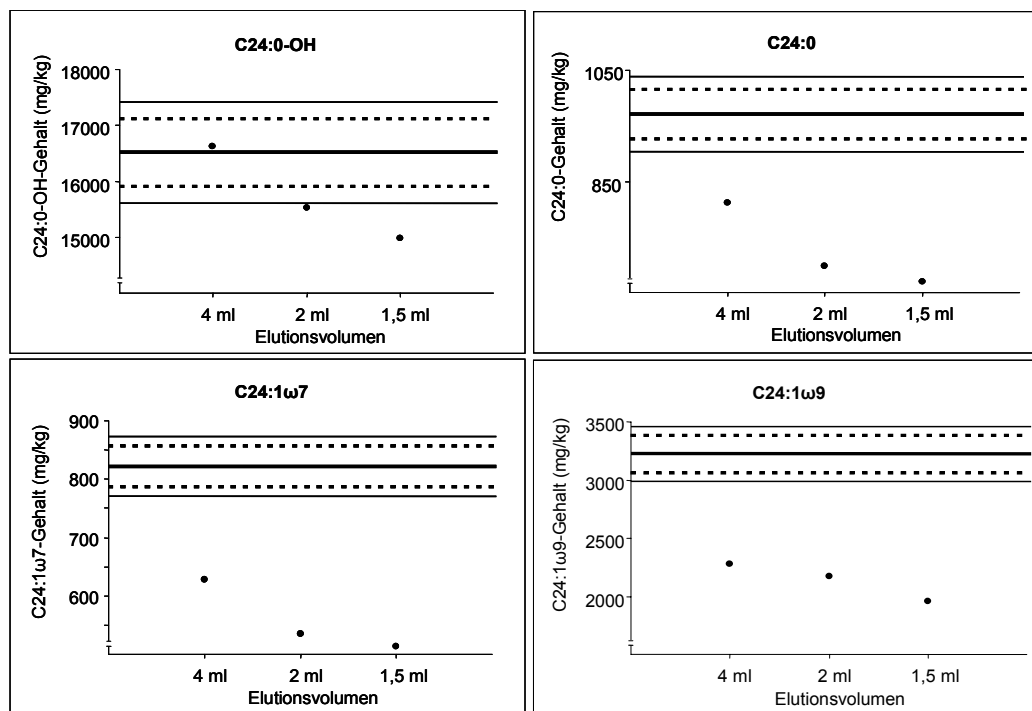


Abbildung 8: Qualitätsregelkarten der quantifizierten Fettsäuren (C24:1ω9, C24:1ω7, C24:0 und C24:0-OH) für die Methanoleinsätze (4-1,5 ml).

Linie (dick): Mittelwert; kurz gestrichelt: OWG/UWG; Linie (fein): OEG/UEG

Bei der Analyse der Proben ergab sich, dass das 2-4 fache Bettvolumen nicht ausreichend ist, um alle Zielanalyten ohne Verlust von der Säule zu eluieren. Die Unterschreitung der unteren Warngrenze der Messwerte von C24:1ω9, C24:1ω7 und C24:0 bei Einsatz von 4 ml Methanol zeigt an, dass mit sehr deutlichen Abweichungen der Quantität bei diesen Fettsäuren zu rechnen ist (Abbildung 8). Dieses Ergebnis konnte mittels gepaarten t-Test bestätigt werden ($p < 0,001$). Ausnahme bildet hier nur die Cerebronsäure, deren Messwerte innerhalb der Warngrenze liegen. Hier konnten auch mittels gepaarten t-Test keine signifikanten Abweichungen zur Elution mit 8 ml Methanol nachgewiesen werden ($p = 0,790$).

Erst ab einem Eluentenvolumen von 5 ml können bei der C24:0 Gehalte ermittelt werden, die der analytischen Qualität entsprechen, die nach dem Einsatz von 8 ml Methanol berechnet wurden. Jedoch liegen bei den Fettsäureisomeren der C24:1 die Ergebnisse direkt auf den Eingriffsgrenzen und somit muss dieses Elutionsvolumen als inakzeptabel erachtet werden (Abbildung 7).

Hingegen konnten bei einem Einsatz von 6 ml Methanol bei allen untersuchten Fettsäuren Ergebnisse erhalten werden, welche sowohl innerhalb der Eingriffsgrenze als auch der Warngrenze lagen. Bei dieser Elutionsmenge konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zur Elutionsmenge von 8 ml Methanol für die C24:1ω9 festgestellt werden ($p = 0,404$). Ähnliche Ergebnisse wurden für die anderen nichthydroxylierten Fettsäuren ermittelt. Somit ist dieses Volumen ausreichend für die vollständige Elution der Zielanalyten ohne quantitative und qualitative Verluste.

=

Abschließend wurde ein Vergleich der ursprünglichen SPE-Methode (Elution mit 3 ml Aceton + 8 ml Methanol) und der optimierten Methode (6 ml Methanol) vorgenommen. Hier zeigt sich das gleiche zuvor beschriebene Bild. Trotz der verringerten Lösungsmittelmenge konnten die komplexen Lipide vollständig eluiert werden (Abbildung 9).

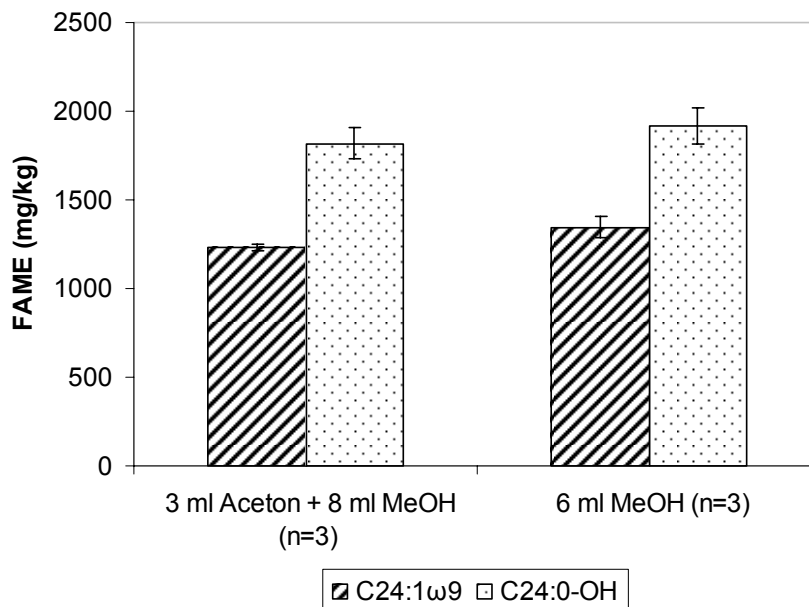


Abbildung 9: Vergleich der FAME-Gehalte von C24:1ω9 und C24:0-OH bei Einsatz von 3 ml Aceton+ 8 ml Methanol und 6 ml Methanol während der Elutionsphase (n=3).

Die Prüfung der Mittelwerte auf statistische Signifikanz ergab mittels Mann-Whitney-Test einen p-Wert von 0,4. Somit konnten die in den Einzeluntersuchungen gewonnenen Ergebnisse bestätigt werden. Es kann kein Unterschied zwischen den zwei SPE-Methoden festgestellt werden. Die Reduktion der Menge des eingesetzten Eluenten hat neben dem sparsameren Einsatz von Chemikalien noch weitere wesentliche Vorteile. Durch die um 5 ml drastisch reduzierte Lösungsmittelmenge verkürzen sich die Laufzeit der SPE sowie die Zeitdauer des Eindampfens um insgesamt 30 min.

Verwendung alternativer SPE-Kartuschen

Im Verlauf des Vorversuchs erfolgte aus Gründen der Kosteneinsparung ein Wechsel des Bezuges der SPE-Kartuschen vom Hersteller Supelco zum Hersteller Phenomenex. Beide Kartuschenhersteller geben für die in diesen Untersuchungen verwendeten Kartuschen ein Bettgewicht von 500 mg Silicagel bei einer Porengröße von 60 Å an.

Dadurch war es notwendig, die Qualität sowie Quantität der Festphasenextraktion unter Verwendung der Phenomenexkartuschen zu überprüfen. Dazu wurden jeweils drei Versuche mit 3 ml Aceton + 8 ml Methanol bzw. 6 ml Methanol mit drei Kartuschen beider Lieferanten durchgeführt. Die Werte für die eluierten Fettsäuren C24:1ω9 sowie C24:0-OH lagen für die

Phenomenexkartuschen leicht, jedoch nicht signifikant ($p=0,262 - 0,632$; gepaarter t-Test), über denen der Supelcokartuschen (Abbildung 10).

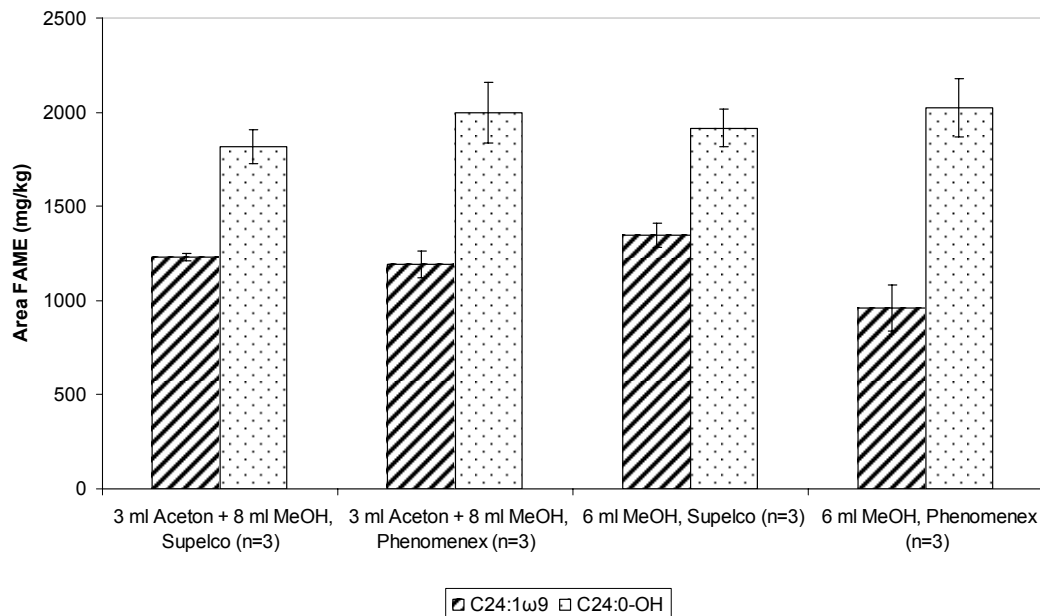


Abbildung 10: Vergleich der SPE-Kartuschen der Firmen Supelco und Phenomenex für die Elution der FAME mit 3 ml Aceton und 8 ml Methanol sowie für die Elution mit 6 ml Methanol.

Eine Ausnahme bildete die Nervensäure, hier war der Gehalt bei Verwendung der Phenomenex-Kartuschen mit einem Elutionsvolumen von 6 ml Methanol signifikant niedriger als bei Einsatz der SPE-Kartuschen von Supelco (mit $p=0,008$, gepaarter t-Test).

In einer zweiten Versuchsreihe wurde die optimale Elutionsmenge für die Phenomenexkartuschen ermittelt. Es wurden Elutionsvolumina von 6,5 bis 8 ml Methanol im Vergleich zu 3 ml Aceton + 8 ml Methanol getestet. Auch unter Verwendung der Phenomenex-Kartuschen ist der Verzicht auf Aceton möglich. Die optimale Elutionsmenge beträgt für die Phenomenexkartuschen jedoch 7 und nicht 6 ml (Abbildung 11).

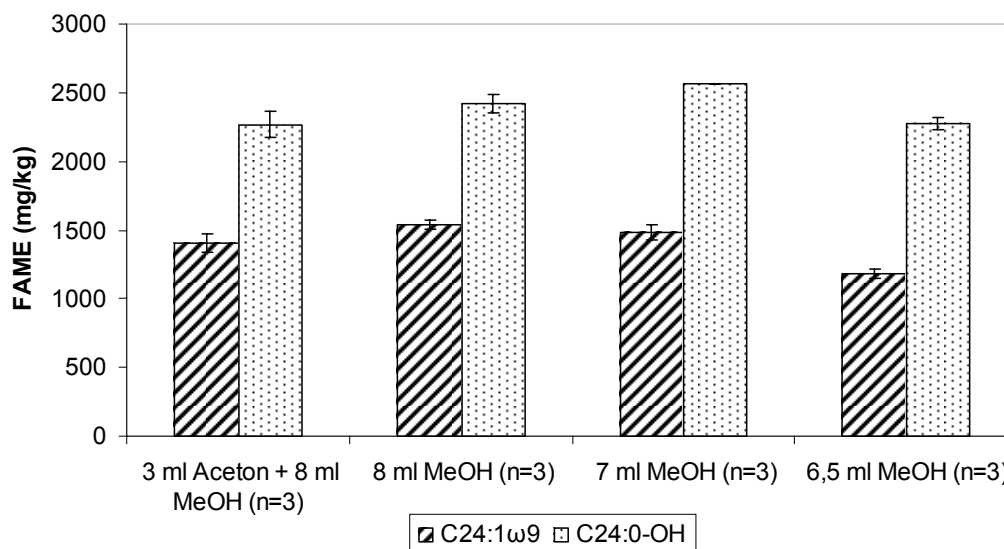


Abbildung 11: Ermittlung der optimalen Elutionsmenge für die FAME bei Verwendung von SPE-Kartuschen der Herstellers Phenomenex.

Zusammenfassend lässt sich aus diesen Ergebnissen schlussfolgern, dass die Überprüfung der Ergebnisse für die SPE nach dem Wechsel der Herstellerfirma notwendig ist, da sich die Bedingungen für das Erzielen optimaler Werte ändern können.

4.1.3.2 Reduktion der Methylierungsdauer

Gemäß der RGT-Regel (Reaktionsgeschwindigkeit-Temperatur-Regel) verdoppelt sich die Reaktionsgeschwindigkeit bei einer Temperaturerhöhung um 10 °C. Im Vorprojekt 03HS011 wurde ermittelt, dass bei einer Temperatur von 60 °C eine Zeitdauer von mindestens 12 h benötigt wird, um eine vollständige Reaktion zu erzielen. Die theoretische Berechnung der Methylierungsdauer bei einer Temperatur von 90 °C ergibt somit laut RGT-Regel eine Zeitdauer von 1,5 h. Diese Berechnung war Ausgangspunkt dieser Untersuchungen. Für die Methylierungstemperatur von 90 °C wurden drei verschiedene Zeiten getestet: 1 h, 1,5 h und 2 h Methylierungsdauer (Abbildung 12). Bei allen drei Zeiträumen konnte ein höherer Gehalt an Fettsäuremethylestern (FAME) detektiert werden. Zwischen den drei Zeiträumen konnte mittels einseitiger ANOVA kein signifikanter Unterschied der Mittelwerte der C24:0-OH festgestellt werden ($p=0,226$). Bei der C24:1ω9 wurde ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den Zeiträumen festgestellt ($p=0,107$).

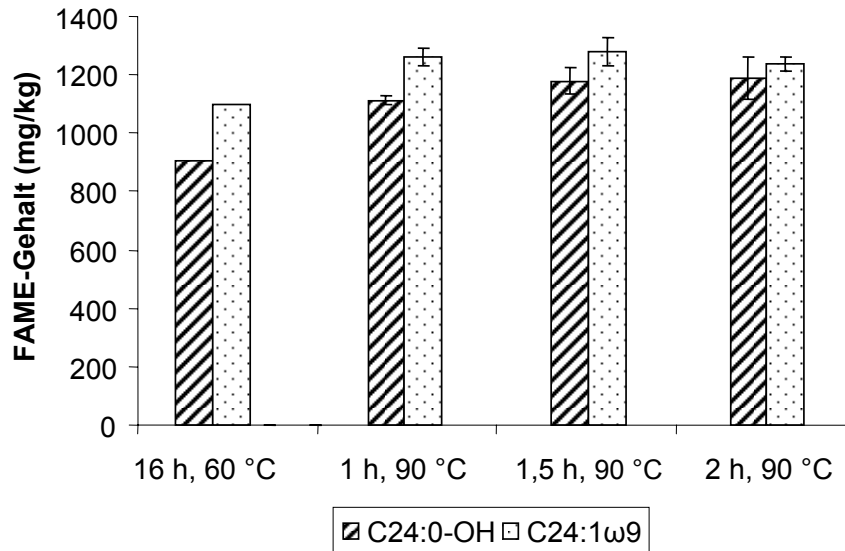


Abbildung 12: Vergleich der Gehalte an FAME C24:1ω9 und C24:0-OH bei einer Methylierungsdauer von 16 h bei 60 °C (n=1) und bei 1 h, 1,5 h sowie 2 h bei einer Temperatur von 90 °C (n=4).

Unter Anwendung der Zeitdauer von 1,5 h wurden in einer weiteren Untersuchung Methylierungstemperaturen von 70 bis 90 °C getestet (Abbildung 13). Während bei 70 °C suboptimale Werte für die nicht hydroxylierten und hydroxylierten Fettsäuren gemessen wurden, konnte ein leichter Anstieg des Fettsäuremethylester-Gehaltes mit steigender Temperatur beobachtet werden. Signifikante Unterschiede bei der einseitigen ANOVA ergaben sich für die C24:1ω9 ($p=0,045$). Im weiteren Testverlauf konnte festgestellt werden, dass die Methylierung bei 70 °C signifikant von der klassischen Methylierung (16 h, 60 °C) abweicht ($p=0,019$). Dagegen konnten für die C24:0-OH keine signifikanten Unterschiede bei allen drei Temperaturen berechnet werden ($p=0,338$, einseitige ANOVA).

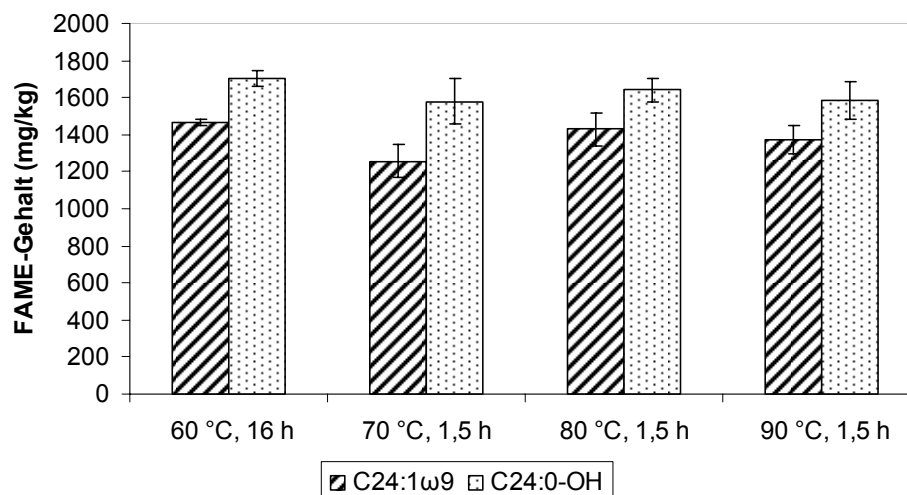


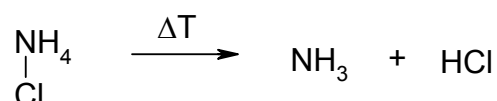
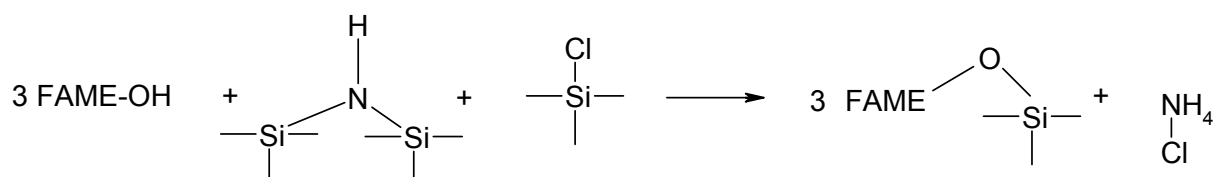
Abbildung 13: Vergleich der Gehalt an FAME C24:1ω9 und C24:0-OH der klass. Methylierung (60 °C, 16 h) mit Methylierungstemperaturen von 70-90 °C bei einer Methylierungsdauer von 1,5 h (n=3).

Um sicherzugehen, dass ein vollständiger Reaktionsumsatz stattfindet, wurde für die Methylierung eine Zeitdauer von 1,5 h bei einer Reaktionstemperatur von 90 °C gewählt. Dadurch ergibt sich eine Zeitersparnis von 14,5 h (90,6 %). Somit ist die Probenvorbereitung innerhalb von acht Arbeitsstunden möglich. Auf diese Weise konnte der Zeitaufwand für die Probenvorbereitung um 50 % von zwei Werktagen auf einen Werktag reduziert werden.

4.1.3.3 Verwendung eines alternativen Silylierungsmittels

Das bislang verwendete Silylierungsgemisch Pyridin/Hexamethyldisilazan/Trimethylchlorasilan (Pyridin/HMDS/TMCS) im Verhältnis: 10:3:1 (v/v/v) führt zur Bildung der Nebenprodukte Ammoniumchlorid und Siliziumdioxid. Ammoniumchlorid dissoziiert mit steigender Temperatur zunehmend in Ammoniak und Salzsäure (Formel 1).

Formel 1: Silylierung der Hydroxyfettsäuremethylester und Zersetzung des Nebenproduktes Ammoniumchlorid unter Hitzeinwirkung im GC-Injektor.



Diese Verbindungen fügen der stationären Phase der GC-Kapillarsäule große Schäden zu und verursachen somit einen hohen Verschleiß der Trennsäule. Um diese Nachteile zu vermeiden, war es notwendig, alternative Silylierungsmittel zu testen. Es wurden drei Silylierungsmittel ausgewählt: N,O-Bis(trimethylsilyl)-acetamid (BSA), N,O-Bis(trimethylsilyltrifluoro)-acetamid (BSTFA) und Trimethylsilylimidazol (TMSIM). Allen Silylierungsreagenzien wurden zunächst 1 % TMCS zugesetzt. Alle Werte wurden in dreifachen Aufarbeitungen einer Hirnprobe vom Schwein und jeweils Einfachmessung bestimmt.

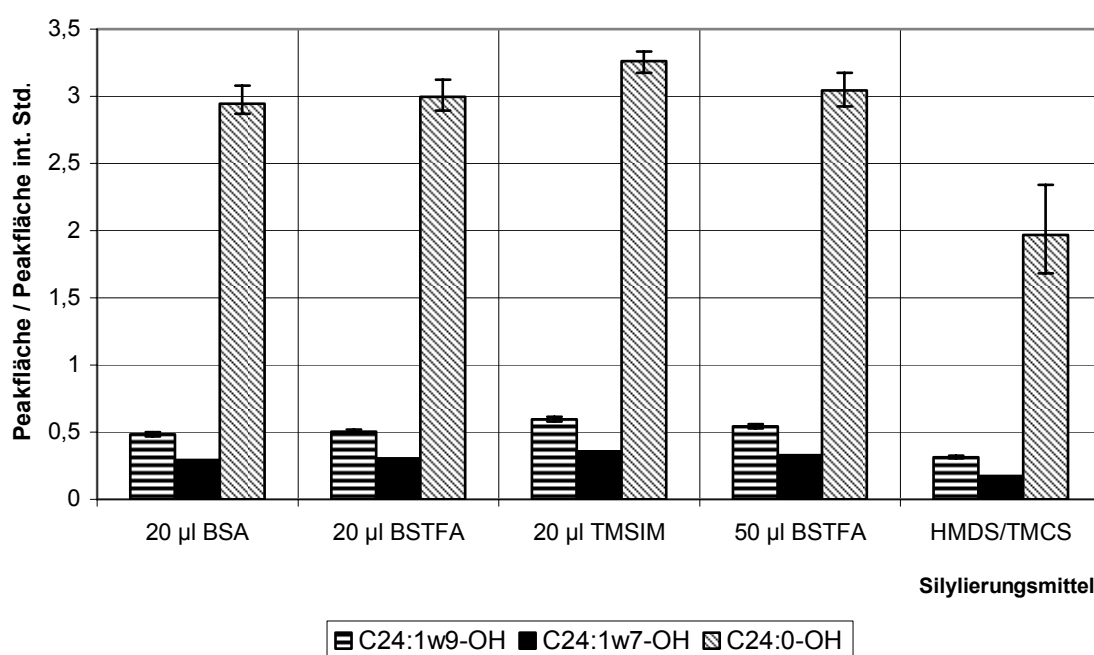


Abbildung 14: Darstellung der auf den internen Standard normierten Peakflächen der ω 7- und ω 9-Hydroxytetracosensäure sowie der Cerebronsäure bei Verwendung unterschiedlicher Silylierungsmittel (Zusatz von 1 %TMCS).

Der Vergleich der Mittelwerte aller drei Hydroxyfettsäuren zeigt einen leicht erhöhten Wert bei der Verwendung von 20 µl TMSIM (Abbildung 14). Mit 20 µl TMSIM konnten gegenüber dem Einsatz von 20µl BSA ($p=0,016$, gepaarter t-Test) und 20 µl BSTFA ($p=0,048$, gepaarter t-Test) signifikant höhere Ergebnisse erzielt werden. Für den Einsatz von 50 µl BSTFA hingegen konnte kein Unterschied zu 20 µl TMSIM festgestellt werden ($p=0,208$). Gegenüber der klassischen Methode mit HMDS/TMCS führt die Verwendung von 20 µl TMSIM zu wesentlich erhöhten Peakflächen ($p=0,018$, gepaarter t-Test). Die Wahl des alternativen Silylierungsmittels fiel daher auf TMSIM, da mit diesem Reagenz trotz des geringen Volumens von

20 µl eine größere Reaktionsausbeute im Vergleich zur bestehenden Methode erzielt werden konnte.

In einem weiteren Versuch wurde untersucht, welchen Einfluß das Lösungsmittel auf die Ausbeute der Silylierungsreaktion hat. Ziel war dabei, auf Pyridin zu verzichten und eine geeignete Alternative zu finden. Grundlegende Bedingung für den Einsatz als Silylierungsmittel sind eine gute Löslichkeit für Agenz, Reagenz und Reaktionsprodukte sowie das Fehlen silylierbarer Gruppen, um Konkurrenzreaktionen auszuschließen. Da das Derivatisierungsmittel TMSIM die höchsten Reaktionsausbeuten (Abbildung 14) aufwies, wurden für dieses Silylierungsmittel die alternativen Lösungsmittel Toluol, Pyridin und Dimethylformamid (DMF) im Vergleich zur konventionellen Methode mit HMDS/TMCS in Pyridin getestet. Dazu wurden 50 µl TMSIM in je 100 µl Pyridin, Toluol bzw. DMF gelöst und den bis zur Trockne eingedampften Fettsäuremethylestern der Probe hinzugegeben. Für die Reaktion wurde das Silylierungsgemisch für 5 min auf 100 °C erwärmt. Es erfolgte die Zugabe von 1 ml *n*-Hexan, welches die Fettsäuremethylester und die Trimethylsilylether der Hydroxyfettsäuremethylester hervorragend löst.

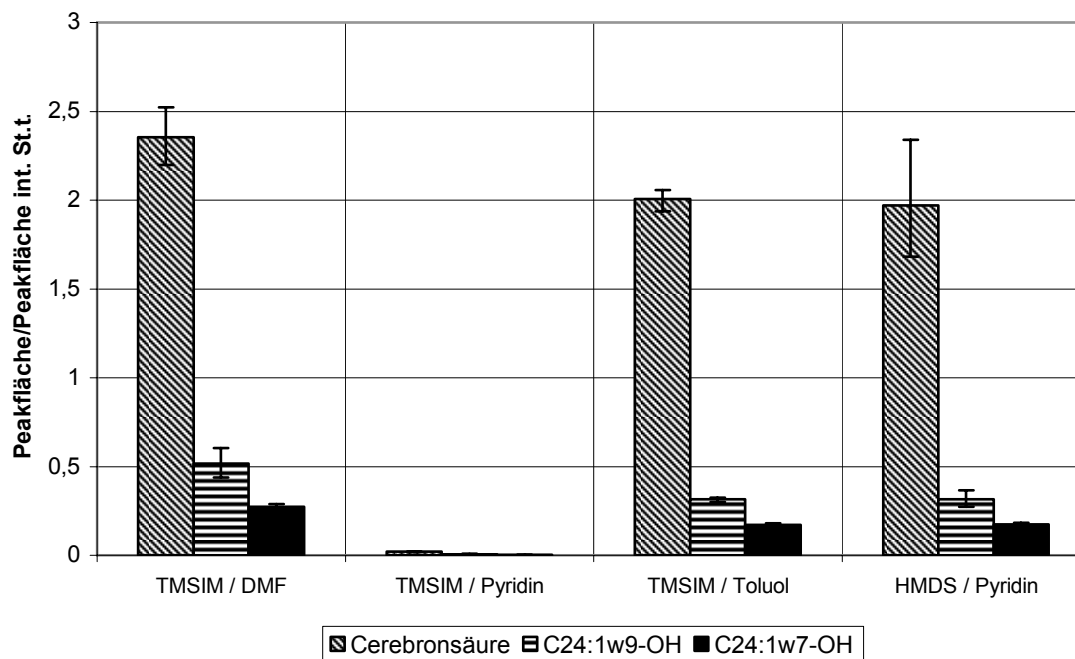


Abbildung 15: Darstellung der auf den internen Standard normierten Peakflächen der ω 7- und ω 9-Hydroxytetracosensäure sowie der Cerebronsäure bei Verwendung unterschiedlicher Lösungsmittel während der Silylierung.

Zwischen den Versuchsreihen TMSIM in DMF bzw. Toluol und HMDS in Pyridin ergab der Varianzvergleich mittels einseitiger ANOVA keine signifikanten Unterschiede. Der Einsatz des Silylierungsmittels TMSIM in Pyridin war jedoch signifikant schlechter ($p = 0,009 - 0,013$) als jede andere der Versuchsreihen (Abbildung 15). Für weitere Messungen wurde das Lösungsmittel DMF ausgewählt, da es eine hervorragende Löslichkeit für das Silylierungsmittel bietet. Zudem erfolgt der Übergang der Trimethylsilylether und der FAME von der DMF- in die *n*-Hexanphase während des Ausschüttelns vollständig. Dies konnte mit gezielten GC-Messungen der DMF-Phase nachgewiesen werden. Durch Abtrennung der Reaktionsprodukte und des überschüssigen Silylierungsmittels konnte die Verschmutzung des GC-Einlaßsystems verringert werden.

In einem weiteren Versuch wurde hinsichtlich der Reaktionstemperatur getestet, ob die Silylierung auch bei Raumtemperatur vollständig verläuft. Dazu wurden gleichartige Proben auf identische Weise aufgearbeitet und für 5 bzw. 20 min bei Raumtemperatur sowie für 5 min bei 100 °C silyliert.

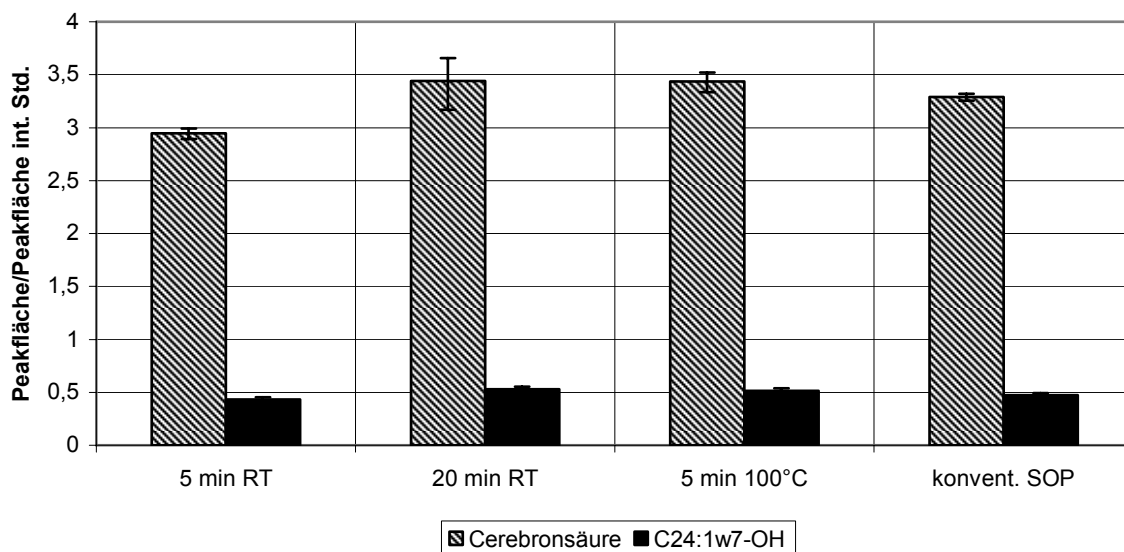


Abbildung 16: Darstellung der auf den internen Standard normierten Peakflächen der Cerebronsäure und der ω 9-Hydroxy-tetracosensäure bei verschiedenen Zeiten bei Raumtemperatur (RT), bei einer Zeitdauer von 5 min bei 100 °C sowie unter Anwendung der konventionellen SOP.

Im Vergleich der vier Versuchsreihen ist festzustellen, dass bei erhöhter Temperatur (100°C) eine Reaktionsdauer von 5 min ausreichend ist. Die statistische Überprüfung des Ergebnisses mittels einseitiger ANOVA zeigte signifikante Unterschiede für die Zeitdauer 5 min bei Raumtemperatur und 100 °C ($p=0,017$) sowie für die Zeitdauer 5 min und 20 min bei Raumtemperatur ($p=0,025$). Somit ist zu schlussfolgern, dass eine erhöhte Temperatur notwendig ist, um innerhalb der kurzen Reaktionszeit von 5 min einen vollständigen Reaktionsumsatz zu erzielen. Eine verlängerte Reaktionsdauer von 20 min würde ebenfalls zu einem vollständigen Reaktionsumsatz führen, hätte jedoch auch eine Verlängerung der Zeitdauer des Analysenverfahrens um 15 min zur Folge.

Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass mittels TMSIM optimale Resultate für die Silylierung der Hydroxygruppen bei minimalen Chemikalieneinsatz und geringerem Verschleiß der Teile des GC-Einlaßsystems sowie der Kapillarsäule erzielt wurden. Bei Verwendung von 50 μ l TMSIM in 100 μ l Dimethylformamid (DMF) konnten bei einer Reaktionsdauer von 5 min bei 100 °C, im Vergleich zur konventionellen SOP aus dem vorangegangenen Projekt, nahezu identische Reaktionsausbeuten erzielt werden. Der Chemikalieneinsatz zur Derivatisierung konnte somit von 500 μ l auf 150 μ l verringert werden. Durch den Wegfall von Trimethylchlorsilan wird die Bildung von unerwünschten Nebenprodukten verhindert.

4.1.3.4 Kalibration aus der Probenmatrix

Für die Quantifizierung des ZNS-Gehaltes der untersuchten Fleischerzeugnisse wird die Cerebronsäure als Marker verwendet, da sie über die höchste Konzentration im tierischen ZNS verfügt. Diese Hydroxyfettsäure kommt jedoch in Spuren auch in anderen als ZNS-Geweben vor. Zur Vermeidung von falsch-positiven Resultaten wurde bereits im vorangegangenen Forschungsvorhaben (03HS011) ein Cut-off-Wert für die Cerebronsäure von 2,43 mg/kg berechnet. Dies entspricht einem ZNS-Gehalt beim Rind von 0,2 % ZNS. Jedoch war die Quantifizierung des ZNS-Gehaltes aufgrund starker Matrixeffekte durch eine Vielzahl an Begleitverbindungen in der komplexen chemischen Umgebung der Analyten problematisch. Die externe Kalibration mittels reiner Stammlösungen der in Toluol gelösten Fettsäuremethylester Lignocerinsäuremethylester (C24:0), ω 9-Tetracosensäuremethylester (C24:1 ω 9) und Cerebronsäuremethylester (C24:1-OH) resultierte zwar in Kalibrationsgeraden hervorragender Linearität (Bestimmtheitsmaß $R^2 > 0,99$) sowie Reproduzierbarkeit (RSD 0,5 %, n=4). Jedoch überstieg der mittels Analyse ermittelte Gehalt der Verbindungen in Proben mit definiertem ZNS-Zusatz die Vorgaben, in einigen Fällen bis zum Vierfachen. Die Wiederfindungsraten lagen beim Vorversuch im Mittel bei 190 % (n=26, 40 - 440 %) mit einer Schwankungsbreite, ausgedrückt als relative Standardabweichung RSD von 61,2 %. Daher wurde nach alternativen Quantifizierungsmöglichkeiten gesucht. Einen großen Vorteil hätte die Addition eines am Fettsäurerest deuterierten komplexen Standardlipids zu Beginn der Probenvorbereitung. Eine solche Verbindung ist ideal zur Überwachung der Reproduzierbarkeit während der Probenvorbereitung. Nachteilig für die Quantifizierung ist jedoch das Vorliegen des Standards als Einzelkomponente. Im Gegensatz dazu liegen die Zielfettsäuren in einem großen Verband unterschiedlicher Verbindungen eingeschlossen in den Gewebezellen vor. Um die gewünschten Komponenten analytisch verfügbar zu machen, muss die Zellmembran aufgebrochen werden. Da anzunehmen ist, dass dieser Prozess ebenso wie die Extraktion der Analyten aus dem aufgebrochenen Zellgewebe nicht zu 100 % vollständig verläuft bzw. Matrix-Effekte durch Begleitkomponenten auftreten, würde eine Quantifizierung über ein deuteriertes Lipid zu Minderbefunden führen. Daher wurde eine weitere Möglichkeit in Betracht gezogen: die Kalibration aus einer identischen Brühwurstmatrix mit definiertem ZNS-Zusatz. Für die Durchführung der Kalibration aus der Probenmatrix wurden Brühwurststandards mit 0 % (Sa0), 0,5 % (Gemisch aus Sa0 und Sa1), 1 % (Sa1) sowie 3 % (Sa3) ZNS-Zusatz vom Rind verwendet. Diese wurden auf identische Weise, nach der optimierten SOP, aufgearbeitet wie die Realproben. Für die Auswertung und das Erstellen der Kalibrationsgeraden wurde der ZNS-Gehalt des Standards über der auf den internen Standard normierten Peakfläche der hydroxylierten Fettsäuren aufgetragen. Die einzelnen Kalibrationspunkte wiesen relative

Standardabweichungen von 10 - 63 % auf. Bei der Bewertung dieser Ergebnisse muss jedoch beachtet werden, dass bei dieser Art der Kalibration eine vollständige Probenvorbereitung erfolgt ist, wodurch sich zwangsläufig ein größerer Fehler als bei der externen Kalibration ergibt. Die Linearität für den Marker Cerebronsäure war dennoch sehr gut ($R^2=0,998$; Abbildung 17).

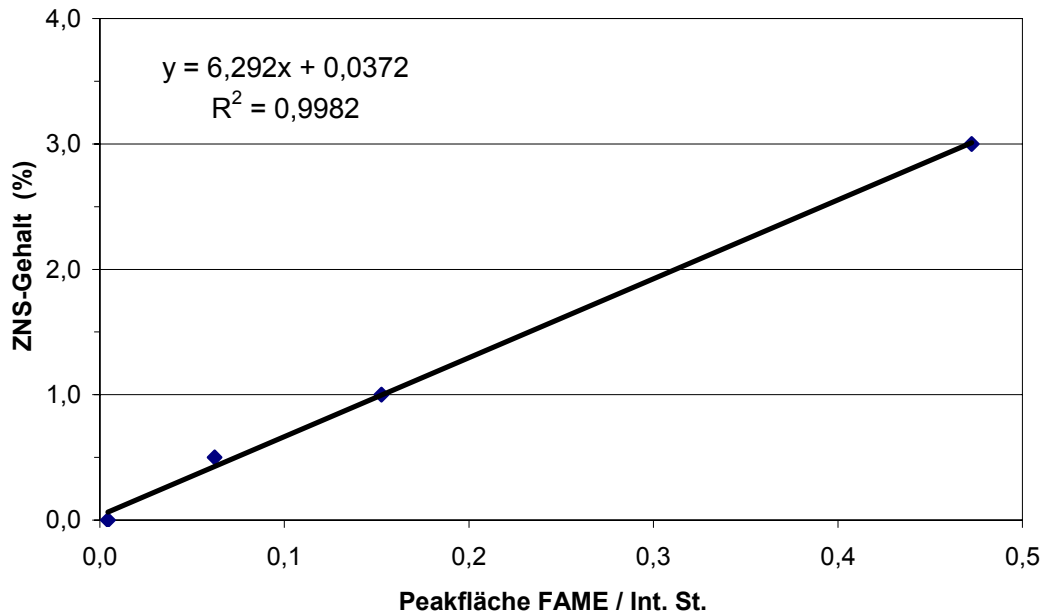


Abbildung 17: Kalibrationsgerade der Matrixkalibration für die Cerebronsäure C24:0-OH

Die quantitative Analyse von Realproben mittels Matrixkalibration war sehr zufrieden stellend. Für den ZNS-Gehalt 0 - 3% lag die Wiederfindungsrate im Mittel bei 100 % ($n=16$, 60 - 220 %), mit einer Schwankungsbreite, ausgedrückt als relative Standardabweichung RSD von 40,2 %. Aufgrund dieser guten Ergebnisse wurde die SOP aktualisiert und die externe Kalibration durch die Kalibration aus der Brühwurstmatrix ersetzt. Hierfür wurde aufgrund der leichteren Verfügbarkeit auf das ZNS vom Schwein (6 Monate) zurückgegriffen.

Optimierung der Differenzierung der ZNS-Spezies

Für die Differenzierung zwischen mehreren Spezies (Rind, Schaf, Schwein, Geflügel) hatte sich die Notwendigkeit der Anpassung der Tierartbestimmung ergeben. Darüberhinaus hatte der im vorhergehenden Projekt durchgeführte Blindversuch gezeigt, dass eine Optimierung der Differenzierung zwischen den Tierarten Rind und Schaf geboten ist.

Aus diesen Gründen wurden umfangreiche Untersuchungen über die Eignung weiterer Fett-säureverhältnisse für die Tierartdifferenzierung vorgenommen. Im Ergebnis konnten zwei neue Verhältnisse ($C24:1\omega9-OH / C25:0-OH$) und ($C24:1 \omega9 / \omega7$)/($C24:1 \omega9-OH / \omega7-OH$) identifiziert werden. Desweiteren wurde eine zweistufige Differenzierung eingeführt (siehe Kapitel 6 und Abbildung 18).

Das Verhältnis $C24:1\omega9-OH / C25:0-OH$ wurde für die erste Stufe der Tierartdifferenzierung eingesetzt, die Differenzierung zwischen Wiederkäuern und Nichtwiederkäuern. In der zweiten Stufe erfolgten dann die Differenzierungen innerhalb der Gruppe der Wiederkäuer (Rind/Schaf) bzw. der Gruppe der Nichtwiederkäuer (Schwein/Geflügel).

Da für die Berechnung des Alters unterschiedliche bzw. tierartabhängige Verhältnisse zum Einsatz kommen (siehe Kapitel 6), ist der zweite Differenzierungsschritt essentiell für die Identifizierung von SRM-Material. Zu diesem Zweck wurde das Verhältnis ($C24:1 \omega9 / \omega7$)/($C24:1 \omega9-OH / \omega7-OH$) für die Trennung zwischen Rind und Schaf in die Tierartdifferenzierung aufgenommen. Für die Differenzierung innerhalb der Gruppe der Nichtwiederkäuer wurden die zwei Verhältnisse ($C24:1\omega9-OH / C25:0-OH$ und $C24:1\omega7-OH / C24:1\omega9-OH$) als geeignet identifiziert und für die Trennung verwendet.

Basierend auf den Daten der erweiterten ZNS-Datenbank wurden neue Grenzwerte für die in die Auswertung einbezogenen FS-Verhältnisse berechnet. Zur Erleichterung der Auswertung ihrer Ergebnisse, wurde den Ringtestteilnehmern ein Fließschema für die Tierartdifferenzierung übermittelt (Abbildung 18).

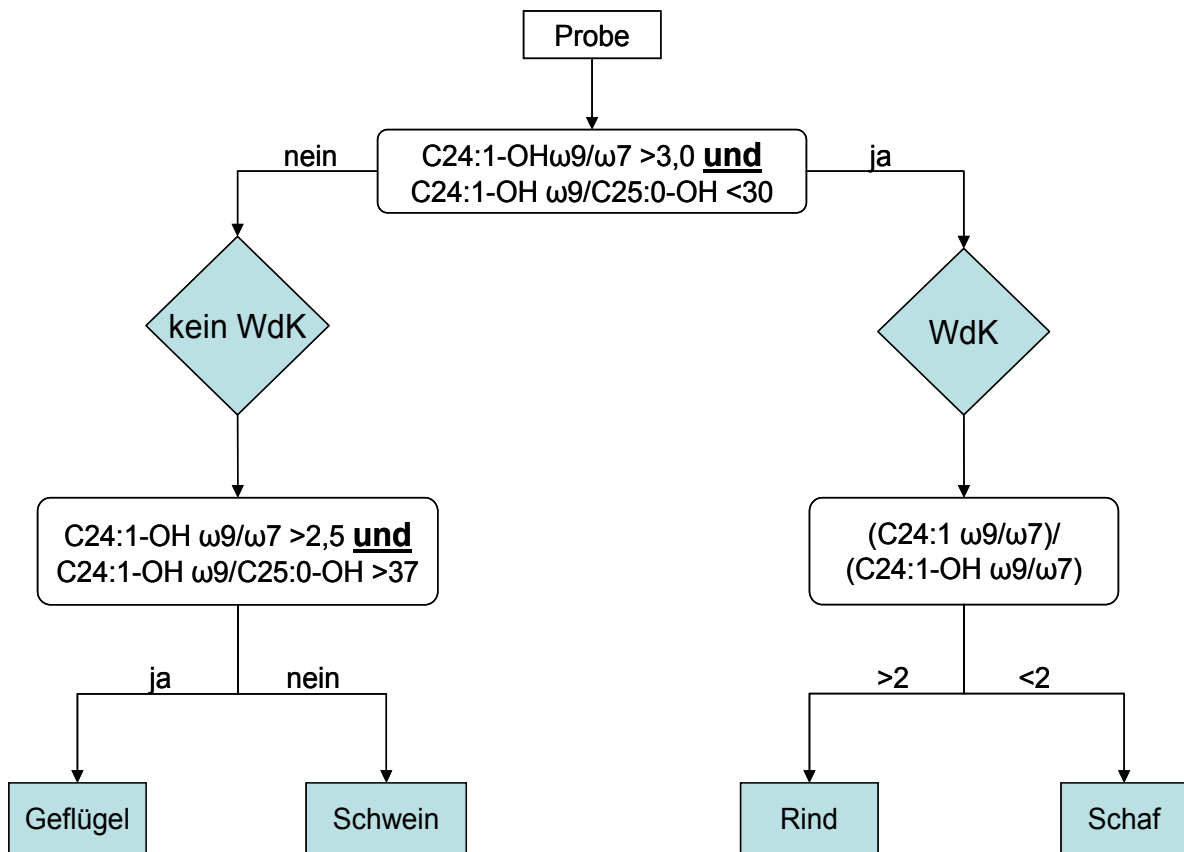


Abbildung 18: Fließschema zur Tierartdifferenzierung (WdK: Wiederkäuer)

Laborinterne Validierung nach der Methodenoptimierung

Den Abschluss für die Arbeiten zur Methodenoptimierung und SOP-Anpassung bildeten Analysen zur laborinternen Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit. Dazu wurden an drei aufeinander folgenden Tagen jeweils 10 Proben des Brühwurststandards mit 3 % ZNS-Zusatz mit zufrieden stellendem Ergebnis analysiert. Die Wiederholpräzision innerhalb eines Tages lag zwischen 3,6 % und 8,9 %. Die Reproduzierbarkeit innerhalb von drei Tagen lag bei 9,5 %.

4.1.4 Erste Validierung und Charakterisierung des Verfahrens auf qualitativer Basis (Ringtest 1, Meilenstein 4)

Für den ersten Ringtest stand die Validierung der qualitativen Aussagen des SRM-Referenzverfahrens im Vordergrund. Dazu zählte

- a) die Differenzierung zwischen ZNS-positiven und ZNS-negativen Proben, sowie die Überprüfung des Cut-Off-Wertes;
- b) die Identifikation der Tierart bei nachgewiesenem ZNS;
- c) die Kategorisierung des Tialters bzw. Berechnung des Tialters bei nachgewiesenem Wiederkäuer-ZNS.

Hierzu wurden Anfang September 2007 Brühwurststandardmaterialien an alle 19 teilnehmende Laboratorien versandt. Zur Durchführung des ersten Ringtests erhielten die Teilnehmer vier Brühwurststandards (0 %, 0,5 %, 1 %, 3 % ZNS-Gehalt) zur Kalibration, 27 anonymisierten Brühwurstproben (0 % oder 3 % ZNS-Gehalt), 1 ml interner Standard, jeweils 80 Vials, Wägschälchen und Zentrifugenröhrchen. Aufgrund der Kritik einiger Teilnehmer hinsichtlich der hohen Arbeitsbelastung für die Analyse sämtlicher Proben wurde eine Teilung der Proben in zehn primäre (obligatorisch) und 17 sekundäre (fakultativ) Messproben vorgenommen (Tabelle 13). Für eine erfolgreiche Teilnahme an diesem Versuch wurde die Bearbeitung der primären Messproben als ausreichend erachtet. Die Messung der sekundären Proben erfolgte auf freiwilliger Basis und wurde von 6 Laboratorien teilweise oder komplett durchgeführt.

Da bereits im vorangegangenen Forschungsvorhaben 03HS011 nachgewiesen werden konnte, dass die Erkitzung keinen Einfluss auf die Tierartendifferenzierung ausübt, wurden die hochoerhitzten (133°C, 30°min) lediglich als Sekundärproben untersucht.

Tabelle 13: Probenplan des ersten Ringtests

Probenschlüssel	Verwendung	ZNS-Gehalt (%)	Tierart	Alter (Monate)	Erhitzung (°C)
RV1-BW0		0	Schwein	6	110
RV1-BW0,5	Standard (Kalibration)	0,5	Schwein	6	110
RV1-BW1		1	Schwein	6	110
RV1-BW3		3	Schwein	6	110
RV1-2		2	Geflügel	1	110
RV1-3		0	-	-	110
RV1-8		3	Rind	35	110
RV1-9	Primäre Messprobe (anonymisiert)	3	Schwein	27	110
RV1-10		3	Schaf	5	110
RV1-14		2	Geflügel	14	110
RV1-19		0	-	-	110
RV1-20		3	Schaf	27	110
RV1-23		3	Rind	5	110
RV1-25		3	Schwein	6	110
RV1-1			0	-	-
RV1-4		3	Rind	35	130
RV1-5		3	Schaf	27	130
RV1-6		3	Schwein	27	130
RV1-7		0	-	-	110
RV1-11		2	Geflügel	1	130
RV1-12		0	-	-	110
RV1-13	Sekundäre Messprobe (anonymisiert)	0	-	-	110
RV1-15		3	Schwein	6	130
RV1-16		3	Rind	5	130
RV1-17		2	Geflügel	14	130
RV1-18		3	Schaf	5	130
RV1-21		3	Rind	19	110
RV1-22		0	-	-	110
RV1-24		0	-	-	110
RV1-26	0	-	-	110	
RV1-27		3	Rind	19	130

Weiterhin wurde den Ringtestteilnehmern die überarbeitete SOP zugesandt. Über die Fa. Sigma-Aldrich erhielten die Teilnehmer wiederum auf Kosten des Ausrichters des Ringtests Kartuschen sowie die Derivatisierungsmittel methanolische Salzsäure und Trimethylsilylimidazol (TMSI). Die Rückmeldung der Ergebnisse erfolgte, wie auch in den anderen Versuchsteilen, in elektronischer Form als Excel Tabelle (Tabelle 14). Diese wurde den Teilnehmern zusammen mit der SOP auf CD-ROM zur Verfügung gestellt.

Tabelle 14: Formular zur Ergebnisrückmeldung

Teilnehmer Laborcode:

Kalibrierungsdaten															
Aufarbeitung (g)	Messung	Standard	ZNS (%)	Tierart	Alter	Datum	Einwaage (g)	Area							
								IS C22 D2	C24:1w9	C24:1w7	C24:1-OHw9	C24:1-OHw7	C24:0-OH	C25:0-OH	
1	1	BW-0	0	-	-										
1	1	BW-0.5	0.5	Schwein	6 Monate										
2	1	BW-0.5	0.5	Schwein	6 Monate										
1	1	BW-1	1	Schwein	6 Monate										
1	2	BW-1	1	Schwein	6 Monate										
1	3	BW-1	1	Schwein	6 Monate										
2	1	BW-1	1	Schwein	6 Monate										
1	1	BW-3	3	Schwein	6 Monate										
2	1	BW-3	3	Schwein	6 Monate										

FAME	ret. Time	Masse
C24:0-OH		
C24:1w9		
C24:1w7		
C24:1-OHw9		
C24:1-OHw7		
C25:0-OH		

Nr.	Fehler
1	Probenverlust vor Zugabe des IS
2	schlechte Elution der Probe während der SPE
3	weißer Niederschlag im Eluat
4	Probenverlust nach Zugabe des IS
5	weißer Niederschlag bei Zugabe der methanol. HCl
6	Verlust an methanol. HCl
7	sonstiges, Erläuterung bitte

Messergebnisse obligatorische Proben

Probe	Datum	Einwaage (g)	Area					Verhältnisswerte			Auswertung					
			IS C22 D2	C24:1w9	C24:1w7	C24:1-OHw9	C24:1-OHw7	C24:0-OH	C25:0-OH	V1: C24:1w9 / w7	V2: C24:1w9-OH / w7-OH	C24:1w9-OH / C25:0-OH	ZNS (%)	Tierart	Tieralter	
RV1-2																
RV1-2																
RV1-3																
RV1-3																
RV1-8																
RV1-8																
RV1-9																
RV1-9																
RV1-10																
RV1-10																
RV1-14																
RV1-14																
RV1-19																
RV1-19																
RV1-20																
RV1-20																
RV1-23																
RV1-23																
RV1-25																
RV1-25																

4.1.4.1 Qualitative Auswertung der Messergebnisse

Die Identifizierung von SRM erfordert eine korrekte Bestimmung von ZNS sowie dessen Tierart und Alter. Im Folgenden werden die Ergebnisse in der Reihenfolge Gewebe-Tierart-Alter präsentiert.

Für die Unterscheidung zwischen ZNS positiven und negativen Proben beträgt der verwendete Cut-Off 0,2 % ZNS (Kapitel 4.1.3.4). Die Konzentration wird anhand des Gehaltes an Cerebronsäure mittels Kalibration der Brühwurststandards ermittelt (SOP, Anhang A.5).

Die Ergebnisse der Primärproben (Tabelle 15) und der Sekundärproben (Tabelle 16) zeigen, dass 13 von 14 Teilnehmern eine korrekte Zuordnung aller Proben vorgenommen haben. Die Messwerte von Teilnehmer 1 weisen aufgrund starker Streuung auf Probleme in der Probenaufarbeitung hin, die sich auch in der Kalibration der Brühwurststandards bestätigen (siehe Labor 1 im Anhang Abbildung 37). Im Ergebnis einer Rücksprache mit Teilnehmer 1 wurden die Fehler auf die Bearbeitung durch eine ungeübte Mitarbeiterin zurückgeführt.

Tabelle 15: Differenzierung der Primärproben zwischen ZNS positiv/negativ (Cut-Off 0,2% ZNS) (n=14 Laboratorien)

Labor	RV1- 2 pos	RV1- 3 neg	RV1- 8 pos	RV1- 9 pos	RV1- 10 pos	RV1- 14 pos	RV1- 19 neg	RV1- 20 pos	RV1- 23 pos	RV1- 25 pos
1	pos	<u>pos</u>	pos	pos	pos	pos	<u>pos</u>	pos	pos	pos
2	pos	neg	pos	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos
3	pos	neg	pos	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos
5	pos	neg	pos	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos
7	pos	neg	pos	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos
8	pos	neg	pos	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos
10	pos	neg	pos	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos
11	pos	neg	pos	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos
14	pos	neg	pos	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos
15	pos	neg	pos	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos
17	pos	neg	pos	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos
18	pos	neg	pos	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos
19	pos	neg	pos	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos
21	pos	neg	pos	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos

pos - positive Probe (ZNS >0,2%)
 neg - negative Probe (ZNS <0,2%)
 rot/unterstrichen - Fehlklassifikation

Die fakultativen, sekundären Proben wurden von 4 Teilnehmern vollständig sowie von 2 Teilnehmern zum Teil bearbeitet. Entsprechend der Ergebnisse der obligatorischen, primären Proben wurden hier ebenfalls, mit Ausnahme von Teilnehmer 1, alle Bestimmungen korrekt durchgeführt. Die falschen Zuordnungen von Teilnehmer 1 beruhten ausschließlich auf falsch-positiven Ergebnissen (Tabelle 16).

Tabelle 16: Differenzierung der Sekundärproben zwischen ZNS positiv/negativ (Cut-Off 0,2% ZNS) (n=6 Laboratorien)

Labor	RV1-1 neg	RV1-4 pos	RV1-5 pos	RV1-6 pos	RV1-7 neg	RV1-11 pos	RV1-12 neg	RV1-13 neg	RV1-15 Pos	RV1-16 pos
1	<u>pos</u>	n.b.	pos	pos	<u>pos</u>	pos	<u>pos</u>	n.b.	n.b.	n.b.
5	neg	pos	pos	pos	neg	pos	neg	n.b.	pos	pos
10	neg	pos	pos	pos	neg	pos	neg	neg	pos	pos
14	neg	pos	pos	pos	neg	pos	neg	neg	pos	pos
17	neg	pos	pos	pos	neg	pos	neg	neg	pos	pos
18	neg	pos	pos	pos	neg	pos	neg	neg	pos	pos

Tabelle 16: Fortsetzung

Labor	RV1-17 pos	RV1-18 pos	RV1-21 pos	RV1-22 neg	RV1-24 neg	RV1-26 neg	RV1-27 Pos
1	pos	n.b.	pos	<u>pos</u>	n.b.	<u>pos</u>	n.b.
5	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
10	pos	pos	pos	neg	neg	neg	pos
14	pos	pos	pos	neg	neg	neg	pos
17	pos	pos	pos	neg	neg	neg	pos
18	pos	pos	pos	neg	neg	neg	pos

pos - positive Probe (ZNS >0,2%)
 neg - negative Probe (ZNS <0,2%)
 n.b. - freiwillige Probe wurde nicht bearbeitet
 rot/unterstrichen - Fehlklassifikation

Für die Bestimmung der Spezies des verarbeiteten ZNS wurde zunächst basierend auf den Verhältnissen aus C24:1-OH ω 9/ C24:1-OH ω 7 und C24:1-OH ω 9/ C25:0-OH eine Unterscheidung in Wiederkäuer (WDK) und nicht Wiederkäuer (kein WDK) vorgenommen.

Die Auswertung der Primärproben (Tabelle 17) ergab bei sechs Teilnehmern (43 %) eine korrekte Zuordnung bei allen Proben. Bei den restlichen Teilnehmern wurden Fehlklassifikationen in unterschiedlicher Anzahl verursacht.

Tabelle 17: Differenzierung der Primärproben zwischen Wiederkäuer (WDK) und Nicht-Wiederkäuer (kein WDK) (n=14 Laboratorien)

Labor	RV1-2 kein WDK	RV1-3 neg	RV1-8 WDK	RV1-9 kein WDK	RV1-10 WDK	RV1-14 kein WDK	RV1-19 neg	RV1-20 WDK	RV1-23 WDK	RV1-25 kein WDK
1	kein WDK	<u>kein WDK</u>	WDK	<u>WDK</u>	WDK	kein WDK	<u>WDK</u>	WDK	WDK	kein WDK
2	<u>WDK</u>	neg	WDK	kein WDK	WDK	<u>WDK</u>	neg	WDK	WDK	kein WDK
3	kein WDK	neg	WDK	kein WDK	WDK	kein WDK	neg	WDK	WDK	kein WDK
5	kein WDK	neg	WDK	kein WDK	WDK	kein WDK	neg	WDK	WDK	kein WDK
7	kein WDK	neg	WDK	kein WDK	WDK	kein WDK	neg	WDK	WDK	kein WDK
8	kein WDK	neg	WDK	<u>WDK</u>	WDK	kein WDK	neg	WDK	WDK	kein WDK
10	kein WDK	neg	WDK	kein WDK	WDK	<u>WDK</u>	neg	WDK	WDK	kein WDK
11	kein WDK	neg	WDK	kein WDK	WDK	<u>WDK</u>	neg	WDK	WDK	kein WDK
14	kein WDK	neg	WDK	kein WDK	<u>kein WDK</u>	kein WDK	neg	WDK	WDK	kein WDK
15	kein WDK	neg	WDK	kein WDK	WDK	kein WDK	neg	WDK	WDK	kein WDK
17	<u>WDK</u>	neg	WDK	kein WDK	WDK	<u>WDK</u>	neg	WDK	WDK	kein WDK
18	kein WDK	neg	WDK	kein WDK	WDK	kein WDK	neg	WDK	WDK	kein WDK
19	kein WDK	neg	WDK	kein WDK	WDK	kein WDK	neg	WDK	WDK	kein WDK
21	kein WDK	neg	WDK	kein WDK	<u>kein WDK</u>	kein WDK	neg	WDK	WDK	kein WDK

WDK (Wiederkäuer) - Tierarten Rind und Schaf
kein WDK - Tierarten Schwein und Geflügel
neg - negative Probe (ZNS <0,2%)
rot/unterstrichen - Fehlklassifikation

Hierbei wurde bei fünf Teilnehmern (36 %) lediglich eine Probe, bei zwei Teilnehmern (14 %) zwei Proben und von einem Teilnehmer (7 %) drei Proben falsch klassifiziert (Abbildung 19).

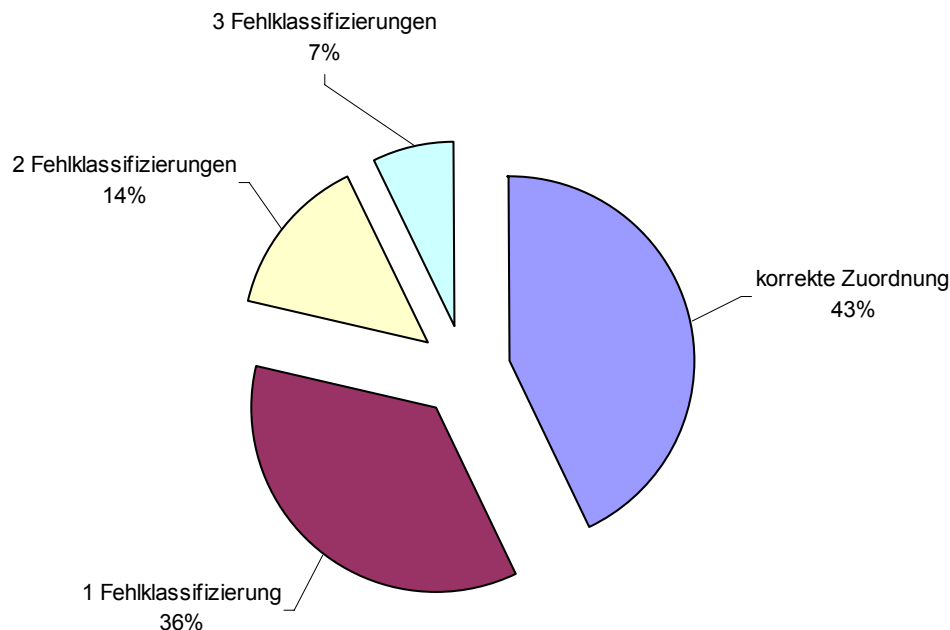


Abbildung 19: Relative Anzahl der Fehlklassifizierung bei der Differenzierung ZNS-positiver Proben in Wiederkäufer und Nicht-Wiederkäufer (14 Teilnehmer, 10 Proben).

Bei den Sekundärproben (Tabelle 18) gelang zwei Teilnehmern eine korrekte Einordnung für alle Proben, während drei Teilnehmer lediglich bei einer Probe eine falsche Zuordnung vorgenommen hatten. Hierbei handelte es sich um die Proben RV1-17 und RV1-18. Die Ergebnisse von Teilnehmer 1 führten zu einer fehlerhaften Zuordnung in sechs Fällen (RV1-1, RV1-6, RV1-7, RV1-12, RV1-22 und RV1-26). Fünf Proben hiervon waren bereits bei der Differenzierung als falsch-positiv eingeschätzt worden. Bei der Differenzierung Wiederkäufer/Nichtwiederkäufer wurden diese Proben den Nichtwiederkäuern zugeordnet. Die Probe RV1-6 wurde falsch-positiv als Wiederkäufer bewertet.

Tabelle 18: Differenzierung der Sekundärproben zwischen Wiederkäuer (WDK) und Nicht-Wiederkäuer (kein WDK) (n=6 Laboratorien)

Labor	RV1-1 neg	RV1-4 WDK	RV1-5 WDK	RV1-6 kein WDK	RV1-7 neg	RV1-11 kein WDK	RV1-12 neg	RV1-13 neg	RV1-15 kein WDK	RV1-16 WDK
1	<u>kein WDK</u>	n.b.	WDK	<u>WDK</u>	<u>kein WDK</u>	kein WDK	<u>kein WDK</u>	n.b.	n.b.	n.b.
5	neg	WDK	WDK	kein WDK	neg	kein WDK	neg	n.b.	kein WDK	WDK
10	neg	WDK	WDK	kein WDK	neg	kein WDK	neg	neg	kein WDK	WDK
14	neg	WDK	WDK	kein WDK	neg	kein WDK	neg	neg	kein WDK	WDK
17	neg	WDK	WDK	kein WDK	neg	WDK	neg	neg	kein WDK	WDK
18	neg	WDK	WDK	kein WDK	neg	kein WDK	neg	neg	kein WDK	WDK

Tabelle 18: Fortsetzung

Labor	RV1-17 kein WDK	RV1-18 WDK	RV1-21 WDK	RV1-22 neg	RV1-24 neg	RV1-26 neg	RV1-27 WDK
1	kein WDK	n.b.	WDK	<u>kein WDK</u>	n.b.	<u>kein WDK</u>	n.b.
5	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
10	<u>WDK</u>	WDK	WDK	neg	neg	neg	WDK
14	kein WDK	<u>kein WDK</u>	WDK	neg	neg	neg	WDK
17	<u>WDK</u>	WDK	WDK	neg	neg	neg	WDK
18	kein WDK	WDK	WDK	neg	neg	neg	WDK

WDK (Wiederkäuer) - Tierarten Rind und Schaf
kein WDK - Tierarten Schwein und Geflügel
neg - negative Probe (ZNS <0,2%)
n.b. - freiwillige Probe wurde nicht bearbeitet
rot/unterstrichen - Fehlklassifikation

Basierend auf den Ergebnissen der Differenzierung zwischen Wiederkäuern und Nicht-Wiederkäuern erfolgte die Zuordnung der Proben zu den Tierarten Rind / Schaf (WDK) oder Schwein / Geflügel (nicht WDK) (Abbildung 18). Die Ergebnisse der Tierartidentifizierung bei den Primärproben wurden in Tabelle 19 und für die Sekundärproben in Tabelle 20 zusammengefasst. Zur besseren Übersicht wurden die Fehlklassifikationen hervorgehoben. Für die

Primärproben kann gesagt werden, dass die Tierartidentifizierung des verarbeiteten ZNS weitestgehend korrekt vorgenommen wurde. Auffällig war lediglich Probe RV1-9 (Tierart Schwein), die in der Mehrzahl der Fälle der Tierart Geflügel zugeordnet wurde. Auch wurden Proben mit ZNS vom Geflügel den Tierarten Schaf und Rind zugeordnet (RV1-2 und RV1-14). Ausschlaggebend für diese Fehlklassifikation war hierbei die zuvor falsche Zuordnung zu den Wiederkäuern gewesen (siehe Tabelle 17).

Neben diesen Fehlklassifikationen traten auch Fehler bei der Trennung der zwei Tierarten Rind/Schaf auf (RV1-8, RV1-20 und RV1-23). Als Ursache konnten hier analytische Fehler identifiziert werden.

Tabelle 19: Tierartdifferenzierung der Tierarten Rind, Schaf, Geflügel und Schwein in den Primärproben (n=14 Laboratorien)

Labor	RV1-2 Geflügel	RV1-3 neg	RV1-8 Rind	RV1-9 Schwein	RV1-10 Schaf	RV1-14 Geflügel	RV1-19 neg	RV1-20 Schaf	RV1-23 Rind	RV1-25 Schwein
1	Geflügel	<u>Geflügel</u>	<u>Schaf</u>	<u>Schaf</u>	Schaf	Geflügel	<u>Rind</u>	<u>Rind</u>	<u>Schaf</u>	Schwein
2	<u>Rind</u>	neg	Rind	<u>Geflügel</u>	Schaf	<u>Schaf</u>	neg	Schaf	Rind	Schwein
3	Geflügel	neg	Rind	<u>Geflügel</u>	Schaf	Geflügel	neg	Schaf	Rind	Schwein
5	Geflügel	neg	Rind	<u>Geflügel</u>	Schaf	Geflügel	neg	Schaf	Rind	Schwein
7	Geflügel	neg	Rind	<u>Geflügel</u>	Schaf	Geflügel	neg	Schaf	Rind	Schwein
8	Geflügel	neg	Rind	<u>Rind</u>	Schaf	Geflügel	neg	<u>Rind</u>	Rind	Schwein
10	Geflügel	neg	Rind	Schwein	Schaf	<u>Schaf</u>	neg	Schaf	Rind	Schwein
11	Geflügel	neg	Rind	<u>Geflügel</u>	Schaf	<u>Schaf</u>	neg	Schaf	Rind	Schwein
14	Geflügel	neg	Rind	<u>Geflügel</u>	<u>Geflügel</u>	Geflügel	neg	Schaf	Rind	Schwein
15	Geflügel	neg	Rind	<u>Geflügel</u>	Schaf	Geflügel	neg	<u>Rind</u>	Rind	Schwein
17	<u>Schaf</u>	neg	Rind	<u>Geflügel</u>	Schaf	<u>Schaf</u>	neg	Schaf	Rind	Schwein
18	Geflügel	neg	Rind	<u>Geflügel</u>	Schaf	Geflügel	neg	Schaf	Rind	Schwein
19	Geflügel	neg	Rind	<u>Geflügel</u>	Schaf	Geflügel	neg	Schaf	Rind	Schwein
21	Geflügel	neg	Rind	<u>Geflügel</u>	<u>Geflügel</u>	Geflügel	neg	Schaf	Rind	Schwein

neg - negative Probe (ZNS <0,2%)

rot/unterstrichen - Fehlklassifikation

Tabelle 20: Tierartdifferenzierung der Tierarten Rind, Schaf, Geflügel und Schwein in den Sekundärproben (n=6 Laboratorien)

Labor	RV1-1 neg	RV1-4 Rind	RV1-5 Schaf	RV1-6 Schwein	RV1-7 neg	RV1-11 Geflügel	RV1-12 neg	RV1-13 neg	RV1-15 Schwein	RV1-16 Rind
1	<u>Geflügel</u>	n.b.	Schaf	<u>Schaf</u>	<u>Geflügel</u>	Geflügel	<u>Geflügel</u>	n.b.	n.b.	n.b.
5	neg	Rind	Schaf	Schwein	neg	Geflügel	neg	n.b.	Schwein	Rind
10	neg	Rind	Schaf	Schwein	neg	Geflügel	neg	neg	Schwein	Rind
14	neg	Rind	Schaf	<u>Geflügel</u>	neg	Geflügel	neg	neg	Schwein	Rind
17	neg	Rind	Schaf	<u>Geflügel</u>	neg	<u>Schaf</u>	neg	neg	Schwein	Rind
18	neg	Rind	Schaf	<u>Geflügel</u>	neg	Geflügel	neg	neg	Schwein	Rind

Tabelle 20: Fortsetzung

Labor	RV1-17 Geflügel	RV1-18 Schaf	RV1-21 Rind	RV1-22 neg	RV1-24 neg	RV1-26 neg	RV1-27 Rind
1	Geflügel	n.b.	<u>Schaf</u>	<u>Geflügel</u>	n.b.	<u>Schwein</u>	n.b.
5	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
10	<u>Schaf</u>	Schaf	Rind	neg	neg	neg	Rind
14	Geflügel	<u>Geflügel</u>	Rind	neg	neg	neg	Rind
17	<u>Schaf</u>	Schaf	Rind	neg	neg	neg	Rind
18	Geflügel	Schaf	Rind	neg	neg	neg	Rind

neg - negative Probe (ZNS <0,2%)
n.b. - freiwillige Probe wurde nicht bearbeitet
rot/unterstrichen - Fehlklassifikation

Zusammenfassend erfolgte die Tierartenzuordnung überwiegend korrekt. Tabelle 21 zeigt eine Gegenüberstellung der in den Primärproben enthaltenen und nachgewiesenen Tierarten und der qualitativen Bestimmung von ZNS. Bei 112 von insgesamt 140 Proben wurde die Tierart richtig erkannt (80%). Die Tierarten Rind, Schaf und Geflügel wurden von allen Teilnehmern mit einer hohen Treffsicherheit identifiziert (Rind 92,86 %, Schaf 82,14 %, Geflügel 78,57 %). Jedoch kam es bei der Tierart Schwein in 39,29 % der Fälle zu einer Verwechslung mit der Tierart Geflügel.

Tabelle 21: Kontingenztabelle zur Tierartdifferenzierung der Primärproben aller Teilnehmer (n=14)

		Negativ	Rind	Schaf	Schwein	Geflügel	Gesamt
Negativ	Anzahl	26	1	0	0	1	28
	% von Negativ	92,86 %	3,57 %	0 %	0 %	3,57 %	100 %
Rind	Anzahl	0	26	2	0	0	28
	% von Rind	0 %	92,86 %	7,14 %	0 %	0 %	100 %
Schaf	Anzahl	0	3	23	0	2	28
	% von Schaf	0 %	10,71 %	82,14 %	0 %	7,14 %	100 %
Schwein	Anzahl	0	1	1	15	11	28
	% von Schwein	0 %	3,57 %	3,57 %	53,57 %	39,29 %	100 %
Geflügel	Anzahl	0	1	5	0	22	28
	% von Geflügel	0 %	3,57 %	17,86 %	0 %	78,57 %	100 %
Gesamt	Anzahl	26	32	31	15	36	140
	% von Gesamt	18,57 %	22,86 %	22,14 %	10,71 %	25,71 %	100 %

Die Ergebnisse der Sekundärproben (Tabelle 22) bestätigen hinsichtlich der Tierartenzuordnung die in den Primärproben erzielten Ergebnisse, auch hier waren die Verwechslungen der Tierart Schwein mit der Tierart Geflügel auffällig. Dies ist jedoch nicht von praktischer Relevanz für die Einordnung als SRM.

Tabelle 22: Kontingenztabelle zur Tierartdifferenzierung der Sekundärproben, Ergebnisse der freiwillig teilnehmenden Laboratorien Nr. 1, 5, 10, 14, 17, 18 (n=6)

		Negativ	Rind	Schaf	Schwein	Geflügel	Gesamt
Negativ	Anzahl	31	0	0	1	4	36
	% von Negativ	86,11 %	0 %	0 %	2,78 %	11,11 %	100 %
Rind	Anzahl	0	18	1	0	0	19
	% von Geflügel	0 %	94,74 %	5,26 %	0 %	0 %	100 %
Schaf	Anzahl	0	0	9	0	1	10
	% von Rind	0 %	0 %	90 %	0 %	10 %	100 %
Schwein	Anzahl	0	0	1	7	3	11
	% von Schwein	0 %	0 %	9,09 %	63,64 %	27,27 %	100 %
Geflügel	Anzahl	0	0	3	0	8	11
	% von Schaf	0 %	0 %	27,27 %	0 %	72,73 %	100 %
Gesamt	Anzahl	31	18	14	8	16	87
	% von Gesamt	35,63 %	20,69 %	16,09 %	9,20 %	18,39 %	100 %

Um eine korrekte Zuordnung des beigemengten ZNS in die Gruppe der spezifizierten Risikomaterialien vornehmen zu können, ist zusätzlich zur Bestimmung der Tierart auch eine Bestimmung des Tieralters notwendig. In Tabelle 23 und Tabelle 24 ist für die Tierart Rind das ermittelte Tieralter in Monaten dargestellt. Die Berechnung des Tieralters bei Nachweis von Rinder-ZNS erfolgte mit Hilfe der im Rahmen dieser Projektarbeiten erstellten Regressionsformel (Formel 2).

Formel 2: Regressionsfunktion zur Tieraltersbestimmung beim Rind

$$\text{Tieralter Rind [Monate]} = 7,4726 * \frac{C24 : 1\omega9 - OH}{C24 : 1\omega7 - OH} - 22,607$$

Tabelle 23 gibt einen Überblick zu den Ergebnissen der Altersberechnung der Teilnehmer. Im Mittel wurde bei der Probe RV1-8 ein Alter von 30 ± 14 Monaten und bei der Probe RV1-23 ein Alter von 4 ± 2 Monaten berechnet. Somit kann gesagt werden, dass das berechnete mittlere Tieralter des verarbeiteten ZNS in den Proben RV1-8 (Rind, 35 Monate) und RV1-23 (Rind, 5 Monate) den korrekten Altersbereich widerspiegelt. Lediglich Probe RV1-8 des Teilnehmers 2 weicht von den Ergebnissen der anderen Teilnehmer deutlich ab, hier wurde ein Alter von 11 Monaten berechnet.

Tabelle 23: Bestimmung des Tieralters in Monaten der Tierart Rind in den Primärproben (n=14 Laboratorien)

Labor	RV1-2 Gefl. 1 M.	RV1-3 neg	RV1-8 Rind 35 M.	RV1-9 Schw. 27 M.	RV1-10 Schaf 5 M.	RV1-14 Gefl. 14 M.	RV1-19 neg	RV1-20 Schaf 27 M.	RV1-23 Rind 5 M.	RV1-25 Schw. 6 M.
1	-	-	-	-	-	-	<u>1,0E+05</u>	<u>2,4E+08</u>	-	-
2	<u>9,0</u>	-	<u>11,2</u>	-	-	-	-	-	4,9	-
3	-	-	24,2	-	-	-	-	-	2,4	-
5	-	-	23,3	-	-	-	-	-	4,1	-
7	-	-	70,2	-	-	-	-	-	8,3	-
8	-	-	40,4	<u>3,4</u>	-	-	-	<u>122,6</u>	8,8	-
10	-	-	22,9	-	-	-	-	-	0,9	-
11	-	-	28,9	-	-	-	-	-	3,5	-
14	-	-	29,4	-	-	-	-	-	5,0	-
15	-	-	33,5	-	-	-	-	<u>157,9</u>	5,7	-
17	-	-	30,3	-	-	-	-	-	4,8	-
18	-	-	23,7	-	-	-	-	-	1,7	-
19	-	-	25,8	-	-	-	-	-	4,1	-
21	-	-	23,4	-	-	-	-	-	2,9	-

Gefl. - Geflügel
 Schw. - Schwein
 M. - Tieralter in Monaten
 "-" - keine Zuordnung zur Tierart Rind
rot/unterstrichen - Fehlklassifikation

Die falsch zugeordneten Ergebnisse der Proben RV1-19 und RV1-20 ergeben unrealistische Alterseinstufungen und könnten somit als Indikator genutzt werden, um Fehlklassifikationen im Vorfeld zu erkennen. Die Fehlklassifikationen beim Schwein (RV1-9) und Geflügel (RV1-2) führten nicht zu einer falschen Interpretation als SRM.

Analog zu den Ergebnissen der Primärproben zeigen die Ergebnisse der Sekundärproben mit zwei Ausnahmen (Teilnehmer 18, RV1-21 und RV1-27) einen korrekten Bereich des Tieralters hinsichtlich der SRM-Einstufung. Da mit Ausnahme von Teilnehmer 1 bei den Sekundärproben der Nachweis von Rinder-ZNS immer richtig erfolgte, ergab sich entsprechend bei der Berechnung des Tieralters folgende Ergebnisse: für die Probe RV1-16: 3 ± 1 Monat, für RV1-4 28: ± 6 Monate, für die Probe RV1-21: 13 ± 3 Monate und für die Probe RV-27: 14 ± 2 Monate (siehe auch Kap. 4.1.2.1). Aus diesen Ergebnissen ist abzuleiten, dass die Altersberechnung beim Rind grundsätzlich zu niedrig erfolgt ist. Falsche Zuordnungen der Tierart Rind und damit eine irrtümliche Berechnung des Tieralters wurden bei den Sekundärproben von den Teilnehmern nicht vorgenommen.

**Tabelle 24: Bestimmung des Tialters im Monaten der Tierart Rind in den Sekundärproben
(n=6 Laboratorien)**

Labor	RV1-1 neg	RV1-4 Rind 35 M.	RV1-5 Schaf 27 M.	RV1-6 Schw. 27 M.	RV1-7 neg	RV1-11 Gefl. 1 M.	RV1-12 neg	RV1-13 neg	RV1-15 Schw. 6 M.	RV1-16 Rind 5 M.
1	-	n.b.	-	-	-	-	-	n.b.	n.b.	n.b.
5	-	27,4	-	-	-	-	-	n.b.	-	3,1
10	-	20,1	-	-	-	-	-	-	-	3,1
14	-	29,2	-	-	-	-	-	-	-	4,5
17	-	27,2	-	-	-	-	-	-	-	2,8
18	-	37,0	-	-	-	-	-	-	-	3,7

Tabelle 24: Fortsetzung

Labor	RV1-17 Gefl. 14 M.	RV1-18 Schaf 5 M.	RV1-21 Rind 19 M.	RV1-22 neg	RV1-24 neg	RV1-26 neg	RV1-27 Rind 19 M.
1	-0	n.b.	-	-	n.b.	-	n.b.
5	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
10	-	-	12,7	-	-	-	13,1
14	-	-	15,0	-	-	-	16,3
17	-	-	15,7	-	-	-	14,3
18	-	-	<u>8,7</u>	-	-	-	<u>11,2</u>

Gefl. - Geflügel
 Schw. - Schwein
 M. - Tialter in Monaten
 n.b. - freiwillige Probe wurde nicht bearbeitet
 "-" - keine Zuordnung zur Tierart Rind
 rot/unterstrichen - Fehlklassifikation

Für die Tierart Schaf wurde eine Klassifizierung hinsichtlich des Tialters auf der Basis der in Tabelle 25 angegebenen Parameter vorgenommen. Von Bedeutung war hier nur die Zuordnung in die Gruppen älter oder jünger als 12 Monate.

Tabelle 25: Parameter zur Bestimmung des Tieralters beim Schaf

Tierart und Alter (Monate)	C24:1ω9 / C24:1ω7	C24:1ω9-OH / C24:1ω7-OH
Schaf > 12 Monate	>12	>10
Lamm < 12 Monate	<12	<10

Bei allen Proben, in denen der korrekte Nachweis des Schaf-ZNS erfolgt war (RV1-10 und RV1-27), wurde auch das ZNS-Alter richtig ermittelt. Vier Versuchsteilnehmer ordneten die Proben (RV1-2; RV1-9; RV1-14) fälschlicherweise der Tierart Schaf zu. Jedoch führte diese Fehlklassifikationen nicht zu einer falschen Zuordnung zum SRM (Tabelle 26), da in allen Fällen das „Schaf-ZNS“ in die Alterstufe <12 Monate eingeordnet wurde.

Teilnehmer 1 hatte bereits beim positiven ZNS-Nachweis und bei der Tierartzuordnung einige Abweichungen, die sich entsprechend bei der nachfolgenden Altersbestimmung als Folgefehler fortsetzten. Die Fehlklassifikationen der Proben RV1-8 und RV1-23 durch diesen Teilnehmer führten bei Probe RV1-23 zu einer falsch-positiven SRM-Kategorisierung des nachgewiesenen ZNS.

Tabelle 26: Bestimmung der Alterskategorie der Tierart Schaf (größer/kleiner 12 Monate) in den Primärproben (n=14 Laboratorien)

Labor	RV1- 2 Gefl. 1 M.	RV1- 3 neg	RV1- 8 Rind 35 M.	RV1- 9 Schw. 27 M.	RV1- 10 Schaf 5 M.	RV1- 14 Gefl. 14 M.	RV1- 19 neg	RV1- 20 Schaf 27 M.	RV1- 23 Rind 5 M.	RV1- 25 Schw. 6 M.
1	-	-	<u>>12</u>	<u><12</u>	<12	-	-	-	<u>>12</u>	-
2	-	-	-	-	<12	<u><12</u>	-	>12	-	-
3	-	-	-	-	<12	-	-	>12	-	-
5	-	-	-	-	<12	-	-	>12	-	-
7	-	-	-	-	<12	-	-	>12	-	-
8	-	-	-	-	<12	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	<12	<u><12</u>	-	>12	-	-
11	-	-	-	-	<12	<u><12</u>	-	>12	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	>12	-	-
15	-	-	-	-	<12	-	-	-	-	-
17	<u><12</u>	-	-	-	<12	<u><12</u>	-	>12	-	-
18	-	-	-	-	<12	-	-	>12	-	-
19	-	-	-	-	<12	-	-	>12	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	>12	-	-

Gefl. - Geflügel
 Schw. - Schwein
 M. - Tieralter in Monaten
 “-“ - keine Zuordnung zur Tierart Schaf
 rot/unterstrichen - Fehlklassifikation

Auch im Falle der Sekundärproben erfolgte eine korrekte Einordnung des Tieralters bei der Tierart Schaf (Tabelle 27). Die aufgetretenen Fehlklassifikationen bei den Proben RV1-6, RV1-11 und RV1-17 führten ebenfalls nicht zu einer Fehlinterpretation der Ergebnisse als SRM. Die Verwechslung der zwei Tierarten Rind und Schaf (Probe RV1-21) bei Teilnehmer 1 führte ebenfalls zu keiner Beeinträchtigung der SRM-Kategorisierung.

Tabelle 27: Bestimmung der Alterskategorie der Tierart Schaf (größer/kleiner 12 Monate) in den Sekundärproben (n=6 Laboratorien)

Labor	RV1-1 neg	RV1-4 Rind 35 M.	RV1-5 Schaf 27 M.	RV1-6 Schw. 27 M.	RV1-7 neg	RV1-11 Gefl. 1 M.	RV1-12 neg	RV1-13 neg	RV1-15 Schw. 6 M.	RV1-16 Rind 5 M.
1	-	n.b.	>12	<u><12</u>	-	-	-	n.b.	n.b.	n.b.
5	-	-	>12	-	-	-	-	n.b.	-	-
10	-	-	>12	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	>12	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	>12	-	-	<u><12</u>	-	-	-	-
18	-	-	>12	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 27: Fortsetzung

Labor	RV1-17 Gefl. 14 M.	RV1-18 Schaf 5 M.	RV1-21 Rind 19 M.	RV1-22 neg	RV1-24 neg	RV1-26 neg	RV1-27 Rind 19 M.
1	-	n.b.	<u>>12</u>	-	n.b.	-	n.b.
5	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
10	<u><12</u>	<12	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-
17	<u><12</u>	<12	-	-	-	-	-
18	-	<12	-	-	-	-	-

Gefl. - Geflügel
 Schw. - Schwein
 M. - Tieralter in Monaten
 n.b. - freiwillige Probe wurde nicht bearbeitet
 "-" - keine Zuordnung zur Tierart Schaf
 rot/unterstrichen - Fehlklassifikation

Für die Auswertung wurden die von den einzelnen Teilnehmern erzielten Ergebnisse hinsichtlich der Tierart und des Alters zusammengefasst und in die Kategorien SRM und SRM negativ (non-SRM) eingeordnet.

Die Zuordnungen in die Gruppen SRM/non-SRM für die Primärproben (Tabelle 28) und die Sekundärproben (Tabelle 29) sind im Einzelnen nachfolgend angeführt. Dabei zeigte sich, dass drei Versuchsteilnehmer deutlich abweichende Ergebnisse geliefert haben. Versuchsteilnehmer 1 hat bei der Untersuchung der Primärproben RV1-19 und RV1-23 falsch-positive Ergebnisse erhalten. Dagegen ermittelte der Ringtestteilnehmer 2 ein falsch-negatives Ergebnis bei Probe RV1-8 (Tabelle 28).

Tabelle 28: Differenzierung der Proben hinsichtlich des SRM-Status in den Primärproben (n=14 Laboratorien)

Labor	RV1-2 Gefl. 1 M.	RV1-3 neg	RV1-8 Rind 35 M.	RV1-9 Schw. 27 M.	RV1-10 Schaf 5 M.	RV1-14 Gefl. 14 M.	RV1-19 neg	RV1-20 Schaf 27 M.	RV1-23 Rind 5 M.	RV1-25 Schw. 6 M.
1	non-SRM	<u>non-SRM</u>	SRM	non-SRM	non-SRM	non-SRM	<u>SRM</u>	SRM	<u>SRM</u>	non-SRM
2	non-SRM	neg	<u>non-SRM</u>	non-SRM	non-SRM	non-SRM	neg	SRM	non-SRM	non-SRM
3	non-SRM	neg	SRM	non-SRM	non-SRM	non-SRM	neg	SRM	non-SRM	non-SRM
5	non-SRM	neg	SRM	non-SRM	non-SRM	non-SRM	neg	SRM	non-SRM	non-SRM
7	non-SRM	neg	SRM	non-SRM	non-SRM	non-SRM	neg	SRM	non-SRM	non-SRM
8	non-SRM	neg	SRM	non-SRM	non-SRM	non-SRM	neg	SRM	non-SRM	non-SRM
10	non-SRM	neg	SRM	non-SRM	non-SRM	non-SRM	neg	SRM	non-SRM	non-SRM
11	non-SRM	neg	SRM	non-SRM	non-SRM	non-SRM	neg	SRM	non-SRM	non-SRM
14	non-SRM	neg	SRM	non-SRM	non-SRM	non-SRM	neg	SRM	non-SRM	non-SRM
15	non-SRM	neg	SRM	non-SRM	non-SRM	non-SRM	neg	SRM	non-SRM	non-SRM
17	non-SRM	neg	SRM	non-SRM	non-SRM	non-SRM	neg	SRM	non-SRM	non-SRM
18	non-SRM	neg	SRM	non-SRM	non-SRM	non-SRM	neg	SRM	non-SRM	non-SRM
19	non-SRM	neg	SRM	non-SRM	non-SRM	non-SRM	neg	SRM	non-SRM	non-SRM
21	non-SRM	neg	SRM	non-SRM	non-SRM	non-SRM	neg	SRM	non-SRM	non-SRM

SRM - ZNS-Zusatz Rind und Schaf älter als 12 Monate (RV1-8; RV1 20)

rot/unterstrichen - Fehlklassifikation

Bei den Sekundärproben ermittelte der Versuchsteilnehmer 18, bei den Proben RV1-21 und RV1-27, zwei falsch-negative Ergebnisse (Tabelle 29). Die restlichen Primär- und Sekundärproben wurden von den Ringtestteilnehmern richtig kategorisiert.

Tabelle 29: Differenzierung der Proben hinsichtlich des SRM-Status in den Sekundärproben (n=6 Laboratorien)

Labor	RV1-1 neg	RV1-4 Rind 35 M.	RV1-5 Schaf 27 M.	RV1-6 Schw. 27 M.	RV1-7 neg	RV1-11 Gerfl. 1 M.	RV1-12 neg	RV1-13 neg	RV1-15 Schw. 6 M.	RV1-16 Rind 5 M.
1	non-SRM	n.b.	SRM	non-SRM	non-SRM	non-SRM	non-SRM	n.b.	n.b.	n.b.
5	non-SRM	SRM	SRM	non-SRM	non-SRM	non-SRM	non-SRM	n.b.	non-SRM	non-SRM
10	non-SRM	SRM	SRM	non-SRM	non-SRM	non-SRM	non-SRM	non-SRM	non-SRM	non-SRM
14	non-SRM	SRM	SRM	non-SRM	non-SRM	non-SRM	non-SRM	non-SRM	non-SRM	non-SRM
17	non-SRM	SRM	SRM	non-SRM	non-SRM	non-SRM	non-SRM	non-SRM	non-SRM	non-SRM
18	non-SRM	SRM	SRM	non-SRM	non-SRM	non-SRM	non-SRM	non-SRM	non-SRM	non-SRM

Labor	RV1-17 Gefl. 14 M.	RV1-18 Schaf 5 M.	RV1-21 Rind 19 M.	RV1-22 neg	RV1-24 neg	RV1-26 neg	RV1-27 Rind 19 M.
1	non-SRM	n.b.	SRM	non-SRM	n.b.	non-SRM	n.b.
5	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
10	non-SRM	non-SRM	SRM	non-SRM	non-SRM	non-SRM	SRM
14	non-SRM	non-SRM	SRM	non-SRM	non-SRM	non-SRM	SRM
17	non-SRM	non-SRM	SRM	non-SRM	non-SRM	non-SRM	SRM
18	non-SRM	non-SRM	<u>non-SRM</u>	non-SRM	non-SRM	non-SRM	<u>non-SRM</u>

SRM - ZNS-Zusatz Rind und Schaf älter als 12 Monate (RV1-4; RV1 5; RV1-21; RV1-27)

rot/unterstrichen - Fehlklassifikation

Der ermittelte SRM-Status des eingemischten ZNS wurde bei den Primärproben in 96,43 % der Fälle korrekt zugeordnet. SRM negative Tiere wurden mit 98,21 % iger Sicherheit erkannt (Tabelle 30). Dieses Ergebnis ist als sehr gut einzuschätzen.

Tabelle 30: Kontingenztafel zur SRM / non-SRM Differenzierung der Primärproben aller Teilnehmer (n=14)

		SRM	non-SRM	Gesamt
SRM	Anzahl	27	1	28
	% von SRM	96,43 %	3,57 %	100 %
non-SRM	Anzahl	2	110	112
	% von non-SRM	1,79 %	98,21 %	100 %
Gesamt	Anzahl	29	111	140
	% von Gesamt	20,71 %	79,29 %	100 %

Bei der Analyse der Sekundärproben müssen die Ergebnisse aufgrund der geringeren Anzahl von Varsusteilnehmern und Proben mit Einschränkung bewertet werden. Jedoch konnte auch hier der gleiche Trend wie bei der Auswertung der Ergebnisse der Primärproben beobachtet werden. Es wurden 90 % der Proben richtig als SRM und 100 % richtig als non-SRM eingestuft (Tabelle 31).

Tabelle 31: Kontingenztafel zur SRM / non-SRM Differenzierung der Sekundärproben, Ergebnisse der freiwillig teilnehmenden Laboratorien Nr. 1, 5, 10, 14, 17, 18 (n=6)

		SRM	non-SRM	Gesamt
SRM	Anzahl	18	2	20
	% von SRM	90 %	10 %	100 %
non-SRM	Anzahl	0	67	67
	% von non-SRM	0 %	100 %	100 %
Gesamt	Anzahl	18	69	87
	% von Gesamt	20,69 %	79,31 %	100 %

4.1.4.2 Quantitative Auswertung der Messergebnisse

Für die quantitative Auswertung der Messergebnisse wurden die Parameter ZNS-Gehalt und Tialter Rind herangezogen. Der ZNS-Gehalt wurde mittels Kalibrationsfunktion der Brühwurststandards mit 0%, 0,5%, 1% und 3% ZNS errechnet. Abbildung 20 zeigt ein Beispieldiagramm einer Kalibrationskurve der Matrix-Kalibration (siehe SOP, Anhang A.5.4, Seite 164), wie es jeder Versuchsteilnehmer selbst erstellt und für seine eigenen Auswertungen herangezogen hat. Im Anhang Abbildung 38 sind die Kalibrationskurven aller Versuchsteilnehmer angegeben.

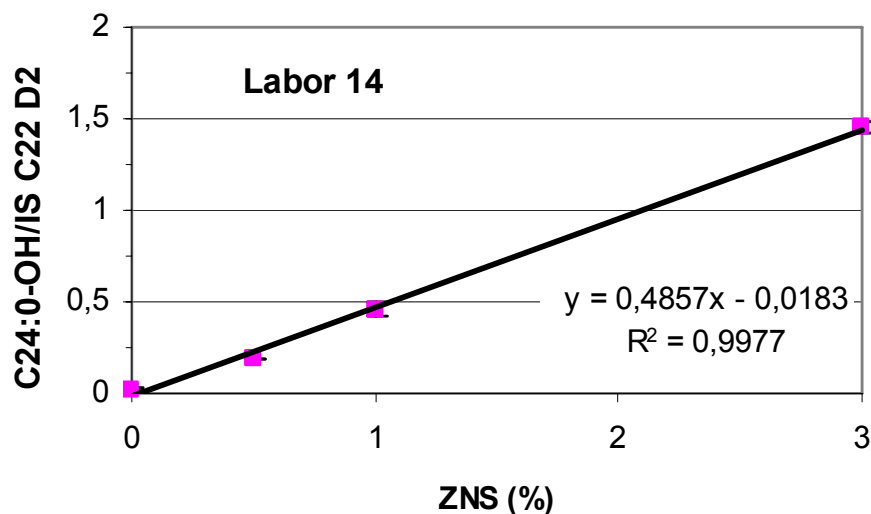


Abbildung 20: Beispieldiagramm der Kalibration anhand des ZNS-Gehaltes aus der Brühwurstmatrix

Basierend auf den Vorgaben der DIN ISO 5725-2:2002 (Anonym 2004) wurden für die analysierten Parameter Merkmalsniveaus für jede analysierte Probe festgelegt (Tabelle 32).

Hierfür wurden die Parameter

V1 = Verhältnis der FAME C24:1 ω 9/C24:1 ω 7	(Merkmal 1-8),
V2 = Verhältnis der FAME C24:1 ω 9-OH/C24:1 ω 7-OH	(Merkmal 9-16),
V3 = Verhältnis der FAME C24:1 ω 9-OH/C25:0-OH	(Merkmal 17-23),
ZNS-Gehalt	(Merkmal 25-32),
Tialter beim Rind	(Merkmal 33-34)

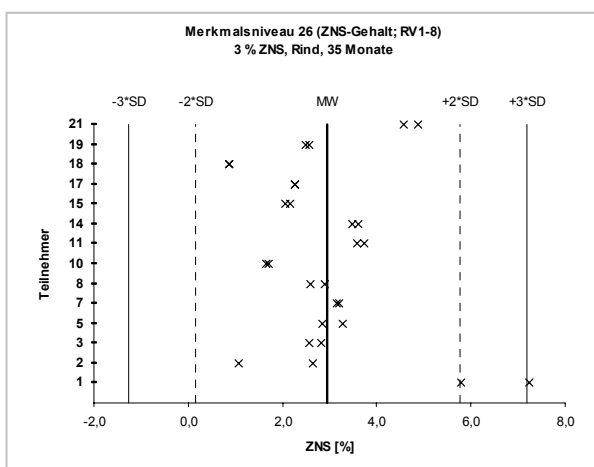
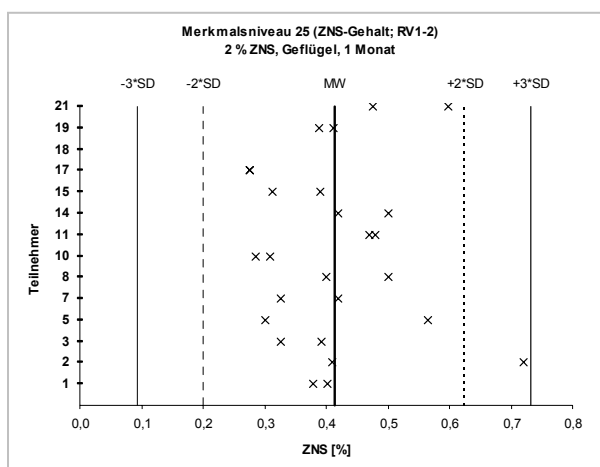
ausgewählt.

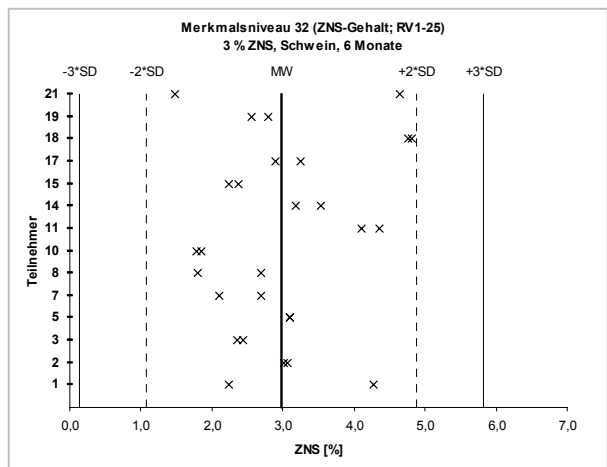
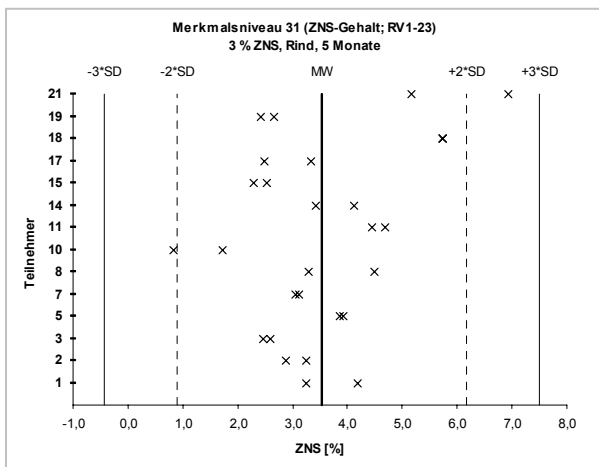
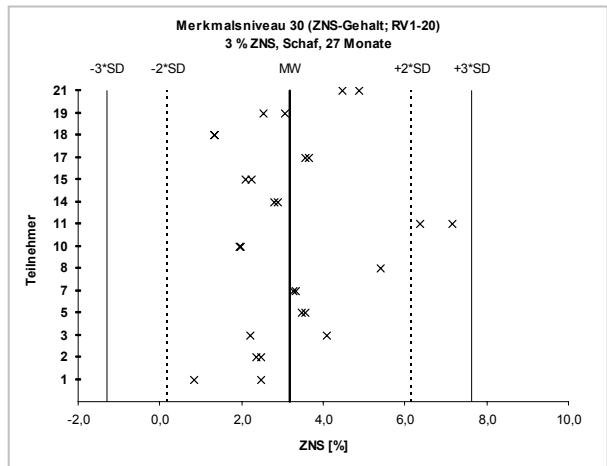
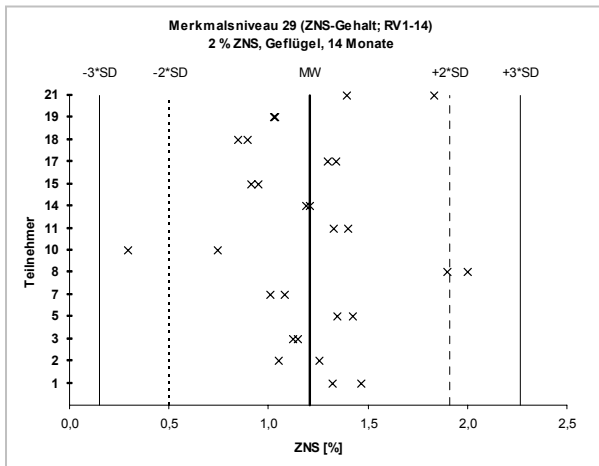
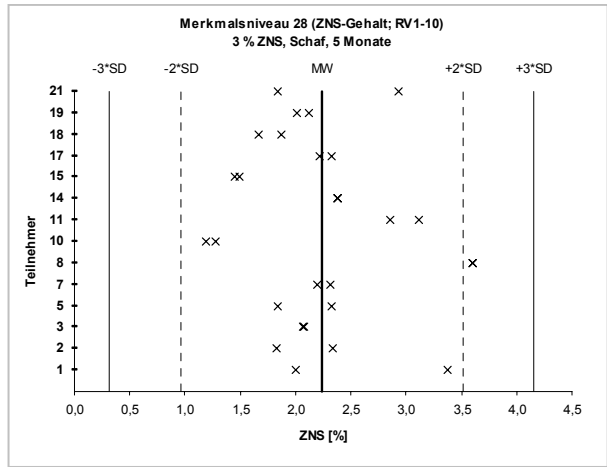
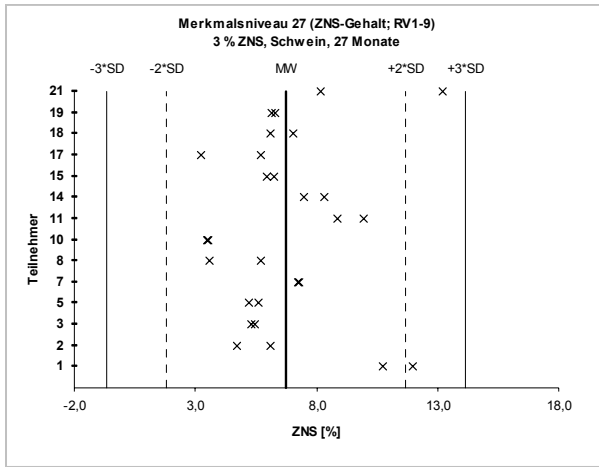
Tabelle 32: Festlegung der analysierten Merkmalsniveaus nach DIN ISO 5725-2:2002

	V1: <u>C24:1ω9</u> C24:1 ω 7	V2: <u>C24:1ω9-OH</u> C24:1 ω 7-OH	V3: <u>C24:1ω9-OH</u> C25:0-OH	ZNS-Gehalt	Alter Rind
RV1-2	1	9	17	25	k.R.
RV1-8	2	10	18	26	33
RV1-9	3	11	19	27	k.R.
RV1-10	4	12	20	28	k.R.
RV1-14	5	13	21	29	k.R.
RV1-20	6	14	22	30	k.R.
RV1-23	7	15	23	31	34
RV1-25	8	16	24	32	k.R.

k.R. - kein Rind

Im Folgenden werden die erzielten Ergebnisse für die Merkmale 25 bis 32 (ZNS-Gehalt) und 33 bis 34 (Tieralter) eingehend besprochen. Basierend auf den von den Teilnehmern rückgemeldeten Ergebnissen wurden zunächst Ursprungstabellen erstellt (Anhang: Tabelle 63, Tabelle 64, Tabelle 65, Tabelle 66). Die ausreißerbereinigten Ursprungsdaten sind in Abbildung 21 dargestellt. Die Ausreißerbereinigung erfolgte nach dem Grubbs-Test, basierend auf den von jedem Teilnehmer erzielten Mittelwerten jedes Merkmalsniveaus (Anhang: Tabelle 67, Tabelle 68, Tabelle 69, Tabelle 70). Als Ausreißer nach Grubbs wurden Messergebnisse bezeichnet, die mit 99 %iger Wahrscheinlichkeit außerhalb der Grundgesamtheit lagen.





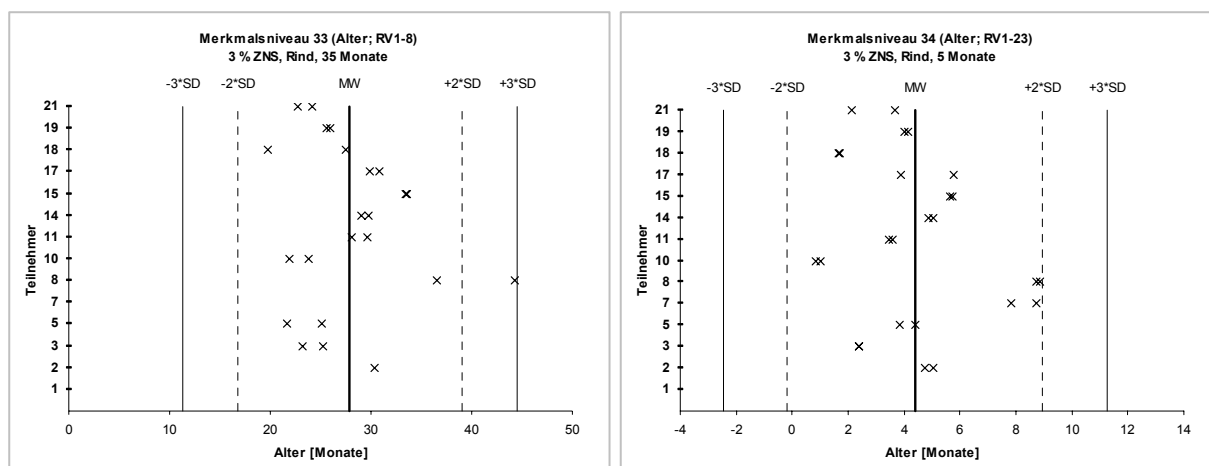


Abbildung 21: Darstellung der Ursprungsdaten (Tabelle 66) für den ermittelten ZNS-Gehalt (Merkmal 25-32) und Tieralter beim Rind (Merkmal 33-34)

Die statistischen Kenngrößen sind in Tabelle 33 dargestellt. Hier zeigt sich besonders für die Merkmalsniveaus 26, 28, 30, 31 und 32 eine gute Näherung zum tatsächlich in der Probe enthaltenen ZNS-Gehalt von 3%. Hierbei handelte es sich um die Tierarten Rind und Schaf, sowie das zur Kalibration benutzte ZNS vom Schwein (6 Monate, Merkmal 32). Bei den Merkmalen 25 und 29 (Tierart Geflügel) wurden gegenüber dem Erwartungswert von 2 % ZNS relativ zu niedrige Ergebnisse erzielt. Beim Merkmalsniveau 27 handelte es sich um ZNS von älteren Schweinen (27 Monate), hier wurde mehr als das Doppelte des enthaltenen ZNS bestimmt. Ursache dafür ist die Zunahme des Gehaltes an Cerebronsäure, die als Indikator für die Quantifizierung von ZNS dient, bei Schweinen mit zunehmendem Alter. Geflügel enthält nach unseren Erkenntnissen weniger Cerebronsäure im ZNS, so dass damit die Minderbefunde erklärbar werden. Die Ergebnisse bei der Tierart Geflügel erfordern den Beobachtungen nach, ebenso wie die der Tierart Schwein zusätzlich die Einführung eines altersabhängigen Korrekturfaktors. Dies erscheint aber unter dem Gesichtspunkt, dass Schweine- oder Geflügelhirn nicht als SRM gelten, von untergeordneter Bedeutung. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass das Alter auf den ermittelten ZNS-Gehalt bei den Tierarten Rind und Schaf, also den als SRM eingestufteten Tierarten, keinen größeren Einfluss hat und aus diesem Grund auf einen altersabhängigen Korrekturfaktor bei diesen Tierarten verzichtet werden kann.

Tabelle 33: Statistische Kenngrößen für die Ermittlung des ZNS-Gehaltes in Prozent (Merkmal 25-32) und des Tieralters in Monaten (Merkmal 33-34) beim Rind basierend auf Tabelle 70

Merkmalsniveau	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
Anzahl Messwerte	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14
Fehlende Messwerte	1	0	0	0	0	0	0	0	2	1
Gesamtmittelwert	0,41	2,96	6,74	2,24	1,21	3,26	3,53	2,98	28,01	4,39
Standardabweichung	0,09	1,40	2,35	0,60	0,35	1,50	1,29	0,79	5,26	2,30
Standardfehler	0,02	0,37	0,63	0,16	0,09	0,40	0,35	0,21	1,52	0,64
Konfidenzintervall für Gesamtmittelwert	0,05	0,81	1,36	0,34	0,20	0,87	0,75	0,46	3,34	1,39
Bereich	0,29	5,65	7,86	2,37	1,43	5,43	4,77	2,98	17,53	7,87
Maximum	0,57	6,51	11,36	3,60	1,95	6,77	6,05	4,78	40,38	8,79
Minimum	0,28	0,86	3,49	1,23	0,52	1,34	1,28	1,81	22,85	0,92
Perzentilen										
25%	0,36	2,11	5,37	2,06	1,03	2,17	2,54	2,40	23,55	2,77
75%	0,46	3,55	7,91	2,39	1,39	3,60	3,90	3,26	30,36	5,15

Die Verteilung der ermittelten ZNS-Gehalte im Boxplot Diagramm (Abbildung 22) unterstreichen nochmals diesen Befund. Deutlich erkennbar sind die Minderbefunde an ZNS im Probenmaterial, welches Geflügel-ZNS enthält (1. und 5. Boxplot), diese Beobachtung konnte auch durch eigene Untersuchungen gestützt werden (Tabelle 49). Zusätzlich war der Mehrbefund an ZNS bei den Proben, die ZNS vom Schwein mit einem Alter von 27 Monaten enthielten auffällig.

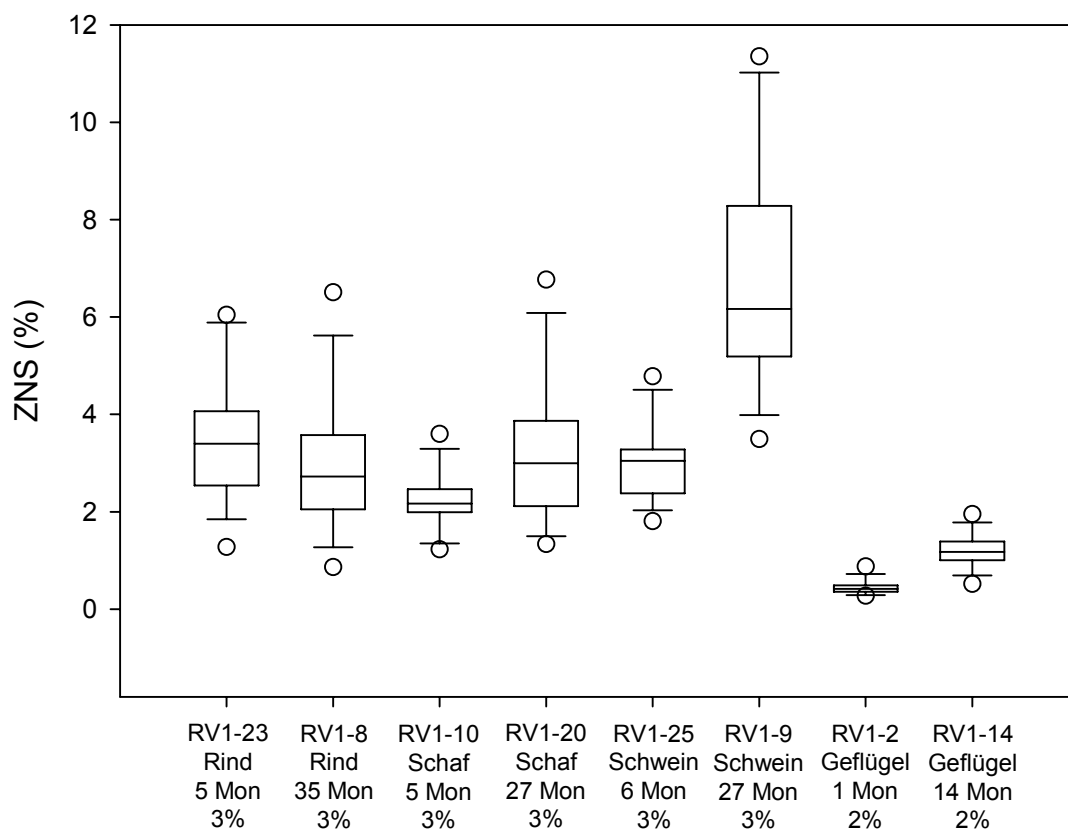


Abbildung 22: Statistische Verteilung der Messwerte der am ersten Ringtest beteiligten Laboratorien (n=14) hinsichtlich des ZNS-Gehaltes unterschiedlicher Tierarten und Alter

Im Boxplot Diagramm (Abbildung 23) ist die Verteilung des ermittelten Tieralters anhand dreier Tieralter beim Rind dargestellt. Die Proben enthielten 3 % Rinderhirn von einem 5 Monate alten Kalb (RV1-23, Primärprobe), von einem 19 Monate alten Rind (RV1-21/RV1-27, Sekundärprobe) und von einem 35 Monate alten Rind (RV1-8, Primärprobe). Aus den Ergebnissen geht hervor, dass die von den Ringtestteilnehmern durchgeführte Altersbestimmung in guter Qualität vorgenommen wurde. Dadurch bedingt konnte SRM (Rind 35 Monate) eindeutig von Nicht-SRM (Rind 5 Monate) unterschieden werden. Die Aussagekraft der Ergebnisse der untersuchten Sekundärproben mit dem ZNS eines 19 Monate alten Rindes ist aufgrund der geringen Anzahl von Messergebnissen (n=8) mit Einschränkungen zu bewerten. Jedoch deuten sich Tendenzen in Richtung des vorgegebenen Tieralters an.

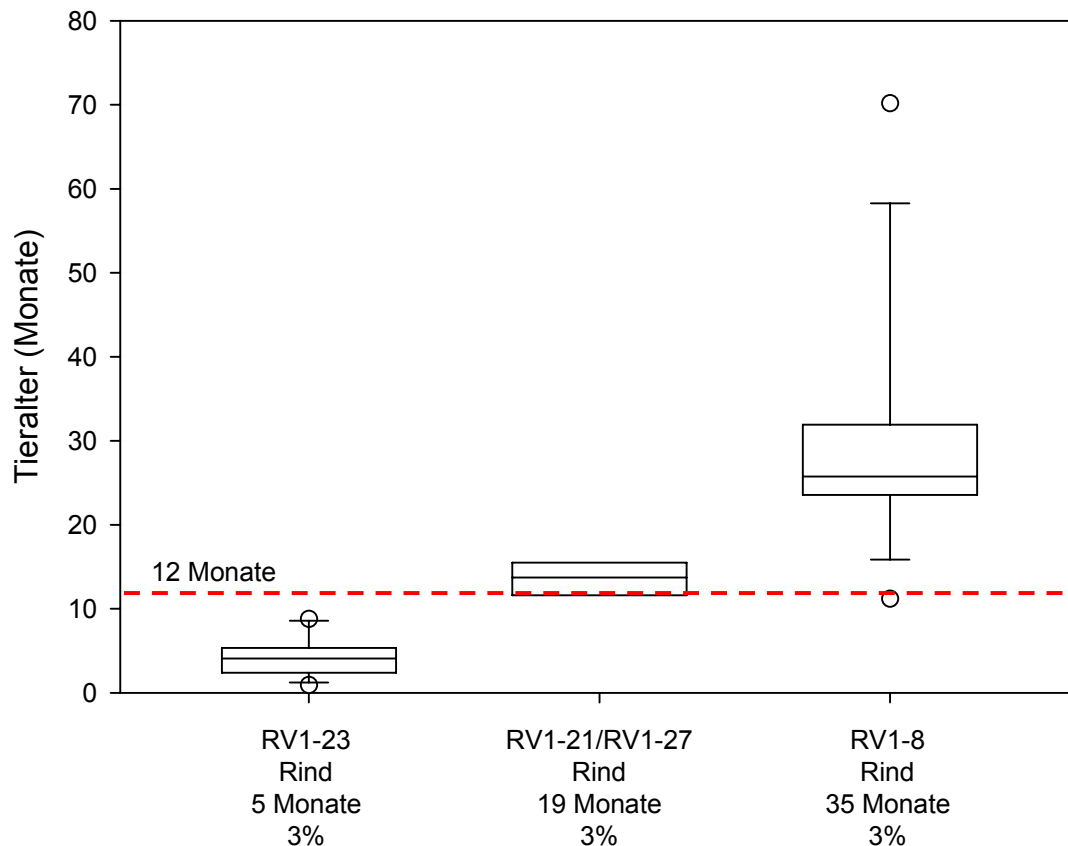


Abbildung 23: Statistische Verteilung der Messwerte der am ersten Ringtest beteiligten Laboratorien (n=14) hinsichtlich des Tieralters Rind (5 Monate und 35 Monate)

Zusammenfassend kann der erste Ringtest wie folgt bewertet werden:

- Die Zielstellung des qualitativen Nachweises von SRM anhand der Differenzierung ZNS positiver und negativer Proben, der Identifikation der Tierart und der Einordnung des Tieralters / der Tieralterskategorie wurde erreicht. Einzelne Fehlklassifikationen hinsichtlich der Tierart führten nur in wenigen Fällen zur fehlerhaften Einordnung des SRM-Status. Von den 14 Teilnehmern wurden 96,43 % der SRM-positiven (n=28) und 98,21 % der SRM negativen (n=112) Proben korrekt erkannt.
- Die quantitative Bestimmung des ZNS-Gehaltes war nicht Aufgabe des ersten Ringtests, jedoch wurde eine gute Näherung an den in der Probe enthaltenen ZNS-Gehalt bei den SRM relevanten Tierarten Rind und Schaf erreicht. Die Quantifizierung des ZNS bei den nicht SRM relevanten Tierarten Schwein und Geflügel würden die Einführung eines Korrekturfaktors erfordern. Dies erscheint jedoch vor dem Hintergrund der Zielstellung, der Erfassung von SRM in Fleischerzeugnissen, als nicht erforderlich.
- Die Bestimmung des Tieralters erbrachte beim Rind eine hinreichende Trennung zwischen den verschiedenen Tieraltern (5, 19 und 35 Monate).

4.1.5 Zweite Validierung und Charakterisierung des Verfahrens auf quantitativer Basis (Ringtest 2)

Für den abschließenden zweiten Ringtest war ursprünglich eine Teilnehmerzahl von zehn Laboratorien geplant gewesen. Jedoch wurde aufgrund des regen Interesses der Entschluss gefasst, den Ringtest mit den 14 bis zu diesem Zeitpunkt teilnehmenden Laboratorien durchzuführen.

Ziel der zweiten Validierung war zusätzlich zu den bereits im ersten Ringtest ermittelten Parametern die Quantifizierung des verwendeten ZNS. Hierzu wurden an die Teilnehmer 11 Proben versandt (Tabelle 34).

Der wesentliche Unterschied zu den Proben, die im ersten Ringtest untersucht wurden, bestand darin, dass der ZNS-Gehalt der ZNS-positiven Proben nur 0,5 % oder 1 % betrug. Dies erschwert erfahrungsgemäß die Quantifizierung des ZNS-Gehaltes und damit auch die Unterscheidung zwischen ZNS-positiv und -negativ. Insbesondere wird aber die Bestimmung von Tierart und Alter des ZNS, also die Ermittlung der qualitativen Parameter, bei den relativ geringen Konzentrationen an ZNS, durch Matrixeffekte stark erschwert. Es war aber davon auszugehen, dass die Versuchsteilnehmer schon im ersten Ringtest genügend Erfahrungen gesammelt hatten, so dass diese erschwerte Aufgabe der Bestimmung von ZNS-Gehalt, Tierart und -alter des ZNS als lösbar angesehen werden konnte.

Tabelle 34: Probenplan des zweiten Ringtests

Probenschlüssel BFEL	Verwendung	ZNS- Konzentration (%)	Tierart	Alter (Monate)	Erhitzung (°C)
RV2-BW0	Standard (Kalibration)	0	Schwein	6	110
RV2-BW0,5		0,5	Schwein	6	110
RV2-BW1		1	Schwein	6	110
RV2-BW3		3	Schwein	6	110
RV2-1	Messprobe (Anonymisiert)	0,5	Rind	5	110
RV2-3		1	Schaf	27	110
RV2-8		0,5	Schaf	5	110
RV2-10		0	-	-	110
RV2-16		0,5	Rind	35	110
RV2-20		1	Rind	5	110
RV2-21		1	Schwein	6	110
RV2-22		0,5	Schaf	27	110
RV2-24		0,5	Schwein	6	110
RV2-25		1	Rind	35	110
RV2-27		1	Schaf	5	110

Die Rückmeldung der Ergebnisse erfolgte von 12 Laboratorien (Tabelle 8), wobei in einem Labor (Teilnehmer 14) zwei Mitarbeiter unabhängig voneinander die Aufbereitung und Analyse der Proben durchführten, so dass insgesamt bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse von 13 Teilnehmern ausgegangen wird.

4.1.5.1. Qualitative Auswertung der Messergebnisse

Auch für die Auswertung des zweiten Ringtests galt der Grundsatz, dass die qualitative Bestimmung von SRM eine korrekte Identifizierung ZNS positiver Proben, der Tierart und Kategorisierung des Alters des im Produkt enthaltenen ZNS erfordert. Im Folgenden werden auch hier die Ergebnisse in der genannten Reihenfolge präsentiert.

Für die Unterscheidung zwischen ZNS-positiven und ZNS-negativen Proben wurde wieder der Cut-Off von 0,2 % ZNS herangezogen. Diese Grenzkonzentration wird mittels der Kalibrationskurve der Cerebronsäurekonzentration in den Brühwurststandards ermittelt (Anhang A.5). Die Ergebnisse (Tabelle 35) zeigen, dass 10 von 13 Teilnehmern eine korrekte Kategorisierung aller Proben gelungen ist. Zwei Teilnehmer (8 und 17) hatten jeweils eine Probe falsch-negativ beurteilt. Die Ergebnisse von Labor 1 (negative Proben wurden nicht erkannt) deuten auch im zweiten Ringtest auf das Fortbestehen analytischer Probleme hin. Dies spie-

gelt sich auch in der mangelhaften Kalibrationskurve der Brühwurststandards wider, welche einen Korrelationskoeffizienten $R^2 = 0,963$ aufweist (siehe Labor 1 im Anhang Abbildung 40).

Tabelle 35: Differenzierung der Proben im zweiten Ringtest zwischen ZNS positiv/negativ (Cut-Off 0,2% ZNS) (n=13 Laboratorien)

Labor	RV2-1 pos	RV2-3 pos	RV2-8 pos	RV2-10 neg	RV2-16 pos	RV2-20 pos	RV2-21 pos	RV2-22 pos	RV2-24 pos	RV2-25 pos	RV2-27 pos
1	pos	pos	pos	<u>pos</u>	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
2	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
3	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
5	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
7	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
8	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos	pos	<u>neg</u>	pos	pos
10	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
11	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
14a	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
14b	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
17	pos	pos	pos	neg	<u>neg</u>	pos	pos	pos	pos	pos	pos
18	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
21	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos

pos - positive Probe (ZNS >0,2%)
neg - negative Probe (ZNS <0,2%)
rot/unterstrichen - Fehlklassifikation

Für die Bestimmung der Tierart des verwendeten ZNS wurde zunächst basierend auf den Verhältnissen aus C24:1-OH ω 9 / C24:1-OH ω 7 und C24:1-OH ω 9 / C25:0-OH eine Unterscheidung in Wiederkäuer (WDK) und nicht Wiederkäuer (kein WDK) vorgenommen.

Die Auswertung der Proben des zweiten Ringtests (Tabelle 36) ergab, dass zwei Teilnehmern (3 und 8) die korrekte Identifizierung aller Proben mit Wiederkäuer-ZNS gelungen ist. Sieben Teilnehmer (1, 2, 5, 10, 11, 17 und 18) ordneten eine Probe falsch zu. Hierbei handelte es sich immer um einen falsch-negativen Nachweis von Nichtwiederkäuer-ZNS. Vier Teilnehmer (7, 14a, 14b und 7) erkannten nicht, dass das in zwei Proben enthaltene ZNS von einem Wiederkäuer stammte. Dabei ist zu erwähnen, dass es sich immer um die gleichen zwei Proben RV2-8 und RV2-27 handelte.

Tabelle 36: Differenzierung der Proben des zweiten Ringtests zwischen Wiederkäuer (WDK) und Nicht-Wiederkäuer (kein WDK) (n=13 Laboratorien)

Labor	RV2-1	RV2-3	RV2-8	RV2-10	RV2-16	RV2-20	RV2-21 kein WDK	RV2-22	RV2-24 kein WDK	RV2-25	RV2-27
1	WDK	WDK	WDK	<u>kein WDK</u>	WDK	WDK	kein WDK	WDK	kein WDK	WDK	WDK
2	<u>kein WDK</u>	WDK	WDK	ZNS neg	WDK	WDK	kein WDK	WDK	kein WDK	WDK	WDK
3	WDK	WDK	WDK	ZNS neg	WDK	WDK	kein WDK	WDK	kein WDK	WDK	WDK
5	WDK	WDK	<u>kein WDK</u>	ZNS neg	WDK	WDK	kein WDK	WDK	kein WDK	WDK	WDK
7	WDK	WDK	<u>kein WDK</u>	ZNS neg	WDK	WDK	kein WDK	WDK	kein WDK	WDK	<u>kein WDK</u>
8	WDK	WDK	WDK	ZNS neg	WDK	WDK	kein WDK	WDK	<u>ZNS neg</u>	WDK	WDK
10	<u>kein WDK</u>	WDK	WDK	ZNS neg	WDK	WDK	kein WDK	WDK	kein WDK	WDK	WDK
11	WDK	WDK	WDK	ZNS neg	WDK	<u>kein WDK</u>	kein WDK	WDK	kein WDK	WDK	WDK
14a	WDK	WDK	<u>kein WDK</u>	ZNS neg	WDK	WDK	kein WDK	WDK	kein WDK	WDK	<u>kein WDK</u>
14b	WDK	WDK	<u>kein WDK</u>	ZNS neg	WDK	WDK	kein WDK	WDK	kein WDK	WDK	<u>kein WDK</u>
17	WDK	WDK	WDK	ZNS neg	<u>ZNS neg</u>	WDK	kein WDK	WDK	kein WDK	WDK	WDK
18	<u>kein WDK</u>	WDK	WDK	ZNS neg	WDK	WDK	kein WDK	WDK	kein WDK	WDK	WDK
21	WDK	WDK	<u>kein WDK</u>	ZNS neg	WDK	WDK	kein WDK	WDK	kein WDK	WDK	<u>kein WDK</u>

WDK (Wiederkäuer) - Tierarten Rind und Schaf
kein WDK - Tierarten Schwein und Geflügel
neg - negative Probe (ZNS <0,2%)
rot/unterstrichen - Fehlklassifikation

Analog zum ersten Ringtest erfolgte im Anschluß an die Zuordnung der einzelnen ZNS-positiven Proben zu den Wiederkäuer oder Nicht-Wiederkäuer die Gruppierung zu den Tierarten Rind, Schaf, Schwein oder Geflügel. Die Ergebnisse sind in Tabelle 37 zusammengefasst und fehlerhafte Klassifizierungen sind entsprechend hervorgehoben. Obwohl der Schwierigkeitsgrad im zweiten Ringtest durch die niedrigere ZNS-Konzentration erhöht war, konnte die nahezu gleiche Trefferquote bei der Tierartklassifizierung ermittelt werden. Insgesamt wurden im zweiten Ringtest von 143 Proben 110 (76,9 %) der richtigen Tierart zugeordnet. Im ersten Ringtest lag die Trefferquote bei 80 %.

Tabelle 37: Tierartdifferenzierung der Tierarten Rind, Schaf und Schwein in den Proben des zweiten Ringtests (n=13 Laboratorien)

Labor	RV2-1 Rind	RV2-3 Schaf	RV2-8 Schaf	RV2-10 neg	RV2-16 Rind	RV2-20 Rind	RV2-21 Schwein	RV2-22 Schaf	RV2-24 Schwein	RV2-25 Rind	RV2-27 Schaf
1	Rind	Schaf	Schaf	<u>Schwein</u>	Rind	Rind	Schwein	Schaf	<u>Geflügel</u>	Rind	Schaf
2	<u>Geflügel</u>	<u>Rind</u>	<u>Rind</u>	neg	Rind	Rind	Schwein	<u>Rind</u>	Schwein	Rind	Schaf
3	<u>Schaf</u>	Schaf	Schaf	neg	<u>Schaf</u>	<u>Schaf</u>	Schwein	Schaf	Schwein	<u>Schaf</u>	Schaf
5	Rind	Schaf	<u>Geflügel</u>	neg	Rind	Rind	Schwein	Schaf	Schwein	Rind	Schaf
7	Rind	Schaf	<u>Geflügel</u>	neg	Rind	Rind	Schwein	<u>Rind</u>	Schwein	Rind	<u>Geflügel</u>
8	Rind	Schaf	Schaf	neg	<u>Schaf</u>	<u>Schaf</u>	Schwein	Schaf	<u>neg</u>	<u>Schaf</u>	Schaf
10	<u>Schwein</u>	Schaf	Schaf	neg	Rind	Rind	Schwein	Schaf	Schwein	Rind	Schaf
11	Rind	Schaf	Schaf	neg	Rind	<u>Geflügel</u>	Schwein	Schaf	Schwein	Rind	Schaf
14a	Rind	Schaf	<u>Geflügel</u>	neg	Rind	Rind	Schwein	<u>Rind</u>	Schwein	Rind	<u>Geflügel</u>
14b	Rind	Schaf	<u>Geflügel</u>	neg	Rind	Rind	Schwein	<u>Rind</u>	<u>Geflügel</u>	Rind	<u>Geflügel</u>
17	<u>Schaf</u>	Schaf	Schaf	neg	<u>neg</u>	Rind	Schwein	Schaf	Schwein	Rind	Schaf
18	<u>Geflügel</u>	Schaf	Schaf	neg	Rind	Rind	Schwein	<u>Rind</u>	Schwein	Rind	Schaf
21	Rind	Schaf	<u>Geflügel</u>	neg	Rind	Rind	Schwein	Schaf	Schwein	Rind	<u>Geflügel</u>

neg - negative Probe (ZNS <0,2%)
rot/unterstrichen - Fehlklassifikation

Wie auch in Ringtest 1 wurden Proben mit ZNS vom Schaf den Tierarten Rind oder Geflügel zugeordnet. Jedoch wurden im zweiten Ringtest deutlich mehr Proben statt der Tierart Schaf dem Geflügel zugeordnet (17 %; erster Ringtest: 7%). Auch der Anteil der Verwechslungen zwischen Rind und Schaf ist deutlich gegenüber dem ersten Ringtest gestiegen, von vormals 18 % auf 29 %. Hierfür sind Matrixeffekte verantwortlich, welche aufgrund der geringeren ZNS-Gehalte in den Proben des zweiten Ringtests, einen größeren Einfluß auf die Messergebnisse haben.

Selten war die Misklassifikation von Schweine- und Geflügel-ZNS zu beobachten, statt 39 % Fehlerquote im ersten Ringtest wurden im zweiten Ringtest nur noch 8 % der Schweine-ZNS haltigen Proben als Geflügel-ZNS-haltig identifiziert.

Basierend auf den Ergebnissen in Tabelle 37 wurde eine Kontingenztafel (Tabelle 38) mit den Trefferquoten für die einzelnen Tierarten im zweiten Ringtest erstellt.

Von den Teilnehmern wurden 12 (92,31 %) der 13 Negativproben richtig erkannt. Die Wiederfindungsraten ergaben für die Tierarten Rind 76,47 %, Schaf 69,23 % und Schwein 92 %. Auf Proben mit ZNS-Zusatz vom Geflügel wurde im zweiten Ringtest verzichtet, da die Notwendigkeit der Probenreduktion auch in diesem Versuchsabschnitt bestand.

Tabelle 38: Kontingenztabelle zur Tierartdifferenzierung der Proben aller Teilnehmer am zweiten Ringtest (n=13)

		Negativ	Rind	Schaf	Schwein	Geflügel	Gesamt
Negativ	Anzahl	12	0	0	1	0	13
	% von Negativ	92,31 %	0 %	0 %	7,69 %	0 %	100 %
Rind	Anzahl	1	39	8	1	3	51
	% von Geflügel	1,96 %	76,47 %	15,69 %	1,96 %	5,88 %	100 %
Schaf	Anzahl	0	7	36	0	9	52
	% von Rind	0 %	13,46 %	69,23 %	0 %	17,31 %	100 %
Schwein	Anzahl	1	0	0	23	2	25
	% von Schwein	4 %	0 %	0 %	92 %	8 %	100 %
Gesamt	Anzahl	14	46	44	25	14	143
	% von Gesamt	9,79 %	32,17 %	30,77 %	17,48 %	9,79 %	100 %

Um eine korrekte Zuordnung des beigemengten ZNS in die Gruppe der spezifizierten Risikomaterialien vornehmen zu können, wurde auch in diesem Versuchsabschnitt eine Bestimmung des Tieralters vorgenommen. Grundlage für die Berechnung war wiederum die im Rahmen dieses Projekts ermittelte Regressionsfunktion (Formel 2, Seite 60). Tabelle 39 gibt das für die Tierart Rind ermittelte Tieralter in Monaten wider.

Die Errechnung des Tieralters erfolgte für sämtliche Proben, bei denen die vorhergehende Bestimmung die Tierart Rind erbrachte, basierend auf der nach der aktuellen Rechtsgrundlage (Anonym 2001) geltenden Altersgrenze von 12 Monaten für Gewebe des ZNS zur Einstufung als SRM. Die Teilnehmer des zweiten Ringtests konnten bei 44 von 46 Proben mit ZNS vom Rind bei denen eine korrekte Tierartbestimmung erfolgt ist ebenfalls eine korrekte Altersberechnung vornehmen. Sowohl für die Probe RV2-1 (n=8) als auch für RV2-20 (n=11) ergab sich ein Alter von 3 ± 3 Monaten. Beide Proben enthielten das ZNS eines 5 Monate alten Rindes. Damit liegt die Altersschätzung sehr nah am wahren Wert.

Für die Proben mit dem ZNS des 35 Monate alten Rindes wurde ein mittleres Alter von 28 ± 14 Monaten (RV2-25, n=11) und von 37 ± 19 Monaten (RV2-16, n=8) berechnet. Damit liegt die Altersschätzung der Probe RV2-16 deutlich näher am realen Alter, als bei Probe RV2-25. Es konnte wiederum festgestellt werden, dass sehr hohe, unwahrscheinliche Werte des ermittelten Tieralters Hinweise auf Fehlklassifizierungen bei der Tierart bzw. auf analytische Probleme geben können.

Bei der Probe RV2-8 des Teilnehmers 2 führte die falsche Tierartzuordnung letztendlich zu einer falschen SRM-Kategorisierung. Diese Probe verdeutlicht noch einmal, dass die korrekte Differenzierung zwischen den Rinder-ZNS und den Schaf-ZNS-Proben von immenser Bedeutung für die SRM-Einteilung ist. Die beim Rind eingesetzte Regressionsformel für die Altersberechnung kann nicht auf die Tierart Schaf übertragen werden. Eine Altersberech-

nung für das Schaf-ZNS basierend auf der Rinder-ZNS-Formel führt zu einem höheren berechneten Alter.

Tabelle 39: Bestimmung des Tieralters in Monaten der Tierart Rind, zweiter Ringtest (n=13 Laboratorien)

Labor	RV2-1 Rind 5 M.	RV2-3 Schaf 27 M.	RV2-8 Schaf 5 M.	RV2-10 neg	RV2-16 Rind 35 M.	RV2-20 Rind 5 M.	RV2-21 Schw. 6 M.	RV2-22 Schaf 27 M.	RV2-24 Schw. 6 M.	RV2-25 Rind 35 M.	RV2-27 Schaf 5 M.
1	1,8	-	-	-	<u>5,1</u>	1,4	-	-	-	19,8	-
2	-	<u>138,1</u>	<u>23,2</u>	-	<u>4,0</u>	2,3	-	<u>161,9</u>	-	19,1	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	2,5	-	-	-	61,6	4,5	-	-	-	30,3	-
7	8,6	-	-	-	30,7	11,8	-	<u>192,8</u>	-	68,2	-
8	2,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	16,7	1,3	-	-	-	15,3	-
11	1,5	-	-	-	21,2	-	-	-	-	20,1	-
14a	4,3	-	-	-	52,9	4,0	-	<u>150,5</u>	-	27,9	-
14b	1,5	-	-	-	28,4	2,1	-	<u>135,4</u>	-	24,3	-
17	-	-	-	-	-	2,2	-	-	-	18,4	-
18	-	-	-	-	62,7	0,9	-	<u>86,9</u>	-	36,5	-
21	-0,1	-	-	-	24,7	3,4	-	-	-	25,6	-

Schw. - Schwein
M. - Tieralter in Monaten
“-“ - keine Zuordnung zur Tierart Rind
rot/unterstrichen - Fehlklassifikation

Für die Tierart Schaf wurde auch im zweiten Ringtest eine Klassifizierung hinsichtlich des Tieralters vorgenommen. Von Bedeutung war hier nur die Zuordnung in eine der zwei Gruppen (<12 Monate, >12 Monate). Tabelle 40 gibt eine Übersicht dieser Zuordnung, entsprechend falsche Gruppierungen wurden hervorgehoben.

Aus Tabelle 40 ist zu entnehmen, dass von den 52 Proben, die ZNS vom Schaf enthielten, 34 hinsichtlich des Tieralters und der Tierart richtig eingeordnet wurden (65 %). In zwei Proben erfolgte bei richtiger Tierartbestimmung eine Fehlklassifikation des Tieralters durch Teilnehmer 3. In den acht Fällen, in denen fälschlicherweise die Tierart Schaf ermittelt wurde handelte es sich um Proben mit ZNS-Zusatz vom Rind. Bei diesen konnte nach der Altersbestimmung in sechs Fällen eine richtige Kategorisierung hinsichtlich des SRM-Status vor-

genommen werden. Lediglich in zwei Fällen (RV2-16 und RV2-25) erfolgte durch das Labor 3 eine falsch-negative SRM-Beurteilung.

Tabelle 40: Bestimmung der Alterskategorie der Tierart Schaf (größer/kleiner 12 Monate), zweiter Ringtest (n=13 Laboratorien)

Labor	RV2-1 Rind 5 M.	RV2-3 Schaf 27 M.	RV2-8 Schaf 5 M.	RV2-10 neg	RV2-16 Rind 35 M.	RV2-20 Rind 5 M.	RV2-21 Schw. 6 M.	RV2-22 Schaf 27 M.	RV2-24 Schw. 6 M.	RV2-25 Rind 35 M.	RV2-27 Schaf 5 M.
1	-	>12	<12	-	-	-	-	>12	-	-	<12
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<12
3	<u><12</u>	<u><12</u>	<12	-	<u><12</u>	<u><12</u>	-	<u><12</u>	-	<u><12</u>	<12
5	-	>12	-	-	-	-	-	>12	-	-	<12
7	-	>12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	>12	<12	-	<u>>12</u>	<u><12</u>	-	>12	-	<u>>12</u>	<12
10	-	>12	<12	-	-	-	-	>12	-	-	<12
11	-	>12	<12	-	-	-	-	>12	-	-	<12
14a	-	>12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14b	-	>12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	<u><12</u>	>12	<12	-	-	-	-	>12	-	-	<12
18	-	>12	<12	-	-	-	-	-	-	-	<12
21	-	>12	-	-	-	-	-	>12	-	-	-

Schw. - Schwein
M. - Tieralter in Monaten
“-“ - keine Zuordnung zur Tierart Schaf
rot/unterstrichen - Fehlklassifikation

Nachfolgend sind die Zuordnungen in die Gruppen SRM/non-SRM für die Proben des zweiten Ringtests im Einzelnen aufgeführt (Tabelle 41). Abweichende Ergebnisse wurden markiert.

Die Einordnung wurde von neun der gewerteten Teilnehmer korrekt vorgenommen. Zwei Teilnehmer (1 und 17) hatten eine Probe, Teilnehmer 2 zwei Proben und Teilnehmer 3 hatte vier Proben falsch klassifiziert. Auffällig war, dass Teilnehmer 3 sämtliche Proben als non-SRM angegeben hatte, so dass hier die Vermutung eines analytischen Fehlers naheliegt, der jedoch nicht zum Ausschluss aus der qualitativen Auswertung führte, da hierfür keine Bewertungskriterien wie bei qualitativen Analysen vorgegeben sind. Insgesamt wurden sieben Proben von vier Teilnehmern falsch-negativ bewertet. Hierbei sticht die Probe RV2-16 mit vier

falsch-negativen Ergebnissen von vier Teilnehmern deutlich hervor. Die Probe RV2-8 war die einzige falsch-positive SRM-Probe in diesem zweiten Ringtest.

Tabelle 41: Differenzierung der Proben hinsichtlich des SRM-Status, zweiter Ringtest (n=13 Laboratorien)

Labor	RV2-1 Rind 5 M.	RV2-3 Schaf 27 M.	RV2-8 Schaf 5 M.	RV2-10 neg	RV2-16 Rind 35 M.	RV2-20 Rind 5 M.	RV2-21 Schw. 6 M.	RV2-22 Schaf 27 M.	RV2-24 Schw. 6 M.	RV2-25 Rind 35 M.	RV2-27 Schaf 5 M.
1	non-SRM	SRM	non-SRM	non-SRM	<u>non-SRM</u>	non-SRM	non-SRM	SRM	non-SRM	SRM	non-SRM
2	non-SRM	SRM	<u>SRM</u>	non-SRM	<u>non-SRM</u>	non-SRM	non-SRM	SRM	non-SRM	SRM	non-SRM
3	non-SRM	<u>non-SRM</u>	non-SRM	non-SRM	<u>non-SRM</u>	non-SRM	non-SRM	<u>non-SRM</u>	non-SRM	<u>non-SRM</u>	non-SRM
5	non-SRM	SRM	non-SRM	non-SRM	SRM	non-SRM	non-SRM	SRM	non-SRM	SRM	non-SRM
7	non-SRM	SRM	non-SRM	non-SRM	SRM	non-SRM	non-SRM	SRM	non-SRM	SRM	non-SRM
8	non-SRM	SRM	non-SRM	non-SRM	SRM	non-SRM	non-SRM	SRM	non-SRM	SRM	non-SRM
10	non-SRM	SRM	non-SRM	non-SRM	SRM	non-SRM	non-SRM	SRM	non-SRM	SRM	non-SRM
11	non-SRM	SRM	non-SRM	non-SRM	SRM	non-SRM	non-SRM	SRM	non-SRM	SRM	non-SRM
14a	non-SRM	SRM	non-SRM	non-SRM	SRM	non-SRM	non-SRM	SRM	non-SRM	SRM	non-SRM
14b	non-SRM	SRM	non-SRM	non-SRM	SRM	non-SRM	non-SRM	SRM	non-SRM	SRM	non-SRM
17	non-SRM	SRM	non-SRM	non-SRM	<u>non-SRM</u>	non-SRM	non-SRM	SRM	non-SRM	SRM	non-SRM
18	non-SRM	SRM	non-SRM	non-SRM	SRM	non-SRM	non-SRM	SRM	non-SRM	SRM	non-SRM
21	non-SRM	SRM	non-SRM	non-SRM	SRM	non-SRM	non-SRM	SRM	non-SRM	SRM	non-SRM

Schw. - Schwein
SRM - ZNS-Zusatz Rind und Schaf älter als 12 Monate (RV1-8; RV1 20)
rot/unterstrichen - Fehlklassifikation

Für die bessere Übersicht über die Ergebnisse der SRM/non-SRM-Kategorisierung wurde für den zweiten Ringtest eine Kontingenztafel erstellt (Tabelle 42)

Der ermittelte SRM-Status des eingemischten ZNS wurde in 86,54 % der Proben (erster Ringtest: 96,43 %) korrekt zugeordnet, SRM negative Tiere wurden zu 98,90 % (erster Ringtest: 98,21 %) als solche erkannt. Unter Berücksichtigung der für den zweiten Ringtest erschwerten Bedingungen ist auch dieses Ergebnis als sehr zufriedenstellend zu werten.

Tabelle 42: Kontingenztabelle zur SRM / non-SRM Differenzierung Proben im zweiten Ringtest (n=13 Teilnehmer)

		SRM	non-SRM	Gesamt
SRM	Anzahl	45	7	52
	% von SRM	86,54 %	13,46 %	100%
non-SRM	Anzahl	1	90	91
	% von non-SRM	1,10 %	98,90 %	100%
Gesamt	Anzahl	46	97	143
	% von Gesamt	32,17 %	67,83 %	100%

Werden diese Ergebnisse unter Ausschluss von Teilnehmer 3 betrachtet, ergeben sich hinsichtlich der Erkennung des SRM mit 93,75 % wesentlich günstigere Ergebnisse (Tabelle 43).

Tabelle 43: Kontingenztabelle zur SRM / non-SRM Differenzierung Proben im zweiten Ringtest unter Ausschluss von Teilnehmer 3 (n=12 Teilnehmer)

		SRM	non-SRM	Gesamt
SRM	Anzahl	45	3	48
	% von SRM	93,75%	6,25%	100,00%
non-SRM	Anzahl	1	83	84
	% von non-SRM	1,19%	98,81%	100,00%
Gesamt	Anzahl	46	86	132
	% von Gesamt	34,85%	65,15%	100,00%

4.1.5.2 Quantitative Auswertung der Messergebnisse

Basierend auf den Vorgaben der DIN ISO 5725-2:2002 (Anonym 2004) wurden auch für den zweiten Ringtest Merkmalsniveaus für jede analysierte Probe/Parameter festgelegt (Tabelle 44). Hierfür wurden die Parameter

V1 = Verhältnis der FAME C24:1 ω 9/C24:1 ω 7	(Merkmal 1-10),
V2 = Verhältnis der FAME C24:1 ω 9-OH/C24:1 ω 7-OH	(Merkmal 11-20),
V3 = Verhältnis der FAME C24:1 ω 9-OH/C25:0-OH	(Merkmal 21-30),
ZNS-Gehalt	(Merkmal 31-40),
Tieralter beim Rind	(Merkmal 41-44)

ausgewählt.

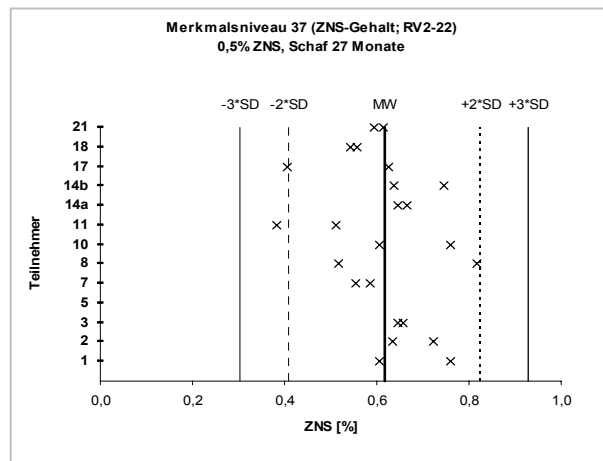
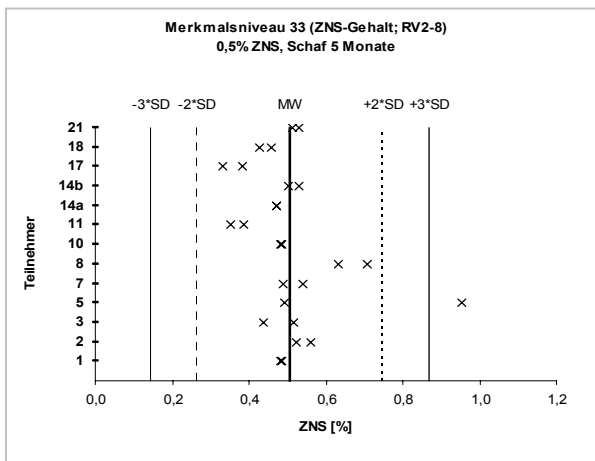
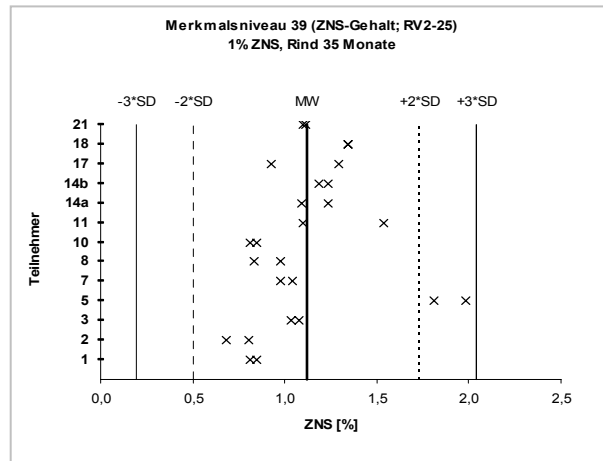
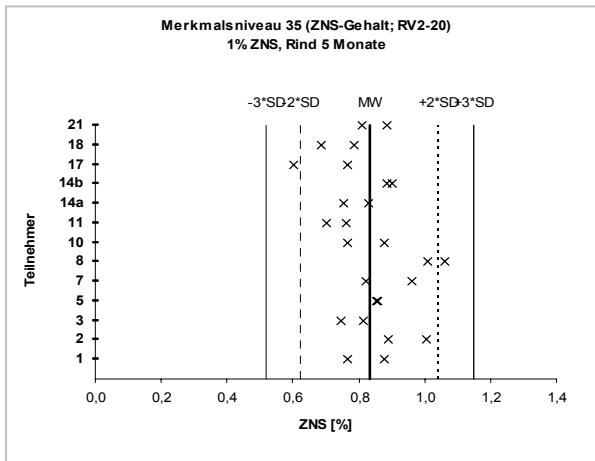
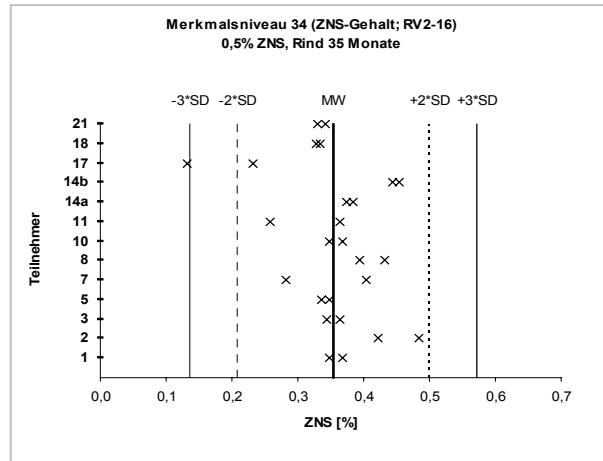
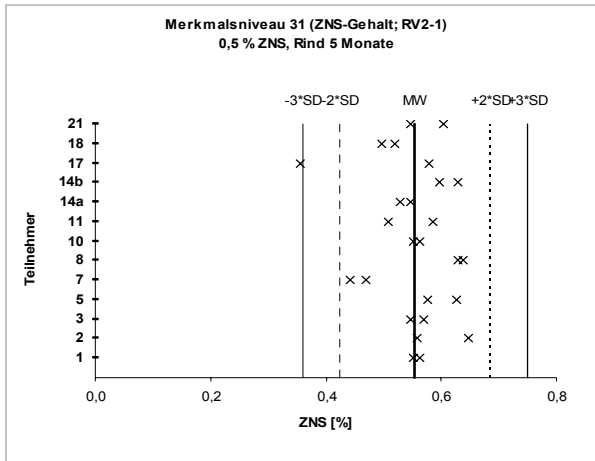
Tabelle 44: Festlegung der analysierten Merkmalsniveaus für den zweiten Ringtest nach DIN ISO 5725-2:2002

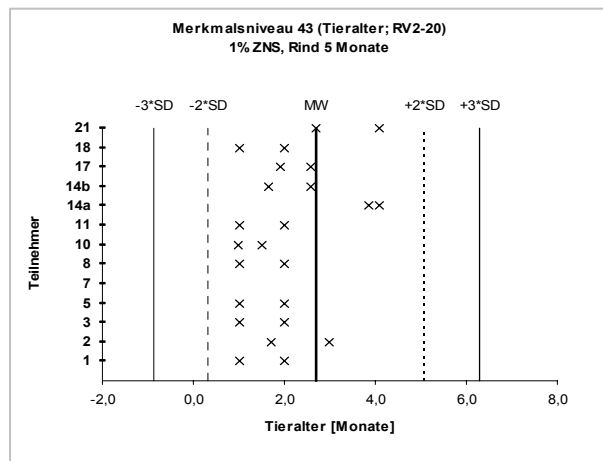
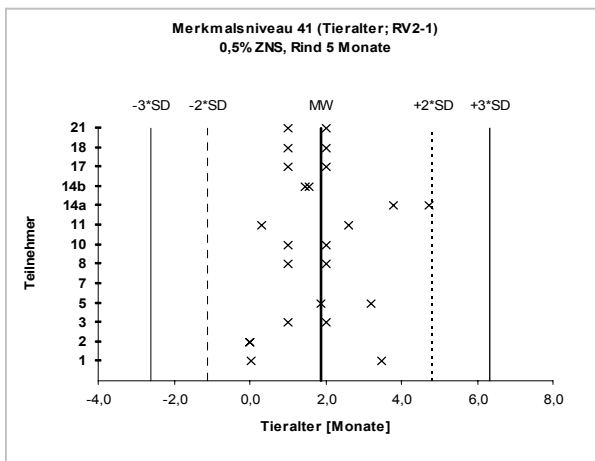
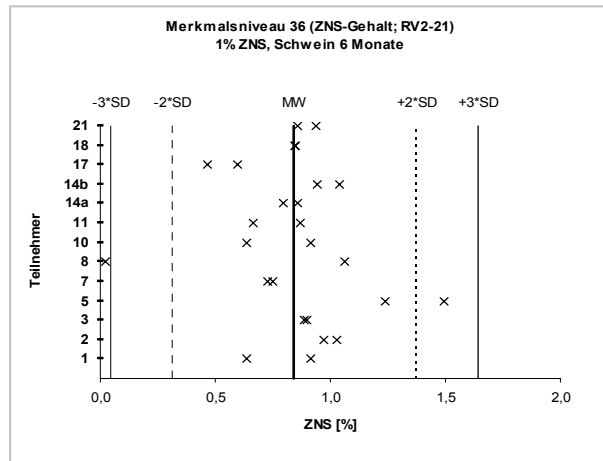
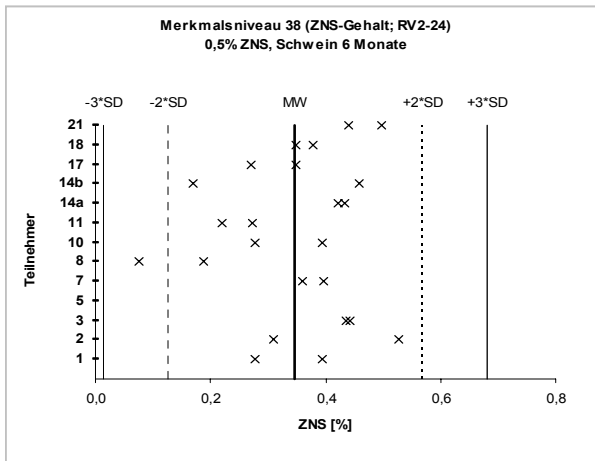
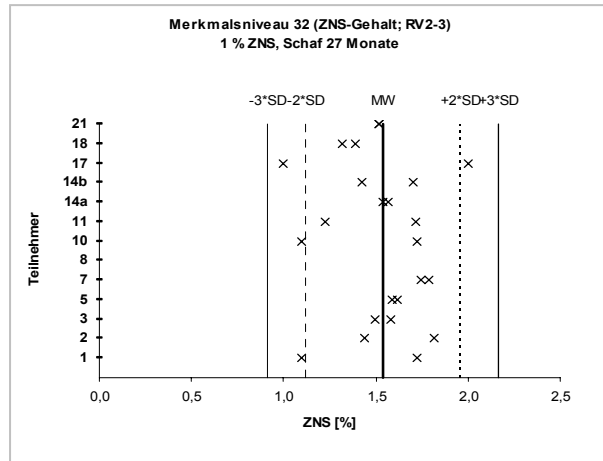
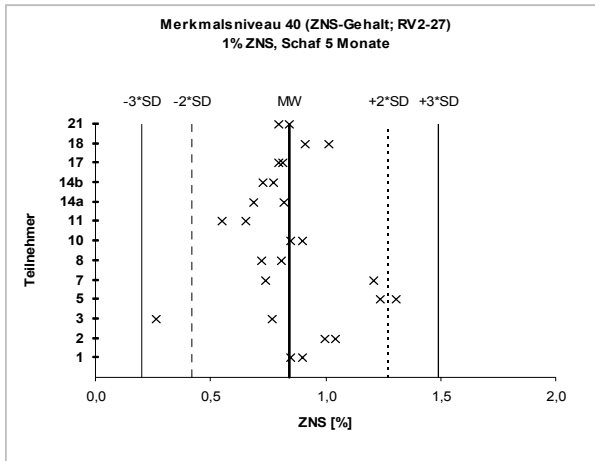
	V1: C24:1 ω 9 C24:1 ω 7	V2: C24:1 ω 9-OH C24:1 ω 7-OH	V3: C24:1 ω 9-OH C25:0-OH	ZNS-Gehalt [%]	Alter Rind [Monate]
RV2-1	1	11	21	31	41
RV2-3	2	12	22	32	k.R.
RV2-8	3	13	23	33	k.R.
RV2-16	4	14	24	34	42
RV2-20	5	15	25	35	43
RV2-21	6	16	26	36	k.R.
RV2-22	7	17	27	37	k.R.
RV2-24	8	18	28	38	k.R.
RV2-25	9	19	29	39	44
RV2-27	10	20	30	40	k.R.

k.R. - kein Rind

Im Folgenden werden die erzielten Ergebnisse des zweiten Ringtests für die Merkmale 31 bis 40 (ZNS-Gehalt) und 41 bis 44 (Tieralter) eingehend besprochen. Basierend auf den von den Teilnehmern gemeldeten Ergebnissen wurden zunächst Ursprungstabellen erstellt (siehe Anhang: Tabelle 76 bis 78). Die ausreißerbereinigten Ursprungsdaten sind in Abbildung 24 dargestellt. Die Ausreißerbereinigung erfolgte nach dem Grubbs-Test, basierend auf den berechneten Mittelwerten jedes Merkmalsniveaus (siehe Anhang: Tabelle 80 bis 82). Als

Ausreißer nach Grubbs wurden Messergebnisse bezeichnet, die mit 99 %iger Wahrscheinlichkeit außerhalb der Grundgesamtheit lagen.





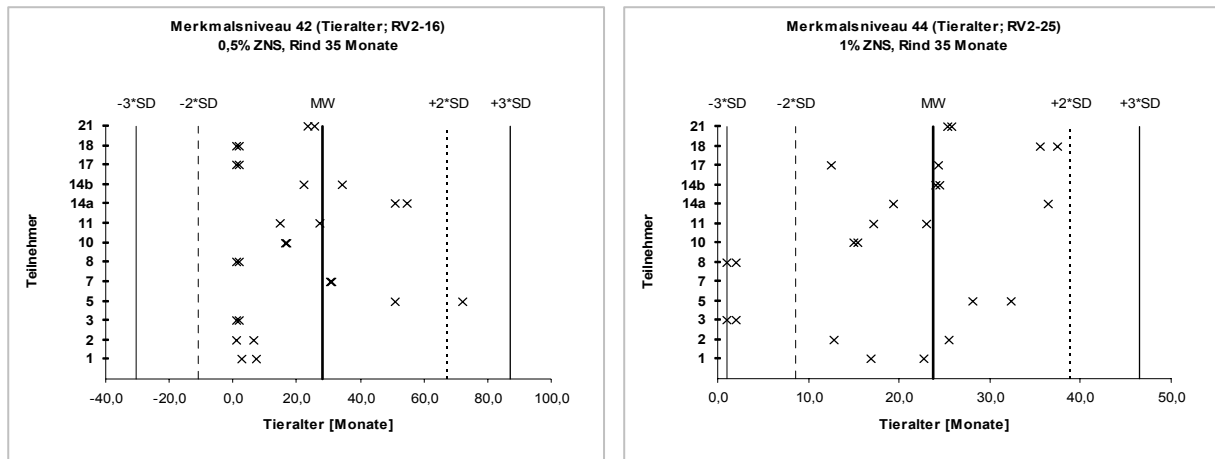


Abbildung 24: Darstellung der Ursprungsdaten (Tabelle 79) für den ermittelten ZNS-Gehalt (Merkmal 31-40) und Tieralter beim Rind (Merkmal 41-44)

Die Verteilung der ermittelten ZNS-Gehalte im Boxplot Diagramm (Abbildung 25) zeigt besonders für die Proben RV2-1, RV2-8, RV2-16, RV2-22, RV2-24 eine gute Näherung zum tatsächlich in der Probe enthaltenen ZNS-Gehalt von 0,5 %. Hierbei handelte es sich um das ZNS der Tierarten Rind, Schaf und Schwein, welches auch in den für die Kalibration eingesetzten Brühwurststandards enthalten ist.

Bei Zusatz von 1 % ZNS konnte für die Proben RV2-20, RV2-21, RV2-25, RV2-27 ebenfalls eine gute Näherung an den tatsächlichen Gehalt erreicht werden. Auffällig war bei diesen Proben die im Vergleich stärkere Streuung, die insbesondere bei der Probe RV2-25 zu beobachten ist. Die Probe RV2-3 wich deutlich vom vorgegebenen ZNS-Gehalt der Probe ab und war ebenfalls hinsichtlich der Streuung auffällig.

Als Ursache hierfür kann, wie auch schon in der Auswertung des ersten Ringtests besprochen, die Zunahme des Gehaltes an Cerebronsäure mit zunehmendem Alter in Frage kommen (siehe auch Kapitel 7).

Im ersten Ringtest wurde bereits ermittelt, dass das Tieralter bei den SRM-relevanten Tierarten Schaf und Rind keinen signifikanten Einfluss auf die Menge des ermittelten ZNS-Gehaltes hat, da bei diesen Tierarten keine Abhängigkeit des Cerebronsäuregehaltes im ZNS mit dem Tieralter nachgewiesen werden konnte. Allerdings konnte eine mit dem Alter des ZNS zunehmende Streuung festgestellt werden. Die Einführung eines altersabhängigen Korrekturfaktors erübrigt sich daher.

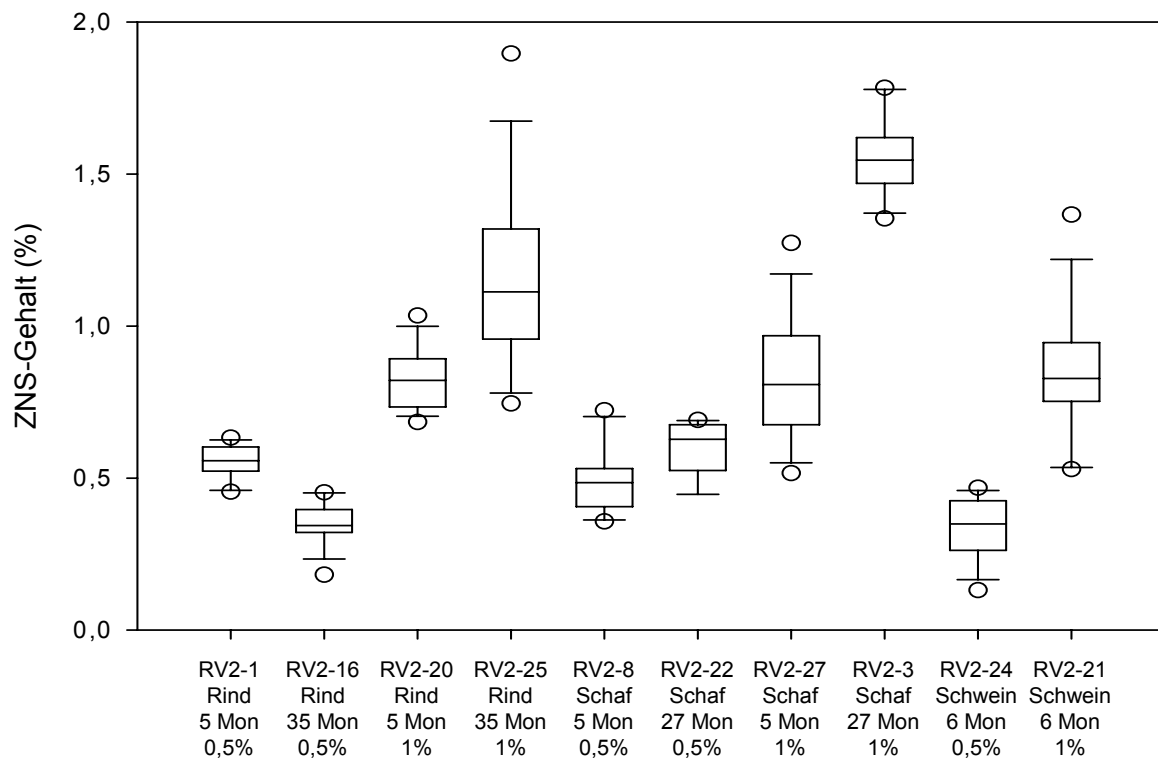


Abbildung 25: Statistische Verteilung der Messwerte der am zweiten Ringtest beteiligten Laboratorien (n=13) hinsichtlich des ZNS-Gehaltes unterschiedlicher Tierarten und Alter

Im Boxplot Diagramm (Abbildung 26) ist die Verteilung des ermittelten Tieralters von je zwei Proben der Tierart Rind mit ZNS-Gehalten von 0,5 % und 1 % dargestellt. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass die Altersbestimmung der Tiere unter 12 Monaten von den Ringtestteilnehmern in guter Qualität vorgenommen wurde. Bei den älteren Tieren (> 12 Monate) zeigte sich mit abnehmender ZNS-Konzentration eine zunehmende Streuung. Bei 1 % ZNS-Gehalt konnten SRM und nicht-SRM relevante Tieralter noch sicher voneinander getrennt werden, bei 0,5 % ZNS-Zusatz war dies nicht immer möglich. Zwei Teilnehmer (Teilnehmer 1 und 2) hatten ungewöhnlich niedrige Tieralter für diese Probe (RV2-16) ermittelt, die jedoch nicht als Ausreisser identifiziert wurden.

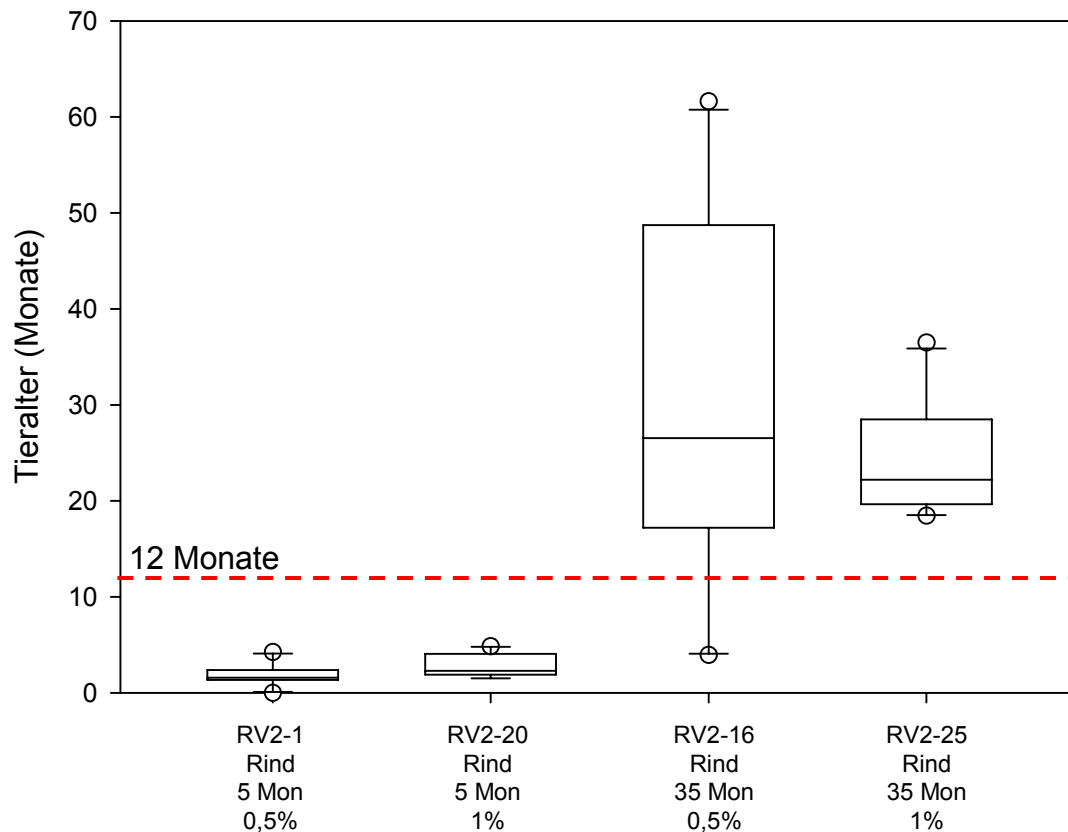


Abbildung 26: Statistische Verteilung der Messwerte der am zweiten Ringtest beteiligten Laboratorien (n=13) hinsichtlich des Tieralters Rind (5 Monate und 35 Monate)

Die Präzision des Messverfahrens bezogen auf den ZNS-Gehalt kann für die praktische Anwendung als abhängig vom ZNS-Gehalt gelten. Für die Berechnung der Wiederholstandardabweichung (s_r) und Vergleichsstandardabweichung (s_R) wurden die Messwerte aus der Tabelle 79 (siehe Anhang, Seite 154) herangezogen. Nach den Vorgaben der DIN-ISO-5725-2 wurde die Ausreißerbereinigung nach dem Grubbs-Tests durchgeführt. Dabei wurden drei Ausreißer mit 99 %iger Sicherheit sowie eine Einzelmessung von der Berechnung ausgeschlossen. Die zwei Fastausreißer (95 %ige Sicherheit) gingen in die Berechnung ein (siehe Anhang, Tabelle 83, Seite 156).

Die Ergebnisse der Berechnung von s_r und s_R der Merkmalsniveaus 31-40 (ZNS-Gehalt) aus den Ursprungsdaten sind in Tabelle 45 zusammengefasst.

Für den im zweiten Ringtest ermittelten Messbereich von 0,48 % bis 1,02 % ZNS kann die Gesamtpräzision des Messverfahrens wie folgt angegeben werden:

Wiederholstandardabweichung $s_r = 0,118$ %ZNS

Vergleichsstandardabweichung $s_R = 0,162$ %ZNS

Die Präzision des Messverfahrens nach den Vorgaben der DIN-ISO-5725-2 bezogen auf den ZNS-Gehalt wurde für das validierte Analysenverfahren jedoch als abhängig vom ZNS-Gehalt ermittelt, welches eine getrennte Betrachtung erfordert.

Somit ergeben sich für die untersuchten Gehalte an ZNS folgende statistische Kenngrößen:

Messpunkt 0,48 %ZNS

Wiederholstandardabweichung $s_r = 0,075$ %ZNS

Vergleichsstandardabweichung $s_R = 0,095$ %ZNS

Messpunkt 1,02% ZNS

Wiederholstandardabweichung $s_r = 0,162$ %ZNS

Vergleichsstandardabweichung $s_R = 0,228$ % ZNS

Tabelle 45: Statistische Auswertung der Merkmale 31-40 (ZNS-Gehalt) des zweiten Ringtests nach DIN ISO 5725-2:2002

Merkmals-niveau	Probenbezeichnung	Labore (p)	Gesamt-mittelwert (\hat{m})	Wiederhol- standard- abweichung (s_r)	Vergleichs- standard- abweichung (s_R)
31	RV2-1 (Rind, 5 M., 0,5 % ZNS)	13	0,555	0,053	0,065
34	RV2-16 (Rind, 35 M., 0,5 % ZNS)	13	0,355	0,041	0,074
33	RV2-8 (Schaf, 5 M., 0,5 % ZNS)	13	0,506	0,095	0,122
37	RV2-22 (Schaf, 27 M., 0,5 % ZNS)	12	0,616	0,097	0,105
38	RV2-24 (Schwein, 6 M., 0,5 % ZNS)	12	0,347	0,088	0,112
35	RV2-20 (Rind, 5 M., 1 % ZNS)	13	0,833	0,067	0,106
39	RV2-25 (Rind, 35 M., 1 % ZNS)	13	1,117	0,128	0,312
40	RV2-27 (Schaf, 5 M., 1 % ZNS)	13	0,845	0,144	0,217
32	RV2-3 (Schaf, 27 M., 1 % ZNS)	11	1,529	0,240	0,240
36	RV2-21 (Schwein, 6 M., 1 % ZNS)	13	0,842	0,230	0,267

4.1.6 Validierung der Homogenität der Verteilung von ZNS in den Standardmaterialien als Beitrag zur Absicherung der Ergebnisse der Ringtests (Meilenstein 5)

Eine unabdingbare Grundvoraussetzung für die erfolgreiche Durchführung von vergleichenden analytischen Untersuchungen, insbesondere im Rahmen von Ringtests, ist die hinreichend homogene Verteilung des interessierenden Analyten in den verwendeten Standard-Referenzmaterialien. Selbstverständlich kann a posteriori aus den im Ringtest erfassten Ergebnissen ebenfalls auf hinreichende Homogenität geschlossen werden, insbesondere bei sehr niedrigen Varianzen. In Anbetracht des enormen Zeit-, Arbeits- und Kostenaufwands von Ringtests ist die a priori Abschätzung hinreichender Analythomogenität jedoch ausgesprochen ratsam. Bei noch grundlegend zu validierenden Verfahren sollte dabei ein vom analytischen Prinzip unabhängiges Verfahren Anwendung finden.

Im Forschungsvorhaben wurden an Stichproben vom MRI gelieferten Probenmaterial ZNS-Verteilungsuntersuchungen mit Hilfe eines GFAP-ELISA sowie der Immunhistochemie mit Neurofilament (NF) als ZNS-Marker durchgeführt.

Immunhistochemische Verteilungsuntersuchungen

Das immunhistochemische Verfahren wurde von Aupperle und Mitarbeitern entwickelt und beschrieben (Aupperle et al., 2002). Als ZNS-Marker dient hier das Neurofilament (NF), dessen spezifische Darstellung im mikroskopischen Präparat mit Hilfe monoklonaler Antikörper gelingt. Neurofilament kommt sowohl im ZNS als auch im peripheren Nervensystem vor und erlaubt somit keine direkte immunchemische Differenzierung. Jedoch ist die Erkennung von Bestandteilen des peripheren Nervensystems (Nervenfasern) durch deren gute mikromorphologische Erfassbarkeit gegeben.

Voruntersuchungen an einigen Konserven des vom MRI bereitgestellten Standardmaterials zeigen, wie beispielhaft in der Abbildung 27 für die Konzentrationen von 1 % und 3 % ZNS dargestellt, dass die NF-Immunoreaktivität erwartungsgemäß diffus-homogen in der Brühwurstgrundmatrix verteilt aber nur sehr subtil ausgeprägt ist. Einzelne partikuläre ZNS-Bestandteile sind in Abhängigkeit von dem ZNS-Gehalt nachweisbar. Diese bieten jedoch nicht die Möglichkeit für eine hinreichend sichere quantitative Auswertung.

Da die Eignung der immunhistochemischen NF-Darstellung im vorliegenden Standardmaterial für quantitative Aussagen derzeit noch sehr begrenzt ist, wurde auf weitergehende Untersuchungen verzichtet. Die Ergebnisse können nur als qualitativer Hinweis auf eine homogene Verteilung des Proteinmarkers Neurofilament gewertet werden.

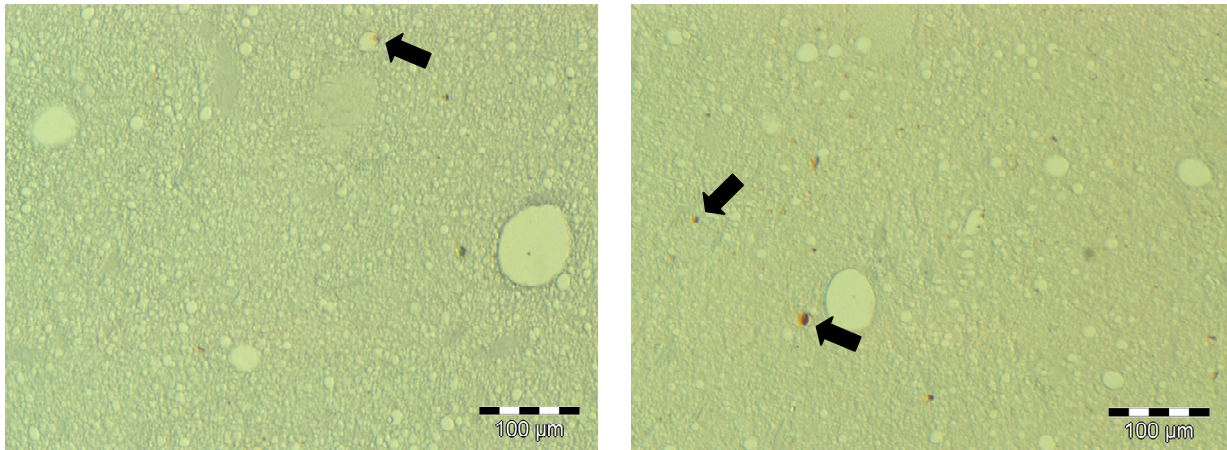


Abbildung 27: Immunhistochemische Darstellung von Neurofilament (NF) in ZNS-Standardmaterial

Links: 1 % ZNS, rechts: 3 % ZNS, Pfeile: NF-Partikel (beispielhaft)

Immunchemische Verteilungsuntersuchungen

Im Rahmen der Verteilungsuntersuchungen wurde für die Analyse des GFAP-Gehaltes ein im Institut für Lebensmittelhygiene der Universität Leipzig entwickelter GFAP-ELISA (Kunath et al., 2006), auf dem auch ein kommerziell verfügbarer GFAP-ELISA (Brainostic™ GFAP ELISA Kit, ScheBo®-Biotech AG, Gießen) basiert, verwendet. Eine detaillierte Beschreibung dieses Verfahrens kann auch dem vorangegangenen Abschlußbericht zur Entwicklung der GC/MS-Referenzmethode (Lücker et. al. 2005) entnommen werden.

Die Testung der Varianzquellen auf statistische Signifikanz und Varianzzerlegung erfolgte mit Hilfe der mehrfaktoriellen hierarchischen Varianzanalyse vom gemischten Modell im Folgenden als ANOVA abgekürzt.

Für diese statistische Auswertung sind geeignete hierarchisch strukturierte Probenahme- und Untersuchungsmodelle erforderlich. Wie in Tabelle 46 dargestellt, wurden in den eigenen Untersuchungen für die ZNS Konzentrationen von 1 % (K1) und 3 % (K2) aus dem vom MRI bereitgestellten Material (porcines ZNS, Erhitzungsstufe: 110 °C) jeweils 4 zufällig ausgewählte Dosen (D1..D4) an 4 definierten Stellen (S1..S4) jeweils 2 g Probenmaterial entnommen und im Potter mit SDS homogenisiert. Aus dem Homogenat wurden jeweils drei Proben (P1..P3) aufgearbeitet und im GFAP-ELISA in Doppelbestimmung analysiert.

Zusätzlich zu diesem „Makromodell“ (M1) wurde aus zwei der vier Dosen (D1, D2) Probenmaterial nach gleichem Schema (jedoch von nicht identischen Stellen) noch nach einem „Mikromodell“ (M2) untersucht. Dabei wurde von den Stellen (S1..S4) jeweils 4 Proben (P1..P4) von jeweils etwa 10 mg, nach vorausgehender fokaler manueller Homogenisation, entnommen, getrennt aufgearbeitet und im Anschluss ebenfalls in Doppelbestimmung im GFAP-ELISA analysiert. Somit ergaben sich im Makromodell 4 x 4 x 192 und im Mikromodell 128 Messwerte.

Tabelle 46: Hierarchien für die mehrfaktorielle Varianzanalyse zur GFAP-Verteilungsuntersuchung

Im Makromodell (M1) wurden insgesamt $2 \times 4 \times 4 \times 3 = 96$, im Mikromodell (M2) $2 \times 2 \times 4 \times 4 = 64$ Proben aufgeschossen und jeweils in Doppelbestimmungen mittels GFAP-ELISA analysiert. Die vertikale (V) und horizontale (H) Lokalisation der Stellen (S) ist angegeben.

Stufe (Fehlerquelle)	Abkürzung	Bemerkung	n (M1)	n (M2)
ZNS-Gehalte	K	Vorgegeben als Sollwert	2	2
	K1	1% ZNS		
	K2	3% ZNS		
Dosen	D	Vollständig randomisiert	4	2
	D1, 2, 3, 4			
	D1, D2			
Stellen	S	Partiell randomisiert:	4	4
	S1	V: Mitte, H: Mitte		
	S2	V: Rand, H:Unten		
	S3	V: Rand, H:Oben		
	S4	V: Rand, H:Mitte		
Proben	P	Vollständig randomisiert	3	4
	P1..3	2 g Matrix aus S		
	P1..4	10 mg Matrix aus S		
Messungen	M1,2	Vollständig randomisiert	2	2

Um vorliegende Heteroskedasizitäten (Levene-Test, Daten nicht dargestellt) auszuschließen, wurde die ANOVA-Auswertung getrennt nach Konzentrationen und Modellen durchgeführt. Zudem wurden die Hierarchie-Ebenen „Messungen“ (M) und „Proben“ (P) wegen der Geringfügigkeit der Varianzen in den Doppelbestimmungen (Daten nicht dargestellt) zusammengeführt (M = P). Dem zufolge wurden die ANOVA-Modelle von ursprünglich 5 auf 3 Stufen reduziert (D, S, M).

Zur Übersicht sind die ermittelten Datenverteilungen der Einzelbestimmungen für die beiden Modelle und Konzentrationen in Abbildung 28 in Box-Whisker-Plots zusammengefasst. Es wird deutlich, dass die Modelle einerseits ähnliche, nahezu normal verteilte und leicht linkssteile Verteilungen ergeben, somit gut vergleichbar sind, und andererseits in allen vier Fällen die Streubreiten recht ausgeprägt sind. Jedoch liegen die zentralen 50 % der Einzelmessungen in jeweils engen Bereichen und reduzieren so die Gesamtvarianzen.

Aus den Scatterplots der GFAP-Einzelmessungen in Abbildung 29 für 1 % ZNS und Abbildung 30 für 3 % ZNS, dargestellt sind auch Mittelwert und Standardabweichung für die

jeweiligen Stellen und für den Gesamtdatensatz (Konzentration, Methode), wird deutlich, dass zwischen den Dosen zum Teil gut nachweisbare Unterschiede vorliegen, während diese innerhalb der Dosen meist geringer ausfallen.

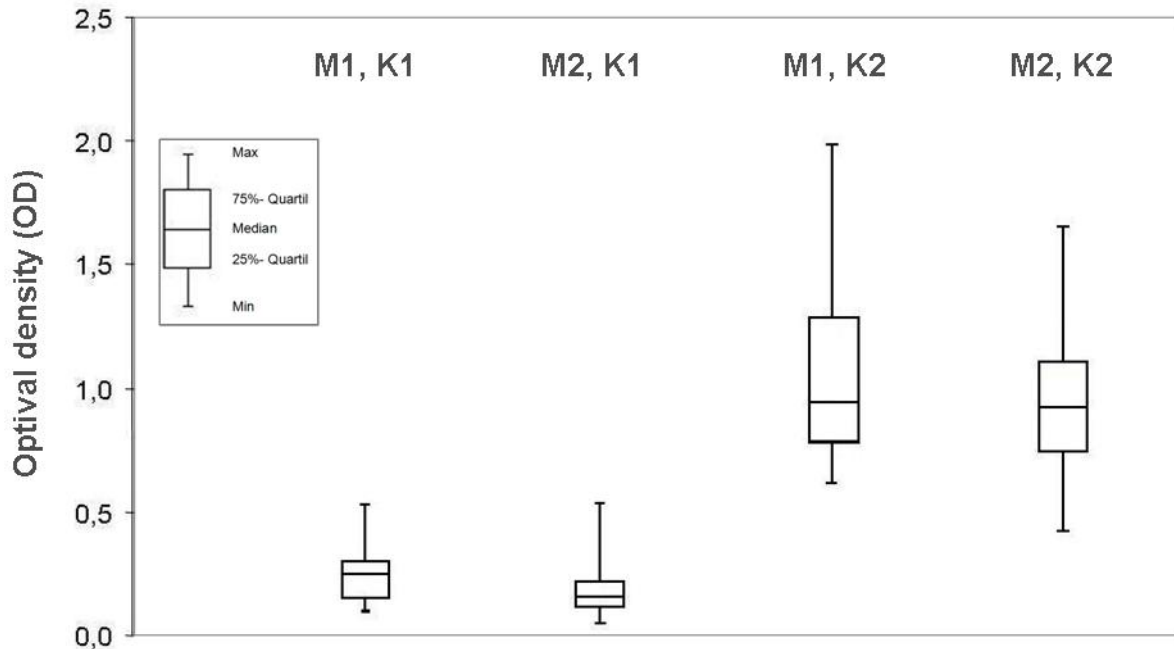


Abbildung 28: Verteilung der Einzelmessungen in der Übersicht (Box-Whisker-Plot) getrennt nach Modell und ZNS-Gehalten

M1: Makromodell, M2: Mikromodell, K1: 1 % ZNS, K2: 3 % ZNS

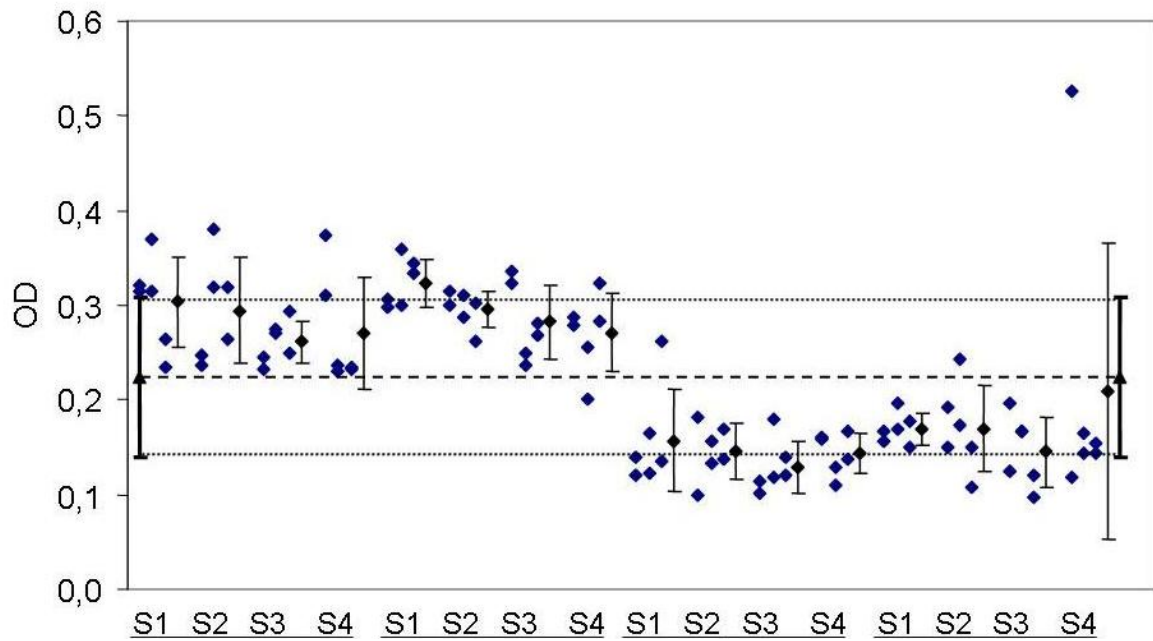


Abbildung 29: Ergebnisse der GFAP-Verteilungsuntersuchungen für Standardmaterial (D1..4) mit 1 % ZNS im Makromodell

Rauten: OD-Werte der Einzelmessungen, Rauten mit Fehlerbalken: Mittelwerte und Standardabweichungen für die Stelle (S1..4), Dreiecke (und gestrichelte Linie) mit Fehlerbalken (und punktierten Linien): Mittelwerte und Standardabweichungen aller Daten

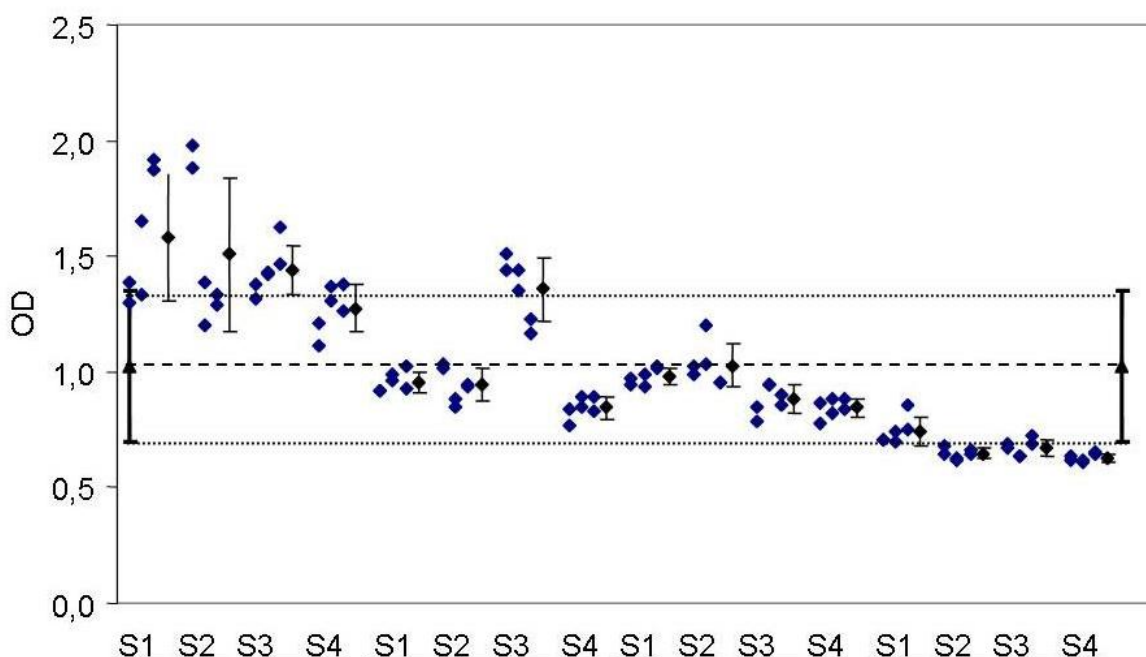


Abbildung 30: Ergebnisse der GFAP-Verteilungsuntersuchungen für Standardmaterial (D1..4) mit 3 % ZNS im Makromodell

Rauten: OD-Werte der Einzelmessungen, Rauten mit Fehlerbalken: Mittelwerte und Standardabweichungen für die Stelle (S1..4), Dreiecke (und gestrichelte Linie) mit Fehlerbalken (und punktierten Linien): Mittelwerte und Standardabweichungen aller Daten

In der statistischen Auswertung, der Ergebnisse, sie sind in Tabelle 47 zusammengefasst, bestätigen sich die Unterschiede zwischen den Dosen im Makromodell für beide ZNS-Gehalte mit $P < 0,001$ als hochsignifikant, während diese im Mikromodell nur im 3 % ZNS-Gehalt und nur mit $P < 0,05$ signifikant sind.

Der Einfluss der Stellen ist in beiden Modellen nur beim 3 % ZNS Gehalt mit $P < 0,01$ im Makromodell und mit $P < 0,05$ im Mikromodell signifikant.

Die Varianzzerlegung zeigt, dass die verteilungsbedingten Varianzen (Heterogenität) im Vergleich zur Restvarianz (analytisch-instrumentelle Varianz) bei Berücksichtigung aller vier Dosen im Makromodell die Gesamtvarianz zu einem beträchtlichen Anteil beeinflussen. Dies gilt noch mehr für die berechneten Standardabweichungen, bei denen die Heterogenität den analytischen Gesamtfehler deutlich dominiert. Bei Berücksichtigung nur zweier Dosen (D1 und D2) werden diese heterogenitätsbedingten Einflüsse nicht (Makromodell) oder nur gering (Mikromodell) nachweisbar.

Aus den immunchemischen ZNS-Verteilungsuntersuchungen ergeben sich Hinweise auf nachweisbare GFAP-Heterogenitäten, die sich insbesondere auf Unterschiede zwischen einzelnen Dosen, weniger auf die Lokalisationen innerhalb der Dosen („Stellen“) beziehen.

Diese Befunde würden am ehesten auf eine unterschiedliche temperaturbedingte Reduktion der Immunreaktivität von GFAP bei der Herstellung der Vollkonserven zurückzuführen sein. Da sich die Fettsäuren als ausgesprochen hitzeresistent erwiesen haben, wäre keine Relevanz für die GC/MS-Ringtests zu befürchten. A posteriori waren erkennbar durch Heterogenität bedingte Unterschiede in den Ergebnissen der GC/MS-Untersuchungen nicht feststellbar.

Tabelle 47: Ergebnisse der Verteilungsuntersuchung mit dem GFAP-ELISA

Mehrfaktorielle hierarchische Varianzanalyse der ermittelten GFAP-Gehalte in den Dosen 1 bis 4 (D1..4) mit der Makromethode (M1) bzw. in Dosen 1 und 2 (D1,2) mit dem Makro- und Mikromodell (M1, M2); signifikante Ergebnisse im F-Test für $P < 0,001$: ***, $P < 0,01$: ** und $P < 0,05$: *, s^2 : Varianz, δ : Standardabweichung und Σ : Gesamtvarianz, bzw. Gesamtstandardabweichung.

Modell	ZNS	D	Fehler-Quelle	F-Test	s^2	δ
M1	1 %	D1..4	D	0,0000***	0,0057	0,0755
			S (D)	0,7084	0,0000	0,0000
			M (D S)	-	0,0018	0,0424
			Σ	-	0,0075	0,0866
M1	3 %	D1..4	D	0,0000***	0,0991	0,3148
			S (D)	0,0030**	0,0137	0,1170
			M (D S)	-	0,0174	0,1320
			Σ	-	0,1302	0,3608
M1	1 %	D1,2	D	0,4884	0,0000	0,0070
			S (D)	0,5733	0,0000	0,0100
			M (D S)	-	0,0017	0,0412
			Σ	-	0,0074	0,0860
M1	3 %	D1,2	D	0,0175*	0,0814	0,2853
			S (D)	0,0313*	0,0233	0,1526
			M (D S)	-	0,0326	0,1806
			Σ	-	0,2675	0,5172
M2	1 %	D1,2	D	0,1891	0,0006	0,0245
			S (D)	0,2185	0,0007	0,0265
			M (D S)	-	0,0054	0,0735
			Σ	-	0,0067	0,0819
M2	3 %	D1,2	D	0,2482	0,0015	0,0385
			S (D)	0,8187	0,0000	0,0000
			M (DS)	-	0,0780	0,2792
			Σ	-	0,0795	0,2819

4.1.7 Optimierung der Grundlage zur Identifizierung von ZNS-Spezies, -Alter und Quantifizierung (Meilenstein 6)

Ausgangspunkt waren Daten verschiedener Fettsäuremuster unterschiedlicher Tierarten und Alterskategorien aus dem vorhergehenden Forschungsvorhaben (Lücker et. al. 2005) sowie einer Vielzahl eigener Untersuchungen nach Abschluss dieses Projektes. Sie dienten dem Zweck der Differenzierung von Tierart und Tieralter des ZNS. Diese im Vergleich zum Vorprojekt wesentlich erweiterte Datenbasis war im Hinblick auf verschiedene Altersstufen und der Tierart Geflügel jedoch noch nicht ausreichend. Daher sollte im Verlauf der laufenden Ringtests die bestehende Datenbank weiter ausgebaut werden.

Als Geflügel wurden Tiere der Arten Gans (sieben Gehirne, eine Altersstufe), Ente (acht Gehirne, eine Altersstufe), Huhn (16 Gehirne, zwei Altersstufen) und Pute (14 Gehirne, zwei Altersstufen) beprobt. Bei der Tierart Schwein wurden von insgesamt 50 Tieren im Alter von 10 Tagen bis 40 Monaten Proben vom ZNS entnommen. Weiterhin wurden das ZNS von neun Ziegen und 24 Schafen beprobt.

4.1.7.1 Quantifizierte Fettsäuregehalte im ZNS von Schwein, Schaf, Ziege und Geflügel

Für die ZNS-Spezies Schwein wurden mittlere Cerebronsäuregehalte von 594 mg/kg bis 2.379 mg/kg für die vier analysierten Altersgruppen (10 Tage, 2 Monate, 5 Monate und 20-40 Monate) gemessen (Tabelle 48). Abweichend von der Tierart Rind kann jedoch für diese Tierart kein mittlerer Cerebronsäuregehalt für alle vier Altersklassen berechnet werden, da dieser im ZNS altersabhängig ist (siehe Kap. 4.1.7.3). Wenn eine genaue Ermittlung des Gehaltes von Schweine-ZNS in Fleischerzeugnissen erforderlich ist, so ist diese unter Berücksichtigung des Alters des ZNS vorzunehmen.

Tabelle 48: Gehalte der FAME C24:0, C24:1 ω 9 und C24:1 ω 7 sowie C24:0-OH im Gehirn von Schweinen der Altersklassen 10 Tage, 2 Monate und 5 Monate.

	C24:0 (mg/kg)		C24:1 ω 9 (mg/kg)		C24:1 ω 7 (mg/kg)		C24:0-OH (mg/kg)	
	mw	sd	mw	sd	mw	sd	mw	sd
Schwein 10 Tage (n=6)	305	33	341	45	118	9	594	162
Schwein 2 Monate (n=13)	442	152	914	182	352	63	1037	218
Schwein 5 Monate (n=12)	497	57	1467	257	646	189	1130	102
Schwein 20-40 Monate (n=3)	527	63	2440	1298	868	735	2379	183

mw- Mittelwert

sd- Standardabweichung

Beim Geflügel gestaltet sich zwischen den Tierarten die Cerebronsäurekonzentration im Gehirn als ausgesprochen heterogen. Die mittleren Gehalte reichen von 220 mg/kg (Gans) bis 1.876 mg/kg (Huhn, 21 Wochen) (Tabelle 49). Somit ist das Zusammenfassen der vier Tier-

arten zu einer Gruppe (Geflügel) für eine genaue Quantifizierung des ZNS-Gehaltes nicht zweckdienlich. Zudem gibt es Hinweise auf eine starke Altersabhängigkeit des Cerebronsäuregehaltes im ZNS der Tierart Huhn, die ebenso wie beim Schwein eine altersabhängige Quantifizierung der ZNS-Konzentration erfordern würde.

Tabelle 49: Gehalte der FAME C24:0, C24:1 ω 9 und C24:1 ω 7 sowie C24:0-OH im Gehirn von Enten (9 Monate, n=9), Gänsen (9 Monate), Hühnern (13 und 21 Wochen), Puten (16 und 21 Wochen).

	C24:0 (mg/kg)		C24:1 ω 9 (mg/kg)		C24:1 ω 7 (mg/kg)		C24:0-OH (mg/kg)	
	mw	sd	mw	sd	mw	sd	mw	sd
Ente (9 Monate, n= 9)	427	118	1727	481	362	101	936	338
Gans (9 Monate, n= 7)	371	82	1399	240	236	50	220	45
Huhn (13 Wochen, n= 7)	298	78	1416	394	319	64	378	139
Huhn (21 Wochen, n= 12)	511	235	2599	762	583	158	1876	644
Pute (16 Wochen, n= 15)	238	59	786	181	245	45	243	63
Pute (21 Wochen, n= 9)	338	72	1163	265	340	73	383	101

mw- Mittelwert

sd- Standardabweichung

Im Allgemeinen sind die Gehalte an Hydroxyfettsäuren beim Geflügel im Vergleich zu anderen Tierarten sehr gering. Der Cerebronsäuregehalt bei Puten im Alter von 21 Wochen entspricht 34 % des Wertes den ein Schwein gleichen Alters aufweist.

Die Peaks aller Hydroxyfettsäuren in den Chromatogrammen sind im Vergleich zu Säugertierproben identischen Alters bedeutend kleiner (Abbildung 31).

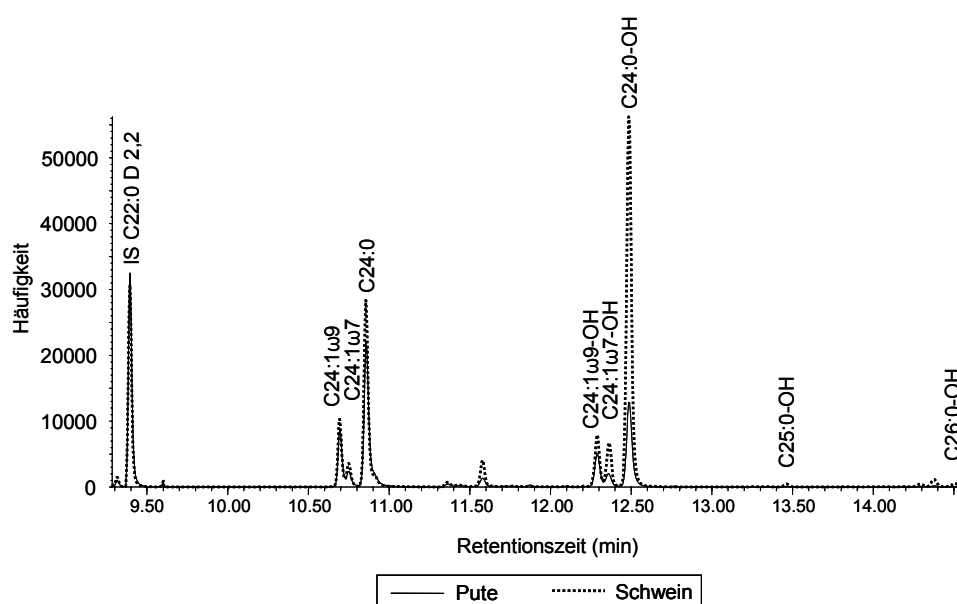


Abbildung 31: Vergleich der FAME eines Schweinegehirns und eines Putengehirns.

Insbesondere die Fettsäuren C25:0-OH und die C26:0-OH, die beim Schwein in der Altersgruppe 5 Monate gut sichtbar sind, können bei 5 Monate alten Puten nur in Spuren nachge-

wiesen werden. Bei Aufnahme dieser zwei Fettsäuren kann die Differenzierung zwischen Säugetieren und Vögeln erleichtert werden.

Erfolgt die Kalibration basierend auf Brühwurststandards mit ZNS von 6 Monate alten Schweinen, so werden geringere Gehalte an ZNS nachgewiesen, wenn Geflügel-ZNS verarbeitet wurde, da dieses einen wesentlich geringeren Gehalt an Cerebronsäure besitzt als ZNS von Schwein. ZNS-Gehalte von 0,3 % Geflügelgehirn würden bei einer Brühwurstkalibration mit Schweine-ZNS zu einer Konzentration von <0,2 % ZNS (unterhalb des Cut Off) und damit zu einem falsch-negativen Ergebnis führen. Somit ist die Einführung eines Korrekturfaktors (Faktor 3) für die Geflügelarten notwendig. Problematisch ist die zusätzliche Altersabhängigkeit, die im Verlauf dieser Arbeit beim Huhn beobachtet wurde. Bei den anderen Geflügelarten steht eine Überprüfung noch aus.

Der mittlere Cerebronsäuregehalt über alle Alterstufen bei der Ziege beträgt $1351,98 \pm 484$ mg/kg (n=10) und liegt damit etwas höher als bei den Schafen (1270 ± 203 mg/kg; n=12), die im letzten Forschungsprojekt gemessen wurden (Lücker et al. 2005). Auch der mittlere Gehalt der Lignocerinsäure (817 ± 360 mg/kg; n=9) unterscheidet sich kaum von den Gehalten die bei Schafen nachgewiesen wurden. Nahezu dreifach so hohe Gehalte wie beim Schaf konnten im Mittel bei der Nervonsäure (1463 ± 715 mg/kg; n=9) sowie bei der C24:1 ω 7 (200 ± 97 mg/kg, n=9) bestimmt werden (Tabelle 50).

Tabelle 50: Gehalte der FAME C24:0, C24:1 ω 9 und C24:1 ω 7 sowie C24:0-OH im Gehirn der Ziege.

Proben: 3 Monate alten Ziegen (n=3), 4-8 Monate alten Ziegen (n=3), 10-18 Monate alten Ziegen (n=1) und zwei Ziegen unbekanntes Alters.

	C24:0 (mg/kg)		C24:1 ω 9 (mg/kg)		C24:1 ω 7 (mg/kg)		C24:0-OH (mg/kg)	
	mw	sd	mw	Sd	Mw	sd	mw	sd
Ziege 3 Monate (n=3)	485	286	1018	624	180	83	991	508
Ziege 4-8 Monate (n=3)	671	90	1302	583	242	29	1025	98
Ziege 10-18 Monate (n=1)	1113		886		391		1142	
Ziege alter unbekannt (n=2)	1068	544	1999	1116	109	25	1899	437

mw- Mittelwert
sd- Standardabweichung

Da von nur vier Ziegen das genaue Alter bekannt ist, konnte eine Korrelationsberechnung für die Fettsäuren, wie dies bei den anderen Tieren erfolgte, nicht vorgenommen werden. Bei den anderen ZNS-Proben war das Alter mittels Zahnaltersbestimmung geschätzt worden oder gänzlich unbekannt. Die Zahnaltersbestimmung wird vor den Autoren als unzureichend für die Erstellung einer Altersdatenbank angesehen, da es sich hierbei nur um grobe Schätzwerte handelt. Somit kann eine Abhängigkeit des Cerebronsäuregehaltes vom Alter

bei dieser Tierart nicht vollständig ausgeschlossen werden. Für eine Überprüfung werden aber noch weitere ZNS-Proben von Tieren mit definiertem Alter benötigt.

4.1.7.2 Optimierung der Differenzierung des ZNS der Tierarten Rind, Schaf, Schwein und Geflügel

Im vorangegangenen Forschungsbericht wurden die Verhältnisse C24:1 ω 9 / C24:1 ω 7 (V1) und C24:1 ω 9-OH / C24:1 ω 7-OH (V2) für die Differenzierung der Tierarten Rind, Schaf und Schwein vorgeschlagen. Für die Trennung zwischen Wiederkäuern (Rind und Schaf) und Nicht-Wiederkäuern (Schwein) sind diese zwei Verhältnisse ausreichend. Ist jedoch eine Unterscheidung zwischen Rind und Schaf erforderlich, so muss der Quotient aus beiden Verhältnissen (V1/V2) gebildet und zusätzlich zur Differenzierung herangezogen werden. Dies kann man mittels Partial Least Square-Discriminant Analysis (PLS-DA) verdeutlichen. Bei diesem statistischen Verfahren wird basierend auf Variablen ein Modell zur Trennung von Klassen erstellt. Anschließend kann basierend auf diesem Modell eine Vorhersage der Klassenzugehörigkeit von Proben mit unbekannter Klasse erfolgen (Eriksson et al. 2006). Übertragen auf dieses Verfahren ergibt sich somit die Möglichkeit der Erstellung eines mathematischen Modells zur Trennung zwischen den Tierarten Rind, Schwein und Schaf basierend auf den eingegebenen Verhältniswerten, die aus der Untersuchung von ZNS-Proben gewonnen wurden. Dieses Modell kann anschließend für die Vorhersage der Gruppenzugehörigkeit (Rind, Schwein oder Schaf) von ZNS-positiven Brühwurstproben verwendet werden.

Werden die Verhältnisse V1 und V2 in einem Modell für die Trennung zwischen den drei Tierarten Rind, Schaf und Schwein eingefügt, so ergibt sich ein Modell mit schlechter Vorhersagefähigkeit ($Q^2_{cum} = 0,338$). Laut Lundstedt et al. (1998) werden für biologische Daten Modelle mit einem $Q^2_{cum} > 0,4$ als akzeptabel betrachtet. Somit ist das obengenannte Modell nicht geeignet für die Trennung der drei Tierarten. Wird hingegen das Verhältnis V1/V2 in das Modell aufgenommen, würde dies zu einem deutlichen Anstieg der Vorhersagefähigkeit führen. Statt $Q^2_{cum} = 0,338$ ergibt sich $Q^2_{cum} = 0,842$. Mit Hilfe dieses zweiten Modells gelang die korrekte Trennung von 95,6% der untersuchten ZNS-Proben ($n=116$). Damit konnte nachgewiesen werden, dass nur basierend auf den drei Verhältnissen V1, V2, V1/V2 die eindeutige Trennung der drei Tierarten Rind, Schaf und Schwein gelingt (Grießbach et al. 2008). Der Grund für die verbesserte Trennung bei Aufnahme des Verhältnisses V1/V2 in die Modelberechnung liegt in den sich signifikant unterscheidenden Mittelwerten des Verhältnisses für die Tierarten Rind und Schaf ($p > 0,001$, Mann-Whitney-U-Test).

Das Modell mit den drei Verhältnissen ist jedoch nicht ausreichend, wenn es zusätzlich die Tierart Geflügel abzugrenzen gilt. Aufgrund der Überschneidungen, insbesondere bei den Minimal- und Maximalwerten (Tabelle 51, Tabelle 52 und Tabelle 53) ist in diesem Fall keine eindeutige Trennung zwischen den vier Tierarten möglich.

Tabelle 51: Statistische Kenngrößen des FS-Verhältnisses C24:1 ω 9-OH/C24:1 ω 7-OH für die Tierarten Rind (n=24), Schaf (n=14), Ziege (n=6);Schwein (n=40), Geflügel (n=54).

	Rind (n=24)	Schaf (n=14)	Ziege (n=6)	Schwein (n=40)	Geflügel (n=54)
Mittelwert	6,19	8,16	6,69	1,32	3,27
Standardabweichung	2,20	4,81	1,47	0,17	0,68
Maximum	2,61	2,13	5,14	1,04	2,09
Minimum	10,14	23,80	8,86	1,81	4,42

Tabelle 52: Statistische Kenngrößen des FS-Verhältnisses C24:1 ω 9/C24:1 ω 7 für die Tierarten Rind (n=24), Schaf (n=14), Ziege (n=6);Schwein (n=40), Geflügel (n=54).

	Rind (n=24)	Schaf (n=14)	Ziege (n=6)	Schwein (n=40)	Geflügel (n=54)
Mittelwert	17,39	8,16	6,44	2,62	4,36
Standardabweichung	6,04	4,81	1,89	0,41	1,02
Maximum	7,98	2,13	3,78	1,77	2,95
Minimum	25,84	23,80	8,91	3,80	6,43

Tabelle 53: Statistische Kenngrößen des FS-Verhältnisses (C24:1 ω 9/C24:1 ω 7)/(C24:1 ω 9-OH/C24:1 ω 7-OH) für die Tierarten Rind (n=24), Schaf (n=14), Ziege (n=6);Schwein (n=40), Geflügel (n=54).

	Rind (n=24)	Schaf (n=14)	Ziege (n=6)	Schwein (n=40)	Geflügel (n=54)
Mittelwert	2,82	1,18	0,96	2,00	1,34
Standardabweichung	0,17	0,31	0,16	0,22	0,16
Maximum	2,50	0,33	0,73	1,48	1,01
Minimum	3,15	1,57	1,14	2,35	1,85

Bei der Untersuchung der Fettsäurezusammensetzung des ZNS von Geflügel wurden sehr geringe Gehalte an hydroxylierten Fettsäuren festgestellt. Daher würden sich Verhältnisse mit hydroxylierten Fettsäuren hervorragend für die Trennung zwischen Geflügel- und Säugetier-ZNS eignen. Zur Auswahl standen die Cerebronsäure (C24:0-OH), die Hydroxypentacosansäure (C25:0-OH) sowie die Hydroxyhexacosansäure (C26:0-OH). Die Cerebronsäure ist aufgrund der Altersabhängigkeit des Gehaltes beim Schwein nicht geeignet, daher wurden die Hydroxypentacosansäure und die Hydroxynervonsäure ausgewählt.

Zur Vereinfachung der Auswertung für den Anwender wurde die Tierartdifferenzierung von der einstufigen Differenzierung in eine zweistufige Differenzierung umgewandelt (Abbildung 32). Eine Differenzierung nur in Wiederkäuer und Nichtwiederkäuer ist nicht ausreichend für die SRM-Kategorisierung. Innerhalb der Gruppe der Wiederkäuer muss eine Differenzierung in Rind und Schaf erfolgen um zu gewährleisten, dass eine richtige Berechnung des Alters erfolgen kann. Eine Anwendung des Verhältnisses zur Altersberechnung beim Rind (Formel 3, S.107) bei der Tierart Schaf würde zu einer zu hohen Einschätzung des Tieralters und letztendlich zu falsch-positiven SRM-Ergebnissen führen.

Darüberhinaus ermöglicht die zweistufige Differenzierung die folgerichtige Anwendung der Verhältnisse und damit eine wesentliche Verbesserung der Trennung der Tierarten gegenüber dem einstufigen Modell.

Bei der zweistufigen Differenzierung wurde in der ersten Stufe zwischen Wiederkäuern (WdK) und Nicht-Wiederkäuern (kein WdK) getrennt. Für diesen Schritt wurden die Verhältnisse $C_{24}:1\omega_9\text{-OH} / C_{24}:1\omega_7\text{-OH}$ (V2) und $C_{24}:1\omega_9\text{-OH} / C_{25}:0\text{-OH}$ (V3) ausgewählt.

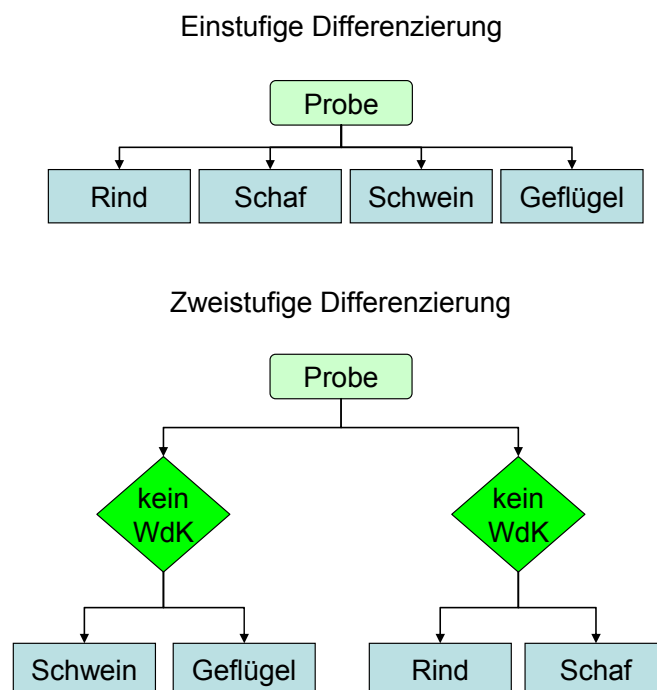


Abbildung 32: Schematische Darstellung der einstufigen und zweistufigen Tierartdifferenzierung.

Die Ähnlichkeit der Verhältnswerte beim Schwein und Geflügel auf der einen Seite und bei Rind und Schaf auf der anderen Seite ermöglichen diese Vorgehensweise. Die festgelegten Grenzwerte basieren auf den berechneten Minima und Maxima der jeweiligen Tierarten (Tabelle 51 und Tabelle 54).

Tabelle 54: Mittlere Verhältniswerte und Schwankungsbreiten des FS-Verhältnisses C24:1 ω 9-OH/C25:0-OH für die Tierarten Rind (n=24), Schaf (n=14), Ziege (n=6);Schwein (n=40), Geflügel (n=54).

	Rind (n=24)	Schaf (n=14)	Ziege (n=6)	Schwein (n=40)	Geflügel (n=54)
Mittelwert	2,57	25,78	46,19	22,59	86,53
Standardabweichung	2,43	24,28	20,10	9,59	36,71
Maximum	0,54	1,97	25,90	3,75	35,16
Minimum	8,35	99,81	72,09	65,38	188,03

Für die Zuordnung einer ZNS-positiven Probe zur Gruppe der Wiederkäuer muss der rechnerische Wert des Verhältnisses C24:1 ω 9-OH / C24:1 ω 7-OH über drei und der Verhältniswert von C24:1 ω 9-OH / C25:0-OH unter 30 liegen. Wird eine dieser Bedingungen nicht erfüllt, so ist diese Probe in die Gruppe der Nicht-Wiederkäuer einzuordnen.

In der zweiten Differenzierungsstufe erfolgt dann jeweils die Differenzierung innerhalb der Gruppe der Wiederkäuer in Schaf und Rind sowie innerhalb der Gruppe der Nichtwiederkäuer in Schwein und Geflügel.

Für die Differenzierung zwischen Rind und Schaf wurde das Verhältnis (C24:1 ω 9 / C24:1 ω 7) / (C24:1 ω 9-OH / C24:1 ω 7-OH) ausgewählt. Ein Verhältniswert größer zwei bedingt die Zuordnung des detektierten ZNS zur Tierart Rind. Es weist für die Trennung der beiden Tierarten signifikante Verhältnismittelwerte auf ($p=0,000$, Mann-Whitney-U-Test) und eignet sich somit hervorragend für die Differenzierung. Es ist jedoch nicht für die Trennung innerhalb der Nichtwiederkäuer geeignet (Tabelle 53).

Für eine Differenzierung zwischen Schwein und Geflügel innerhalb der Klasse der Nicht-Wiederkäuer, wurden nochmals die Verhältnisse C24:1 ω 9-OH / C24:1 ω 7-OH und C24:1 ω 9-OH / C25:0-OH mit folgenden Grenzwerten ausgewählt. Für die Einordnung zur Tierart Geflügel muss der Verhältniswert von C24:1 ω 9-OH / C24:1 ω 7-OH größer als 2,5 und der Verhältniswert von C24:1 ω 9-OH / C25:0-OH größer als 37 sein. Ein Nichterfüllen einer der beiden Bedingungen resultiert automatisch in der Zuordnung zum Schwein (Abbildung 18).

4.1.7.3 Optimierung der Altersbestimmung des ZNS

In vorausgegangenen Forschungsarbeiten waren die Fettsäureverhältnisse C24:1 ω 9 / C24:1 ω 7 (V1) und C24:1 ω 9-OH / C24:1 ω 7-OH (V2) für die Bestimmung des Tialters beim Rind und Schaf als geeignet bewertet worden. Die Altersbestimmung erfolgte basierend auf Grenzwerten der Verhältnisse, die für festgelegte Altersklassen beim Rind

(<12 Monate, 13-24 Monate, 25-36 Monate und >36 Monate) und Schaf (<12 Monate, >12 Monate) berechnet wurden. Diese Altersklassen orientierten sich an der im Jahre 2005 gültigen SRM-Definition, die besagte, dass unter anderem das Gehirn und Rückenmark von Wiederkäuern älter als 12 Monate als SRM einzugruppiert ist.

Vorteil dieser Vorgehensweise ist, dass eine schnelle und einfache Zuordnung zu den Altersklassen erfolgen kann. Jedoch müssten diese starren Altersklassen bei jeder Änderung der rechtlichen Vorgaben erneut angepasst werden. Im vorliegenden Projekt wurde daher eine Umstellung der Altersberechnung auf die Regressionsanalyse vorgenommen, um das Verfahren in dieser Hinsicht zu flexibilisieren.

Neben der Umstellung der Altersbestimmung von Grenzwerten auf die Regressionsanalyse erfolgte die Auswahl und Prüfung weiterer Fettsäureverhältnisse.

Tieraltersbestimmung des ZNS der Tierart Rind

Die für die Altersbestimmung verwendeten Verhältnisse C24:1 ω 9 / C24:1 ω 7 (V1) und C24:1 ω 9-OH / C24:1 ω 7-OH (V2) wurden hinsichtlich der Korrelation mit dem Alter des ZNS untersucht. Für das Verhältnis V1 beträgt der Korrelationskoeffizient $r=0,842$ und für das Verhältnis V2 $r=0,871$.

Aufgrund des geringeren Korrelationskoeffizienten von V1 wurde nur für V2 eine Funktion zur Altersbestimmung erstellt (Abbildung 33). Die Funktion lautet:

**Formel 3: Berechnung des Tieralters beim Rind basierend auf dem Verhältnis
C24:1 ω 9-OH / C24:1 ω 7-OH.**

$$\text{Alter (Monate)} = 7,4726 \cdot (\text{C24:1}\omega\text{9-OH} / \text{C24:1}\omega\text{7-OH}) - 22,607$$

und weist ein Bestimmtheitsmaß von $R^2=0,700$ auf.

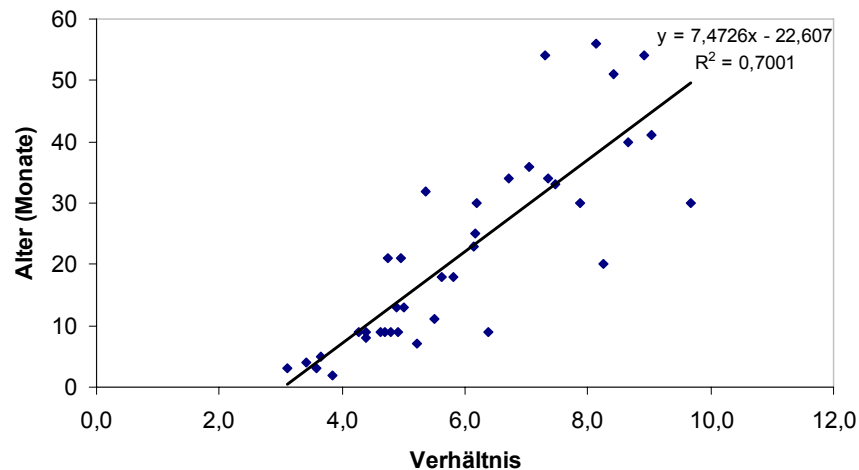


Abbildung 33: Funktion zur Berechnung des Tieralters des ZNS vom Rind basierend auf dem Verhältnis C24:1 ω 9-OH/C24:1 ω 7-OH.

Die mittlere Differenz zwischen vorhergesagtem und tatsächlichem Alter der beprobten Tiere beträgt für das Verhältnis V2: 6 ± 6 Monate (MW $\pm\sigma$).

Bei der Suche nach neuen verwertbaren Verhältnissen wurden aus allen zwölf gemessenen Fettsäuren 66 Verhältnisse gebildet und die Korrelation zum Alter berechnet. Eine Übersicht zu den gebildeten Verhältnissen und deren Abkürzungen befindet sich in Tabelle 55. Hierbei wiesen die Verhältnisse C24:1 ω 7-OH / C25:0-OH (V42) und C24:0-OH / C25:0-OH (V35) den höchsten Korrelationskoeffizienten auf. Basierend auf 24 Gehirnprouben vom Rind wurde ein Korrelationskoeffizient (r) nach Spearman-Rho von $r=-0,925$ (V42) und von $r=-0,908$ (V35) ermittelt (Tabelle 56, Abbildung 34 und Abbildung 35).

Tabelle 55: Bezeichnung der 66 Verhältnisse.

Bez.	Fettsäureverhältnis	Bez.	Fettsäureverhältnis
V1	C24:1 ω9/C24:1ω7	V34	C24:0-OH/C24:1ω9
V2	C24:1ω9-OH/C24:1ω7-OH	V35	C24:0-OH/C25:0-OH
V3	C24:1ω9-OH/C25:0-OH	V36	C24:0-OH/C26:0-OH
V4	C22:1ω7/C24:1ω7-OH	V37	C24:0-OH/C26:1ω7-OH
V5	C22:1ω7/C24:1ω9-OH	V38	C24:0-OH/C26:1ω9-OH
V6	C22:1ω7/C24:1ω7	V39	C22:1ω7/C24:0
V7	C22:1ω7/C24:1 ω9	V40	C24:1ω7-OH/C24:1ω7
V8	C22:1ω7/C25:0-OH	V41	C24:1ω7-OH/C24:1ω9
V9	C22:1ω7/C26:0-OH	V42	C24:1ω7-OH/C25:0-OH
V10	C22:1ω7/C26:1ω7-OH	V43	C24:1ω7-OH/C26:0-OH
V11	C22:1ω7/C26:1ω9-OH	V44	C24:1ω7-OH/C26:1ω7-OH
V12	C22:1ω9/C24:0	V45	C24:1ω7-OH/C26:1ω9-OH
V13	C22:1ω9/C24:0-OH	V46	C24:1ω9-OH/C24:1ω7
V14	C22:1ω9/C24:1ω7-OH	V47	C24:1ω9-OH/C24:1ω9
V15	C22:1ω9/C24:1ω9-OH	V48	C22:1ω7/C24:0-OH
V16	C22:1ω9/C24:1ω7	V49	C24:1ω9-OH/C26:0-OH
V17	C22:1ω9/C24:1ω9	V50	C24:1ω9-OH/C26:1ω7-OH
V18	C22:1ω9/C25:0-OH	V51	C24:1ω9-OH/C26:1ω9-OH
V19	C22:1ω9/C26:0-OH	V52	C22:1ω7/C22:1ω9
V20	C22:1ω9/C26:1ω7-OH	V53	C24:1ω7/ C25:0-OH
V21	C22:1ω9/C26:1ω9-OH	V54	C24:1ω7/ C26:0-OH
V22	C24:0/C24:0-OH	V55	C24:1ω7/ C26:1ω7-OH
V23	C24:0/C24:1ω7-OH	V56	C24:1ω7/ C26:1ω9-OH
V24	C24:0/C24:1ω9-OH	V57	C24:1ω9/C25:0-OH
V25	C24:0/C24:1ω7	V58	C24:1ω9/ C26:0-OH
V26	C24:0/C24:1ω9	V59	C24:1ω9/ C26:1ω7-OH
V27	C24:0/C25:0-OH	V60	C24:1ω9/ C26:1ω9-OH
V28	C24:0/C26:0-OH	V61	C25:0-OH / C26:0-OH
V29	C24:0/C26:1ω7-OH	V62	C25:0-OH / C26:1ω7-OH
V30	C24:0/C26:1ω9-OH	V63	C25:0-OH / C26:1ω9-OH
V31	C24:0-OH/C24:1ω7-OH	V64	C26:0-OH / C26:1ω7-OH
V32	C24:0-OH/C24:1ω9-OH	V65	C26:0-OH / C26:1ω9-OH
V33	C24:0-OH/C24:1ω7	V66	C26:1ω7-OH/C26:1ω9-OH

Tabelle 56: Funktionen der Verhältnisse C24:0-OH/C25:0-OH (V35) und C24:1 ω-7-OH/C25:0-OH (V42) für die Altersschätzung beim Rind.

Verhältnis	Formel für die Berechnung des Alters in Monaten	R ²	mittlere Differenz zwischen Ist- und Sollwert (Monate)
V35	Alter = 542,76(V35) ^{-1,2509}	0,919	5
V42	Alter = 6,9126(V42) ^{-0,7669}	0,933	5

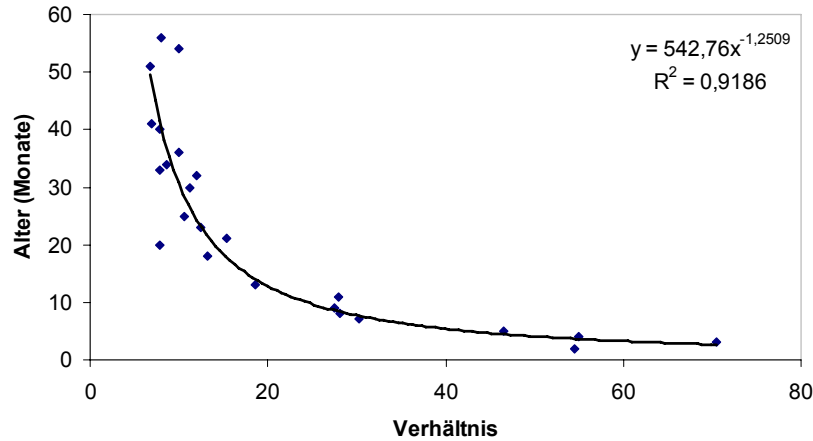


Abbildung 34: Funktion für die Berechnung des Tieralters beim Rind basierend auf dem Verhältnis C24:0-OH/C25:0-OH.

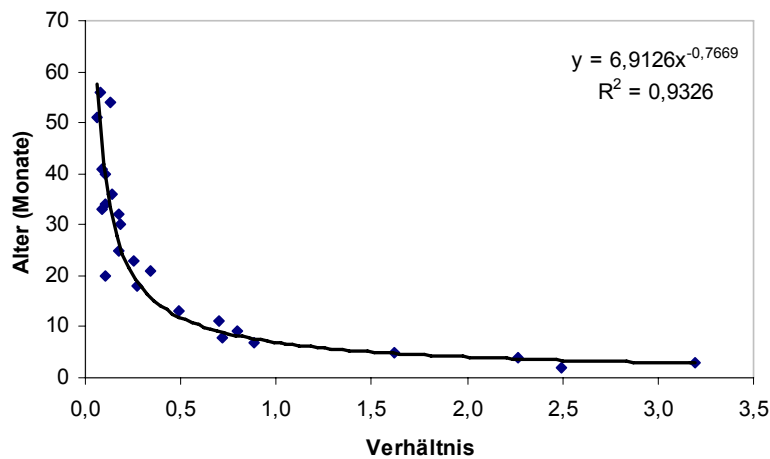


Abbildung 35: Funktion für die Berechnung des Tieralters beim Rind basierend auf dem Verhältnis C24:1ω7-OH/C25:0-OH.

Die mittlere Differenz zwischen dem berechneten Alter und dem tatsächlichen Alter beträgt 5 ± 7 Monate (MW $\pm\sigma$) für V35 und 5 ± 6 Monate für V42.

Beide Verhältnisse liegen damit um etwa einen Monat unter der mittleren Differenz des Verhältnisses V2. Somit kann mit diesen Verhältnissen die Genauigkeit der Altersbestimmung leicht verbessert werden.

Um die Eignung der zwei Fettsäureverhältnisse V35 und V42 für die Tieraltersbestimmung in Brühwürsten zu testen, wurden Proben aus den zwei Ringtests analysiert und das Alter mittels der Verhältnisfunktionen berechnet (Tabelle 57).

Hierbei ergaben sich mittlere Abweichungen des berechneten Alters vom tatsächlichen Alter von acht Monaten bei beiden Verhältnissen. Damit erhöht sich dieser Wert um drei Monate im Vergleich zu reinen ZNS-Proben. Es ist zu beachten, dass die Schwankungen bei V35 kleiner sind (sd= 4Monate) als bei V42 (sd=6 Monate). Als Ursache für die Differenzen zwi-

schen reinen ZNS-Proben und den ZNS-positiven Wurstproben kommen Matrixeffekte in betracht.

Tabelle 57: Vergleich des auf den Verhältnissen V35 und V42 berechneten Alters sowie der jeweiligen Ist-/Sollwertdifferenz von Ringtestproben mit Zusatz von Rinder-ZNS .

Probe	Erhitzung (°C)	ZNS (%)	Alter (Monate)	berechnetes Alter (Monate)		Differenz Ist-/Sollwert (Monate)	
				V35	V42	V35	V42
RV1-16	130	3	5	6	5	1	0
RV1-23	110	3	5	6	5	1	0
RV2-1	110	0,5	5	13	8	8	3
RV2-4	130	0,5	5	14	6	9	1
RV2-20	110	1	5	13	5	8	0
RV2-26	130	1	5	13	6	8	1
RV1-21	110	3	19	16	11	3	8
RV1-27	130	3	19	14	10	5	9
RV2-13	130	0,5	19	30	9	11	10
RV2-14	110	0,5	19	30	11	11	8
RV2-18	110	1	19	25	12	6	7
RV2-19	130	1	19	25	11	6	8
RV1-4	130	3	35	22	24	13	11
RV1-8	110	3	35	26	21	9	14
RV2-2	130	1	35	44	20	9	15
RV2-6	130	0,5	35	44	27	9	8
RV2-16	110	0,5	35	51	17	16	18
RV2-25	110	1	35	40	20	5	15

Die Schwankungen der Ergebniswerte des Tieralters zwischen dem ersten und dem zweiten Ringtest können durch die ZNS-Gehalte, die Erhitzung oder durch analytische Fehler bedingt sein. Im Gegensatz zum ersten Ringtest bei dem Proben mit einem ZNS-Gehalt von 3 % ZNS verwendet wurden, erfolgte im zweiten Ringtest die Analyse von Proben mit 0,5 % bzw. 1 % ZNS. Die Trennung der Fettsäureisomere C24:1 ω -9-OH und C24:1 ω -7-OH könnte bei Proben mit 0,5 % ZNS unter Umständen erschwert sein.

Durch eine stärkere Erhitzung ergeben sich etwas höhere Gehalte der analysierten Fettsäuren (Lücker et al. 2005), jedoch wird dadurch die Altersbestimmung nicht beeinflusst. Der Vergleich zwischen den zwei Erhitzungsgraden der Ringtestproben bestätigt dies. Für das Verhältnis V35 wurde ein nicht signifikantes Ergebnis mittels Wilcoxon-Test berechnet ($p=0,416$; $n=9$), gleiches gilt für V42 ($p=0,481$; $n=9$).

Auffällig ist, dass mit dem Verhältnis V42 eine eindeutige Identifizierung der 19 Monate alten Rinder als SRM nicht möglich ist, dies gelingt hierbei nur in einem Fall (RV2-18). Dagegen

wurden mit V35 vier Proben falsch dem SRM-Material zugeordnet. Es muss also davon ausgegangen werden, dass bei Anwendung des Verhältnis V42 für die Altersbestimmung falsch-negative und bei Anwendung von V35 falsch-positive Ergebnisse hinsichtlich der SRM Beurteilung erzielt werden. Tendenziell scheint aber das Verhältnis V35 für die Altersbestimmung besser geeignet zu sein als V42, da hier die Gefahr von falsch-negativen Ergebnissen vermieden wird.

Tieraltersbestimmung des ZNS der Tierart Schaf

Die Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Spearman-Rho und die Funktionserstellung wurde bei der Tierart Schaf nur auf die ZNS-Proben angewandt von denen das genaue Tialter (n=11) bekannt war (Tabelle 58).

Tabelle 58: Proben vom ZNS Schaf für die Berechnung des Korrelationskoeffizienten und der Funktion für die Altersvorhersage.

Tier	Alter (Monate)
Schaf 17	10
Schaf 18	72
Schaf 55	0
Schaf 56	0
Schaf 65	8
Schaf 66	10
Schaf 67	9
Schaf 68	3
Schaf 69	7
Schaf 70	7
Schaf 71	9

Der Korrelationskoeffizient für das Verhältnis C24:1 ω 9-OH / C24:1 ω 7-OH (V2) beträgt -0,881. Die Regressionsfunktion für die Altersvorhersage beim Schaf lautet:

Formel 4: Berechnung des Tieralters beim Schaf basierend auf dem Verhältnis C24:1 ω 9-OH / C24:1 ω 7-OH.

$$\text{Alter (Monate)} = 131,54 \cdot e^{-22,668 \cdot (1/V39)} \quad (R^2=0,789)$$

Die mittlere Abweichung zwischen vorhergesagtem und tatsächlichem Alter bei diesem Verhältnis beträgt 5 \pm 5Monate.

Für das Verhältnis V1 wurde wegen der zu geringen Korrelation mit dem Alter (r = -0,395) auf die Erstellung einer Regressionsfunktion verzichtet.

Analog zu der Tierart Rind erfolgte die systematische Untersuchung der Abhängigkeit der Fettsäurekonzentration sowie der daraus gebildeten 66 Verhältnisse vom Alter.

Die höchste Korrelation mit dem Alter wurde für die C25:0-OH ($r = 0,959$) ermittelt.

Für die C24:0-OH wurde ebenfalls eine sehr starke Korrelation ($r = 0,913$) zwischen Alter und dem Fettsäuregehalt nachgewiesen. Die geringste Abhängigkeit des Fettsäuregehaltes vom Alter wurde für die C24:0 berechnet ($r = -0,193$) (Tabelle 59).

Tabelle 59: Korrelationskoeffizienten für die Stärke des Zusammenhangs zwischen dem Alter der Schafe (n=11) und der analysierten Fettsäuren (n=12).

r = Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho

Fettsäure	r	Fettsäure	r
C22:1 ω 7	0,390	C24:1 ω 7	0,294
C22:1 ω 9	0,628	C24:1 ω 9	0,771
C24:0	-0,193	C25:0-OH	0,959
C24:0-OH	0,913	C26:0-OH	0,899
C24:1 ω 7-OH	-0,275	C26:1 ω 7-OH	0,339
C24:1 ω 9-OH	0,862	C26:1 ω 9-OH	0,784

Bei der Untersuchung auf Korrelation zwischen dem Alter und den 66 ermittelten Verhältnissen wurde für vier Verhältnisse ein Korrelationskoeffizient von $>0,9$ berechnet (Tabelle 60).

Tabelle 60: Funktionen für die Altersberechnung der Fettsäureverhältnisse, die einen Korrelationskoeffizienten $>0,9$ bei der Tierart Schaf aufweisen.

Verhältnis	Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho	Formel für die Berechnung des Alters in Monaten	R ²	mittlere Differenz Ist-/ Sollwert (Monate)
V42	-0,945	Alter = $11,598e^{-0,1807 \cdot V42}$	0,745	5
V45	-0,908	Alter = $513,34 \cdot (V45)^{-3,6886}$	0,658	5
V61	0,973	Alter = $12,913 \cdot (V61) - 5,4251$	0,946	3
V62	-0,959	Alter = $2,12 \cdot (V62) + 3,65$	0,981	3

Bei der Berechnung der mittleren Differenz zwischen Ist- und Sollwert ergaben sich Abweichungen von 3 bis 5 Monaten. Hierbei sind die Verhältnisse C25:0-OH / C26:1 ω 7-OH (V62) und C25:0-OH / C26:0-OH (V61) aufgrund ihrer geringen Differenz zwischen berechnetem und tatsächlichem Alter (3 Monate) und der hohen Korrelationskoeffizienten am besten geeignet für die Altersvorhersage beim Schaf.

Die ermittelten Verhältnisse wurden an Proben aus beiden Ringtests auf ihre Eignung für die Altersvorhersage erprobt (Tabelle 61).

Tabelle 61: Vergleich des auf den Verhältnissen V39, V42, V45, V61 und V62 berechneten Alters sowie der jeweiligen Ist-/Sollwertdifferenz von Ringtestproben mit Zusatz von Schaf-ZNS .

Probe	Alter (Monate)	geschätztes Alter (Monate)					Differenz Ist-/Sollwert (Monate)				
		V39	V42	V45	V61	V62	V39	V42	V45	V61	V62
RV1-10	5	4	8	11	9	6	1	3	6	4	1
Rv1-18	5	4	8	9	10	6	1	3	4	5	1
RV2-15	5	3	9	21	8	6	2	4	16	3	1
RV2-27	5	4	9	15	12	6	1	4	10	7	1
RV2-5	5	2	8	10	9	6	3	3	5	4	1
RV2-8	5	2	8	24	15	6	3	3	19	10	1
Rv1-20	27	35	11	n.b.	40	n.b.	8	16	n.b.	13	n.b.
RV1-5	27	43	11	54	53	37	16	16	27	26	10
RV2-11	27	24	11	49	47	18	3	16	22	20	9
RV2-12	27	23	11	45	41	42	4	16	18	14	15
RV2-22	27	17	11	n.b.	n.b.	n.b.	10	16	n.b.	n.b.	n.b.
RV2-3	27	37	11	53	29	35	10	16	26	2	8

n.b.-nicht bestimmbar

Hier hat sich bestätigt, dass mit Hilfe des Verhältnisses V62 das Alter mit den geringsten Abweichungen vorhersagt werden kann. Es wurde eine mittlere Differenz zwischen vorhergesagtem und tatsächlichem Alter von 5 ± 6 Monaten ($MW \pm \sigma$) berechnet. Vor allem bei den Proben, die ZNS von 5 Monate alten Tiere enthielten, wurden nur sehr geringe Abweichungen vom tatsächlichen Alter berechnet (± 1 Monat). Die Abweichungen bei den 27 Monate alten Schafen führen bei allen analysierten Proben zu einer Klassifikation als SRM. Bei den restlichen Verhältnissen wurden mittlere Abweichungen von 5-16 Monaten berechnet.

Das Verhältnis V39 ist ebenfalls gut für die Altersvorhersage beim Schaf geeignet. Es wurden keine falsch-positiven oder falsch-negativen SRM-Nachweise mit diesem Verhältnis ermittelt. Als ungeeignet stellten sich dagegen die Verhältnisse V42, V45 und V61 heraus.

Da bei der Tierart Schaf eine bislang unbekannt hohe Korrelation des ZNS-Indikators Cerebronsäure (C24:0-OH) mit dem Tialter nachgewiesen wurde, erfolgte die Überprüfung analog bei den Tierarten Schwein und Rind.

Im Gegensatz zur Tierart Rind ($r=0,445$), konnte beim Schwein für die Cerebronsäure (C24:0-OH) eine hohe Korrelation zwischen dem Alter und dem Fettsäuregehalt belegt werden ($r=0,800$). Diese hohe Korrelation könnte bei der Quantifizierung des ZNS-Gehaltes zu starken Abweichungen vom realen ZNS-Gehalt besonders bei zwei bis drei Jahre alten

Schweinen führen. Somit wäre für eine genaue Quantifizierung ein altersabhängiger Korrelationsfaktor notwendig. Da jedoch ein Großteil der Schlachtschweine in einem Alter von 6 Monaten zur Schlachtung kommt, erscheint dieser zusätzliche Schritt nicht sinnvoll.

Die Ergebnisse für die Tierart Geflügel deuten gleichfalls auf eine Altersabhängigkeit der Cerebronsäure hin, die jedoch vor dem Hintergrund der SRM Bewertung des ZNS die Einführung eines altersabhängigen Korrekturfaktors als nicht erforderlich erscheinen lassen.

Zusammenfassend ist hinsichtlich der Altersbestimmung des ZNS festzustellen, das beim Rind das Verhältnis C24:1 ω 9-OH/C24:1 ω 7-OH am Besten geeignet ist. Eine Einschätzung des ZNS-Alters ist auf Grundlage der folgenden Funktion (Formel 3) mit hinreichender Sicherheit möglich.

$$\text{Alter (Monate)} = 7,4726 \cdot (\text{C24:1}\omega\text{9-OH/C24:1}\omega\text{7-OH}) - 22,607$$

Für die Altersbestimmung beim Schaf sind die Verhältnisse C25:0-OH / C26:1 ω 7-OH und C24:1 ω 9-OH / C24:1 ω 7-OH geeignet. Die Berechnung des Tieralters beim Schaf kann nach folgenden zwei Funktionen (Formel 4 und 5) durchgeführt werden:

$$\text{Alter (Monate)} = 131,54 \cdot e^{-22,668 \cdot (\text{C24:1}\omega\text{9-OH/C24:1}\omega\text{7-OH})} \quad (\text{Formel 4})$$

und

Formel 5: Berechnung des Tieralters bei Schaf-ZNS basierend auf dem Verhältnis C25:0-OH / C26:1 ω 7-OH.

$$\text{Alter (Monate)} = 2,12 \cdot (\text{C25:0-OH / C26:1}\omega\text{7-OH}) + 3,65$$

Da diese Erkenntnisse erst gegen Ende dieses Projektes gewonnen wurden konnten diese nicht mehr in die Validierung mit einbezogen werden. Die Nachberechnungen haben jedoch ergeben, dass sich an der Klassifizierung für SRM / Non-SRM bei Einsatz der Regressionsfunktion für das Verhältnis V2 keine relevanten Änderungen hinsichtlich der Klassifizierung ergeben hätten. Für das Verhältnis V61 können keine Aussagen getroffen werden, da die hierfür erforderliche Fettsäure C26:1-OH ω 9 von den Teilnehmern nicht analysiert wurde.

4.2 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Darstellung

Im Forschungsvorhaben wurde das neu entwickelte Referenzverfahren zum Nachweis von spezifiziertem Risikomaterial (SRM) in Fleischerzeugnissen und Tiermehlen durch Ringtests hinsichtlich der Wiederholbarkeit, Vergleichbarkeit und analytischen Sicherheit validiert.

Als Grundlage diente das im vorangegangenen BMELV-Forschungsvorhaben (03HS011) entwickelte gaschromatographisch/massenspektrometrische (GC/MS) Verfahren. Vereinfacht dargestellt basiert dieses auf der Erfassung und Quantifizierung bestimmter ZNS-typischer Fettsäuren und deren Muster mittels GC/MS.

Es war das Ziel, mit dem Ringtest das Referenzverfahren zur Sicherung der Vermeidung eines humanen BSE-Expositionsrisikos über die Nahrungskette und auch zur Kontrolle bestehender gemeinschaftsrechtlicher Kennzeichnungsvorschriften analytisch zu charakterisieren.

Zur Verfügung stehende immunchemische Nachweisverfahren erlauben keine Identifizierung von Tierart und Erfassung des Alters des nachgewiesenen ZNS. Sie weichen dem zufolge erheblich von der rechtlichen Definition für spezifizierte Risikomaterialien (SRM) der Verordnung (EG) 999/2001 ab. Diese immunchemischen Verfahren zeichnen sich durch eine erhebliche Instabilität der Markerproteine gegenüber Temperatureinflüssen aus. Fleischtechnologisch übliche Erhitzungen bei der Herstellung von Vollkonserven können Reduktionen der Immunreaktivität um 50% und mehr verursachen. Sie sind demnach ungeeignet für die Erfassung von ZNS in Tiermehlen. Weiterhin fehlte der Lebensmittelüberwachung bislang ein unabhängiges Referenzverfahren zur Überprüfung bzw. Bestätigung von zweifelhaften bzw. positiven ZNS-Befunden.

Wertung

Mit der breiten Bewährung des Verfahrens im Verlauf dieses Forschungsvorhabens konnte der Beweis erbracht werden, dass das Verfahren praktikabel und anwendbar ist. Es konnte in diesem Projekt gezeigt werden, dass das auf diese Weise erprobte Verfahren in der Lage ist mit 98%iger Sicherheit SRM in Fleischerzeugnissen als solches zu erfassen.

Somit können, erstmals in der Geschichte der Lebensmittelüberwachung, mit hoher statistischer Sicherheit Aussagen über die Tierart und das Alter des verarbeiteten ZNS getroffen werden. Damit ist es nun möglich, spezifisches Risikomaterial (SRM) eindeutig und sicher zu identifizieren.

Das Schließen einer analytischen Lücke zur Bestimmung von SRM in Fleischerzeugnissen führt zu einer entscheidenden Verbesserung der analytischen Möglichkeiten hinsichtlich der Lebensmittelüberwachung. Das Verfahren steht nunmehr der amtlichen Überwachung zur Verfügung.

Umsetzung/Anwendung

Eine Einarbeitung in die Amtliche Sammlung für Untersuchungsverfahren nach §64 LFBG als Referenzverfahren zum Nachweis von SRM in Fleischerzeugnissen ist erwünscht und kann aufgrund der Ergebnisse dieser Ringtests vorgenommen werden.

5 Zusammenfassung

Im Forschungsvorhaben wurde das neu entwickelte Referenzverfahren zum Nachweis von spezifiziertem Risikomaterial (SRM) in Fleischerzeugnissen und Tiermehlen durch Ringtests hinsichtlich der Wiederholbarkeit, Vergleichbarkeit und analytischen Sicherheit validiert. Als Grundlage diente das im vorangegangenen Forschungsvorhaben (03HS011), finanziert durch das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV), entwickelte gaschromatographisch-massenspektrometrische (GC/MS) Verfahren. Vereinfacht dargestellt, basiert dieses Analysenverfahren auf der Erfassung und Quantifizierung bestimmter Fettsäuren, welche typischerweise in Geweben des zentralen Nervensystems (ZNS) vorkommen, sowie deren Verhältnisse mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS).

Dieses Referenzverfahren soll einen Beitrag zur Vermeidung eines humanen alimentären Expositionsrisikos mit den Erregern der transmissiblen spongiformen Enzephalopathien (TSE) leisten sowie zur Kontrolle bestehender gemeinschaftsrechtlicher Lebensmittelkennzeichnungsvorschriften (2000/13/EG) dienen.

Die zur Verfügung stehenden oder sich in der Entwicklung befindenden ZNS-Nachweisverfahren lassen bestenfalls eine Identifizierung der Tierart, aber keinerlei Aussage über das Alter des nachgewiesenen ZNS zu. Die damit erhaltenen Ergebnisse weichen somit erheblich von der rechtlichen Definition für SRM der Verordnung (EG) 999/2001 ab.

Das hier validierte Verfahren zeichnet sich durch eine erhebliche Hitzestabilität der Markerlipide aus. Fleischtechnologisch übliche Erhitzungen bei der Herstellung von Vollkonserven haben auf den Nachweis von SRM keinen signifikanten Einfluss. Sie sind demzufolge auch geeignet für die Erfassung von ZNS in Tiermehlen.

Eine Quantifizierung des ZNS in Fleischerzeugnissen ist mit Hilfe immunchemischer Verfahren nicht möglich, aufgrund der Hitzelabilität der Markerproteine und veränderliche Gehalte an saurem Gliafaserprotein (GFAP). Die derzeit zur Verfügung stehenden molekularbiologischen Verfahren sind hinsichtlich der Hitzestabilität der Boten-Ribonukleinsäure (m-RNA) und deren Gehalte bei unterschiedlichen Tierarten nicht verifiziert.

Bis heute fehlt der Lebensmittelüberwachung ein unabhängiges Referenzverfahren zur Überprüfung bzw. Bestätigung von zweifelhaften bzw. positiven ZNS-Befunden und der Identifizierung von SRM.

Diese Lücke wird durch den Nachweis von ZNS-typischen Fettsäuren mittels GC/MS geschlossen.

Das GC/MS Verfahren zum Nachweis von SRM beruht auf der folgenden komplexen Analy senstrategie:

- (1) Identifizierung und Quantifizierung von ZNS-positiven Proben (Cut-off 0,2 % ZNS) anhand des Cerebronsäuregehaltes
- (2) Identifizierung der Tierart des verarbeiteten ZNS
- (3) Identifizierung des Tieralters bzw. der Alterskategorie des verarbeiteten ZNS

Der Ablauf der Validierung wurde in drei Teile gegliedert, einen Vorversuch zur Einarbeitung der Teilnehmer, den ersten Ringtest mit qualitativer Fragestellung (ZNS Identifikation, Tier art- und Tieraltersbestimmung) und einen zweiten Ringtest zur Ermittlung der quantitativen Kenngrößen des Verfahrens.

Deutschlandweit konnten 21 Teilnehmer zu Beginn des Vorversuchs gewonnen werden, von denen 20 am Vorversuch teilnahmen. Bereits während des Vorversuchs konnten bedingt durch die Anregungen der Teilnehmer und eigener methodischer Arbeiten vielseitige Erkenntnisse gewonnen werden, die zur Optimierung der bestehenden Standard Operation Procedure (SOP) verwendet wurden. Wesentliche Verbesserungen wurden erreicht hinsichtlich der Reduktion der Analysenzeit (um 50 %) und des Materialaufwandes (z.B. Lösungsmittel). Diese optimierte SOP diente als Grundlage für die beiden Ringtests.

Hierfür wurden Brühwurstproben vom Max-Rubner-Institut (Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel), Standort Kulmbach hergestellt. Das ZNS der Tierarten Rind, Schaf, Schwein und Geflügel in jeweils zwei bis drei Altersstufen wurde den Brühwurstproben in Mengen von 0,5 bis 3 % zugemischt. In eigenen Untersuchungen ergaben sich keine Hinweise auf relevante, die Ergebnisse der Ringtests verfälschende, ZNS-Inhomogenitäten im bereitgestellten Material. Im ersten Ringtest wurden ausschließlich Proben mit Zusatz von 3 % ZNS untersucht, Proben mit 0,5 % und 1 % wurden im zweiten Ringtest untersucht.

Der erste Ringtest wurde mit 15 Teilnehmern durchgeführt, denen insgesamt 27 Realproben sowie Verbrauchsmaterialien zur Verfügung gestellt wurden. Aufgrund des Arbeitsaufwandes wurde entschieden, die zu analysierenden Brühwurstproben in 10 primäre (obligatorische) und 17 sekundäre (fakultative) Proben

Ziel des ersten Ringtests war die sichere Identifizierung von ZNS in den zugesandten Proben sowie die Kategorisierung des ZNS als SRM. Im Endergebnis wurden die von 14 Teilnehmern erzielten Ergebnisse hinsichtlich der Tierart und des Alters des nachgewiesenen ZNS zusammengefasst und den Kategorien SRM-positiv und SRM-negativ zugeordnet. Der ermittelte SRM-Status des eingemischten ZNS der Primärproben wurde in 96,4 % der Fälle korrekt eingeordnet. SRM negative Proben wurden mit 98,2 % iger Sicherheit erkannt. Bei der Analyse der Sekundärproben wurde ein vergleichbares Ergebnis erzielt. Es wurden 90% der Proben richtig als SRM-positiv und 100 % richtig als SRM-negativ eingestuft. Die Bestim-

mung des Tieralters erbrachte beim Rind eine hinreichende Trennung zwischen den verschiedenen Tieraltern (5, 19 und 35 Monate).

Ziel des zweiten Ringtests war die Validierung des Verfahrens, insbesondere im Hinblick auf die Quantifizierung des ZNS sowie Bestimmung der Validierungsparameter Wiederholbarkeit und Vergleichbarkeit. Hierzu wurden 14 Teilnehmern insgesamt elf Proben für die Analyse zur Verfügung gestellt.

In Endergebnis wurden die von 13 Teilnehmern erzielten Ergebnisse auch im zweiten Ringtest in die Kategorien SRM-positiv und SRM-negativ eingeordnet. Der ermittelte SRM-Status des eingemischten ZNS wurde bei 86,5 % der Proben korrekt zugeordnet. SRM-negative Proben wurden zu 98,9 % als solche erkannt. Die SRM-Kategorisierung war im zweiten Ringtest wesentlich schwieriger als im ersten, da Matrixeffekte bei geringen ZNS-Konzentrationen für den analytischen Nachweis eine größere Rolle spielen. Dies zeigte sich besonders bei einem Teilnehmer, der keine Trennung zwischen SRM und nicht-SRM realisieren konnte. Eine Bewertung der Zuordnung unter Ausschluss dieses Teilnehmers ergibt mit 93,8% richtiger Zuordnung zur Kategorie SRM deutlich bessere Ergebnisse.

Für die quantitative Bestimmung des ZNS-Gehaltes wurde für die Tierarten Rind, Schaf und Schwein eine gute Näherung der ermittelten zu den vorgegebenen ZNS-Gehalten erreicht.

In beiden Ringtests konnte gezeigt werden, dass das Tieralter bei der SRM-relevanten Tierart Rind keinen signifikanten Einfluss auf die Menge des berechneten ZNS-Gehaltes hat. Hinsichtlich des ermittelten Tieralters von je zwei Proben der Tierart Rind (5 und 35 Monate) mit ZNS-Gehalten von 0,5 % und 1 % ergab sich eine eindeutige Trennung hinsichtlich der SRM-relevanten Altersgrenze von 12 Monaten. Lediglich bei der niedrig konzentrierten Probe mit 0,5 % ZNS (RV2-16) war beim alten Rind eine starke Streuung des ermittelten Tieralters zu beobachten.

Für den im zweiten Ringtest ermittelten Messbereich von 0,48 % bis 1,02 % ZNS kann die Gesamtpräzision des Messverfahrens wie folgt angegeben werden:

Wiederholstandardabweichung $s_r = 0,118 \text{ \%ZNS}$

Vergleichsstandardabweichung $s_R = 0,162 \text{ \%ZNS}$

Die Präzision des Messverfahrens nach den Vorgaben der DIN-ISO-5725-2 bezogen auf den ZNS-Gehalt wurde für das validierte Analysenverfahren jedoch als abhängig vom ZNS-Gehalt ermittelt, welches eine getrennte Betrachtung erfordert.

Somit ergeben sich für die untersuchten Gehalte an ZNS folgende statistische Kenngrößen:

Messpunkt 0,48 %ZNS

Wiederholstandardabweichung $s_r = 0,075 \text{ \%ZNS}$

Vergleichsstandardabweichung $s_R = 0,095 \text{ \%ZNS}$

Messpunkt 1,02% ZNS

Wiederholstandardabweichung $s_r = 0,162 \% \text{ZNS}$

Vergleichsstandardabweichung $s_R = 0,228 \% \text{ZNS}$

Mit diesen Kenngrößen ist das Verfahren zur Bestimmung von spezifiziertem Risikomaterial (SRM) in Fleischerzeugnissen / Tiermehlen hinsichtlich der Wiederholbarkeit, Vergleichbarkeit und der analytischen Sicherheit im untersuchten Konzentrationsbereich an ZNS charakterisiert. Es steht nun ein Verfahren mit voll entwickelter Analysenstrategie zur Verfügung, das der Zielsetzung einer Verbesserung des Verbraucherschutzes gegen eine Exposition mit dem BSE-Erreger entspricht.

In Anbetracht der umfassend positiven Ergebnisse ist im Anschluss des Forschungsprojektes eine Etablierung des entwickelten analytischen Verfahrens als Referenzverfahren in der Lebensmittelüberwachung und eine Einarbeitung in die Amtliche Sammlung für Untersuchungsverfahren nach §64 LFBG sehr empfehlenswert.

6 Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen

6.1 Geplante Ziele

Das Ziel des Projektes war die Validierung eines potentiellen Referenzverfahrens für den Nachweis von Geweben des zentralen Nervensystems (ZNS) als spezifiziertem Risikomaterial (SRM) in Fleischerzeugnissen und Tiermehlen.

Das Projekt verfolgte zum Erreichen des Gesamtzieles die folgenden Arbeitsziele:

1. die Identifikation geeigneter Laboratorien der Lebensmittelüberwachung in Deutschland;
2. den Transfer der Standard Operating Procedure (SOP) des GC/MS-Referenzverfahrens in diese Laboratorien und dessen Etablierung;
3. die Herstellung von Standardmaterialien mit definierten ZNS-Zusätzen unter kontrollierten Bedingungen und in Anlehnung an herkömmliche Technologien für Fleischerzeugnisse bzw. Futtermittel;
4. die Kontrolle der Standardmaterialien auf Homogenität und ZNS-Gehalt;
5. die Durchführung eines Vorlaufs zu den eigentlichen Ringtests, um die SOP zu überprüfen, die Laboratorien auf die Durchführung der eigentlichen Ringtests vorzubereiten und die SOP gegebenenfalls auf spezifische Besonderheiten und Bedingungen außerhalb des eigenen Labors anzupassen;
6. einen ersten Ringtest zur Charakterisierung der spezifischen Parameter des GC/MS-Verfahrens hinsichtlich
 - a) der Identifikation von ZNS (einschließlich der Überprüfung des Cutoff-Wertes),
 - b) der Identifikation der Tierart und
 - c) der Alterskategorie;
7. einen zweiten Ringtest zur Validierung des Verfahrens, insbesondere im Hinblick auf die Quantifizierung des ZNS bei positiven Ergebnissen und Festlegung der Wiederholbarkeit und Vergleichbarkeit;

8. die Erweiterung der ZNS-Datenbank zur Optimierung der multifaktoriellen Auswertung analytischer GC/MS-Ergebnisse für die Identifizierung von ZNS-Spezies und -alter sowie zur Quantifizierung von ZNS-Gehalten bei positiven Proben.

6.2 Erreichte Ziele

Die Arbeiten im Rahmen des Forschungsprojektes ergaben die folgenden Ergebnisse

1. An 99 Einrichtungen und Institute wurden Informationen zum Stand der Forschung zum ZNS-Nachweis mittels GC-MS übermittelt. Verbunden damit war die Anfrage, ob Interesse an der Teilnahme von Ringtests zur Validierung des SRM-Referenzverfahrens besteht. Es konnten eine der Planung entsprechende Anzahl positiver Antworten verzeichnet werden. Insgesamt hatten sich 21 Laboratorien bereit erklärt, am Ringtest teilzunehmen.
2. Die SOP zur Bestimmung von ZNS in Fleischerzeugnissen und Tiermehlen, die im vorangegangenen Projekt (03HS011) erarbeitet wurde erfolgreich transferiert und in den teilnehmenden Laboratorien etabliert.
3. Das gesamte Probenmaterial für beide Ringtests wurde im August 2007 durch das Max Rubner Institut, dem Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel (MRI), Standort Kulmbach bereitgestellt.
4. Der ZNS Gehalt wurde jeweils von einer Probe jeder Charge mittels GC/MS überprüft und bestätigt. Hinweise auf relevante, die Ergebnisse des Ringtests verfälschende, Inhomogenitäten der ZNS-Verteilung im bereitgestellten Standardmaterial ergaben sich nicht.
5. Zur Teilnahme am Vorlauf zu den eigentlichen Ringtests erklärten sich 20 Laboratorien bereit, von denen 15 Teilnehmer diesen abschlossen. Die gewonnenen Erkenntnisse und die Ergebnisse eigener methodischer Untersuchungen wurden in eine neue SOP eingearbeitet. Diese diente als verbindliche Methode für die anschließenden Ringtests. Durch diese Optimierungen konnte die SOP auf die spezifischen Bedingungen in den verschiedenen Laboratorien angepasst, die Analysenzeit wesentlich verkürzt und die Materialkosten gesenkt werden.
6. Ein erster Ringtest zur Charakterisierung des Verfahrens hinsichtlich der Identifikation von ZNS (positiv/negativ), seiner Tierart und der Alterskategorie konnte erfolgreich durchgeführt werden. Der im vorangegangenen Forschungsvorhaben (03HS011) für den Analyten Cerebronsäure aufgestellte Cut-Off wurde hierbei bestätigt.

7. Ein zweiter Ringtest zu Validierung des Verfahrens hinsichtlich der Quantifizierung des ZNS konnte erfolgreich durchgeführt werden. Die Werte für die Wiederhol- und Vergleichsstandardabweichung wurden für das Verfahren ermittelt.
8. Im Projektzeitraum wurden weitere ZNS-Proben unterschiedlicher Tierarten und -alter der Datenbank hinzugefügt. Von der Tierart Geflügel wurden Tiere der Arten Gans (sieben Gehirne, eine Altersstufe), Ente (acht Gehirne, eine Altersstufe), Huhn (16 Gehirne, zwei Altersstufen) und Pute (14 Gehirne, zwei Alterstufen) beprobt. Von der Tierart Schwein wurden von insgesamt 50 Tieren im Alter von 10 Tagen bis 40 Monaten Proben vom ZNS entnommen. Weiterhin wurden das ZNS von neun Ziegen und 24 Schafen beprobt.

6.3 Vergleich der geplanten und erreichten Ziele, weitergehende Fragestellungen

Alle ursprünglich geplanten Ziele des Projektes wurden im Wesentlichen erreicht. Darüber hinaus wurden die Arbeiten zur Verbesserung und Rationalisierung des Analysenverfahrens, auch Dank der zahlreichen Anregungen der Ringtestteilnehmer, umfangreicher realisiert als ursprünglich geplant.

Es konnte gezeigt werden, dass dieses Verfahren zum Nachweis von ZNS als SRM in Fleischzeugnissen geeignet ist und sich als zukünftiges Referenzverfahren in der Diagnostik anbietet. Im Rahmen des Projektes wurde eine verbindliche Standard Operating Procedure (SOP) entwickelt.

In Anbetracht der umfassend positiven Ergebnisse ist im Anschluß dieses Forschungsprojektes eine Etablierung des entwickelten analytischen Verfahrens als Referenzverfahren in der Lebensmittelüberwachung und eine Einarbeitung in die Amtliche Sammlung für Untersuchungsverfahren nach §64 LFBG empfehlenswert.

7 Literaturverzeichnis

- Anonym (2001): Verordnung (EG) Nr. 999/2001 des Europäischen Parlaments und des Rates mit Vorschriften zur Verhütung, Kontrolle und Tilgung bestimmter transmissibler spongiformer Enzephalopathien. ABl. L 147; 2001
- Anonym (2004): DIN ISO 5725-1 und -2, in: DIN-Taschenbuch 355, Statistik – Genauigkeit von Messungen – Ringversuche (1. Auflage), Beuth Verlag; 2004; ISBN 3-410-15752-2
- Anonym (2006): SPE Reference Manual & Users Guide. Phenomenex USA, Part.-No.:AA0-6067.
- Aupperle, H., Lücker, E., Overhoff, M., Schon, H.A. (2002): Verfahren zum Nachweis von im Hinblick auf die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) unerwünschten Zutaten in Fleisch-erzeug-nissen. 6. Immunhistologischer Nachweis von zentralem und peripherem Nervengewebe in Fleisch-erzeugnissen. Fleischwirtschaft 82 (3):100-104
- Deutscher Akkreditierungs Rat (2007): Liste der Akkreditierten Stellen (Bereich Lebensmittel und Lebensmittelanalytik); <http://www.dar.bam.de/ast/ib14.html>
- Eriksson, L., Johansson, E., Kettaneh-Wold, N., Trygg, J., Wikström, C., Wold, S. (2006) Multi- and Megavariate Data Analysis. Part I Basic Principles and Applications. 2. Auflage. Umeå (Schweden): Umetrics AB;.
- Hennion, M. C., Pichon, V. (1994) Solid-Phase Extraction of Polar Organic Pollutants from Water. Environmental Science & Technology; 28(13):A576-A583.
- Kunath, O., Lücker, E., Troeger, K. (2006): Zur analytischen Erfassung und Bedeutung von ZNS-Kontaminationen im Schlachtprozess mittels GFAP-ELISA am Beispiel der Kopffleischgewinnung. Proceedings 46. DVG Arbeitstagung des Arbeitsgebietes „Lebensmittelhygiene“ 2005, Garmisch- Partenkirchen, DVG Service GmbH, Gießen, ISBN 3-938026-37-5, S: 463-468
- Leye, M., Joh, H., Unland, P.(2007): Adressbuch Lebensmittelüberwachung und -untersuchung. Behr's Verlag; ISBN 978-3-86022-057-3
- Lücker, E. (1999): Direct solid sampling ETAAS determination of cadmium in equine muscle. J. Anal. At. Spectrom. 14: 583-587.

Lücker, E., Lachhab, S., Biedermann, W. Gießbach, M., Welz, K., Grundmann, C., Kunath, O., Teschner, S., Truyen, U. (2005): Entwicklung einer Referenzmethode zum Nachweis von spezifischem Risikomaterial in Fleischerzeugnissen/Tiermehlen. Forschungsprojekt 514-33.34/03HS011. Bundesministerium für Verbraucher-schutz, Ernährung und Landwirtschaft

Lundstedt, T., Seifert, E., Abramo, I., Thelin, B., Nyström, A., Pettersen, J., Bergman, R. (1998): Experimental design and optimization. Chemom. Intell. Lab. Syst., 42 (1–2), S. 23-25.

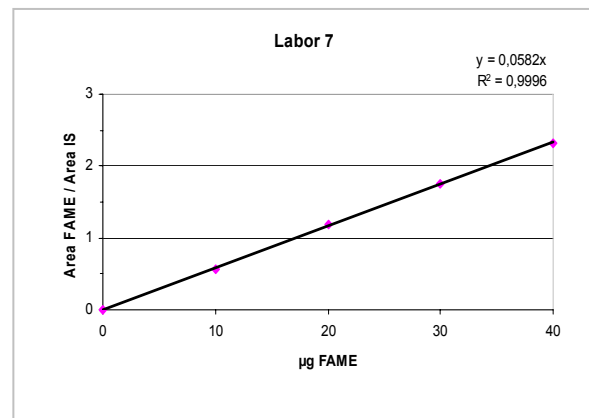
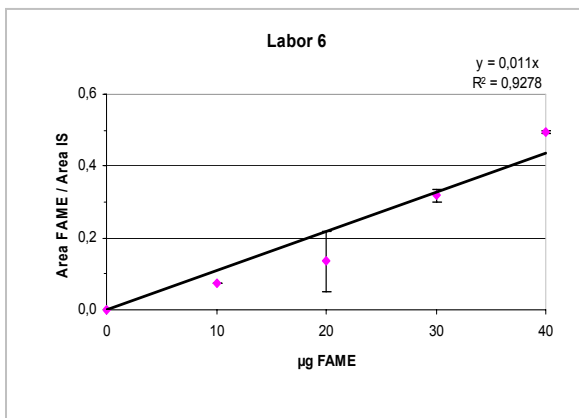
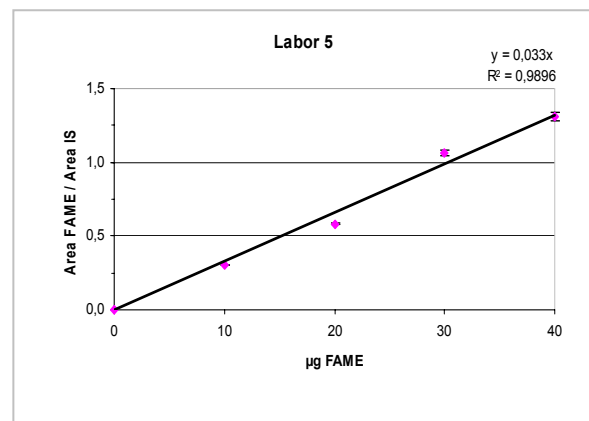
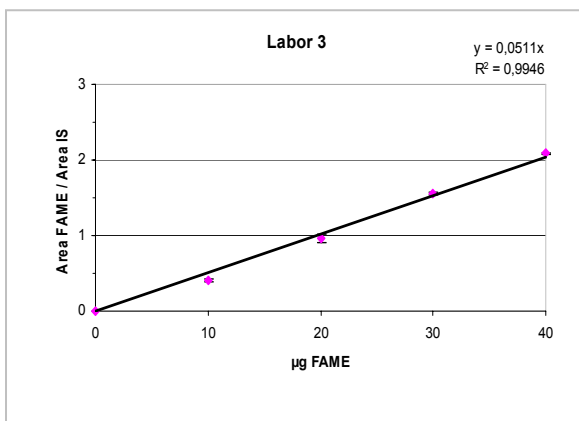
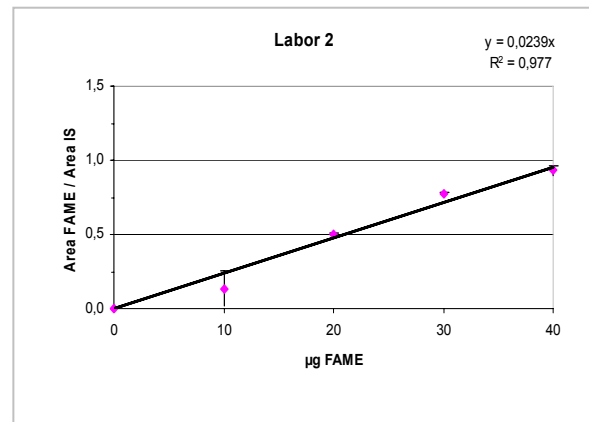
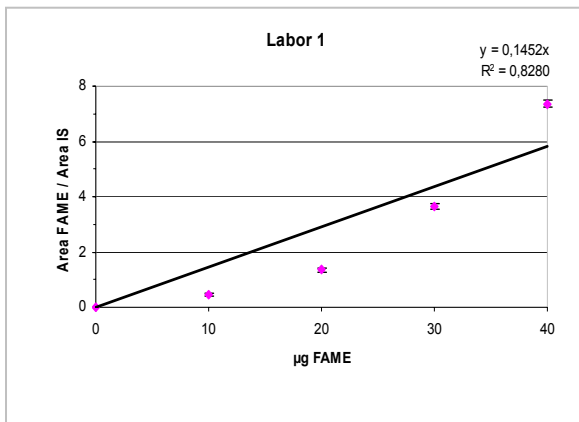
A Anhang

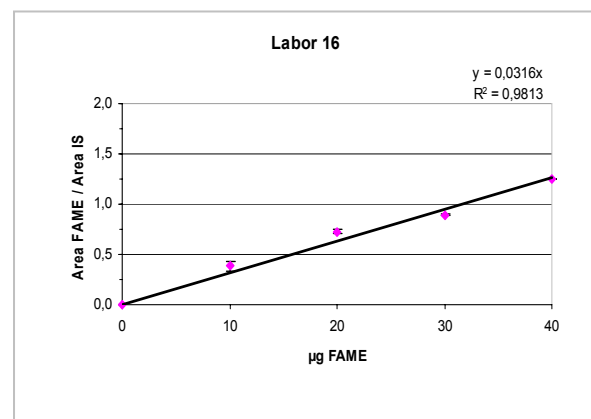
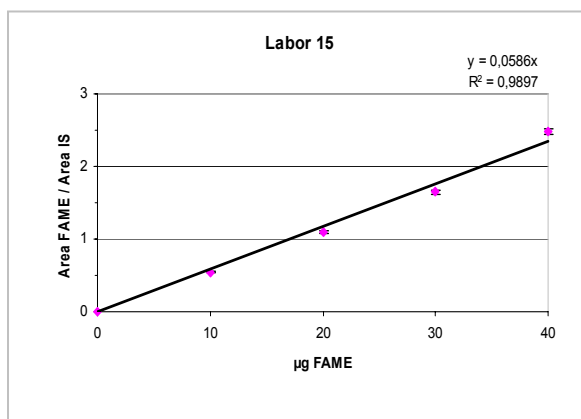
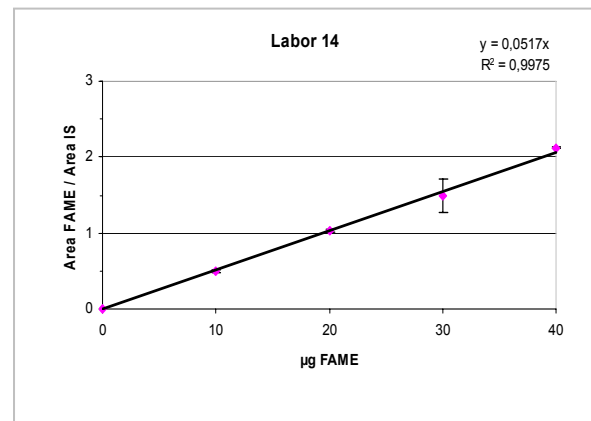
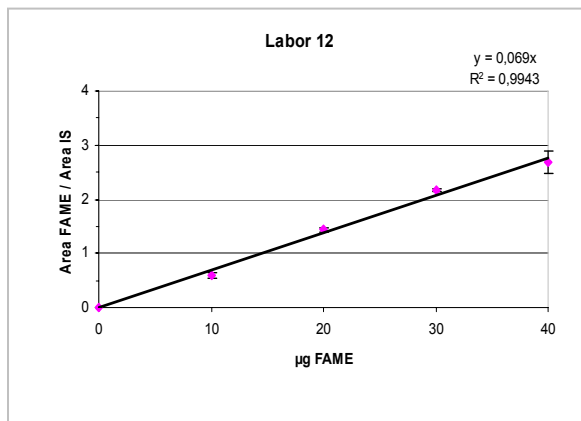
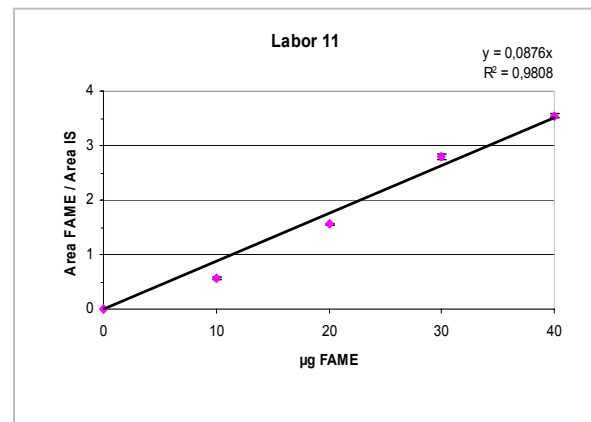
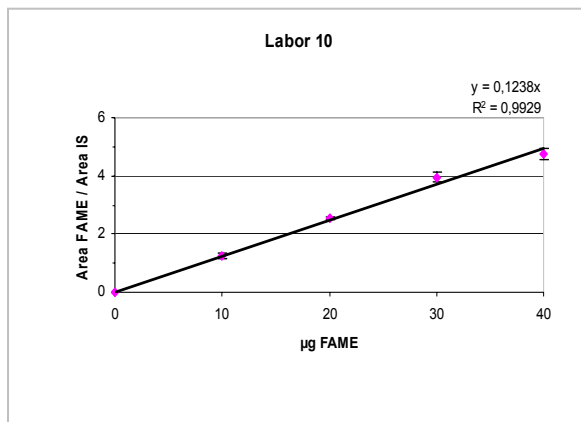
Zum Forschungsbericht

Charakterisierung der Wiederholbarkeit, Vergleichbarkeit und analytischen Sicherheit des neu entwickelten Referenzverfahrens zum Nachweis von spezifiziertem Risikomaterial (SRM) in Fleischerzeugnissen / Tiermehlen durch Ringtests

A.1 Zusammenstellung der Abbildungen des Vorversuchs	129
A.2 Zusammenstellung der Tabellen und Abbildungen des ersten Ringtests	135
A.3 Zusammenstellung der Tabellen und Abbildungen des zweiten Ringtests	148
A.4 Nachweis von spezifiziertem Risikomaterial in Fleischerzeugnissen und Tiermehlen - Methodenbeschreibung	162
A.5 Publikationen im Berichtszeitraum	174

A.1 Zusammenstellung der Abbildungen des Vorversuchs





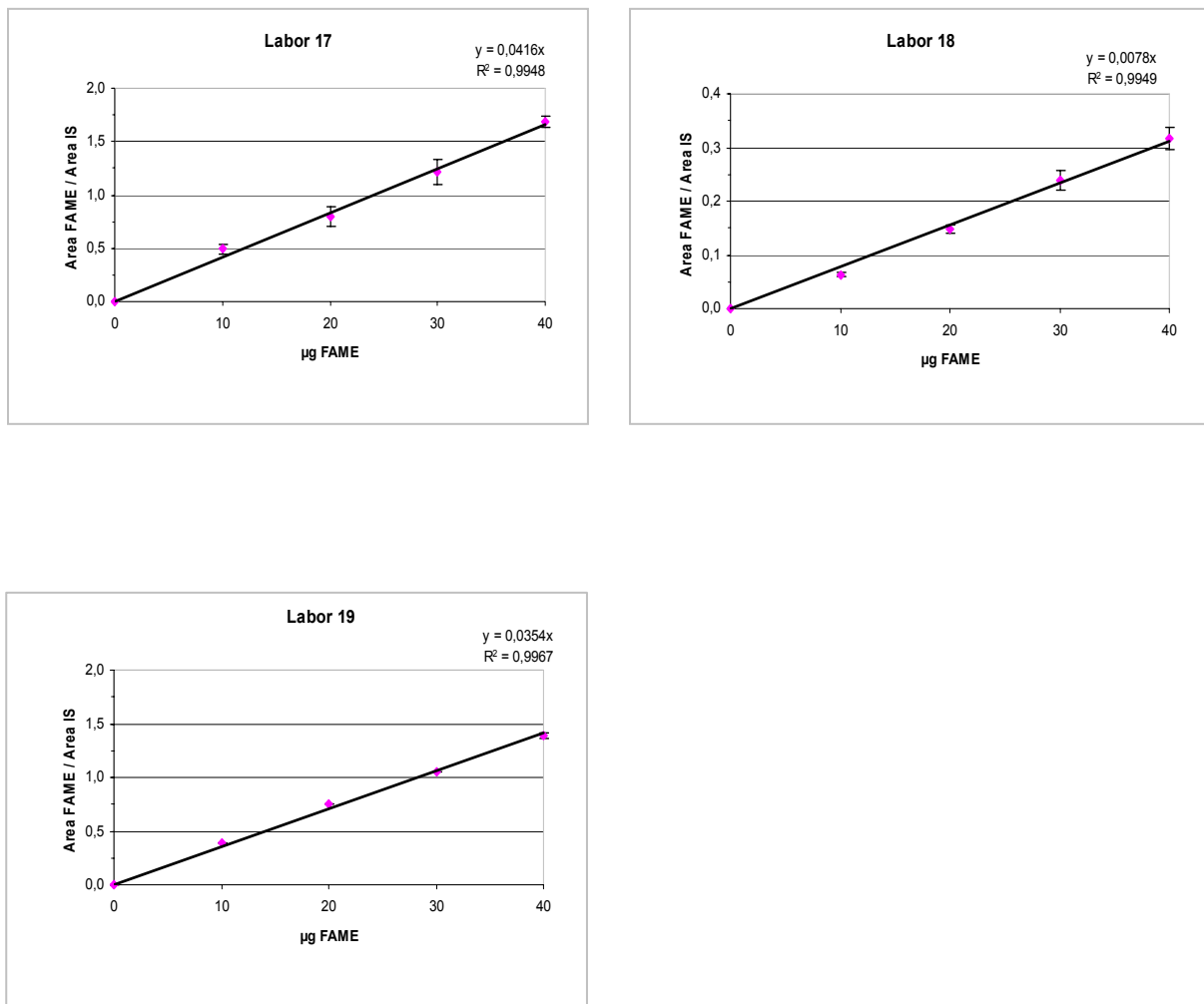
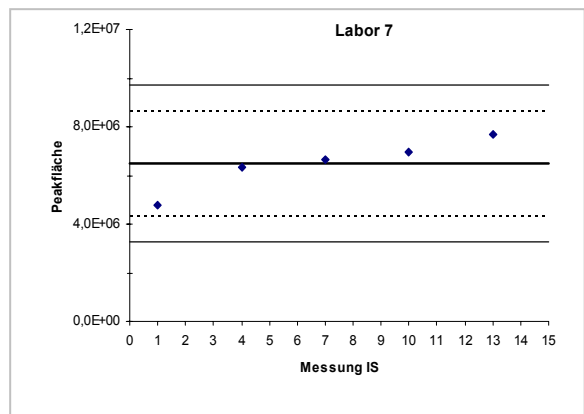
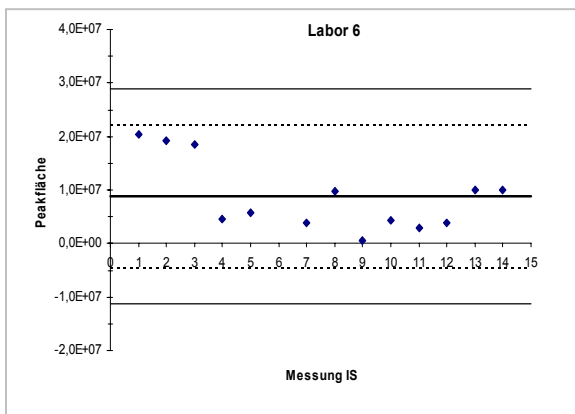
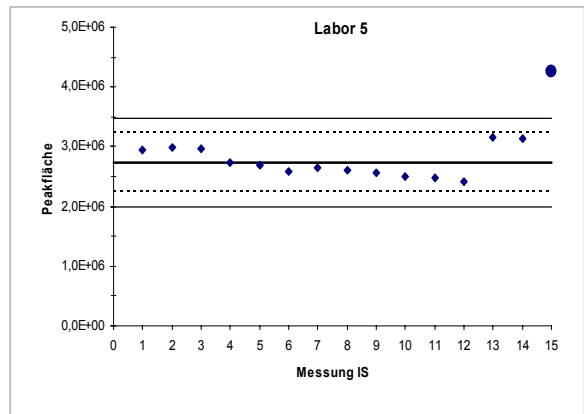
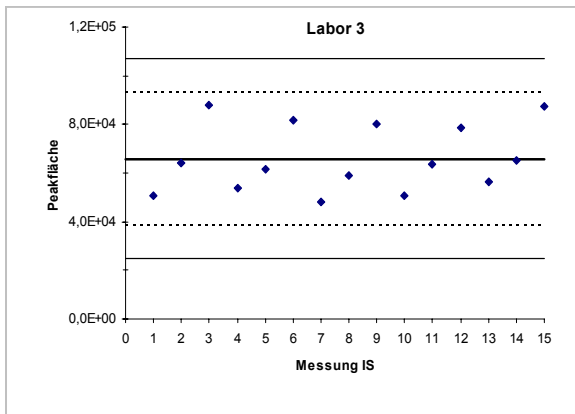
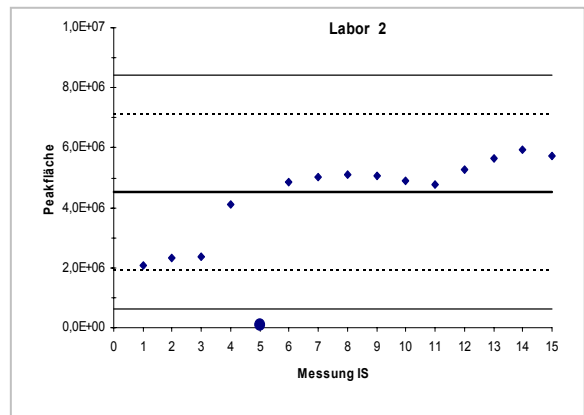
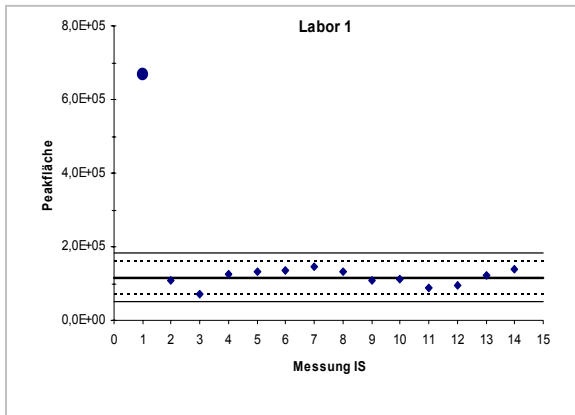
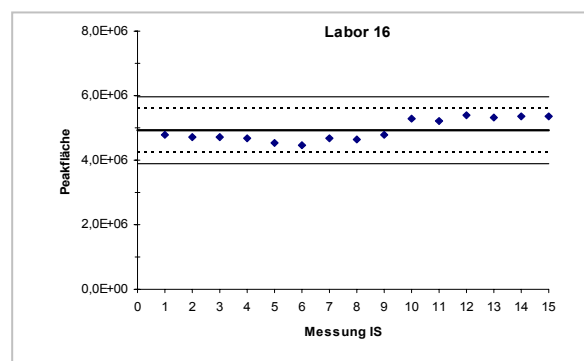
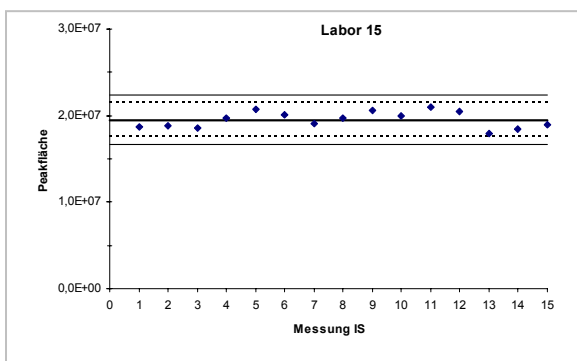
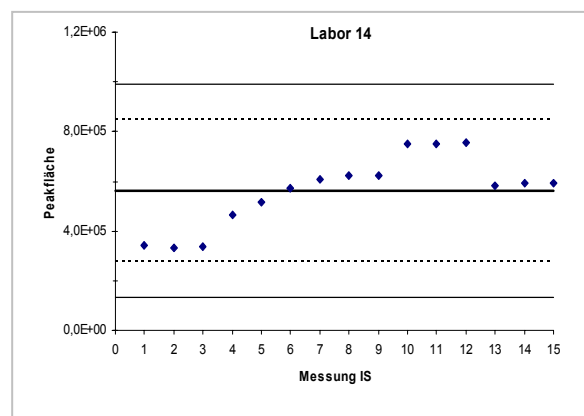
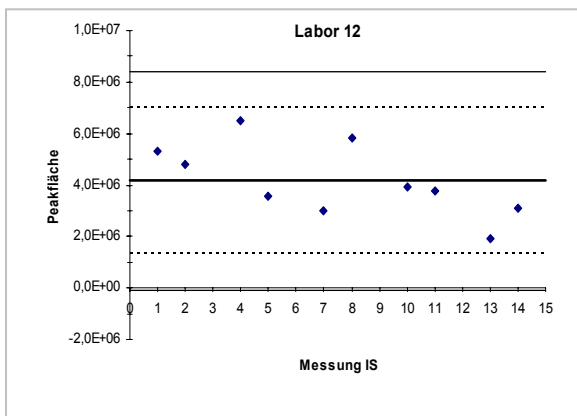
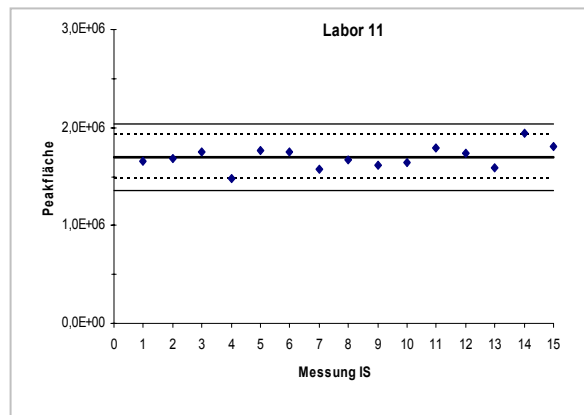
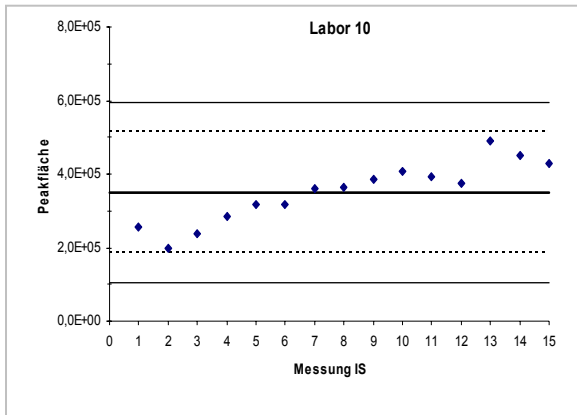


Abbildung 36: Kalibrationskurven der am Vorversuch beteiligten Laboratorien für die Cerebrolicsäure





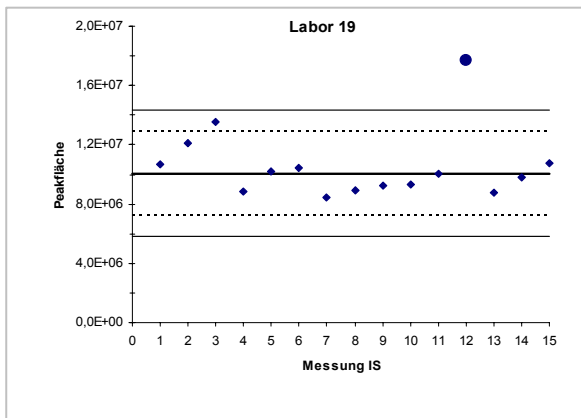
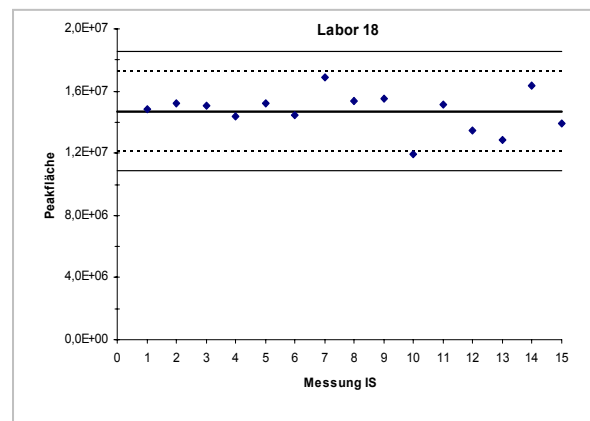
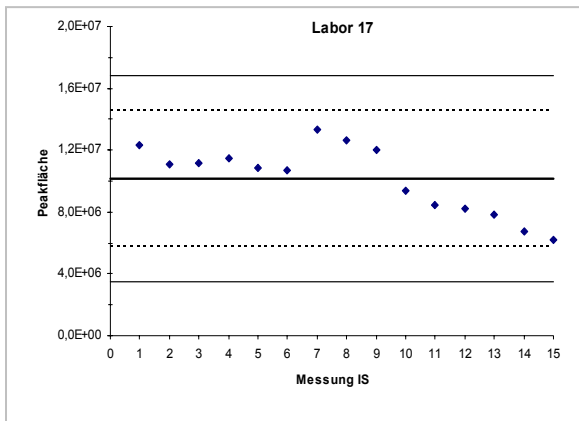
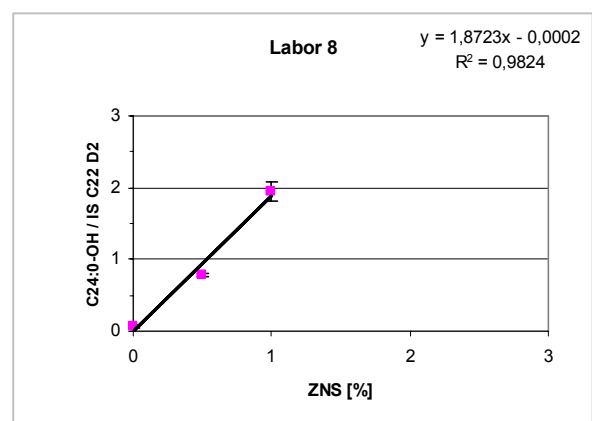
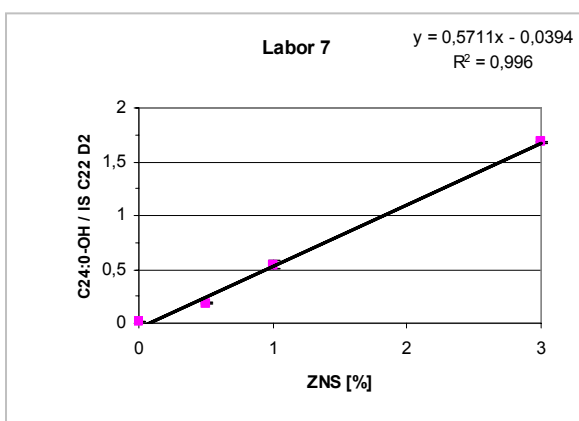
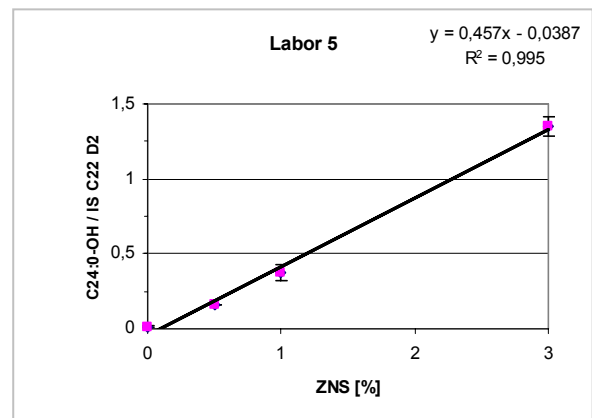
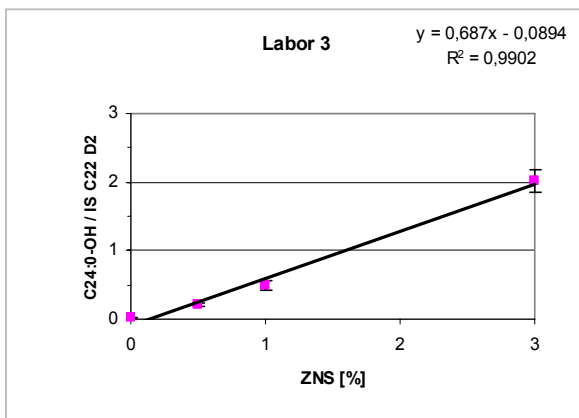
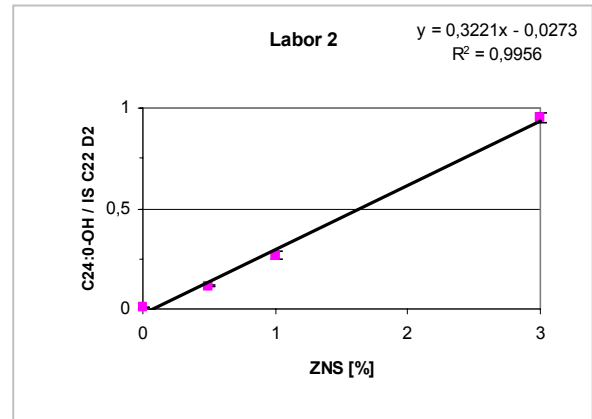
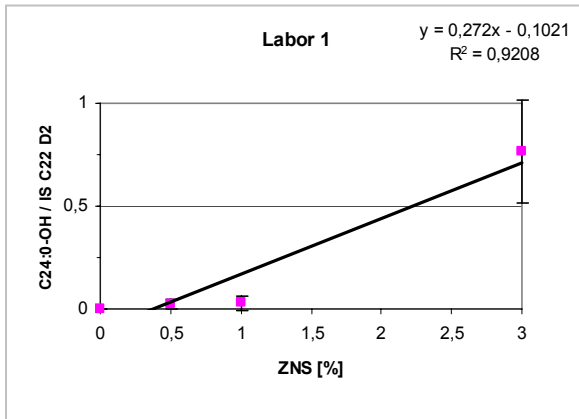
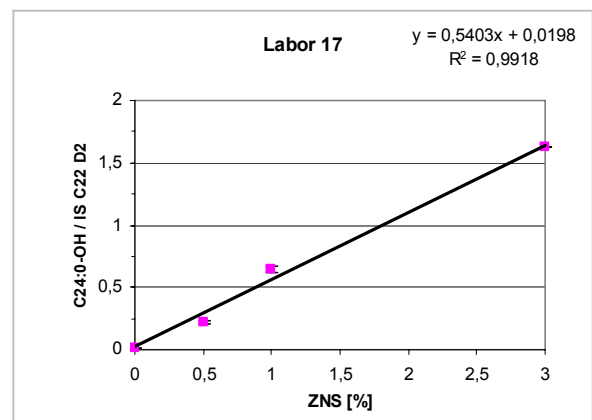
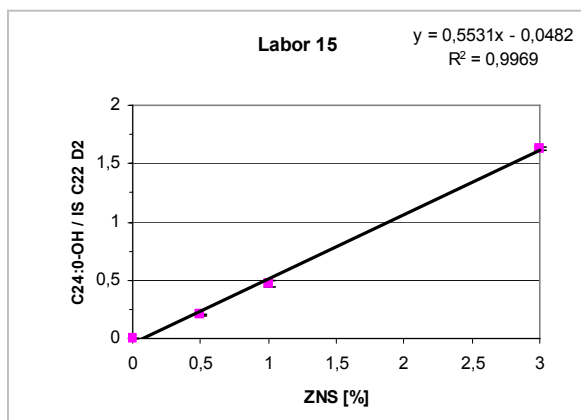
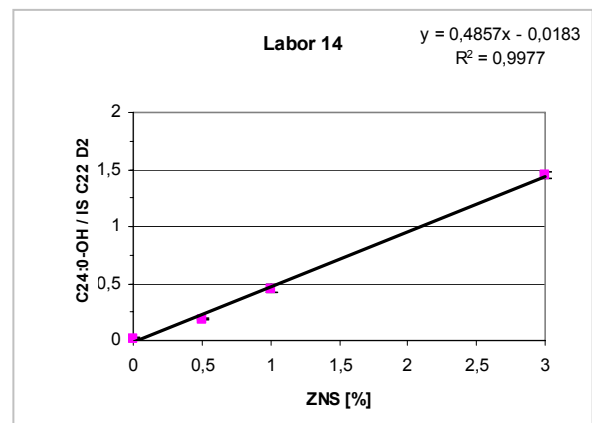
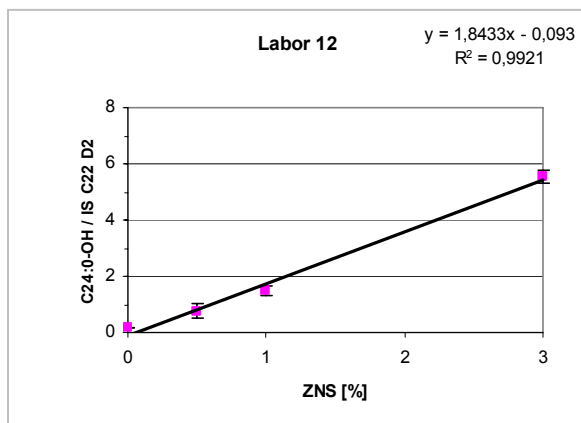
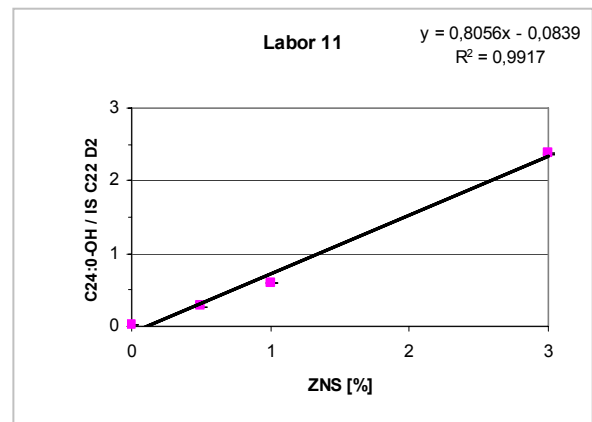
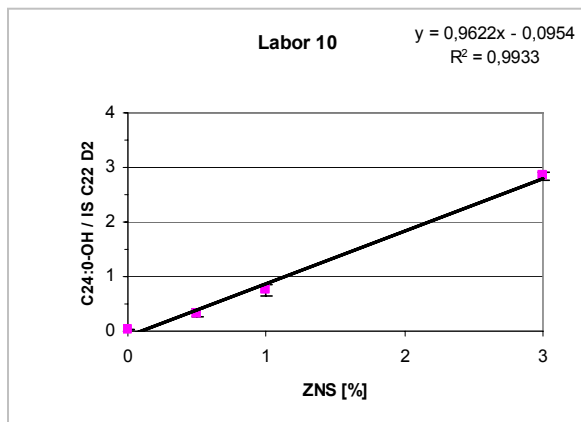


Abbildung 37: Qualitätsregelkarten der beteiligten Laboratorien für die wiederholte Messung der Fläche des Internen Standards im Gaschromatogramm (IS: Interner Standard)

A.2 Zusammenstellung der Tabellen und Abbildungen des ersten Ringtests





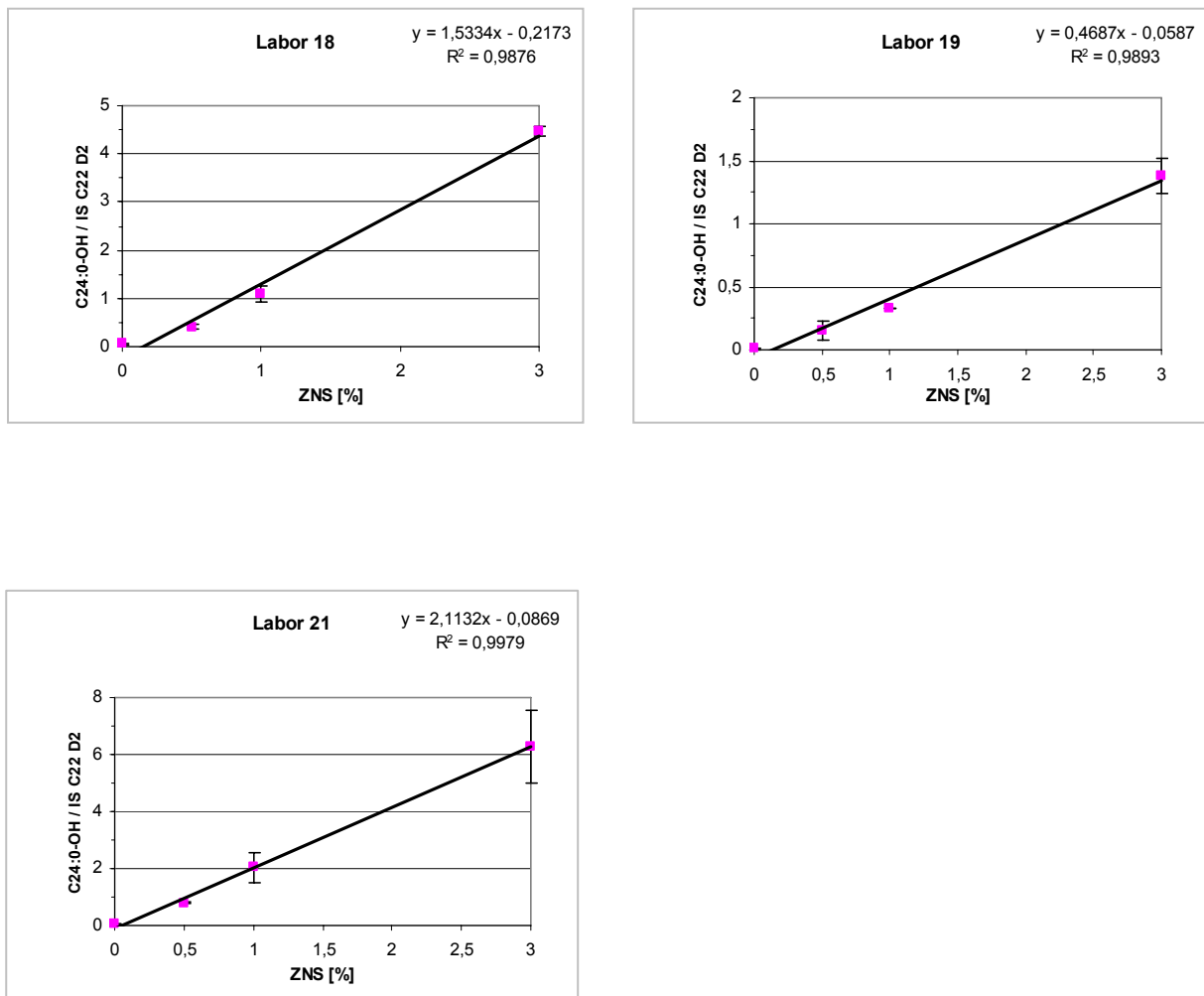


Abbildung 38: Kalibrationskurven für die ZNS Bestimmung aus der Brühwurstmatrix (Standards mit 0%, 0,5%, 1%, 3% ZNS, Schwein, 6 Monate) der am ersten Ringtest beteiligten Laboratorien (n=15)

Tabelle 62: Festlegung der analysierten Mekmalsniveaus für den ersten Ringtest nach DIN ISO 5725-2:2002

	V1: C24:1ω9 C24:1ω7	V2: C24:1ω9-OH C24:1ω7-OH	V3: C24:1ω9-OH C25:0-OH	ZNS-Gehalt [%]	Alter Rind [Monate]
RV1-2	1	9	17	25	
RV1-8	2	10	18	26	33
RV1-9	3	11	19	27	
RV1-10	4	12	20	28	
RV1-14	5	13	21	29	
RV1-20	6	14	22	30	
RV1-23	7	15	23	31	34
RV1-25	8	16	24	32	

Tabelle 63: Ursprungsdaten der Primärproben des ersten Ringtests für das Verhältnis V1 (C24:1ω9 / C24:1ω7) nach DIN ISO 5725

Labor	Merkmalsniveau							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	1,21E+01	7,75E+07	7,77E+00	8,16E+00	3,37E+01	5,11E+07	5,71E+07	4,54E+00
	4,37E+07	5,96E+07	6,34E+00	7,64E+00	5,68E+00	4,70E+07	6,59E+07	4,32E+00
2	8,55E+00	2,30E+01	6,42E+00	7,77E+00	6,24E+00	1,79E+01	9,10E+00	4,08E+00
	8,42E+00	6,14E+00	6,39E+00	8,06E+00	6,65E+00	1,90E+01	9,44E+00	3,76E+00
3	7,42E+00	1,57E+01	5,70E+00	6,13E+00	5,86E+00	1,53E+01	7,22E+00	3,57E+00
	6,39E+00	1,57E+01	5,71E+00	6,04E+00	5,82E+00	1,39E+01	7,24E+00	3,59E+00
5	7,62E+00	2,25E+01	6,45E+00	8,60E+00	6,64E+00	2,10E+01	9,56E+00	4,11E+00
	7,90E+00	2,31E+01	6,64E+00	8,06E+00	6,29E+00	2,11E+01	9,22E+00	4,08E+00
7	1,09E+01	4,47E+01	8,69E+00	1,20E+01	9,97E+00	3,01E+01	1,71E+01	5,07E+00
	1,17E+01	4,40E+01	8,52E+00	1,18E+01	9,33E+00	3,52E+01	1,60E+01	5,04E+00
8	1,40E+01	3,22E+04	1,12E+01	1,25E+01	9,75E+00	4,83E+04	2,03E+01	6,21E+00
	1,28E+01	3,87E+04	1,08E+01	1,13E+01	1,12E+01	n.b.	1,45E+01	6,09E+00
10	8,37E+00	2,14E+01	7,02E+00	7,68E+00	6,16E+00	2,66E+01	9,90E+00	4,42E+00
	8,32E+00	1,71E+01	6,81E+00	7,43E+00	6,50E+00	1,83E+01	9,35E+00	4,04E+00
11	6,43E+00	1,40E+01	6,55E+00	7,28E+00	6,62E+00	1,72E+01	8,62E+00	3,76E+00
	6,92E+00	1,42E+01	6,53E+00	7,19E+00	6,74E+00	1,69E+01	8,19E+00	3,80E+00
14	7,12E+00	1,97E+01	5,72E+00	7,37E+00	6,01E+00	1,88E+01	9,51E+00	3,86E+00
	7,20E+00	2,02E+01	5,92E+00	7,31E+00	6,02E+00	1,91E+01	9,48E+00	3,88E+00
15	6,51E+00	5,56E+06	5,76E+00	6,36E+00	6,04E+00	3,97E+06	9,80E+00	3,72E+00
	7,12E+00	5,47E+06	6,52E+00	6,50E+00	5,76E+00	3,68E+06	1,05E+01	3,89E+00
17	7,93E+00	1,86E+01	6,19E+00	7,26E-01	6,29E+00	1,53E+01	8,85E+00	4,20E+00
	7,78E+00	1,94E+01	6,19E+00	6,74E+00	6,47E+00	1,65E+01	8,56E+00	4,19E+00
18	8,87E+00	1,75E+01	6,43E+00	7,69E+00	6,70E+00	1,25E+01	7,39E+00	3,48E+00
	8,94E+00	1,66E+01	6,42E+00	7,28E+00	6,61E+00	1,52E+01	7,62E+00	3,46E+00
19	8,51E+00	2,18E+01	7,14E+00	8,32E+00	7,41E+00	2,02E+01	1,03E+01	4,51E+00
	8,23E+00	2,19E+01	7,04E+00	8,29E+00	7,27E+00	2,01E+01	1,03E+01	4,49E+00
21	6,40E+00	1,58E+01	5,14E+00	6,85E+00	6,01E+00	1,52E+01	8,30E+00	3,32E+00
	7,25E+00	1,67E+01	5,57E+00	7,20E+00	5,94E+00	1,53E+01	9,07E+00	3,78E+00

n.b. - nicht bestimmt

**Tabelle 64: Ursprungsdaten der Primärproben des ersten Ringtests für das Verhältnis V2
(C24:1 ω 9-OH / C24:1 ω 7-OH) nach DIN ISO 5725**

Labor	Merkmalsniveau							
	9	10	11	12	13	14	15	16
1	6,46E+04	8,56E+07	1,88E+08	6,04E+07	1,20E+08	5,15E+07	5,37E+07	1,94E+00
	5,21E+05	7,66E+07	2,24E+08	1,24E+08	1,12E+08	1,22E+07	7,49E+07	1,36E+00
2	4,63E+00	7,09E+00	2,72E+00	7,07E+00	3,72E+00	2,44E+01	3,70E+00	1,59E+00
	3,82E+00	1,95E+00	2,52E+00	7,21E+00	3,61E+00	2,39E+01	3,66E+00	1,62E+00
3	3,39E+00	6,40E+00	2,59E+00	6,16E+00	3,47E+00	1,72E+01	3,35E+00	1,50E+00
	3,52E+00	6,13E+00	2,58E+00	6,11E+00	3,42E+00	2,16E+01	3,34E+00	1,49E+00
5	3,50E+00	6,38E+00	2,59E+00	6,69E+00	3,31E+00	1,48E+01	3,54E+00	1,54E+00
	2,24E+00	5,92E+00	2,67E+00	6,68E+00	3,56E+00	2,12E+01	3,61E+00	1,56E+00
7	4,37E+00	1,34E+01	2,69E+00	9,34E+00	4,13E+00	8,24E+01	4,19E+00	1,51E+00
	1,69E+01	1,14E+01	2,67E+00	1,00E+01	3,93E+00	7,54E+01	4,07E+00	1,53E+00
8	4,57E+00	8,95E+00	3,71E+00	9,48E+00	4,10E+00	1,94E+01	4,19E+00	1,57E+00
	5,57E+00	7,91E+00	3,25E+00	8,91E+00	4,13E+00	n.b.	4,21E+00	1,65E+00
10	3,37E+00	5,96E+00	2,38E+00	6,04E+00	3,32E+00	1,63E+01	3,16E+00	1,45E+00
	3,55E+00	6,21E+00	2,40E+00	6,29E+00	3,36E+00	1,52E+01	3,14E+00	1,44E+00
11	3,52E+00	6,79E+00	2,53E+00	6,70E+00	3,37E+00	1,72E+01	3,50E+00	1,50E+00
	3,88E+00	6,99E+00	2,57E+00	6,72E+00	3,43E+00	1,61E+01	3,49E+00	1,48E+00
14	3,78E+00	7,00E+00	2,61E+00	7,08E+00	3,68E+00	2,18E+01	3,70E+00	1,58E+00
	3,97E+00	6,92E+00	2,61E+00	6,99E+00	3,68E+00	2,26E+01	3,68E+00	1,58E+00
15	4,23E+00	7,51E+00	2,62E+00	7,53E+00	3,71E+00	2,37E+01	3,79E+00	1,53E+00
	4,05E+00	7,51E+00	2,61E+00	7,62E+00	3,74E+01	2,46E+01	3,78E+00	1,53E+00
17	4,16E+00	7,02E+00	2,77E+00	6,70E+00	3,65E+00	1,65E+01	3,80E+00	1,63E+00
	4,20E+00	7,15E+00	2,97E+00	6,44E+00	3,62E+00	1,66E+01	3,55E+00	1,63E+00
18	4,12E+00	5,67E+00	2,62E+00	6,46E+00	3,40E+00	2,26E+06	3,25E+00	1,44E+00
	4,09E+00	6,71E+00	2,63E+00	6,44E+00	3,38E+00	2,32E+06	3,25E+00	1,43E+00
19	3,59E+00	6,45E+00	2,56E+00	6,74E+00	3,41E+00	1,87E+01	3,58E+00	1,51E+00
	3,70E+00	6,50E+00	2,58E+00	6,70E+00	3,44E+00	1,66E+01	3,56E+00	1,53E+00
21	3,62E+00	6,26E+00	2,51E+00	6,27E+00	3,54E+00	1,91E+01	3,52E+00	1,38E+00
	3,42E+00	6,06E+00	2,51E+00	6,50E+00	3,45E+00	1,60E+01	3,31E+00	1,55E+00

n.b. - nicht bestimmt

**Tabelle 65: Ursprungsdaten der Primärproben des ersten Ringtests für das Verhältnis V3
(C24:1 ω 9-OH / C25:0-OH) nach DIN ISO 5725**

Labor	Merkmalsniveau							
	17	18	19	20	21	22	23	24
1	6,46E+04	1,61E+00	2,10E+00	2,15E+01	7,99E+01	2,17E+00	6,67E+00	4,74E+00
	5,21E+05	6,47E+00	2,17E+00	2,12E+01	8,92E+01	2,74E+00	6,91E+00	5,10E+00
2	6,37E-01	2,66E-01	3,18E-01	2,08E+00	4,90E+00	5,00E-01	8,05E-01	7,91E-01
	8,72E+00	5,61E-01	3,04E-01	2,08E+00	5,15E+00	4,40E-01	7,68E-01	7,75E-01
3	4,66E+01	1,23E+00	1,56E+00	1,05E+01	3,43E+01	1,78E+00	3,71E+00	3,58E+00
	6,16E+01	1,05E+00	1,56E+00	1,07E+01	3,09E+01	2,03E+00	3,73E+00	3,58E+00
5	6,06E+05	2,14E+00	2,72E+00	2,02E+01	1,34E+02	6,61E+00	9,81E+00	8,57E+00
	4,91E+05	2,10E+00	2,66E+00	2,10E+01	1,30E+02	5,96E+00	9,05E+00	8,29E+00
7	9,61E+01	1,56E+00	2,00E+00	2,65E+01	8,63E+01	2,71E+00	7,13E+00	6,35E+00
	1,20E+02	1,58E+00	1,96E+00	2,78E+01	8,11E+01	3,00E+00	6,81E+00	6,94E+00
8	9,28E+01	1,33E+00	1,57E+00	2,24E+01	5,18E+01	3,28E+00	6,49E+00	4,50E+00
	7,63E+01	1,28E+00	3,32E+00	1,94E+01	5,43E+01	n.b.	5,09E+00	4,76E+00
10	3,70E+01	9,40E-01	1,08E+00	8,10E+00	1,96E+01	1,57E+00	2,89E+00	2,74E+00
	3,57E+01	9,20E-01	1,12E+00	7,46E+00	1,58E+01	1,60E+00	2,61E+00	2,79E+00
11	3,55E+01	7,91E-01	1,05E+00	7,43E+00	1,96E+01	1,38E+00	2,76E+00	2,53E+00
	4,52E+01	7,76E-01	1,04E+00	7,48E+00	1,97E+01	1,38E+00	2,79E+00	2,52E+00
14	1,83E+02	4,67E+00	5,77E+00	4,50E+01	1,26E+02	8,98E+00	1,59E+01	1,61E+01
	1,88E+02	4,71E+00	5,81E+00	4,55E+01	1,24E+02	9,31E+00	1,59E+01	1,64E+01
15	4,13E+06	2,63E+00	3,24E+00	3,00E+01	2,95E+07	4,89E+00	9,47E+00	9,31E+00
	3,51E+06	2,61E+00	3,54E+00	2,91E+01	2,72E+06	4,98E+00	9,68E+00	9,55E+00
17	1,12E+01	3,50E-01	4,69E-01	2,92E+00	7,63E+00	6,34E-01	1,12E+00	1,09E+00
	1,76E+01	3,45E-01	5,09E-01	2,91E+00	7,41E+00	6,10E-01	1,06E+00	1,17E+00
18	7,59E+01	2,25E+00	2,79E+00	1,86E+01	4,64E+01	2,30E+00	4,11E+00	3,98E+00
	7,64E+01	2,24E+00	2,69E+00	1,82E+01	4,40E+01	2,44E+00	4,21E+00	3,99E+00
19	6,20E+01	1,84E+00	2,59E+00	1,93E+01	4,80E+01	3,16E+00	6,34E+00	6,10E+00
	5,91E+01	1,88E+00	2,63E+00	1,90E+01	4,73E+01	3,40E+00	6,71E+00	6,36E+00
21	1,45E+02	3,90E+00	4,09E+00	3,23E+01	8,37E+01	5,14E+00	1,13E+01	1,11E+01
	1,31E+02	3,43E+00	4,08E+00	2,85E+01	9,15E+01	5,81E+00	1,33E+01	1,03E+01

n.b. - nicht bestimmt

Tabelle 66: Ursprungsdaten der Primärproben des ersten Ringtests für den von den Versuchsteilnehmern ermittelten ZNS-Gehalt in Prozent (Merkmal 25-32) und das Tieralter in Monaten (Merkmal 33-34) beim Rind nach DIN ISO 5725

Labor	Merkmalsniveau									
	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
1	0,38	5,78	10,72	2,00	1,47	2,48	3,24	2,24	n.b.	n.b.
	0,40	7,24	11,99	3,38	1,32	0,84	4,18	4,28	n.b.	n.b.
2	0,72	2,65	4,72	1,83	1,05	2,37	3,25	3,06	30,4	5,0
	0,41	1,08	6,12	2,34	1,25	2,49	2,87	3,00	nb	4,7
3	0,39	2,58	5,44	2,08	1,12	4,10	2,46	2,45	25,3	2,4
	0,33	2,81	5,30	2,07	1,15	2,21	2,61	2,36	23,2	2,4
5	0,56	3,29	5,61	2,33	1,35	3,55	3,85	3,09	25,1	3,8
	0,30	2,86	5,20	1,84	1,42	3,48	3,92	3,09	21,6	4,4
7	0,33	3,21	7,25	2,31	1,01	3,33	3,05	2,70	77,6	8,7
	0,42	3,14	7,26	2,20	1,08	3,27	3,12	2,11	62,8	7,8
8	0,50	2,60	3,60	3,60	2,00	5,40	4,50	2,70	44,2	8,7
	0,40	2,90	5,70	3,60	1,90	nb	3,30	1,80	36,5	8,9
10	0,29	1,66	3,46	1,19	0,75	1,94	1,73	1,78	21,9	1,0
	0,31	1,70	3,53	1,27	0,29	1,98	0,82	1,84	23,8	0,9
11	0,48	3,73	9,95	2,86	1,33	6,37	4,68	4,10	28,1	3,6
	0,47	3,59	8,85	3,11	1,40	7,17	4,44	4,36	29,6	3,5
14	0,50	3,48	7,49	2,38	1,19	2,88	3,43	3,53	29,7	5,0
	0,42	3,62	8,33	2,38	1,21	2,80	4,13	3,18	29,1	4,9
15	0,39	2,17	6,25	1,49	0,91	2,09	2,53	2,24	33,5	5,7
	0,31	2,06	5,96	1,45	0,95	2,25	2,29	2,37	33,5	5,7
17	0,28	2,27	5,71	2,32	1,34	3,65	2,49	3,24	29,9	5,8
	0,28	2,27	3,24	2,22	1,30	3,55	3,34	2,90	30,8	3,9
18	1,48	0,86	7,04	1,87	0,85	1,35	5,74	4,76	19,8	1,7
	0,81	0,86	6,08	1,66	0,90	1,33	5,72	4,81	27,5	1,7
19	0,39	2,50	6,16	2,01	1,03	2,54	2,66	2,55	25,6	4,2
	0,41	2,56	6,29	2,12	1,03	3,06	2,43	2,79	25,9	4,0
21	0,48	4,89	8,16	2,93	1,40	4,87	5,17	1,48	24,2	3,7
	0,60	4,56	13,22	1,84	1,84	4,46	6,92	4,65	22,7	2,1

n.b. - nicht bestimmt

Tabelle 67: Arithmetische Mittelwerte des Verhältnisses V1 (C24:1 ω 9 / C24:1 ω 7) aus Tabelle 63

Labor	Merkmalsniveau							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	2,19E+07**	6,85E+07**	7,05E+00	7,90E+00	1,97E+01**	4,90E+07**	6,15E+07**	4,43E+00
2	8,48E+00	1,46E+01	6,40E+00	7,92E+00	6,44E+00	1,84E+01	9,27E+00	3,92E+00
3	6,91E+00	1,57E+01	5,71E+00	6,09E+00	5,84E+00	1,46E+01	7,23E+00	3,58E+00
5	7,76E+00	2,28E+01	6,54E+00	8,33E+00	6,46E+00	2,11E+01	9,39E+00	4,09E+00
7	1,13E+01	4,43E+01**	8,61E+00*	1,19E+01	9,65E+00	3,26E+01**	1,66E+01	5,05E+00
8	1,34E+01*	3,55E+04**	1,10E+01**	1,19E+01	1,05E+01	4,83E+04**	1,74E+01	6,15E+00**
10	8,34E+00	1,92E+01	6,92E+00	7,56E+00	6,33E+00	2,25E+01	9,62E+00	4,23E+00
11	6,68E+00	1,41E+01	6,54E+00	7,24E+00	6,68E+00	1,70E+01	8,40E+00	3,78E+00
14	7,16E+00	2,00E+01	5,82E+00	7,34E+00	6,01E+00	1,89E+01	9,50E+00	3,87E+00
15	6,81E+00	5,52E+06**	6,14E+00	6,43E+00	5,90E+00	3,82E+06**	1,02E+01	3,81E+00
17	7,85E+00	1,90E+01	6,19E+00	3,73E+00	6,38E+00	1,59E+01	8,71E+00	4,19E+00
18	8,91E+00	1,70E+01	6,43E+00	7,49E+00	6,66E+00	1,38E+01	7,50E+00	3,47E+00
19	8,37E+00	2,19E+01	7,09E+00	8,31E+00	7,34E+00	2,02E+01	1,03E+01	4,50E+00
21	6,83E+00	1,63E+01	5,36E+00	7,02E+00	5,97E+00	1,53E+01	8,68E+00	3,55E+00

** als statistischer Ausreisser betrachtet (Grubbs-Test, 99% statistische Sicherheit)

* als Fastausreisser betrachtet (Grubbs-Test, 95% statistische Sicherheit)

Tabelle 68: Arithmetische Mittelwerte des Verhältnisses V2 (C24:1 ω 9-OH / C24:1 ω 7-OH) aus Tabelle 64

Labor	Merkmalsniveau							
	9	10	11	12	13	14	15	16
1	2,93E+05**	8,11E+07**	2,06E+08**	9,23E+07**	1,16E+08**	3,18E+07**	6,43E+07**	1,65E+00
2	4,23E+00	4,52E+00	2,62E+00	7,14E+00	3,66E+00	2,42E+01	3,68E+00	1,60E+00
3	3,45E+00	6,27E+00	2,58E+00	6,13E+00	3,44E+00	1,94E+01	3,35E+00	1,49E+00
5	2,87E+00	6,15E+00	2,63E+00	6,68E+00	3,43E+00	1,80E+01	3,57E+00	1,55E+00
7	1,06E+01**	1,24E+01**	2,68E+00	9,69E+00	4,03E+00	7,89E+01**	4,13E+00	1,52E+00
8	5,07E+00	8,43E+00	3,48E+00**	9,20E+00	4,12E+00	1,94E+01	4,20E+00	1,61E+00
10	3,46E+00	6,08E+00	2,39E+00	6,16E+00	3,34E+00	1,58E+01	3,15E+00	1,45E+00
11	3,70E+00	6,89E+00	2,55E+00	6,71E+00	3,40E+00	1,67E+01	3,50E+00	1,49E+00
14	3,87E+00	6,96E+00	2,61E+00	7,04E+00	3,68E+00	2,22E+01	3,69E+00	1,58E+00
15	4,14E+00	7,51E+00	2,62E+00	7,58E+00	2,04E+00**	2,42E+01	3,79E+00	1,53E+00
17	4,18E+00	7,09E+00	2,87E+00	6,57E+00	3,63E+00	1,65E+01	3,67E+00	1,63E+00
18	4,10E+00	6,19E+00	2,63E+00	6,45E+00	3,39E+00	2,29E+06**	3,25E+00	1,44E+00
19	3,64E+00	6,47E+00	2,57E+00	6,72E+00	3,42E+00	1,76E+01	3,57E+00	1,52E+00
21	3,52E+00	6,16E+00	2,51E+00	6,39E+00	3,50E+00	1,75E+01	3,41E+00	1,46E+00

** als statistischer Ausreisser betrachtet (Grubbs-Test, 99% statistische Sicherheit)

* als Fastausreisser betrachtet (Grubbs-Test, 95% statistische Sicherheit)

Tabelle 69: Arithmetische Mittelwerte des Verhältnisses V3 (C24:1 ω 9-OH / C25:0-OH) aus**Tabelle 65**

Labor	Merkmalsniveau							
	17	18	19	20	21	22	23	24
1	2,93E+05**	4,04E+00	2,13E+00	2,13E+01	8,45E+01	2,45E+00	6,79E+00	4,92E+00
2	4,68E+00	4,13E-01	3,11E-01	2,08E+00	5,02E+00	4,70E-01	7,87E-01	7,83E-01
3	5,41E+01	1,14E+00	1,56E+00	1,06E+01	3,26E+01	1,91E+00	3,72E+00	3,58E+00
5	5,49E+05**	2,12E+00	2,69E+00	2,06E+01	1,32E+02	6,29E+00	9,43E+00	8,43E+00
7	1,08E+02	1,57E+00	1,98E+00	2,72E+01	8,37E+01	2,85E+00	6,97E+00	6,64E+00
8	8,45E+01	1,31E+00	2,45E+00	2,09E+01	5,30E+01	3,28E+00	5,79E+00	4,63E+00
10	3,63E+01	9,30E-01	1,10E+00	7,78E+00	1,77E+01	1,58E+00	2,75E+00	2,76E+00
11	4,03E+01	7,84E-01	1,04E+00	7,45E+00	1,96E+01	1,38E+00	2,77E+00	2,52E+00
14	1,85E+02	4,69E+00	5,79E+00	4,53E+01	1,25E+02	9,15E+00	1,59E+01	1,62E+01
15	3,82E+06**	2,62E+00	3,39E+00	2,96E+01	1,61E+07**	4,94E+00	9,58E+00	9,43E+00
17	1,44E+01	3,47E-01	4,89E-01	2,92E+00	7,52E+00	6,22E-01	1,09E+00	1,13E+00
18	7,61E+01	2,24E+00	2,74E+00	1,84E+01	4,52E+01	2,37E+00	4,16E+00	3,98E+00
19	6,06E+01	1,86E+00	2,61E+00	1,91E+01	4,77E+01	3,28E+00	6,52E+00	6,23E+00
21	1,38E+02	3,67E+00	4,09E+00	3,04E+01	8,76E+01	5,47E+00	1,23E+01	1,07E+01

** als statistischer Ausreisser betrachtet (Grubbs-Test, 99% statistische Sicherheit)

* als Fastausreisser betrachtet (Grubbs-Test, 95% statistische Sicherheit)

Tabelle 70: Arithmetische Mittelwerte des ermittelten ZNS-Gehaltes (Merkmal 25-32) und des Tieralters in Monaten (Merkmal 33,34) der Spezies Rind aus Tabelle 66

Labor	Merkmalsniveau									
	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
1	0,39	6,51*	11,35	2,69	1,40	1,66	3,71	3,26	nb	nb
2	0,57	1,86	5,42	2,08	1,15	2,43	3,06	3,03	30,4	4,9
3	0,36	2,70	5,37	2,07	1,13	3,16	2,53	2,40	24,2	2,4
5	0,43	3,07	5,40	2,08	1,39	3,52	3,89	3,09	23,3	4,1
7	0,37	3,17	7,25	2,26	1,05	3,30	3,09	2,40	49,6*	8,3
8	0,45	2,75	4,65	3,60	1,95	5,40	3,90	2,25	40,4	8,8
10	0,30	1,68	3,49	1,23	0,52	1,96	1,28	1,81	22,9	0,9
11	0,48	3,66	9,40	2,99	1,37	6,77	4,56	4,23	28,9	3,5
14	0,46	3,55	7,91	2,38	1,20	2,84	3,78	3,36	29,4	5,0
15	0,35	2,11	6,11	1,47	0,93	2,17	2,41	2,30	33,5	5,7
17	0,28	2,27	4,47	2,27	1,32	3,60	2,91	3,07	30,3	4,8
18	0,88**	0,86	6,56	1,77	0,87	1,34	5,73	4,78	23,7	1,7
19	0,40	2,53	6,23	2,06	1,03	2,80	2,54	2,67	25,8	4,1
21	0,54	4,73	10,69	2,39	1,62	4,66	6,05	3,07	23,4	2,9

** als statistischer Ausreisser betrachtet (Grubbs-Test, 99% statistische Sicherheit)

* als Fastausreisser betrachtet (Grubbs-Test, 95% statistische Sicherheit)

n.b. - nicht bestimmt

**Tabelle 71: Wiederholstandardabweichungen des Verhältnisses V1 (C24:1 ω 9 / C24:1 ω 7) aus
Tabelle 63**

Labor	Merkmalsniveau							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	A	A	1,01	0,37	A	A	A	0,15
2	0,09	11,93	0,02	0,21	0,29	0,75	0,24	0,23
3	0,73	0,04	0,00	0,06	0,03	0,98	0,01	0,02
5	0,20	0,40	0,14	0,38	0,25	0,05	0,24	0,03
7	0,56	A	0,12	0,13	0,46	A	0,77	0,02
8	0,87	A	A	0,83	1,01	A	4,15	A
10	0,03	3,09	0,15	0,17	0,24	5,91	0,39	0,27
11	0,35	0,12	0,02	0,06	0,08	0,20	0,30	0,03
14	0,06	0,36	0,14	0,05	0,00	0,22	0,02	0,01
15	0,43	E	0,54	0,10	0,19	A	0,52	0,12
17	0,11	0,59	0,00	4,25	0,13	0,90	0,20	0,00
18	0,05	0,64	0,01	0,29	0,06	1,91	0,16	0,01
19	0,20	0,10	0,07	0,02	0,10	0,05	0,03	0,01
21	0,60	0,65	0,30	0,24	0,05	0,08	0,55	0,33

A - Ausreisser; E - Einzelmesswert; n.b. - nicht bestimmt

Tabelle 72: Wiederholstandardabweichungen des Verhältnisses V2 (C24:1 ω 9-OH / C24:1 ω 7-OH) aus Tabelle 64

Labor	Merkmalsniveau							
	9	10	11	12	13	14	15	16
1	A	A	A	A	A	A	A	0,41
2	0,57	3,63	0,14	0,10	0,08	0,34	0,03	0,02
3	0,09	0,19	0,00	0,04	0,04	3,07	0,00	0,01
5	0,89	0,33	0,06	0,01	0,18	4,52	0,05	0,01
7	A	A	0,01	0,50	0,14	A	0,09	0,01
8	0,71	0,73	A	0,40	0,02	E	0,01	0,06
10	0,13	0,18	0,02	0,17	0,03	0,80	0,01	0,01
11	0,25	0,14	0,03	0,02	0,04	0,75	0,01	0,01
14	0,14	0,06	0,00	0,06	0,00	0,59	0,01	0,00
15	0,13	0,00	0,00	0,06	A	0,57	0,01	0,00
17	0,03	0,09	0,14	0,18	0,02	0,12	0,18	0,01
18	0,02	0,73	0,00	0,02	0,01	A	0,00	0,00
19	0,08	0,03	0,01	0,02	0,02	1,48	0,01	0,01
21	0,14	0,14	0,00	0,16	0,06	2,16	0,15	0,12

A - Ausreisser; E - Einzelmesswert; n.b. - nicht bestimmt

**Tabelle 73: Wiederholstandardabweichungen des Verhältnisses V3 (C24:1 ω 9-OH / C25:0-OH)
aus Tabelle 65**

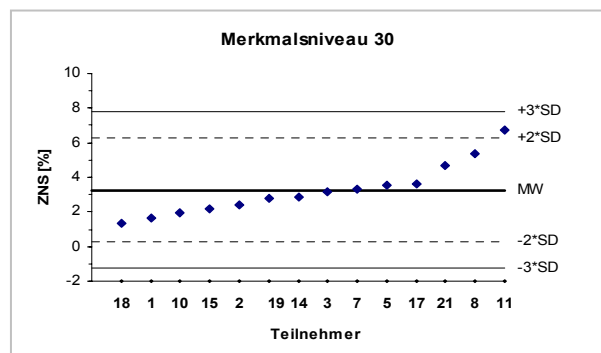
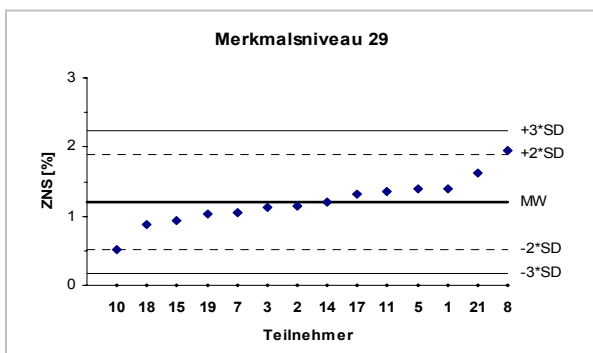
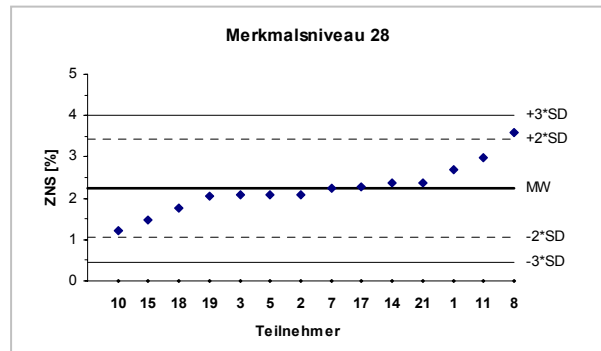
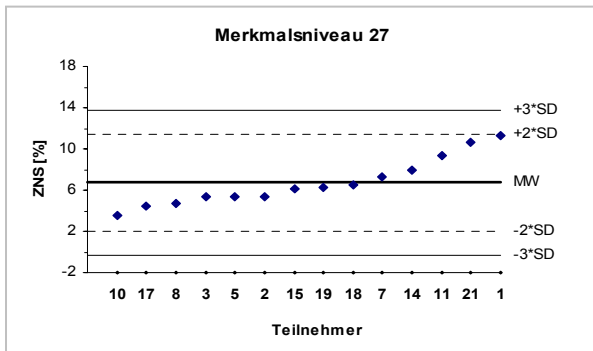
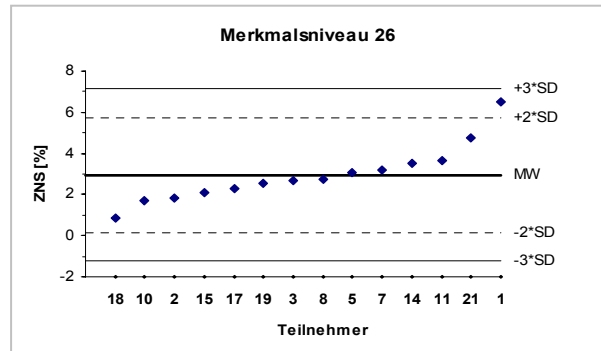
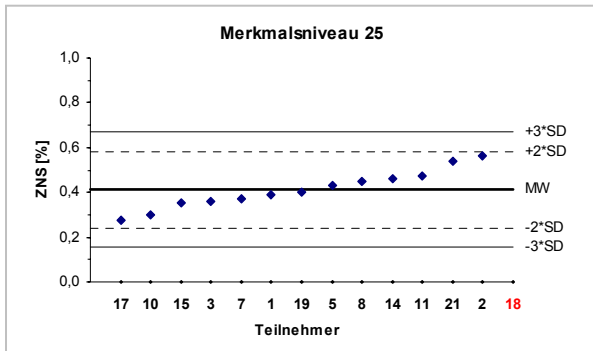
Labor	Merkmalsniveau							
	17	18	19	20	21	22	23	24
1	A	3,44	0,05	0,21	6,55	0,40	0,17	0,25
2	5,71	0,21	0,01	0,00	0,17	0,04	0,03	0,01
3	10,60	0,13	0,00	0,11	2,39	0,17	0,01	0,00
5	A	0,03	0,04	0,56	2,72	0,46	0,54	0,20
7	16,58	0,01	0,03	0,89	3,68	0,20	0,22	0,42
8	11,62	0,03	1,23	2,08	1,72	n.b.	0,99	0,18
10	0,93	0,01	0,03	0,46	2,69	0,02	0,20	0,04
11	6,84	0,01	0,00	0,04	0,01	0,00	0,02	0,01
14	3,84	0,03	0,03	0,34	1,24	0,24	0,03	0,25
15	A	0,01	0,22	0,60	A	0,06	0,14	0,17
17	4,48	0,00	0,03	0,01	0,15	0,02	0,04	0,06
18	0,40	0,01	0,07	0,27	1,71	0,10	0,07	0,01
19	2,07	0,03	0,03	0,20	0,51	0,17	0,26	0,18
21	9,96	0,33	0,01	2,69	5,47	0,48	1,43	0,60

A - Ausreisser; E - Einzelmesswert; n.b. - nicht bestimmt

**Tabelle 74: Wiederholstandardabweichungen des ermittelten ZNS-Gehaltes (Merkmal 25-32)
und des Tieralters in Monaten (Merkmal 33,34) der Spezies Rind aus Tabelle 66**

Labor	Merkmalsniveau									
	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
1	0,02	1,03	0,89	0,97	0,10	1,16	0,66	1,44	n.b.	n.b.
2	0,22	1,11	0,99	0,36	0,14	0,08	0,26	0,04	n.b.	0,20
3	0,05	0,16	0,10	0,01	0,02	1,33	0,10	0,06	1,44	0,00
5	0,19	0,30	0,29	0,35	0,05	0,05	0,05	0,00	2,43	0,40
7	0,07	0,04	0,01	0,08	0,05	0,05	0,05	0,42	10,48	0,65
8	0,07	0,21	1,48	0,00	0,07	n.b.	0,85	0,64	5,47	0,10
10	0,02	0,03	0,05	0,06	0,32	0,03	0,64	0,05	1,35	0,10
11	0,01	0,10	0,78	0,18	0,05	0,57	0,17	0,18	1,05	0,07
14	0,06	0,10	0,59	0,00	0,01	0,06	0,49	0,25	0,44	0,11
15	0,05	0,08	0,20	0,03	0,02	0,11	0,17	0,09	0,03	0,04
17	0,00	0,00	1,75	0,07	0,03	0,07	0,60	0,24	0,66	1,33
18	A	0,00	0,68	0,15	0,04	0,02	0,01	0,04	5,48	0,01
19	0,02	0,04	0,09	0,08	0,00	0,37	0,16	0,17	0,25	0,11
21	0,09	0,23	3,58	0,77	0,31	0,29	1,24	2,24	1,02	1,10

A - Ausreisser; E - Einzelmesswert; n.b. - nicht bestimmt



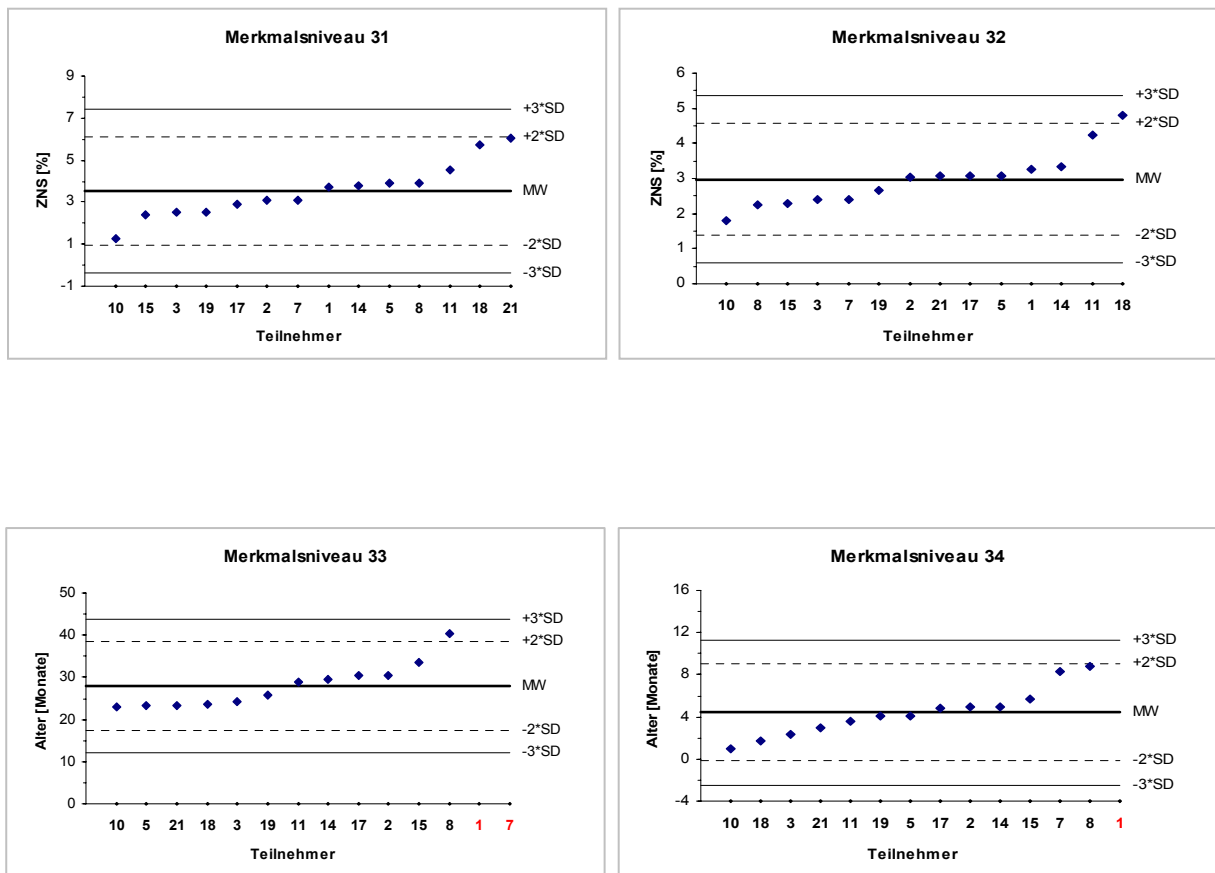
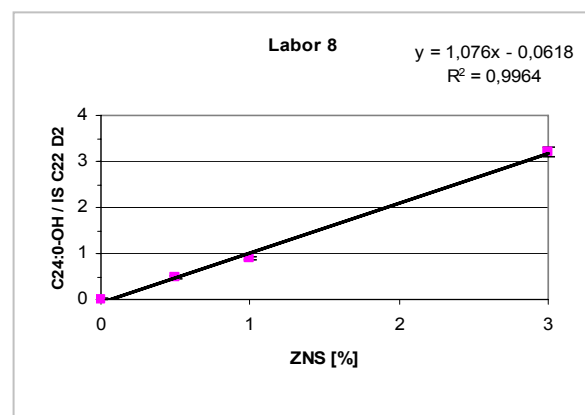
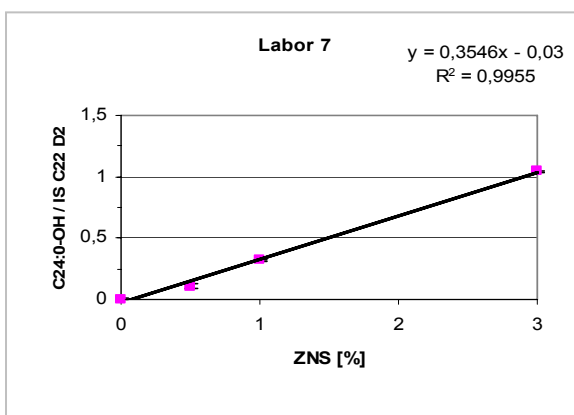
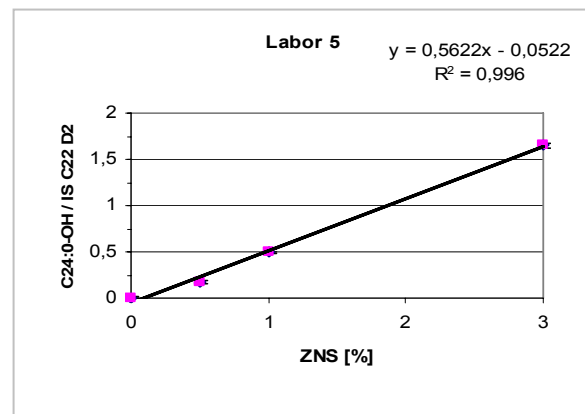
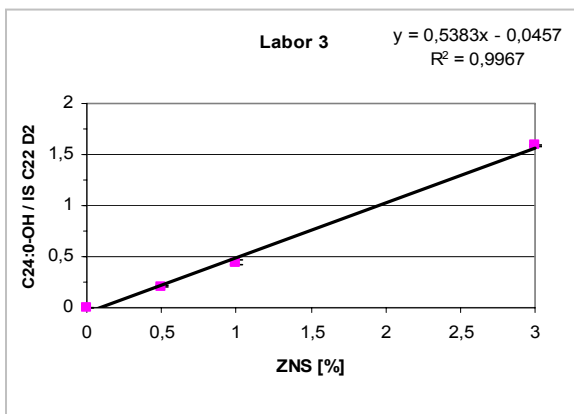
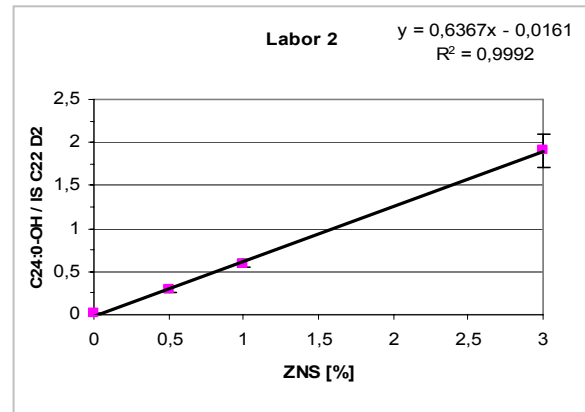
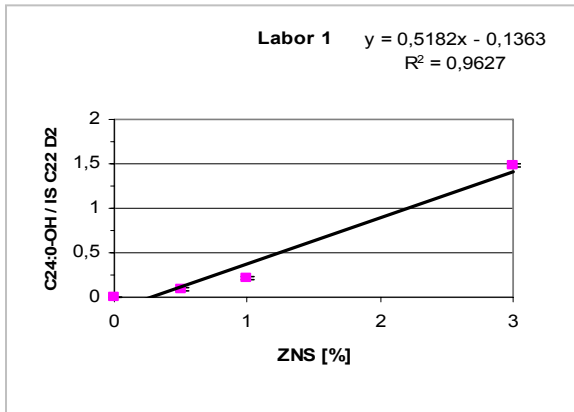
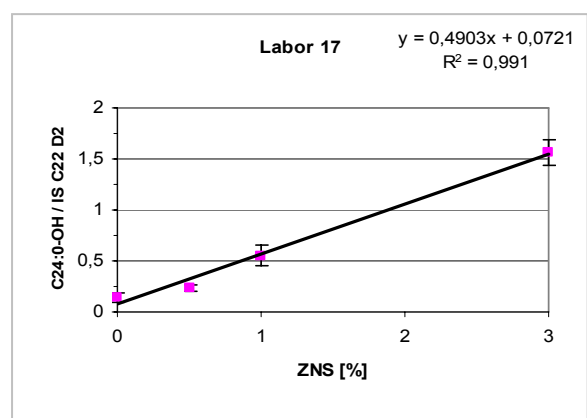
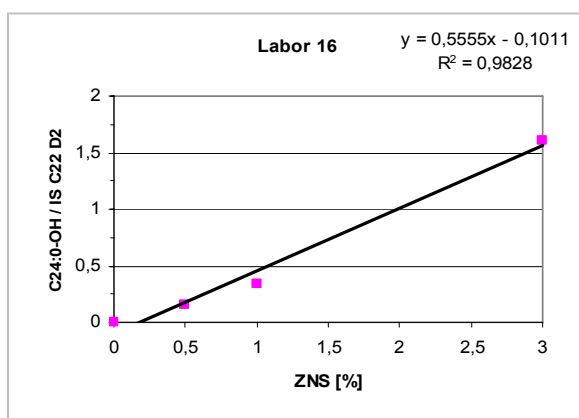
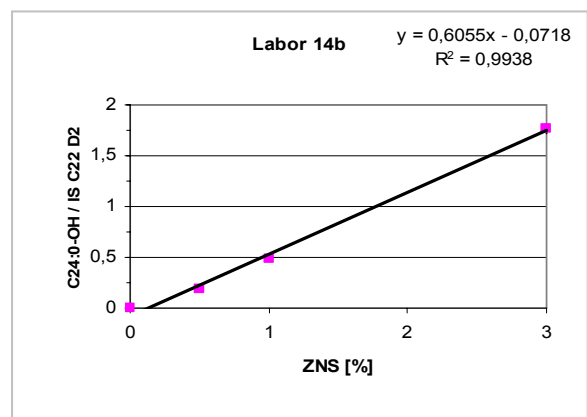
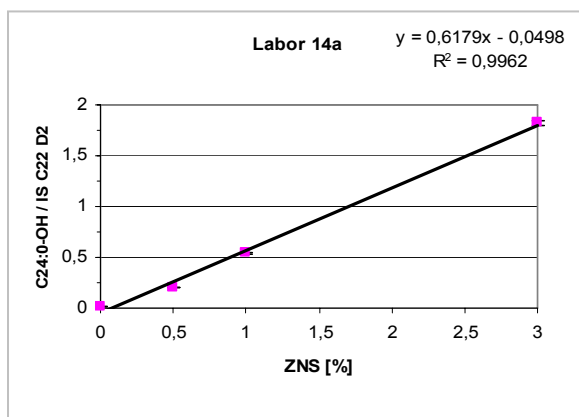
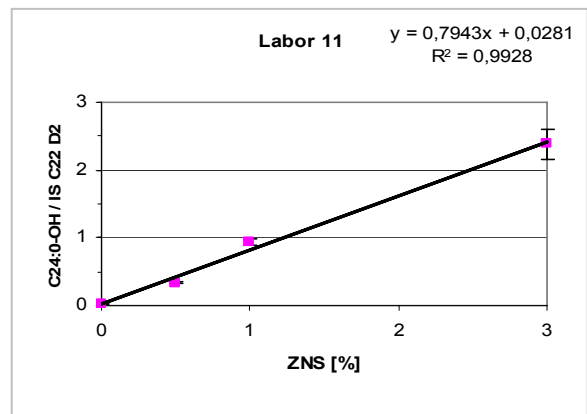
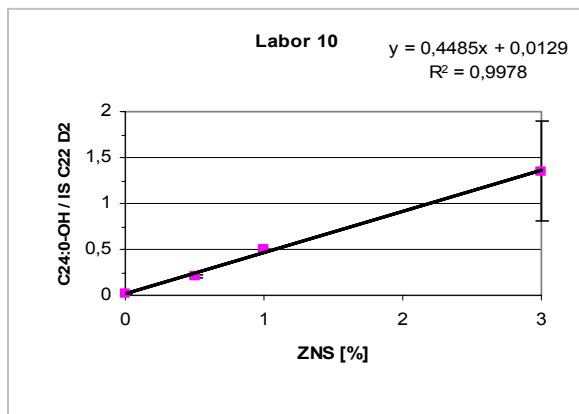


Abbildung 39: Aufsteigende Reihung der erzielten Messwerte jedes Teilnehmers für die Merkmalsniveaus 25-32 (ZNS-Gehalt) und 33-34 (Tieralter) entsprechend Tabelle 32

A.3 Zusammenstellung der Tabellen und Abbildungen des zweiten Ringtests





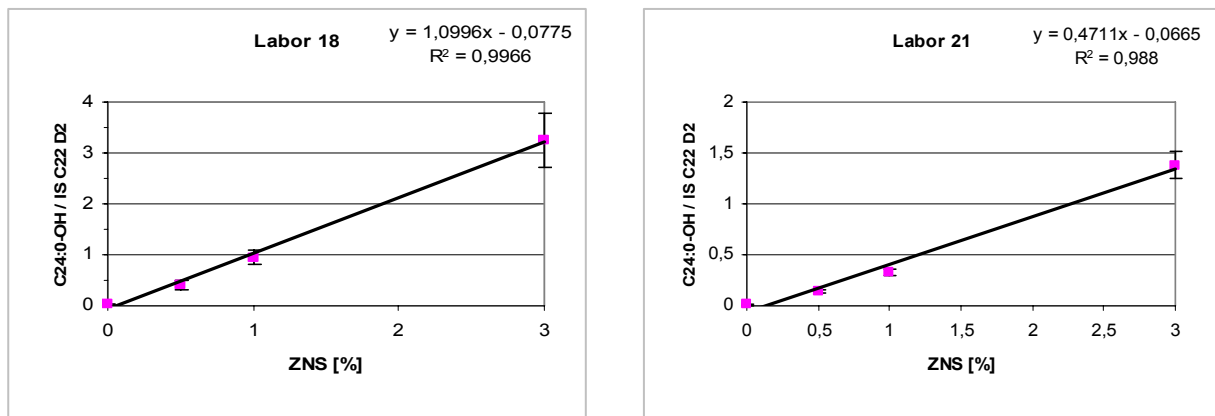


Abbildung 40: Kalibrationskurven für die ZNS Bestimmung aus der Brühwurstmatrix (Standards mit 0%, 0,5%, 1%, 3% ZNS, Schwein, 6 Monate) der am zweiten Ringtest beteiligten Laboratorien (n=14)

Tabelle 75: Festlegung der analysierten Mekmalsniveaus für den zweiten Ringtest nach DIN ISO 5725-2:2002

	V1: C24:1 ω 9 C24:1 ω 7	V2: C24:1 ω 9-OH C24:1 ω 7-OH	V3: C24:1 ω 9-OH C25:0-OH	ZNS-Gehalt [%]	Alter Rind [Monate]
RV2-1	1	11	21	31	41
RV2-3	2	12	22	32	
RV2-8	3	13	23	33	
RV2-16	4	14	24	34	42
RV2-20	5	15	25	35	43
RV2-21	6	16	26	36	
RV2-22	7	17	27	37	
RV2-24	8	18	28	38	
RV2-25	9	19	29	39	44
RV2-27	10	20	30	40	

Tabelle 76: Ursprungsdaten der Primärproben des zweiten Ringtests für das Verhältnis V1 (C24:1 ω 9 / C24:1 ω 7) nach DIN ISO 5725

Labor	Merkmalsniveau									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1,17E+01	2,29E+01	8,77E+00	2,05E+01	1,23E+01	3,70E+00	1,75E+01	5,23E+00	2,79E+01	7,38E+00
	1,27E+01	2,44E+01	7,46E+00	2,75E+01	1,30E+01	3,95E+00	2,27E+01	4,93E+00	2,18E+01	7,03E+00
2	2,51E+01	5,00E+01	1,21E+01	6,83E+01	2,37E+01	5,04E+00	7,49E+01	6,65E+00	4,66E+01	1,13E+01
	2,26E+01	5,05E+01	1,30E+01	5,79E+01	2,45E+01	5,20E+00	7,13E+01	6,64E+00	4,55E+01	1,10E+01
3	2,49E+00	4,41E+00	2,14E+00	2,98E+00	2,42E+00	1,34E+00	3,51E+00	1,41E+00	4,27E+00	1,62E+00
	2,16E+00	3,93E+00	2,05E+00	3,21E+00	2,54E+00	1,25E+00	3,08E+00	1,07E+00	5,20E+00	1,48E+00
5	6,82E+00	1,58E+01	6,05E+00	3,90E+01	6,47E+00	3,48E+00	1,85E+01	4,11E+00	1,84E+01	5,66E+00
	7,20E+00	1,52E+01	6,45E+00	2,24E+01	1,03E+01	3,67E+00	1,79E+01	4,24E+00	1,77E+01	5,54E+00
7	1,65E+01	3,35E+01	1,31E+01	4,11E+01	1,35E+01	4,54E+00	1,08E+02	5,45E+00	8,00E+01	1,13E+01
	1,60E+01	3,37E+01	1,24E+01	3,85E+01	1,93E+01	4,81E+00	1,08E+02	5,45E+00	1,06E+02	1,11E+01
8	1,08E+01	2,20E+01	5,41E+00	9,71E+00	5,02E+00	4,91E+00	1,45E+01	4,62E+00	2,33E+01	7,45E+00
	6,70E+00	1,99E+01	7,18E+00	1,56E+01	7,85E+00	2,84E+00	2,52E+01	7,05E+00	1,89E+01	5,83E+00
10	7,99E+00	1,85E+01	7,14E+00	1,96E+01	9,09E+00	4,33E+00	2,11E+01	5,25E+00	1,97E+01	7,12E+00
	8,34E+00	1,87E+01	7,47E+00	1,96E+01	8,60E+00	4,47E+00	2,06E+01	4,91E+00	2,02E+01	7,37E+00
11	8,31E+00	1,63E+01	5,22E+00	5,56E+01	6,91E+00	2,92E+00	1,22E+01	2,33E+00	1,84E+01	5,23E+00
	8,20E+00	1,46E+01	4,56E+00	4,40E+01	6,07E+00	2,48E+00	1,67E+01	2,32E+00	1,67E+01	4,50E+00
14a	1,37E+01	1,84E+01	8,11E+00	8,74E+01	8,98E+00	3,84E+00	9,13E+03	4,36E+00	2,16E+01	7,16E+00
	1,36E+01	1,78E+01	8,57E+00	7,80E+03	9,86E+00	3,43E+00	1,02E+04	4,47E+00	2,09E+01	7,61E+00
14b	1,05E+01	1,92E+01	7,67E+00	1,04E+04	9,27E+00	3,79E+00	1,26E+04	2,90E+03	2,06E+01	6,40E+00
	1,08E+01	2,06E+01	8,12E+00	1,09E+04	8,98E+00	3,72E+00	8,79E+03	2,45E+00	2,23E+01	6,44E+00
17	7,83E+00	1,36E+01	7,83E+00	1,32E+01	1,04E+01	3,79E+00	1,77E+01	4,64E+00	1,68E+01	7,47E+00
	8,43E+00	0,00E+00	8,62E+00	1,51E+01	8,86E+00	3,49E+00	1,73E+01	5,31E+00	1,93E+01	8,34E+00
18	1,35E+03	1,69E+01	9,94E+00	2,51E+01	6,97E+00	4,14E+00	4,90E+04	5,71E+00	2,39E+01	9,20E+00
	5,31E+02	2,58E+01	1,07E+01	2,20E+01	7,72E+00	4,12E+00	5,10E+04	4,58E+00	2,64E+01	9,31E+00
21	8,70E+00	1,87E+01	7,85E+00	2,17E+01	9,88E+00	5,04E+00	1,77E+01	6,81E+00	1,72E+01	6,95E+00
	7,86E+00	1,84E+01	8,48E+00	2,34E+01	8,43E+00	4,89E+00	1,89E+01	5,89E+00	1,72E+01	7,10E+00

n.b. - nicht bestimmt

**Tabelle 77: Ursprungsdaten der Primärproben des zweiten Ringtests für das Verhältnis V2
(C24:1 ω 9-OH / C24:1 ω 7-OH) nach DIN ISO 5725**

Labor	Merkmalsniveau									
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	3,03E+00	1,51E+01	4,01E+00	3,42E+00	2,82E+00	1,38E+00	5,51E+03	1,25E+00	5,29E+00	5,48E+00
	3,49E+00	5,44E+03	1,15E+01	4,00E+00	3,60E+00	1,37E+00	1,99E+01	1,32E+00	6,07E+00	7,33E+00
2	2,88E+00	2,42E+01	6,06E+00	3,91E+00	3,42E+00	1,27E+00	2,30E+01	1,01E+00	6,43E+00	5,92E+00
	2,94E+00	1,89E+01	6,20E+00	3,20E+00	3,25E+00	1,14E+00	2,63E+01	1,32E+00	4,74E+00	7,05E+00
3	3,01E+00	1,65E+01	5,82E+00	5,94E+00	3,26E+00	1,47E+00	2,58E+01	1,35E+00	6,22E+00	5,80E+00
	3,08E+00	1,62E+01	5,72E+00	4,86E+00	3,09E+00	1,44E+00	2,47E+01	1,28E+00	6,71E+00	5,72E+00
5	3,28E+00	2,55E+01	7,19E+00	1,27E+01	3,59E+00	1,49E+00	2,65E+01	1,34E+00	7,37E+00	7,13E+00
	3,45E+00	2,61E+01	7,36E+00	9,85E+00	3,68E+00	1,50E+00	3,01E+01	1,20E+00	6,79E+00	7,67E+00
7	4,16E+00	9,25E+01	8,54E+00	7,17E+00	4,75E+00	1,41E+00	2,89E+01	1,20E+00	1,20E+01	1,19E+01
	4,20E+00	8,69E+01	9,38E+00	7,10E+00	4,47E+00	1,41E+00	2,87E+01	1,14E+00	1,23E+01	1,13E+01
8	3,33E+00	2,27E+07	8,54E+00	1,75E+01	4,00E+00	1,62E+00	8,00E+06	1,44E+00	1,17E+01	1,14E+01
	3,44E+00	2,27E+07	8,68E+00	1,68E+01	4,55E+00	1,00E+00	1,01E+07	1,40E+00	1,56E+01	1,29E+01
10	2,46E+00	1,79E+01	5,08E+00	5,22E+00	3,16E+00	1,33E+00	1,80E+01	1,20E+00	5,04E+00	5,42E+00
	2,43E+00	1,87E+01	5,12E+00	5,29E+00	3,23E+00	1,39E+00	1,61E+01	1,21E+00	5,10E+00	6,05E+00
11	3,07E+00	1,72E+01	6,12E+00	6,70E+00	3,23E+00	1,18E+00	1,27E+01	1,03E+00	6,10E+00	5,36E+00
	3,38E+00	1,64E+01	4,74E+00	5,04E+00	2,75E+00	1,11E+00	1,43E+01	1,00E+00	5,33E+00	4,78E+00
14a	3,66E+00	2,30E+01	6,50E+00	9,85E+00	3,57E+00	1,41E+00	2,22E+01	1,24E+00	7,89E+00	6,11E+00
	3,53E+00	1,79E+01	7,29E+00	1,04E+01	3,54E+00	1,37E+00	2,42E+01	1,23E+00	5,62E+00	6,95E+00
14b	3,22E+00	2,28E+01	6,61E+00	6,01E+00	3,25E+00	1,35E+00	2,12E+01	1,10E+00	6,30E+00	5,66E+00
	3,23E+00	1,64E+01	6,36E+00	7,64E+00	3,37E+00	1,38E+00	2,11E+01	1,09E+00	6,25E+00	5,85E+00
17	3,94E+00	1,04E+01	5,67E+00	6,90E+00	3,37E+00	1,56E+00	1,85E+01	1,20E+00	4,70E+00	8,07E+00
	4,22E+00	0,00E+00	6,05E+00	7,14E+00	3,28E+00	1,36E+00	1,74E+01	1,20E+00	6,29E+00	8,39E+00
18	3,15E+00	1,82E+01	5,56E+00	1,35E+01	3,30E+00	1,44E+00	1,44E+01	1,06E+00	7,79E+00	8,08E+00
	2,78E+00	1,43E+01	6,58E+00	9,36E+00	3,00E+00	1,50E+00	1,50E+01	1,13E+00	8,03E+00	8,11E+00
21	3,24E+00	1,69E+01	6,01E+00	6,18E+00	3,39E+00	1,41E+00	1,63E+01	1,21E+00	6,42E+00	6,36E+00
	2,77E+00	1,76E+01	6,55E+00	6,47E+00	3,57E+00	1,40E+00	1,84E+01	1,26E+00	6,47E+00	6,85E+00

n.b. - nicht bestimmt

**Tabelle 78: Ursprungsdaten der Primärproben des zweiten Ringtests für das Verhältnis V3
(C24:1 ω 9-OH / C25:0-OH) nach DIN ISO 5725**

Labor	Merkmalsniveau									
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
1	3,13E+00	1,77E+00	1,06E+01	1,01E+00	3,63E+00	5,19E+00	1,90E+00	7,33E+00	9,82E-01	1,11E+01
	3,53E+00	1,98E+00	2,04E+01	1,03E+00	3,85E+00	4,23E+00	1,83E+00	8,28E+03	9,76E-01	1,54E+01
2	5,05E+00	3,00E+00	1,51E+01	1,46E+00	6,64E+00	6,42E+00	3,25E+00	9,49E+00	5,43E+00	1,30E+01
	5,21E+00	2,97E+00	1,72E+01	1,35E+00	5,20E+00	6,26E+00	3,14E+00	5,44E+01	6,54E+00	1,01E+01
3	2,32E+00	1,69E+00	7,36E+00	7,43E-01	2,84E+00	3,88E+00	1,76E+00	5,24E+00	9,08E-01	6,10E+00
	2,91E+00	1,68E+00	7,89E+00	8,11E-01	2,75E+00	3,87E+00	1,67E+00	6,14E+00	8,65E-01	7,47E+00
5	1,24E+01	6,34E+00	3,21E+01	2,54E+00	9,73E+00	1,49E+01	4,78E+00	2,07E+01	2,79E+00	2,75E+01
	1,15E+01	6,08E+00	2,84E+01	2,51E+00	1,58E+01	1,38E+01	4,82E+00	1,81E+01	2,93E+00	2,85E+01
7	1,24E+01	5,18E+00	3,47E+01	2,98E+00	1,19E+01	1,83E+01	5,94E+00	2,56E+01	2,81E+00	4,87E+01
	1,21E+01	4,97E+00	3,70E+01	2,72E+00	1,24E+01	1,91E+01	6,07E+00	2,64E+01	2,86E+00	4,86E+01
8	1,75E+00	9,12E-01	5,54E+00	5,56E-01	1,85E+00	2,50E+00	8,45E-01	2,96E+00	4,44E-01	5,31E+00
	1,74E+00	9,74E-01	5,65E+00	5,69E-01	1,71E+00	8,81E-06	1,28E+00	3,07E+00	5,41E-01	5,06E+00
10	6,36E+00	3,68E+00	1,81E+01	1,21E+00	4,24E+00	1,27E+01	4,56E+00	1,17E+01	1,31E+00	1,58E+01
	6,02E+00	3,76E+00	1,79E+01	1,21E+00	4,22E+00	1,15E+01	4,36E+00	1,24E+01	1,27E+00	1,97E+01
11	2,72E+00	1,57E+00	8,69E+00	7,86E-01	3,06E+00	4,08E+00	1,66E+00	6,68E+00	8,41E-01	9,05E+00
	2,72E+00	1,55E+00	8,40E+00	7,35E-01	2,99E+00	4,41E+00	1,70E+00	7,21E+00	8,29E-01	8,49E+00
14a	1,32E+01	6,33E+00	4,40E+01	3,50E+00	1,35E+01	1,79E+01	7,01E+00	2,97E+01	3,50E+00	4,19E+01
	1,33E+01	6,42E+00	4,33E+01	3,41E+00	1,31E+01	1,92E+01	7,06E+00	3,16E+01	3,70E+00	3,86E+01
14b	1,17E+01	6,40E+00	4,17E+01	3,13E+00	1,28E+01	1,67E+01	6,91E+00	5,20E+03	3,53E+00	4,26E+01
	1,24E+01	6,31E+00	4,08E+01	3,26E+00	1,29E+01	1,67E+01	7,11E+00	3,52E+01	3,51E+00	4,23E+01
17	5,50E+00	4,58E+00	1,99E+01	1,97E+00	7,00E+00	1,33E+01	4,88E+00	1,39E+01	1,82E+00	2,60E+01
	5,59E+00	0,00E+00	1,94E+01	1,90E+00	7,61E+00	1,05E+01	4,31E+00	1,43E+01	1,97E+00	2,28E+01
18	6,04E+00	3,64E+00	1,77E+01	1,73E+00	6,13E+00	9,30E+00	3,72E+00	1,21E+01	1,45E+00	1,62E+01
	6,16E+00	3,67E+00	1,72E+01	1,79E+00	6,30E+00	9,77E+00	3,81E+00	1,30E+01	1,44E+00	1,61E+01
21	1,10E+01	5,29E+00	3,50E+01	3,01E+00	1,02E+01	1,57E+01	5,59E+00	2,44E+01	2,70E+00	3,14E+01
	1,10E+01	5,33E+00	3,42E+01	2,90E+00	1,08E+01	1,61E+01	5,78E+00	2,46E+01	2,86E+00	3,42E+01

n.b. - nicht bestimmt

Tabelle 79: Ursprungsdaten der Primärproben des zweiten Ringtests für den von den Versuchsteilnehmern ermittelten ZNS-Gehalt in Prozent (Merkmal 31-40) und das Tieralter in Monaten (Merkmal 41-44) beim Rind nach DIN ISO 5725

Labor	Merkmalsniveau													
	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
1	0,55	1,73	0,49	0,35	0,88	0,91	0,61	0,39	0,81	0,90	0,04	2,92	n.b.	16,91
	0,56	1,10	0,48	0,37	0,77	0,64	0,76	0,28	0,85	0,85	3,48	7,32	4,28	22,75
2	0,65	1,81	0,56	0,48	0,89	1,03	0,72	0,53	0,81	1,04	n.b.	6,64	2,98	25,47
	0,56	1,44	0,52	0,42	1,00	0,97	0,63	0,31	0,68	0,99	n.b.	1,28	1,72	12,80
3	0,57	1,50	0,44	0,34	0,75	0,90	0,64	0,44	1,03	0,26	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
	0,55	1,58	0,52	0,36	0,81	0,89	0,66	0,43	1,08	0,77	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
5	0,58	1,62	0,49	0,34	0,86	1,24	1,11	0,87	1,81	1,24	1,88	72,23	n.b.	32,43
	0,63	1,59	0,95	0,35	0,85	1,49	1,21	0,77	1,98	1,31	3,20	51,03	4,86	28,15
7	0,44	1,79	0,49	0,28	0,82	0,75	0,58	0,36	1,04	1,21	8,50	30,94	12,86	66,91
	0,47	1,75	0,54	0,40	0,96	0,73	0,55	0,40	0,97	0,74	8,79	30,46	10,76	69,54
8	0,63	2,16	0,63	0,39	1,06	1,06	0,82	0,19	0,83	0,72	2,31	n.b.	n.b.	n.b.
	0,64	2,31	0,71	0,43	1,01	0,02	0,52	0,08	0,98	0,81	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
10	0,55	1,73	0,49	0,35	0,88	0,91	0,61	0,39	0,81	0,90	n.b.	16,43	1,00	15,04
	0,56	1,10	0,48	0,37	0,77	0,64	0,76	0,28	0,85	0,85	n.b.	16,89	1,51	15,50
11	0,51	1,71	0,39	0,36	0,76	0,87	0,51	0,22	1,54	0,65	0,30	27,42	1,52	22,99
	0,58	1,22	0,35	0,26	0,70	0,67	0,38	0,27	1,10	0,55	2,62	15,03	n.b.	17,19
14a	0,55	1,54	0,47	0,37	0,75	0,86	0,67	0,42	1,09	0,82	4,73	50,99	4,08	36,38
	0,53	1,56	0,47	0,38	0,83	0,80	0,65	0,43	1,23	0,69	3,79	54,84	3,86	19,41
14b	0,60	1,43	0,50	0,45	0,90	1,04	0,64	0,17	1,19	0,77	1,47	22,28	1,64	24,48
	0,63	1,70	0,53	0,44	0,89	0,94	0,75	0,46	1,24	0,73	1,56	34,52	2,59	24,12
17	0,58	1,78	0,38	0,23	0,77	0,46	0,63	0,35	1,30	0,82	n.b.	n.b.	2,58	12,48
	0,36	n.b.	0,33	0,13	0,60	0,60	0,41	0,27	0,93	0,80	n.b.	n.b.	1,90	24,40
18	0,50	1,39	0,43	0,33	0,69	0,85	0,54	0,35	1,34	0,91	0,91	n.b.	2,03	35,57
	0,52	1,32	0,46	0,33	0,79	0,85	0,56	0,38	1,34	1,01	n.b.	47,33	n.b.	37,42
21	0,55	1,52	0,51	0,34	0,81	0,86	0,62	0,44	1,11	0,80	1,62	23,60	2,70	25,36
	0,60	1,52	0,53	0,33	0,88	0,94	0,59	0,50	1,10	0,84	n.b.	25,75	4,07	25,74

n.b. - nicht bestimmt

Tabelle 80: Arithmetische Mittelwerte des Verhältnisses V1 (C24:1 ω 9 / C24:1 ω 7) aus Tabelle 76

Labor	Merkmalsniveau									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1,22E+01	2,36E+01	8,12E+00	2,40E+01	1,27E+01	3,83E+00	2,01E+01	5,08E+00	2,49E+01	7,21E+00
2	2,39E+01*	5,02E+01*	1,26E+01	6,31E+01	2,41E+01*	5,12E+00	7,31E+01	6,65E+00	4,60E+01**	1,11E+01
3	2,32E+00	4,17E+00	2,09E+00	3,09E+00	2,48E+00	1,29E+00	3,30E+00	1,24E+00	4,73E+01**	1,55E+00
5	7,01E+00	1,55E+01	6,25E+00	3,07E+01	8,39E+00	3,58E+00	1,82E+01	4,17E+00	1,81E+01	5,60E+00
7	1,62E+01	3,36E+01	1,28E+01	3,98E+01	1,64E+01	4,68E+00	1,08E+02	5,45E+00	9,28E+01**	1,12E+01
8	8,73E+00	2,09E+01	6,29E+00	1,26E+01	6,43E+00	3,88E+00	1,99E+01	5,83E+00	2,11E+01	6,64E+00
10	8,26E+00	1,54E+01	4,89E+00	4,98E+01	6,49E+00	2,70E+00	1,44E+01	2,33E+00	1,76E+01	4,87E+00
11	8,26E+00	1,54E+01	4,89E+00	4,98E+01	6,49E+00	2,70E+00	1,44E+01	2,33E+00	1,76E+01	4,87E+00
14a	1,37E+01	1,81E+01	8,34E+00	3,94E+03**	9,42E+00	3,63E+00	9,65E+03	4,42E+00	2,13E+01	7,39E+00
14b	1,07E+01	1,99E+01	7,89E+00	1,07E+04**	9,12E+00	3,76E+00	1,07E+04	1,45E+03**	2,15E+01	6,42E+00
17	8,13E+00	6,78E+00	8,22E+00	1,41E+01	9,63E+00	3,64E+00	1,75E+01	4,98E+00	1,81E+01	7,91E+00
18	9,42E+02**	2,13E+01	1,03E+01	2,36E+01	7,35E+00	4,13E+00	5,00E+04**	5,15E+00	2,52E+01	9,26E+00
21	8,28E+00	1,86E+01	8,16E+00	2,25E+01	9,16E+00	4,97E+00	1,83E+01	6,35E+00	1,72E+01	7,02E+00

** als statistischer Ausreisser betrachtet (Grubbs-Test, 99% statistische Sicherheit)

* als Fastausreisser betrachtet (Grubbs-Test, 95% statistische Sicherheit)

Tabelle 81: Arithmetische Mittelwerte des Verhältnisses V2 (C24:1 ω 9-OH / C24:1 ω 7-OH) aus

Tabelle 77

Labor	Merkmalsniveau									
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	3,26E+00	2,73E+03**	7,75E+00	3,71E+00	3,21E+00	1,37E+00	2,77E+03**	1,29E+00	5,68E+00	6,41E+00
2	2,91E+00	2,15E+01	6,13E+00	3,56E+00	3,34E+00	1,21E+00	2,47E+01	1,16E+00	5,59E+00	6,48E+00
3	3,05E+00	1,64E+01	5,77E+00	5,40E+00	3,18E+00	1,45E+00	2,52E+01	1,32E+00	6,47E+00	5,76E+00
5	3,37E+00	2,58E+01	7,27E+00	1,13E+01	3,63E+00	1,49E+00	2,83E+01	1,27E+00	7,08E+00	7,40E+00
7	4,18E+00	8,97E+01**	8,96E+00	7,13E+00	4,61E+00	1,41E+00	2,88E+01	1,17E+00	1,22E+01	1,16E+01
8	3,39E+00	2,27E+07**	8,61E+00	1,71E+01*	4,28E+00	1,31E+00	9,06E+06**	1,42E+00	1,36E+01	1,21E+01
10	3,22E+00	1,68E+01	5,43E+00	5,87E+00	2,99E+00	1,14E+00	1,35E+01	1,01E+00	5,71E+00	5,07E+00
11	3,22E+00	1,68E+01	5,43E+00	5,87E+00	2,99E+00	1,14E+00	1,35E+01	1,01E+00	5,71E+00	5,07E+00
14a	3,60E+00	2,04E+01	6,89E+00	1,01E+01	3,56E+00	1,39E+00	2,32E+01	1,23E+00	6,76E+00	6,53E+00
14b	3,23E+00	1,96E+01	6,49E+00	6,83E+00	3,31E+00	1,36E+00	2,11E+01	1,10E+00	6,28E+00	5,76E+00
17	4,08E+00	5,18E+00*	5,86E+00	7,02E+00	3,33E+00	1,46E+00	1,80E+01	1,20E+00	5,49E+00	8,23E+00
18	2,96E+00	1,62E+01	6,07E+00	1,14E+01	3,15E+00	1,47E+00	1,47E+01	1,10E+00	7,91E+00	8,10E+00
21	3,01E+00	1,73E+01	6,28E+00	6,33E+00	3,48E+00	1,40E+00	1,73E+01	1,24E+00	6,44E+00	6,60E+00

** als statistischer Ausreisser betrachtet (Grubbs-Test, 99% statistische Sicherheit)

* als Fastausreisser betrachtet (Grubbs-Test, 95% statistische Sicherheit)

**Tabelle 82: Arithmetische Mittelwerte des Verhältnisses V3 (C24:1 ω 9-OH / C25:0-OH) aus
Tabelle 78**

Labor	Merkmalsniveau									
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
1	3,33E+00	1,87E+00	1,55E+01	1,02E+00	3,74E+00	4,71E+00	1,87E+00	4,14E+03**	9,79E-01	1,33E+01
2	5,13E+00	2,99E+00	1,61E+01	1,40E+00	5,92E+00	6,34E+00	3,20E+00	3,20E+01	5,99E+00	1,15E+01
3	2,62E+00	1,68E+00	7,62E+00	7,77E-01	2,80E+00	3,88E+00	1,72E+00	5,69E+00	8,87E-01	6,78E+00
5	1,19E+01	6,21E+00	3,02E+01	2,53E+00	1,28E+01	1,44E+01	4,80E+00	1,94E+01	2,86E+00	2,80E+01
7	1,23E+01	5,07E+00	3,59E+01	2,85E+00	1,21E+01	1,87E+01	6,00E+00	2,60E+01	2,84E+00	4,86E+01
8	1,75E+00	9,43E-01	5,59E+00	5,62E-01	1,78E+00	1,25E+00	1,06E+00	3,01E+00	4,93E-01	5,18E+00
10	2,72E+00	1,56E+00	8,54E+00	7,60E-01	3,03E+00	4,25E+00	1,68E+00	6,94E+00	8,35E-01	8,77E+00
11	2,72E+00	1,56E+00	8,54E+00	7,60E-01	3,03E+00	4,25E+00	1,68E+00	6,94E+00	8,35E-01	8,77E+00
14a	1,33E+01	6,38E+00	4,36E+01	3,45E+00	1,33E+01	1,85E+01	7,04E+00	3,07E+01	3,60E+00	4,03E+01
14b	1,20E+01	6,35E+00	4,12E+01	3,20E+00	1,28E+01	1,67E+01	7,01E+00	2,62E+03**	3,52E+00	4,24E+01
17	5,55E+00	2,29E+00	1,96E+01	1,93E+00	7,30E+00	1,19E+01	4,60E+00	1,41E+01	1,90E+00	2,44E+01
18	6,10E+00	3,65E+00	1,74E+01	1,76E+00	6,22E+00	9,53E+00	3,77E+00	1,25E+01	1,45E+00	1,61E+01
21	1,10E+01	5,31E+00	3,46E+01	2,96E+00	1,05E+01	1,59E+01	5,68E+00	2,45E+01	2,78E+00	3,28E+01

** als statistischer Ausreißer betrachtet (Grubbs-Test, 99% statistische Sicherheit)

* als Fastausreißer betrachtet (Grubbs-Test, 95% statistische Sicherheit)

**Tabelle 83: Arithmetische Mittelwerte des ermittelten ZNS-Gehaltes (Merkmal 31-40) und des
Tieralters in Monaten (Merkmal 41-44) der Spezies Rind aus Tabelle 79**

Labor	Merkmalsniveau													
	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
1	0,56	1,41	0,49	0,36	0,82	0,78	0,68	0,34	0,83	0,87	2	5	4	20
2	0,60	1,63	0,54	0,45	0,95	1,00	0,68	0,42	0,75	1,02	n.b.	4	2	19
3	0,56	1,54	0,48	0,35	0,78	0,89	0,65	0,44	1,06	0,52	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
5	0,60	1,60	0,72	0,34	0,86	1,37*	1,16**	0,82**	1,90*	1,27	3	62	5	30
7	0,45	1,77	0,51	0,34	0,89	0,74	0,57	0,38	1,01	0,98	9**	31	12**	68**
8	0,63	2,24**	0,67	0,41	1,03	0,54	0,67	0,13	0,91	0,76	2	n.b.	n.b.	n.b.
10	0,55	1,47	0,37	0,31	0,73	0,77	0,45	0,25	1,32	0,60	1	21	2	20
11	0,55	1,47	0,37	0,31	0,73	0,77	0,45	0,25	1,32	0,60	1	21	2	20
14a	0,54	1,55	0,47	0,38	0,79	0,83	0,66	0,43	1,16	0,75	4*	53	4	28
14b	0,61	1,56	0,52	0,45	0,89	0,99	0,69	0,31	1,21	0,75	2	28	2	24
17	0,47	1,78 ^E	0,36	0,18	0,68	0,53	0,52	0,31	1,11	0,81	n.b.	n.b.	2	18
18	0,51	1,35	0,44	0,33	0,74	0,85	0,55	0,36	1,34	0,96	1	47	2	36
21	0,58	1,52	0,52	0,34	0,85	0,90	0,60	0,47	1,10	0,82	2	25	3	26

** als statistischer Ausreißer betrachtet (Grubbs-Test, 99% statistische Sicherheit)

* als Fastausreißer betrachtet (Grubbs-Test, 95% statistische Sicherheit)

E - Einzelmessung

n.b. - nicht bestimmt

**Tabelle 84: Wiederholstandardabweichungen des Verhältnisses V1 (C24:1 ω 9 / C24:1 ω 7) aus
Tabelle 76**

Labor	Merkmalsniveau									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0,73	1,05	0,93	4,97	0,50	0,18	3,68	0,21	4,31	0,25
2	8,79	18,10	3,29	28,87	7,52	0,76	36,92	1,21	A	3,00
3	1,77	0,37	0,62	7,36	0,60	0,11	2,52	0,00	A	0,20
5	14,24	32,58	7,68	38,85	15,62	2,73	47,96	3,70	29,12	6,63
7	0,24	0,34	0,06	0,16	0,09	0,07	0,30	0,24	A	0,10
8	3,30	8,43	2,83	25,30	2,78	1,58	10,90	2,15	9,35	2,96
10	0,27	0,44	0,29	11,72	2,72	0,13	0,43	0,09	0,51	0,08
11	6,55	12,89	4,73	13,20	2,29	0,61	63,58	0,86	44,08	4,09
14a	0,34	0,17	0,49	A	4,08	0,19	0,47	0,00	18,05	0,16
14b	3,69	8,27	4,97	A	10,11	0,07	66,45	A	58,14	2,58
17	2,88	1,52	1,26	4,13	2,00	1,46	7,60	1,72	3,15	1,15
18	A	0,99	0,03	2,85	0,88	1,05	A	1,27	0,55	0,91
21	0,25	0,16	0,23	0,02	0,35	0,10	0,37	0,24	0,40	0,17

A - Ausreisser; E - Einzelmesswert; n.b. - nicht bestimmt

Tabelle 85: Wiederholstandardabweichungen des Verhältnisses V2 (C24:1 ω 9-OH / C24:1 ω 7-OH) aus Tabelle 77

Labor	Merkmalsniveau									
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	0,33	A	5,30	0,42	0,55	0,00	A	0,05	0,55	1,31
2	0,43	3,83E+03	3,85	0,06	0,12	0,07	2,20	0,22	0,26	1,00
3	0,04	3,76	0,10	0,51	0,12	0,09	2,33	0,23	1,20	0,80
5	0,05	1,63	0,27	1,94	0,01	0,23	0,39	0,02	1,05	0,89
7	0,05	A	0,07	0,76	0,12	0,02	A	0,05	0,35	0,06
8	0,14	A	1,04	5,53	0,35	0,04	1,28	0,04	0,46	1,00
10	0,13	0,47	0,12	2,01	0,06	0,00	2,51	0,10	0,41	0,38
11	0,50	46,91	0,84	1,90	0,76	0,06	0,78	0,00	3,67	3,02
14a	0,03	3,92	0,59	0,05	0,20	0,00	0,18	0,04	0,25	0,46
14b	0,61	1,61E+07	0,60	7,32	0,33	0,15	5,66E+06	0,21	0,46	0,08
17	0,08	31112,70	0,10	0,47	0,40	0,44	1,49E+06	0,02	2,78	1,05
18	0,69	1,60E+07	2,55	8,18	0,99	0,23	7,15E+06	0,15	7,47	5,28
21	0,02	0,54	0,03	0,04	0,05	0,05	1,39	0,01	0,04	0,45

A - Ausreisser; E - Einzelmesswert; n.b. - nicht bestimmt

Tabelle 86: Wiederholstandardabweichungen des Verhältnisses V3 (C24:1 ω 9-OH / C25:0-OH) aus Tabelle 78

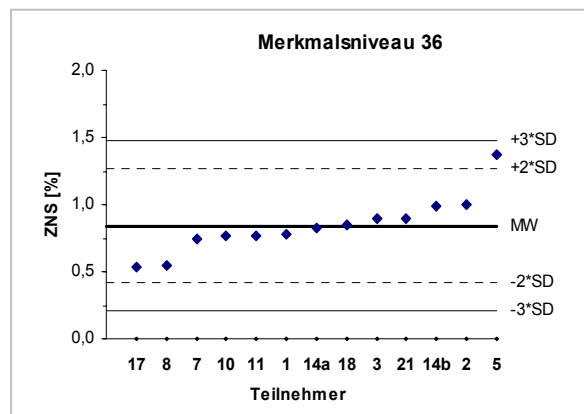
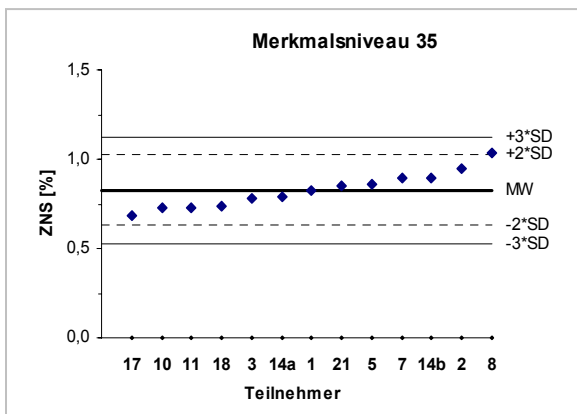
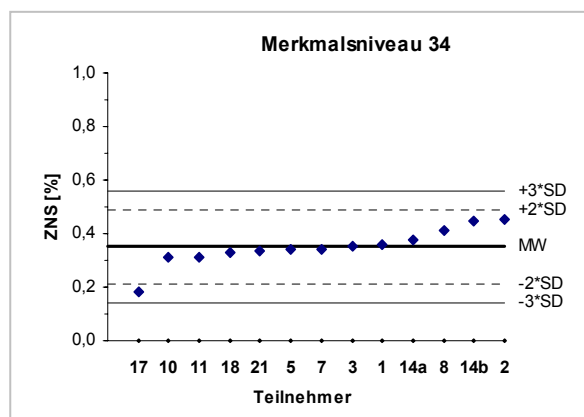
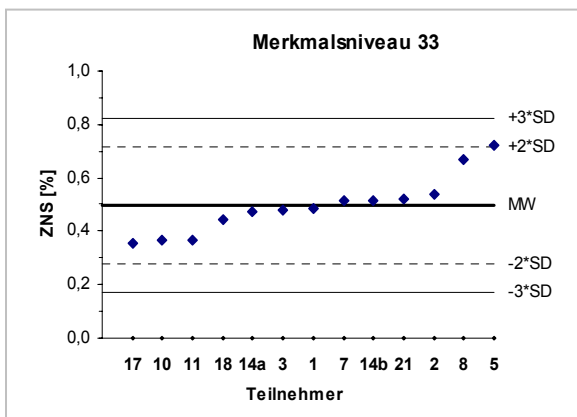
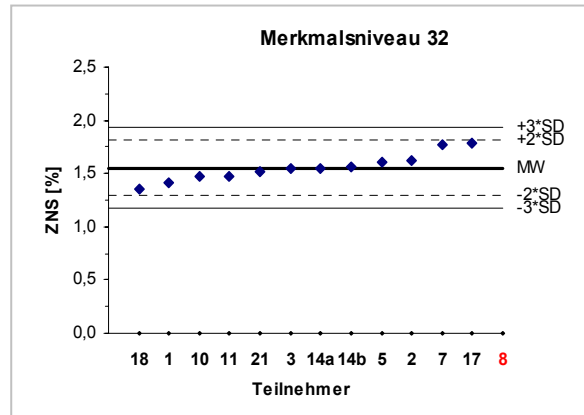
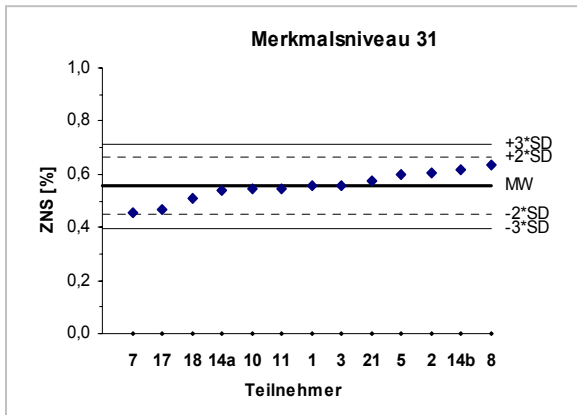
Labor	Merkmalsniveau									
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
1	0,28	0,15	6,92	0,01	0,16	0,68	0,05	A	0,00	3,01
2	1,08	0,72	3,75	0,31	1,97	1,55	1,01	5,85E+03	3,15	1,69
3	0,11	0,03	1,46	0,08	1,02	0,11	0,08	31,77	0,79	2,06
5	2,04	0,91	6,93	0,43	1,67	1,68	0,98	34,78	3,98	2,82
7	0,42	0,00	0,38	0,05	0,07	0,01	0,06	0,63	0,03	0,97
8	6,70	3,30	17,09	1,22	4,94	7,82	2,20	10,28	1,36	14,14
10	0,61	0,18	2,60	0,02	4,28	0,78	0,02	1,84	0,10	0,71
11	0,65	0,64	4,46	0,33	2,77	3,15	0,79	5,31	0,09	14,31
14a	0,22	0,15	1,67	0,19	0,37	0,55	0,09	0,61	0,03	0,11
14b	7,33	2,87	22,28	1,53	7,45	11,71	3,69	A	1,71	30,58
17	0,01	0,04	0,08	0,01	0,10	1,77	0,31	0,08	0,07	0,18
18	3,27	1,91	8,78	0,45	1,79	8,97	2,32	6,12	0,54	7,61
21	0,24	0,06	0,15	0,00	0,01	0,83	0,14	0,50	0,03	2,75

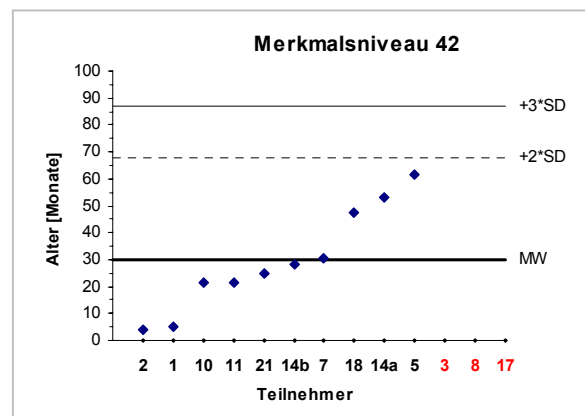
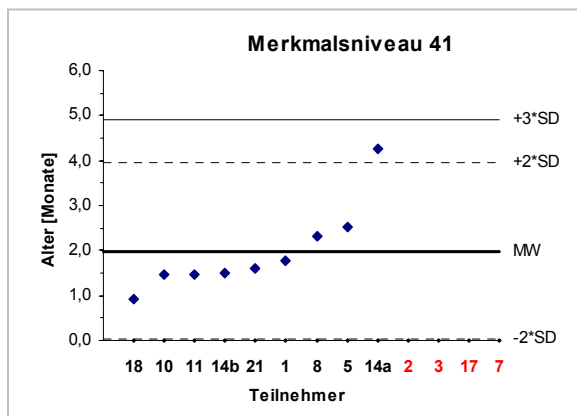
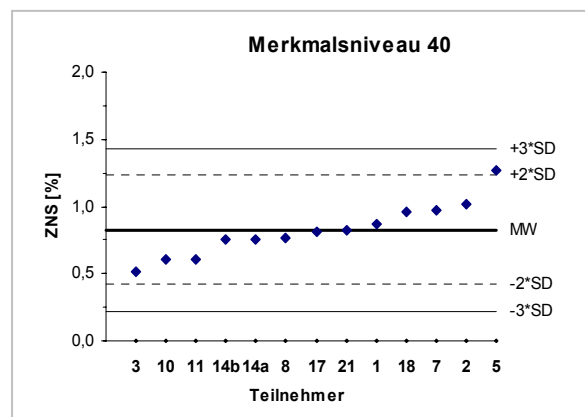
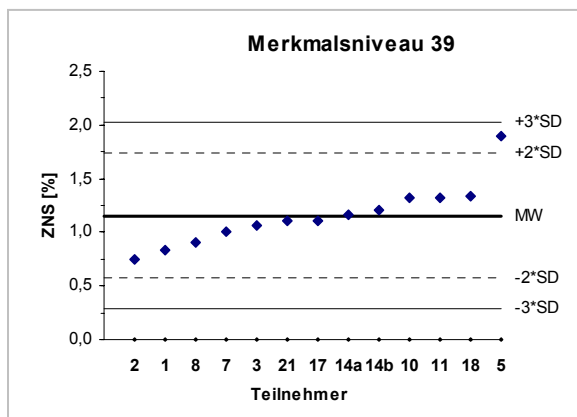
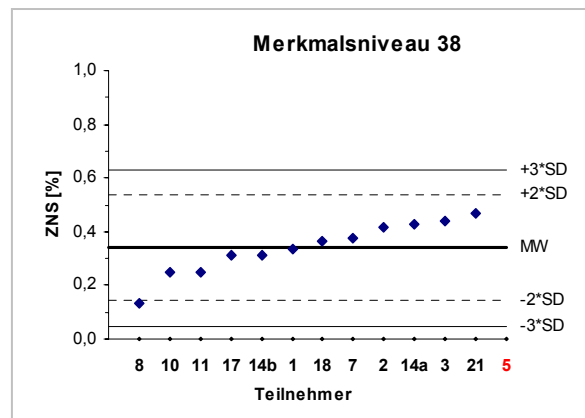
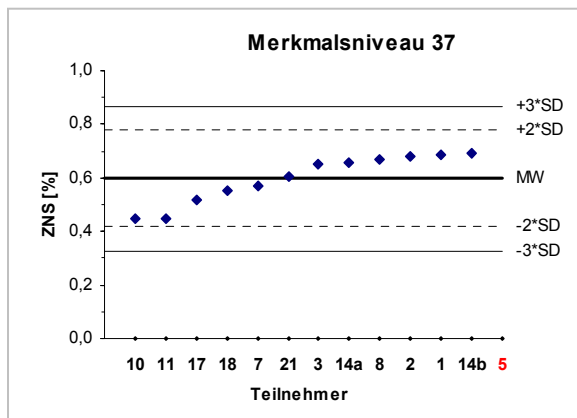
A - Ausreisser; E - Einzelmesswert; n.b. - nicht bestimmt

Tabelle 87: Wiederholstandardabweichungen des ermittelten ZNS-Gehaltes (Merkmal 31-40) und des Tialters in Monaten (Merkmal 41-44) der Spezies Rind aus Tabelle 79

Labor	Merkmalsniveau													
	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
1	0,01	0,45	0,00	0,01	0,08	0,20	0,11	0,08	0,03	0,04	2,43	3,11	E	4,13
2	0,06	0,51	0,05	0,08	0,09	0,27	0,03	0,18	0,03	0,14	n.b.	0,48	0,92	1,92
3	0,06	0,27	0,03	0,04	0,08	0,04	0,06	0,15	0,09	0,03	n.b.	3,79	0,90	8,96
5	0,01	0,04	0,06	0,05	0,18	0,05	A	A	0,25	0,52	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
7	0,02	0,06	0,05	0,01	0,05	0,01	0,01	0,01	0,03	0,36	E	E	E	E
8	0,02	A	0,02	0,02	0,03	0,25	0,32	0,30	0,52	0,33	E	n.a.	n.a.	n.a.
10	0,04	0,02	0,33	0,01	0,00	0,18	0,07	0,07	0,12	0,05	0,94	14,99	E	3,03
11	0,13	0,14	0,33	0,05	0,02	0,53	0,44	0,29	0,67	0,07	3,75	14,20	5,66	27,41
14a	0,02	0,03	0,03	0,09	0,10	0,01	0,02	0,03	0,05	0,33	0,20	0,34	1,49	1,86
14b	0,11	0,29	0,07	0,01	0,07	0,24	0,19	0,15	0,10	0,01	4,58	E	E	E
17	0,01	0,11	0,06	0,03	0,04	0,73	0,21	0,08	0,10	0,06	n.b.	n.b.	E	E
18	0,06	0,42	0,16	0,06	0,09	0,63	0,06	0,22	0,12	0,06	E	E	E	E
21	0,01	0,45	0,00	0,01	0,08	0,20	0,11	0,08	0,03	0,04	E	0,33	0,36	0,33

A - Ausreisser; E - Einzelmesswert; n.b. - nicht bestimmt





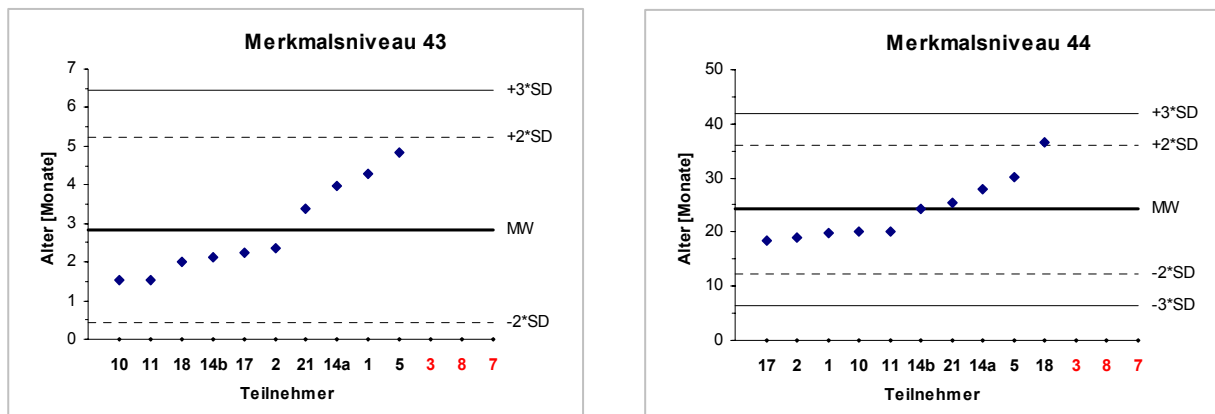


Abbildung 41: Aufsteigende Reihung der erzielten Messwerte jedes Teilnehmers für die Merkmalsniveaus 31-40 (ZNS-Gehalt) und 41-44 (Tieralter) entsprechend Tabelle 83

A.4 Nachweis von spezifiziertem Risikomaterial in Fleischerzeugnissen und Tiermehlen - Methodenbeschreibung

A.4.1 Anwendungsbereich

Das beschriebene Verfahren gibt genaue Informationen über den Analysengang zur qualitativen und quantitativen Erfassung von Geweben des zentralen Nervensystems (ZNS) in Fleischerzeugnissen auf der Grundlage von ZNS-typischen Fettsäuren als Marker. Basierend auf spezifischen Verhältnissen der detektierten ZNS-typischen Fettsäuren ist eine Charakterisierung des nachgewiesenen ZNS hinsichtlich Tierart und Tieralter möglich. Damit gestattet dieses Referenzverfahren eine Einschätzung bezüglich des Vorliegens von spezifiziertem Risikomaterial (SRM).

A.4.2 Prinzip

Das Verfahren basiert auf der Lösungsmittelextraktion der Lipide aus Fleischerzeugnissen, der Isolation komplexer Lipide aus den Gesamtlipiden durch Festphasenextraktion (SPE) mit anschließender Derivatisierung der Fettsäuren zu ihren Fettsäuremethylestern (FAME) sowie der Hydroxyfettsäuremethylester zu ihren Trimethylsilylderivaten. Die Analyse der FAME erfolgt mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS).

A.4.3 Chemikalien und Geräte

Interner Standard

- Docosansäure, deuteriert,
C22:0-2,2 D2 1 mg/ml in Chloroform Larodan, Malmö, Schweden

Standards zur Kalibration und zur Qualitätssicherung

- Brühwurststandards zur Kalibration mit ZNS vom Schwein:
 - 0 % (RV-BW 0)
 - 0,5 % (RV-BW 0,5)
 - 1 % (RV-BW 1)
 - 3 % (RV-BW 3)
- Brühwurststandard zur Qualitätssicherung mit ZNS vom Schwein:
 - 1 % (RV-BW 1)

Lösungsmittel

- 2-Methylpropanol p.a. Riedel de Haen, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- Dimethylformamid (DMF), zur Synthese Merck, Darmstadt
- Methanol p.a. Merck, Darmstadt

- *n*-Hexan p.a. Merck, Darmstadt
- andere Chemikalien**
- Methanolische Salzsäure, 3 N, p.a. Supelco, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
 - Natriumchlorid, p.a. Merck, Darmstadt
 - Natriumsulfat, wasserfrei, p.a. Merck, Darmstadt
 - Seesand, gewaschen Merck, Darmstadt
 - Trimethylsilylimidazol (TMSIM) Supelco, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Verbrauchsmaterialien

- Einmalspritzen NORM-JECT® Henke SASS Wolf, Tuttlingen
- Eppendorf Multipette® 4780 Eppendorf, Hamburg
- Eppendorf Pipette Research 100 µl Eppendorf, Hamburg
- Eppendorf Pipette Reference 2500 µl Eppendorf, Hamburg
- Mörser 12 cm Ø, mit Pistill VWR International, Darmstadt
- Ausblasvorrichtung Mini-Vap 6´ er Supelco, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- Pipette 1000 µl ROTH, Karlsruhe
- Pasteurpipetten, Glas 2 ml VWR International, Darmstadt
- Pipettenspitzen blau, 1ml VWR International, Darmstadt
- Pipettespitzen gelb, 100 µl VWR International, Darmstadt
- Pipettenspitzen weiß, 2,5 ml VWR International, Darmstadt
- Reagenzröhrchen Pyrex® 16x100 mm, Schraubdeckel mit PTFE-Einsatz VWR International, Darmstadt
- Reagenzröhrchen Duran® 12x100mm, Schraubdeckel mit PTFE-Einsatz Schott, Mainz
- Strata SI-1 Silica (55µm, 70A) 3 ml, 500 mg Silicagel Phenomenex, Aschaffenburg
- Vials 1,5 ml Agilent Technologies, Palo Alto, USA
- Wägeschälchen, Diamant VWR International, Darmstadt
- Zentrifugenröhrchen PP, 15 ml, mit Deckel VWR International, Darmstadt
- Zentrifugenröhrchen, PP, 15 ml ohne Deckel VWR International, Darmstadt

Laborgeräte

- Abzug
- Analysenwaage ST 200 (200 g ± 0,1 mg) Ströhlein, Kaarst
- Gaschromatograph 6890N Agilent Palo Alto, CA, USA
- Kapillarsäule HP-5MS, 60 m x 0,32 mm x 0,25 µm (alternativ 30 m oder 100 m Länge) Agilent Palo Alto, CA, USA
- Liner, split /splitless, 4mm ID, gepackt mit deaktivierter Glaswolle Supelco, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- Quadrupol-Massenspektrometer 5973N Agilent Palo Alto, CA, USA
- SUPELCO Visiprep™ DL Supelco, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

- | | |
|--------------------------------------|---------------------|
| • Trockenschrank, heiz- und regelbar | Binder, Tuttlingen |
| • Überkopfschüttler Reax 2 | Heidolph, Kehlheim |
| • Vortexer REAX top | Heidolph, Kehlheim |
| • Wasserbad, heiz- und regelbar | Heidolph, Kehlheim |
| • Zentrifuge Universal 32 | Hettich, Tuttlingen |

Silylierungsreagenz

1,5 ml Dimethylformamid (DMF) werden mit 0,75 ml Trimethylsilylimidazol (TMSIM) gemischt. Die Lösung muss vor jeder Silylierung neu angemischt werden. Die hergestellte Menge ist ausreichend für die Silylierung von 15 Proben.

Anmerkung: Das DMF muss unbedingt mindestens den Reinheitsgrad zur Synthese haben, da sonst darin gelöstes Wasser mit dem TMSIM reagiert.

Arbeitsschutz: Dieser Arbeitsschritt muss unter dem Abzug erfolgen!

A.4.4 Kalibration

Die Kalibration erfolgt unter Einsatz von 4 Brühwurstkalibrationsstandards mit bekanntem ZNS-Gehalt (ZNS stammt vom Schwein). Für jeden Kalibrationspunkt wird eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Einwaage an Kalibrationsstandards beträgt einheitlich 400 mg, die Aufarbeitung erfolgt analog der Probenaufarbeitung (ab Punkt 5.2).

Kalibrationsstandards

Es werden die Kalibrationsstandards nach Punkt 3.2. eingesetzt.

Einwaage für Kalibration

Die Kalibrationsstandards werden pro Bestimmung in einer Menge von 400 mg wie folgt eingewogen:

Ein Wägeschälchen wird auf der Analysenwaage auf Null tariert. Zuerst werden etwa 2 g körniges Na_2SO_4 , wasserfrei auf dem Boden des Wägeschälchens verteilt und das genaue Gewicht (x_1) notiert. Eine gleichmäßige Verteilung des Na_2SO_4 verhindert das Festkleben von Kalibrationsmaterial am Wägeschälchen. Anschließend wird ca. 1 g Kalibrationsstandard auf die Na_2SO_4 -Schicht auf 5 mg genau eingewogen. Das angezeigte Gewicht (x_2) wird ebenfalls notiert. Die Einwaage an Kalibrationsstandard (x_3) wird errechnet aus der Gewichts Differenz zwischen dem angezeigten Gewicht (x_2) und der Einwaage an Na_2SO_4 (x_1). Entsprechend der Formel $x_3 = x_2 - x_1$. Dann werden ca. 3 g pulverisiertes Na_2SO_4 , wasserfrei hinzu gegeben. Anschließend erfolgt das Auffüllen mit Seesand auf exakt das 10-fache der Einwaage ($x_4 = 10 \cdot x_3$). Die Mischung wird in einen Mörser überführt und mit dem Pistill homogenisiert. Für eine Doppelbestimmung werden jeweils 4 g (3,98 g bis 4,02 g) (x_5) des homogenen Ge-

misches (x_4) in ein Zentrifugenröhrchen, 15 ml mit Deckel, eingewogen. Die Einwaage an Kalibrationsstandard beträgt somit 400 mg.

Aufarbeitung und Analyse der Kalibrationsstandards

Die Aufarbeitung und Analyse der Kalibrationsstandards erfolgt analog der Aufarbeitung und Analyse der Proben, entsprechend 5.2ff und 6. Jede Kalibrationslösung wird dreimal analysiert (24 Messwerte).

Auswertung

Für jeden Kalibrationspunkt wird aus den beiden Messwerten der korrigierten Flächen ($Q = \text{Area}_{\text{C}_{24:0\text{-OH}}} / \text{Area}_{\text{IS}}$) der Mittelwert berechnet. Die Mittelwerte werden zur Konstruktion der Regressionsgeraden verwendet. Dabei wird Q auf der Ordinate und die ZNS-Konzentration c [%] auf der Abzisse aufgetragen. Somit ergibt sich die Regressionsgerade $Q = m \cdot c + b$, die die Grundlage für die Quantifizierung der Probenanalysen bildet.

A.4.5 Probenaufarbeitung

A.4.5.1 Probeneinwaage für eine Doppelbestimmung

Die Fleischerzeugnisse werden pro Analyse in einer Menge von 400 ± 25 mg wie folgt eingewogen:

Ein Wägeschälchen wird auf der Analysenwaage auf Null tariert. Zuerst werden etwa 2 g körniges Na_2SO_4 , wasserfrei auf dem Boden des Wägeschälchens verteilt und das genaue Gewicht notiert (x_1). Eine gleichmäßige Verteilung des Na_2SO_4 verhindert das Festkleben von Probenmaterial am Wägeschälchen. Anschließend werden 800 ± 50 mg Probenmaterial auf die Na_2SO_4 -Schicht eingewogen (x_2). Die Gewichts Differenz zwischen dem angezeigten Gewicht (x_2) und der Einwaage an Na_2SO_4 (x_1) entspricht der Probeneinwaage für die Doppelbestimmung (x_3). Dann werden ca. 3 g pulverisiertes Na_2SO_4 , wasserfrei hinzugegeben und mit Seesand auf genau die 10-fache Menge ($x_4 = 10 \cdot x_3$), also $8 \text{ g} \pm 0,5 \text{ g}$, der Probeneinwaage aufgefüllt. Die gesamte Menge wird in einen Mörser überführt und mit dem Pistill homogenisiert. Je etwa 4 g des homogenen Gemisches werden für eine Doppelbestimmung auf der Analysenwaage in ein Zentrifugenröhrchen, 15 ml mit Deckel, genau eingewogen. Die Einwaage an beprobtem Fleischerzeugnis beträgt 10% der Gemischeinwaage (ca. 4 g), also ca. 400 mg (Probeneinwaage E in der Berechnungsformel Punkt 7). Diesen Wert bitte notieren!

Anmerkung: Die eingewogenen Proben können bis zur Probenvorbereitung im dicht verschlossenen Zentrifugenröhrchen im Tiefkühlschrank (mind. -20°C) aufbewahrt werden.

A.4.5.2 Lipidextraktion

Auf das Gemisch aus Probe, Na_2SO_4 und Seesand im Zentrifugenröhrchen werden 2,5 ml Methanol pipettiert, das Zentrifugenröhrchen verschlossen und 2×10 sec zur Benetzung des Feststoffes gevortext. Anschließend erfolgt die Zugabe von 2,5 ml *n*-Hexan. Die Extraktion erfolgt durch einstündiges Schütteln der Zentrifugenröhrchen im Überkopfschüttler bei

Raumtemperatur. Anschließend werden 3 ml gesättigte NaCl-Lösung hinzugegeben, 2 x 10 sec gevortext und 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Die obere Phase (erster Rohextrakt) wird mit einer Pasteurpipette entnommen und in das Vorratsgefäß der Festphasenextraktion pipettiert. Anschließend erfolgt eine zweite Extraktion der gleichen Probe mit 3 ml *n*-Hexan, 5 min im Überkopfschüttler. Nach fünfminütigem Zentrifugieren bei 2000 rpm, wird erneut die obere Phase (zweiter Rohextrakt) mit einer Pasteurpipette entnommen und gleichfalls in das Vorratsgefäß der Festphasenextraktion dieser Probe überführt.

A.4.5.3 Festphasenextraktion (SPE, solid phase extraction)

Einrichtung der Festphasenextraktion im Supelco Visiprep™ DL

Der Ablauf der Arbeiten zur Festphasenextraktion ist in Abbildung 42 dargestellt. In den unteren Teil der Apparatur werden Zentrifugenröhrchen (PP) ohne Verschluss eingesetzt (Schritt 1) und die Apparatur mit dem Deckel verschlossen (Schritt 2). Die SPE Tubes werden auf den Deckel des Vakuum-Extraktors gesteckt (Schritt 3). Anschließend erfolgt das Befüllen der Tubes ca. 5 mm hoch mit körnigem Na₂SO₄, wasserfrei (Schritt 4). Auf jede Kartusche werden ein Adapter (Schritt 5) und eine PP-Spritze (5 ml) ohne Kolben als Vorratsgefäß (Schritt 6) aufgesetzt.

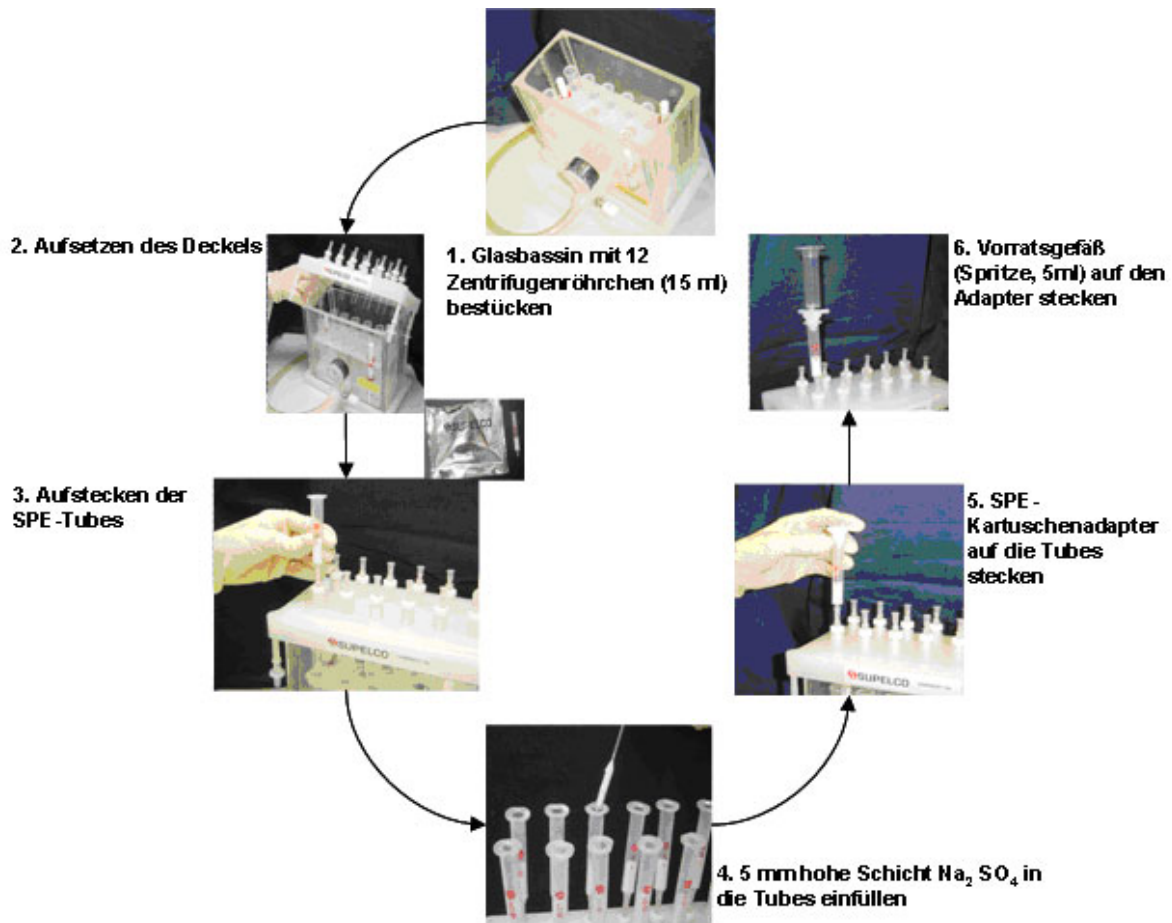


Abbildung 42: Einrichtung der Festphasenextraktion im Supelco Visiprep™ DL

Durchführung der Festphasenextraktion

Für die Konditionierung der Säulen erfolgt die Zugabe von 1 ml *n*-Hexan in jedes Tube zur Benetzung des Pulvers. Der Rohextrakt wird, wie bereits unter Kapitel 0 angegeben, in die Vorratsgefäße pipettiert und ohne Vakuum über die Kartusche laufen gelassen. Dann werden auf gleiche Art mit 5 ml *n*-Hexan/2-Methylpropanol 90:10 (v/v) die Neutrallipide und freien Fettsäuren eluiert. Durch Anlegen eines Vakuums werden anschließend eventuelle Reste der Lösungsmittel von der Säule gesaugt. Das erste Eluat wird verworfen und die PP-Röhrchen gegen verschließbare Reagenzröhrchen, 16 x 100 mm, zur Aufnahme der eluierten, komplexen Lipide ausgetauscht.

Für die Elution der komplexen Lipide werden 7 ml Methanol auf die Säulen gegeben. Dieser Schritt erfolgt gleichfalls ohne Vakuum. Anschließend werden durch das Anlegen eines Vakuums die Säulen trocken gesaugt. Das Methanol-Eluat stellt den gereinigten Extrakt der komplexen Lipide dar. Diesem Reinextrakt werden 10 µl des inneren Standards C22:0-2,2-D 2 entsprechend Punkt 3.1 zugesetzt.

Arbeitsschutz: Dieser Arbeitsschritt muss unter dem Abzug erfolgen!

A.4.5.4 Aufkonzentrierung und Methylierung

Die Reagenzröhrchen werden in ein 55 °C heißes Wasserbad gestellt. Unter Zuhilfenahme einer Abdampfvorrichtung (z.B. Mini-Vap 6'er) wird mittels Stickstoffstrom das Lösungsmittel abgedampft. Zum Abdampfrückstand gibt man 1 ml 3 N methanolischer Salzsäure und verschließt das Röhrchen mittels Schraubverschluss hermetisch. Die Gläser werden kurz gevortext.

Die Umesterung der komplex gebundenen Fettsäuren zu den Methylestern erfolgt bei 90 °C im Trockenschrank für 1,5 h. Danach werden die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt.

Arbeitsschutz: Dieser Arbeitsschritt muss unter dem Abzug mit Schutzhandschuhen und Schutzbrille erfolgen!

Hinweis: Es ist wichtig, dass die Reagenzröhrchen **dicht** verschlossen werden, da ein Verlust an methanolischer Salzsäure zu falschen Ergebnissen führt!

A.4.5.5 Gewinnung der FAME

Die Gewinnung der FAME nach der Methylierung erfolgt durch Zugabe von 2 ml *n*-Hexan sowie 2 ml gesättigter NaCl-Lösung. Die Proben werden 2 x 10 sec gevortext und 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Die untere Phase aus NaCl-Lösung, Methanol und Salzsäure wird mittels einer Pasteurpipette abgesaugt und verworfen. Um eine vollständige Entfernung der Salzsäure sicher zu stellen, werden nochmals 2 ml NaCl-Lösung hinzugegeben, 2 x 10 sec gevortext und bei 2000 rpm 5 min zentrifugiert. Die obere Phase wird danach mit einer Pasteurpipette entnommen und in ein mit ca. 100 mg körnigem Na₂SO₄, wasserfrei, gefülltes und verschließbares Reagenzglas 12x100 mm überführt. Das Lösungsmittel, *n*-Hexan, wird, wie bereits in Kapitel 0 beschrieben, in einem 55 °C heißen Wasserbad unter Stickstoffstrom abgedampft.

Arbeitsschutz: Dieser Arbeitsschritt muss unter dem Abzug erfolgen!

A.4.5.6 Silylierung

Zu jeder Probe werden 150 µl des Gemisches aus Trimethylsilylimidazol (TMSIM) und Dimethylformamid (DMF) (2:1, v/v) nach Punkt 3.7 gegeben. Das Reagenzglas wird verschlossen, kurz gevortext und 5 min bei 100°C im Trockenschrank belassen. Anschließend wird 1 ml *n*-Hexan zugegeben und die Mischung 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Der klare Überstand wird mittels Pasteurpipette in ein 1,5 ml Vial überführt. Das Vial wird verschlossen und steht für die GC-MS-Analyse bereit.

Arbeitsschutz: Dieser Arbeitsschritt muss unter dem Abzug erfolgen

Anmerkung: Bei Auftreten von Problemen, die während der einzelnen Arbeitsschritte entstanden sind, bitte in die Auswertungstabelle unter Probleme die entsprechende Codierung des Fehlerschlüssels und gegebenenfalls Erläuterungen eintragen.

A.4.6 GC-MS-Analyse

Gaschromatographische Parameter

Die gaschromatographischen Parameter richten sich nach Art und Dimension der Kapillarsäule und sind vom Anwender anzupassen.

Empfohlene Parameter:

für eine 60 m Säule HP-5MS (0,32 mm ID, 250 µm Filmdicke)

- Splitlose Injektion (Split nach 2 min: 10:1, ,15 ml/min)
- Liner: Split/splitless Liner, mit deaktivierter Glaswolle gepackt, 4mm ID
- Injektortemperatur: 280 °C
- Probenmenge: 1 µl
- Trägergas: Helium (constant flow 1,5 ml/min, $v = 32$ cm/s)
- Temperaturprogramm:
90°C (1 min) → 20°C/min bis 140°C → 12°C/min bis 260°C → 2°C/min bis 295°C (4 min) → Post Run: 305°C (5 min)

für eine 30 m Säule HP-5MS (0,25 mm ID, 250 µm Filmdicke)

- Splitlose Injektion (Split nach 2 min: 10:1, ,15 ml/min)
- Liner: Split/splitless Liner, mit deaktivierter Glaswolle gepackt, 4mm ID
- Injektortemperatur: 280 °C
- Probenmenge: 1 µl
- Trägergas: Helium (constant flow 1,1 ml/min)
- Temperaturprogramm:
90°C (0,5 min) → 39°C/min bis 140°C → 23°C/min bis 260°C → 4 °C/min bis 295°C (1 min) → Post Run: 315°C (5 min)

Massenspektrometrische Parameter

- EI-Modus, 70 eV
- SIM -Modus
- Transfer line 280 °C
- Ionenquelle 250 °C
- Quadrupol 150 °C

Die quantitative Analyse der Proben erfolgt im SIM-Modus. Empfohlen wird die Detektion der SIM-Ionen in definierten Zeitfenstern entsprechend der Retentionszeit (z.B. C22:0 D2: 18,3 - 18,7 min, siehe Tabelle 88). Unter den angegebenen. Analysebedingungen gelten folgende in Tabelle 88 angeführten Retentionszeiten als Richtwerte (bei Verwendung einer 30 m Kapillarsäule) und folgende detektierte Massen:

Tabelle 88: Retentionszeiten und SIM-Massen der Fettsäuremethylester (* IS)

Fettsäuremethylester (FAME)	Kurzbezeichnung	Retentionszeit (min)	Massenzahlen (amu)
*Docosansäure 2,2-D2	*C22:0 D2	18,5	76, 356
ω9-Tetracosensäure	C24:1ω9	21,1	348
ω7-Tetracosensäure	C24:1ω7	21,2	348
ω9-Hydroxy-Tetracosensäure	C24:1-OHω9, sil	24,2	73, 409, 453
ω7-Hydroxy-Tetracosensäure	C24:1-OHω7, sil.	24,4	73, 409, 453
2-Hydroxy-Tetracosensäure	C24:0-OH, sil.	24,6	73, 411, 455
2-Hydroxy-Pentacosensäure	C25:0-OH, sil.	26,5	425, 469

Zur Auswertung der Chromatogramme können sowohl ein automatischer Integrationsalgorithmus als auch die manuelle Integration eingesetzt werden.

Anmerkung: Bitte die Integration der Peakflächen über die Summe der angegebenen SIM-Massen durchführen und nicht über ein ausgewähltes Ion!

A.4.7 Auswertung

Berechnung des ZNS-Gehaltes

Für die Berechnung des ZNS-Gehaltes c [%] der Proben werden die Parameter m und b aus der Regressionsgeraden $Q = m \cdot c + b$ herangezogen (Punkt 4.4). Unter Einbeziehung der Probeneinwaage E (Punkt 5.1) ergibt sich folgende Beziehung für die Ermittlung des ZNS-Gehaltes der Probe:

$$c = \frac{Q \cdot \frac{E_K}{E} - b}{m}$$

Es bedeuten:

c = ZNS-Gehalt [%]

Q = Flächenverhältnis der Peaks C24:0-OH, sil. / C22:0 2,2-D2 (innerer Standard)

E_K = Einwaage der Kalibrationsstandards [g] = 0,4 g

E = Probeneinwaage [g]

b = Ordinatenabschnitt

m = Anstieg der Regressionsgeraden [1/%]

Differenzierung zwischen ZNS-positiven und –negativen Proben

Zur Unterscheidung zwischen ZNS-positiven und – negativen Proben, wird der nach 7.1 ermittelte ZNS-Gehalt der Probe herangezogen. Proben mit einem ZNS-Gehalt < 0,2% werden als ZNS-negativ eingestuft. Proben mit ZNS-Gehalten > 0,2% gelten als ZNS-positiv. Nur bei positiven Proben erfolgt die Bestimmung der Tierart und des Tialters.

Bestimmung von Tierart des detektierten ZNS

Basierend auf den Peakflächen der in Tabelle 1 angegebenen Fettsäuren erfolgt die Bestimmung der Tierart nach folgendem Schema.

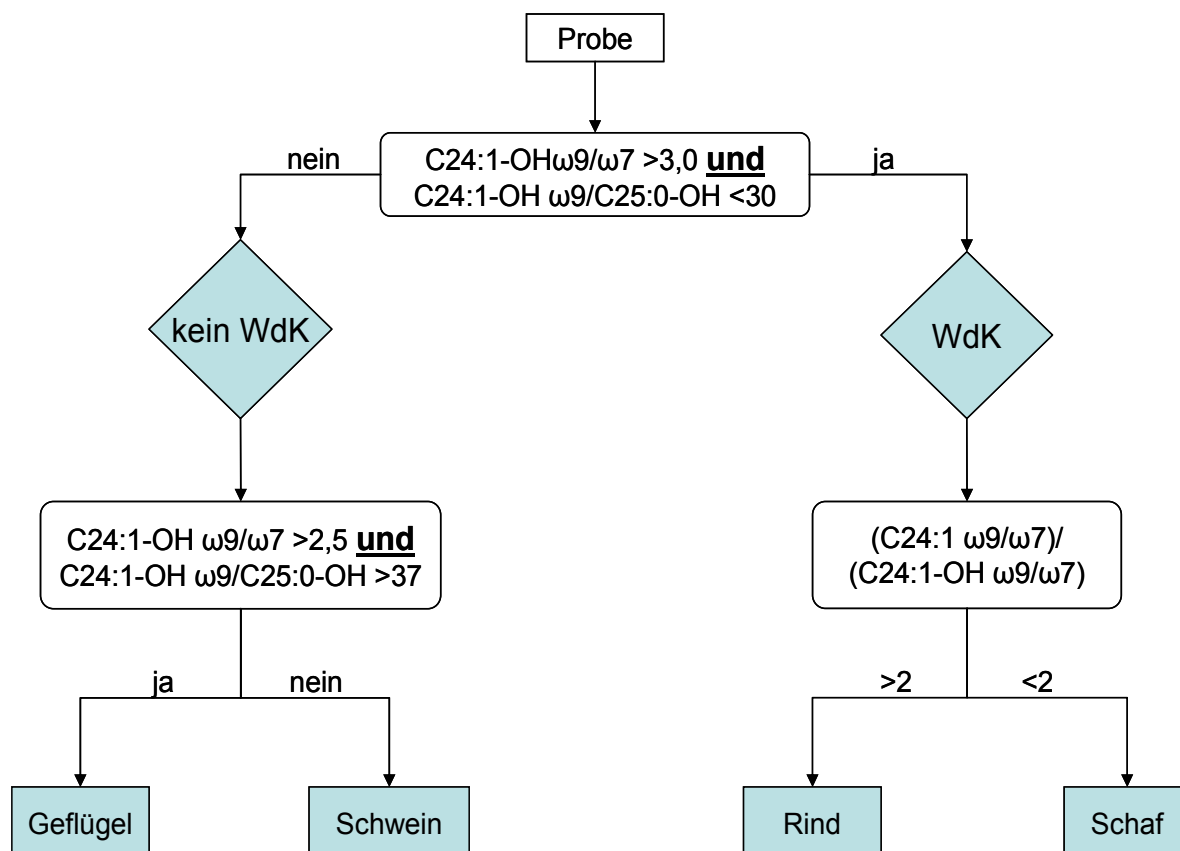


Abbildung 43: Schema zur Bestimmung der Tierart bei ZNS-positiven Proben

Die ersten beiden Verhältnisse ($C_{24}:1\text{-OH } \omega_9/\omega_7$ und $C_{24}:1\text{-OH } \omega_9/C_{25}:0\text{-OH}$) dienen zur Unterscheidung zwischen Wiederkäuern (WdK) und Nicht-Wiederkäuern. Es müssen beide Bedingungen erfüllt sein! Die weiteren angegebenen Verhältnisse ermöglichen eine Differenzierung zwischen Rind und Schaf bei den Wiederkäuern und Schwein und Geflügel bei den Nicht-Wiederkäuern.

Anmerkung: Handelt es sich eindeutig um eine ZNS-positive Probe, können aber nicht alle Fettsäuren für die Tierartbestimmung nachgewiesen werden, so sind alle Peakflächen der nicht detektierten Fettsäuren = 1 zu setzen.

Bestimmung des Tieralters bei den Tierarten Rind und Schaf

Für die Einordnung des detektierten ZNS zu den spezifizierten Risikomaterialien ist die Tieraltersbestimmung bei Rinder- und Schaf-ZNS notwendig. Für die Ermittlung des Tieralters bei Rind und Schaf wird das FAME-Verhältnis $C_{24}:1\omega_9\text{-OH} / \omega_7\text{-OH}$ genutzt.

Regressionsfunktionen zur Bestimmung des Tieralters bei Rind:

$$\text{Alter} = 7,4726 * \text{VH} - 22,607$$

Es bedeutet:

VH= Verhältniswert für $C_{24}:1\text{-OH } \omega_9/ C_{24}:1\text{-OH } \omega_7$

Bestimmung der Alterskategorien bei Schafen:**Tabelle 89: Parameter zur Bestimmung des Alters der Tierart Schaf**

Tierart und Alter (Monate)	C24:1 ω 9 / C24:1 ω 7	C24:1 ω 9-OH / C24:1 ω 7-OH
Schaf > 12 Monate	>12	>10
Lamm < 12 Monate	<12	<10

Qualitätsnachweis

Mit Hilfe von Qualitätsregelkarten des Internen Standards und des Brühwurststandards RV-BW 1 erfolgt die laufende Prozess- und Präzisionskontrolle. Die Präzision der Aufarbeitung ab Punkt 0 wird mittels des detektierten ZNS-Gehaltes des RV-BW-1 Standards, der Bestandteil jeder Sequenz ist, kontrolliert. Ein Über- bzw. ein Unterschreiten der Warngrenzen Mittelwert \pm 2fache Standardabweichung ($MW \pm 2\sigma$) kann bei einmaligen Auftreten toleriert werden. Erfolgt jedoch das Über- bzw. Unterschreiten der Eingriffsgrenze ($MW \pm 3\sigma$), so ist das Ergebnis der Messung zu verwerfen. Die Kontrolle des RV-BW 1, der bei jeder Sequenz mitläuft, dient der Überprüfung der korrekten Extraktion und SPE-Aufarbeitung. Für diesen Standard wurden beispielhaft die in Tabelle 90 stehenden Grenzwerte ermittelt.

Tabelle 90: Beispiel für Grenzwerte des ZNS-Gehaltes für die Probe RV-BW 1

FAME	Mittelwert	obere Warngrenze	untere Warn-grenze	obere Ein-griffsgrenze	untere Ein-griffsgrenze
ZNS [%]	1,01	1,17	0,84	1,25	0,75

Anmerkung: Eine Sequenz kann, abhängig von der Größe des SPE-Vakuum-Extraktors, auch weniger oder mehr Proben umfassen.

A.5 Publikationen im Berichtszeitraum

Vortrag im Rahmen des 4. Leipziger Tierärztekongresses 17.-19.01.2008

Schwerpunkt Lebensmittelsicherheit

Krex & Lücker

TSE: Nachweis von spezifizierten Risikomaterialien

Christian Krex*, Ernst Lücker

Institut für Lebensmittelhygiene, Universität Leipzig

Einleitung

Zum vorbeugenden Schutz des Verbrauchers vor der Exposition mit transmissiblen spongiformen Enzephalopathien (TSE) wurden im Verlauf der BSE-Krise auf nationaler und gemeinschaftsrechtlicher Ebene vorbeugende Maßnahmen etabliert. Nach wie vor kommt dabei der Entfernung und unschädlichen Beseitigung von so genannten spezifizierten Risikomaterialien (SRM) die primäre Bedeutung zu.

In Anbetracht weltweit zurückgehender BSE-Inzidenzen (etwa 35 % Rückgang pro Jahr) von 2.215 Fällen im Jahr 2001 bis auf 329 Fälle im Jahr 2006 werden von verschiedenen Seiten zunehmend Konzepte für eine Reduzierung der vorbeugenden Maßnahmen gefordert. Insbesondere kommt dies in der so genannten „TSE-Roadmap“ der Europäischen Kommission (European Commission, 2005) zum Ausdruck.

Problematik der Risikobewertung

Bis heute bleibt, anhand der vorhandenen wissenschaftlichen Daten, die Frage nach der Inkubationszeit von vCJD unbeantwortet. Bisherige Einschätzungen der Inkubationszeit gehen von einer Resorption des pathogenen Prionproteins über den Darm aus. Jedoch besteht die Möglichkeit, dass sich bei einer Aufnahme des Erregers über die Mundschleimhaut mit anschließender nervaler Ausbreitung diese erheblich verkürzen könnte (BfR, 2006; EFSA, 2005). Epidemiologische Daten über Kuru zeigen lange Inkubationszeiten bis zu 56 Jahren (Collinge et al., 2006). Dazu kommt eine Prävalenz von 237 vCJD-positiven pro Millionen Einwohner (Hilton et al., 2005) die im Rahmen der „Appendixstudie“ im Vereinigten Königreich ermittelt wurde. Diese Erkenntnisse lassen die Prognosen, hinsichtlich der Entwicklung von vCJD, auf Basis der bisherigen Daten nicht sicher erscheinen.

Dies geht auch aus Gutachten der EFSA und des BfR hervor, die eine derzeit unzureichende bis widersprüchliche Datenlage bemängeln und daher das Risiko für den Verbraucher zum jetzigen Zeitpunkt nicht sicher kalkulierbar ansehen (BfR, 2006; EFSA, 2005).

Auch in Zukunft muss damit gerechnet werden, dass die BSE nicht vollständig aus den Rinderbeständen zurückgedrängt werden kann. Hierauf deutet die Theorie, das sporadisch in Rindern vorkommende Prionen bei der Passage durch einen intermediären Wirt wie das Schaf mutieren könnten und somit für das Rind infektiös werden (Béringue et al. 2007).

Das globale BSE Risiko (GBR) gibt die Wahrscheinlichkeit für das Vorkommen eines oder mehrerer klinisch oder subklinisch mit dem BSE Erreger infizierter Rinder in einem Land/Region an. Das Vorkommen infizierter Rinder ist in Kategorie:

- I. hoch unwahrscheinlich
- II. unwahrscheinlich, aber nicht ausgeschlossen
- III. wahrscheinlich, aber entweder nicht bestätigt oder in geringen Zahlen bestätigt
- IV. bei einer größeren Anzahl bestätigt.

Häufig ist das globale BSE Risiko für viele Länder/Regionen noch nicht erfasst (Abb. 1).

Somit ist, für den Import von Fleischerzeugnissen aus Ländern mit unbekanntem BSE Status, das Risiko für den Verbraucher nicht vorhersagbar.

*krex@vetmed.uni-leipzig.de

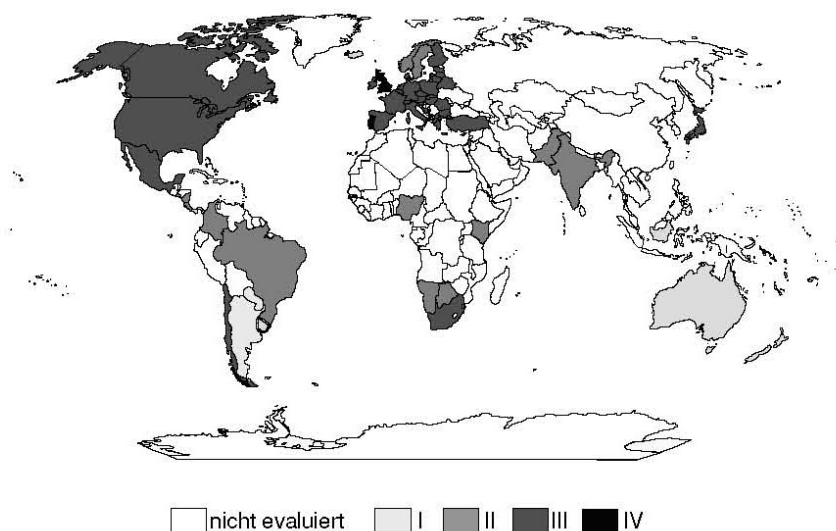


Abb. 1: Das globale BSE Risiko 2000-2006 (EFSA, 2006).

Überwachung der SRM-Freiheit der Lebensmittelkette

Sollten bestehende Maßnahmen zur Eindämmung von BSE aus finanziellen Gründen reduziert werden, so besteht die Gefahr eines mangelhaften Verbraucherschutzes. Um die Verbrauchersicherheit gewährleisten zu können, müssen alternative Maßnahmen in Erwägung gezogen werden.

An bestimmten Punkten (z.B. Herstellung von Fleischerzeugnissen) kann eine Endproduktkontrolle auf Einhaltung des SRM-Verbotes und zum Ausschluss von Kontaminationen mit SRM, die bestehenden Maßnahmen sinnvoll ergänzen, bzw. ersetzen.

Zum Nachweis von ZNS in Lebensmitteln stehen bereits unterschiedliche analytische Methoden zur Verfügung (Tab. 1). Diese können als kostengünstige stichprobenartige Endproduktkontrolle die flächendeckenden Maßnahmen sinnvoll ergänzen bzw. im Falle der Reduktion bestehender Maßnahmen auch als Alternative fungieren.

Tabelle 1: Methoden zum Nachweis von Geweben des ZNS in Fleischerzeugnissen

	Marker	Quelle/Referenz
AC	Cholesterin ^{1,2}	Lücker und Bülte (1997, 1999)
	Fettsäuren ³	Niederer and Bollhalder (2001); Biedermann et al. (2002); Lücker et al. (2002)
IC	NSE; Myelin Proteolipid Protein, GFAP, MBP, Syntaxin ⁴	Lücker et al. (1998); Sandmeier et al. (2006); Overhoff et al. (2002)
	GFAP; PrP ^{Sc} , Syntaxin 1B ⁵	Schmidt et al. (1999); Lücker et al. (2002), Love et al. (2000)
	NSE und GFAP, S100 β , MBP, NF ⁶	Wenisch et al. (1999); Love et al. (2000); Tersteeg et al. (2002); Aupperle et al. (2002)
MB	GFAP- und MBP - mRNA ⁷	Abdulmawjood et al. (2005); Lange et al. (2002); Seyboldt et al. (2003)

AC analytische Chemie, IC Immunchemie, MB Molekularbiologie

1 enzymatisch-photometrische Untersuchung, 2 GC, 3 GC/MS, 4 Western Blot, 5 ELISA, 6 Immunhistologie, 7 RT-PCR

Von den Verfahren, die im Bereich der analytischen Chemie (AC) entwickelt wurden ist besonders der Nachweis von ZNS-typischen Fettsäuren mittels GC/MS aufgrund des Nachweises von Tierart und Alter als Referenzverfahren geeignet. Der Nachweis von Cholesterin eignet sich aufgrund fehlender Spezifität des Markers lediglich für ein schnelles Screening. Beide Marker sind jedoch, im Gegensatz zu denen anderer Methoden ausgesprochen/hinreichend hitzestabil.

Auf dem Gebiet der Immunchemie (IC) sind in der Literatur viele Marker/Methoden zum Nachweis von Geweben des ZNS beschrieben. Einige, wie z.B. der Nachweis von GFAP mittels ELISA sind wie die molekularbiologischen Techniken (MB) für den Einsatz in der Routine sehr gut geeignet und werden auf internationaler Ebene validiert. Mit dem GFAP-ELISA steht eine nach der Amtlichen Sammlung für Untersuchungsverfahren (§64 LMBG) amtlich anerkannte, standardisierte Methode zur Verfügung. Nur der GC/MS-analytische Ansatz vermag Spezies und Alter des detektierten ZNS im Sinne der Legaldefinition SRM zu klassifizieren.

Fazit

Die wissenschaftliche Neubewertung des BSE Expositionsrisikos für den Verbraucher ist nach wie vor nicht abgeschlossen. Bisherige Daten beruhen zurzeit überwiegend noch auf den Beobachtungen aus der Überwachung. Diese zeigen weltweit eine deutliche Abnahme der BSE/vCJD Fälle.

Der weltweite Rückgang der BSE führt in der Politik und der Öffentlichkeit zu einer verstärkten Diskussion über die Reduktion bestehender präventiver Maßnahmen. Dabei wird jedoch oft ignoriert, dass viele Fragen bis heute unbeantwortet sind. Dies betrifft vor allem Fragen zur Übertragbarkeit oder der Inkubationszeit.

Um weiterhin, bei einer Reduktion der bestehenden Maßnahmen den Schutz der Verbraucher sicherstellen zu können, sollte die Freiheit der Nahrungskette von SRM als wichtigste Maßnahme aufrechterhalten bleiben. Die stichpunktartige Kontrolle auf ZNS-Freiheit von Fleischerzeugnissen und Futtermitteln bietet eine wirksame und kostengünstige Ergänzung und gegebenenfalls Alternative zu bestehenden Maßnahmen. Es eignen sich vor allem Methoden der Immunchemie für ein kostengünstiges Screening von Fleischerzeugnissen. Als Referenzverfahren bietet sich die GC/MS aufgrund der Nachweisbarkeit von Tierart und Alter des verwendeten ZNS, aber auch der erhöhten thermischen Stabilität der Fettsäuren an.

Literatur

(Die Literaturliste kann beim Autor angefordert werden: krex@vetmed.uni-leipzig.de)

Vortrag im Rahmen der 61. Arbeitstagung des ALTS 09.-11.06.2008

Ringtest zum Nachweis von ZNS in Fleischerzeugnissen

Christian Krex, Franziska Hartmann, Maria Griebßbach, Wolfgang Biedermann, Uwe Truyen,
Ernst Lücker

Zentrum für Veterinary Public Health
Institut für Lebensmittelhygiene
Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Einleitung

Im Zuge der BSE-Krise wurden europaweit Maßnahmen ergriffen, um den Kreislauf des Erregers in der Nahrungskette zu durchbrechen. Die wichtigsten Maßnahmen in diesem Zusammenhang sind gemäß der Verordnung EG 999/2001 das Verarbeitungsverbot in Lebensmitteln und die unschädliche Beseitigung von spezifizierten Risikomaterialien (SRM). Zur Überwachung des bestehenden Verarbeitungsverbotes von SRM sind Verfahren erforderlich, die detektierte zentralnervöse Gewebe (ZNS) der verwendeten Tierspezies und einem rechtlich vorgegebenen Tieralter (zur Zeit 12 Monate) zuordnen können. Bislang war kein Verfahren verfügbar, welches über den ZNS-Nachweis hinaus auch die Identifizierung der Tierart und eine Kategorisierung des Tieralters ermöglicht. Hinzu kommt, dass die verfügbaren ZNS-Nachweisverfahren eine erhebliche Instabilität der Marker gegenüber thermischen Einflüssen aufweisen.

Im vorangegangenen Forschungsvorhaben (BMELV, 03HS011) wurde ein Referenzverfahren für den Nachweis von Geweben des zentralen Nervensystems (ZNS) in Fleischerzeugnissen und Tiermehlen entwickelt. Basis hierfür sind die Erfassung und Quantifizierung bestimmter Fettsäuren der komplexen Lipide des ZNS mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS). Im Rahmen dieses Forschungsprojektes wurde das Verfahren bereits erfolgreich anhand von zwei Blindversuchen laborintern getestet. Durch die Bestimmung ZNS-typischer Fettsäuren mit Hilfe der GC/MS ist die Einordnung des detektierten ZNS zum SRM anhand der Legaldefinition nun erstmals grundsätzlich möglich. Darüber hinaus weisen die Fettsäuren eine hohe Resistenz gegenüber Hitzeeinflüssen auf. Mit einer Reduktion der ZNS-Nachweisbarkeit, wie sie bei anderen ZNS-Nachweisverfahren zu erwarten sind, muss nicht gerechnet werden.

Zurzeit wird am Institut für Lebensmittelhygiene der Universität Leipzig ein Ringtest zur Validierung dieses GC-MS-Verfahrens durchgeführt (BMELV Forschungsvorhaben 05HS050).

Die Arbeiten an diesem Ringtest haben im Januar 2007 begonnen. Der Ablauf wurde in drei Teile gegliedert:

- Vorversuch: zur Einarbeitung der Laboratorien in das Verfahren
- erster Ringtest: qualitative Bestimmung von Spezies und Tieralter des ZNS zur Kategorisierung als SRM, bzw. non-SRM
- zweiter Ringtest: quantitative Erfassung des ZNS

Dieser Beitrag stellt die Ergebnisse des ersten Ringtests vor, dessen Ziel unter anderem die Differenzierung zwischen SRM positiven und SRM negativen Proben war.

Material und Methoden

Als Basis für diesen Ringtest wurde das im Rahmen des BMELV-Forschungsvorhabens (03HS011) entwickelte GC/MS Verfahren zum Nachweis von ZNS verwendet. Das Verfahren wurde im Laufe des Vorversuchs hinsichtlich Zeitaufwand und Chemikalieneinsatz der Analyse optimiert (Hartmann et al., 2007). Des Weiteren wurde die Ergebnisauswertung überarbeitet. Sämtliche Neuerungen wurden den Teilnehmern in Form einer für den Ringtest überarbeiteten Standardarbeitsanweisung (SOP) zur Verfügung gestellt.

Das Verfahren folgt einer komplexen Analysenstrategie, bestehend aus der:

1. Quantifizierung des ZNS-Gehalts mittels der Cerebronsäure.
2. Identifizierung von ZNS-positiven Proben Grenzwert für das Verfahren (Cut-off) 0,2% ZNS.
3. Identifizierung der Tierart basierend auf einem Auswertungsschema.
4. Schätzung des Alters: Bei Rindern erfolgt dies anhand einer Regressionsfunktion für das Isomerenverhältnis der Hydroxytetracosensäure. Bei Schafen erfolgt die Einteilung in zwei Altersklassen, Schaf <12 Monate und Schaf >12 Monate, mittels zuvor festgelegten Grenzwerten für die Tetracosensäure- und die Hydroxytetracosensäureverhältnisse.

Zur Teilnahme am ersten Ringtest erklärten sich 19 nationale Untersuchungseinrichtungen und private Laboratorien bereit.

Für die Analyse wurden zehn Brühwurstproben mit Beimengungen von ZNS verschiedener Tierarten (Rind, Schaf, Schwein und Geflügel) und verschiedener Altersstufen versandt (Tabelle 1). Alle zehn Proben mussten als Doppelbestimmung von jedem Teilnehmer analysiert werden.

Tabelle 1: Übersicht über Tierart, Tialter und ZNS-Konzentration der untersuchten Proben des ersten Ringtest.

Tierart	Tialter (Monate)	ZNS-Konzentration
Rind	5 und 35	3 %
Schaf	5 und 27	3 %
Schwein	6 und 27	3 %
Geflügel	1 und 14	2 %
Kontrollproben (2x)		0 %

Ergebnisse und Diskussion

Nach Abschluss des ersten Ringtests erfolgte die Rückmeldung der Ergebnisse von 15 Teilnehmern an den Versuchsausrichter. Ein Teilnehmer wurde aus der Auswertung eliminiert, da dieser den vorgegebenen Analysenplan nicht eingehalten hatte.

Der erste Auswertungsschritt umfasst die Differenzierung zwischen ZNS-negativen und ZNS-positiven Proben. Von den Teilnehmern wurden 112 ZNS-positiv Proben (98,25%) richtig identifiziert. Bei zwei Proben erfolgte eine falsch-negative Beurteilung (1,75%). Die ZNS-negativen Kontrollproben (n=26) wurden von allen Teilnehmern richtig erkannt. (Tabelle 2).

Tabelle 2: Kontingenztabelle zur Differenzierung ZNS-positiver und ZNS-negativer Proben (n=14 Laboratorien).

		ZNS-Positiv	ZNS-Negativ	Gesamt
ZNS-Positiv	Anzahl	112	2	114
	% von ZNS-Positiv	98,25 %	1,75%	100 %
ZNS-Negativ	Anzahl	0	26	26
	% von ZNS-Negativ	0 %	100 %	100 %
Gesamt	Anzahl	112	28	140
	% von Gesamt	80 %	20 %	100 %

Im zweiten Auswertungsschritt erfolgte anhand des in der SOP vorgegebenen Auswertungsschemas die Identifikation der Tierart. Im Ergebnis wurden die Proben zu den für die SRM-Zuordnung relevanten Tierarten Rind und Schaf zu 92,86% bzw. 82,14% richtig nachgewiesen (Tabelle 3).

Tabelle 3: Kontingenztabelle zur Differenzierung der Tierart (n=14 Laboratorien).

		Negativ	Geflügel	Rind	Schwein	Schaf	Gesamt
Negativ	Anzahl	26	1	1	0	0	28
	% von Negativ	92,86%	3,57%	3,57%	0%	0%	100%
Geflügel	Anzahl	0	22	1	0	5	28
	% von Geflügel	0%	78,57%	3,57%	0%	17,86%	100%
Rind	Anzahl	0	0	26	0	2	28
	% von Rind	0%	0%	92,86%	0%	7,14%	100%
Schwein	Anzahl	0	11	1	15	1	28
	% von Schwein	0%	39,29%	3,57%	53,57%	3,57%	100%
Schaf	Anzahl	0	2	3	0	23	28
	% von Schaf	0%	7,14%	10,71%	0%	82,14%	100%
Gesamt	Anzahl	26	36	32	15	31	140
	% von Gesamt	18,57%	25,71%	22,86%	10,71%	22,14%	100%

Im letzten Auswertungsschritt erfolgt die Bestimmung des Tialters bei den Tierarten Rind und Schaf. In den mit ZNS von 5 Monate alten Rindern versetzten Proben wurde aus den Ergebnissen aller Teilnehmer ein mittleres Tialter von $4,2 \pm 2,4$ Monaten berechnet.

Für die Proben mit zugesetztem ZNS von 35 Monate alten Rindern wurde ein mittleres Tialter von $29,8 \pm 13,9$ Monaten ermittelt. Bei der Tierart Schaf wurden 12 (n=14) Proben der Altersklasse <12 Monate und 11 (n=14) Proben der Altersklasse >12 Monate eingeordnet. Bei sämtlichen Proben, bei denen die Tierart Schaf korrekt identifiziert wurde, konnte die richtige Altersklasse nachgewiesen werden.

Die Zusammenfassung der einzelnen Parameter erlaubte letztendlich die Unterscheidung zwischen SRM-positiven und SRM-negativen (non-SRM) Proben. Hier konnte trotz teilweise geringer Wiederfindungsraten bei den Tierarten Schwein (53,57%) und Geflügel (78,57%) ein sehr zufriedenstellendes Ergebnis erzielt werden. Die Zuordnung von SRM-positiven Proben erfolgte mit einer Genauigkeit von 96,43% (n=27). Lediglich eine Probe (3,57%) führte zu einem falsch-negativen Ergebnis. Die Erkennung von SRM-negativen Proben erfolgte mit einer noch höheren Genauigkeit von 98,21% (n=110) (Tabelle 4).

Tabelle 4: Kontingenztabelle zur Diferenzierung von SRM und non-SRM (n=14 Laboratorien)

		SRM	non-SRM	Gesamt
SRM	Anzahl	27	1	28
	% von SRM	96,43%	3,57%	100%
non-SRM	Anzahl	2	110	112
	% von non-SRM	1,79%	98,21%	100%
Gesamt	Anzahl	29	111	140
	% von Gesamt	20,71%	79,29%	100%

Somit konnte bereits im ersten Teil des Ringtests ein sehr zufriedenstellendes Ergebnis für den fettsäurebasierten Nachweis von ZNS in Fleischerzeugnissen und dessen Kategorisierung hinsichtlich des SRM-Status erzielt werden.

Die Förderung des Vorhabens erfolgte aus Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) über die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE).

Literatur

Hartmann F, Griebbach M, Baumann D, Biedermann W, Krex C, Truyen U, Lücker E. GIT Spezial (2007) 27: 15-17.

13th International Symposium of Separation Sciences (ISSS), High Tatras, Slovakia, 27.-29.6.2007

DETECTION AND CLASSIFICATION OF CENTRAL NERVOUS SYSTEM TISSUE BY GASCHROMATOGRAPHY-MASS-SPECTROMETRY (GC/MS)



Maria Griefbach¹, Franziska Hartmann¹, Nicole Massag², Daniela Baumann³, Christian Krex¹, Wolfgang Biedermann³, Uwe Truyen³, Ernst Lückert¹
¹Institute of Food Hygiene, Department of Veterinary Medicine, University of Leipzig,
²Novartis Pharma AG
³Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, University of Leipzig

Introduction

In order to protect the consumer from pathogens of transmissible spongiform encephalopathies (TSEs), the EC directive 999/2001 specifies several tissues from certain species and age-categories as risk materials (SRM). SRM have to be strictly removed from the food chain, separately collected, and destroyed. Tissues from the central nervous system (CNS) of cattle, sheep and goat, older than 12 months, are the most relevant part of SRM with regard to TSE.

In order to monitor and control the specifications as given by the current legislation, several methods for the detection of CNS in meat products have been developed. These methods are based on the detection of CNS-specific proteins (e.g. glial fibrillary acid protein-GFAP) or special RNA-fragments of these proteins (e.g. GFAP, Myelin basic protein).

Unfortunately, they do not fully meet the legal specifications of SRM because of missing species and/or age-specificity. The species-detection can be achieved by reversed transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). But a method for the determination of the age is not existing. In addition, the traceability of most CNS-markers is reduced by heating.

In contrast to the markers mentioned above, the fatty acids analysed with GC/MS are not affected by heat treatment (Lücker 2006). Furthermore, the calculation of fatty acid ratios allows the determination of species and age-category of the detected CNS. Thus, the legal specifications of SRM can be met by this alternative analytical approach.

In this presentation an introduction into the analytical strategy for the detection of CNS-based SRM by GC/MS is given. In addition the feasibility of the differentiation of species and age of CNS by using certain fatty acid ratios are demonstrated.

Experimental

Material

- Brain samples: 43 cattle, 19 pig and 38 sheep
- Brains were homogenised by blender (Moulinette, Moulinex®) and stored at -20 °C until further analysis.

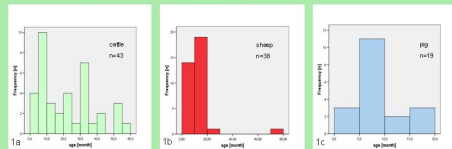


Figure 1 a-c: overview of frequencies of tested brain-samples of cattle, sheep and pig

Sample Preparation:

- The analysis of brain samples was carried out according to the method previously published by Lückert et al. (2004) (Figure 2).

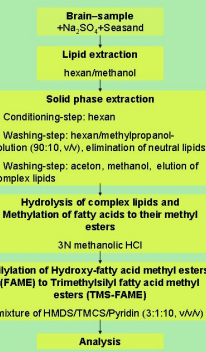


Figure 2: Scheme of sample preparation

GC/MS:

- GC/MS 6890 N/5973 (Agilent Technologies)
- Column: VF23 ms 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm (Varian Technologies)
- Splitless- Injektion, volume: 1 µl, temperature: 280 °C, glass wool packed liner
- Carrier gas: helium, flow rate: 0,8 ml/min
- Temperature settings: start at 100 °C (0 min) → 20 °C/min → 190 °C (0 min) → 3 °C/min → 220 °C (0 min), post run-phase: 250 °C (5 min)



Figure 3: GC/MS Agilent 6890 N.

Target analytes:

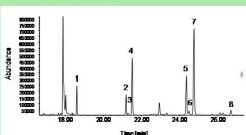


Figure 4: Chromatogram of cattle-CNS. SIM.

Peak	Analyte	Abbreviation
1	*Docosanoic acid D2	*C22:0 2,2 D2
2	Lignocenic acid	C24:0
3	ω 9 -Tetracosenoic acid	C24:1 ω 9
4	ω 7 -Tetracosenoic acid	C24:1 ω 7
5	ω 9 -Oxotetracosenoic acid	C24:1-OH ω 9
6	ω 7 -Oxotetracosenoic acid	C24:1-OH ω 7
7	Cerebronic acid	C24:0-OH
8	Hydroxypentacosanoic acid	C25:0-OH

Table 1: Target analytes ("Internal Standard")

- The statistical evaluation was performed by SPSS 14.0 for Windows. For the multivariate analyse SIMCA-P 11.0 was used, especially.

Results

Detection of CNS

- The most suitable marker for the detection of CNS is cerebronic acid (C24:0-OH).

Species differentiation

- Differentiation of species cattle, sheep and pig base on the fatty acid ratios: C24:1ω9/ω7, C24:1-OHω9/ω7 and (C24:1ω9/ω7)/(C24:1-OHω9/ω7) (Table 2).
- The discriminant analysis of the three ratios shows an excellent distinction between the three species (Figure 6).

Species	FAME-ratio		
	C24:1ω9/ω7	C24:1-OHω9/ω7	(C24:1ω9/ω7)/(C24:1-OHω9/ω7)
cattle	8,7 - 35,0	3,1 - 9,7	2,5 - 4,3
sheep	6,2 - 18,9	5,1 - 18,1	0,9 - 1,5
pig	3,2 - 4,6	4,2 - 2,0	2,3 - 2,7

Table 2: Ratios of the detected fatty acids C24:1ω9/ω7, C24:1-OHω9/ω7 and (C24:1ω9/ω7)/(C24:1-OHω9/ω7) for the differentiation of the species cattle, sheep and pig.

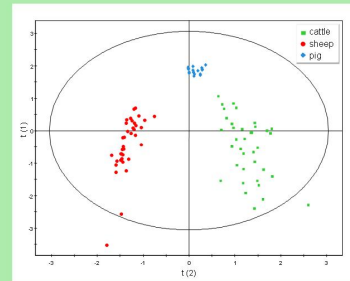


Figure 6: Discriminant analysis of the fatty acid ratios C24:1ω9/ω7, C24:1-OHω9/ω7 and (C24:1ω9/ω7)/(C24:1-OHω9/ω7) for the differentiation of CNS from cattle, sheep and pig (the ellipse represents the 95 % confidence interval).

Age determination

- The age determination is carried out for the CNS of cattle.

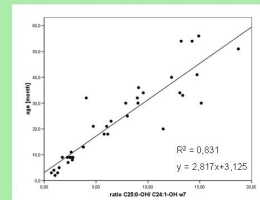


Figure 7: Regression analysis of the age dependent ratio C25:0-OH/C24:1-OHω7

- The fatty acid ratio C25:0-OH/C24:1-OHω7 allows the prediction of the animal age at the date of slaughter (Figure 7).
- The correlation between age and this ratio is very high ($r = 0,935$; Spearman-Rho).
- The mean difference between predicted and observed age is 4,76 month (sd=5,31).

Conclusion

Following the detection of CNS in meat products, for the categorisation of CNS as SRM or non-SRM (in a legal sense) two questions have to be answered:

- To which kind of species belongs this detected CNS?
- How old was the animal?

At the moment, the presented method is the only CNS-detection-method which allows in principle to answer both questions. The differentiation between the common slaughter species (cattle, sheep and pig) can be facilitated by using the ratios C24:1ω9/ω7, C24:1-OH ω9/ω7 and (C24:1ω9/ω7)/(C24:1-OHω9/ω7).

The prediction of the animal-age of CNS of cattle is carried out by regression analysis of fatty acid ratio of C25:0-OH and C24:1-OHω7. The correlation between this ratio and the animal-age for cattle is very high ($r = 0,935$; Spearman-Rho). The age determination for the CNS of goat and sheep is one aim of our further studies.

References

- Bäckhaus K, Erichson B, Pirlik W, Welber R, Multivariate Analysemethoden, Springer Verlag, 11. Auflage
- Jänssen and Laatz, Statistische Datenanalyse mit SPSS für Windows, Springer Verlag, 5. Auflage, 439-444
- Lückert et al. (2004) Analytical and Bioanalytical Chemistry, 380 865-870
- Lückert E. (2006) Zur Spezifität und Stabilität des ZNS-Nachweises: Proceedings, 46. DVG Arbeitstagung des Arbeitsgebietes „Lebensmittelhygiene“, Garmisch-Partenkirchen, 276-281
- N. N. (2001) Regulation (EC) No 999/2001 Of the European Parliament and of the Council of 22 May 2001 laying down rules for the prevention, control and eradication of certain transmissible spongiform encephalopathies, Official Journal of the European Communities No. L 147/11 of 31.5.2001

This poster was printed by URZ Leipzig.

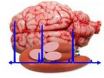
Prion 2007, Edinburgh, Schottland 26.-28.09.2007

Species and age differentiation of CNS for the detection of SRM



Maria Griebach, Franziska Hartmann, Daniela Baumann*, C. Krex, W. Biedermann, U. Truyen*, E. Lückner

Institute of Food Hygiene, Department of Veterinary Medicine, University of Leipzig, 04103 Leipzig, Germany
 *Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, Department of Veterinary Medicine, University of Leipzig, 04103 Leipzig, Germany



1 Introduction

Specified risk materials (SRM) are tissues with high amount of infectivity for transmissible spongiform encephalopathies (TSE). It has to be thoroughly removed from the food chain, separately collected, and destroyed [1]. The most relevant part of SRM are tissues of the central nervous system (CNS: brain and spinal cord) of cattle, sheep and goat, older than 12 months. In order to monitor and control the adherence to these legal specifications, several methods for the detection of CNS in meat products have been developed. Currently, the combined determination of species and age of the detected CNS is exclusively possible by profiling CNS-typical fatty acids.

2 Objectives

Species determination: Differentiation between species cattle, sheep and pig was successfully performed in CNS samples by partial least square-discriminant analysis (PLS-DA) [2].

Age determination: The age estimation in CNS samples was performed by age categories [3,4]. Previously, we published a new approach in age estimation: the application of regression analysis.

Aims of this study:

- Addition of CNS from poultry to our database
- Differentiation between the CNS of the four species (cattle, sheep, pig and poultry)
- Improving the precision of the age estimation

3 Methods

CNS Samples:

- Cattle (n=38)
- Sheep (n=38)
- Pig (n=40)
- Poultry (n=16)

Analytical principal [4,5]:

```

Sample
  ↓
Lipid extraction
  ↓
Solid phase extraction (SPE)
  ↓
Hydrolyzation and esterification of fatty acids
  ↓
Silylation of fatty acid methyl ester (FAME)
  ↓
GC-MS analysis
                    
```

Peak	Analyte	Abbreviation
1	Docosanoic acid D2	*C22:0 2,2 D2
2	15Z-Tetracosenoic acid	C24:1(n-9)
3	17Z-Tetracosenoic acid	C24:1(n-7)
4	Lignoceric acid	C26:0
5	15Z-Oxytetracosenoic acid	2OH-C24:1(n-9)
6	17Z-Oxytetracosenoic acid	2OH-C24:1(n-7)
7	Cerebronic acid	2OH-C24:0
8	2-Hydroxytetracosanoic acid	2OH-C25:0
9	2-Hydroxytetracosanoic acid	2OH-C26:0

Figure 1: SIM chromatogram of the analysed fatty acid methyl esters in pig CNS

Statistics:

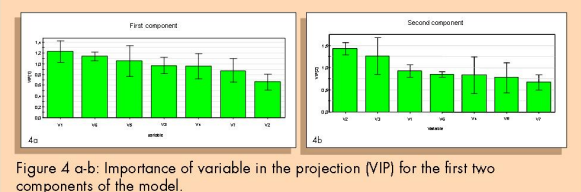
- Multivariate Data Analysis: SIMCA-P 11.0
- Regression analysis: SPSS 14.0

4 Results and Discussion

- Samples were classified in four groups (poultry, cattle, sheep and pig) (figure 3)

Figure 3: Scatter plot of the first two components in the PLS-DA for the CNS-species differentiation.

- Fitting of the model (R^2y)=0,904
- Predictive ability of the model (Q^2_{corr})=0,894
- 93,2% of samples could be classified correctly



Age estimation of cattle CNS

- Regression analysis based on a novel fatty acid ratio 2OH-C24:0/2OH-C25:0 (Fig.5)
- 38 samples (age range: 2 - 56 months)
- Correlation between age and ratio coefficient of correlation $[r] = -0,930$, Spearman-Rho

Figure 5: Regression analysis for the age estimation in cattle CNS.

- Cattle <12 month: predicted age ± 3,5 month (95% confidence interval)
- Mean difference between predicted and observed age was 3,7 month (sd=5,1)
- Mean difference between predicted and observed age of the old ratio 2OH-C25:0:OH/2OH-C24:1 (n=7) is 4,8 month (sd=5,3) [2]
- Improved age estimation in pure CNS for 1 month
- Cerebronic acid present in other tissues → direct Application of ratio for age estimation in sausages questionable

4 Results and Discussion

Species determination

Table 2: Overview of the applied ratios as variables (V1-V7) in PLS-DA.

V1	C24:1(n-9)/C24:1(n-7)
V2	2OH-C24:1(n-9)/2OH-C24:1(n-7)
V3	V1/V2
V4	2OH-C25:0-OH/2OH-C24:1(n-7)
V5	2OH-C24:1(n-9)/2OH-C25:0-OH
V6	2OH-C24:0/2OH-C25:0
V7	C24:0/(2OH-C24:0+2OH-C25:0+2OH-C26:0)

- Old model insufficient for differentiation between cattle, sheep, pig and poultry
- 7 selected fatty acid ratios (table 2) for PLS-DA

5 Conclusion

We included successfully the CNS of poultry in our PLS-DA model for species differentiation. We are now able to differentiate between the CNS of cattle, sheep, pig and poultry based on seven fatty acid ratios. Furthermore, we could improve the age estimation in pure CNS by a novel fatty acid ratio.

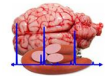
Acknowledgement: The authors would like to thank Lia Kieker and Dana Rüter for the sample preparation. This study was supported by the German Ministry for Alimentation, Agriculture and Consumer Protection (05HS050).

Schweine
 [1] H. J. Regula [Ed.], 1997/2000: Die Europäische Parliament und der Council 1722/May 2001: Importing down sides for the prevention, control and eradication of certain transmissible spongiform encephalopathies. Official Journal of the European Communities, No. 2001 L147/17
 [2] Griebach M., Hartmann, F., Baumann, D., Baumann, C., Krex, W., Biedermann, U., Truyen, E., Lückner, DCA, 2007 in press
 [3] Kieker, L., W. Biedermann, S. Isenhardt, U. Truyen, A. Havel, Arch. Anim. Resour. Chem., 2003, 20(2004):666
 [4] Griebach, M., Hartmann, F., Baumann, D., Krex, W., Biedermann, U., Truyen, E., Lückner, D., 2007: Methodologie der statistischen Analyse. Jahrbuch Hygiene 27 (2007):209-205, Österreichische Akademie der Wissenschaften, p. 396-403
 [5] Biedermann, U., Isenhardt, S., Kieker, L., Truyen, U., Havel, A. Havel, Arch. Anim. Resour. Chem., 2005, 20(2006):1021

Photograph by: C. Krex

Prion 2007, Konferenz, Edinburgh, Schottland 26.-28.09.2007

Validation of a Reference Method for the Detection of CNS in Meat Products by GC/MS

 UNIVERSITÄT LEIPZIG
VME
 Veterinärmedizinische Fakultät


C. Krex, Maria Griebach, Franziska Hartmann, Daniela Baumann*, W. Biedermann, U. Truyen*, E. Lücker

Institute of Food Hygiene, Department of Veterinary Medicine, University of Leipzig, 04103 Leipzig, Germany

*Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, Department of Veterinary Medicine, University of Leipzig, 04103 Leipzig, Germany

1 Introduction

In the course of the mad cow crisis several preventive measures were established in certain member states, and finally, Europe wide. These measures aimed at a reduction of a potential human exposure risk with the agent of transmissible spongiform encephalopathies (TSE). Currently, the removal and harmless disposal of so called specified risk materials (SRM, EC-Reg. 999/2001) is given the highest priority.

The legal definition of SRM according to the European directive 999/2001 defines tissues of concern, in particular the central nervous system (CNS: brain and spinal cord) from cattle, sheep and goats over 12 months of age.

2 Objectives

At the Institute for Food Hygiene a procedure was developed, which is capable of detecting CNS, its species and age in meat products. This is based on the determination of fatty acid patterns as markers for CNS and its age and species by means of GC/MS. Currently, this method is being evaluated in a ring test organised by the Institute of Food Hygiene, University of Leipzig, funded by the BMELV.

The present contribution summarises preliminary results from the validation of this procedure from the current ring testing.

3 Methods

The ring test is carried out - as supervised by the Institute for Food Hygiene in Leipzig in three stages (Figure 1):

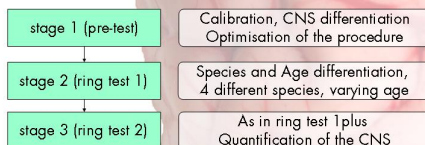


Fig 1: Ring test, sequence and goals

Overall, 20 laboratories from private and official institutions in Germany applied for taking part in this ring test. The first stage of this ring test was carried out in the period of April to June 2007.

Each participant received three emulsion type sausage containing 1% and 3% CNS from cattle, 3% CNS from pig and one sample without addition of CNS. The tasks were to differentiate between CNS positive and negative samples and to determine the species of the added CNS.

The method as previously described by Lücker et al. (2004) and Biedermann et al. (2004) was used. In brief, the method is based on solvent extraction of lipids from meat products, the isolation of complex lipids from the total amount of lipids by solid phase extraction (SPE), followed by a derivatisation of the fatty acids to their fatty acid methyl esters (FAME) and a silylation of the hydroxy-FAME to their trimethylsilyl-derivates. The analysis of the FAME was achieved by GC/MS.

The target analytes are listed in Table 1; an example of a routine GC/MS chromatogram of FAMES from cattle is presented in Figure 2.



Tab. 1: Retention times and SIM-Masses of the FAME (* Internal Standard)

fatty acid methyl esters (FAME)	short-description	retention-time (min)	atomic mass unit (amu)
*docosanoic acid 2,2-D2	*C22:0 D2	9.39	76, 356
ω 9-tetracosanoic acid	C24:1 ω 9	10.70	348
ω 7-tetracosanoic acid	C24:1 ω 7	10.76	348
ω 9-hydroxy-tetracosanoic acid	C24:1-OH ω 9, sil.	12.30	73, 409, 453
ω 7-hydroxy-tetracosanoic acid	C24:1-OH ω 7, sil.	12.37	73, 409, 453
2-hydroxy-tetracosanoic acid	C24:0-OH, sil.	12.49	73, 411, 455

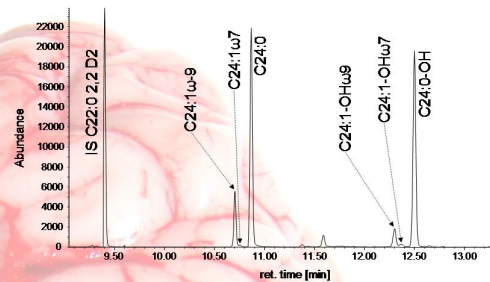


Fig. 2: Chromatogram of the relevant FAME in a cattle brain (Column HP-5ms 30m x 0,25mm x 0,25µm)

4 Results

The first stage (pre-test) of the ring test, including 15 out of the registered participants, started in April 2007 and was completed in June 2007. Two participants cancelled in the beginning of the first stage and three participants failed to present results.

All the remaining participants could correctly distinguish CNS positive from CNS negative samples. Neither false positive nor false negative results were presented by any participant.

The quantification of the CNS was carried out based on the amount of cerebronic acid (C24:0-OH). The measurements resulted in a relative standard deviation about 5% between the participants (samples containing 1% CNS) and from 12 to 15% (samples containing 3% CNS) (Table 2).

Tab. 2: Results of the quantification (C24:0-OH)

CNS [%]	Standard species	C24:0-OH [mg/kg]		
		\bar{x} (n=15)	SD	RSD
0	-	0.69	0.21	23.76
1	cattle	28.79	1.12	4.68
3	cattle	99.00	13.27	12.35
3	pig	100.78	16.47	15.54

The species determination was successfully carried out with few exceptions (Table 3). The incorrect results were primarily based on one participant who had analytical problems that could be identified and solved during the evaluation of the results.

Tab. 3: Age determination of the CNS (all participants, n=15)

default		result		
species	amount	species	amount	percent
pig	19	pig	18	94.7
		no data	1*	5.3
cattle	38	cattle	26	68.4
		sheep	3	7.9
		cattle or sheep	4	10.5
		pig	1*	2.6
		no data	3*+1	10.5
		sum cattle/sheep**	33	86.8

* data were provided by a single laboratory

** for the classification as SRM the animal species could be summarised

Based on the results of the first stage (pre-test) we obtained, the current procedure for the detection of CNS in meat products could be further optimised. This included both, the method (silylation, methylation) and the characterisation of the analyte (CNS-species and -age).

5 Conclusions

The pre-test, as the first stage of the ring test was successfully completed. The experiences that we have gained so far influence the next part of the ring test directly. First results of the second stage of the ring test are expected at the end of 2007. The completion of the ring test is scheduled for summer 2008.

References

Biedermann W., E. Lücker, J. Pörschmann, S. Lachhab, U. Truyen, A. Hensel (2004): Anal Bioanal Chem 379, 1031-1038

Lücker E., W. Biedermann, S. Lachhab, U. Truyen, A. Hensel (2004): Anal Bioanal Chem 380, 866-870

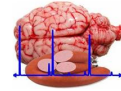
This project is funded by the Federal Ministry of Food, Agriculture and Consumer Protection (BMELV; 05HS050)

27th International Symposium on Chromatography, Münster, September 21 – 25, 2008

Optimization and validation of a GC/MS method for the detection of central nervous system tissue in meat-products



Maria Griaßbach, F. Hartmann, C. Krex, W. Biedermann, U. Truyen, E. Lücker
Center for Veterinary Public Health, University of Leipzig



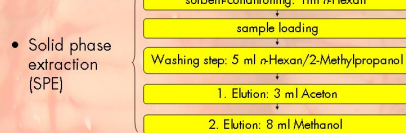
Introduction

Background:

- The disposal of central nervous system tissue (CNS) as part of the specified risk material (SRM) is one of the main targets to avoid the contamination of the human food chain with the BSE pathogen.
- Prior to validation of a GC/MS method by a national round robin test, the basic procedure (Lücker et al. 2005) had been optimized in order to increase the acceptance of the method.
- Here we present the results of the optimization, which was focused on reduction of cost and time for the sample preparation as well as maintenance of the GC/MS-system.

Material: CNS-samples from pig

Sample preparation (duration 2d) according to Lücker et al. (2005):



• Solid phase extraction (SPE)

• Derivatization:

- Transesterification of fatty acids: 3M methanolic HCl 16h/60 °C
- Silylation of hydroxy fatty acids: Pyridin/HMDS/TMCS (10:3:1 v/v/v)

GC/MS-method:

- Capillary column: HP-5ms 30 m x 0,32 mm x 0,25 µm (Agilent Techn., Palo Alto, CA, USA)

- Temperature program : 90 °C (1') → 20 °C/min → 140 °C (0') → 12 °C/min → 260 °C (0') → 2 °C/min → 295 °C (4') post run: 305 °C (5')

- Target analytes: (n-9) tetracosanoic acid (C24:1 (n-9))
2-hydroxytetracosanoic acid (2OH-C24:0)
2-hydroxytetracosanoic acid (2OH-C24:1 (n-7))

Optimization: Solid phase extraction

- Silicagel sorbent bed volume ca. 600 µl /500mg (Hennion und Pichon 1994)
- Eluotropic strength E^0 : Methanol (0,73) > Acetone (0,43) (Thurman and Mills, 1998)
- Fractionation of complex lipids is not crucial

1. Is the application of Acetone for the elution of all complex lipids negligible?
2. What is the optimal elution volume for this procedure?

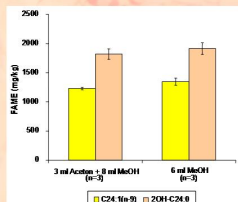


Fig. 1. Comparison of the yields of eicosanoic and nervonic acid obtained by elution with 3 ml Acetone + 8 ml Methanol (MeOH) and 6 ml Methanol.

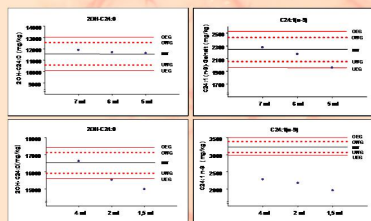


Fig. 2. Quality control charts of 2OH-C24:0 and C24:1(n-9) concentration obtained by elution volumes of 1,5-, 7 ml Methanol.

Results:

- Addition of a drying step → Acetone is not necessary ($p=0,065-0,153$; paired t-Test)
- Optimal Elution volume: 6 ml methanol

Optimization: Silylation

- Problem: extensive maintenance of the GC/MS-system due to the accumulation of Ammonium chloride

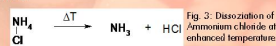


Fig. 3. Dissociation of Ammonium chloride at enhanced temperature.

- Alternative silylation reagents:
 - N,O-Bis(trimethylsilyl)-acetamid (BSA)
 - N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoro-acetamid (BSTFA)
 - Trimethylsilylimidazole (TMSIM)

1. Is it possible to replace HMDS/TMCS by one of the alternative silylation reagents?
2. If so, which conditions are needed?

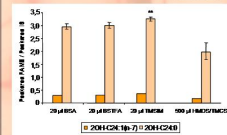


Fig. 4. Comparison of the yield of the silylation reagents BSA, BSTFA, TMSIM and HMDS/TMCS.

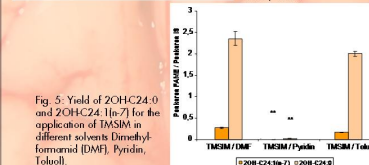


Fig. 5. Yield of 2OH-C24:0 and 2OH-C24:1(n-7) for the application of TMSIM in different solvents Dimethylformamid (DMF), Pyridin, Toluol).

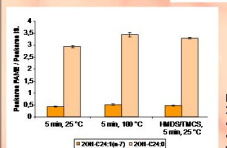


Fig. 6. Yield of 2OH-C24:0 and 2OH-C24:1(n-7) for the application of TMSIM for 5 min at 25 °C and 100 °C in comparison to HMDS/TMCS.

Results:

- alternative Silylation:
 - 50 µl TMSIM in 100 µl DMF
 - 5 min/100 °C

Optimization: Methanolysis

- Problem: Transesterification takes 16 h (60 °C) → time consuming sample preparation → acceptance in laboratories is low
- Transesterification is an temperature dependent reaction

1. Is it possible to reduce the time for transesterification, if the temperature was elevated?

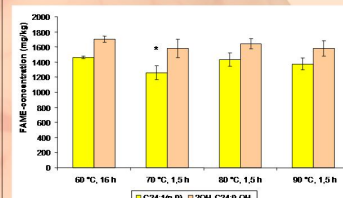


Fig. 7. Influence of methanolysis temperature (70-90 °C) on the quantification of 2OH-C24:0 and C24:1(n-9).

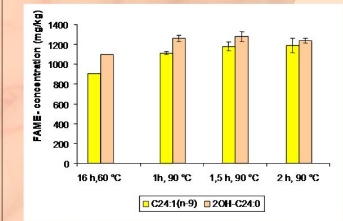


Fig. 8. Influence of time (12h) on the yield of 2OH-C24:0 and C24:1(n-9) after methanolysis at 90 °C.

Results:

- Complete Transesterification: 3 M methanolic HCl; 1,5 h /90 °C → Time for sample preparation was reduced by 14,5 h

Discussion and Conclusion

Previous method:

- Sample preparation was time-consuming (2 days)
- Laborious GC/MS maintenance

Current method:

- Sample preparation time is reduced by 15h → duration now 1 day
- Personnel costs were reduced
- Results are faster obtained now

- Frequency and cost for maintenance of GC/MS-system is reduced
- Reduced amount of chemicals → lower cost for waste disposal, benefit to personal health and environment

Literatur: Hennion, Pichon, [1994] Environ.Sci. Tech.28, Lücker E. et al. [2003] Forschungsbericht des BMELV-Projekt Nr. 03HS011 ; Niederer M., Bollhölzer R. [2001] Mitt. Lebensm. Hyg. [92] 133-144; Thurman E.M., Mills M.S. Solid phase extraction: principles and practice. Wiley. (1998)

This work was part of a study funded by the Federal Ministry of Food, Agriculture and Consumer Protection, Germany [BMELV-project-No. 05HS050].

Photograph by: C. Krex



Available online at www.sciencedirect.com

Journal of Chromatography A, 1179 (2008) 69–73

**JOURNAL OF
CHROMATOGRAPHY A**

www.elsevier.com/locate/chroma

Species and age determination of central nervous system tissue by fatty acid patterns

Maria Griebbach^{a,*}, Franziska Hartmann^a, Nicole Massag^b, Daniela Baumann^c,
Christian Krcx^a, Wolfgang Biedermann^a, Uwe Truycn^c, Ernst Lückcr^a

^a Institute of Food Hygiene, University of Leipzig, An den Tierkliniken 1, 04103 Leipzig, Germany^b Novartis Pharma AG, Forum 1, Novartis Campus, 4056 Basel, Switzerland^c Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, University of Leipzig, An den Tierkliniken 1, 04103 Leipzig, Germany

Available online 22 October 2007

Abstract

The banning of specified risk materials (SRMs) from food chain is one of the most important measures to protect the consumer against any exposition with the agent of transmissible spongiform encephalopathies (TSEs). In order to control the SRM-ban, suitable methods for the detection of SRMs have to be developed. In this study homogenized samples of central nervous system (CNS) tissue from cattle ($n = 38$), sheep ($n = 38$) and pig ($n = 40$) were analyzed by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). The analysis was focused on the identification of fatty acid ratios for species differentiation and age estimation. We found a novel fatty acid ratio (C24:1(n-9)/(n-7))/(2OH–C24:1(n-9)/(n-7)) for species differentiation. For the first time, we used multivariate analysis for species differentiation, based on fatty acid ratios. It showed an excellent predictive ability (Q_{cum}^2) $Q_{cum}^2 = 0.842$. For age estimation in cattle CNS we discovered a novel fatty acid ratio 2OH–C25:0/2OH–C24:1(n-7). The ratio is strongly correlated with age (coefficient of correlation (r) = 0.935, Spearman-Rho). The corresponding regression analysis which allows the prediction of age by this ratio was acceptable (coefficient of determination (R^2) = 0.831).

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: GC–MS; CNS detection; SRM; Species differentiation; Age determination; PLS-DA

1. Introduction

In order to protect the consumer from pathogens of transmissible spongiform encephalopathies (TSEs), the European Union regulation 999/2001 [1] defines several tissues as specified risk materials (SRMs). SRMs have to be thoroughly removed from the food chain, separately collected, and destroyed. The most relevant SRMs are tissues of the central nervous system (CNS: brain and spinal cord) of cattle, sheep and goat, older than 12 months [2].

In order to monitor and control the adherence to these legal specifications, several methods for the detection of CNS in meat products have been developed, in particular [2–8].

These methods are based on the detection of CNS specific proteins (e.g. glial fibrillary acid protein—GFAP) or certain ribonucleic acid (RNA) fragments encoding these proteins [6–8]. Methods for the immunochemical CNS detection are fast,

low in cost, and partially validated. They are currently applied in official food control. However, the CNS detection by specific protein or RNA markers does not meet the legal specifications of SRM. They often do not facilitate the identification of the animal species (cattle, sheep, goats) and/or the age of the CNS (older than 12 months). In addition, the traceability of protein CNS markers, and possibly most of the RNA CNS markers, can be considerably reduced by heating during usual food technological processing.

In 2001, Niederer and Bollhalder developed a method for detecting CNS in food stuff [9]. It was based on detecting specific fatty acids in CNS. These fatty acids (FAs) are components of complex lipids (i.e. cerebrosides). In contrast to the markers mentioned above, the complex lipids are not affected by heat treatment. In following studies, the sample preparation and the gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) detection of the FA were optimized [10,11]. In addition, it was shown that cerebronic acid (2OH–C24:0) was the most suitable marker for the detection of CNS in meat products [11]. Originally it was suggested to apply the FA ratio of the cis-/trans-isomers of nervonic acid (C24:1(n-9)) for the differentiation between

* Corresponding author. Tel.: +49 341 97 38 163; fax: +49 341 97 38 249.
E-mail address: griesbach@vmf.uni-leipzig.de (M. Griebbach).

the species (cattle, sheep and pig) [9]. In continuative studies, we discovered that the formerly denoted *trans*-nervonic acid is in reality the 17Z-tetracosenoic acid (C24:1(n-7)) [12]. Nevertheless, we could confirm the suitability of the ratio C24:1(n-9)/C24:1(n-7) (ratio A) for species differentiation [11]. In order to optimize the species discrimination, we used an additional FA ratio 2OH-C24:1(n-9)/2OH-C24:1(n-7) (ratio B) [13]. Still the separation between sheep and cattle remains difficult, therefore novel discriminators are required. Moreover, we showed that the age category of the detected CNS can be estimated by using both ratios (A and B).

In this study we present an additional fatty acid ratio for the species differentiation of processed CNS in meat products. Furthermore, we demonstrate a new approach for the species differentiation of CNS, based on partial least square-discriminant analysis (PLS-DA) of the fatty acid ratios. Moreover, a novel fatty acid ratio for the determination of age in cattle CNS is introduced.

2. Experimental

2.1. Samples

Brain was sampled from cattle ($n=38$), sheep ($n=38$) and pig ($n=40$) at a local abattoir. All animals were healthy at time of slaughter and declared fit for human consumption. This was determined by an official veterinary ante and post mortem inspection. Cattle older than 24 months and sheep older than 18 months were tested BSE-negative without exception. All samples were homogenized by use of a blender (Moulinette, Groupe SEB, Ecully Cedex, France) and stored at -20°C until analysis. The age of cattle was taken from the animal identity card ("Rinderpass"), with the exception of two cases. In these cases, we estimated the animal age (both >54 months) by dental profile according to Nickel et al. [14], only. Fig. 1a–c show the age distribution of sampled animals. The age of cattle ranged from 2 to 56 months. The animal age for pig ranged from 1 to 40 months and for sheep from 1 to 76 months.

2.2. Sample preparation

The sample preparation and analysis of brain samples was carried out according to the analytical procedure published pre-

viously [11]. For lipid extraction *n*-hexane (pure), methanol (for analysis) and saturated sodium chloride solution were used. All chemicals for extraction were purchased from Merck, Darmstadt, Germany.

Solid-phase extraction (SPE) was used for separating complex and neutral lipids. The conditioning step was performed by adding *n*-hexane to the Supelclean LC-Si SPE-tube, 3 ml (Supelco, Bellefonte, PA, USA) prior to the introduction of the samples to the column. The washing step was performed with a mixture of *n*-hexane/isopropanol (pure) (90:10, v/v) in order to eliminate the neutral lipids. Afterwards the SPE tubes were dried. The complex lipids were eluted by acetone (pure, Riedel-de Haen, Buchs, Switzerland) and methanol (for analysis). All solutions passed passively through the tube. We added $10\ \mu\text{g}$ of the internal standard [$2,2\text{-}^2\text{H}_2$]docosanoic acid (C22:0-d₂) (Larodan, Malmö, Schweden) to the eluate.

Hydrolysis of the complex lipids and the preparation of fatty acid methyl esters (FAMES) were obtained by addition of 3 M methanolic hydrochloric acid (Supelco). The reaction was performed in a screw-capped tube (PTFE cap liner, VWR International, Darmstadt, Germany) at 60°C for at least 12 h. After cooling, the samples were washed with saturated sodium chloride solution. A subsequent silylation step was necessary for improved detection of hydroxyl fatty acids by GC-MS. The introduction of the trimethylsilyl group at the hydroxyl function was achieved by adding a solution of hexamethyldisilazane (HMDS), trimethylchlorosilane (TMCS) and pyridine (10:3:1, v/v/v). HMDS, TMCS and pyridine were purchased from Merck. To avoid hydrolyses of the silylation reagent, sodium sulfate was added to the samples. Furthermore, samples were dried under nitrogen stream prior to the silylation step.

2.3. GC-MS

Analysis of the fatty acids was performed on a 6890N gas chromatograph coupled with mass selective detector 5973N (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). The injection mode was split less. A glass wool packed liner (Agilent Technologies) was inserted in the injection chamber, which was kept at 280°C . One microlitre of sample was injected for the separation by 50% cyanopropyl phase column (VF 23 ms, Varian Technologies, Palo Alto, CA, USA) $30\ \text{m} \times 0.25\ \text{mm}$, $0.25\ \mu\text{m}$. Employment of this appropriate stationary phase instead of the

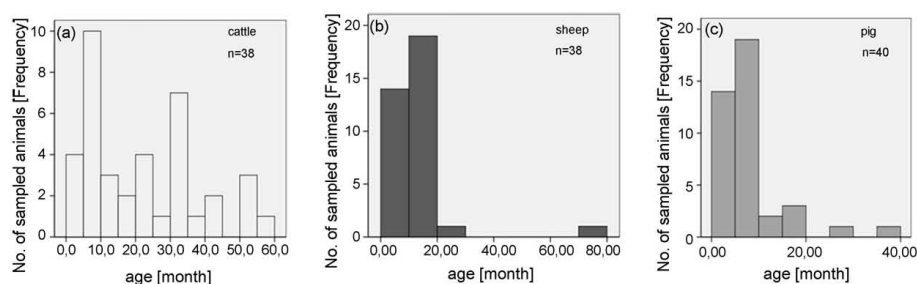


Fig. 1. (a–c) Histogram of the tested samples from cattle, sheep and pig.

Table 1
Target analytes for categorisation of CNS

Peak	Analyte	Abbreviation	Selected ions (<i>m/z</i>)
1	[2,2- ² H ₂]Docosanoic acid ^a	C22:0-d ₂ ^a	76,356
2	15Z-Tetracosenoic acid (nervonic acid)	C24:1(n-9)	348
3	17Z-Tetracosenoic acid	C24:1(n-7)	348
4	2-Hydroxytetracosanoic acid (cerebronic acid), sil.	2OH-C24:0	411,455
5	15Z-Hydroxytetracosenoic acid, sil.	2OH-C24:1(n-9)	409,453
6	17Z-Hydroxytetracosenoic acid, sil.	2OH-C24:1(n-7)	409,453
7	2-Hydroxypentacosanoic acid, sil.	2OH-C25:0	425,469

m/z: Ratio mass/charging.

^a Internal standard

previously utilized 5% phenyl, 95% polydimethylsiloxane phase (60 m × 0.32 mm, 0.25 μm) [10] improved peak resolution as well as peak shape. The GC system was operated in programmed temperature modus: initial temperature 90 °C, 0 min hold, first linear ramp 20 °C/min until 190 °C, 0 min hold, second linear ramp 3 °C/min until final temperature 220 °C, post run phase at 250 °C, 5 min hold. Data acquisition was performed in single ion monitoring (SIM) mode. The target analytes and the selected ions are listed in Table 1. Fig. 2 shows the retention order.

2.4. Statistics

The statistical evaluation of data was performed by use of SPSS 14.0 (SPSS, Chicago, USA) and SIMCA P 11.0 (Umetrics, Umea, Sweden).

2.5. Partial least square-discriminant analysis

One aim of the discriminant analysis is the identification of the best separation of known groups based on several features (variables). Another aim is the prediction of group membership of unclassified samples on a previous generated model [15–17]. To characterize the achievement of the first aim R^2y is used. This term describes how well the differences between the groups are explained by the model. How well new observations can be classified into the proper group is given by Q^2_{cum} [18]. Values of

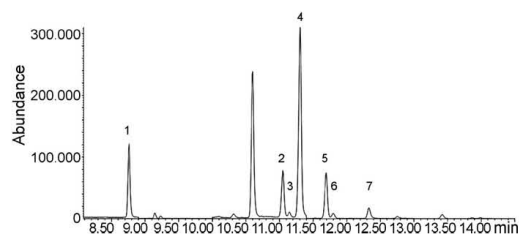


Fig. 2. SIM-chromatogram of FAME, partially silylated, of brain originated from sheep. Regarding Table 1 peak numbers and selected ions are identical.

Table 2
Minimum and maximum values of the FA ratios for the differentiation between the three species cattle, sheep and pig

Species	Ratio A		Ratio B		Ratio A/B	
	Min	Max	Min	Max	Min	Max
Cattle	8.7	35.0	3.1	9.7	2.5	4.3
Sheep	6.2	18.9	5.1	18.1	0.9	1.6
Pig	1.9	4.7	1.1	2.0	1.6	2.7

$R^2y > 0.7$ and $Q^2_{cum} > 0.4$ are considered to denote acceptable models for biological data [19]. The importance of a variable in the discriminant analysis can be expressed by the variable importance in the projection (VIP). VIP is normalized. The average squared VIP value is 1. So variables in the model with a VIP > 1 are important [18]. In this model three groups were formed: cattle, sheep and pig. The data set for creating and testing the model was the same.

3. Results

3.1. Species differentiation

For the differentiation between the CNS of sheep and cattle a new ratio was formed by dividing the ratios C24:1(n-9)/C24:1(n-7) (ratio A) and 2OH-C24:1(n-9)/2OH-C24:1(n-7) (ratio B). The applied minimum and maximum values for the differentiation between the CNS of the three species cattle, sheep and pig are listed in Table 2. In order to visualize the suitability of the ratios for species differentiation, we performed a PLS-DA. First model (model 1) was based on all three FA ratios (A, B and A/B) and the second (model 2) on the ratios A and B (confidence level 95%). The prediction set consisted in both models of 116 CNS samples. Three brain samples, originating from two sheep and one cattle, were excluded from the models as outliers. They exceeded the 95% confidence level. Both models are explained by two components. Plotted results of model 1 have shown good differentiation between the three species. Three clusters could be observed (Fig. 3). The fitting of model (R^2y) was 0.843. The predictive ability Q^2_{cum} of model 1 was 0.842. At the present prediction, 95.6% of the samples could be classified correctly (Table 3). The VIP values of the ratio A/B were: 0.92 ± 0.3 for the first component and 1.05 ± 0.13 for the second one. Only the ratio A achieved higher VIP values in the first component (1.31 ± 0.07). PLS-DA results of model 2 revealed a poor fitting model ($R^2y = 0.392$) and a bad predictive ability ($Q^2_{cum} = 0.338$).

Table 3
Misclassification list of the discriminant analysis

	members	cattle	sheep	pig	No class
cattle	37	33	0	0	4
sheep	36	0	35	0	1
pig	40	0	0	40	0

Dark grey: correct classified samples; light grey: wrong classified samples.

3.2. Determination of age

The ratio considered for the calculation of age in cattle brain was 2OH–C25:0/2OH–C24:1(n-7) (ratio C). A high correlation between age and this ratio could be observed (coefficient of correlation (r)=0.935, Spearman-Rho). As a positive linear relation the age of the animal will tend to increase, if the value of the fatty acid ratio increases. The equation for the determination of age (y) on the basis of the ratio (x) can be expressed by:

$$x=2.817y + 3.125 \text{ (coefficient of determination } (R^2)=0.831)$$

The calculated mean difference between predicted versus observed age was 4.5 months (SD=5.2). The coefficient of correlation of the previously used ratio B for the determination of age was $r=0.89$, Spearman-Rho. The mean difference of predicted versus observed age was 6 months (SD=5.7).

4. Discussion

For the detection and classification of CNS in meat products a new analytical approach was introduced by Niederer and Bollhalder [9]. This analytical GC–MS approach was basically confirmed and optimized in several follow-up studies [10–13,20]. However, a recently published study showed that the discrimination between the CNS of sheep and cattle might be insufficient despite introducing a second FA ratio [13]. To optimize species differentiation, we searched for new ratios. By forming the quotient of the two fatty acid ratios C24:1(n-9)/C24:1(n-7) (ratio A) and 2OH–C24:1(n-9)/2OH–C24:1(n-7) (ratio B) a new ratio was discovered. The novel ratio (ratio A/ratio B) improves the discrimination between CNS of cattle and sheep almost perfectly. However, if this ratio is applied solely for species determination, confusion between cattle and pig might be possible (Table 2). PLS-DA of model 1 showed excellent results (82.3% predictive ability). Three isolated clus-

ters could be found (Fig. 3). The scattering within the cattle cluster is related to the age dependent ratios A and B. Furthermore, the age distribution of sampled cattle is larger than of samples which were taken from pig or sheep. In both species, samples are focused on animals below age of 20 months. Thus, the scattering of data is small. The analysis performed with the two age dependent ratios A and B only resulted in poor prediction of CNS-species (38.8% predictive ability). Thus, the addition of the novel fatty acid ratio improved the prediction of CNS-species; and VIP values confirmed this fact. In the second component, the new ratio was most important; the predictive ability of this component was 72.8%.

The determination of age is essential for the analytical identification of SRM according to its legal specification [1]. CNS of cattle, sheep and goat over age of 12 months counts as one of these. The use of SRM for human or animal food is strictly forbidden in the European Union. Currently, the determination of age of processed CNS in meat products is exclusively possible by profiling CNS-typical fatty acids. In the past, the ratios A and B were used for the estimation of age categories (<12 months, 12–24 months, 25–36 months, >36 months) in cattle CNS [13]. These categories were determined according to the legal specifications of SRM (older than 12 months). If the state of law changes (i.e. age limit for SRM is raised to 20 months), the age categories will not fit. Therefore, the limits of all categories have to be recalculated. An age estimation based on regression analysis is independent from such limits. The correlation between age and the ratios A or B are insufficient for age estimation. However, the novel 2OH–C25:0/2OH–C24:1(n-7) ratio C is more suitable for the age estimation. Therefore, the result is an enhanced precision in age calculation.

Acknowledgement

This investigation was supported partially by the German Ministry of Food, Agriculture and Consumer Protection.

References

- [1] European Commission, Off. J. Eur. Commun. L147 (2001) 1.
- [2] E. Lückner, S. Horlacher, E. Eigenbrodt, Br. J. Nutr. 86 (2001) 115.
- [3] E. Lückner, E. Eigenbrodt, S. Wenisch, M. Failing, R. Leiser, M. Bülte, J. Food Prot. 62 (1999) 268.
- [4] E. Lückner, E. Eigenbrodt, S. Wenisch, R. Leiser, M. Bülte, J. Food Prot. 63 (2000) 258.
- [5] G.R. Schmidt, K.L. Hossner, R.S. Yemm, D.H. Gould, J.P. O'Callaghan, J. Food Prot. 62 (1999) 394.
- [6] B. Lange, T. Alter, A. Froeb, E. Lückner, Berl. Munch. Tierarztl. Wschr. 116 (2003) 467.
- [7] A. Abdulmawjood, H. Schonenbrucher, M. Bulte, J. Mol. Diagn. 7 (2005) 368.
- [8] C. Seyboldt, A. John, T. von Mueffling, B. Nowak, S. Wenzel, J. Food Prot. 66 (2003) 644.
- [9] M. Niederer, R. Bollhalder, Mitt. Lebensm. Hyg. 92 (2001) 133.
- [10] W. Biedermann, E. Lückner, A. Hensel, Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 115 (2002) 131.
- [11] E. Lückner, W. Biedermann, S. Lachhab, U. Truyen, A. Hensel, Anal. Bioanal. Chem. 380 (2004) 866.

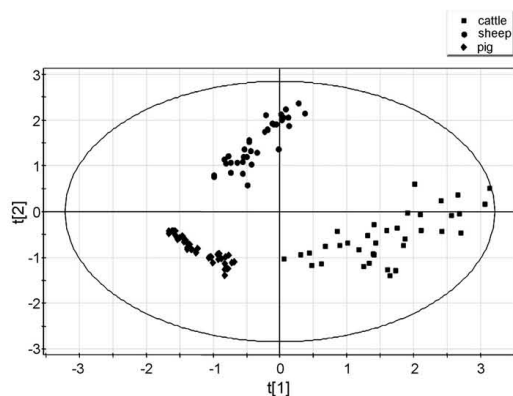


Fig. 3. Two dimensional PLS-DA scores plot of the fatty acid ratios C24:1(n-9)/C24:1(n-7) (ratio A) and 2OH–C24:1(n-9)/2OH–C24:1(n-7) (ratio B) and ratio A/ratio B for the differentiation of CNS from cattle, sheep and pig (the ellipse represents the 95% confidence interval).

- [12] W. Biedermann, E. Lückner, J. Porschmann, S. Lachhab, U. Truyen, A. Hensel, *Anal. Bioanal. Chem.* 379 (2004) 1031.
- [13] M. Griefbach, S. Lachhab, W. Biedermann, E. Lückner, U. Truyen, *Proceedings 46, DVG Arbeitstagung des Arbeitsgebietes "Lebensmittelhygiene"*, 27–30 September 2005, Garmisch-Partenkirchen, 2005, pp. 396–401.
- [14] R. Nickel, A. Schummer, E. Seiferle, *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*, Band II, Parey Buchverlag, Berlin, 1999, 94–97.
- [15] H.-F. Eckey, R. Kosfeld, M. Rengers, *Multivariate Statistik*, Gabler Verlag, Wiesbaden, 2002, p. 289.
- [16] J.F. Hair, R.E. Anderson, R.L. Tatham, W.C. Black, *Multivariate Data Analysis*, Prentice-Hall, New Jersey, 1998, p. 239.
- [17] J. Janssen, W. Laatz, *Statistische Datenanalyse mit SPSS für Windows*, Springer, Berlin, 2005.
- [18] N.N. *Users Guide to SIMCA-P*, Umetrics, Umea.
- [19] T. Lundstedt, E. Seifert, L. Abramo, B. Thelin, Å. Nyström, J. Pettersen, R. Bergman, *Chemom. Intell. Lab.* 42 (1998) 23–25.
- [20] J. Porschmann, U. Trommler, W. Biedermann, U. Truyen, *J. Chromatogr. A* 1127 (2006) 26.

Ernährung mit Köpfchen

Nachweis von Hirnzusätzen in Fleischerzeugnissen mittels GC-MS



v.l.n.r.: Franziska Hartmann, Christian Krex, Maria Griebach, Institut für Lebensmittelhygiene, Fakultät für Veterinärmedizin, Universität Leipzig

Eine bewusste, gesunde Ernährung ist heutzutage in aller Munde. Angespielt wird dabei in der Regel auf den Nährwert, Vitamin- und Mineralstoffgehalt der Nahrungsmittel. Es ist jedoch ebenso selbstverständlich dem Verbraucher Nahrungsmittel anzubieten, die frei von Krankheitserregern sind.

Die BSE-Krise (BSE, bovine spongiforme Enzephalopathie) ist sicher vielen noch in ausgeprägter Erinnerung. In den letzten Jahren sind die Wogen der Empörung abgeebbt, aber gehört das „Schreckgespenst“ BSE deswegen der Vergangenheit an? Unzureichende Rückverfolgbarkeit, nicht durchgeführte BSE-Tests, mangelhafte Entfernung von Risikomaterial, aber auch der so genannte Gammelfleischskandal bestätigen die alte Weisheit „Vertrauen ist gut, Kontrolle ist besser“.

Zum Schutz der Konsumenten vor Täuschung und Krankheitserregern ist eine stichprobenartige analytische Kontrolle der Endprodukte (Fleischerzeugnisse) durch die amtliche Lebensmittelüberwachung nach wie vor unerlässlich. Die primäre Maßnahme gegen eine potentielle Exposition mit BSE-Erregern besteht in der rechtlichen Definition von spezifiziertem Risikomaterial (SRM), die nachweislich oder potentiell Träger dieses Erregers sein können. SRM sind insbesondere Gehirn und Rückenmark, also Gewebe des zentralen Nervensystems (ZNS) von Rindern, Schafen und Ziegen, die älter als 12 Monate sind. SRM müssen während der Schlachtung amtlich entfernt, durch Einfärbung unver-

wechselbar gekennzeichnet, getrennt entsorgt und, in der Regel durch Verbrennen, unschädlich beseitigt werden, so dass ein Eintrag in die Nahrungskette sicher ausgeschlossen werden kann. Zur Unterstützung und Kontrolle dieses SRM-Verbots wurden verschiedene Verfahren entwickelt und zum Teil validiert, mit denen der Nachweis von ZNS in Endprodukten (Fleischerzeugnisse) möglich ist.

Als ZNS-Marker wurden Cholesterin, bestimmte Proteine (u.a. Neuronenspezifische Enolase NSE, saures Gliafaserprotein GFAP) sowie deren m-RNA genutzt (Übersicht in [1]). Insbesondere der immunchemisch analytische Ansatz zum ZNS-Nachweis war erfolgreich und

hatte Eingang in die Routine der Lebensmittelüberwachung gefunden [2]. All diesen analytischen Ansätzen ist jedoch der Nachteil gemeinsam, dass bei einem positiven ZNS-Nachweis keine Aussage über das Vorliegen von SRM getroffen werden kann. Dem steht die rechtliche Spezifizierung des ZNS hinsichtlich Tierart und -alter entgegen. Mittels immunchemischen und molekularbiologischen Verfahren ist das nachgewiesene ZNS bestenfalls hinsichtlich der Tierart, nicht jedoch hinsichtlich des Alters charakterisierbar. Weiterhin bestehen bei diesen Verfahren Probleme infolge Analytverluste durch die fleischtechnologischen Beeinflussungen. Der amtlichen Überwachung fehlt ein Referenzverfahren für den ZNS-Nachweis, welches die genannten Nachteile nicht aufweist [3, 4, 5, 6]. Um eine Aussage treffen zu können, ob das nachgewiesene ZNS-Gewebe tatsächlich zur Kategorie Risikomaterial zählt, ist die Bestimmung der Tierart und des Tialters zum Zeitpunkt der Schlachtung unerlässlich (EG-VO 999/2001). Dies ist nun im Laufe unserer Forschungsarbeit gelungen. Es wurde ermittelt, dass sich mit steigendem Lebensalter der Tiere das Fettsäuremuster insbesondere im Gehirn ändert. Die Verhältnisse $\omega 9/\omega 7$ -Tetracosensäure (Verhältnis A) sowie $\omega 9/\omega 7$ -2-Hydroxytetracosensäure (Verhältnis B) zeigen eine gute Korrelation mit dem Alter der Tiere von denen das nachgewiesene ZNS stammt.

Probenvorbereitung

Die untersuchten ZNS-typischen Fettsäuren: $\omega 7/\omega 9$ -Tetracosensäure (C24:1 $\omega 7$, C24:1 $\omega 9$), $\omega 7/\omega 9$ -2-Hydroxytetracosensäure (C24:1 $\omega 7$ -OH, C24:1 $\omega 9$ -OH) und Cerebronsäure (C24:0-OH) liegen im ZNS als komplex gebundene Lipide (Phosphoglyceride, Sphingosine, Cerebroside) vor. Somit ist eine mehrstufige Probenvorberei-

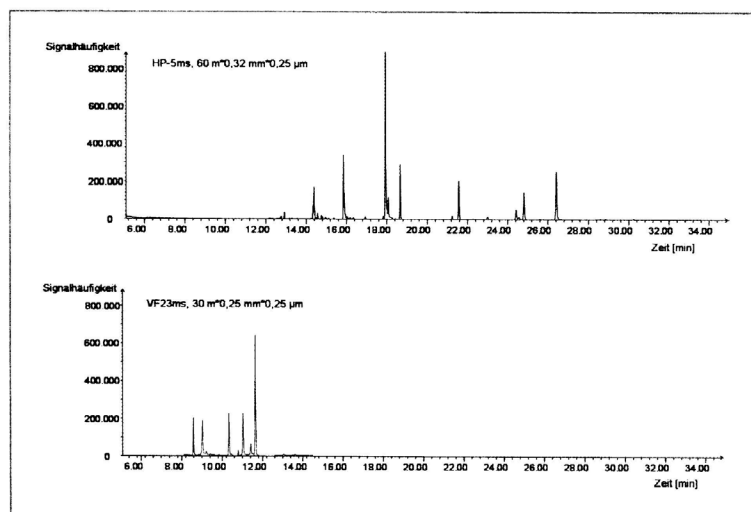


Abb. 1: Vergleich der SIM-Chromatogramme einer Hirnprobe vom Schaf nach der Trennung auf zwei verschiedenen Kapillarsäulen mit unterschiedlichen stationären Phasen und Säulendimensionen (DB-5 60m*0,32mm*0,25 µm oberes Chromatogramm; VF23 ms 30 m*0,25 mm*0,25 µm unteres Chromatogramm).

KOPPLUNGSTECHNIKEN

tung notwendig, um die Abtrennung von der Matrix sowie die Analytanreicherung zu erreichen.

Ausgangspunkt der Probenvorbereitung ist die kalte Lösungsmittel-Extraktion der eingewogenen Fleisch- oder Wurstprobe. Die anschließende Festphasenextraktion (SPE) des Extraktes hat die Abtrennung der komplexen Lipide von den einfachen Lipiden, den Di- und Triglyceriden sowie den freien Fettsäuren zum Ziel.

Die komplex gebundenen Fettsäuren werden im dicht verschlossenen Gefäß mit methanolischer Salzsäure zu den entsprechenden Methylestern umgeestert (90 °C; 1,5 h).

Die zu den Zielanalyten zählenden Fettsäuren: Cerebronsäure (C24:0-OH) sowie ω 7/ ω 9-Hydroxytetracosensäure (C24:1 ω 7-OH, C24:1 ω 9-OH) verfügen über eine Hydroxygruppe, die den chromatographischen Prozess, die Detektion und die damit verbundene Auswertung der erhaltenen Daten durch Peakverbreiterung, mangelnde Reproduzierbarkeit und Erhöhung der Nachweisgrenze stört. Üblicherweise werden solche OH-Gruppen silyliert. Die Einführung einer Trimethylsilylgruppe (TMS) am Sauerstoffatom der Hydroxyfunktion wurde bislang mit einem Gemisch aus Pyridin/Hexamethyldisilazan/Trimethylchlorosilan (Pyridin/HMDS/TMCS) im Verhältnis: 10:3:1 (v/v/v) erreicht. Die Nebenprodukte Ammoniumchlorid und Pyridinhydrochlorid beeinträchtigen die Haltbarkeit der stationären Phase der Kapillarsäule. Von den getesteten Silylierungsmitteln N,O-Bis(trimethylsilyl)-acetamid (BSA), N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA) und Trimethylsilylimidazol (TMSIM) erwies sich TMSIM als die günstigste Lösung. Die Reaktionsausbeute war vergleichbar mit der Verwendung des Gemischs Pyridin/HMDS/TMCS. Bei einer Reakti-

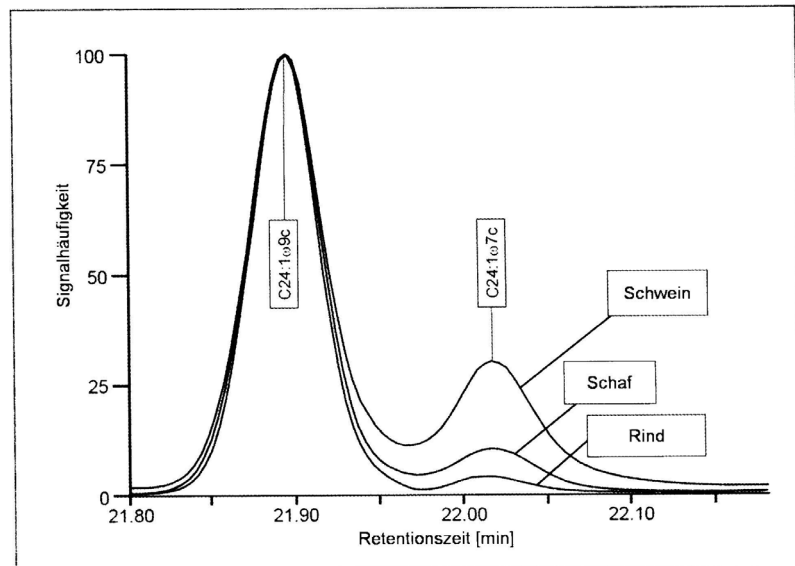


Abb. 2: Ausschnitt aus den SIM-Chromatogrammen der Isomere FAME C24:1 aus ZNS der Tierarten Rind, Schaf und Schwein

onszeit von 5 min und Reaktionstemperatur von 100 °C entstanden keine störenden Nebenprodukte. Der höchste Reaktionsumsatz wurde mit dem polaren, basischen Lösungsmittel Dimethylformamid (DMF) erreicht. Unter den angegebenen Bedingungen beträgt die Probendurchsatzzeit etwa 8 Stunden.

Chromatographie

In vielen Fällen wird für die Entwicklung einer optimalen chromatographischen Trennmethode von einer universellen Kapillarsäule mit 95 % Polydi-

methylsiloxan- (PDMS) und 5 % Phenylbeschichtung (HP-5) als Startpunkt ausgegangen. Auch im bestehenden Verfahren wurde zunächst eine HP-5ms-Kapillarsäule (Agilent, 60 m * 0,32 mm * 0,25 μ m) verwendet (Trägergas: Helium 1,5 ml/min; Injektion: 1 μ l FAME-Extrakt splitlos; Temperaturprogramm: 90 °C (1 min) \rightarrow 20 °C/min \rightarrow 140 °C (0 min) \rightarrow 12 °C/min \rightarrow 260 °C \rightarrow 2 °C/min \rightarrow 295 °C (4 min) \rightarrow Postrun: 305 °C (5 min)). Eine weitere für die Fettsäureanalytik übliche stationäre Phase wurde getestet: 50 % PDMS mit 50 % Cyanopropylphenylgruppen (Varian, VF23ms, 30 m * 0,25 mm * 0,25 μ m). (Trägergas: Helium 0,8 ml/min; Injektion: 1 μ l FAME-Extrakt splitlos; Temperaturprogramm: 100 °C (0 min) \rightarrow 20 °C/min \rightarrow 190 °C (0 min) \rightarrow 3 °C/min \rightarrow 220 °C (0 min) \rightarrow Postrun: 250 °C (5 min)).

Die erhaltenen Chromatogramme einer Hirnprobe sind in Abbildung 1 beispielhaft dargestellt.

Die geringeren Dimensionen und die hohe Selektivität der Kapillarsäule mit der Cyanopropylphase verkürzen die Analysendauer und resultieren in optimalen Peakformen. Aufgrund der geringeren Säulendimensionen konnte die Analysendauer von 30 min auf 9 min verkürzt werden.

Bei der Verwendung von Cyanopropylphenylphasen ist die Verwendung saurer Derivatisierungsmittel jedoch kritisch. Je polarer die Beschichtung der verwendeten Kapillare, desto anfälliger ist diese gegenüber chemischer Zerstörung. Durch den Einsatz des alternativen Silylierungsmittels TMSIM wurde die Verwendung dieser Kapillarsäulen jedoch ermöglicht.

Die massenspektrometrische Detektion erfolgte im SIM-Modus (73, 76, 348, 356, 409, 411, 453, 455).

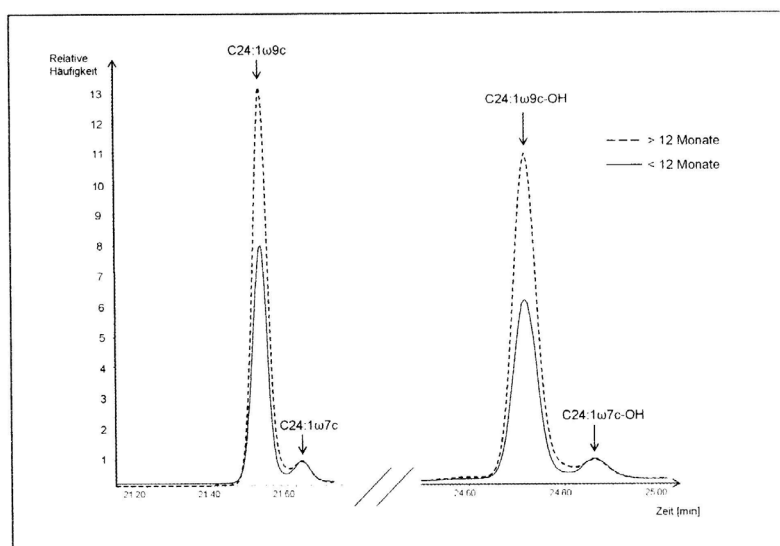


Abb. 3: Ausschnitt aus den SIM-Chromatogrammen der Isomere der FAME C24:1 und C24:1-OH aus ZNS der Tierart Schaf in zwei verschiedenen Altersstufen

K O P P L U N G S T E C H N I K E N

Quantifizierung

Die Cerebronsäure ist unter den vorhergehend genannten Analyten die Fettsäure mit der größten Differenz zwischen den Gehalten in den Blindproben (ZNS-freie Wurstmatrizes) und dem Gehalt im ZNS. Sie wird daher als Marker verwendet. Da sie in Spuren auch in anderen als ZNS-Gewebe vorkommt, wurde im hier vorgestellten Verfahren ein Schwellwert (cut-off) festgelegt. Proben mit einem Gehalt von $>2,43$ mg/kg Cerebronsäure (das entspricht einem ZNS-Gehalt von 0,2%) werden in der vorliegenden Methode als ZNS-positiv betrachtet. Die Quantifizierung erfolgt über externe Kalibration unter Verwendung einer Stammlösung von Cerebronsäure-FAME im Konzentrationsbereich 10–40 ng/ μ l. Die Wiederfindungsraten liegen zwischen 90–110%. Die Präzision des Verfahrens ausgedrückt als Standardabweichung liegt bei 3,8% ($n=12$). Weiterhin besteht auch die Möglichkeit der Matrix-Kalibration. Dazu werden Brühwurststandards mit definierten ZNS-Zusätzen auf die gleiche Weise aufgearbeitet wie die Realproben.

Tierartdifferenzierung

Mit der vorgestellten GC-MS-Methode ist es möglich, bei ZNS-positiven Proben die Tierart von der das ZNS stammt, zu ermitteln. Zur Differenzierung der Tierart werden drei verschiedene Fettsäure-Verhältnisse verwendet. Neben dem Verhältnis A konnte nun ein weiteres tierartspezifisches Flächenverhältnis anderer ZNS-Fettsäuren gefunden werden. Das Verhältnis B sowie der Quotient aus beiden genannten Verhältnissen: A / B. Mit Hilfe aller drei Quotienten können die Tierarten Rind, Schaf und Schwein eindeutig und mit ausreichender Sicherheit zugeordnet werden [7]. In Abbildung 2 ist als Beispiel der FAME $\omega 9/\omega 7$ -C24:1-Ausschnitt aus den SIM-Chromatogrammen der Tierarten Rind, Schaf und Schwein dargestellt. Dabei wird ersichtlich, dass es zwischen den Tierarten Unterschiede in den Verhältnissen der Peakflächen der $\omega 9$ - und $\omega 7$ -FAME der Tetracosensäure gibt.

Tieralterdifferenzierung

Um das Tieralter zu bestimmen, ist zunächst die Kenntnis bzw. der Nachweis der Tierart grundlegende Bedingung, da die Verhältnisse A und B in Abhängigkeit der Spezies variieren. Für die Tierart Rind und überwiegend auch für die Tierart Schaf konnte eine Korrelation mit dem Alter der Tiere und dem Verhältnis A / B ermittelt werden. In Abbildung 3 ist der Anstieg der Peakflächen der $\omega 9$ -Isomere gegenüber den $\omega 7$ -Isomeren der Verbindungen C24:1 und C24:1-OH für das ZNS von Tieren, die älter als 12 Monate waren, deutlich zu erkennen. Auf Basis dieser ansteigenden Werte der Verhältnisse A und B erfolgt die Auswertung hinsichtlich der Altersstufen der Tiere. Es ist uns somit gelungen ZNS in Fleischereiprodukten nicht nur nachzuweisen, sondern auch die Tierart und sogar das Tieralter des detektierten ZNS zu be-

stimmen. Somit ist die vorgestellte GC-MS-Methode das bislang einzige analytische Verfahren, welches die Einstufung von ZNS-Material gemäß der EG-Verordnung 999/2001 ermöglicht.

Fazit

Die vorgestellte, optimierte GC-MS-Methode eignet sich hervorragend zum Nachweis spezifizierten Risikomaterials über die Detektion von ZNS-Fettsäuren in Fleischereiprodukten. Die Zeitdauer der Probenvorbereitung konnte verkürzt und der Einsatz von Derivatisierungsmitteln reduziert werden. Durch die Verwendung selektiver Säulen geringerer Dimension wurden verbesserte chromatographische Trennungen bei kürzeren Analysenzeiten erzielt. Die Quantifizierung ist über externe Kalibration bzw. eine Matrixkalibration möglich.

Die beschriebene GC-MS-Methode ermöglicht über den quantitativen Nachweis hinaus die Bestimmung der Tierart des verwendeten ZNS und sogar des Tialters zum Zeitpunkt der Schlachtung. Damit ist das vorgestellte Verfahren das bislang einzige, welches eine Kontrollmöglichkeit gemäß der gesetzlichen Vorschriften zur Verwendung von ZNS in Fleischereiprodukten bietet. Das GC-MS-Verfahren wird derzeit am Institut für Lebensmittelhygiene der Universität durch einen Ringtest, gefördert vom Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) validiert.

Referenzen:

- [1] Lücker, E.: Nova Acta Leopoldina NF94, Nr. 347, 167–181 (2006)
- [2] Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch in der Fassung der Bekanntmachung vom 26. April 2006 (BGBl. I S. 945), § 64 Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren, Bekanntmachung
- [3] Niederer, M. Bollhalder, R. Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchungen und Hygiene, Band 92, 2/2001
- [4] Lücker, E.; Biedermann, W.; Lachhab, S.; Hensel, A.: Fleischwirtschaft 82(10), 123–128 (2002)
- [5] Biedermann, W.; Lücker, E.; Pörschmann, J.; Lachhab, S.; Truyen, U.; Hensel A., :Anal Bioanal Chem. 379 (7-8), 1031–1038, (2004)
- [6] Lücker, E.; Biedermann, W.; Lachhab, S.; Truyen, U.; Hensel, A.: Anal Bioanal Chem 380(7–8), 86–870, (2004)
- [7] Grießbach, M.; Hartmann, F.; Massag, N.; Baumann, D.; Krex, Ch.; Biedermann, W.; Truyen, U.; Lücker, E.: J Chromatogr A, im Druck

Autoren:

Franziska Hartmann, Maria Grießbach, Daniela Baumann, Wolfgang Biedermann, Christian Krex, Uwe Truyen, Ernst Lücker, Fakultät für Veterinärmedizin, Universität Leipzig

KONTAKT

Dipl.-Chem. Franziska Hartmann
Universität Leipzig
Tel.: 0341/9738158
f.hartmann@vetmed.uni-leipzig.de

INFORMATIONEN EASY INFO 205