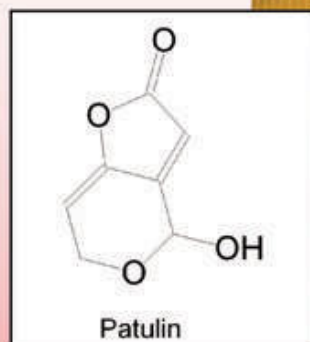
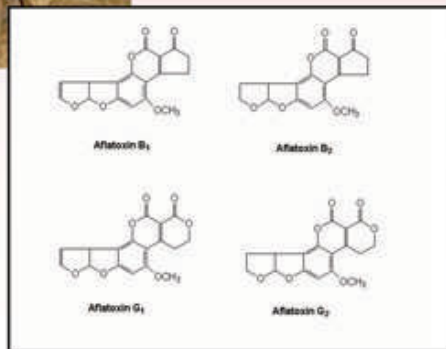


Andreas Sascha Wendt

Bestimmung von Aflatoxinen und Patulin mittels online-SPE-LC



Cuvillier Verlag Göttingen

Bestimmung von Aflatoxinen und Patulin mittels online-SPE-LC

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Andreas Sascha Wendt
aus Bremen

Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2007

Zugl.: (TU) Braunschweig, Univ., Diss., 2007

978-3-86727-252-0

1. Referent:

Professor Dr. Peter Winterhalter

2. Referent:

apl. Professor Dr. Ulrich Engelhardt

eingereicht am:

07.02.2007

mündliche Prüfung (Disputation) am:

05.04.2007

Druckjahr 2007

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2007

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2007

Gedruckt auf säurefreiem Papier

978-3-86727-252-0

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor dieser Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge mit Veröffentlichungen

WENDT, A.-S.; RAEZKE K.-P.; WINTERHALTER, P.: Analytik von Aflatoxinen mittels online-SPE-HPLC (Vortrag), Tagung der Regionalverbände Nord und Nordost der Lebensmittelchemischen Gesellschaft (LChG) der Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh), Hannover, 30.03.2004, veröffentlicht in: Lebensmittelchemie (2004), 58, 71-72

WENDT, A.-S.; RAEZKE K.-P.; WINTERHALTER, P.: Möglichkeiten der online-Analytik von Mykotoxinen (Poster), Deutscher Lebensmittelchemikertag, Bonn, 13.-15.09.2004 veröffentlicht in: Lebensmittelchemie (2004), 58, 157

WENDT, A.-S.; RAEZKE K.-P.; WINTERHALTER, P.: Online-SPE-LC-Analyse von Mykotoxinen – ein Weg zu schnellen und verlässlichen Ergebnissen (Poster), 27. Mykotoxin-Workshop, Dortmund, 13.-15. Juni 2005, Tagungsband, 100

WENDT, A.-S.; RAEZKE K.-P.; WINTERHALTER, P.: Chances of Online-SPE-LC Analysis of Mycotoxins (Poster), Deutscher Lebensmittelchemikertag/EuroFoodChem XIII, Hamburg, 19.-23.09.2005, veröffentlicht in: EuroFoodChem XIII – Proceedings Vol. 2, 499-503

WENDT, A.-S.; RAEZKE K.-P.; WINTERHALTER, P.: Determination of Patulin by Online-SPE-LC (Poster), 28. Mykotoxin-Workshop, Bydgoszcz/Polen, 29.-31.5.2006, veröffentlicht in: Mycotoxin Research (2006), 22, 4, 222-229

WENDT, A.-S.; RAEZKE K.-P.; WINTERHALTER, P.: Bestimmung des Mykotoxins Patulin per online-SPE-LC (Vortrag), Tagung des Regionalverbands Nord der Lebensmittelchemischen Gesellschaft (LChG) der Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh), Hannover, 23.03.2007, Kurzbeitrag zur Veröffentlichung vorgesehen in: Lebensmittelchemie (2007) (eingereicht)

Veröffentlichungen

WENDT, A.-S.; RAEZKE K.-P.; WINTERHALTER, P. (2006): Online-SPE-LC-Analyse von Aflatoxinen, GIT Labor-Fachzeitschrift, 50, April 2006, 306-310

Für meine Eltern

Summary

The aim of the PhD thesis presented herein has been to further develop existing principles for the analysis of mycotoxins using patulin and aflatoxins as examples. The group of aflatoxins receives special attention due to the high toxicity and wide distribution of these substances, whereas Patulin mainly occurs in fruits, a matrix otherwise unsusceptible for mycotoxins. As the molecule is quite small, other analytical principles than for most of the other mycotoxins have to be applied.

The classic analysis of **aflatoxins** consists of a sample preparation with immunoaffinity columns (IAC), followed by LC (liquid chromatography) separation and fluorescence detection. This technique shows a range of advantages, such as high selectivity and low limits of quantification. Drawbacks are the high costs of immunoaffinity columns as well as the considerable manual effort.

Within the frame of this work, the **multiple use of expensive immunoaffinity columns was achieved for the first time**, making use of all commercially available columns, instruments, chemicals and consumables. In order to achieve this, the IAC-SPE (solid phase extraction) step was automatised with the help of the sample preparation unit SP 3000 (Knauer, Spectralytics).

The newly developed method works as follows:

The sample is extracted with a methanol/water-mixture. An aliquot is evaporated and the residue is re-dissolved. The sample solution is then analysed by online-SPE-LC using commercially available immunoaffinity material (r-biopharm). The subsequent LC separation is carried out on a RP 18 column with gradient elution. For the final fluorescence detection, a post-column derivatisation (CoBrA cell) is employed.

With the system described herein, 30 and more usages of single immunoaffinity column are possible. Taking into consideration a current price of approx. € 10,- per column, a significant saving compared to the manual procedure is achieved.

This newly developed method was validated and tested on several matrices. As the validation proved, the newly developed method achieves performance parameters similar to traditional methods. For the most important compound aflatoxin B₁, the relative standard deviation under reproducibility conditions (RSD_R) is 20,2 %, the mean recovery is 108,3 % (matrix calibration). Thereby the method fulfils the performance criteria of the EU regulation 401/2006 for all four aflatoxins B₁, B₂, G₁, and G₂.

The reached limits of quantification (e.g. aflatoxin B₁: 0.20 µg/kg) allow reliable performance for concentrations much below the lowest legal maximum limit. Furthermore the procedure was successfully tested in a ring trial and was accredited in January 2007.

For the mycotoxin **patulin**, the analysis method most often used consists of a liquid-liquid partitioning step with ethyl acetate, combined with an alkaline washing step, with subsequent LC-UV determination. This procedure usually delivers reliable results, nevertheless it requires quite an amount of time and manpower. The alkaline washing step can represent an additional problem, as patulin is unstable under alkaline conditions.

The method presented in this work **for the first time** transfers the sample preparation including the crucial washing step onto the **online-SPE technique**. In order to improve the cleaning effect, the extraction is carried out after the addition of a neutral buffer.

The analysis procedure works according to the following principle:

The sample is diluted in a phosphate buffer solution. Subsequently a single extraction step with ethyl acetate is carried out. After the solvent has been removed, the sample is re-dissolved and analysed by online-SPE-LC using the sample preparation unit SP 3000 combined with SDB-(styrene-divinylbenzene-)material. The alkaline washing step is carried out by the SP 3000 device. The elution takes place with the help of the elution strength of the LC eluent (gradient system with water and acetonitrile). After the LC separation on a Polaris C18A analytical column (Varian), the final UV detection takes place.

This newly developed method was validated and tested on various matrices. As the validation shows, the method reaches performance parameters comparable to traditional offline-methods. The relative standard deviation under reproducibility conditions RSD_R was 12.7 %, the mean recovery was 99,1 % (matrix calibration). Therefore the method fulfils the performance requirements of the EU regulation 401/2006 for the determination of patulin.

The achieved limit of quantification amounts to 10.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, therefore reliable performance is possible below the lowest legal limits. The method was tested on a ring trial sample and was accredited in January 2007 as well.

Both methods take advantage of the online-SPE technique. It automates the sample preparation and thereby considerably reduces the amount of time and manpower. Furthermore this technique allows for operation 24 hours a day, seven days a week and minimises the solvent requirements. These characteristics qualify the online-SPE technique for the fast analysis of great numbers of samples in the routine of a modern laboratory.

Inhaltsverzeichnis

Vorveröffentlichungen der Dissertation.....	3
Summary.....	7
Inhaltsverzeichnis	9
Abkürzungsverzeichnis	13
1 Einleitung.....	15
1.1 Guter Schimmel – böser Schimmel.....	16
1.2 Eine kurze Geschichte der Mykotoxine.....	17
1.3 Aflatoxine	22
1.3.1 Historisches: Der Truthahn-Tod	22
1.3.2 Chemisches: Blaue und grüne Fluoreszenz	24
1.3.3 Mikrobiologisches: Eine <i>Aspergillus</i> -Spezialität.....	25
1.3.4 Vorkommen: Weltweit & in Nestern.....	27
1.3.5 Toxikologisches: Stärkstes natürliches Cancerogen	30
1.3.6 Rechtliches: Niedrige Grenzwerte im µg/kg-Bereich	32
1.3.7 Analytisches: Hohe Selektivität durch Immunoaffinitätsmaterial	33
1.4 Patulin	39
1.4.1 Historisches: An apple a day	39
1.4.2 Chemisches: Klein und ungesättigt	40
1.4.3 Mikrobiologisches: Expansive Bildung durch <i>P. expansum</i>	42
1.4.4 Vorkommen: Der Frucht-Fan.....	43
1.4.5 Toxikologisches: Krebserregend – oder auch nicht?	45
1.4.6 Rechtliches: Neue EU-Grenzwerte für Apfelprodukte.....	46
1.4.7 Analytisches: Das etwas andere Mykotoxin	47
1.5 Festphasenextraktion + Immunoaffinitätssäulen.....	52
1.5.1 Festphasenextraktion (SPE)	52
1.5.2 Immunoaffinitätssäulen (IAC).....	53
1.6 Online-SPE.....	56
1.7 Flüssigchromatographie (LC).....	59
2 Problemstellung	61
2.1 Hintergrund.....	61
2.2 Stand der Forschung.....	61
2.2.1 Aflatoxine	61
2.2.2 Patulin.....	64
2.3 Ziele der Doktorarbeit.....	66
2.3.1 Aflatoxine	67
2.3.2 Patulin.....	67
3 Material und Methoden	69
3.1 Bestimmung von Aflatoxinen per online-SPE-LC	69

3.1.1	Kurzbeschreibung der Methode	69
3.1.2	Sicherheitshinweise	69
3.1.3	LC-Bedingungen	69
3.1.4	Online-SPE	70
3.1.5	Herstellung von Eluenten, Reagenzien und Standardlösungen.....	71
3.1.6	Durchführung	73
3.1.7	Auswertung.....	74
3.1.8	Liste der Chemikalien und Geräte.....	74
3.1.9	Bestimmung von Aflatoxinen per offline-SPE-LC (Kontrollmethode)	75
3.2	Bestimmung von Patulin per online-SPE-LC.....	79
3.2.1	Kurzbeschreibung der Methode	79
3.2.2	Angaben zum Prüfsystem	79
3.2.3	Herstellung von Eluent, Reagenzien und Standardlösungen.....	81
3.2.4	Durchführung (Kalibrierung, Probenvorbereitung).....	83
3.2.5	Auswertung	85
3.2.6	Liste der Chemikalien und Geräte.....	85
3.2.7	Bestimmung von Patulin per offline-LC-UV (Kontrollmethode)	87
4	Ergebnisse und Diskussion	91
4.1	Aflatoxine	91
4.1.1	Voraussetzungen für die Mehrfachnutzung des Immunoaffinitäts-Materials	91
4.1.2	Probenextraktion.....	94
4.1.3	Waschschritt	96
4.1.4	Elutionsschritt	96
4.1.5	Chromatographische Trennung.....	104
4.1.6	Detektion.....	106
4.1.7	Auswertung.....	107
4.1.8	Anwendung der Methode	108
4.1.9	Validierung und Akkreditierung	109
4.1.10	Laborvergleichsuntersuchung	122
4.1.11	Methodenvergleich.....	127
4.1.12	Vorteile der Methode.....	130
4.2	Patulin	131
4.2.1	SPE-Aufarbeitung	131
4.2.2	Probenextraktion.....	135
4.2.3	Waschschritt	139
4.2.4	Elution.....	142
4.2.5	Chromatographische Trennung.....	143
4.2.6	Detektion.....	145
4.2.7	Auswertung.....	146
4.2.8	Anwendung der Methode	147
4.2.9	Validierung und Akkreditierung	149
4.2.10	Laborvergleichsuntersuchung	154
4.2.11	Methodenvergleich.....	156
4.2.12	Vorteile der Methode.....	160
5	Validierungen	161
5.1	Aflatoxine	161
5.1.1	Messungen	161
5.1.2	Ergebnisse/Bewertungen	165
5.1.3	Gesamtbewertung der Validierung	180
5.2	Patulin	181
5.2.1	Messungen	181

5.2.2	Ergebnisse/Bewertungen	183
5.2.3	Gesamtbewertung der Validierung	190
6	Zusammenfassung.....	191
7	Ausblick	194
8	Literatur	195
	Danke!	211
	Anhang: Lebenslauf	212

Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
ACN	Acetonitril
AFB/G/M	Aflatoxin B/G/M
AIJN	Association of the Industry of Juices and Nectars from Fruits and Vegetables of the EU (European Fruit Juice Association) Europäische Fruchtsaftunion
AOAC	Association of Official Analyst Chemists <i>US-Amerikanische Vereinigung offizieller analytischer Chemiker</i>
ASU	Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB
CRM	Certified Reference Material Zertifiziertes Referenzmaterial
CSL	Central Science Laboratory <i>Offizielles Regierungs-Labor in Sand Hutton, UK</i>
CSSR	Ceskoslovenská socialistická republika (ehemalige) Tschechoslowakei
CV	Coefficient of variation Variationskoeffizient
DAD	Dioden-Array-Detektor (UV-Vis)
DAP	Deutsches Akkreditierungssystem Prüfwesen GmbH
DC	Dünnschichtchromatographie
DIN	Deutsches Institut für Normung
DNA	Desoxyribonucleic acid Desoxyribonukleinsäure
DON	Deoxynivalenol
EFSA	European Food Safety Agency Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit
EG	Europäische Gemeinschaft
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMAN	European Mycotoxin Awareness Network
EN	Europäische Normung
EU	Europäische Union
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations Welt-Ernährungsorganisation der Vereinten Nationen
FAPAS	Food Analysis Performance Assessment Scheme <i>Laborvergleichsuntersuchungs-Programm von CSL, UK</i>
FDA	U.S. Food & Drug Administration US-amerikanische Lebensmittel- und Arzneimittelbehörde
FE	Flächeneinheiten
FLD	Fluoreszenz-Detektor/-Detektion
GC	Gas chromatography Gaschromatographie
HMF	5-Hydroxymethylfurfural
HPLC	High performance liquid chromatography Hochleistungs-Flüssigchromatographie
HPTLC	High performance thin-layer chromatography Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie
HRGC	High resolution gas chromatography Hochauflösende Gaschromatographie
HRMS	High resolution mass spectrometry Hochauflösende Massenspektrometrie
IA-	Immunoaffinitäts-
IAC	Immunoaffinity column Immunoaffinitätssäule
ID	Inner Diameter Innendurchmesser
IEC	International Electrotechnical Commission Internationale elektrotechnische Kommission
IFU	International fruit juice union (International Federation of Fruit Juice Producers)

IFJU	→ IFU
i.p.	intraperitoneal innerhalb des Bauchraums
ISO	International Organization for Standardization Internationale Organisation für Standardisierung
LC	Liquid chromatography Flüssigchromatographie
LC-MS	Liquid chromatography-mass spectrometry Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie
LD ₅₀	Letale Dosis (50 % Todesrate)
LLE	Liquid-liquid extraction → LLP
LLP	Liquid-liquid partitioning Flüssig-flüssig-Extraktion
LMBG	Lebensmittel- und Bedarfsgegenstände-Gesetz
LVU	Laborvergleichsuntersuchung
MeOH	Methanol
MHmV	Mykotoxin-Höchstmengenverordnung
MRL	Maximum Residue Limit Zulässiger Grenzwert (Rückstandshöchstmenge)
OTA	Ochratoxin A
PBS	Phosphate-buffered saline Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PDA	Photo-Diode-Array
ppb	parts per billion Teile pro Milliarde Teile (≈ µg/kg)
ppm	parts per million Teile pro Million Teile (≈ mg/kg)
QRK	Qualitätsregelkarte
RASFF	Rapid Alert System Food and Feed Schnellwarnsystem der EU für Lebens- und Futtermittel
r	Wiederholgrenze
R	Vergleichsgrenze
RP	Reversed phase (material) Umkehrphasen-(Material)
RSD _r	Relative standard deviation (repeatability) Relative Standardabweichung unter Wiederholbarkeitsbedingungen
RSD _R	Relative standard deviation (reproducibility) Relative Standardabweichung unter Reproduzierbarkeitsbedingungen
SIDA	Stable isotope dilution assay → SIVA
SIVA	Stabilisotopenverdünnungsanalyse
SLMB	Schweizerisches Lebensmittelbuch
SPE	Solid-phase extraction Festphasenextraktion
THF	Tetrahydrofuran
TLC	Thin-Layer Chromatography Dünnschichtchromatographie
UdSSR	(ehemalige) Union der Sozialistischen Sowjetrepubliken
UK	United Kingdom Vereinigtes Königreich (Großbritannien und Nordirland)
UNEP	United Nations Environment Programme Umweltprogramm der Vereinten Nationen
USA	United States of America Vereinigte Staaten von Amerika
UV	Ultraviolett (Naher) ultravioletter Spektralbereich (200 - 400 nm)
Vis	Visible Sichtbarer Spektralbereich (400 - 800 nm)
WHO	World Health Organization Weltgesundheitsorganisation der Vereinten Nationen
ZON	Zearalenon
ZZuIV	Zusatzstoff-Zulassungsverordnung

1 Einleitung

Schimmelpilzgifte, wissenschaftlich als Mykotoxine bezeichnet, begleiten den Menschen seit jeher. Mykotoxine finden sich in erster Linie in der Nahrung und in Wohnräumen, jedoch auch in Böden und anderen Örtlichkeiten. Trotz des jahrtausendelangen Kontakts der Menschen mit Schimmelpilzgiften sind die Mykotoxine erst in den letzten Jahrzehnten in den Fokus der Wissenschaft gelangt. Inzwischen hat man viele Mykotoxine und ihre Bildner identifiziert, und auch viele negative gesundheitliche Auswirkungen dieser Gifte sind bekannt. Mykotoxine entfalten ihre toxischen Wirkungen einerseits akut, von Erbrechen bis Leberzirrhose. Viel gefährlicher sind andererseits jedoch die chronischen Effekte von Mykotoxinen, sie können beispielsweise hochgradig krebserregend sein oder den Hormonhaushalt beeinflussen.

Mit dem beständig wachsenden Wissen über Bildung, Vorkommen und Toxikologie von Mykotoxinen wächst auch das Interesse der Analytiker und des Gesetzgebers an diesen Substanzen. Die beiden Seiten hängen voneinander ab, da der Festsetzung eines neuen Höchstgehalts durch den Gesetzgeber die Entwicklung einer entsprechend empfindlichen und zuverlässigen Analyseverfahren durch die Wissenschaft vorausgehen muss. Gerade in den letzten Jahren sind von der Europäischen Union und dem deutschen Gesetzgeber diverse neue Höchstmengen für Mykotoxine in Lebensmitteln festgesetzt worden.

Als Folge der wachsenden Anzahl festgeschriebener Grenzwerte werden Analysen in erheblicher Größenordnung sowohl seitens der Lebensmittelüberwachung als auch seitens der Lebensmittelindustrie benötigt. Für letztere kann in Zeiten der Globalisierung und der Just-in-time-Logistik die Zeit, die eine Mykotoxin-Analyse erfordert, zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt und damit unter Umständen zu einem großen Kostenfaktor werden, der weit über den vom Labor berechneten Preis hinausgeht. Neben der Schnelligkeit spielen natürlich auch die Kosten selbst sowie die Zuverlässigkeit und Genauigkeit des Ergebnisses eine entscheidende Rolle.

An dieser Stelle knüpft die vorliegende Dissertation an. Sie beschäftigt sich mit der Entwicklung von Analysemethoden für die beispielhaft ausgewählten Mykotoxine Aflatoxine und Patulin. Beide spielen eine besondere Rolle unter den Mykotoxinen: Die Gruppe der Aflatoxine ist nicht nur der giftigste Vertreter der Mykotoxine, sie ist zugleich das am weitesten verbreitete Schimmelpilzgift. Patulin hingegen findet sich bevorzugt in Früchten, einer Matrix, die sonst eher unanfällig für Mykotoxine ist. Das Molekül ist darüber hinaus relativ klein und unspezifisch, d.h. seine Molekülstruktur bietet wenig Ansätze (funktionelle Gruppen, dreidimensionale Strukturen) für eine selektive Analytik, beispielsweise für die in der Mykotoxin-Analytik eingesetzten Immunoaffinitätsäulen.

Das Ziel der Arbeit war die Entwicklung von Methoden zur Mykotoxin-Analytik unter Verwendung der online-Kopplung von Festphasenextraktion mit Flüssigchromatographie. Diese als online-SPE-LC bezeichnete Technik verfügt über eine Reihe von Vorteilen, insbesondere durch die Automatisierung der Probenvorbereitung. Online-SPE-LC-Methoden sind im Allgemeinen schneller, kostengünstiger und genauer als die manuell durchgeführten Varianten. Die Übertragung dieser Vorteile auf die Mykotoxin-Analytik und ihre Anwendung in der Laborroutine standen im Zentrum der durchgeführten Entwicklungsarbeiten.

1.1 Guter Schimmel – böser Schimmel

Jedem ist das schon einmal passiert – weißer oder grüner Flaum überzieht das Brot, das man gestern noch mit Genuss gegessen hat. Das Brot ist verschimmelt, und man erinnert sich an „Omas Legenden“ über Schimmel und seine Giftigkeit.

Mit dem umgangssprachlichen Begriff „Schimmel“ sind dabei Mikro-pilze gemeint, die sich z.B. in Lebensmitteln entwickeln und zu deren Verderb führen. Nach wissenschaftlicher Definition zeichnen sich Schimmelpilze durch die in Tab. 1-1 zusammengefassten Eigenschaften aus.

Schimmelpilze begleiten den Menschen seit jeher, teils zu seinem Nutzen, teils zu seinem Schaden. „Guter Schimmel“ veredelt Lebensmittel und ermöglicht erst den Genuss von Camembert oder bestimmten Salami-Sorten. „Böser Schimmel“ hingegen führt zu Lebensmittelverderb (spontan verschimmelte Lebensmittel) und kann gesundheitsschädlich sein, sei es durch Auftreten in feuchten Räumen oder durch Bildung toxischer Stoffe in Lebensmitteln.

Letztere sind die sogenannten Mykotoxine, abgeleitet von den Begriffen Myko = Pilz (griechisch) und Toxin = Gift (griechisch-neulateinisch) (DUDEN FREMDWÖRTERBUCH, 1990). Bei diesen Schimmelpilzgiften handelt es sich um Sekundärmetabolite (vergl. Tab. 1-1), die nicht der Aufrechterhaltung der primären Lebensfunktionen der Pilze dienen (TRUCKSESS et al., 2001, S. 4). Vielmehr haben diese Substanzen den Zweck, konkurrierende Mikroorganismen wie beispielsweise Bakterien zu schädigen, um sich selbst besser entwickeln zu können.

Wie BENNETT et al. (2003) darlegen, ist der Begriff „Mykotoxin“ allerdings erst 1962 als Folge der von Aflatoxinen verursachten Turkey X-Krankheit geprägt worden, davor waren die entsprechenden toxischen Substanzen wie Ergotalkaloide (Mutterkorn) als Pilzgifte („fungal toxins“) bezeichnet worden.

Das Interesse des Menschen an diesen Mykotoxinen, dokumentiert durch die Anzahl von einschlägigen Internet-Seiten (Tab. 1-2), beruht dabei auf ihrer unangenehmen Eigenschaft, nicht nur toxisch für Mikroorganismen zu sein, sondern auch Menschen, Tieren und Pflanzen erheblichen Schaden zufügen zu können, vergl. 1.2.

Aus diesem Grund interessieren sich Wissenschaftler einerseits für die Bedingungen, unter denen Mykotoxine gebildet werden, andererseits ist die Neu- und Weiterentwicklung von Analysemethoden zur quantitativen Bestimmung von Mykotoxinen ein großes Forschungsgebiet.

Tab. 1-1. Definition Schimmelpilze (nach WEIDENBÖRNER, 2000, S. 127)

Definition Schimmelpilze
ruderales Lebensstrategie
filamentöse Wuchsform
hohe Wachstumsgeschwindigkeit
hohe Sporulationsfähigkeit
überwiegend vegetative Vermehrung
parasexueller Zyklus
Empfindlichkeit gegenüber Bodenfungistasis
ubiquitäres Vorkommen
universelle geographische Verbreitung
ausgeprägte Metabolitbildung (→ Mykotoxine)

Tab. 1-2. Treffer für Schimmelpilz-bezogene Begriffe auf der Internet-Suchmaschine Google

(www.google.de, Stand: 02.04.06)

Begriff	Treffer
Mykotoxin	44.200
Mycotoxin	586.000
Schimmel ¹	5.920.000
Mould ²	12.200.000
Mold ³	57.900.000
Schimmelpilz	625.000
Schimmelpilzgift	13.600
Aflatoxin	1.440.000
Patulin	141.000

¹ Anm.: hierunter fallen auch Treffer für Klaviere und Pferde

² Britisches Englisch: Schimmel

³ Amerikanisches Englisch: Schimmel

1.2 Eine kurze Geschichte der Mykotoxine

Wie in 1.1 dargestellt, begleiten Mykotoxine die Menschheit seit jeher. Auch die potentielle Giftigkeit von Schimmel gehört schon lange zum Wissen der Menschen (KRÄMER, 1997). Am längsten bekannt ist dabei die Gefährlichkeit des **Mutterkorns**, der Dauerform des Pilzes *Claviceps purpurea*, der vor allem Roggen befällt. Mutterkorn enthält 0,25 bis 1 % Mutterkorn-Alkaloide, die die Krankheit „Ergotismus“ auslösen. Ergotismus äußert sich in Nervenschäden und absterbenden Gliedmaßen und war im Mittelalter als „St. Antonius-Feuer“ oder „Brennend schmerzhaftes Höllenfeuer“ bekannt. Die Zuordnung der Erkrankung zum Mutterkorn gelang im 18. Jahrhundert (WEIDENBÖRNER, 2000, 2001; KRÄMER, 1997; TASHAN, 2005).

Anfang des 20. Jahrhunderts wurde in der damaligen UdSSR mit der **Alimentären toxischen Aleukie** (ATA) eine weitere von Mykotoxinen verursachte Krankheit beschrieben. Sie trat vermutlich zuerst im Jahre 1891 auf und forderte bis in die Jahre nach dem Zweiten Weltkrieg mehrere Hunderttausend Menschenleben. Die Krankheit äußert sich in einer Verringerung der Leukozytenzahl, einer Schädigung des Knochenmarks sowie Hautnekrosen. Verursacht wurde die Krankheit damals durch den Verzehr von auf dem Feld überwintertem Getreide, das mit Schimmel der Gattung Fusarien befallen war. Die Fusarien bildeten eine Reihe von Mykotoxinen der Gruppe der Trichothecene wie T-2 Toxin, Nivalenol, HT-2 Toxin etc. (WEIDENBÖRNER, 2000, 2001).

In den 50er Jahren des vergangenen Jahrhunderts wurde erstmals eine Erkrankung namens **Balkan endemic nephropathy** (BEN; Balkan endemische Nephropathie) beschrieben, die in der bulgarischen Provinz Vratza auftrat. BEN äußert sich in Nierenschäden, einhergehend mit einer stark erhöhten Nierentumorrates. Eine genaue Ursache konnte damals nicht ermittelt werden, jedoch scheinen Schimmelpilze (*Aspergillus*, *Penicillium* und andere) und die von ihnen produzierten Mykotoxine, insbesondere Ochratoxin A (OTA), die Verursacher der Krankheit zu sein (WEIDENBÖRNER, 2001).

Kurz nach BEN trat eine sehr giftige Substanzklasse ins Interesse der Öffentlichkeit – die **Aflatoxine**. Im Jahre 1960 starben in Großbritannien rund 100.000 Truthähne an der sogenannten „Turkey X“-Krankheit. Als Verursacher wurde das Futter ermittelt: brasilianisches Erdnussmehl. Man erkannte, dass die Schimmelpilze der Art *Aspergillus* für das Sterben verantwortlich waren, genauer gesagt die von ihnen produzierten Substanzen, denen man den Namen „Aflatoxine“ gab, abgeleitet vom Namen des verursachenden Pilzes *Aspergillus flavus* und dem Wort **Toxin**, dem Fachbegriff für Gift (WEIDENBÖRNER, 2001, S. 245, 4ff).

Dieser Vorfall zog auch die Bildung des Begriffs „Mykotoxin“ im Jahre 1962 nach sich, der den fast synonymen Begriff „Pilzgift“ für die unter 1.1 beschriebene Gruppe von Substanzen ablöste. Unter diesem Begriff fasste man nun alle niedermolekularen Sekundärmetabolite von Schimmelpilzen zusammen, zur genauen Definition siehe 1.1. Neben den Aflatoxinen wurden beispielweise auch das zuerst als Antibiotikum eingestufte Patulin und die lange bekannten Mutterkornalkaloide jetzt als „Mykotoxine“ klassifiziert, in Abgrenzung zu den Pilzgiften, die von Ständerpilzen und anderen giftigen Makropilzen gebildet werden, beispielweise vom Fliegenpilz oder vom Knollenblätterpilz (BENNETT et al., 2003).

Eine weitere Folge des Ausbruchs der tödlichen Aflatoxikose im Jahre 1960 war das explosionsartig steigende Interesse an Mykotoxinen, so dass der Zeitraum zwischen 1960 und 1975 auch als „Mykotoxin-Goldrausch“ bezeichnet wird (MAGGON et al., 1977). Die hohe Anzahl an Wissenschaftlern, die sich „im Goldrausch“ mit der finanziell gut ausgestatteten Mykotoxin-Forschung beschäftigten, kann heute noch an der relativ großen Zahl an wissenschaftlichen Veröffentlichungen zu diesem Thema im o.g. Zeitraum abgelesen werden.

Eine „Karriere“ vom Antibiotikum zum Mykotoxin erlebte das **Patulin**: Im Jahre 1943 wurde die Substanz als Antibiotikum beispielsweise gegen Erkältung in klinischen Versuchen (PATULIN CLINICAL TRIALS COMMITTEE, 1943) erprobt. Jedoch wurde in den Versuchen offensichtlich, dass Patulin toxische Nebenwirkungen hervorrief, so dass die Substanz in den 60er Jahren unter dem neu definierten Begriff „Mykotoxin“ re-klassifiziert wurde (BENNETT et al., 2003), vergl. 1.4.1.

Das aktuelle Wissen über Mykotoxine ist sehr umfangreich und umfasst viele wissenschaftliche Fachbereiche, von der Toxikologie über biochemische Bildungswege bis hin zu einer Vielzahl an Analysemethoden. Der Forschung sind heute rund 400 Mykotoxine bekannt, die von etwa 350 verschiedenen Schimmelpilz-Spezies gebildet werden (WEIDENBÖRNER, 2001, S. 172). Dabei sind die Gattungen *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* und *Alternaria* die bedeutendsten.

Tab. 1-3 zeigt die sieben wichtigsten in Lebensmitteln auftretenden Mykotoxine bzw. Mykotoxingruppen und die Haupt-Risikolebensmittel; ihre Eigenschaften sind in Tab. 1-4 zusammengestellt (mit Ausnahme von Patulin und Aflatoxin). Die Eigenschaften dieser Mykotoxine, mit denen sich diese Doktorarbeit befasst, sind unter den jeweiligen Unterkapiteln (Aflatoxine: 1.3.2, Tab. 1-6; Patulin: 1.4.2, Tab. 1-12) zu finden.

Tab. 1-3. Die sieben wichtigsten in Lebensmitteln auftretenden Mykotoxine

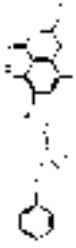
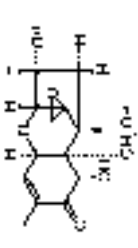
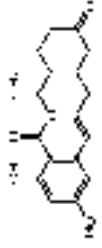

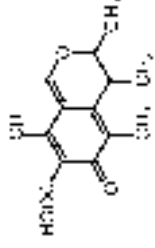
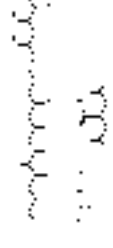
Mykotoxin(gruppe)	Wichtigste Risiko-Lebensmittel ¹
Aflatoxine	Nüsse und Samen (Erdnüsse, Mandeln, Pistazien etc.), Gewürze (Paprika, Pfeffer usw.), Mais und Maisprodukte; Milch und Milchprodukte
Citrinin	Reis und andere Getreidearten
Fumonisine	Mais und Maisprodukte
Ochratoxin A	Getreide und Getreideprodukte, Wein, Trauben, Kakao, Kaffee
Patulin	Früchte und Fruchtprodukte, in erster Linie Äpfel und Apfelprodukte, auch Pfirsiche, Birnen etc.
Trichothecene (DON, T-2 Toxin etc.)	Getreide und Getreideprodukte
Zearalenon	Getreide und Getreideprodukte, v.a. Mais

¹ nach WEIDENBÖRNER (2001), JELINEK et al. (1989), EU-KONTAMINANTEN-HÖCHSTGEHALTSVERORDNUNG 466/2001, MYKOTOXIN-HÖCHSTMENGENVERORDNUNG (MHmV)

Die unter dem Begriff Mykotoxine zusammengefassten Substanzen sind dabei chemisch sehr heterogen, so dass analytische Methoden den spezifischen chemisch-physikalischen Eigenschaften sowohl des jeweiligen Mykotoxins als auch der entsprechenden Matrix angepasst werden müssen.

Die im Rahmen der Forschung erkannte Gefährlichkeit von Mykotoxinen für Menschen und Tiere in Verbindung mit der Entwicklung immer empfindlicherer und genauerer Analysemethoden führte weltweit zur Festsetzung von Grenzwerten. Die Europäische Union (EU) hat in der Kontaminanten-Höchstgehaltsverordnung 466/2001 Grenzwerte für Aflatoxine, Deoxynivalenol (DON), Ochratoxin A (OTA), Zearalenon und Patulin festgelegt; Höchstgehalte für Fumonisine sowie für T-2 und HT-2 Toxin sind in Vorbereitung. Diese Höchstgehalte werden im deutschen Recht um Grenzwerte in der Mykotoxin-Höchstmengenverordnung (MHmV) und der Diätverordnung ergänzt. Für Aflatoxine und Patulin wird in den jeweiligen Kapiteln (1.3.6 und 1.4.6) auf die rechtliche Situation detaillierter eingegangen. Einen Überblick über die zum Zeitpunkt der Dissertation in Deutschland geltenden Höchstgehalte für die übrigen Mykotoxine gibt Tab. 1-5.

Tab. 1-4. Steckbriefe der wichtigsten Mykotoxine (s. auch Tab. 1-3; Aflatoxine: Tab. 1-6; Patulin: Tab. 1-12) (nach WEIDENBÖRNER, 2001; MERCK, 2006)

Mykotoxin	Chem. Struktur	Summenformel	Molgewicht	Wichtigste Produzenten	Toxizität	LD ₅₀ (oral)	Anmerkungen
Ochratoxin A (OTA)		C ₂₀ H ₁₈ O ₆ NCl	402 g/mol	<i>A. ochraceus</i> , <i>A. alutaceus</i> , <i>P. verrucosum</i>	Stark nierenschädigend, cancerogen, mutagen, teratogen	20-22 mg/kg Körpergewicht (Ratte)	tritt auch in gemäßigten Breiten häufiger auf
Deoxynivalenol (DON)		C ₁₅ H ₂₀ O ₆	296 g/mol	Fusarien-Spezies: <i>F. culmorum</i> , <i>F. graminearum</i>	Erbrechen, Gewichtsverlust, Hämorrhagien, immunsuppressiv	46 mg/kg Körpergewicht (Maus)	Synonym: Vomitoxin
Zearalenon		C ₁₈ H ₂₂ O ₅	318 g/mol	div. Fusarien: <i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i>	Hormonähnliche Wirkungen: Veränderungen an Uterus, Vagina; Unfruchtbarkeit	> 4000 mg/kg Körpergewicht (Ratte)	*keine akute Toxizität
T-2 Toxin (s. Abb.) HT-2 Toxin		C ₂₄ H ₃₄ O ₉ (T-2) C ₂₂ H ₂₃ O ₈ (HT-2)	466 (T-2), 415 (HT-2) g/mol	<i>F. graminearum</i> , <i>F. acuminatum</i>	Dermatotoxisch, Erbrechen	T-2: 4 mg/kg Körpergewicht (Ratte)	
Citrinin		C ₁₃ H ₁₄ O ₅	250 g/mol	div. Aspergillus- und Penicillium-Spezies, <i>M. purpureus</i>	Fötotoxisch, nieren- und leberschädigend	50 mg/kg Körpergewicht (Ratte)	Möglicher synergistischer Effekt mit OTA
Fumonisin B ₁ (Abb.), B ₂ , B ₃		721 (B ₁), 705 (B ₂), 705 (B ₃) g/mol		<i>Fusarium moniliforme</i> , <i>F. proliferatum</i>	Leukoencephalomalacie, Leberkrebs, Lungenödeme	-	

Eine Übersicht über die in den einzelnen Staaten der Erde geltenden Grenzwerte liefert der FAO-Bericht aus dem Jahre 1997 (Food and Nutrition Paper 64), modifiziert wiedergegeben von WEIDENBÖRNER (2001). Diese Darstellung wurde inzwischen aktualisiert und auf den Stand von 2003 gebracht (FAO, 2004: Food and Nutrition Paper, 84). Die FAO stellt dabei fest, dass die Anzahl an Ländern, die spezifische Bestimmungen für Mykotoxine erlassen haben, mit den Jahren stark gewachsen ist.

Tab. 1-5: In Deutschland geltende Höchstgehalte für die wichtigsten Mykotoxine
(Stand 01.10.2006) (außer: Aflatoxine: Tab. 1-9; Patulin: Tab. 1-13)

Erzeugnis	Höchstgehalt (µg/kg)	Rechtliche Grundlage
OCHRATOXIN A		
Rohe Getreidekörner (einschließlich Rohreis und Buchweizen)	5,0	466/2001
Alle aus Getreide gewonnenen Erzeugnisse	3,0	466/2001
Getrocknete Weintrauben (Korinthen, Rosinen und Sultaninen)	10,0	466/2001
Getrocknete Feigen	2	MHmV
Sonstiges Trockenobst	8	MHmV
Geröstete Kaffeebohnen sowie gemahlener gerösteter Kaffee außer löslicher Kaffee	5,0	466/2001
Löslicher Kaffee (Instant-Kaffee)	10,0	466/2001
Wein sowie andere Getränke auf Wein- und/oder Traubenmostbasis	2,0	466/2001
Traubensaft, Traubensaftzutaten in anderen Getränken, einschließlich Traubennektar und konzentrierter rekonstituierter Traubensaft	2,0	466/2001
Getreidebeikost und andere Beikost für Säuglinge und Kleinkinder	0,50	466/2001
Diätetische Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke, die eigens für Säuglinge bestimmt sind	0,50	466/2001
DEOXYNIVALENOL (DON)		
Andere unverarbeitete Getreide als Hartweizen, Hafer und Mais	1250	466/2001
Unverarbeiteter Hartweizen und Hafer	1750	466/2001
Getreidemehl, einschließlich Maismehl, Maisgrits und Maisschrot	750	466/2001
Brot, Feine Backwaren, Kekse, Getreide-Snacks und Frühstückscerealien	500	466/2001
Brot, Kleingebäck und Feine Backwaren	350 ¹	MHmV
Andere Getreideerzeugnisse	500 ¹	MHmV
Teigwaren (trocken)	750	466/2001
Getreidebeikost und andere Beikost für Säuglinge und Kleinkinder	200	466/2001
Getreideerzeugnisse für Diätetische Lebensmittel für Säuglinge und Kleinkinder	100 ¹	DiätV
ZEARALENON		
Andere unverarbeitete Getreide als Mais	100	466/2001
Getreidemehl, ausgenommen Maismehl	75	466/2001
Brot, Feine Backwaren, Kekse	50	466/2001
Getreide-Snacks und Frühstückscerealien (nicht aus Mais)	50	466/2001
Getreideerzeugnisse	50 ¹	MHmV
Getreidebeikost und andere Beikost für Säuglinge und Kleinkinder (nicht aus Mais)	20	466/2001
Getreideerzeugnisse für Diätetische Lebensmittel für Säuglinge & Kleinkinder	20	DiätV

Erzeugnis	Höchstgehalt (µg/kg)	Rechtliche Grundlage
FUMONISINE B₁ und B₂		
Maiserzeugnisse, ausgenommen Cornflakes	500	MHmV
Cornflakes	100	MHmV
Maiserzeugnisse für Diätetische Lebensmittel für Säuglinge und Kleinkinder	100	DiätV

¹ Achtung: teilweise Widerspruch zum EU-Recht

² Rechtsgrundlagen:

466/2001: KONTAMINANTEN-HÖCHSTGEHALTSVERORDNUNG 466/2001

MHmV: MYKOTOXIN-HÖCHSTMENGENVERORDNUNG

DiätV: DIÄTVERORDNUNG

1.3 Aflatoxine

Aflatoxine genießen eine Sonderstellung unter den Mykotoxinen. Auch wenn ihre Bedeutung verhältnismäßig spät entdeckt wurde (1.3.1), sorgt eine Reihe von herausragenden Eigenschaften dafür, dass dieser Substanzgruppe besonderes Augenmerk von Wissenschaftlern und Gesetzgebern zuteil wird:

- **ubiquitäre Verbreitung:** Schimmelpilze, die potenziell Aflatoxine bilden können, kommen grundsätzlich weltweit vor. Jedoch ist der Anteil an belasteten Lebensmitteln in warmen Regionen der Erde deutlich höher. Durch den weltweiten Handel mit Lebensmitteln werden immer wieder auch Aflatoxin-belastete Lebensmittel in gemäßigte Breiten importiert.
- **sehr hohe Toxizität:** Aflatoxine zeigen eine Reihe von toxischen Eigenschaften. Während die akute Toxizität heutzutage nur eine geringe Rolle spielt, wird besondere Aufmerksamkeit der Aufnahme von sub-akuttoxischen Aflatoxin-Mengen geschenkt. Die chronische Toxizität äußert sich einerseits in Leberschädigungen, andererseits in der „unangenehmen“ Eigenschaft von Aflatoxinen, Krebs auslösen zu können. So gilt das am weitesten verbreitete Aflatoxin B₁ als stärkstes natürliches Cancerogen. Näheres findet sich unter 1.3.5.
- **Vorkommen in Nestern:** Die inhomogene Verteilung von Aflatoxinen in vielen Lebensmitteln durch die Bildung von Schimmelnestern (1.3.4) stellt besondere Herausforderungen an die Probenahme. Bereits einzelne verschimmelte Nüsse können eine signifikante Kontamination einer ganzen Partie verursachen.

Diese unerwünschten Eigenschaften sorgen zum einen für eine erhöhte Aufmerksamkeit des Gesetzgebers (1.3.6), zum anderen sind Aflatoxine ein beliebtes Forschungsgebiet für Analytiker, Mikrobiologen, Toxikologen, Veterinäre, Biochemiker und andere Fachrichtungen, wie die hohe Zahl von 7495 Fach-Publikationen* in der Primärliteratur verdeutlicht.

*Stand: 22.07.2006, Stichwort: „Aflatoxin“, Seite www.pubmed.gov der US-amerikanischen National Library of Science

1.3.1 Historisches: Der Truthahn-Tod

Bereits im Jahre 1910 wurde die Toxizität von Aflatoxinen von Kühl beschrieben (WEIDENBÖRNER, 2000). In das Interesse der Öffentlichkeit traten die Aflatoxine jedoch erst im Jahre 1960 (vergl. 1.2), als mehr als 100.000 Truthähne in Großbritannien qualvoll verendet sind. Als Ursache wurde schließlich das Futter ermittelt: Erdnussmehl aus Brasilien. Dieses Nebenprodukt der Erdnussöl-Produktion, das auch unter dem Namen Rosetimehl bekannt ist, war belastet mit Schimmelpilzen der Gattungen *Aspergillus flavus* Link bzw. *Aspergillus parasiticus* Speare. Das Mehl enthielt vier Substanzen, die grüne und blaue Fluoreszenz zeigten: die Aflatoxine waren entdeckt, benannt nach einem der toxinbildenden Pilze *Aspergillus flavus*. Die von diesen Toxinen ausgelöste Aflatoxikose, auch als „Turkey X“-Krankheit bzw. -Syndrom bekannt, äußerte sich in Hämorrhagien, Leber- und Nierenschäden. In diese Zeit fällt auch das Auftreten von Lebertumoren bei Regenbogenforellen in den USA, verursacht durch Aflatoxin-kontaminierte Baumwollsaamen im Futter (JAIMEZ et al., 2000).

Nicht nur bei Truthähnen, sondern auch beim Menschen sind Ausbrüche einer akuten Aflatoxikose bekannt, insbesondere in unterentwickelten Ländern. Wie das CENTER FOR FOOD SAFETY & APPLIED NUTRITION (1992, laufend aktualisiert) der FDA berichtet, sind mindestens zwei ältere Fälle einer akuten Aflatoxin-Vergiftung bei einer Gruppe von Menschen bekannt. Im Herbst 1974 erkrankten 397 Personen aus 150 Dörfern in einem Gebiet

im Nordwesten Indiens an einer akuten Aflatoxikose. Von diesen Erkrankten starben 108, entsprechend 27 %. Die Krankheit äußerte sich in hohem Fieber, rasch fortschreitender Gelbsucht, Ödemen an den Gliedmaßen, Schmerzen, Erbrechen und Leberschwellungen. Eine histopathologische Untersuchung ergab folgende Befunde: fortgeschrittene Wucherungen der Gallenkanäle, periportale Leber-Fibrosen, gastrointestinale Hämorrhagien. Ursache für diese Vergiftungserscheinungen war der Konsum von Aflatoxin-belastetem Mais, der gemäß späteren Untersuchungen zwischen 250 und 15.000 µg/kg (!) Aflatoxine enthielt – der derzeit gültige Grenzwert in der EU für Gesamt-Aflatoxine liegt bei 4 µg/kg. Die tägliche Aflatoxin B₁-Aufnahme der betroffenen Personen wurde auf mindestens 55 µg/kg Körpergewicht geschätzt, für eine unbestimmte Anzahl von Tagen. Eine zehn Jahre später durchgeführte Nachuntersuchung der Überlebenden ergab allerdings eine vollständige Erholung von den Krankheitssymptomen.

Ein zweiter Fall wurde im Jahr 1982 aus Kenia gemeldet, wo 20 Menschen in ein Krankenhaus eingewiesen wurden, von denen 60 % (zwölf Personen) starben. Die tägliche Aflatoxin-Aufnahme wurde auf mindestens 38 µg/kg Körpergewicht geschätzt, für eine unbestimmte Dauer.

In den letzten Jahren sind wieder vermehrt akute Fälle von Aflatoxikosen in Folge der herrschenden Wetterbedingungen in Afrika aufgetreten. Im Jahr 2004 erkrankten im Osten Kenias 317 Menschen an akuter Aflatoxikose, von denen 125 starben (AZZIZ-BAUMGARTNER et al., 2005). Im Rahmen dieses Ausbruchs wurden Maisproben von örtlichen Märkten und aus Eigenanbau analysiert. Es zeigte sich, dass die Proben erheblich mit Aflatoxinen kontaminiert waren: 55 % der Proben überschritten den in Kenia geltenden Gesamt-Aflatoxin-Grenzwert von 20 µg/kg (zum Vergleich: EU-Grenzwert 4 µg/kg), 35 % zeigten Gehalte > 100 µg/kg und 7 % gar Gehalte > 1.000 µg/kg. In den Gegenden mit der höchsten Anzahl von Aflatoxikose-Fällen wurde auch eine höhere durchschnittliche Aflatoxin-Belastung festgestellt als in Gegenden mit nur wenigen Fällen (Mittelwerte 53 µg/kg gegenüber 8 µg/kg). Auch zeigte die Belastung der Lebensmittel in Patientenhaushalten signifikant höhere Werte als die in Kontrollhaushalten (355 µg/kg gegenüber 44 µg/kg). Da zugleich virale Leberinfektionen als Krankheitsursache ausgeschlossen werden konnten, stehen die Krankheitsfälle in direktem Zusammenhang mit der nachgewiesenen sehr hohen Aflatoxin-Belastung der Nahrung (LEWIS et al., 2005).

Als Ursache für diese Kontamination des Mais wurde eine von Trockenheit verursachte schlechte Ernte ermittelt, die geschädigten Mais hervorbrachte, welcher wiederum anfällig für Schimmelpilze ist. Aus Angst vor Dieben wurde der Mais darüber hinaus vermehrt zu Hause statt wie sonst in Kornkammern gelagert. Wegen der größeren Feuchte und Wärme in den Häusern entwickelten sich die Schimmelpilze noch besser (BARRETT, 2005).

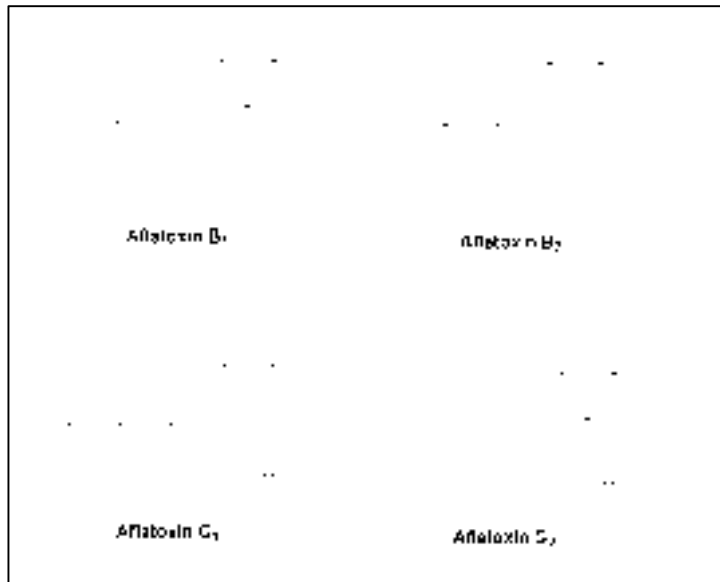
Aufgrund der im Folgenden beschriebenen Eigenschaften von Aflatoxinen ist jedoch davon auszugehen, dass diese Mykotoxine den Menschen seit jeher begleiten – und schädigen. Der Verzehr von verschimmelten Lebensmitteln, ob bewusst (z.B. in Notzeiten) oder unbewusst (wenn der Schimmel in verarbeiteten Lebensmitteln nicht mehr sichtbar ist), wird insbesondere in warmen Klimaten seit langem zu Leberschäden und Krebserkrankungen geführt haben.

Skurriles am Rande: Toxikologisches Selbst-Experiment

Die o.g. Quelle (CENTER FOR FOOD SAFETY & APPLIED NUTRITION, 1992, laufend aktualisiert) berichtet darüber hinaus von einem Selbstmordversuch durch Aflatoxin-Aufnahme: Ein Labormitarbeiter mit entsprechendem Zugang zu Chemikalien hat versucht, sich mit der zweitägigen Aufnahme von jeweils 12 µg Aflatoxin B₁ je Kilogramm Körpergewicht das Leben zu nehmen, sechs Monate später hat er den Versuch mit täglich 11 µg/kg Körpergewicht über 14 Tage wiederholt. Außer vorübergehendem Ausschlag, Übelkeit und Kopfschmerzen konnten keine weiteren Krankheitssymptome beobachtet werden. In einer Nachuntersuchung 14 Jahre später wurden keine Auffälligkeiten, auch nicht der Leberfunktionen, festgestellt.

1.3.2 Chemisches: Blaue und grüne Fluoreszenz

Aus chemischer Sicht handelt es sich bei Aflatoxinen um Difurancumarin-Derivate. Abb. 1-1 zeigt die chemischen Strukturen der wichtigsten Aflatoxine. Die übrigen Aflatoxine sind Derivate der abgebildeten Grundformen.



Aus der Gruppe der Aflatoxine sind derzeit rund 20 Toxine bekannt, u.a. Aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂, M₁, M₂, B_{2a}, G_{2a}, B₃, GM₁, M₄, P₁ und Q₁. Von Schimmelpilzen natürlich gebildet werden jedoch nur die Aflatoxine B₁, B₂, G₁ und G₂, darüber hinaus spielen die Aflatoxine M₁ und M₂ mengenmäßig eine wichtige Rolle. Die M-Aflatoxine sind wie auch die übrigen Aflatoxine Metabolisierungsprodukte der Aflatoxine B₁, B₂, G₁ und G₂.

Abb. 1-1.
Chemische Struktur der wichtigsten Aflatoxine

Die Benennung der Aflatoxine erfolgt dabei nach folgendem Muster:

- Aflatoxine B und G: Die Buchstaben bezeichnen die Farbe der Fluoreszenz unter UV-Licht, die von den Substanzen emittiert wird. Die Aflatoxine B₁ und B₂ fluoreszieren **blau** (blue), die Aflatoxine G₁ und G₂ hingegen **grün** (green).
- Aflatoxin M: Bei den M-Aflatoxinen handelt es sich um Metabolite, die vom Säugetierkörper gebildet werden und sich dementsprechend unter anderem in der **Milch** (milk) nach Aufnahme von Aflatoxin-belastetem Futter nachweisen lassen.
- Der Index bezeichnet die relative chromatographische Mobilität bezogen auf ein Normalphasensystem. Daraus folgt, dass auf einer Umkehrphase (s. 1.7 Flüssigchromatographie) Aflatoxin B₁ später als B₂ eluiert, ebenso G₁ später als G₂.

(WEIDENBÖRNER 2000, 2001)

Tab. 1-6 fasst die wichtigsten Eigenschaften der o.g. relevanten Aflatoxine zusammen. Die Aflatoxine B₁ und G₁ unterscheiden sich von den jeweiligen Varianten mit dem Index 2 durch eine zusätzliche Doppelbindung. Diese Substanzen zeigen eine deutlich geringere Fluoreszenz. Verursacht wird dieser Effekt augenscheinlich durch eine geringere Starrheit (vergl. MAIER, 1992): Die Substituenten an der C-C-Doppelbindung liegen planar, d.h. es wirken geringere Abstoßungskräfte. Vermutlich wird das Molekül dadurch weniger sterisch gehindert, immitierte Strahlungsenergie in Schwingungsenergie statt in Emissionsstrahlung (Fluoreszenz) umzuwandeln. Erst nach Derivatisierung beispielsweise mit Brom oder Iod und der damit verbundenen Sättigung der Doppelbindung weisen auch die Aflatoxine B₁ und G₁ hinreichende Fluoreszenz auf und können sehr gut mittels LC-FLD detektiert werden.

Tab. 1-6. Aflatoxine – allgemeine Eigenschaften (nach MERCK, 2006)

Aflatoxin	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
Chemischer Name	(6a <i>R</i> - <i>cis</i>)-2,3,6a,9a-Tetrahydro-4-methoxycyclopenta[<i>c</i>]furo[3',2':4,5]furo[2,3- <i>h</i>][1]-benzopyran-1,11-dion	(6a <i>R</i> - <i>cis</i>)-2,3,6a,8,9,9a-Hexahydro-4-methoxycyclopenta[<i>c</i>]furo[3',2':4,5]furo[2,3- <i>h</i>][1]benzopyran-1,11-dion	(7a <i>R</i> ,10a <i>S</i>)-3,4,7a,10a-Tetrahydro-5-methoxy-1 <i>H</i> ,12 <i>H</i> -furo[3',2':4,5]furo[2,3- <i>h</i>]pyrano[3,4- <i>c</i>][1]benzopyran-1,12-dion	(7a <i>R</i> ,10a <i>S</i>)-3,4,7a,9,10,10a-Hexahydro-5-methoxy-1 <i>H</i> ,12 <i>H</i> -furo[3',2':4,5]furo[2,3- <i>h</i>]pyrano[3,4- <i>c</i>][1]benzopyran-1,12-dion
Summenformel	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	C ₁₇ H ₁₄ O ₇
Molgewicht	312,27 g/mol	314,29 g/mol	328,27 g/mol	330,29 g/mol
Schmelzpunkt	268-269 °C	286-289 °C	244-246 °C	237-240 °C
Max. UV-Absorption	223 nm (in Ethanol)	363 nm (in Ethanol)	362 nm (in Ethanol)	363 nm (in Ethanol)
LD₅₀ oral in 1 Tag alten Entenküken	18,2 µg/50 g Körpergewicht	84,8 µg/50 g Körpergewicht	39,2 µg/50 g Körpergewicht	172,5 µg/50 g Körpergewicht
LD₅₀ i.p. in mice	9,5 mg/kg Körpergewicht	-	-	-

1.3.3 Mikrobiologisches: Eine *Aspergillus*-Spezialität

Aflatoxine werden nach derzeitigem Stand nur von drei Spezies der Gattung *Aspergillus* gebildet: dem namensgebenden Pilz *Aspergillus flavus* Link (Abb. 1-2), *Aspergillus parasiticus* Speare und *Aspergillus nomius* Kurtzman et al. Etwa 50 % der *A. flavus*-Stämme sind Aflatoxinbildner, wobei der Prozentsatz in wärmeren Klimaten augenscheinlich deutlich höher liegt. So waren in der ehemaligen CSSR nur 0,8 % von 694 getesteten Stämmen Aflatoxin-positiv (WEIDENBÖRNER, 2000).

Bildungsweg

Der vorgeschlagene natürliche Syntheseweg beginnt beim Ausgangsprodukt Acetat, die wichtige C₂-C₃-Doppelbindung tritt erstmals bei der Substanz Versicolor A auf. Über die folgenden Zwischenprodukte Sterigmatocystin (selbst ein Mykotoxin) und O-Methylsterigmatocystin wird schließlich Aflatoxin B₁ gebildet (Abb. 1-3).

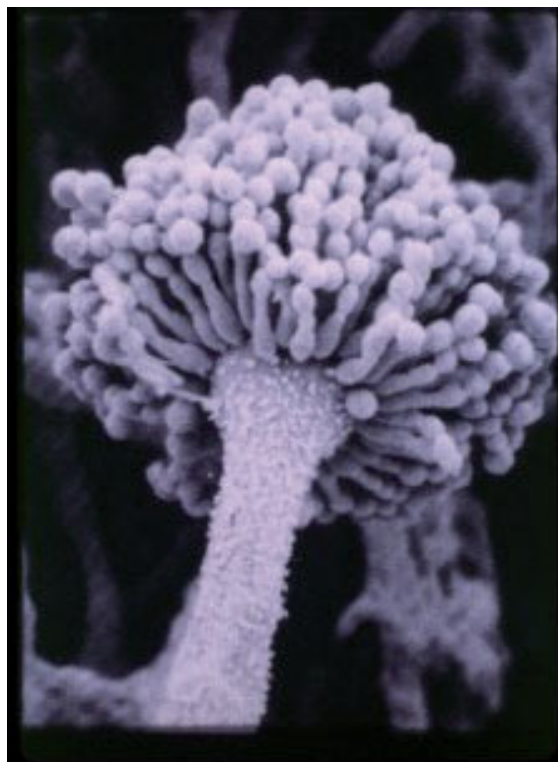


Abb. 1-2. *Aspergillus flavus* (Quelle: <http://ehso.com/ehshome/aflatoxin.php>, 18.10.06)

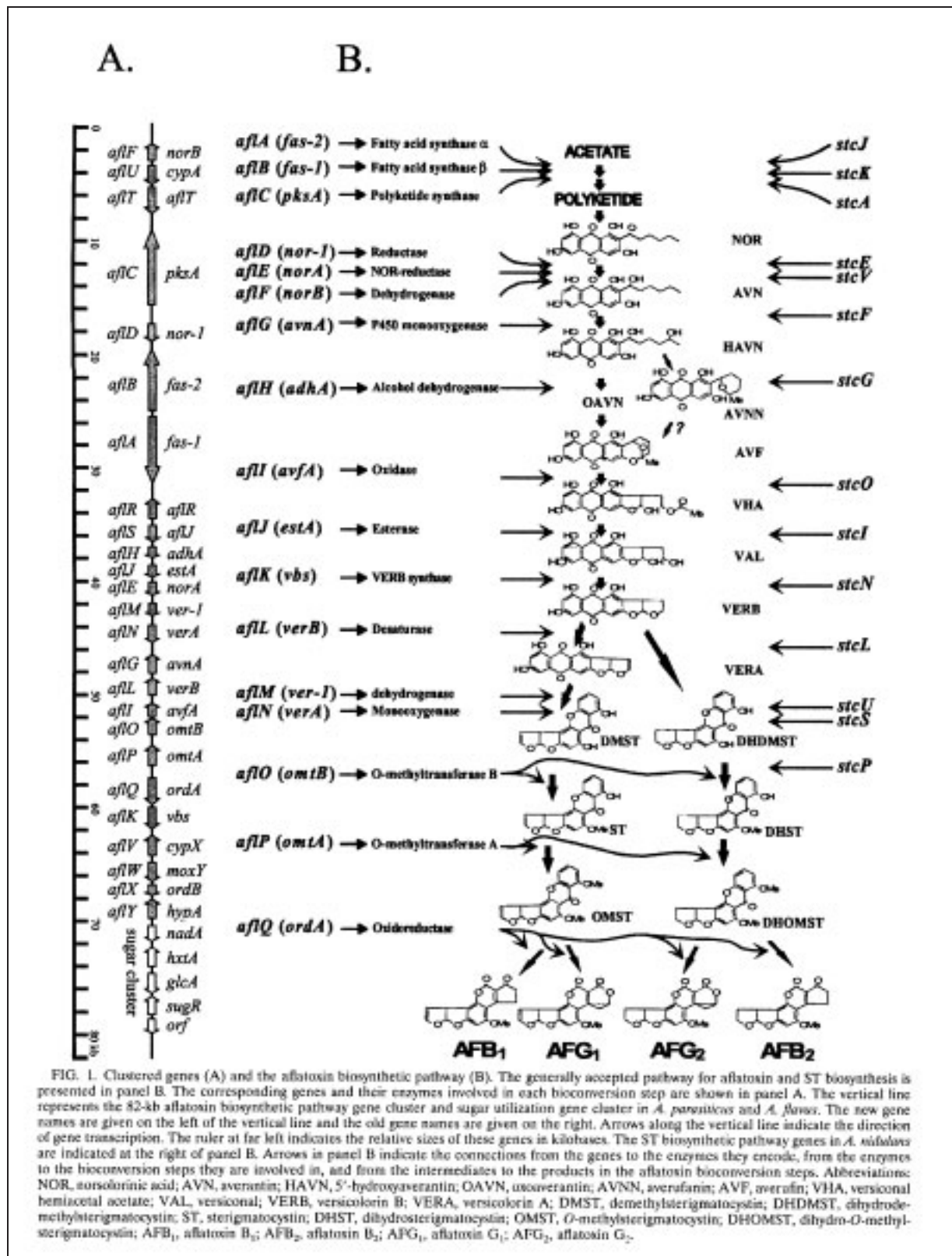


Abb. 1-3. Biosynthese von Aflatoxin B₁ (aus: YU et al., 2004)

Die höchste Aflatoxinsyntheserate tritt in der Phase des maximalen Wachstums in der sog. Log-Phase oder exponentiellen Phase auf. In den Konidien und Sklerotien der Pilze können erhebliche Mengen Aflatoxine gebildet werden, wie das Beispiel *A. flavus* zeigt: In den Konidien konnten bis zu 84 mg/kg Aflatoxin B₁ und bis zu 566 mg/kg Aflatoxin G₁ nachgewiesen

werden, in den Sklerotien bis zu 135 mg/kg Aflatoxin B₁ und 968 mg/kg Aflatoxin G₁ (WEIDENBÖRNER, 2000).

Aus diesen Zahlen wird deutlich, dass beim Wachstum von Aflatoxin-bildenden Pilzen in Lebensmitteln schnell die gesetzlichen Grenzwerte (1.3.6), die im unteren µg/kg-Bereich und damit im Vergleich zu o.g. Zahlen um den Faktor 10.000 niedriger liegen, erreicht werden können.

Aufgrund des Auftretens der Schimmelpilze in Nestern (1.3.4) können sehr hohe Aflatoxin-konzentrationen u.a. in einzelnen Nüssen und Samen erreicht werden. Dokumentierte Extremwerte sind: Baumwollsaat: > 5 g/kg, Erdnuss: 1,1 g/kg, Mais: 0,4 g/kg, Pistazien: 1,4 g AFB₁/kg. Dabei wird der gesetzliche Höchstgehalt in Deutschland von beispielsweise 2 µg/kg AFB₁ bis zum Faktor 2,5 x 10⁶, also zweieinhalbmillionenfach überschritten (WEIDENBÖRNER, 2000).

Bedingungen für die Aflatoxinbildung

Die Aflatoxinbildung wird gefördert durch Dürre und Insektenbefall in Verbindung mit hohen Temperaturen vor der Ernte. Nach der Ernte fördert feuchtes Wetter bei hohen Temperaturen die Toxinproduktion. Auch sind bestimmte Nutzpflanzen-Züchtungen anfälliger für eine Aflatoxin-Kontamination als andere (WEIDENBÖRNER, 2001; WILLIAMS et al., 2004). Allgemein liegt die optimale Temperatur für Aflatoxinbildung bei 25 bis 30 °C (WEIDENBÖRNER, 2000).

Aflatoxin-Muster

Die am häufigsten in Lebensmitteln auftretenden Aflatoxine sind die Aflatoxine B₁, G₁ und M₁. Zwar sind AFB₁, AFB₂ und AFG₁ häufig im selben Lebensmittel anzutreffen, jedoch dominiert mengenmäßig mit 60 bis 80 % das Aflatoxin B₁. Bei Abwesenheit von AFB₁ sind auch die anderen Aflatoxine AFB₂, AFG₁ und AFG₂ nicht zugegen. Meistens liegt AFG₁ in höheren Konzentrationen als AFB₂ und AFG₂ vor (WEIDENBÖRNER, 2001).

M-Aflatoxine

Die M-Aflatoxine, benannt nach ihrem Auftreten in der Milch, sind Metabolisierungsprodukte, die vom Säugetierkörper nach der Aufnahme von Aflatoxin-belastetem Futter gebildet werden. So werden die beiden bedeutendsten M-Aflatoxine M₁ und M₂ aus den Aflatoxinen B₁ und B₂ durch Hydroxylierung metabolisiert. Hierbei werden 0,3 bis 3 % des mit dem Futter aufgenommenen AFB₁ als AFM₁ mit der Milch ausgeschieden (WEIDENBÖRNER, 2000, 2001).

1.3.4 Vorkommen: Weltweit & in Nestern

Zwar werden Aflatoxine wie oben erläutert bevorzugt in den wärmeren Klimaten gebildet, jedoch handelt es sich bei diesen Mykotoxinen durchaus um ein weltweites Problem. Neben den so genannten Entwicklungsländern mit tropischem Klima sind auch warme Regionen in Ländern mit hohem landwirtschaftlichem Standard betroffen, beispielsweise der Süden und Mittlere Westen der USA (WEIDENBÖRNER, 2001). Weiterhin ist der in Folge der Globalisierung der Weltwirtschaft (Welthandel: +7,2 % in 2005 lt. FISCHER WELTALMANACH 2007) wachsende internationale Handel mit Lebensmitteln für einen Export von Aflatoxin-Problemen in gemäßigte Breiten verantwortlich. Viele der im Folgendem vorgestellten Risikolebensmittel werden darüber hinaus bevorzugt (Erdnüsse, Pistazien, Mais) oder ausschließlich (Pfeffer, Paranüsse) in Aflatoxin-gefährdeten Gebieten angebaut.

Trotz der erkannten Gefährlichkeit von Aflatoxinen und einer Reihe von verfügbaren Maßnahmen gegen Aflatoxin-Bildung bleiben Aflatoxin-belastete Lebensmittel ein aktuelles Problem auch bei Lebensmitteln, die in die EU eingeführt werden. Beleg hierfür ist die hohe Zahl von Meldungen über Aflatoxin-belastete Lebensmittel im Schnellwarnsystem der EU (RASFF – Rapid Alert System Food and Feed*).

Der RASFF-Jahresreport 2005 (EUROPEAN COMMUNITIES, 2006) liefert aktuelle statistische Daten für das Mykotoxin- und insbesondere das Aflatoxin-Problem, vergl. Tab. 1-7 und Abb. 1-4.

* http://ec.europa.eu/food/rapidalert/index_en.html

Tab. 1-7. Anteil der Mykotoxin- und Aflatoxin-Meldungen an den Gesamt-Meldungen im RASFF der EU (2005) (EUROPEAN COMMUNITIES, 2006)

	Anzahl Meldungen	Anteil an Gesamt-meldungen	Anteil an Mykotoxin-Meldungen
Gesamtmeldungen	3228	100 %	-
davon Mykotoxine	993	30,8 %	100 %
davon Aflatoxine	947	29,3 %	95,4 %
davon Patulin	6	0,2 %	0,6 %

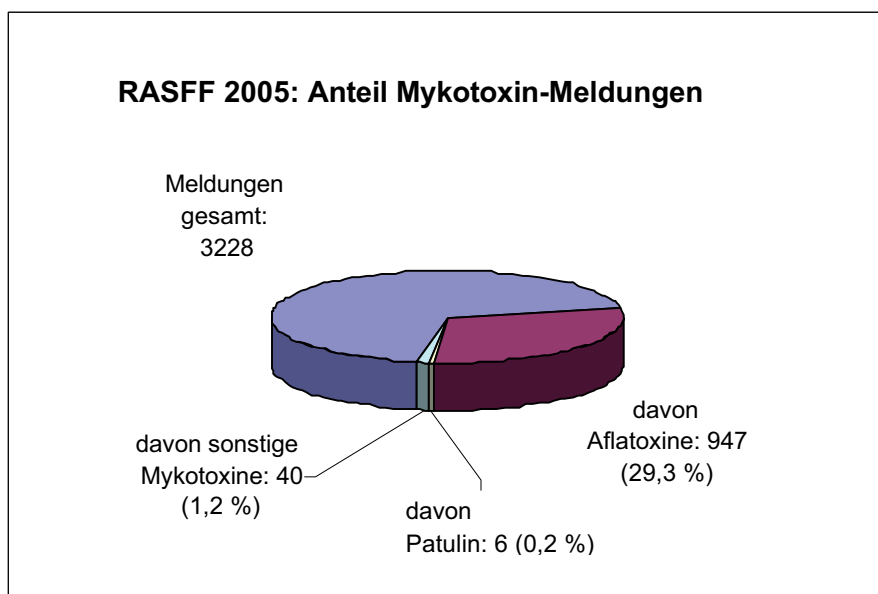


Abb. 1-4. Anteil der Mykotoxin- und Aflatoxin-Meldungen an den Gesamt-Meldungen im RASFF der EU (2005)

Diese Statistik verdeutlicht, dass Mykotoxine ein nicht unerhebliches Problem für die Lebensmittel- und Futtermittelsicherheit in der EU darstellen, wobei die Gruppe der Aflatoxine eine herausragende Rolle spielt. Aflatoxine haben einen Anteil von 29,3 % an den Gesamt-meldungen und einen Anteil von 95,4 % (!) an den Meldungen, die Mykotoxine betreffen. Zum Vergleich: Für **Patulin** hingegen wurden mit insgesamt 6 (im Jahr 2005 in der ganzen EU!) nur sehr wenige Grenzwertüberschreitungen dokumentiert. Neben diesem Aspekt spielt Patulin jedoch eine nicht unerhebliche Rolle zur Beurteilung einer möglichen Verbrauchertäuschung (1.4.4).

Das oben dargestellte Bild wiederholt sich im Jahr 2006: in einem Dreimonatszeitraum (11. bis 23. Woche 2006) waren von insgesamt 363 Warnmeldungen 172 (= 47,4 %) Meldungen über Grenzwertüberschreitungen für Aflatoxine in Lebensmitteln, s. Tab. 1-8 (FOOD & RECHT, Mai/06, Juni/06, Juli/06). Der Schwerpunkt liegt dabei auf Schalenfrüchten und Baumnüssen, insbesondere Pistazien und Erdnüsse sowie deren Verarbeitungsprodukte wie Erdnussmus (sog. „Erdnussbutter“).

Tab. 1-8. Anteil der Aflatoxin-Meldungen an den Gesamt-Meldungen im RASFF der EU (Drei-Monats-Zeitraum 2006)

Woche	Meldungen über Aflatoxine	Meldungen gesamt	Anteil Meldungen über Aflatoxine	Quelle
11.-14.	75	142	52,8 %	FOOD & RECHT, Mai/06
15.-18.	33	83	39,8 %	FOOD & RECHT, Juni/06
19.-23.	64	138	46,4 %	FOOD & RECHT, Juli/06
gesamt	172	363	47,4 %	

Das Problem hoher Aflatoxin-Gehalte in Pistazien führte im Jahr 1997 sogar zu einem zeitweisen Importverbot für Pistazien aus dem Iran (ENTSCHEIDUNG 97/613/EG). Auch wenn dieses inzwischen wieder aufgehoben ist, bestehen weiterhin „Sondervorschriften für aus bestimmten Drittländern eingeführte bestimmte Lebensmittel wegen des Risikos einer Aflatoxin-Kontamination dieser Erzeugnisse“. Unter diesem Titel fasst die ENTSCHEIDUNG DER KOMMISSION 2006/504/EWG vom 12. Juli 2006 bisherige Einzelregelungen zusammen. Diese aktuelle Entscheidung als auch der hohe Anteil an Aflatoxin-Warmmeldungen im RASFF belegen, dass die Aflatoxin-Problematik weiterhin ein wichtiges Thema ist.

Skurriles am Rande: Pistazien aus Persien

Der Journalist Victor Hernandez aus Warburg fragte 1997 in Folge des erwähnten EU-Importverbots für Pistazien aus dem Iran (ENTSCHEIDUNG 97/613/EG) in heimischen Supermärkten nach der Herkunft der angebotenen Pistazien. Gemäß dem im Internet veröffentlichtem Artikel* gab die Leiterin eines örtlichen Discounters zu Protokoll, keine Pistazien aus dem Iran zu verkaufen, sondern nur welche aus Persien (!). Der Journalist attestierte der Dame mangelnde Erdkunde- und Geschichtskenntnisse.

* www.wildwechsel.de/artikel/input/pistazie.htm



Abb. 1-5. Pistazientüte mit Totenkopf (Quelle: s. links genannter Link)

Vorkommen in Nestern

Während die Herausforderung, Aflatoxine in einer vorhandenen Probe analytisch korrekt zu erfassen, von der Wissenschaft weitgehend gelöst ist, stellt die korrekte und repräsentative Probenahme ein besonderes Problem dar. Der Grund hierfür liegt im Auftreten von Schimmelpilzen und damit von Aflatoxinen in Form von Nestern (s. 1.3), so dass sie sehr heterogen in einer Partie verteilt vorliegen. Da beispielsweise einzelne Pistazien oder Erdnusskerne über 1 g/kg Aflatoxin B₁ enthalten können, kann bereits die Anwesenheit einer einzigen verschimmelten Nuss ausreichen, um im Extremfall eine Million Nüsse über den Grenzwert von 2 µg/kg (EU-VERORDNUNG 466/2001) hinaus zu belasten.

Die Art und Weise der Probenahme stellt somit einen sehr wichtigen Schritt in der Aflatoxin-Analytik dar, denn die beste Analyseverfahren ist wertlos, wenn die Laborprobe nicht repräsentativ für die zu untersuchende Charge ist.

Diesem Fakt Rechnung tragend hat die EU genaue Vorgaben für die Probenahme zur Aflatoxin-Analytik gemacht. In der neuen VERORDNUNG (EG) Nr. 401/2006 der Kommission vom 23. Februar 2006 zur Festlegung der Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Kontrolle des Mykotoxingehalts von Lebensmitteln, die die bisher für Aflatoxine anzuwendende Richtlinie 98/53/EG ablöst, wird in der Begründung unter Abs. 7 ausgeführt:

„Aflatoxine sind in einer Partie sehr heterogen verteilt, vor allem in einer Partie Lebensmittel mit großer Partikelgröße wie etwa getrocknete Feigen oder Erdnüsse. Damit bei Lebensmittelchargen mit großer Partikelgröße die gleiche Repräsentativität erreicht wird, sollte das

Gewicht der Sammelprobe größer sein als bei Lebensmittelchargen mit kleinerer Partikelgröße. Da die Verteilung der Mykotoxine in verarbeiteten Erzeugnissen im Allgemeinen weniger heterogen ist als in den unverarbeiteten Getreideerzeugnissen, sollten für verarbeitete Erzeugnisse einfachere Vorgehensweisen bei der Probenahme festgelegt werden.“

1.3.5 Toxikologisches: Stärkstes natürliches Cancerogen

Ein Grund für das besondere Interesse der Forschung an Aflatoxinen sind die toxischen Eigenschaften dieser Substanzklasse. Es wird dabei zwischen der akuten und der chronischen Toxizität unterschieden.

Akute Toxizität

Wie Eingangs erwähnt ist die Bedeutung der akuten Toxizität von Aflatoxinen in der Praxis eher gering, in den so genannten entwickelten Ländern ist sie praktisch zu vernachlässigen. Der wichtigste Grund hierfür ist, dass üblicherweise offensichtlich spontan verschimmelte Lebensmittel nicht mehr in den Verkehr gelangen oder verarbeitet werden bzw. vom Konsumenten nicht mehr verzehrt werden. Die Situation sieht anders aus in Ländern mit Nahrungsmittelknappheit und/oder schlecht informierter Bevölkerung. Darüber hinaus ist der Anteil an Aflatoxin-belasteten Lebensmitteln in vielen Entwicklungsländern deutlich höher als in den gemäßigten Breiten, s. hierzu auch 1.3.3.

Das schlechte Nahrungsmittelangebot war auch eine Ursache für den Verzehr von verschimmeltem Mais in Kenia, wo in den letzten Jahren wiederholt Ausbrüche von Aflatoxikose aufgetreten sind (1.3.1).

Akute Vergiftungen äußern sich in erster Linie in Leberschädigungen. Das betroffene Organ schwillt an und entwickelt eine blasse Farbe. Weiterhin werden Störungen der Blutgerinnung beobachtet, die Hämorrhagien zur Folge haben. Der Serumweißgehalt sinkt, während Serumenzyme der Leber ansteigen. Auch Blutungen im gastrointestinalen System, Nierenschädigungen und Blutstau in der Lunge können Folge einer akuten Aflatoxikose sein (WEIDENBÖRNER, 2001).

Chronische Toxizität

Ein besonderes Problem stellt die chronische Toxizität von Aflatoxinen dar. Diese wird verursacht durch die Langzeit-Aufnahme geringer Aflatoxin-Mengen, beispielsweise durch direkt verschimmelte Lebensmittel oder häufiger durch belastete verarbeitete Lebensmittel, denen man den Schimmelbefall nicht mehr ansieht, wie z.B. Erdnussmus, gemahlene Gewürze oder Cornflakes. Insbesondere die ausgeprägte Cancerogenität dieser Verbindungsgruppe verdient in diesem Zusammenhang besonderes Augenmerk (WILLIAMS et al., 2004). Das am häufigsten auftretende Aflatoxin B₁ gilt gar als stärkstes natürlich vorkommendes Cancerogen (SQUIRE, 1981). Aflatoxine verursachen dabei in erster Linie Leberkrebs, wie in diversen Studien wiederholt dargelegt wird (wiedergegeben z.B. von JAIN et al., 2005; WILLIAMS et al., 2004; BANKOLE et al., 2006). Insbesondere in Verbindung mit einer Hepatitis B-Infektion sind Aflatoxine Verursacher einer hohen Leberkrebsrate (s. zitierte Artikel; NGINDU et al., 1982; BARRETT, 2005; KRISHNAMACHARI et al., 1975). Dabei wird Aflatoxin B₁ im Körper

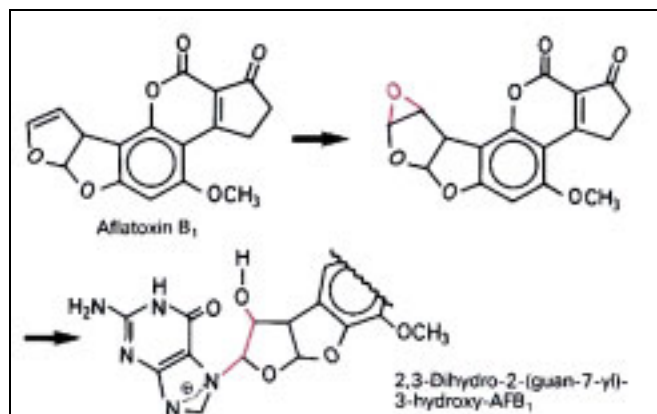


Abb. 1-6. Cancerogene Wirkung von Aflatoxin B₁: Adduktbildung mit DNA (aus: FORTH et al., 1992)

über die **Bildung eines Epoxids** aktiviert, das ganz überwiegend mit N-7 von Guanin, einer der vier Basen der DNA, reagiert. Das gebildete Addukt kann sich durch Öffnung des Imidazolrings stabilisieren und dabei lange in der DNA erhalten bleiben (FORTH et al., 1992). Diese Mutation (= Veränderung der DNA) kann dann zur Ausbildung von Leberkrebs führen.

Neben einer möglichen Krebsentwicklung sind u.a. andere Leberschäden (Hämorrhagien, Nekrosen etc.) und Nierenschäden möglich. Weiterhin hemmt eine chronische Aflatoxinaufnahme das Wachstum bei Kindern (BARRETT, 2004; WILLIAMS et al., 2004). Aflatoxin-belastete Futtermittel führen zu verringerter Gewichtszunahme von Nutztieren, einhergehend mit einer verschlechterten Futterausnutzung, ebenso ist die Reproduktionsrate erniedrigt (WEIDENBÖRNER, 2001).

Zusätzlich verfügen Aflatoxine über immunsuppressive Eigenschaften (SHARMA, 1993), was neben den beschriebenen direkten toxischen Effekten zu Sekundäreffekten führt. Durch das geschwächte Immunsystem wird der Körper anfälliger für Sekundärinfektionen durch Bakterien, Viren und Pilze (s. auch oben: Zusammenwirken von Aflatoxinen und Hepatitis-Viren) (WILLIAMS et al., 2004; WEIDENBÖRNER, 2001).

Strategien zur Senkung der Toxinkonzentration

Die Senkung der Aflatoxin-Belastung von Lebensmitteln ist das erklärte Ziel von Gesetzgebern und Wissenschaftlern. Als sinnvollster Ansatz ist dabei die Kontaminationsreduzierung der Rohware durch geeignete landwirtschaftliche Maßnahmen anzusehen. So wird beispielsweise versucht, durch optimierte Anbau-, Trocknungs- und Lagerungsmethoden das Pilzwachstum und die Toxinbildung zu minimieren. Ebenso wird an der Selektion pilzresistenter Sorten, auch in Form von gentechnisch veränderten Organismen gearbeitet (RAJASEKARAN et al., 2006).

Auch von der Ausbringung nicht-toxinbildender Pilzstämme, die die entsprechenden toxinbildenden Verwandten verdrängen sollen, wird berichtet (DORNER et al., 2006).

Da das Verschimmeln beispielsweise einzelner Nüsse nicht von vorneherein vermieden werden kann, sind mechanische Verfahren zum Aussortieren verschimmelter Nüsse üblich. So kann beispielsweise ein Lichtsensor fehlgefärbte Nüsse erkennen, die mittels eines Luftstoßes aus der Reihe vorbeifliegender Nüsse aussortiert werden.

Diesen Verfahren trägt der Gesetzgeber Rechnung, der für Getreide und Nüsse, die „vor der Verwendung sortiert oder physikalisch behandelt“ werden (VERORDNUNG (EG) Nr. 466/2001), höhere Grenzwerte als für Ware, die zum direkten Verzehr bestimmt ist, erlassen hat.

Als letzte Möglichkeit ist die Detoxifikation des Endprodukts, insbesondere im Futtermittelbereich, anzusehen. So wird beispielsweise von VEKIRU et al. (2006) das Binden von Aflatoxinen an verschiedenen Mineralien erprobt. Neben sogenannten HSCAS (Hydrated sodium calcium aluminiumsilicates) stehen auch andere Tonminerale wie Bentonite im Zentrum der Forschung. Ebenso befindet sich die Extraktion mit überkritischem Kohlendioxid, ein Verfahren, das beispielsweise zur Entkoffeinierung von Kaffee eingesetzt wird, in der Entwicklung (EHLERS et al., 2006). Neben diesen physikalischen Verfahren wird auch eine chemische Entgiftung z.B. durch Oxidation mit Schwefeldioxid getestet.

Bei den beschriebenen Verfahren sind allerdings noch einige Fragen zu klären, beispielsweise ob an Mineralien adsorbierte Aflatoxine bei der späteren Magen-Darm-Passage wieder abgegeben werden und ob andere Stoffe wie Vitamine ebenfalls gebunden werden. Auch ist die Frage, ob solche Verfahren rechtlich zulässig sind bzw. einer gesonderten Zulassung bedürfen, noch offen.

Als Fazit bleibt auch aus Sicht des Autors jedoch festzuhalten, dass das Aflatoxin-Problem an der Wurzel, also bei der Urproduktion, angepackt werden sollte – und nicht erst, wenn die Aflatoxine bereits im Lebens- oder Futtermittel sind.

1.3.6 Rechtliches: Niedrige Grenzwerte im µg/kg-Bereich

Aufgrund der beschriebenen Eigenschaften besteht die Notwendigkeit, die Aufnahme von Aflatoxinen durch den Menschen weitestgehend zu begrenzen. Zu diesem Zweck wurden von vielen Staaten Grenzwerte für Aflatoxine in Lebensmitteln und teilweise auch in Futtermitteln erlassen. Eine Übersicht von VAN EGMOND aus 1989 enthält bereits Informationen zur Rechtslage in 66 Ländern. WEIDENBÖRNER (2001) gibt eine Aufstellung der Welternährungsorganisation FAO aus dem Jahr 1997 wieder.

Von den meisten Staaten sind Grenzwerte für folgende Substanzen festgelegt:

- **Aflatoxin B₁** als das am häufigsten auftretende Aflatoxin, das darüber hinaus über die höchste Toxizität verfügt
- **Gesamt-Aflatoxin (AFB₁ + B₂ + G₁ + G₂)**: die Summe der häufigsten Aflatoxine
- **Aflatoxin M₁** als beispielsweise in Milch auftretender Aflatoxin-Metabolit

In erster Linie werden Grenzwerte für die am stärksten gefährdeten Lebensmittel, die in signifikanter Menge verzehrt werden, festgesetzt. Hierunter fallen Nüsse und Samen (wie Erdnüsse, Pistazien, Mandeln), Getreide (v.a. Mais), Gewürze (Pfeffer, Paprika) sowie Milch und Milcherzeugnisse. Darüber hinaus werden häufig für diätetische Lebensmittel für Säuglinge und Kleinkinder deutlich striktere Grenzwerte festgelegt als für Lebensmittel des allgemeinen Verzehrs.

Da Aflatoxine einerseits auch für Nutztiere giftig sind, andererseits die von Tieren gebildeten toxischen Metabolite in die Milch übergehen können, haben verschiedene Länder auch Grenzwerte für Aflatoxine in Futtermitteln erlassen.

Zwar sind Aflatoxine aufgrund ihrer Eigenschaften unerwünscht in Lebensmitteln, die erlassenen Grenzwerte müssen jedoch auch berücksichtigen, dass es technisch kaum möglich ist, die Aflatoxin-Belastung von Lebensmitteln auf Null zu senken – was auch aus analytischer Sicht nicht sinnvoll ist, da „Null“ immer eine Frage der Nachweisgrenze ist.

Die in der EU und Deutschland geltenden Grenzwerte für Aflatoxine in Lebensmitteln (s. Tab. 1-9) liegen im unteren µg/kg-Bereich, während andere Länder durchaus großzügiger sind. So erlauben beispielsweise die USA gemäß WEIDENBÖRNER (2001) 20 µg/kg Gesamtaflatoxin in Lebensmitteln.

Während Aflatoxine in verarbeiteten Produkten wie Erdnussmus oder Mehl relativ homogen vorliegen (GILBERT et al., 1991), bereitet das stark inhomogene Auftreten von Aflatoxinen (1.3.4) in Rohwaren wie ganzen Nüssen auch rechtliche Probleme hinsichtlich der Beurteilung der Verkehrsfähigkeit der Ware. Durch spezielle Probenahme- und Analysevorschriften (VERORDNUNG (EG) Nr. 401/2006) sowie rechtlich jedoch nicht bindende „Leitlinien für zuständige Behörden für die Kontrolle der EU-Rechtsvorschriften über Aflatoxine“, die derzeit überarbeitet werden (LAUBER, 2006), wird das Ziel einer repräsentativen Probenahme und einer einheitlichen analytischen Beurteilung (Akzeptanz oder Rückweisung) verfolgt.

In der VERORDNUNG (EG) Nr. 401/2006 werden dabei Anforderungen an die Labore sowie Leistungskriterien für die anzuwendenden Analysemethoden aufgestellt.

Tab. 1-9. In Deutschland geltende Höchstmengen für Aflatoxine (Stand: 22.07.2006)

Lebensmittel	Aflatoxin B ₁	Summe Aflatoxin B ₁ + B ₂ + G ₁ + G ₂	Aflatoxin M ₁	Rechtliche Grundlage ²
Einheit	µg/kg	µg/kg	µg/kg	
Erdnüsse, Schalenfrüchte und Trockenfrüchte und deren Verarbeitungserzeugnisse ¹	2,0	4,0	-	466/2001
Getreide und dessen Verarbeitungserzeugnisse ¹	2,0	4,0	-	466/2001
Bestimmte Gewürze (v.a. Paprika, Chili, Pfeffer, Muskat, Ingwer, Gelbwurz)	5,0	10,0	-	466/2001
Sonstige Lebensmittel	2,0	4,0	-	MHmV
Enzyme und -zubereitungen zur Lebensmittelherstellung	-	0,05	-	MHmV
Diätetische Lebensmittel für Säuglinge und Kleinkinder	0,05	0,05	0,01	DiätV
Beikost für Säuglinge und Kleinkinder	0,10	-	-	466/2001
Säuglingsanfangs- und Folgenahrung	-	-	0,025	466/2001
Diätetische Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke, die für Säuglinge bestimmt sind	0,10	-	0,025	466/2001
Milch	-	-	0,05	466/2001 & MHmV
Milcherzeugnisse	-	-	0,05	MHmV

¹ zum unmittelbaren Verzehr oder zur Verwendung als Lebensmittelzutat bestimmt; für Ware, die vor der Verwendung sortiert oder physikalisch behandelt wird, gelten höhere Grenzwerte

² Rechtsgrundlagen:

466/2001: KONTAMINANTEN-HÖCHSTGEHALTSVERORDNUNG 466/2001

MHmV: MYKOTOXIN-HÖCHSTMENGENVERORDNUNG

DiätV: DIÄTVERORDNUNG

1.3.7 Analytisches: Hohe Selektivität durch Immunoaffinitätsmaterial

Für die Analytik von Aflatoxinen in Lebensmitteln, Futtermitteln und anderen Matrices stehen diverse Methoden zur Verfügung, was angesichts der großen Anzahl an wissenschaftlichen Veröffentlichungen (s. 1.3.1) zu Aflatoxinen, darunter viele zur Analytik, nicht verwunderlich ist.

Im Folgenden werden die wichtigsten Analysemethoden unter Diskussion ihrer Vor- und Nachteile kurz präsentiert.

1.3.7.1 Flüssigchromatographie (LC)

Die Flüssigchromatographie, kurz LC (Liquid Chromatography), ist die gängigste Technik bei der Analyse von Aflatoxinen. So verwendeten in der internationalen FAPAS-

Laborvergleichsuntersuchung Nr. 0488 aus dem Jahr 2006 (Aflatoxine in Erdnüssen, s. 4.1.10) 74 von 82 Laboren, entsprechend 90,2 %, die LC.

Sie wird meist eingesetzt in Kombination mit einer Immunoaffinitätssäule (IAC – Immunoaffinity column)-Probenvorbereitung und Fluoreszenzdetektion (FLD), vergl. Review von JAI-MEZ et al. (2000). Um eine ausreichende Fluoreszenz der Aflatoxine B₁ und G₁ zu erreichen, ist eine Derivatisierung erforderlich, vorzugsweise mit Brom unter Einsatz der so genannten CoBrA-Zelle oder mit Iod (KOK, 1986).

Normierte Methoden (umgangssprachlich auch „offizielle Methoden“ genannt) wenden häufig diese klassische Kombination an, die zu „sauberen“ Chromatogrammen bei sehr niedrigen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen führt.

Die im Rahmen dieser Dissertation entwickelte Methode zur Analyse von Aflatoxinen basiert ebenfalls auf diesen hier kurz dargestellten Prinzipien. Eine detaillierte Diskussion findet sich unter 1.7.

1.3.7.2 Gas-Chromatographie (GC)

Methode der Wahl für die Analyse von flüchtigen und leicht verdampfenden Substanzen ist häufig die Gas-Chromatographie (CAMMANN, 2001). Aflatoxine hingegen sind schwerflüchtig, unter Berücksichtigung eines Schmelzpunkts von beispielsweise 268-269 °C für Aflatoxin B₁ (MERCK, 2006). Aus diesem Grund spielt die GC keine Rolle in der Routineanalytik von Aflatoxinen, auch eine Derivatisierung zu leichter flüchtigen Substanzen ist in der Literatur nicht beschrieben.

1.3.7.3 ELISA

Der **Enzyme-linked immunosorbent assay** (ELISA) bezeichnet ein weit verbreitetes Screeningverfahren, das zur Gruppe der immunochemischen Bestimmungsmethoden gehört. Das Prinzip beruht auf der Antikörper-Antigen-Reaktion: Auf einer Trägerplatte immobilisierte Antikörper binden spezifisch den Analyten (z.B. Aflatoxine). Anschließend werden enzymmarkierte Reaktanden hinzugegeben, die die noch freien Antikörper besetzen (kompetitiver ELISA). Nach Entfernung der überschüssigen freien Reaktanden wird ein farbloses Substrat zugegeben, das von den gebundenen Enzymen in eine farbige Substanz umgesetzt wird. Diese Färbung wird photometrisch gemessen und erlaubt die quantitative Bestimmung der Analyten, wobei eine schwächere Färbung die Anwesenheit des Analyten in der Probe signalisiert. Ein hoher Probendurchsatz bei selektiver und sensitiver Detektion ist der wesentliche Vorteil dieses Screeningverfahrens (CAMMANN, 2001, S. 8-15ff). Dem gegenüber steht die Notwendigkeit, Positivbefunde mit einem anderen Verfahren bestätigen zu müssen, da bei Screeningverfahren die Gefahr von falsch-positiven Befunden besteht.

Im Bereich der Aflatoxin-Analytik sind ELISA-Methoden beschrieben von RAZZAZI-FAZELI et al. (2004) und KOLOSOVA et al. (2006); der deutsche Anbieter r-biopharm beispielsweise hat verschiedene Aflatoxin-ELISA-Testkits für AFM₁, AFB₁ (Nachweisgrenze 1 µg/kg) und Gesamtaflatoxine im Angebot (R-BIOPHARM, 2006).

1.3.7.4 Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS)

Wie auch in anderen Feldern der Spurenanalytik beispielsweise im Bereich der Tierarzneimittel- oder Pflanzenschutzmittel-Rückstände, gewinnt die Kopplung von Flüssigchromatographie mit massenspektrometrischer Detektion (LC-MS) in der Analytik von Mykotoxinen zunehmend an Bedeutung. Die Vorteile dieser Technik wie sehr hohe Selektivität in Verbindung mit hoher Sensitivität erlauben das Arbeiten mit sehr niedrigen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (CAMMANN, 2001, S. 6-41ff).

Im Bereich Mykotoxine sind LC-MS-Methoden sowohl für Einzelsubstanzen wie Zearalenon (z. B. ROSENBERG et al., 1998) oder Patulin (s. 1.4.7.4) als auch Multimethoden für mehrere Mykotoxine (z.B. BISELLI et al., 2004, 2005) beschrieben.

TANAKA et al. (2006) präsentieren eine LC-MS-Multimethode mit Time-of-flight-Detektion, mit der auch Aflatoxine erfasst werden. Die erreichten Leistungsdaten der Methode wie Nachweisgrenze (0,1 bis 0,3 µg/kg für Aflatoxin B₁) und Wiederfindung (84 bis 112 % für Aflatoxin B₁) liegen im Bereich klassischer LC-FLD-Methoden (s. 4.1.11). Der wichtigste Vorteil der beschriebenen Methode liegt somit in der Möglichkeit, mehrere Mykotoxine in einer Analyse zu bestimmen.

Als weitere Beispiele für LC-MS-Methoden seien die von HURST et al. (1987), CAPPIELLO et al. (1995), VAHL et al. (1998) und DEUSSING (2006) publizierten genannt; eine aktuelle Übersicht über LC- und GC-MS-Methoden für Mykotoxine liefern SFORZA et al. (2006).

Insgesamt betrachtet handelt es sich bei der LC-MS um eine im Vergleich zur LC mit anderer Detektion deutlich teurere Technik, die darüber hinaus in vielen Laboren insbesondere in weniger entwickelten Ländern nicht zur Verfügung steht. Aufgrund der sehr selektiven Probenvorbereitung mit Immunoaffinitätssäulen in Verbindung mit selektiver Fluoreszenzdetektion nach Nachsäulenderivatisierung (vergl. 1.5.2) erreicht die Flüssigchromatographie Leistungsdaten (Bestimmungsgrenzen im unteren µg/kg-Bereich, bei störungsarmen Chromatogrammen), die sonst häufig nur von LC-MS-Methoden erreicht werden.

Somit birgt die Anwendung der LC-MS bei der Analytik von Aflatoxinen im Allgemeinen nicht hinreichend Vorteile gegenüber der LC, die derzeit weiterhin die Methode der Wahl in der Routineanalytik von Aflatoxinen ist. Näheres zur LC-Analytik unter 1.7.

1.3.7.5 Dünnschichtchromatographie (DC)

Die Dünnschichtchromatographie (kurz DC) als eine der ältesten chromatographischen Trenntechniken eignet sich ebenfalls für die Analyse von Aflatoxinen (TRUCKSESS, 1974). Ebenso wenden ältere offizielle Methoden wie die deutsche ASU § 64 LFGB L 00.00-2 (BVL, Stand: Dez. 2004) aus dem Jahre 1981 oder die AOAC-Methoden 968.22 und 970.45 (Erdnüsse und Erdnussprodukte), 971.23 (Kakaobohnen) und 971.24 (Kokosnuss, Kopra und Kopramehl) (AOAC, 1995) dieses Prinzip an.

Die auch mit TLC (thin layer chromatography) abgekürzte Technik zeichnet sich durch niedrige Kosten aus und stellt nur geringe Anforderungen an die apparative Laborausstattung. Auch wenn mit der DC angeblich Nachweisgrenzen von 1 µg/kg Aflatoxin erreicht werden können (EMAN, Fact Sheet 7, 2006), spielt die DC in modernen Analytiklaboren kaum eine Rolle, was im wesentlichen auf die vergleichsweise schlechten Werte für Reproduzierbarkeit, Nachweisgrenze und andere Leistungsdaten sowie auf den hohen manuellen Aufwand zurückzuführen ist (z.B. OTTA et al., 2000). Nichtsdestotrotz wird die DC als so genannte HPTLC (High-performance thin layer chromatography) bzw. Planarchromatographie beständig weiterentwickelt und auch in der Aflatoxin-Analytik mit vorgeschaltetem SPE-Schritt eingesetzt (NAWAZ et al., 1992, 1995).

1.3.7.6 Weitere Verfahren

Neben den oben beschriebenen Techniken gibt es einige „exotischere“ Methoden, die im Rahmen dieser Einleitung kurz erwähnt werden sollen:

- a) Fluorimetrie: Die Eigenfluoreszenz der Aflatoxine wird bei der LC-Bestimmung genutzt, jedoch ist auch der Einsatz ohne vorherige LC-Trennung beschrieben und eignet sich in diesem Fall zur Bestimmung des Gesamt-Aflatoxingehalts. Als Beispiel sei die von MALONE et al. (2000) entwickelte Methode erwähnt, die eine Bestimmungsgrenze von 5 µg/kg Aflatoxin in Mais erreicht. Eine weitere fluorimetrische Methode,

geeignet für Aflatoxin-Konzentrationen $> 10 \mu\text{g}/\text{kg}$, wurde in einem Ringversuch erprobt (TRUCKSESS et al., 1991).

- b) Overpressured-layer chromatography (OPLC): Die OPLC stellt eine Verbindung zwischen LC und HPTLC dar, bei der die Substanzen auf einer analytischen Schicht getrennt und mittels Densitometrie detektiert werden (OTTA et al., 2000). Voraussetzung zur Nutzung des OPLC-Verfahrens ist die Anschaffung von entsprechendem Equipment.
- c) Kapillarelektrophorese (CE): MARAGOS (zitiert in: TRUCKSESS et al., 2001) präsentiert eine Methode mittels CE-FLD nach IAC-Aufreinigung. Ebenso wie bei der OPLC wird das entsprechende spezielle Equipment zur Durchführung von CE-Analysen benötigt.
- d) Säulenchromatographie: Als Vorläufer der LC (HPLC) können entsprechende Verfahren mittels Säulenchromatographie angesehen werden, wie beschrieben von SEIBER et al. (1973).
- e) Weiterhin wird die Entwicklung von Schnelltests zur Kontrolle „auf dem Feld“ statt im Labor vorangetrieben, beispielsweise in Form eines Teststreifens (DELMULLE et al., 2005).

1.3.7.7 Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitungsmethode der Wahl für Aflatoxine ist die Aufreinigung eines Probenextrakts mittels Immunoaffinitätssäulen (immunoaffinity columns - IAC), einer besonderen Art von Festphasenextraktions(Solid Phase Extraction – SPE)-Säulen, s. auch 1.5.2. Diese Säulen zeichnen sich durch eine hohe Selektivität aus. In Verbindung mit LC-Fluoreszenz ist dies das am häufigsten eingesetzte Analyseverfahren. IAC-Phasen gelten als das modernste Probenvorbereitungs-Werkzeug für Aflatoxine (JAIMEZ et al., 2000).

Daneben sind diverse Methoden beschrieben, die eine klassische SPE unter Nutzung verschiedener Materialien einsetzen. Ebenso sind MycoSep-Säulen erhältlich, deren Prinzip unten erläutert ist. Ältere Methoden verwenden einen Flüssig-flüssig-Extraktionsschritt mit Chloroform, z.B. die AOAC-Methode 968.22 (AOAC, 1995).

Die Vor- und Nachteile der einzelnen Techniken sind in Tab. 1-10 zusammengestellt.

Klassische Festphasenextraktion

Für die Aflatoxin-Analytik ist der Einsatz verschiedener SPE-Materialien (s. auch 1.5.1) beschrieben: polare Silicasäulen und unpolare Umkehr-Materialien (RP 18-, RP 8-, RP 2-, Cyclohexyl- und Phenylphasen) kommen zum Einsatz (JAIMEZ et al., 2000).

MycoSep

Mit den von der Firma Romer Labs (Vertrieb: Coring Systems, Gernsheim) entwickelten Multifunktionssäulen MycoSep[®] lassen sich Probelösungen schnell aufreinigen. MycoSep-Säulen funktionieren wie umgekehrte SPE-Säulen: Sie lassen den oder die Analyten passieren und halten möglichst viele Matrixbestandteile fest. Anwendungen für Aflatoxine sind beispielsweise beschrieben von WILSON et al. (1991), AKIYAMA et al. (2001), DORNER et al. (1988) und in der AOAC-Methode 994.08 (AOAC, 1995; TRUCKSESS et al., 1994). Das Prinzip der Multifunktionssäulen ist bereits in der 1975 veröffentlichten AOAC-Methode 975.36 (AOAC, 1995) dargestellt.

Tab. 1-10. Vergleich der einzelnen Probenvorbereitungstechniken für Aflatoxine

Technik	Vorteile	Nachteile
Immunoaffinitätssäulen	<ul style="list-style-type: none"> • sehr hohe Selektivität • geringe Lösungsmittelvolumina • einfache Handhabung 	<ul style="list-style-type: none"> • zeitaufwändig • personalintensiv • Verwendung von sehr teuren Einmalartikeln
Klassische Festphasenextraktion	<ul style="list-style-type: none"> • einfache Handhabung • geringe Lösungsmittelvolumina • hinreichend saubere Extrakte für anschließende LC 	<ul style="list-style-type: none"> • zeitaufwändig • personalintensiv • Verwendung von teuren Einmalartikeln
MycoSep	<ul style="list-style-type: none"> • einfache Handhabung • geringe Lösungsmittelvolumina • schnell • niedriger Personalbedarf • kein Waschschrift wie bei SPE erforderlich 	<ul style="list-style-type: none"> • Verwendung von sehr teuren Einmalartikeln • Selektivität eingeschränkt
Flüssig-flüssig-Extraktion mit Chloroform	<ul style="list-style-type: none"> • geringe Anforderungen an Laborausstattung 	<ul style="list-style-type: none"> • Verwendung eines toxischen Lösungsmittels • hoher Zeitaufwand • personalintensiv • große Probenserien schlecht zu koordinieren

Wie die Übersicht zeigt, zeichnen sich alle klassischen Probenvorbereitungsverfahren durch einige Vorteile aus, verfügen jedoch auch über mehrere Nachteile: Sie sind mehr oder weniger zeitaufwändig, verwenden teure Einmalartikel und binden bei manueller Durchführung Personal.

1.3.7.8 Derivatisierung zur Detektion

Während die chromatographische Trennung der vier Haupt-Aflatoxine mittels Flüssigchromatographie (LC) kein Problem darstellt, ergibt sich bei der Detektion ein Problem: Als selektive Detektionsmethode bietet sich zwar die Fluoreszenz an. Jedoch verfügen nur die Aflatoxine B₂ und G₂ über eine von Natur aus starke Fluoreszenz, bedingt durch die Starrheit des Moleküls und das weit delokalisierte Elektronensystem (verg. MAIER, 1990). Die Aflatoxine B₁ und G₁ hingegen verfügen über eine weitere Doppelbindung (vergl. Abb. 1-1), was zu einer weitaus geringeren Fluoreszenz führt. Dies ist aus Sicht des Analytikers besonders hinderlich, da Aflatoxin B₁ sowohl das giftigste als auch das am häufigsten auftretende Aflatoxin ist. Abhilfe lässt sich durch eine Reihe von technischen Kniffen schaffen, die in Tab. 1-11 zusammengestellt sind. Die meisten Techniken zielen auf eine Sättigung der Doppelbindung, um den Molekülen ähnliche Fluoreszenzeigenschaften wie den Aflatoxinen B₂ und G₂ zu verschaffen.

Tab. 1-11: Derivatisierungstechniken für Aflatoxine

Nachsäulenderivatisierung				
Technik	Prinzip	Vorteile	Nachteile	Lit. (Bsp.)
CoBrA-Zelle (Brom)	im LC-Eluenten enthaltenes Bromid wird elektrochemisch zu Brom oxidiert, welches an die Doppelbindung der Aflatoxine B ₁ und G ₁ addiert	<ul style="list-style-type: none"> • Technisch einfach einzusetzen • Keine Derivatisierungspumpe erforderlich • Chemikalien (Eluenten) lange haltbar 	<ul style="list-style-type: none"> • CoBrA-Zelle relativ teuer (ab ca. € 2.800) • CoBrA-Zelle nur für Aflatoxin-Analytik einsetzbar 	KOK et al. (1986); STROKA et al. (2000)
Iod	Iodlösung wird mittels Derivatisierungspumpe zum LC-Eluenten gemischt; Addition von Iod an Doppelbindung bei 70 °C (Thermostack)	<ul style="list-style-type: none"> • Derivatisierungspumpe vielseitig einsetzbar • einfache Chemikalien • einfache Handhabung 	<ul style="list-style-type: none"> • Derivatisierungspumpe und Thermostack erforderlich • Iod greift Materialien wie Schläuche, Pumpendichtungen etc. an • Iodlösung nur einen Tag haltbar 	PATEY et al. (1991)
PBPB (Pyridinhydrobromidperbromid)	PBPB-Lösung wird mittels Derivatisierungspumpe zum LC-Eluenten gemischt; Addition von Brom an Doppelbindung	<ul style="list-style-type: none"> • Derivatisierungspumpe vielseitig einsetzbar • einfache Handhabung 	<ul style="list-style-type: none"> • Derivatisierungspumpe erforderlich • PBPB-Lösung nur vier Tage haltbar 	STROKA et al. (2000); GARNER et al. (1993)
Cyclodextrine (CD)	Cyclodextrin-Lösung wird mittels Derivatisierungspumpe zum LC-Eluenten gemischt; CD-Aflatoxin-Komplex zeigt erheblich gesteigerte Fluoreszenz	<ul style="list-style-type: none"> • keine aggressiven Chemikalien nötig • einfache Handhabung 	<ul style="list-style-type: none"> • Derivatisierungspumpe erforderlich • Cyclodextrine relativ teuer 	CEPEDA et al. (1996); Review: JAIMEZ et al. (2000)
Photochemisch	Hydroxylierung der AFB ₁ und G ₁ in die hochfluoreszierenden Hemiacetale AFB _{2a} und G _{2a} mittels UV-Bestrahlung	<ul style="list-style-type: none"> • keine Reagenzien nötig • einfache Handhabung 	<ul style="list-style-type: none"> • Zusatzgerät nötig, das nur für Aflatoxin-Analytik eingesetzt werden kann • Hemiacetale nur begrenzt stabil • Relativ wenig Erfahrung in Anwendung 	PAPADOPOULOU-BOURAOUI et al. (2002); LCTech Applikation
Vorsäulenderivatisierung				
TFA (Trifluoressigsäure)	TFA derivatisiert AFB ₁ und AFG ₁ in die hochfluoreszierenden Hemiacetale B _{2a} und G _{2a}	<ul style="list-style-type: none"> • einfache Handhabung 	<ul style="list-style-type: none"> • Hemiacetale nur begrenzt stabil • weiterer manueller Schritt erforderlich 	in: JAIMEZ et al. (2000)

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wird eine CoBrA-Zelle zur Nachsäulenderivatisierung eingesetzt, da diese wie in Tab. 1-11 gezeigt eine Reihe von Vorteilen bietet und sich in der Routine bewährt hat.

1.4 Patulin

Ebenso wie die Aflatoxine genießt auch das Patulin eine Sonderstellung unter den Mykotoxinen, jedoch aus anderen Gründen:

- **Vorkommen:**

Während die übrigen wichtigen Mykotoxine in erster Linie Getreide, Nüsse und Gewürze befallen, findet sich Patulin fast ausschließlich in Früchten und Fruchtprodukten (1.4.4).

- **Molekülgröße:**

Patulin ist ein vergleichsweise kleines Molekül (Abb. 1-7), was zu einigen Besonderheiten in der Analytik führt (1.4.7).

Zwar wird Patulin nicht die Bedeutung beigemessen wie den Aflatoxinen, wie an der deutlich geringeren Anzahl an wissenschaftlichen Veröffentlichungen abzulesen ist (485 gegenüber 7495 Fach-Publikationen*). Jedoch ist der Patulin-Gehalt neben dem toxikologischen Aspekt auch ein Qualitätsparameter, und Kleinkinder können durch den Konsum von belasteten Fruchtprodukten relativ schnell die erlaubte vorläufige Tageshöchstdosis erreichen (1.4.5). Insofern besteht von vielen Seiten Interesse an schnellen, kostengünstigen und zuverlässigen Analysemethoden für die Bestimmung von Patulin in Lebensmitteln.

*in der Primärliteratur, Stand: 22.07.2006, Stichwort: „Patulin“, Seite www.pubmed.gov der US-amerikanischen National Library of Science)

1.4.1 Historisches: An apple a day

Wie in der Einleitung (1.2) kurz erwähnt hat das Patulin einen „Abstieg“ vom Antibiotikum zum Mykotoxin hinter sich. Es wurde zuerst in den 40er Jahren des letzten Jahrhunderts isoliert. Aufgrund der praktisch gleichzeitigen Entdeckung durch diverse Arbeitsgruppen wurden dem Patulin verschiedene Namen gegeben, beispielsweise Clavacin (Anslow et al., 1943), Expansin (Van Lwijk, 1938), Claviformin (Chain et al., 1942), Clavatin (Bergel et al., 1943), Gigantic Acid (Philpot, 1943) oder Mycoin C (DeRosnay et al., 1952), wie MOAKE et al. (2005) in ihrem Review aufführen. Die Benennung erfolgte dabei häufig nach dem Namen des Pilzes, aus dessen Kultur die Substanz isoliert wurde (z.B. *Penicillium expansum*, *Aspergillus clavatus*).

Patulin wurde zuerst als antifungales Breitband-Antibiotikum erprobt, das sich jedoch später als besonders wirksam gegenüber Bakterien erwies. Nach CIEGLER et al. (1971) zeigte sich, dass Patulin mehr als 75 verschiedene Bakterien-Spezies hemmt, sowohl Gram-positive wie Gram-negative. In verschiedenen klinischen Untersuchungen 1943/44 wurde die Wirksamkeit des Mykotoxins gegen die Erkältung erprobt, jedoch konnte eine signifikante Verbesserung des Heilungsprozesses nicht festgestellt werden (PATULIN CLINICAL TRIALS COMMITTEE, 1943, reprinted 2002).

Allerdings stellte sich im Laufe vieler Forschungsarbeiten (beispielsweise zusammengestellt von MOAKE et al., 2005) heraus, dass Patulin nicht nur giftig für Bakterien und Pilze, sondern auch für Tiere und höhere Pflanzen ist (s. 1.4.4). Nach und nach wurden cytotoxische und genotoxische Effekte festgestellt, auch akute Vergiftungserscheinungen wurden beobachtet.

In Folge dessen begannen Gesetzgeber auf der ganzen Welt, Höchstmengen für Patulin in Lebensmitteln, zumeist in Höhe von 50 µg/kg bzw. µg/L, einzuführen (MOAKE et al., 2005). Auch erfolgte in den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts eine Re-Klassifizierung des Patulin vom Antibiotikum zum Mykotoxin (BENNETT et al., 2003).

1995 setzte ein Expertenkomitee aus Welternährungsorganisation (FAO) und Weltgesundheitsorganisation (WHO) einen „provisional maximum daily intake“ (PMDI) von 0,4 µg/kg Körpergewicht fest (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1995), s. 1.4.5.

Seit 2003 hat auch die EU Höchstgehalte für Patulin für bestimmte Lebensmittel festgesetzt (EU-KONTAMINANTEN-HÖCHSTGEHALTSVERORDNUNG 466/2001, vergl. Tab. 1-13). Da Äpfel und Apfelprodukte wie Saft und Mus als am meisten gefährdete Lebensmittel gelten, wurden Grenzwerte zumeist auf diese Lebensmittel beschränkt. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass durchaus auch andere Fruchtsorten betroffen sein können (MOAKE et al., 2005; auch BURDA, 1992).

Skurriles am Rande

Als etwas gewagt kann die auf der brasilianischen Seite www.micotoxinas.com.br dargelegte These angesehen werden, dass das im Englischen sehr bekannte Sprichwort „An apple a day keeps the doctor away“ (Ein Apfel am Tag hält den Arzt fern) auf den Patulingehalt des Obstes zurückgeht (Boletim No. 27 der Seite www.micotoxinas.com.br, verantwortlich: Prof. Homero FONSECA, Universität Sao Paulo). Zwar verfügt Patulin über antibakterielle Eigenschaften (1.4.4), jedoch treten nennenswerte Patulinmengen nur in verschimmelten Früchten auf, die wohl kaum noch direkt verzehrt werden. Die ernährungsphysiologische Bedeutung von Äpfeln liegt vielmehr in ihrem Gehalt an Vitaminen, Mineralstoffen und sekundären Pflanzenstoffen begründet (LIEBSTER, 2002; HERRMANN, 2001).

1.4.2 Chemisches: Klein und ungesättigt

Chemisch gesehen handelt es sich bei Patulin um ein ungesättigtes Lacton mit einem Molgewicht von 154,12 g/mol (Abb. 1-7). Eine allgemeine Übersicht über die chemisch-physikalischen Daten liefert Tab. 1-12.

Tab. 1-12. Patulin – allgemeine Eigenschaften (nach MERCK, 2006; SLMB, 2004)

Chemischer Name	4-Hydroxy-4 <i>H</i> -furo[3,2- <i>c</i>]pyran-2(6 <i>H</i>)-on
Synonyme	Clavacin, Clavatin, Claviformin, Expansin, Mycoin C, Penicidin
Summenformel	C ₇ H ₆ O ₄
Molgewicht	154,12 g/mol
Schmelzpunkt	111,0 °C
Max. UV-Absorption	276,5 nm
Löslichkeit	- löslich in Wasser und den meisten organischen Lösungsmitteln wie Ethylacetat, Aceton, Dichlormethan - unlöslich in Petrolether - sehr hohe Löslichkeit in Ethylacetat
Stabilität	instabil unter alkalischen Bedingungen
LD₅₀ i.p. in mice	50 mg/kg

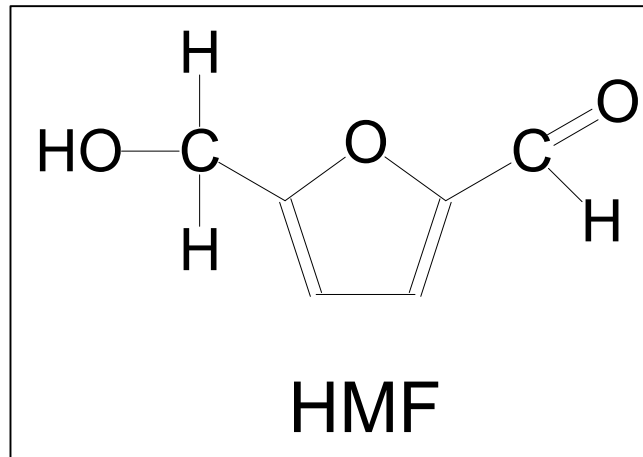
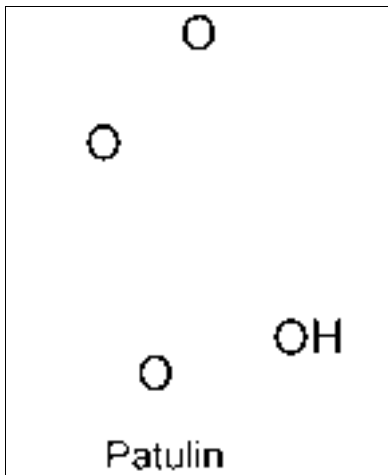


Abb. 1-7. Patulin: Chemische Struktur Abb. 1-8. HMF: Chemische Struktur

Das Mykotoxin Patulin zeichnet sich dabei durch einige Besonderheiten aus, die Folgen beispielsweise für die Stabilität haben und somit auch bei der Analytik berücksichtigt werden müssen:

- **Molekülgröße und -struktur:** Patulin ist ein im Vergleich mit den übrigen Haupt-Mykotoxinen (1.2, Tab. 1-4) kleines Molekül. Die Molmasse beträgt nur 154,12 g/mol, verglichen mit beispielsweise 312,27 g/mol für Aflatoxin B₁. Aus der kleinen und unspezifischen Molekülstruktur ergeben sich Schwierigkeiten beispielsweise bei der Herstellung von Patulin-spezifischen Immunoaffinitätsmaterial (s. 1.7) (MHADHBI et al., 2005). Auch ist die strukturelle Ähnlichkeit zum Zuckerabbauprodukt HMF (Hydroxymethylfurfural) (Abb. 1-8), das in erhitzten Fruchtprodukten in erheblichen Mengen auftreten kann (GÖKMEN et al., 1999), ein Problem, da die beiden Substanzen vor der Detektion z.B. flüssigchromatographisch getrennt werden müssen (SHEPHARD et al., 2000).
- **Instabilität:** Patulin als ungesättigtes und damit reaktionsfreudiges Lacton ist nur unter bestimmten Bedingungen stabil. Die folgenden Faktoren spielen dabei eine besondere Rolle:
 - **pH-Wert:** Wie bereits Untersuchungen in den 70er Jahren zeigten, ist Patulin unter alkalischen Bedingungen instabil (BRACKETT et al., 1979), insgesamt ergibt sich eine gegenläufige Beziehung zwischen dem pH-Wert und der Stabilität von Patulin (McCALLUM et al., 2002).
 - **Fermentation:** Patulin findet sich kaum in fermentierten Fruchtprodukten wie Apfelwein aufgrund eines weitgehenden Patulinabbaus durch die zur Fermentation eingesetzten Hefen (STINSON et al., 1978; ALTMAYER et al., 1982; BURROUGHS, 1977; MOSS et al., 2002; MOAKE et al., 2005).
 - **Reaktion mit SH-Gruppen:** Patulin neigt zur Reaktion mit Sulfhydryl-(SH-)Gruppen von Molekülen wie Cystein oder Glutathion. Die dabei gebildeten Addukte zeichnen sich durch eine sehr viel geringere Toxizität als das freie Patulin aus (LINDROTH et al., 1978; CIEGLER et al., 1976). Hieraus folgt, dass bestimmte Lebensmittel wie Fleisch, Mehl, Käse oder Orangensaft kaum freies Patulin enthalten, obwohl potenzielle Patulin-Produzenten durchaus auf diesen Substraten wachsen können (WEIDENBÖRNER, 2001). Zusammengefasst sind eiweißreiche Lebensmittel kaum von einer Patulin-Kontamination bedroht.
 - **Schwefeldioxid:** Gemäß Untersuchungen von BURROUGHS et al. (1977) treten bei der Reaktion von Schwefeldioxid (SO₂) mit Patulin zwei Mechanismen auf: ein reversibler (Öffnen des Hemiacetal-Rings) und ein irreversibler (SO₂-Addition an die Doppelbindung). Durch letzteren Mechanismus tritt ein Patulin-Abbau bei Gegenwart von Schwefeldioxid ein. Dieser Effekt konnte im Rahmen der Dissertation durch eigene Aufstockversuche an geschwefelten Trockenfrüchten bestätigt werden: Die Wiederfindung an zur Probe „Trockenaprikosen“ dotiertem Patulin war mit 2,7 % vernachläss-

sigbar gering (analysiert mittels offline-Routinemethode, 3.2.7). Wie eine andere Analyse zeigte, war die Probe mit 5470 mg/kg Sulfit weit über den Grenzwert (2000 mg/kg nach ZZuV) hinaus geschwefelt worden.

- **Vitamin C:** Nicht nur Schwefeldioxid, auch die reduzierend wirkende Ascorbinsäure (Vitamin C) sowie Thiamin (Vitamin B₁) bauen Patulin ab (WEIDENBÖRNER, 2001; YAZICI et al., 2002). Im hohen Vitamin C-Gehalt von Citrusfrüchten liegt damit einer der Gründe für die geringe Präposition dieser Früchte für eine Patulin-Kontamination.

Aus diesen Eigenschaften begründet sich das bevorzugte Vorkommen von Patulin in Früchten: Früchte sind sauer und enthalten wenig Protein und andere potenziell Patulin-abbauende Substanzen. Zugleich bieten Früchte ideale Wachstumsbedingungen für einige Patulinbildner, s. folgendes Kapitel.

Patulin ist darüber hinaus im sauren pH-Bereich (pH 3,5 bis 5,5) hitzestabil (WEIDENBÖRNER, 2000) und übersteht damit beispielsweise die Pasteurisation von Säften.

1.4.3 Mikrobiologisches: Expansive Bildung durch *P. expansum*

Patulin wird nach heutigem Stand der Wissenschaft von rund 60 Schimmelpilz-Spezies aus mehr als 30 Arten gebildet (LAI et al., 2000). Die wichtigsten Produzenten gehören dabei zu den Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium* (MOAKE et al., 2005; LAI et al., 2000, WEIDENBÖRNER, 2001), außerdem spielt *Byssochlamys nivea* eine Rolle (ROLAND et al., 1984; RICE et al., 1977). Als am bedeutendsten wird dabei der Pilz *Penicillium expansum*, der Braunschimmel bei Äpfeln (Abb. 1-10), Birnen, Kirschen und anderen Früchten verursacht, angesehen. Weitere wichtige Patulin-Bildner sind der namensgebende Pilz *Penicillium patulum* (später *P. urticae*, dann *P. griseofulvum* genannt) (BENNETT et al., 2003), *P. roqueforti*, *P. claviforme*, *Aspergillus giganteus*, *A. terreus* und *A. clavatus* (MOAKE et al., 2005).

Insbesondere die Patulin-Synthese von *Penicillium expansum* ist dabei gut untersucht, beginnend mit dem Auftreten von Patulin in verschimmelten Äpfeln (WILSON et al., 1973). Das Ausmaß der Patulin-Produktion hängt dabei von einer Reihe von Faktoren ab. So unterscheiden sich einzelne *P. expansum*-Stämme untereinander durch das Ausmaß, in dem sie Patulin produzieren. Auch die Temperatur sowie die Zusammensetzung der umgebenden Atmosphäre spielen eine Rolle (PASTER et al., 1995), Erkenntnisse, die bei der Controlled Atmosphere-(CA-)Lagerung insbesondere von Äpfeln genutzt werden. Nahe der optimalen Pilz-Wachstumstemperatur von 30 °C wird kaum Patulin gebildet, ebenso bei 0 bis 5 °C (SOMMER et al., 1974; STOTT et al., 1975). Auch die Art und Verfügbarkeit der Kohlenstoff- und Stickstoffquelle hat einen Einfluss auf die Patulin-Produktion: Niedrige Kohlenhydratgehalte wirken der Patulin-Produktion entgegen, ebenso bestimmte Stickstoffquellen wie Casein oder Käse (STOTT et al., 1975). Aus letztgenannter Untersuchung wurde der Schluss gezogen, dass Molkereiprodukte keine guten Substrate für Patulin-Bildung sind, selbst wenn der Schimmel an sich gut wächst. Auch hier wird die unter 1.4.2 genannte Reaktion von Patulin mit Proteinen als Ursache diskutiert.

Von STOTT et al. (1975) wurden als optimale Bedingungen für die Patulin-Produktion durch *P. expansum* ermittelt: Temperatur von 25 °C, Glucose als Kohlenhydratquelle sowie anorganischer Stickstoff als N-Quelle.

In Zusammenschau mit 1.4.2 stellen Früchte damit das optimale Substrat für eine Patulin-Kontamination durch *P. expansum* dar.

Ein weiterer Faktor hierfür ist der hohe Anteil an Patulin-Bildnern unter den *P. expansum*-Stämmen: Während beispielsweise nur 1 % der Penicillen, die von Brot und Mehl isoliert wurden, auch Patulin produzierte, waren fast 70 % der von verschimmelten Äpfeln isolierten *P. expansum*-Stämme auch Patulin-Bildner (WEIDENBÖRNER, 2001).

Die Biosynthese von Patulin ist gut erforscht und beinhaltet eine Reihe von Kondensations- und Redoxreaktionen (Abb. 1-9), die größtenteils enzymkatalysiert ablaufen. Patulin entsteht

dabei als Polyacetat-Sekundärmetabolit, auch Polyketid genannt. Ausgangspunkt für die Synthese sind Acetyl-Coenzym A (CoA) und 3 Einheiten Malonyl-CoA (MOAKE et al., 2005).

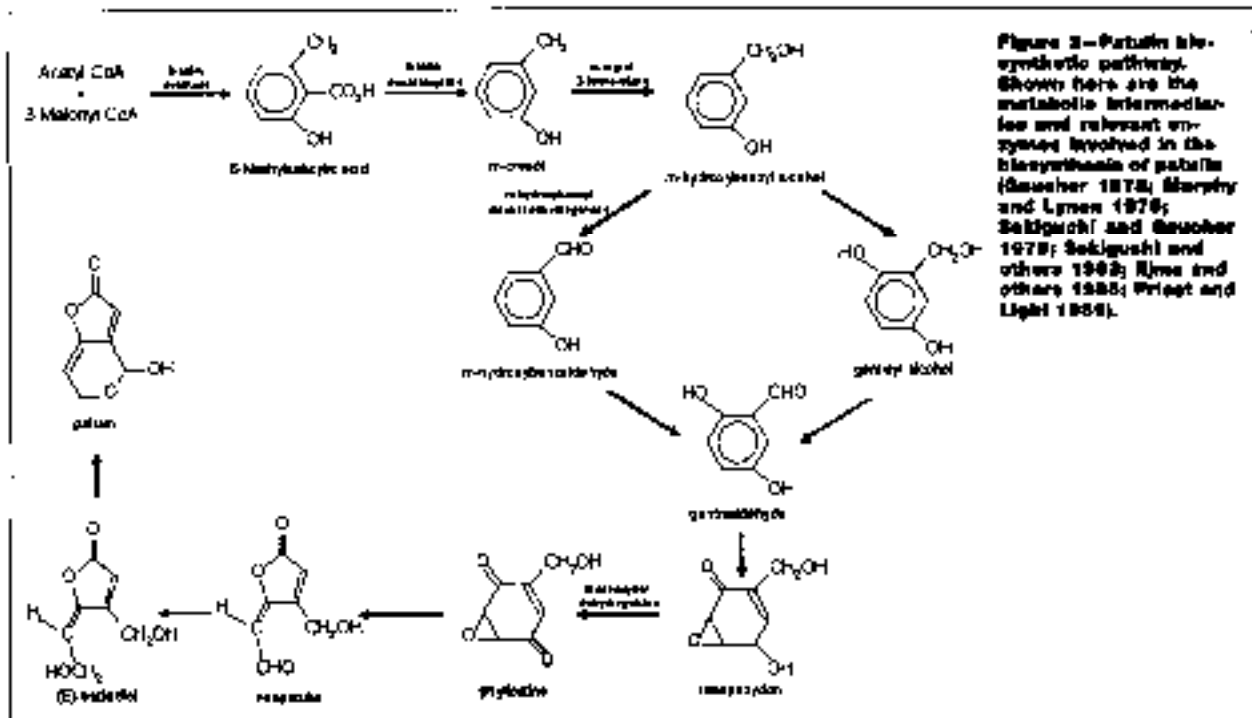


Abb. 1-9. Biosynthese von Patulin (aus: MOAKE et al., 2005)

1.4.4 Vorkommen: Der Frucht-Fan

Wie in den beiden vorangegangenen Kapiteln erläutert, stellen Früchte das optimale Substrat für die Bildung von Patulin dar. Lange Zeit war man davon ausgegangen, dass sich das Patulin-Problem nur auf **Äpfel** (s. Abb. 1-10) und Apfelprodukte bezieht, woraufhin sich die ersten Höchstmengen auf diese Lebensmittel beschränkten (WHO, 1990, zitiert in: MOAKE et al., 2005). Inzwischen wurde diese Meinung revidiert und Patulin in vielen anderen Früchten gefunden, beispielsweise:

- Weintrauben
- Kirschen
- Heidelbeeren (LARSEN et al., 1998)
- Aprikosen
- Pfirsiche
- Erdbeeren

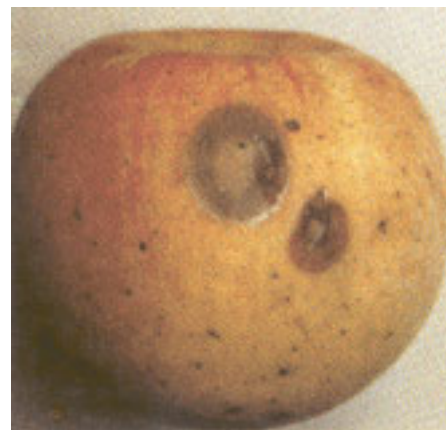


Abb. 1-10. Apfel mit Braunschimmelstellen (aus DIEMAIR, 1990)

Auch andere Lebensmittel wie Nüsse (Erdnüsse, Mandeln, Haselnüsse etc.) und Cerealien können betroffen sein, jedoch aus den oben erläuterten Gründen in sehr viel geringerem Umfang (MOAKE et al., 2005; WEIDENBÖRNER, 2001).

Bestimmte Früchte sind hingegen nicht besonders anfällig für Patulin, beispielsweise Pflaumen aufgrund ihres vergleichsweise hohen Proteingehalts oder Orangen, vermutlich wegen ihres Ascorbinsäure-Gehalts.

Wenn Patulin-belastete Früchte verarbeitet werden, findet sich das Mykotoxin auch in den entsprechenden Produkten wie Saft oder Kompott. Da verschimmelte Früchte kaum direkt verzehrt werden, geht von diesen Verarbeitungsprodukten die größte Gefahr aus, zur Patulin-Belastung des Verbrauchers beizutragen. Dabei sind vereinzelt sehr hohe Patulin-Konzentrationen beobachtet worden. So berichtet WEIDENBÖRNER (2001) von einem an einem Straßenstand in den USA erworbenen Apfelsaft, der mit 45.000 µg/L Patulin kontaminiert war, also dem 900fachen des EU-Grenzwerts. In Faulstellen von Äpfeln finden sich nach Ergebnissen von FRANK et al. (1976) bis 1.000.000 µg/kg (!) Patulin. Die durchschnittliche Patulin-Belastung von Lebensmitteln liegt jedoch weit unterhalb dieser Extremwerte. Reihenuntersuchungen in verschiedenen Ländern zeigen, dass die meisten Produkte den beispielsweise von der EU und den USA festgesetzten Grenzwert von 50 µg/kg (µg/L) nicht überschreiten. Eine aktuelle Studie von PIEMONTESE et al. (2005) über den Patulin-Gehalt von konventionellen und biologischen Säften und Fruchtprodukten in Italien zeigte, dass Patulin je nach untersuchtem Lebensmittel in bis zu 54 % der Produkte nachweisbar war – allerdings bei Verwendung einer sehr empfindlichen Methode, die eine Bestimmungsgrenze von 0,5 µg/kg erreichte. Der Anteil belasteter Ware war bei biologischen Produkten tendenziell höher, vermutlich da im biologischen Landbau keine chemisch-synthetischen Fungizide eingesetzt werden dürfen. Der Maximalgehalt lag bei 69 µg/kg in einem biologischen Apfelsaft. Jedoch wiesen nur vier von 169 Proben, entsprechend 2,4 %, Patulin-Gehalte oberhalb des Grenzwertes auf. Ein vergleichbares Bild (Patulin oft nachweisbar, aber kaum über 50 µg/kg) in europäischen Ländern liefern diverse Untersuchungen aus den Jahren 1976 bis 1985, zusammengefasst von JELINEK et al. (1989). Ähnliche Ergebnisse werden auch aus Südafrika (MOAKE et al., 2005), Taiwan (LAI et al., 2000) und Japan (ITO et al., 2004) berichtet. In Australien hingegen war die Patulin-Belastung von Lebensmitteln Anfang der neunziger Jahre noch ein erhebliches Problem, wie eine Studie von BURDA (1992) nachwies: In 28,3 % aller Fruchtsaftproben wurde Patulin oberhalb von 50 µg/L detektiert, positiv bei einer Nachweisgrenze von 5 µg/L waren sogar 57,5 % aller Proben. Auch die Maximalgehalte von bis zu 1130 µg/L geben Anlass zur Besorgnis. Neben diesen überraschend hohen durchschnittlichen Patulin-Gehalten zeigte die Studie von BURDA, dass die Patulin-Konzentration stark Hersteller-abhängig und somit auf die Auswahl der Rohware und die technologische Behandlung zurückzuführen war.

Stark erhöhte Befunde berichten ebenfalls MOAKE et al. (2005) für Apfelsaft aus Straßenverkauf in den USA sowie GÖKMEN et al. (1998) für Apfelsaftkonzentrate aus der Türkei.

Neben dem toxikologischen Aspekt (1.4.5) dienen Grenzwerte für Patulin auch dem Täuschungsschutz, da erhöhte Patulin-Gehalte im Endprodukt auf einen erhöhten Anteil schimmelig und damit minderwertiger Frucht-Rohwaren hinweisen (1.4.6).

Fermentierte Fruchtprodukte wie Apfelwein, englischer Cider oder französischer Cidre sind kaum Patulin-gefährdet, da ein eventuell vorhandener Patulin-Gehalt während der alkoholischen Gärung um mehr als 90 % reduziert wird (s. 1.4.2). Wird jedoch nach der Fermentation unvergorener Saft beigegeben, so kann über diesen Weg durchaus Patulin in das alkoholische Getränk eingetragen werden (STINSON et al., 1978).

Eine Besonderheit stellt der Pilz *Byssochlamys nivea* dar. Während Aspergillen und Penicillen ebenso wenig die Pasteurisierung/Sterilisierung von Lebensmitteln überstehen wie die vegetative Form von *Byssochlamys nivea*, überleben die hitzeresistenten Ascosporen dieses Pilzes und seines Verwandten *Byssochlamys fulva* die Hitzebehandlung und können im abgepackten Lebensmittel auskeimen (RICE et al., 1977; KRÄMER, 1997).

Strategien zur Senkung der Toxinkonzentration

Da das Auftreten von Patulin im Wesentlichen auf verschimmelte Früchte zurückzuführen ist, liegt hier der erste Ansatzpunkt, um die Patulin-Belastung von Lebensmitteln zu senken. Üblicherweise werden Säfte und andere Fruchtprodukte aus derjenigen Ware hergestellt, die aufgrund von Beschädigungen oder sonstigen Eigenheiten nicht direkt als Frischobst verkauft werden kann (ROSENBERGER, 2003, zitiert in: MOAKE et al., 2005). Durch diese Beschädigungen können leicht *Penicillium expansum* und andere potenzielle Patulin-Bildner in die Früchte gelangen und für eine Kontamination sorgen. Aus diesem Grund gilt die sorgfältige Auswahl der Rohwaren als wichtigste Maßnahme zur Verringerung der Patulin-Belastung (CODEX, 2002), dennoch wird sich bei industrieller Produktion eine gewisse Patulin-Kontamination nie ganz ausschließen lassen (ROSENBERGER, 2003, zitiert in: MOAKE et al., 2005).

Ein erster Schritt zur Verringerung der Schimmelentwicklung stellt die Lagerung der Früchte unter kontrollierter Atmosphäre (CA – Controlled Atmosphere) mit erhöhtem Kohlendioxid- und erniedrigtem Sauerstoff-Gehalt bei definierten Temperaturen dar (PASTER et al., 1995). Lebensmitteltechnologische Schritte führen zu einer Patulin-Reduktion während der Saft-Herstellung. Im Verlauf der Arbeitsschritte Waschen, Behandeln, Pressen, Depektinierung, Klärung und Schönen erfolgt eine Patulin-Reduktion, deren Ausmaß durch bestimmte Variationen, z.B. durch einen Waschschrift mit Hochdruck-Wasser, erhöht werden kann (ACAR et al., 1998). Auch chemische Desinfektionsmittel können die Pilzbelastung und damit die Patulin-Kontamination verringern. So berichten CHEN et al. (2004) vom Einsatz von Natriumhypochlorit, Kaliumsorbitat (auch LENNOX et al., 1984), Schwefeldioxid (auch BURROUGHS et al., 1977), Essigsäure und Wasserstoffperoxid. In dem Review „Mycotoxins“ erwähnt TRUCKSESS (2006) die erfolgreiche Verwendung des neuen Desinfektionsmittels Elektrolysiertes oxidierendes (EO-)Wasser. Weiterhin werden andere auf Chlor basierende Desinfektionsmittel wie Chlordioxid oder Chlor selber angewendet. Eine biologische Möglichkeit stellt hingegen die Infektion mit einem antagonistisch wirkenden Bakterienstamm wie *Pseudomonas syringae* dar. Das beispielsweise zur Entkeimung von Gewürzen eingesetzte Bestrahlungsverfahren führte in einer Studie zu einer 50 %igen Reduzierung des Patulin-Gehalts (MOAKE et al., 2005).

Ein klassisches Mittel zur Patulin-Reduktion ist das Versetzen oder Filtrieren mit Aktivkohle, wobei verschiedene Varianten zur Toxinverminderung getestet worden sind (SANDS et al., 1976).

Bei allen oben beschriebenen Schritten ist neben der Effektivität der Behandlung zu prüfen, ob keine toxischen Rückstände aus dem Behandlungsmittel selbst oder aus Reaktionsprodukten zurückbleiben. Auch ist zu untersuchen, ob erwünschte Inhaltsstoffe wie Vitamine oder Polyphenole ebenfalls mitentfernt werden. Und die Lebensmittelindustrie wird selbstverständlich auch das Kosten-Nutzen-Verhältnis im Auge behalten.

1.4.5 Toxikologisches: Krebserregend – oder auch nicht?

Wie unter Historisches (1.4.1) dargelegt verfügt Patulin über antibakterielle Eigenschaften, so dass es zuerst als Antibiotikum eingesetzt werden sollte. Bereits früh wurden jedoch die giftigen Eigenschaften erkannt.

Akute Toxizität

Nachgewiesen sind cytotoxische (zelltoxische) Eigenschaften von Patulin (TRUCKSESS et al., 2001), die sich u.a. in Hemmung der Proteinsynthese, Störung von Enzymwirkungen oder Bildung von Protein-Quervernetzungen äußern können (Übersicht in MOAKE et al., 2005). Akute Vergiftungen können sich beispielsweise in Ödemen, gastro-intestinalen Blutungen, Nierenschäden oder Erbrechen äußern, jedoch sind die Studienergebnisse nicht immer schlüssig und akute Vergiftungen bei Mensch oder Tier außerhalb von Laborversu-

chen nicht eindeutig nachgewiesen. Da in diesen Laborversuchen sehr viel höhere Patulin-Dosen eingesetzt wurden als durch den Verzehr kontaminierter Nahrung zu erwarten sind, bleibt die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf reale Verzehrsgewohnheiten fraglich (MOAKE et al., 2005; TRUCKSESS et al., 2001).

Chronische Toxizität

In diesem Bereich geht der wissenschaftliche Streit in erster Linie um die Frage, ob Patulin als Cancerogen einzustufen ist oder nicht. Die entsprechenden Studienergebnisse, bei denen wiederum häufig sehr hohe Dosen zum Einsatz kamen, sind uneindeutig, wie TRUCKSESS et al. (2001) und das CENTER FOR FOOD SAFETY & APPLIED NUTRITION (CFSAN) der US-amerikanischen FDA (2001) feststellten. Als chronische Effekte stehen u.a. neurotoxische, immunotoxische und –suppressive sowie genotoxische, teratogene und carcinogene Wirkungen im Raum (MOAKE et al., 2005). Als gesichert kann angesehen werden, dass Patulin die DNA (Desoxyribonucleic acid; das Erbmateriale) schädigen kann, wie verschiedene Studien aus unterschiedlichen Jahrzehnten exemplarisch zeigen: K.-S. LEE et al. (1986), HOPKINS (1993), SCHUMACHER et al. (2005). Bei diesen genotoxischen Eigenschaften spielt u.a. die Reaktivität von Patulin mit freien Sulfhydrylgruppen (1.4.2) eine Rolle (MOAKE et al., 2005). Gemäß Ergebnissen von KRUMM et al. (2006) kann eine chronische Patulin-Aufnahme das Risiko einer allergischen Sensibilisierung erhöhen, beruhend auf der Tatsache, dass Patulin die Funktion der T-Zellen des Immunsystems beeinflusst.

Patulin wird jedoch schnell vom Säugetierorganismus eliminiert, so dass Anreicherungseffekte praktisch keine Rolle spielen (CFSAN, 2001; RYCHLIK, 2003).

Aus den vorliegenden toxikologischen Daten sowie Daten zu den Verzehrsgewohnheiten für die Risikolebensmittel hat das Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) im Jahr 1995 einen Provisional Tolerable Daily Intake (PTDI)*-Wert für Patulin von 0,43 µg/kg Körpergewicht festgelegt, wobei ein Sicherheitsfaktor von 100 berücksichtigt wurde. Wie das CFSAN (2001) darstellt, kann dieser PDTI-Wert von Säuglingen und Kleinkindern unter gewissen Umständen überschritten werden, da diese Bevölkerungsgruppe relativ große Mengen an Apfelprodukten konsumiert. Die CFSAN empfiehlt den Herstellern, die Patulin-Konzentration insgesamt zu senken. Vor diesem Hintergrund ist auch der niedrigere EU-Grenzwert für Patulin in Kleinkindernahrung (10 statt 25 bzw. 50 µg/kg) zu sehen.

* teilweise auch als PMTDI (Provisional Maximum Tolerable Daily Intake) bezeichnet

1.4.6 Rechtliches: Neue EU-Grenzwerte für Apfelprodukte

Während insbesondere für Aflatoxine, aber auch für Ochratoxin A bereits seit längerem Grenzwerte in der EU gelten, wurden Höchstmengen für Patulin erst im Jahre 2003 festgesetzt. Auch Deutschland hatte vorher keine einzelstaatliche Vorschrift eingeführt, während beispielsweise die Schweiz schon früher einen Grenzwert für Patulin von 50 µg/kg Fruchtsaft festgelegt hatte.

Mit der VERORDNUNG (EG) Nr. 1425/2003 wurde die Kontaminanten-Höchstgehalts-VERORDNUNG (EG) Nr. 466/2001 um Höchstgehalte für Patulin ergänzt. Allerdings wurden nur bestimmte Fruchtprodukte mit einer Höchstmenge belegt, wie Fruchtsäfte und Fruchtsaftkonzentrate sowie bestimmte alkoholische Getränke aus Äpfeln. Auch feste Apfelerzeugnisse wie Mus wurden erfasst. Andere Fruchtprodukte sind jedoch nicht explizit aufgeführt, wie beispielsweise Konfitüren oder Fruchtaufstriche, die nach eigener Erfahrung im Routinebetrieb auch gelegentlich Patulin enthalten können; ebenso wenig werden Getreideprodukte gelistet. Der Grund für diese Beschränkung wird in Erwägungsgrund Nr. 3 der VERORDNUNG (EG) Nr. 1425/2003 genannt: „Patulin kann zwar in zahlreichen Frucht- und Getreidesorten sowie in anderen Lebensmitteln mit Schimmelpilzbefall vorkommen, häufigste Kontaminationsquelle sind jedoch Apfelerzeugnisse.“

Mit einem strengeren Grenzwert von 10 µg/kg wurden Apfelerzeugnisse, die für die besondere Ernährung von Säuglingen und Kleinkinder gedacht sind (sog. diätetische Lebensmittel) sowie Beikost allgemein belegt, um Kleinkinder besser vor diesem Mykotoxin zu schützen. Die derzeit in Deutschland und der EU geltenden Grenzwerte sind in Tab. 1-13 zusammengefasst.

Zu dieser Verordnung wurde auch die Richtlinie zu Probenahmeverfahren und Analysemethoden (Nr. 2003/78/EG) erlassen, die jedoch inzwischen in der zusammenfassenden „VERORDNUNG (EG) Nr. 401/2006 der Kommission vom 23. Februar 2006 zur Festlegung der Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Kontrolle des Mykotoxin-gehalts von Lebensmitteln“ aufgegangen ist.

Tab. 1-13. Derzeit geltende Höchstmengen für Patulin (Stand: 27.7.2006)

Lebensmittel	Patulin ¹ [µg/kg]
Fruchtsäfte, insbesondere Apfelsaft, und Fruchtsaftzusätze in anderen Getränken, einschließlich Fruchtnektar; Fruchtsaftkonzentrate nach Rekonstitution entsprechend den Herstellerangaben	50,0
Spirituosen, Apfelwein und andere aus Äpfeln gewonnene oder Apfelsaft enthaltende fermentierte Getränke	50,0
Feste, für den direkten Verzehr bestimmte Apfelerzeugnisse, einschließlich Apfelkompott, Apfelpüree	25,0
Apfelsaft sowie feste Apfelerzeugnisse, einschließlich Apfelkompott und Apfelpüree, für Säuglinge und Kleinkinder (diätetische Lebensmittel)	10,0
andere Beikost als Getreidebeikost	10,0

¹Rechtsgrundlage: KONTAMINANTEN-HÖCHSTGEHALTSVERORDNUNG 466/2001

Interessanterweise wurden Höchstmengen für Patulin in Spirituosen und anderen alkoholischen Erzeugnissen festgesetzt, obwohl Patulin die Fermentation nicht in nennenswerten Mengen übersteht. Somit macht dieser Grenzwert in der Praxis nur Sinn bei Getränken, denen frische Apfelprodukte nach der Fermentation zugesetzt worden sind.

Bei Patulin kommt neben dem toxikologischen Aspekt, dem die EU-Verordnung 466/2001 Rechnung trägt, noch ein anderer rechtlicher Hintergrund zum Tragen: So fordern sowohl die deutsche FRUCHTSAFTVERORDNUNG als auch die KONFITÜRENVERORDNUNG, die jeweils auf EU-Richtlinien basieren, die Verwendung von gesunden, nicht verdorbenen und reifen Früchten. Ein erhöhter Patulingehalt würde jedoch auf einen erhöhten Anteil verschimmelter Früchte deuten, vergl. auch BURDA (1992). Dies wiederum wäre minderwertige Ware, die nicht den o.g. Verordnungen entspricht, so dass es sich gegebenenfalls um einen Fall von Verbrauchertäuschung handeln würde. Somit können auch erhöhte Patulin-Gehalte in Lebensmitteln, die nicht explizit von der Kontaminanten-Höchstgehaltsverordnung 466/2001 erfasst werden, zu einer Beanstandung führen. Um jedoch eine Beanstandung wegen Gesundheitsgefährdung (nach § 5 LFVG) aussprechen zu können, wären sehr hohe Patulin-Gehalte, die toxikologisch relevant sein könnten, erforderlich, s. auch 1.4.4.

1.4.7 Analytisches: Das etwas andere Mykotoxin

Für die Analytik von Patulin in Lebensmitteln, Futtermitteln und anderen Matrices stehen diverse Methoden in erster Linie unter Verwendung chromatographischer Techniken zur Verfügung. Die oben beschriebenen Besonderheiten des Patulins müssen auch bei der Analytik berücksichtigt werden. Im Folgenden werden die wichtigsten Analysemethoden unter Diskussion ihrer Vor- und Nachteile kurz vorgestellt.

1.4.7.1 Flüssigchromatographie (LC)

Die Flüssigchromatographie, kurz LC (Liquid Chromatography), ist weiterhin die Methode der Wahl bei der Analyse von Patulin, vergl. Review von SHEPHARD et al. (2000) oder die Statistik der aktuellen FAPAS-Laborvergleichsuntersuchung (No. 1623: Patulin in cloudy apple juice, März 2006): Von 55 teilnehmenden Laboren haben 52, entsprechend 94,5 %, die LC als Methode gewählt, nur ein Labor LC-MS und zwei GC.

Die Detektion erfolgt zumeist mittels UV bei 276 oder 277 nm, dem UV-Absorptionsmaximum von Patulin (MERCK, 2006). Auch ein DAD (Diode-Array-Detektor), ebenfalls bekannt als PDA-(Photo-Diode-Array)-Detektor, kommt gelegentlich zum Einsatz, da dieser die Möglichkeit bietet, ein Spektrum zur Absicherung der Identität aufzunehmen. Auf die Probenvorbereitung zur LC wird unter 1.4.7.7 gesondert eingegangen; die LC-Verfahren selbst werden unter 2.2 vorgestellt.

* Food Analysis Performance Assessment Scheme, Central Science Laboratory, Sand Hutton, UK

1.4.7.2 Gas-Chromatographie (GC)

Wie unter 1.3.7.2 erwähnt, ist die GC die Methode der Wahl für die Analyse von flüchtigen und leicht verdampfenden Substanzen (CAMMANN, 2001). Patulin ist hingegen bei einem Schmelzpunkt von 111 °C (MERCK, 2006) relativ schwerflüchtig, so dass zumeist eine Derivatisierung zu einer leichter flüchtigen Substanz durchgeführt wird. TARTER et al. (1991) beschreiben eine Methode mittels Kapillar-GC, bei der Patulin vor der Trennung zum Heptafluorobutyrat-Derivat umgesetzt wird, während RUPP et al. (2000) eine Trimethylsilylierung einsetzen. Eine Bestätigungsmethode, die ohne Derivatisierung auskommt, präsentieren hingegen ROACH et al. (2000).

Da für die LC-Bestimmung auf diesen zusätzlichen Derivatisierungsschritt verzichtet werden kann, spielt die GC kaum eine Rolle bei der Routineanalytik von Patulin, s.o. Gelegentlich wird GC-MS (Gas-Chromatographie-Massenspektrometrie) als qualitative Bestätigungsmethode eingesetzt (z.B. RUPP et al., 2000). RYCHLIK et al. (1999) verwenden den von ihnen synthetisierten isotope markierten Patulin-Standard (1998) auch zusammen mit der HRGC-HRMS-Technik (High resolution gas chromatography-high resolution mass spectrometry). Zur Derivatisierung von Patulin und internem Standard wurde TMS (Trimethylsilanol) verwendet. Mit dieser aufwändigen SIVA-Technik erreichten Rychlik et al. Nachweisgrenzen, die um den Faktor 100 unter denen der klassischen LC-UV-Analytik liegen, was den Einsatz dieser Technik beispielsweise für physiologische Analysen (Patulin-Metabolismus, Patulin-Konzentration im Blut) interessant macht.

1.4.7.3 ELISA und andere immunochemische Verfahren

Für die Entwicklung und Anwendung immunochemischer Verfahren wie den ELISA (s. 1.3.7.3) ist die Verfügbarkeit entsprechend selektiver Antikörper erforderlich. Diese sind für Patulin derzeit noch nicht kommerziell erhältlich, weder in Form eines ELISA-Tests noch als Immunoaffinitätssäulen (s. 1.5.2) für die Probenvorbereitung. Zwar wird auf diesem Gebiet beständig geforscht, wie die Arbeiten von MHADHBI et al. (2005) und SHEU et al. (1999b) exemplarisch zeigen. Jedoch ist Patulin ein relativ kleines und unspezifisches Molekül mit weit verbreitet anzutreffenden funktionellen Gruppen, so dass entsprechende Antikörper relativ unselektiv sind (McELROY et al., 1993). Ein weiteres Problem stellt die Reaktivität von Patulin mit freien Sulfhydrylgruppen dar – diese sind auch in den Antikörpern (Proteine) selbst enthalten und können mit Patulin eine kovalente Bindung eingehen (MHADHBI et al., 2005).

1.4.7.4 Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS)

Für die Bestimmung von Patulin ist inzwischen eine Reihe von LC-MS-Methoden publiziert. RYCHLIK et al. veröffentlichten 1998 eine Methode zur Synthese eines isotopenmarkierten Patulin-Standards ($^{13}\text{C}_2$ -Patulin), mit dem Ziel, diesen als internen Standard einzusetzen. Die Zugabe eines solchen markierten Standards zur Probe erlaubt eine exaktere Quantifizierung des Patulins in der Probe, da sich isotopenmarkiertes Patulin chemisch fast genauso verhält wie Patulin selbst und somit eine Wiederfindungskorrektur der Analyse ermöglicht. Dieses als SIVA (Stabil-Isotopen-Verdünnungs-Analyse), englisch SIDA (stable isotope dilution assay) bezeichnete Verfahren wurde für Patulin von RYCHLIK et al. 1999 veröffentlicht. Die Detektion erfolgt im ESI-(Electrospray Ionisation-)Modus. Eine andere Ionisierungstechnik beschreiben TAKINO et al. (2003): Sie nutzen APPI (atmospheric pressure photoionization) sowie eine online-Probenvorbereitung mit Säulenschalttechnik, die mit der in dieser Arbeit beschriebenen online-SPE verwandt ist. Die neben ESI am häufigsten eingesetzte Ionisierungstechnik APCI (atmospheric pressure chemical ionization) wurde von SEWRAM et al. (2000) für die Patulin-Bestimmung eingesetzt.

Eine online-SPE-LC-MS-Methode für Patulin unter Verwendung von $^{13}\text{C}_3$ -Patulin als internen Standard beschreiben ITO et al. (2004). Einen aktuellen Überblick über LC-MS-Methoden für Patulin liefert der Übersichtsartikel von SFORZA et al. (2006).

Isotopenmarkiertes Patulin (hier: Patulin- $^{13}\text{C}_{5-7}$, mit ca. 74 % Patulin- $^{13}\text{C}_7$, zum Preis von € 300,-) ist beispielsweise erhältlich von CORING, Gernsheim (Preisliste, 2005).

Wie bereits dargestellt (1.3.7.4) zeichnet sich in der Rückstandsanalytik ein Trend zur LC-MS- bzw. LC-MS/MS-Technik ab. Jedoch handelt es sich bei der LC-MS um eine im Vergleich zur LC deutlich teurere Technik, die darüber hinaus in vielen Laboren insbesondere in weniger entwickelten Ländern nicht zur Verfügung steht.

Auf absehbare Zeit wird voraussichtlich die immer wieder optimierte LC mit UV-Detektion (1.4.7.1) die Methode der Wahl bleiben, da auch sie hinreichend empfindliches und exaktes Arbeiten unterhalb der gesetzlichen Grenzwerte erlaubt.

1.4.7.5 Dünnschichtchromatographie (DC)

Die klassische Dünnschichtchromatographie spielt in der Routineanalytik von Patulin praktisch keine Rolle mehr. Ursache sind die bereits bei den Aflatoxinen (1.3.7.5) beschriebenen Nachteile. Die offizielle AOAC-Methode 974.18 (AOAC, 1995), entwickelt im Jahre 1974, arbeitet mit Ethylacetat-Extraktion und Silica-Gel-Säulenaufreinigung. Die DC-Trennung erfolgt mittels Silica-Gel-Platten und anschließender Spray-Derivatisierung mit MBTH (3-Methyl-2-benzothiazolinon-Hydrazon). Die Methode erreicht eine Nachweisgrenze von ca. 20 µg/L; eine densitometrische Quantifizierung ist möglich (SHEPHARD et al., 2000).

Eine weitere offizielle DC-Methode repräsentiert die internationale Norm ISO 8128-2:1993, deren erster Teil (8128-1) eine LC-Methode (s. 2.2.2.1) beschreibt.

1.4.7.6 Weitere Verfahren

Neben der Detektion von Patulin selbst wurden moderne Verfahren zum Nachweis potenzieller Patulin-Bildner entwickelt. Ergänzend zu klassischen mikrobiologischen Methoden findet die PCR (Polymerase Chain Reaction – Polymerase Ketten-Reaktion)-Technik Anwendung zum schnellen Nachweis von *P. expansum* (MAREK et al., 2003). Auch die Detektion eines für die Patulin-Produktion essentiellen Gens mittels PCR ist beschrieben (PATERSON et al., 2000). PRIETA et al. veröffentlichten 1994 eine Methode mittels einer Dialyse, diese Methode wird von SHEU et al. (1999a) in Verbindung mit MS eingesetzt.

1.4.7.7 Probenvorbereitung

Für die Probenvorbereitung von Patulin-Proben sind diverse Verfahren publiziert, der Schwerpunkt liegt dabei auf der Flüssig-flüssig-Extraktion (liquid-liquid partitioning (LLP) oder extraction (LLE)) und der Festphasenextraktion (SPE – solid phase extraction). Eine Abwandlung der LLP stellt die Verwendung von Extrelut-Säulen dar. Während diese beschriebenen Verfahren das Ziel der Aufreinigung und Aufkonzentrierung von Patulin verfolgen, lassen MycoSep-Säulen Patulin passieren, halten aber störende Matrixkomponenten zurück. Bei pektinreichen Produkten wie naturtrübem Apfelsaft oder Apfelmus wird von vielen Methoden ein Depektinierungsschritt verwendet, um eine bessere Extraktion des Patulins zu erreichen, vergl. z.B. ASU § 64 LFGB L 31.00-20 (BVL, Stand: Dez. 2004). Zur Depektinierung werden entsprechende Pektin-abbauende Enzyme (Pektinasen) eingesetzt. Die Vor- und Nachteile der einzelnen Techniken sind in Tab. 1-14 zusammengestellt.

Flüssig-flüssig-Extraktion

Die Flüssig-flüssig-Extraktion wird im Allgemeinen mit Ethylacetat durchgeführt, in dem Patulin sehr gut löslich ist (MERCK, 2006). In Verbindung mit der LC ist dies die klassische Aufreinigung zur Abtrennung von ionischen und bestimmten polaren Verbindungen (SHEPHARD, 2000). Die Ethylacetatphase wird mit basischer Lösung (zumeist mit Natriumcarbonat-Lösung) zur Entfernung polyphenolischer Störsubstanzen (SHEPHARD, 2000) gewaschen. Hierbei handelt es sich um einen kritischen Schritt, da Patulin im Basischen instabil ist (BRACKETT et al., 1979).

Nach Extraktions- und Waschschrift wird das Ethylacetat beispielsweise am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in einem wässrigen Lösungsmittel, vorzugsweise im LC-Eluenten, gelöst.

Eine Abwandlung dieser Aufarbeitung stellt die Verwendung von **Extrelut-Säulen** dar, die eine Vereinfachung des LLP-Schritts ermöglicht: Die Probelösung wird auf eine Extrelut-Säule gegeben. Nach einer Einwirkzeit wird mit Ethylacetat eluiert. Im Eluat finden sich Patulin und bestimmte Matrixkomponenten.

Festphasenextraktion

Bei der Festphasenextraktions-Technik (1.5.1) wird die Probelösung über eine Festphase gegeben. Idealerweise hält die Festphase den oder die Analyten möglichst selektiv fest, während sich Matrixbestandteile mit Waschlösungen entfernen lassen. Für die Patulin-Analytik ist der Einsatz verschiedener SPE-Materialien (2.2) beschrieben.

MycoSep®

Wie für Aflatoxine (1.3.4.7) sind auch für Patulin MycoSep-Säulen erhältlich, deren Prinzip oben erläutert wurde (vergl. MALONE et al., 1998).

Die einzelnen Probenvorbereitungstechniken werden teilweise auch kombiniert eingesetzt, um eine bessere Aufreinigung und damit niedrigere Nachweisgrenzen zu erreichen (LLP + SPE bei ARRANZ et al., 2005; zwei SPE-Schritte bei LEHMANN et al., 1990).

Wie die Übersicht zeigt, zeichnen sich alle klassischen Probenvorbereitungsverfahren durch einige Vorteile aus, verfügen jedoch auch über mehrere Nachteile: Sie sind mehr oder weniger zeitaufwändig, verwenden teure Einmalartikel, binden Personal oder können Probleme in der Reproduzierbarkeit aufweisen, da kritische Schritte (Waschschrift bei LLP) manuell durchgeführt werden.

Tab. 1-14. Vergleich der einzelnen Probenvorbereitungstechniken für Patulin

Technik	Vorteile	Nachteile
Flüssig-flüssig-Extraktion	<ul style="list-style-type: none"> • nur geringe Ansprüche an Laborausstattung • hinreichend saubere Extrakte für anschließende LC 	<ul style="list-style-type: none"> • große Lösungsmittelvolumina • langwierig • personalintensiv • Waschschrift kritisch für Patulin-Stabilität • große Probenserien schlecht zu koordinieren
Extrelut-Säulen	<ul style="list-style-type: none"> • einfache Handhabung • schnell • geringere Lösungsmittelvolumina 	<ul style="list-style-type: none"> • Verwendung von teuren Einmalartikeln • Durchführung des Waschschrifts auf Säule nicht möglich, dadurch kaum ausreichende Aufreinigung
Festphasenextraktion	<ul style="list-style-type: none"> • einfache Handhabung • geringere Lösungsmittelvolumina • Waschschrift kann auf Säule durchgeführt werden • hinreichend saubere Extrakte für anschließende LC 	<ul style="list-style-type: none"> • langwierig • personalintensiv • Verwendung von teuren Einmalartikeln
MycoSep	<ul style="list-style-type: none"> • einfache Handhabung • geringe Lösungsmittelvolumina • schnell • kaum Personalbedarf • Waschschrift nicht erforderlich 	<ul style="list-style-type: none"> • Verwendung von teuren Einmalartikeln • Selektivität eingeschränkt

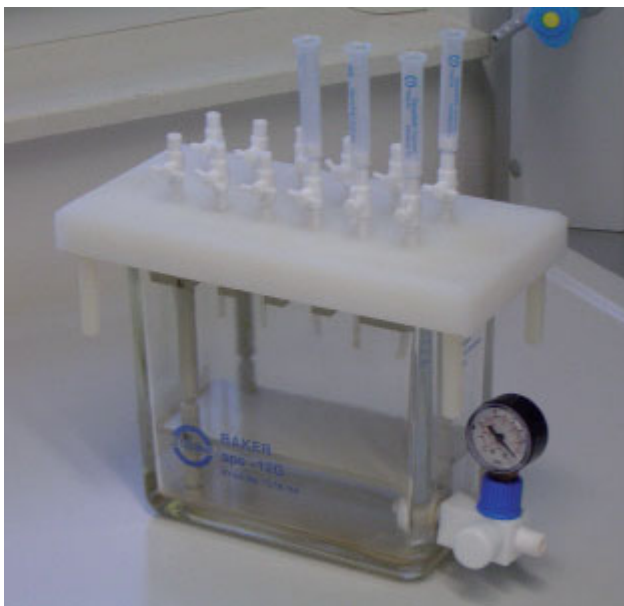
1.5 Festphasenextraktion + Immunoaffinitätssäulen

1.5.1 Festphasenextraktion (SPE)

Die Festphasenextraktions-(SPE-)Technik dient der Anreicherung und Reinigung des oder der Analyten aus einem Probenextrakt und wird vor allem im Rückstands- und Kontaminantenbereich, also zur Bestimmung von Substanzen in Spurenkonzentrationen eingesetzt. SPE-Säulen sind mit vielen verschiedenen Füllungen erhältlich, so dass das zur Applikation passende Material ausgesucht werden kann und muss.

Der Ablauf besteht aus den folgenden Schritten, dargestellt am Beispiel einer RP-SPE-Säule:

1. Die SPE-Säule wird auf eine entsprechende Apparatur (Abb. 1-11) gesteckt.
2. Die Säule wird konditioniert, zumeist mit einem organischen Lösungsmittel wie Methanol oder Acetonitril, gefolgt von Wasser.
3. Die Probelösung wird aufgegeben.
4. Anschließend wird die Säule gewaschen.
5. Die Säule wird trockengesaugt, um Reste der Waschlösung zu entfernen.
6. Abschließend erfolgt die Elution mit einem geeigneten Lösungsmittel, zumeist Methanol oder Acetonitril.



Falls erforderlich wird das Eluat eingengt und in einem geeigneten Lösungsmittel wieder aufgenommen, um anschließend mittels LC oder LC-MS analysiert werden zu können.

Die Vorteile der SPE im Vergleich zu anderen Probenvorbereitungstechniken sind:

- relativ einfache Handhabung
- verringerte Lösungsmittelvolumina beispielsweise gegenüber der Flüssig-Extraktion
- je nach Applikation gute Selektivität
- viele verschiedene Materialien und Applikationen verfügbar

Abb. 1-11. SPE-Manifold (Baker)

Im Routinebetrieb, d.h. bei der Analyse vieler Proben in kurzer Zeit, ist diese manuelle SPE mit einer Reihe von Nachteilen verbunden:

- sie ist sehr zeitintensiv
- der Personalbedarf ist recht hoch
- die relativ teuren SPE-Säulen werden im Allgemeinen nur einmal verwendet
- die Anzahl parallel analysierbarer Proben ist begrenzt

1.5.2 Immunoaffinitätssäulen (IAC)

Einen Sonderfall der SPE stellen die Immunoaffinitätssäulen (immunoaffinity column – IAC) dar. Immunoaffinitätssäulen sind mit einem Gel (strenggenommen handelt es sich also nicht um eine **Festphasenextraktion**) gefüllt, in dem spezifische Antikörper immobilisiert sind. Diese Proteine binden den oder die Analyten sehr selektiv und lassen den Großteil der Matrixbestandteile passieren (Abb. 1-12: IAC-Testprinzip am Beispiel Aflatoxine). Da dieses Material selektiver als alle chemischen SPE-Phasen ist, erhält man mittels IAC-Aufreinigung sehr reine Extrakte, die kaum Matrixbestandteile enthalten und somit nur wenig Störungen in den LC-Chromatogrammen verursachen, wie das Aflatoxin-Chromatogramm einer unbelasteten Probe Erdnüsse (Abb. 1-13) zeigt.

2. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion.

Die Säule enthält eine Gel-Suspension, an die monoklonale Antikörper spezifisch für Aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂ und M₁ kovalent gebunden sind.

- A: Die Probe wird aufgetragen; sind Aflatoxine im Probenextrakt vorhanden, werden diese von den monoklonalen Antikörpern gebunden.
- B: Alle anderen Substanzen werden nicht gebunden und passieren die Säule.
- C: Die gebundenen Aflatoxine werden aus dem Antigen-Antikörper-Komplex mit Methanol eluiert. Durch Methanol werden die Antikörper denaturiert und setzen dabei das Antigen (Aflatoxin) frei.

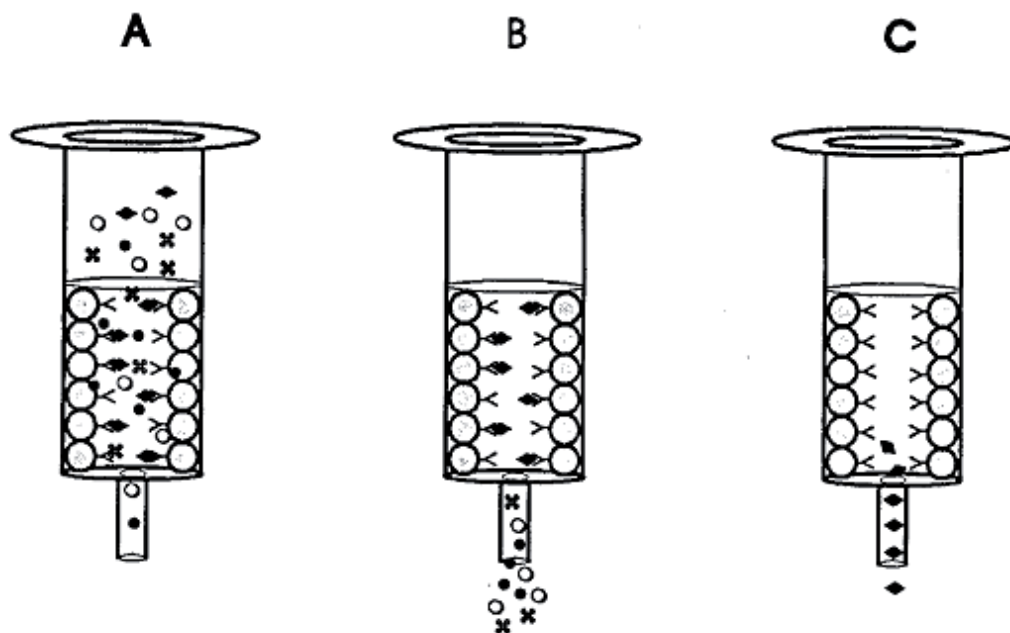


Abb. 1: Prinzip einer Immunoaffinitätssäule

Monoklonal vs. polyklonal

Die Gewinnung der Antikörper für IA-Säulen wie auch für ELISA-Testkits erfolgt üblicherweise durch Immunisierung von Versuchstieren. Dazu werden den Tieren, zumeist Kaninchen, der oder die Analyten (hier: Aflatoxine) gespritzt. Das Immunsystem der Tiere bildet Antikörper gegen diese so genannten Antigene. Diese **polyklonalen Antikörper** können anschließend aus dem Blut gewonnen werden. Polyklonale Antikörper sind in ihrer Spezifität sehr heterogen und zeigen von Lot zu Lot leicht variierende Eigenschaften.

Monoklonale Antikörper hingegen werden im Labor aus einer Zell-Linie mit identischem Erbmateriale (monoklonal) gewonnen und verfügen daher über eine hohe Spezifität und Homogenität (CAMMANN, 2001, S. 8-16f). Nach Aufreinigung werden die Antikörper für IA-Säulen an einem Trägermaterial wie Sepharose immobilisiert.

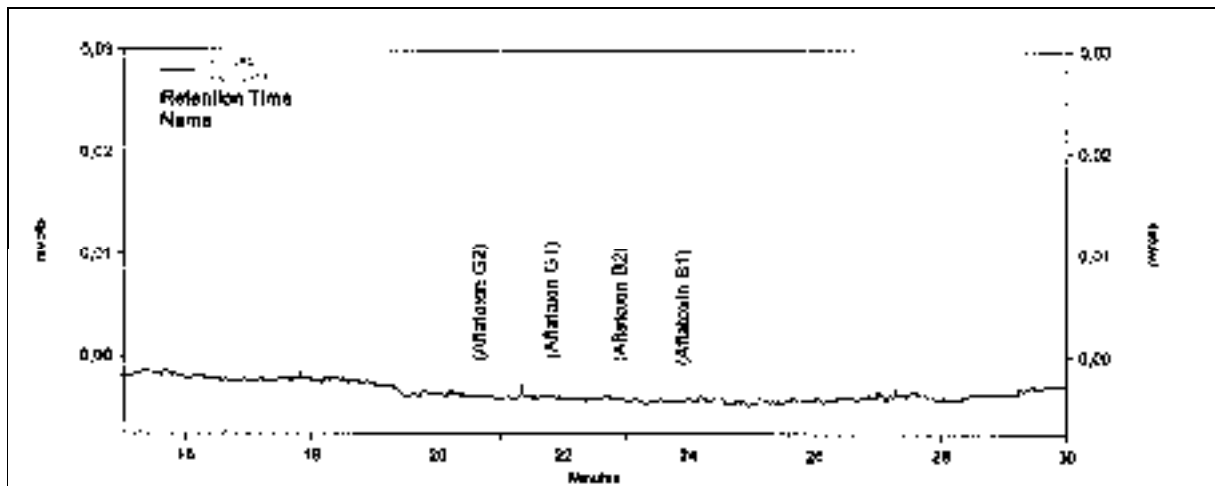


Abb. 1-13. Chromatogramm Aflatoxin-freie Erdnüsse

Die Arbeitsschritte der IAC-Aufreinigung (Abb. 1-12) entsprechen prinzipiell den unter 1.5.1 aufgeführten Schritten für die klassische SPE, allerdings müssen alle Schritte vor der Proben-Elution so ausgeführt werden, dass die empfindlichen Antikörper nicht denaturieren. So verbietet sich die Anwendung von organischen Lösungsmitteln zur Konditionierung, da hierbei die Tertiärstruktur der Eiweiße und damit die Fähigkeit, Mykotoxine zu binden, zerstört werden würde (SCOTT et al., 1997a; R-BIOPHARM, 2003).

Immunoaffinitätssäulen sind für viele Arten von Analyten kommerziell erhältlich. Einen Schwerpunkt bildet dabei die Analytik von Mykotoxinen.

Für die folgenden der in Tab. 1-3 aufgeführten Mykotoxine sind IA-Säulen auf dem Markt*:

- Aflatoxine B₁, B₂, G₁ und G₂
- Ochratoxin A (OTA)
- Deoxynivalenol (DON)
- T-2/HT-2 Toxin
- Aflatoxine M₁ und M₂
- Zearalenon
- Fumonisine B₁, B₂ und B₃

Immunoaffinitätssäulen sind von folgenden Herstellern bzw. Anbietern erhältlich*:

- r-biopharm, Darmstadt, Deutschland
- Coring, Gernsheim, Deutschland
- VICAM, Klaus Ruttmann GmbH, Hamburg
- Neogen Europe, Auchincruive, UK

* Stand: Oktober 2006, Listen jeweils ohne Anspruch auf Vollständigkeit

Aus den unter 1.4.2 und 1.4.7.3 genannten Gründen ist bisher kein Immunoaffinitätsmaterial für Patulin erhältlich.

Zwar bieten Immunoaffinitätssäulen neben den „SPE-Vorteilen“ der einfachen Handhabung und der geringen Lösungsmittelmengen den großen Vorteil einer hohen Selektivität. Nachtei-

le sind jedoch der hohe manuelle und zeitliche Aufwand bei der Aufarbeitung – und die hohen Kosten: Die Preise pro IA-Säule liegen zur Zeit zwischen € 10,58 (r-biopharm RIDA® Aflatoxin column) und € 22,90 (r-biopharm DONPREP), abhängig von der Abnahmemenge (Bsp.: R-BIOPHARM, Preisliste 2006). Da im Routinelabor mit dem Gebrauch von weiteren Säulen für Qualitätssicherungsmaßnahmen (Validierung, Führung von Qualitätsregelkarten etc.) und erforderliche Bestätigungsanalysen kalkuliert werden muss, übersteigen die tatsächlichen Kosten pro analysierter Probe die genannten Einzelpreise erheblich.

Auf weitere mögliche Probleme bei der Verwendung von IA-Säulen machen CASTEGNARO et al. (2006) aufmerksam. Im Bereich der in dieser Arbeit interessierenden Aflatoxine konnte folgendes festgestellt werden: In komplexen Proben (hier: bestimmte Maisproben) ist es möglich, dass unbekannte Matrixkomponenten aufgrund einer strukturellen Ähnlichkeit mit Aflatoxinen die Bindungsstellen der Antikörper blockieren und somit zu niedrige Ergebnisse für die Aflatoxine verursachen. Auch ist es möglich, dass in alkalisch behandelten Lebens- und Futtermitteln (Kakao, mit Ammoniak behandelte Futtermittel) der Aflatoxin-Lactonring geöffnet vorliegt, was dazu führt, dass diese offenen Formen nicht ausreichend mit den Antikörpern in Wechselwirkung treten. Entsprechend werden offene Aflatoxine nicht mit IA-Säulen erfasst, es sei denn, eine saure Extraktion wird durchgeführt. Offene Aflatoxine werden durch saures Milieu, beispielsweise durch die Magensäure von Säugetieren, wieder geschlossen und verfügen dann über eine entsprechende toxische Wirkung.

Die o.g. Autoren sehen ein grundsätzliches Problem darin, dass die Validierung von offiziellen Methoden (AOAC, EU etc.) nur an wenigen Matrices durchgeführt wird und diese Methoden auf andere, teilweise sehr komplexe Matrices wie Frühstückscerealien übertragen werden. Die oben genannten Effekte können dabei zu falschen Analyseergebnissen führen. Zu diesem Thema sei angemerkt, dass streng genommen eine Validierung für jede einzelne Matrix durchgeführt werden müsste, beispielsweise für jede Art von Cornflakes. Aus Machbarkeitsgründen muss hier in jedem Einzelfall ein sinnvoller Weg gefunden werden, erst recht in einem Routinelabor.

1.6 Online-SPE

Die unter 1.5 beschriebene SPE-Probenvorbereitungstechnik bedeutet bei manueller Durchführung einen hohen Zeit- und Personalaufwand. Zur Umgehung dieser Nachteile sind diverse Systeme zur Automatisierung erhältlich. Diese kann offline erfolgen, d.h. unabhängig von der anschließenden chromatographischen Trennung. Alternativ erfolgt sie online, d.h. direkt gekoppelt mit einer LC- oder LC-MS-Analyse. Tab. 1-15 führt eine Auswahl kommerziell erhältlicher Systeme auf; UNGER et al. (1995; S. 268) listen weitere Instrumente auf, die jedoch teilweise nicht mehr erhältlich sind. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Methoden setzen die Probenvorbereitungseinheit SP 3000 (Knauer, Spectralytics) (Abb. 1-14) ein, eine Weiterentwicklung des von APPLICA entwickelten Geräts SP2000. Der wichtigste Vorteil dieser Geräte liegt in einem Ausstattungsmerkmal: Sie verfügen über ein zweites Schaltventil, das sogenannte Bypass-Ventil. Mit diesem zweiten Ventil sind komplexere Fließwege möglich, was beispielsweise bei den Aflatoxinen erst die online-SPE-Analyse ermöglicht (s. 3.1.4).



Abb. 1-14. Probenvorbereitungseinheit SP 3000 (Knauer)

Tab. 1-15. Kommerziell erhältliche automatisierte Probenvorbereitungssysteme

System	Anbieter	Kommentar
SP 3000	Knauer, Berlin Spectralytics, Aalen	
AutoTrace/ RapidTrace	Caliper Life Sciences GmbH, Rüsselsheim	„Caliper“ hat die Fa. „Zymark“ aufgekauft; früheres Produkt: „Zymark BenchMate II“
ASPEC	Gilson Int., Bad Camberg	
MPS	Gerstel, Mühlheim a.d.R.	
Millilab Workstation	Waters GmbH, Eschborn	Nicht mehr im Angebot

Stand: Oktober 2006, ohne Anspruch auf Vollständigkeit

Skurriles am Rande: Online-SPE fürs Kamelrennen

Der in Tab. 1-15 genannte Anbieter Caliper preist auf seiner Homepage* das Product „RapidTrace“ wie folgt an:

„The product also provides utility in a variety of other industries, including the Tobacco, Food and Beverage, and even **the horse and camel racing industries.**“

Es ist zu vermuten, dass das Gerät bei der Analyse von Dopingproben von Rennpferden und –kamelen eingesetzt wird.

* <http://www.caliperls.com/products/rapidtrace.html>, Zugang am 23.10.06

Prinzip

Die online-SPE-Einheit wird zwischen Autosampler und Trennsäule in ein bestehendes LC-System integriert (Abb. 1-15). Die unten dargestellten Schaltbilder (Abb. 1-16 und 1-17) verdeutlichen das Prinzip.

Abb. 1-15. Integration der Probenvorbereitungseinheit in eine LC-Anlage

(v.l.: Degasser, Pumpe, SP 3000, Autosampler, UV-Detektor, Fluoreszenz-Detektor mit Nachsäulenderivatisierung/CoBrA-Zelle)

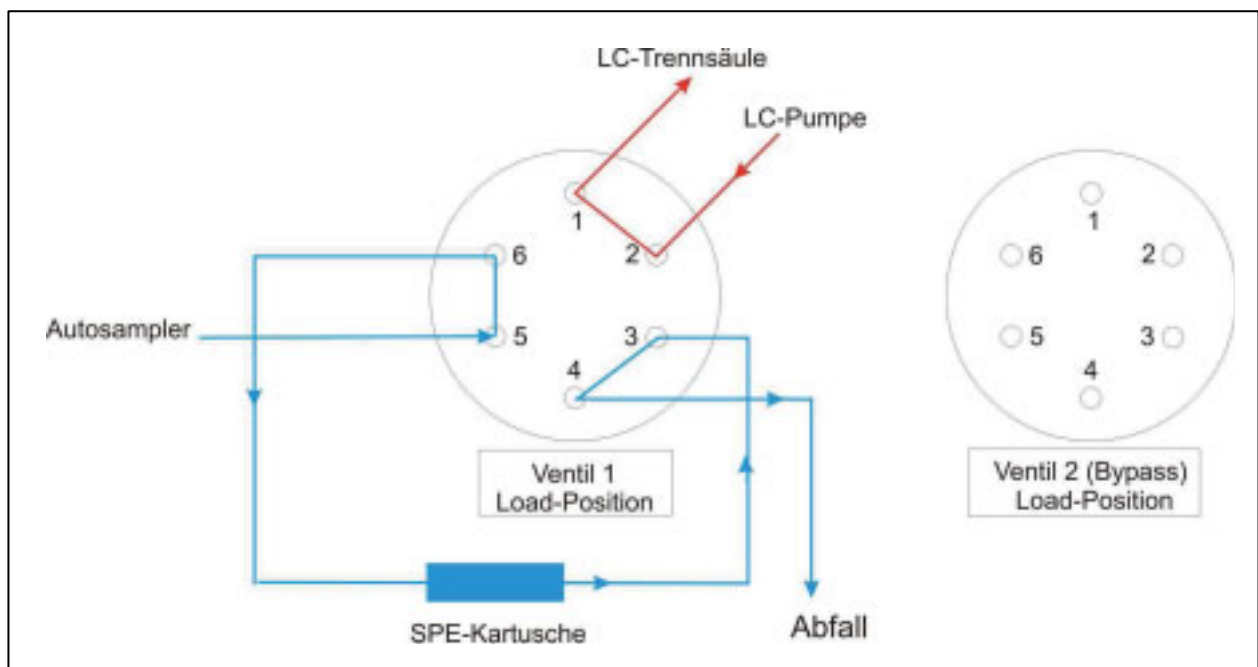


Abb. 1-16. SP 3000: Probenaufgabe, Waschschrift, Rekonditionierung

Schritt 1: Probenaufgabe (Abb. 1-16)

Der Autosampler injiziert direkt auf die mit einem geeigneten SPE-Material gefüllte SPE-Kartusche.

Schritt 2: Waschschrift (Abb. 1-16)

Das Modul pumpt zur Entfernung der Matrix eine geeignete Waschlösung (Wasser, Puffer etc.) über die Kartusche in den Abfall.

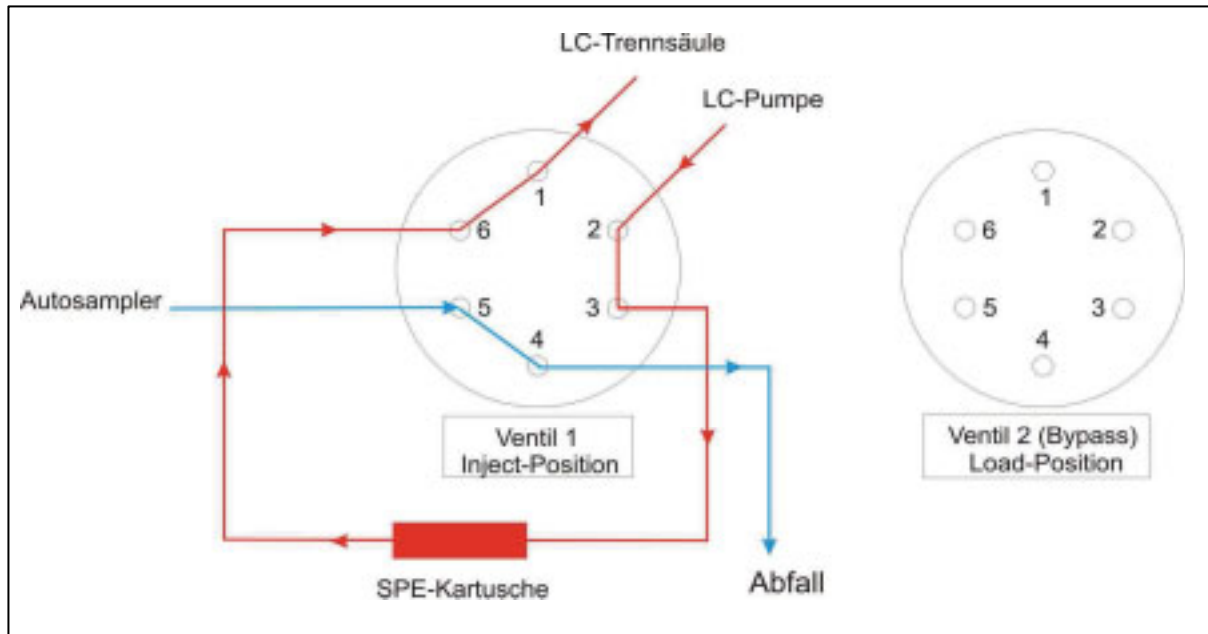


Abb. 1-17. SP 3000: Transferschritt

Schritt 3: Transferschritt (Abb. 1-17)

Nach Schaltung des Ventils fließt der LC-Eluent, von der LC-Pumpe kommend, über die SPE-Kartusche. Mittels der Elutionskraft des LC-Eluenten werden dabei die Analyten auf die Trennsäule transferiert.

Schritt 4: Rekonditionierung (Abb. 1-16)

Während der LC-Trennung wird die SPE-Kartusche, nach erneuter Schaltung in die Ausgangsposition, mit Wasser (Puffer etc.) gereinigt und rekonditioniert. Danach steht sie für eine weitere automatisierte Probenvorbereitung zur Verfügung.

Die Vorteile der Automatisierung gegenüber der manuellen Durchführung liegen in folgenden Punkten:

- erhebliche Zeitersparnis
- deutlich verringerter Personalbedarf
- Mehrfachverwendung des SPE-Materials (bis zu mehreren hundert Mal, abhängig von Material und Applikation)
- erhöhte Reproduzierbarkeit durch Automatisierung
- Verwendung derselben Kartusche für alle Proben- und alle Standardlösungen
- hierdurch auch automatische Wiederfindungskorrektur des SPE-Schritts auch für Standardlösungen
- verringerte Lösungsmittelvolumina
- Verbesserung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze gegenüber direkter Analyse durch Aufkonzentrierung, dabei Injektion großer Probenvolumina (bis 1000 μL und mehr) möglich

Die online-SPE-Technik gewinnt insbesondere in der chromatographischen Rückstandsanalytik immer mehr an Bedeutung. Anwendungsbeispiele sind die Analyse von Pestiziden (HENNION, 1998) oder des Antibiotikums Chloramphenicol in Honig und anderen Bienenprodukten (GROTEWAHL, 2006).

Die Anwendung im Bereich Aflatoxine wird unter 2.2.1 beschrieben.

1.7 Flüssigchromatographie (LC)

Wie in den Kapiteln über Aflatoxine (1.3.7) und Patulin (1.4.7) dargelegt ist die Flüssigchromatographie (LC) die mit Abstand am häufigsten angewandte Technik bei der Bestimmung dieser Mykotoxine.

Die Abkürzung LC (liquid chromatography – Flüssigchromatographie) wird dabei synonym mit dem Begriff HPLC (high performance liquid chromatography – Hochleistungs-Flüssigchromatographie) verwendet. Traditionell wurde mit dem „P“ der Begriff „pressure“ (Druck) abgekürzt, abgeleitet von den relativ hohen Arbeitsdrücken (rund 50 bis 250 bar) des Systems. KROMIDAS hat in seinem HPLC-Buch (1997) eine nicht immer ganz ernstgemeinte Reihe weiterer Interpretationsmöglichkeiten zusammengestellt, in denen jeweils mindestens ein Fünkchen Wahrheit steckt, s. Tab. 1-16.

Tab. 1-16. Was die Abkürzung „HPLC“ bedeuten kann (nach KROMIDAS, 1997)

Englisch	Deutsch
High Performance Liquid Chromatography	Hochleistungs-Flüssigchromatographie
High Pressure Liquid Chromatography	Hochdruck-Flüssigchromatographie
High Price Liquid Chromatography	Hochpreis-Flüssigchromatographie
High Prestige Liquid Chromatography	Hochprestige-Flüssigchromatographie
High Peaks Liquid Chromatography	Hochpeak-Flüssigchromatographie
High Profite Liquid Chromatography	Hochprofit-Flüssigchromatographie
High Propaganda Liquid Chromatography	Hochreklame-Flüssigchromatographie
High Promise Liquid Chromatography	Hochversprechende Flüssigchromatographie
High Philosophy Liquid Chromatography	Hochphilosophie-Flüssigchromatographie
High Polite Liquid Chromatography	Hochhöfliche Flüssigchromatographie
High Problem Liquid Chromatography	Hochproblem-Flüssigchromatographie
High Phantasy Liquid Chromatography	Hochphantasie-Flüssigchromatographie
High Pragmatic Liquid Chromatography	Hochpragmatische Flüssigchromatographie
High Pleasure Liquid Chromatography	Hochfreude-Flüssigchromatographie

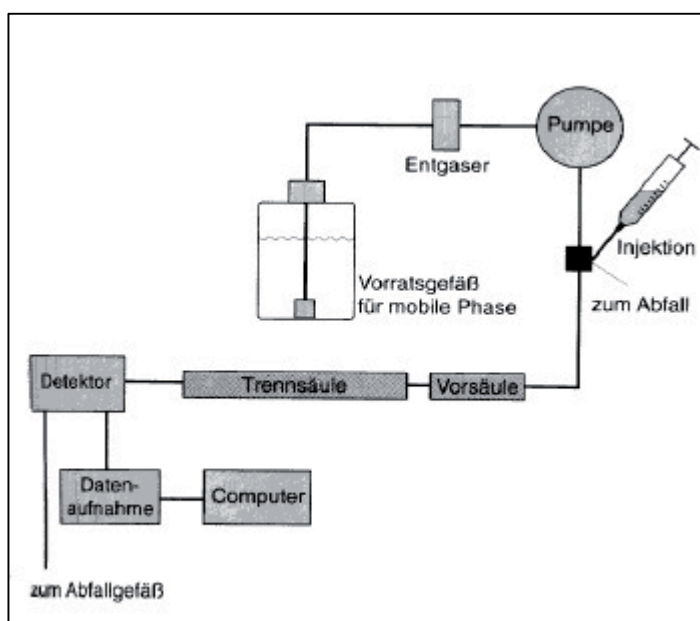


Abb. 1-18. Aufbau einer LC-Anlage
(aus: CAMMANN, 2001)

Die LC gehört zu den chromatographischen Trenntechniken und funktioniert nach folgendem Prinzip (Abb. 1-18, vergl. auch Abb. 1-15):

Eine Pumpe fördert eine Flüssigkeit, den sogenannten Eluenten (mobile Phase), über eine Trennsäule (stationäre Phase). Die zu analysierende Probelösung wird vor der Trennsäule aufgegeben, die Bestandteile der Probelösung treten mit der Füllung der Trennsäule in Wechselwirkung. Durch die unterschiedlich starke Wechselwirkung der einzelnen Probestoffe werden diese unterschiedlich lange auf der Trennsäule festgehalten und erreichen zeitlich verzögert den Detektor hinter der Trennsäule, der

den interessierenden Stoff erfasst (vergl. CAMMANN, 2001, S. 6-26ff; RÜCKER et al., 2001, S. 440ff; MEYER, 1992).

Die Minimalausrüstung einer LC-Anlage (Abb. 1-18) besteht aus folgenden Komponenten:

- Pumpe
- Probenaufgabesystem
- Trennsäule
- Detektor
- Datenausgabe

Üblicherweise verfügen moderne LC-Anlage auch über folgende Module:

- Degasser (zur Entgasung der Eluenten)
- Autosampler (als automatisches Probenaufgabesystem)
- Säulenthermostat (teilweise im Autosampler integriert)
- Datenverarbeitung am Computer (als Datenausgabe)

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten LC-Anlagen verfügen darüber hinaus über folgende Bestandteile:

- online-SPE (1.6)
- Nachsäulen-Derivatisierungseinheit (Aflatoxine)

Die LC bzw. HPLC ist eine Weiterentwicklung der Dünnschichtchromatographie (DC), bei der ebenfalls die in einer mobilen Phase gelösten Probekomponenten mit einer stationären Phase in Wechselwirkung treten. Jedoch erlaubt die LC einen automatisierten Rund-um-die-Uhr-Betrieb und minimiert den Personaleinsatz. Mindestens ebenso wichtig sind die deutlich besseren Leistungsdaten der LC beispielsweise hinsichtlich Reproduzierbarkeit, Nachweis- und Bestimmungsgrenze etc. Die LC als robuste und relativ kostengünstige Technik stellt die ideale Ergänzung zur Gas-Chromatographie (GC) dar, da mit der LC nicht- oder schwerflüchtige Komponenten gut getrennt und detektiert werden können (CAMMANN, 2001). Hinzu kommt, dass ein LC-System im Gegensatz zur LC-MS-Technik praktisch zur Grundausstattung eines analytischen Labors gehört und neue Applikationen somit kaum Neuinvestitionen erfordern.

2 Problemstellung

2.1 Hintergrund

Das Interesse an Mykotoxinen sowohl von Seiten der Wissenschaft als auch von Seiten der Gesetzgeber hat in den letzten Jahren deutlich zugenommen.

Die Mykotoxanalytik unterliegt dabei wie in der Einleitung dargestellt ständigen Weiterentwicklungen. Diverse Arbeitsgruppen forschen an der Neuentwicklung von Analyseverfahren und an der Weiterentwicklung bestehender Methoden.

Aufgrund der gesetzlich festgesetzten Höchstmengen für eine Reihe von Mykotoxinen kommt den Analyseverfahren besondere Bedeutung zu. Ihr Ergebnis entscheidet, ob ein Lebensmittel verkehrsfähig ist oder nicht. Entsprechend hohe Ansprüche werden an die Analysemethoden gestellt: Das Ergebnis muss nicht nur entsprechend richtig und vergleichbar sein, es muss für den Auftraggeber auch möglichst schnell zur Verfügung stehen, bei möglichst niedrigen Kosten. Diesen Druck der Weiterentwicklung haben somit insbesondere private Labore, die im Wettbewerb um Aufträge von Händlern, Verarbeitern, Herstellern und anderen am Verkehr mit Lebensmitteln Beteiligten stehen.

Vor diesem Hintergrund war das Ziel der vorliegenden Dissertation, Methoden zur Analyse von Mykotoxinen zu entwickeln, die sich durch die folgenden Vorteile von bestehenden Methoden unterscheiden sollten: Sie sollten schneller, kostengünstiger und zuverlässiger sein. Diese Ziele sollten durch Anwendung der bekannten online-SPE-LC-Kopplung auf die Analyse der exemplarisch ausgewählten Mykotoxine Patulin und Aflatoxine erreicht werden, unter Beibehaltung bewährter Analyseprinzipien.

2.2 Stand der Forschung

Im Folgenden ist der Stand der Forschung für die Analyse von Aflatoxinen und Patulin beschrieben, mit dem Schwerpunkt auf der Probenvorbereitung, deren Übertragung auf die online-SPE das Hauptziel der Doktorarbeit war.

2.2.1 Aflatoxine

2.2.1.1 Routinemethoden

Die Methode der Wahl zur Analyse von Aflatoxinen besteht aus einer Probenvorbereitung mit Immunoaffinitätssäulen und einer chromatographischen Analyse mittels Flüssigchromatographie mit Fluoreszenzdetektion nach Nachsäulenderivatisierung (JAIMEZ et al., 2000; auch TRUCKSESS, 2006). Auch ein Großteil der modernen so genannten offiziellen Methoden arbeitet nach diesem Prinzip:

Die deutsche **Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB** (früher § 35 LMBG), herausgegeben vom BVL (Stand Dez. 2004), enthält Methoden für die folgenden Matrices, die alle mit Immunoaffinitätssäulen-Reinigung und anschließender LC-Fluoreszenz-Analyse mit Nachsäulenderivatisierung arbeiten:

- **L 15.00-2:** Getreide, Schalenfrüchte und verwandte Produkte
- **L 23.05-2:** Erdnüsse, Pistazien, Feigen und Paprikapulver
- **L 48.00-1:** Säuglings- und Kleinkindernahrung

Auch die folgenden offiziellen Methoden und Normen wenden dieses Analyseprinzip an:

- **AOAC Official Method 991.31:** "Aflatoxins in Corn, Raw Peanuts, and Peanut Butter, Immunoaffinity Column (Aflatest) Method (49.2.18)" (1995)
- **ISO-Norm 16050:2003:** "Foodstuffs – Determination of aflatoxin B₁, and the total content of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in cereals, nuts and derived products – High-performance liquid chromatographic method"
- **ISO-Norm 14718:1998:** "Animal feeding stuffs – Determination of aflatoxin B₁ content of mixed feeding stuffs – Method using high-performance liquid chromatography"
- **SLMB Kap. 54, Methode 1.1.5 (2004):** „Bestimmung der Aflatoxine B₁, B₂, G₁, G₂ in verschiedenen Lebensmitteln mittels HPLC basierend auf der Norm EN 14123“ (*Anm.: damit identisch mit ASU § 64 LFGB L 23.05-2, s.o.*)

2.2.1.2 Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung für die Aflatoxin-Analyse besteht aus einem Extraktionsschritt, bei dem in der Probe enthaltene Aflatoxine möglichst quantitativ in Lösung gebracht werden, und einem Aufreinigungs- und Aufkonzentrierungsschritt. Letzterer wird wie beschrieben üblicherweise mit Immunoaffinitätssäulen durchgeführt, s. auch 1.3.7.7 und 1.5.2.

Für den Extraktionsschritt sind verschiedene Ansätze beschrieben. STROKA et al. haben 1999 verschiedene Extraktionsmittel für die Analyse von Aflatoxin B₁ in diversen Matrices geprüft. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass Methanol/Wasser-Gemische (80:20, v/v) zumeist geeigneter sind als solche aus Wasser mit Acetonitril oder Aceton.

COLE et al. (1994) kommen zu der Empfehlung, für die Aflatoxin-Analyse von Erdnüssen ein Methanol/Wasser-Gemisch (80:20, v/v) einzusetzen, bei einer Extraktionsmittelkonzentration von 3 mL/g.

Diese Empfehlungen liegen dicht an den vom IAC-Hersteller R-BIOPHARM (2003) gemachten Vorgaben, nach denen ein Methanol/Wasser-Gemisch 70:30 (v/v) in einer Konzentration von 5 mL/g Probe eingesetzt wird. Die ASU § 64 LFGB-Methode L 15.00-2 setzt ebenfalls ein 70:30-Gemisch zur Extraktion ein, die Methode L 23.05-2 hingegen ein 80:20-Gemisch, gegebenenfalls mit einer an die Matrix angepassten Modifikation, wie der Zusatz von Hexan bei Erdnussmus. Die Methode für Säuglingsnahrung (L 48.00-1) verwendet eine Aceton/Wasser-Mischung (BVL, Stand: Dez. 2004).

Nach JAIMEZ et al. (2000) ist das Extraktionsmittel grundsätzlich der zu extrahierenden Matrix anzupassen. Insbesondere bei stark fetthaltigen und anderen komplexen Proben kann eine Variation des Extraktionsmittels, z.B. durch Zusatz von Hexan oder durch Zugabe von Natriumchlorid zu besseren Extraktionsergebnissen führen, vergl. z.B. ASU L 23.05-2.

Immunoaffinitätssäulen-Reinigung

Für die Anwendung von Immunoaffinitätssäulen ist eine Reihe von Methoden beschrieben. Neben den drei oben erwähnten ASU § 64 LFGB-Methoden (s. auch TRUCKSESS et al., 1991; STROKA et al., 2000) setzen u.a. die folgenden Methoden IAC ein, vergl. auch Reviews von HOLCOMB et al. (1992) und JAIMEZ et al. (2000):

Zwei der ersten Veröffentlichungen hierzu stammten von GROOPMAN et al. (1984, 1988). HOLCOMB et al. (1991) beschrieben bereits die heute noch als „Stand der Technik“ angesehene Kombination aus Immunoaffinitätssäulen-Probenvorbereitung und anschließender LC-Trennung mit Fluoreszenzdetektion nach Nachsäulenderivatisierung.

PATEY et al. veröffentlichten eine in einem Ringversuch erprobte IAC-Probenvorbereitung für Aflatoxin B₁ (1990) und für alle Aflatoxine (1991) in Erdnussbutter.

Für die Analytik von Aflatoxin M₁ in Milch wurde in drei Veröffentlichungen (1991a und b, 1992) von FARJAM et al. eine online-Methode beschrieben, die mit einer Immuno-Vorsäule arbeitet. MORTIMER et al. veröffentlichten schon 1987 eine Methode zur Bestimmung von

AFM₁ in Milch und Milchpulver mittels IAC und anschließender LC. Dieses Prinzip wurde 1993 von TUINSTRAL et al. in einem Ringversuch verifiziert.

2.2.1.3 Automatisierung des SPE-Schritts

Wie bei anderen Analyten auch, sind diverse Ansätze zur Automatisierung des SPE-Schritts geprüft worden. Dabei ist grundsätzlich zwischen offline- und online-Automatisierungen zu unterscheiden (s. auch 1.6):

offline-SPE-LC-Kopplung: Ein Anwendungsbeispiel aus der Mykotoxin-Analytik von Staub stammt von KUSSAK et al. (1995b), die eine Millilab 1A Workstation eingesetzt haben. Ebenfalls IAC wurden von HINKEL et al. (2005) und von SHARMAN et al. (1992) für die offline-Vorbereitung von Ochratoxin A-Proben eingesetzt, unter Verwendung des Rapid Trace-Systems. Das auch online verwendbare Gerät ASPEC (s. folgender Absatz) wurde von ESKOLA et al. (2002) zur Bestimmung von Ochratoxin A und Zearalenon eingesetzt.

online-SPE-LC-Kopplung: Im Bereich der Aflatoxinanalytik präsentierten CARMAN et al. (1996) ein selbst entwickeltes Robotersystem zur automatischen Durchführung des IAC-Schritts und der anschließenden Injektion in das LC-System. Bereits Anfang der neunziger Jahre stellten SHARMAN et al. (1991a) ein kommerziell erhältliches System zur SPE-LC-Analyse vor, das für den Gebrauch mit Immunoaffinitätsäulen modifiziert wurde. Eine weitere Anwendung stammt von NIEDWETZKI et al. (1994), die ein Zymark BenchMate-Gerät zur Automatisierung der Probenvorbereitung mit optionaler online-LC-Kopplung einsetzen. Die Technik erreichte Nachweisgrenzen von 0,1 µg/kg (AFB₁, AFG₁) bzw. 0,03 µg/kg (AFB₂, AFG₂). Neben dem erwähnten BenchMate-Gerät ist ein anderes Instrument namens ASPEC (Automated solid phase extraction) des Herstellers Gilson auf dem Markt (vergl. SHARMAN et al., 1991a). Weiterhin wurde kürzlich eine online-SPE-LC-MS-Kopplung beschrieben, bei der ein Probenvorbereitungsgerät (MultiPurposeSampler – MPS) der Firma Gerstel zum Einsatz kommt (DEUSSING, 2006).

Diese vorgestellten Systeme haben jedoch den Nachteil, dass für jede Analyse eine neue IA-Säule benötigt wird, so dass der Hauptvorteil in der Automatisierung der Probenvorbereitung liegt.

Eine Automatisierung unter Mehrfachnutzung von IA-Material wurde hingegen von URANO et al. (1993) beschrieben. Im verwendeten System wurde allerdings selbsterzeugtes statt kommerziell erhältlichem Immunoaffinitätsmaterial eingesetzt. Die Methode erreichte gute Leistungsdaten an den Matrices Mais und Erdnüsse, bei guter Stabilität des Immunoaffinitätsmaterials, das mehr als 50 Mal genutzt werden konnte.

Hier liegt das Hauptproblem bei der **Mehrfachnutzung von Immunoaffinitätsmaterial**: die im IA-Material enthaltenen Antikörper sind empfindlich gegenüber organischen Lösungsmitteln (SCOTT et al., 1997a), da es sich um Proteine handelt. Ohne diese organischen Lösungsmittel ist jedoch eine Elution, d.h. eine Trennung des Antikörper-Antigen-Komplexes, kaum möglich (s. 1.5.2).

Mit der angestrebten Mehrfachnutzung von IA-Material für die Aflatoxinanalyse haben sich neben der beschriebenen Arbeit von URANO et al. (1993) diverse andere Forschergruppen beschäftigt, wie eine Übersicht von SCOTT et al. (1997a) belegt. Die meisten Projekte arbeiteten dabei ebenfalls an Aflatoxinen. Als eine der ersten Arbeiten beschrieben GROOPMAN et al. (1988) die Bestimmung von Aflatoxinen und Metaboliten in biologischen Flüssigkeiten. Die Nutzungsanzahl für die IA-Säulen betrug dabei mehr als 100 Mal. Für die Matrix Milch haben KAVERI et al. (1987) und FARJAM et al. (1991a und b, 1992) die Mehrfachnutzung von IAC beschrieben, wobei mehr als 20 Nutzungen erreicht werden konnten. In einer anderen Publikation berichteten FARJAM et al. (1992) von 109 Nutzungen für die Bestimmung von Aflatoxin M₁ in dialysierter Milch. Die Dialyse entfernt dabei Substanzen, die die Stabilität

des Immunoaffinitätsmaterials negativ beeinflussen. Die Mehrfachverwendung für Bier wurde von SCOTT et al. (1997b) dargelegt.

Auch für andere Mykotoxine ist die Mehrfachverwendung von IA-Material beschrieben, mit dem Schwerpunkt auf Ochratoxin A (OTA). So wurden 30 und mehr Nutzungen für OTA in Kaffee von NAKAJIMA et al. (1990) erreicht. Weitere Arbeiten sind von STUDER-ROHR et al. (1995) und ZIMMERLI et al. (1995, 1996) veröffentlicht. Eine Technik für Fumonisine stammt von SCOTT et al. (1997a), eine für Zearalenon von AZCONA et al. (1990). RAZZAZI-FAZELI et al. (2006) präsentierten eine neue Variante von Immunoaffinitätsmaterial, entwickelt für die Analytik von Deoxynivalenol (DON). Dabei werden die Antikörper in ein Gel eingeschlossen, was ein schonenderes Verfahren als die klassische Immobilisierung darstellt. Die Säulen sind ebenfalls wiederverwendbar (mindestens 25 Mal) und erreichen gute Wiederfindungen > 85 %, allerdings ist eine mögliche Verschleppung durch unvollständige Elution noch nicht geprüft worden (mündliche Auskunft des Autors, 2006).

Für die Mehrfachnutzung von Immunoaffinitätsmaterial ist in jedem Fall eine weitestgehende **Regenerierung** der Antikörper erforderlich. Diese erfolgt zumeist mit Wasser oder Phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS). Die Art und Weise sowie die Erfolgsaussichten der Regeneration hängen dabei von der Art des Antikörpers ab (mono- oder polyklonal). Gemäß der Zusammenfassung von SCOTT et al. (1997a) geht die Regenerierung von polyklonalen Antikörpern schneller und vollständiger.

2.2.1.4 Fluoreszenz-Detektion nach Derivatisierung

Aufgrund der guten Fluoreszenzeigenschaften der Aflatoxine eignet sich diese Detektionsmöglichkeit sehr gut für eine selektive Analytik, vergl. 1.3.7.1.

Wie unter 1.3.7.8 beschrieben ist es dabei erforderlich, die Aflatoxine B₁ und G₁ zu derivatisieren, um eine empfindliche Fluoreszenzdetektion zu erreichen.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde zu diesem Zweck eine CoBrA-Zelle zur Nachsäulenderivatisierung eingesetzt, da diese wie in Tab. 1-11 gezeigt eine Reihe von Vorteilen bietet.

2.2.2 Patulin

2.2.2.1 Routinemethoden

Die klassische Patulin-Analytik besteht aus einer Flüssig-flüssig-Extraktion (englisch abgekürzt LLP) mit Ethylacetat und anschließender Umkehrphasen-LC-Trennung mit UV-Detektion bei 275 bis 277 nm (SHEPHARD et al., 2000; MOAKE et al., 2005; s. auch 1.4.7.1).

Dieses Prinzip wenden ebenfalls die meisten genormten Verfahren an:

- **ASU § 64 LFGB L 31.00-20** (BVL, Stand Dez. 2004), identisch mit der deutschen Norm DIN EN 14177: „Bestimmung von Patulin in klarem und trübem Apfelsaft und Apfelpüree“; die Methode L 30.00-4 („Bestimmung von Patulin in Apfelpüree“) verweist auf die genannte Methode.
- **ISO 8128-1:1993**: „Apple juice, apple juice concentrate and drinks containing apple juice – Determination of patulin content – Part 1: Method using high-performance liquid chromatography“
- **AOAC-Methode 995.10**: „Patulin in apple juice, liquid chromatographic method, AOAC-IUPAC-IFJU Method“ (BRAUSE et al., 1996)

- **Schweizerisches Lebensmittelbuch** (SLMB, Ausgabe 2004; Hrsg.: BUNDESAMT FÜR GESUNDHEIT): Kap. 54, Methode 1.3

Auch eine Reihe weiterer veröffentlichter Methoden arbeitet mit LLP-LC-UV, beispielsweise GÖKMEN et al. (1996; 1999, simultane Bestimmung von Patulin und HMF), LAI et al. (2000), BARTOLOMÉ et al. (1994, Verwendung eines DAD), AKTAS et al. (2004, ebenfalls mit DAD) BRAUSE et al. (1996) und MacDONALD et al. (2000). Die Vorschriften beziehen sich zu meist auf die Analyse von Apfelprodukten, jedoch kann dieses Analyseprinzip auch auf andere Fruchtmatrices übertragen werden.

2.2.2.2 Probenvorbereitung

Wie unter 1.4.7.7 beschrieben beruht die Probenvorbereitung üblicherweise entweder auf einer Flüssig-flüssig-Extraktion mit Ethylacetat und integriertem Waschschrift mit basischer Carbonatlösung oder auf einem Festphasen-Extraktionsschrift. Als Abwandlung hiervon kann die MycoSep-Säulentechnik angesehen werden, die den Analyten passieren lässt, aber Matrixbestandteile zurückhält.

Da ein Ziel der Arbeit die Übertragung der Patulin-Analytik auf die online-SPE-Technik war, wird im Folgenden auf den aktuellen Stand der Technik bei der SPE-Aufarbeitung von Patulin eingegangen. Eine zusätzliche Flüssig-flüssig-Extraktion sollte sofern möglich umgangen werden. Eine MycoSep-Aufarbeitung wurde als zusätzlicher Aufreinigungsschrift ins Auge gefasst, bevorzugt in Form einer zweiten Kartusche bei der online-SPE.

Festphasenextraktion (SPE)

In den vergangenen Jahren sind verstärkt Festphasenextraktions-Methoden für die Isolierung von Patulin entwickelt worden (SHEPHARD et al., 2000). Basierend auf der von H.S. LEE et al. (1986) durchgeführten Aufreinigung von HMF an einer RP 18-Kartusche, entwickelten LEHMANN et al. (1990) eine Methode mit zwei Reinigungsschriften an einer RP 18- und einer Kieselgelsäule zur Analyse des chemisch verwandten Patulins (vergl. 1.4.2).

TRUCKSESS et al. (1999; identisch: 2001) präsentierten eine Methode, die OASIS HLB SPE-Säulen (Waters) verwendet. Nach Probenaufgabe wird die Säule mit Natriumcarbonat-Lösung gewaschen, so dass der sonst per Flüssig-flüssig-Extraktion durchgeführte Waschschrift in die SPE-Aufarbeitung eingebaut wird. Die Elution erfolgt mit einem Acetonitril/Ether-Gemisch (2:98, v/v), die abschließende Analyse klassisch mittels LC-UV.

Eine während der Erstellung der hier präsentierten Arbeit veröffentlichte Methode beschrieb die Verwendung einer Spritzenkartusche (syringe-cartridge), bei der der Waschschrift ebenfalls auf der SPE-Phase durchgeführt wird (EISELE et al., 2003): Die Lösungen werden mit Hilfe einer Spritze über eine SPE-Säule gedrückt. Der Waschschrift erfolgt mit Natriumcarbonat-Lösung und die Elution mit einem Diethylether/Ethylacetat(90:10, v/v)-Gemisch. Die quantitative Bestimmung wird ebenfalls mittels LC-UV durchgeführt.

Als Vorbereitung für eine anschließende LC-MS-Analyse haben ITO et al. (2004) drei SPE-Materialien getestet: OASIS HLB (Waters, s.o.), Styrol-Divinylbenzol und Styrol-Divinylbenzol mit N-Methacrylat (beide GL Sciences). Sie erreichten für das letztgenannte Material die besten Wiederfindungen.

Eine Kombination aus Flüssig-flüssig-Extraktion und Festphasenextraktion beschrieben RO-VIRA et al. (1993): Nach Extraktion mit Ethylacetat, Einkonzentrieren und anschließendem Aufnehmen in Chloroform wird die Lösung auf eine Sep-Pak SiO₂-Kartusche (Waters) aufgegeben. Nach drei Waschschriften wird der Analyt mit Ethylacetat/Chloroform 80:20 (v/v) eluiert. Nach Entfernung des Lösungsmittels wird der Rückstand in Wasser/Tetrahydrofuran (99:1, v/v) aufgenommen und mittels LC-UV analysiert. Ebenfalls mittels LLP + SepPak-SPE bereiteten RYCHLIK et al. (1999) die Proben für die anschließende HRGC-HRMS-Analyse vor. HERRY et al. (1996) beschrieben eine ähnliche Vorbereitung, bei der der LLP-Schrift mittels Extrelut-Säulen (Merck) durchgeführt wird (vergl. 1.4.7.7). Die Elution erfolgt mit einem Toluol/Ethylacetat-Gemisch (75:25, v/v). Die folgende SPE-Aufreinigung wird an einer

Florisil-Säule (Waters) durchgeführt. Nach zwei Waschschrritten wird schließlich mit Toluol/Ethylacetat-Gemisch (75:25, v/v) eluiert, abschließend erfolgt eine LC-UV-Analyse. Ebenfalls eine aus zwei Schritten bestehende Aufarbeitung beschrieben ARRANZ et al. (2005), eine im Verlauf dieser Dissertation veröffentlichte Arbeit. Die Extraktion wird mittels Ethylacetat/Hexan (60:40, v/v) unter Zugabe von Sand, Natriumsulfat und Natriumhydrogencarbonat durchgeführt. Der folgende SPE-Schritt erfolgt mittels Silicagel-SPE-Säule (Supelco) und die Elution mit Ethylacetat/Hexan (60:40, v/v). Die Analyse wird per LC-UV durchgeführt. Anzumerken ist, dass bei der hier beschriebenen Methode Patulin nicht bzw. fast nicht von der SPE-Kartusche zurückgehalten wird; vielmehr bleiben störende Matrixkomponenten hängen. Somit ähnelt diese Aufarbeitung dem MycoSep-Prinzip (1.4.7.7).

Waschschritt

In der Patulin-anfälligsten Matrix Frucht befinden sich insbesondere viele saure Substanzen, die bei der LC-UV-Analyse stören können, da sie ähnliche Eigenschaften haben, beispielsweise eine hohe Polarität sowie eine UV-Absorption im UV-Maximum von Patulin (276,5 nm). Um diese Substanzen zumindest zu einem erheblichen Teil zu entfernen, wird ein basischer Waschschritt, üblicherweise mit Natriumcarbonat-(Na_2CO_3 -)Lösung durchgeführt. Bei der LLP-Aufarbeitung wird der Ethylacetat-Extrakt mit Natriumcarbonat-Lösung ausgeschüttelt, so dass saure Komponenten, in erster Linie Phenole, deprotoniert werden. Hierdurch werden die Substanzen ionischer und polarer, so dass sich ihre Löslichkeit in der wässrigen Phase stark erhöht (SHEPHARD et al., 2000).

Dieser Waschschritt kann auch auf einer SPE-Kartusche durchgeführt werden, vergl. TRUCKSESS et al. (1999, 2001) und EISELE et al. (2003). Auf diesem Weg werden Matrixkomponenten von der SPE-Säule in den Abfall gewaschen.

Zum Einsatz kommen im Allgemeinen Natriumcarbonat-Lösungen mit Konzentrationen zwischen 1 % (z.B. TRUCKSESS et al., 1999, 2001; EISELE et al., 2003) und 1,5 % (z.B. ASU L 31.00-20; BRAUSE et al., 1996; MacDONALD et al., 2000).

2.2.2.3 Automatisierung des SPE-Schritts

Die Anzahl an publizierten SPE-Methoden für Patulin ist eher klein, im Vergleich zur Vielzahl an LLP-Methoden. Eine online-SPE-LC-Kopplung ist bisher nicht veröffentlicht worden, wohl aber eine Kopplung aus online-SPE-Aufarbeitung und LC-MS-Analyse.

TAKINO et al. beschrieben 2003 folgendes Prinzip: Parallel zur LC-MS wird ein Säulenschaltventil eingesetzt. Mit Hilfe einer wässrigen mobilen Phase, die von einer zusätzlichen Pumpe gefördert wird, wird die injizierte Probe Apfelsaft auf eine RP 18-Vorsäule gegeben, die als Anreicherungssäule dient. Parallel dazu wird eine LC-Trennsäule mittels Eluent konditioniert. Nach einer kurzen Anreicherungsphase schaltet das Ventil und die LC-MS-Analyse beginnt.

2.2.2.4 LC-Trennung und Detektion

An den bewährten Techniken wie LC-Trennung an Umkehrphasen-Material mit anschließender UV-Detektion (2.2.2.1) sollte möglichst festgehalten werden. Sollten Trennprobleme auftauchen, wäre gegebenenfalls ein Ausprobieren anderer Säulenmaterialien sinnvoll.

2.3 Ziele der Doktorarbeit

Aus dem präsentierten Stand der Forschung ergeben sich einige potenzielle Verbesserungsmöglichkeiten für die Analytik von Mykotoxinen. Mit Hilfe der online-SPE-LC-Kopplung (1.6) sollen einige der Nachteile der bestehenden Methoden umgangen werden, beispielsweise der hohe manuelle Aufwand und die Verwendung von Einweg-IA-Material.

Hierfür wurden beispielhaft die Mykotoxine Aflatoxine und Patulin ausgewählt, s. auch 1 Einleitung.

2.3.1 Aflatoxine

Das wichtigste Ziel der Arbeit war es, erstmalig die Mehrfachnutzung von Immunoaffinitätsäulen zu ermöglichen, unter Einsatz von kommerziell erhältlichen Säulen, Geräten, Chemikalien und Hilfsmitteln. Hierzu sollte die Probenvorbereitungseinheit SP 3000 (Knauer, Spectralytics) genutzt werden.

Für den Fall, dass geeignete Bedingungen gefunden werden konnten, war die Erarbeitung einer Routinemethode für die Analyse von Aflatoxinen in Lebensmitteln mittels online-SPE-LC angestrebt. Die entwickelte Methode sollte die Anforderungen erfüllen, die an Routinemethoden in einem modernen Dienstleistungslabor gestellt werden, d.h. sie sollte schnelle und zuverlässige Ergebnisse bei möglichst niedrigem Personal- und Kostenaufwand liefern. Darüber hinaus wurde eine Validierung der Methode sowie die Absicherung der Vergleichbarkeit der Ergebnisse durch Teilnahme an Laborvergleichsuntersuchungen angestrebt.

Bewährte Analyseschritte wie die Verwendung von Immunoaffinitätsmaterial zur Probenvorbereitung, eine RP-LC-Trennung sowie die abschließende selektive Fluoreszenz-Detektion nach Nachsäulenderivatisierung mittels CoBrA-Zelle sollten erhalten bleiben.

2.3.2 Patulin

Wie oben dargestellt, verfügen Routinemethoden für Patulin über einige Nachteile, insbesondere was den manuellen Aufwand sowie den kritischen Waschschrift angeht. Durch die Übertragung eines möglichst großen Teils der Probenvorbereitung auf die online-SPE sollte eine entsprechende Verringerung des Personal- und Materialbedarfs sowie eine Optimierung des Waschschrifts erreicht werden.

Zu Beginn der Entwicklung wurde ein geeignetes SPE-Material zur Reinigung und Aufkonzentrierung von Patulin aus wässrigen Probenlösungen gesucht. Als nächste Ziele sollten diese Extraktion sowie der Waschschrift mittels Carbonatlösung auf die online-SPE-LC-Kopplung übertragen werden. Als letztes war daraus folgend eine Vereinfachung der manuellen Probenvorbereitung angestrebt.

Insbesondere von der online-Durchführung des SPE-Schritts sowie des Waschschrifts wurde neben den oben beschriebenen Vorteilen beispielsweise beim Zeit- und Personalaufwand eine Verbesserung der Reproduzierbarkeit der Analyse erwartet. Da Patulin im Alkalischen instabil ist (z.B. BRACKETT et al., 1979; McCALLUM et al., 2002), können bei manueller Durchführung des Waschschrifts (LLP oder SPE) leichte Variationen in der Durchführung, insbesondere die Dauer des Waschschrifts betreffend, für Schwankungen in der Reproduzierbarkeit verantwortlich sein. Durch eine Automatisierung des Waschschrifts würden alle Proben sowie die Standards identisch behandelt, so dass eventuell auftretende Verluste für alle Analysen praktisch gleich hoch ausfallen müssten.

Wie bei den Aflatoxinen wurde angestrebt, wesentliche bewährte Analyseprinzipien zu übernehmen: Verwendung von SPE und gegebenenfalls Flüssig-flüssig-Extraktion zur Probenvorbereitung, Waschschrift mit Carbonatlösung, RP-LC-Trennung mit UV-Detektion.

Analog zur Aflatoxin-Methode sollte sich die zu entwickelnde Patulin-Methode als Routinemethode in einem modernen Labor bewähren. Ebenso war eine Validierung der Methode sowie die Absicherung der Vergleichbarkeit der Ergebnisse durch Teilnahme an Laborvergleichsuntersuchungen angestrebt.

3 Material und Methoden

3.1 Bestimmung von Aflatoxinen per online-SPE-LC

3.1.1 Kurzbeschreibung der Methode

Aflatoxine werden mit einer Mischung aus Methanol und Wasser aus der Matrix extrahiert. Nach Entfernung des organischen Lösungsmittels wird die Probe mittels online ausgeführter Immunoaffinitäts-Festphasenextraktion (online-SPE) aufgereinigt und aufkonzentriert. Anschließend erfolgt die Bestimmung mittels LC mit Fluoreszenzdetektion nach Nachsäulenderivatisierung.

3.1.2 Sicherheitshinweise

ACHTUNG: Aflatoxine sind hochgradig krebserzeugende und giftige Substanzen! Aflatoxin B₁ gilt als stärkstes natürliches Cancerogen! Sämtliche Arbeitsschritte sind entsprechend vorsichtig durchzuführen! Die gängigen Sicherheitsvorschriften wie Schutzkleidungspflicht, Arbeiten unter dem Abzug etc. sind unbedingt zu beachten! Die Entgiftung von mit Aflatoxinen in Berührung gekommenen Geräten erfolgt durch mind. 30-minütiges Lagern in Natriumhypochlorit-Lösung.

3.1.3 LC-Bedingungen

Trennsäule: Multospher 100 RP 18 - 5 µm, 250 x 4,6 mm

Eluent: A: Reinstwasser mit 119 mg Kaliumbromid und 100 µL Salpetersäure (65 %ig) je Liter
B: Methanol/Acetonitril 50:50 (v/v) mit 119 mg Kaliumbromid und 100 µL Salpetersäure (65 %ig) je Liter

Gradient:

Tab. 3-1. LC-Gradient

Zeit [min]	A [%]	B [%]	Fluss [mL/min]
0	60	40	0,7
10,5	60	40	0,7
25	20	80	0,7
30	20	80	0,7
35	60	40	0,7
40	60	40	0,7

Säulen-Temperatur: Raumtemperatur

Injektionsvolumen: 1000 µL

Laufzeit: 40 min

3.1.4 Online-SPE

Das Grundprinzip der online-Festphasenextraktion wurde bereits unter 1.6 erläutert. Die zu dieser Methode gehörenden Schaltpläne und die Erläuterung des Funktionsprinzips finden sich unter 4.1.4.

Online-SPE-Einheit: Knauer SP 3000

Kartusche: Edelstahl, 20 x 2 ID mm

Kartuschenfüllung: r-biopharm RIDA® Aflatoxin column

Transferschleife: 200 µL

Tab. 3-2. SP 3000: Schaltprogramm

Schritt	Zeit [min]	Line [%]				Event ¹	Fluss [mL/min]	Bemerkung
		A	B	C	D			
1	0.0	0	100	0	0	0000 0000	0,4	Injektion
2	7.0	0	100	0	0	0000 0100	0,4	
3	7.1	0	0	100	0	0000 0100	4,0	Füllen Transferschleife
4	8.5	0	0	100	0	0000 0100	0,4	
5	8.6	0	0	100	0	0010 0000	0,4	Transfer auf LC-Säule
6	8.7	0	100	0	0	0010 0000	0,4	
7	10.9	0	100	0	0	0000 0000	0,4	Rekonditionierung
8	25.0	0	100	0	0	0000 0000	0,4	

¹ bei Anschluss Injektionsventil an Pos. 3 und Bypassventil an Pos. 6; 0 = Load-Position, 1 = Inject-Position

Tab. 3-3. SP 3000: Eluentenbelegung (zu Tab. 3-2)

Line	Lösung
A	Frei
B	Reinstwasser
C	Acetonitril/Wasser 67:33 (v/v)
D	Frei

Tab. 3-4. SP 3000: Setup Injektionsventil V1 (zu Tab. 3-2) (vergl. Abb. 4-2)

Position	Kapillare
1	Zur LC-Säule
2	Von LC-Pumpe
3	Transferschleife 200 µL
4	Von Autosampler kommend
5	Zum Abfall
6	Von IAC-Kartusche

Tab. 3-5. SP 3000: Setup Bypassventil V2 (zu Tab. 3-2)

Position	Kapillare
1	Zum Abfall
2	Nicht belegt
3	Nicht belegt
4	Nicht belegt
5	Zur IAC-Kartusche
6	Transferschleife 200 μ L

Nachsäulenderivatisierungssystem

Derivatisierungseinheit: CoBrA-Zelle

Detektion: Fluoreszenz
 Extinktion 362 nm
 Emission 440 nm

Die Nachsäulenderivatisierung erfolgt mit Hilfe der CoBrA-Zelle, vergl. Anleitung hierzu (CORING, 2004). In der CoBrA-Zelle wird das im Eluenten enthaltene Bromid elektrolytisch zu freiem Brom oxidiert, welches für die Derivatisierung sorgt.

3.1.5 Herstellung von Eluenten, Reagenzien und Standardlösungen

3.1.5.1 Herstellung der Eluenten

Eluent A: **Wasser mit Kaliumbromid**
 119 mg Kaliumbromid in ein 1L-Eluentengefäß einwiegen und in 1000 mL Reinstwasser lösen.
 Nach Lösen des Salzes 100 μ L 65 %ige Salpetersäure zugeben, Eluent gut durchmischen und im Ultraschallbad entgasen.
 Die Lösung ist bei Raumtemperatur 1 Woche haltbar.

Eluent B: **Methanol/Acetonitril (50:50, v/v) mit Kaliumbromid**
 119 mg Kaliumbromid in ein 1L-Eluentengefäß einwiegen, 500 mL Methanol zugeben, 500 mL Acetonitril zugeben. Unter Lösen des Salzes gut durchmischen und 100 μ L 65 %ige Salpetersäure zugeben. Eluent gut durchmischen und im Ultraschallbad entgasen.
 Die Lösung ist bei Raumtemperatur 6 Monate haltbar.

3.1.5.2 Herstellung von Reagenzien

Methanol/Wasser 70:30 (v/v) 150 mL Reinstwasser in ein 500 mL-Eluentengefäß geben und mit 350 mL Methanol versetzen.
 Die Lösung ist bei Raumtemperatur 1 Jahr haltbar.

Wasser/Methanol 92,5:7,5 (v/v)	75 mL Methanol in ein 1000 mL-Eluentengefäß geben und mit 925 mL Reinstwasser versetzen; die Lösung durchmischen und im Ultraschallbad entgasen. Die Lösung ist bei Raumtemperatur 6 Monate haltbar.
Wasser/Methanol 50:50 (v/v)	250 mL Methanol in ein 500 mL-Eluentengefäß geben und mit 250 mL Reinstwasser versetzen; die Lösung durchmischen und im Ultraschallbad entgasen. Die Lösung ist bei Raumtemperatur 1 Jahr haltbar.
Acetonitril/Wasser 67:33 (v/v)	66 mL Reinstwasser in ein 250 mL-Eluentengefäß geben und mit 134 mL Acetonitril versetzen. Die Lösung durchmischen und im Ultraschallbad entgasen. Die Lösung ist bei Raumtemperatur 1 Jahr haltbar.

3.1.5.3 Herstellung von Standardlösungen

ACHTUNG! Sicherheits-Hinweise unter 3.1.2 beachten!

Referenzmaterial: ca. 0,3 µg/mL (G ₂ und B ₂) bzw. ca. 1,0 µg/mL (G ₁ und B ₁)	Aflatoxin mix in Methanol (Supelco)
Standard-Stammlösung Aflatoxin-S₀ ca. 6 µg/L (G ₂ und B ₂) bzw. ca. 20 µg/L (G ₁ und B ₁)	100 µL Aflatoxin-Referenzmaterial werden in einen 5 mL-Messkolben pipettiert. Der Kolben wird mit Reinstwasser/Methanol 50:50 (v/v) bis zur Marke aufgefüllt und gründlich durchmischt. Die Lösung wird im Kühlschrank (4-8 °C) aufbewahrt und ist 6 Monate haltbar.
Arbeits-Standard Aflatoxin-RefM₁ ca. 0,12 µg/L (G ₂ und B ₂) bzw. ca. 0,4 µg/L (G ₁ und B ₁) (entspricht ca. 0,6 µg/kg (G ₂ , B ₂) bzw. ca. 2 µg/kg (G ₁ , B ₁))	200 µL Aflatoxin-S ₀ werden in einen 10 mL-Messkolben pipettiert. Der Kolben wird mit Wasser/Methanol 92,5:7,5 (v/v) bis zur Marke aufgefüllt. Die Lösung wird fraktioniert in Autosampler-Vials abgefüllt, eingefroren und bei Bedarf aufgetaut. Die Lösung ist bei -18 °C 6 Monate haltbar (Haltbarkeit des Referenzmaterials beachten!).
Dotierstandard: Dotierstandard Afla-Dot ₁ ca. 60 µg/L (G ₂ und B ₂) bzw. ca. 200 µg/L (G ₁ und B ₁)	1000 µL Aflatoxin-Referenzmaterial werden in einen 5 mL-Meßkolben pipettiert. Der Kolben wird mit Reinstwasser/Methanol 50:50 (v/v) bis zur Marke aufgefüllt und gründlich durchmischt. Die Lösung wird im Kühlschrank (4-8 °C) aufbewahrt und ist 6 Monate haltbar.

Achtung: Die Quantifizierung erfolgt über Matrixkalibrierung (s. 3.1.6.3).

Bei der Berechnung muss die exakte Konzentration des Standards gemäß Zertifikat berücksichtigt werden.

3.1.6 Durchführung

3.1.6.1 Kalibrierung

Kalibriermethode: Matrixkalibrierung

Injektion: 1000 µL

Injektionsreihenfolge:

2 x Aflatoxin-RefM₁, 1 x Matrixkalibrierung, 5 Proben, 1 x Matrixkalibrierung, 5 Proben, 1 x Matrixkalibrierung usw. (nach jeweils 5 Proben neu kalibrieren)

In jeder Sequenz wird ein Lösungsmittelblindwert (3.1.6.4) (Injektion hinter einem Standard) gemessen.

3.1.6.2 Probenvorbereitung

ACHTUNG! Sicherheits-Hinweise unter 3.1.2 beachten!

- Probenmaterial, sofern erforderlich, mit Hilfe eines Stabmixers oder einer Mühle zerkleinern und homogenisieren
- 4 (± 0,05) g homogenisierte Probe in ein 35 ml-Kunststoffröhrchen einwiegen
- 20 mL Methanol/Wasser 70:30 (v/v) zugeben
- auf dem Horizontalschüttler 30 min extrahieren
- Röhrchen 5 min bei 6.500 g zentrifugieren
- 5 mL des Überstands in ein TurboVap-Gefäß pipettieren
- Lösungsmittel mit Hilfe des TurboVap bei 40 °C im Stickstoffstrom entfernen
- Rückstand **sofort** in 5 mL Wasser/Methanol 92,5:7,5 (v/v) aufnehmen und membranfiltrieren
- Probenextrakt in ein Autosamplervial abfüllen
- Online-SPE-LC-Analyse

3.1.6.3 Matrixkalibrierung

Für die Dotierung wird der Dotierstandard Afla-Dot₁ verwendet. Die Probe wird direkt nach dem Einwiegen mit 40 µL Afla-Dot₁ (3.1.5.3) dotiert.

Je Probenmatrix wird mindestens eine unbelastete Probe dotiert und als jeweiliger Matrixkalibrierstandard verwendet.

Die Konzentration entspricht ca. 0,6 µg/kg (B₂, G₂) bzw. 2 µg/kg (B₁, G₁).

3.1.6.4 Lösungsmittelblindwert [BWR-Afla] → Messung 1 x pro Sequenz

- Injektion Wasser/Methanol 92,5:7,5 (v/v)

3.1.6.5 QRK-Proben

Zur Überprüfung der Methode werden regelmäßig dotierte Proben bzw. Proben mit bekannter Aflatoxinkonzentration gemessen.

3.1.7 Auswertung

Integration: Peakflächenbestimmung

Identität: Retentionszeit

Quantifizierung: Matrixkalibrierung

3.1.8 Liste der Chemikalien und Geräte

3.1.8.1 Chemikalien

Chemikalie	Firma	Bestell-Nr.
Kaliumbromid, puriss. p.a.	Fluka	60093
Acetonitril, HPLC-grade	Roth	8825.1
Reinstwasser, HPLC	Barnstead Reinstwassersystem (3.1.8.2)	
Methanol, HPLC gradient grade	J.T.Baker	8402
Aflatoxin mix (in Methanol)	Supelco	46303
Salpetersäure (65 %ig)	Riedel-de Haën	30709
Natriumhypochlorit-Lösung, 30 %	Fluka	71696

3.1.8.2 Geräte und Hilfsmittel

Gerät/Hilfsmittel	Anbieter, Art.-Nr.
LC-System , bestehend aus:	
Degasser SCM1000	
Quaternäre Pumpe P4000	
Autosampler AS3000	
System-Steuerungsgerät SN4000	alle: Thermo Fisher Scientific
Fluoreszenz-Detektor F-1080	Merck-Hitachi
Analog-Digitalwandler SS 420X	Scientific Software
Online-SPE-Einheit	Knauer SP 3000
Nachsäulenderivatisierungseinheit CoBrA-Zelle	Coring Art.-Nr. 3200130

Trennsäule	Multosphere 100 RP 18, 5 µm, 250 x 4,6 mm, CS, Art.-Nr. 546875
Präzisionswaage	Mettler Toledo AG 245
Laborzentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5804
Zentrifugenröhrchen, 16 mL	
Ultraschallbad	Bandelin RK 100 H
Reinstwassersystem	Barnstead Nanopure
Horizontalschüttler	IKA HS 250 basic
Stabmixer	Philips Essence HR I 356/05
Kunststoff-Röhrchen (rund 35 mL)	
Autosampler-Gefäße (1,5 mL)	
RIDA® Aflatoxin column	r-biopharm, Art. Nr. R5001 bzw. R5002 (10 bzw. 50 Stck.)
Mühle	Retsch Grindomix GM200
Konzentrator	Zymark TurboVap II
Membranfilter, regenerierte Cellulose, 0,45 µm, 13 mm	Teknopharma, TR-200435
übliche Laborgeräte	

3.1.9 Bestimmung von Aflatoxinen per offline-SPE-LC (Kontrollmethode)

3.1.9.1 Zweck, Anwendungsbereich, Begriffe

Es wird ein Verfahren zur Bestimmung der Aflatoxine B₁, B₂, G₁ und G₂ in pflanzlichen Lebensmitteln (Getreide, Früchte, Nüsse, etc.) beschrieben. Die hier beschriebene Methode entspricht der ASU § 64 LFGB*-Methode L 15.00-2 mit leichten Modifikationen. Die zur Nachsäulenderivatisierung eingesetzte CoBrA-Zelle wird in der analogen ASU § 64 LFGB*-Methode L 48.00-1 beschrieben.

*ehemals ASU § 35 LMBG

3.1.9.2 Kurzbeschreibung der Methode

Aflatoxine werden mittels Immunoaffinitäts-Festphasenextraktion (IAC-SPE) aufgereinigt und aufkonzentriert. Anschließend erfolgt die Bestimmung mittels LC mit Fluoreszenzdetektion nach erfolgter Nachsäulenderivatisierung.

3.1.9.3 Angaben zum Prüfsystem

Chromatographische Bedingungen

Trennsäule:	Multospher 100 RP 18 - 5 μm , 250 x 4,6 ID mm
Eluent:	Wasser/Methanol/Acetonitril 60:20:20 (v/v/v) mit 119 mg Kaliumbromid und 100 μL Salpetersäure (65 %ig) je Liter
Gradient:	isokratische Elution
Fluss:	0,8 mL/min
Säulen-Temperatur:	Raumtemperatur
Injektionsvolumen:	200 μL
Laufzeit:	40 min

Nachsäulenderivatisierungssystem

Derivatisierungseinheit:	CoBrA-Zelle (s. auch 3.1.4)
Detektion:	Fluoreszenz
	Extinktion 362 nm
	Emission 440 nm

Herstellung von Eluenten, Reagenzien und Standardlösungen

Herstellung des Eluenten

- 119 mg Kaliumbromid in ein 1L-Eluentengefäß geben
- 200 mL Methanol zugeben
- 200 mL Acetonitril zugeben
- 600 mL Reinstwasser zugeben
- Lösung gut vermischen
- nach Lösen des Salzes 100 μL 65 %ige Salpetersäure zugeben
- Eluent gut durchmischen
- im Ultraschallbad entgasen

Die Lösung ist bei Raumtemperatur 6 Monate haltbar.

Herstellung von Reagenzien

Methanol/Wasser 70:30 (v/v)	s. 3.1.5.2
Wasser/Methanol 50:50 (v/v)	s. 3.1.5.2

Herstellung von Standardlösungen

Referenzmaterial: s. 3.1.5.3

Standard-Stammlösung Aflatoxin-S₀ s. 3.1.5.3

Kalibrierstandard Aflatoxin-Ref ₁ ca. 0,6 $\mu\text{g/L}$ (G ₂ und B ₂) bzw. ca. 2 $\mu\text{g/L}$ (G ₁ und B ₁) (entspricht rund 0,6 $\mu\text{g/kg}$ (G ₂ , B ₂) bzw. rund 2 $\mu\text{g/kg}$ (G ₁ , B ₁))	1000 μL Aflatoxin-S ₀ werden in einen 10 mL-Messkolben pipettiert. Der Kolben wird mit Methanol/Wasser 50:50 (v/v) bis zur Marke aufgefüllt. Die Lösung wird fraktioniert in Autosampler-Vials (7.2.10) abgefüllt eingefroren und bei Bedarf aufgetaut.
---	---

Die Lösung ist bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 6 Monate haltbar (Haltbarkeit des Referenzmaterials beachten!).

Dotierstandard: s. 3.1.5.3

Bei der Berechnung muss die exakte Konzentration des Standards gemäß Zertifikat berücksichtigt werden.

3.1.9.4 Durchführung

Kalibrierung

Kalibrierung:	externe 1-Punkt-Kalibrierung
Kalibrierstandard:	Aflatoxin-Ref ₁
Kalibriermethode:	Methode des externen Standards
Injektion:	1 x 200 µL
Injektionsreihenfolge:	2 x Aflatoxin-Ref ₁ , 5 Proben, 1 x Aflatoxin-Ref ₁ , 5 Proben 1 x Aflatoxin-Ref ₁ usw. (nach jeweils 5 Proben neu kalibrieren)

Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung erfolgt nach der Vorschrift der Immunoaffinitätssäulen „RIDA® Aflatoxin column“ von r-biopharm, Darmstadt. Die dort aufgeführten Hinweise sind zu beachten.

Vorschrift für Getreide, Futtermittel, Nüsse (Punkt 7.1 der Vorschrift von r-biopharm), auch für Früchte und Fruchtprodukte geeignet:

- Extraktion wie unter 3.1.6.2 beschrieben durchführen
- 5 mL des Überstands abnehmen
- mit 15 mL Reinstwasser verdünnen
- Die so vorbereitete Probelösung (= 20 mL, entsprechend 1 g Probe) auf die Immunoaffinitätssäule auftragen:

Immunoaffinitäts-SPE

Die Säulen nicht trockenlaufen lassen!

- eine RIDA-Aflatoxin-Säule auf die SPE-Einheit stecken und mit 2 mL Reinstwasser konditionieren
- die Säule mit ca. 1 mL Probenextrakt füllen
- ein Probenreservoir mit passendem Adapter auf das Ende der Säule stecken
- den restlichen Probenextrakt in das Reservoir füllen
- den Probenextrakt langsam und gleichmäßig durch die Säule laufen lassen bzw. mit leichtem Vakuum durch die Säule saugen (Durchflußrate ca. 1 Tropfen/sec)
- den Durchlauf verwerfen
- die Säule mit 10 mL Reinstwasser waschen
- den Durchlauf verwerfen
- die Flüssigkeitsreste gründlich durch Anlegen eines leichten Vakuums für 10 sec entfernen
- Probenreservoir entfernen und ein Eppendorf-Vial unter die Säule stellen
- Analyten mit 0,5 mL Methanol von der Säule eluieren, das Methanol dabei langsam durch die Säule saugen (Durchflußrate ca. 1 Tropfen/sec), um sicherzustellen, dass das gesamte Toxin von den Antikörpern gelöst wird
- bei zu schneller Passage (schneller als 10 sec) wird das Eluat aufgenommen und nochmals auf die Säule aufgetragen
- anschließend wird mit 0,5 mL Reinstwasser eluiert
- Eluatreste durch kurzes Anlegen eines Vakuums (30 sec) gewinnen
- das Eluat (1 mL) wird direkt zur LC-Analyse eingesetzt

QRK-Probe → Messung 1 x pro Sequenz

Zur Überprüfung der Methode werden regelmäßig dotierte Proben bzw. Proben mit bekannter Aflatoxinkonzentration gemessen.

Reagenzienblindwert [BWR-Afla] → Messung 1 x pro Sequenz

Injektion Methanol/Reinstwasser 50:50 (v/v)

3.1.9.5 Auswertung

Integration: Peakflächenbestimmung
Identität: Retentionszeit
Quantifizierung: Methode des Externen Standards

3.1.9.6 Liste der Chemikalien und Geräte

Chemikalien s. 3.1.8.1

Geräte und Hilfsmittel

s. 3.1.8.2, außerdem:

Eppendorf-Vials, 2 mL	
SPE-Einheit Baker spe-12G	J.T. Baker, 7018-94
Bakerbond spe-Reservoir, 75 mL	J.T. Baker, 7120-03

3.2 Bestimmung von Patulin per online-SPE-LC

3.2.1 Kurzbeschreibung der Methode

Patulin wird mittels Flüssig-flüssig-Extraktion aufgereinigt. Anschließend erfolgt die Bestimmung per online-SPE-LC mit UV-Detektion. Dabei wird Patulin auf einer mit SDB*-Material gefüllten Kartusche adsorbiert, aufkonzentriert und gereinigt. Auf dieser Kartusche wird auch der sonst offline durchgeführte Waschschrift mit Carbonatlösung durchgeführt. Abschließend wird Patulin mittels des LC-Eluenten auf die Trennsäule transferiert. Die Detektion erfolgt mit UV bei einer Wellenlänge von 277 nm.

*SDB: Styrol-Divinylbenzol

3.2.2 Angaben zum Prüfsystem

3.2.2.1 Chromatographische Bedingungen

Trennsäule: Varian Polaris C18 A 5 μ , 250 x 4,6 mm mit ChromSep-Vorsäule

Eluent A: Wasser

Eluent B: Acetonitril

LC-Gradient:

Tab. 3-6. LC-Gradient Patulin-Bestimmung mittels online-SPE-LC

Zeit [min]	A [%]	B [%]	Fluss [mL/min]	Bemerkung
0	90	10	0,8	
10	90	10	0,8	
20	70	30	0,8	
25	10	90	0,8	Spülschritt
27	10	90	0,8	
30	90	10	0,8	
35	90	10	0,8	

Säulen-Temperatur: Raumtemperatur

Injektionsvolumen: 500 μ L

Detektion: UV, 277 nm

Hinweise zur Handhabung der LC-Säule:

Nach jeder Sequenz wird zur Schonung der Trennsäule und Verlängerung der Nutzungsdauer ein Spülschritt integriert, so dass die Trennsäule auf Acetonitril/Wasser 80:20 (v/v) gelagert wird.

Tab. 3-7. LC-Spülmethode

Zeit [min]	A [%]	B [%]	Fluss [mL/min]
0	90	10	0,8
5	20	80	0,8
30	20	80	0,8

3.2.2.2 Online-SPE

Die online-Festphasenextraktion für Patulin wird nach dem unter 1.6 beschriebenen Grundprinzip durchgeführt. Als SPE-Material wird ein Styrol-Divinylbenzol-Copolymer von Baker eingesetzt. Grundsätzlich ist der Einsatz einer zweiten Kartusche zur Vorreinigung des Extraktes beispielsweise mit MycoSep-Material denkbar. Näheres (mögliche Materialien und Schaltungen, experimentelle Ergebnisse usw.) hierzu unter 4.2.3.

Online-SPE-Einheit: Knauer SP 3000

Kartusche: Edelstahl, 20 x 2 ID mm

Kartuschenfüllung: Styrol-Divinylbenzol-Copolymer

Schaltprogramm:

Tab. 3-8. SP 3000: Schaltprogramm Patulin-Bestimmung mittels online-SPE-LC

Schritt	Zeit [min]	Line [%]				Event ¹	Fluss [mL/min]	Bemerkung
		A	B	C	D			
1	0.0	0	100	0	0	0000 0000	0,4	Injektion
2	5.0	0	100	0	0	0000 0000	0,4	
3	5.1	0	0	0	100	0000 0000	0,4	Waschschritt mit Natriumcarbonat-Lsg.
4	6.5	0	0	0	100	0000 0000	0,4	
5	6.6	0	100	0	0	0000 0000	0,4	
6	10.0	0	100	0	0	0010 0000	0,4	Transfer auf LC-Säule
7	10.1	100	0	0	0	0010 0000	0,4	
8	20,0	100	0	0	0	0000 0000	0,4	Reinigung der SDB-Kartusche
9	25.0	100	0	0	0	0000 0000	0,4	
10	25.1	0	100	0	0	0000 0000	0,4	Rekonditionierung

¹ bei Anschluss Injektionsventil an Pos. 3 und Bypassventil an Pos. 6; 0 = Load-Position, 1 = Inject-Position

Tab. 3-9. SP 3000: Eluentenbelegung (zu Tab. 3-8)

Line	Lösung
A	Methanol
B	Acetatpuffer pH 4
C	Frei
D	Natriumcarbonatlösung, 1,5 %ig

Tab. 3-10. SP 3000: Setup Injektionsventil V1 (zu Tab. 3-8) (s. auch Abb. 1-16)

Position	Kapillare
1	zur LC-Säule
2	von LC-Pumpe
3	zur SDB-Kartusche
4	zum Abfall
5	vom Autosampler
6	von SDB-Kartusche

Schaltung im Backflush-Modus (vergl. 4.2.4)

3.2.3 Herstellung von Eluent, Reagenzien und Standardlösungen

3.2.3.1 Herstellung von Eluenten

Reinstwasser bzw. Acetonitril werden jeweils in Eluentengefäße abgefüllt und im Ultraschallbad entgast.

3.2.3.2 Herstellung von Reagenzien

Acetatpuffer (pH 4)

4,1 g Natriumacetat-Trihydrat werden in 250 mL Reinstwasser gelöst. Der pH-Wert der Lösung wird mit Hilfe des pH-Meters mit Eisessig auf pH 4,0 eingestellt.

Die Lösung wird im Kühlschrank aufbewahrt und ist 1 Monat haltbar.

Natriumcarbonatlösung, 1,5 %ig

1,5 g Natriumcarbonat, wasserfrei, werden in 100 mL Reinstwasser gelöst.

Die Lösung wird im Kühlschrank aufbewahrt und ist 1 Monat haltbar.

Carrez I

15,0 g Kaliumhexacyanoferrat(II)-Trihydrat werden in einen 100 mL-Messkolben eingewogen. Der Kolben wird unter Lösen des Salzes mit Reinstwasser bis zur Marke aufgefüllt. Das Salz muss dabei vollständig gelöst sein.

Haltbarkeit: 3 Monate bei Raumtemperatur

Carrez II

30,0 g Zinkacetat-Dihydrat werden in einen 100 mL-Messkolben eingewogen. Der Kolben wird unter Lösen des Salzes mit Reinstwasser bis zur Marke aufgefüllt. Das Salz muss dabei vollständig gelöst sein.

Haltbarkeit: 3 Monate bei Raumtemperatur

Phosphatpuffer pH 7, 100 mM

8,9 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat werden in 500 mL Reinstwasser gelöst, der pH-Wert der Lösung wird mit Hilfe des pH-Meters mit konz. Phosphorsäure auf pH 7 eingestellt.

Die Lösung wird im Kühlschrank aufbewahrt und ist 2 Wochen haltbar.

Phosphatpuffer pH 8, 100 mM	8,9 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat werden in 500 mL Reinstwasser gelöst, der pH-Wert der Lösung wird mit Hilfe des pH-Meters mit verdünnter Phosphorsäure auf pH 8 eingestellt. Die Lösung wird im Kühlschrank aufbewahrt und ist 2 Wochen haltbar.
Natronlauge, c = 1 mol/L	4,0 g Natriumhydroxid werden in einen 100 mL-Messkolben eingewogen und in Reinstwasser gelöst. Anschließend wird der Kolben mit Reinstwasser bis zur Marke aufgefüllt und gut durchmischt. Haltbarkeit: 1 Monat bei Raumtemperatur
Phosphorsäure (14 %ig)	1 mL konz. Phosphorsäure werden mit 8,5 mL Reinstwasser (7.1.8) versetzt und gut durchmischt. Haltbarkeit: 1 Monat bei Raumtemperatur

3.2.3.3 Herstellung von Standardlösungen

Referenzmaterial: Patulin in Acetonitril (biopure, Vertr.: Coring)
ca. 100 µg/mL

Exakte Konzentration des Referenzmaterials gemäß Zertifikat berücksichtigen!

Zur Überprüfung der LC-Trennung wird Hydroxymethylfurfural (HMF) eingesetzt.

Std.-Stammlsg. Patulin/HMF-S₀ (1 µg/mL) x * 100 µL Patulin-Referenzmaterial werden in einen 10 mL-Meßkolben pipettiert. In diesen Kolben werden y * 100 µL HMF-S₀ (c (HMF) = ca. 100 µg/mL) pipettiert. Der Kolben wird mit Acetatpuffer (pH 4) bis zur Marke aufgefüllt und gründlich durchmischt.
Haltbarkeit: 6 Monate bei + 4°C

Standard Patulin/HMF-RefM₁ (20 µg/L) (entspricht 33,3 µg/kg) 1000 µL Patulin/HMF-S₀ werden in einen 50 mL-Messkolben pipettiert, bis zur Marke mit Acetatpuffer (pH 4) aufgefüllt und gut durchmischt.
Die Lösung Patulin/HMF-RefM₁ wird fraktioniert (je ca. 1,5 mL) in Autosampler-Vials bei -18 °C tiefgefroren und bei Bedarf aufgetaut.
Haltbarkeit: 6 Monate bei -18°C

x = 100 (µg/mL)/tatsächl. Konz. Patulin-Referenzmaterial (µg/mL) (s. Zertifikat)

y = 100 (µg/mL)/tatsächl. Konz. HMF-S₀ (µg/mL)

Achtung: Die Quantifizierung erfolgt über Matrixkalibrierung (s. 3.2.4.3)!

Die Lösung Patulin-RefM₁ enthält zur Überprüfung der LC-Trennung HMF (20 µg/L, entsprechend ebenfalls 33,3 µg/kg). Unter den verwendeten LC-Bedingungen eluiert HMF rund 1,3 min vor Patulin.

Dotierstandard:

Dotierstandard Patulin-Dot₁
(1 µg/mL)

x * 100 µL Patulin-Referenzmaterial werden in einen 10 mL -Messkolben pipettiert. Der Kolben wird mit Acetatpuffer (pH 4) bis zur Marke aufgefüllt und gründlich durchmischt.

Haltbarkeit: 6 Monate bei + 4°C.

$x = 100 (\mu\text{g/mL}) / \text{tatsächl. Konz. Patulin-Referenzmaterial } (\mu\text{g/mL})$ (s. Zertifikat)

3.2.4 Durchführung (Kalibrierung, Probenvorbereitung)

3.2.4.1 Kalibrierung

Standard: Patulin/HMF-RefM₁

Kalibriermethode: Matrixkalibrierung

3.2.4.2 Probenvorbereitung

Standard-Probenvorbereitung (Flüssig-flüssig-Extraktion):

Feste Proben und Konzentrate:

- Das Probenmaterial, sofern erforderlich, mit Hilfe eines Stabmixers zerkleinern und homogenisieren.
- 1 (± 0,05) g homogenisierte Probe in ein 16-mL-Zentrifugenröhrchen einwiegen.
- Mit 4 mL Phosphatpuffer pH 8 versetzen und auf dem Schüttler lösen.
- Die Probe mit 5 mL Ethylacetat (Dispenser verwenden) versetzen und 30 min auf dem Schüttler extrahieren.
- Das Röhrchen 5 min bei 10.000 g zentrifugieren und anschließend die organische Phase quantitativ in ein weiteres Röhrchen, das ausreichend (ca. einen halben Spatel) wasserfreies Natriumsulfat enthält, überführen.
- Zur Trocknung der Ethylacetat-Phase das Röhrchen ca. 1 min gut schütteln.
- Probenröhrchen 5 min bei 10.000 g zentrifugieren.
- 3 mL des Überstands in ein weiteres Zentrifugenröhrchen überführen und im TurboVap bei **30 °C** im Stickstoffstrom zur Trockne einengen.
- Den Rückstand **sofort** in 1000 µL Acetatpuffer (pH 4) aufnehmen und im Ultraschallbad mindestens 5 min lösen.
- Die Lösung membranfiltrieren und in Autosampler-Vials überführen.
- Bei längerer Standzeit werden die Probelösungen bei –18 °C eingefroren.

Flüssige Proben (klare Säfte u.ä.):

- Flüssige Proben durch Schütteln homogenisieren.
- Anschließend 1 g ($\pm 0,05$) g in ein 16-mL-Zentrifugenröhrchen einwiegen, mit 4 mL Phosphatpuffer pH 7 verdünnen und direkt mit 5 mL Ethylacetat (Dispenser!) versetzen.
- Die weitere Aufarbeitung erfolgt wie oben beschrieben.

Komplexe Matrices

- Bei pektinreichen Matrices (naturtrüber Apfelsaft, Apfelmus etc.) kann eine Depektinierung zur Verbesserung der Wiederfindungsrate sinnvoll sein. Dies geschieht durch Vorbehandlung der Probe mit Pektinase.
- Bei sehr sauren Matrices (Zitronensaftkonzentrat, andere Saftkonzentrate etc.) reicht die Pufferkapazität des zur Verdünnung eingesetzten Phosphatpuffers unter Umständen nicht aus. In diesem Fall kann eine manuelle pH-Wert-Einstellung der Probelösung (auf pH 7 mit 1 mol/L NaOH) vor der Extraktion für sauberere Extrakte sorgen.

Carrez-Klärung:

Bei sehr schwieriger Matrix kann eine Carrezklärung durchgeführt werden, alternativ kann das offline-Verfahren (3.2.7) verwendet werden.

Durchführung Carrez-Klärung:

- 1 ($\pm 0,05$) g Probe in ein 16-mL-Zentrifugenröhrchen einwiegen.
- Mit 4 mL Phosphatpuffer pH 7 versetzen und auf dem Schüttler lösen.
- 100 μ L Carrez I-Lösung zugeben.
- Nach kräftigem Schütteln 100 μ L Carrez II-Lösung zupipettieren.
- Nach erneutem Schütteln wie oben beschrieben mit der Extraktion mit Ethylacetat weiterarbeiten.

3.2.4.3 Matrixkalibrierung

Je Probenmatrix wird mindestens eine unbelastete Probe dotiert und als jeweiliger Matrixkalibrierstandard verwendet.

Die Herstellung des Dotierstandards Patulin-Dot₁ entspricht der Herstellung der Standardlösung Patulin/HMF-S₀, allerdings wird auf die Zugabe von HMF verzichtet (3.2.3.3). Die für Matrixkalibrierung (bzw. Standardaddition) verwendete Probe wird direkt nach dem Einwiegen mit 50 μ L Patulin-Dot₁ (Dotierstandard) dotiert. Dies entspricht einer Patulin-Konzentration von **50 μ g/kg**.

3.2.4.4 QRK-Proben

Zur Überprüfung der Methode werden regelmäßig dotierte Proben bzw. Proben mit bekannter Patulinkonzentration gemessen.

3.2.4.5 Reagenzienblindwert [BWR-Pat] → Messung 1 x pro Sequenz

- Injektion Acetatpuffer pH 4

3.2.4.6 LC-Analyse

Standards, Proben und Matrixkalibrierung werden mit den unter 3.2.2 genannten LC-Bedingungen analysiert. Die LC-Sequenz wird mit der Messung von 2 Standards und 1 Matrixkalibrierung gestartet. Anschließend im Rhythmus „5 Proben, 1 Matrixkalibrierung“ gemessen.

Die Qualität der Trennung wird mit Hilfe des Arbeitsstandards Patulin/HMF-Ref₁ (3.2.3.3) überprüft. HMF und Patulin sollten eine Retentionszeitdifferenz von mindestens 0,8 min aufweisen.

Zur Behebung von Störungen s. 3.2.4.2.

3.2.5 Auswertung

Integration: Peakflächenbestimmung

Identität: Retentionszeit

Quantifizierung: Methode der Matrixkalibrierung

3.2.6 Liste der Chemikalien und Geräte

3.2.6.1 Chemikalien

Chemikalie	Firma	Bestell-Nr.
Natriumacetat-Trihydrat	Merck	6267
Natriumcarbonat, wasserfrei, p.a.	Fluka	71350
Ethylacetat für HPLC	J.T. Baker	9282-03
Natriumsulfat, wasserfrei, p.a.	Merck	1.06649
Essigsäure, 100%ig (Eisessig)	Merck	1.00063
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, p.a.	Fluka	71638
Acetonitril, HPLC-grade	Roth	8825.1

Reinstwasser, HPLC	Barnstead Reinstwassersystem (s. 3.2.6.2)	
Methanol, HPLC gradient grade	J.T.Baker	8402
Patulin, in Acetonitril	biopure (Vertrieb: Coring System, Best.-Nr. 3309126)	002026
Hydroxymethylfurfural (HMF)	Fluka	55690
Kaliumhexacyanoferrat (II)-Trihydrat	Fluka	60290
Zinkacetat-Dihydrat	Fluka	96458
Natriumhydroxid, Plätzchen, reinst	Merck	1.06482
Phosphorsäure, 85 %	Merck	1.00573

3.2.6.2 Geräte und Hilfsmittel

Gerät/Hilfsmittel	Anbieter, Art.-Nr.
LC-System , bestehend aus:	
Degasser SCM1000	
Quaternäre Pumpe P4000	
Autosampler AS3000	
System-Steuerungsgerät SN4000	
UV-Detektor UV1000	alle: Thermo Fisher Scientific
Online-SPE-Einheit	Knauer SP 3000
Trennsäule	Varian Polaris 5 C18-A, 250 x 4.6 ID mm, 5 µm, A2000250C046 (incl. holder with ChromSep guard column)
Präzisionswaage	Mettler Toledo AG 245
Laborzentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5804
pH-Meßgerät	WTW pH 526
Ultraschallbad	Bandelin RK 100 H
Reinstwassersystem	Barnstead Nanopure
Schüttler	IKA Vibrax VXR basic
Stabmixer	Philips Essence HR I 356/05
Zentrifugenröhrchen (16 mL)	

Autosampler-Gefäße (1,6 mL)

Membranfilter, regenerierte Teknopharma, TR-200435
Cellulose, 0,45 µm, 13 mm

TurboVap LV Zymark

Bakerbond SPE SDB 200 mg/3 mL J.T. Baker, 7519-02

übliche Laborgeräte

3.2.7 Bestimmung von Patulin per offline-LC-UV (Kontrollmethode)

3.2.7.1 Zweck, Anwendungsbereich

Es wird ein Verfahren zur Bestimmung des Mykotoxins Patulin in Früchten und Fruchtprodukten (Saft, Konzentrat, Püree etc.) beschrieben.

3.2.7.2 Kurzbeschreibung der Methode

Patulin wird mittels Flüssig-flüssig-Extraktion aufgereinigt und aufkonzentriert. Anschließend erfolgt die Bestimmung mittels LC mit UV-Detektion.

3.2.7.3 Angaben zum Prüfsystem

Chromatographische Bedingungen

Trennsäule: LiChrospher 100 RP 8 EC-5 µ, 250 x 4,6 mm
Eluent A: Wasser
Eluent B: Acetonitril

Gradient:

Tab. 3-11. LC-Gradient Patulin-Bestimmung mittels LLP-LC-UV

Zeit [min]	A [%]	B [%]	Fluss [mL/min]	Bemerkung
0	90	10	0,8	
15	90	10	0,8	
18	20	80	0,8	Spülschritt
22	20	80	0,8	
25	90	10	0,8	
35	90	10	0,8	

Säulen-Temperatur: Raumtemperatur

Injektionsvolumen: 50 µL

Detektion: UV, 277 nm

Hinweise zur Handhabung der LC-Säule:

Nach jeder Sequenz wird zur Schonung der Trennsäule und Verlängerung der Nutzungsdauer ein Spülschritt integriert, so dass die Trennsäule auf Acetonitril/Wasser 80:20 (v/v) gelagert wird.

Tab. 3-12. LC-Spülmethode

Zeit [min]	A [%]	B [%]	Fluss [mL/min]
0	90	10	0,8
5	20	80	0,8
30	20	80	0,8

3.2.7.4 Herstellung von Eluenten, Reagenzien und Standardlösungen

Herstellung von Eluenten

s. 3.2.3.1

Herstellung von Reagenzien

s. 3.2.3.2

Herstellung von Standardlösungen

s. auch 3.2.3.3

Kalibrierstandard Patulin/HMF-Ref₁
(100 µg/L)
(entspricht 41,7 µg/kg*)

1000 µL Patulin/HMF-S₀ (3.2.3.3) werden in einen 10 mL-Messkolben pipettiert, bis zur Marke mit Acetatpuffer (pH 4) aufgefüllt und gut durchmischt.

Die Lösung Patulin/HMF-Ref₁ wird fraktioniert (je ca. 1 mL) in Autosampler-Vials bei –18 °C tiefgefroren und bei Bedarf aufgetaut.

Haltbarkeit: 6 Monate bei –18°C

*Die Berechnung gilt für die Standard-Probenvorbereitung. Bei der MycoSep-Aufarbeitung entspricht der Standard 50 µg/kg.

Achtung: Die Quantifizierung erfolgt über Matrixkalibrierung (s. 3.2.7.5)!

Die Lösung Patulin/HMF-Ref₁ enthält zur Überprüfung der LC-Trennung HMF (100 µg/L, entsprechend 41,7 µg/kg bzw. 50 µg/kg). Unter den verwendeten LC-Bedingungen eluiert HMF rund 2 min vor Patulin.

Dotierstandard: s. 3.2.3.3

3.2.7.5 Durchführung (Kalibrierung, Probenvorbereitung)

Kalibrierung

Kalibrierung: 1-Punkt-Kalibrierung
Kalibriermethode: Matrixkalibrierung

Probenvorbereitung

Standard-Probenvorbereitung (Flüssig-flüssig-Extraktion):

Feste Proben und Konzentrate:

- Das Probenmaterial, sofern erforderlich, mit Hilfe eines Stabmixers zerkleinern und homogenisieren.
- 2 (± 0,05) g homogenisierte Probe in ein 16-mL-Zentrifugenröhrchen einwiegen.
- Mit 2 mL Reinstwasser versetzen und auf dem Schüttler lösen.
- Die Probe mit 5 mL Ethylacetat (Dispenser verwenden) versetzen und 30 min auf dem Schüttler extrahieren.

- Das Röhrchen 5 min bei 10.000 g zentrifugieren und die Ethylacetatphase mit einer Pasteurpipette quantitativ in ein weiteres Zentrifugenröhrchen überführen.
- Die folgenden Schritte müssen **zügig** nacheinander durchgeführt werden, da der Analyt im basischen Medium nicht stabil ist:
- Die organische Phase mit 1 mL 1,5 %iger Na₂CO₃-Lösung versetzen und 1 min auf dem Schüttler schütteln.
- Zur Phasentrennung bei 10.000 g 1 min zentrifugieren.
- Anschließend die organische Phase sofort quantitativ in ein weiteres Röhrchen, das ausreichend (ca. einen halben Spatel) wasserfreies Na₂SO₄ enthält, überführen.
- Zur Trocknung der Ethylacetat-Phase das Röhrchen ca. 1 min gut schütteln.
- Proberöhrchen 5 min bei 10.000 g zentrifugieren.
- 3 mL des Überstands in ein weiteres Zentrifugenröhrchen überführen und im TurboVap bei **30 °C** im Stickstoffstrom zur Trockne einengen.
- Den Rückstand sofort in 500 µL Acetatpuffer (pH 4) aufnehmen und im Ultraschallbad mindestens 5 min lösen.
- Die Lösung membranfiltrieren und in Autosampler-Vials überführen, wobei 200 µL-Einsätze zu verwenden sind.
- Bei längerer Standzeit werden die Probelösungen bei –18 °C eingefroren.

Flüssige Proben (Säfte u.ä.):

- Flüssige Proben durch Schütteln homogenisieren.
- Anschließend 2 g (± 0,05) g in ein 16-mL-Zentrifugenröhrchen einwiegen und direkt mit 5 mL Ethylacetat (Dispenser!) versetzen.
- Die weitere Aufarbeitung erfolgt wie oben beschrieben.

Carrez-Klärung:

Bei sehr schwieriger Matrix kann eine Carrezklärung durchgeführt werden, alternativ die MycoSep-Aufarbeitung, s.u.

Durchführung Carrez-Klärung:

- 2 (± 0,05) g Probe in ein 16-mL-Zentrifugenröhrchen einwiegen.
- Mit 2 mL Reinstwasser versetzen und auf dem Schüttler lösen.
- 100 µL Carrez I-Lösung zugeben.
- Nach kräftigem Schütteln 100 µL Carrez II-Lösung zupipettieren.
- Nach erneutem Schütteln wie oben beschrieben mit der Extraktion mit Ethylacetat weiterarbeiten.

Alternative Probenvorbereitung (MycoSep™ Patulin):

Stellt sich die LC-Analyse der erhaltenen Probenlösung aufgrund komplexer Matrix als schwierig heraus, wird folgende Aufarbeitung durchgeführt:

Die Aufarbeitung erfolgt in Anlehnung an die Vorschrift „MycoSep™ Patulin“ des Herstellers Romer Lab (Vertrieb: Coring, Gernsheim).

- 2,5 (± 0,05) g zerkleinerte und homogenisierte Probe in ein Zentrifugenröhrchen einwiegen.
- Mit 2 mL Reinstwasser versetzen und auf dem Schüttler lösen.
- 10 mL Acetonitril hinzugeben.
- 5 Minuten auf dem Schüttler schütteln.
- Probe bei 10.000 g 5 min zentrifugieren.
- 8 mL der oberen Acetonitril-Phase abnehmen und in ein Kulturröhrchen überführen.
- Eine MycoSep™ Patulin-Säule mit dem roten Ende voran auf das Kulturröhrchen setzen und die Säule langsam durch die Lösung drücken, bis sich etwas mehr als 4 mL aufgereinigtes Extrakt im oberen Teil der Säule angesammelt haben.
- 4 mL dieses Aliquots in ein Zentrifugenröhrchen überführen und im Stickstoffstrom bei 40 °C mit Hilfe des TurboVap fast bis zur Trockne eingengen.
- Rückstand sofort mit 500 µL Acetatpuffer (pH 4) aufnehmen und in Autosampler-Vials überführen, wobei 200 µL-Einsätze zu verwenden sind. Bei Bedarf kann die Lösung vorher membranfiltriert werden.

Matrixkalibrierung

Zur Kalibrierung wird je Matrix eine Matrixkalibrierung durchgeführt. Bei Bedarf kann die Quantifizierung auch über Standardaddition durchgeführt werden.

Die Herstellung des Dotierstandards Patulin-Dot₁ entspricht der Herstellung der Standardlösung. Patulin/HMF-S₀, allerdings wird auf die Zugabe von HMF verzichtet (s. 3.2.7.4). Die für Matrixkalibrierung (bzw. Standardaddition) verwendete Probe wird direkt nach dem Einwiegen mit 100 µL Patulin-Dot₁ (Dotierstandard) dotiert. Dies entspricht einer Patulin-Konzentration von **50 µg/kg**.

QRK-Proben

Zur Überprüfung der Methode werden regelmäßig dotierte Proben bzw. Proben mit bekannter Patulinkonzentration gemessen.

Reagenzienblindwert [BWR-Pat] → Messung 1 x pro Sequenz

- Injektion Acetatpuffer pH 4

LC-Analyse

Standards, Matrixkalibrierung und Proben werden mit den unter 3.2.7.3 genannten LC-Bedingungen analysiert. Die LC-Sequenz wird mit der Messung von 2 Standards und 1 Matrixkalibrierung gestartet. Anschließend im Rhythmus „5 Proben, 1 Matrixkalibrierung“ gemessen.

Die Qualität der Trennung wird mit Hilfe des Kalibrierstandards Patulin/HMF-Ref₁ (3.2.7.4) überprüft. HMF und Patulin sollten eine Retentionszeitdifferenz von mindestens 0,8 min aufweisen.

Im Falle von störender Matrix im Bereich des Patulin-Peaks kann die Durchführung der alternativen Probenvorbereitung (s.o.) für Abhilfe sorgen.

3.2.7.6 Auswertung

Integration:	Peakflächenbestimmung
Identität:	Retentionszeit
Quantifizierung:	Matrixkalibrierung

3.2.7.7 Liste der Chemikalien und Geräte

Chemikalien: s. 3.2.6.1

Geräte und Hilfsmittel

s. 3.2.6.2, zusätzlich

Trennsäule	LiChrospher 100 RP 8 EC-5 µ, 250 x 4,6 mm, CS, Art.-Nr. 586 649
µ-Einsätze, 30 x 5 mm	AZ Analysentechnik, IN1105030
MycoSep Patulin	Romer Labs, 1004015 (Vertrieb: Coring, Gernsheim)

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Aflatoxine

Eines der Ziele der Doktorarbeit war die Entwicklung einer Methode zur Bestimmung von Aflatoxinen mittels online-SPE-LC unter Mehrfachnutzung von Immunoaffinitätsmaterial, vergl. 2.3.1. Die zur folgenden Diskussion gehörende Methode ist unter 3.1 beschrieben.

4.1.1 Voraussetzungen für die Mehrfachnutzung des Immunoaffinitäts-Materials

Die Aufarbeitung von Aflatoxin-Proben mittels Immunoaffinitätsmaterial bietet eine Reihe von Vorteilen, insbesondere eine sehr hohe Selektivität, die mit anderen Vorbereitungstechniken kaum erreicht werden kann (1.5.2). Aus diesem Grund ist die IAC-Aufarbeitung heute Bestandteil der meisten genormten Aflatoxin-Methoden (2.2.1).

Für die Eignung von Immunoaffinitätsmaterial im online-SPE-Betrieb ist es erforderlich, dieses mehrfach nutzen zu können. Diesem Ansinnen steht allerdings der chemische Aufbau von Immunoaffinitätsmaterial entgegen: Es handelt sich um mono- oder polyklonale Antikörper und somit um Proteine (s. auch 1.5.2 und 2.2.1 sowie SCOTT et al., 1997a). Zur Elution wird ein organisches Lösungsmittel eingesetzt, das die Antikörper denaturiert. Dabei wird die Bindung zu den Analyten gebrochen, so dass die Elution der Zielsubstanzen möglich ist (SCOTT et al., 1997a).

Aus diesem Elutionsschritt ergibt sich ein Problem für die Mehrfachnutzung von Immunoaffinitätsmaterial: Eine irreversible Denaturierung der Antikörper führt dazu, dass der Antikörper keine Affinität zum Antigen, also zum Analyten mehr aufweist und damit unwirksam wird. Die gelösten Analyten fließen ohne Retention durch die Immunoaffinitätssäule durch, ein Falsch-Negativbefund ist die Folge.

Das erste Ziel der Methodenentwicklung war somit, herauszufinden, ob eine Variation des eigentlich vorgeschriebenen Lösungsmittels eine Mehrfachnutzung der IAC ermöglichen würde.

Versucht man, die Denaturierung der Antikörper durch Verwendung eines milderen Elutionsmittels mit erniedrigtem oder ohne Gehalt an organischen Lösungsmitteln zu verringern, besteht allerdings die Gefahr, dass die Elution nicht vollständig erfolgt. Dies würde einerseits zu einem Minderbefund für den Analyten führen, andererseits würden die auf dem IA-Material verbleibenden Reste des Analyten zu einem Carry-over in die nächste Analyse führen und könnten dabei einen Falsch-Positiv-Befund verursachen.

Somit sollten die zu ermittelnden Elutionsbedingungen in erster Linie folgende Eigenschaften aufweisen:

- Die Elution muss vollständig erfolgen, damit kein Carry-over in die nächste Analyse stattfindet.
- Die Antikörper sollen weitestgehend intakt bleiben, so dass eine Mehrfachnutzung des IA-Materials möglich ist.

In der Literatur finden sich hierfür folgende Entwicklungsansätze (vergl. 2.2.1):

- URANO et al. (1993) verwendeten eine Säulenschalttechnik, um Aflatoxine online auf einer Affinitätsphase anzureichern und anschließend zu eluieren. Die Probenaufgabe erfolgte mit Wasser, die Elution mit dem LC-Eluenten (Wasser/Methanol/Acetonitril 56:26:18, v/v, mit

Zusatz von Kaliumbromid und Salpetersäure für die elektrochemische Brom-Erzeugung in der CoBrA-Zelle). Als Immunoaffinitätsmaterial wurden mono- und polyklonale Antikörper eingesetzt, die an ein Epoxy-aktiviertes Säulenmaterial namens Protein-Pak (Millipore-Waters) gebunden wurden. Die aufgegebene Probelösung wies einen Methanolanteil von 22,5 % auf.

Die Methode erreichte gute Leistungsdaten (85 % Wiederfindung, bei relativ hohen Dotier-niveaus; CV < 5 % in Mais, < 10 % in Erdnüssen; Nachweisgrenzen von 0,1 µg/kg für AFB₁ und AFG₁ bzw. von 0,03 µg/kg für AFB₂ und AFG₂ erreichbar) und eine gute Stabilität des Immunoaffinitätsmaterials, das mehr als 50 Mal genutzt werden konnte.

Allerdings wurde kein kommerziell erhältliches, sondern selbst synthetisiertes Immunoaffinitätsmaterial verwendet, so dass die verwendeten Bedingungen nicht Eins zu Eins in der vorliegenden Arbeit umgesetzt werden konnten. Vielmehr sollten kommerziell verfügbare und damit standardisierte Materialien genutzt werden, um den erheblichen Aufwand sowie den Bedarf an speziellen Geräten für die Produktion von IA-Material zu umgehen.

- Eine frühere Arbeit von GROOPMAN et al. (1988) berichtet von einer Immunoaffinitäts-säule, die zur Isolierung von Aflatoxinen aus biologischen Flüssigkeiten und Lebensmittel-Extrakten genutzt wurde. Die Elution erfolgte mittels eines Dimethylsulfoxid(DMSO)/Phosphatpuffer(pH 7,4)-Gemisches (50:50, v/v), während die Säule mit PBS-Puffer (pH 7,4) regeneriert wurde. Die Säule konnte über 100 Mal ohne nennenswerten Aktivitätsverlust verwendet werden.

Wie die Autoren berichten, wurden jedoch nicht alle Aflatoxine bei der Probenaufgabe festgehalten. Auch ist das in der Elutionslösung enthaltene DMSO sehr ungünstig für die spätere Analyse, da es sich aufgrund seiner Schwerflüchtigkeit nur sehr schlecht wieder entfernen lässt, erst recht in Kombination mit einem Phosphatpuffer. Darüber hinaus wurde dieses frühe Experiment nicht mit kommerziell erhältlichem IA-Material durchgeführt und diente eher präparativen denn analytischen Zwecken. Über Nachweisgrenzen oder Details zur analysierten Matrix wurden nur wenige Angaben gemacht.

- FARJAM et al. haben 1991 und 1992 drei zusammenhängende Arbeiten veröffentlicht, die sich mit der online-Bestimmung von Aflatoxinen in Milch und anderen Matrices unter Mehrfachnutzung von Immunoaffinitätsmaterial beschäftigen: Die erste Arbeit (1991a) setzt ein Säulenschaltssystem zur Probenvorbereitung von entfetteter Milch ein. Die erste Vorsäule enthält mono- oder polyklonale AFM₁-Antikörper. Auf diese Vorsäule wird die Milchprobe injiziert, die anschließende Elution erfolgt mit Methanol/Wasser 70:30 (v/v). Das Eluat wird online mit Wasser verdünnt und über eine zweite Vorsäule, die mit RP 18-Material gefüllt ist, gespült. Dabei bleibt der Analyt auf dem RP 18-Material hängen und wird nach Schaltung mit dem LC-Eluenten (Wasser/ACN/MeOH 60:16:24, v/v/v) auf die analytische Säule transferiert, wo die Trennung und die abschließende Fluoreszenz-Detektion stattfinden. Die zweite Arbeit (1991b) beschreibt ergänzende Experimente. Die Autoren kommen dabei zu folgenden Ergebnissen:
 - Die Immunoaffinitäts-Vorsäulen können mindestens 20 Mal genutzt werden.
 - Zur Regeneration reicht Wasser aus, die Verwendung eines Puffers (pH 7) bringt keinen Vorteil.

Verwendung monoklonaler Antikörper:

- Monoklonale Antikörper verlieren in den ersten fünf bis sechs Läufen einen großen Teil (mind. 90 %) ihrer Kapazität, verhalten sich danach bei der Analyse von Standardlösungen aber stabil.
- Bei der Analyse von Milchproben wird jedoch ein stetiger Abfall der Kapazitäten beobachtet.
- Die Regeneration mit Wasser dauert relativ lange.

Verwendung polyklonaler Antikörper:

- Polyklonale Antikörper zeigen hingegen keinen Abfall an Empfindlichkeit in den ersten Läufen.
- Die Regenerationszeit ist kurz.
- Die Kapazität ist deutlich geringer.

Um das Problem der mangelnden Stabilität gegenüber Milchproben zu umgehen, haben FARJAM et al. (1992) ein Dialysesystem entwickelt, das der online-IA-SPE vorgeschaltet ist und störendes Milchprotein entfernt. Über 70 Milchproben konnten mit einer Immunoaffinitätssäule (mit monoklonalen Antikörpern) analysiert werden.

Aus diesen Arbeiten konnten **folgende Schlüsse** gezogen werden:

- Polyklonale Antikörper könnten für die Mehrfachanwendung geeigneter als monoklonale sein, da sie keinen Aktivitätsverlust in den ersten Läufen erleiden und leicht renaturiert werden können.
- Die Elution mit Gemischen aus organischen Lösungsmitteln und Wasser ist möglich, ohne dass die Antikörper nennenswerten Schaden nehmen.
- Zur Regeneration der Antikörper reicht das Spülen mit Wasser.
- Auf eine komplizierte Probenvorbereitung bzw. den Einbau eines weiteren Probenvorbereitungsschritts (hier: Dialyse) sollte möglichst verzichtet werden.

Dabei ist zu beachten, dass nicht sicher ist, dass diese Ergebnisse auf andere Arten von Antikörpern übertragen werden können.

Die Nachteile der von FARJAM et al. beschriebenen Verfahren sind die hohe Komplexität und der damit verbundene erhebliche technische Aufwand (Dialyse, 3 Pumpen, 3 Schaltventile etc.), wobei darüber hinaus Teile davon nicht kommerziell erhältlich sind, sondern von den Autoren selbst hergestellt wurden. Weiterhin ist nicht bekannt, ob sich das Prinzip auf andere gängige Lebensmittel wie Mais, Gewürze, Nüsse etc. übertragen lässt.

- ZIMMERLI et al. (1995) berichten von über 20 Nutzungen von handelsüblichen Immunoaffinitätssäulen bei der Bestimmung von Ochratoxin A (OTA) in Blut und Milch. Die Probenvorbereitung beginnt mit einer Probenextraktion mit Chloroform, die nach Einengung und Rekonstitution anschließende IAC-SPE wird manuell durchgeführt. Zur Reconditionierung der Ochratoxin A-Säule wird diese mit PBS-Lösung gewaschen. Dieses Verfahren haben die Autoren auch erfolgreich auf OTA in Wein (1996) angewendet.

Die Mehrfachverwendung von Immunoaffinitätsmaterial konnte somit für mehrere flüssige Matrices nachgewiesen werden. Bei der Übertragung der Prinzipien auf Aflatoxine ist jedoch zu beachten, dass Aflatoxin-Proben üblicherweise komplexer zusammengesetzt sind als die von Zimmerli untersuchten. Auch dauerte der Regenerationsprozess mit mindestens 20 Stunden sehr lange, bevor eine IA-Säule wieder einsatzbereit war. Ebenso ist zu bezweifeln, ob sich Aflatoxin-Antikörper ähnlich wie OTA-Antikörper verhalten.

- Einen neuen, erst gegen Ende der hier präsentierten Arbeit veröffentlichten Ansatz verfolgen RAZZAZI-FAZELI et al. (2006), die die Antikörper (hier: gegen DON) in einem Gel immobilisieren (sog. Sol-Gel-Methode) statt an Sepharose, was ein schonenderes Verfahren als die klassische Immobilisierung darstellt, so dass die Antikörper weniger Schaden nehmen und damit eine höhere Affinität zum Analyten aufweisen. Diese Antikörper sollen wiederverwendbar (mind. 25 Mal) und lange lagerbar sein.

Für die vorliegende Arbeit über Aflatoxine stellt sich grundsätzlich die Frage, ob die Sol-Gel-Methode auch mit Aflatoxin-Antikörpern funktionieren würde. Weiterhin haben die Autoren gemäß mündlicher Auskunft noch nicht geprüft, ob ein Carry-over stattfindet, d.h. ob die Elution vollständig ist. Wie die im Laufe dieser Arbeit gesammelten Erfahrungen zeigen, muss dies unbedingt abgesichert werden. Weiterhin sind Sol-Gel-Immunoaffinitätsmaterialien noch nicht kommerziell erhältlich.

Schlussfolgerungen

Gemäß verfügbarer Literatur ist die Mehrfachnutzung von Immunoaffinitätsmaterial durchaus möglich – auch wenn dies verständlicherweise von den Herstellern der Immunoaffinitätssäulen nicht empfohlen wird, vgl. z.B. Vorschrift von R-BIOPHARM (2003).

Unter Nutzung der o.g. Prinzipien und Ideen sollte – sofern möglich – eine Mehrfachnutzung von Immunoaffinitätsmaterial unter folgenden Vorgaben erzielt werden:

- Es sollten handelsübliche Immunoaffinitätssäulen verwendet werden. Als Ausgangspunkt wurden RIDA Aflatoxin columns von r-biopharm eingesetzt, mit deren Handhabung Erfahrung aus dem Routinebetrieb vorlag.
- Zur online-SPE sollte ein im Labor verfügbares kommerziell erhältliches Probenvorbereitungssystem eingesetzt werden. Das verwendete Instrument APPLICA SP2000 (Anbieter: APPLICA, Bremen) bzw. dessen Nachfolgemodell SP 3000 (Anbieter: Knauer, Spectralytics) haben sich in verschiedenen Anwendungen im Routinebetrieb insbesondere in der Rückstandsanalytik bewährt. Aufgrund der Ausstattung mit einem zweiten Ventil, dem sogenannten Bypass-Ventil, sind besondere Schaltungen und Fließwege möglich, die die online-Durchführung einer Analyse in einigen Fällen erst möglich machen.
- Die manuelle Probenvorbereitung sollte so einfach wie möglich gestaltet werden, um diese zeitaufwändigen und fehleranfälligen Schritte auf ein Minimum zu reduzieren. Ebenso sollte auf giftige und umweltproblematische Chemikalien und Lösungsmittel wie Chloroform verzichtet werden.
- Zur Probenvorbereitung eingesetzte Volumina und Gerätschaften sollten den Gegebenheiten des Labors angepasst werden.

4.1.2 Probenextraktion

Die vom Säulenhersteller R-BIOPHARM (2003) gemachten Vorgaben für die Probenvorbereitung von Getreide, Futtermitteln und Nüssen (Punkt 7.1. der Vorschrift) sehen folgendermaßen aus:

5 g der gemahlene Probe werden mit 25 mL Methanol (70 %) versetzt und 10 min durch Mischen (Magnetrührer) oder leichtes Schütteln extrahiert. Nach Filtration durch einen Papierfilter werden 5 mL des Extrakts mit 15 mL dest. Wasser versetzt und die so vorbereitete Probelösung (= 20 mL) wird vollständig auf die Säule aufgetragen.

Die Vorschrift für Kräuter, Gewürze und Teeblätter sieht außerdem einen Zusatz von 0,25 mL Tween 20, einem Tensid, zur verdünnten Probelösung sowie anschließendes zweiminütiges Rühren vor.

Der Wasseranteil im Extraktionsmittel sorgt dabei für eine Durchfeuchtung des Probematerials und erlaubt so das bessere Eindringen des organischen Lösungsmittels, was zu einer verbesserten Extraktion führt (JAIMEZ et al., 2000).

Aus der genannten Vorschrift ergibt sich, dass die auf die Immunoaffinitätssäule aufgegebene verdünnte Probelösung einen Methanolanteil von 17,5 vol% aufweist. Bei diesem organischem Anteil werden die Analyten somit noch von den Antikörpern der IAC-Säule praktisch quantitativ festgehalten, da r-biopharm eine Wiederfindungsrate von ca. 90 % angibt. Hieraus folgt auch, dass die Antikörper nicht grundsätzlich von organischen Anteilen zerstört werden, vielmehr handelt es sich um eine Konzentrations- und vermutlich Mengenfrage – und um eine Frage der Art des organischen Lösungsmittels.

Der bewährte **Extraktionsschritt mit Methanol/Wasser 70:30 (v/v)**, der ähnlich beispielsweise von COLE et al. (1994) sowie der ASU § 64 LFGB-Methode L 15.00-2 (BVL, Stand: Dez. 2004) beschrieben wird, sollte beibehalten werden. Im Vergleich zur R-BIOPHARM-Vorschrift (2003) wurde einzig eine leichte Einwaagereduktion von 5 auf 4 g vorgenommen, bei gleichzeitiger Reduzierung des Extraktionsmittelvolumens (20 statt 25 mL), um 35 mL-Polypropylenröhrchen einsetzen zu können, auf deren Handhabung das Labor ausgerichtet ist. Hierbei bleibt die ursprüngliche Probekonzentration von 0,2 g/mL erhalten; dieses Verfahren hat sich in der akkreditierten Hausmethode zur offline-Bestimmung von Aflatoxinen in Anlehnung an ASU § 64 LFGB L 15.00-2 (3.1.9) bewährt. Die verwendete Probekonzentration

on von 0,2 g/mL liegt dabei noch unter der Empfehlung von COLE et al. (1994), die eine Konzentration von 0,33 g/mL (entsprechend 3 mL Extraktionsmittel pro Gramm Probe) empfehlen, vergl. auch 2.2.1. Entsprechend den Erfahrungen aus der Routineanalytik bei AP-PLICA führt eine verringerte Einwaage im Allgemeinen zu einer verbesserten Extraktion bei reduzierten Matrixstörungen. Den limitierenden Faktor bei der Aflatoxin-Analyse stellt jedoch die teilweise stark inhomogene Verteilung der Mykotoxine in der Probe dar, vergl. z.B. DORNER et al. (1993). Aus diesem Grund wurde auf eine stärkere Reduzierung der Einwaage verzichtet, da sonst eine signifikant verschlechterte Wiederholbarkeit der Methode zu erwarten gewesen wäre. Die Wiederholbarkeit der entwickelten Methode wurde im Rahmen der Validierung (4.1.9; 5.1) nachgewiesen.

Fast alle veröffentlichten Methoden verwenden eine einmalige Extraktion und verzichten auf das wiederholte Extrahieren der Probe. Da Aflatoxine gut im Extraktionsmittel löslich sind (s. beispielsweise COLE et al., 1994) und keine Flüssig-flüssig-Extraktion (siehe 4.2 Patulin) durchgeführt werden soll, kann auf eine aufwändige Mehrfachextraktion verzichtet werden.

Die r-biopharm-Methode schreibt als nächstes einen 1:4-Verdünnungsschritt für den Probenextrakt vor, um den organischen Anteil wie beschrieben abzusenken. Um die Auswirkungen dieses Schritts auf die Leistungsfähigkeit der Methode zu erkennen, ist es erforderlich, die weiteren Schritte bis zur abschließenden LC-Analyse mit einzubeziehen:

Gemäß r-biopharm-Vorschrift werden 5 mL eines 0,2 g/mL-Probenextrakts für die IAC-SPE eingesetzt, so dass effektiv 1 g Probe auf die Säule aufgebracht wird. Die anschließende Elution erfolgt mit 0,5 mL Methanol. Um keine unerwünschten Lösungsmittelleffekte bei der folgenden LC-Analyse zu erhalten (KROMIDAS, 1997, S. 75), wird das Eluat verdünnt, indem 0,5 mL Reinstwasser über die IAC-Säule gegeben werden, wobei zugleich letzte Methanolreste gewonnen werden. Die in die LC injizierte Probelösung hat somit eine Probenkonzentration von 1 g/mL, bei einem Injektionsvolumen von 200 µL (vergl. 3.1.9). Effektiv gelangen damit 200 mg Probe auf die Trennsäule.

Bei der online-SPE ist ein Injektionsvolumen von bis zu 1000 µL erfahrungsgemäß sinnvoll zu handhaben. Um dieselbe Probemenge wie bei der beschriebenen offline-Variante aufzugeben, muss die Probelösung somit eine Konzentration 200 mg/mL aufweisen. Der nach r-biopharm-Vorschrift verdünnte Probenextrakt weist jedoch nur eine Probenkonzentration von 50 mg/mL auf. Damit würden Nachweis- und Bestimmungsgrenze bei der online-Variante um etwa den Faktor 4 schlechter ausfallen als bei der offline-Methode.

Entfernung des organischen Lösungsmittels

Zur Umgehung dieses Problems wird das Lösungsmittel (Methanol/Wasser 70:30, v/v) im Stickstoffstrom bei 40 °C mit Hilfe eines TurboVaps entfernt, der Rückstand wird mittels Wasser/Methanol 92,5:7,5 (v/v) aufgenommen. Zur Schonung des Immunoaffinitätsmaterials wäre zwar ein Lösen in reinem Wasser vorteilhafter, jedoch sorgt ein kleiner Methanol-Anteil für eine verbesserte Löslichkeit der Aflatoxine, wie verschiedene Versuche zeigten. Zur Einkonzentrierung wird ein Aliquot von 5 mL des o.g. Probenextraktes (20 mL, Probenkonzentration 0,2 g/mL) verwendet; der erhaltene Rückstand wird in 5 mL Wasser/Methanol 92,5:7,5 (v/v) wieder gelöst, so dass die Probenkonzentration von 0,2 g/mL erhalten bleibt. Durch das fünffach höhere Injektionsvolumen gegenüber der offline-Methode, bei einer nur ein Fünftel so großen Probenkonzentration, wird effektiv dieselbe Probemenge (200 mg) zur LC-Analyse eingesetzt.

Die komplette Entfernung des Lösungsmittels hat den Vorteil, dass der Rückstand in einem definierten Volumen aufgenommen werden kann. Im Rahmen der Doktorarbeit wurde zuerst versucht, das Lösungsmittel nicht komplett einzudampfen und die Aflatoxine in wässriger Lösung zu halten, unter Verwendung von 16 mL-Zentrifugenröhrchen. Jedoch ist das Auffüllen auf ein definiertes Volumen (hier: 5 mL) mit dieser Technik nicht möglich.

Was bewirkt der Methanol-Anteil im Lösungsmittel?

Wie erwähnt sorgt ein kleiner Methanol-Anteil im Lösungsmittel für eine bessere Löslichkeit der Analyten sowohl im Probenextrakt als auch in den Standardlösungen. Diese Beobachtung konnte im Rahmen der Routineanalytik gemacht werden: Wurde der Kalibrierstandard

in Wasser gelöst, die Proben hingegen in Anlehnung an die R-BIOPHARM-Vorschrift (2003) in Methanol/Wasser 50:50 (v/v), so wurden für die Proben zu hohe Aflatoxin-Gehalte ermittelt. Bedingt durch die schlechtere Löslichkeit der Aflatoxine in reinem Wasser waren die erhaltenen Signale für die Kalibrierlösung zu klein, so dass zu hohe Ergebnisse für die Aflatoxin-Konzentration in den Probelösungen erhalten wurden. Eine Angleichung der Lösungsmittel-Zusammensetzung des Standards an die des Lösungsmittels für die Proben behob das Problem.

Aus dieser Erfahrung heraus werden die für die LC-Analyse bestimmten Probe- und Standardlösungen im selben Lösungsmittel angesetzt, nämlich in Wasser/Methanol 92,5:7,5 (v/v). Der limitierende Faktor bei der Höhe des Methanol-Anteils stellt dabei das Immunoaffinitätsmaterial dar: Gemäß R-BIOPHARM-Vorschrift (2003) werden Aflatoxine noch bei Aufgabe einer 17,5 %igen Methanol-Lösung quantitativ aus der Probelösung extrahiert. Bei höheren Anteilen steigt einerseits die Löslichkeit der Aflatoxine, andererseits werden die Antikörper des IA-Materials denaturiert, so dass die Aflatoxine nicht mehr quantitativ gebunden werden. Der Methanol-Anteil von 7,5 % stellt dabei eine empirisch ermittelte Konzentration dar, bei der gemäß Experimenten eine nennenswerte Schädigung der Antikörper auch bei Mehrfachnutzung nicht stattfindet, zugleich aber die Löslichkeit der Analyten im Vergleich zur rein wässrigen Lösung deutlich verbessert wird.

4.1.3 Waschschrift

Nachdem die Aflatoxine erfolgreich auf das Immunoaffinitätsmaterial aufgebracht sind, stellt sich die Frage nach der Reinigung des gebundenen Probenextrakts. Wie unter 1.5.2 berichtet, zeichnet sich Immunoaffinitätsmaterial durch eine sehr hohe Selektivität aus, so dass die meisten unerwünschten Matrixbestandteile von der Kartusche bzw. Säule gewaschen werden können. Hierzu wird im Allgemeinen Wasser eingesetzt, vergl. R-BIOPHARM-Vorschrift (2003) oder die so genannten offiziellen Methoden ASU § 64 LFGB L 15.00-2 und L 23.05-2 (BVL, Stand: Dez. 2004). Alternativ kann auch phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS – phosphate buffered saline) mit einem pH von 7,4 verwendet werden (SHARMAN et al., 1991b), jedoch wird diese zumeist nur zur Vorkonditionierung der IA-Säulen eingesetzt (vergl. z.B. CHAN et al., 2004).

Aufgrund des vielfach erprobten Einsatzes von Wasser als Waschlösung wurde dieses auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzt. Ein Zusatz von kleinen Mengen eines organischen Lösungsmittels wie Methanol wäre zwar denkbar, würde aber bei dauerhaftem Gebrauch zur Schädigung der Antikörper beitragen. Die hohe Selektivität von Immunoaffinitätsmaterial in Verbindung mit der selektiven Fluoreszenz-Detektion sorgt erfahrungsgemäß für sehr saubere Chromatogramme, daher wurde ein technisch aufwändigerer Waschschrift für nicht erforderlich erachtet.

4.1.4 Elutionsschritt

Wie unter 4.1.1 dargelegt ist die Elution der kritische Schritt bei der Mehrfachnutzung von Immunoaffinitätsmaterial, da Bedingungen gefunden werden müssen, bei denen die Antikörper weitestgehend intakt für eine wiederholte Nutzung bleiben, die Elution der Analyten jedoch trotzdem quantitativ erfolgt.

Die Übertragung einer manuellen Festphasenextraktion auf die online-SPE-Probenzubereitungseinheit erfolgt üblicherweise dadurch, dass die geeigneten Bedingungen für die Mehrfachverwendung des SPE-Materials offline, sprich manuell erprobt werden und das geeignete Verfahren anschließend auf die online-Variante übertragen wird, vergl. 4.2 Patulin. Jedoch sind andere SPE-Materialien wie RP 18- oder SDB-Material (s. ebenfalls Patulin) sehr viel stabiler als die aus gebundenen Proteinen aufgebauten IA-Phasen, so dass eine Eins zu Eins-Übertragbarkeit der offline-Ergebnisse auf die online-Methode nicht unbedingt zu erwarten war.

Ausgangspunkt der Überlegungen waren dabei die von R-BIOPHARM (2003) gemachten Vorgaben zur Handhabung der verwendeten Immunoaffinitätssäulen: Demnach bleiben die Analyten bei 17,5 vol % Methanol noch an die Antikörper gebunden, während sie mit reinem Methanol eluiert werden.

4.1.4.1 Wahl des Elutionsmittels und der Elutionsart

Grundsätzlich standen folgende Möglichkeiten zur Elution zur Wahl:

- Nutzung der Elutionskraft des LC-Eluenten
- Verwendung des Bypass-Ventils des SP 3000, um eine höhere Elutionskraft zu erreichen

Im Folgenden werden die Vor- und Nachteile der verschiedenen Techniken kurz diskutiert und die praktischen Erfahrungen dargestellt:

Elution mittels LC-Eluent

Wie unter 4.1.1 erläutert eignen sich organische Lösungsmittel allein oder in Kombination mit Wasser zur Elution von Aflatoxinen von Immunoaffinitätsmaterial. Die klassische online-SPE-Technik setzt die Elutionskraft der mobilen Phase der Flüssigchromatographie ein, um die Analyten von der Anreicherungskartusche auf die Trennsäule zu transferieren, vergl. 1.6.

Der von der ASU § 64 LFGB-Methode L 15.00-2 (BVL, Stand Dez. 2004) vorgeschriebene LC-Eluent, der bei APPLICA für die Routinemethode zur (offline-)Aflatoxin-Bestimmung (3.1.9) übernommen wurde, ist folgendermaßen zusammengesetzt: Wasser/Methanol/Acetonitril 60:20:20 (v/v/v), zusätzlich Kaliumbromid und etwas verdünnte Salpetersäure für die Nachsäulenderivatisierung. Diese Mischung mit gleichen Anteilen Methanol und Acetonitril in Verbindung mit einer chromatographischen Trennung an RP 18-Material hat sich in der Routine bewährt und wird beispielsweise auch von der AOAC vorgeschrieben, s. AOAC-Methode 991.31 (AOAC, 1995, Chapter 49.2.18).

Diese Elutionsmethode wurde online unter folgenden Bedingungen getestet:

Injektionsvolumen: 1000 µL
 Kartuschenfüllung: RIDA Aflatoxin r-biopharm (s. 3.1.8.2)
 Aufbau: wie unter 1.6 beschrieben

Tab. 4-1. SP 3000: Vereinfachtes Schaltschema zur Prüfung der Elutionskraft des LC-Eluenten

Zeit [min]	Online-SPE-Schaltung	Beschreibung
0	0 (Transfer)	Aufspülen des Standards* mit Wasser
5	1 (Injektion)	Elution mit LC-Eluent (Wasser/MeOH/ACN 60:20:20, v/v/v)
15	0 (Transfer)	Rekonditionierung der IA-Kartusche

*c (Aflatoxin B₁, G₁) = 2,0 µg/L; c (Aflatoxin B₂, G₂) = 0,6 µg/L, in Wasser

Dabei zeigte sich, dass im nächsten LC-Lauf ohne Standardinjektion (Blindwert) eine Verschleppung auftrat, d.h. das Chromatogramm zeigte signifikante Peaks für alle vier Aflatoxine, obwohl keine Analyten injiziert worden waren. Aus diesem Carry-over wurde geschlossen, dass die Elutionskraft des LC-Eluenten nicht ausreicht, um eine vollständige Elution der Analyten zu gewährleisten. Dies ist insofern bemerkenswert, da der Eluent immerhin 40 % organischen Anteil enthält, darunter zur Hälfte Acetonitril, dessen Elutionskraft größer ist als die von Methanol. Diese Eigenschaft von Acetonitril wird von SCOTT et al. (1997a) für Immunoaffinitätssäulen beschrieben, der gleiche Effekt tritt jedoch auch bei Umkehr-LC-Phasen wie die weit verbreiteten RP 18-Materialien auf, vergl. KROMIDAS (1997), S. 151.

Aus diesem Ergebnis ergaben sich zwei mögliche Lösungsansätze:

1. Die Erhöhung der Elutionskraft des LC-Eluenten.
2. Der Einsatz des Bypass-Ventils des online-SPE-Geräts zur gezielten Variation der Elutionskraft.

Möglichkeit 1 würde natürlich auch die anschließende chromatographische Trennung auf der RP 18-Phase beeinflussen. Die vier zu trennenden Aflatoxine B₁, B₂, G₁ und G₂ sind chemisch sehr ähnlich (s. Abb. 1-1, 1.3.2). Unter den beschriebenen Routinebedingungen (3.1.9: ASU § 64 L 15.00-2, modifiziert) gelingt eine gute Trennung (vergl. Abb. 4-1). Eine Erhöhung der Elutionskraft hingegen würde die vier Peaks weiter zusammenrücken lassen und zu einer Verschlechterung der Auflösung führen. Sollte eine erhebliche Erhöhung der Elutionskraft erforderlich sein, besteht die Gefahr, dass die vier Analyten nicht mehr sauber getrennt werden und zusammenlaufen. Ein weiteres Problem bei der beobachteten geringen Elutionskraft besteht darin, dass die Analyten nicht „kompakt“ auf die Trennsäule transferiert werden, so dass die Peaks breit werden und sich dadurch die Leistungsfähigkeit der Trennung ebenfalls verschlechtert.

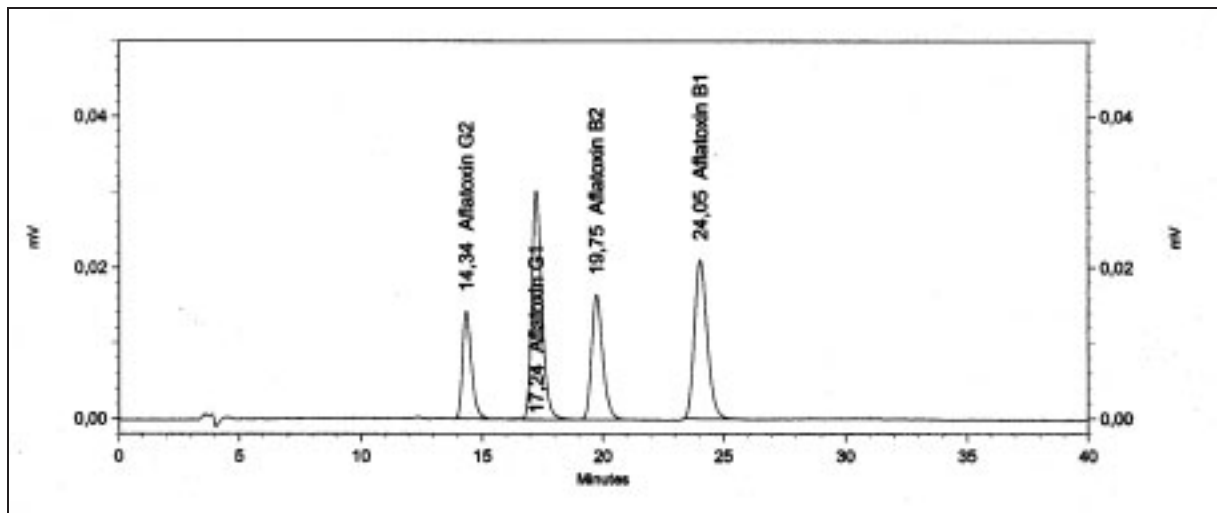


Abb. 4-1. Chromatogramm Aflatoxin-Standardlösung, offline-Routinemethode (3.1.9) ($c(\text{AFB}_1, \text{G}_1) \approx 2 \mu\text{g/L}$, $c(\text{AFB}_2, \text{G}_2) \approx 0,6 \mu\text{g/L}$)

Elution mit Hilfe des Bypass-Ventils

Aus diesen Gründen wurde Variante 2 zur Problembewegung favorisiert. Mit Hilfe der unten erläuterten Bypass-Schaltung ist es möglich, gezielt die Elutionsbedingungen an der Probenvorbereitungseinheit zu steuern. Mittels einer Transferschleife wird ein definiertes Volumen eines frei wählbaren Lösungsmittels dem LC-Eluenten bei jeder Analyse vorweggeschickt.

Das Volumen der Transferschleife sollte dabei nicht zu groß gewählt werden, um Lösungsmittelleffekte bei der anschließenden chromatographischen Trennung zu vermeiden (vergl. KROMIDAS, 1997, S. 75). Zumeist werden daher Volumina zwischen 100 und 200 μL eingesetzt. Als Lösungsmittel erschienen Mischungen von Wasser mit Methanol und/oder Acetonitril am geeignetsten, da sowohl reines Methanol (s. Vorschrift R-BIOPHARM, 2003) als auch reines Acetonitril (SCOTT et al., 1997a) zu einer kaum reversiblen Denaturierung der Antikörper führen würden.

In zahlreichen Versuchen wurde ein Transferschleifenvolumen von 200 μL als geeignet ermittelt. Beim organischen Lösungsmittel fiel die Wahl schließlich auf Acetonitril. Aufgrund der höheren Elutionskraft gegenüber Antikörpern genügt ein geringerer Anteil an Acetonitril, um eine vollständige Elution der Aflatoxine zu gewährleisten. Dadurch erwies sich ein Acetonitril/Wasser-Gemisch insgesamt als schonender als ein Methanol/Wasser-Gemisch mit gleicher Elutionskraft. Mit Acetonitril waren deutlich mehr Analysen ohne Aktivitätsverlust der

Antikörper, ausgedrückt durch praktisch konstante Peakflächen in den Chromatogrammen, möglich als mit Methanol. In kleinen Schritten wurde schließlich das kleinste Acetonitril/Wasser-Verhältnis ermittelt, das noch eine vollständige Elution (vergl. Leerwert-Chromatogramm, Abb. 4-6) erlaubt und dabei die Antikörper aufgrund eines möglichst großen Wasseranteils weitestgehend schont.

4.1.4.2 SP 3000: Schaltprinzip und Programmierung

Das Grundprinzip der online-Festphasenextraktion wurde bereits unter 1.6 erläutert. Wie oben dargestellt wurde für die Analyse von Aflatoxinen eine Schaltvariante unter Nutzung des Bypassventils entwickelt. Dieses zweite Ventil erlaubt die Verwendung einer Transferschleife (Volumen: 200 μL), die mit einem definierten Acetonitril/Wasser-Gemisch (67:33, v/v) gefüllt wird. Die folgenden Abbildungen 4-2 bis 4-4 verdeutlichen das Arbeitsprinzip der Probenvorbereitungseinheit SP 3000. Die dazugehörige Programmierung wird im Anschluss beschrieben.

Schritt 1: Probenaufnahme (Abb. 4-2)

Der Autosampler injiziert direkt auf die mit Immunoaffinitätsmaterial gefüllte SPE-Kartusche.

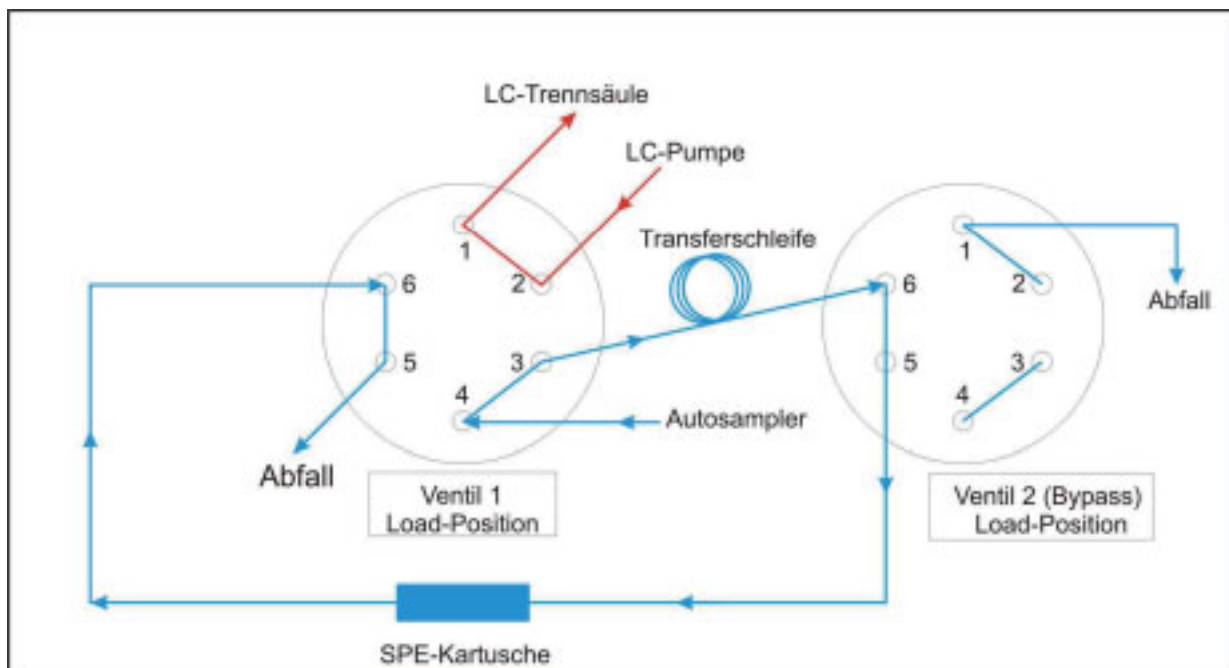


Abb. 4-2. SP 3000: Probenaufnahme, Waschschrift und Rekonditionierung

Schritt 2: Waschschrift (Abb. 4-2)

Die Probenvorbereitungseinheit pumpt zur Entfernung von Matrixbestandteilen Wasser über die Kartusche in den Abfall.

Schritt 3: Füllung der Transferschleife (Abb. 4-3)

Als Besonderheit bei der Analyse von Aflatoxinen wird die Bypass-Schaltung über das zweite Ventil des SP 3000 genutzt, um bei jedem Transferschritt dem LC-Eluenten ein definiertes Volumen (200 μL) eines Acetonitril/Wasser(67:33, v/v)-Gemisches vorwegzuschicken. Die Füllung der Transferschleife erfolgt dabei nach Schaltung des Bypass-Ventils 2, wobei die Transferschleife überfüllt wird.

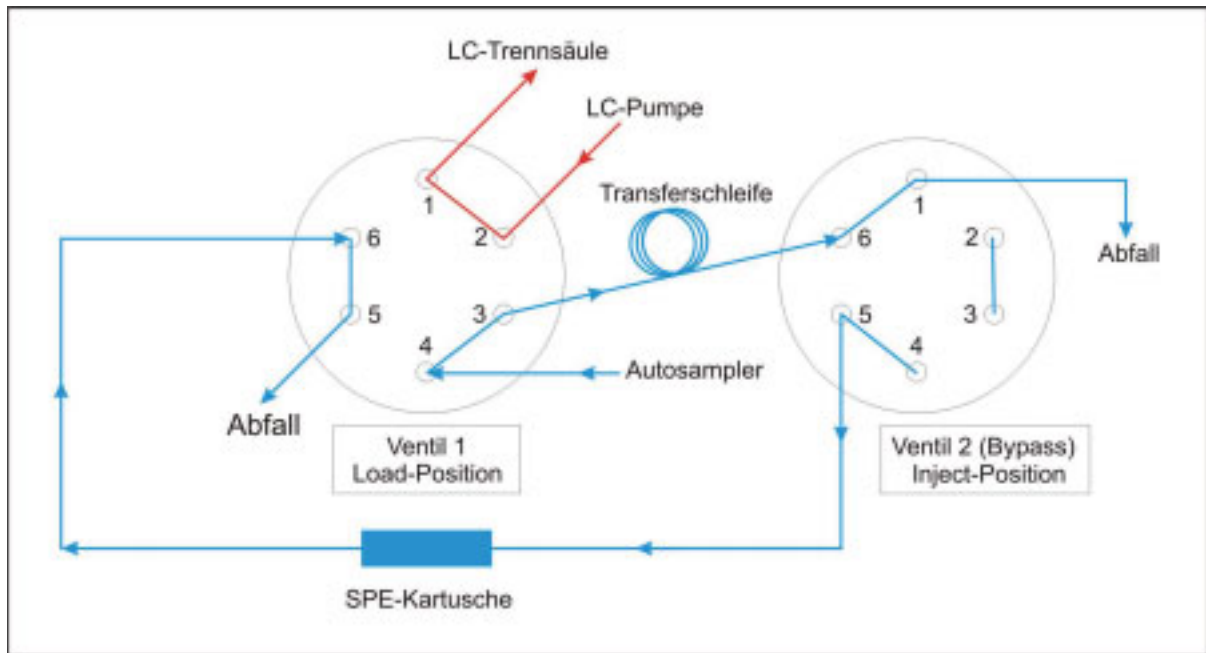


Abb. 4-3. SP 3000: Füllung der Transferschleife

Schritt 4: Transferschritt (Abb. 4-4)

Nach Schaltung des Ventile 1 und 2 fließt der LC-Eluent, von der LC-Pumpe kommend, über die SPE-Kartusche, dabei die Füllung der Transferschleife vor sich herschiebend. Auf diesem Weg werden die Analyten auf die Trennsäule transferiert. Dieser Schritt ist zur Schonung der Antikörper mit 2,3 min möglichst kurz gehalten.

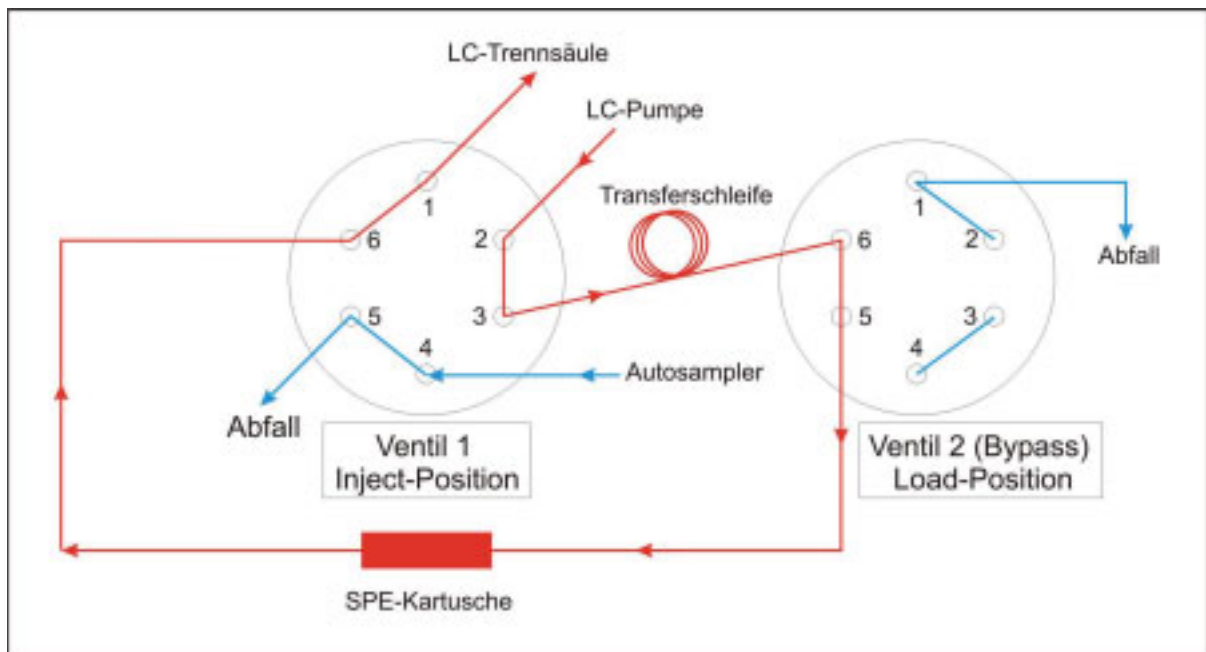


Abb. 4-4. SP 3000: Transferschritt

Schritt 5: Rekonditionierung (Abb. 4-2)

Während der LC-Trennung wird parallel dazu, nach erneuter Schaltung in die Ausgangsposition, die IA-Kartusche mit Wasser gereinigt und rekonditioniert. Danach steht sie für eine weitere automatisierte Probenvorbereitung zur Verfügung.

Zu diesem Aufbau (Abb. 4-2 bis 4-4) gehört folgendes SP 3000-Programm:

Transferschleifenvolumen: 200 µL
Eluent: Acetonitril/Wasser 67:33 (v/v)

Tab. 4-2. SP 3000: Schaltprogramm für die online-SPE-LC-Analyse von Aflatoxinen

SP 3000-Schritt	Zeit [min]	Line [%]				Event ¹	Fluss [mL/min]	Bemerkung
		A	B	C	D			
1	0.0	0	100	0	0	0000 0000	0,4	Injektion
2	7.0	0	100	0	0	0000 0100	0,4	
3	7.1	0	0	100	0	0000 0100	4,0	Füllen Transferschleife
4	8.5	0	0	100	0	0000 0100	0,4	
5	8.6	0	0	100	0	0010 0000	0,4	Transfer auf LC-Säule
6	8.7	0	100	0	0	0010 0000	0,4	
7	10.9	0	100	0	0	0000 0000	0,4	Rekonditionierung
8	25.0	0	100	0	0	0000 0000	0,4	

¹ bei Anschluss Injektionsventil an Pos. 3 und Bypassventil an Pos. 6; 0 = Load-Position, 1 = Inject-Position

Tab. 4-3. Eluentenbelegung SP 3000 (zu Tab. 4-2)

Line	Lösung
A	Frei
B	Reinstwasser
C	Acetonitril/Wasser 67:33 (v/v)
D	Frei

4.1.4.3 Anwendung der online-SPE-Vorbereitung

Mittels der hier und unter 3.1.4 wiedergegebenen online-SPE-Bedingungen ist damit erstmals eine Mehrfachnutzung von handelsüblichem Immunoaffinitätsmaterial bei der Analyse von Aflatoxinen durchgeführt worden. In der Praxis sind dabei mindestens 20 Nutzungen einer Kartuschenfüllung ohne nennenswerten Aktivitätsverlust möglich, wie ein optischer Vergleich der Standardchromatogramme der 2. und der 19. Nutzung desselben Immunoaffinitätsmaterials zeigt (Abb. 4-5).

Die tatsächlich mögliche Nutzungsanzahl ist dabei von verschiedenen Faktoren abhängig. Neben der Güte der Kartuschenpackung (behutsames Einfüllen des Gels, dadurch dichte Packung ohne Beschädigung des Gels) spielt die Art der Proben eine Rolle. Proben mit einem stark sauren pH-Wert wie Früchte beeinträchtigen die Stabilität der Antikörper stärker als „neutrale“ Proben. Die stark Aflatoxin-gefährdeten Matrices Erdnüsse, Maisprodukte (Cerealien) sowie Mehl erwiesen sich als unkritisch hinsichtlich der Stabilität, so dass 30 und mehr Nutzungen problemlos möglich waren. Dies verdeutlicht Tab. 4-4, die einen Vergleich der Flächen für Standardlösungen an verschiedenen Stellen einer Sequenz zeigt. Eine Abnahme der Empfindlichkeit im Verlauf der Sequenz ist nicht feststellbar.

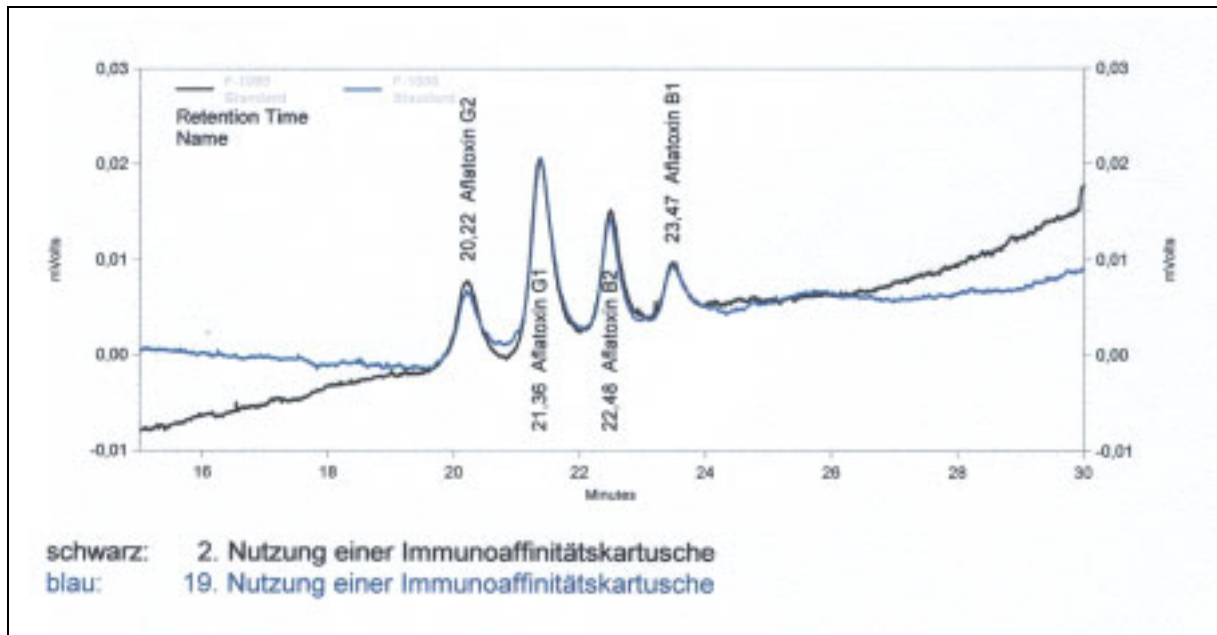


Abb. 4-5. Stabilität des Immunoaffinitätsmaterials – Vergleich Standardchromatogramm der 2. und der 19. Nutzung

Tab. 4-4. Flächenvergleich für Standardlösung Afla-RefM₁ im Laufe einer Sequenz mit Erdnuss-Proben (8. Nutzung = 100 %)

Aflatoxin	Fläche 8. Nutzung	Fläche 20. Nutzung	Fläche 31. Nutzung
B ₁	235990 (100 %)	233498 (98,9 %)	240829 (102,1 %)
B ₂	797295 (100 %)	879816 (110,4 %)	840354 (105,4 %)
G ₁	445032 (100 %)	472074 (106,1 %)	477337 (107,3 %)
G ₂	529184 (100 %)	518016 (97,9 %)	476348 (90,0 %)

Die Elution läuft quantitativ ab, die Blindläufe (Injektion von Wasser/Methanol 92,5:7,5, v/v) zeigen ebenso wenig wie die Chromatogramme unbelasteter Proben Verschleppungen aus der vorangegangenen Analyse. Dies verdeutlicht Abb. 4-6, die das Chromatogramm einer unbelasteten Erdnuss-Probe zeigt.

Polyklonal oder monoklonal?

Wie unter 1.5.2 erläutert unterscheidet man zwischen mono- und polyklonalen Antikörpern, die gemäß Arbeiten von FARJAM et al. (1991a und b; s. 4.1.1) unterschiedliche Eigenschaften bei der Mehrfachnutzung haben. Aus den hier präsentierten Ergebnissen ließe sich ableiten, dass es sich bei dem hier eingesetzten Immunoaffinitätsmaterial von r-biopharm um polyklonale Antikörper handeln könnte. Wie von Farjam et al. beschrieben, zeigen die Antikörper konstante Aktivitäten über 20 und mehr Läufe und lassen sich schnell regenerieren. Gemäß Produktbeschreibung von r-biopharm enthalten RIDA Aflatoxin-Säulen jedoch monoklonale Antikörper. Somit lassen sich die Ergebnisse von Farjam et al. nicht Eins zu Eins auf die Antikörper von heutzutage erhältlichen Immunoaffinitätssäulen übertragen. Ein Vorteil der monoklonalen Antikörper ist, dass ihre Eigenschaften weniger Chargen-abhängig sind.

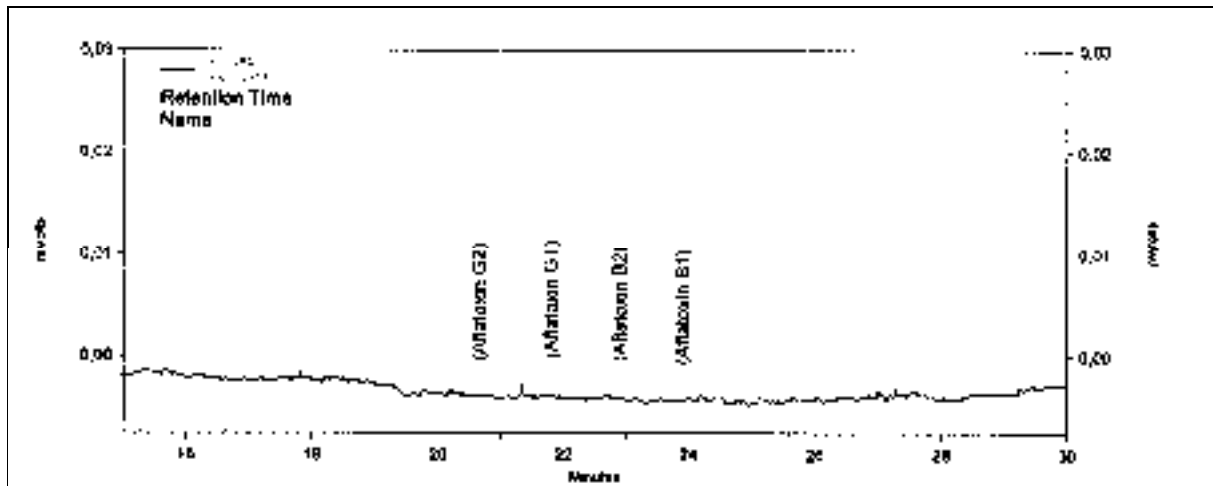


Abb. 4-6. online-SPE-LC: Chromatogramm unbelastete Probe (Erdnuss)

Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit konnte dies bestätigt werden, da verschiedene Lots der Säulen zum Einsatz kamen und vergleichbare Ergebnisse lieferten. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die hier präsentierte Methode auch in Zukunft mit anderen Chargen der Säulen funktionieren wird.

Erfreulicherweise erwiesen sich die Antikörper zudem als nicht sehr empfindlich gegenüber Matrixbestandteilen, ein Problem, das Farjam et al. mit Milchproben hatten und das sie durch Einsatz einer online-Dialyseeinheit umgingen. Weiterhin benötigt die hier vorgestellte Methode keinen Verdünnungsschritt mit Wasser (Einsatz einer zusätzlichen Pumpe!) und keine weitere Kartusche. Dies wurde erst durch die Verwendung des Bypass-Ventils des SP 3000 möglich, da dadurch die Elutionskraft gezielt an die Eigenschaften der Antikörper angepasst werden konnten.

Manuelle Mehrfachnutzung

Nachdem bereits relativ früh im Verlauf der Arbeit erkennbar wurde, dass eine Mehrfachnutzung von handelsüblichem Immunoaffinitätsmaterial mit Hilfe einer Probenvorbereitungseinheit möglich ist, stellte sich die Frage, ob dieses Experiment auch manuell funktionieren würde. Hierzu wurden die gleichen Immunoaffinitätssäulen von r-biopharm eingesetzt. Die Elution erfolgte mit dem zu diesem Zeitpunkt getesteten Methanol/Wasser-Gemisch (75:25, v/v). Die übrige Anwendung folgte der Vorschrift von R-BIOPHARM (2003). Während online unter diesen Bedingungen ein Aktivitätsverlust der Antikörper erst nach der 5. Nutzung feststellbar war, waren beim manuellen Einsatz bereits bei der zweiten Nutzung deutlich kleinere Peaks im anschließend aufgenommenen Chromatogramm sichtbar. Somit ist die Mehrfachnutzung von IA-Material manuell nur sehr eingeschränkt möglich, zumindest unter den getesteten Bedingungen.

Wesentlicher Unterschied zwischen der online- und offline-Anwendung stellt der Trocknungsschritt dar: Bei der manuellen Aufarbeitung erfolgt die Elution durch Durchsaugen des Elutionsmittels (hier: Methanol/Wasser-Gemisch) und anschließendem Trockensaugen. Bei der online-Variante wird das IA-Material ständig unter Lösungsmittel (zumeist Wasser) gehalten. Vermutlich fördert das Trockenlaufen die Denaturierung der Antikörper, was zu einem raschen Aktivitätsverlust führen könnte. Diese Vermutung wird von der Anleitung zu den RIDA Aflatoxin-Säulen von R-BIOPHARM (2003) bestätigt, in der die Anweisung gegeben wird, die Säulen während der Aufarbeitung nicht trocken laufen zu lassen. Allerdings kann auf das Trockensaugen bei der Elution nicht ohne weiteres verzichtet werden, weil auf diesem Weg eine vollständige Elution und ein definiertes Endvolumen der Probelösung erreicht werden, was Voraussetzungen für die spätere Quantifizierung mittels LC sind.

Somit sind die Ergebnisse der Mehrfachnutzung per online-SPE nicht direkt auf eine manuelle Mehrfachnutzung übertragbar – und umgekehrt.

4.1.5 Chromatographische Trennung

Eluenten

Durch die Verwendung von 200 μL Acetonitril/Wasser 67:33 (v/v) als per Transferschleife vorweggeschicktes Elutionsmittel wird auch die nachfolgende LC-Trennung beeinflusst. Der organische Anteil ist mit 67 % höher als im LC-Eluenten mit 40 % (Wasser/ACN/MeOH 60:20:20, v/v), wodurch Peakverbreiterungen verursacht werden. Um diesem chromatographischen Problem zu begegnen, wurde eine Gradientenelution entwickelt, die eine leichte Modifikation des routinemäßig verwendeten isokratischen Systems darstellt.

Die Trennung von wässrigem und organischem Anteil erlaubt dabei das „Hochfahren“ des organischen Anteils nach Transfer der Analyten auf die Trennsäule, so dass der Peakverbreiterung entgegen gewirkt wird und wieder schärfere Peaks resultieren. Statt des isokratischen Eluenten (Wasser/ACN/MeOH 60:20:20, v/v, mit 119 mg Kaliumbromid und 100 μL Salpetersäure (65 %ig) je Liter) werden dabei die folgenden Eluenten eingesetzt:

- Eluent A: Reinstwasser mit 119 mg Kaliumbromid und 100 μL Salpetersäure (65 %ig) je Liter
 Eluent B: Methanol/Acetonitril 50:50 (v/v) mit 119 mg Kaliumbromid und 100 μL Salpetersäure (65 %ig) je Liter

Der Zusatz von Kaliumbromid ermöglicht die elektrochemische Bromerzeugung in der CoBrA-Zelle, die zur Nachsäulenderivatisierung (1.3.7.8) benötigt wird, die Salpetersäure dient der Erhöhung der Leitfähigkeit (CORING, 2004). Durch Zusatz dieser beiden Chemikalien zu beiden Eluenten wird dafür gesorgt, dass die Kaliumbromid- und Salpetersäure-Konzentration in der CoBrA-Zelle immer gleich bleibt, unabhängig vom jeweiligen Mischungsverhältnis der Eluenten A und B. Eine leichte Herabsetzung des Flusses im Vergleich zur offline-Methode von 0,8 auf 0,7 mL/min verhindert wirkungsvoll ein „Durchrutschen“ der Aflatoxine, d.h. dass bei verringerter Fließgeschwindigkeit die Analyten mit der Trennsäule in Wechselwirkung treten und nicht mit dem Transfergemisch ACN/Wasser 67:33 ohne chromatographische Trennung durch die Säule fließen.

Folgender Gradient hat sich als geeignet erwiesen (s. 3.1.3):

Tab. 4-5. LC-Gradient

Zeit [min]	A [%]	B [%]	Fluss [mL/min]
0	60	40	0,7
10,5	60	40	0,7
25	20	80	0,7
30	20	80	0,7
35	60	40	0,7
40	60	40	0,7

Wie aus Tab. 4-2 ersichtlich, schaltet das Ventil V1 nach 8,6 min, womit der Transfer der Analyten von der Kartusche auf die LC-Trennsäule beginnt. Ab diesem Zeitpunkt herrschen noch ca. 2 min lang isokratische Bedingungen (Eluent A/Eluent B 60:40, v/v). Das Hochfahren des organischen Anteils beginnt bei 10,5 min und sorgt für die beschriebene schärfere Elution.

Trennsäule

Für die Flüssigchromatographie steht eine fast unüberschaubare Auswahl an Trennsäulen zur Verfügung, die sich in erster Linie in der Art ihrer Füllmaterialien unterscheiden. Weitere Kriterien sind beispielsweise die Säulendimensionen, die Körnchengröße und -form.

Bei den Füllmaterialien differenziert man grundsätzlich zwischen so genannten hydrophilen Normalphasen (NP = Normal Phase), die mit nicht-wässrigen Lösungsmitteln betrieben wer-

den, und hydrophoben Umkehrphasen (RP = Reversed Phase), die mit wässrigen Systemen betrieben werden können.

Erste LC-Trennungen von Aflatoxinen wurden als Transfer von der DC-Analytik an Kieselgelphasen durchgeführt, sprich an Normalphasen. Heutzutage hat jedoch die RP-Technik die traditionelle Normalphasen-Chromatographie weitgehend verdrängt (JAIMEZ et al., 2000; HOLCOMB et al., 1992). Sowohl die sog. offiziellen Methoden der LFGB-(BVL, Stand: Dez. 2004) und AOAC(1995)-Sammlungen als auch ein Großteil der sonstigen veröffentlichten LC-Methoden (vergl. JAIMEZ et al., 2000) verwenden RP-Phasen zur Aflatoxin-Analyse.

Die chemische Struktur der zu trennenden Aflatoxine unterscheidet sich dabei in folgenden Punkten (s. auch Abb. 1-1: Strukturformeln unter 1.3.2): Während die B-Aflatoxine über einen Fünfring mit Carbonylfunktion verfügen (in genannter Abbildung rechts), besitzen die G-Aflatoxine an gleicher Stelle einen Sechsring mit Lactonfunktion (Sauerstoffatom im Ring). Vermutlich eluieren die unpolaren B-Aflatoxine in einem RP-System später, da sie besser mit der unpolaren Phase in Wechselwirkung treten können. Die Aflatoxine G₁ und B₁ verfügen darüber hinaus über eine zusätzliche Doppelbindung (im Bild links). Der sich hieraus ergebende andere sterische Aufbau könnte für die stärkere Retention dieser Substanzen verantwortlich sein. Somit ergibt sich die folgende Elutionsreihenfolge im RP-System:

Aflatoxin G₂ → Aflatoxin G₁ → Aflatoxin B₂ → Aflatoxin B₁

In der offline-Routineanalytik von Aflatoxinen wird bei APPLICA eine **Multospher 100 RP 18 5 µm**-Trennsäule (Chromatographie-Service, Langerwehe) mit den Dimensionen 250 x 4,6 ID mm eingesetzt. Es handelt sich dabei um ein RP 18-Material mit einer Korngröße von 5 µm ohne end-capping, d.h. freie Silanolgruppen liegen noch aktiviert vor. Mit dieser Säule wird unter den beschriebenen Bedingungen (3.1.9) eine Basislinientrennung der vier Analyten erreicht, s. Abb. 4-1.

Für die neu entwickelte online-Methode (3.1) wurde dieselbe Trennsäule eingesetzt. Dabei eluieren die vier Aflatoxine dichter hintereinander, s. Abb. 4-7.

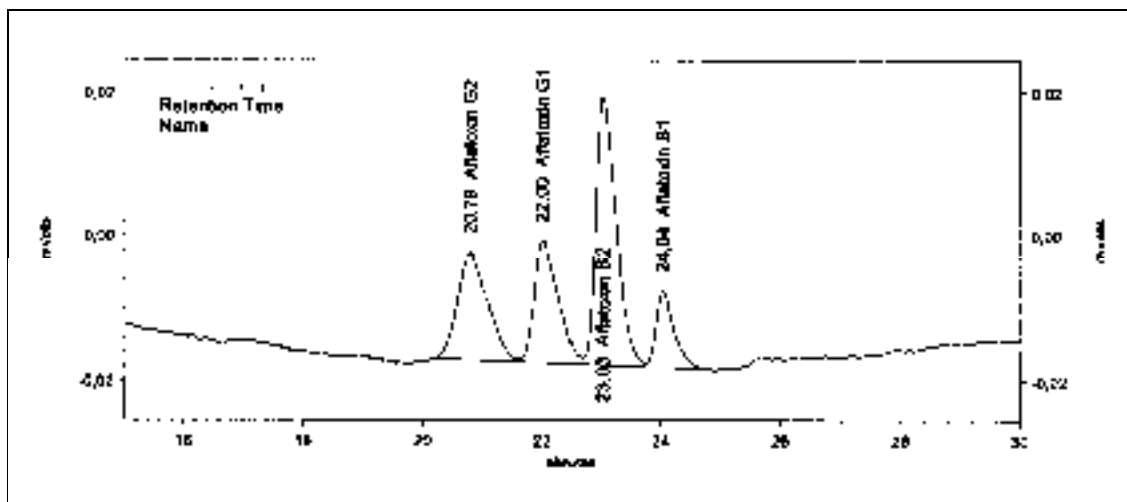


Abb. 4-7. Chromatogramm Aflatoxin-Standard bei online-Analyse
(c (Aflatoxine B₁, G₁) = 0,4 µg/L, c (Aflatoxine B₂, G₂) = 0,12 µg/L)

Die Ursache hierfür ist bei der online-SPE zu suchen: Wie oben dargestellt ist zur quantitativen Elution die Verwendung von 200 µL eines Acetonitril/Wasser-Gemisches 67:33 (v/v) erforderlich. Um ein „Durchrauschen“ der Aflatoxine zu verhindern, war eine Erniedrigung des Flusses von 0,8 auf 0,7 mL/min erforderlich. Zur Peakschärfung wurde ein Gradientensystem mit ansteigendem organischen Anteil entwickelt, was das erkennbare „Zusammenrücken“ der vier Analyten zur Folge hat. Jedoch erreicht die Methode akzeptable Auflösungen (s. 4.9; 5.1.2.1, 5.1.2.2) von minimal R_S = 1,12, bei einer geforderten Mindest-Auflösung von

$R_S = 0,8$ laut laborinterner Validierungsvorschrift. Darüber hinaus führt die Verwendung von IA-Material in der Probenvorbereitung zu sauberen Chromatogrammen, so dass die Spezifität der Methode unter der geringeren Trennung nicht leidet, vergl. z.B. Chromatogramm „Cornflakes, dotiert“ (Abb. 4-8), das nur beim in der Praxis relativ unbedeutenden AFG₂ einen nennenswerten Matrixpeak im interessierenden Bereich erkennen lässt.

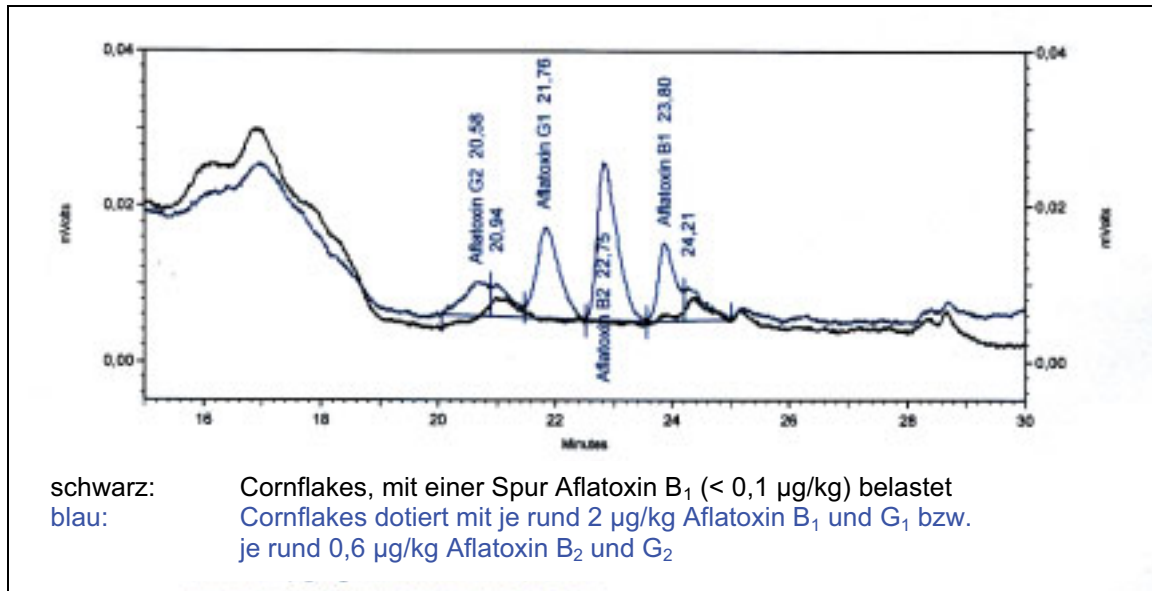


Abb. 4-8. Chromatogramm dotierte Probe „Cornflakes“ (dotiert mit 2 µg/kg (Aflatoxin B₁, G₁) sowie 0,6 µg/kg (Aflatoxin B₂, G₂); belastet mit einer Spur Aflatoxin B₁)

Unter Beachtung der gewichtigen Vorteile der hier präsentierten Methode (s. 4.1.12) wird der oben erläuterte Nachteil der schlechteren Trennung als von geringem Interesse beurteilt.

Standardkonzentration

Wie oben beschrieben wird bei der online-Analytik mit 1000 µL gegenüber 200 µL bei der offline-Technik ein fünffach höheres Injektionsvolumen eingesetzt. Dies erlaubt eine Reduzierung der Aflatoxin-Konzentration im Standard um den Faktor Fünf, bei gleichbleibenden Absolutmengen an Analyten, die auf die Säule gelangen. Die Standardlösung „Aflatoxin-RefM₁“ hat somit nur noch eine Konzentration von 0,4 µg/L (AFB₁, G₁) bzw. 0,12 µg/L (AFB₂, G₂), was aus toxikologischer Sicht eine Verbesserung für die Arbeitssicherheit darstellt. Es sei angemerkt, dass die Quantifizierung nicht über die beschriebene Standardlösung erfolgt, sondern hierfür die Methode der Matrixkalibrierung gewählt wurde, s.u.

4.1.6 Detektion

Die Detektion erfolgt mittels Fluoreszenz nach Nachsäulenderivatisierung, das in der Routine der LC-Analytik von Aflatoxinen am häufigsten angewandte Verfahren. Die Verwendung einer CoBrA-Zelle zur Nachsäulenderivatisierung verfügt dabei über eine Reihe von Vorteilen (vergl. 1.3.7.8; STROKA et al., 2000) gegenüber anderen Derivatisierungstechniken. Das bekannte Prinzip (im Eluenten enthaltenes Bromid wird elektrochemisch zu Brom oxidiert, welches die Aflatoxine mit Doppelbindung derivatisiert) gilt dabei selbstverständlich auch bei der hier präsentierten online-Methode.

Wie unter 4.1.5 beschrieben wird trotz Gradientenelution für eine gleichbleibende Konzentration des Bromids im Eluenten gesorgt, um gleichmäßige Derivatisierungsbedingungen zu ermöglichen.

Die Detektion erfolgt schließlich über Fluoreszenz, was in Verbindung mit den übrigen Methodenparametern (Aufreinigung über Immunoaffinitätsmaterial, chromatographische Trennung etc.) für eine höchstmögliche Selektivität sorgt. Die Wahl der Extinktions- und Emissionswellenlänge von 362 bzw. 440 nm folgt dabei den Empfehlungen des Anbieters der CoBrA-Zelle (CORING, 2004). Die offiziellen ASU § 64-LFGB-Methoden L 23.05-2 sowie L 48.00-1 (BVL, Stand: Dez. 2004) empfehlen Wellenlängen-Kombinationen im gleichen Bereich: 365/435 nm bzw. 362/448 nm.

4.1.7 Auswertung

Identität

Die Identität wird durch Vergleich der Retentionszeiten der Peaks im Probenchromatogramm mit denen der Peaks des externen Standards-Chromatogramms bestimmt.

Quantifizierung

Als eine Voraussetzung zur korrekten Quantifizierung wird die Verwendung von zertifizierten Kalibrierstandards angesehen (BRODACZ, 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde auf eine entsprechende Standardlösung von Supelco zurückgegriffen. Die Quantifizierung erfolgt mittels der Methode der Matrixkalibrierung, d.h. je zu untersuchender Matrix wird eine vorhandene Leerwertprobe (ohne messbaren Aflatoxingehalt) mit den vier Analyten dotiert und analog zu den Proben aufgearbeitet. Mit dieser Probe wird kalibriert. Zur Probeneinwaage von 4 g werden 40 µL der Afla-Dot₁-Standardlösung gegeben. Dieser Dotierstandard enthält je rund 200 µg/L Aflatoxin B₁ und G₁ sowie je rund 60 µg/L Aflatoxin B₂ und G₂. Somit weist der Matrixkalibrierstandard die folgenden Konzentrationen auf:

Tab. 4-6. Konzentration Matrixkalibrier-Standard

Analyt	c [µg/kg] (ca.)
Aflatoxin B ₁	2,0
Aflatoxin B ₂	0,6
Aflatoxin G ₁	2,0
Aflatoxin G ₂	0,6

Die Berechnung der Konzentration der jeweiligen Aflatoxine in der Probe erfolgt damit nach folgendem Muster:

$$c(\text{Analyt}) = \frac{c(\text{Matrixkal.} - \text{Std.})[\mu\text{g} / \text{kg}] \times \text{Fläche}(\text{Probe})[\text{FE}] \times F}{\text{Fläche}(\text{Matrixkal.} - \text{Std.})[\text{FE}]} [\mu\text{g} / \text{kg}] \quad \text{Gleichung 4-1}$$

mit	c (Matrixkal.-Std.)	Konzentration des Matrixkalibrierstandards in [µg/kg]
	Fläche (Probe)	Fläche des Analyt-Peaks in der Probelösung in [FE] (Flächeneinheiten)
	Fläche (Matrixkal.-Std.)	Fläche des Analyt-Peaks in der Matrixkalibrier-Standardlösung in [FE]
	F	Verdünnungsfaktor (bei Abweichungen von der Vorschrift)

Da es sich bei dem verwendeten Referenzmaterial um einen gelösten Mischstandard handelt, sind die o.g. Konzentrationen als Sollwerte zu verstehen. Die angegebenen circa-Konzentrationen müssen bei der Quantifizierung mit den realen Konzentrationen gemäß Herstellerzertifikat korrigiert werden.

Wie im Rahmen der Validierung (5.1.2.8) nachgewiesen wurde, ist dabei eine Einpunkt-Kalibrierung ausreichend; die Erstellung einer Kalibriergerade aus mehreren Standardkonzentrationen bei jeder Messreihe ist nicht erforderlich.

Wie Versuche zeigten, liefert die in der Routine häufig angewandte Kalibrierung mit externen Standards keine zufrieden stellenden Ergebnisse, so liegen die Wiederfindungen mit 39,2 bis 64,0 % nicht im angestrebten Bereich (70 bis 110 %). Auch schwankten die Wiederfindungen in Abhängigkeit von der Matrix. Als Konsequenz wurde auf die Methode der Matrixkalibrierung zurückgegriffen. Hierdurch werden die unterschiedlichen Eigenschaften der verschiedenen Matrices besser berücksichtigt, was z.B. zwischen der fettreichen Matrix „Erdnuss“ und der fettarmen Matrix „Weizenmehl“ deutlich wird.

Bestätigung

Zur Absicherung der Identität bieten sich die folgenden Verfahren an:

- **Dotierung:** Parallel zur eigentlichen Probe wird eine Probe nach Dotierung mit den interessierenden Analyten aufgearbeitet. Eine Peak-Erhöhung der interessierenden Analyten bei praktisch gleichbleibender Retentionszeit zeigt einen Positivbefund an.
- **Ausschalten der Nachsäulenderivatisierung:** Zur Absicherung der Identität der beiden von der Nachsäulenderivatisierung beeinflussten Aflatoxine B₁ und G₁ (1.3.7.8) bietet sich das Entfernen der CoBrA-Zelle an, vergl. ASU § 64 LFGB L 23.05-2, Nr. 6.10 (BVL, Stand Dez. 2004). Die Peaks der genannten Substanzen müssen danach um den Faktor 10 und mehr kleiner werden. Bei der Durchführung dieser Bestätigung ist wichtig, dass die LC-Trennsäule direkt mit dem Fluoreszenzdetektor verbunden wird. Wird hingegen nur der Strom der CoBrA-Zelle abgestellt, kann in der Zellmembran noch vorhandenes freies Brom weiterhin für eine Derivatisierung der Aflatoxine sorgen. Diese Bestätigungsmethode bietet sich vor allem aus zwei Gründen an: zum einen ist der technische Aufwand gering, zum anderen ist das Aflatoxin B₁ wie beschrieben das am häufigsten auftretende Aflatoxin, das auf diesem Weg bestätigt werden kann.
- **Verwendung der offline-Methode:** Die Analyse mittels der traditionellen offline-IAC-LC-Methode (3.1.9) in Anlehnung an o.g. § 64-Methode ermöglicht ebenfalls eine Absicherung der Befunde. Zwar kommt dasselbe IA-Material zum Einsatz, jedoch erlauben Unterschiede in der Aufarbeitung und LC-Trennung (z.B. keine Gradientenelution, dadurch andere Retentionszeiten) die Bestätigung von Positivbefunden.
- **LC-MS:** Sofern eine LC-MS-Methode (vergl. 1.3.7.4) zur Verfügung steht, bietet sich die Absicherung der Identität mit dieser selektiven Technik an.

Qualitätssicherungs-Maßnahmen

In jeder Analysenserie werden eine Qualitätsregelkarten-Probe mit bekanntem Gehalt an Aflatoxinen und zusätzlich ein Blindwert (Wasser/Methanol 92,5:7,5, v/v) zur Prüfung auf Verschleppungen analysiert.

4.1.8 Anwendung der Methode

Ein ausdrückliches Ziel der Methodenentwicklung war die Anwendung in der Routineanalytik. Dafür war es erforderlich, dass die Methode einfach und leicht in den Laboralltag zu implementieren ist. Daher wurde die Methode den Laborgegebenheiten bei APPLICA angepasst, beispielsweise in dem mit 35 mL-Polypropylenröhrchen zur Extraktion gearbeitet wird, für die passende Einsätze für die Zentrifuge vorhanden sind.

Zur Einkonzentrierung werden 16 mL-Zentrifugenröhrchen verwendet, die in großer Anzahl parallel im TurboVap bearbeitet werden können. Zur Vermeidung von Querkontaminationen und zum Schutz der Gesundheit des Laborpersonals kommen bevorzugt Einwegartikel aus Kunststoff zum Einsatz.

Wie der Einsatz der Methode im Routinebetrieb zeigte, ist die Methode auch bei anderen Matrices als bei der Validierungsmatrix (Erdnüsse, s. 4.1.9) anwendbar. Die Methode wurde erfolgreich u.a. an folgenden Probenarten erprobt:

Cornflakes, Weizenmehl, Kakao, Nüsse, Früchte (Erdbeeren, Aprikosen etc.)

Abb. 4-8 zeigt das Chromatogramm für die Matrix Cornflakes (Vergleich dotiert und undotiert), die Probe ist mit Spuren von Aflatoxin B₁ unterhalb der Bestimmungsgrenze belastet (ca. 0,07 µg/kg). Abb. 4-9 zeigt das Chromatogramm für die Matrix Weizenmehl.

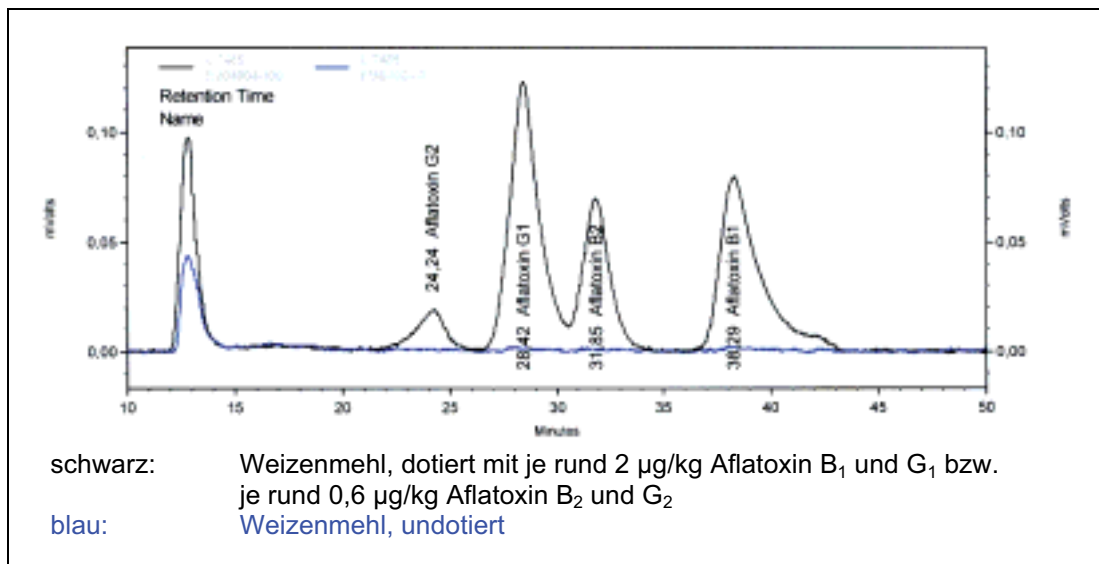


Abb. 4-9. Chromatogramm dotierte Probe „Weizenmehl“ (dotiert mit rund 2 µg/kg (Aflatoxin B₁, G₁) sowie rund 0,6 µg/kg (Aflatoxin B₂, G₂))

4.1.9 Validierung und Akkreditierung

Der Begriff „**Validierung**“ wird von der internationalen Norm DIN EN ISO/IEC 17025 definiert als die Bestätigung durch Untersuchung und Bereitstellung eines Nachweises, dass die besonderen Anforderungen für einen speziellen beabsichtigten Gebrauch erfüllt werden. Die Forderung, dass eine Methode für den vorgesehenen Gebrauch geeignet ist, bedeutet, dass dieser klar beschrieben ist (z.B. in Form einer schriftlichen Prüfmethode) und die sich aus der beabsichtigten Anwendung ergebenden besonderen Forderungen (z.B. zu erreichende Bestimmungsgrenze, s.u.) spezifiziert sind.

Die Validierung der im Rahmen dieser Arbeit präsentierten Prüfmethode erfolgte dabei nach der laborinternen Validierungsvorschrift vom 03.07.2006, in Anlehnung an Vorgaben der EU-ENTSCHEIDUNG 2002/657/EG. Die Berechnung erfolgte mit der Validierungssoftware Valoo 1.0 (analytik-software, Dr. Stella Windmann).

Für Mykotoxine hat die EU gesonderte Anforderungen an Probenahme und Analysemethoden erlassen, zusammengefasst in der neuen VERORDNUNG (EG) 401/2006. Auf diese besonderen Vorgaben, die im Zweifel Vorrang vor der horizontalen o.g. Entscheidung 2002/657/EG haben, wird bei der Beurteilung der Validierung eingegangen.

Die Wahl der Matrix, mit der die Validierung durchgeführt wird, stellt dabei eine schwierige Entscheidung dar. Streng genommen wäre für jede Matrix (im Bereich Aflatoxine beispielsweise Paprikapulver, Mais, diverse Maisprodukte, diverse Nüsse und Samen wie Pistazien, Erdnüsse, Paranüsse etc.) eine eigene Validierung erforderlich, was aus Zeit- und Kostengründen nicht möglich ist. Daher wählt man eine Matrix, die einerseits häufig mit dem Analyten belastet ist, zum anderen von der Schwierigkeit der Analytik her nicht zu leicht ist, so

dass die Ergebnisse auf möglichst viele andere Matrices übertragen werden können. Eine Absicherung wird entsprechend an den in Frage kommenden anderen Matrices durchgeführt.

Als Matrix für den Parameter Aflatoxine wurden handelsübliche Erdnüsse (geröstet und gesalzen) gewählt, ein klassisches Risikolebensmittel für eine Aflatoxin-Kontamination. Aufgrund ihres hohen Fettanteils sind Erdnüsse keine leicht zu analysierende Matrix, da Aflatoxine insbesondere in Erdnussmus gegebenenfalls in Fett-Tröpfchen eingekapselt vorliegen können (vergl. ASU § 64 LFGB L 23.05-2, BVL, Stand Dez. 2004). Da Erdnüsse dazu einen relativ hohen Proteinanteil haben (LIEBSTER, 2002, S. 107), sollten sich die Ergebnisse dieser Validierung auch auf andere „leichtere“ Matrices sowie auf Lebensmittel mit ähnlicher Zusammensetzung (andere Nüsse und Samen) übertragen lassen.

Das komplette Validierungsprotokoll ist unter 5.1 wiedergegeben. An dieser Stelle soll auf die wichtigsten Ergebnisse eingegangen werden:

4.1.9.1 Linearität und Arbeitsbereich

Mit Linearität wird der Konzentrations- oder Messbereich bezeichnet, bei dem ein linearer, d.h. proportionaler und mathematisch definierbarer Zusammenhang zwischen der Menge an zu bestimmender Komponente und dem Messwert besteht (KROMIDAS, 1995). Rechnerisch und graphisch (beispielhafte Abb. 4-10) wird eine Ausgleichsgerade („lineare Regression“) ermittelt:

$$y = bx + a \quad \text{Gleichung 4-2}$$

mit:

- y: Mess-Signal des Analyten
- x: Konzentration des Analyten
- b: Steigung (s.u.)
- a: Achsenabschnitt (s.u.)

Folgende Kenngrößen sind bei Betrachtung der Linearität interessant (s. auch KROMIDAS, 1995):

- Die **Steigung b** ist einerseits ein Maß für die Empfindlichkeit einer Analysemethode. Je größer die Steigung, desto größer ist auch die Änderung des Mess-Signals pro Änderung der Konzentration, entsprechend feinere Konzentrationsunterschiede können gemessen werden. Wird die Steigung (durch Auftragung der gemessenen Ist-Konzentration gegen die Soll-Konzentration oder durch Umrechnung mittels einer Standard-Regressionsgeraden, 5.2.2.5) **relativ** angegeben, so lässt sich direkt die Wiederfindung (4.1.9.4) ablesen. Beispiel: die relative Steigung beträgt 0,830, so entspricht dies einer Wiederfindung von 83,0 %. Im Idealfall beträgt die (relative) Steigung 1,000, entsprechend 100 %.
- Der **Achsenabschnitt a** gibt an, welches Mess-Signal erhalten wird, wenn die Konzentration des Analyten Null ist. Der Achsenabschnitt ist idealerweise ebenfalls gleich Null (die Gerade geht durch den Nullpunkt), ansonsten ist der Wert (wie in der Praxis fast immer) entweder positiv oder negativ. Dieser Blindwert stellt einen systematischen Fehler dar und sollte möglichst klein sein, d.h. möglichst kleiner als die Nachweisgrenze der Methode.
- Der **Korrelationskoeffizient r** gibt die Güte der Linearität zwischen Konzentration und Mess-Signal an. Eine ideale Korrelation wird durch den Koeffizienten $r = 1,0000$ charakterisiert.
- Mit der **Reststandardabweichung** wird die Streuung der Messwerte um die Regressionsgerade bezeichnet.
- Hiermit hängt die **Verfahrensstandardabweichung** zusammen, die man erhält, wenn man die Reststandardabweichung auf die Mitte des Arbeitsbereichs normiert.

- Wird die Verfahrensstandardabweichung relativ in Prozent angegeben, so erlaubt der erhaltene **Verfahrensvariationskoeffizient**, auch als relative Verfahrensstandardabweichung bezeichnet, einen Vergleich verschiedener Messverfahren (s. auch 4.1.11 und 4.2.11).

Für die neu entwickelte Methode wurden folgende Kenngrößen ermittelt:

Tab. 4-7. Aflatoxine – Ergebnisse 1. Messreihe dotierte Leerwertproben

Ergebnisse dotierte Leerwertproben				
	Mess-Signal Aflatoxin B₁	Mess-Signal Aflatoxin B₂	Mess-Signal Aflatoxin G₁	Mess-Signal Aflatoxin G₂
% bezogen auf den Grenzwert (100 % = x µg/kg Probe)	100 % = 1,87 µg/kg	100 % = 0,58 µg/kg	100 % = 1,74 µg/kg	100 % = 0,59 µg/kg
	Signal [FE]	Signal [FE]	Signal [FE]	Signal [FE]
Lineare Kalibrierung¹	y = bx + a	y = bx + a	y = bx + a	y = bx + a
Steigung b (relativ)	322467 (n.a.)	1077155 (n.a.)	499219 (n.a.)	511381 (n.a.)
Achsenabschnitt a [FE] (µg/kg)	-9391,67 (-0,03)	-5368,47 (-0,01)	37175,33 (0,08)	43049,67 (0,08)
Relative Verfahrens- standardabweichung [%]	6,05 %	0,86 %	6,69 %	2,49 %
Korrelationskoeffizient	0,9964	0,9999	0,9959	0,9994

¹ Die Regressionsgerade wurde unter Verwendung der Stufen 50, 100 und 150 % erstellt, damit die ermittelten Werte mit denen der 2. Messreihe vergleichbar sind und für den F- und t-Test ein einheitlicher Datenpool zur Verfügung steht.; n.a. – nicht auswertbar (s. 5.1.2.8)

Achsenabschnitt a:

Aflatoxin B₁: Die dem Achsenabschnitt entsprechende Konzentration (-0,03 µg/kg) der in der Praxis verwendeten Kalibrierungsart (dotierte Leerwertproben) liegt im Bereich der Nachweisgrenze (0,02 µg/kg) und deutlich unterhalb der Bestimmungsgrenze (0,20 µg/kg) des Analyten und kann somit vernachlässigt werden.

Für Aflatoxin B₂ ergibt sich mit -0,005 µg/kg ein Wert kleiner als die Nachweisgrenze (0,01 µg/kg); für die Aflatoxine G₁ und G₂ liegt der Wert (je rund 0,08 µg/kg) zwar höher als die Nachweisgrenze, jedoch deutlich unterhalb der Bestimmungsgrenzen (0,17 bzw. 0,16 µg/kg) und der im Prüfbericht bei APPLICA angegebenen Reportgrenze von 0,3 µg/kg.

Steigung b/Wiederfindung:

Aufgrund der verwendeten Kalibrieremethode (Matrixkalibrierung) wird der 100 %-Standard definitionsgemäß gleich 2 µg/kg bzw. 0,6 µg/kg gesetzt. Somit ist die Wiederfindung automatisch 100 % +/- Messungenauigkeit. Unter Berücksichtigung der in Tab. 4-7 wiedergegebenen relativen Verfahrensstandardabweichung ergibt sich eine Wiederfindung von mindestens 93,3 %. Dieser Wert liegt gut im nach VERORDNUNG 401/2006 (Tab. 4-15) geforderten Bereich von 70 bis 110 %.

Korrelationskoeffizient:

Für alle vier Aflatoxine erhält man gute Korrelationskoeffizienten > 0,995.

Relative Verfahrensstandardabweichung:

Die relativen Verfahrensstandardabweichungen sind hier auf eine Messreihe bezogen, somit handelt es sich um RSD_r. Nach Horwitz wäre ein Wert von RSD_R (hier: 45,3 %) * 0,66 = 29,9 % (VERORDNUNG 401/2006) zu erwarten. Alle vier Werte liegen erheblich unterhalb dieses Wertes; der höchste Wert beträgt 6,7 % (Aflatoxin G₁).

Graphische Darstellung

Abb. 4-10 zeigt beispielhaft die Regressionsgerade der 1. Messreihe für Aflatoxin B₁ (dotierte Leerwertproben), s. auch Erläuterung in Tab. 4-7, Fußnote 1. Die mit Valoo 1.0 berechnete dazugehörige Geradengleichung (s. auch oben) lautet:

$$y = 322467x - 9391,67 \quad \text{Gleichung 4-3}$$

mit x c (Aflatoxin B₁) [µg/kg]
y Signal in Flächeneinheiten [FE]

Steigung b = 322467

Achsenabschnitt a = - 9391,67

Korrelationskoeffizient r = 0,9964

Relative Verfahrensstandardabweichung: 6,05 %

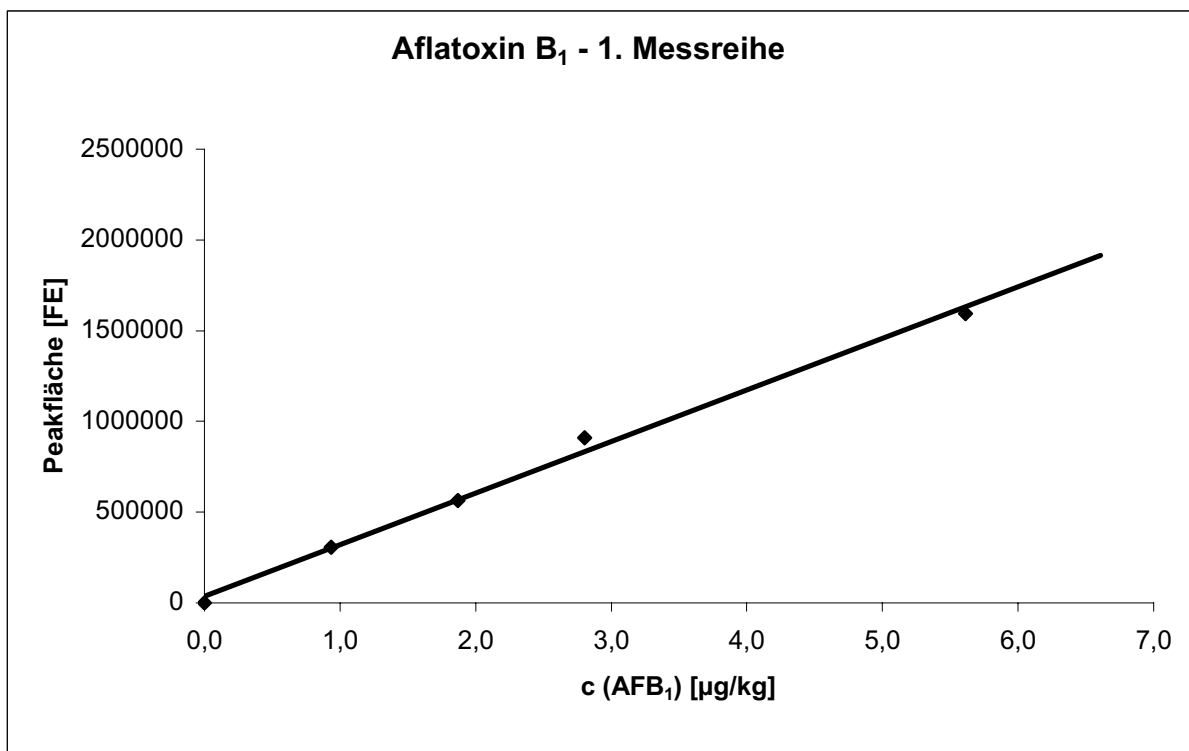


Abb. 4-10. Aflatoxin B₁ – Regressionsgerade dotierte Leerwertproben

Arbeitsbereich

Aus der Validierung ergeben sich die folgenden linearen Arbeitsbereiche:

Tab. 4-8. Bestimmung von Aflatoxinen per online-SPE-LC: Arbeitsbereiche

Analyt	Arbeitsbereich von...bis...	
	Bestimmungsgrenze [µg/kg]	Höchste Konzentration der Kalibrierkurve [µg/kg]
Aflatoxin B ₁	0,20	6,0
Aflatoxin B ₂	0,06	1,8
Aflatoxin G ₁	0,17	6,0
Aflatoxin G ₂	0,16	1,8

Die in Tab. 4-8 wiedergegebene obere Grenze der Kalibrierkurve gibt die höchste Konzentration der Kalibrierkurve wieder. In diesem Bereich ist die Funktion linear. Vermutlich geht der tatsächliche lineare Bereich deutlich über diesen obersten Messpunkt hinaus.

4.1.9.2 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Als **Nachweisgrenze** definiert die DIN 32645 (DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG, 1994) die kleinste nachweisbare Menge eines Analyten. Die Irrtumswahrscheinlichkeit, ob der Analyt vorhanden ist oder nicht, beträgt 50 %. Wie KROMIDAS (1995, S. 186) ausführt, ist die Nachweisgrenze die geringste Konzentration, die qualitativ von der Arbeitsmenge mit einer gegebenen Wahrscheinlichkeit unterschieden werden kann.

Die **Bestimmungsgrenze** hingegen ist die kleinste Konzentration, bei der noch eine quantitative Aussage (mit einer gegebenen Wahrscheinlichkeit) möglich ist.

Es gibt mehrere Möglichkeiten, die Nachweis- und Bestimmungsgrenze einer Methode zu ermitteln: Die Berechnung nach DIN 32645 ergibt für die neu entwickelte Aflatoxin-Methode (3.1) zu hohe Werte, verursacht durch die geringe Anzahl an Datenpunkten. Deshalb wird eine Berechnung über das Signal/Rausch-Verhältnis (engl. Signal-to-noise (S/N) ratio) durchgeführt, vergl. KROMIDAS (1995), S. 186. Hierzu wird das Chromatogramm eines Matrixkalibrierungs-Standards ausgewertet, der entsprechend Prüfmethode (3.1) Grenzwertdotiert ist, s. Abb. 4-11. Die Auswertung wird folglich an einer dotierten und der Prüfmethode folgend aufgearbeiteten Probe (Erdnüsse) vorgenommen. Dies garantiert, dass sich die ermittelten Grenzen auf eine reale Probe und nicht auf Standardlösungen beziehen. Hierdurch werden Matrixeinflüsse und mögliche Verluste bei der Aufarbeitung berücksichtigt.

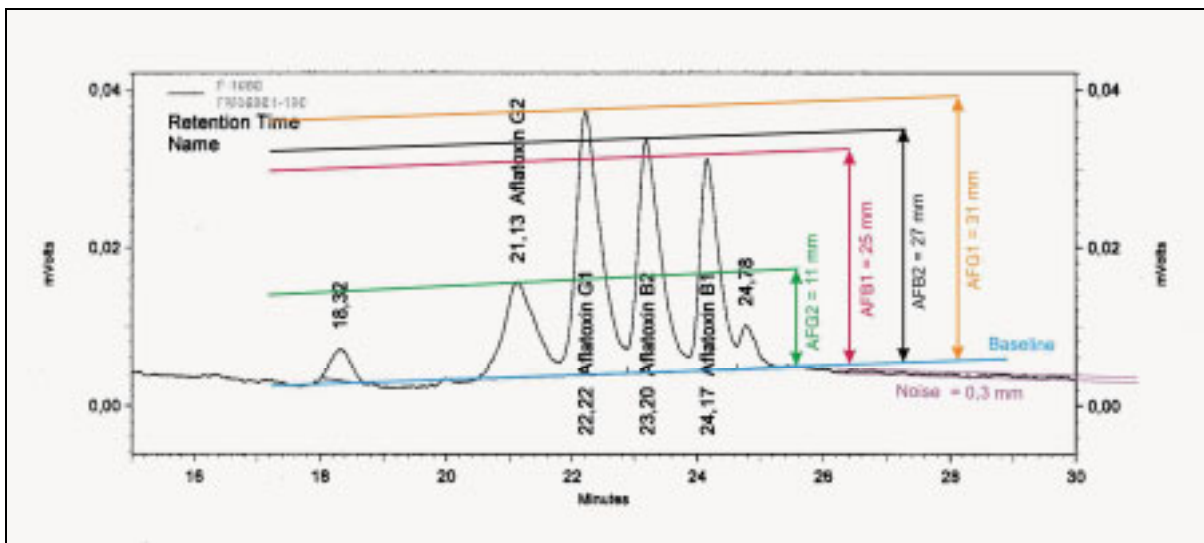


Abb. 4-11. Aflatoxine mittels online-SPE-LC: graphische Ermittlung der Signalhöhe (S = Signal) und des Rauschens (N = Noise) für die Berechnung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Bei der manuellen Auswertung ergaben sich die folgenden Ergebnisse (Tab. 4-9):

Tab. 4-9. Graphische Auswertung des in Abb. 4-8 dargestellten Chromatogramms

Peak	Konzentration [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	Signalhöhe [mm]
Aflatoxin B ₁	1,87	25
Aflatoxin B ₂	0,58	27
Aflatoxin G ₁	1,74	31
Aflatoxin G ₂	0,59	11
Noise	-	0,3 ¹

¹Basislinienrauschen

Nach KROMIDAS (1995, S. 186) ist für die Berechnung der Nachweisgrenze ein Signal-Rausch-Verhältnis von 2:1 bis 3:1 heranzuziehen, vergl. auch KNOLL (1985); die Bestimmungsgrenze liegt beim zwei- bis dreifachen der Nachweisgrenze. Unter strenger Auslegung der Vorgaben wurde für die Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze ein Signal/Rausch-Verhältnis von 3:1 bzw. 10:1 zu Grunde gelegt. Daraus ergeben sich die in Tab. 4-10 aufgeführten Werte.

Tab. 4-10. Aflatoxine per online-SPE-LC: Nachweis – und Bestimmungsgrenze

	Nachweisgrenze (S/N = 3)	Bestimmungsgrenze (S/N = 10)
Aflatoxin B ₁	0,07 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0,20 $\mu\text{g}/\text{kg}$
Aflatoxin B ₂	0,02 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0,06 $\mu\text{g}/\text{kg}$
Aflatoxin G ₁	0,05 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0,17 $\mu\text{g}/\text{kg}$
Aflatoxin G ₂	0,05 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0,16 $\mu\text{g}/\text{kg}$

Die Bestimmungsgrenzen liegen für alle Analyten weit unterhalb der niedrigsten Grenzwerte von 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Aflatoxin B₁) bzw. 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Summe Aflatoxine B₁, B₂, G₁ und G₂) für Lebensmittel allgemein, vergl. 1.3.6. HÄDRICH et al. (1996, 1. Mitteilung) fordern, dass die Bestimmungsgrenze erfahrungsgemäß etwa um den Faktor 3 bis 5 kleiner als der Grenzwert sein sollte. Die hier ermittelten Bestimmungsgrenzen sind um mindestens den Faktor 10 kleiner als die niedrigsten gesetzlichen Höchstmengen und erlauben somit sicheres Arbeiten im Bereich der Grenzwerte.

Für eine Anwendung der Methode bei diätetischen Lebensmitteln für Säuglinge und Kleinkinder wäre jedoch eine Modifikation des Verfahrens erforderlich, da die Bestimmungsgrenzen teilweise oberhalb der gesetzlichen Grenzwerte (0,05 bis 0,10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) für diese Produkte liegen.

4.1.9.3 Messungengenauigkeit und Wiederholbarkeit

Jeder Analysenwert ist mit einer gewissen Messungengenauigkeit („Messunsicherheit“) verbunden, hervorgerufen durch systematische und zufällige Fehler im Analysenverlauf. Hieraus folgt, dass Messwerte idealerweise normalverteilt („Gauß-verteilt“) um einen Mittelwert sind. Eine Auftragung von theoretisch unendlich vielen Messwerten (Häufigkeit gegen Messwert) ergibt die sogenannte Gauß'sche Glockenkurve (Abb. 4-12).

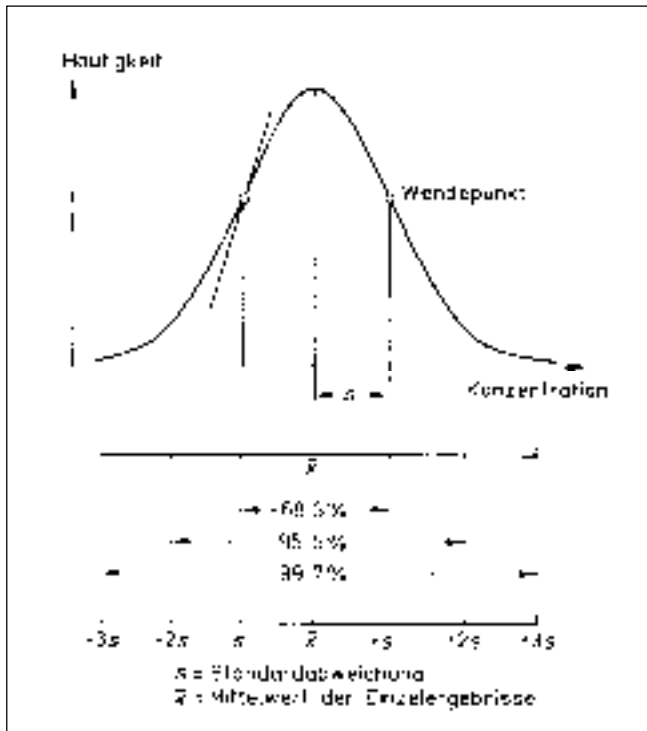


Abb. 4-12. Gauß'sche Glockenkurve
(aus FUNK et al., 1992, S. 68)

Aus der Abb. 4-12 ist die **Standardabweichung** s abzulesen, d.h. die mittlere Abweichung des Einzelmesswerts vom Mittelwert. Die Standardabweichung wird zum Mittelwert der Einzelergebnisse \bar{x} addiert sowie subtrahiert, so dass das Einzelergebnis als $x \pm s$ angegeben wird.

Für die Angabe der Messungenaugkeit muss man zwischen zwei unterschiedlichen Verfahren unterscheiden: die Wiederholbarkeit und die Vergleichbarkeit.

Als **Wiederholbarkeit (repeatability r)** bezeichnet man die Präzision unter Wiederholbedingungen, d.h. dieselbe Probe wird wiederholt vom selben Analytiker mit denselben Geräten und Chemikalien untersucht. Als **Vergleichbarkeit (reproducibility R)** wird hingegen die Analyse derselben Probe mit derselben Methode entweder in verschiedenen Laboratorien (Interlabor-Vergleichbarkeit) oder im selben Labor, jedoch durchgeführt von einer anderen Person

mit anderen Chemikalien und Geräten, bezeichnet (KROMIDAS, 1995, S. 185f).

Hiermit zusammen hängen die häufig in Publikationen angegebenen Größen **Relative Standardabweichung** unter Wiederholbarkeitsbedingungen (RSD_r) und unter Reproduzierbarkeitsbedingungen (RSD_R), wobei letztere sich nach EU-VERORDNUNG 401/2006 auf unterschiedliche Labore bezieht. Die beiden Werte hängen wie folgt voneinander ab:

$$RSD_r = RSD_R \times 0,66$$

Gleichung 4-4 (aus EU-Verordnung 401/2006)

Die **Wiederholgrenze r** wiederum ist derjenige Wert, unterhalb dem man die absolute Differenz zwischen zwei Einzelergebnissen, die man unter Wiederholbedingungen gewonnen hat, mit einer vorgegebenen Wahrscheinlichkeit erwarten darf. Üblicherweise wird für diese Wahrscheinlichkeit ein Wert von 95 % angenommen. Dieses **Signifikanzniveau von 95 %** bezeichnet die relative Sicherheit für eine statistische Entscheidung. Im vorliegenden Fall bedeutet es, dass 95 % aller Messwerte (entsprechend 19 von 20) innerhalb der Messungenaugkeit liegen; dies definiert den so genannten **Vertrauensbereich** (KROMIDAS, 1995, S. 185f).

Die Wiederholgrenze r hängt dabei von der Standardabweichung s_r ab:

$$r = 1,96\sqrt{2s_r} = 2,77s_r \approx 2,8s_r \quad \text{Gleichung 4-5 (nach KROMIDAS, 1995)}$$

Analog hängt die **Vergleichsgrenze R** von der Standardabweichung unter Vergleichsbedingungen ab:

$$R = 1,96\sqrt{2s_R} = 2,77s_R \approx 2,8s_R \quad \text{Gleichung 4-6 (nach KROMIDAS, 1995)}$$

Das Ausmaß der Standardabweichung ist dabei interessanterweise konzentrationsabhängig – und nicht, wie man meinen sollte, methoden- oder matrixabhängig. Dieses von Horwitz durch Auswertung von Ringversuchen entdeckte Phänomen (vergl. HORWITZ et al., 1980) lässt sich rechnerisch wie folgt darstellen:

$$CV = 2^{(1 - 0,5 \log c)}$$

Gleichung 4-7 (aus EU-ENTSCHEIDUNG 2002/657/EG)

Mit CV Variationskoeffizient (CV – coefficient of variation)
 log dekadischer Logarithmus
 c Konzentration (c – concentration), ausgedrückt als Zehnerpotenz des Massenbruchs (Beispiel: 1 µg/kg = 10⁻⁹)

Graphisch dargestellt ergibt sich das so genannte Horwitz-Horn (Abb. 4-13). Wie man sieht, steigt der Variationskoeffizient mit sinkender Konzentration stark an. Beispielsweise erhält man für den typischen Konzentrationsbereich von Aflatoxinen in Lebensmitteln (1 µg/kg = 1 ppb = 10⁻⁹) einen Variationskoeffizienten von 45,3 %.

Es ist zu beachten, dass die hier präsentierte Konzentrationsabhängigkeit eine Annäherung und damit die ungefähr zu erwartenden Werte darstellt (KROMIDAS, 1995, S. 177; HORWITZ et al., 1980).

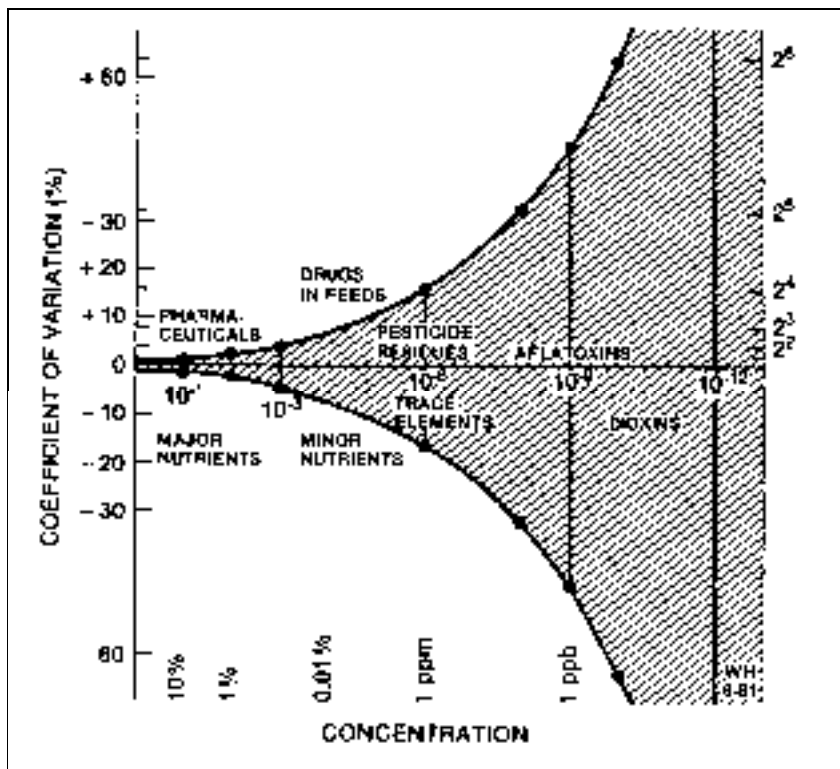


Abb. 4-13. Das „Horwitz-Horn“: Interlabor-Variationskoeffizient als Funktion der Konzentration (aus: HORWITZ et al., 1980)

Die Tab. 4-11 bis 4-14 zeigen die im Rahmen der durchgeführten Validierung (5.1) ermittelten Leistungsparameter für die einzelnen Aflatoxine.

Tab. 4-11. Aflatoxin B₁ – Wiederholbarkeit und Vergleichbarkeit

Aflatoxin B₁	Einheit	50 % Grenzwert (0,935 µg/kg)	100 % Grenzwert* (1,87 µg/kg)	150 % Grenzwert (2,805 µg/kg)
Mittelwert Konzentration (Ist)	[µg/kg]	1,01	1,87	3,29
Mittelwert Wiederfindung	[%]	107,5 %	100 %*	117,3 %
Rel. Standardabw. RSD _R (laborintern)	[%]	6,7 %	14,1 %	9,1 %
Abs. Standardabw. Konzentration s _R	[µg/kg]	0,07	0,27	0,30
Vergleichsgrenze (95 %) relativ (≈ 2,8 x s _R) R	[%]	18,7 %	39,5 %	25,3 %
Vergleichsgrenze (95 %) absolut (≈ 2,8 x s _R) R	[µg/kg]	0,19	0,74	0,84

* Matrixkalibrierstandard; Werte für Standardabweichung usw. über die Flächen berechnet

Tab. 4-12. Aflatoxin B₂ – Wiederholbarkeit und Vergleichbarkeit

Aflatoxin B₂	Einheit	50 % Grenzwert (0,29 µg/kg)	100 % Grenzwert* (0,58 µg/kg)	150 % Grenzwert (0,87 µg/kg)
Mittelwert Konzentration (Ist)	[µg/kg]	0,30	0,58	0,83
Mittelwert Wiederfindung	[%]	101,8%	100 %*	95,5 %
Rel. Standardabw. RSD _R (laborintern)	[%]	10,6 %	8,2 %	11,6 %
Abs. Standardabw. Konzentration s _R	[µg/kg]	0,03	0,05	0,10
Vergleichsgrenze (95 %) relativ (≈ 2,8 x s _R) R	[%]	29,5 %	23,0 %	32,5 %
Vergleichsgrenze (95 %) absolut (≈ 2,8 x s _R) R	[µg/kg]	0,09	0,14	0,27

* Matrixkalibrierstandard; Werte für Standardabweichung usw. über die Flächen berechnet

Tab. 4-13. Aflatoxin G₁ – Wiederholbarkeit und Vergleichbarkeit

Aflatoxin G₁	Einheit	50 % Grenzwert (0,87 µg/kg)	100 % Grenzwert* (1,74 µg/kg)	150 % Grenz- wert (2,61 µg/kg)
Mittelwert Konzentration (Ist)	[µg/kg]	0,94	1,79	2,95
Mittelwert Wiederfindung	[%]	107,5 %	100 %*	113,1 %
Rel. Standardabw. RSD_R (laborintern)	[%]	15,8 %	5,9 %	11,6 %
Abs. Standardabw. Kon- zentration s_R	[µg/kg]	0,15	0,08	0,35
Vergleichsgrenze (95 %) relativ (≈ 2,8 x s_R) R	[%]	44,1 %	16,6 %	32,5 %
Vergleichsgrenze (95 %) absolut (≈ 2,8 x s_R) R	[µg/kg]	0,42	0,21	0,98

* Matrixkalibrierstandard; Werte für Standardabweichung usw. über die Flächen berechnet

Tab. 4-14. Aflatoxin G₂ – Wiederholbarkeit und Vergleichbarkeit

Aflatoxin G₂	Einheit	50 % Grenzwert (0,295 µg/kg)	100 % Grenzwert* (0,59 µg/kg)	150 % Grenz- wert (0,885 µg/kg)
Mittelwert Konzentration (Ist)	[µg/kg]	0,32	0,59	0,77
Mittelwert Wiederfindung	[%]	106,8 %	100 %*	87,0 %
Rel. Standardabw. RSD_R (laborintern)	[%]	19,6 %	2,1 %	17,0 %
Abs. Standardabw. Kon- zentration s_R	[µg/kg]	0,06	0,02	0,13
Vergleichsgrenze (95 %) relativ (≈ 2,8 x s_R) R	[%]	54,8 %	6,0 %	47,5 %
Vergleichsgrenze (95 %) absolut (≈ 2,8 x s_R) R	[µg/kg]	0,18	0,04	0,38

* Matrixkalibrierstandard; Werte für Standardabweichung usw. über die Flächen berechnet

Gemäß der EU-VERORDNUNG 401/2006 wird für die Bestimmung von Aflatoxinen empfohlen, dass die Präzision RSD_R den Wert der Horwitz-Gleichung (Gleichung 4-7) nicht überschreitet; der höchste zulässige Wert ist das Doppelte des nach Horwitz erhaltenen Wertes (Tab. 4-15).

Tab. 4-15. Leistungskriterien für die Bestimmung von Aflatoxinen gemäß EU-VERORDNUNG 401/2006

a) Leistungskriterien für die Bestimmung von Aflatoxinen			
Kriterium	Konzentrationsbereich	Empfohlener Wert	Höchster zulässiger Wert
Blindwerte	Alle	Vernachlässigbar	—
Wiederfindungsrate — Aflatoxin M1	0,01-0,05 µg/kg	60 bis 120 %	
	> 0,05 µg/kg	70 bis 110 %	
Wiederfindungsrate — Aflatoxine B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	< 1,0 µg/kg	50 bis 120 %	
	1-10 µg/kg	70 bis 110 %	
	> 10 µg/kg	80 bis 110 %	
Präzision RSD _x	Alle	Gemäß der Horwitz-Gleichung	2 * der nach der Horwitz-Gleichung erzielte Wert

Der Präzisionswert der RSD_x wird berechnet durch Multiplikation des Präzisionswerts der RSD_x mit 0,66 bei der jeweiligen Konzentration.

Gemäß Horwitz-Gleichung (Gleichung 4-7) erhält man für die Grenzwert-Konzentration von 2 µg/kg (Aflatoxine B₁ und G₁) einen Variationskoeffizienten von 40,7 %, für die „100 %-Konzentration von 0,6 µg/kg bei den Aflatoxinen B₂ und G₂ einen Koeffizienten von 48,9 %.

Alle oben unter laborinternen Vergleichsbedingungen ermittelten Werte für Aflatoxin B₁ und B₂ liegen unter dem empfohlenen Wert und dazu weit unter dem höchsten zulässigen Wert. Bei den Aflatoxinen G₁ und G₂ liegen die berechneten Werte teilweise etwas über dem empfohlenen Wert, aber immer weit unter dem höchstzulässigen.

Damit erfüllt die hier präsentierte Methode die Anforderungen nach EU-VERORDNUNG 401/2006.

4.1.9.4 Wiederfindung

Die Wiederfindung bezeichnet gemäß EU-ENTSCHEIDUNG 2002/657/EG den Prozentsatz der wahren Konzentration eines Stoffs, der beim Analysenverfahren wieder gefunden wird.

Die Quantifizierung beim neu entwickelten Verfahren erfolgt über die Methode der Matrixkalibrierung. Dabei wird die 100 %-Stufe als Matrixkalibrierstandard (beispielsweise: 1,87 µg/kg Aflatoxin B₁ = Grenzwertkonzentration) definiert, so dass die Wiederfindung für diese Konzentrationsstufe automatisch 100 % beträgt.

Die gesetzlichen Anforderungen an die Wiederfindungsrate einer Analysemethode nach der oben erwähnten EU-Verordnung 401/2006 werden eingehalten (vergl. Tab. 4-15), einzige Ausnahme ist die Wiederfindung für die Aflatoxine B₁ und G₁ bei der Stufe 150 %, die 117 bzw. 113 % statt der geforderten max. 110 % beträgt. Allerdings resultieren hieraus keine Minder- oder Falsch-Negativbefunde.

4.1.9.5 Entscheidungsgrenze CC α und Nachweisvermögen CC β

Die EU-ENTSCHEIDUNG 2002/657/EG fordert die Bestimmung der Entscheidungsgrenze (CC α) und des Nachweisvermögens (CC β) anstelle der traditionellen Parameter Nachweis- und Bestimmungsgrenze (4.1.9.2).

Die **Entscheidungsgrenze (CC α)** ist der Grenzwert, bei und über dem mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von α bestimmt werden kann, dass eine Probe positiv ist. Der α -Fehler (falsch-positive Entscheidung) ist die Wahrscheinlichkeit, dass die Probe in Wirklichkeit analytfrei ist, obwohl ein positiver Messwert vorliegt (FUNK et al., 1992, S. 22ff).

Das **Nachweisvermögen (CC β)** ist der kleinste Gehalt des Stoffes, der mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von β in einer Probe nachgewiesen, identifiziert oder quantifiziert werden kann. Im Fall von Stoffen mit einem festgelegten zulässigen Grenzwert bedeutet dies, dass das Nachweisvermögen die Konzentration ist, bei der eine Methode zulässige Grenzkonzentrationen mit einer statistischen Sicherheit von $1-\beta$ nachzuweisen vermag.

Der β -Fehler (falsch-negative Entscheidung) ist die Wahrscheinlichkeit, dass die untersuchte Probe die Substanz doch enthält, obwohl das Analyseergebnis als Null (Blindwert) angesehen wird (FUNK et al., 1992, S. 22ff).

In Abb. 4-14 ist die Ermittlung der Entscheidungsgrenze und des Nachweisvermögens für Analyten mit festgelegtem Grenzwert graphisch dargestellt.

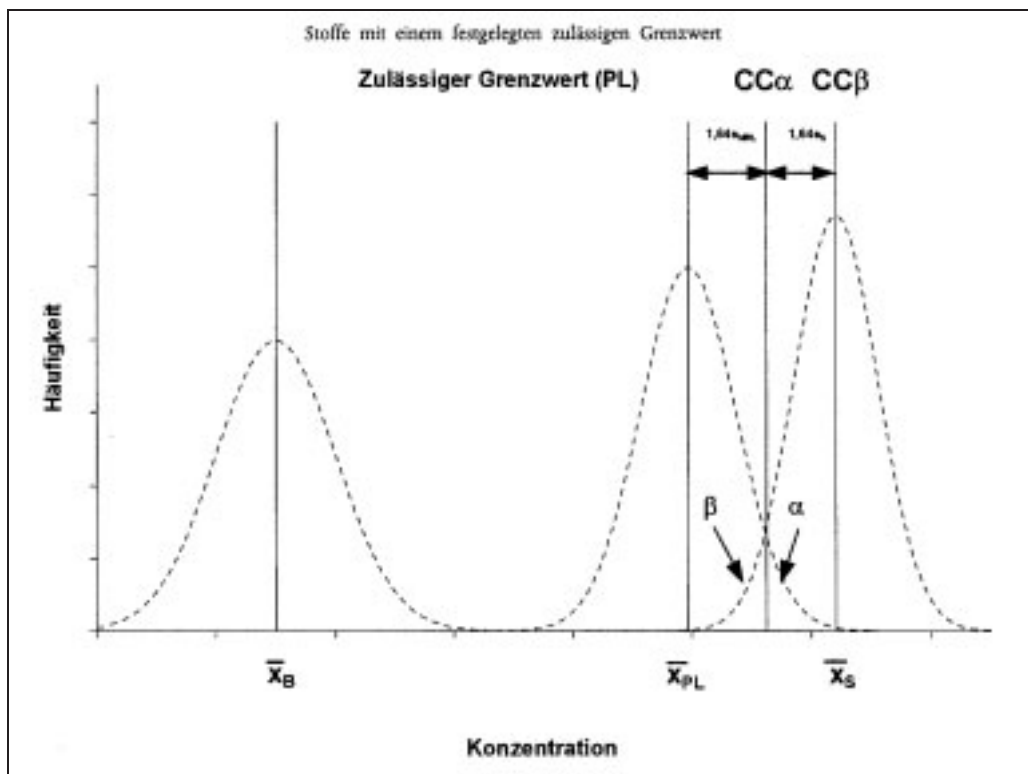


Abb. 4-14. Entscheidungsgrenze (CC α) und Nachweisvermögen (CC β)
(aus: ENTSCHEIDUNG 2002/657/EG)

mit

\bar{x}_B = mittlere „Konzentration“ der Leerwertprobe

\bar{x}_{PL} = mittlere Konzentration der Probe, die den Analyten in der Konzentration des zulässigen Grenzwerts enthält

\bar{x}_S = mittlere Konzentration der verunreinigten Probe

σ_{MRL} = Standardabweichung der Probe, die den Analyten an der Konzentration des zulässigen Grenzwerts enthält (unter laborinternen Reproduzierbarkeitsbedingungen)

σ_S = Standardabweichung der verunreinigten Probe

weitere Abkürzungen: s. Text

Ermittlung von CC α und CC β : Wahl des Verfahrens

Das zu wählende Verfahren für die Ermittlung von Entscheidungsgrenze und Nachweisvermögen hängt zuerst davon ab, ob für den Analyten ein zulässiger Grenzwert festgelegt wor-

den ist oder nicht (ENTSCHEIDUNG 2002/657/EG). Sowohl für Aflatoxine als auch für Patulin (4.2.9.5) sind Grenzwerte u.a. von der EU festgelegt worden, vergl. 1.3.6 und 1.4.6. Die genannte EU-Entscheidung bietet zwei Verfahren zur Auswahl, wobei das im Folgenden beschriebene geeignet ist, da entsprechende Daten im Rahmen der Validierung gewonnen wurden:

• **Entscheidungsgrenze (CC α)**

Repräsentatives Leerwertmaterial wird in gleichmäßigen Schritten in Konzentrationen um den zulässigen Grenzwert dotiert. Nach der Analyse der Proben wird das Signal gegen die zugesetzte Konzentration aufgetragen. Die entsprechende Konzentration am zulässigen Grenzwert plus das 1,64fache der Standardabweichung der laborinternen Reproduzierbarkeit ist gleich der Entscheidungsgrenze ($\alpha = 5\%$).

Als Formel ausgedrückt:

$$CC\alpha = c_{\text{Grenzwert}}(\text{Analyt}) + 1,64 RSD_r \quad \text{Gleichung 4-8}$$

• **Nachweisvermögen (CC β)**

Repräsentatives Leerwertmaterial wird in gleichmäßigen Schritten in Konzentrationen um den zulässigen Grenzwert dotiert. Nach der Analyse der Proben wird die Standardabweichung des mittleren gemessenen Gehalts an der Entscheidungsgrenze berechnet. Die entsprechende Konzentration am Wert der Entscheidungsgrenze plus das 1,64fache der Standardabweichung der laborinternen Reproduzierbarkeit ist gleich dem Nachweisvermögen ($\beta = 5\%$).

Als Formel ausgedrückt:

$$CC\beta = c_{\text{Entscheidungsgrenze}}(\text{Analyt}) + 1,64 RSD_r \quad \text{Gleichung 4-9}$$

Ermittlung von CC α und CC β : Berechnung

Die Berechnung wird am **Beispiel Aflatoxin B₁** dargestellt:

Benötigte Daten:

Zulässiger Grenzwert:	2 µg/kg
Gemessene Konzentration am Grenzwert:	2 µg/kg
Laborinterne Reproduzierbarkeit:	0,28 µg/kg (= 14,1 %) (Rel. Standardabw. RSD _R (laborintern); s. 4.1.9.3)

$$\rightarrow CC\alpha = 2 + 1,64 \times 0,28 \quad [\mu\text{g/kg}] \quad \text{Gleichung 4-10}$$

$$= 2,46 \mu\text{g/kg}$$

Entscheidungsgrenze CC α (Aflatoxin B₁): 2,46 µg/kg

Weiterhin benötigte Daten

Gemessene Konz. an der Entscheidungsgrenze:	2,46 µg/kg
Laborinterne Reproduzierbarkeit:	0,35 µg/kg (= 14,1 %) (Rel. Standardabw. RSD _R (laborintern); s. 4.1.9.3)

$$\rightarrow CC\beta = 2,46 + 1,64 \times 0,35 \quad [\mu\text{g/kg}] \quad \text{Gleichung 4-11}$$

$$= 3,03 \mu\text{g/kg}$$

Nachweisvermögen CC β (Aflatoxin B₁): 3,03 µg/kg

In der Tab. 4-16 sind die Daten für alle vier Aflatoxine zusammengestellt. Da es nur explizite Grenzwerte für Aflatoxin B₁ (2 µg/kg) sowie für die Summe der vier Aflatoxine gibt (4 µg/kg), wurde für die Aflatoxine B₂, G₁ und G₂ derselbe Grenzwert wie für Aflatoxin B₁ angenommen. Die Berechnung erfolgt wie in obigem Beispiel demonstriert.

Tab. 4-16. Entscheidungsgrenze (CC α) und Nachweisvermögen (CC β) für Aflatoxine mittels online-SPE-LC

Analyt	Entscheidungsgrenze CC α [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	Nachweisvermögen CC β [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
Aflatoxin B ₁	2,46	3,03
Aflatoxin B ₂	2,38	2,84
Aflatoxin G ₁	2,20	2,41
Aflatoxin G ₂	2,56	3,28

Für den Analyten Aflatoxin B₁ beispielsweise bedeutet dies, dass bei einer gemessenen Konzentration von 2,46 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Entscheidungsgrenze CC α) nur noch eine Wahrscheinlichkeit von 5 % (α -Fehler) besteht, dass die Probe in Wahrheit Aflatoxin B₁ unterhalb des Grenzwerts von 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ enthält (falsch-positive Entscheidung). Bei einer Konzentration von 3,03 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Nachweisvermögen CC β) beträgt die Wahrscheinlichkeit, dass die Probe als negativ gemessen wird, obwohl der Analyt in der Grenzkonzentration enthalten ist (falsch-negative Entscheidung), nur noch 5 % (β -Fehler).

4.1.9.6 Akkreditierung

Die hier vorgestellte Methode zur Bestimmung von Aflatoxinen mittels online-SPE-LC wurde durch die DAP (Deutsches Akkreditierungssystem Prüfwesen GmbH) akkreditiert und im Januar 2007 in den Anhang der Akkreditierungsurkunde aufgenommen.

4.1.10 Laborvergleichsuntersuchung

In einer Laborvergleichsuntersuchung (LVU) wird die Vergleichbarkeit eines Analysenergebnisses mit denen anderer Labore ermittelt. Für den Kunden eines Labors stellt diese Vergleichbarkeit ein wichtiges Qualitätskriterium dar, da er dann darauf vertrauen kann, dass andere Labore das ihm vorliegende Ergebnis innerhalb gewisser Schwankungsbreiten bestätigen werden.

Maßstab für die Vergleichbarkeit stellt der z-score dar. Der z-score gibt die Abweichung des betrachteten Messwerts vom Mittelwert im Verhältnis zur durchschnittlichen Abweichung an, die aus Ringversuchen bekannt ist oder bei deren Fehlen nach Horwitz (4.1.9.5) berechnet wird. Bei einer statistischen Normalverteilung der Analysenergebnisse liegen 95 % aller Ergebnisse innerhalb einer Bandbreite von $-2 \leq z \leq 2$. Dieser Bereich wird als akzeptabel angesehen, vergl. 4.1.9.3.

Die z-scores der einzelnen Labore werden dabei vom u.g. LVU-Anbieter FAPAS (vergl. FAPAS-Report zu Test Nr. 0488 – Aflatoxine in Erdnüssen, 2006) wie folgt berechnet:

$$z = \frac{x - \hat{X}}{\sigma^p} \quad \text{Gleichung 4-12}$$

mit x = Messwert des Labors [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
 \hat{X} = robuster Mittelwert für den Analyten [$\mu\text{g}/\text{kg}$] (Bsp. Aflatoxin B₁: 2,06 $\mu\text{g}/\text{kg}$)
 σ^p = Ziel-Standardabweichung, hier berechnet nach Horwitz [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
 (Bsp. Aflatoxin B₁: 0,452 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

Bsp.:

Der für die u.g. LVU mit der online-SPE-LC-Methode ermittelte Aflatoxin B₁-Gehalt betrug 1,77 µg/kg. Hieraus berechnet sich folgender z-score:

$$z = \frac{1,77 - 2,06}{0,452} = -0,64 \quad \text{Gleichung 4-13}$$

Die hier präsentierte Methode wurde erfolgreich in einer solchen Laborvergleichsuntersuchung (LVU) verifiziert. Bei dem von April bis Juni 2006 durchgeführten FAPAS (Food Analysis Performance Assessment Scheme)-Test Nr. 0488, der vom renommierten Central Science Laboratory (CSL) in Großbritannien angeboten wurde, nahmen 101 Labore aus 37 Ländern teil. In der Matrix „Erdnuss“ sollte der Aflatoxingehalt bestimmt werden. Die Ergebnisse sind in Tab. 4-17 zusammengefasst.

Tab. 4-17. Ergebnisse des FAPAS-Tests Nr. 0488, April-Juni 2006

Parameter	Robuster Mittelwert [µg/kg]	Anteil zufriedener z-scores ¹	Eigenes Ergebnis (Labor Nr. 84) [µg/kg]	Eigener z-score ¹
Aflatoxin B ₁	2,06	85 %	1,77	-0,6
Aflatoxin B ₂	0,69	86 %	0,76	0,5
Aflatoxin G ₁	2,11	85 %	1,91	-0,4
Aflatoxin G ₂	0,74	89 %	0,50	-1,5
Gesamt-Aflatoxin²	5,59	87 %	4,94	-0,5

¹ zufriedener z-score: $|z| \leq 2$ (s. auch Erläuterungen im Text)

² Summe aus Aflatoxin B₁, B₂, G₁ und G₂

Abb. 4-15 zeigt den Ausschnitt aus dem Originalreport mit dem online-SPE-LC-Ergebnis (Labor Nr. 84). Die Abb. 4-16 bis 4-20 visualisieren die Güte des eingereichten Ergebnisses relativ zu den anderen Laboren, jeweils für Aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂ und Gesamt-Aflatoxin. Die horizontalen Linien zeigen die obere und untere Grenze des akzeptablen z-scores (-2 bis +2) sowie den Mittelwert aller Labore (sog. „assigned value“) an.

FAPAS® Aflatoxin B₁ 0488
LABORATORY SURVEILLANCE

Table 1 (continued): Results and z-scores, Peanut Test Material

Laboratory number	Result (µg/kg)	z-score	Result (µg/kg)	z-score	Result (µg/kg)	z-score	Result (µg/kg)	z-score	Result (µg/kg)	z-score	Result (µg/kg)	z-score	Result (µg/kg)	z-score	
080	1.83	111	-0.5	0.74	102	0.3	1.75	113	-0.8	0.93	71	1.1	5.25	-0.3	
081	1.48	90	-1.3	0.30	105	-2.6	1.51	94	-1.3	0.29	82	-2.8	3.58	-1.6	
082	2.32	116	0.6	0.92	85	1.5	2.28	117	0.4	0.96	48	1.3	6.48	0.7	
083	2.09	101	0.1	0.32	102	-2.4	2.04	117	-0.1	0.44	95	-1.9	5.24	-0.3	
084	1.77		-0.6	0.76		0.5	1.91		-0.4	0.50		-1.5	4.94	-0.5	
085	1.91	92.3	-0.3	0.58	93.0	-0.7	1.84	96.3	-0.6	0.71	66.2	-0.2	5.04	90.0	-0.4
086	1.63	82.29	-0.9	0.54	81.89	-1.0	1.75	81.81	-0.8	0.68	68.15	-0.4	4.68	79.89	-0.7
087	1.95						1.94			1.92					
088	1.99	93.92	-0.6	0.77	94.97	-0.5	1.95	91.64	-0.9	1.91	91.92	-0.9	4.97	93.92	-0.6
089	1.879	92.92	-0.7	0.78	92.92	-0.7	1.879	92.92	-0.7	1.879	92.92	-0.7	4.92	92.92	-0.7
090	1.97	94.97	-0.5	0.79	94.97	-0.5	1.97	94.97	-0.5	1.97	94.97	-0.5	4.94	94.97	-0.5

Page 15 of 15

Abb. 4-15. Ergebnis FAPAS-Test 0488: Aflatoxine in Erdnüssen, online-SPE-LC-Ergebnis = rot umrandet

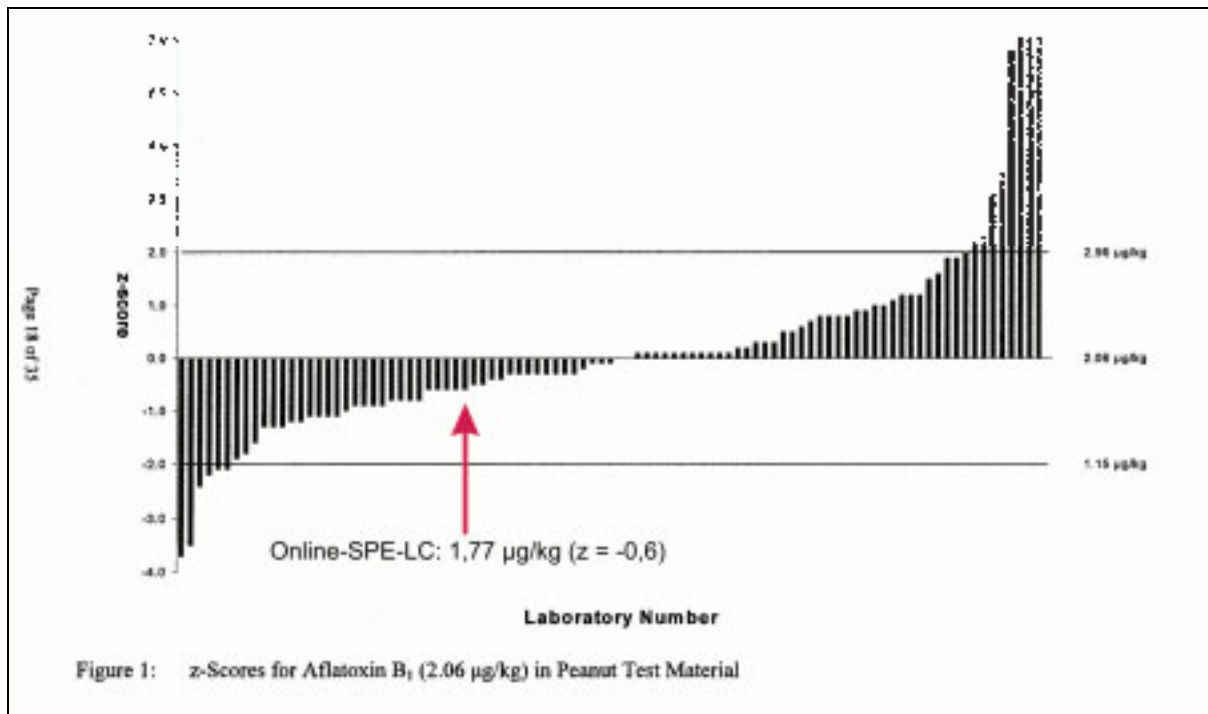


Abb. 4-16. Ergebnis FAPAS-Test 0488: Aflatoxin B₁ in Erdnüssen, online-SPE-LC-Ergebnis = roter Pfeil

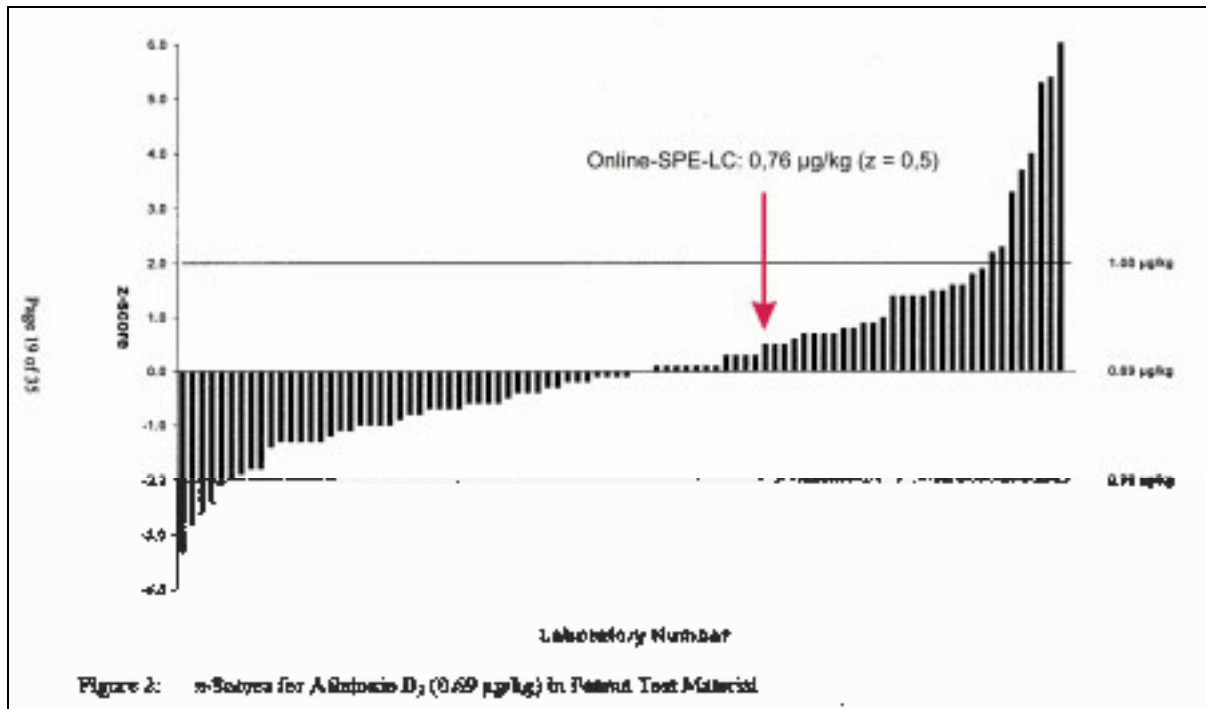


Abb. 4-17. Ergebnis FAPAS-Test 0488: Aflatoxin B₂ in Erdnüssen, online-SPE-LC-Ergebnis = roter Pfeil

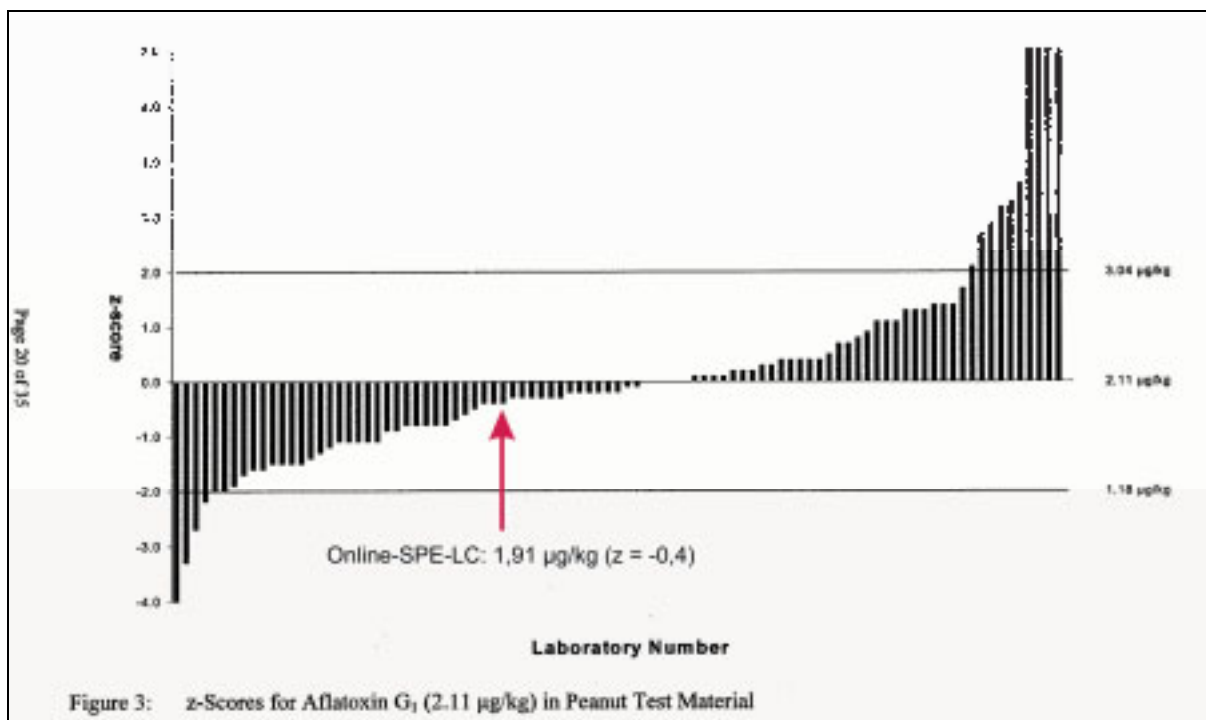


Abb. 4-18. Ergebnis FAPAS-Test 0488: Aflatoxin G₁ in Erdnüssen, online-SPE-LC-Ergebnis = roter Pfeil

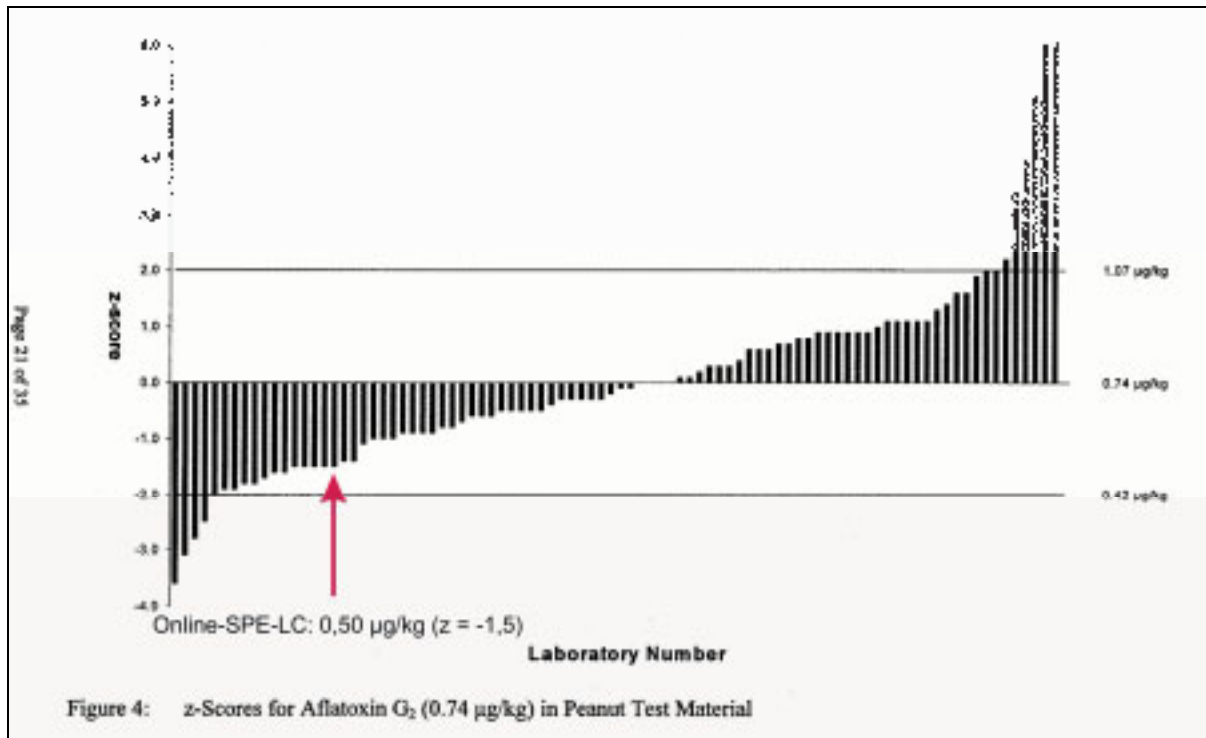


Abb. 4-19. Ergebnis FAPAS-Test 0488: Aflatoxin G₂ in Erdnüssen, online-SPE-LC-Ergebnis = roter Pfeil

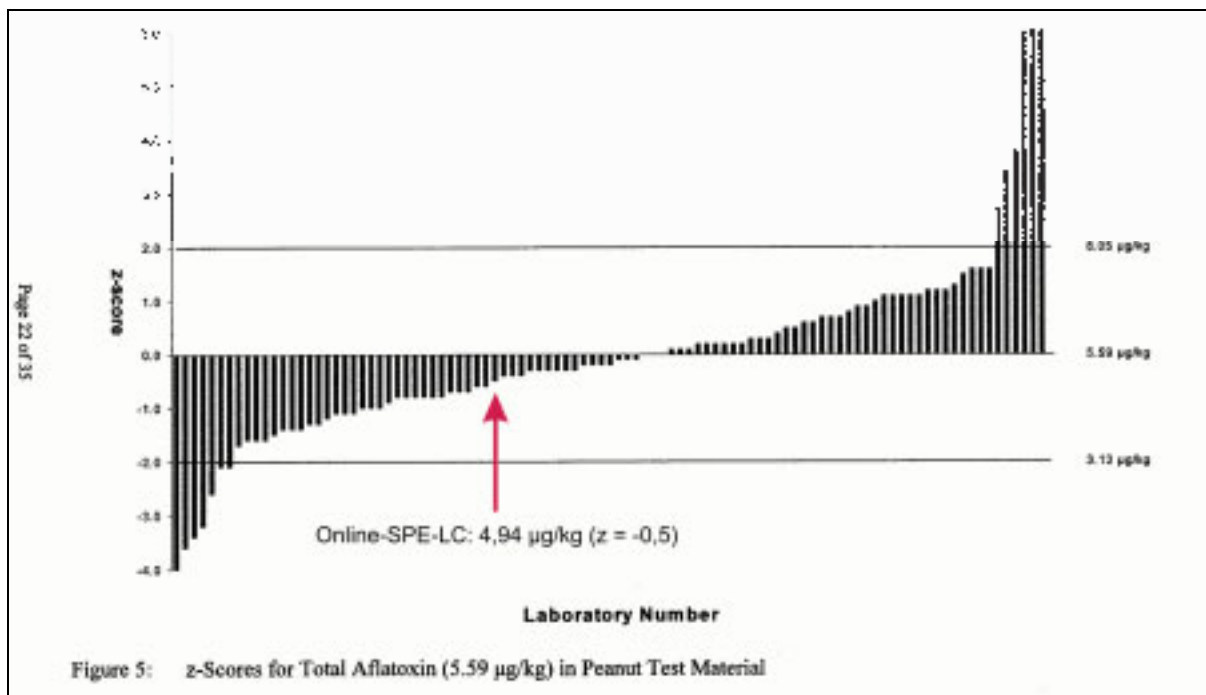


Abb. 4-20 Ergebnis FAPAS-Test 0488: Gesamt-Aflatoxin in Erdnüssen, online-SPE-LC-Ergebnis = roter Pfeil

Alle fünf mit der neu entwickelten online-SPE-LC-Methode erzielten Werte liegen im zufrieden stellenden Bereich ($-2 \leq z \leq 2$). Mit Ausnahme des Wertes für das in der Praxis relativ unbedeutende Aflatoxin G₂ werden sogar sehr gute Werte für den z-score von $|z| \leq 0,6$ erreicht.

Somit hat die in dieser Arbeit präsentierte Methode ihre Leistungsfähigkeit in einer international anerkannten Laborvergleichsuntersuchung unter Beweis gestellt.

4.1.11 Methodenvergleich

4.1.11.1 Vergleich Probenvorbereitung online vs. offline

Wo liegen nun die Vorteile der online-SPE für Aflatoxine, verglichen mit der manuellen Durchführung? Tab. 4-18 zeigt einen Vergleich zwischen der manuellen SPE-Durchführung mit Manifold (Abb. 1-11; 1.5) und der automatisierten online-SPE (Abb. 1-14; 1.6), beispielhaft an einer Serie mit zwölf Proben, aufgeteilt auf zwei Matrices.

Aus Tab. 4-18 ist abzulesen, wo die wichtigsten Vorteile bei der online-SPE-Vorbereitung bei Aflatoxinen liegen: Neben einer deutlichen Einsparung im Personalbereich (2 h gegenüber 4 h) liegt der Hauptvorteil bei den Kosten für die Immunoaffinitätssäulen. Während bei klassischer Aufarbeitung mit ca. € 15,- IAC-Kosten pro Probe zu rechnen ist (bei einem Verkaufspreis für diese Analyse von ca. € 70,-), fällt dieser Posten bei der online-Variante mit nur € 1,- kaum ins Gewicht – ein wichtiges Ziel dieser Arbeit ist damit erreicht worden. Aufgrund der Automatisierung ist es weiterhin einfacher, größere Probenserien parallel zu analysieren, da der SPE-Schritt rund um die Uhr durchgeführt werden kann, so dass eine weitere Vorgabe der Arbeit erfüllt ist.

Beispiel: Probenserie aus 12 Proben

Tab. 4-18. Vergleich Probenvorbereitung Aflatoxine offline-online

	Manuell ASU § 64 LFGB L 15.00-2 mod. (BVL, Stand Dez. 2004)	Automatisiert Online-SPE-LC
Zeitbedarf gesamt	Homogenisierung/ Einwaage/Extraktion: 2 h Manuelle SPE: 2,5 h	Homogenisierung/ Einwaage/Extraktion: 2,25 h Einkonzentration: 2 h
Personalbedarf	Homogenisierung/ Einwaage/Extraktion: 1,5 h Manuelle SPE: 2,5 h gesamt: 4 h	Homogenisierung/ Einwaage/Extraktion: 1,75 h Vorbereitung online-SPE: 0,25 h gesamt: 2 h
Benötigte IA-Säulen pro Probe	1,5 (inkl. QRK, Validierung, Bestätigung, etc.)	0,1 (inkl. QRK, Validierung, Bestätigung, etc.)
Säulenkosten hieraus	€ 15,-/Probe	€ 1,-/Probe
Benötigte IA-Säulen gesamt	22	1
Säulenkosten hieraus gesamt	€ 330,-	€ 10,-
Lösungsmittelbedarf für SPE	413 mL Reinstwasser 7,5 mL Methanol	383 mL Reinstwasser 120 mL ACN/Wasser 67:33 (v/v)
Betriebsart	Nur während der Arbeitszeit (max. 40 h pro Woche)	Rund um die Uhr (max. 168 h pro Woche)

Sämtliche Angaben sind ungefähre Werte und beziehen sich auf durchschnittlichen Routinebetrieb

4.1.11.2 Vergleich Validierung online vs. Validierung offline

Weiterhin interessant ist ein laborinterner Vergleich der Validierung der neu entwickelten online-Methode mit der offline-Routinemethode, die in Anlehnung an ASU § 64 LFGB L 15.00-2 (BVL, Stand Dez. 2004; vergl. 3.1.9) durchgeführt wird, s. Tab. 4-19. Diese Validierung wurde im Oktober 2004 nach dem damals laborintern gültigen Validierungsschema durchgeführt, das inzwischen deutlich weiter entwickelt worden ist. Hierdurch können nicht alle Parameter direkt miteinander verglichen werden.

Die relative Standardabweichung unter Wiederholbedingungen (RSD_r) liegt für die Aflatoxine B_2 und G_2 mit der neu entwickelten Methode besser, für die beiden anderen Aflatoxine B_1 und G_1 hingegen schlechter. Hierbei ist zu beachten, dass sich die Werte auf unterschiedlich umfangreiches Datenmaterial gründen (online-SPE: 1 Messreihe mit Sechsfach-Bestimmung; offline-SPE: 1 Messreihe mit Einfach-Bestimmung). Somit lassen sich aus diesen Daten nur Trends herauslesen. Laborinterne Daten für die relative Standardabweichung unter Reproduzierbarkeitsbedingungen liegen für die klassische Methode leider nicht vor, so dass ein Vergleich nicht möglich ist.

Tab. 4-19. Vergleich Leistungsdaten online-SPE-LC vs. ASU L 15.00-12 mod. (offline)

Parameter	Aflatoxin	Online-SPE	ASU § 64 LFGB L 15.00-2 mod.	Anm.
RSD_r [%]	B_1	6,05	0,99	bezogen auf eine Messreihe (Wiederholbedingungen)
	B_2	0,86	1,10	
	G_1	6,69	1,34	
	G_2	2,49	14,4	
Nachweisgrenze [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	B_1	0,07	0,03	S/N = 3
	B_2	0,02	0,01	
	G_1	0,05	0,01	
	G_2	0,05	0,04	
Bestimmungsgrenze [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	B_1	0,20	0,09	S/N = 10
	B_2	0,06	0,04	
	G_1	0,17	0,05	
	G_2	0,16	0,12	
Mittlere Wiederfindung [%]	B_1	108,3	109,2	Mittelwert aus den drei Stufen 50, 100 und 150 % ¹
	B_2	99,4	102,3	
	G_1	107,7	102,3	
	G_2	97,7	58,7	

¹ Angaben in Prozent der Grenzwertkonzentration

Direkt vergleichbar sind jedoch Nachweis- und Bestimmungsgrenze. Wie unter 4.1.9.2 dargestellt, liegen die mit der online-SPE-Methode erreichten Bestimmungsgrenzen weit unterhalb der gesetzlich geforderten Werte, ebenso die mit der offline-Variante erzielten. Die Bestimmungsgrenzen liegen mit der neuen Methode etwas höher, vor allem für B_1 und G_1 . Ursache hierfür ist vermutlich die bei der Elution nicht zu vermeidende leichte Peakverbreiterung. Dabei wird die Peakhöhe und damit das Signal-Rausch-Verhältnis kleiner. Bei der Wiederfindung liegen hingegen beide Methoden gleichauf, beim Aflatoxin G_2 hat jedoch die online-SPE-Methode einen deutlichen Vorteil (97,7 zu 58,7 % Wiederfindung). Der Grund hierfür liegt in der Kalibrationsart: die bei der Immunoaffinitätsäulen-Aufarbeitung häufig auftretenden Verluste an AFG₂ (vergl. die in o.g. ASU-Methode L 15.00-2 veröffentlichten Validierungsdaten) werden durch die Matrixkalibrierung bei der online-SPE kompensiert.

4.1.11.3 Vergleich mit anderen Methoden

Der Vergleich von Leistungsdaten zwischen verschiedenen Methoden wird dadurch erschwert, dass einerseits Begriffe in der Validierung nicht immer einheitlich verwendet werden, zum anderen die Ermittlung von Leistungsparametern nicht nach einheitlichen Maßstäben erfolgt. Die Ursachen hierfür sind vielfältig, eine wichtige ist die Tatsache, dass es „die Validierung“ nicht gibt. Vielmehr hat der Analytiker, der eine Methode validieren möchte, innerhalb gewisser Vorgaben festzulegen, wie welche Leistungsdaten ermittelt und bewertet werden. Ziel ist vereinfacht gesagt der Nachweis, dass die Methode für den beabsichtigten Zweck geeignet ist (vergl. KROMIDAS, 1999; 4.1.9). Den nicht immer einheitlichen Sprachgebrauch verdeutlicht das Beispiel „Reproduzierbarkeit“. Nach der EU-ENTSCHEIDUNG 2002/657/EG ist Reproduzierbarkeit (Vergleichspräzision) die Präzision unter Reproduzierbarkeitsbedingungen. Letztere sind wiederum definiert als „Bedingungen, unter denen Testergebnisse mit derselben Methode, identischem Testmaterial, in verschiedenen Laboratorien, durch verschiedene Untersucher und mit unterschiedlicher Ausrüstung erzielt werden“. Ein Beispiel hierfür wäre ein Ringversuch („collaborative trial“), jedoch keine Laborvergleichsuntersuchung, bei der die Methodenwahl frei ist.

Wie KROMIDAS (1999) anmerkt, wird der Begriff „Reproduzierbarkeit“ im Laboralltag jedoch häufig anders verwendet: „Die Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten war gut“ – dieser Satz bezieht sich jedoch auf Wiederhol- und nicht Vergleichsbedingungen. Um die Irritation komplett zu machen, definiert die o.g. EU-Entscheidung aber auch die „laborinterne Reproduzierbarkeit“ – als im selben Labor unter festgesetzten Bedingungen (Methode, Testmaterialien, Untersucher etc.) über begründete lange Zeiträume erzielte Präzision.

Auch die Art und Weise, wie die Werte laborintern gewonnen werden (Anzahl der Messungen, Wiederhol- oder Vergleichsbedingungen etc.), variiert häufig von Veröffentlichung zu Veröffentlichung. Somit ist eine gewisse Verwirrung im Bereich „Validierung“ vorhanden, und die in Publikationen gemachten Angaben sollten kritisch hinterfragt werden.

Tab. 4-20. Bestimmung von Aflatoxinen mittels online-SPE-LC: Vergleich mit anderen Methoden

Methode und Matrix	Publikation	Konzentration Beispielanalyt	Leistungsdaten	Anm.
Online-SPE-LC Erdnüsse	diese Dissertation, 2006	1,01 µg/kg AFB₁	s_R 6,7 % RSD_R 20,2 %	
ASU L 23.05-2 IAC-LC Erdnussmus	BVL, Stand Dez. 2004	0,87 µg/kg AFB ₁	RSD _R 19 %	Beide Veröffentlichungen beziehen sich auf denselben Ringversuch
IAC-LC u.a. Erdnussmus	STROKA et al., 2000	1,5 µg/kg AFB ₁	RSD _R 14 %	
IAC-LC bzw. –TLC Erdnussmus	PATEY et al., 1990	13,6 µg/kg Gesamtaflatoxine	CV 45 %	Ringversuch
MycoSep-LC u.a. Erdnüsse	TRUCKSESS et al., 1994	5 µg/kg Gesamtaflatoxine	RSD _R 69,4 %	Ringversuch
IAC-LC Erdnussmus	PATEY et al., 1991	2,6 µg/kg AFB ₁	CV 36 %, RSD _R 36,6 %	Ringversuch
Automatisierte IAC-LC Erdnussmus	SHARMAN et al., 1991	7,1 µg/kg AFB ₁	s _r 9,9 %	Automatisierung mit BenchMate (s. 1.6)
Automatisierte IAC-LC Nüsse	NIEDWETZKI et al., 1994	4 µg/kg AFB ₁	RSD 15,0 %	Automatisierung mit ASPEC (s. 1.6)

„Erdnussmus“ meint die im englisch-amerikanischen Sprachgebrauch bekannte peanut butter („Erdnussbutter“)

Die in Tab. 4-20 zusammengestellten Daten zeigen, dass die Leistungsfähigkeit der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methode vergleichbar ist mit anderen veröffentlichten Methoden. Neben den o.g. Punkten muss darüber hinaus berücksichtigt werden, dass Ringversuchsproben zumeist anders behandelt werden als Routineproben, HORWITZ (1980) spricht in diesem Zusammenhang von „idealisierten Bedingungen“ (z.B. höhere Anzahl an Messungen, bester Mitarbeiter führt Analysen durch usw.). Oder anders ausgedrückt: In der Routine muss mit größeren Schwankungen kalkuliert werden. Auch unter diesem Aspekt sind veröffentlichte Leistungsdaten sowohl von Ringversuchen als auch von sonstigen Publikationen mit Vorsicht zu verwenden. Schließlich ist immer wieder zu beobachten, dass akkreditierte (und damit validierte) Methoden zu schlechten Ergebnissen in Laborvergleichsuntersuchungen führen. Eine Validierung alleine muss somit nicht zwangsweise zu einer leistungsfähigen Routinemethode führen.

Der angestrebte Vorteil der Automatisierung, die verbesserte Wiederholbarkeit und Präzision, konnte nicht erreicht werden, vielmehr liegen die Leistungsdaten vergleichbar mit offline-Methoden, wie die Tab. 4-19 und 4-20 zeigen. Vermutlich wird der sonst beobachtete Vorteil der automatisierten Probenvorbereitung (vergl. NIEDWETZKI et al., 1994; GROTEWAHL, 2006) wettgemacht durch die Verwendung empfindlicher Antikörper, so dass die Extraktion von Aflatoxinen aus der Matrix nicht immer so gleichmäßig wie gewünscht abläuft.

An dieser Stelle sollen nicht die Nachteile der Methode verschwiegen werden. Wesentlicher Nachteil ist die erhöhte Anzahl an durchzuführenden Analysen aufgrund der erforderlichen Matrixkalibrierung. Weiterhin erfordert der Einkonzentrierungsschritt einen gewissen Zeitbedarf, bei jedoch nur geringem Personalbedarf. Jedoch werden die Nachteile durch die oben beschriebenen und im folgenden Kapitel (4.1.12) zusammengefassten Vorteile mehr als ausgeglichen.

4.1.12 Vorteile der Methode

Zusammengefasst zeichnet sich die entwickelte Methode zur Bestimmung von Aflatoxinen in pflanzlichen Lebensmitteln mittels online-SPE-LC durch folgende Vorteile aus:

- schnell
- kostengünstig durch Automatisierung und Mehrfachverwendung von teurem Immunoaffinitätsmaterial
- für hohen Probendurchsatz durch Automatisierung der Probenvorbereitung geeignet
- sicher
- erprobt an verschiedenen Matrices im Routinebetrieb
- erfolgreiche Teilnahme an Laborvergleichsuntersuchung
- validiert
- durch die DAP akkreditiert
- erfüllt gesetzliche Anforderungen an Methoden für die Mykotoxinanalytik
- Wiederfindungskorrektur durch Verwendung derselben Kartusche für Proben und Standards

4.2 Patulin

Ebenso wie für Aflatoxine sollte für Patulin eine Methode zur Bestimmung mittels online-SPE-LC entwickelt werden, vergl. 2.3.2. Besonderes Augenmerk sollte auf eine Vereinfachung der Probenvorbereitung sowie eine Automatisierung des Waschschriffs gelegt werden. Die zur folgenden Diskussion gehörende Methode ist unter 3.2 beschrieben.

4.2.1 SPE-Aufarbeitung

Auswahl des SPE-Materials

Als erster Schritt der Methodenentwicklung wurde ein SPE-Material gesucht, das geeignet ist, Patulin aus wässriger Lösung festzuhalten und bei Applikation eines Lösungsmittels mit organischem Anteil wieder freizugeben. Das Material sollte außerdem stabil gegenüber der basischen Waschlösung sein sowie möglichst wenig Störsubstanzen im Lauf der Elution abgeben.

In der Literatur sind hierzu folgende Ansätze beschrieben, s. auch 2.2.2:

- EISELE et al. (2003) verwenden zwei verschiedene SPE-Materialien: OASIS HLB (Waters), ein hydrophiles-lipophiles, makroporöses Copolymer, aufgebaut aus den Monomeren Divinylbenzol (lipophil) und N-Vinylpyrrolidon (hydrophil), sowie Strata X 33u Polymeric Sorbent (Phenomenex). Beide Phasen werden zur SPE mittels Spritzentechnik eingesetzt und sollen lt. den Autoren identische Leistungseigenschaften unter den folgenden Bedingungen aufweisen:
Die SPE-Kartusche wird mit Wasser, Methanol und wiederum Wasser konditioniert, wobei die Flüssigkeiten mit Hilfe einer Spritze mit konstantem Fluss durch die Säule gedrückt werden.
Danach werden 2,5 mL Probe (Apfelsaft) ebenfalls mit Hilfe einer Spritze über die Säule gegeben, anschließend wird mit 2 mL 1 %iger Natriumcarbonat-Lösung, unmittelbar gefolgt von 2 mL 1 %iger Essigsäure gewaschen. Nach Trocknung mit Luft bzw. Vakuum wird mit Ethylacetat/Diethylether 10:90 (v/v) eluiert. Das Lösungsmittel wird mittels Helium oder Stickstoff entfernt und der Rückstand in verdünnter Essigsäure (0,1 %) gelöst.
- TRUCKSESS et al. (1999, identisch: 2001) setzen ebenfalls OASIS HLB-Material von Waters für die SPE ein, Die Kartusche wird mit Methanol und Wasser konditioniert, unter Verwendung eines SPE-Manifolds mit Probenreservoir (Abb. 1-11). Nach Trockenlaufen der Kartusche werden 5 mL Probe (Apfelsaft) aufgegeben. Nachdem die Probe durchgelaufen ist, wird mit 1 mL 1 %iger Natriumcarbonat-Lösung und 1 mL 1 %iger Essigsäure gewaschen. Die Kartusche wird mittels Vakuum getrocknet. Die anschließende Elution erfolgt mit Acetonitril/Diethylether 2:98 (v/v). Das Lösungsmittel wird im Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand in Essigsäurelösung (pH 4) gelöst.
- Als Probenvorbereitung für die LC-MS-Bestimmung von Patulin wurden drei verschiedene SPE-Materialien von ITO et al. (2004) evaluiert: OASIS HLB (s.o.), GL-Pak PLS-2 (ein Styrol-Divinylbenzol-Copolymer, GL Sciences) und Aquasis PLS-3 (N-Methacrylat-Polymer, GL Sciences). Sie kamen zu dem Ergebnis, dass das letztere Material mit rund 95 % die beste Wiederfindung für Patulin liefert, verglichen mit rund 85 % für OASIS HLB und rund 47 % für GL-Pak. Anwendung: Die SPE-Kartusche wird mit Methanol und Wasser konditioniert. Anschließend werden 5 mL Probe aufgegeben. Nach einem Waschschriff mit Wasser wird die Kartusche unter Vakuum getrocknet. Die Elution erfolgt mit 5 mL Methanol. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Stickstoffstrom wird die Probe in Wasser aufgenommen.

Auf einen basischen Waschschrift wird bei dieser Methode verzichtet. Vermutlich ist er aufgrund der höheren Spezifität der anschließenden MS-Detektion, verglichen mit der UV-Detektion, entbehrlich.

- TAKINO et al. (2003) setzen eine online-Säulenschalttechnik bei der LC-MS-Bestimmung von Patulin ein. Hierbei wird eine Zorbax Eclipse XDB C18-Vorsäule (12,5 x 4,6 mm ID, Agilent) als Anreicherungssäule eingesetzt. Ein Probenaliquot von 10 µL wird mit Hilfe einer weiteren Pumpe mit einem Fluss von 0,5 mL/min auf die o.g. Vorsäule gefördert. Nach 0,3 min schaltet das Ventil, und der LC-Eluent (10 mmol/L wässrige Ammoniumacetat-Lösung/Methanol 98:2, v/v) transferiert den Analyten im Backflush-Verfahren auf die analytische Säule.

Die oben präsentierte Methodik ist auf die Anwendung mit anschließender LC-MS-Analyse zugeschnitten. Aufgrund der hohen Selektivität der MS-Detektion genügen kleine Probenmengen für eine ausreichend empfindliche Analyse, auf einen basischen Reinigungsschritt kann verzichtet werden. Mit dem beschriebenen Prinzip (0,3 min Aufspülen) wird kaum ein Reinigungseffekt erzielt, und auf Grund des geringen Probenvolumens von 10 µL ist zudem der Aufkonzentrierungseffekt vernachlässigbar. Die Anwendung von C18(RP 18)-Material erwies sich darüber hinaus im Rahmen dieser Dissertation als ungeeignet für die SPE-Anreicherung von Patulin, da Patulin erfahrungsgemäß von RP 18-Material bereits mit Wasser eluiert wird.

- Eine frühe Arbeit von LEHMANN et al. (1990) beschreibt die Analyse von Patulin in Obst-säften, bei der zwei Kartuschen sukzessiv zum Einsatz kommen: ebenfalls eine RP 18-Kartusche (Baker) und eine Kieselgelsäule. Die RP 18-Kartusche wird mit Methanol und Wasser konditioniert, anschließend wird 1 mL Probe aufgegeben. Nach Waschen mit Wasser und Hexan wird trocken gesaugt, die Elution erfolgt mit Ethylacetat. Mit dem Eluat wird anschließend eine Kieselgel-SPE durchgeführt.

Diese Methode ist mit zwei SPE-Schritten sehr zeit-, personal- und materialintensiv. Wie bereits dargestellt eignet sich nach Erfahrung des Autors RP 18-Material nur bedingt zur SPE-Aufreinigung von Patulin. Die Verwendung von wasserlabilem Kieselgel als SPE-Material ist ungeeignet für die online-Applikation, da es hierfür von Vorteil ist, nur mit wässrigen Lösungen kompatible Materialien einzusetzen.

Neben diesen reinen SPE-Probenvorbereitungsverfahren sind **Kombinationen aus Flüssig-flüssig-Extraktion (LLP) und Festphasenextraktion (SPE)** beschrieben:

- ROVIRA et al. (1993) präsentieren eine Kombination aus LLP und Kieselgelsäule. Die Probe wird dreimal mit Ethylacetat ausgeschüttelt; die vereinigten Extrakte werden unter reduziertem Druck eingeeengt. Die Probe wird in Chloroform mit etwas Wasser aufgenommen und mit Natriumsulfat getrocknet. Ein Aliquot der Lösung wird auf eine mit Chloroform konditionierte Sep-Pak SiO₂-Kartusche (Waters) gegeben. Ebenfalls mittels LLP + SepPak-SPE bereiten RYCHLIK et al. (1999) die Proben für die anschließende HRGC-HRMS-Analyse vor.

Wie oben beschrieben ist die Verwendung von Kieselgel als SPE-Material für die online-SPE-Aufarbeitung ungeeignet.

- HERRY et al. (1996) beschreiben eine ähnliche Vorbereitung, bei der der LLP-Schritt mittels Extrelut-Säulen durchgeführt wird (vergl. 1.4.7.7). Die Probe wird auf eine Extrelut-Säule (Merck) gegeben und mit einem Toluol/Ethylacetat-Gemisch (75:25, v/v) eluiert. Nach Lösungsmittelentfernung wird der Rückstand in Chloroform mit etwas Wasser aufgenommen. Die weitere Aufarbeitung erfolgt mit Florisil-Säulen (Waters).

Diese Methode wendet mit Florisil (Magnesiumsilikat) ebenso eine unter wässrigen Bedingungen nicht stabile SPE-Phase an. Auch der Einsatz von halogenhaltigen Lösungsmitteln ist aus Umwelt- und Gesundheitsschutz-Aspekten nicht vorteilhaft.

- Ebenfalls eine aus zwei Schritten bestehende Aufarbeitung beschreiben ARRANZ et al. (2005), eine Arbeit, die im Verlauf dieser Dissertation veröffentlicht wurde. Die dort beschriebene Methode wurde validiert und erfolgreich in einem Ringversuch getestet und ermöglichte so erst die Einführung des EU-Grenzwertes für Patulin in Babynahrung von 10 µg/L bzw. µg/kg. Für die Extraktion werden Sand, Natriumsulfat und Natriumhydrogencarbonat in einem Zentrifugenröhrchen gemischt und mit Ethylacetat/Hexan (60:40, v/v) versetzt. Anschließend werden 10 g Probe hinzugegeben, das Röhrchen wird geschüttelt. Der folgende SPE-Schritt wird mit Hilfe einer Silicagel-SPE-Säule (Supelco) durchgeführt. Wie oben beschrieben ist die Verwendung von Kieselgelsäulen für die zu entwickelnde Methode ungeeignet.

Aus den dargestellten Publikationen lassen sich einige **Forschungsansätze** für die angestrebte online-SPE-Analyse herausziehen:

- Für den Festphasenextraktionsschritt eignen sich beispielsweise monolithische Phasen wie Styrol-Divinylbenzol-(SDB) oder N-Vinylpyrrolidon-Divinylbenzol-Copolymere (OASIS HLB), s.u.
- Auch RP 18-Material könnte gemäß Literatur geeignet sein.
- Der Einsatz von Phasen, die unter wässrigen Bedingungen nicht stabil sind, sollte möglichst vermieden werden.
- Der für eine anschließende LC-UV-Analyse wichtige basische Waschschrift kann auch auf einer SPE-Phase durchgeführt werden, so dass eine Übertragung dieses Schritts auf die online-SPE prinzipiell möglich ist.
- Ist eine ausreichende Reinigung durch einen SPE-Schritt nicht möglich, bleibt der Einsatz eines zusätzlichen Flüssig-flüssig-Extraktionsschritts eine Option.

Als erstes wurden verschiedene SPE-Materialien auf ihre Eignung getestet, Patulin aus wässriger Standardlösung zu extrahieren und bei Applikation eines organischen Lösungsmittels wieder freizusetzen.

Geprüft wurde die Eignung der folgenden Phasen: RP 8, RP 18, Amino, Cyano, Florisil und SDB (alle: Baker).

Wie die manuellen Versuche zeigten, lassen sehr apolare Materialien wie RP 18 jedoch das polare Molekül Patulin bereits in wässrigen Lösungen passieren, so dass sie für die angestrebte möglichst quantitative Aufkonzentrierung ungeeignet sind. Auch modifizierte Phasen wie Amino- oder Cyano-Material erwiesen sich als nicht geeignet, da sie ebenso Patulin nicht quantitativ aus Wasser festhalten konnten.

Mit dem so genannten SDB-Material, einem **Styrol-Divinylbenzol-Copolymer**, war hingegen eine Extraktion von Patulin aus wässriger Lösung mit guter Wiederfindung möglich; ebenso funktioniert die Elution von Patulin mit einem wässrig-organischen Lösungsmittelgemisch. Wie spätere Versuche zeigten, lässt sich auch der Carbonat-Waschschrift online bei Einsatz von SDB-Material durchführen, weswegen die weitere Methodenentwicklung mit diesem SPE-Material durchgeführt wurde. Zum Einsatz kam das SDB-Material Bakerbond 7519-02 (Mallinckrodt Baker).

Auf weitere Tests beispielsweise mit OASIS wurde aus Kostengründen verzichtet, da sich SDB als hinreichend geeignet erwiesen hatte.

Styrol-Divinylbenzol-Copolymer (SDB)

SDB gehört zu den so genannten monolithischen Phasen, die durch Polymerisation geeigneter Monomere und Quervernetzer hergestellt werden. Bei SDB wird das Monomer Styrol über den Quervernetzer Divinylbenzol verknüpft. Durch Zugabe von Porogenen wie Wasser, Alkoholen, Toluol oder Alkanen entstehen bei der Polymerisation Poren verschiedener Größe, die einerseits den Fluss der mobilen Phase erlauben, andererseits für die notwendigen chromatographischen Wechselwirkungen sorgen (HUBER, 2005), s. Abb. 4-21 und 4-22.

Monolithische Phasen werden einerseits als stationäre Phase in der Flüssigchromatographie (LC) eingesetzt, andererseits eignen sie sich auch für die Festphasenextraktion (SPE). Sie sind druckstabil und müssen beispielsweise für die SPE-Anwendung nicht konditioniert werden.

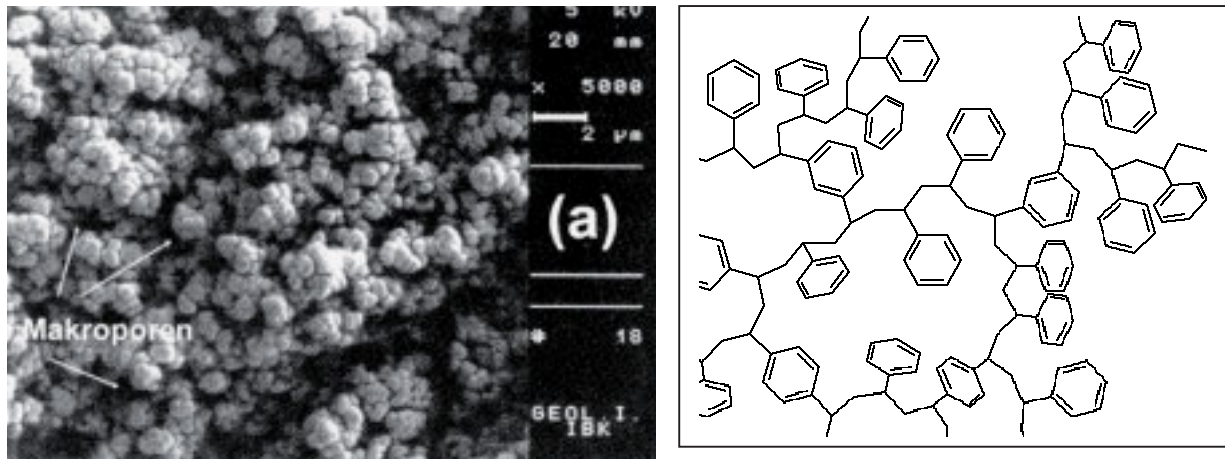


Abb. 4-21 (links). Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Styrol-Divinylbenzol-Copolymers (aus HUBER, 2005)

Abb. 4-22 (rechts). Strukturausschnitt eines Styrol-Divinylbenzol-Copolymers (aus: www.vs-c.de)

Einsatz von SDB zur SPE von Patulin

Aufgrund seiner Molekülstruktur (Abb. 1-7; 1.4.2) verfügt Patulin über mehrere Möglichkeiten, mit stationären Phasen in Wechselwirkung zu treten:

- polare Wechselwirkungen (Sauerstoffatome)
- Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoff-Brücken
- π - π -Wechselwirkungen über delokalisierte Elektronen (ungesättigtes Lacton)
- apolare Wechselwirkungen

Es wird vermutet, dass bei der Adsorption an SDB-Material (Abb. 4-22) die folgenden Wechselwirkungen eine Rolle spielen:

- apolare Wechselwirkungen
- π - π -Wechselwirkungen mit Phenylresten
- in geringen Umfang Wasserstoff-Brücken mit C-H-Bindungen

Wiederfindung

Ein Vergleich der Peakfläche des direkt in die LC injizierten Kalibrierstandards Patulin-Ref₁ (s. 3.2.7) mit der des per online-SPE-LC analysierten Standards Patulin-RefM₁ (3.2.3.3) (Tab. 4-21) zeigt die sehr gute Wiederfindung für Patulin auf der SDB-Kartusche. Die relative Peakfläche des online-Standards liegt nur 2,2 % niedriger als die relative Peakfläche des Routine-offline-Standards, d.h. im Rahmen der zu erwartenden Messunsicherheit. Somit tritt kein nennenswerter Analytverlust beim online-SPE-Schritt auf.

Tab. 4-21. Vergleich der Peakflächen online und offline injizierter Standard

	Standard-lösung	c (Patulin) [µg/L]	Injiziertes Vol. [µL]	Inj. Menge Patulin [ng]	Peakfläche [FE]	Peakfläche/Patulin [FE/ng]
online	Patulin-RefM ₁	20	500	10	57467	5746,7 (97,8 %)
offline	Patulin-Ref ₁	100	50	5	28107	5621,4 (100 %)

4.2.2 Probenextraktion

Patulin ist als polares Molekül sehr gut in wässrigen Lösungen löslich (MERCK, 2006). Somit ist ein Zusatz von organischen Lösungsmitteln zur Extraktion des Analyten aus der Matrix nicht erforderlich. Üblicherweise reicht ein Lösen der Probe mit Wasser bzw. kann eine flüssige Probe wie Saft direkt eingesetzt werden. Bei Konzentraten ist gegebenenfalls ein Verdünnen mit Wasser auf eine bestimmte Saftstärke (Brix) sinnvoll.

Die meisten Analysemethoden für Patulin, auch sog. offizielle wie die deutsche ASU § 64 LFGB L 31.00-20 (BVL, Stand Dez. 2004), setzen jedoch einen Flüssig-flüssig-Extraktionsschritt (Liquid-liquid partitioning – LLP) im Rahmen der Probenvorbereitung ein (vergl. 1.4.7.1 und 2.2.2.1; SHEPHARD et al., 2000; MOAKE et al., 2005). Dabei wird die Probe zumeist mehrfach mit Ethylacetat ausgeschüttelt, teilweise bis zu dreimal. Ebenso wird beim Waschschrift mit Carbonatlösung erheblicher manueller Aufwand (Waschen der organischen Phase, Extrahieren der Waschlösung) betrieben.

Wie in der Problemstellung (2.2.2) dargelegt, sollte auf den hier beschriebenen Extraktionsschritt möglichst verzichtet werden. Im Verlauf der Methodenentwicklung ist es jedoch nicht gelungen, ohne Flüssig-flüssig-Extraktionsschritt Extrakte zu gewinnen, die sauber genug für eine anschließende online-SPE-LC-Analyse sind. Auch bei langen online-Waschschriften mit Wasser und Carbonatlösung (länger als 2,5 min) war es nicht möglich, die Probenlösungen so weit aufzureinigen, dass störungsarme Chromatogramme erzielt werden konnten.

Aus diesem Grund wurde nach einem möglichst einfach durchzuführenden, aber dennoch effektiven Extraktionsschritt gesucht.

Flüssig-flüssig-Extraktion vs. Extrelut®

Zur Vereinfachung der Flüssig-flüssig-Extraktion bietet sich die Durchführung dieses Schritts mittels Extrelut®-Säulen (Merck) an. Hierbei wird die Probenlösung auf die Säule gegeben. Nach kurzer Einwirkzeit wird mit einem organischen Lösungsmittel (hier: Ethylacetat) eluiert. Dieser organische Extrakt kann weiterbearbeitet werden. Somit bietet die Extrelut®-Säule die Möglichkeit, Flüssig-flüssig-Extraktionen vereinfacht mittels Säulen durchzuführen.

Im Rahmen der Doktorarbeit wurden mit Extrelut®-Säulen allerdings „dreckigere“ Extrakte als mit der klassischen LLP erhalten. Darüber hinaus sind Extrelut®-Säulen Einwegartikel, deren Kosten gerade bei höheren Probenzahlen deutlich ins Gewicht fallen würden.

Vereinfachung des Extraktionsschritts

Bereits bei der Übertragung der klassischen offline-Patulin-Methode (LC-UV nach Flüssig-flüssig-Extraktion) auf den Labor-Routinebetrieb wurde der zeit- und personalaufwändige Extraktionsschritt vereinfacht: Statt bis zu drei Extraktionen wird nur eine Extraktion mit Ethylacetat durchgeführt. Ebenso wird auf das Rückextrahieren der basischen Waschlösung verzichtet.

Zur besseren Quantifizierung (Wiederfindung bei externer Kalibrierung ca. 70 – 75 %) wird mit Matrixkalibration gearbeitet, d.h. eine unbelastete Probe derselben Art wird parallel mit-analysiert und als Kalibrierstandard genutzt. Dieses Verfahren bedeutet zwar mehr Aufwand bei der instrumentellen Analytik, dieser Nachteil wird jedoch durch die stark vereinfachte Probenvorbereitung ausgeglichen.

Das hier in Kurzform beschriebene Verfahren (vergl. 3.2.7) wurde erfolgreich in zwei LVUs getestet (z-score: -0,4 (Apfelmus, FAPAS 1619), z-score: 0,1 (naturtrüber Apfelsaft, FAPAS 1623), vergl. 4.2.10).

Verbesserte Effizienz des Extraktionsschritts

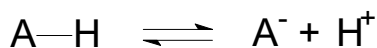
Ein weiteres Ziel war die Verbesserung der Effizienz der Probenvorbereitung, d.h. die weitestgehende Eliminierung von störenden Matrixbestandteilen zu einem möglichst frühen Zeitpunkt im Analysefortschritt.

Bei der LC-UV-Bestimmung von Patulin stören in erster Linie Substanzen, die bei der verwendeten Wellenlänge von 277 nm UV-aktiv sind und im Analysengang nicht entfernt werden. Insbesondere phenolische Substanzen und gegebenenfalls organische Säuren kom-

men in größeren Mengen in Früchten vor und können bei der LC-UV-Analyse zu Interferenzen führen (SHEPHARD et al., 2000). Gemäß BARTOLOMÉ et al. (1994) handelt es sich bei den phenolischen Störsubstanzen u.a. um Furan-2-carbonsäure, Catechin, Kaffeesäure, Chlorogensäure, p-Cumarinchinonsäure, p-Cumarinsäure, p-Cumarylglucose und Epicatechin. Wie von LIEBSTER (2002) und HERRMANN (2001) dargestellt, sind Äpfel reich an sekundären Pflanzenstoffen, darunter vielen Polyphenolen. Der hohe Anteil an sauren Verbindungen wie Chlorogensäure ist auch der Grund für die Durchführung eines basischen Waschschriffs (2.2.2) in praktisch allen Patulin-Methoden.

Folglich wurde nach Möglichkeiten gesucht, saure Verbindungen, die bei dem klassischen basischen Waschschrift entfernt werden, bereits beim Ausschütteln abzutrennen. Als sinnvoller Weg wurde dabei die Einstellung des ursprünglich sauren pH-Werts der Probe auf praktisch neutrale Werte angesehen.

Gemäß der Gleichgewichtsreaktion



Gleichung 4-14 (aus BLASCHETTE, 1993) (mit A: beliebiges Säureanion)

führt ein Anheben des pH-Werts und damit ein Entfernen von Protonen aus dem Gleichgewicht zu einer Verschiebung der in Gleichung 4-14 dargestellten Gleichgewichtsreaktion auf die rechte Seite. Damit liegt in einem annähernd neutralen Medium ein Großteil der Säuren deprotoniert und somit in ionischer Form vor. Aufgrund der höheren Polarität verbleiben diese Verbindungen in der wässrigen Phase und werden nicht mehr mit der Ethylacetat-Phase extrahiert. Patulin als neutrales Molekül wird hingegen von einer pH-Wert-Einstellung nicht beeinflusst, so lange das Mykotoxin nicht zu lange alkalischen Bedingungen ausgesetzt wird, unter denen es nur begrenzt stabil ist (1.4.2).

Der positive Effekt einer Neutralisierung vor der Extraktion wurde bereits bei der Bearbeitung komplexer Matrices wie Zitronensaftkonzentrat in der Routineanalytik festgestellt, wo erst eine pH-Wert-Einstellung zu auswertbaren Chromatogrammen führte.

Für die angestrebte pH-Wert-Einstellung kamen prinzipiell zwei Verfahren in Frage:

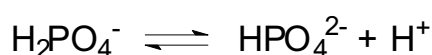
- manuelle Neutralisierung jeder einzelnen Probe mittels Lauge (bevorzugt: Natronlauge) und pH-Meter
- Verwendung eines Puffers zur pH-Wert-Einstellung

Das letztgenannte Verfahren ist dabei deutlich einfacher und schneller in der Handhabung, darüber hinaus sind Substanzverluste, die beim manuellen pH-Messen kaum zu vermeiden sind, ausgeschlossen. Auf der anderen Seite bietet das erste Verfahren den Vorteil der individuellen Behandlung jeder einzelnen Probe.

Gemäß dem Schweizerischen Lebensmittelbuch (Hrsg.: BUNDESAMT FÜR GESUNDHEIT, 2004) Kap. 28A, Tab. 28.3, weist beispielsweise Apfelsaft einen pH-Wert von 2,9 bis 4,6 auf. Ziel für eine effektive Extraktion sollte ein annähernd neutraler pH-Wert im Bereich pH 6 bis 7 sein. Hierfür wurde ein Puffersystem entwickelt, mit dem die flüssige Probe verdünnt bzw. in dem die feste Probe gelöst wird.

Zum Einsatz kommt dabei ein Phosphatpuffer pH 7 oder pH 8, c = 100 mmol/L. Für Apfelsaft reicht der pH 7-Puffer, bei sehr sauren Früchten muss gegebenenfalls auf den basischen Puffer ausgewichen werden. Gemäß KROMIDAS (1997, S. 95) eignen sich Phosphatpuffer für den in Frage stehenden pH-Bereich von pH 6 bis 7.

Der Puffer wird aus Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat mit einer Konzentration von 100 mmol/L hergestellt. Der pH-Wert wird mit verdünnter Phosphorsäure (14 %ig) auf pH 7 bzw. pH 8 eingestellt. Hierdurch ergibt sich das folgende Puffersystem:



Gleichung 4-15 (nach BLASCHETTE, 1993, S. 202)

Beim Mischen dieses Puffers mit einer sauren Probelösung (= Zufügen von freien Protonen H^+) verschiebt sich das Gleichgewicht auf die linke Seite, Protonen werden aus dem Gleichgewicht entfernt, vorhandene saure Substanzen wie Phenole und Fruchtsäuren dissoziieren nach (s. Gleichung 4-14) und liegen verstärkt ionisch vor.

Entwicklung der Pufferzusammensetzung

Zum Finden der geeigneten Pufferzusammensetzung wurde die Probe (hier: Apfelsaft) zuerst mit verschiedenen Puffervolumina gemischt. Wie Tab. 4-21 zeigt, ergibt sich bei einem Verhältnis von 4 mL Puffer (100 mM, pH 7) und 1 mL Apfelsaft ein praktisch neutraler pH-Wert. Dieses Verhältnis von Probe zu Puffer wurde als geeignet für die weitere Methodentwicklung angesehen.

Tab. 4-22. Einfluss verschiedener Puffermengen auf den pH-Wert von Probelösungen

Apfelsaft [mL]	Phosphatpuffer pH 7 (100 mmol/L) [mL]	pH-Wert der Mischung
1	4	6,6
2	3	5,3
2,5	2,5	4,6

Zur Ermittlung der geeigneten Pufferkonzentration wurden drei verschiedene Konzentrationen des pH 7-Puffers hergestellt: 50, 100 und 150 mmol/L. Wie Tab. 4-23 zeigt, ist der Unterschied zwischen dem 100 und 150 mM-Puffer relativ klein, während sich der 50 mM-Puffer als zu schwach erwies, um bei einer sehr sauren Probe wie Heidelbeeren eine annähernde Neutralisierung zu erreichen.

Tab. 4-23. Einfluss verschiedener Pufferstärken (pH 7) auf den pH-Wert von Probelösungen

Zugegebener Phosphatpuffer	+ 4 mL Puffer pH 7, 50 mM	+ 4 mL Puffer pH 7, 100 mM	+ 4 mL Puffer pH 7, 150 mM
Probe	Resultierender pH-Wert	Resultierender pH-Wert	Resultierender pH-Wert
Apfelsaft ¹ (1 mL)	6,5	6,9	6,9
Heidelbeermus (1 g)	5,6	6,2	6,7

¹ andere Charge als der in Tab. 4-22 aufgeführte Saft

Wie der Versuch mit den verschiedenen Pufferstärken zeigte, könnte die Pufferwirkung des für Apfelsaft geeigneten Phosphatpuffers (pH 7, 100 mM) für andere Matrices nicht ausreichend sein. Deswegen wurde für solche Matrices zusätzlich die Verwendung eines auf pH 8 eingestellten sowie eines konzentrierteren (150 mM) Puffers geprüft; die Ergebnisse sind in Tab. 4-24 zusammengestellt. Es zeigte sich, dass mit dem konzentrierteren Puffer kaum höhere pH-Werte als mit dem „normal konzentrierten“ (100 mM) erreicht werden. Interessanterweise zeigten die Chromatogramme, die bei Verwendung des konzentrierten Puffers erzielt wurden, sogar mehr störende Matrix. Möglicherweise steht durch die höhere Ionenstärke in der wässrigen Phase weniger Wasser zur Solvatisierung der Ionen zur Verfügung, so dass mehr Matrix in die organische Phase extrahiert wird. Die Verwendung des schwach basischen Puffers hingegen bringt fast neutrale pH-Werte der resultierenden Probelösung.

Tab. 4-24. Einfluss verschiedener Puffer-pH-Werte auf den pH-Wert von Probelösungen

Zugegebener Phosphatpuffer	+ 4 mL Puffer, pH 7, 100 mM	+ 4 mL Puffer pH 7, 150 mM	+ 4 mL Puffer pH 8, 100 mM
Probe	Resultierender pH-Wert	Resultierender pH-Wert	Resultierender pH-Wert
Heidelbeermus (1 g)	6,2	6,2	6,5
Aprikosenmus (1 g)	5,6	5,7	6,4

Tab. 4-25. Vergleich der pH-Werte von Apfelsaft mit Wasser zu Apfelsaft mit Puffer

	pur	+ 4 mL Reinstwasser	+ 4 mL Puffer pH 7, 100 mM	+ 4 mL Puffer pH 8, 100 mM
Probe	Resultierender pH-Wert	Resultierender pH-Wert	Resultierender pH-Wert	Resultierender pH-Wert
1 mL Apfelsaft	3,43	3,43	6,66	7,22

Den großen Effekt der Pufferzugabe verdeutlicht Tab. 4-25: Der Zusatz vom pH 7-Puffer zum Apfelsaft bewirkt annähernd eine Neutralisierung des pH-Werts der resultierenden Lösung, während nur mit Wasser verdünnter Apfelsaft weiterhin einen deutlich sauren pH-Wert aufweist. Bei Zusatz des pH 8-Puffers erhält man sogar eine schwach basische Lösung. Die Auswirkungen auf den anschließenden Extraktionsschritt zeigt Abb. 4-23, vergl. auch die folgenden Ausführungen.

An dieser Stelle stellt sich die Frage, warum Saft einen geringeren Säuregehalt als die getesteten Frucht-Rohwaren hat. Möglicherweise verbleiben saure Bestandteile im Pressrückstand bei der Safterstellung, so dass nicht die komplette Säure in den Saft übergeht. Untersuchungen von MARKOWSKI et al. (2006) zeigen, dass der Polyphenol-Gehalt bei der Produktion von klarem Apfelsaft gegenüber Äpfeln und naturtrüben Apfelsaft signifikant abnimmt, was die obige These unterstützt. Ebenso ist es möglich, dass säurearme Züchtungen bevorzugt für die Saftproduktion eingesetzt werden.

Aus den präsentierten Ergebnissen ergibt sich in der Praxis die Verwendung der folgenden Puffersysteme:

Fruchtsäfte (wie Apfelsaft):

1 mL Probe wird in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert und mit 4 mL Phosphatpuffer pH 7 (100 mmol/L) verdünnt, bevor die Probe mit 5 mL Ethylacetat extrahiert wird (3.2).

Feste Fruchtproben (Apfelmus, Rohwaren, Konfitüre etc.)

1 g Probe wird in ein Zentrifugenröhrchen eingewogen und in 4 mL Phosphatpuffer pH 8 (100 mmol/L) gelöst, bevor die Probe mit 5 mL Ethylacetat extrahiert wird (3.2).

Den bemerkenswert großen Effekt der Pufferzugabe verdeutlicht Abb. 4-23, die das Chromatogramm einer dotierten Apfelsaft-Probe mit und ohne Einsatz des Puffers zeigt (Aufarbeitung und Analyse wie unter 3.2 beschrieben). Während bei Verwendung des Puffers ein Chromatogramm erzielt wird, das weitgehend frei von Interferenzen ist, ist das Chromatogramm der Probe ohne Pufferzugabe „überfahren“, so dass keine Auswertung möglich ist.

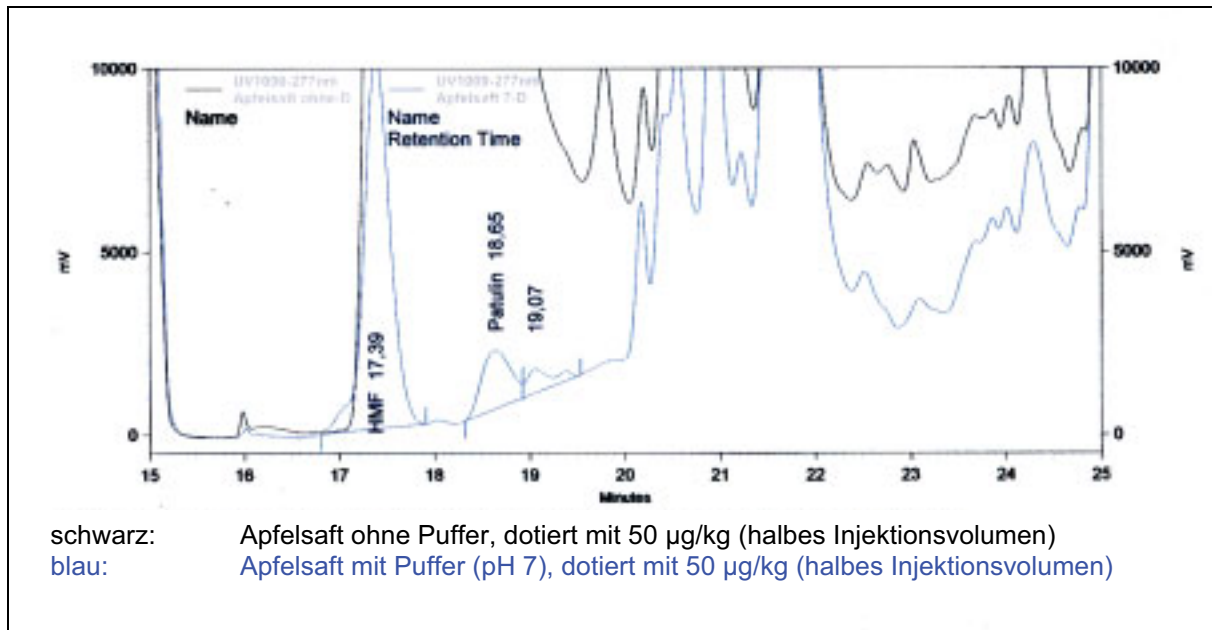


Abb. 4-23. Vergleich Chromatogramm nach Aufarbeitung mit und ohne Puffer pH 7

Wie oben erwähnt eignet sich der schwach basische Phosphatpuffer (pH 8, 100 mmol/L), um saurere Früchte weitgehend zu neutralisieren. Die sich im Endeffekt ergebenden pH-Werte der Lösungen (Tab. 4-22 bis 4-25) liegen bei Verwendung des neutralen wie auch des basischen Puffers im neutralen bis schwach sauren Bereich, so dass keine Patulin-Verluste aufgrund eines zu hohen pH-Wertes der Lösung zu befürchten sind.

Sollte das Chromatogramm einer Probe trotz Pufferung zu viele Interferenzen aufweisen, können diese Probleme durch manuelle Neutralisierung der Probenlösung behoben werden – sofern die Ursache der hohe Säuregehalt der Probe ist.

4.2.3 Waschschrift

Mit dem beschriebenen Extraktionsschritt nach Neutralisierung (4.2.2) lassen sich viele potenzielle Störsubstanzen eliminieren. Zur weiteren Aufreinigung ist die Verwendung eines basischen Waschschrifts empfehlenswert. Dieser Waschschrift ist Bestandteil fast aller Aufreinigungsverfahren mit Flüssig-flüssig-Extraktion (vergl. 2.2.2) und kann auch in Verbindung mit einer Festphasenextraktion eingesetzt werden (EISELE et al., 2003; TRUCKSESS et al., 1999, 2001).

Für diesen basischen Waschschrift wird praktisch durchgängig wässrige Natriumcarbonatlösung (Na_2CO_3) eingesetzt, zumeist in einer Konzentration von 1,0 oder 1,5 %. Bei der LLP wird die Ethylacetatphase mit der Carbonatlösung ausgeschüttelt, bei der SPE wird die Lösung über die Festphasenextraktions-Säule gegeben. Dieser Schritt birgt die Gefahr von Analytverlusten aufgrund der beschriebenen Instabilität von Patulin im basischen Milieu (1.4.2).

Mit der beabsichtigten Übertragung auf die online-SPE wird dieser Gefahr wirkungsvoll begegnet, da sowohl Standard/Matrixkalibrier- als auch Probelösungen über dasselbe online-SPE-Programm analysiert werden. Zum einen wird dadurch jede Probe gleich behandelt (Dauer des Waschschrifts ist immer identisch), was bei einer manuellen Durchführung kaum gewährleistet werden kann, so dass unterschiedlich lange Waschschrift auftreten können. Zum anderen wird der Waschschrift nicht nur wie bei anderen Verfahren auf die Proben angewendet, sondern auch auf die Standard- und Matrixkalibrierlösungen. Hieraus folgt, dass eventuell auftretende Verluste Standards und Proben gleichmäßig betreffen, was für eine automatische Wiederfindungskorrektur sorgt.

Mit Hilfe der online-SPE-Einheit SP 3000 wird die auf der SDB-Kartusche festgehaltene Probe 1,5 min lang mit 1,5 %iger Natriumcarbonat-Lösung gewaschen (Tab. 4-26, Schritt 3). Längere Waschschrte oder höhere Konzentrationen an Carbonat führten in den durchgeführten Experimenten zu nennenswerten Verlusten an Analyt.

Der in Abb. 4-24 dargestellte Chromatogrammvergleich für die Probe „Apfelsaft, dotiert mit 50 µg/kg“ zeigt hingegen die „Unschädlichkeit“ des Carbonatwaschschrts unter den beschriebenen Bedingungen: Der Patulinpeak ist in beiden Chromatogrammen (mit und ohne Carbonatwaschschr) praktisch gleich groß, d.h. der Reinigungsschr führt zu keinem nennenswerten Patulinverlust. Weiterhin wird der direkt hinter Patulin eluierende Störpeak kleiner, was die Quantifizierung verbessert.

Der Unterschied zwischen den Chromatogrammen ist in dieser Beispielmatrix relativ klein, d.h. viele störende saure Substanzen wurden bereits beim Extraktionsschr mit Ethylacetat abgetrennt. Setzt man jedoch andere Matrices wie dunkle Früchte (z.B. Heidelbeeren) ein, so ist der Reinigungseffekt deutlich größer.

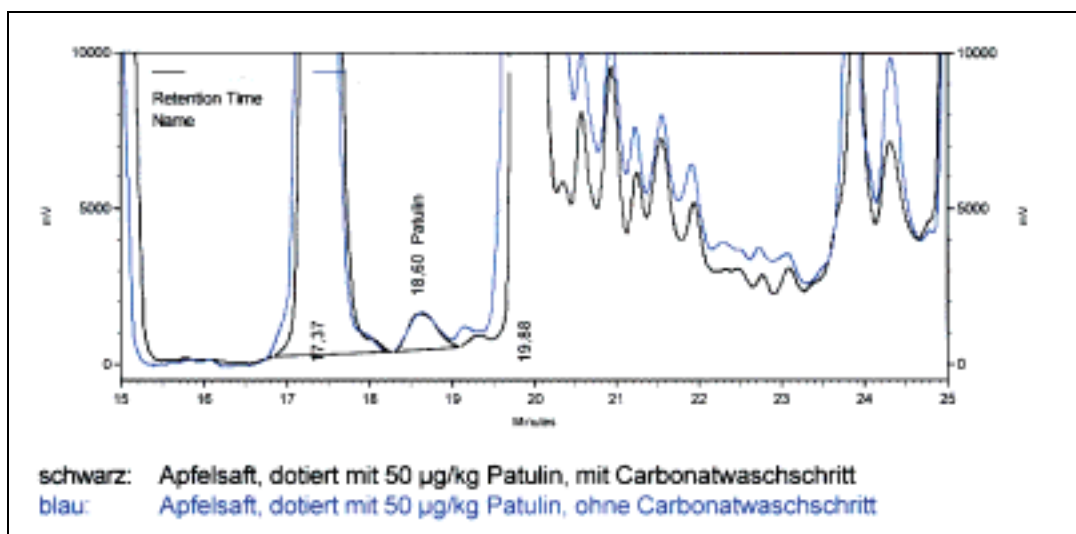


Abb. 4-24. Vergleich Chromatogramm mit und ohne online-Waschschr

Zusammenfassend konnten die folgenden online-SPE-Bedingungen als geeignet ermittelt werden:

Tab. 4-26. SP 3000: Schaltprogramm

Schritt	Zeit [min]	Line [%]				Event ¹	Fluss [mL/min]	Bemerkung
		A	B	C	D			
1	0.0	0	100	0	0	0000 0000	0,4	Injektion
2	5.0	0	100	0	0	0000 0000	0,4	
3	5.1	0	0	0	100	0000 0000	0,4	Waschschr mit Natriumcarbonat-Lsg.
4	6.5	0	0	0	100	0000 0000	0,4	
5	6.6	0	100	0	0	0000 0000	0,4	
6	10.0	0	100	0	0	0010 0000	0,4	Transfer auf LC-Säule
7	10.1	100	0	0	0	0010 0000	0,4	
8	20,0	100	0	0	0	0000 0000	0,4	Reinigung der SDB-Kartusche
9	25.0	100	0	0	0	0000 0000	0,4	
10	25.1	0	100	0	0	0000 0000	0,4	Rekonditionierung

¹ bei Anschluss Injektionsventil an Pos. 3 und Bypassventil an Pos. 6; 0 = Load-Position, 1 = Inject-Position

Tab. 4-27. SP 3000: Eluentenbelegung (zu Tab. 4-26)

Line	Lösung
A	Methanol
B	Acetatpuffer pH 4
C	Frei
D	Natriumcarbonat-Lösung 1,5 %

Die in Tab. 4-26 dargestellten Schritte laufen bei der online-SPE wie folgt ab (vergl. 1.6):

- Schritt 1 und 2: Die vom Autosampler injizierte Probelösung wird mit Acetatpuffer (pH 4) 5 min lang auf die SDB-Kartusche aufgespült und mit dem Puffer gewaschen (s. auch Abb. 1-16).
- Schritt 3 und 4: Es folgt der 1,5-minütige Waschschrift mit Carbonatlösung.
- Schritt 5 und 6: Die Kartusche wird erneut mit Acetatpuffer gewaschen, um Reste der basischen Carbonatlösung zu entfernen und für ein saures Milieu zu sorgen.
- Schritt 6 und 7: Nach Schaltung des Ventils 1 fließt der LC-Eluent über die SDB-Kartusche und transferiert den Analyten dabei auf die LC-Trennsäule (s. 4.2.4 und Abb. 1-17).
- Schritt 8 und 9: Das Ventil 1 schaltet in die Ausgangsposition zurück, die SDB-Kartusche wird mit Methanol gewaschen, um verbliebene Störsubstanzen zu entfernen (Abb. 1-16). Dabei wird die Kartusche hinreichend gereinigt, wie das Chromatogramm eines Blindlaufs (Abb. 4-25) zeigt.
- Schritt 10: Die Probenvorbereitungseinheit fördert Acetatpuffer und re-equilibriert so das SDB-Material für die nächste Analyse.

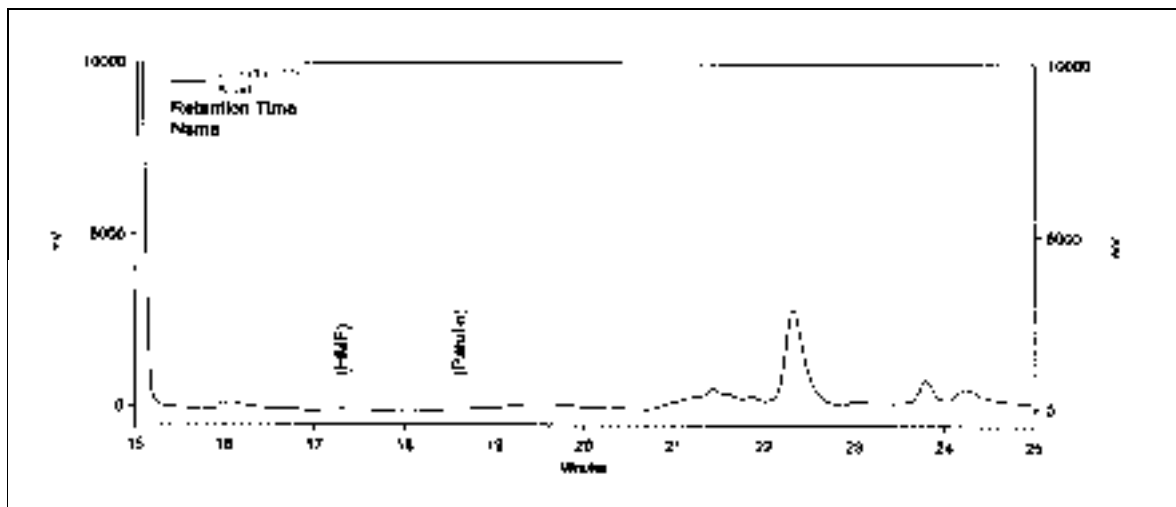


Abb. 4-25. Chromatogramm Blindlauf (Injektion von Acetatpuffer, pH 4)

MycoSep-Vorkartusche: Eine Möglichkeit zur weiteren online-Aufreinigung?

Im Rahmen der Übertragung der SPE-Aufarbeitung auf die Probenvorbereitungseinheit wurden verschiedene Möglichkeiten einer erweiterten online-Aufarbeitung geprüft. Beispielsweise ist es denkbar, das Prinzip der MycoSep-Aufarbeitung (1.4.7.7) online anzuwenden. Hierzu wird eine zweite Kartusche mit geeignetem MycoSep-Material gefüllt und mit Hilfe des Bypassventils des SP 3000 in die online-Probenvorbereitung eingebaut. Der Autosampler injiziert dabei die Probelösung via MycoSep-Kartusche auf die SDB-Kartusche. Im Idealfall passiert Patulin die MycoSep-Vorkartusche praktisch quantitativ, während störende Matrixkomponenten von der Vorkartusche festgehalten werden.

MycoSep-Multifunktionssäulen werden von der Fa. Romer Labs (Vertrieb: Coring, Gernsheim) in verschiedenen Varianten hergestellt, die auf die Anforderungen für die jeweilige

Applikation abgestimmt sind. Beispielsweise werden nach der AOAC-Methode 975.36 (AOAC, 1995) Säulen für die Aflatoxin-Bestimmung u.a. mit folgenden Chemikalien gefüllt: Florisil (Magnesiumsilikat), Silikagel und Calciumsulfat. Gemäß der AOAC-Methode 994.08 (auch: TRUCKSESS et al., 1994) enthalten MycoSep-Säulen für die Aflatoxin-Bestimmung Umkehrphasen-, Ionenausschluss- und Ionenaustausch-Materialien.

Nach Herstellerangaben kommen für Patulin zwei MycoSep-Säulen in Frage: MycoSep 226 („Patulin“) und 228 („AflaPat“). Beide Säulen werden auch für andere Mykotoxin-Bestimmungen (Aflatoxine, Zearalenon) eingesetzt. Diese beiden Materialien wurden für eine online-Vorreinigung getestet. Da die Füllung von MycoSep-Säulen aus verschiedenen Schichten besteht, wurden die Schichten einzeln sowie in Mischung getestet. Zwar konnten dabei Teilerfolge erzielt werden, jedoch verhinderten die folgenden Schwierigkeiten den dauerhaften Erfolg:

- die Eigenschaften der Säulen variieren augenscheinlich von Charge zu Charge
- teilweise blieb Patulin aus wässriger Probelösung auf der Säule hängen (nach Herstellervorgaben wird die Probe mit Acetonitril ausgeschüttelt und die organische Phase über die MycoSep-Säule gegeben)
- mit steigender Anzahl an analysierten Proben verschmutzte die MycoSep-Vorkartusche zunehmend, so dass der Reinigungseffekt nachließ

Als Fazit bleibt festzuhalten, dass der Einbau einer MycoSep-Vorkartusche prinzipiell in Betracht gezogen werden kann. Allerdings ist es im Rahmen dieser Arbeit nicht gelungen, eine geeignete Kombination aus MycoSep-Material und Applikationsbedingungen zu finden, unter denen eine stabile Durchführung der Analyse möglich war.

4.2.4 Elution

Im Gegensatz zur Aflatoxin-Analyse (4.1.4) ist bei Patulin der Einsatz des Bypass-Ventils zur Erhöhung der Elutionskraft nicht erforderlich. Vielmehr reicht der organische Anteil des Eluenten aus, um Patulin von der Kartusche auf die LC-Trennsäule zu spülen. Wie aus Tab. 4-26 ersichtlich, schaltet das Ventil 1 der Probenvorbereitungseinheit nach 10,0 min, so dass der LC-Eluent über die SPE-Kartusche fließt. Mit diesem Schritt beginnt die Elution und zugleich die chromatographische Trennung.

Die Schaltung erfolgt dabei im Backflush-Modus (Abb.1-17), d.h. die Fließrichtung über die SPE-Kartusche während des Probentransfers auf die Trennsäule ist umgekehrt wie bei der Probeninjektion auf die Kartusche. Der Vorteil liegt darin, dass der als enges Band an einem Ende der Kartusche konzentrierte Analyt bei der Elution auch als enges Band auf die Trennsäule transferiert wird und keine Vortrennung auf der SPE-Kartusche erfährt.

Zum Schaltzeitpunkt besitzt der LC-Eluent (Tab. 4-28) eine Zusammensetzung von 90 % Wasser und 10 % Acetonitril. Dieser organische Anteil reicht aus, um den polaren Analyten Patulin vom SDB-Material zu eluieren.

Tab. 4-28. LC-Gradient für die online-SPE-LC-Bestimmung von Patulin

Zeit [min]	Wasser [%]	Acetonitril [%]	Fluss [mL/min]	Bemerkung
0	90	10	0,8	
10	90	10	0,8	
20	70	30	0,8	
25	10	90	0,8	Spülschritt
27	10	90	0,8	
30	90	10	0,8	
35	90	10	0,8	

Ein Vergleich mit anderen Publikationen bestätigt, dass bereits geringe Anteile an organischen Lösungsmitteln ausreichen, um Patulin vom RP-Material zu eluieren. TRUCKSESS et al. (1999) beispielsweise arbeiten mit 0,05 % wässriger Trifluoressigsäure/Acetonitril-Lösung 98:2 (v/v) zur Elution bei Verwendung einer RP 18-Trennsäule; die offizielle Methode ASU § 64 LFGB L 31.00-20 (BVL, Stand Dez. 2004) arbeitet mit Wasser/Acetonitril 95:5 (v/v), angesäuert mit Perchlorsäure, ebenfalls in Kombination mit einer RP 18-Trennsäule.

Das Hochfahren des organischen Anteils beginnt praktisch zeitgleich mit dem Transfer des Analyten von der online-SPE-Einheit auf die LC-Trennsäule.

4.2.5 Chromatographische Trennung

Die chromatographische Trennung der Probenextrakte muss bei der Patulin-Analyse in erster Linie für zwei Dinge sorgen (vergl. SHEPHARD et al., 2000):

1. das Abtrennen des chemisch ähnlichen Zuckerabbauprodukts Hydroxymethylfurfural (HMF) (Struktur: Abb. 1-8), das in den meisten in Frage kommenden Matrices (Apfelsaft, Apfelmus, Konfitüre, sonstige Frucht-Verarbeitungsprodukte) vorkommt
2. die Abtrennung von phenolischen Störsubstanzen, die nicht während der Probenvorbereitung entfernt werden konnten (s. auch BARTOLOMÉ et al., 1994)

Das für die Patulin-Analytik bevorzugt eingesetzte Säulenmaterial ist das in der LC häufig verwendete RP 18-Material. Neben den beiden unter 4.2.4 genannten Verfahren wird es unter anderem eingesetzt von den genormten Methoden der AOAC (Methode 995.10, 1995) und des Schweizerischen Lebensmittelbuchs (BUNDESAMT FÜR GESUNDHEIT, 2004), Kap. 54, 1.3.3. Weitere Beispiele sind der von BRAUSE et al. (1996) beschriebene AOAC-Ringversuch, die Publikationen von GÖKMEN et al. (1996, 1999) oder von BARTOLOMÉ et al. (1994). Als Eluenten kommen zumeist Gemische aus Wasser und Methanol oder Acetonitril zum Einsatz, die gelegentlich auch angesäuert werden.

In der offline-Routineanalytik (3.2.7) wurde bei APPLICA allerdings vor einiger Zeit von RP 18- auf RP 8-Säulen umgestellt, ebenso wurde Acetonitril an Stelle von Methanol als organischer Anteil eingesetzt. Die Kombination einer polareren Säule mit einem organischen Lösungsmittel mit höherer Elutionskraft (vergl. MEYER, 1992) führt zu einer deutlich besseren Trennung von Patulin und HMF.

Für die neu entwickelte online-SPE-Methode war die Variation von Säulenmaterial und LC-Eluent nur eingeschränkt möglich. Die Ursache hierfür liegt in der online-SPE-Probenvorbereitung, bei der bereits ein gewisser organischer Anteil zur vollständigen Elution des Analyten vorhanden sein muss. Somit ist man bei der Wahl der Anfangsbedingungen nicht frei. Im vorliegenden Fall ist ein Acetonitril-Anteil von 10 % im Eluenten zu Beginn der Trennung vorgegeben. Ein geringerer organischer Anteil im Eluenten sorgte im Experiment für eine unscharfe Elution, die entsprechend zu verschleppten Peaks mit unsymmetrischer Form führt. Die Verwendung der in der offline-Analytik bewährten RP 8-Säule (Chromatographie-Service, Langerwehe) erwies sich als ungeeignet für diese Bedingungen, ebenso waren gute Trennungen von Patulin und phenolischen Interferenzen mit folgenden Materialien nicht möglich: RP 18, PRP-1 (Polystyrol-Divinylbenzol, s. 4.2.3) (beide Chromatographie-Service) und Pursuit 5 U PFP (Varian). Während die Trennung von HMF und Patulin mit den meisten Säulenmaterialien gelang, erwies sich die Trennung von Patulin und phenolischen Matrixpeaks als schwierig. Auch die Variation des Eluenten (pH-Wert-Einstellung, Zugabe von Ionenpaarreagenz etc.) brachte nicht die gewünschten Trennerfolge.

Erst mit dem Einsatz einer **Polaris 5 C18-A-Säule** (Varian) wurde eine ausreichende Trennung von Patulin und Störsubstanzen möglich, vergl. Abb. 4-26, die das Chromatogramm eines dotierten Apfelsafts (50 µg/kg) zeigt. In Verbindung mit dem in Tab. 4-28 dargestellten LC-Gradienten und dem online-SPE-Schaltprogramm (Tab. 4-26) eluiert Patulin nach

18,67 min und damit 1,29 min später als HMF (Auflösung $R_s = 1,63$; gefordert nach interner Validierungsvorschrift: min. 0,8). Die später eluierenden Störsubstanzen sind deutlich vom Patulinpeak getrennt. Letzteres war bei den anderen getesteten Säulenmaterialien wie Pur-suit nicht zu erreichen, der Patulinpeak war immer überlagert.

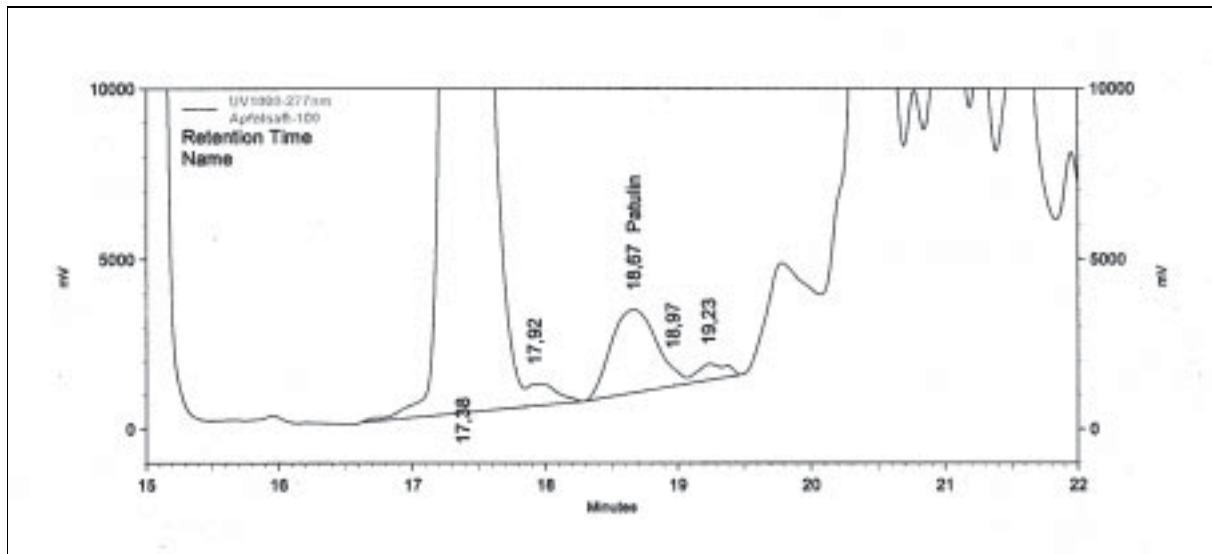


Abb. 4-26. Chromatogramm Probe „Apfelsaft“ (dotiert mit 50 µg/kg Patulin)

Grundsätzlich besteht die Möglichkeit, die Trennung von Patulin und Matrix durch eine Variation des Gradienten weiter zu verbessern. Unter den vorgegebenen Bedingungen (Anfangsgehalt an Acetonitril von 10 %) war jedoch durch diese Variation keine Verbesserung zu erreichen: Entweder wurde der Patulinpeak überlagert oder die Peakform des Patulin verschlechterte sich (Verbreiterung, Tailing). Ebenso wurde die Verwendung von Methanol anstelle von Acetonitril getestet, die jedoch ebenfalls keine Verbesserung der Trennung brachte.

Das in Tab. 4-28 mit „Spülschritt“ vermerkte Hochfahren des organischen Anteils im LC-Eluenten dient der Reinigung der LC-Trennsäule von Matrixsubstanzen. Wie die Proben-Chromatogramme zeigen (Abb. 4-26 und 4-29), werden viele Matrixbestandteile erst bei höherem organischen Anteil in der mobilen Phase eluiert. Ohne diesen Spülschritt würde ein Teil dieser Interferenzen erst in einem der nächsten Läufe von der Säule eluieren und könnte dabei zu Störungen in den folgenden Chromatogrammen führen. Weiterhin dient dieses Entfernen von Matrixsubstanzen der Erhöhung der Lebensdauer der Trennsäule.

Eigenschaften Polaris-Phasen

Die Polaris-Phasen von Varian zeichnen sich gemäß Herstellerangaben (VARIAN, 2005) durch folgende Eigenschaften aus:

- hohe Dichte
- polar-modifizierte Oberfläche
- geeignet für die Analyse sowohl polarer als auch hydrophober Komponenten
- pH-stabil zwischen pH 1,5 und 10
- stabil auch bei hohen Wassergehalten in der mobilen Phase
- unterschiedliche Selektivität im Vergleich zu RP 18-Säulen

Polaris-Phasen gehören zu den „modernen“ LC-Materialien und basieren auf ultrareinem Silika, an das Alkylketten und polare Modifikationen angehängt sind. Hierdurch wird die Oberfläche gut von polaren Eluenten (Wasser, Acetonitril) „durchfeuchtet“. Lt. Hersteller eignen sich Polaris-Phasen gut für die Trennung polarer Komponenten, da diese aufgrund von Interaktionen mit den polaren Modifikationen gut retardiert werden. Diese Interaktionen werden von Varian als „mild“ beschrieben, was zu einer guten Peakform führen soll.

Diese Eigenschaften passen gut auf das Anforderungsprofil für die gesuchte Trennsäule zur online-SPE-LC-Analyse von Patulin:

- Wie beschrieben muss das polare Molekül Patulin von ebenfalls polaren Matrixkomponenten (HMF, Phenole etc.) abgetrennt werden. Somit scheint eine Säule, die besonders gut polare Komponenten retardiert, sehr geeignet.
- Die in der Patulin-Routineanalytik häufig eingesetzten Umkehrphasen (RP 18, RP 8) sind, wie in der Praxis bestätigt werden konnte, nicht besonders widerstandsfähig gegenüber hohen Wasseranteilen, die jedoch zur Retention von Patulin auf der Säule erforderlich sind. Der maximale organische Anteil in den meisten Trennsystemen beträgt 10 % (vergl. 3.2.7). Zwar lässt sich die Lebensdauer durch Spülschritte und Lagerung unter hohem Organik-Anteil verbessern, dieser Effekt ist jedoch begrenzt.
- Ein weiterer Vorteil ist die gute Druckstabilität. In der Patulin-Analytik können hohe Drücke beim „Hochfahren“ des organischen Anteils in der mobilen Phase entstehen, die von einer Polaris-Phase gut vertragen werden.

Ein Nachteil dieser modernen Säule ist der relativ hohe Stückpreis von derzeit ca. € 400, der jedoch von den o.g. Vorteilen, insbesondere der Langlebigkeit der Säule, ausgeglichen wird. Außerdem wird der höhere Säulenpreis durch den stark verringerten Personal- und Materialbedarf in der Probenvorbereitung (vergl. Abb. 4-33) mehr als wettgemacht.

Die unter den verschiedenen Polaris-Phasen gewählte Säule **Polaris C18A** hat laut mündlicher Hersteller-Auskunft Trenneigenschaften ähnlich einer RP 8-Säule. Wie oben dargestellt, erwiesen sich die Trenneigenschaften einer RP 8-Phase in der offline-Analytik als sehr geeignet. Daher schien ein Test dieser Polaris-Säule mit vergleichbaren Trenneigenschaften sinnvoll.

4.2.6 Detektion

Die Methode der Wahl bei der Detektion von Patulin ist die UV-Detektion (MOAKE et al., 2005). Zumeist wird sinnvollerweise eine Wellenlänge im Bereich der maximalen UV-Absorption bei 276,5 nm (MERCK, 2006) eingesetzt. Offizielle und andere publizierte Methoden verwenden beispielsweise:

- 276 nm (ASU § 64 LFGB L 31.00-20 (BVL, Stand Dez. 2004); AOAC 995.10, 1997; TRUCKSESS et al., 1999; EISELE et al., 2003; ARRANZ et al., 2005)
- 275 nm (SLMB, BUNDESAMT FÜR GESUNDHEIT, 2004, Kap. 54, 1.3.3)
- 272 nm (ROVIRA et al., 1993)

In der vorliegenden Arbeit wurde mit der Wellenlänge 277 nm die Einstellung der offline-Routinemethode übernommen. Wie das UV-Spektrum von Patulin (Abb. 4-27) zeigt, sind signifikante Unterschiede in der Empfindlichkeit im Bereich der hier präsentierten Wellenlängen nicht zu erwarten. Zur Nutzung des Spektrums zur Identitätsbestätigung s. 4.2.7.

Die UV-Detektion ist universell einsetzbar und damit relativ unspezifisch, wie die zahlreichen Matrixpeaks im Chromatogramm (Abb. 4-26) zeigen. Als Alternative bietet sich prinzipiell die selektivere Fluoreszenz-Detektion (s. Aflatoxine, 4.1.6) an. Die lt. Literatur (www.chembank.broad.harvard.edu) geeigneten Wellenlängen, darunter die Kombination von 485 nm (Extinktion) und 530 nm (Emission) für die höchste Fluoreszenz-Intensität, wurden experimentell getestet. Jedoch konnte keine Kombination gefunden werden, bei der eine ausreichende Fluoreszenz des Patulin-Moleküls gegeben war.

4.2.7 Auswertung

Identität

Die Identität wird durch den Vergleich der Retentionszeit des Peaks im Probenchromatogramm mit der des Peaks des externen Standards ($c = 20 \mu\text{g/L}$, hergestellt aus zertifiziertem Standardmaterial von biopure, Vertrieb: Coring, Gernsheim) bestimmt. Zur Kontrolle der korrekten Abtrennung des HMFs vom Patulin ist diesem externen Standard HMF in gleicher Konzentration beigemischt.

Quantifizierung

Die Quantifizierung erfolgt mittels der Methode der Matrixkalibrierung, d.h. je zu untersuchender Matrix wird eine vorhandene Leerwertprobe (ohne messbaren Patulingehalt) mit dem Analyten dotiert und analog zu den Proben aufgearbeitet. Mit dieser Probe wird kalibriert. Zur Probeneinwaage von 1 g (1 mL bei flüssigen Proben) werden 50 μL der Patulin-Dotier-Standardlösung gegeben. Dieser Dotierstandard enthält 1 $\mu\text{g/mL}$ Patulin. Somit entspricht der Matrixkalibrierstandard der folgenden Konzentration:

$$c(\text{Patulin}) = 50 \mu\text{g/kg}$$

Wie im Rahmen der Validierung (4.2.9 und 5.2) nachgewiesen wurde, ist dabei eine Einpunkt-Kalibrierung ausreichend, die Erstellung einer Kalibriergerade aus mehreren Standardkonzentrationen bei jeder Messreihe ist nicht erforderlich.

Die Berechnung der Patulin-Konzentration in der Probe erfolgt damit nach folgendem Muster:

$$c(\text{Patulin}) = \frac{c(\text{Matrixkal.} - \text{Std.})[\mu\text{g} / \text{kg}] \times \text{Fläche}(\text{Probe})[\text{FE}] \times F}{\text{Fläche}(\text{Matrixkal.} - \text{Std.})[\text{FE}]} [\mu\text{g} / \text{kg}] \quad \text{Gleichung 4-16}$$

mit	$c(\text{Patulin})$	Konzentration an Patulin in der Probe in [$\mu\text{g/kg}$]
	$c(\text{Matrixkal.}-\text{Std.})$	Konzentration des Matrixkalibrierstandards in [$\mu\text{g/kg}$]
	Fläche (Probe)	Fläche des Patulinpeaks in der Probelösung in [FE] (Flächeneinheiten)
	Fläche (Matrixkal.-Std.)	Fläche des Patulinpeaks in der Matrixkalibrier-Standardlösung in [FE]
	F	Verdünnungsfaktor (bei Abweichungen von der Vorschrift)

Gegebenenfalls kann die Konzentrationsangabe auch in [$\mu\text{g/L}$] erfolgen, sofern bei der Probeneinwaage nach Volumen pipettiert und nicht nach Masse eingewogen wird (z.B. 1 mL statt 1 g).

Im Rahmen der offline-Methodenentwicklung (3.2.7) wurde festgestellt, dass bei der vereinfachten Flüssig-flüssig-Extraktion unbefriedigende Wiederfindungen von rund 70 % erreicht werden. Aus diesem Grund wurde die offline-Analytik erfolgreich auf Matrixkalibrierung umgestellt.

Die Wiederfindungsraten für die online-SPE-LC liegen mit 84,1 bis 91,3 % (3.2.2.8) zwar besser, jedoch wurde auch hier die bewährte Methode der Matrixkalibrierung gewählt, insbesondere vor dem Hintergrund, dass sich die verschiedenen Matrices sehr unterschiedlich verhalten können. So liegt die Wiederfindung in einem trüben Apfelsaft (72,3 %) deutlich unter den oben angegebenen Werten. Durch die Verwendung der Matrixkalibrierung werden diese Unterschiede zwischen den Matrices ausgeglichen.

Bestätigungsmöglichkeiten

Zur Absicherung der Identität bieten sich die folgenden Verfahren an:

- **Dotierung:** Parallel zur eigentlichen Probe wird die Probe nach Dotierung mit dem interessierenden Analyten aufgearbeitet. Eine Peak-Erhöhung des Analyten bei praktisch gleichbleibender Retentionszeit zeigt einen Positivbefund an.
- **UV-Spektrum:** Eine Identitätsabsicherung über das UV-Spektrum wird von einigen Publikationen beschrieben (z.B. GÖKMEN et al., 1999; BARTOLOMÉ et al., 1994). Hierfür wird ein Dioden-Array-Detektor (DAD, auch als PDA bezeichnet) benötigt, der neben der Quantifizierungswellenlänge (hier: 277 nm) ein Spektrum im Wellenlängenbereich von ca. 200 bis 400 nm aufnehmen kann. Ein Vergleich des Spektrums des verdächtigen Peaks mit dem Spektrum eines Patulin-Standards (Abb. 4-27) erlaubt eine Absicherung der Identität und kann helfen, co-eluierende Störpeaks zu erkennen. Allerdings ist das UV-Spektrum der potenziellen Störsubstanz HMF (Abb. 4-28) sehr ähnlich, so dass eine Überprüfung der korrekten Trennung der beiden Komponenten, beispielsweise durch Zugabe von HMF zum Arbeitsstandard, durchaus sinnvoll ist.
- **Verwendung der offline-Methode:** Die Analyse mittels der bewährten offline-LLP-LC-UV-Methode in Anlehnung an ASU § 64 LFGB L 31.00-20 (BVL, Stand Dez. 2004) (3.2.7) ermöglicht ebenfalls eine Absicherung der Befunde. Dabei wird die Probe zwar ebenfalls mit Ethylacetat ausgeschüttelt, jedoch erfolgt der Waschschrift manuell, und es wird eine andere Trennsäule (RP 8 statt Polaris) eingesetzt, so dass die Bestimmung mittels eines anderen chromatographischen Systems erfolgt.
- **LC-MS:** Sofern eine LC-MS-Methode (vergl. 1.4.7.4) zur Verfügung steht, bietet sich die Absicherung der Identität mit dieser selektiven Technik an.

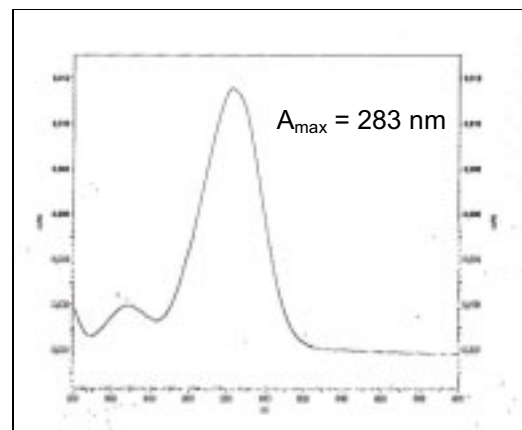
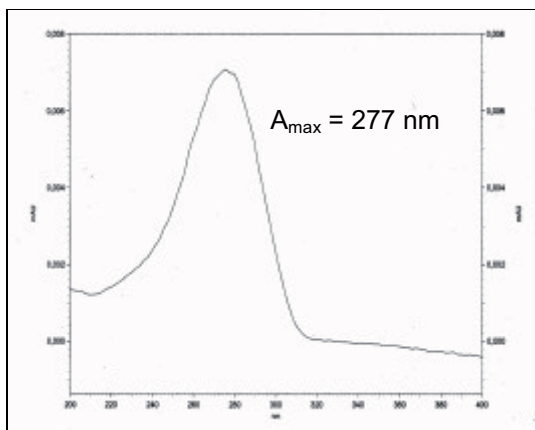


Abb. 4-27 und 4-28. UV-Spektren von Patulin (links) und HMF (jeweils in Wasser)

Qualitätssicherungs-Maßnahmen

In jeder Analysenserie wird eine Qualitätsregelkarten-Probe mit bekanntem Gehalt sowie ein Blindwert (Injektion von Acetatpuffer, pH 4) zur Prüfung auf Verschleppungen analysiert.

4.2.8 Anwendung der Methode

Wie auch bei der Aflatoxin-Methode (4.1.8) war die Anwendbarkeit in der Routineanalytik ausdrückliches Ziel der Entwicklung. Hierfür wurde die Methode an die Laborgegebenheiten bei APPLICA angepasst. Beispielsweise finden sämtliche Schritte der Probenvorbereitung (Lösen, Extraktion, Trocknung, Einkonzentrierung und Wiederlösen) in 16 mL-Zentrifugenröhrchen statt. Durch Verwendung dieser Röhrchen können viele Proben parallel aufgearbeitet werden.

Der hohe Anteil an Einwegartikeln vermeidet Querkontaminationen und dient dem Gesundheitsschutz des Laborpersonals. Durch die Miniaturisierung wird die Menge an eingesetzten Lösungsmitteln reduziert, was den Umweltschutz fördert und Kosten minimiert.

Der Einsatz der Methode im Routinebetrieb zeigt die Anwendbarkeit auch bei anderen Matrices als bei der, die zur Validierung genutzt wurde (Apfelsaft, Abb. 4-26, s. 4.2.9). Die Methode wurde erfolgreich u.a. an folgenden Matrices erprobt:

Früchte wie

- Kirschen (Abb. 4-29)
- Erdbeeren
- Aprikosen

Fruchtprodukte wie

- Apfelmus,
- Konfitüre
- Saftkonzentrate

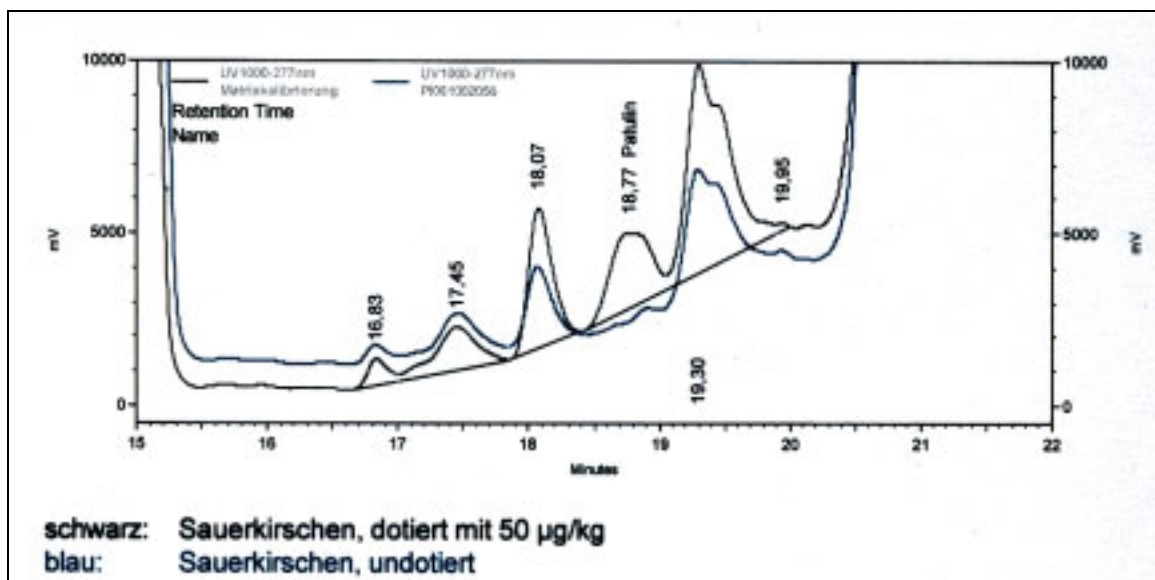


Abb. 4-29. Chromatogramm Sauerkirschen (unbelastet und dotiert mit 50 µg/kg)

Pektin-haltige Proben

In einigen Publikationen, darunter auch in offiziellen Methoden wie ASU § 64 LFGB L 31.00-20 (BVL, Stand Dez. 2004), wird vorgeschrieben, bei pektinhaltigen Proben wie Apfelmus oder naturtrübem Apfelsaft eine Vorbehandlung durchzuführen. Dabei wird das Pektin vor Analysebeginn enzymatisch mit einer Endogalacturonase abgebaut. Hierzu wird die flüssige Probe direkt und die feste Probe nach Lösen in Wasser mit Enzymlösung versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur oder 2 h bei 40 °C stehen gelassen. Diese Behandlung soll einerseits die Wiederfindung für Patulin verbessern, andererseits der Bildung von Emulsionen beim Extraktionsschritt mit Ethylacetat entgegenwirken.

Im Rahmen der Entwicklung der Routine-offline- wie auch der hier präsentierten online-SPE-LC-Methode wurde die Auswirkung einer Pektinase-Behandlung auf den Analysenverlauf und die Wiederfindung geprüft. Dabei kam eine kommerziell erhältliche Endogalacturonase (Fluka) zum Einsatz. Wie die praktischen Erfahrungen zeigten, führt die Enzymbehandlung bei Apfelmus und trübem Apfelsaft tatsächlich zu einer Verringerung der Emulsionsbildung, eine Verbesserung der Wiederfindungsrate konnte jedoch nicht festgestellt werden. Aus diesem Grund wurde darauf verzichtet, den zeitraubenden Pektinase-Abbau in die Prüfvorschrift zu übernehmen, der darüber hinaus eine weitere potenzielle Fehlerquelle darstellt. Beide erfolgreichen Ergebnisse an pektinreichen Matrices bei LVU-Teilnahmen wurden ohne den

Vorbehandlungsschritt erzielt (s. 4.2.2, Vereinfachung des Extraktionsschritts). Außerdem erfolgt eine automatische Korrektur von möglichen Patulin-Verlusten durch die Methode der Matrixkalibrierung. Somit bleibt die Methode auch bei pektinreichen Lebensmitteln trotz dieser Vereinfachung leistungsfähig, wie die erfolgreiche Analyse der LVU-Probe „naturtrüber Apfelsaft“ per online-SPE-LC zeigte (4.2.10).

4.2.9 Validierung und Akkreditierung

Die theoretischen Grundlagen zum Thema „Validierung“ sind unter dem jeweiligen Unterkapitel bei den Aflatoxinen (4.1.9) erläutert.

Zur Ermittlung von statistischen Kenngrößen und zum Nachweis der Leistungsfähigkeit wurde die hier vorgestellte Methode zur Bestimmung von Patulin mittels online-SPE-LC validiert. Die Validierung erfolgte dabei wiederum nach der laborinternen Validierungsvorschrift vom 03.07.2006, in Anlehnung an Vorgaben der EU-Entscheidung 2002/657. Als Matrix wurde klarer Apfelsaft gewählt, die klassische Risikomatrix für eine Patulin-Kontamination. Das komplette Validierungsprotokoll ist unter 5.2 wiedergegeben. An dieser Stelle soll auf die wichtigsten Ergebnisse eingegangen werden:

4.2.9.1 Linearität und Arbeitsbereich

Für die neu entwickelte Methode „Bestimmung des Gehalts an Patulin per online-SPE-LC“ wurden die in der folgenden Tabelle dargestellten Werte für die Linearität erhalten:

Tab. 4-29. Patulin – Ergebnisse 1. Messreihe dotierte Leerwertproben

Ergebnisse dotierte Leerwertproben	
	Mittelwert des Mess-Signals Patulin
% bezogen auf den Grenzwert (100 % = 50 µg/kg Probe)	Signal [FE]
0 % Grenzwert (0 µg/kg)	0
50 % Grenzwert (25 µg/kg)	24983
100 % Grenzwert (50 µg/kg)	46774
150 % Grenzwert (75 µg/kg)	70444
300 % Grenzwert (150 µg/kg)	142553
Lineare Kalibrierung	$y = a + bx$
Steigung b	942,60
Achsenabschnitt a [µg/kg]	276,56 (2,02 µg/kg)
Relative Verfahrensstandardabweichung [%] RSD_r	1,57 %
Korrelationskoeffizient	0,9998

Achsenabschnitt a:

Die dem Achsenabschnitt entsprechende Konzentration von 2,0 µg/kg liegt unterhalb der Nachweisgrenze von 2,5 µg/kg (nach DIN 32645, s. 4.2.9.2). Damit kann dieser systematische Blindwert vernachlässigt werden.

Steigung b/Wiederfindung:

Die relative Steigung (Ist-Konzentration gegen Soll-Konzentration) beträgt 0,830, entsprechend 83,0 % Wiederfindung. Dieser Wert liegt gut im geforderten Bereich von 70 bis 105 % (VERORDNUNG (EG) 401/2006, s. Tab. 4-35). Im Gegensatz zur Bestimmung von Aflatoxinen wurde mit einer Matrixkalibrierungs-Stufe gearbeitet, die nicht Bestandteil der in der Tab. 4-19 genannten Stufen (0, 50, 100, 150, 300 %) ist (100 µg/kg = 200 %). Somit konnte eine relative Wiederfindung berechnet werden.

Korrelationskoeffizient:

Der ermittelte Korrelationskoeffizient liegt mit 0,9998 sehr nahe am Optimum von 1,0000 und ist damit als sehr gut zu beurteilen.

Relative Verfahrensstandardabweichung:

Die relative Verfahrensstandardabweichung ist hier analog zu den Aflatoxinen (4.1.9.1) auf eine Messreihe bezogen, somit handelt es sich um RSD_r . Nach Horwitz wäre hier ein Wert von RSD_R (hier: 25,1 %) * 0,66 = 16,6 % zu erwarten. Der Wert von 1,57 % unterschreitet diesen Wert nach Horwitz deutlich.

Graphische Darstellung

Abb. 4-30 zeigt beispielhaft die Regressionsgerade der 1. Messreihe für Patulin (dotierte Leerwertproben). Die mit Valoo 1.0 berechnete dazugehörige Geradengleichung lautet:

$$y = 942,60 x + 276,56$$

Gleichung 4-17

mit x c (Patulin) [µg/kg]
y Signal in Flächeneinheiten [FE]

Korrelationskoeffizient $r = 0,9998$

Relative Standardabweichung: 1,57 %

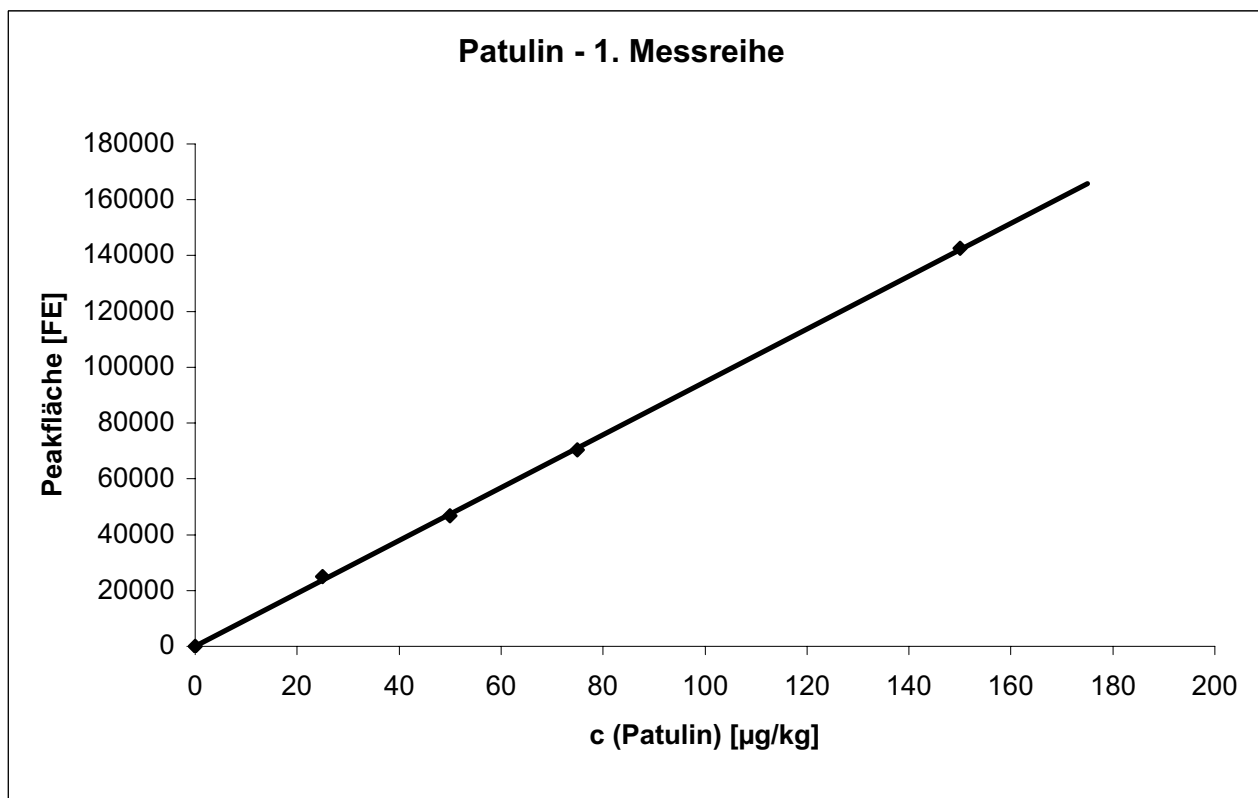


Abb. 4-30. Patulin – Regressionsgerade dotierte Leerwertproben

Arbeitsbereich

Aus der Validierung ergibt sich der folgende lineare Arbeitsbereich:

Tab. 4-30. Patulin per online-SPE-LC: Arbeitsbereich

Analyt	Arbeitsbereich von...bis...	
	Bestimmungsgrenze [µg/kg]	Höchste Konzentration der Kalibrierkurve [µg/kg]
Patulin	10,3	150

Die in Tab. 4-30 wiedergegebene obere Grenze der Kalibrierkurve gibt die höchste Konzentration der Kalibrierkurve an. In diesem Bereich ist die Funktion linear. Vermutlich geht der tatsächliche lineare Bereich deutlich über diesen obersten Messpunkt hinaus.

4.2.9.2 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweis- und die Bestimmungsgrenze wurden nach DIN 32645 softwaregestützt (Valoo 1.0) berechnet.

Tab. 4-31. Patulin per online-SPE-LC: Nachweis- und Bestimmungsgrenze nach DIN 32645

	Nachweisgrenze* [µg/kg]	Bestimmungsgrenze* [µg/kg]
Patulin	2,5 µg/kg	10,3 µg/kg

*Werte jeweils für untere Grenze aus Messreihe 1 angegeben; Messreihe 2 liefert ähnliche Werte

Zum Vergleich: Berechnet über das Signal-Rausch-Verhältnis (S/N) (Abb. 4-31, vergl. 4.1.9.2) ergeben sich die folgenden vergleichbaren Werte:

Tab. 4-32. Patulin per online-SPE-LC: Nachweis- und Bestimmungsgrenze, bestimmt über das Signal-Rausch-Verhältnis

	Nachweisgrenze (S/N = 3)	Bestimmungsgrenze (S/N = 10)
Patulin	4 µg/kg	14 µg/kg

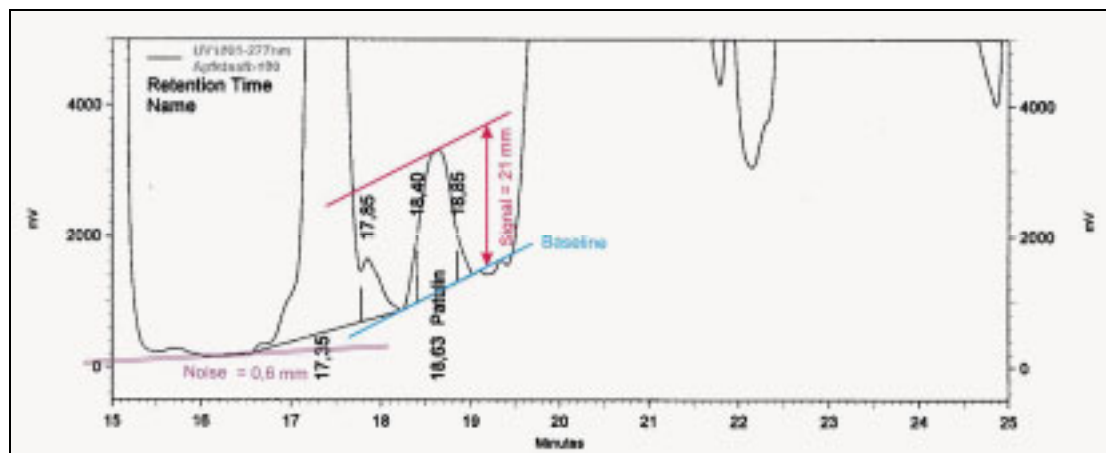


Abb. 4-31. Patulin mittels online-SPE-LC; graphische Ermittlung der Signalthöhe (S = Signal) und des Rauschens (N = Noise) für die Berechnung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Tab. 4-33. Rechnerische Auswertung des in Abb. 4-31 dargestellten Chromatogramms

Peak	Konzentration [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	Signalhöhe [mm]
Patulin	50	21
Noise	-	0,6 ¹

¹Basislinienrauschen

Die Bestimmungsgrenzen liegen signifikant unterhalb der niedrigsten Grenzwerte von 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Dadurch ist sicheres Arbeiten im Bereich der Grenzwerte möglich.

Für eine Anwendung der Methoden bei diätetischen Lebensmitteln für Säuglinge und Kleinkinder wäre eine Modifikation der Methode empfehlenswert, da die Bestimmungsgrenze im Bereich des gesetzlichen Grenzwerts (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) für diese Produkte liegt, so dass derzeit kein Sicherheitsbereich bestehen würde.

4.2.9.3 Messungenauigkeit und Wiederholbarkeit

Die Tab. 4-34 zeigt die im Rahmen der durchgeführten Validierung (5.2) ermittelten Leistungsparameter für Patulin.

Zur Definition von Messungenauigkeit und Wiederfindung sowie von zugehörigen Begriffen s. 4.1.9.3.

Tab. 4-34. Patulin – Wiederholbarkeit und Vergleichbarkeit

Patulin	Einheit	50 % Grenzwert (25 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	100 % Grenzwert (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	150 % Grenzwert (75 $\mu\text{g}/\text{kg}$)
Mittelwert Konzentration	[$\mu\text{g}/\text{kg}$]	26,61	48,08	70,98
Mittelwert Wiederfindung	[%]	106,5 %	96,1 %	94,7 %
Rel. Standardabw. RSD_R	[%]	16,3 %	9,6 %	12,4 %
Abs. Standardabw. Konzentration s_R	[$\mu\text{g}/\text{kg}$]	4,35	4,61	8,73
Vergleichsgrenze (95 %) relativ ($\approx 2,8 \times s_R$) R	[%]	45,5 %	26,8 %	34,8 %
Vergleichsgrenze (95 %) Absolut ($\approx 2,8 \times s_R$) R	[$\mu\text{g}/\text{kg}$]	12,18	12,91	24,44

Tab. 4-35. Leistungskriterien für die Bestimmung von Patulin gemäß EU-VERORDNUNG 401/2006

c) Leistungskriterien für die Bestimmung von Patulin			
Konzentration $\mu\text{g/kg}$	Patulin		
	RSD _r %	RSD _R %	Wiederfindungsrate %
< 20	≤ 30	≤ 40	50 bis 120
20—50	≤ 20	≤ 30	70 bis 105
> 50	≤ 15	≤ 25	75 bis 105

Die gesetzlichen Anforderungen an die Leistungsfähigkeit einer Analyseverfahren für Mykotoxine werden in der EU-VERORDNUNG 401/2006 vom 23.2.2006 zur „Festlegung der Probeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Kontrolle des Mykotoxingehalts von Lebensmitteln“ festgelegt, vergl. 4.1.9.3.

Diese Verordnung fordert für Analysemethoden für Patulin die in Tab. 3-35 aufgeführten Leistungskriterien. Gemäß der in dieser Verordnung gemachten Definition (s. 4.1.9.3) bezieht sich RSD_R auf die Interlabor-Vergleichbarkeit, ein Wert, der im Rahmen der hier präsentierten Validierung nicht bestimmt werden konnte. Vielmehr wurde die laborinterne Reproduzierbarkeit RSD_R ermittelt, s. Tab. 4-34, ebenso die relative Standardabweichung der Wiederholbarkeit RSD_r (Tab. 4-29).

Für den mittleren Konzentrationsbereich nach Tab. 4-35 (20-50 $\mu\text{g/kg}$) darf RSD_r maximal 20 % betragen. Dieser Wert wird selbst von den beiden laborinternen RSD_R-Werten für die Konzentrationsstufen 25 und 50 $\mu\text{g/kg}$ (16,3 und 9,6 %, Tab. 4-34) unterschritten. Dasselbe gilt für die dritte Stufe (75 $\mu\text{g/kg}$), wo der RSD_R-Wert von 12,4 % (Tab. 4-34) ebenfalls unter dem geforderten RSD_r-Wert von max. 15 % nach Tab. 4-35 liegt.

Damit erfüllt die hier präsentierte Methode die Anforderungen nach EU-VERORDNUNG 401/2006.

4.2.9.4 Wiederfindung

Die Quantifizierung beim neu entwickelten Verfahren erfolgt über die Methode der Matrixkalibrierung. Dabei wurde im Rahmen der Validierung ein 100 $\mu\text{g/kg}$ -Standard (entsprechend 200 % des Grenzwerts) als Matrixkalibrierstandard eingesetzt.

Die gesetzlichen Anforderungen an die Wiederfindung einer Analyseverfahren nach der genannten EU-Verordnung 401/2006 (Tab. 4-35) werden eingehalten, einzige Ausnahme ist die Wiederfindung bei Stufe 50 %, die 106,5 % statt der geforderten max. 105 % beträgt. Allerdings resultieren hieraus keine Minder- oder Falsch-Negativbefunde.

4.2.9.5 Entscheidungsgrenze CC α und Nachweisvermögen CC β

Die theoretischen Grundlagen sind unter 4.1.9.5 dargelegt. Als Berechnungsbasis wird der Grenzwert von 50 $\mu\text{g/kg}$ für Apfelsaft (vergl. 1.4.6) genommen.

Ermittlung von $CC\alpha$ und $CC\beta$: Berechnung

Benötigte Daten:

Zulässiger Grenzwert:	50 $\mu\text{g}/\text{kg}$
Gemessene Konzentration am Grenzwert:	48,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Wiederfindung 96,1 %; s. 4.2.9.3)
Laborinterne Reproduzierbarkeit:	4,61 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (= 9,6 %) (RSD_R bei 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$; s. 4.2.9.3)

$$\begin{aligned} \rightarrow CC\alpha &= 48,1 + 1,64 \times 4,61 && [\mu\text{g}/\text{kg}] && \text{Gleichung 4-18} \\ &= 55,7 \mu\text{g}/\text{kg} \end{aligned}$$

Entscheidungsgrenze $CC\alpha$ (Patulin): 55,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$

Weiterhin benötigte Daten

Gemessene Konz. an der Entscheidungsgrenze:	53,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (bei Wiederfindung 96,1 %; s. 4.2.9.3)
Laborinterne Reproduzierbarkeit:	5,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (= 9,6 %) (RSD_R bei 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$; s. 4.2.9.3)

$$\begin{aligned} \rightarrow CC\beta &= 53,5 + 1,64 \times 5,1 && [\mu\text{g}/\text{kg}] && \text{Gleichung 4-19} \\ &= 61,9 \mu\text{g}/\text{kg} \end{aligned}$$

Nachweisvermögen $CC\beta$ (Patulin): 61,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$

Dies bedeutet, dass bei einer gemessenen Konzentration von 55,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Entscheidungsgrenze $CC\alpha$) nur noch eine Wahrscheinlichkeit von 5 % (α -Fehler) besteht, dass die Probe in Wahrheit Patulin unterhalb des Grenzwerts von 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ enthält (falsch-positive Entscheidung). Bei einer Konzentration von 61,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Nachweisvermögen $CC\beta$) beträgt die Wahrscheinlichkeit, dass die Probe als negativ gemessen wird, obwohl der Analyt in der Grenzkonzentration enthalten ist (falsch-negative Entscheidung), nur noch 5 % (β -Fehler).

4.2.9.6 Akkreditierung

Die hier vorgestellte Methode zur Bestimmung von Patulin mittels online-SPE-LC wurde durch die DAP (Deutsches Akkreditierungssystem Prüfwesen GmbH) akkreditiert und im Januar 2007 in den Anhang der Akkreditierungsurkunde aufgenommen.

4.2.10 Laborvergleichsuntersuchung

Die hier präsentierte Methode wurde erfolgreich an einer LVU-Probe getestet. Bei dem von Januar bis März 2006 durchgeführten FAPAS-Test Nr. 1623, der vom CSL (vergl. 4.1.10) angeboten wurde, nahmen 55 Labore aus 23 Ländern teil. In der Matrix „naturtrüber Apfelsaft“ sollte der Patulin-Gehalt bestimmt werden. Eingereicht wurde das mittels der offline-Routinemethode (3.2.7) erzielte Patulin-Ergebnis von 57 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Parallel wurde die Probe mittels der sich zu diesem Zeitpunkt noch in der Entwicklung befindlichen online-SPE-Methode analysiert und das Ergebnis vor Eintreffen der Auswertung bei der Qualitätsmanagementbeauftragten von APPLICA eingereicht.

Die Ergebnisse sind in Tab. 4-36 zusammengefasst und in Abb. 4-32 graphisch dargestellt.

Tab. 4-36. Ergebnisse des FAPAS-Tests Nr. 1623 (Patulin in naturtrübem Apfelsaft), Januar bis März 2006

APPLICA-Methode	Robuster Mittelwert [µg/kg]	Anzahl zufriedenster z-scores ¹	Eigenes Ergebnis ² [µg/kg]	Eigener z-score ¹
ASU § 64 LFGB L 31.00-20 mod. ²	55,2	82 %	57	0,1
Online-SPE-LC	-	-	66	0,9 ³

¹ zufriedenster z-score: $|z| \leq 2$ (a. auch Erläuterungen unter 4.1.10)

² eingereichtes Ergebnis (Labor Nr. 19) mit offline-Routinemethode (3.2.7)

³ berechneter z-score für online-SPE-LC-Ergebnis

Der rechnerische z-score wurde dabei wie folgt ermittelt:

In die Gleichung 4-12 (s. 4.1.10 und FAPAS Report Nr. 1623)

$$z = \frac{x - \hat{X}}{\sigma^p} \quad \text{Gleichung 4-20}$$

wurden die folgenden Werte eingesetzt

x = Messwert des Labors (hier: online-SPE-LC) (66 µg/kg)

\hat{X} = robuster Mittelwert für den Analyten (55,2 µg/kg)

σ^p = Ziel-Standardabweichung, berechnet nach Horwitz (12,1 µg/kg)

$$z = \frac{66 - 55,2}{12,1} = 0,89 \quad \text{Gleichung 4-21}$$

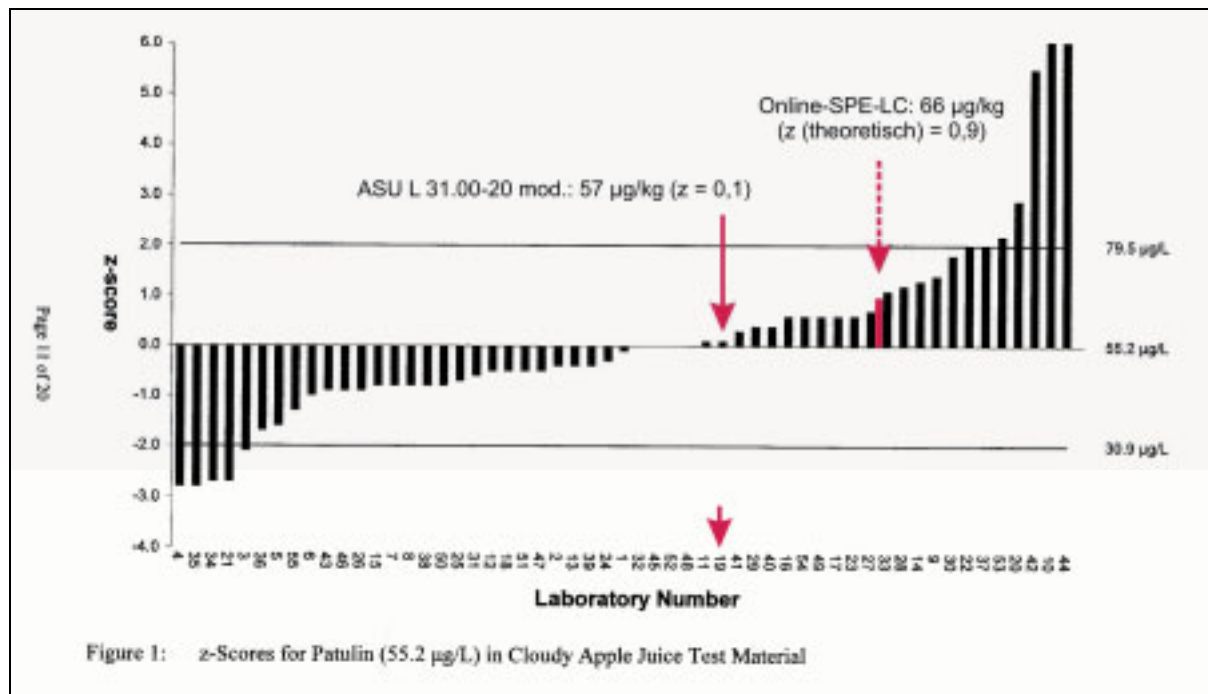


Abb. 4-32. Ergebnisse des FAPAS-Tests Nr. 1623 (Patulin in naturtrübem Apfelsaft) roter durchgezogener Pfeil: offline-Routineergebnis (Labor Nr. 19) roter gestrichelter Pfeil: online-SPE-LC-Ergebnis (rechnerischer z-score)

4.2.11 Methodenvergleich

Wo liegen nun die Vorteile der online-SPE-LC-Analyse für Patulin, verglichen mit der manuellen Durchführung mit Flüssig-flüssig-Extraktion oder SPE?

4.2.11.1 Probenvorbereitung

Die große Zeit- und Personalsparnis gegenüber bisherigen Routinemethoden wird in Abb. 4-33 verdeutlicht: Während nach der offiziellen Methode ASU § 64 LFGB L 31.00-20 (BVL, Stand Dez. 2004) eine Vielzahl von manuellen Probenvorbereitungsschritten erforderlich ist, wird dieser Aufwand bei der neu entwickelten online-SPE-LC-Methode auf ein Minimum reduziert.

- Die Zahl der Extraktionsschritte ist von vier auf einen reduziert.
- Der sonst manuell durchgeführte Waschschrift erfolgt automatisch online.
- Statt 90 mL Ethylacetat werden nur 5 mL (entsprechend 1/14!) benötigt, was aus Kosten- und Umweltsicht eine große Ersparnis darstellt.
- Der Einkonzentrierungsschritt lässt sich sehr viel schneller durchführen, da nur 3 statt ca. 90 mL Ethylacetat einkonzentriert werden müssen.
- Auch bei pektinreichen Matrices kann auf einen aufwändigen Depektinierungsschritt verzichtet werden.

Hiermit ist eines der Hauptziele der Doktorarbeit erreicht worden: die erhebliche Vereinfachung der Probenvorbereitung.

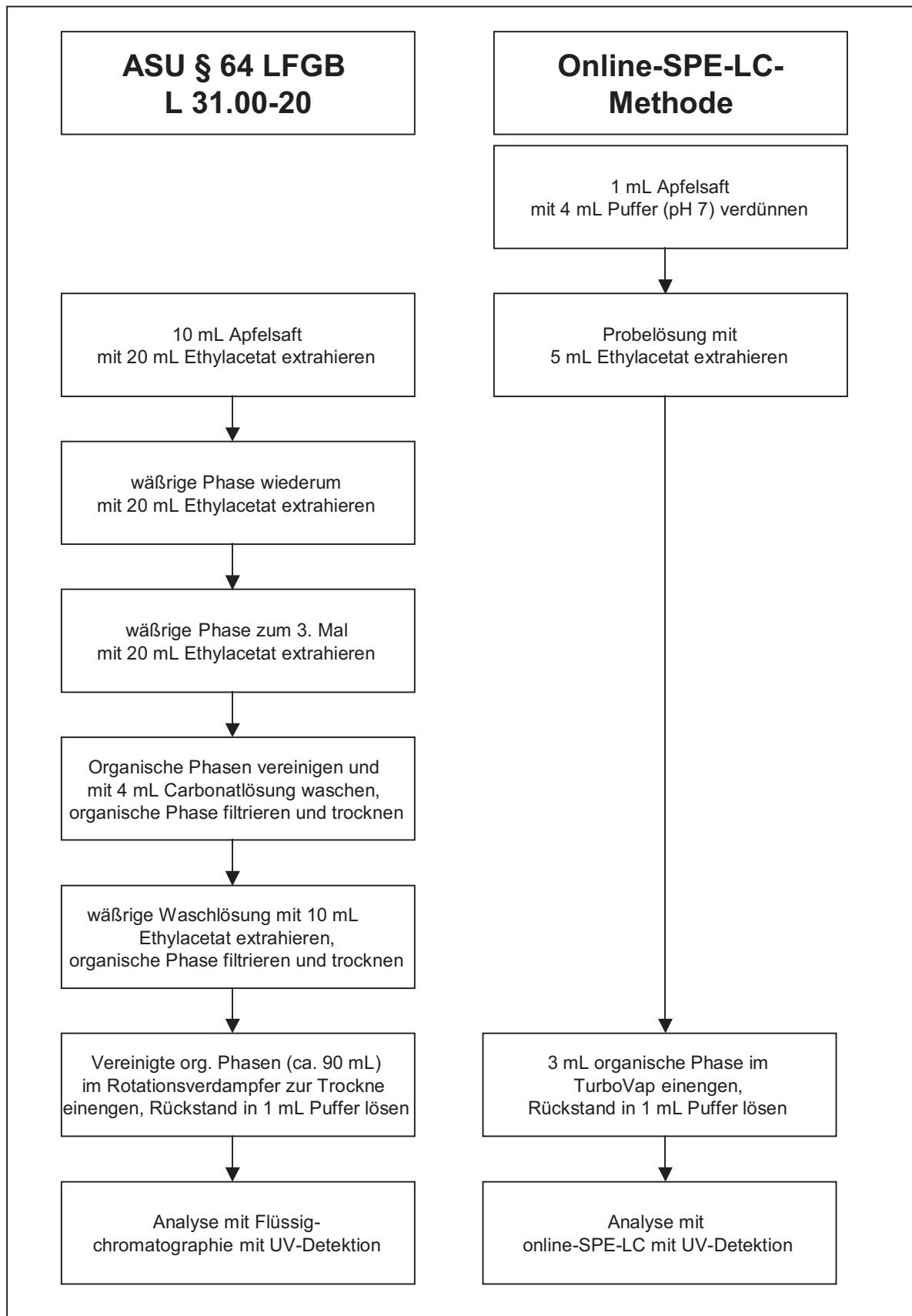


Abb. 4-33. Probenvorbereitung – Vergleich online-SPE-LC-Methode und ASU § 64 LFGB L 31.00-20 (BVL, Stand Dez. 2004) am Beispiel „Apfelsaft (klar)“

Analog zu den Aflatoxinen (4.1.11.1) zeigt der in Tab. 4-37 dargelegte Vergleich die konkreten Vorteile am Beispiel einer Probenserie von zwölf Proben, aufgeteilt auf zwei Matrices.

Beispiel: Probenserie aus 12 Proben

Tab. 4-37. Vergleich Probenvorbereitung Patulin online (SPE) vs. offline (LLP)

	ASU § 64 LFGB L 31.00-20 Flüssig-flüssig-Extraktion (LLP)	Automatisiert Online-SPE
Zeitbedarf gesamt	Homogenisierung/ Einwaage/Extraktion: 4,5 h Einkonzentration: 1,5 h gesamt: 6 h	Homogenisierung/ Einwaage/Extraktion: 1,5 h Einkonzentration: 0,5 h gesamt: 2 h
Personalbedarf	Homogenisierung/ Einwaage/Extraktion: 2,5 h Einkonzentration: 0,5 h gesamt: 3 h	Homogenisierung/ Einwaage/Extraktion: 0,75 h Vorbereitung online-SPE: 0,25 h Gesamt: 1 h
Benötigte SDB- Säulen pro Probe	-	0,03 (inkl. QRK, Validierung, Bestätigung, etc.)*
Kosten hieraus	-	€ 0,07/Probe
Benötigte SDB- Säulen gesamt	-	0,33
Kosten hieraus gesamt	-	€ 0,78
Lösungsmittel- bedarf	Ethylacetat 1350 mL Carbonatlösung 60 mL	Ethylacetat 75 mL Acetatpuffer 188 mL Methanol 120 mL Carbonatlösung 12 mL Phosphatpuffer 60 mL
Betriebsart	Nur während der Arbeitszeit (max. 40 h pro Woche)	Rund um die Uhr (max. 168 h pro Woche)

* eine Säule mit 3 mL Inhalt reicht für ca. drei Kartuschenfüllungen

Sämtliche Angaben sind ungefähre Werte und beziehen sich auf durchschnittlichen Routinebetrieb

Aus Tab. 4-37 ist abzulesen, wo die wichtigsten Vorteile bei der online-SPE-Vorbereitung für Patulin liegen: Neben einer deutlichen Einsparung im Personalbereich (1 h gegenüber 3 h) liegt der Hauptvorteil bei den Kosten für die Lösungsmittel. Während bei klassischer Aufarbeitung ein Bedarf an Ethylacetat von 1350 mL zu kalkulieren ist, fällt dieser Posten bei der online-Variante mit nur 75 mL kaum ins Gewicht, ein Vorteil, der sich auch in niedrigeren Entsorgungskosten niederschlägt. Ein weiterer wichtiger Vorteil liegt darin, dass aufgrund der Automatisierung größere Probenserien parallel analysiert werden können, da der SPE-Schritt rund um die Uhr durchgeführt werden kann.

4.2.11.2 Vergleich Validierung online vs. Validierung offline

Weiterhin interessant ist ein laborinterner Vergleich der Validierung der neu entwickelten online-Methode mit der offline-Routinemethode, die in Anlehnung an ASU § 64 LFGB L 31.00-20 (BVL, Stand Dez. 2004) durchgeführt wird (Tab. 4-38). Diese Validierung wurde im September 2004 nach dem damals laborintern gültigen Validierungsschema durchgeführt, das inzwischen deutlich weiter entwickelt worden ist. Hierdurch können nicht alle Parameter direkt miteinander verglichen werden.

Tab. 4-38. Vergleich laborinterne Validierungsdaten online vs. offline

Parameter	Online-SPE	ASU § 64 LFGB L 31.00-20 mod.	Anmerkung
RSD _r [%]	1,57 %	2,18 %	Bezogen auf eine Messreihe (Wiederholbedingungen)
RSD _R	12,7 %	12,4 %	Laborinterne Reproduzierbarkeitsbedingungen (Mittelwert der RSD _R der drei Stufen 50, 100 und 150 %)
Nachweisgrenze [µg/kg]	2,5	2,6	DIN 32645
Bestimmungsgrenze [µg/kg]	10,3	10,6	DIN 32645
Mittlere Wiederfindung [%]	99,1	97,9*	Mittelwert aus den drei Stufen 50, 100 und 150 %

* berechnet über die Methode der Matrixkalibrierung, die nach der Validierung eingeführt wurde

Der in Tab. 4-38 präsentierte Vergleich offenbart, dass die beiden Methoden praktisch die gleichen Leistungsdaten aufweisen – unter der Berücksichtigung, dass die Werte nicht identisch gewonnen wurden. Die Standardabweichung unter Wiederholbarkeitsbedingungen (RSD_r) deckt sich ebenso wie diejenige unter laborinternen Reproduzierbarkeitsbedingungen. Auch die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sind fast identisch, ebenso die Wiederfindung – im Wesentlichen begründet durch die Nutzung der Matrixkalibrierung für beide Verfahren. Dieses Ergebnis bestätigt die Theorie von Horwitz, dass Variationskoeffizienten konzentrations- und nicht methodenabhängig sind (s. 4.1.9.3).

Somit bietet die neu entwickelte Methode eine Reihe von Vorteilen (s.o. und 4.2.12) bei gleicher Leistungsfähigkeit.

4.2.11.3 Vergleich mit anderen Methoden

Die theoretischen Grundlagen zu diesem Unterkapitel sind unter 4.1.11.3 erläutert worden.

Tab. 4-39. Vergleich mit anderen Methoden

Methode und Matrix	Publikation	Beispiel-Konzentration	Leistungsdaten	Anmerkungen
Online-SPE-LC Apfelsaft	diese Dissertation, 2007	50 µg/kg	RSD _r = 9,2 %, RSD _R = 25,8 %	
ASU § 64 LFGB L 31.00-20 Apfelsaft	BVL, Stand Dez. 2004	54 µg/L	RSD _r = 11 % RSD _R = 25 %	
LLP-LC Apfelsaft	BARTOLOMÉ et al., 1994	44,1 µg/L	SD = 5,5 %	Dreifachanalyse
LLP-LC Apfelsaft	GÖKMEN et al., 1996	50 µg/L	SD = 1,16 %	SD erscheint sehr niedrig
LLP-SPE-LC Apfelsaft	ARRANZ et al., 2005	25 µg/kg	RSD _R = 28,3 %	
SPE-LC Apfelsaft	EISELE et al., 2003	50 µg/kg	RSD _r = 8,0 %	
SPE-LC Apfelsaft	TRUCKSESS et al., 1999	50 µg/L	RSD _r = 8,2 %	

Die in Tab. 4-39 zusammengestellten Daten zeigen, dass die Leistungsfähigkeit der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methode vergleichbar ist mit anderen veröffentlichten Methoden. Weiterhin sind die unter 4.1.11.3 gemachten Anmerkungen auch auf die Analyse von Patulin übertragbar.

Auch die Nachteile der Methode sollen nicht verschwiegen werden. Wesentlicher Nachteil ist die erhöhte Anzahl an durchzuführenden Analysen aufgrund der erforderlichen Matrixkalibrierung. Diese Nachteile werden durch die oben dargestellten und im folgenden Kapitel (4.2.12) zusammengefassten Vorteile mehr als kompensiert.

4.2.12 Vorteile der Methode

Zusammengefasst zeichnet sich die entwickelte Methode zur Bestimmung von Patulin in pflanzlichen Lebensmitteln mittels online-SPE-LC durch folgende Vorteile aus:

- schnell
- für hohen Probendurchsatz durch Automatisierung der Probenvorbereitung geeignet
- kostengünstig durch Automatisierung und Mehrfachverwendung von teurem SPE-Material
- sicher
- erprobt an verschiedenen Matrices im Routinebetrieb
- erfolgreiche Erprobung an einer LVU-Probe
- validiert
- durch die DAP akkreditiert
- erfüllt gesetzliche Anforderungen an Methoden für die Mykotoxinanalytik
- Wiederfindungskorrektur durch Verwendung derselben Kartusche für Proben und Standards

5 Validierungen

In diesem Kapitel sind die laborinternen Validierungsprotokolle in bearbeiteter Form wiedergegeben. Eine detaillierte Kommentierung der wichtigsten Validierungsergebnisse findet sich im Ergebnisteil unter 4.1.9 (Aflatoxine) bzw. 4.2.9 (Patulin).

5.1 Aflatoxine

Grundlage dieser Validierung ist die unter 3.1 beschriebene Prüfmethode zur Bestimmung des Gehalts an Aflatoxinen in pflanzlichen Lebensmitteln mittels online-SPE-LC. In dieser Methode sind Probenvorbereitung, Analysebedingungen und Hinweise zur Auswertung beschrieben.

Für die Berechnung wurde die Validierungssoftware Valoo 1.0 (analytik-software Dr. Stella Windmann) verwendet.

Die prozentualen Angaben beziehen sich auf Aflatoxin B₁, das am häufigsten auftretende und giftigste Aflatoxin. Dabei wird die Grenzwertkonzentration von 2 µg/kg gleich 100 % gesetzt. Aufgrund des Einsatzes eines kommerziell bezogenen Mischstandards (Aflatoxine B₁, B₂, G₁ und G₂) ergeben sich „krumme“ Konzentrationen, die von den ganzzahligen Soll-Konzentrationen abweichen (Bsp.: 100 % Aflatoxin B₁ entspricht 1,87 µg/kg statt 2 µg/kg).

5.1.1 Messungen

5.1.1.1 Systemtest

Der Systemtest dient der Erbringung des Nachweises, dass die verwendeten Geräte (hier: die LC-Anlage) messbereit sind und den beabsichtigten Zweck erfüllen können. Hierzu werden Standard- und Blindwertlösung je sechsfach injiziert, um Stabilität des Mess-Signals und das verschleppungsfreie Arbeiten nachzuweisen.

Es wurden folgende Geräte am 11.08.2006 dem Systemtest unterworfen:
LC-Anlage PH-3, bestehend aus den Komponenten Degasser SCM1000, Pumpe P4000, Autosampler AS3000, System-Steuerungsgerät SN4000 (alle Thermo Fisher Scientific), Fluoreszenz-Detektor F-1080 (Merck-Hitachi), Analog-Digitalwandler SS 420X (Scientific Software), Probenvorbereitungseinheit SP 3000 (Knauer), Nachsäulenderivatisierungseinheit CoBrA-Zelle (Coring)

Für den Systemtest wurde folgende Standardlösung verwendet:

Aflatoxin-RefM₁, enthaltend die folgenden Analyten:

Tab. 5-1. Konzentration der Aflatoxin-Standardlösung RefM₁

Analyt	c [µg/L]	entspricht* [µg/kg]
Aflatoxin B ₁	187	1,87
Aflatoxin B ₂	58	0,58
Aflatoxin G ₁	174	1,74
Aflatoxin G ₂	59	0,59

*bezogen auf die Konzentration in der Probe (s. 3.1)

Zur Blindwertbestimmung wurde Wasser/Methanol 92,5:7,5 (v/v), das Lösungsmittel für Probe- und Standardlösungen, verwendet.

- a) Standardlösung 6 x gemessen
 b) Blindwert 6 x gemessen

5.1.1.2 Spezifität

Die Spezifität beschreibt die Fähigkeit eines Analyseverfahrens, nur den gesuchten Analyten zu erfassen, wobei andere in der Probe anwesende Bestandteile (die Matrix) das Analyseergebnis nicht beeinflussen (FUNK et al., 1992). Die Auflösung wird dabei nach folgender Formel berechnet:

$$R_s = \frac{2 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{(w_{b1} + w_{b2})}$$

mit t_{R2}, t_{R1} : Retentionszeiten der Peaks ab Injektionszeitpunkt
 w_{b1}, w_{b2} : Basisbreite der Peaks

Es wurden folgende Matrices verwendet:

Tab. 5-2. Matrices zur Spezifitätsprüfung

Matrix	Typ	Min. R_s
Cerealien	Cornflakes	$R_s > 0,8$
Früchte	Erdbeeren	$R_s > 0,8$

Die Proben wurden mit folgendem Standard dotiert: 40 µL Afla-Dot₁; entspr. rund 2 µg/kg (AFB₁, AFG₁) bzw. rund 0,6 µg/kg (AFB₂, AFG₂)

Die ermittelte minimale Auflösung soll ebenfalls die Anforderung von $R_s > 0,8$ erfüllen.

5.1.1.3 Selektivität

Die Selektivität meint die Fähigkeit einer Methode, verschiedene, nebeneinander zu bestimmende Komponenten (hier: vier Aflatoxine) ohne gegenseitige Störung zu erfassen und sie somit eindeutig zu identifizieren (KROMIDAS, 1999).

Tab. 5-3. Standard zur Selektivitätsprüfung

Standard	Min. R_s
Aflatoxin-RefM ₁	$R_s > 0,8$

Die ermittelte minimale Auflösung soll die Anforderung von $R_s > 0,8$ erfüllen.

5.1.1.4 Anwendbarkeit/Robustheit

Die Qualität der Analyse wird über dotierte Proben kontrolliert. Je Aufarbeitung wird mindestens eine dotierte unbelastete Probe, angepasst an die zu untersuchende Matrix, analysiert.

Die Dotierung dieser Analyten erfolgte in einer Konzentration entsprechend rund 2 µg/kg (Aflatoxin B₁ und G₁) bzw. 0,6 µg/kg (Aflatoxin B₂ und G₂).

Zusätzlich wurden einmalig folgende Proben analysiert:

Tab. 5-4. Matrices zur Prüfung der Anwendbarkeit der Methode

Matrix	Probe
Cerealien	Cornflakes
Mehl	Weizenmehl
Frucht	Erdbeeren

Da mit der Methode der Matrixkalibrierung gearbeitet wird, ist eine Wiederfindung der Analyten nicht sinnvoll zu überwachen. Die Matrixkalibrierung sorgt für eine automatische Wiederfindungskorrektur.

5.1.1.5 Stabilität Standardlösungen

Tab. 5-5. Prüfung der Standardlösungen auf Stabilität

Standard		
Aflatoxin-S₀	Sofort nach Herstellung Herstelldatum: 14.09.06 Messdatum: 22.09.06	3 Monate nach Herstellung Herstelldatum: 01.06.06 Messdatum: 22.09.06

Gemessen wird der jeweils aus „altem“ und „neuen“ Aflatoxin-S₀ angesetzte Standard Aflatoxin-RefM₁. Bisher wurde der RefM jeweils messtäglich frisch angesetzt. Auf eine Stabilitätsprüfung dieser Standardlösung wurde daher bislang verzichtet, auch unter dem Aspekt, dass zur Quantifizierung die Methode der Matrixkalibrierung verwendet wird.

5.1.1.6 Stabilität Analyten in Matrix

Die Stabilität der Analyten wurde in der Matrix Aprikosen überprüft:

Tab. 5-6. Prüfung der Stabilität des Analyten in Matrix

Analyt	1. Messung	2. Messung
Aflatoxin B₁	24 Stunden nach Dotierung Dotierung: 31.08.06 Messdatum: 01.09.06	22 Tage nach Dotierung Dotierung: 31.08.06 Messdatum: 22.09.06

Die Probe wurde zwischen den Analysen bei -18 °C aufbewahrt.

Aufgrund der Quantifizierung mittels Matrixkalibrierung ist die Verwendung eines externen Standards wenig sinnvoll. Stattdessen wird gegen eine frisch hergestellte Matrixdotierung gemessen (2. Messung).

5.1.1.7 Kalibrierkurve/Linearität (1. Messreihe dotierte Proben und zugehörige Messreihen dotierte Reagenzienleerwerte und verdünnte Standards)

Für diese Messreihe wurde die Anlage PH-3 verwendet (Bestandteile der Anlage siehe 5.1.1.1).

Die Probenvorbereitungen wurden am 09.06., die Messungen am 10.06. und die Auswertungen am 17.06.2006 durchgeführt.

Probenmaterial (Leerwertprobe): Erdnüsse

Die Referenzmaterialien wurden für die Messreihe der verdünnten Standards in folgendem Lösungsmittel gelöst: Wasser/Methanol 92,5:7,5 (v/v)

Die prozentualen Angaben beziehen sich auf Aflatoxin B₁, s. 5.1.

Die oben genannte Leerwertprobe wird mit folgenden Konzentrationen dotiert, aufbereitet und gemessen:

- | | |
|---|---|
| a) 0% Grenzwert-Konzentration (0 µg/kg) | 3 Aufbereitungen, jeweils 1x gemessen |
| b) 50 % Grenzwert-Konzentration (1 µg/kg) | 6 Aufbereitungen , jeweils 1x gemessen |
| c) 100 % Grenzwert-Konzentration (2 µg/kg) | 6 Aufbereitungen , jeweils 1x gemessen |
| d) 150 % Grenzwert-Konzentration (3 µg/kg) | 6 Aufbereitungen , jeweils 1x gemessen |
| e) 300 % Grenzwert-Konzentration (6 µg/kg) | 3 Aufbereitungen, jeweils 1x gemessen |

Ein zugehöriger Reagenzienleerwert wird wie folgt dotiert, aufbereitet und gemessen:

- | | |
|--|-----------------------------|
| a) 0% Grenzwert-Konzentration (0 µg/kg) | 1 Aufbereitung, 1x gemessen |
| b) 50 % Grenzwert-Konzentration (1 µg/kg) | 1 Aufbereitung, 1x gemessen |
| c) 100 % Grenzwert-Konzentration (2 µg/kg) | 1 Aufbereitung, 1x gemessen |
| d) 150 % Grenzwert-Konzentration (3 µg/kg) | 1 Aufbereitung, 1x gemessen |
| e) 300 % Grenzwert-Konzentration (6 µg/kg) | 1 Aufbereitung, 1x gemessen |

Verdünnte Standards werden in den folgenden Konzentrationen hergestellt und gemessen:

- | | |
|--|-----------|
| a) 0% Grenzwert-Konzentration (0 µg/kg) | 1 Messung |
| b) 50 % Grenzwert-Konzentration (1 µg/kg) | 1 Messung |
| c) 100 % Grenzwert-Konzentration (2 µg/kg) | 1 Messung |
| d) 150 % Grenzwert-Konzentration (3 µg/kg) | 1 Messung |
| e) 300 % Grenzwert-Konzentration (6 µg/kg) | 1 Messung |

5.1.1.8 Wiederholpräzision/Wiederfindung

Zur Definition der Begriffe siehe 4.1.9.3 und 4.1.9.4.

Die Daten für die Ermittlung der Wiederholpräzision und der Wiederfindung werden aus der 1. und 2. Messreihe (5.1.1.9) generiert.

5.1.1.9 Laborinterne Reproduzierbarkeit und Messungenaugigkeit (2. Messreihe dotierte Proben)

Zur Definition der Begriffe siehe 4.1.9.3.

Für diese Messreihe wurde die Anlage PH-3 verwendet (Bestandteile der Anlage s. 5.1.1.1).

Die Probenvorbereitungen wurden am 14.09., die Messungen am 15.09. und die Auswertungen am 18.09.2006 durchgeführt. Die Durchführung erfolgte durch eine andere Person als bei der 1. Messreihe, unter Verwendung anderer Chemikalien. Die Verwendung eines anderen LC-Geräts war nicht möglich, da eine entsprechend ausgestattete Anlage nur einmal zur Verfügung stand.

Probenmaterial: Erdnüsse

Die oben genannte Leerwertprobe wird mit folgenden Konzentrationen dotiert:

- | | |
|--|---------------------------------------|
| a) 50 % Grenzwert-Konzentration (1 µg/kg) | 6 Aufbereitungen, jeweils 1x gemessen |
| b) 100 % Grenzwert-Konzentration (2 µg/kg) | 6 Aufbereitungen, jeweils 1x gemessen |
| c) 150 % Grenzwert-Konzentration (3 µg/kg) | 6 Aufbereitungen, jeweils 1x gemessen |

5.1.1.10 Nachweis-/Bestimmungsgrenze

Eine softwaregestützte Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze nach DIN 32645 erwies sich aufgrund der relativ geringen Anzahl an Messwerten als nicht möglich.

Die Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze erfolgt daher über das Signal-Rausch-Verhältnis (S/N-Verhältnis). Hierzu wird das Chromatogramm einer Grenzwert-dotierten Probe verwendet, s. 4.1.9.2. Für die Nachweisgrenze wurde die Vorgabe S/N = 3 und für die Bestimmungsgrenze die Vorgabe S/N = 10 gemacht.

5.1.2 Ergebnisse/Bewertungen

5.1.2.1 Systemeignungstest

Tab. 5-7. Systemeignungstest Aflatoxine

Analyt	Mittelwert Mess-Signal [FE]	Rel. Standardabw. Mess-Signal [%]	Mittlere Re- tentionszeit [min]	Rel. Standard- abw. Ret.zeit [%]
Aflatoxin B ₁	1467549	5,01	24,96	0,18
Aflatoxin B ₂	1360838	2,18	24,05	0,21
Aflatoxin G ₁	2753818	1,79	23,27	0,19
Aflatoxin G ₂	1092595	2,02	22,28	0,21

Die Forderung der relativen Standardabweichung für Messsignal und Retentionszeit von < 5 % ist erfüllt, einzig die Mess-Signalabweichung für Aflatoxin B₁ liegt an der Grenze. Verschleppungen treten nicht auf.

5.1.2.2 Spezifität

Die Forderung $R_s > 0,8$ ist für beide Proben erfüllt.

Die geringste Auflösung beträgt

$R_s = 0,99$ (Cornflakes) für den Analyten Aflatoxin B₁ zu Matrix sowie

$R_s = 1,11$ (Erdbeeren) für den Analyten Aflatoxin B₂ zu Aflatoxin G₁.

5.1.2.3 Selektivität

Die Forderung $R_s > 0,8$ ist erfüllt.

Die geringste Auflösung beträgt $R_s = 2,29$ für den Analyten Aflatoxin B₂ zu Aflatoxin G₁.

5.1.2.4 Anwendbarkeit/Robustheit

Die Methode erwies sich als geeignet für die geprüften Matrices, s. unten stehende Daten für Erdnüsse, vergl. Chromatogramme für Weizenmehl (Abb. 4-9) und Cornflakes (Abb. 4-8).

5.1.2.5 Stabilität Standard-Lösungen

Tab. 5-8. Plan für Prüfung der Standardlösungen auf Stabilität

Standard		
Aflatoxin-S₀	Sofort nach Herstellung Herstelldatum: 14.09.06 Messdatum: 22.09.06	3 Monate nach Herstellung Herstelldatum: 01.06.06 Messdatum: 22.09.06

Tab. 5-9. Prüfung der Standardlösungen auf Stabilität

Analyt	Peakfläche „alter“ Standard	Peakfläche „neuer“ Standard	Abweichung
Aflatoxin B₁	206626	204450	1,1 %
Aflatoxin B₂	597009	577521	3,4 %
Aflatoxin G₁	375015	376812	0,5 %
Aflatoxin G₂	215716	213248	1,2 %

Die maximale Abweichung der Peakflächen „alter“ Standard zum Standard aus frisch angesetzttem S₀ beträgt 3,4 %.

Dies entspricht der Forderung einer maximalen Abweichung von 5%.

5.1.2.6 Stabilität Analyt in Matrix

Tab. 5-10. Prüfung der Stabilität der Analyten in Probe

Analyt	24 Stunden nach Dotierung* Dotierung: 31.08.06 Messdatum: 01.09.06	22 Tage nach Dotierung der Probe Dotierung: 31.08.06 Messdatum: 22.09.06	
Aflatoxin B₁	1,87 µg/kg	1,65 µg/kg	88,2 %
Aflatoxin B₂	0,58 µg/kg	0,55 µg/kg	94,8 %
Aflatoxin G₁	1,74 µg/kg	1,40 µg/kg	80,5 %
Aflatoxin G₂	0,59 µg/kg	0,52 µg/kg	88,1 %

*Matrixkalibrierung

Die minimale Wiederfindung bei der Messung drei Wochen nach Dotierung beträgt 80,5 %.

Dies entspricht der Forderung nach einer Wiederfindung von 70 bis 110 %.

5.1.2.7 Kalibrierkurve/Linearität

Die Kalibrierkurve/Linearität wurde mit Hilfe der Messungen der 1. Messreihe bestimmt. Eine Kommentierung der ermittelten Werte findet sich im Ergebnisteil unter 4.1.9. Die Regressionsgeraden wurde unter Verwendung der Stufen 50, 100 und 150 % erstellt, damit die ermittelten Werte mit denen der 2. Messreihe vergleichbar sind und damit für den F- und t-Test ein einheitlicher Datenpool zur Verfügung steht.

Tab. 5-11. Ergebnisse dotierte Leerwertproben (Erdnuss) – 1. Messreihe

Ergebnisse dotierte Leerwertproben				
	Mess-Signal Aflatoxin B ₁	Mess-Signal Aflatoxin B ₂	Mess-Signal Aflatoxin G ₁	Mess-Signal Aflatoxin G ₂
% bezogen auf den Grenzwert (100 % = x µg/kg Probe)	100 % = 1,87 µg/kg	100 % = 0,58 µg/kg	100 % = 1,87 µg/kg	100 % = 0,59 µg/kg
	Signal (Ist) [FE]	Signal (Ist) [FE]	Signal (Ist) [FE]	Signal (Ist) [FE]
0 % Grenzwert (0 µg/kg)	0	0	0	0
50 % Grenzwert (1 µg/kg)	307001	299275	495226	196978
100 % Grenzwert (2 µg/kg)	563879	602053	858356	338623
150 % Grenzwert (3 µg/kg)	910013	921003	1363867	498693
300 % Grenzwert (6 µg/kg)	1593466	1443435	2665054	924665
Lineare Kalibrierung¹	y = a + bx	y = a + bx	y = a + bx	y = a + bx
Steigung b	322467	1077155	499219	511381
Achsenabschnitt a [FE] ([µg/kg])	-9391,67 (-0,03)	-5368,47 (-0,005)	37175,33 (0,08)	43049,67 (0,075)
Relative Verfahrens- standardabweichung [%]	6,05 %	0,86 %	6,69 %	2,49 %
Korrelationskoeffizient	0,9964	0,9999	0,9959	0,9994

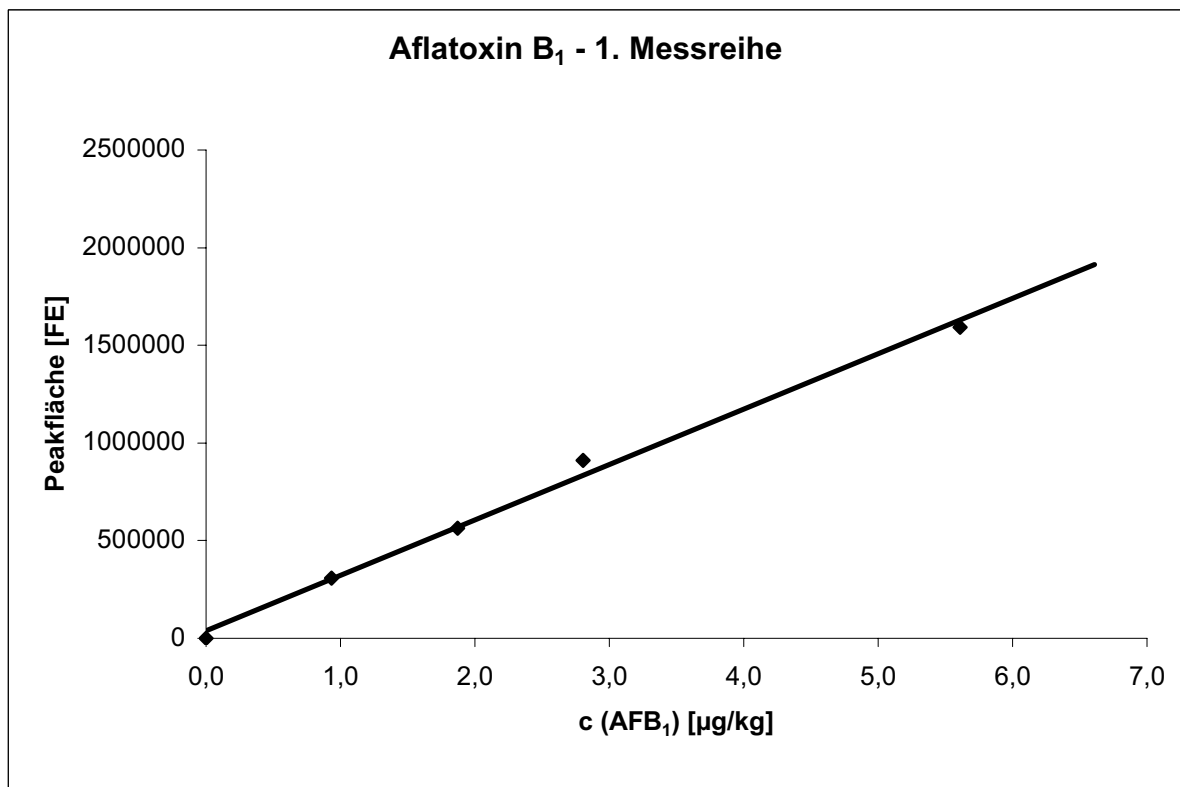
¹ Die Regressionsgeraden wurde unter Verwendung der Stufen 50, 100 und 150 % erstellt, damit die ermittelten Werte mit denen der 2. Messreihe vergleichbar sind und für den F- und t-Test ein einheitlicher Datenpool zur Verfügung steht.

Tab. 5-12. Dotierte Reagenzienleerwerte

Ergebnisse dotierte Reagenzienleerwerte				
	Mess-Signal Aflatoxin B ₁	Mess-Signal Aflatoxin B ₂	Mess-Signal Aflatoxin G ₁	Mess-Signal Aflatoxin G ₂
% bezogen auf den Grenzwert (100 % = x µg/kg Probe)	100 % = 1,87 µg/kg	100 % = 0,58 µg/kg	100 % = 1,87 µg/kg	100 % = 0,59 µg/kg
	Signal (Ist) [FE]	Signal (Ist) [FE]	Signal (Ist) [FE]	Signal (Ist) [FE]
0 % Grenzwert (0 µg/kg)	0	0	0	0
50 % Grenzwert (1 µg/kg)	540921	188244	506546	45963
100 % Grenzwert (2 µg/kg)	935808	376486	885183	104936
150 % Grenzwert (3 µg/kg)	1156489	551099	1161117	161283
300 % Grenzwert (6 µg/kg)	2022641	1063845	2041609	406382
Lineare Kalibrierung	y = a + bx	y = a + bx	y = a + bx	y = a + bx
Steigung b (relativ)	309417	600631	347008	247526
Achsenabschnitt a [FE] ([µg/kg])	296049 (0,59)	22370 (0,03)	242924 (0,48)	-39420 (-0,22)
Relative Verfahrens- standardabweichung [%]	6,23 %	1,68 %	4,46 %	7,58 %
Korrelationskoeffizient	0,9975	0,9998	0,9987	0,9963

Tab. 5-13. Ergebnisse verdünnte Standardreihe

Ergebnisse verdünnte Standards				
	Mess-Signal Aflatoxin B ₁	Mess-Signal Aflatoxin B ₂	Mess-Signal Aflatoxin G ₁	Mess-Signal Aflatoxin G ₂
% bezogen auf den Grenzwert (100 % = x µg/kg Probe)	100 % = 1,87 µg/kg	100 % = 0,58 µg/kg	100 % = 1,87 µg/kg	100 % = 0,59 µg/kg
	Signal (Ist) [FE]	Signal (Ist) [FE]	Signal (Ist) [FE]	Signal (Ist) [FE]
0 % Grenzwert (0 µg/kg)	0	0	0	0
50 % Grenzwert (1 µg/kg)	479879	916779	912997	504843
100 % Grenzwert (2 µg/kg)	1089388	2147226	2266339	1660035
150 % Grenzwert (3 µg/kg)	1776323	3370283	3420914	2276201
300 % Grenzwert (6 µg/kg)	4061675	7463064	7592219	5199968
Lineare Kalibrierung	y = a + bx	y = a + bx	y = a + bx	y = a + bx
Steigung b	774322	4534090	1534017	3130795
Achsenabschnitt a	-320158	-470321	-455666	-360492
Relative Verfahrensstandardabweichung [%]	3,91 %	2,41 %	2,61 %	5,81 %
Korrelationskoeffizient	0,9990	0,9996	0,9996	0,9978

Abb. 5-1. Aflatoxin B₁: Regressionsgerade – dotierte Leerwertproben

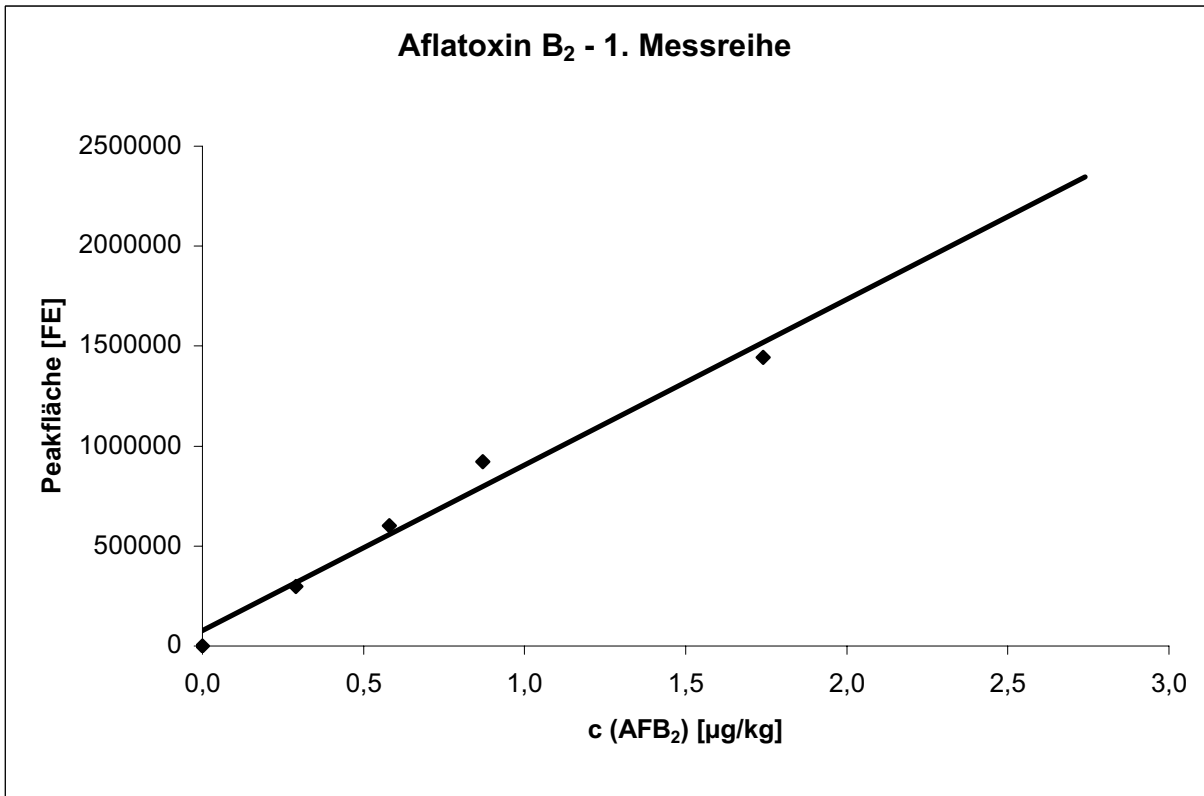


Abb. 5-2. Aflatoxin B₂: Regressionsgerade – dotierte Leerwertproben

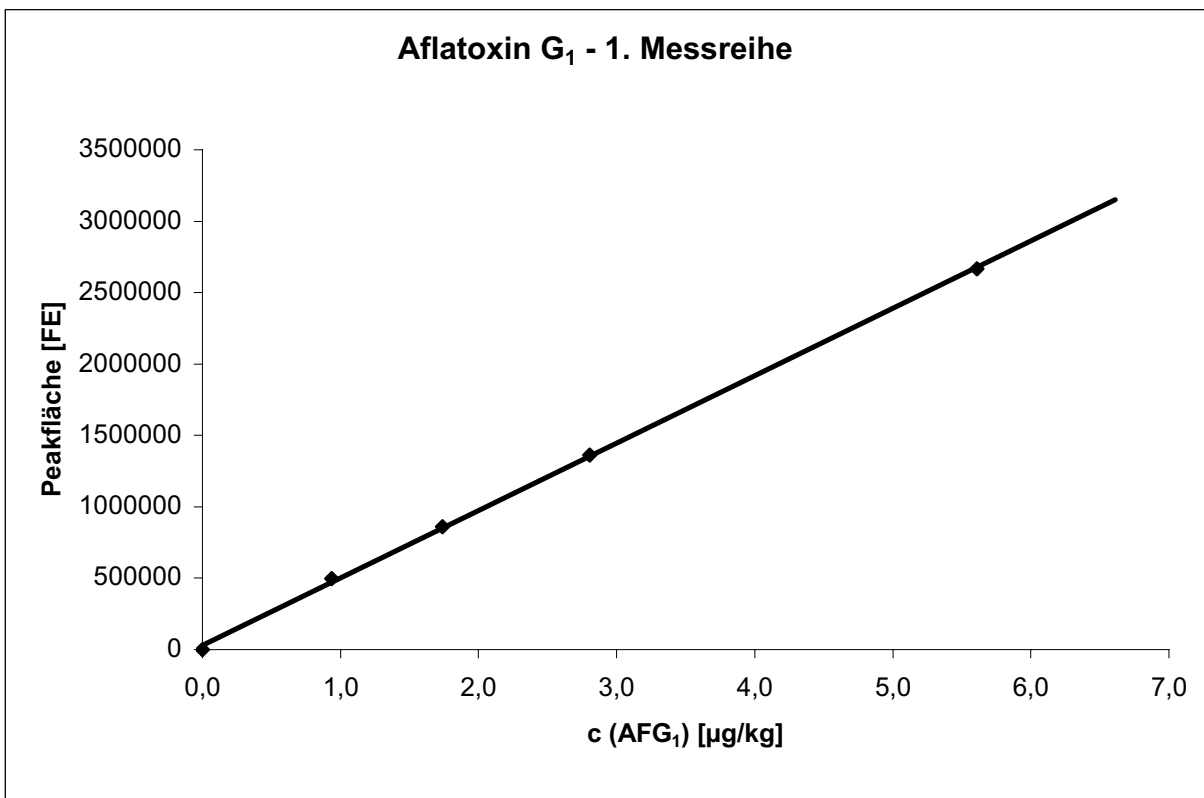


Abb. 5-3. Aflatoxin G₁: Regressionsgerade – dotierte Leerwertproben

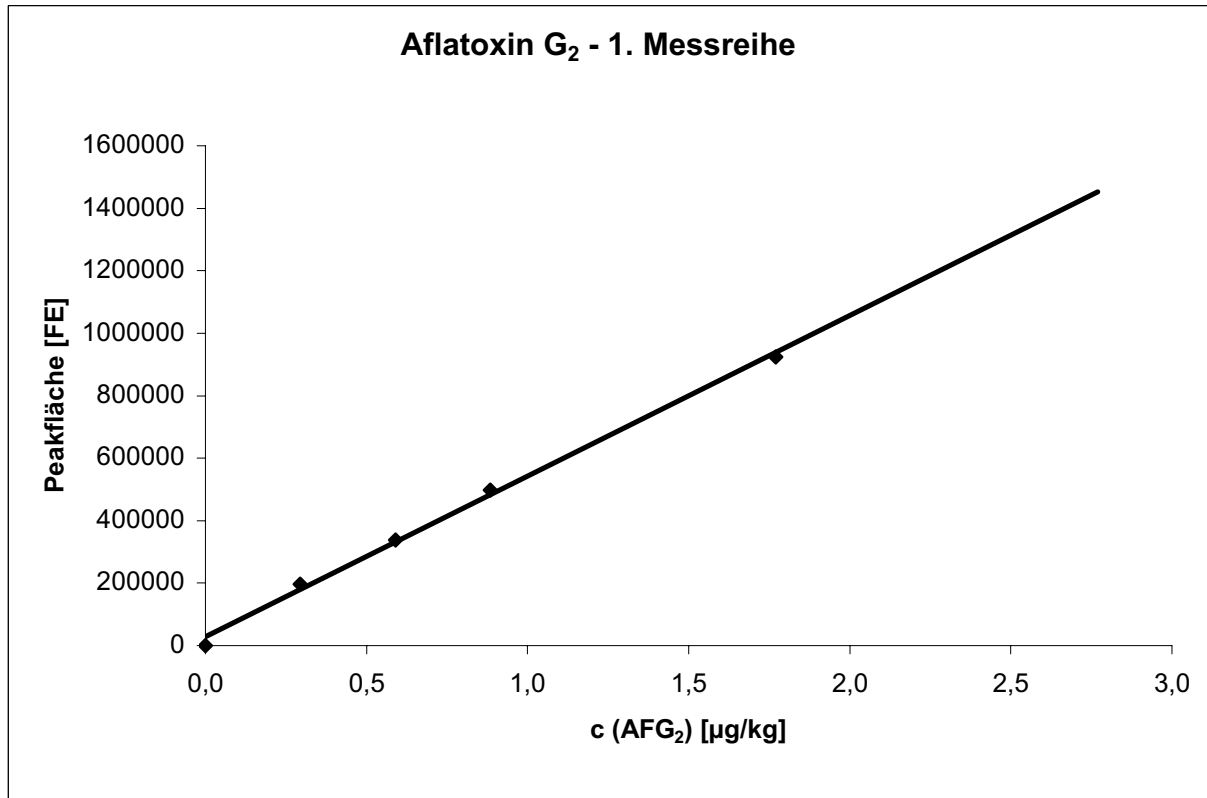


Abb. 5-4. Aflatoxin G₂: Regressionsgerade – dotierte Leerwertproben

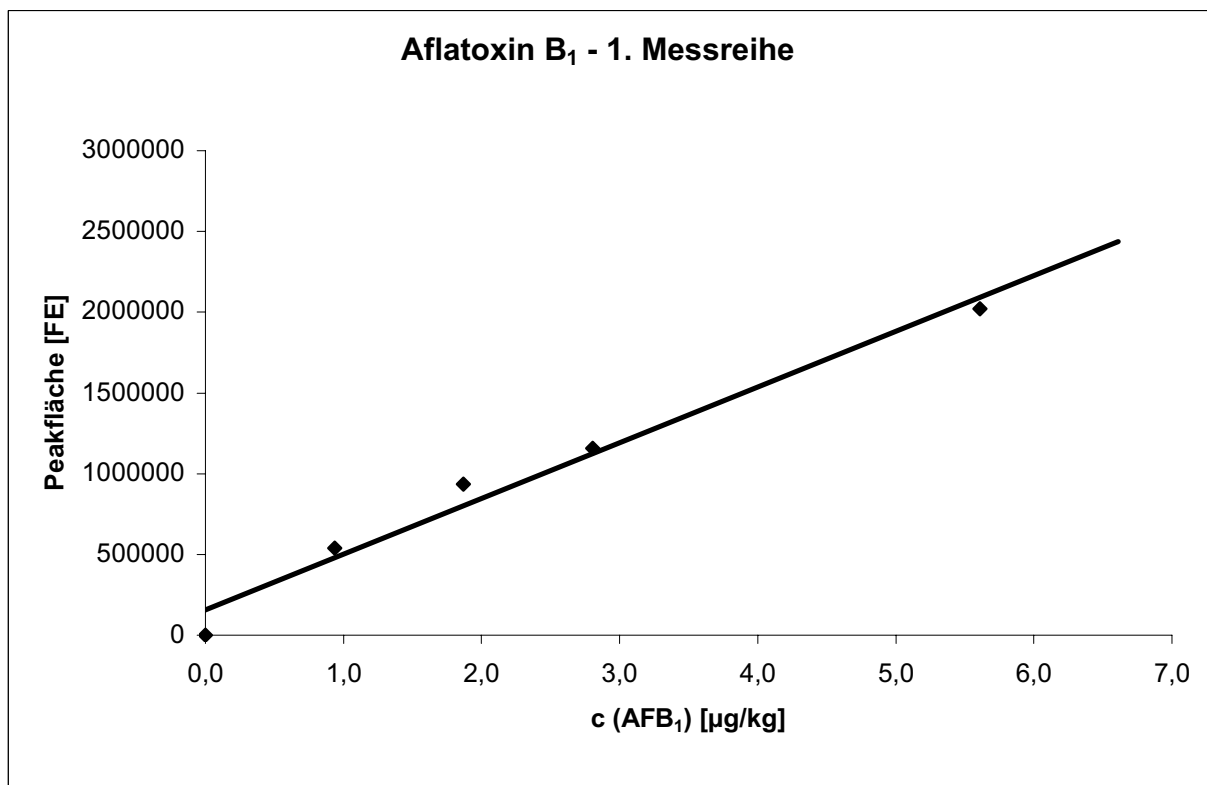


Abb. 5-5. Aflatoxin B₁: Regressionsgerade – dotierte Reagenzienleerwerte

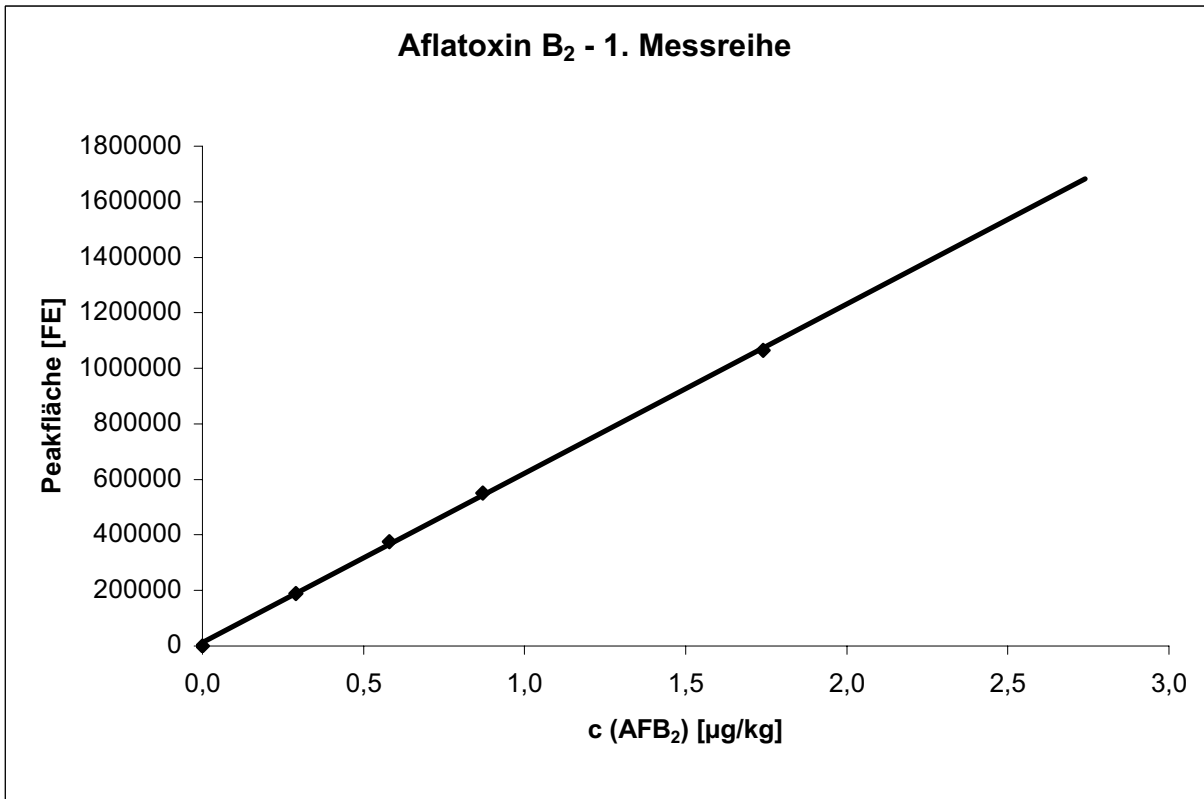


Abb. 5-6. Aflatoxin B₂: Regressionsgerade – dotierte Reagenzienleerwerte

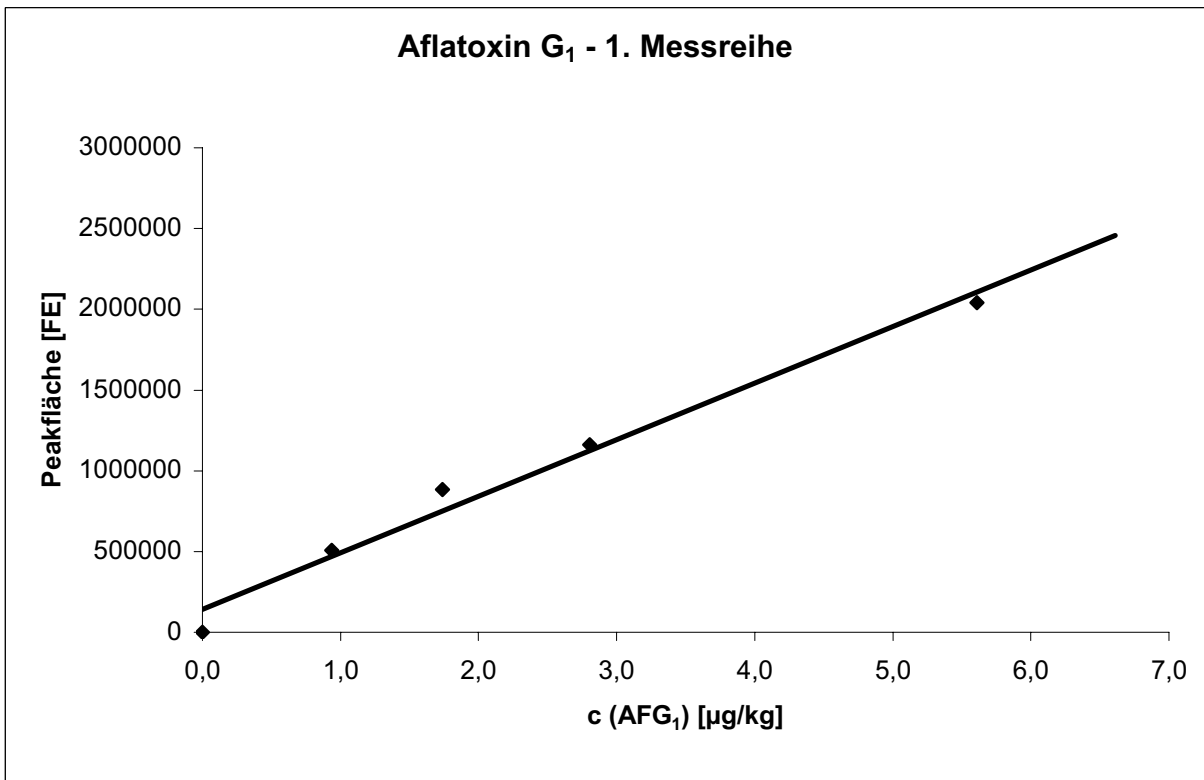


Abb. 5-7. Aflatoxin G₁: Regressionsgerade – dotierte Reagenzienleerwerte

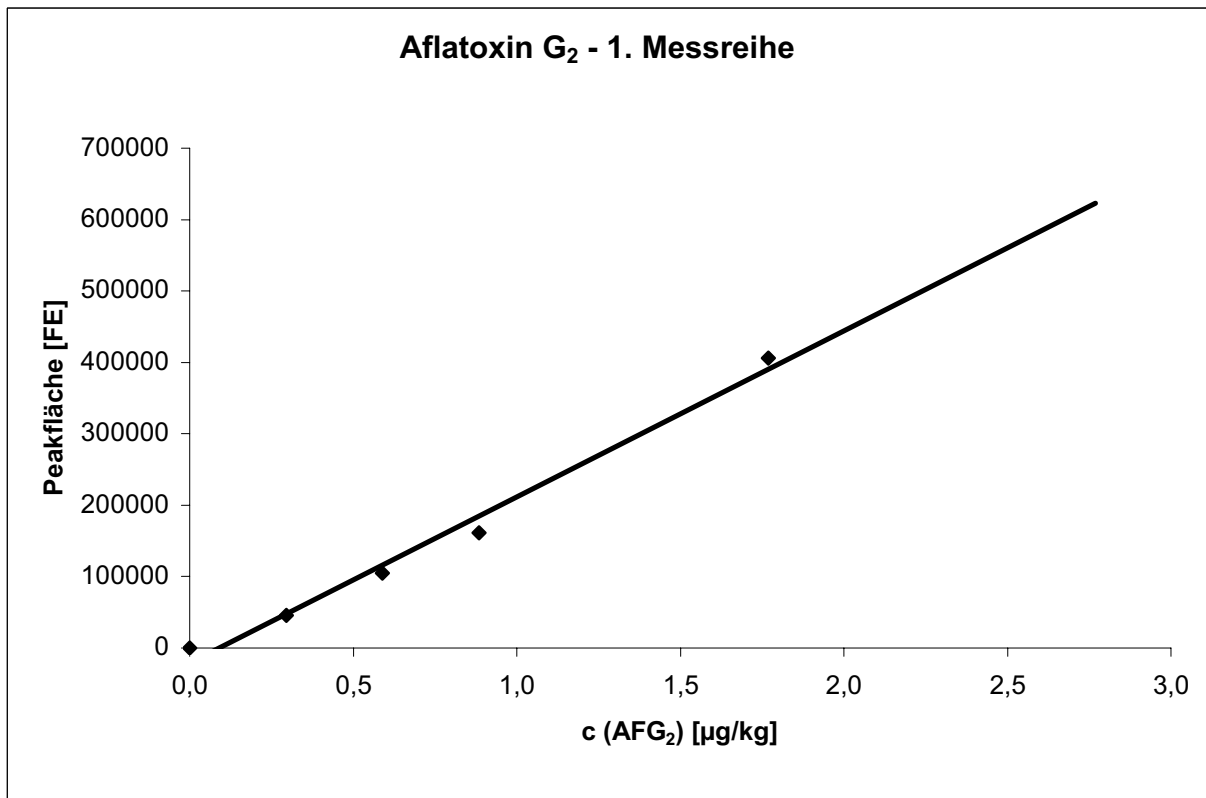


Abb. 5-8. Aflatoxin G₂: Regressionsgerade – dotierte Reagenzienleerwerte

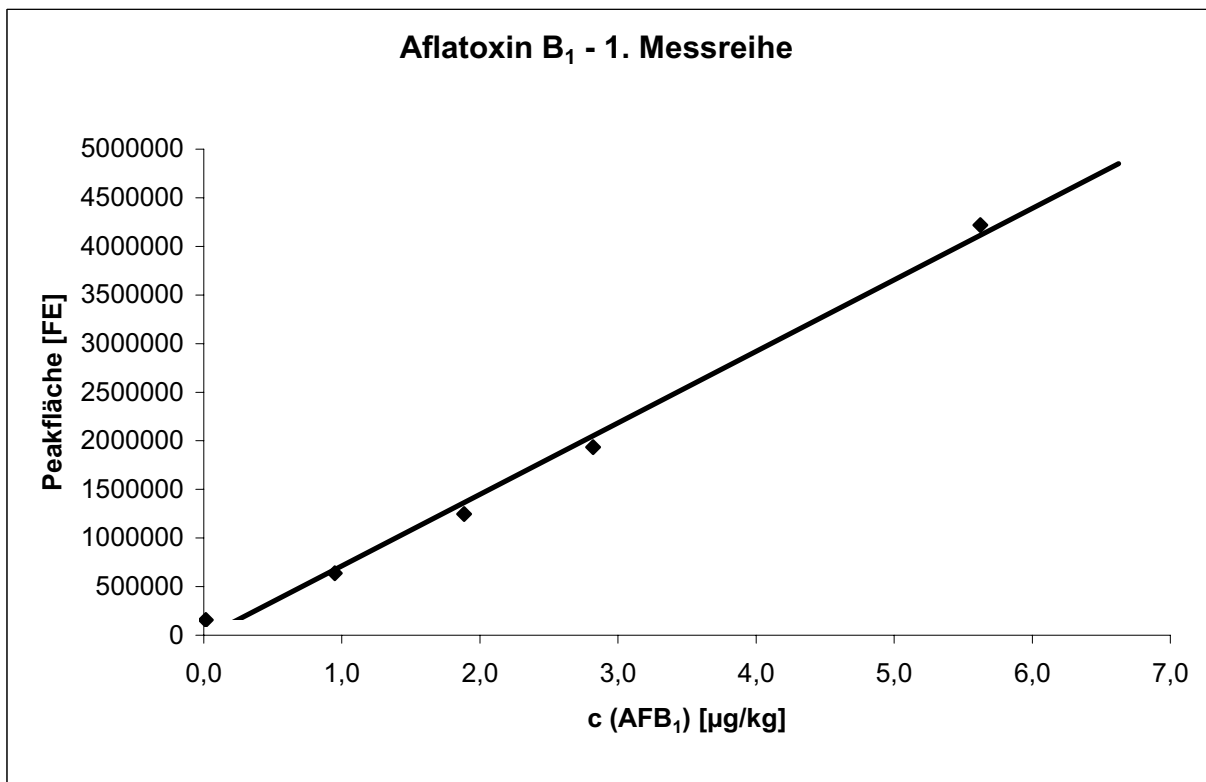


Abb. 5-9. Aflatoxin B₁: Regressionsgerade – verdünnte Standards

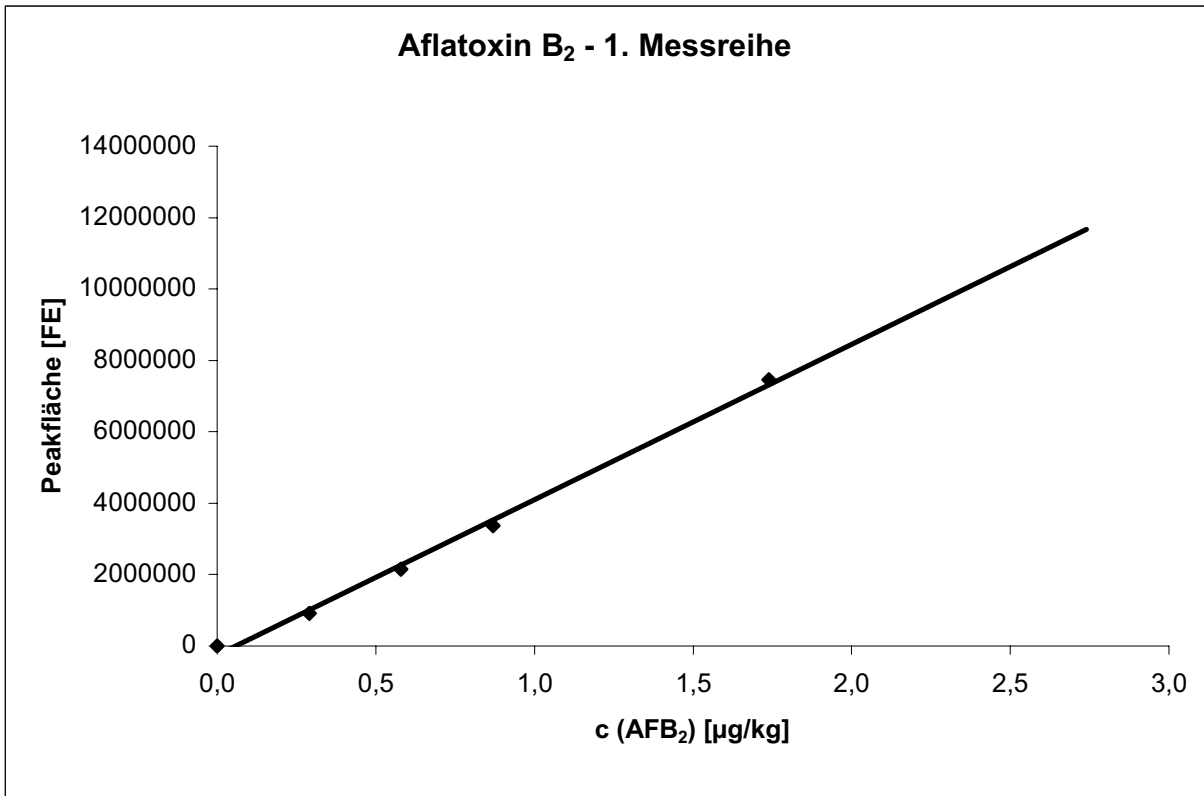


Abb. 5-10. Aflatoxin B₂: Regressionsgerade – verdünnte Standards

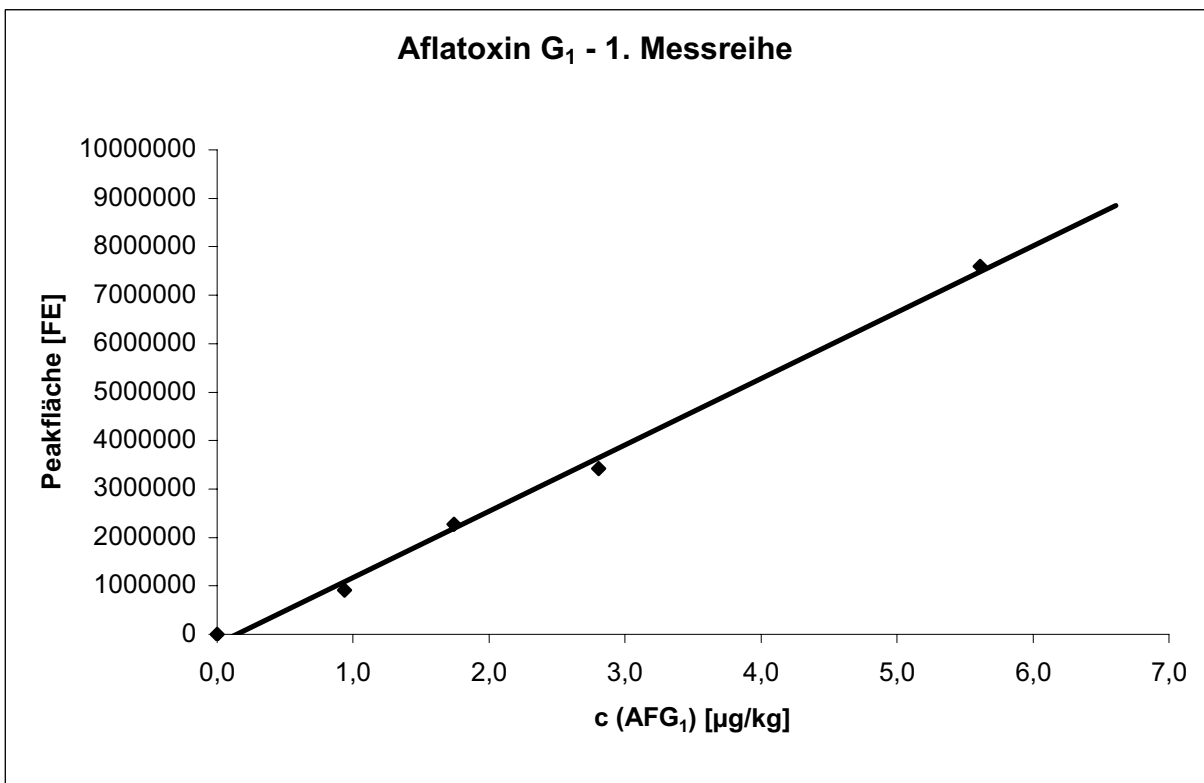


Abb. 5-11. Aflatoxin G₁: Regressionsgerade – verdünnte Standards

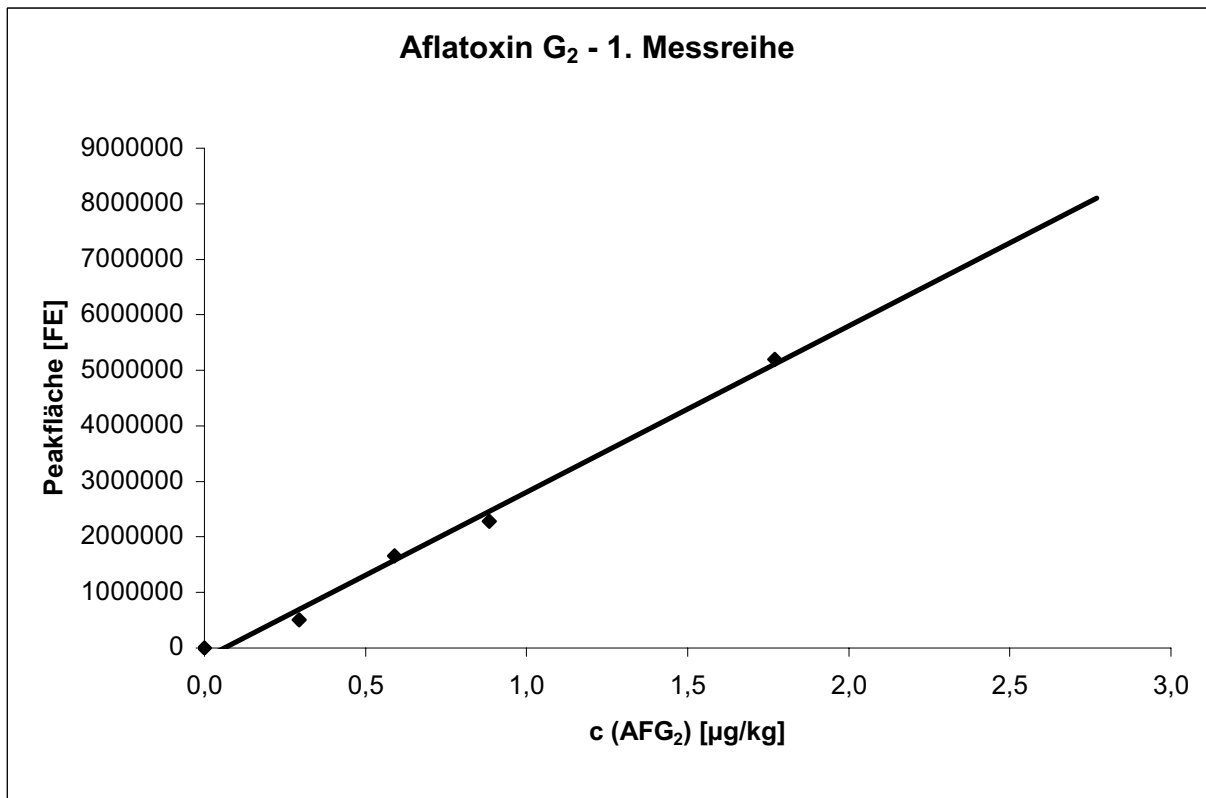


Abb. 5-12. Aflatoxin G₂: Regressionsgerade – verdünnte Standards

5.1.2.8 Festlegung der Kalibrierungsart

Die folgenden Berechnungen werden für den wichtigsten Analyten **Aflatoxin B₁** vorgenommen.

Tab. 5-14. Festlegung der Kalibrierungsart am Beispielanalyten Aflatoxin B₁

	0 % Grenzwert- Konz.	50 % Grenzwert- Konz.	100 % Grenzwert- Konz.	150 % Grenzwert- Konz.	300 % Grenzwert- Konz.
berechn. Mess-Signal verd. Std.	0	479879	1089388	1776323	4061675
berechn. Mess-Signal dot. Reag.lw.	0	540921	935808	1156489	2022641
berechn. Mess-Signal dot. Lw.probe	0	307001	563879	910013	1593466
Wiederfindung dot. Reag.lw. ¹	-	112,7 %	85,9 %	65,1 %	49,8 %
Wiederfindung dot. Lw.probe ¹	-	64,0 %	51,8 %	51,2 %	39,2 %

¹ Bezugspunkt der Berechnung ist das berechnete Mess-Signal der verdünnten Standards. Die Mess-Signale der verdünnten Standards entsprechen 100 % Wiederfindung

Aus dem Vergleich der Wiederfindungen resultiert in der Praxis eine Kalibrierung mit dotierten Leerwertproben. Hierdurch erfolgt eine automatische Wiederfindungskorrektur für Matrixeinflüsse.

Zugleich zeigt sich, dass der Vergleich von Daten, die in unterschiedlichen Sequenzen (dotierte Leerwertproben/Reagenzienleerwerte/verdünnte Standards) gewonnen wurden, nicht immer möglich ist (vergl. auch Daten für Aflatoxin B₂ und G₂). Die Ursache liegt in der Verwendung von Antikörpern, die sich zwar gleichmäßig in einer Sequenz (s. obige Regressionsgeraden), nicht jedoch zwischen den Sequenzen verhalten.

Die dem Achsenabschnitt entsprechende Konzentration (-0,03 µg/kg) der in der Praxis verwendeten Kalibrierungsart (dotierte Leerwertproben) liegt im Bereich der Nachweisgrenze (0,02 µg/kg) und deutlich unterhalb der Bestimmungsgrenze (0,20 µg/kg) des Analyten und kann somit vernachlässigt werden.

Tab. 5-15. Prüfung der Zulässigkeit der Einpunkt-Kalibrierung

Prüfung der Zulässigkeit einer 1-Punkt-Kalibrierung durch Vergleich: Auswertung mit Hilfe Geradenfunktion – Auswertung mit Hilfe 1-Punkt-Kalibrierung			
Zielwert: 1,87 µg/kg	c [µg/kg] (= A) Auswertung mit Geradenfunktion	c [µg/kg] (= B) Auswertung mit 1-Pkt.-Kal.	Abweichung B im Vergleich zu A (%)
1. Messung 100 % Grenzwert	1,82	1,87	2,67
2. Messung 100 % Grenzwert	1,66	1,87	11,36
3. Messung 100 % Grenzwert	1,63	1,87	13,50
4. Messung 100 % Grenzwert	1,66	1,87	10,97
5. Messung 100 % Grenzwert	2,13	1,87	13,88
6. Messung 100 % Grenzwert¹	-	-	-
			Mittl. Abwchg.= 10,48 %

¹ nicht verwertbar, da Leistungsfähigkeit der IA-Kartusche erschöpft

Der obige Vergleich der Auswertungen von Leerwertproben, die entsprechend einer Konzentration von 100 % des Grenzwertes dotiert wurden, zeigt die Anwendbarkeit der 1-Punkt-Kalibrierung.

Der Arbeitsbereich der 1-Punkt-Kalibrierung für Aflatoxin B₁ beträgt: 0,20 µg/kg (Bestimmungsgrenze) bis 6 µg/kg.

5.1.2.9 Wiederholpräzision/Wiederfindung (Richtigkeit)

Die Konzentrationen wurden mit Hilfe der 1-Punkt-Kalibrierung berechnet. Eine Kommentierung der ermittelten Werte findet sich ebenfalls im Ergebnisteil unter 4.2.9.

Tab. 5-16. Aflatoxin B₁: Wiederholpräzision und Wiederfindung

Aflatoxin B₁		50 % Grenzwert (0,935 µg/kg)	100 % Grenzwert (1,87 µg/kg)*	150 % Grenzwert (2,805 µg/kg)
Mittelwert Konzentration [µg/kg]	1. Messreihe	1,07	1,87	3,14
	2. Messreihe	0,94	1,87	3,44
	Mittelwert	1,01	1,87	3,29
Mittelwert Wiederfindung [%]	1. Messreihe	114,4 %	100 %	111,9 %
	2. Messreihe	100,5 %	100 %	122,6 %
	Mittelwert	107,5 %	100 %	117,3 %
Rel. Standardabw. [%]	1. Messreihe	6,68 %	12,07 %	8,87 %
	2. Messreihe	6,70 %	16,12 %	9,22 %
	Mittelwert	6,69 %	14,10 %	9,05 %
Abs. Standardabw. Konzentration [µg/kg]	1. Messreihe	0,07	0,23	0,28
	2. Messreihe	0,06	0,30	0,32
	Mittelwert	0,07	0,27	0,30
Abs. Standardabw. Wiederfindung [%]	1. Messreihe	7,64 %	12,07 %	9,93 %
	2. Messreihe	6,73 %	16,12 %	11,30 %
	Mittelwert	7,19 %	14,10 %	10,62 %
Wiederholbarkeit (95 %) Konzentration [µg/kg]	1. Messreihe	0,20	0,64	0,78
	2. Messreihe	0,17	0,84	0,89
	Mittelwert	0,19	0,74	0,84
Wiederholbarkeit (95 %) Wiederfindung [%]	1. Messreihe	21,39 %	33,80 %	27,79 %
	2. Messreihe	18,85 %	45,14 %	31,65 %
	Mittelwert	20,12 %	39,47 %	29,72 %

* Matrixkalibrierstandard; Werte für Standardabweichung usw. über die Flächen berechnet

Tab. 5-17. Aflatoxin B₂: Wiederholpräzision und Wiederfindung

Aflatoxin B₂		50 % Grenzwert (0,29 µg/kg)	100 %* Grenzwert (0,58 µg/kg)*	150 % Grenzwert (0,87 µg/kg)
Mittelwert Konzentration [µg/kg]	1. Messreihe	0,28	0,58	0,86
	2. Messreihe	0,31	0,58	0,80
	Mittelwert	0,30	0,58	0,83
Mittelwert Wiederfindung [%]	1. Messreihe	96,6 %	100 %	98,9 %
	2. Messreihe	106,9 %	100 %	92,0 %
	Mittelwert	101,8 %	100 %	95,5 %
Rel. Standardabw. [%]	1. Messreihe	11,20 %	13,60 %	13,59 %
	2. Messreihe	9,89 %	2,81 %	9,59 %
	Mittelwert	10,55 %	8,21 %	11,59 %
Abs. Standardabw. Konzentration [µg/kg]	1. Messreihe	0,03	0,08	0,12
	2. Messreihe	0,03	0,02	0,08
	Mittelwert	0,03	0,05	0,10
Abs. Standardabw. Wiederfindung [%]	1. Messreihe	10,82 %	13,60 %	13,44 %
	2. Messreihe	10,57 %	2,86 %	8,82 %
	Mittelwert	10,70 %	8,23 %	11,13 %
Wiederholbarkeit (95 %) Konzentration [µg/kg]	1. Messreihe	0,09	0,22	0,33
	2. Messreihe	0,09	0,05	0,21
	Mittelwert	0,09	0,14	0,27
Wiederholbarkeit (95 %) Wiederfindung [%]	1. Messreihe	30,29 %	38,08 %	37,63 %
	2. Messreihe	29,60 %	8,00 %	24,70 %
	Mittelwert	29,95 %	23,04 %	31,17 %

* Matrixkalibrierstandard; Werte für Standardabweichung usw. über die Flächen berechnet

Tab. 5-18. Aflatoxin G₁: Wiederholpräzision und Wiederfindung

Aflatoxin G₁		50 % Grenzwert (0,87 µg/kg)	100 %* Grenzwert (1,74 µg/kg)	150 % Grenz- wert (2,61 µg/kg)
Mittelwert Konzentration [µg/kg]	1. Messreihe	0,98	1,74	3,11
	2. Messreihe	0,89	1,74	2,79
	Mittelwert	0,94	1,74	2,95
Mittelwert Wiederfin- dung [%]	1. Messreihe	112,6 %	100 %	119,2 %
	2. Messreihe	102,3 %	100 %	106,9 %
	Mittelwert	107,5 %	100 %	113,1 %
Rel. Standardabw. [%]	1. Messreihe	15,93 %	3,39 %	16,31 %
	2. Messreihe	15,59 %	8,42 %	6,9 %
	Mittelwert	15,76 %	5,91 %	11,61 %
Abs. Standardabw. Konzentration [µg/kg]	1. Messreihe	0,16	0,06	0,51
	2. Messreihe	0,14	0,09	0,19
	Mittelwert	0,15	0,08	0,35
Abs. Standardabw. Wiederfindung [%]	1. Messreihe	17,94 %	3,33 %	19,44 %
	2. Messreihe	15,95 %	9,00 %	7,38 %
	Mittelwert	16,95 %	6,17 %	13,41 %
Wiederholbarkeit (95 %) Konzentration [µg/kg]	1. Messreihe	0,44	0,16	1,42
	2. Messreihe	0,39	0,25	0,54
	Mittelwert	0,42	0,21	0,98
Wiederholbarkeit (95 %) Wiederfindung [%]	1. Messreihe	50,22 %	9,33 %	54,44 %
	2. Messreihe	44,66 %	25,20 %	20,65 %
	Mittelwert	47,44 %	17,27 %	37,55 %

* Matrixkalibrierstandard; Werte für Standardabweichung usw. über die Flächen berechnet

Tab. 5-19. Aflatoxin G₂: Wiederholpräzision und Wiederfindung

Aflatoxin G₂		50 % Grenzwert (0,295 µg/kg)	100 % Grenzwert (0,59 µg/kg)	150 % Grenz- wert (0,885 µg/kg)
Mittelwert Konzentration [µg/kg]	1. Messreihe	0,33	0,59	0,83
	2. Messreihe	0,30	0,59	0,71
	Mittelwert	0,32	0,59	0,77
Mittelwert Wiederfin- dung [%]	1. Messreihe	111,9 %	100 %	93,8 %
	2. Messreihe	101,7 %	100 %	80,2 %
	Mittelwert	106,8 %	100 %	87,0 %
Rel. Standardabw. [%]	1. Messreihe	18,97 %	1,39 %	22,05 %
	2. Messreihe	20,15 %	2,89 %	11,91 %
	Mittelwert	19,56 %	2,14 %	16,98 %
Abs. Standardabw. Konzentration [µg/kg]	1. Messreihe	0,06	0,01	0,18
	2. Messreihe	0,06	0,02	0,08
	Mittelwert	0,06	0,02	0,13
Abs. Standardabw. Wiederfindung [%]	1. Messreihe	21,23 %	1,39 %	20,68 %
	2. Messreihe	20,49 %	2,84 %	9,55 %
	Mittelwert	20,86 %	2,12	15,12 %
Wiederholbarkeit (95 %) Konzentration [µg/kg]	1. Messreihe	0,18	0,02	0,51
	2. Messreihe	0,17	0,05	0,24
	Mittelwert	0,18	0,04	0,38
Wiederholbarkeit (95 %) Wiederfindung [%]	1. Messreihe	59,44 %	3,89 %	57,90 %
	2. Messreihe	57,38 %	7,95 %	26,75 %
	Mittelwert	58,41 %	5,92 %	42,33 %

* Matrixkalibrierstandard; Werte für Standardabweichung usw. über die Flächen berechnet

5.1.2.10 Laborinterne Reproduzierbarkeit und Messunsicherheit

Die laborinterne Reproduzierbarkeit bzw. Messunsicherheit wurde mit Hilfe der Messungen der 1. und 2. Messreihe der dotierten Leerwertproben bestimmt.

Mit dem F- und t-Test wird dabei software-gestützt (Valoo 1.0) geprüft, ob die Standardabweichungen aus zwei unterschiedlichen Messreihen vergleichbar sind, ob also Varianzhomogenität herrscht (Test auf Gleichheit der Varianzen). Ist das der Fall, so stammen die Werte aus einer Grundgesamtheit (KROMIDAS, 1999, S. 74; FUNK et al. 1992, S. 19f).

F- und t-test zeigten, dass die Messergebnisse beider Messreihen zur Auswertung herangezogen werden dürfen.

Die Wiederfindung der 100 %-Stufe ist wiederum definitionsgemäß gleich 100 %, da diese Stufe als Matrixkalibrierstandard eingesetzt wurde.

Tab. 5-20. Aflatoxin B₁: Laborinterne Reproduzierbarkeit und Messunsicherheit

Aflatoxin B₁		50 % Grenzwert (0,935 µg/kg)	100 % Grenzwert (1,87 µg/kg)	150 % Grenzwert (2,805 µg/kg)
Mittelwert Konzentration [µg/kg]	1. – 2. Messreihe	1,01	1,87	3,29
Mittelwert Wiederfindung [%]	1. – 2. Messreihe	107,5 %	100 %	117,3 %
Rel. Standardabw. [%]	1. – 2. Messreihe	6,69 %	14,10 %	9,05 %
Abs. Standardabw. Kon- zentration [µg/kg]	1. – 2. Messreihe	0,07	0,27	0,30
Abs. Standardabw. Wieder- findung [%]	1. – 2. Messreihe	7,19 %	14,10 %	10,62 %
Wiederholbarkeit (95 %) Konzentration (≈ 2,8 x s) [µg/kg]	1. – 2. Messreihe	0,19	0,74	0,84
Wiederholbarkeit (95 %) Wiederfindung (≈ 2,8 x s) [%]	1. – 2. Messreihe	20,12 %	39,47 %	29,72 %

Tab. 5-21. Aflatoxin B₂: Laborinterne Reproduzierbarkeit und Messunsicherheit

Aflatoxin B₂		50 % Grenzwert (0,29 µg/kg)	100 % Grenzwert (0,58 µg/kg)	150 % Grenz- wert (0,87 µg/kg)
Mittelwert Konzentration [µg/kg]	1. – 2. Messreihe	0,30	0,58	0,83
Mittelwert Wiederfin- dung [%]	1. – 2. Messreihe	101,8%	100 %	95,5 %
Rel. Standardabw. [%]	1. – 2. Messreihe	10,55 %	8,21 %	11,59 %
Abs. Standardabw. Kon- zentration [µg/kg]	1. – 2. Messreihe	0,03	0,05	0,10
Abs. Standardabw. Wiederfindung [%]	1. – 2. Messreihe	10,70 %	8,23 %	11,13 %
Wiederholbarkeit (95 %) Konzentration ($\approx 2,8 \times s$) [µg/kg]	1. – 2. Messreihe	0,09	0,14	0,27
Wiederholbarkeit (95 %) Wiederfindung ($\approx 2,8 \times s$) [%]	1. – 2. Messreihe	29,95 %	23,04 %	31,17 %

Tab. 5-22. Aflatoxin G₁: Laborinterne Reproduzierbarkeit und Messunsicherheit

Aflatoxin G₁		50 % Grenzwert (0,87 µg/kg)	100 % Grenzwert (1,74 µg/kg)	150 % Grenz- wert (2,61 µg/kg)
Mittelwert Konzentration [µg/kg]	1. – 2. Messreihe	0,94	1,79	2,95
Mittelwert Wiederfin- dung [%]	1. – 2. Messreihe	107,5 %	100 %	113,1 %
Rel. Standardabw. [%]	1. – 2. Messreihe	15,76 %	5,91 %	11,61 %
Abs. Standardabw. Kon- zentration [µg/kg]	1. – 2. Messreihe	0,15	0,08	0,35
Abs. Standardabw. Wiederfindung [%]	1. – 2. Messreihe	16,95 %	6,17 %	13,41 %
Wiederholbarkeit (95 %) Konzentration ($\approx 2,8 \times s$) [µg/kg]	1. – 2. Messreihe	0,42	0,21	0,98
Wiederholbarkeit (95 %) Wiederfindung ($\approx 2,8 \times s$) [%]	1. – 2. Messreihe	47,44 %	17,27 %	37,55 %

Tab. 5-23. Aflatoxin G₂: Laborinterne Reproduzierbarkeit und Messunsicherheit

Aflatoxin G₂		50 % Grenzwert (0,295 µg/kg)	100 % Grenzwert (0,59 µg/kg)	150 % Grenz- wert (0,885 µg/kg)
Mittelwert Konzentration [µg/kg]	1. – 2. Messreihe	0,32	0,59	0,77
Mittelwert Wiederfin- dung [%]	1. – 2. Messreihe	106,8 %	100 %	87,0 %
Rel. Standardabw. [%]	1. – 2. Messreihe	19,56 %	2,14 %	16,98 %
Abs. Standardabw. Kon- zentration [µg/kg]	1. – 2. Messreihe	0,06	0,02	0,13
Abs. Standardabw. Wiederfindung [%]	1. – 2. Messreihe	20,86 %	2,12 %	15,12 %
Wiederholbarkeit (95 %) Konzentration (≈ 2,8 x s) [µg/kg]	1. – 2. Messreihe	0,18	0,04	0,38
Wiederholbarkeit (95 %) Wiederfindung (≈ 2,8 x s) [%]	1. – 2. Messreihe	58,41 %	5,92 %	42,33 %

5.1.2.11 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Berechnung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze nach DIN 32645 ergibt zu hohe Werte, verursacht durch die geringe Anzahl an Datenpunkten.

Über das Signal/Rausch-Verhältnis (S/N) berechnet ergeben sich folgende Werte, vergl. 4.1.9.2:

Tab. 5-24. Aflatoxine: Nachweis- und Bestimmungsgrenze

	Nachweisgrenze (S/N = 3)	Bestimmungsgrenze (S/N = 10)
Aflatoxin B₁	0,07 µg/kg	0,20 µg/kg
Aflatoxin B₂	0,02 µg/kg	0,06 µg/kg
Aflatoxin G₁	0,05 µg/kg	0,17 µg/kg
Aflatoxin G₂	0,05 µg/kg	0,16 µg/kg

5.1.3 Gesamtbewertung der Validierung

Das verwendete Prüfverfahren ist für die Bestimmung von Aflatoxinen in pflanzlichen Lebensmitteln geeignet.

Die gesetzlichen Anforderungen an die Leistungsfähigkeit einer Analyseverfahren nach EU-Verordnung 401/2006 vom 23.2.2006 zur „Festlegung der Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Kontrolle des Mykotoxingehalts von Lebensmitteln“ werden eingehalten, einzige Ausnahme ist die Wiederfindung für Aflatoxin B₁ und G₁ bei Stufe 150 %, die 117 % bzw. 113 % statt der geforderten max. 110 % beträgt. Allerdings resultieren hieraus keine Minder- oder Falsch-Negativbefunde.

5.2 Patulin

Grundlage dieser Validierung ist die unter 3.2 beschriebene Prüfmethode zur Bestimmung des Gehalts an Patulin in pflanzlichen Lebensmitteln mittels online-SPE-LC. In dieser Methode sind Probenvorbereitung, Analysebedingungen und Hinweise zur Auswertung beschrieben.

Für die Berechnung wurde die Validierungssoftware Valoo 1.0 (analytik-software Dr. Stella Windmann) verwendet.

5.2.1 Messungen

5.2.1.1 Systemtest

Es wurden folgende Geräte dem Systemtest unterworfen:

LC-Anlage PH-3, bestehend aus den Komponenten Degasser SCM1000, Pumpe P4000, Autosampler AS3000, UV-Detektor UV1000, System-Steuerungsgerät SN4000 (alle Thermo Fisher Scientific), Probenvorbereitungseinheit SP 3000 (Knauer)

Für den Systemtest wurde folgende Standardlösung verwendet: Patulin-RefM₁, c (Patulin) = 20 µg/L, entsprechend 33,3 µg/kg.

Zur Blindwertbestimmung wurde Acetatpuffer (pH 4) (3.2.3.2) verwendet.

- a) Standardlösung (20 µg/L, entspr. 33,3 µg/kg) 6 x gemessen
 b) Blindwert 6 x gemessen

5.2.1.2 Spezifität

Es wurden folgende Matrices verwendet

Tab. 5-25. Matrices zur Spezifitätsprüfung

Matrix	Typ	Min. R _s
Fruchtsaft	Apfelsaft	R _s > 0,8
Frucht	Sauerkirschen	R _s > 0,8

Die Proben wurden mit folgendem Standard dotiert: Patulin-Dot₁; entspr. 50 µg/kg
 Die ermittelte minimale Auflösung soll die Anforderung von R_s > 0,8 erfüllen.

5.2.1.3 Selektivität

Tab. 5-26. Standard zur Selektivitätsprüfung

Standard	Min. R _s
Patulin/HMF-RefM ₁	R _s > 0,8

Die ermittelte minimale Auflösung soll die Anforderung von R_s > 0,8 erfüllen.

5.2.1.4 Anwendbarkeit/Robustheit

Die Qualität der Analyse wird über dotierte Proben kontrolliert. Je Aufarbeitung wird mindestens eine dotierte unbelastete Probe, angepasst an die zu untersuchende Matrix, analysiert. Die Dotierung erfolgte in einer Konzentration entsprechend 50 µg/kg.

Zusätzlich wurde eine Probe Sauerkirschen analysiert.

5.2.1.5 Kalibrierkurve/Linearität (1. Messreihe dotierte Proben und zugehörige Messreihen dotierte Reagenzienleerwerte und verdünnte Standards)

Für diese Messreihe wurde die Anlage PH-3 verwendet (Bestandteile der Anlage siehe 5.2.1.1).

Die Probenvorbereitungen und Messungen wurden am 31.03. und die Auswertungen am 08.04.2006 durchgeführt.

Probenmaterial (Leerwertprobe): Apfelsaft

Das Referenzmaterial wurde für die Messreihe der verdünnten Standards in Acetatpuffer (pH 4) (3.2.3.2) gelöst.

Die oben genannte Leerwertprobe wird mit folgenden Konzentrationen dotiert, aufbereitet und gemessen:

- | | |
|--|---|
| a) 0% Grenzwert-Konzentration (0 µg/kg) | 3 Aufbereitungen, jeweils 1x gemessen |
| b) 50 % Grenzwert-Konzentration (25 µg/kg) | 6 Aufbereitungen , jeweils 1x gemessen |
| c) 100 % Grenzwert-Konzentration (50 µg/kg) | 6 Aufbereitungen , jeweils 1x gemessen |
| d) 150 % Grenzwert-Konzentration (75 µg/kg) | 6 Aufbereitungen , jeweils 1x gemessen |
| e) 300 % Grenzwert-Konzentration (150 µg/kg) | 3 Aufbereitungen, jeweils 1x gemessen |
| f) Matrixkalibrierung (100 µg/kg = 200 %) | 3 Aufbereitungen, jeweils 1x gemessen |

In dieser Messreihe wurde im Gegensatz zur 2. Messreihe mit einer zusätzlichen Stufe zur Matrixkalibrierung gearbeitet.

Ein zugehöriger Reagenzienleerwert wird wie folgt dotiert, aufbereitet und gemessen

- | | |
|--|-----------------------------|
| a) 0% Grenzwert-Konzentration (0 µg/kg) | 1 Aufbereitung, 1x gemessen |
| b) 50 % Grenzwert-Konzentration (25 µg/kg) | 1 Aufbereitung, 1x gemessen |
| c) 100 % Grenzwert-Konzentration (50 µg/kg) | 1 Aufbereitung, 1x gemessen |
| d) 150 % Grenzwert-Konzentration (75 µg/kg) | 1 Aufbereitung, 1x gemessen |
| e) 300 % Grenzwert-Konzentration (150 µg/kg) | 1 Aufbereitung, 1x gemessen |

Verdünnte Standards werden in den folgenden Konzentrationen hergestellt und gemessen:

- | | |
|--|-----------|
| a) 0% Grenzwert-Konzentration (0 µg/kg) | 1 Messung |
| b) 50 % Grenzwert-Konzentration (25 µg/kg) | 1 Messung |
| c) 100 % Grenzwert-Konzentration (50 µg/kg) | 1 Messung |
| d) 150 % Grenzwert-Konzentration (75 µg/kg) | 1 Messung |
| e) 300 % Grenzwert-Konzentration (150 µg/kg) | 1 Messung |

5.2.1.6 Wiederholpräzision/Wiederfindung

Die Daten für die Ermittlung der Wiederholpräzision und der Wiederfindung werden aus der 1. und 2. Messreihe generiert.

5.2.1.7 Laborinterne Reproduzierbarkeit/Messungengenauigkeit (2. Messreihe dotierte Proben)

Für diese Messreihe wurde die Anlage PH-3 verwendet (Bestandteile der Anlage siehe 5.2.1.1).

Die Probenvorbereitungen und Messungen wurden am 14.09. und die Auswertungen am 17.09.2006 durchgeführt. Die Durchführung erfolgte durch eine andere Person als bei der 1. Messreihe, unter Verwendung anderer Chemikalien. Die Verwendung eines anderen LC-Geräts war nicht möglich, da eine entsprechend ausgestattete Anlage nur einmal zur Verfügung stand.

Probematerial: Apfelsaft

Die oben genannte Leerwertprobe wird mit folgenden Konzentrationen dotiert:

- a) 50 % Grenzwert-Konzentration (25 µg/kg) 6 Aufbereitungen, jeweils 1x gemessen
- b) 100 % Grenzwert-Konzentration (50 µg/kg) 6 Aufbereitungen, jeweils 1x gemessen
- c) 150 % Grenzwert-Konzentration (75 µg/kg) 6 Aufbereitungen, jeweils 1x gemessen

5.2.1.8 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurden softwaregestützt nach DIN 32645 ermittelt (Valoo 1.0).

Zum Vergleich wurde die Nachweis- und Bestimmungsgrenze auch über das Signal-Rausch-Verhältnis bestimmt. Hierzu wird das Chromatogramm einer Grenzwert-dotierten Probe verwendet, s 4.2.9.2. Für die Nachweisgrenze wurde die Vorgabe S/N = 3 und für die Bestimmungsgrenze die Vorgabe S/N = 10 gemacht.

5.2.2 Ergebnisse/Bewertungen

5.2.2.1 Systemeignungstest

Tab. 5-27. Systemeignungstest Patulin

Mittelwert Mess-Signal [FE]	Rel. Standardabw. Mess-Signal	Mittlere Reten- tionszeit [min]	Rel. Standardabw. Retentionszeit
47028	1,39 %	18,59 min	0,22 %

Die Forderung der relativen Standardabweichung für Mess-Signal und Retentionszeit von < 5% ist erfüllt.

Verschleppungen treten nicht auf. Allerdings eluiert ein Systempeak hinter Patulin, der jedoch die Auswertung nicht stört.

5.2.2.2 Spezifität

Die Forderung $R_s > 0,8$ ist für beide Proben erfüllt.

Die geringste Auflösung beträgt

$R_s = 1,63$ für den Analyten Patulin (zu Matrix)

5.2.2.3 Selektivität

Die Forderung $R_s > 0,8$ ist erfüllt.

Die geringste Auflösung beträgt $R_s = 2,39$ für den Analyten Patulin (zu HMF).

5.2.2.4 Anwendbarkeit/Robustheit

Für die dotierten Proben wird die Forderung einer Wiederfindung zwischen 70–110 % erfüllt (bei Matrixkalibrierung gemäß Prüfmethode).

Die erzielten Wiederfindungen betragen

83,9 % für die Matrix Apfelsaft,

89,7 % für die Matrix Aprikosen.

Dies entspricht der oben genannten Forderung.

5.2.2.5 Kalibrierkurve/Linearität

Die Kalibrierkurve/Linearität wurde mit Hilfe der Messungen der 1. Messreihe bestimmt.

Tab. 5-28. Ergebnisse dotierte Leerwertproben (Apfelsaft) – 1. Messreihe

Ergebnisse dotierte Leerwertproben	
% bezogen auf den Grenzwert (100 % = 50 µg/kg Probe)	Mittelwert des Mess- Signals Patulin Signal (Ist) [FE]
0 % Grenzwert (0 µg/kg)	0
50 % Grenzwert (25 µg/kg)	24983
100 % Grenzwert (50 µg/kg)	46774
150 % Grenzwert (75 µg/kg)	70444
300 % Grenzwert (150 µg/kg)	142553
Lineare Kalibrierung	$y = a + bx$
Steigung $b^{1,2}$	942,60 (83,0 % Wdf.)
Achsenabschnitt a [µg/kg]²	276,56 (2,02 µg/kg)
Relative Verfahrens- standardabweichung [%]	1,57 %
Korrelationskoeffizient	0,9998

¹ Angabe der relativen Steigung (= Wiederfindung) bei dieser Messreihe möglich, da eine zusätzliche Stufe (200 %) zur Matrixkalibrierung eingesetzt wurde

² Erläuterung s. Tab. 5-29

Tab. 5-29. Ergebnisse dotierte Reagenzienleerwertproben

Ergebnisse dotierte Reagenzien-Leerwertproben	
% bezogen auf den Grenzwert (100 % = 50 µg/kg Probe)	Mess-Signal
	Signal (Ist) [FE]
0 % Grenzwert (0 µg/kg)	0
50 % Grenzwert (25 µg/kg)	28402
100 % Grenzwert (50 µg/kg)	49029
150 % Grenzwert (75 µg/kg)	78225
300 % Grenzwert (150 µg/kg)	159664
Lineare Kalibrierung	$y = a + bx$
Steigung b^2	0,9391
Achsenabschnitt a [µg/kg]²	0,1916
Relative Verfahrens- standardabweichung [%]	3,89 %
Korrelationskoeffizient	0,9990

² Für die Umrechnung der mathematischen Parameter der Linearitätsfunktion der Auftragung Messsignal vs. Konzentration (Soll) in mathematische Parameter der Linearitätsfunktion der Auftragung Konzentration (Ist) gegen Konzentration (Soll) wurde die Geradenfunktion

$$y = 1135,31x - 1350,14$$

verwendet. Diese Geradenfunktion entspricht der Geradenfunktion des Mess-Signals in Abhängigkeit der Konzentration (Soll) der verdünnten Standards.

Tab. 5-30. Ergebnisse verdünnte Standardreihe

Ergebnisse verdünnte Standards	
% bezogen auf den Grenzwert (100 % = 50 µg/kg Probe)	Mess-Signal
	Signal (Ist) [FE]
0 % Grenzwert (0 µg/kg)	0
50 % Grenzwert (25 µg/kg)	27375
100 % Grenzwert (50 µg/kg)	55630
150 % Grenzwert (75 µg/kg)	82941
300 % Grenzwert (150 µg/kg)	169246
Lineare Kalibrierung	$y = a + bx$
Steigung b	1135,31
Achsenabschnitt a	-1350,14
Relative Verfahrens- standardabweichung [%]	0,83 %
Korrelationskoeffizient	1,0000

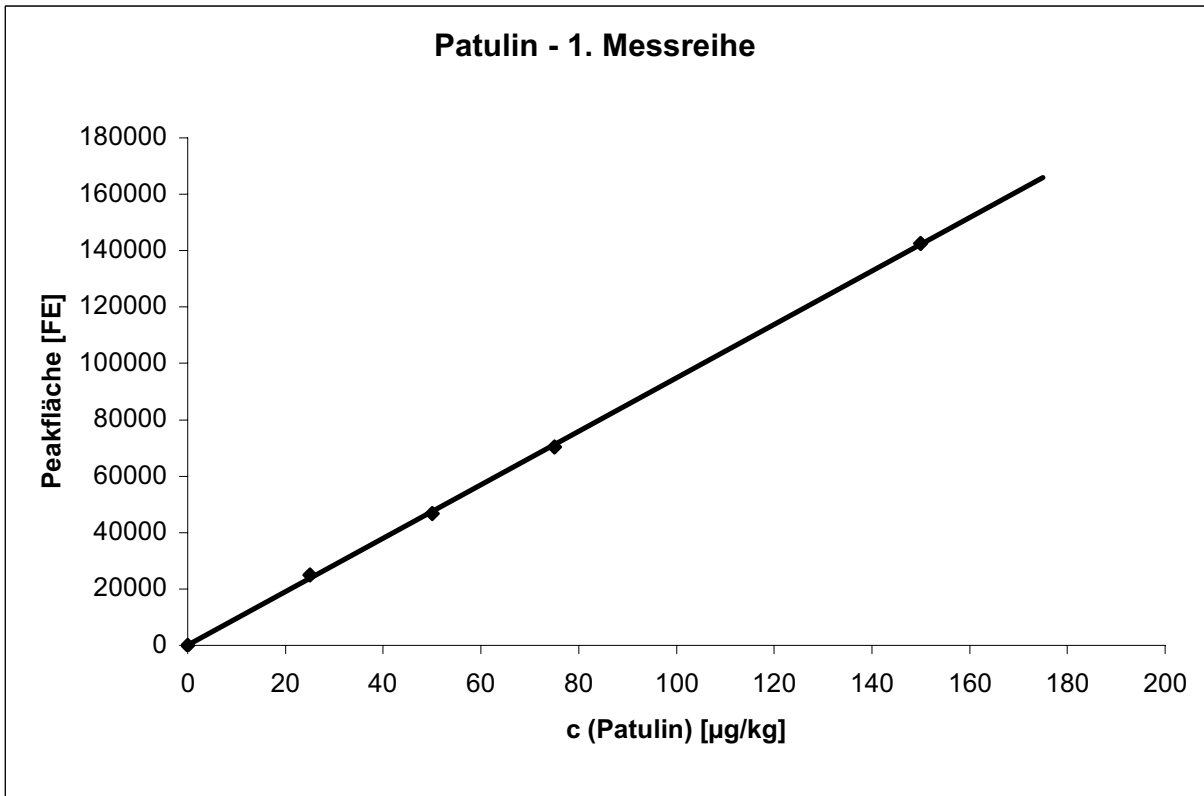


Abb. 5-13. Regressionsgerade Patulin – 1. Messreihe (dotierte Leerwertproben)

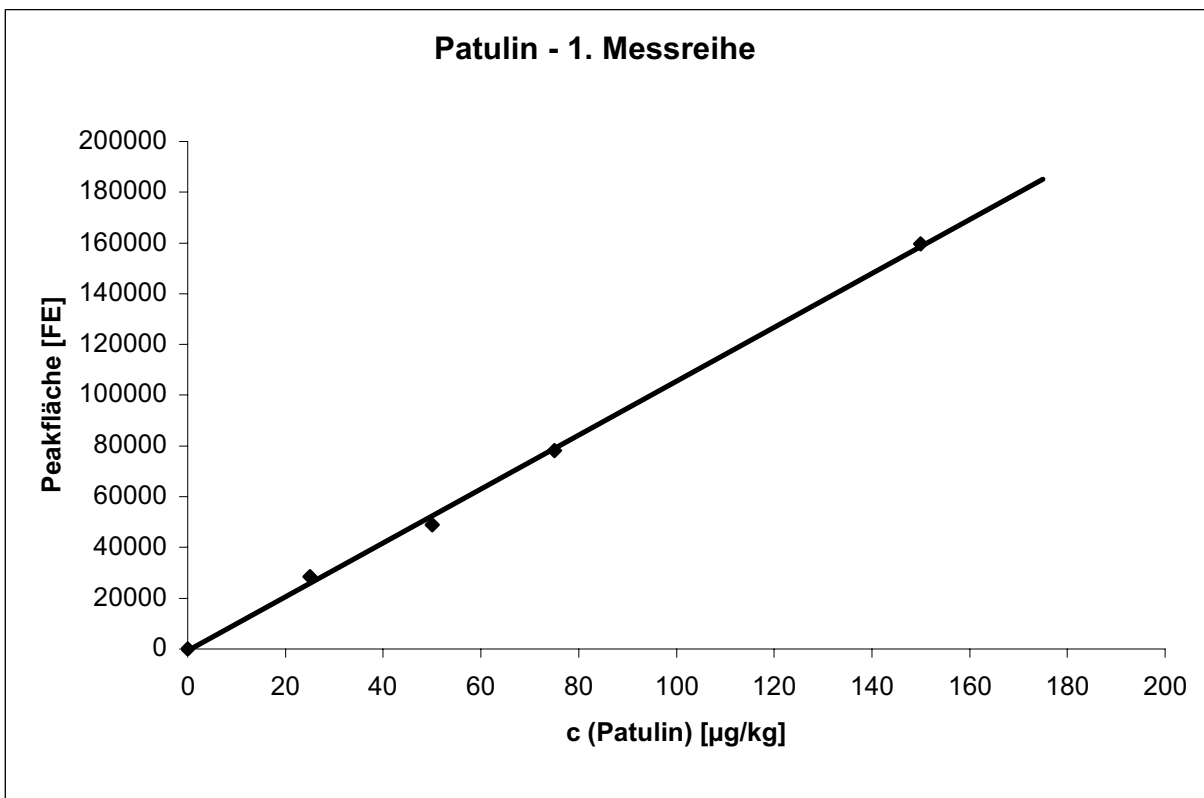


Abb. 5-14. Regressionsgerade Patulin – dotierte Reagenzienleerwerte

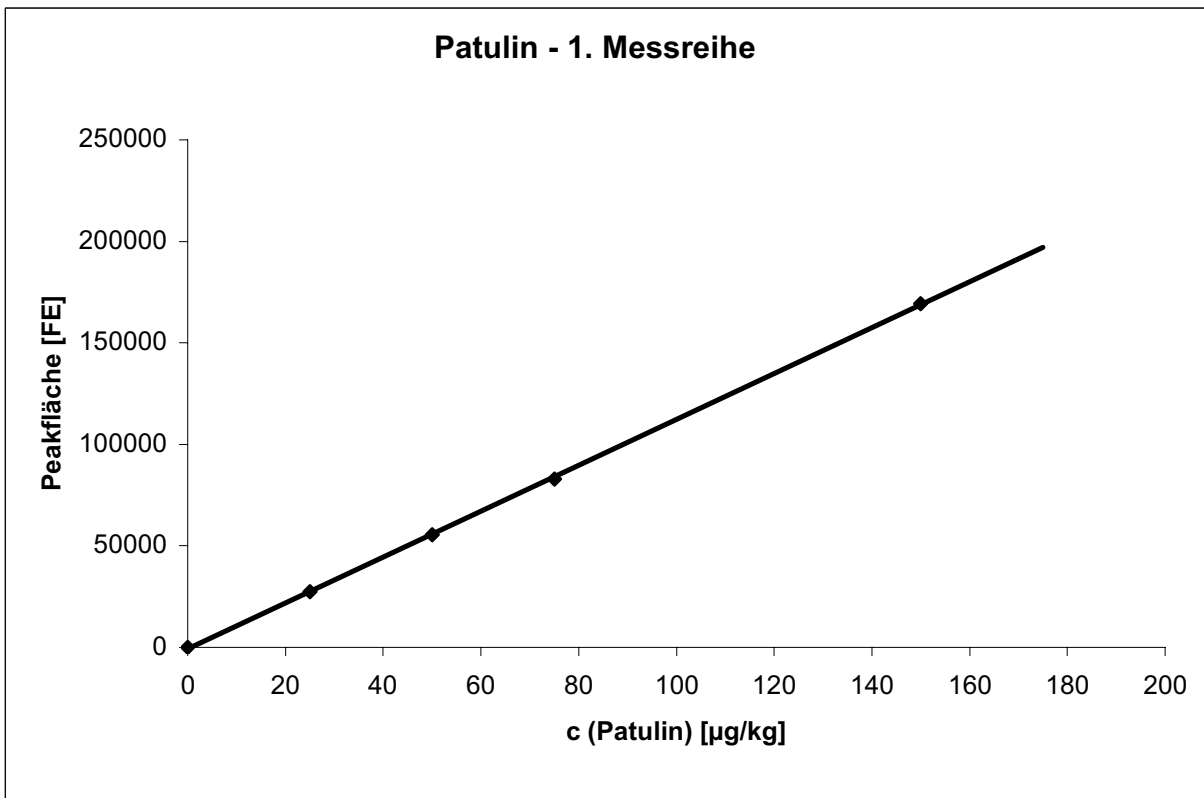


Abb. 5-15. Regressionsgerade Patulin – verdünnte Standards

5.2.2.6 Festlegung der Kalibrierungsart

Tab. 5-31. Patulin: Festlegung der Kalibrierungsart

	0 % Grenzwert- Konz.	50 % Grenzwert- Konz.	100 % Grenzwert- Konz.	150 % Grenzwert- Konz.	300 % Grenzwert- Konz.
berechn. Messsignal verd. Std.	0	27375	55630	82941	169246
berechn. Messsignal dot. Reag.lw.	0	28402	49029	78225	159664
berechn. Messsignal dot. Lw.probe	0	24983	46774	70444	142553
Wiederfindung dot. Reag.lw. ¹	-	103,8 %	88,1 %	94,3 %	94,3 %
Wiederfindung dot. Lw.probe ¹	-	91,3 %	84,1 %	84,9 %	84,2 %

¹ Bezugspunkt der Berechnung ist das berechnete Mess-Signal der verdünnten Standards. Die Mess-Signale der verd. Standards entsprechen 100 % Wiederfindung

Aus dem Vergleich der Wiederfindungen resultiert eine Kalibrierung in der Praxis mit dotierten Leerwertproben, auch begründet in den Erfahrungen, die mit dem vereinfachten Ethylacetat-Extraktionsschritt im Rahmen der Entwicklung der offline-Prüfmethode (3.2.7) gemacht wurden (relativ schlechte Wiederfindungen bei externer Kalibrierung).

Die dem Achsenabschnitt entsprechende Konzentration (2,9 µg/kg) der in der Praxis verwendeten Kalibrierungsart (dotierte Leerwertproben) ist kleiner als die Nachweisgrenze (4 µg/kg) des Analyten und kann somit vernachlässigt werden.

Tab. 5-32. Patulin: Prüfung der Zulässigkeit der Einpunkt-Kalibrierung

Prüfung der Zulässigkeit einer 1-Punkt-Kalibrierung durch Vergleich: Auswertung mit Hilfe Geradenfunktion – Auswertung mit Hilfe 1-Punkt-Kalibrierung			
Ziel: 50 µg/kg	c [µg/kg] (= A) Auswertung mit Geradenfunktion	c [µg/kg] (= B) Auswertung mit 1-Pkt.-Kal.	Abweichung B im Vergleich zu A (%)
1. Messung 100 % Grenzwert	43	50	16,3
2. Messung 100 % Grenzwert	42	42	0
3. Messung 100 % Grenzwert	49	55	12,2
4. Messung 100 % Grenzwert	50	48	4,0
5. Messung 100 % Grenzwert	56	52	7.1
6. Messung 100 % Grenzwert¹	-	-	-
			Mittl. Abweichg. = 7,9 %

¹ Ausreißer aufgrund eines technischen Problems

Der obige Vergleich der Auswertungen von Leerwertproben, die entsprechend einer Konzentration von 100 % des Grenzwertes dotiert wurden, zeigt die Anwendbarkeit der 1-Punkt-Kalibrierung.

Der Arbeitsbereich der 1-Punkt-Kalibrierung beträgt: 10 µg/kg (Bestimmungsgrenze nach DIN 32645, s.u.) bis 150 µg/kg.

5.2.2.7 Wiederholpräzision und Wiederfindung (Richtigkeit)

Die Konzentrationen wurden mit Hilfe der 1-Punkt-Kalibrierung berechnet. Eine Kommentierung der ermittelten Werte findet sich im Ergebnisteil unter 4.2.9.

Tab. 5-33. Patulin: Wiederholpräzision und Wiederfindung

Patulin		50 % Grenzwert (25 µg/kg)	100 % Grenzwert (50 µg/kg)	150 % Grenzwert (75 µg/kg)
Mittelwert Konzentration [µg/kg]	1. Messreihe	25,93	49,18	73,24
	2. Messreihe	27,29	46,86	68,71
	Mittelwert	26,61	48,08	70,98
Mittelwert Wiederfindung [%]	1. Messreihe	103,7 %	98,4 %	97,7 %
	2. Messreihe	109,2 %	93,7 %	91,6 %
	Mittelwert	106,5 %	96,1 %	94,7 %
Rel. Standardabw. [%]	1. Messreihe	12,39 %	10,65 %	8,9 %
	2. Messreihe	20,12 %	8,49 %	15,92 %
	Mittelwert	16,26 %	9,57 %	12,41 %
Abs. Standardabw. Konzentration [µg/kg]	1. Messreihe	3,21	5,24	6,52
	2. Messreihe	5,49	3,98	10,94
	Mittelwert	4,35	4,61	8,73
Abs. Standardabw. Wiederfindung [%]	1. Messreihe	12,85 %	10,48 %	8,70 %
	2. Messreihe	21,97 %	7,96 %	14,58 %
	Mittelwert	17,41 %	9,22 %	11,64 %
Wiederholbarkeit (95 %) Konzentration [µg/kg]	1. Messreihe	8,99	14,67	18,25
	2. Messreihe	15,37	11,14	30,63
	Mittelwert	12,18	12,91	24,44
Wiederholbarkeit (95 %) Wiederfindung [%]	1. Messreihe	35,98 %	29,34 %	24,35 %
	2. Messreihe	61,52 %	22,27 %	40,83 %
	Mittelwert	48,75 %	25,81 %	32,59 %

5.2.2.8 Laborinterne Reproduzierbarkeit/Messunsicherheit

Die laborinterne Reproduzierbarkeit/Messunsicherheit wurde mit Hilfe der Messungen der 1. und 2. Messreihe der dotierten Leerwertproben bestimmt.

F- und t-test zeigten, dass die Messergebnisse beider Messreihen zur Auswertung herangezogen werden dürfen.

Tab. 5-34. Patulin: Laborinterne Reproduzierbarkeit und Messunsicherheit

		Patulin	Patulin	Patulin
		50 % Grenzwert (25 µg/kg)	100 % Grenzwert (50 µg/kg)	150 % Grenzwert (75 µg/kg)
Mittelwert Konzentration [µg/kg]	1. – 2. Messreihe	26,61	48,08	70,98
Mittelwert Wiederfindung [%]	1. – 2. Messreihe	106,5 %	96,1 %	94,7 %
Rel. Standardabw. [%]	1. – 2. Messreihe	16,26 %	9,57 %	12,41 %
Abs. Standardabw. Konzentration [µg/kg]	1. – 2. Messreihe	4,35	4,61	8,73
Abs. Standardabw. Wiederfindung [%]	1. – 2. Messreihe	17,41 %	9,22 %	11,64 %
Wiederholbarkeit (95 %) Konzentration ($\approx 2,8 \times s$) [µg/kg]	1. – 2. Messreihe	12,18	12,91	24,44
Wiederholbarkeit (95 %) Wiederfindung ($\approx 2,8 \times s$) [%]	1. – 2. Messreihe	48,75 %	25,81 %	32,59 %

5.2.2.9 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweis- und die Bestimmungsgrenze wurden nach DIN 32645 softwaregestützt berechnet:

Tab. 5-35. Nachweis- und Bestimmungsgrenze nach DIN 32645

	Nachweisgrenze* [µg/kg]	Bestimmungsgrenze* [µg/kg]
Patulin	2,5 µg/kg	10,3 µg/kg

*Werte jeweils für untere Grenze aus Messreihe 1 angegeben; Messreihe 2 liefert ähnliche Werte

Zum Vergleich: Über das Signal-Rausch-Verhältnis (S/N) bestimmt ergeben sich die folgenden Werte:

Tab. 5-36. Nachweis- und Bestimmungsgrenze über das S/N-Verhältnis berechnet

	Nachweisgrenze (S/N = 3)	Bestimmungsgrenze (S/N = 10)
Patulin	4 µg/kg	14 µg/kg

5.2.3 Gesamtbewertung der Validierung

Das verwendete Prüfverfahren ist für die Bestimmung von Patulin in Fruchtprodukten geeignet.

Die gesetzlichen Anforderungen an die Leistungsfähigkeit einer Analyseverfahren nach EU-Verordnung 401/2006 vom 23.2.2006 zur „Festlegung der Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Kontrolle des Mykotoxingehalts von Lebensmitteln“ werden eingehalten, einzige Ausnahme ist die Wiederfindung bei Stufe 50 %, die 107 % statt der geforderten max. 105 % beträgt. Allerdings resultieren hieraus keine Minder- oder Falsch-Negativbefunde.

6 Zusammenfassung

Englische Zusammenfassung (Summary) s. Seite 7

Mit dem Begriff „Mykotoxine“ werden die giftigen Sekundärmetabolite von Mikropilzen zusammengefasst, die seit den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts in den Fokus von Wissenschaft und Gesetzgebern gerückt sind. Mit den wachsenden Erkenntnissen über diese natürlichen Gifte steigt auch der Bedarf an Analysemethoden zur Mykotoxin-Bestimmung. Mit der Weiterentwicklung der Technik ist diese Analytik mit der Zeit immer schneller, empfindlicher und genauer geworden. Auf dieser Basis aufbauend war es das Ziel der hier präsentierten Doktorarbeit, bestehende Analyseprinzipien weiterzuentwickeln, beispielhaft an den Mykotoxinen Patulin und Aflatoxine.

Die Gruppe der Aflatoxine erhält besondere Beachtung von Forschung und Gesetzgebung, bedingt durch die hohe Giftigkeit und weite Verbreitung dieser Substanzklasse.

Patulin hingegen tritt in Obst auf, einer Matrix, die sonst unanfällig für Mykotoxine ist. Da das Molekül relativ klein ist, müssen andere Analyseprinzipien als bei den meisten anderen Mykotoxinen angewandt werden.

Die klassische Analytik von **Aflatoxinen** besteht aus einer Immunoaffinitätssäulen-Probenvorbereitung (IAC-SPE) mit anschließender LC-Trennung und Fluoreszenz-Detektion nach Nachsäulenderivatisierung. Diese Technik verfügt über eine Reihe von Vorteilen wie sehr hohe Selektivität, sehr niedrige Bestimmungsgrenzen und gute Reproduzierbarkeit. Auf der Gegenseite stehen hohe Kosten für die Immunoaffinitätssäulen sowie der erhebliche manuelle Aufwand. Im Rahmen dieser Arbeit ist es **erstmalig gelungen, die Mehrfachnutzung der teuren Immunoaffinitätssäulen** zu ermöglichen, unter Einsatz von kommerziell erhältlichen Säulen, Geräten, Chemikalien und Hilfsmitteln. Hierzu wurde der SPE-Schritt mit Hilfe der Probenvorbereitungseinheit SP 3000 (Knauer, Spectralytics) automatisiert. Dadurch konnten sowohl der Zeit- und Personalaufwand für die Probenvorbereitung ebenso wie die Kosten für IA-Säulen pro analysierter Probe erheblich verringert werden.

Die neu entwickelte Methode funktioniert nach folgendem Schema:

Die Probe wird eingewogen und mit einem Methanol/Wasser-Gemisch extrahiert. Ein Aliquot des Extrakts wird eingeeengt und der Rückstand in Wasser mit einem geringen Methanolanteil aufgenommen. Diese Probelösung ist bereits fertig für die online-SPE-LC-Analyse, bei der der Autosampler die Probelösung auf eine mit handelsüblichem Immunoaffinitätsmaterial (r-biopharm) gefüllte Kartusche injiziert. Anschließend reinigt das SP 3000 die Kartusche mit Wasser. Die Elution erfolgt unter Nutzung des Bypassventils, einer Besonderheit des SP 3000. Dabei wird dem LC-Eluenten ein definiertes Volumen (hier: 200 µL) eines Acetonitril/Wasser-Gemischs (67:33, v/v) vorweggeschickt, was erst die vollständige Elution der Aflatoxine vom Immunoaffinitätsmaterial erlaubt. Die anschließende LC-Trennung erfolgt auf einer RP 18-Phase unter Nutzung eines Gradientensystem. Zur Derivatisierung für die abschließende Fluoreszenz-Detektion wird die bewährte CoBrA-Zelle eingesetzt.

Mit dem hier beschriebenen System sind 30 und mehr Nutzungen einer einzigen Immunoaffinitätssäule möglich. Unter Berücksichtigung eines derzeitigen Stückpreises von ca. € 10,- wird hier ein erheblicher Kostenvorteil gegenüber der manuellen Durchführung deutlich.

Die neu entwickelte Methode wurde validiert und an verschiedenen Matrices erprobt, darunter Erdnüsse, Cornflakes, Weizenmehl und Paprikapulver. Wie die Validierung an der Matrix „Erdnüsse“ zeigte, erreicht die neu entwickelte Methode Leistungsdaten wie vergleichbare klassische Methoden. Für den bedeutendsten Analyten Aflatoxin B₁ beträgt die relative Standardabweichung unter Vergleichsbedingungen RSD_R 20,2 %, die mittlere Wiederfindung liegt bei 108,3 % (Matrixkalibrierung). Damit erfüllt die Methode die Leistungskriterien der EU-Verordnung 401/2006 für die Bestimmung von Aflatoxinen, was auch für die an dieser Stelle nicht aufgeführten Daten für die übrigen Aflatoxine B₂, G₁ und G₂ gilt. Die erreichte Bestimmungsgrenze für Aflatoxin B₁ beträgt 0,20 µg/kg, so dass sicheres Arbeiten bis weit unterhalb des niedrigsten gesetzlichen Grenzwerts für Aflatoxin B₁ von 2 µg/kg problemlos mög-

lich. Gleiches gilt für die übrigen drei Aflatoxine und damit für die daraus berechnete Summe (niedrigster Grenzwert für Gesamt-Aflatoxin: 4 µg/kg). Die Methode wurde im Januar 2007 durch die DAP akkreditiert.

Weiterhin wurde mit dem Verfahren erfolgreich an einer Laborvergleichsuntersuchung (Matrix: Erdnüsse, Anbieter: FAPAS) teilgenommen, bei der für alle fünf Parameter Aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂ und Gesamt-Aflatoxine gute z-scores (Ziel: $|z| \leq 2$) erreicht wurden. Dabei liegen die z-scores für alle Parameter mit Ausnahme des in der Praxis eher irrelevanten Aflatoxins G₂ sogar bei $|z| \leq 0,6$.

Die am häufigsten eingesetzte Methode zur Analyse von **Patulin** besteht aus einer Flüssigflüssig-Extraktion mit Ethylacetat, bei der ein basischer Waschschrift durchgeführt wird. Nach Entfernen des organischen Lösungsmittels erfolgt die abschließende LC-Trennung mit UV-Detektion. Diese Methode liefert üblicherweise gute Ergebnisse, jedoch erfordert sie einen nicht unerheblichen Personal- und Zeitaufwand. Ein weiteres Problem kann der basische Waschschrift darstellen, da Patulin im basischen Milieu nicht stabil ist. Eine ungleichmäßige manuelle Durchführung des Waschschrifts kann deshalb zu einer schlechteren Reproduzierbarkeit führen.

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode überträgt die Probenaufarbeitung inklusive des kritischen Waschschrifts **erstmalig auf die online-SPE**. Zur Verbesserung des Aufreinigungseffektes erfolgt die Extraktion mit Ethylacetat nach Zugabe eines neutralen Puffers. Hierdurch wird sehr viel weniger Matrix in die organische Phase extrahiert.

Die Analyse erfolgt dabei nach folgendem Prinzip:

Die Probe wird mit einem Phosphatpuffer verdünnt bzw. gelöst. Anschließend wird eine einmalige Extraktion mit Ethylacetat durchgeführt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird die Probe in Acetatpuffer gelöst und unter Verwendung der Probenvorbereitungseinheit SP 3000 mittels online-SPE-LC analysiert. Dabei injiziert der Autosampler die Probelösung auf eine mit SDB-(Styrol-Divinylbenzol-)Material gefüllte Kartusche. Der basische Waschschrift erfolgt auf der Kartusche mittels des SP 3000. Die Elution erfolgt im Backflush-Verfahren mit Hilfe der Elutionskraft des Eluenten (Gradient aus Wasser und Acetonitril). Nach der LC-Trennung an einer Polaris C18A-Säule (Varian) findet die abschließende UV-Detektion bei 277 nm statt.

Die Verbindung von erheblich vereinfachter Probenextraktion und online-SPE-LC-Analyse erlaubt schnelleres Arbeiten in Kombination mit verringertem Personaleinsatz sowie erheblicher Einsparung an Lösungsmitteln, jeweils im Vergleich zu bisherigen Methoden.

Die neu entwickelte Methode wurde validiert und an verschiedenen Matrices erprobt, darunter Sauerkirschen, Apfelsmus und Aprikosen. Wie die Validierung an der Risikomatrix „Apfelsaft“ zeigte, erzielt die neu entwickelte Methode Leistungsdaten wie vergleichbare klassische offline-Methoden. Die relative Standardabweichung unter Vergleichsbedingungen RSD_R beträgt 12,7 %, die mittlere Wiederfindung liegt bei 99,1 % (Matrixkalibrierung). Damit erfüllt die Methode die Leistungskriterien der EU-Verordnung 401/2006 für die Bestimmung von Patulin. Die erreichte Bestimmungsgrenze beträgt 10,3 µg/kg, so dass sicheres Arbeiten bis unterhalb des niedrigsten gesetzlichen Grenzwerts für Patulin von 25 µg/kg problemlos möglich ist. Die Methode wurde im Januar 2007 durch die DAP akkreditiert.

Beide Methoden profitieren von der Technik der online-SPE. Sie automatisiert die Probenvorbereitung und sorgt dabei für eine erhebliche Einsparung an Zeit und Personal. Weiterhin erlaubt diese Technik den Rund-um-die-Uhr-Betrieb und verringert den Lösungsmittelbedarf. Diese Eigenschaften qualifizieren die online-SPE für die schnelle Analyse großer Probenzahlen im Routinebetrieb in einem modernen Labor.

Ein weiterer Vorteil der automatisierten Probenvorbereitung liegt in der Verwendung derselben Kartusche für eine Probenserie inklusive Standards. Dadurch werden alle Lösungen - Proben wie Standards - gleich behandelt und erfahren dieselbe Wiederfindung für den SPE-Schritt.

Beide präsentierten Analyseverfahren arbeiten mit der Methode der Matrixkalibrierung. Dies bringt zwar den Nachteil mit sich, dass die Anzahl zu analysierender Proben höher als bei externer Kalibrierung ist. Jedoch sind die Eigenschaften der zu analysierenden Proben für beide Parameter sehr unterschiedlich – Erdnüsse verhalten sich anders als Weizenmehl, Apfelmus anders als Apfelsaft. Dank der Matrixkalibrierung werden die hieraus resultierenden unterschiedlichen Wiederfindungen ausgeglichen.

Somit ist es im Rahmen der hier vorliegenden Dissertation anhand der Beispielanalyten Aflatoxine und Patulin erstmals gelungen, die Analytik von Mykotoxinen auf die online-SPE-LC-Technik im Routinebetrieb eines Labors zu übertragen. Für Aflatoxine wird darüber hinaus zum ersten Mal die Mehrfachnutzung von kommerziell erhältlichem Immunoaffinitätsmaterial beschrieben. Damit kann die Analytik von Aflatoxinen deutlich kostengünstiger und schneller durchgeführt werden, bei hoher Zuverlässigkeit. Durch Einsatz der online-SPE-LC-Technik für Patulin konnte der Aufwand für die Probenvorbereitung drastisch verringert werden, so dass eine effizientere Methode entwickelt werden konnte. Beide Methoden sind für den Einsatz im Laboralltag optimiert und haben sich im Routinebetrieb bewährt. Die Leistungsfähigkeit der Methoden wurde im Rahmen von Laborvergleichsuntersuchungen nachgewiesen.

7 Ausblick

Das Buch zu – und alle Fragen offen?

Nach Abschluss der vorliegenden Arbeit stellt sich als erstes die Frage, ob die angewandten Prinzipien auch auf die Analytik anderer Mykotoxine übertragen werden können. Wie für Aflatoxine sind Immunoaffinitätssäulen auch für die übrigen Haupt-Mykotoxine erhältlich. Denkbar wäre somit, auch Mykotoxine wie Ochratoxin A (OTA), Zearalenon oder Deoxynivalenol (DON) per online-SPE-LC zu analysieren. Hierfür müssten online-Elutionsbedingungen gefunden werden, unter denen die Antikörper des Immunoaffinitätsmaterials nicht nennenswert denaturieren und zugleich die Elution quantitativ verläuft. Es ist allerdings zu vermuten, dass die Antikörper sich jeweils individuell verhalten, so dass die für Aflatoxine geeigneten Bedingungen sich wahrscheinlich nicht einfach auf andere Analyten übertragen lassen.

Bei Bedarf könnte geprüft werden, ob eine Modifikation der beiden Methoden auch die sichere Anwendung in der Analytik diätetischer Lebensmittel für Säuglinge und Kleinkinder ermöglichen könnte. Ansätze hierfür wären eine Erhöhung der Injektionsvolumina oder der jeweiligen Probeneinwaagen, womit jedoch auch ein höherer Aufwand verbunden sein könnte. Eine andere Möglichkeit zur Steigerung der Empfindlichkeit bietet die Kopplung der online-SPE mit der LC-MS-Technik. Hierbei könnten die Vorteile der beiden Techniken zusammengeführt werden. Somit wäre beispielsweise das Erreichen niedrigerer Bestimmungsgrenzen und damit ebenfalls eine Ausweitung der Analytik auf diätetische Lebensmittel möglich. Für Patulin ist darüber hinaus ein isotopen-markierter Standard erhältlich, der als interner Standard in der MS-Detektion eingesetzt werden kann. Bei dieser Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA) könnte auf die Matrixkalibrierung verzichtet werden.

8 Literatur

Rechtsgrundlagen und Beurteilungsgrundlagen – EU (jeweils in der am 01.10.2006 gültigen Fassung)

VERORDNUNG (EG) Nr. 466/2001 der Kommission vom 8. März 2001 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln, ABl. Nr. L 77, 1-13

VERORDNUNG (EG) Nr. 1425/2003 der Kommission vom 11. August 2003 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 466/2001 in Bezug auf Patulin, ABl. Nr. L 203, 1-3

VERORDNUNG (EG) Nr. 401/2006 der Kommission vom 23. Februar 2006 zur Festlegung der Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Kontrolle des Mykotoxingehalts von Lebensmitteln, ABl. L 70 vom 9.3.2006, 12-34

RICHTLINIE 98/53/EG der Kommission vom 16. Juli 1998 zur Festlegung von Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Kontrolle bestimmter Lebensmittel auf Einhaltung der Höchstgehalte für Kontaminanten, ABl. L 201 vom 17.7.1998, 93–101

RICHTLINIE 2003/78/EG der Kommission vom 11. August 2003 zur Festlegung der Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Kontrolle des Patulingehalts von Lebensmitteln, ABl. L 203 vom 12.8.2003, 40–44

ENTSCHEIDUNG DER KOMMISSION 97/613/EG vom 8. September 1997 über die zeitweilige Aussetzung der Einfuhren von Pistazien und bestimmter hieraus hergestellter Erzeugnisse, deren Ursprung oder Herkunft der Iran ist, ABl. L 248 v. 11.9.1997, 33

ENTSCHEIDUNG DER KOMMISSION 2002/657/EG vom 12. August 2002 zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen, ABl. L 211 v. 17.8.2002, 8-36

ENTSCHEIDUNG DER KOMMISSION 2006/504/EWG vom 12. Juli 2006 über Sondervorschriften für aus bestimmten Drittländern eingeführte bestimmte Lebensmittel wegen des Risikos einer Aflatoxin-Kontamination dieser Erzeugnisse, ABl. L 199 v. 21.7.2006, 21-32

KONTROLLE DER EU-RECHTSVORSCHRIFTEN ÜBER AFLATOXINE, Leitlinien für zuständige Behörden, www.europa.eu

Rechtsgrundlagen – Deutschland (jeweils in der am 01.10.2006 gültigen Fassung)

Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (LEBENSMITTEL- UND FUTTERMITTEL-GESETZBUCH – LFGB) i.d.F. der Bekanntmachung v. 24. April 2006, BGBl. I S. 945

Verordnung über Höchstmengen an Mykotoxinen in Lebensmitteln (MYKOTOXIN-HÖCHSTMENGENVERORDNUNG - MHmV) vom 2. Juni 1999, BGBl. I S. 1248

Verordnung über Konfitüren und einige ähnliche Erzeugnisse (KONFITÜRENVERORDNUNG – KonfV) v. 23. Oktober 2003, BGBl. I S. 2151

Verordnung über Fruchtsaft, einige ähnliche Erzeugnisse und Fruchtnektar (FRUCHTSAFT-VERORDNUNG) v. 24. Mai 2004, BGBl. I S. 1016

Verordnung über diätetische Lebensmittel (DIÄTVERORDNUNG - DiätV), i.d.F. der Bekanntmachung v. 28. April 2005, BGBl. I S. 1161

Sonstige Literatur

ACAR, J.; GÖKMEN, V.; TAYDAS, E.E. (1998): The effects of processing technology on the patulin content of juice during commercial apple juice concentrate production, *Z Lebensm Unters Forsch A*, 207, 328-331

AKIYAMA, H.; GODA, Y.; TANAKA, T.; TOYODA, M. (2001): Determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in spices using a multifunctional column clean-up, *J. Chromatogr. A*, 932, 153-157

AKTAS, A.H.; YILMAZER, M.; DEMIRCI, S. (2004): Determination of patulin in apple juice produced in Isparta, Turkey by HPLC with diode array detection, *J. Food Drug Anal.*, 12, 3, 288-231

ALTMAYER, B.; EICHBORN, K.W.; PLAPP, R. (1982): Untersuchungen über den Patulingehalt von Traubenmosten und Wein, *Z Lebensm Unters Forsch*, 175, 172-174

ANDERSEN, B.; SMEDSGAARD, J.; FRISVAD, J.C. (2004): *Penicillium expansum*: Consistent production of patulin, chaetoglobosins, and other secondary metabolites in culture and their natural occurrence in fruit products, *J. Agric. Food Chem.*, 52, 2421-2428

AOAC → ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYST CHEMISTS

ARRANZ, I.; DERBYSHIRE, M.; KROEGER, K.; MISCHKE, C.; STROKA, J.; ANKLAM, M. (2005): Liquid chromatographic method for quantification of patulin at 10 ng/mL in apple-based products intended for infants: interlaboratory study, *J. AOAC Int.*, 88, 2, 518-525

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYST CHEMISTS (AOAC) (Ed.) (1995): *AOAC Official Methods of Analysis*

AZCONA, J.I.; ABOUZIED, M.M.; PESTKA, J.J. (1990): *J. Food Prot.*, 53, 577-580

AZZIZ-BAUMGARTNER, E.; LINDBLADE, K.; GIESEKER, K.; SCHURZ ROGERS, H.; KLESZAK, S.; NJAPAU, H.; SCHLEICHER, R.; McCOY, L.F.; MISORE, A.; DeCOCK, K.; RUBIN, C.; SLUTSKER, L.; the AFLATOXIN INVESTIGATIVE GROUP (2005): Case-control study of an acute aflatoxicosis outbreak, Kenya, 2004, *Environ. Health Perspect.*, 113, 12, 1779-1783

BANKOLE, S.; SCHOLLENBERGER, M.; DROCHNER, W. (2006): Mycotoxin contamination of food systems in sub-Saharan Africa, 28. Mykotoxin-Workshop, Bydgoszcz, Polen, Tagungsband, 60

BARRETT, J. (2004): Aflatoxin Exposure after weaning, *Environ. Health Perspect.*, 112, 13, A 759

BARRETT, J. (2005): Liver Cancer and Aflatoxin, *Environ. Health Perspect.*, 113, 12, A 837-A 838

BARTOLOMÉ, B.; BENGOCHEA, M.L.; PÉREZ-ILZARBE, F.J.; HERNÁNDEZ, T.; ESTRELLA, I.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C. (1994): Determination of patulin in apple juice by high-performance liquid chromatography with diode-array detection, *J. Chromatogr. A*, 664, 39-43

- BENNETT, J.W.; KLICH, M. (2003): Mycotoxins, *Clin. Microbiol. Rev.*, 16, 3, 497-516
- BERETTA, B.; GAIASCHI, A.; GALLI, C.L.; RESTANI, P. (2000): Patulin in apple-based foods: occurrence and safety evaluation, *Food Addit. Contam.*, 17, 5, 399-406
- BETTINA, V. (1989): Review: Chromatographic methods as tools in the field of mycotoxins, *J. Chromatogr.*, 477, 187-233
- BISELLI, S.; HARTIG, L.; WEGNER, H.; HUMMERT, C. (2004): Analysis of Fusarium toxins using LC/MS-MS: Application to various food and feed matrices, *Recent Applications in LC-MS*, Nov. 2004, 25-30
- BISELLI, S.; WEGNER, H.; HUMMERT, C. (2005): A multicomponent method for Fusarium toxins in cereal based food and feed samples using HPLC-MS/MS, *Mycotoxin Research*, 21, 1, 18-22
- BLASCHETTE, A. (1993): *Allgemeine Chemie II*, 3. Aufl., UTB für Wissenschaft/Quelle und Meyer, Heidelberg, Wiesbaden, 199
- BRACKETT, R.E.; MARTH, E.H. (1979): Stability of patulin at pH 6.0-8.0 and 25 °C, *Z Lebensm Unters Forsch*, 169, 92-94
- BRAUSE, A.R.; TRUCKSESS, M.W.; THOMAS, F.S.; PAGE, S.W. (1996): Determination of patulin in apple juice by liquid chromatography: collaborative study, *J. AOAC Int.*, 79, 2, 451-455
- BRODACZ, W. (2005): Mykotoxinanalytik: Kalibrierstandards und zertifizierte Referenzmaterialien, *Labo*, Feb. 2005, 22-26
- BUNDESAMT FÜR GESUNDHEIT (BAG), FACHEINHEIT LEBENSMITTELSICHERHEIT (Schweiz), Bern: Schweizerisches Lebensmittelbuch (SLMB), Ausgabe 2004, Kap. 54, 1.1 (Aflatoxine), 1.3 (Patulin)
- BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT (BVL): Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (früher: § 35 LMBG) (A-SU § 64 LFGB), Beuth Verlag, Stand Dezember 2004
- BURDA, K. (1992): Incidence of patulin in apple, pear and mixed fruit products marketed in New South Wales, *J. Food Prot.*, 40, 796-798
- BURROUGHS, L. (1977): Stability of patulin to sulfur dioxide and to yeast fermentation, *J. AOAC*, 60, 1, 100-103
- BVL → BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT
- CAMMANN, K. (Hrsg.) (2001): *Instrumentelle Analytische Chemie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin
- CAPPIELLO, A.; FAMIGLINI, G.; TIRILLINI, B. (1995): Determination of aflatoxins in peanut meal by LC/MS with a particle beam interface, *Chromatographia*, 40, 411-416
- CARMAN Jr., A.S.; KUAN, S.S.; WARE, G.M.; UMRIGAR, P.P.; MILLER, K.V.; GUERRERO, H.G. (1996): Robotic automated analysis of foods for aflatoxin, *J. AOAC Int.*, 79, 2, 456-464

CASTEGNARO, M.; TOZLOVANU, M.; WILD, C.; MOLINIÉ, A.; SYLLA, A.; PFOHLESZKOWICZ, A. (2006): Advantages and drawbacks of immunoaffinity columns in analysis of mycotoxins in food, *Mol. Nutr. Food Res.*, 50, 480-487

CENTER FOR FOOD SAFETY & APPLIED NUTRITION (CFSAN), U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION (FDA) (1992, laufend aktualisiert): Foodborne Pathogenic Microorganisms and natural toxins handbook: Aflatoxins, <http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap41.html>

CENTER FOR FOOD SAFETY & APPLIED NUTRITION (CFSAN), U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION (FDA) (2001): Patulin in apple juices, apple juice concentrates and apple juice products, Compliance policy guidance for FDA staff, <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/patubck2.html> (22.05.2006)

CENTRAL SCIENCE LABORATORY (CSL): FAPAS (Food Analysis Performance Assessment Scheme) proficiency test no. 1623: Patulin in cloudy apple juice, report, January - March 2006, Central Science Laboratory, Sand Hutton, UK

CENTRAL SCIENCE LABORATORY (CSL): FAPAS (Food Analysis Performance Assessment Scheme) proficiency test no. 0488: Aflatoxin analysis in peanuts, report, April - June 2006, Central Science Laboratory, Sand Hutton, UK

CEPEDA, A.; FRANCO, C.M.; FENTE, C.A.; VÁZQUEZ, B.I.; RODRÍGUEZ, J.L.; PROGNON, P.; MAHUZIER, G. (1996): Postcolumn excitation of aflatoxins using cyclodextrins in liquid chromatography for food analysis, *J. Chromatogr. A*, 721, 69-74

CFSAN → CENTER FOR FOOD SAFETY & APPLIED NUTRITION

CHAN, D.; MacDONALD, S.J.; BOUGHTFLOWER, V.; BRERETON, P. (2004): Simultaneous determination of aflatoxins and ochratoxin A in food using a fully automated immunoaffinity column clean-up and liquid chromatography-fluorescence detection, *J. Chromatogr. A*, 1059, 13-16

CHEN, I.; INGHAM, B.H.; INGHAM, S.C. (2004): Survival of *Penicillium expansum* and patulin production on stored apples after wash treatments, *J. Food Sci.*, 69, 8, C669-C675

CIEGLER, A.; DETROY, R.W.; LILLEHOJ, E.B. (1971): Patulin, penicillic acid, and other carcinogenic lactones. In: Ciegler, A.; Kadis, S.; Ajl, S.J. (Hrsg.): *Microbial toxins*, Vol. 6, Academic Press, New York, London, 409

CIEGLER, A.; BECKWITH, A.C.; JACKSON, L.K. (1976): Teratogenicity of patulin and patulin adducts formed with cysteine, *Appl. Environ. Microbiol.*, 31, 5, 664-667

CODEX, Committee on Food Additives and Contaminants (2002): Proposed draft code of practice for the reduction of patulin contamination in apple juice and apple juice ingredients in other beverages 8 (at step 5 of procedure), Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Genf, Schweiz, 1-7

COLE, R.J.; DORNER, J.W. (1994): Extraction of aflatoxins from naturally contaminated peanuts with different solvents and solvent/peanut ratios, *J. AOAC Int.*, 77, 6, 1509-1511

CORING (2004): Anleitung zur CoBrA-Zelle, Code 3200130, Stand: April 2004, Coring System Diagnostix GmbH, Gernsheim, Deutschland

CORING (2005): Preisliste Stand Juli 2005/1, Coring System Diagnostix GmbH, Gernsheim, Deutschland

CSL → CENTRAL SCIENCE LABORATORY

DELMULLE, B.S.; DE SAEGER, S.M.D.G.; SIBANDA, L.; BARNA-VETRO, I.; VAN PETEGHEM, C.H. (2005): Development of an immunoassay-based lateral flow dipstick for the rapid detection of aflatoxin B₁ in pig feed, *J. Agric. Food Chem.*, 53, 3364-3368

DEUSSING, G. (2006): Aflatoxine mit LC-MS bestimmen, *LaborPraxis*, Sept. 2006, 44-46

DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG (DIN) (1994): DIN 32645, Ausgabe 1994-05, Chemische Analytik, Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze, Ermittlung unter Wiederholbedingungen, Begriffe, Verfahren, Auswertung, Deutsches Institut für Normung e.V., Berlin

DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG (DIN) (2005): DIN EN ISO/IEC 17025, Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien (ISO/IEC 17025:2005) Deutsches Institut für Normung e.V., Berlin

DIEMAIR, S. (Hrsg.) (1990): Lebensmittel-Qualität, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart

DORNER, J.W.; COLE, R.J. (1988): Rapid determination of aflatoxins in raw peanuts by liquid chromatography with postcolumn iodination and modified minicolumn cleanup, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 71, 1, 43-47

DORNER, J.W.; COLE, R.J. (1993): Variability among peanut subsamples prepared for aflatoxin analysis with four mills, *J. AOAC Int.*, 76, 5, 983-987

DORNER, J.W.; LAMB, M.C. (2006): Development and commercial use of afla-GUARD[®], an aflatoxin biocontrol agent, *Mycotoxin Res.*, 22, 1, 33-38

DUDEN (1990): Band 5: Fremdwörterbuch, Dudenverlag, Mannheim, Wien, Zürich

EHLERS, D.; CZECH, E.; QUIRIN, K.-W.; WEBER, R. (2006): Distribution of aflatoxins between extract and extraction residue of paprika using supercritical carbon dioxide, *Phytochem. Anal.*, 17, 114-120

EISELE, T.A.; GIBSON, M.Z. (2003): Syringe-cartridge solid-phase extraction method for patulin in apple juice, *J. AOAC Int.*, 86, 6, 1160-1163

EMAN → EUROPEAN MYCOTOXIN AWARENESS NETWORK

ESKOLA, M.; KOKKONEN, M.; RIZZO, A. (2002): Application of manula and automated systems for purification of ochratoxin A and zearalenone in cereals with immunoaffinity columns, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 41-47

EUROPEAN COMMUNITIES, Health & Consumer Protection, Directorate General (SANCO) (2006): The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) – Annual Report 2005

EUROPEAN MYCOTOXIN AWARENESS NETWORK (EMAN): Fact sheets on analytical methods, Fact Sheet 7: Aflatoxins, http://193.132.193.215/eman2/fsheet2_7.asp (Zugang am 03.01.2006)

FARJAM, A.; DE VRIES, R.; LINGEMAN, H.; BRINKMAN, U.A.T. (1991a): Immuno precolumns for selective on-line sample pretreatment of aflatoxins in milk prior to column liquid chromatography, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 44, 175-184

FAO → FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS

FARJAM, A.; VAN DER MERBEL, N.C.; LINGEMAN, H.; FREI, R.W.; BRINKMAN, U.A.T. (1991b): Non-selective desorption of immuno precolumns coupled on-line with column liquid chromatography: determination of aflatoxins, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 45, 73-87

FARJAM, A.; VAN DER MERBEL, N.C.; NIEMANN, A.A.; LINGEMAN, H.; BRINKMAN, U.A.T. (1992): Determination of aflatoxin M₁ using a dialysis-based immunoaffinity sample pretreatment system coupled on-line to liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, 589, 141-149

FISCHER WELTAMANACH 2007 (2006), Fischer Taschenbuch Verlag, Frankfurt am Main, 688

FONSECA, H. (2006): Boletim No. 27: Fungal toxins found in food, www.micotoxinas.com.br, Zugang am 23.07.2006

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) (1997): Food and Nutrition Papers, no. 64: Worldwide regulations for mycotoxins

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) (2004): Food and Nutrition Papers, no. 81: Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003

FOOD & RECHT, Mai/06, Behr's Verlag, 12-13

FOOD & RECHT, Juni/06, Behr's Verlag, 13-14

FOOD & RECHT, Juli/06, Behr's Verlag, 13-14

FORTH, W.; HENSCHLER, D.; RUMMEL, W.; STARKE, K. (Hrsg.) (1992): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 6. Aufl., BI Wissenschaftsverlag, Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich, 732-733

FRANK, H.K.; ORTH, R.; HERMANN, R. (1976): Patulin in Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft, I. Kernobst und daraus hergestellte Produkte, *Z Lebensm Unters Forsch*, 162, 149-157

FUNK, W.; DAMMANN, V.; DONNEVERT, G. (1992): Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie, VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge

GARNER, R.C.; WHATTAM, M.M.; TAYLOR, P.J.L.; STOW, M.W. (1993): Analysis of United Kingdom purchased spices for aflatoxins using an immunoaffinity column clean-up procedure followed by high-performance liquid chromatographic analysis and post-column derivatisation with pyridinium bromide perbromide, *J. Chromatogr.*, 648, 485-490

GILBERT, J.; SHARMAN, M.; WOOD, G.M.; BOENKE, A.; WAGSTAFFE, P.J. (1991): The preparation, validation and certification of the aflatoxin content of two peanut butter reference materials, *Food Addit. Contam.*, 8, 3, 305-320

GÖKMEN, V.; ACAR, J. (1996): Rapid reversed-phase liquid chromatographic determination of patulin in apple juice, *J. Chromatogr. A*, 730, 53-58

GÖKMEN, V.; ACAR, J. (1998): Incidence of patulin in apple juice concentrates produced in Turkey, *J. Chromatogr. A*, 815, 99-102

GÖKMEN, V.; ACAR, J. (1999): Simultaneous determination of 5-hydroxymethylfurfural and patulin in apple juice by reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 847, 69-74

GROOPMAN, J.D.; TRUDEL, L.J.; DONAHUE, P.R.; MARSHAK-ROTHSTEIN, A.; WOGAN, G.N. (1984): High-affinity monoclonal antibodies for aflatoxins and their application to solid-phase immunoassays, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 81, 7728-7731

GROOPMAN, J.D.; DONAHUE, K.F. (1988): Aflatoxin, a human carcinogen: Determination in foods and biological samples by monoclonal antibody affinity chromatography, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 71, 5, 861-867

GROTEWAHL, D. (2006): Entwicklung von Methoden zur Bestimmung von Chloramphenicol in Bienenprodukten mittels LC-MS, Dissertation, Christian-Albrechts-Universität Kiel, Cuvillier Verlag, Göttingen

HÄDRICH, J. (1993): Zur Ableitung der Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze nach dem Eichkurvenverfahren, 1. Mitteilung: *Dtsch. Lebensm. Rundsch.*, 89, 2, 35-42; 2. Mitteilung: *Dtsch. Lebensm. Rundsch.*, 89, 3, 72-80; 3. Mitteilung: *Dtsch. Lebensm. Rundsch.*, 89, 9, 286-289

HENNION, M.-C. (1998): Automation in multiresidue analysis of pesticides using on-line solid-phase extraction and liquid chromatography, *Analisis Magazine*, 26, 6, M 131-137

HINKEL, C.; KÖLLING-SPEER, I.; SPEER, K. (2005): Anwendung der automatisierten festphasenextraktion bei der Bestimmung von Ochratoxin A, *Mycotoxin Research*, 21, 2, 128-131

HERRMANN, K. (2001): Inhaltsstoffe von Obst und Gemüse, Ulmer, Stuttgart, 2002

HERRY, M.P.; LEMÉTAYER, N. (1996): Liquid chromatographic determination of patulin in french apple ciders, *J. AOAC Int.*, 79, 5, 1107-1110

HOLCOMB, M.; THOMPSON Jr., H.C. (1991): Analysis of aflatoxins (B₁, B₂, G₁, and G₂) in rodent feed by HPLC using postcolumn derivatization and fluorescence detection, *J. Agric. Food Chem.*, 39, 137-140

HOLCOMB, M.; WILSON, D.M.; TRUCKSESS, M.W.; THOMPSON JR., H.C. (1992): Review: Determination of aflatoxins in food products by chromatography, *J. Chromatogr.*, 341-352

HOPKINS, J. (1993): The toxicological hazards of patulin, *Br. Ind., Biol. Res. Assoc. Bull.*, 32, 3-4

HORWITZ, W.; KAMPS, L.V.; BOYER, K.W. (1980): Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 63, 6, 1344-1354

HUBER, C. (2005): Aus einem Guss, *Nachrichten aus der Chemie*, 53, 5, 591-592

HURST, W.J.; SNYDER, K.P.; MARTIN Jr., R.A. (1987): High-performance liquid chromatographic determination of the mycotoxins patulin, penicillic acid, zearalenone and sterigmatocystin in artificially contaminated cocoa beans, *J. Chromatogr.*, 392, 389-396

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO): ISO 8128-1:1993: Apple juice, apple juice concentrates and drinks containing apple juice – Determination of patulin content – Part 1: Method using high-performance liquid chromatography

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO): ISO 8128-2:1993: Apple juice, apple juice concentrates and drinks containing apple juice – Determination of patulin content – Part 2: Method using thin layer chromatography

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO): ISO 14718:1998: Animal feeding stuffs – Determination of aflatoxin B₁ content of mixed feeding stuffs – Method using high-performance liquid chromatography

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO): ISO 16050:2003: Foodstuffs – Determination of aflatoxin B₁, and the total content of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in cereals, nuts and derived products – High-performance liquid chromatographic method

ISO → INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION

ITO, R.; YAMAZAKI, H.; INOUE, K.; YOSHIMURA, Y.; KAWAGUCHI, M.; NAKAZAWA, H. (2004): Development of liquid chromatography-electrospray mass spectrometry for the determination of patulin in apple juice: Investigation of its contamination levels in Japan, *J. Agric. Food Chem.*, 52, 7464-7468

JAIMEZ, J.; FENTE, C.A.; VAZQUEZ, B.I.; FRANCO, C.M.; CEPEDA, A.; MAHUZIER, G.; PROGNON, P. (2000): Review: Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis, *J. Chromatogr. A*, 882, 1-10

JAIN, R.V.; MILLS, P.K.; PARIKH-PATEL, A. (2005): Cancer incidence in the south Asian population of California, 1988-2000, *J. Carcinog.*, 4, 21

JELINEK, C.F.; POHLAND, A.E.; WOOD, G.E. (1989): Worldwide occurrence of mycotoxins in foods and feeds – an update, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 72, 2, 223-230

KAVERI, S.V.; FREMY, J.-M.; LAPEYRE, C.; STROSBERG, A.D. (1987): Immunodetection and immuno-purification of aflatoxins using a high affinity monoclonal antibody to aflatoxin B₁, *Lett. Appl. Microbiol.*, 4, 71-75

KNOLL, J.E. (1985): Estimation of the limit of detection in chromatography, *J. Chromatogr. Sc.*, 23, 422-425

KOK, W.T.; VAN NEER, T.C.H.; TRAAG, W.A.; TUINSTRA, L.G.M.T. (1986): Determination of aflatoxins in cattle feed by liquid chromatography and post-column derivatization with electrochemically generated bromine, *J. Chromatogr.*, 1986, 231-236

KOLOSOVA, A.Y.; SHIM, W.-B.; YANG, Z.-Y.; EREMIN, S.A.; CHUNG, D.-H. (2006): Direct competitive ELISA based on a monoclonal antibody for detection of aflatoxin B₁. Stabilization of ELISA kit components and application to grain samples, *Anal. Bioanal. Chem.*, 384, 286-294

KRÄMER, J. (1997): *Lebensmittel-Mikrobiologie*, 3. Aufl., UTB für Wissenschaft/Ulmer, Stuttgart, 85-98

KRISHNAMACHARI, K.A.; NAGARAJAN, V.; RAMESH, V.B. (1975): Hepatitis due to aflatoxicosis: an outbreak in Western India, *Lancet*, 1, 7915, 1061-1063

KROMIDAS, S. (Hrsg.) (1995): *Qualität im analytischen Labor*, VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo

KROMIDAS, S. (1997): *HPLC-Tips*, Band I, NOVIA, Saarbrücken

KROMIDAS, S. (1999): *Validierung in der Analytik*, Wiley-VCH, Weinheim

KROMIDAS, S. (2003): *HPLC-Tipps*, Band 2, NOVIA, Saarbrücken

- KRUMM, B.; RÖDER, C.; LEHMANN, I. (2006): Th2 reactivity and allergic reaction by patulin, 28. Mykotoxin-Workshop, Bydgoszcz, Polen, Tagungsband, 55
- KUSSAK, A.; ANDERSSON, B.; ANDERSSON, K. (1995a): Immunoaffinity column clean-up for the high-performance liquid chromatographic determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ and Q₁ in urine, J. Chromatogr. B, 672, 253-259
- KUSSAK, A.; ANDERSSON, B.; ANDERSSON, K. (1995b): Determination of aflatoxins in airborne dust from feed factories by automated immunoaffinity column clean-up and liquid chromatography, J. Chromatogr. A, 708, 55-60
- LAI, C.-L.; FUH, Y.-M. ; SHIH, D.Y.-C. (2000): Detection of mycotoxin patulin in apple juice, J. Food Drug Anal., 8, 2, 85-96
- LARSEN, T.O.; FRISVAD, J.C.; RAVN, G.; SKAANING, T. (1998): Mycotoxin production by *Penicillium expansum* on blackcurrant and cherry juice, Food Addit. Contam., 15, 6, 671-675
- LAUBER, U. (2006): Aktuelle rechtliche Regelungen (Höchstmengen, Probenahme) zu Mykotoxinen in Lebensmitteln auf nationaler und EU-Ebene, 28. Mykotoxin-Workshop, Bydgoszcz, Polen, Tagungsband, 29; mündliche Mitteilung
- LCTech Applikation: Aflatoxin-Analytik mittels photochemischer Nachsäulenderivatisierung, LCTech GmbH, Dorfen, Deutschland
- LEE, H.S.; ROUSEFF, R.L.; NAGY, S. (1986): HPLC determination of furfural and 5-hydroxymethylfurfural in citrus juices, J. Food Sci., 51, 4, 1075-1076
- LEE, K.-S.; RÖSCHENTHALER, R.J. (1986): DNA-damaging activity of patulin in *Escherichia coli*, Appl. Environ. Microbiol., 52, 5, 1046-1054
- LEHMANN, D.; WALD, B. (1990): Bestimmung von Patulin in Obstsäften mit Hochleistungs-Flüssigchromatographie nach Festphasenextraktion, Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 86, 7, 216-217
- LENNOX, J.E.; McELROY, L.J. (1984): Inhibition of growth and patulin synthesis in *Penicillium expansum* by potassium sorbate and sodium propionate in culture, Appl. Environ. Microbiol., 48, 2, 1031-1033
- LEWIS, L.; ONSONGO, M.; NJAPAU, H.; SCHURZ-ROGERS, H. ; LUBER, G. ; KIESZAK, S.; NYAMONGO, J.; BACKER, L.; DAHIYE, A.M.; MISORE, A.; DeCOCK, K.; RUBIN, C.; KENYA AFLATOXICOSIS INVESTIGATION GROUP (2005): Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in Eastern and Central Kenya, Environ. Health Perspect., 113, 12, 1763-1767
- LIEBSTER, G. (2002): Warenkunde Obst und Gemüse, Band 1: Obst, 2. Aufl. der Neuauflage, Hädecke Verlag, Düsseldorf, 2002, 43-44
- LINDROTH, S.; VON WRIGHT, ATTE (1978): Comparison of the toxicities of patulin and patulin adducts formed with cysteine, Appl. Environ. Microbiol., 35, 6, 1003-1007
- MacDONALD, S.; LONG, M.; GILBERT, J. (2000): Liquid chromatographic method for the determination of patulin in clear and cloudy apple juices and apple puree: collaborative study, J. AOAC Int., 83, 6, 1387-1394
- MAGGON, K.K.; GUPTA, S.K.; VENKITASUBRAMANIAN, T.A. (1977): Biosynthesis of aflatoxins, Bacteriol. Rev., 41, 822-855

- MAIER, H.G. (1990): Lebensmittel- und Umweltanalytik, Steinkopff Verlag, Darmstadt, 100-102mn
- MALONE, B.R.; HUMPHREY, C.W.; FLEETWOOD, K.D.; ROMER, T.R. (1998): Rapid low-solvent method for the determination for patulin in apple juice and apple juice concentrate, AOAC International annual meeting, Abstract No. A113
- MALONE, B.R.; HUMPHREY, C.W.; ROMER, T.R.; RICHARD, J.L. (2000): Determination of aflatoxins in grains and raw peanuts by a rapid procedure with fluorometric analysis, J. AOAC Int., 83, 1, 95-98
- MAREK, P.; ANNAMALAI, T.; VENKITANARAYANAN, K. (2003): Detection of *Penicillium expansum* by polymerase chain reaction, Int. J. Food Microbiol., 89: 139-144
- MARKOWSKI, J.; PLOCHARSKI, W. (2006): Determination of phenolic compounds in apples and processed apple products, J. Fruit Ornament. Plant Res., 14 (suppl. 2), 133-142
- McCALLUM, J.L.; TSAO, T. (2002): Factors affecting patulin production by *Penicillium expansum*, J. Food Prot., 65, 12, 1937-1942
- McELROY, L.J.; WEISS, C.M. (1993): The production of polyclonal antibodies against the mycotoxin derivative patulin hemiglutarate, Can. J. Microbiol., 39, 861-863
- MERCK & Co.: The Merck Index, 14. ed. (2006)
- MEYER, V.R. (1992): Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie, 7. Aufl., Salle + Sauerländer, Frankfurt/Main, Aarau
- MHADHBI, H.; BENREJEB, S.; MARTEL, A. (2005): Studies on the affinity chromatography purification of anti-patulin polyclonal antibodies by enzyme linked immunosorbent assay and electrophoresis, Food Addit. Contam., 22, 12, 1243-1251
- MOAKE, M.M.; PADILLA-ZAKOUR, O.I.; WOROBO, R.W. (2005): Comprehensive review of patulin control methods in foods, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety (CRFSFS), 1, 8-21
- MORTIMER, D.N.; GILBERT, J.; SHEPHERD, M.J. (1987): Rapid and highly sensitive analysis of aflatoxin M₁ in liquid and powdered milks using an affinity column cleanup, J. Chromatogr., 407, 393-398
- MOSS, M.O.; LONG, M.T. (2002): Fate of patulin in the presence of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Food Addit. Contam., 19, 4, 387-399
- NAKAJIMA, N.; TEREDA, H.; HISADA, K.; TSUBOUCHI, H.; YAMAMOTO, K.; UDA, T.; ITOH, Y.; KAWAMURA, O.; UENO, Y. (1990): Food Agric. Immunol., 2, 189-195
- NAWAZ, S.; COKER, R.D.; HASWELL, S.J. (1992): Development and evaluation of analytical methodology for the determination of aflatoxins in palm kernels, Analyst, 117, 67-74
- NAWAZ, S.; COKER, R.D.; HASWELL, S.J. (1995): J. Planar Chromatogr., 8, 4
- NGINDU, A.; JOHNSON, B.K.; KENYA, P.R.; NGIRA, J.A., OCHENG, D.M.; NANDWA, H. et al. (1982): Outbreak of acute hepatitis caused by aflatoxin poisoning in Kenya, Lancet, 1, 8285, 1346-1348

- NIEDWETZKI, G.; LACH, G.; GESCHWILL, K. (1994): Determination of aflatoxins in food by use of an automatic work station, *J. Chromatogr. A*, 661, 175-180
- OTTA, K.H.; PAPP, E.; BAGÓCSI, B. (2000): Determinations of aflatoxins in food by over-pressured-layer chromatography, *J. Chromatogr. A*, 882, 11-16
- PAPADOPOULOU-BOURAOUI, A.; STROKA, J.; ANKLAM, E. (2002): Comparison of Two Post-Column Derivatization Systems, Ultraviolet Irradiation and Electrochemical Determination, for the Liquid Chromatographic Determination of Aflatoxins in Food, *J. AOAC Int.*, 85, 2, 411-416
- PASTER, N.; HUPPERT, D.; BARKAI-GOLAN, R. (1995): Production of patulin by different strains of *Penicillium expansum* in pear and apple cultivars stored at different temperatures and modified atmospheres, *Food Addit. Contam.*, 12, 1, 51-58
- PATERSON, R.R.M.; ARCHER, S.; KOZAKIEWICZ, Z.; LEA, A.; LOCKE, T.; O'GRADY, E. (2000): A gene probe for the patulin metabolic pathway with potential for use in patulin and novel disease control, *Biocontrol. Sci. Technol.*, 10, 509-512
- PATEY, A.L.; SHARMAN, M.; GILBERT, J. (1990): Determination of aflatoxin B₁ levels in peanut butter using an Immunoaffinity column clean-up procedure: inter-laboratory study, *Food Addit. Contam.*, 7, 4, 515-520
- PATEY, A.L.; SHARMAN, M.; GILBERT, J. (1991): Liquid chromatographic determination of aflatoxin levels in peanut butters using an Immunoaffinity column cleanup method: International collaborative trial, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 74, 1, 76-81
- PATULIN CLINICAL TRIALS COMMITTEE, MEDICAL RESEARCH COUNCIL (1943): Report: Clinical trial of patulin in the common cold, *Lancet*, ii, 373-375, reprinted (2004): *Int. J. Epidemiol.*, 33, 243-246
- PIEMONTENESE, L.; SOLFRIZZO, M.; VISCONTI, A. (2005): Occurrence of patulin in conventional and organic fruit products in Italy and subsequent exposure assessment, *Food Addit. Contam.*, 22, 5, 437-442
- PRIETA, J.; MORENO, M.A.; DÍAZ, S.; SUÁREZ, DOMÍNGUEZ, L. (1994): Survey of patulin in apple juice and children's apple food by the diphasic dialysis membrane procedure, *J. Agric. Food Chem.*, 42, 1701-1703
- R-BIOPHARM (2003): Anleitung zu RIDA[®] Aflatoxin column, Art. Nr. R5001 und R5002, Stand: 03-07-08, r-biopharm AG, Darmstadt, Deutschland
- R-BIOPHARM (2006): Preisliste 2006, r-biopharm AG, Darmstadt, Deutschland
- RAJASEKARAN, K.; CARY, J.W.; CLEVELAND, T.E. (2006): Prevention of preharvest aflatoxin contamination through genetic engineering of crops, *Mycotoxin Res.*, 22, 2, 118-124
- RAZZAZI-FAZELI, E.; NOVIANDI, C.T.; PORASUPHATANA, S.; AGUS, A.; BÖHM, J. (2004): A survey of aflatoxin B₁ and total aflatoxin contamination in baby food, peanut and corn products sold at retail in Indonesia analysed by ELISA and HPLC, *Mycotoxin Research*, 20, 2, 51-58
- RAZZAZI-FAZELI, E.; CICHNA-MARKL, M.; BÖHM, C.; BRENN-STRUCKHOFOVA, Z. (2006): Neue Ansätze in der Immunanalytischen Probenvorbereitung von DON, 28. Mykotoxin-Workshop, Bydgoszcz, Polen, Tagungsband, 46

- RICE, S.L.; BEUCHAT, L.R.; WORTHINGTON, R.E. (1977): Patulin production by *Byssochlamys* spp. in fruit juices, *Appl. Environm. Microbiol.*, 34, 6, 791-796
- ROACH, J.A.G.; WHITE, K.D.; TRUCKSESS, M.W.; THOMAS, F.S. (2000): Capillary gas chromatography/mass spectrometry with chemical ionization and negative ion detection for confirmation of identity of patulin in apple juice, *J. AOAC Int.*, 83, 1, 104-112
- ROLAND, J.O.; BEUCHART, L.R. (1984): Influence of temperature and water activity on growth and patulin production by *Byssochlamys nivea* in apple juice, *Appl. Environ. Microbiol.*, 47, 1, 205-207
- ROSENBERG, E.; KRŠKA, R.; WISSIACK, R.; KMETOV, V.; JOSEPHS, R.; RAZZAZI, E.; GRASSERBAUER, M. (1998): High-performance liquid chromatography-atmospheric-pressure chemical ionization mass spectrometry as a new tool for the determination of the mycotoxin zearalenone in food and feed, *J. Chromatogr. A*, 819, 277-288
- ROSENBERGER, D.A. (2003): Control of *Penicillium expansum* during apple harvest and storage, in: Patulin technical symposium, Feb 18-19, 2003; Kissimmee, Fla., National Center for Food Safety and Technology, Summit III
- ROVIRA, R.; RIBERA, F.; SANCHIS, V.; CANELA, R. (1993): Improvements in the quantification of patulin in apple juice by high-performance liquid chromatography, *J. Agric. Food Chem.*, 41, 214-216
- RÜCKER, G.; NEUGEBAUER, M.; WILLEMS, G.G. (2001): Instrumentelle pharmazeutische Analytik, 3. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart
- RUPP, H.S.; TURNIPSEED, S.B. (2000): Confirmation of patulin and 5-hydroxymethylfurfural in apple juice by gas chromatography/mass spectrometry, *J. AOAC Int.*, 83, 3, 612-620
- RYCHLIK, M.; SCHIEBERLE, P. (1998): Synthesis of ¹³C-labeled patulin [4-Hydroxy-4*H*-furo[3,2-*c*]pyran-2(6*H*)-one] to be used as internal standard in a stable isotope dilution assay, *J. Agric. Food Chem.*, 46, 5163-5169
- RYCHLIK, M.; SCHIEBERLE, P. (1999): Quantification of the mycotoxin patulin by a stable isotope dilution assay, *J. Agric. Food Chem.*, 47, 3749-3755
- RYCHLIK, M. (2003): Rapid degradation of the mycotoxin patulin in man quantified by stable isotope dilution assays, *Food Addit. Contam.*, 20, 9, 829-837
- SANDS, D.C.; McINTYRE, J.L.; WALTON, G.S. (1976): Use of activated charcoal for the removal of patulin from cider, *Appl. Environ. Microbiol.*, 32, 3, 388-391
- SCHUMACHER, D.; LEHMANN, L.; METZLER, M. (2005): Untersuchung zur Induktion von oxidativen DNA-Schäden durch das Mykotoxin Patulin in kultivierten V79-Zellen, *Lebensmittelchemie*, 59, 36
- SCHWEIZERISCHES LEBENSMITTELBUCH (SLMB) → BUNDESAMT FÜR GESUNDHEIT
- SCOTT, P.M.; TRUCKSESS, M.W. (1997a): Application of Immunoaffinity columns to mycotoxin analysis, *J. AOAC Int.*, 80, 5, 941-949
- SCOTT, P.M.; LAWRENCE, G.A. (1997b): Determination of aflatoxins in beer, *J. AOAC Int.*, 80, 6, 1229-1234

SEIBER, J.N.; HSIEH, D.P.H. (1973): Application of high-speed liquid chromatography to the analysis of aflatoxins, *Journal of the AOAC*, 56, 4, 827-830

SEWRAM, V.; NAIR, J.J.; NIEUWOUDT, T.W.; LEGGOTT, N.L., SHEPHARD, G.S. (2000): Determination of patulin in apple juice by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 897, 365-374

SFORZA, S.; DALL'ASTA, C.; MARCHELLI, R. (2006): Recent advances in mycotoxin determination food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.*, 25, 1, 54-76

SHARMA, R.P. (1993): Immunotoxicity of mycotoxins, *J. Dairy Sc.*, 76, 892-897

SHARMAN, M.; PATEY, A.L.; GILBERT, J. (1989): Application of an immunoaffinity column sample clean-up to the determination of aflatoxin M₁ in cheese, *J. Chromatogr.*, 474, 457-461

SHARMAN, M.; GILBERT, J. (1991a): Automated aflatoxin analysis of foods and animal feeds using immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatographic determination, *J. Chromatogr.*, 543, 200-225

SHARMAN, M.; PATEY, A.L.; BLOOMFIELD, D.A.; GILBERT, J. (1991b): Surveillance and control of aflatoxin contamination of dried figs and fig paste imported into the United Kingdom, *Food Addit. Contam.*, 8, 3, 299-304

SHARMAN, M.; MacDONALD, S.; GILBERT, J. (1992): Automated liquid chromatographic determination of ochratoxin A in cereals and animal products using immunoaffinity column clean-up, *J. Chromatogr.*, 603, 285-289

SHEPHARD, G.S.; LEGGOTT, N.L. (2000): Review: Chromatographic determination of the mycotoxin patulin in fruit and fruit juices, *J. Chromatogr. A*, 882, 17-22

SHEU, F.; SHYU, Y.T. (1999a): Analysis of patulin in apple juice by diphasic dialysis extraction with in situ acylation and mass spectrometric determination, *J. Agric. Food Chem.*, 47, 2711-2714

SHEU, F.; LEE, O.; SHYU, Y.T. (1999b) : The synthesis of antigens and the production of antibodies against patulin derivatives, *J. Food Drug Anal.*, 7, 1, 65-72

SLMB → BUNDESAMT FÜR GESUNDHEIT

SOMMER, N.F.; BUCHANAN, J.R.; FORTLAGE, R.J. (1974): Production of patulin by *Penicillium expansum*, *Appl. Microbiol.*, 28, 4, 589-593

SQUIRE, R.A. (1981): Ranking animal carcinogens: a proposed regulatory approach, *Science*, 214, 877-880

STINSON, E.E.; OSMAN, S.F., HUHTANEN, C.N.; BILLS, D.D. (1978): Disappearance of patulin during alcoholic fermentation of apple juice, *Appl. Environ. Microbiol.*, 36, 4, 620-622

STOTT, W.T.; BULLERMAN, L.B. (1975): Influence of carbohydrate and nitrogen source on patulin production by *Penicillium patulum*, *Appl. Microbiol.*, 30, 5, 850-854

STROKA, J.; PETZ, M.; JOERISSEN, U.; ANKLAM, E. (1999): Investigation of various extractants for the analysis of aflatoxin B₁ in different food and feed matrices, *Food Addit. Contam.*, 16, 8, 331-338

- STROKA, J.; PETZ, M.; ANKLAM, E. (2000): Analytical methods for the determination of aflatoxins in various food matrices at concentrations regarding the limits set in European Regulations: Development, characteristics, limits, *Mycotoxin Research*, 16, 23-42
- STUDER-ROHR, I.; DIETRICH, D.R.; SCHLATTER, J.; SCHLATTER, C. (1995): The occurrence of ochratoxin A in coffee, *Food Chem. Toxicol.*, 33, 341-355
- TAKINO, M.; DAISHIMA, S.; NAKAHARA, T. (2003): Liquid chromatography/mass spectrometric determination of patulin in apple juice using atmospheric pressure photoionization, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 17, 1965-1972
- TANAKA, H.; TAKINO, M.; SUGITA-KONISHI, Y.; TANAKA, T. (2006): Development of a liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometric method for the simultaneous determination of trichothecenes, zearalenone and aflatoxins in foodstuffs, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 20, 1422-1428
- TARTER, E.J.; SCOTT, P.M. (1991): Determination of patulin by capillary gas chromatography of the heptafluorobutyrate derivative, *J. Chromatogr.*, 538, 441-446
- TASCHAN, H.; KASUNIC, I.; MARTE, S.; WINDIRSCH, B. (2005): Mutterkornalkaloide in Getreide, *Lebensmittelchemie*, 59, 35-36
- TRUCKSESS, M.W. (1974): Observation on the thin layer chromatographic development of corn extracts with ethyl ether, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 57, 5, 1220-1221
- TRUCKSESS, M.W.; STACK, M.E.; NESHEIM, S.; PAGE, S.W.; ALBERT, R.H. (1991): Immunoaffinity column coupled with solution fluorescence of liquid chromatography with postcolumn derivatization for determination of aflatoxins in corn, peanuts, and peanut butter: Collaborative study, *J. AOAC Int.*, 74, 1, 81-88
- TRUCKSESS, M.W.; STACK, M.E.; NESHEIM, S.; ALBERT, R.H.; ROMER, T.R. (1994): Multifunctional column coupled with liquid chromatography for determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁, and G₂ in corn, almonds, brazil nuts, peanuts, and pistachio nuts: collaborative study, *J. AOAC Int.*, 1994, 77, 6, 1512-1521
- TRUCKSESS, M.W.; TANG, Y. (1999): Solid-phase extraction method for patulin in apple juice and unfiltered apple juice, *Journal J. AOAC Int.*, 82, 5, 1109-1113
- TRUCKSESS, M.W.; POHLAND, A.E. (Hrsg.) (2001): *Mycotoxin protocols, Methods in Molecular Biology*, Vol. 157, Humana Press, Totowa
- TRUCKSESS, M.W. (2006): *Mycotoxins, General Referee Report*, *J. AOAC Int.*, 89, 1, 270-284
- TUINSTRAN, L.G.M.T.; ROOS, A.H.; VAN TRIJP, J.M.P. (1993): Liquid chromatographic determination of aflatoxin M₁ in milk powder using immunoaffinity columns for cleanup: Interlaboratory study, *J. AOAC Int.*, 76, 6, 1248-1254
- UNGER, K.K.; WEBER, E. (Hrsg.) (1995): *Handbuch der HPLC*, Teil 1, 2. Aufl., GIT Verlag, Darmstadt
- URANO, T.; TRUCKSESS, M.W.; PAGE, S.W. (1993): Automated affinity liquid chromatography system for on-line isolation, separation, and quantification of aflatoxins in methanol-water extracts of corn or peanuts, *J. Agric. Food Chem.*, 41, 1982-1985

VAHL, M.; JORGENSEN, K. (1998): Determination of aflatoxins in food using LC/MS/MS, Z. Lebens. Unters. Forsch. A, 206, 243-245

VAN EGMOND, H.P. (1989): Current situation on regulations for mycotoxins. Overview of tolerances and status of standard methods of sampling and analysis, Food Additives and Contaminants, 6, 2, 139-188

VARIAN (2005): Varian Inc. Consumables & Supplies 2005-2006 Catalog, Varian Deutschland, Darmstadt, 82-83

VEKIRU, E.; FRUHAUF, S.; SAHIN, M.; OTTNER, F.; KRŠKA, R. (2006): Investigation of various adsorbents for their ability to deactivate Aflatoxin B₁, 28. Mykotoxin-Workshop, Bydgoszcz, Polen, Tagungsband, 60

WEIDENBÖRNER, M. (2000): Lexikon der Lebensmittelmykologie, Springer, Berlin Heidelberg New York

WEIDENBÖRNER, M. (2001): Encyclopedia of Food Mycotoxins, Springer, Berlin Heidelberg New York

WHO → WORLD HEALTH ORGANIZATION

WILLIAMS, J.H.; PHILLIPS, T.D.; JOLLY, P.E.; STILES, J.K.; JOLLY, C.M.; AGGARWAL, D. (2004): Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions, Am. J. Clin. Nutr., 80, 1106-22

WILSON, D.M.; NUOVO, G.J. (1973): Patulin production in apples decayed by *Penicillium expansum*, Appl. Microbiol., 26, 1, 124-125

WILSON, T.J.; ROMER, T.R. (1991): Use of the Mycosep multifunctional cleanup column for liquid chromatographic determination of aflatoxins in agricultural products, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 74, 6, 951-956

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (1990): Evaluation of certain food additives and contaminants, WHO, Forty-fourth report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives, Genf, Technical Report Series, 789, 29-30

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (1995): Evaluation of certain food additives and contaminants, WHO, Forty-fourth report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives, Genf, Technical Report Series, 859, 36-38

YAZICI, S.; VELIOGLU, Y.S. (2002): Effect of thiamine hydrochloride, pyridoxine hydrochloride and calcium-d-pantothenate on the patulin content of apple juice concentrate, Nahrung/Food, 46, 4, 256-257

YU, J.; CHANG, P.-K.; EHRlich, K.C.; CARY, J.W.; BHATNAGAR, D.; CLEVELAND, T.E.; PAYNE, G.A.; LINZ, J.E.; WOLOSHUK, C.P.; BENNETT, J.W. (2004): Minireview: Clustered Pathway Genes in Aflatoxin Biosynthesis, Appl. Environ. Microbiol., 70, 3, 1253-1262

ZIMMERLI, B.; DICK, R. (1995): Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high-performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and Immunoaffinity column cleanup: methodology and Swiss data, J. Chromatogr. B, 666, 85-99

ZIMMERLI, B.; DICK, R. (1996): Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assessment, Food Addit. Contam., 13, 6, 655-668

Danke!

Die vorliegende Arbeit wurde von Februar 2003 bis Oktober 2006 bei der APPLICA GmbH, Angewandte Chemische Analytik, in Bremen erstellt, unter Anleitung von Herrn Dr. Kurt-Peter Raezke. Herr Prof. Dr. Peter Winterhalter vom Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität Braunschweig betreute diese Arbeit.

Mein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Peter Winterhalter und Herrn Dr. Kurt-Peter Raezke für die interessante Themenstellung und die freundliche Betreuung. Der Geschäftsführung der APPLICA GmbH, namentlich Frau Antje Raezke und Herrn Dr. Kurt-Peter Raezke, danke ich für die großzügige Bereitstellung der für die erfolgreiche Durchführung der vorliegenden Arbeit erforderlichen Ressourcen, insbesondere in Form von Geräten und Chemikalien.

Ebenso danke ich dem APPLICA-Team im Allgemeinen und Saskia Timmermann im Besonderen für ihre Hilfe bei der Durchführung der praktischen Arbeiten – sie musste ständig neue Ideen über sich ergehen lassen. Für ständige Diskussionsbereitschaft und Unterstützung danke ich ebenso den APPLICA-Kollegen Sabine Beckmann, Dr. Lutz Elflein, Melanie Koch und Dr. Torsten Peix. Weiterer Dank für ihre praktische Unterstützung gebührt den APPLICA-Praktikanten Janine Jochens und Lutz Jachol.

Für ihre Korrekturen danke ich besonders Dr. Anja Weltring, die sicherlich froh war, sich in der Forschung mal nicht mit Rinderfaeces beschäftigen zu müssen, Dr. Kirsten Peters, die nicht nur bei den Korrekturen Rückgrat bewiesen hat, Dr. Silke Voßmann, die als Zahnmedizinerin die Toxikologie-Abschnitte auf Herz und Nieren geprüft hat, und Barbara Blankenship, die beim Gegenlesen der englischen Zusammenfassung ihren lebensmittelchemischen Wissensstand weiter vergrößert hat.

Meinem ehemaligen Semester danke ich für die tolle Gemeinschaft während des Studiums – und den weiterbestehenden guten Kontakt. Den Kollegen am Institut für Lebensmittelchemie der TU Braunschweig gebührt ebenso Dank wie meinen Freunden, die für die nötige Zerstreuung zur Verfügung standen.

Familie Corinna und Thomas Welling danke ich für ihre allgemeine Unterstützung.

Mein herzlicher Dank geht an meine Eltern, die mir das Studium und damit diese Doktorarbeit ermöglicht und mich immer gefördert haben.

Mein großer Dank geht an meine Partnerin Daniela Grotewahl für ihre ständige Unterstützung.

Zu guter Letzt möchte ich *Aspergillus flavus* und *Penicillium expansum* danken – ohne ihre Mitarbeit wäre die Arbeit, die Sie in Händen halten, nie möglich gewesen.

Anhang: Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Andreas-Sascha Wendt
Geburtsdatum	11. Dezember 1975
Geburtsort	Bremen
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Berufliche Tätigkeit

seit Dezember 2002	Lebensmittelchemiker bei der APPLICA GmbH Angewandte Chemische Analytik, Bremen Prüfleiter Flüssigchromatographie, Schwerpunkt Analytik von pflanzlichen Lebensmitteln
Mai 2001 bis Nov. 2002	Mitarbeit in elterlicher Druckerei mit Schwerpunkt Marketing

Dissertation

seit Februar 2003	Anfertigung der Dissertation <i>Bestimmung von Aflatoxinen und Patulin mittels online-SPE-LC</i> Institut für Lebensmittelchemie, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig/APPLICA GmbH, Bremen
-------------------	---

Praktische Ausbildung

April 2001	Zweite Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker Staatliches Lebensmitteluntersuchungsamt Braunschweig Abschluss: Staatlich geprüfter Lebensmittelchemiker
ab März 2000	Praktisches Jahr am Staatlichen Lebensmitteluntersuchungsamt Braunschweig und Bedarfsgegenständeuntersuchungsamt Lüneburg

Studium

Dez. 1999 bis März 2000	Anfertigung der Wissenschaftlichen Abschlussarbeit <i>Untersuchungen über Thearubigene mit HSCCC und HPLC</i> Bestandteil der Ersten Staatsprüfung
November 1999	Erste Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
Oktober 1997	Vorprüfung für Lebensmittelchemiker Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

Ab Oktober 1995 Studium der Lebensmittelchemie
Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

Schulbildung

Mai 1995 Abitur am Cato Bontjes van Beek-Gymnasium, Achim

1982 bis 1995 Grundschule, Orientierungsstufe, Gymnasium in Achim

Weitere Veröffentlichung (s. auch Seite 3)**aus der Wissenschaftlichen Abschlussarbeit**

DEGENHARDT, A.; ENGELHARDT, U.; WENDT, A.-S.; WINTERHALTER, P. (2000): Isolation of Black Tea Pigments Using High-Speed Countercurrent Chromatography and Studies on Properties of Black Tea Polymers, J. Agr. Food Chem., 48, 5200-5205

