

Analytik und Vorkommen von Mutterkornalkaloiden in ausgewählten Lebensmitteln

Genehmigte Dissertation
vorgelegt von Diplom-Lebensmittelchemikerin Carola Müller aus Berlin

An der Fakultät III – Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
– Dr. rer. nat. –

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Lothar Kroh
Gutachterin: Prof. Dr. Andrea Hartwig
Gutachter: Prof. Dr. Reiner Wittkowski
Gutachter: Prof. Dr. Dr. Ewald Usleber

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 17. September 2009

Berlin 2010
D 83

Impressum

Dissertationen

Vorgelegt von Carola Müller

Analytik und Vorkommen von Mutterkornalkaloiden in ausgewählten
Lebensmitteln

Bundesinstitut für Risikobewertung
Pressestelle
Thielallee 88-92
14195 Berlin

Berlin 2010 (Dissertationen 01/2010)
133 Seiten, 37 Abbildungen, 43 Tabellen
€ 10,-

Druck: Umschlag, Inhalt und buchbinderische Verarbeitung
BfR-Hausdruckerei Dahlem

ISSN 1863-852X ISBN 3-938163-55-0

Inhalt

1	Zusammenfassung	7
2	Abstract	9
3	Problemstellung	11
4	Einleitung	13
5	Theoretischer Teil	17
5.1	Toxikologie der Mutterkornalkaloide	17
5.1.1	Die Geschichte der Mutterkornvergiftungen	17
5.1.2	Pharmakologische Wirkung ausgewählter Mutterkornalkaloide	17
5.1.3	Toxische Effekte im Menschen	23
5.1.4	Bewertung des Gefährdungspotentials und Ableitung eines toxikologischen Endpunktes	24
5.1.5	Toxische Effekte in Säugetieren	25
5.2	Die Pilzgattung Claviceps	28
5.2.1	Vorkommen und Aussehen	28
5.2.2	Inhaltsstoffe	29
5.2.3	Infektionszyklus	30
5.2.4	Einflussfaktoren und Bekämpfung	31
5.2.5	Biosynthese	31
5.3	Physikalisch-chemische Eigenschaften der Mutterkornalkaloide	34
5.3.1	Chemische Struktur	34
5.3.2	Physikalisch-chemische Eigenschaften	36
5.4	Vorkommen von Mutterkornalkaloiden	37
5.5	Gesetzliche Regelungen von Mutterkornalkaloiden	41
5.5.1	Lebensmittelrechtliche Regelungen	41
5.5.2	Futtermittelrechtliche Regelungen	41
6	Analytik von Mutterkornalkaloiden	43
6.1.1	Extraktion und Aufreinigung	43
6.1.2	Flüssigchromatographie (HPLC)	45
6.1.3	Gaschromatographie (GC)	46
6.1.4	Dünnschichtchromatographie (DC)	46
6.1.5	Immunochemische Verfahren	47
6.1.6	Elektrophorese	48
6.1.7	Qualitative massenspektrometrische Methoden	48
7	Material und Methoden	51
7.1	Chemikalien und Materialien	51
7.1.1	Chemikalien	51
7.1.2	Standardsubstanzen	51
7.1.3	Hilfsmittel	51
7.1.4	Geräte und Software	52
7.1.5	Probenmaterial	52
7.2	Probenvorbereitung	53

7.3	Probenaufarbeitung	53
7.3.1	Probenaufreinigung nach halogenorganischer Extraktion	53
7.3.2	Probenaufreinigung nach nicht-halogenorganischer Extraktion (Alox-Methode)	53
7.3.3	Probenaufreinigung nach nicht-halogenorganischer Extraktion (LC-MS/MS-Schnellmethode)	54
7.4	Geräteeinstellungen	54
7.4.1	HPLC-FLD	54
7.4.2	LC-MS/MS	55
7.4.2.1	HPLC	55
7.4.2.2	MS/MS	55
7.5	Bestimmung der analytischen Grenzen	56
7.5.1	Definitionen nach DIN 32645	56
7.5.2	Durchführung der Bestimmung der analytische Grenzen für Lebensmittel und Futtermittel	56
7.6	Bestimmung der Wiederfindungen	57
7.6.1	Wiederfindung nach halogenorganischer Extraktion	57
7.6.2	Wiederfindung nach nicht-halogenorganischer Extraktion (Alox- und LC-MS/MS-Schnellmethode) für Lebensmittel	57
7.6.3	Wiederfindung nach nicht-halogenorganischer Extraktion (Alox-Methode) für Futtermittel	58
7.7	Bestimmung der Präzision	58
7.7.1	Ermittlung der Präzision nach halogenorganischer Extraktion	58
7.7.2	Ermittlung der Präzision nach nicht-halogenorganischer Extraktion (Alox- und LC-MS/MS-Schnellmethode) für Lebensmittel	59
8	Ergebnisse	61
8.1	Überprüfung der Messsysteme	61
8.1.1	Beispielchromatogramme	61
8.1.2	Arbeitsbereich und Linearität der Analysensysteme	64
8.1.3	Ermittlung der Methodenfaktoren für die HPLC-FLD	64
8.2	Methodenentwicklung	65
8.2.1	Optimierung des Aufreinigungsmaterials	65
8.2.2	Optimierung des Extraktionsmittels	67
8.3	Aufreinigung nach halogenorganischer Extraktion	67
8.3.1	Bestimmung der analytischen Grenzen nach DIN 32645	67
8.3.2	Bestimmung der Wiederfindungsrate	68
8.3.3	Bestimmung der Präzisionsdaten	68
8.3.4	Laborvergleichsuntersuchung im Rahmen der Mykotoxin-Arbeitsgruppe nach § 64 LFGB	69
8.4	Aufreinigung nach nicht-halogenorganischer Extraktion (Alox-Methode)	72
8.4.1	Bestimmung der analytischen Grenzen nach DIN 32645 für Lebensmittel	72
8.4.2	Bestimmung der analytischen Grenzen nach DIN 32645 für Futtermittel	74
8.4.3	Bestimmung der Wiederfindungsrate	74
8.4.3.1	Wiederfindung nach nicht-halogenorganischer Extraktion (Alox-Methode) mittels HPLC-FLD in Lebensmitteln	74
8.4.3.2	Wiederfindung nach nicht-halogenorganischer Extraktion (Alox-Methode) mittels LC-MS/MS in Lebensmitteln	74

8.4.3.3	Wiederfindung nach nicht-halogenorganischer Extraktion (Alox-Methode) mittels HPLC-FLD in Futtermitteln	79
8.4.4	Bestimmung der Präzisionsdaten	79
8.5	Aufreinigung nach nicht-halogenorganischer Extraktion (LC-MS/MS-Schnellmethode)	82
8.5.1	Bestimmung der analytischen Grenzen nach DIN 32645 für Lebensmittel	82
8.5.2	Bestimmung der Wiederfindungsrate	83
8.5.3	Bestimmung der Präzisionsdaten	85
8.6	Kreuzvalidierung – Vergleich der verschiedenen Methoden	87
8.7	Gehalte in Lebensmitteln	90
8.8	Zusammenfassung der Ergebnisse	96
9	Diskussion	99
9.1	Betrachtung der ermittelten analytischen Grenzen	99
9.2	Betrachtung der ermittelten Wiederfindungsraten	101
9.3	Betrachtung der ermittelten Präzisionsdaten	101
9.4	Gehalte in Lebensmitteln	103
10	Zusammenfassung und Ausblick	105
10.1	Zusammenfassung	105
10.2	Ausblick	106
11	Anhang	107
12	Literatur	115
13	Abkürzungsverzeichnis	127
14	Abbildungsverzeichnis	129
15	Tabellenverzeichnis	131
	Danksagung	133

1 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mehrere Analysemethoden zur Bestimmung von zwölf Mutterkornalkaloiden in Getreiden und ausgewählten Getreideprodukten sowie Futtermitteln entwickelt.

In der bisher routinemäßig eingesetzten Methode werden das von Scott und Lawrence publizierte Extraktionsmittel, bestehend aus Dichlormethan, Ethylacetat, Methanol und Ammoniumhydroxid [Scott und Lawrence, 1980], und das von Klug entwickelte Aufreinigungssystem mit Weinsäure-imprägnierter Diatomeenerde und Ammoniakbegasung [Klug, 1986] verwendet. Da Bedarf an einer effizienteren Analysemethode insbesondere für die Deutsche Lebensmittelüberwachung besteht und eine Standardisierung im Rahmen der §-64-LFGB-Arbeitsgruppe „Mykotoxine“ angestrebt wird, war es notwendig, arbeitstechnisch bedenkliche Reagenzien (halogenorganische Lösemittel, Ammoniakbegasung) so weit wie möglich zu ersetzen.

Es wurde daher auf die Ammoniakbegasung und die Verwendung von Dichlormethan verzichtet und ein Extraktionsmittel bestehend aus Ethylacetat, Methanol und Ammoniumhydroxid etabliert. Die Detektion erfolgte nach Aufreinigung an basischem Aluminiumoxid und flüssigchromatographischer Trennung der Alkaloide mittels Fluoreszenzdetektor sowie Quadrupol-Tandem-Massenspektrometer. Die entwickelten Analysemethoden wurden in Bezug auf Arbeitsbereich, analytische Grenzen, Richtigkeit und Präzision hausintern erfolgreich validiert, wobei sich zeigte, dass mit der Fluoreszenzdetektion vergleichbare Ergebnisse wie mit der LC-MS/MS-Detektion erzielt werden konnten, da Mutterkornalkaloide durch ihre chromophoren Eigenschaften mit diesem System sehr sensitiv und selektiv analysiert werden können.

Darüber hinaus wurde die Einsetzbarkeit der Methode mit fluoreszenzbasierter Detektion in fünf Laboren der amtlichen Überwachung erfolgreich geprüft. Die Methode wurde in deren Routinebetrieb übernommen.

Durch Nutzung der hohen Empfindlichkeit und Selektivität des Tandem-Massenspektrometers konnte zudem eine sog. „Dilute-and-Shoot“-Analysemethode unter Verzicht der Aufreinigung erarbeitet werden. Die Validierung zeigte, dass diese Methode die allgemeinen Anforderungen an die Spurenanalytik erfüllt, darüber hinaus kann sie aufgrund ihrer Effizienz und schnellen Durchführbarkeit auch besonders gut als Screening-Methode eingesetzt werden.

Die Untersuchung von 130 Lebensmittelproben zeigte, dass der in Deutschland als provisorische Bewertungsgrundlage entsprechend der Interventionsrichtlinie [VO (EG) 824/2000, 2000] herangezogene Orientierungswert von 1000 Mikrogramm Gesamtalkaloide pro Kilogramm nicht überschritten wurde.

2 Abstract

Several analytical methods for the determination of twelve ergot alkaloids in cereals, selected cereal products, and feeding stuff were developed within this work.

Starting points were the extraction solvent published by Scott and Lawrence, a mixture of dichloromethane, ethyl acetate, methanol and aqueous ammonia [Scott and Lawrence, 1980], and the cleanup procedure developed by Klug, consisting of tartaric acid impregnated diatomaceous earth, and fumigation with ammonia [Klug, 1986]. Since it was the aim of this work to provide a method for the German Food Surveillance standardised according to § 64 German Food and Feed Act, halogenated solvents had to be avoided.

In the course of this work fumigation with ammonia and the use of dichloromethane were eluded. An extraction solvent mixture consisting of ethyl acetate, methanol, and aqueous ammonia was established. Detection, after cleanup with basic alumina and liquid chromatographic separation, was performed applying either a fluorescence detector or a tandem mass spectrometer.

The developed methods were then checked for working range, their analytical limits, accuracy, and precision, and were successfully inhouse validated. Validation demonstrated that fluorescence detection in terms of selectivity and sensitivity was equally suitable as tandem mass spectrometric detection due to the chromophoric nature of the ergot alkaloids.

In addition, the fluorescence based method was successfully tested by five laboratories of the Official German Food Surveillance and is now employed for routine analysis.

By taking advantage of the sensitivity and selectivity of the tandem mass spectrometric system, a method without the basic alumina cleanup was developed. Validation demonstrated that this method meets the general demands of trace analysis. In addition, it is suitable as screening-method, due to its efficiency.

Applicability of the developed methods was proved by analysing 130 cereal and cereal based samples. The former maximum level of a total alkaloid content of 1000 µg/kg laid down in Regulation (EG) 824/2000 [VO 824/2000, 2000] concerning the taking-over of cereals by intervention agencies was exceeded by none of the analysed samples.

3 Problemstellung

Die Verunreinigung von Getreide mit Mutterkorn galt in den letzten Jahren als ein beherrschbares Problem im Bereich der Lebensmittelsicherheit. Hierzu trugen u. a. die verbesserte Technologie der Schwarzreinigung und die Gute Landwirtschaftliche Praxis (GLP) bei.

Im Rahmen umfangreicher Untersuchungen (Besondere Ernte- und Qualitätsermittlung) wies die Bundesanstalt für Getreide-, Kartoffel- und Fettforschung (BAGKF)¹ 2003 in fünf Roggenmehlen Mutterkornalkaloidgehalte zwischen 2308 und 7255 Mikrogramm pro Kilogramm Mehl nach. Aufgrund dieser Mutterkornalkaloidgehalte wurde vom Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) eine Stellungnahme verfasst [BfR, 2004], in der das Institut empfiehlt, EU-einheitliche Richtwerte bzw. Höchstwerte für Gesamtalkaloide sowie für toxikologisch relevante Einzelalkaloide des Mutterkorns festzusetzen. Zudem wird auf den Forschungsbedarf zu den geschilderten Kenntnislücken in Bezug auf Toxizität und Exposition aufmerksam gemacht.

Die im Bereich der Lebensmittelanalytik in Deutschland vielfach eingesetzte Analysenmethode basiert auf einer basischen, halogenorganischen Extraktion, gefolgt von einer Aufreinigung durch einen mittels Ammoniakbegasung in situ erzeugten Kationenaustauscher und anschließender flüssigchromatographischer Trennung der Alkaloide mit Fluoreszenzdetektion [Klug, 1986].

Besonders in Hinsicht auf die Probenaufreinigung ist diese Analysenmethode als sehr zeit- und arbeitsintensiv einzustufen, verbunden mit einem hohen Verbrauch an halogenorganischen Lösemitteln, und damit für den heutigen Routinebetrieb als überarbeitungsbedürftig anzusehen.

Die von Mutterkornalkaloiden ausgehende Toxizität und das Fehlen einer validierten, in der Routineanalytik der amtlichen Überwachung einsetzbaren Analysenmethode waren Anlass zur Initiierung des Projektes „Mutterkornalkaloide in Lebensmitteln: Analytik und Vorkommen“.

Ziel dieses Projektes war es, eine einfach handhabbare, effiziente Bestimmungsmethode zu entwickeln, hausintern zu validieren, auf Lebensmittel anzuwenden und damit eine Basis zur Sammlung von Expositionsdaten zu schaffen.

¹ heute Max-Rubner-Institut der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel (BfEL), Standort Detmold

4 Einleitung

Am 22. September 1692 wurden in Salem, Massachusetts (USA) 19 Männer und Frauen gehängt und ein Mann zu Tode gequetscht. Sie waren der Hexerei für schuldig befunden worden.

Auslöser hierfür waren die Aussagen von acht Mädchen, unter ihnen die Tochter und die Nichte des Pfarrers Samuel Parris. Sie litten seit Dezember 1691 an „übler Laune, unbotmäßiger Rede, krampfartigen Anfällen“, während derer sie „gezwickt, gestochen und gebissen“ wurden. Sie vollführten seltsame Gesten und berichteten von Attacken mit Blindheit, Schwerhörigkeit, Visionen von Feuerbällen und der Fähigkeit zu fliegen. „Sie wurden in Stücke gerissen, die Knochen aus den Gelenken gezerrt“ [Carporeael, 1976; Matossian, 1989 b].

Einige populäre Medizinhistoriker gehen heute davon aus, dass die Mädchen unter einer Vergiftung durch Mutterkorn litten und halluzinierten [Carporeael, 1976; Kaye, 1995; Matossian, 1989 b].

Ähnliches wird für die Hexenprozesse des 17. Jahrhunderts in Finnmark, Norwegen berichtet [Alm, 2003].

Im botanischen Sinne handelt es sich bei Mutterkorn um die Überwinterungsform (Dauermycel) des Pilzes *Claviceps purpurea*, der auf den Fruchtknoten von Wildgräsern, aber auch einheimischen Getreidearten wächst und dort an der Stelle der Karyopsen Sklerotien bildet [Mielke, 2000; Strasburger, 2002]. Weitere gängige Namen sind Purpurroter Hahnenpilz, Ergot, Krähenkorn, Hahnensporn, Hungerkorn oder Tollkorn [Guggisberg, 1954].

Die Sklerotien des Mutterkornpilzes enthalten giftige Alkaloide, die zwei verschiedene Krankheiten auslösen können:

- den **Ergotismus gangraenosus** (Brandseuche, Ignis Sacer, St. Antoniusfeuer), begleitet von Durchblutungsstörungen, Nekrosen und Gangränen der Akren und Extremitäten, und
- den **Ergotismus convulsivus** (Krampfseuche), gekennzeichnet durch epileptische Anfälle, unkontrollierte Muskelkontraktionen, Flexion der Extremitäten, Lähmungserscheinungen, Krämpfe, Psychosen und Halluzinationen [Guggisberg, 1954; Lorenz, 1979; Schoch und Schlatter, 1985; Klug, 1986; van Dongen und de Groot, 1995; Aschmann und Maser, 2007].

Die Mädchen aus Salem wiesen deutliche, dem Ergotismus convulsivus ähnliche Symptome auf [Carporeael, 1976].

Die ersten Belege zum Vorkommen von Mutterkorn wurden auf das Jahr 600 v. Chr. datiert; auf assyrischen Tontafeln wurden die Sklerotien als „schädliche Gebilde“ beschrieben, weshalb Mutterkornvergiftungen auch als die älteste bekannte Mykotoxikose bezeichnet werden [Mielke, 2000].

Bereits Hippokrates (460–370 v. Chr.) empfahl eine Zubereitung aus in Wasser gekochter, gemahlener Gerste zur Einleitung der Wehen. Da gemahlene Gerste auf Menschen keinen derartigen Effekt ausübt, ist davon auszugehen, dass das Getreide mit Mutterkorn belastet war [Rensburg und Altenkirk, 1974].

Von der späten Antike bis zum Ende des Mittelalters traten Mutterkornvergiftungen in epidemischen Ausmaßen auf. Kobert schätzte die Zahl an Erkrankten allein in der Zeit von 1000 bis 1500 n. Chr. auf etwa Hunderttausend [Kobert, 1889, zitiert in Mielke, 2000].

Die letzte bekannte lokale Epidemie in Europa trat 1951 in Südfrankreich (Pont St. Esprit) auf. Bäcker hatten aus Profitgier Weizen mit stark Mutterkorn-belastetem Roggen „gestreckt“ und das daraus hergestellte Brot verkauft. Mehrere Menschen starben, zahlreiche litten unter Vergiftungserscheinungen [Gabbai et al., 1951; Mielke, 2000].

Für das Mittelalter waren die Brand- und die Krampfseuche derart prägend, dass Maler wie Matthias Grünewald und Pieter Bruegel der Ältere auf ihren Bildern an Ergotismus leidende Menschen darstellten (s. Bild 4.1 und Bild 4.2).

Bild 4.1 zeigt den Ausschnitt „Versuchung des Antonius“ aus dem Isenheimer Altar von Matthias Grünewald, auf dem ein Mann mit dem Krankheitsbild des „Heiligen Feuers“ (Ergotismus gangraenosus) dargestellt ist.



Bild 4.1: „Endstadium einer vom Ergotismus geplagten Kreatur“, Matthias Grünewald, 1515, Isenheimer Altar, entnommen aus [Wikipedia: Mutterkorn, 2008]

In Bild 4.2, einem Ausschnitt aus Pieter Bruegels „Der Kampf zwischen Karneval und Fasten“, sind zwei an Ergotismus leidende Menschen dargestellt. Der Mann links zeigt deutliche Symptome des Ergotismus convulsivus, mit starker Flexion der Beine. Dem Mann rechts fehlt der rechte Unterschenkel, ausgelöst durch gangränösen Ergotismus.



Bild 4.2: Ergotismus convulsivus (links) und Ergotismus gangraenosus (rechts), Pieter Bruegel der Ältere, 1559, „Der Kampf zwischen Karneval und Fasten“ [Hagen, 2004]

5 Theoretischer Teil

5.1 Toxikologie der Mutterkornalkaloide

5.1.1 Die Geschichte der Mutterkornvergiftungen

Die toxische Wirkung des Mutterkorns war lange unbekannt, weshalb Sklerotien mit dem Getreide zu Mehl verarbeitet wurden und so Auslöser der wichtigsten Mykotoxikose, dem Ergotismus, waren.

Die Krankheit verläuft in zwei Ausprägungen, dem Ergotismus gangraenosus und dem Ergotismus convulsivus.

Die konvulsivische Form trat hauptsächlich östlich des Rheins auf, im Gegensatz zur gangränösen Form, die westlich des Rheins weit verbreitet war [Eadie, 2004].

Die ersten Massenvergiftungen, die heute auf eine Aufnahme von Mutterkornalkaloiden zurückgeführt werden, wurden 437 v. Christus aus Sparta berichtet. Im 20. Jahrhundert traten die letzten Vergiftungen in Manchester und Russland (1926–1927), Südengland und Frankreich (1951–1952) auf.

1985 wurde der letzte bekannte Fall einer alimentären Mutterkornvergiftung aus Deutschland berichtet: Ein 13-jähriges Mädchen klagte über Sehstörungen und Kopfschmerzen, ausgelöst durch den regelmäßigen Verzehr eines Roggen-Müslis, das offensichtlich keiner Schwarzreinigung unterzogen worden war [Mielke, 2000; Schiff, 2006; Aschmann und Maser, 2006].

5.1.2 Pharmakologische Wirkung ausgewählter Mutterkornalkaloide

Das Wirkungsspektrum der Mutterkornalkaloide ist komplex, uneinheitlich und noch nicht vollständig aufgeklärt. Basierend auf ihrer Verwendung als Arzneimittel zur Behandlung von Blutungen, Migräne und zur Einleitung von Wehen, ist die Wirkung von Ergotalkaloiden als Agonisten² und Antagonisten³ adrenerger, dopaminergischer und serotonergischer Rezeptoren teilweise bekannt.

Bild 5.1 zeigt die strukturelle Verwandtschaft des Ergolinsystems mit den Neurotransmittern Noradrenalin, Dopamin und Serotonin.

² Pharmakon imitiert die Wirkung des Mediators und aktiviert Rezeptor [Forth, 2001]

³ Pharmakon blockiert die Bindung des Mediators und damit die Mediator-induzierte Wirkung [Forth, 2001]

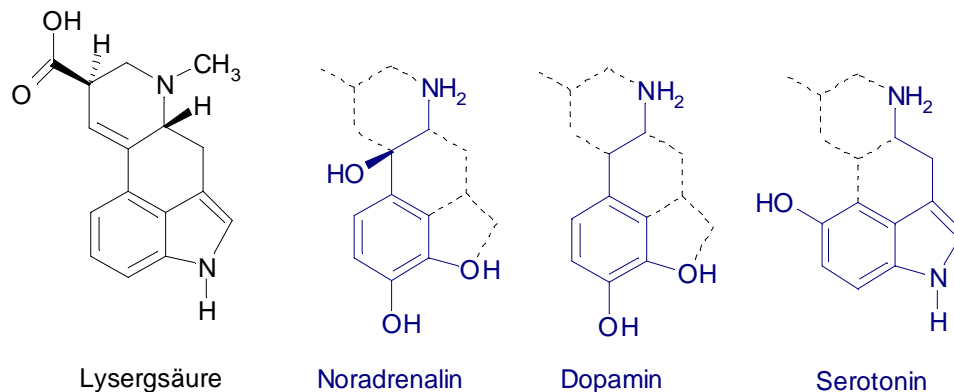


Bild 5.1: Strukturelle Verwandtschaft von Mutterkornalkaloiden und Neurotransmittern [Forth et al., 2001]

Die wichtigsten klinischen Symptome wie Vasokonstriktionen, Muskel- und Uteruskontraktionen, Erbrechen, verminderte Immunantwort und Fortpflanzungsfähigkeit, Störungen des Schlaf-Wach-Zyklus, Veränderung des Blutdrucks, verminderte Prolaktin-Sekretion mit folgender Agalaktie, Halluzinationen und Gangränen beruhen auf der Interaktion mit den drei spezifischen Rezeptoren [Silberstein und McCrory, 2003; EFSA, 2005; Schiff, 2006]. Viele dieser Symptome werden auch bei der Einnahme von Lysergsäurediethylamid (LSD) beobachtet.

Tabelle 5.1 gibt eine allgemeine Übersicht des Wirkungsprofils der verschiedenen Ergotalkaloidderivate wieder.

Tabelle 5.1: Wirkungsprofil verschiedener Mutterkornalkaloidgruppen, nach [de Groot et al., 1998; van Dongen und de Groot, 1993]

Verbindung	Vasokonstriktion	Uterotone Wirkung	Ergotismus gangraenosus
Ergopeptide [Ergotamin]	+++	++	+++
Dihydroergopeptide [Dihydroergotamin]	++	±	±
Lysergsäureamide [Ergometrin, Methylergometrin]	±	+++	±
LSD	±	++	++

+++ : sehr starke Wirkung, ++ : starke Wirkung, ± : keine ausgeprägte Wirkung

Die pharmakologische Verwendung von Mutterkorn zur Weheneinleitung begann im 19. Jahrhundert. Sie wurde nach etwa 15 Jahren aufgrund der toxischen Wirkung für Mutter und Kind auf die Behandlung der Nachgeburtsblutung beschränkt, wobei es auch hierbei häufig zu Fehldosierungen kam, die Gefäßschäden verursachten [Guggisberg, 1954, Römpf online: Ergot, 2007].

Ergometrin und das halbsynthetische Methylergometrin, die noch heute zur Beschleunigung der Plazentaablösung und Stoppung postpartaler Blutungen eingesetzt werden, wirken mäßig als Vasokonstriktoren, führen jedoch zu starken Uteruskontraktionen und unterscheiden sich in seiner Wirkung deutlich von den Ergopeptiden [de Groot et al., 1998, EFSA 2005]. Ergotamin und Dihydroergotamin werden seit 1925 in der Migränetherapie eingesetzt. Ihre Wirkung beruht hauptsächlich auf der agonistischen Interaktion mit Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT)-Rezeptoren.

Tabelle 5.2 gibt eine Übersicht über die für die Wirkung der Mutterkornalkaloiden verantwortlichen Rezeptoren wieder.

Tabelle 5.2: Mutterkornalkaloidbeeinflusste Rezeptoren und deren Wirkung [Jähnichen, 2005; Saunders-Bush und Mayer, 2005, Wikipedia: 5-HT Receptor, 2008]

Rezeptor	Lokalisation	Funktion	Dysfunktion	Einfluss von Mutterkornalkaloiden	Agonist	Antagonist
5-HT _{1A}	Blutgefäße ZNS	Aggression Angst Appetit Atmung Blutdruck Gedächtnis Herzfrequenz Schmerzwahrnehmung Schlaf-Wach-Rhythmus Sexualverhalten Suchtverhalten Thermoregulation Übelkeit, Erbrechen Vasokonstriktion	Angst Depression	- Übelkeit Dysphorie	Dihydroergotamin Ergotamin Methysergid	
5-HT _{1B}	Blutgefäße ZNS	Aggression Angst Bewegung Blutdruck Gedächtnis Herzfrequenz Lernen Sexualverhalten Suchtverhalten Vasokonstriktion	Angst Depression	+ Konstriktion dilatierter Kranialgefäße Inhibierung der Freisetzung entzündlicher Peptide aus der Hirnhaut	Dihydroergotamin Ergotamin Methysergid	Metergolin
5-HT _{1D}	Blutgefäße ZNS	Angst Bewegung Vasokonstriktion	Migräne	+ Inhibierung der Freisetzung entzündlicher Peptide aus der Hirnhaut	Dihydroergotamin Ergotamin Methysergid	Metergolin

Fortsetzung Tabelle 5.2: Mutterkornalkaloidbeeinflusste Rezeptoren und deren Wirkung [Jähnichen, 2005; Saunders-Bush und Mayer, 2005, Wikipedia: 5-HT Receptor, 2008]

Rezeptor	Lokalisation	Funktion	Dysfunktion	Einfluss von Mutterkornalkaloiden	Agonist	Antagonist
5-HT _{2A}	Blutgefäße Glatte Muskulatur PNS Thrombozyten Verdauungstrakt ZNS	Angst Appetit Blutdruck Gedächtnis Herzfrequenz Lernen Schlaf-Wach-Rhythmus Sexualverhalten Suchtverhalten Thermoregulation Thrombozytenaggregation Vasokonstriktion Wahrnehmung	Migräne Depression Schizophrenie	+ Migräneprophylaxe - Halluzinationen Verhaltensstörungen Uterotone Wirkung	Ergometrin LSD Lisurid	Methysergid
5-HT _{2B}	Blutgefäße Glatte Muskulatur PNS Thrombozyten Verdauungstrakt ZNS	Angst Appetit Herz-Kreislauf Verdauung Schlaf-Wach-Rhythmus Vasokonstriktion	Migräne	+ Migräneprophylaxe - Halluzinationen Verhaltensstörungen		Methysergid
D ₂	Blutgefäße Nieren ZNS	Ausscheidung Gedächtnis Suchtverhalten Vasodilatation	Schizophrenie Erbrechen Morbus Parkinson	+ Stimulierung der Dopamin-Ausschüttung (Morbus Parkinson) - Hemmung der Prolaktinsynthese Übelkeit und Erbrechen	Bromocriptin Cabergolin	

+: therapeutische Wirkung von Mutterkornalkaloiden -: schädliche Wirkung von Mutterkornalkaloiden

Die Wirkung von Ergotamin und Dihydroergotamin wurde bisher auf die Konstriktion der Arterien im Kopfbereich durch einen 5-HT_{1B}-Rezeptor-beeinflussten Agonismus zurückgeführt. Da Dihydroergotamin ein schwächerer Vasokonstriktor als Ergotamin ist, jedoch eine vergleichbare Wirkung in der Migränetherapie aufweist, muss ein weiterer Mechanismus involviert sein. Neuere Forschungsergebnisse zeigen, dass die 5-HT_{1B}-, 5-HT_{1D}- und 5-HT_{1F}-Rezeptor-vermittelte Ausschüttung von entzündlichen Peptiden durch Mutterkornalkaloide im Trigemini-Nerv inhibiert wird [Forth et al., 2001; Bigal und Tepper, 2003; Silberstein und McCrory, 2003; Saunders-Bush und Mayer, 2005; Schiff, 2006].

LSD, das wohl bekannteste halbsynthetische Mutterkornderivat, weist eine starke Affinität zu fast allen serotonergen Rezeptoren auf. Die halluzinogene Wirkung beruht im Besonderen auf einer partiell-agonistischen Interaktion mit 5-HT_{2A}-Rezeptoren [Forth et al., 2001].

Methysergid (s. Bild 5.2 a), ein halbsynthetisches, LSD-ähnliches, einfaches Lysergsäureamid, wird aufgrund seiner Wirkung als 5-HT_{2A}- und 5-HT_{2B}-Antagonist zur Migräneprophylaxe eingesetzt. Wie bei LSD kommt es bei der Einnahme von Methysergid zu halluzinogenen und psychedelischen Effekten [Forth et al., 2001; Saunders-Bush und Mayer, 2005, Meyers Lexikon Online: Mutterkornalkaloide, 2008].

Bromocriptin und Cabergolin (Bild 5.2 b und c) sind D₂-Rezeptor-Agonisten. Sie werden in Kombination mit L-3,4-Dihydroxyphenylalanin zur Therapie von Morbus Parkinson eingesetzt. Beide Substanzen hemmen die Sekretion von Prolaktin, das bei Frauen zum Milcheinschuss sowie zum Ausbleiben der Menstruation und des Eisprungs führt. Sie werden daher im Rahmen der Behandlung von Mastitis puerperalis oder Fertilitätsstörungen eingesetzt [Larsen et al., 1999; Forth et al., 2001; Saunders-Bush und Mayer, 2005].

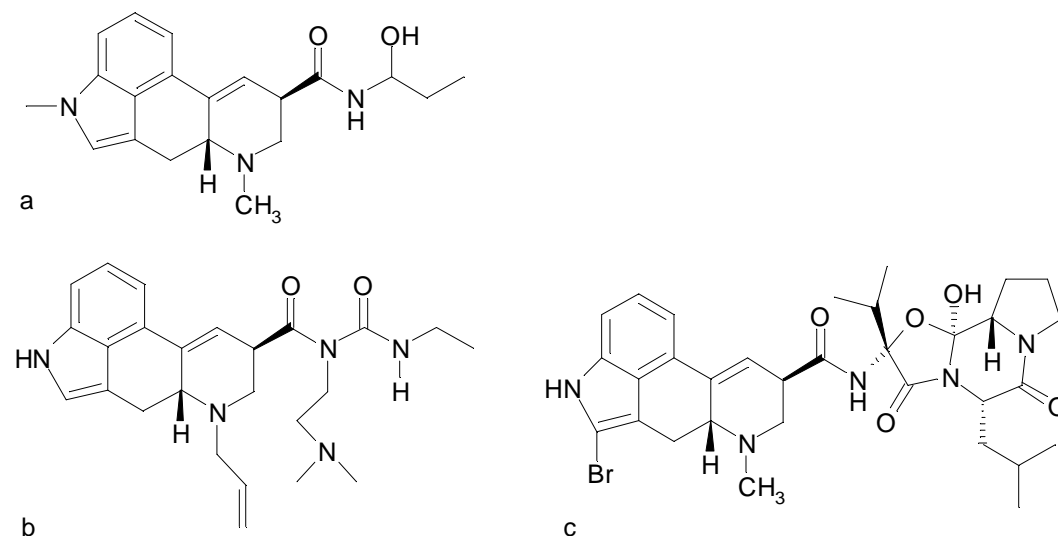


Bild 5.2: Chemische Strukturen von Methysergid (a), Cabergolin (b) und Bromocriptin (c)

5.1.3 Toxische Effekte im Menschen

Obwohl es sich bei Mutterkornvergiftungen um die älteste bekannte Mykotoxikose handelt und Mutterkornalkaloide in der Medizin Anwendung finden, sind die Wirkmechanismen noch nicht vollständig aufgeklärt.

Akute und subakute Toxizität

Die Symptome einer akuten Mutterkornvergiftung sind zunächst wenig spezifisch. Hierzu zählen Herzrasen, Übelkeit mit Erbrechen durch direkte Wirkung auf das emetische Zentrum des zentralen Nervensystems (ZNS), Schwindel, Durchfall, vermehrter Speichelfluss, Blutdrucksteigerung, Kopfschmerzen, Pupillenerweiterung, Wechsel von Kälte- und Hitzegefühl, Kribbeln, Parästhesien und Gefühllosigkeit in den Extremitäten und Krämpfe. Bei letalen Intoxikationen tritt der Tod durch Atemlähmung und Kreislaufversagen ein.

Bei Schwangeren kommt es zudem zu Uteruskontraktionen verbunden mit Blutungen, Tetanus uteri (Dauerkontraktion des Uterus), der Erstickung des Embryos, Aborten und Uterusrupturen [Guggisberg, 1954; Lorenz, 1979; Klug, 1986; Aschmann und Maser, 2007].

Da die Alkaloidzusammensetzung der Mutterkörner starken Schwankungen unterliegt, lässt sich eine toxisch wirksame Mutterkorndosis nur abschätzen.

Nach Lorenz treten erste Krankheitssymptome beim Verzehr von mit 1 % Mutterkorn belastetem Getreide auf. 7 % wirken tödlich [Lorenz, 1979].

Wirth und Gloxhuber berichteten vergleichbare Wirkungen. Demnach gelten für den Menschen 0,1 % frisches Mutterkorn in Mehl als ungefährlich, 1 % als toxisch und 8 bis 10 % als lebensgefährlich. Die für den Menschen tödliche Menge liegt bei 5 bis 10 g [Wirth und Gloxhuber, 1994].

Allgemeinen treten akute Vergiftungen durch Mutterkorn selten auf. Das akute Vorstadium geht meist in ein chronisches Erkrankungsstadium über [Guggisberg, 1954].

Chronische Toxizität

Für die chronische Vergiftung mit Mutterkornalkaloiden sind zwei Krankheitsbilder typisch, abhängig von Art und Dosis der aufgenommenen Alkaloide. Beide beginnen mit Durchfall, Erbrechen, Schwindel, Taubheit und Schmerzen in den Gliedmaßen bzw. an der Körperoberfläche, ähnlich den Symptomen der akut-toxischen Wirkung.

Bei dem Ergotismus gangraenosus dominiert die Wirkung der Alkaloide auf die peripheren Blutgefäße. Die Krankheit ist gekennzeichnet durch Durchblutungsstörungen, so dass der Puls in den betroffenen Gliedmaßen nicht mehr fühlbar ist.

Dieses Stadium kann wochenlang andauern, bis die Extremitäten durch Verengung und Verschluss der Blutgefäße absterben. Im Laufe von zwei bis drei Tagen kommt es zu einer scharfen Abgrenzung des Gangrüns, oft gefolgt von einer spontanen, schmerzlosen Abtrennung der betroffenen Gliedmaßen an der Demarkationslinie ohne Blutverlust [Guggisberg, 1954; Klug, 1986; Wirth und Gloxhuber, 1994; Hofmann, 2000].

Bild 5.3 zeigt die nekrotisch veränderten Füße eines Menschen, ausgelöst durch gangränösen Ergotismus.



Bild 5.3: Ergotismus gangraenosus beim Menschen, entnommen aus [KSU, 2008]

Der Ergotismus convulsivus ist charakterisiert durch die Erkrankung des Nervensystems und äußert sich durch gastrointestinale und vasomotorische Symptome. Zunächst treten Augenflimmern, Ohrensausen, Kopfschmerzen und Schwindelgefühl auf, gefolgt von Kopfschmerzen, Übelkeit, Krampfanfällen, schmerzhaften und teilweise irreversiblen Muskelkontraktionen der Flexoren (Krallenstellung der Hände, Überstreckung der Füße) und Psychosen bis hin zu Demenz. Nach der Genesung können Intelligenzdefekte, Krämpfe, Kontrakturen, Anästhesien und Areflexien bestehen bleiben.

Ein weiteres Symptom der chronischen Mutterkornvergiftung beruht auf der Interaktion der Substanzen mit dem Dopamin-D₂-Rezeptor. Hierdurch wird die Prolaktin-Synthese gehemmt, was zu einer Agalaktie führt. 1977 verhungerten in Äthiopien etwa 50 Kinder aufgrund dieses Wirkungsprofils [Urga et al., 2002].

Bei stillenden Müttern, die nach der Entbindung mit Mutterkornextrakten behandelt wurden, zeigten 90 % der Säuglinge Anzeichen von Ergotismus.

5.1.4 Bewertung des Gefährdungspotentials und Ableitung eines toxikologischen Endpunktes

Die Spanne zwischen unbedenklicher, therapeutischer und toxischer Dosis von Mutterkornalkaloiden ist sehr gering wie folgende Beobachtungen zeigen, die von Schoch und Schlatter zur Abschätzung eines toxikologischen Endpunktes herangezogen wurden [Schoch und Schlatter, 1985]:

1. Bei einer Kuh mit einem Gewicht von 700 kg und einer Futtermittelaufnahme von 20 kg Getreide, belastet mit 0,1 % Mutterkorn (0,5 % Gesamtalkaloidgehalt (GAG)), treten erste unerwünschte Effekte auf. Daraus errechnet sich eine Mutterkornaufnahme von 0,143 mg/kg KG und Tag.
2. Erste Krankheitssymptome sind beim Menschen (mit 60 kg Körpergewicht) zu beobachten, wenn 200 g mit 1 % Mutterkorn (0,5 % Gesamtalkaloidgehalt) belastetes Getreide verzehrt werden. Daraus errechnet sich eine Mutterkornaufnahme von 0,167 mg/kg KG und Tag.
3. Die therapeutische Dosis zur Behandlung von Migräne sollte bei einem Gesamtalkaloidgehalt von 0,15 % max. 5 g pro Tag betragen. Daraus errechnet sich eine Mutterkornaufnahme von 0,125 mg/kg KG und Tag bei einem Körpergewicht von 60 kg.

Hieraus leiteten die Autoren einen „No-toxic-effect-level“ von 0,1 mg/kg KG und Tag ab. Allerdings entspricht dieser Wert einer Schwellendosis, da bereits schädliche Effekte auftreten und ist somit als „Lowest observed adverse effect level“ (LOAEL) zu verstehen. Unter Berücksichtigung des üblichen Sicherheitsfaktors von 100 sollte der TDI für den Menschen bei 0,001 mg/kg KG und Tag (oder 1 µg/kg KG/d) liegen.

Nach einer Stellungnahme des BfR können Mehle mit einem Gesamtalkaloidgehalt von 2000 µg/kg (0,1 % Mutterkorn im Getreide) beim Verzehr unerwünschte Wirkungen haben, Mehle mit einem Alkaloidgehalt von über 7000 µg/kg (0,35 % Mutterkorn im Getreide) sogar die Gesundheit schädigen [BfR, 2004].

5.1.5 Toxische Effekte in Säugetieren

Akute Toxizität

Die akute Toxizität verläuft bei Tieren ähnlich wie bei Menschen. Symptome sind u. a. Erbrechen, Diarrhoe, Kreislaufzusammenbruch, Krämpfe, Agonie, Lethargie, Abgänge der Frucht und Tod durch Lähmung des Atemtraktes.

Die akute Toxizität der Mutterkornalkaloide variiert stark, abhängig von der untersuchten Spezies, wie Griffith et al. (s. Tabelle 5.3) zeigen konnten [Griffith et al., 1978]. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass die orale Bioverfügbarkeit spezies- und substanzabhängig große Unterschiede zeigt. So liegt die LD₅₀ bei Hasen bei 550 mg/kg KG p.o. im Vergleich zu 3,0 mg/kg KG iv. für Ergotamin. Für Ergometrin liegt die LD₅₀ nach oraler Aufnahme nur um den Faktor 2,8 bis 8,7 höher als die entsprechende Dosis nach Injektion.

Tabelle 5.3: LD₅₀ von Ergometrin und Ergotamin für verschiedene Nagetiere

LD ₅₀ iv. [mg/kg KG]	Ergometrin	Ergotamin
Hase	3,2	3,0
Ratte	120	38
Maus	160	265

Chronische Toxizität

Aufgrund des schwankenden Alkaloidgehaltes in Mutterkörnern sind die Ergebnisse der Fütterungsversuche oft widersprüchlich, da häufig nur der Sklerotiengehalt bestimmt wurde.

Eine ausführliche Zusammenstellung der toxischen Effekte gibt das EFSA-Gutachten über Mutterkorn als unerwünschte Substanz in Tierfutter [EFSA, 2005]. Hier wird nur eine kurze Zusammenfassung gegeben.

Adverse Effekte in Schweinen

Die toxischen Effekte von Mutterkornalkaloiden sind für Schweine am besten untersucht. Daten der Tierversuche zeigen teilweise widersprüchliche Ergebnisse, so dass die Ableitung eines toxikologischen Endpunkts schwer möglich ist.

Ferkel zeigten bei 0,4 % Sklerotienanteil im Futter eine signifikant verringerte Futtermittelaufnahme und Gewichtszunahme [Mainka et al., 2005 a und 2005 b]. Darüber hinaus wurden trächtigen Sauen bis zu 0,2 % Mutterkorn in der Ration gefüttert. Es zeigte sich kein signifikanter Einfluss auf Trächtigkeit, Laktation und Ferkelwachstum [Digneau et al., 1986]. Im Gegensatz dazu zeigten Ferkel und Jungschweine bei 0,1 und 0,2 % Sklerotien eine optimale Futtermittelaufnahme und Verwertung, sogar höher als in der Kontrollgruppe, so dass eine Ergolin-induzierte Ausschüttung von Wachstumshormonen angenommen wurde [Digneau et al., 1986]. Zudem fielen die Tiere, denen höhere Mutterkorndosen gefüttert wurden, durch Nervosität und Aggressivität auf.

In der Schweinemast zeigten bereits 0,05 % Sklerotien in der Ration eine leicht reduzierte Gewichtszunahme und Futteraufnahme. Diese Effekte waren bei 0,1 % Sklerotien signifikant. Eine verringerte Stickstoff-Retention trat bei 0,1 % bzw. 5 % Mutterkorn auf [Friend und McIntyre, 1970; Whitemore et al., 1976]. Unterschiede lassen sich durch die variierenden Alkaloidzusammensetzungen erklären.

Aus Australien wurden Fälle berichtet, in denen trächtige Sauen mit mit *Claviceps africana* belastetem Sorghum gefüttert wurden. Der Sklerotienanteil in der Ration betrug 1 bis 31 % und enthielt Dihydroergosin als Hauptalkaloid. Die Sauen zeigten verkleinerte Euter sowie Anzeichen eines Eisprungs und produzierten keine Kolostralmilch. Die Ferkel konnten nicht gesäugt werden und verendeten [Blaney et al., 2000]. In einer anschließend durchgeführten Studie wurde gezeigt, dass erstwerfende Sauen besonders empfindlich auf die Alkaloide reagieren. Es wurde empfohlen, einen Sklerotiengehalt von 0,1 % in der Ration für erstwerfende Sauen und von 0,3 % für mehrwerfende Sauen nicht zu überschreiten [Kopinski et al., 2007].

Adverse Effekte in Rindern

Vorherrschende Ergotismus-Symptome bei Rindern sind Lahmheit und Gangrän an Ohren, Schwänzen und Beinen, verbunden mit dem so genannten „Abschuh“ der Hufe. Bild 5.4 zeigt Symptome des Ergotismus gangraenosus beim Rind [McMullen und Stoltenow, 2002].



Bild 5.4: Ergotismus gangraenosus beim Rind, entnommen aus [McMullen und Stoltenow, 2002]

Vier von sechs Rindern starben innerhalb von zehn Tagen nach oraler Gabe von 10 mg/kg KG Ergotamin Tartrat. Hauptsymptome waren hier Futterverweigerung, Hyperventilation, vermehrte Speichelproduktion, verringerte Körpertemperatur in den Extremitäten, aber auch Zungen-Nekrosen oder Reizungen des Darms [Woods et al., 1966].

Rinder, die mit Ergovalin- und Ergopeptid-haltigem Gras gefüttert wurden, zeigten Sohlengeschwüre, Lahmheit und Schwanzgangrän sowie verminderte Gewichtszunahmen [Botha et al., 2004].

Färsen, denen intravenös Ergotamin (ET) bzw. Ergometrin (EM) verabreicht wurde, zeigten eine verringerte Hauttemperatur (ET und EM), Herzfrequenz (ET) und einen geringeren Prolaktin-Spiegel im Blutserum (ET und EM) sowie eine höhere Atemfrequenz (ET und EM) und einen höheren Blutdruck (ET) [Browning und Leite-Browning, 1997].

Stiere, denen mit Mutterkorn belastetes Rohr-Schwingel-Gras (*Festuca arundinacea* infiziert mit *Neotyphodium spp.*) gefüttert wurde, zeigten deutliche Anzeichen von Hyperthermie in Verbindung mit erhöhter Herzfrequenz, was für die verringerte Wachstumszunahme verantwortlich gemacht wurde [Browning, 2004].

Laktierende Fleischkühe wurden zur Überprüfung des Einflusses auf den Ovarialzyklus mit mutterkornalkaloidhaltigem Rohr-Schwingel-Gras gefüttert. Prolaktin-Konzentrationen im Serum sowie Gewicht der Kühe und Kälber waren verringert. Obwohl der Follikeldurchmes-

ser teilweise geringer war, konnte kein Einfluss auf die Follikelfunktion festgestellt werden [Burke und Rorie, 2002].

Adverse Effekte in Geflügel

Da Geflügel als sehr empfindlich gegenüber Mutterkornalkaloiden gilt, wurde der Kamm-Test häufig als „Bio-Assay“ eingesetzt. Hierfür wurde der Probenextrakt parenteral in den Kamm von Hähnen injiziert. Waren Mutterkornalkaloide in der Probe enthalten, so entfärbte sich der Kamm aufgrund einer mutterkorninduzierten Vasokonstriktion [EFSA, 2005].

Legehennen, denen 1, 2 und 3 % mutterkornhaltiges Krafffutter gefüttert wurde, zeigten einen deutlichen Rückgang der Futterraufnahme. Die Legeleistung der zwei letzten Gruppen war um 25 % reduziert im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zudem wiesen sie nekrotisch veränderte, dunkelverfärbte Kämmen auf. Die Morphologie der Eier zeigte ebenfalls deutliche Veränderungen. Es wurden vermehrt Knickeier und Eier mit deformierter Schale gelegt, was auf eine verzögerte Eiablage aufgrund von Uteruskontraktionen zurückgeführt wurde. Des Weiteren zeigten die Tiere Verhaltensauffälligkeiten [Klein und Steinrück, 1987].

Jungmasthühner zeigten bei der Aufnahme von mit 0,25 bzw. 0,1 % Sklerotien belastetem Futter eine Verringerung der Futterraufnahme von 150 g/Woche auf 100 g/Woche im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dadurch sank die durchschnittliche tägliche Gewichtszunahme von über 16 g auf 10 g [Klein und Steinrück, 1987].

Gegenläufige Ergebnisse ergaben die Versuche von Mainka et al. Hühnern, denen bis zu 0,4 % mutterkornhaltiges Futter gefüttert wurde, zeigten keinerlei adverse Effekte [Mainka et al., 2005 a].

Adverse Effekte in Nagetieren

In mehreren Versuchen wurde die subakute bzw. subchronische Toxizität einzelner Mutterkornalkaloide an Ratten untersucht.

In Studien zur Bestimmung der subakuten Toxizität (4–500 mg Ergotamin/kg Futter über vier Wochen) verursachte Ergotamin eine verringerte Futterraufnahme und Gewichtszunahme bei Dosen von über 100 mg/kg Futter. Zudem konnten leichte Veränderungen des „roten Blutbildes“ verzeichnet werden [Speijers et al., 1992].

Abhängig von den Ergotamin-Konzentrationen im Futter wurden verringerte Thyroxin- und Thyroid-stimulierendes-Hormon-Konzentrationen festgestellt. Teilweise waren die Gewichte von Herz, Gehirn, Leber und Eierstöcken signifikant erhöht [Speijers et al., 1992].

In analogen Studien zur Bestimmung der subakuten Toxizität von Ergometrin und α -Ergokryptin wurde bei ähnlichen Symptomen ein „No Observed Effect Level“ (NOEL) von 10 mg Ergometrin-Maleat/kg Futter entsprechend 0,74 mg Ergometrin/kg KG bzw. 4 mg α -Ergokryptin/kg Futter und ein LOAEL von 20 mg α -Ergokryptin/kg Futter ermittelt [Peters-Volleberg et al., 1996; Janssen et al., 2000 a und 2000 b].

In Studien zur Bestimmung der subchronischen Toxizität von Ergotamin (5–80 mg Ergotamin/kg Futter über 13 Wochen) konnten in der letzten Gruppe erhöhte LDL-Cholesterin-Gehalte und alkalische Phosphatase-Aktivitäten sowie verringerte Glukosespiegel im Blutserum nachgewiesen werden. Das Gewicht von Milz und Hirn war im Vergleich zur Kontrollgruppe im Gegensatz zum Gewicht der Hypophyse erhöht. Futterraufnahme und Gewichtszunahme waren für die weiblichen Versuchstiere in der Gruppe mit dem höchsten Ergotamingehalt verringert. Insgesamt wurde ein „No Observed Adverse Effect Level“ (NOAEL) von 20 mg Ergotamin Tartrat/kg Futter entsprechend 0,9 mg Ergotamin/kg KG abgeleitet [Speijers et al., 1993].

5.2 Die Pilzgattung *Claviceps*

5.2.1 Vorkommen und Aussehen

Als Mutterkörner werden die von dem parasitären Schlauchpilz *Claviceps spp.* gebildeten Sklerotien (*Secale cornutum* – Überwinterungsform des Pilzes) bezeichnet, die in feuchten Jahren auf den Ähren verschiedener Süßgräser wie Roggen, Triticale, Weizen, Gerste, Weidelgras und Hirse vorkommen.

Die meisten Vertreter der Gattung *Claviceps* findet man in tropischen und subtropischen Klimazonen, wo eine Art jeweils nur einige wenige Wirte befällt. Hauptvertreter in den klimatisch gemäßigten Zonen ist *Claviceps purpurea*, der ein breites Spektrum an Wirtspflanzen (ca. 400 verschiedene Gräser) befällt [Mühle und Breuel, 2003].

Die Sklerotien der verschiedenen *Claviceps*-Arten und Wirtspflanzen unterscheiden sich in Aussehen, Form und Gewicht beträchtlich. In Tabelle 5.4 sind die von den verschiedenen *Claviceps*-Arten befallenen Wirtspflanzen und gebildeten Alkaloide zusammengefasst [Römpp online: Ergot, 2007].

Tabelle 5.4: Sklerotien-bildende *Claviceps*-Arten und ihre Alkaloide, nach [Römpp online: Ergot, 2007]

Art	Wirtspflanzen	Sklerotien	Alkaloidgehalt [%]
<i>C. purpurea</i>	Roggen, Gerste, Weizen, Dinkel, Weidegräser	5–50 mm lang 2–6 mm breit	~1 Peptidalkaloide, Ergometrin
<i>C. paspali</i>	<i>Paspalum dilatatum</i>	2–4 mm, rundlich	0,3 Lysergsäureamide, Paspalin, Elymoclavin
<i>C. fusiformis</i>	Hirse	2–4 mm, rundlich	0,3 Agroclavine, Chanoclavin, Elymoclavin
<i>C. gigantea</i>	Mais	30–35 mm 5–8 mm	0,03 Festuclavin, Pyroclavin, Chanoclavin
<i>C. africana</i> , <i>Sphacelia</i> <i>sorgi</i>	Sorghum	2 mm 2–4 mm	0,5 Pyroclavin, Festuclavin, Dihydroergosin

Die violett-braun gefärbten auf Roggen gebildeten Sklerotien von *Claviceps purpurea* können bis zu 5 cm lang werden. Sie sind meist gebogen, wiegen 4 bis 200 mg, laufen an den Enden spitz zu und zeigen häufig eine grau-weiße Kappe [Mühle, 1953; Hofmann, 2000; EFSA, 2005]. In Bild 5.5 ist eine mit Mutterkorn belastete Roggenähre dargestellt.



Bild 5.5: Roggenähre mit zwei Sklerotien

Weizen-Sklerotien sind im Gegensatz dazu kleiner, dünner und weniger stark gebogen.

Neben *Claviceps* sind auch Schimmelpilze der Gattungen *Balansia*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Neotyphodium* und *Acremonium* in der Lage, Mutterkornalkaloide zu produzieren, sie spielen jedoch als Nahrungsmittelschädlinge nur eine untergeordnete Rolle [EFSA, 2005].

5.2.2 Inhaltsstoffe

Die Zusammensetzung der Sklerotien unterscheidet sich insbesondere durch den Fettgehalt, die Fettsäurezusammensetzung und die Gehalte an Alkaloiden, Chitin, Farbstoffen und Ergosterin deutlich von der gesunder Getreidekörner [Wolff, 1992; Wolff und Richter, 1989; Wolff, 1992 Mühle und Breuel, 2003].

Roggen enthält ca. 2 % Fett. Im Gegensatz dazu liegt der Fettgehalt im Mutterkorn bei etwa 30 bis 35 % [Wolff und Richter, 1989; Mühle und Breuel, 2003] und dient zum Schutz des Sklerotiums im Winter [LORENZ, 1979].

Wichtigste Fettsäure mit einem Anteil von 30 % in der Fettphase ist die Ricinolsäure (12-Hydroxy-octadec-9-ensäure), die natürlicher Weise sonst nur in den Samen des Wunderbaums (*Ricinus*) und in der Stockrose vorkommt.

Mutterkornsklerotien enthalten 0,05 bis 1 % Alkaloide (Mittelwert etwa 0,2 %), wobei sowohl der Gesamtalkaloidgehalt als auch die Anteile der einzelnen Alkaloide starken Schwankungen unterliegen, abhängig vom produzierenden Pilzstamm, den klimatischen Bedingungen und der Wirtspflanze.

Publikationen widersprechen sich bezüglich der Alkaloidlokalisation im Sklerotium. Young fand einen vierfach höheren Gesamtalkaloidgehalt im Inneren [Young, 1981 a], während nach Silber und Bischoff der Alkaloidgehalt in den Randschichten am höchsten ist und nach innen abnimmt [Silber und Bischoff, 1954].

Young zeigte darüber hinaus, dass das Alkaloidmuster von Sklerotien einer Ähre annähernd gleich war, der Gesamtalkaloidgehalt allerdings um den Faktor zehn schwankte [Young, 1981 a und b]. Innerhalb eines Feldes schwankte neben dem Gesamtalkaloidgehalt auch das Alkaloidmuster. Überregional wurde ein mittlerer Gesamtalkaloidgehalt von 0,249 % bestimmt [Young, 1981 a und b; Young und Chen 1982].

Neben den Alkaloiden werden auch die Ergochrome, Anthrachionon-Farbstoffe, für die toxische Wirkung der Mutterkornalkaloide verantwortlich gemacht. Der Gehalt an Farbstoffen liegt bei 1 bis 2 % [Lorenz, 1979; Schoch und Schlatter, 1985]

Tabelle 5.5 vergleicht die Alkaloidzusammensetzung von kanadischem und europäischem Mutterkorn [Young, 1981a und b, Young und Chen, 1982: EFSA, 2005].

Tabelle 5.5: Vergleich der Alkaloidzusammensetzung von kanadischem und europäischem Mutterkorn [Young, 1981a und b, Young und Chen, 1982, EFSA 2005]

Verbindung	Kanada [%]	Europa [%]
Ergocristin	31,1	30,7
Ergotamin	17,3	35,8
α -Ergokryptin	5,3	-
Ergometrin	5,0	-
Ergosin	4,2	27,0
Ergocornin	4,0	2,2

5.2.3 Infektionszyklus

Die Sporen des Mutterkorns infizieren ausschließlich die weiblichen Geschlechtsorgane der Wirtgräser, da die Narbe durch ihre Sekrete und die besondere Struktur ein ideales Substrat darstellt.

Bei feucht-kühler Witterung keimen zur Zeit der Getreideblüte die im Boden überwinterten Mutterkörner und setzen Ascosporen frei, die durch Wind und Tiere verbreitet werden. Während dieser so genannten Primärinfektion gelangen die Sporen in den Fruchtknoten der Wirtspflanzen und durchwachsen diesen.

Die Nebenfruchtform bewirkt in der Pflanze die Sekretion des klebrigen, stark Zucker- und Sporen-haltigen „Honigtaus“, der durch Insekten, Regen und Wind auf andere Pflanzen übertragen wird. Dieser Vorgang wird als Sekundärinfektion bezeichnet.

Im Verlauf der vegetativen Phase entwickelt sich innerhalb einiger Wochen aus diesen Konidiosporen das lila-braun gefärbte Dauermycel, das Mutterkorn.

Während der Ernte oder durch andere mechanische Einwirkungen fallen die Sklerotien zu Boden und überwintern dort [Guggisberg, 1954; Lorenz, 1979; Schlegel und Zaborosch, 1992; Hofmann, 2000; Mühle und Breuel, 2003]. Eine zusammenfassende Darstellung des Infektionszyklus gibt Bild 5.6, entnommen aus [Taschan et al., 2005].

Da Roggen und Triticale im Gegensatz zu anderen Getreiden Fremdbefruchter sind, bleiben die Blütenstände wesentlich länger geöffnet. Die Infektionswahrscheinlichkeit ist für Roggen und Triticale daher deutlich erhöht.

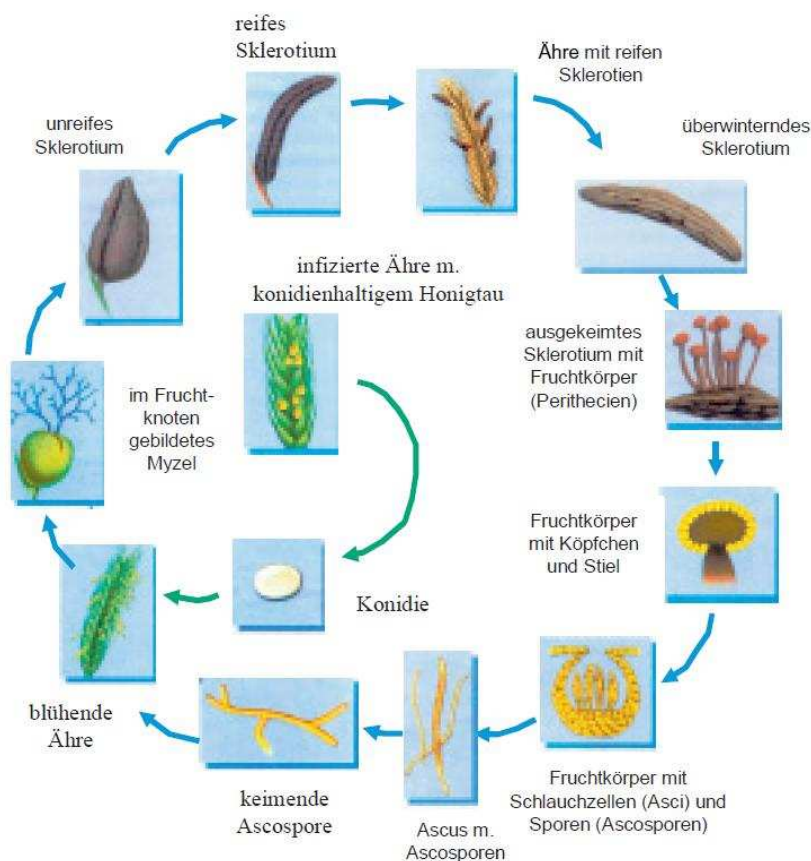


Bild 5.6: Infektionszyklus von *Claviceps purpurea*, entnommen aus [Taschan et al., 2005]

5.2.4 Einflussfaktoren und Bekämpfung

Die Bildung von Mutterkorn auf Getreide wird durch mehrere Einflussfaktoren begünstigt. Zur Vernalisation benötigt das Mutterkorn im Winter über zwei Monate eine Temperatur von 2 bis 4 °C. Wesentlich für eine Infektion ist jedoch eine feucht-kühle Witterung im Vorsommer, da diese zu einer verlängerten Öffnung der Roggenblütenstände führt und der Zutritt der Sporen erleichtert wird [Mothes und Silber, 1952; Mielke, 2000].

Mutterkorn wird auf allen Böden, auf denen Getreide angebaut wird, gefunden. Moor- und Sandböden sind jedoch besonders betroffen.

Ein großen Einfluss hat auch die Fruchtfolge. Ein jährlicher Wechsel von Roggen und Kartoffeln führt zu sehr stark belasteten Schlägen, ebenso wie getreidereiche und enge Fruchtfolgen [Mothes und Silber, 1952; Kamphues und Drochner, 1991].

Besonders gefördert wird die Infektion mit Mutterkorn durch die Anwesenheit von Wildgräsern wie *Poa* oder *Festuca* in angrenzenden Grünstreifen. Sie werden besonders häufig von *Claviceps purpurea* befallen und infizieren dann die angrenzenden Nutzpflanzen. Zudem stehen Nutzpflanzen an Randstreifen weniger Pollen zur Verfügung. Man beobachtet daher häufig eine Infektion an den Feldrändern, die zum Inneren kontinuierlich abnimmt [Mothes und Silber, 1952; Lochow-Petkus, 2008]. Verstärkt wurde das Problem durch das Verbot von Herbizideinsätzen an Wegrändern [Kamphues und Drochner, 1991]. Dies kann durch das Unterpflügen der Feldraine jedoch gut unterbunden werden.

Der Einsatz von halmkurzen Getreidesorten kann ebenfalls zur Förderung des Mutterkornbefalls führen, da die Blütenstände aufgrund der Bodennähe vermehrt Sporen ausgesetzt sind. Als Gegenmaßnahme werden halmstarke Getreidesorten eingesetzt.

Generell erweisen sich alle ackerbaulichen Maßnahmen, die zu einer verzögerten, verlängerten oder ungleichmäßigen Blüte führen, wie nicht bedarfsgerechte Stickstoffdüngung, zu geringe Bestandsdichten, keine oder zu enge Anlage von Fahrgassen, als förderlich für die vermehrte Bildung von Mutterkorn [Lochow-Petkus, 2008].

Weitere Reduktionsmaßnahmen sind die Schwarzreinigung des Saatgutes, die Verwendung von pollenstarkem Saatgut und das Tiefpflügen (ca. 25 cm) der Agrarfläche. Zu vermeiden sind Dünn- und Tiefsaat, starke Bestockung und übermäßiger Einsatz von Wachstumsreglern und Stickstoffdüngern [Lühe et al., 1999; Mielke, 2000; Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft, 2000].

5.2.5 Biosynthese

Die Biosynthese des Ergolingerüstes erfolgt, wie bei allen Indolalkaloiden, ausgehend vom L-Tryptophan.

Im ersten Schritt wird aus Mevalonsäure, ein isoprenoider Grundkörper, nach Decarboxylierung und Pyrophosphatübertragung das Dimethylallylpyrophosphat (DMAP) gebildet, das elektrophil an das C4-Atom des L-Tryptophans angreift und zum Dimethylallyltryptophan (DMAT) reagiert. Es erfolgt die Hydroxylierung der Methylgruppe (C5-Atom) der Isoprengruppe, die Decarboxylierung der Carboxylgruppe des Tryptophans und die N-Methylierung der Aminogruppe. Das Chanoclavin wird anschließend zum Chanoclavinaldehyd oxidiert, das, katalysiert durch die Chanoclavincyclase, unter Wasserabspaltung zum Agroclavin, einem Tetrazyklus reagiert. In zwei aufeinander folgenden Oxidationsschritten wird die am C8-Atom gebundene Methylgruppe zur Carboxylgruppe oxidiert. Über ein komplexes Enzymsystem, die Lysergylpeptidsynthetase, werden die Alkanolamine und Ergopeptide gebildet; der

genaue Mechanismus ist jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt. Vermutlich beginnt die Synthese des Tripeptidrestes mit der Bindung des L-Prolins am Enzymkomplex. Nach Addition zweier weiterer Aminosäuren wird das lineare Tripeptid an die Lysergsäure gebunden und vom Enzymkomplex gespalten. Nach enzymatischer Hydroxylierung erfolgt dann die Zyklisierung des Tripeptids.

Detailliertere Darstellungen der Biosynthesewege sind in [Plieninger et al., 1960; 1964; 1967; 1976 und 1978; Weygand et al., 1962 und 1964; Weygand und Floss, 1963; Ramstad, 1968; Gröger und Erge, 1970; Floss, 1976; Walzel et al., 1997; Panaccione, 2005] publiziert.

Die schematische Zusammenfassung des Biosynthesewegs von Mutterkornalkaloiden ist in Bild 5.7 dargestellt.

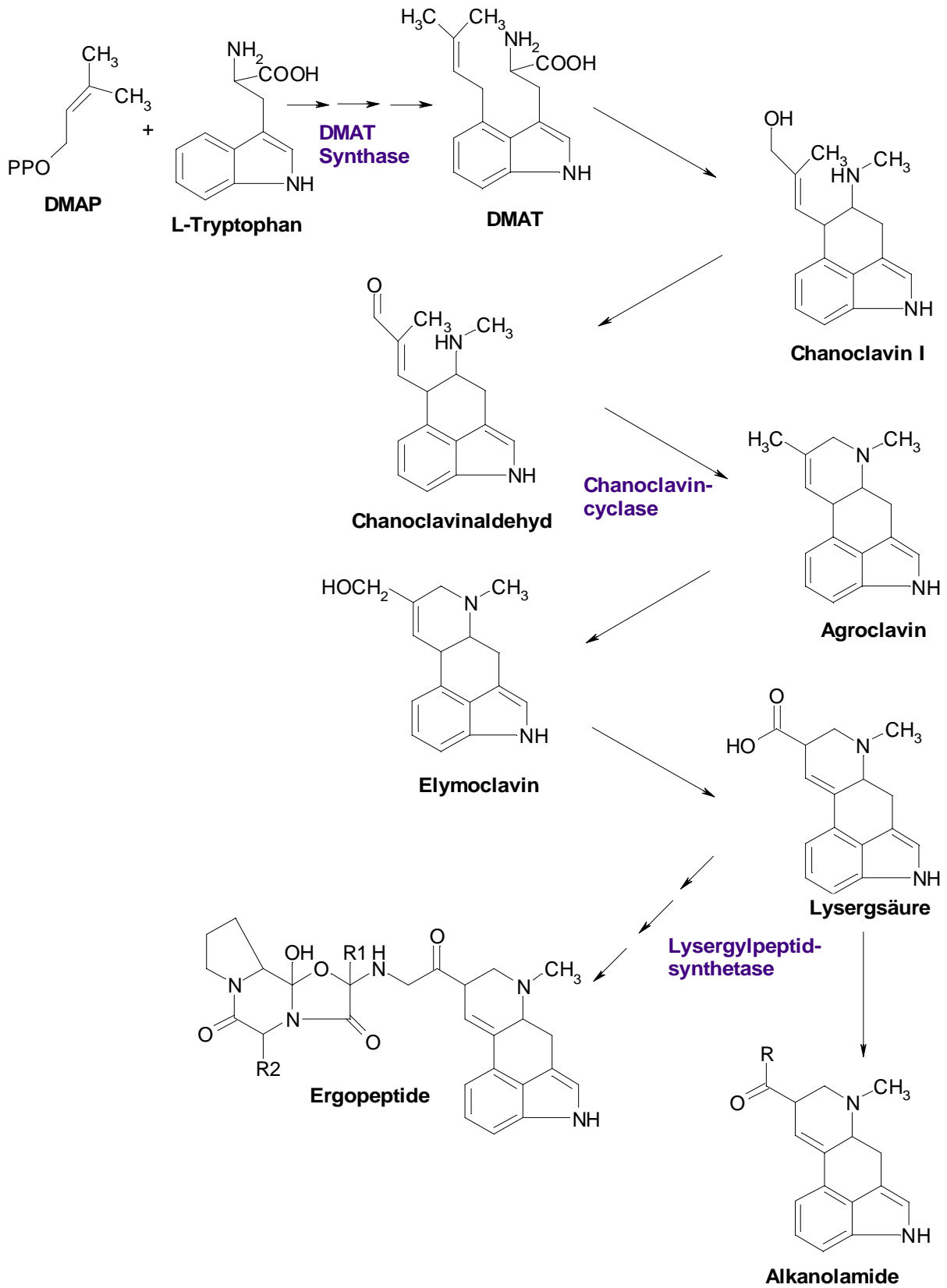


Bild 5.7: Schematische Darstellung des Biosyntheseweges der Mutterkornalkaloide, nach [Panaccione, 2005]

5.3 Physikalisch-chemische Eigenschaften der Mutterkornalkaloide

5.3.1 Chemische Struktur

Gemeinsames Grundgerüst der Mutterkornalkaloide ist das indolhaltige Ergolin (Bild 5.8).

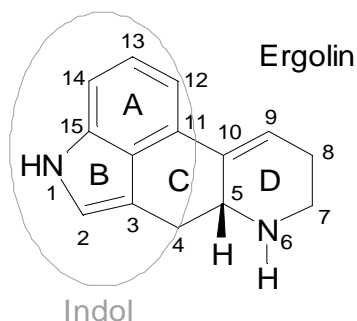


Bild 5.8: Chemische Grundstruktur des Mutterkornalkaloid-Grundgerüsts [Guggisberg, 1954; Hofmann, 2000]

Es werden zwei Gruppen von Mutterkornalkaloiden unterschieden:

Clavin-Alkaloide sind Hydroxy- und Dehydro-Derivate des 6,8-Dimethylergolins [Hofmann, 2000]. Sie kommen im Mutterkorn nur in geringen Mengen vor und werden im Weiteren nicht betrachtet.

Mutterkorn- oder Ergotalkaloide sind Derivate der D-Lysergsäure und der D-Isolysergsäure (Bild 5.9), wobei sich Letztere durch eine geringere pharmakologische Wirksamkeit auszeichnen. Zur Unterscheidung tragen Alkaloide der Lysergsäure das Suffix „-in“ (z. B. Ergometrin) und die der Isolysergsäure das Suffix „-inin“ (z. B. Ergometrinin).

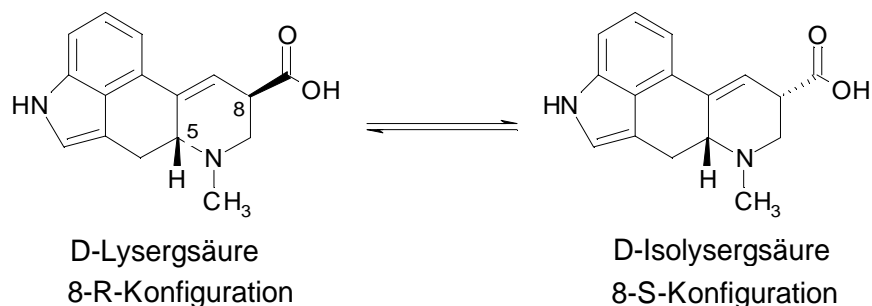


Bild 5.9: Chemische Struktur von D-Lyserg- und D-Isolysergsäure [Guggisberg, 1954; Stoll et al., 1954]

Die D-Lyserg- und die D-Isolysergsäure und deren Derivate können an der C8-Carbonylgruppe über einer säure- oder basenkatalysierte Keto-Enol-Tautomerie, wie in Bild 5.10 dargestellt, in das jeweils andere Diastereomer epimerisieren [Guggisberg, 1954].

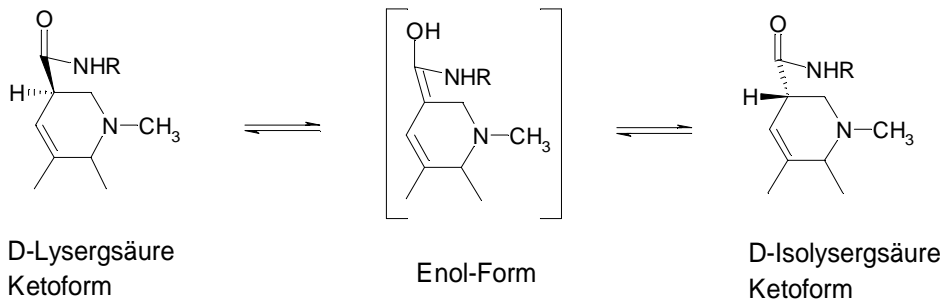


Bild 5.10: Keto-Enol-Tautomerie der "Ine" in die "Inine" [Stoll et al., 1949; Guggisberg, 1954]

Alkaloide der Lysergsäure- und Isolysergsäuregruppe können in drei Untergruppen eingeteilt werden [Guggisberg, 1954, Klug, 1986, Flieger et al., 1997, Hofmann, 2000].

Zu den einfachen Lysergsäureamiden gehören das halbsynthetische Lysergsäurediethylamid (LSD) und das Ergometrin bzw. das Ergometrinin (Bild 5.11).

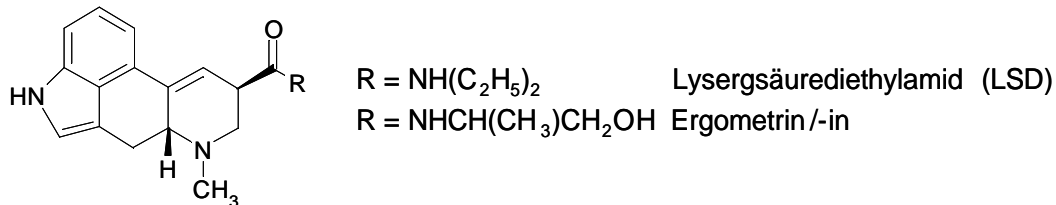


Bild 5.11: Chemische Struktur der einfachen Lysergsäureamide [Stoll et al., 1955]

Ergopeptidalkaloide sind an der C8-Carbonylgruppe amidartig mit einem zyklischen Tripeptid, bestehend aus L-Prolin, einer Aminosäure und einer α -Aminosäure, verknüpft (Bild 5.12, Tabelle 5.6).

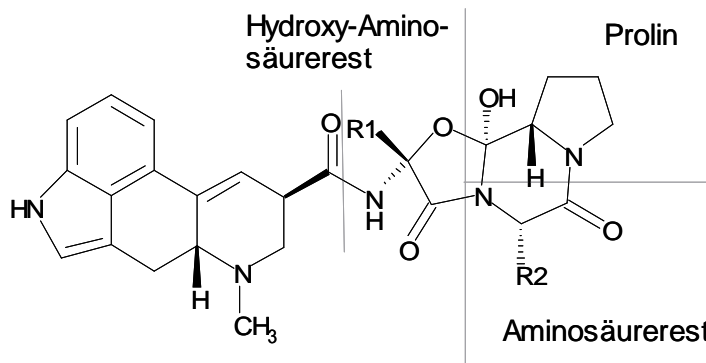
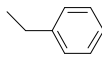



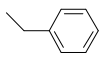



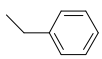




Bild 5.12: Chemische Struktur der Ergopeptide [Stoll et al., 1951; Krěn und Cvak, 1999]

Ergometrin, Ergotamin, Ergosin, Ergocristin, Ergokryptin und Ergocornin sind die prominentesten Vertreter der Ergotalkaloide.

Neben den Ergopeptiden bildet *Claviceps* in geringen Mengen Ergopeptame, die sich von den Ergopeptiden durch den Einbau von D- statt L-Prolin unterscheiden. Sie weisen aufgrund dieser Konfiguration keine Cyclostruktur auf [Flieger et al., 1997]. Da sie in Sklerotien nur in geringen Mengen vorkommen, werden Ergopeptame nicht eingehender betrachtet.

Tabelle 5.6: „Periodisches System“ der Ergopeptide [modifiziert nach Hofmann, 2000; Mühle und Breuel, 2003]

Komponenten des Peptidteils				Summenformel	Einzelalkaloid	Alkaloidgruppe	
Hydroxyaminosäure	R1	Aminosäure	R2				
Prolin	α-Hydroxyalanin	—	Phenylalanin		C ₃₃ H ₃₅ N ₅ O ₅	Ergotamin	Ergotamingruppe
			Leucin		C ₃₀ H ₃₇ N ₅ O ₅	Ergosin	
			Valin		C ₂₉ H ₃₅ N ₅ O ₅	Ergovalin	
	α-Hydroxyvalin		Phenylalanin		C ₃₅ H ₃₉ N ₅ O ₅	Ergocristin	Ergotoxingruppe
			Leucin		C ₃₂ H ₄₁ N ₅ O ₅	Ergokryptin	
			Valin		C ₃₁ H ₃₉ N ₅ O ₅	Ergocornin	
	α-Hydroxy-α-aminobuttersäure		Phenylalanin		C ₃₄ H ₃₇ N ₅ O ₅	Ergostin	Ergoxingruppe
			Leucin		C ₃₁ H ₃₉ N ₅ O ₅	Ergoptin ⁴	
			Valin		C ₃₀ H ₃₇ N ₅ O ₅	Ergonin ⁴	

5.3.2 Physikalisch-chemische Eigenschaften

Mutterkornalkaloide liegen in reiner Form als farblose bis weiße Kristalle vor.

Aufgrund der Heterogenität der am Amid-Stickstoff gebundenen Reste weisen Mutterkornalkaloide unterschiedliche chemische und physikalische Eigenschaften auf. Tabelle 5.7 und Tabelle 5.8 geben u. a. molare Massen, Schmelzpunkte und Löslichkeitsverhalten ausgewählter Verbindungen wieder.

⁴ synthetisch

Tabelle 5.7: Molmassen und Schmelzpunkte ausgewählter Mutterkornalkaloide, entnommen aus [Merck Index, 2001; Römp Online: Ergot-Alkaloide, 2007]

Verbindung	Summenformel	Molmasse [g/mol]	Schmelzpunkt [°C]
Ergometrin	C ₁₉ H ₂₃ N ₃ O ₂	325,4	162
Ergometrinin			196 (Zers.)
Ergosin	C ₃₀ H ₃₇ N ₅ O ₅	547,7	228 (Zers.)
Ergosinin			190-191 (Zers.)
Ergotamin	C ₃₃ H ₃₅ N ₅ O ₅	581,7	213-214 (Zers.)
Ergotaminin			241-243 (Zers.)
Ergocornin	C ₃₁ H ₃₉ N ₅ O ₅	561,7	182-184 (Zers.)
Ergocorninin			228 (Zers.)
α-Ergokryptin	C ₃₂ H ₄₁ N ₅ O ₅	575,7	214 (Zers.)
α-Ergokryptinin			240-242 (Zers.)
Ergocristin	C ₃₅ H ₃₉ N ₅ O ₅	609,7	175 (Zers.)
Ergocristinin			226 (Zers.)

Tabelle 5.8: Löslichkeitsverhalten ausgewählter Mutterkornalkaloide, entnommen aus [Klug, 1986; Merck Index, 2001]

Verbindung	H ₂ O	MeOH	EtOH	EtOAc	Aceton	EtOEt
Ergometrin	+	+	+	+	+	
Ergometrinin	-		o	o	o	
Ergosin	-	o	+	o	+	+
Ergosinin	-	o	o	o	+	
Ergotamin	-	o	o	+	o	+
Ergotaminin	-	o	o	o	o	
Ergocornin	-	o	o	+	+	+
Ergocorninin	-	+ ^Δ	+ ^Δ	+ ^Δ	++	
α-Ergokryptin	-	+	+	+	+	
α-Ergokryptinin	-	+ ^Δ	+ ^Δ		++	
Ergocristin	-	+	+	+	+	o
Ergocristinin	-		+ ^Δ		o	

++: sehr gut +: gut o: mäßig -: unlöslich ^Δ: in der Wärme

Mutterkornalkaloide sind aufgrund ihrer chemischen Struktur empfindlich gegenüber höheren Temperaturen, Lichteinwirkung, Gegenwart von Sauerstoff und chemischen Agenzien sowie extremen pH-Werten. In acetonitrilischer Lösung zersetzen sich die Alkaloide bei direkter Sonneneinwirkung unter Bildung eines tannengrünen Farbstoffs.

5.4 Vorkommen von Mutterkornalkaloiden

Obwohl es sich beim Ergotismus um die älteste bekannte Mykotoxikose handelt und in der Vergangenheit sehr viele Analysemethoden zur Bestimmung von Mutterkornalkaloiden (s. Kap. 5.6) entwickelt wurden, sind nur wenige verlässliche Daten zur Belastungssituation von Lebensmitteln vorhanden. Die in Tabelle 5.9 dargestellten Werte zur Belastungssituation bedürfen aufgrund des Fehlens von Höchstmengen, Analysenstandards und einer vereinheitlichten Berechnungsgrundlage einer kritischen Interpretation. Ein Mittelwert über alle Daten lässt sich nicht ableiten, da der Mutterkorngehalt abhängig von den klimatischen Bedingungen zwischen den Ernten deutlich schwankt und auf verschiedenen Wegen berechnet wurde.

Der bisher höchste Mutterkorngehalt wurde 1987 in Getreide mit 10 % Mutterkorn, entsprechend einem Gesamtalkaloidgehalt von 200 mg/kg gefunden [Wolff, 1992].

Tabelle 5.9 zeigt, dass Roggen höher belastet ist als Triticale. Weizen als selbstbestäubendes Getreide im Gegensatz zu den vorher genannten Fremdbestäubern zeigt die geringsten Mutterkorngehalte.

Der Mutterkornalkaloidgehalt nimmt mit zunehmendem Verarbeitungsgrad in den Produkten im Vergleich zu dem entsprechenden Getreide ab. So lag der mittlere Gesamtalkaloidgehalt in Roggenbackwaren (Brot, Knäckebrötchen, Kräcker) bei 7,8 µg/kg und in Roggenmehl bei 216 µg/kg [Scott et al., 1992].

Baumann et al. ermittelten einen mittleren Gesamtalkaloidgehalt von 21,3 µg/kg in Roggenbrot-Krume und 139,7 µg/kg in Roggenmehl. Zudem konnten sie zeigen, dass der Mutterkorngehalt mit steigender Mehltypen zunimmt [Baumann et al., 1985].

In Weizen-Weißmehl (entspricht ungefähr der deutschen Mehltypen 405–550) lag der mittlere Gesamtalkaloidgehalt bei 4,2 µg/kg, in Halbweißmehl (deutsche Mehltypen 812) bei 30,7 µg/kg und in Ruchmehl (deutsche Mehltypen 1050) bei 103,4 µg/kg.

Scott und Lawrence wiesen eine Reduktion des Gesamtalkaloidgehaltes beim Backen von Weizenvollkornbrot um 100 %, von Roggenbrot um 85 % und von Triticale-Pfannkuchen um 74 % nach [Scott und Lawrence, 1982].

Tabelle 5.9: Belastungssituation von Lebensmitteln mit Mutterkorn (-alkaloiden)

Herkunft	Proben	Zeitraum	Belastete Proben/ Gesamtprobenzahl	Kontamina- tionsgrad [%]	Mittlerer Gesamt- alkaloidgehalt [µg/kg]	Max. Gesamt- alkaloidgehalt [µg/kg]	Literatur			
Deutschland	Getreideprodukte	1986	29/118	25	17,2	199	Klug, 1986			
	Futtergetreide:	1987					Richter et al., 1988			
	Weizen							78/141	55	7340
	Roggen							47/64	73	4240
	Gerste							37/157	24	8980
	Triticale							18/24	75	3320
	Hafer							11/38	29	80
	Getreide	1987	196/426	45	k. A.	≈ 200000 ⁵	Wolff, 1992			
	Roggen, Roggenmehle	2003	30/30	100	818 ⁶	3280 ⁶	Lauber et al., 2005			
	Roggen, Roggenmehle	2004	21/21	100	260 ⁶	974 ⁶				
	Roggenmehl	k. A.	k. A./131	k. A.	674 ⁷	6115 ⁷	Taschan et al., 2005			
	Roggen, Triticale (Mähruschgetreide)	2001	k. A./378 ⁸ k. A./257 ⁸	k. A.	345 ⁹	k. A.	Masloff, 2006			
					199 ⁹					
	Roggen	2005	k. A./58	k. A.	397 ⁷					
Futtermittel	1997– 2006	k. A./103	k. A.	683	2780					
Ganzkorn				416	1588					
Schrot				603	1597					
Mehl				1782	18114					
Brot				415	1307					
Roggen	1985– 2005	116/448	26	k. A.	k. A.	Majerus, 2006				
Weizen							233/424	55		

⁵ Getreide mit einem Mutterkornanteil von 10 %, berechnet unter Annahme eines mittleren Alkaloidgehaltes in Mutterkorn von 0,2 %

⁶ Berechnet als Summe von Ergometrin, Ergosin, Ergotamin, Ergocornin, Ergokryptin, Ergocristin und den entsprechenden Ininen

⁷ Berechnet als Summe von Ergometrin, Ergotamin, α-Ergokryptin, Ergocristin und Ergocornin

⁸ Analysiert in Pools im Rahmen der „Besonderen Ernteermittlung“

⁹ Berechnet als Summe von Ergometrin, Ergotamin und α-Ergokryptin

Fortsetzung Tabelle 5.9: Belastungssituation von Lebensmitteln mit Mutterkorn (-alkaloiden)

Herkunft	Proben	Zeitraum	Belastete Proben/ Gesamtproben- zahl	Kontamina- tionsgrad [%]	Mittlerer Ge- samt- alkaloidgehalt [µg/kg]	Max. Gesamt- alkaloidgehalt [µg/kg]	Literatur
Kanada	Roggenmehl	1985–1991	118/128	92	216 ¹⁰	3972 ¹⁰	Scott et al., 1992
	Weizenmehl	1985–1991	68/93	73	23 ¹⁰	244 ¹⁰	
	Kleie	1985–1991	27/35	77	31 ¹⁰	168 ¹⁰	
	Triticalemehl	1985-1987 1990/1991	24/26	92	82 ¹⁰	283 ¹⁰	
	Roggenbrot, Kräcker, Knäckebrötchen	1986–1991	52/114	46	7,8 ¹⁰	1248 ¹⁰	
	Kindernahrung auf Getreidebasis	1997–1999	41/162	25	3,5 ¹¹	108 ¹¹	Lombaert et al., 2003
Schweiz	Weizen-Weissmehl	1985	7/k. A.	k. A.	4,2 ⁶	9,6 ⁶	Baumann et al., 1985
	Weizen-Halbweissmehl		7/k. A.	k. A.	30,7 ⁶	72,4 ⁶	
	Weizen-Ruchmehl		8/k. A.	k. A.	103,4 ⁶	160,2 ⁶	
	Roggenmehl		6/k. A.	k. A.	139,7 ⁶	397,4 ⁶	
	Roggenbrot-Krume		5/k. A.	k. A.	21,3 ⁶	43,7 ⁶	

k. A. - keine Angabe

¹⁰ Berechnet als Summe von Ergometrin, Ergosin, Ergotamin, Ergocornin, α-Ergokryptin und Ergocristin

¹¹ Berechnet als Summe aus Ergosin, Ergotamin, Ergocornin, α-Ergokryptin und Ergocristin

5.5 Gesetzliche Regelungen von Mutterkornalkaloiden

5.5.1 Lebensmittelrechtliche Regelungen

In Deutschland gibt es für Mutterkorn keine direkt geltenden lebensmittelrechtlichen Regelungen.

Laut Artikel 2 Abs. 1 und 2 in Verbindung mit Anhang I 5.e) der EG-Verordnung 824/2000 der Kommission vom 19.04.2000 über das Verfahren und die Bedingungen für die Übernahme von Getreide durch die Interventionsstellen sowie die Analysemethoden für die Bestimmung der Qualität (Interventionsrichtlinie) muss zur Intervention angenommenes Getreide gesund und handelsüblich sein und darf einen Mutterkorngehalt von 0,05 % in Roggen, Hart- und Weichweizen nicht überschreiten [VO (EG) 824/2000, 2000].

Da Sklerotien im Mittel etwa 0,2 % Mutterkornalkaloide enthalten, lässt sich hieraus ein Höchstwert für den Gesamtalkaloidgehalt von 1000 µg/kg ableiten. Seit Inkrafttreten der EG-Änderungsrichtlinie 1572/2006 zur Interventionsrichtlinie gilt diese Regelung nur noch für Hart- und Weichweizen und nicht mehr für Roggen [VO (EG) 1572/2006, 2006].

In der Mitteilung 2000/C312/01 der Kommission über die Merkmale der Waren, die für die Nahrungsmittelhilfe der Gemeinschaft bereitgestellt werden, darf der Anteil an Mutterkorn in Roggen, Hart- und Weichweizen ebenfalls 0,05 % nicht überschreiten [Mitt. 2000/C312/01, 2000].

In der Schweiz wird ein Höchstwert von 500 mg/kg Sklerotien (\equiv 0,05 % bzw. 1000 µg GA/kg) entsprechend der Fremd- und Inhaltsstoffverordnung (FIV) lediglich für Getreide zur Verarbeitung zu Mehl toleriert. Für Getreide, das unverarbeitet an den Konsumenten abgegeben wird, gilt ein Grenzwert von 200 mg/kg Sklerotien (\equiv 0,02 % bzw. 400 µg GA/kg) [FIV, 2008].

Die Canadian Grain Commission legte in ihren Richtlinien abhängig von Sorte und Güteklasse zulässige Höchstgehalte von 0,01–0,33 % (\equiv 200–6600 µg GA/kg) für Roggen und 0,01–0,10 % (\equiv 200–2000 µg GA/kg) für Weizen fest [Canadian Grain Commission, 2008].

5.5.2 Futtermittelrechtliche Regelungen

Entsprechend der Richtlinie 2002/32/EG vom 7.5.2002 über unerwünschte Stoffe in der Tierernährung, harmonisiert durch das deutsche Futtermittelgesetz (FuttMG) und die Futtermittel-Verordnung (FuttMV), zählt Mutterkorn zu den unerwünschten Stoffen in Futtermitteln [RL 2002/32/EG, 2002].

Nach Abschnitt 6 in Verbindung mit Anlage 5 der FuttMV ist eine Höchstmenge von 1000 mg/kg an Sklerotien (\equiv 0,10 % bzw. 2000 µg GA/kg) für alle Futtermittel, die ungemahlene Getreide enthalten, bei einer Trockenmasse von 88 % festgelegt. Für Futtermittel, die diese Höchstmenge überschreiten, besteht ein Verschneidungsverbot, Reinigungsmaßnahmen dürfen jedoch vorgenommen werden [FuttMV, 2007].

Darüber hinaus wurden der Europäischen Kommission vom deutschen Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) im Jahr 2006 folgende Höchstmengen für vier Mutterkorn-Leitalkaloide vorgeschlagen:

Ergometrin 100 µg/kg
Ergokryptin 100 µg/kg
Ergotamin 300 µg/kg
Ergocristin 600 µg/kg

entsprechend einem Orientierungswert von 1100 µg/kg, der unter Einbeziehung von Ergosin und Ergocornin bei 1500 µg/kg liegen soll.

5.6 Analytik von Mutterkornalkaloiden

Eine detaillierte Zusammenfassung der bisher veröffentlichten Analysemethoden gibt [Scott, 2007].

5.6.1 Extraktion und Aufreinigung

In Tabelle 5.10 sind die bisher in der Literatur beschriebenen Extraktions- und Aufreinigungsmethoden zusammengefasst.

Die Extraktion von Mutterkornalkaloiden aus der Matrix erfolgt im Allgemeinen mittels Flüssigextraktion mit polaren organischen Lösemitteln. Da es sich bei Mutterkornalkaloiden um basische Naturstoffe handelt, erfolgt die Extraktion selten im neutralen pH-Bereich, sondern überwiegend im Basischen, aber auch im Sauren. Hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, dass sowohl eine saure als auch basische Katalyse die Bildung der „Inin“-Isomere fördert.

Häufig erfolgte die Extraktion unter Verwendung von halogenierten organischen Lösemitteln wie Chloroform oder Dichlormethan (DCM). In den letzten Jahren wurden jedoch immer mehr Methoden entwickelt, in denen toxikologisch und ökologisch weniger bedenkliche Lösemittel wie Ethylacetat (EtOAc) oder Acetonitril (ACN) verwendet wurden. Besonders gängiges, basisches Extraktionsmittel ist das erstmalig von Scott und Lawrence beschriebene Gemisch, bestehend aus DCM, EtOAc, MeOH und 28%igem Ammoniumhydroxid im Verhältnis 50/25/5/1, (v/v/v/v) [Scott und Lawrence, 1980]

Die Extraktion im Sauren erfolgt häufig unter Verwendung von Acetonitril und Phosphatpuffern bzw. ortho-Phosphorsäure [Ware et al., 2000].

Die Aufreinigung des Rohextraktes erfolgte zunächst mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE), meist im sauren Milieu auch in Gegenwart von Diatomeenerde zur Vergrößerung der Oberfläche. Diese oft zeitaufwendigen und Lösemittel-intensiven Methoden wurden immer häufiger durch Festphasenextraktion (SPE) ersetzt, wobei sowohl Normalphasen wie Kieselgel als auch Umkehrphasenmaterial wie C18-Phasen eingesetzt wurden [Fajardo et al., 1995].

Nach einer Extraktion unter sauren Bedingungen wird zur Aufreinigung häufig ein Kationenaustauscher verwendet, da die Mutterkornalkaloide während der Extraktion am Stickstoff protoniert werden und am Kationenaustauscher-Material adsorbieren. Die Elution erfolgt dann im Basischen [z. B. Ware et al., 2000].

Ein ähnliches Prinzip machte sich Klug zunutze. Er erzeugte einen in situ-Kationenaustauscher, indem er Diatomeenerde mit 2 %iger Weinsäurelösung imprägnierte und den Probenextrakt aufgab. Nach Deprotonierung der Mutterkornalkaloide durch Begasung der Säule mit Ammoniak und einem Waschschrift erfolgte die Elution mit Dichlormethan [Klug, 1986].

Der Einsatz von selektiven und sensitiven Tandem-Massenspektrometern führt immer mehr zur Etablierung von so genannten „Dilute-and-Shoot“-Methoden, wobei lediglich das Lösemittel des Rohextraktes angepasst wird oder eine Direktinjektion erfolgt [z. B. Bockhorn und Drinda, 2004].

Tabelle 5.10: Ausgewählte Extraktions- und Aufreinigungsmethoden zur Bestimmung von Mutterkornalkaloiden in verschiedenen Matrices

Extraktionsmittel	Aufreinigung	Untersuchte Matrices	Wiederfindung [%]	Literatur
Extraktion im Basischen				
DCM, EtOAc, MeOH, NH ₄ OH (28 %), 50/25/5/1	LLE mit Salzsäure	Mehle	66–93	Scott und Lawrence, 1980
DCM, EtOAc, MeOH, NH ₄ OH (28 %), 50/25/5/1	LLE mit DCM unter Verwendung von Diatomeenerde	Getreidebasierte Lebensmittel	61–97	Klug, 1986
EtOAc, NH ₄ OH (4 %), 100/20	LLE mit Schwefelsäure	Weizen	60–100	Ware et al., 1986
Chloroform, Natronlauge (0,01 mol/l), 9/1	SPE mit Kieselgel	Gemahlene und pelletierte Futtermittel	93	Rottinghaus et al., 1993
EtOAc, NH ₄ OH (4 %), 100/20	SPE mit C18-Material	Weizenmahlfraktionen	65–86	Fajardo et al., 1995
MeOH, Wasser NH ₄ OH (pH 8,5), 70/30/1,5	LLE mit Chloroform	Endophyteninfiziertes Wiesengras	k. A.	Shelby et al., 1997
EtOAc, NH ₄ OH (4 %), 120/20	SPE mit C18-Material mit Ionenpaarreagenz	Babynahrung auf Getreidebasis	74–82	Lombaert et al., 2003
MeOH, konz. NH ₄ OH, 1000/12	-	Getreidebasierte Lebensmittel	50–100	Bockhorn und Drinda, 2004
DCM, EtOAc, MeOH, NH ₄ OH (28 %), 50/25/5/1	-	Pumpernickel, Roggenbrot, Knäckebröt, Roggen	62–97	Bürk et al., 2006
Extraktion im Säuren				
MeOH, H ₃ PO ₄ (0,25 %), 40/60	SPE mit starkem Kationenaustauscher	Weizen	79-96	Ware et al., 2000
2-Propanol, Wasser, Milchsäure, 50/49/1	-	Endophyteninfiziertes Wiesengras	82	Spiering et al., 2002
ACN, Ammoniumacetat (0,01 mol/l), 10/20	SPE mit C18-Material	Roggenmehl	22–110	Mohamed et al., 2006
ACN, Phosphatpuffer pH 6,0, 60/40	SPE mit starkem Kationenaustauscher	Getreide, Mehle, Brot	80–133	Curtui et al., 2007
MeOH, H ₃ PO ₄ (0,013 mol/l) 70/30	SPE mit starkem Kationenaustauscher	Roggenmehl	51–71	Storm et al., 2008
Weitere Extraktionsmethoden				
MeOH	-	Endophyteninfiziertes Wiesengras	98–200	Yates und Powell, 1988

5.6.2 Flüssigchromatographie (HPLC)

Aufgrund der chemisch-physikalischen Eigenschaften der Mutterkornalkaloide ist die HPLC besonders geeignet zur Bestimmung von Mutterkornalkaloiden. Die Detektion erfolgt mittels Fluoreszenzdetektor oder Tandem-Massenspektrometer, wobei die Fluoreszenzdetektion aufgrund der intensiven fluoreszierenden Eigenschaften der Mutterkornalkaloide ebenfalls sehr empfindlich und auch selektiv ist.

Einige bisher beschriebene HPLC-Systeme sind in Tabelle 5.11 zusammengefasst.

Tabelle 5.11: Zusammenfassung von HPLC-Systemen zur Analytik von Mutterkornalkaloiden

Säule Säulenmaterial	Eluent	Detektion	Literatur
Nicht tandemmassenspektrometrische Methoden			
C18	0,01 M NaHCO ₃ in H ₂ O/ACN, 58/42	Photochemischer Reaktionsdetektor	Scholten und Frei, 1979
Lichrosorb RP-8 C8	ACN/(NH ₄) ₂ CO ₃ -Puffer (0,2g/l), 43/57	UV Fluoreszenz	Scott und Lawrence, 1980 Rottinghaus et al. 1993
Spheri-5 C18	ACN/H ₂ O/Triethylamin, 336/645/19	UV	Chervet und Plas, 1984
Separon SGX C18	H ₂ O/MeOH/NH ₄ OH, 35/65/0,1	UV	Krén et al., 1985 Votruba und Flieger, 2000
Hypersil ODS C18	ACN/H ₂ O, 47/53 + 0,1 g (NH ₄) ₂ CO ₃ /l	Fluoreszenz	Klug, 1986
Polystyrol- Divinylbenzol	0,05 M NH ₄ H ₂ PO ₃ in H ₂ O/ACN, 55/45	Fluoreszenz	Ware et al., 1986
Zorbax ODS oder C8 C18 oder C8	Gradient ACN/0,1 M NH ₄ CH ₃ COO	Fluoreszenz	Yates und Powell, 1988
C18	0,02 M Heptansulfonsäure in 1%iger Essigsäure/1%iger Essigsäure in ACN, 60/40	Fluoreszenz	Scott et al., 1992 Fajardo et al., 1995
C18	15 mM K ₃ PO ₄ , 3,75 mM Oktansulfonsäure und 7,5 mM KCl in H ₂ O/ MeOH, 45/55	UV, Fluoreszenz und elektrochemisch	Lin, 1993
C18	Gradient ACN/2,5 mM (NH ₄) ₂ CO ₃ /MeOH	Fluoreszenz	Moubarak et al., 1996
NovaPak C18	Gradient MeOH/0,03%iges NH ₄ OH in H ₂ O	Fluoreszenz	Shelby et al., 1997
Nucleosil 120-5 C18	Gradient MeOH/0,04%iges NH ₄ OH in H ₂ O	ESI-MS	Shelby et al., 1997
Partisil 10, ODS-3 C18	0,014 M Heptansulfonat in H ₂ O/ACN/Essigsäure, 60/40/1	Fluoreszenz	Lombaert, 2000
Spherisorb C8	ACN/ 0,025 M H ₃ PO ₄ (pH 3,1), 1/1 + 1,1 g Natriumheptansulfonat/l	Fluoreszenz	Ware et al., 2000
Prodigy C18	Gradient ACN/ 0,1 M NH ₄ CH ₃ COO in H ₂ O	Fluoreszenz	Spiering et al., 2002
Luna C18	Gradient ACN/ 0,2 g/l (NH ₄) ₂ CO ₃	Fluoreszenz	Lehner et al., 2005
X-Terra MS C18	Gradient ACN/0,01 M NH ₄ CONH ₂ (pH 9,6)	Fluoreszenz	Storm et al., 2008

Fortsetzung Tabelle 5.11: Zusammenfassung von HPLC-Systemen zur Analytik von Mutterkornalkaloiden

Säule Säulenmaterial	Eluent	Detektion	Literatur
Tandemmassenspektrometrische Methoden			
Zorbax SBAq C18	Gradient MeOH/5 mM NH ₄ CH ₃ COO	ESI(+)-MSMS	Bockhorn und Drinda, 2004
Luna Phenyl-Hexyl	Gradient ACN/ 0,2 g/l (NH ₄) ₂ CO ₃	ESI(+)-MSMS	Lehner et al., 2005
Phenosphere C18	MeOH/H ₂ O, 50/50 + 0,1% CHOOH	ESI(+)-MSMS	Bürk et al., 2006
X-Terra MS C18	Gradient 5 mM HFBA in H ₂ O/0,1 % Essigsäure in Acetonitril	ESI(+)-MSMS	Mohamed et al., 2006
SunFire C18	Gradient ACN/ 2,5 mM (NH ₄) ₂ CO ₃ in H ₂ O	ESI(+)-MSMS	Uhlig et al., 2007
"Multi"-Methoden zur Bestimmung verschiedener Mykotoxine			
Alltima C18	Gradient 0,1 % HCOOH in H ₂ O/0,1 % HCOOH in ACN	ESI(+)-MSMS	Spanjer et al., 2008

5.6.3 Gaschromatographie (GC)

Mutterkornalkaloide eignen sich aufgrund ihrer Thermolabilität (Schmelzen erfolgt meist unter Zersetzung (s. Tabelle 5.7) und geringen Flüchtigkeit nur wenig für eine gaschromatographische Bestimmung.

Underivatisierte Peptidalkaloide werden im Injektor bei Temperaturen zwischen 225 und 300 °C am Amidstickstoff zwischen Lysergsäure- und Peptidgruppe gespalten. Die Peptidfragmente werden dann getrennt und mittels Flammenionisationsdetektor, stickstoffspezifischem Detektor oder Massenspektrometer nach negativer chemischer Ionisation detektiert. Diese Technik kann nicht zwischen den Isomeren am C8-Atom unterscheiden. Ergometrin wird unter diesen Bedingungen nicht fragmentiert [Scott, 1996].

Mantle wies das Vorhandensein von Mutterkorn in Milchviehfutter mit Ricinolsäure als Markersubstanz in der Fettphase nach [Mantle, 1996]. Dieses Vorgehen dient jedoch nur als qualitativer Nachweis, da eine Korrelation zwischen Ricinolsäure- und Mutterkornalkaloidgehalt nicht untersucht wurde.

5.6.4 Dünnschichtchromatographie (DC)

Die Dünnschichtchromatographie findet in der Mutterkornanalytik nur noch selten Anwendung.

Da gerade die Peptidalkaloide eine sehr ähnliche Polarität aufweisen, erfolgt die Auftrennung selten mit nur einem Laufmittelsystem. Als stationäre Phasen wurden Kieselgel, auch mit Natronlauge oder Formamid imprägniert, Aluminiumoxid oder mit Formamid imprägnierte Cellulose verwendet. Die mobilen Phasen sind sehr vielfältig und beinhalten oft Chloroform und Aceton. Eine detaillierte Zusammenfassung der verschiedenen DC-Systeme gibt Klug [Klug, 1986].

Aufgrund ihrer chromophoren Eigenschaften können Mutterkornalkaloide auf der DC-Platte in ultraviolettem Licht oder durch Sprühreagenzien sichtbar gemacht werden.

Die bekannteste Farbreaktion beruht auf der Kopplung von Van Urk's Reagenz (p-Dimethylaminobenzaldehyd) im Sauren an die 9–10 Doppelbindung des Ergolin-D-Ringes unter Bildung eines blauvioletten Farbstoffes. Diese Reaktion wird auch zur kolorimetrischen Bestimmung der Mutterkornalkaloide als Summenparameter herangezogen [Keipert und Voigt, 1972; Řeháček und Sajdl, 1990; Krěn und Cvak, 1999].

Eine weitere Möglichkeit zur Sichtbarmachung der Mutterkornalkaloide ist die Verwendung von Dragendorff-Reagenz, bestehend aus Bismutoxidnitrat, Weinsäure und Kaliumiodid. Es bildet sich ein Tetraiodobismutat-Komplex, der an die durch die Weinsäure protonierte Aminogruppe der Alkaloide bindet und eine orange bis braune Färbung aufweist [Dragendorff und Podwysotszki, 1877; Guggisberg, 1954].

5.6.5 Immunochemische Verfahren

Die Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)-Technik eignet sich besonders zum Screening von Mutterkornalkaloiden in verschiedenen Matrices. Die Spezifität ist dabei abhängig vom eingesetzten Antikörper. Bisher wurden hauptsächlich Assays zur Bestimmung einzelner Alkaloide beschrieben, es gelang erst einer Arbeitsgruppe, einen gruppenspezifischen Test mit einer hohen Empfindlichkeit zu entwickeln [Curtui et al., 2007].

Shelby und Kelley entwickelten einen kompetitiv-inhibierenden ELISA, der spezifisch auf alle Mutterkornalkaloide mit Phenylalaninrest (Ergotamin, Ergocristin, Ergostin) reagiert. Die Wiederfindung lag zwischen 26 und 360 % [Shelby und Kelley, 1990].

Zudem erarbeiteten sie einen Antikörper gegen Ergometrin, der für Immunoaffinitätschromatographie-Säulen verwendet werden sollte. Die Nachweisgrenze lag bei 10 µg/kg. Aufgrund der Kreuzreaktivität konnten auch andere Mutterkornalkaloide bestimmt werden, deren Nachweisgrenze bei etwa 1 mg/kg lag [Shelby und Kelley, 1991 und 1992].

Schnitzius et al. stellten einen semiquantitativen, kompetitiven ELISA zur Bestimmung von Mutterkornalkaloiden in Endophyten-infizierten Pflanzen vor. Der monoklonale Antikörper reagierte spezifisch auf die Lysergsäuregruppe der Mutterkornalkaloide, die Kalibrierung des Assays erfolgte mit Lysergsäure. Die Peptidalkaloide Ergokryptin, Ergocristin, Ergocornin und Ergotamin zeigten keine starke Affinität zum Antikörper im Gegensatz zu Ergometrin. Variationskoeffizienten lagen bei 10,2 % innerhalb eines Ansatzes und 18,4 % zwischen den Ansätzen für Stroh und 13,3 bzw. 24,5 % für Getreidekörner [Schnitzius et al., 2001].

Molloy et al. entwickelten einen kompetitiven Immunoassay zur Bestimmung von Dihydroergosin in Hirse und Mischfuttermitteln basierend auf der Verwendung von monoklonalem Mäuse-Antikörper und polyklonalen Hasen-Antikörpern. Die Wiederfindungen lagen zwischen 77 und 103 % mit einer Nachweisgrenze von 0,01 mg/kg und einer Bestimmungsgrenze von 0,1 mg/kg [Molloy et al., 2003].

Curtui et al. erarbeiteten neben Einzelsubstanz-spezifischen (Ergometrin, Ergotamin, Ergokryptin und Ergocornin) Assays einen gruppenspezifischen, direkt-kompetitiven Immunoassay zur Bestimmung von Mutterkornalkaloiden auf Basis polyklonaler Kaninchen-Antikörper. Die Wiederfindung lag zwischen 73 % (Maisgrieß) und 139 % (Säuglingsnahrung) mit Variationskoeffizienten unter 12 % und einer Nachweisgrenze von ca. 20 µg/kg für Getreide, Mehle, Säuglings- und Kleinkindernahrung bzw. 14 µg/kg für Brot. Da der Immunoassay gruppenspezifisch ist, erfolgte die Quantifizierung gegen eine Standardlösung bestehend aus Ergometrin, Ergotamin und Ergocristin im Verhältnis 1/10/14 [Curtui et al., 2007].

5.6.6 Elektrophorese

Die Kapillarelektrophorese (CE) ist eine zur Trennung von optischen Isomeren sehr geeignete Methode. Hierzu werden chirale Selektoren wie Kronenether, Cyclodextrine, Proteine oder chirale Mizellen zum Trennungselektrolyt zugeben, um eine schnellere und bessere Trennung zu ermöglichen [Verleysen und Sandra, 1998]. Mutterkornalkaloide selbst konnten ebenfalls erfolgreich als chirale Selektoren eingesetzt werden [Ingelse et al., 1996 a und 1996 b].

Durch Zugabe von β - bzw. γ -Cyclodextrin zum Hintergrundelektrolyten konnten zwei Mutterkornalkaloide und deren Epimere (Ergometrin/Ergometrinin, Ergotamin/Ergotaminin) durch Kapillarzonenelektrophorese in 0,1 molarem Phosphatpuffer getrennt und bei einer Wellenlänge von 206 nm detektiert werden [Fanali et al., 1992].

Frach und Blaschke entwickelten eine quantitative Methode zur Bestimmung von neun Mutterkornalkaloiden in Sklerotien. Die Sklerotien wurden nach dem von Scott und Lawrence publizierten Extraktionsmittel extrahiert [Scott und Lawrence, 1980]. Nach einem Lösemittelwechsel erfolgte die Trennung und Bestimmung der Mutterkornalkaloide in einem Elektrolytgemisch, bestehend aus Phosphatpuffer (pH 2,5), Cyclodextrinen, Harnstoff und Polyvinylalkohol. Der zur Detektion verwendete Helium-Cadmium-Laser (laserinduzierte Fluoreszenz) zeigte eine 30fach höhere Sensitivität im Vergleich zu einem UV-Detektor. Die Interassay-Wiederfindungen lagen zwischen 61 und 97 % mit Variationskoeffizienten zwischen 3 und 16 % [Frach und Blaschke, 1998].

5.6.7 Qualitative massenspektrometrische Methoden

Massenspektrometrische Methoden ohne vorherige LC-Auftrennung der Analyten können direkt zur Identifizierung von Mutterkornalkaloiden in verschiedenen Matrices angewendet werden. Eine Differenzierung zwischen den C8-Stellungsisomeren ist aufgrund des gleichen Fragmentierungsverhaltens nicht möglich [Scott, 2007].

Plattner et al. identifizierten zwölf Ergopeptidalkaloide (ohne C8-Stellungsisomere) mittels CI-Quadrupol-MS/MS mit Isobutan als Reaktandgas im positiven und negativen Modus [Plattner et al. 1983].

Casy verglich die verschiedenen Ionisationstechniken zur Identifizierung von Mutterkornalkaloiden und Dihydromutterkornalkaloiden [Casy, 1994].

70 eV EI-MS als „harte“ Ionisierungstechnik zeigte Molekülpeaks der Nichtpeptidverbindungen (Lysergsäure, Lysergamid, LSD, Ergometrin etc.) und Dihydroergolin, im Gegensatz zu den Ergo- und Dihydroergopeptiden, die vollständig fragmentierten.

Fast-Atom-Bombardment-MS als „weiche“ Ionisierungstechnik zeigte deutlich die $[M+H]^+$ - und die $[M-H]^-$ -Quasi-Molekülonen.

Lehner et al. ordneten den gruppenspezifischen Fragmenten Strukturen zu, die in der ESI(+)-MS/MS zur Quantifizierung im Multiple-Reaction-Monitoring-Modus verwendet werden [Lehner et al., 2004]. Bild 5.13 und Tabelle 5.12 geben die Fragmentierungsmechanismen und dazu gehörigen Strukturen der Mutterkornalkaloide wieder.

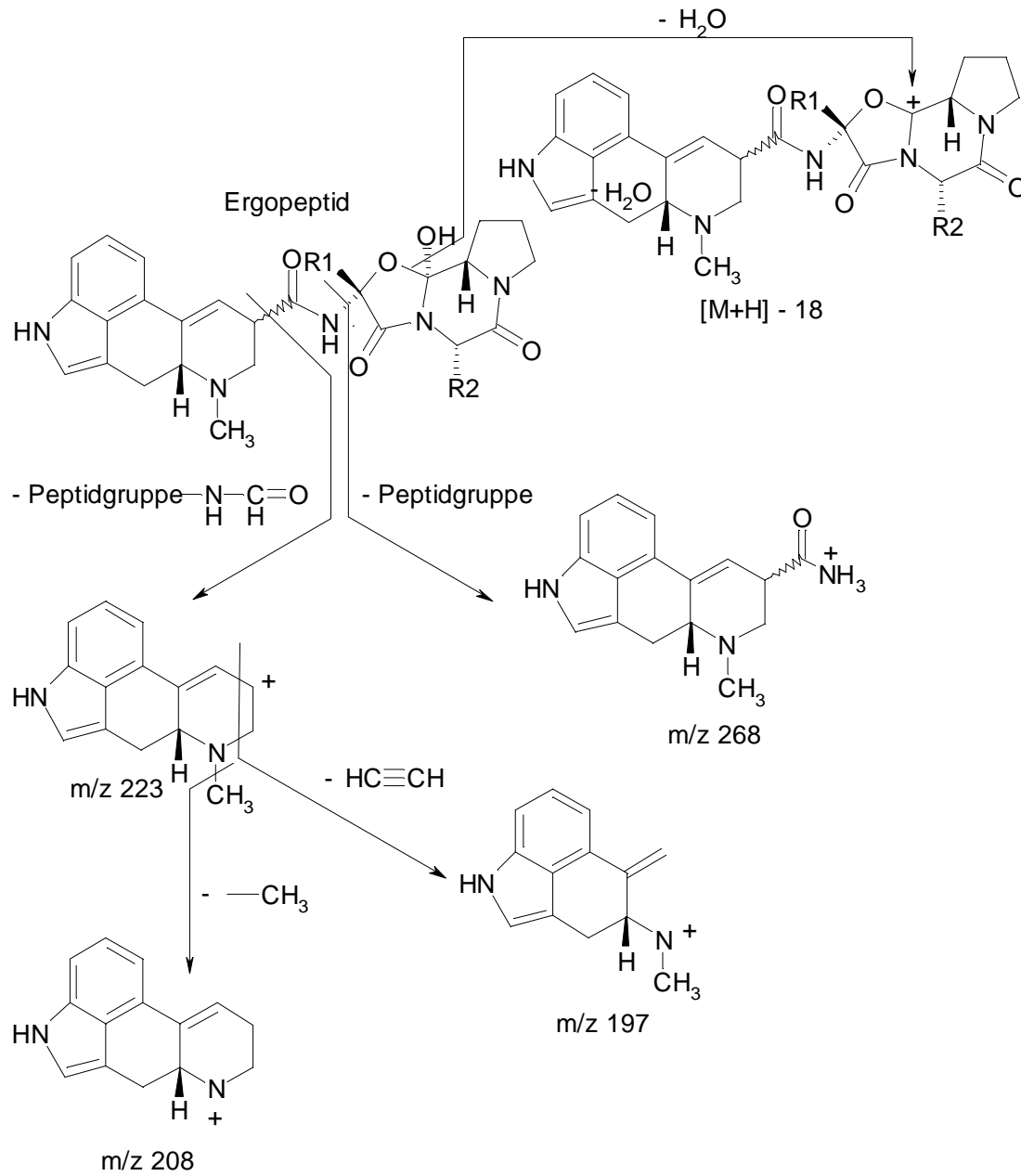


Bild 5.13: Fragmentierung von Mutterkornalkaloiden in der Massenspektrometrie, nach [Lehner et al., 2004]

Tabelle 5.12: Wichtige Fragmentationen in der Massenspektrometrie von Mutterkornalkaloiden

m/z	ET ¹²	EC ¹²	EK ¹²	ECR ¹²	EM ¹²	Zuordnung
[M+H]-18	x	x	x	x		Wasserabspaltung (tertiärer Alkohol) der Peptidgruppe
[[M+H]-18]-28	x	x	x	x		CO-Abspaltung am Dehydrat
[[M+H]-18]-267	x	x	x	x		Abspaltung des Lysergsystems vom Dehydrat
268	x	x	x	x		[Lysergsäureamid + H]
251	x	x	x	x		m/z 268 - NH ₃
223	x	x	x	x	x	[M+H] - [Peptidgruppe-NH ₂ -HC=O]
208	x	x	x	x	x	m/z 223 - CH ₃
197	x	x	x	x	x	m/z 223 - CH≡CH
180	x	x	x	x	x	m/z 223 - CH ₂ =NCH ₃
167	x	x	x	x	x	m/z 223 - CH ₂ =CHNCH ₃

¹² ET = Ergotamin, EC = Ergocornin, EK = Ergokryptin, ECR = Ergocristin, EM = Ergometrin

6 Material und Methoden

6.1 Chemikalien und Materialien

6.1.1 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben,

- werden analysenreine Chemikalien verwendet,
- ist unter „Lösung“ eine wässrige Lösung zu verstehen,
- ist das Wasser von frisch bidestillierter Qualität.
 - Acetonitril (CH_3CN), gradient grade
 - Ammoniumcarbaminat ($\text{NH}_4\text{COONH}_2$)
 - Ammoniumhydroxidlösung (NH_4OH), 25%ig
 - Dichlormethan (CH_2Cl_2)
 - Ethylacetat ($\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$)
 - Methanol (CH_3OH)
 - Silanisierungsreagenz, z. B. Pierce Surfasil

6.1.2 Standardsubstanzen

- Ergocornin ($\text{C}_{31}\text{H}_{39}\text{N}_5\text{O}_5$, CAS-Nr. 564-36-3)
- Ergocorninin ($\text{C}_{31}\text{H}_{39}\text{N}_5\text{O}_5$, CAS-Nr. 564-37-4)
- Ergocristin ($\text{C}_{35}\text{H}_{39}\text{N}_5\text{O}_5$, CAS-Nr. 511-08-0)
- Ergocristinin ($\text{C}_{35}\text{H}_{39}\text{N}_5\text{O}_5$, CAS-Nr. 511-07-9)
- α -Ergokryptin ($\text{C}_{32}\text{H}_{41}\text{N}_5\text{O}_5$, CAS-Nr. 511-09-1)
- α -Ergokryptinin ($\text{C}_{32}\text{H}_{41}\text{N}_5\text{O}_5$, CAS-Nr. 511-10-4)
- Ergometrin-Maleat ($\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_2 \cdot \text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$, CAS-Nr. 129-51-1)
- Ergometrinin ($\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_2$, CAS-Nr. 479-00-5)
- Ergosin ($\text{C}_{30}\text{H}_{37}\text{N}_5\text{O}_5$, CAS-Nr. 561-94-4)
- Ergosinin ($\text{C}_{30}\text{H}_{37}\text{N}_5\text{O}_5$, CAS-Nr. 596-88-3)
- Ergotamin D-Tartrat ($\text{C}_{33}\text{H}_{35}\text{N}_5\text{O}_5 \cdot \frac{1}{2} \text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$, CAS-Nr. 379-79-3)
- Ergotaminin ($\text{C}_{33}\text{H}_{35}\text{N}_5\text{O}_5$, CAS-Nr. 639-81-6)

6.1.3 Hilfsmittel

- Waters Sep-Pak Plus Alumina B SPE-Kartuschen
Porengröße 120 Å, Sorbensmenge 1710 mg
- Aluminiumoxid 90 aktiv basisch (Al_2O_3 , 0,063 – 0,200 mm), für die Chromatographie
- Kunststoffkartuschen (12 ml) zum Befüllen mit Festphasenmaterial,
mit PE-Fritten
- Millipore Ultrafree-MC-Zentrifugenfilter Durapore PVDF 0,45 μm , 0,5 ml
- SPE-Vakuumstation mit Reservoir und Luer-Hähnen

6.1.4 Geräte und Software

- Agilent HP 1100 HPLC-FLD
mit Optilab Membrandegasser, thermostatisierbarem Autosampler, binärer Pumpe, Säulenofen, Fluoreszenzdetektor, Steuerungssoftware HP Chemstation
- Shimadzu 10-A HPLC-FLD
mit Membrandegasser, thermostatisierbarem Autosampler, binärer Pumpe, Säulenofen, Fluoreszenzdetektor, Steuerungssoftware LC-Solution
- Applied Biosystems API 4000 Triple-Quadrupol-Massenspektrometer
mit Electrospray-Ionenquelle, Steuerungssoftware Analyst 1.4
- Retsch Ultra-Zentrifugalmühle ZM 200
mit Steckrotor mit 12 Zähnen, Distanz-Ringsieb mit einer 0,50 mm Conidurlochung
- Grindomix Labormixer
- Turbo-Vap-Eindampfstation TurboVap II
- Vortexer-Laborschüttler
- Beckman-Zentrifuge
mit 250-ml-PE-Zentrifugenbechern für halogenhaltige Lösemittel
- Turbula-Überkopfschüttler
- Elma Transsonic Ultraschallbad T 460
- Eppendorf-Mikrozentrifuge 5415 C

6.1.5 Probenmaterial

Das Untersuchungsmaterial wurde hauptsächlich im Berliner Lebensmitteleinzelhandel im Zeitraum von Dezember 2005 bis Januar 2008 erworben. Der Umfang lag bei bei 132 Proben.

Bild 6.1 gibt die Zusammensetzung des Probenmaterials aufgeschlüsselt nach Warengruppen wieder.

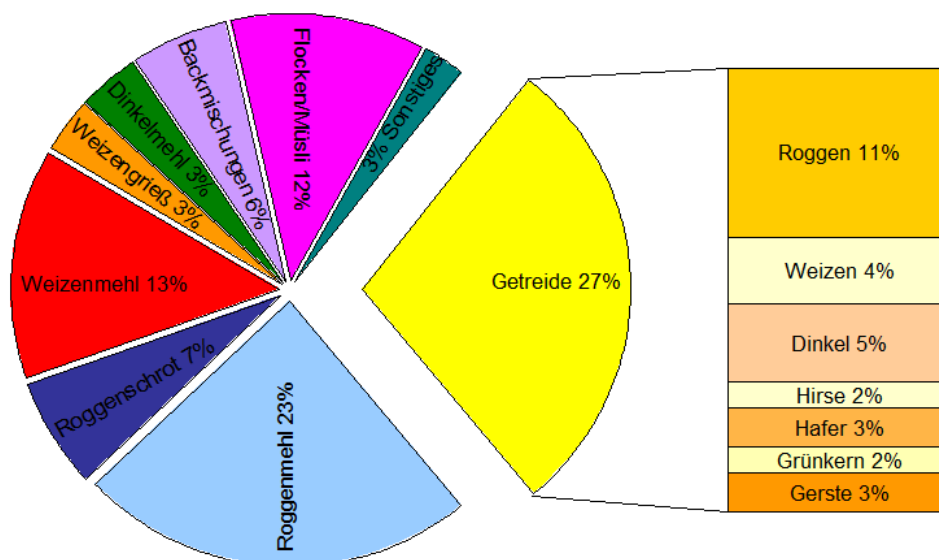


Bild 6.1: Zusammensetzung der untersuchten Proben nach Warengruppen

6.2 Probenvorbereitung

Von jeder Probe wurden je mindestens 500 g gekauft und, wenn nötig, zerkleinert.

Mehle wurden in Polyethylenbeutel eingeschweißt und vor der Analyse gründlich vermengt.

Getreidekörner wurden in einer Zentrifugalmühle mit Distanz-Ringsieb (0,50 mm Lochung) gemahlen. Stark fetthaltige Müslimischungen wurden in einem Labormixer zerkleinert.

Zur Überprüfung der Partikelgröße wurden die gemahlene bzw. zerkleinerten Proben durch ein Sieb mit einer Maschenweite von 0,50 mm gegeben. War die Partikelgröße nicht ausreichend gering, wurde erneut zerkleinert.

6.3 Probenaufarbeitung

Die ausführlichen Methodenbeschreibungen sind im Anhang wiedergegeben.

6.3.1 Probenaufreinigung nach halogenorganischer Extraktion

20 g Probe werden auf 0,01 g genau in ein 250-ml-PE-Zentrifugengefäß eingewogen und nach der Zugabe von 100,0 ml des Extraktionsmittels, bestehend aus Dichlormethan/Ethylacetat/Methanol/Ammoniumhydroxidlösung (50/25/5/1, v/v/v/v), für 45 min turbulent geschüttelt. Anschließend wird die Probe für 25 min bei 4500 g und 10 °C zentrifugiert. 8,0 ml des Überstandes werden auf eine mit 5,0 g basischem Aluminiumoxid gepackte Kartusche gegeben und eluiert. Um eine Analytkonzentrierung vor allem bei höheren Temperaturen zu vermeiden, müssen die Säulen abgedeckt und die Kammer der Vakuumstation mit dem Extraktionsmittel gesättigt werden.

Das Eluat wird in einem Reagenzglas aufgefangen, mit Hilfe eines Vortexers gemischt, ein Aliquot von 2,0 ml abgenommen und in ein 10 ml fassendes, silanisierendes Reagenzglas überführt. Die Lösung wird im Stickstoffstrom (45 °C, 30 min, Gasdruck von 300 bis 700 mbar) bis zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand wird in 2,0 ml des HPLC-Laufmittels, Acetonitril/Ammoniumcarbammat-Puffer (0,2 g/l) (156/200, w/v), aufgenommen. Das Reagenzglas wird mit einem Silikonstopfen verschlossen und für 10 min im Ultraschallbad bei Raumtemperatur behandelt. Ca. 0,5 ml der Lösung werden mittels Zentrifugenfilter bei 20000 g und 10 °C filtriert. 10 µl des gereinigten Extraktes werden mittels HPLC-FLD analysiert.

6.3.2 Probenaufreinigung nach nicht-halogenorganischer Extraktion (Alox-Methode)

20 g Probe werden auf 0,01 g genau in ein 250-ml-PE-Zentrifugengefäß eingewogen und nach der Zugabe von 100,0 ml des Extraktionsmittels, bestehend aus Ethylacetat/Methanol/Ammoniumhydroxidlösung (75/5/7, v/v/v), für 45 min turbulent geschüttelt. Anschließend wird die Probe für 25 min bei 4500 g und 10 °C zentrifugiert.

Die Aluminiumoxid-Kartusche wird zusammen mit einem Vorratsgefäß auf eine Elutionsstation aufgesteckt. 5 ml des Überstandes werden in das Vorratsgefäß pipettiert und in ein Reagenzglas eluiert. Der Durchfluss sollte 1 Tropfen/s nicht überschreiten. Um eine Analytkonzentrierung vor allem bei höheren Temperaturen zu vermeiden, müssen die Säulen abgedeckt und die Kammer der Vakuumstation mit dem Extraktionsmittel gesättigt werden.

Das Eluat wird mit Hilfe eines Labormischers geschüttelt. 2,0 ml hiervon werden in ein silanisierendes Reagenzglas überführt und im Stickstoffstrom bei 45 °C bei einem Gasdruck von 300

bis 700 mbar bis zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wird in 2,0 ml des HPLC-Elutionsmittels, Acetonitril/Ammoniumcarbammat-Puffer (0,2 g/l) (156/200, w/v), aufgenommen und für 15 min bei Raumtemperatur im Ultraschallbad gelöst, wobei das Reagenzglas bzw. der Spitzkolben durch Parafilm oder einen Silikonstopfen verschlossen wird.

0,5 ml dieser Lösung werden in ein Zentrifugengefäß mit Filter gegeben und bei 20000 g und 10 °C filtriert. Diese Probenmesslösung wird in ein HPLC-Probenfläschchen überführt.

6.3.3 Probenaufreinigung nach nicht-halogenorganischer Extraktion (LC-MS/MS-Schnellmethode)

20 g Probe werden auf 0,01 g genau in ein 250 ml-PE-Zentrifugengefäß eingewogen und nach der Zugabe von 100,0 ml des Extraktionsmittels, bestehend aus Ethylacetat/Methanol/Ammoniumhydroxidlösung (75/5/7, v/v/v), für 45 min turbulent geschüttelt.

2,0 ml des Rohextraktes werden in ein silanisieretes Reagenzglas überführt und im Stickstoffstrom bei 45 °C bei einem Gasdruck von 300 bis 700 mbar bis zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wird in 2,0 ml des HPLC-Elutionsmittels, Acetonitril/Ammoniumcarbammat-Puffer (0,2 g/l) (156/200, w/v), aufgenommen und für 15 min bei Raumtemperatur im Ultraschallbad gelöst, wobei das Reagenzglas bzw. der Spitzkolben durch Parafilm oder einen Silikonstopfen verschlossen wird.

0,5 ml dieser Lösung werden in ein Zentrifugengefäß mit Filter gegeben und bei 20000 g und 10 °C zentrifugiert und filtriert. Diese Probenmesslösung wird in ein HPLC-Probenfläschchen überführt.

6.4 Geräteeinstellungen

6.4.1 HPLC-FLD

Säule: Phenomenex Gemini C6-Hexyl, 250 x 4,6 mm, 5-µm-Material

Laufmittel: Acetonitril/Ammoniumcarbammat-Puffer (0,2 g/l) (156/200, w/v)

Fluss:	Zeit	Fluss [ml/min]
	0,1	0,8
	16,0	0,8
	16,1	1,5
	29,0	1,5
	29,1	0,8
	32,0	0,8

Säulentemperatur:	30 °C
Injektionsvolumen:	10 µl
Detektoreinstellung:	Anregung 330 nm Emmission 415 nm

6.4.2 LC-MS/MS

6.4.2.1 HPLC

Säule: Phenomenex Gemini C6-Phenylsäule, 100 x 2,1 mm, 3 µm-Material,

Laufmittel A: Acetonitril

Laufmittel B: Ammoniumcarbamat-Puffer (0,2 g/l)

Gradient:	Zeit [min]	A [%]	B [%]	Fluss [µl/min]
	0,0	45	55	100
	6,0	45	55	100
	9,0	55	45	300
	20,0	55	45	300
	20,1	45	55	100
	22,0	45	45	100

Säulentemperatur: 30 °C

Injektionsvolumen: 10 µl

6.4.2.2 MS/MS

Quellentemperatur: 600 °C

Curtain Gas: 14 psi

Gas 1: 40 psi

Gas 2: 30 psi

CAD: 6 psi

Eingangspotential: 10 V

IS: 5500 V

MRM-Übergänge:

Verbindung	Übergang
Ergometrin	326,0 → 223,0
	326,0 → 208,1
Ergosin	548,4 → 223,0
	548,4 → 207,9
Ergotamin	582,3 → 223,0
	582,3 → 208,1
Ergocornin	562,4 → 267,9
	562,4 → 223,1
Ergokryptin	576,5 → 223,2
	576,5 → 208,0
Ergocristin	610,1 → 223,0
	610,1 → 208,0
Ergometrinin	326,0 → 223,0
	326,0 → 208,1
Ergosinin	548,4 → 530,2
	548,4 → 223,0
Ergotaminin	582,3 → 564,0
	582,3 → 223,0
Ergocorninin	562,3 → 544,4
	562,3 → 222,9
Ergokryptinin	576,3 → 558,4
	576,5 → 223,2
Ergocristinin	610,4 → 592,1
	610,4 → 223,0

6.5 Bestimmung der analytischen Grenzen

6.5.1 Definitionen nach DIN 32645

Die Nachweis-, Erfassungsgrenze und Bestimmungsgrenze sind in DIN 32645 definiert und wurden entsprechend der Leerwertmethode über die Streuung des Leerwertes bestimmt [DIN 32645, 2008].

Zudem wurde eine näherungsweise Abschätzung über die Kalibrierung der Wiederfindung, entsprechend der Kalibriermethode nach DIN 32645, vorgenommen.

Die **Nachweisgrenze (NG)** entspricht dem kleinsten Messwert, der mit einer vorgegebenen Sicherheit vom Blindwert unterschieden werden kann.

Entsprechend eines festgelegten β -Fehlers von 50 % liegen 50 % der Proben mit Gehalten der Nachweisgrenze unterhalb dieser Grenze. Zudem kann mit 99%iger Sicherheit (α -Fehler 1 %) davon ausgegangen werden, dass der Analyt vorhanden ist.

α - und β -Fehler sind bei der **Erfassungsgrenze (EG)** gleich groß. Sie entspricht daher der doppelten Nachweisgrenze. Im Gegensatz zur Nachweisgrenze werden an dieser Grenze nur 1 % der Proben unterhalb liegen.

Im Konzentrationsbereich der **Bestimmungsgrenze (BG)** wird die Anwesenheit des Analyten vorausgesetzt. Sie ist definiert als die kleinste Konzentration einer Substanz, die mit einer vorgegebenen Analysenpräzision bestimmt werden kann. Die Bestimmungsgrenze bezeichnet den Konzentrationswert, bei dem der relative Fehler erstmals die vorgegebene Schranke der Ergebnisunsicherheit unterschreitet z. B. $k=3$, entsprechend 33,3 %.

6.5.2 Durchführung der Bestimmung der analytische Grenzen für Lebensmittel und Futtermittel

Zur Bestimmung der analytischen Grenzen nach DIN 32645 – Leerwertmethode – wurden je 20,0 g eines unbelasteten, gemahlten Roggenmaterials bzw. der in Tabelle 6.1 beschriebene Kraffttermischung mit zehn Wiederholanalysen nach Kap. 6.3.1 oder 6.3.2 oder 6.3.3 aufgearbeitet. Die Detektion erfolgte mittels HPLC-FLD oder LC-MS/MS.

Zur Berechnung wurden ein Signifikanzniveau von $\alpha=0,01$ und einer Ergebnisunsicherheit von 33,3 % ($k=3$) zugrunde gelegt.

Tabelle 6.1: Zusammensetzung der Krafftuttermischung zur Bestimmung der Wiederfindung für Futtermittel

Zusammensetzung	Gehalt [%]
Rohprotein	51,3
Rohfaser	10,4
Rohfett	17,7
Gerste	37,0
Weizen	30,0
Sojabohne, dampferhitzt	16,0
Molkenfett	9,0
Kartoffeleiweiß	3,0
Mineralstoff-Vitamin-Aminosäurevormischung	2,9
Calciumcarbonat	1,0
Monocalciumphosphat	0,6
Sojaöl	0,3
Natriumchlorid	0,2

6.6 Bestimmung der Wiederfindungen

6.6.1 Wiederfindung nach halogenorganischer Extraktion

Die Bestimmung der Wiederfindung für zwölf Mutterkornalkaloide erfolgte durch Aufstockung eines gemahlenen, unbelasteten Roggens auf zwei Konzentrationsniveaus mit je fünf Wiederholungen.

Die Auswahl der Konzentrationsniveaus richtete sich nach den strengsten, diskutierten Höchstmengen für Mutterkorn von 0,01 % bzw. 200 µg/kg Gesamtalkaloidgehalt und lag bei 13 µg/kg (Summe der Lysergsäurederivate 80 µg/kg, Summe der Lyserg- und Isolysergsäurederivate 160 µg/kg) bzw. 27 µg/kg (Summe der Lysergsäurederivate 160 µg/kg, Summe der Lyserg- und Isolysergsäurederivate 320 µg/kg).

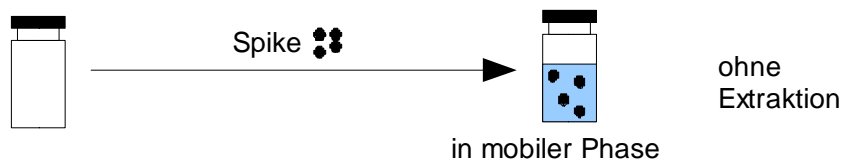
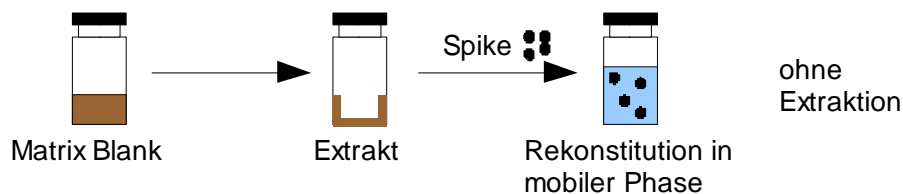
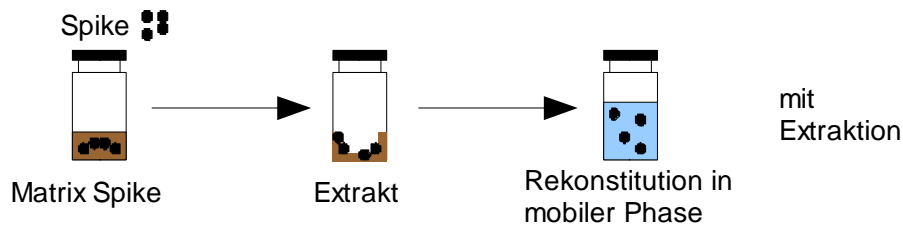
Die weitere Aufarbeitung erfolgte nach Kap. 6.3.1.

6.6.2 Wiederfindung nach nicht-halogenorganischer Extraktion (Alox- und LC-MS/MS-Schnellmethode) für Lebensmittel

Die Wiederfindungsrate wurde lediglich für fünf Leitalkaloide (Ergometrin, Ergotamin, Ergocornin, α -Ergokryptin, Ergocristin) bestimmt, da weitere Standardsubstanzen für Aufstockungsversuche nicht in ausreichender Menge zur Verfügung standen.

Zur Bestimmung der Wiederfindung wurde ein gemahlenes, unbelastetes Roggenmaterial in vier äquidistanten Schritten mit je vier Wiederholanalysen in einem Konzentrationsbereich von ca. 25 bis 150 µg/kg dotiert und nach Kap. 6.3.2 (Alox-Methode) bzw. nach Kap. 6.3.3 (LC-MS/MS-Schnellmethode) aufgearbeitet. Die Detektion erfolgte mit HPLC-FLD oder LC-MS/MS.

Da es in der Ionenquelle zu Ionensuppressions- oder Promotionseffekten kommen kann, wurde für die Methoden mit MS/MS-Detektion zudem eine Matrixkalibration aufgenommen, indem die unbelastete Probe sowohl mit als auch ohne Festphasenfiltration aufgearbeitet und erst bei der Rücklösung der Trocknungsrückstände mit Standardlösung gleicher Konzentration wie die Wiederfindungen versetzt wurde. Ziel war die Überprüfung der Richtigkeit der speziell für die MS/MS-Detektion entwickelten Schnellmethode ohne Festphasenaufreinigung (s. Kap. 6.3.3). Die entsprechenden Schritte sind in Bild 6.2 dargestellt.

StandardkalibrierungMatrixkalibrierungWiederfindungskalibrierung**Bild 6.2: Prinzip zur Ermittlung des Matrixeffektes, modifiziert nach [Kromidas, 2006]****6.6.3 Wiederfindung nach nicht-halogenorganischer Extraktion (Alox-Methode) für Futtermittel**

Stellvertretend für Futtermittel wurde ein komplexes Schweinemast-Krafftutter mit o. g. fünf Leitalkaloiden in einem Konzentrationsbereich von 50 bis 650 µg/kg - entsprechend den in Kap. 5.5.2 genannten diskutierten Höchstmengen für Futtermittel - mit fünf Konzentrationsniveaus (drei Wiederholbestimmungen) dotiert, nach Kap. 6.3.2 aufgereinigt und mit HPLC-FLD detektiert. Die Zusammensetzung der Kraffttermischung ist in Tabelle 6.1 dargestellt.

6.7 Bestimmung der Präzision**6.7.1 Ermittlung der Präzision nach halogenorganischer Extraktion**

Kenndaten zur Überprüfung der Präzision unter Wiederhol- und Zwischenbedingungen wurden für die in Kap. 6.3.1 beschriebene Methode im Rahmen der Begleitung einer Laborvergleichsuntersuchung ermittelt.

Zur Bestimmung der Präzision unter Wiederholbedingungen wurde ein natürlich kontaminiertes Roggenmehl mit einem Gesamtalkaloidgehalt von 1400 µg/kg an einem Tag mit sechs Wiederholbestimmungen analysiert und mit HPLC-FLD detektiert.

Für die Bestimmung der Präzision unter Zwischenbedingungen (s. auch [DIN ISO 5725-3, 2003]) wurde das natürlich kontaminierte Roggenmehl über zwei Monate zweimal wöchentlich jeweils in Doppelbestimmungen analysiert.

6.7.2 Ermittlung der Präzision nach nicht-halogenorganischer Extraktion (Alox- und LC-MS/MS-Schnellmethode) für Lebensmittel

Zur Bestimmung der Präzision unter Wiederhol- und Zwischenbedingungen wurde ein natürlich kontaminiertes Roggenmehl mit einem Gesamtalkaloidgehalt von etwa 300 µg/kg mittels Alox- (Kap. 6.3.2) und LC-MS/MS-Schnellmethode (Kap. 6.3.3) aufgearbeitet und mittels HPLC-FLD und LC-MS/MS analysiert. Dieses Material enthielt elf Alkaloide; Ergometrinin konnte nicht nachgewiesen werden.

Zur Bestimmung der Präzision unter Wiederholbedingungen wurde das Roggenmehl zehnmal von einem Bearbeiter aufgearbeitet. Unter Zwischenbedingungen wurde das Material an sechs Tagen mit drei Wiederholungen durch zwei verschiedene Bearbeiter (erfahren und unerfahren) analysiert (n=18).

7 Ergebnisse

7.1 Überprüfung der Messsysteme

7.1.1 Beispielchromatogramme

In Bild 7.1 sind zwei HPLC-FLD-Chromatogramme dargestellt. Chromatogramm a) zeigt einen im HPLC-Eluenten gelösten Standard mit den zwölf Hauptalkaloiden. Die Konzentration beträgt etwa 10 ng/ml entsprechend einem Gesamtalkaloidgehalt von 600 µg/kg.

Chromatogramm b) zeigt ein natürlich kontaminiertes Roggenschrot aus einer Berliner „Bio-Bäckerei“. Der Gesamtalkaloidgehalt beträgt ca. 740 µg/kg.

Die chromatographischen Bedingungen sind unter Punkt 6.4.1 und im Anhang (HPLC-FLD) zusammengefasst.

Bild 7.2 zeigt die entsprechenden mit der LC-MS/MS aufgenommenen Totalionen-Chromatogramme. Es ist zu berücksichtigen, dass die Extraktion der MRM-Übergänge aus den Totalionen-Chromatogrammen zu einer deutlichen Verbesserung der Auflösung und zu einer Steigerung der Empfindlichkeit führt.

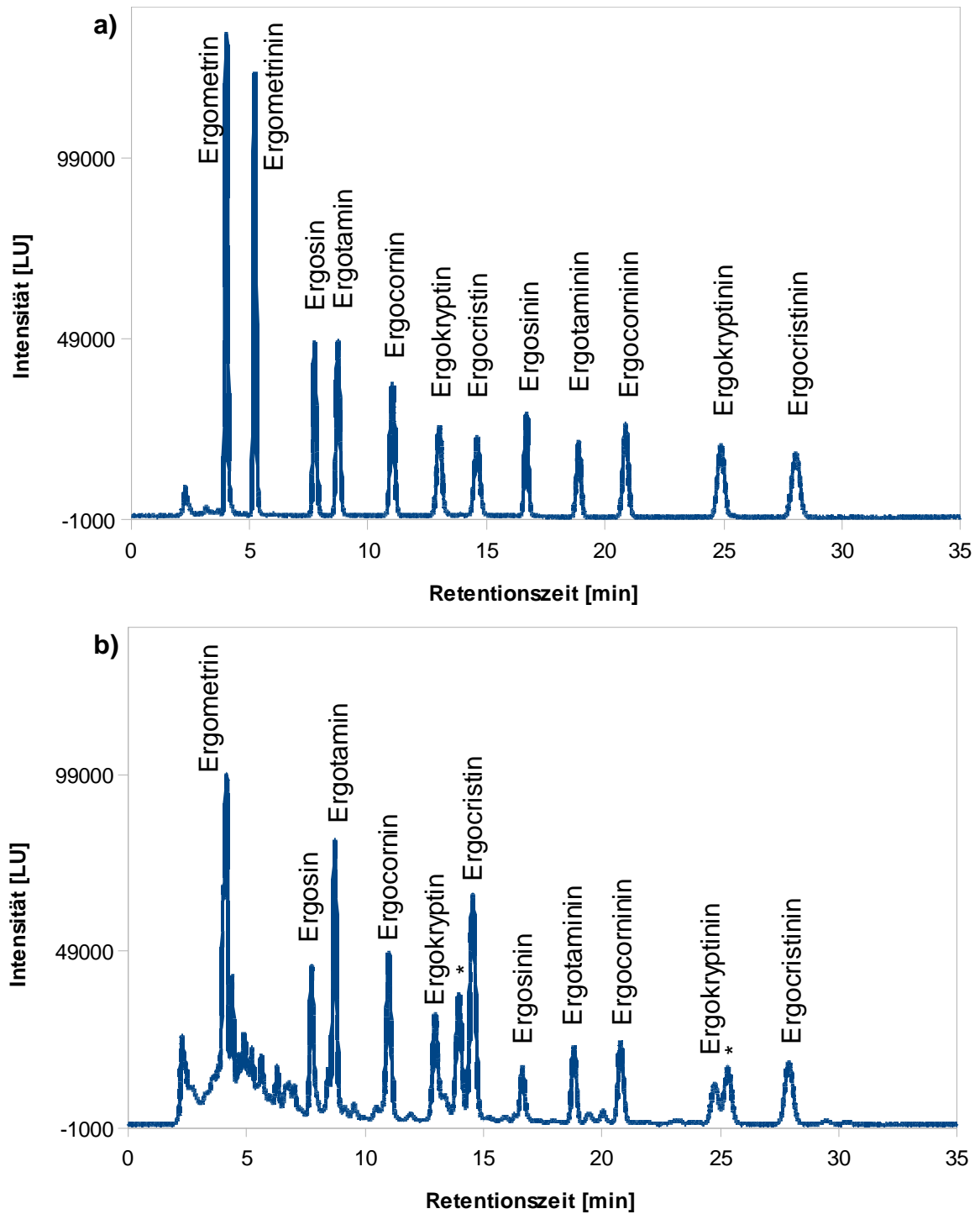


Bild 7.1: HPLC-FLD-Chromatogramme eines Standards (a) und einer Roggenchrotprobe (b)

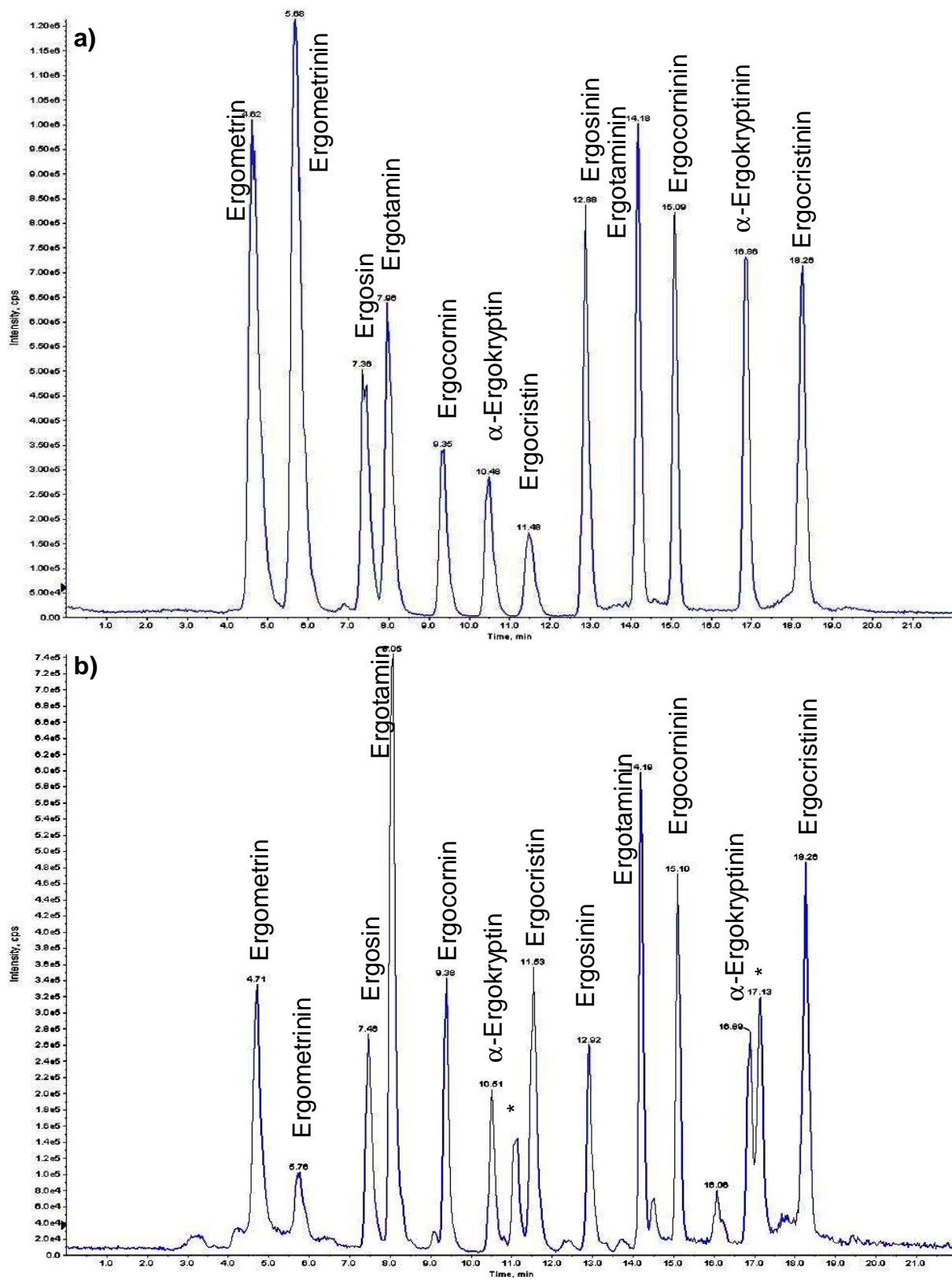


Bild 7.2: LC-MS/MS-Totalionen-Chromatogramme eines Standards (a) und einer Roggenschrotprobe (b)

7.1.2 Arbeitsbereich und Linearität der Analysensysteme

Nach Möglichkeit sollte zur Quantifizierung eine Grundkalibrierung 1. Grades, einem linearen Modell, herangezogen und nur in begründeten Ausnahmefällen mit einer Kalibrierfunktion 2. Grades, einem quadratischen Modell, gearbeitet werden [Funk et al., 2005].

Die rechnerische Überprüfung der Linearität der Grundkalibrierung erfolgte unter Anwendung des Anpassungstests nach Mandel. Der Test geht von der Annahme aus, dass relativ große Abweichungen der Messwerte von der Geraden durch Unlinearität verursacht sind und bei Wahl eines „besseren“ Regressionsmodells – hier 2. Grades – signifikant verringert werden können [DIN 38402-51, 1986; Funk et al., 2005].

Aus den Reststandardabweichungen des linearen und des quadratischen Regressionsmodells wird die Differenz der Abweichungsvarianzen gebildet. Der Quotient aus dieser Differenz und der Reststandardabweichung ergibt den Prüfwert, der mit dem F-Tabellenwert zum 99%igen Signifikanzniveau (16,26) verglichen wird. Ist der Prüfwert kleiner oder gleich 16,26, ist das lineare Regressionsmodell anwendbar.

Der getestete Arbeitsbereich lag für jedes der zwölf Alkaloide zwischen 5 und 250 µg/kg mit acht Konzentrationsniveaus. Der Mandel-Anpassungstest ergab, dass ein lineares Regressionsmodell zur Quantifizierung im getesteten Arbeitsbereich anwendbar ist.

Tabelle 7.1 gibt die Kenndaten der Grundkalibrierungen für die einzelnen Alkaloide und die Ergebnisse des Mandel-Anpassungstests exemplarisch für die HPLC-FLD wieder.

Tabelle 7.1: Kenndaten der Grundkalibrierungen der zwölf Mutterkornalkaloide des HPLC-FLD-Systems

Analyt	Steigung	y-Achsenabschnitt	Korrelationskoeffizient R	Mandel-Test
				Prüfwert
Ergometrin	8497,4	83459,1	0,998	5,00
Ergometrinin	7562,8	91078,4	0,998	5,95
Ergosin	5442,7	35851,6	0,998	5,10
Ergotamin	4999,8	37617,1	0,998	6,15
Ergocornin	5486,3	22742,4	0,999	3,51
α-Ergokryptin	5271,5	19226,3	0,999	2,82
Ergocristin	5392,3	17362,6	0,999	3,88
Ergosinin	3505,2	14985,0	0,999	3,54
Ergotaminin	3274,2	18205,2	0,999	6,72
Ergocorninin	4596,1	26410,1	0,998	4,65
α-Ergokryptinin	4568,1	14231,4	0,998	4,80
Ergocristinin	4238,2	19472,0	0,998	4,01

7.1.3 Ermittlung der Methodenfaktoren für die HPLC-FLD

Da die Verfügbarkeit der „Inin“-Standards eingeschränkt ist, besteht der Bedarf an einer Möglichkeit zur Abschätzung des „Inin“-Gehaltes. Ein geeignetes Mittel bieten Methodenfaktoren.

Der Methodenfaktor f stellt den Proportionalitätsfaktor zwischen dem Konzentration/Signal-Verhältnis einer Probensubstanz und dem einer Standardsubstanz dar. In diesem Fall wird das „In“ als Referenz definiert und darüber der „Inin“-Gehalt näherungsweise bestimmt. Im Gegensatz dazu beschreibt der Responsefaktor die Antwort des Detektors auf das von einer Probensubstanz im Detektor verursachte Signal.

Die Methodenfaktoren wurden auf Basis von zehn unabhängigen Kalibrierreihen in einem Arbeitsbereich von 5 bis 250 µg/kg über elf Monate bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7.2 dargestellt.

Unter Zugrundelegung des Methodenfaktors kann über die bekannten Größen $\text{Signal}_{\text{In}}$, $\text{Konzentration}_{\text{In}}$ und $\text{Signal}_{\text{Inin}}$ die „Inin“-Konzentration nach folgender Formel abgeschätzt werden:

$$\text{Konzentration}_{\text{Inin}} = f \cdot \frac{\text{Konzentration}_{\text{In}} \cdot \text{Signal}_{\text{Inin}}}{\text{Signal}_{\text{In}}}$$

Tabelle 7.2: Relative Responsefaktoren der „Ine“ im Verhältnis zu den korrespondierenden „Ininen“

Analytenpaar	Methoden-faktor f	RSD [%]
Ergometrin - Ergometrinin	1,23	1,9
Ergosin - Ergosinin	1,70	3,1
Ergotamin - Ergotaminin	1,69	8,1
Ergocornin - Ergocorninin	1,15	10,4
α-Ergokryptin - α-Ergokryptinin	1,10	5,9
Ergocristin - Ergocristinin	1,17	6,3

7.2 Methodenentwicklung

7.2.1 Optimierung des Aufreinigungsmaterials

Ausgehend von dem von Scott und Lawrence entwickelten Extraktionsmittel [Scott und Lawrence, 1980], bestehend aus Dichlormethan, Ethylacetat, Methanol, konzentriertem Ammoniumhydroxid im Verhältnis 50/25/5/1, v/v/v/v, wurde ein mit fünf Mutterkornalkaloiden dotierter Roggenmehlextrakt hergestellt. Dieser Extrakt wurde mit verschiedenen Festphasenmaterialien (basisches, neutrales, saures Aluminiumoxid, Aktivkohle, Calflo E, Celite, Kieselgel, Polyamid) versetzt. Chromatogramme und die prozentualen Wiederfindungen der Mutterkornalkaloide sind in Bild 7.3 dargestellt.

Der Vergleich der Chromatogramme zeigt, dass die Aufreinigungseffizienz für die drei verschiedenen Aluminiumoxidmaterialien am größten ist, wobei innerhalb dieser drei Materialien keine signifikanten Unterschiede auftraten. Da die Mutterkornalkaloide im basischen Bereich weniger zur Isomerisierung neigen [Guggisberg, 1954], wurde im Weiteren basisches Aluminiumoxid als Aufreinigungsmaterial verwendet. Die erhöhten Wiederfindungen resultieren aus Aufkonzentrierungseffekten, die auf die Oberflächenvergrößerung während des Filtrationsprozesses zurückzuführen sind. Dies wurde durch das Einbringen des basischen Aluminiumoxids in eine Polyethylenkartusche minimiert.

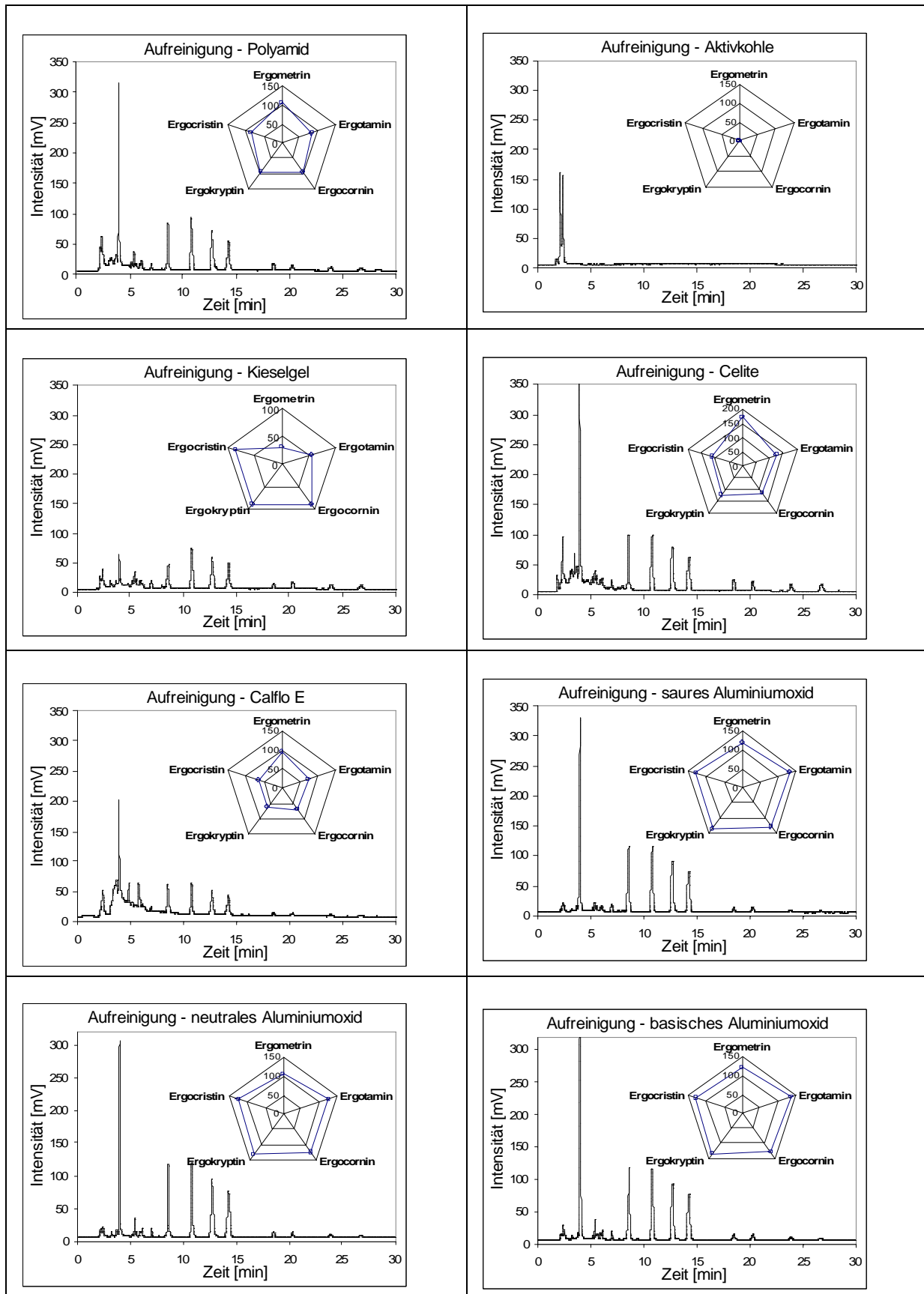


Bild 7.3: Aufreinigungseffizienz und prozentuale Wiederfindungen ausgewählter Mutterkornalkaloide unter Verwendung verschiedener Festphasenmaterialien

7.2.2 Optimierung des Extraktionsmittels

Da es Ziel der vorliegenden Arbeit war, eine im Rahmen der Amtlichen Sammlung nach § 64 LFGB zu standardisierende Analysenmethode zu entwickeln, die internationale Anwendung finden soll, war auf den Einsatz von halogenierten Lösemittel zu verzichten. Daher wurde der Anteil an Dichlormethan durch Ethylacetat ersetzt. Da dieses Extraktionsgemisch für die quantitative Extraktion der polaren Mutterkornalkaloide (Ergometrin, Ergometrinin) zu unpolar war, wurde der Anteil an 25%igem Ammoniumhydroxid erhöht.

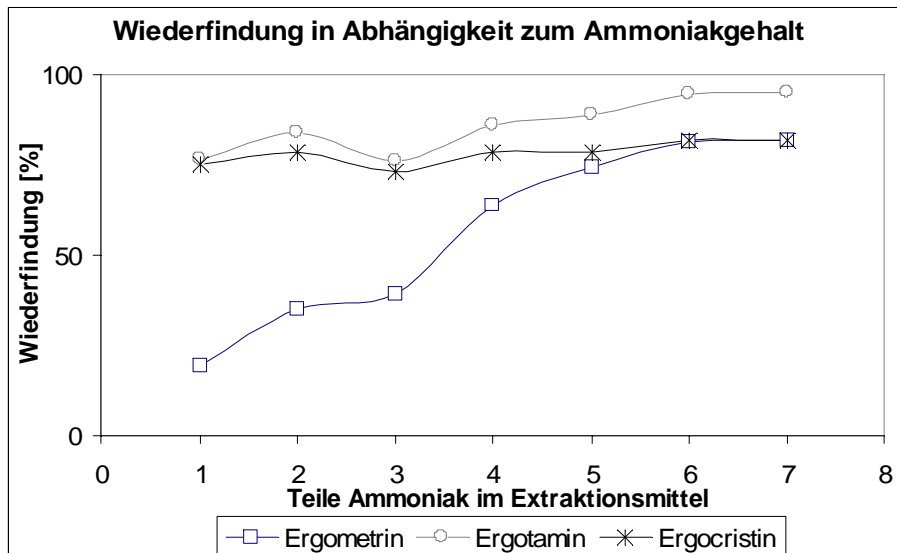


Bild 7.4: Ermittlung des Optimums an Ammoniumhydroxid im Extraktionsmittel

Bild 7.4 zeigt das Verhalten der Wiederfindung in Abhängigkeit vom Ammoniumhydroxidanteil im Extraktionsmittel. Ab einem Ammoniumhydroxidanteil von sechs wird ein Plateaubereich erreicht, ab dem die Wiederfindung nicht mehr zunimmt. Daher wurde im Weiteren mit dem Extraktionsmittel Ethylacetat, Methanol, Ammoniumhydroxid (25 %) im Verhältnis 75/5/7, v/v/v, verwendet.

7.3 Aufreinigung nach halogenorganischer Extraktion

Die Durchführung der getesteten Analysenmethode ist in Kap. 6.3.1 und im Anhang beschrieben.

7.3.1 Bestimmung der analytischen Grenzen nach DIN 32645

Die Bestimmung der analytischen Grenzen erfolgte nach DIN 32645 über die Streuung des Leewertes [DIN 32645, 2008]. Hierzu wurde ein unbelastetes, gemahlenes Roggenmaterial in Zehnfachbestimmung nach o. g. Analysenmethode untersucht. Das genaue Vorgehen ist in Kap. 6.5.2 beschrieben. In Tabelle 7.3 sind die analytischen Grenzen der Methode zusammengefasst.

Tabelle 7.3: Analytische Grenzen nach DIN 32645 (Leerwertmethode) für die Analysenmethode nach halogenorganischer Extraktion

Analyt	Nachweisgrenze [µg/kg]	Erfassungsgrenze [µg/kg]	Bestimmungsgrenze [µg/kg]
Ergometrin	0,46	0,92	1,37
Ergometrinin	0,05	0,10	0,14
Ergosin	0,08	0,16	0,20
Ergotamin	0,07	0,14	0,20
Ergocornin	0,04	0,09	0,12
α-Ergokryptin	0,05	0,09	0,14
Ergocristin	0,15	0,29	0,44
Ergosinin	0,03	0,06	0,09
Ergotaminin	0,07	0,14	0,21
Ergocorninin	0,01	0,02	0,04
α-Ergokryptinin	0,01	0,02	0,03
Ergocristinin	0,03	0,06	0,09

7.3.2 Bestimmung der Wiederfindungsrate

Die Richtigkeit eines Analysenverfahrens kann über zertifizierte Referenzmaterialien (CRM) bestimmt werden. Da für Mutterkornalkaloide bisher keine CRM zur Verfügung stehen, kann die Wiederfindung als Maß für die Richtigkeit herangezogen werden.

Die Bestimmung der Wiederfindung erfolgte nach Kap. 6.6.1 auf zwei Konzentrationsniveaus, wobei die Summe der sechs bzw. zwölf Alkaloide unter einer potentiellen Höchstmenge von 200 µg/kg entsprechend einem Sklerotiengehalt von 0,01 % liegen sollte. Die Ergebnisse der Wiederfindungsstudie sind in Tabelle 7.4 zusammengefasst und liegen zwischen 59 und 122 %.

Tabelle 7.4: Wiederfindungsraten nach halogenorganischer Extraktion

Analyt	13 µg/kg		27 µg/kg	
	WF [%]	RSD [%]	WF [%]	RSD [%]
Ergometrin	89,2	3,3	59,0	4,9
Ergometrinin	121,1	6,3	109,7	1,8
Ergosin	104,3	5,3	95,0	1,3
Ergotamin	90,2	4,8	78,3	1,4
Ergocornin	113,2	11,4	93,8	1,4
α-Ergokryptin	122,2	9,9	106,5	6,1
Ergocristin	65,7	10,9	96,3	5,2
Ergosinin	122,3	3,4	100,3	1,0
Ergotaminin	108,8	3,8	94,0	4,0
Ergocorninin	95,8	4,2	87,1	2,9
α-Ergokryptinin	92,4	8,5	79,2	4,5
Ergocristinin	89,8	4,4	70,4	3,0

7.3.3 Bestimmung der Präzisionsdaten

Im Rahmen der vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) durchgeführten Laborvergleichsuntersuchung (LVU) wurde begleitend eine Homogenitätsbestimmung (n=6) und eine Stabilitätsprüfung (n=36) durchgeführt. Die Homogenitätsbestimmung wurde unter Wiederholbedingungen mit sechs Analysen an einem Tag durch einen Bearbeiter durchgeführt, die Stabilitätsprüfung, die über einen Zeitraum von neun Wochen mit zwei Doppelbestimmungen pro Woche von zwei Bearbeitern durchgeführt wurde, entspricht der Präzision unter Zwischenbedingungen.

Die Ergebnisse der Wiederholbarkeits- und Homogenitätsstudie sind in Tabelle 7.5 zusammengefasst.

Tabelle 7.5: Ergebnisse der Wiederholbarkeits- und Homogenitätsstudie nach halogenorganischer Extraktion

Analyt	MW [µg/kg]	SD [µg/kg]	RSD [%]	Horrat
Ergometrin	32,9	3,7	11,3	0,5
Ergometrinin	32,0	2,3	7,1	0,3
Ergosin	124,1	5,7	4,6	0,2
Ergotamin	216,8	15,7	7,2	0,3
Ergocornin	168,7	7,1	4,2	0,2
α-Ergokryptin	112,6	4,8	4,3	0,2
Ergocristin	376,7	18,1	4,8	0,2
Ergosinin	48,4	3,6	7,5	0,3
Ergotaminin	93,0	12,0	12,9	0,6
Ergocorninin	67,0	2,2	3,2	0,1
α-Ergokryptinin	27,4	1,0	3,5	0,2
Ergocristinin	99,4	7,7	7,8	0,4

Die Ergebnisse der Stabilitäts- und Präzisionsstudie unter Zwischenbedingungen sind Tabelle 7.6 dargestellt.

Der Analyt Ergometrin zeigt eine besonders hohe Streuung mit einer relativen Standardabweichung (RSD_i) von 34,5 % und einem Horrat-Wert von 1,6.

Tabelle 7.6: Ergebnisse der Stabilitäts- und Präzisionsstudie unter Zwischenbedingungen nach halogenorganischer Extraktion

Analyt	0 Tage [µg/kg]	7 Tage [µg/kg]	14 Tage [µg/kg]	30 Tage [µg/kg]	60 Tage [µg/kg]	MW [µg/kg]	SD _i [µg/kg]	RSD _i [%]	Horrat
Ergometrin	34,5	29,7	50,8	33,9	18,7	33,5	11,6	34,5	1,6
Ergometrinin	33,3	29,6	29,3	29,4	29,3	30,2	1,7	5,7	0,3
Ergosin	124,6	123,2	128,8	132,7	143,7	130,6	8,2	6,3	0,2
Ergotamin	214,5	221,5	230,9	239,2	250,1	231,3	14,1	6,1	0,3
Ergocornin	167,5	171,2	160,8	168,4	178,8	169,3	6,6	3,9	0,2
Ergokryptin	111,8	114,1	108,5	107,9	113,9	111,2	2,9	2,6	0,1
Ergocristin	374,9	380,5	359,1	389,4	411,3	383,0	19,2	5,0	0,2
Ergosinin	50,4	44,4	39,8	41,7	40,6	43,4	4,3	9,9	0,5
Ergotaminin	99,5	80,0	70,1	80,3	76,6	81,3	11,0	13,5	0,6
Ergocorninin	69,9	67,2	62,4	66,9	61,6	65,6	3,5	5,3	0,2
Ergokryptinin	27,9	26,5	25,2	27,2	26,8	26,7	1,0	3,7	0,2
Ergocristinin	103,2	91,8	82,2	90,5	86,1	90,7	7,9	8,7	0,4

7.3.4 Laborvergleichsuntersuchung im Rahmen der Mykotoxin-Arbeitsgruppe nach § 64 LFGB

Im Rahmen der Arbeit der Mykotoxin-Arbeitsgruppe nach § 64 LFGB des BVL wurde 2006 in Zusammenarbeit mit dem BfR eine Laborvergleichsuntersuchung zur Ermittlung des Standes der Analytik durchgeführt. Hierfür wurde ein natürlich kontaminiertes Roggenmehl, das vom Chemischen Veterinär- und Untersuchungsamt Stuttgart zur Verfügung gestellt, mit einem mittleren Gesamtalkaloidgehalt von etwa 1550 µg/kg, entsprechend eines Mutterkorngehaltes von ca. 0,08 % an zehn Laboratorien versendet. Den Teilnehmern stand die Wahl der Analysenmethode frei. Berichtet wurden 13 Ergebnisse, da drei Labore jeweils zwei Ergebnisse basierend auf verschiedenen Analysenmethoden einreichten. Die in der LVU angewendeten Analysenmethoden sind in Tabelle 7.7 genauer charakterisiert.

Tabelle 7.7: Charakterisierung der in der LVU angewandten Analysemethoden

Methoden	Mittelwert [µg/kg]	Anzahl Ergebnisse	pH-Wert Extraktionsmittel	Aufreinigung	Detektion
Saure Direktmeth.	783,0	1	sauer	-	LC-MS/MS
MCX	874,7	1	sauer	Mixed-mode Kationen-austauscher	HPLC-FLD
Klug [Klug, 1986]	1453,0	4	basisch	In situ-Kationenaustauscher	HPLC-FLD
Alox [Müller et al., 2006]	1527,4	3	basisch	Basisches Al ₂ O ₃	HPLC-FLD
SCX [Curtui et al., 2007]	1607,0	1	sauer	Starker Kationenaustauscher	HPLC-FLD
Bas. Direktmeth. 1	1623,0	1	basisch	-	LC-MS/MS
Bas. Direktmeth. 2	2250,5	1	basisch	-	LC-MS/MS
ELISA [Curtui et al., 2007]	2300,0	1	sauer	-	Photometrie

Da eine der angewandten Analysemethoden im Gegensatz zu den anderen Verfahren auf einem immunologischen Analysenprinzip basiert, wird diese im Weiteren nicht näher betrachtet, obwohl sie vergleichbare Ergebnisse erzielt und damit einen wesentlichen Beitrag zur Beurteilung der Richtigkeit der angewandten Analyseverfahren lieferte.

Von den zwölf Chromatographie-basierten Ergebnissen wurden neun durch basische Extraktion erhalten, die übrigen drei Ergebnisse durch saure Extraktion. Die weitere Aufreinigung ist abhängig von den gewählten Extraktionsbedingungen, sofern nicht die LC-MS/MS aufgrund ihrer Selektivität und Sensitivität eine weitere Aufreinigung überflüssig macht.

Wird sauer extrahiert und mittels Fluoreszenzdetektor detektiert, erfolgt die Aufreinigung mittels Kationenaustauscher. Aufgrund der sauren Extraktionsbedingungen liegen die Alkaloide als Salze vor und binden an die funktionellen Gruppen des Kationenaustauschermaterials. Durch Elution im Basischen werden die Alkaloide anschließend in ihre Basenform überführt und damit vom Aufreinigungsmaterial desorbiert.

Ein Sonderfall stellt die Analysemethoden nach Klug dar. Die Extraktion erfolgt zwar im Basischen jedoch wird während der Aufreinigung durch Weinsäureimprägnierung und Ammoniakbegasung ein Kationenaustauschermechanismus angewendet. Durch die Imprägnierung der Diatomeenerde und anschließender Probenaufgabe werden die Mutterkornalkaloide in ihre Salzform, in die entsprechende Tartrate überführt. Die wasserlöslichen Salze werden im Gegensatz zu den unpolaren Matrixbestandteilen durch den Waschschriff mit einem organischen Lösemittelgemisch nicht entfernt. Während der Begasung mit Ammoniak werden die Salze wieder in ihre weniger polare Basenform überführt und können dann mit Dichlormethan eluiert werden [Klug, 1986].

Die Verwendung von basischem Aluminiumoxid nach basischer Extraktion stellt einen Festphasenfiltrationsprozess dar. Die Mutterkornalkaloide treten kaum in Wechselwirkung mit dem Material, während Matrixbestandteile, besonders Fette, an dem Festphasenmaterial adsorbieren.

Bild 7.5 zeigt die anhand der unterschiedlichen Analysemethoden ermittelten Gesamtalkaloidgehalte. Chromatographie-basierte Methoden mit saurer Extraktion sind hellgrau, Methoden mit basischer Extraktion sind dunkelgrau markiert. Da die ELISA-Methode aufgrund ihres Funktionsprinzips mit den anderen Methoden kaum vergleichbar ist, wurde sie weiß markiert. Hier erfolgte die Extraktion im Sauren.

Der in Bild 7.5 dargestellte Vergleich der Analysemethoden zeigt deutlich, dass zwei der sauren Extraktionsmethoden zu deutlich niedrigeren Gesamtalkaloidgehalten führen, die etwa um den Faktor zwei unter dem Gesamtmittelwert von 1550 µg/kg liegen. Im Gegensatz dazu liefert die basische Direktmethode 2 deutlich höhere Gesamtalkaloidgehalte, was möglicherweise auf den nur sehr geringen Ammoniakanteil im Extraktionsmittel (Methanol/konz. Ammoniak, 995/5, v/v) und eine damit verbundene erhöhte Coextraktion von Matrixbestandteilen zurückzuführen ist.

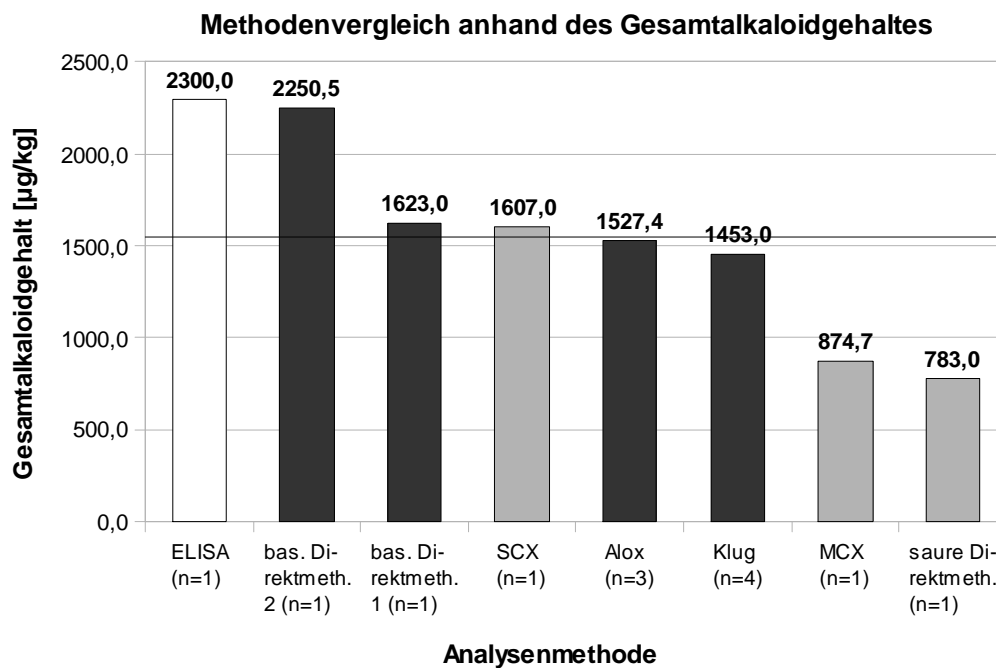


Bild 7.5: Vergleich der in der LVU angewendeten Analysemethoden anhand des Gesamtalkaloidgehaltes

Die weiteren drei basischen und die eine saure Extraktionsmethode zeigen dem mittleren Gesamtalkaloidgehalt sehr ähnliche Ergebnisse zwischen 1453 und 1623 µg/kg.

In Tabelle 7.8 sind die Ergebnisse der einzelnen Alkaloide sowie die mit der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methode erreichten z-Scores dargestellt.

Grundlage für die klassische Auswertung nach DIN ISO 5725-2 ist die Normalverteilung der Ergebnisse [DIN ISO 5725-2, 2002]. Der χ^2 -Test ergab für die vorliegenden Werte jedoch, dass keine Normalverteilung vorliegt. Daher wurde zur weiteren Auswertung ein robustes Modell nach DIN 38402-45 (Huber-Schätzer und Q-Methode [DIN 38402-45, 2003]) gewählt, in dem eine Wichtung der Werte vorgenommen wird und als potentielle Ausreißer klassifizierte Werte keinen quadratischen Einfluss auf das Ergebnis haben.

Tabelle 7.8: Ergebnisse der Laborvergleichsuntersuchung der § 64 LFGB-AG „Mykotoxine“ zur Bestimmung von Mutterkornalkaloiden in Roggenmehl

Analyt	n	MW [µg/kg]	Median [µg/kg]	SD _i [µg/kg]	RSD _i [%]	Horrat	z-Score
Ergometrin	13	104,8	115,5	54,8	52,3	2,3	-1,1
Ergometrinin	12	47,7	42,2	18,4	38,6	1,5	-0,9
Ergosin	12	113,4	121,7	31,9	28,2	1,3	0,5
Ergotamin	13	224,7	244,5	75,4	33,5	1,7	0,1
Ergocornin	13	138,5	148,5	67,2	48,5	2,3	0,4
α-Ergokryptin	13	84,5	77,0	37,7	44,6	1,9	0,6
Ergocristin	13	273,5	286,0	150,8	55,1	2,8	0,6
Ergosinin	12	57,8	52,8	22,2	38,4	1,6	-0,6
Ergotaminin	12	102,4	95,9	48,7	47,6	2,1	-0,5
Ergocorninin	12	72,9	70,5	23,8	32,7	1,4	-0,3
α-Ergokryptinin	12	57,2	53,8	33,9	59,3	2,4	-0,9
Ergocristinin	12	108,6	101,5	48,6	44,7	2,0	-0,3

Entsprechend der DIN 38402-45 gelten z-Scores mit Beträgen ≤ 2 als ausreichend bzw. zufriedenstellend, z-Scores mit Beträgen zwischen 2 und 3 als fragwürdig und z-Scores mit Beträgen größer als 3 als unzureichend.

Mit der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methode wurden in der LVU z-Scores zwischen -1,1 und 0,6 erreicht. Dieses Ergebnis kann als sehr gut beurteilt werden, wobei zu berücksichtigen ist, dass die Vergleichsstandardabweichung über alle Labore groß ist, was sich in Horrat-Werten teilweise über 2 niederschlägt und möglicherweise zu Verzerrungen der z-Scores führt.

7.4 Aufreinigung nach nicht-halogenorganischer Extraktion (Alox-Methode)

Die Durchführung der getesteten Analysenmethode ist in Kap. 6.3.2 und im Anhang beschrieben.

7.4.1 Bestimmung der analytischen Grenzen nach DIN 32645 für Lebensmittel

Die Bestimmung der analytischen Grenzen erfolgte nach DIN 32645 [DIN 32645, 2008] durch Untersuchung eines unbelasteten, gemahlten Roggenmaterials in Zehnfachbestimmung nach o. g. Methode. Zur Detektion wurden das HPLC-FLD- bzw. LC-MS/MS-System verwendet. Das genaue Vorgehen ist in Kap. 6.5.2 beschrieben. In Tabelle 7.9 sind die analytischen Grenzen der Methode zusammengefasst.

Tabelle 7.9: Analytische Grenzen nach DIN 32645 (Leerwertmethode) nach nicht-halogenorganischer Extraktion (Alox-Methode) für Lebensmittel

Analyt	Nachweisgrenze [µg/kg]	Erfassungsgrenze [µg/kg]	Bestimmungsgrenze [µg/kg]
HPLC-FLD			
Ergometrin	1,10	2,20	3,30
Ergometrinin	0,18	0,36	0,55
Ergosin	0,19	0,37	0,55
Ergotamin	0,19	0,37	0,56
Ergocornin	0,07	0,13	0,19
α-Ergokryptin	0,05	0,09	0,14
Ergocristin	0,02	0,06	0,08
Ergosinin	0,06	0,11	0,18
Ergotaminin	0,04	0,09	0,13
Ergocorninin	0,05	0,10	0,16
α-Ergokryptinin	0,03	0,06	0,09
Ergocristinin	0,29	0,59	0,88
LC-MS/MS			
Ergometrin	0,14	0,28	0,47
Ergometrinin	0,09	0,18	0,31
Ergosin	0,12	0,24	0,40
Ergotamin	0,11	0,22	0,38
Ergocornin	0,09	0,18	0,30
α-Ergokryptin	0,10	0,20	0,34
Ergocristin	0,23	0,46	0,78
Ergosinin	0,20	0,40	0,68
Ergotaminin	0,08	0,16	0,28
Ergocorninin	0,17	0,34	0,55
α-Ergokryptinin	0,14	0,28	0,46
Ergocristinin	0,25	0,50	0,83

Zur weiteren Überprüfung der Eignung der Methode wurden die Nachweis- und Bestimmungsgrenze entsprechend der DIN 32645 - Kalibriermethode aus den Wiederfindungsversuchen (s. Kap. 6.6.2) für die HPLC-FLD extrapoliert ($\alpha = 0,01$, $k = 3$). Hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, dass der kalibrierte Bereich zwischen 25 und 125 µg/kg entsprechend den Anforderungen für die Bestimmung der Wiederfindung gewählt wurde und zur exakten Ableitung der analytischen Grenzen zu hoch ist. Korrekterweise sollte der kalibrierte Bereich zwischen der Nachweisgrenze und der zehnfachen Nachweisgrenze liegen [Funk et al., 2005]. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7.10 dargestellt.

Tabelle 7.10: Analytische Grenzen nach DIN 32645 (Kalibriermethode) nach nicht-halogenorganischer Extraktion für Lebensmittel

Analyt	Nachweisgrenze [µg/kg]	Erfassungsgrenze [µg/kg]	Bestimmungsgrenze [µg/kg]
HPLC-FLD			
Ergometrin	8,1	16,2	25,5
Ergotamin	18,9	27,7	57,6
Ergocornin	11,9	23,7	36,5
α-Ergokryptin	18,7	27,3	55,9
Ergocristin	22,3	44,7	66,5
LC-MS/MS			
Ergometrin	11,9	23,9	33,8
Ergotamin	5,2	10,5	15,8
Ergocornin	14,8	29,6	39,5
α-Ergokryptin	9,5	19,0	26,9
Ergocristin	7,3	14,6	21,4

7.4.2 Bestimmung der analytischen Grenzen nach DIN 32645 für Futtermittel

Die Vorgehensweise und die verwendete Kraffuttermischung zur Bestimmung der analytischen Grenzen für Futtermittel ist in Kap. 6.5.2 beschrieben. Die Detektion erfolgte mittels HPLC-FLD. Tabelle 7.11 gibt die ermittelten analytischen Grenzen wieder.

Tabelle 7.11: Analytische Grenzen nach DIN 32645 (Leerwertmethode) nach nicht-halogenorganischer Extraktion für Futtermittel

Analyt	Nachweisgrenze [µg/kg]	Erfassungsgrenze [µg/kg]	Bestimmungsgrenze [µg/kg]
Ergometrin	0,99	1,99	2,98
Ergosin	0,50	0,99	1,48
Ergotamin	0,55	1,10	1,65
Ergocornin	0,37	0,74	1,11
α-Ergokryptin	0,08	0,16	0,25
Ergocristin	0,04	0,08	0,12

7.4.3 Bestimmung der Wiederfindungsrate

7.4.3.1 Wiederfindung nach nicht-halogenorganischer Extraktion (Alox-Methode) mittels HPLC-FLD in Lebensmitteln

Die Wiederfindungen waren im getesteten Bereich lineare Funktionen der Konzentration, was durch eine Residuenanalyse und eine Mandel-Anpassungstest überprüft wurde. Sie lagen zwischen 89,3 (Ergotamin) und 99,8 % (α-Ergokryptin). Die Ergebnisse der Wiederfindungsversuche sind in Bild 7.6 dargestellt. Die Diagramme zeigen die Soll-Konzentration aufgetragen über der Ist-Konzentration. Die Fehlerindikatoren entsprechend der Standardabweichung in µg/kg.

7.4.3.2 Wiederfindung nach nicht-halogenorganischer Extraktion (Alox-Methode) mittels LC-MS/MS in Lebensmitteln

Zur Bestimmung der Wiederfindung wurde in Analogie zu Kap. 6.6.2 ein unbelastetes Material (gemahlener Roggen) in vier äquidistanten Schritten aufdotiert.

Tabelle 7.12 gibt die Wiederfindungsraten ausgewertet gegen die Standard- ($WF_{\text{Standarkal}}$) und gegen die Matrixkalibrierung ($WF_{\text{Matrixkal}}$) für die Quantifizierungsspuren wieder.

Tabelle 7.12: Wiederfindungsraten der Methode nach nicht-halogenorganischer Extraktion mit LC-MS/MS

Analyt	$WF_{\text{Standarkal}}$ [%]	$WF_{\text{Matrixkal}}$ [%]
Ergometrin	70,5	80,9
Ergotamin	82,5	77,3
Ergocornin	92,2	80,4
α-Ergokryptin	106,5	92,7
Ergocristin	104,5	95,4

Bild 7.7 zeigt den Vergleich zwischen Standardkalibrierung sowie Matrix- und Wiederfindungskalibrierung für die Quantifizierungsübergänge exemplarisch nach Alox-Aufreinigung. Die Steigungen der Kalibrierfunktionen sind in Tabelle 7.13 dargestellt.

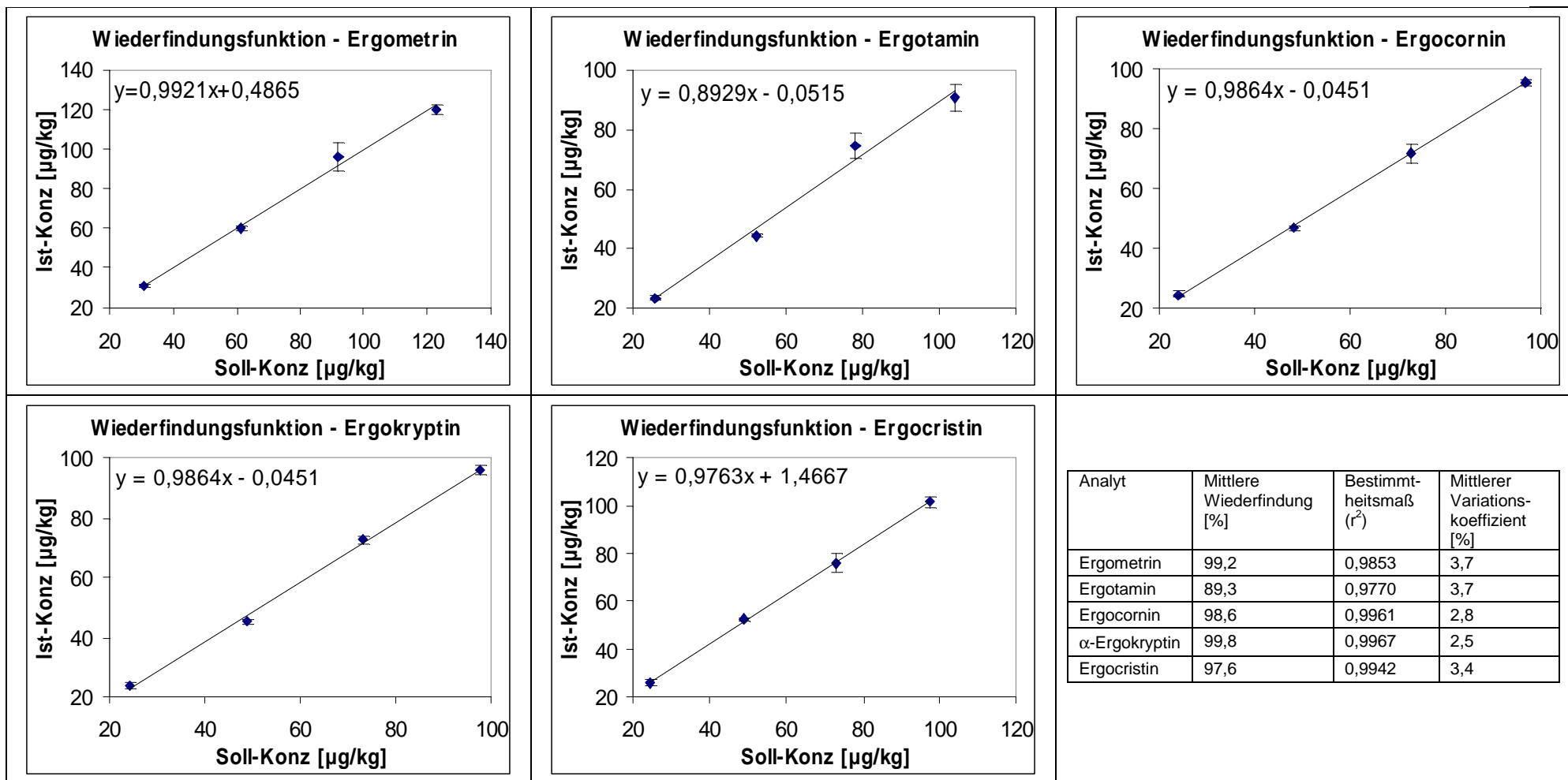


Bild 7.6: Regressionsgeraden der Wiederfindungsfunktionen verschiedener Ergotalkaloide nach nicht-halogenorganischer Extraktion mit HPLC-FLD

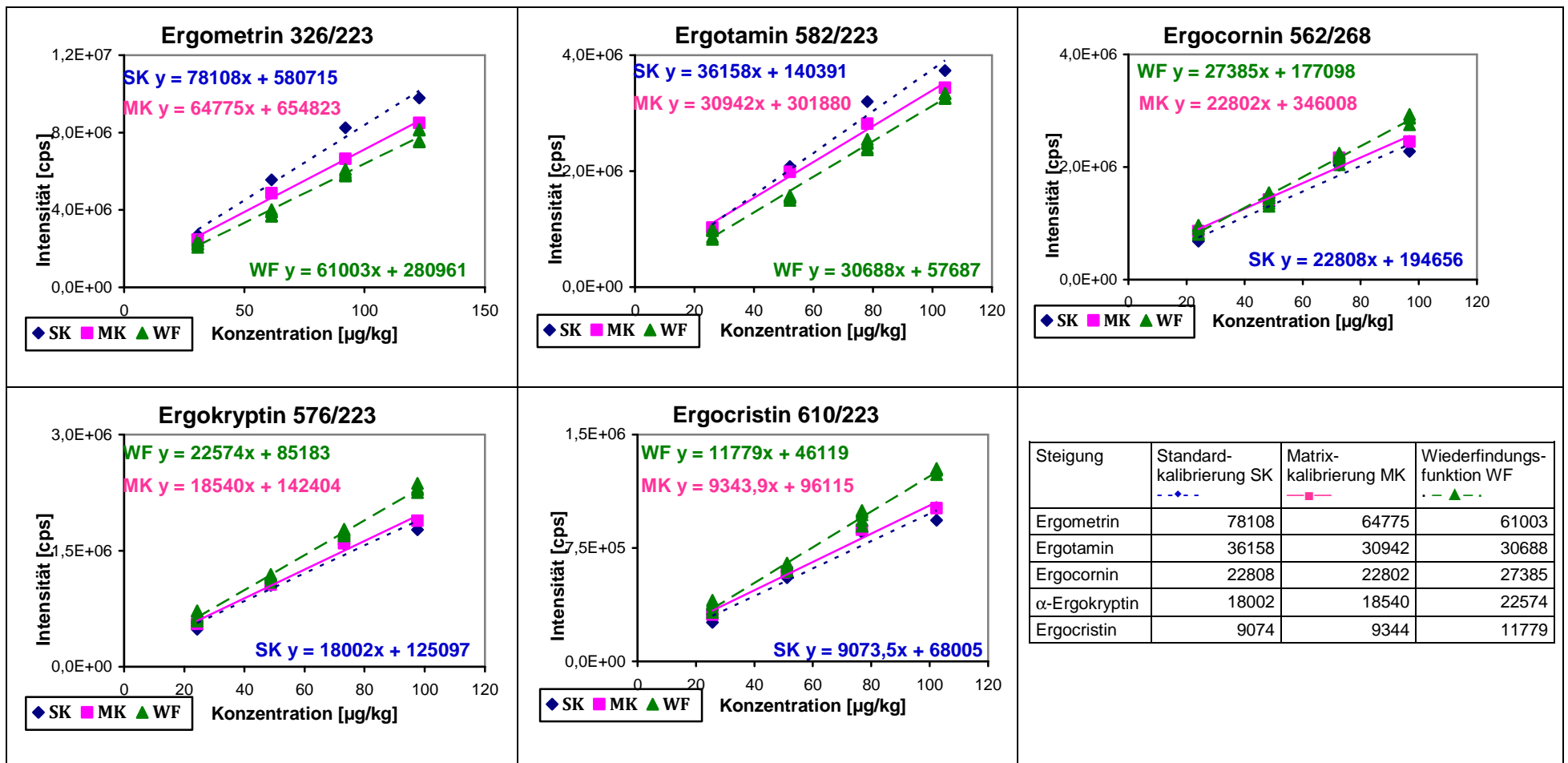


Bild 7.7: Vergleich zwischen Standardkalibrierung sowie Matrix- und Wiederfindungskalibrierung mit Alox-Aufreinigung und LC-MS/MS-Detektion

Tabelle 7.13: Vergleich der Steigungen der Kalibrierfunktionen für die Alox-Methode

Steigung	Standardkalibrierung	Matrixkalibrierung	Wiederfindungskalibrierung
Ergometrin	78108	64775	61003
Ergotamin	36158	30942	30688
Ergocornin	22808	22802	27385
α -Ergokryptin	18002	18540	22574
Ergocristin	9074	9344	11779

Die Methodenwiederfindung entspricht der Prozesseffizienz und errechnet sich aus dem Verhältnis von Wiederfindungskalibrierung zu Standardkalibrierung.

Zur Berechnung der Extraktionsausbeute werden die Schritte Wiederfindungs- und Matrixkalibrierung in Relation gesetzt (s. Bild 7.7).

Durch Vergleich des Signals (hier den Steigungen als mittlere Signale über den Kalibrierbereich) der Standardkalibration mit der Matrixkalibration lässt sich der Matrixeffekt als prozentuale Abweichung von der Standardkalibrierung berechnen. Dieser gibt an, wie stark der Matrixeinfluss auf die Ionisation der Analyten in der Ionenquelle des LC-MS/MS ist. Idealerweise sollte die Summe aus Extraktionsausbeute und Matrixeffekt nahezu die Prozesseffizienz ergeben [Taylor, 2006]. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass es sich hierbei nur um eine näherungsweise Schätzung handelt, da nur die Steigungen, nicht aber die y-Achsenabschnitte eingerechnet wurden. Die verbindlichen Wiederfindungen sind in Tabelle 7.12 dargestellt.

Der Vergleich der Steigungen der Funktionen zeigt, dass es bei den Quantifizierungsübergängen der Alkaloide Ergometrin und Ergotamin zu deutlichen Suppressionseffekten und bei Ergokryptin und Ergocristin zu geringen Promotionseffekten kommt. Bei Ergocornin, Ergokryptin und Ergocristin kommen weder signalsuppressive noch signalpromovierende Effekte in der Ionenquelle zum Tragen, die Steigungen der Geraden für die Standard- und die Matrixkalibrierung sind nahezu identisch. Allerdings liegt die Extraktionseffizienz in allen drei Fällen bei etwa 120 %, was auf eine Coextraktion von Matrixbestandteilen hindeutet.

Die Methodenwiederfindung/Prozesseffizienz, Extraktionsausbeute und der Matrixeffekt der Alox-Methode sind für die Quantifizierungsübergänge der fünf untersuchten Alkaloide in Tabelle 7.14 dargestellt.

Tabelle 7.14: Prozesseffizienz, Extraktionsausbeute und Matrixeffekt der Alox-/LC-MS/MS-Analysenmethode

Analyt	Prozesseffizienz/Wiederfindung [%]	Extraktionsausbeute [%]	Matrixeffekt [%]
Ergometrin	78,1	94,2	-17,1
Ergotamin	84,9	99,2	-14,4
Ergocornin	120,1	120,1	0,0
α -Ergokryptin	125,4	121,8	+3,0
Ergocristin	129,8	126,1	+3,0

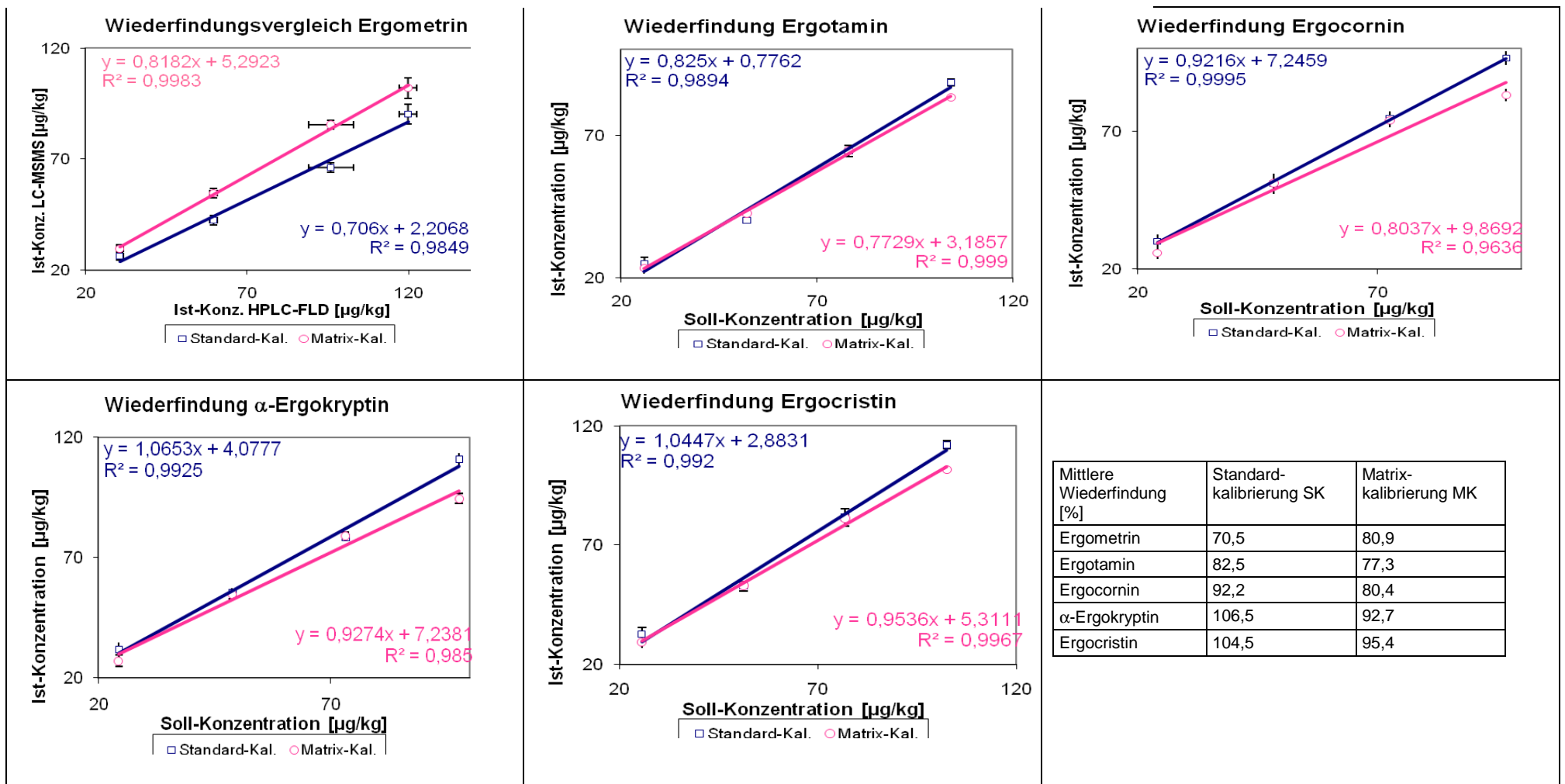


Bild 7.8: Wiederfindungsfunktionen nach Alox-Aufreinigung und LC-MS/MS-Detektion

7.4.3.3 Wiederfindung nach nicht-halogenorganischer Extraktion (Alox-Methode) mittels HPLC-FLD in Futtermitteln

Die Bestimmung der Wiederfindung erfolgte nach Kap. 6.6.3 in einem Konzentrationsbereich von 50 bis 650 µg/kg mit fünf Konzentrationsniveaus (drei Wiederholbestimmungen)

Die mittleren Wiederfindungen und Variationskoeffizienten sind in Tabelle 7.15 dargestellt.

Tabelle 7.15: Wiederfindungen von fünf Mutterkornalkaloiden in Futtermitteln

Analyt	WF [%]	RSD [%]
Ergometrin	80,0	4,5
Ergotamin	78,9	3,8
Ergocornin	94,9	1,8
α-Ergokryptin	93,6	2,3
Ergocristin	74,2	2,2

7.4.4 Bestimmung der Präzisionsdaten

Die Bestimmung der Präzision unter Wiederhol- (n=10) und Zwischenbedingungen (n=18) wurde wie in Kap. 6.7.2 beschrieben durchgeführt.

Alle Präzisionsdaten wurden auf Normalverteilung (R/s- und David-Test), Ausreißer (Grubbs-Test) und Trends (Neumann-Test) unter Zugrundelegen eines α -Fehlers von 1 % getestet.

Die in der Präzisionsstudie ermittelten Mittelwerte und Standardabweichungen für die Alox-HPLC-FLD-Methode sind in Bild 7.9 und für die Alox/LC-MS/MS-Methode in Bild 7.10 dargestellt.

Zur weiteren Beurteilung der Präzisionsdaten wurden Variationskoeffizienten sowie Horrat-Werte, modifiziert nach Thompson, berechnet [Thompson und Lowthian, 1997; Thompson, 2000 a]. Diese sind in Tabelle 7.16 und Tabelle 7.17 dargestellt.

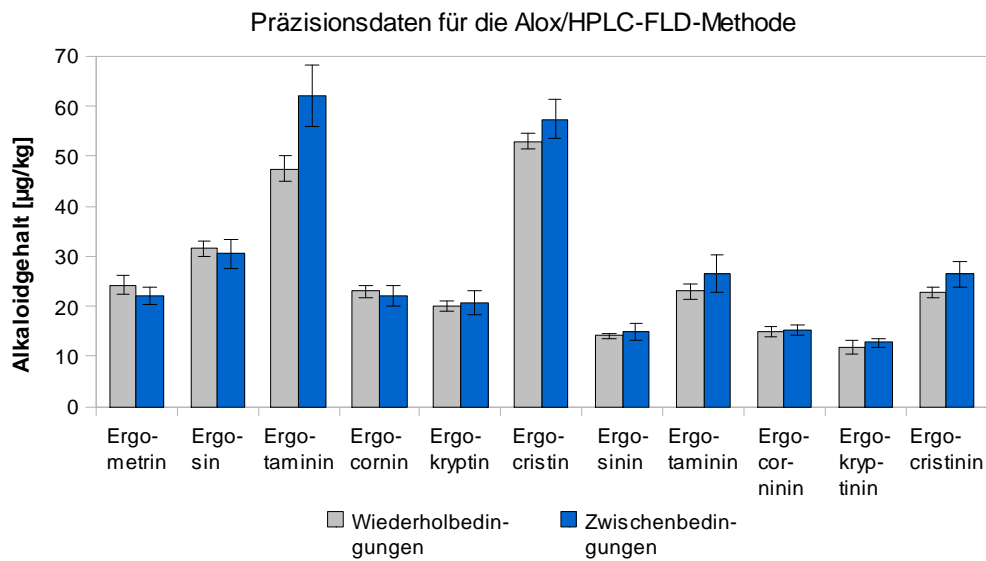


Bild 7.9: Vergleich der Präzisionsdaten unter Wiederhol- und Zwischenbedingungen der Alox-/HPLC-FLD-Methode

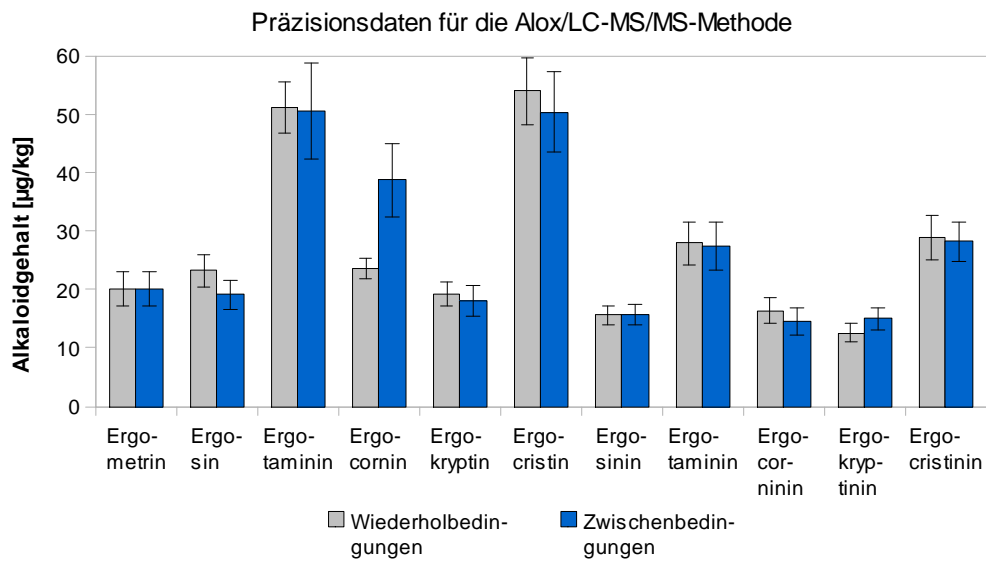


Bild 7.10: Vergleich der Präzisionsdaten unter Wiederhol- und Zwischenbedingungen der Alox-/LC-MS/MS-Methode

Tabelle 7.16: Präzisionsdaten für die Alox/HPLC-FLD-Methode

Analyt	MW [µg/kg]	RSD [%]	Horrrat
Wiederholbedingungen			
Ergometrin	24,3	7,4	0,3
Ergosin	31,5	5,1	0,2
Ergotamin	47,5	5,5	0,3
Ergocornin	23,0	4,8	0,2
α-Ergokryptin	20,0	5,6	0,3
Ergocristin	53,0	2,8	0,1
Ergosinin	14,1	4,4	0,2
Ergotaminin	23,0	6,5	0,3
Ergocorninin	14,9	6,5	0,3
α-Ergokryptinin	11,7	12,4	0,6
Ergocristinin	22,8	4,6	0,2
Zwischenbedingungen			
Ergometrin	22,2	7,7	0,4
Ergosin	30,5	9,8	0,4
Ergotamin	62,1	9,8	0,4
Ergocornin	22,1	8,4	0,4
α-Ergokryptin	20,7	10,9	0,5
Ergocristin	57,4	6,8	0,3
Ergosinin	14,9	12,1	0,5
Ergotaminin	26,5	14,9	0,7
Ergocorninin	15,3	6,5	0,3
α-Ergokryptinin	12,8	6,7	0,3
Ergocristinin	26,4	9,6	0,4

Tabelle 7.17: Präzisionsdaten für die Alox-/LC-MS/MS-Methode

Analyt	MW [µg/kg]	RSD [%]	Horrrat
Wiederholbedingungen			
Ergometrin	20,1	14,7	0,7
Ergosin	23,2	11,9	0,5
Ergotamin	51,2	8,8	0,4
Ergocornin	23,6	7,6	0,3
α-Ergokryptin	19,3	10,9	0,5
Ergocristin	54,0	10,5	0,6
Ergosinin	15,6	10,0	0,6
Ergotaminin	27,9	12,8	0,6
Ergocorninin	16,4	12,9	0,6
α-Ergokryptinin	12,5	12,6	0,6
Ergocristinin	29,0	12,8	0,6
Zwischenbedingungen			
Ergometrin	20,1	14,2	0,6
Ergosin	19,1	12,4	0,6
Ergotamin	50,5	16,2	0,7
Ergocornin	28,8	16,2	0,7
α-Ergokryptin	18,0	14,6	0,7
Ergocristin	50,4	13,7	0,6
Ergosinin	15,7	11,1	0,5
Ergotaminin	27,4	14,5	0,7
Ergocorninin	14,5	16,1	0,7
α-Ergokryptinin	15,0	13,6	0,6
Ergocristinin	28,2	11,9	0,5

7.5 Aufreinigung nach nicht-halogenorganischer Extraktion (LC-MS/MS-Schnellmethode)

Die Durchführung der getesteten Analysenmethode ist in Kap. 6.3.3 und im Anhang beschrieben.

7.5.1 Bestimmung der analytischen Grenzen nach DIN 32645 für Lebensmittel

Die Bestimmung der analytischen Grenzen erfolgte nach DIN 32645 [DIN 32645, 2008] durch Untersuchung eines unbelasteten, gemahlene Roggenmaterials in Zehnfachbestimmung nach o. g. Methode mit anschließender LC-MS/MS-Technik. Das genaue Vorgehen ist in Kap. 6.5.2 beschrieben. In Tabelle 7.18 sind die analytischen Grenzen der Methode zusammengefasst.

Tabelle 7.18: Analytische Grenzen nach DIN 32645 (Leerwertmethode) nach nicht-halogenorganischer Extraktion (LC-MS/MS-Schnellmethode) für Lebensmittel

Analyt	Nachweisgrenze [µg/kg]	Erfassungsgrenze [µg/kg]	Bestimmungsgrenze [µg/kg]
Ergometrin	0,93	1,86	2,79
Ergometrinin	0,23	0,45	0,68
Ergosin	0,17	0,34	0,51
Ergotamin	0,17	0,34	0,50
Ergocornin	0,20	0,39	0,59
α-Ergokryptin	0,10	0,20	0,30
Ergocristin	0,31	0,61	0,92
Ergosinin	0,27	0,55	0,82
Ergotaminin	0,09	0,18	0,27
Ergocorninin	0,26	0,52	0,78
α-Ergokryptinin	0,33	0,66	0,99
Ergocristinin	0,40	0,79	1,19

Auch hier wurden zur weiteren Überprüfung der Eignung der Methode die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen entsprechend der DIN 32645-Kalibriermethode aus den Wiederfindungsversuchen (s. Kap. 6.6.2) extrapoliert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7.19 dargestellt.

Tabelle 7.19: Analytische Grenzen nach DIN 32645 (Kalibriermethode) nach nicht-halogenorganischer Extraktion (LC-MS/MS-Schnellmethode) für Lebensmittel

Analyt	Nachweisgrenze [µg/kg]	Erfassungsgrenze [µg/kg]	Bestimmungsgrenze [µg/kg]
Ergometrin	12,5	25,0	34,9
Ergotamin	26,3	52,5	66,9
Ergocornin	17,4	34,9	45,3
α-Ergokryptin	16,0	32,0	42,1
Ergocristin	20,6	41,3	53,1

7.5.2 Bestimmung der Wiederfindungsrate

Zur Bestimmung der Wiederfindung wurde in Analogie zu Kap. 6.6.2 ein unbelastetes Material (gemahlener Roggen) in vier äquidistanten Schritten aufgestockt und mit je vier Wiederholungen analysiert. Zudem wurde wie in Bild 6.2 dargestellt eine Matrixkalibrierung durchgeführt, da die LC-MS/MS-Technik für Matrixeffekte in der Ionenquelle besonders empfindlich ist und auf diese Weise Suppressions- und Promotionseffekte ausgeglichen werden können.

Tabelle 7.20 gibt die Wiederfindungsraten ausgewertet gegen die Standard- ($WF_{\text{Standarkal}}$) und gegen die Matrixkalibrierung ($WF_{\text{Matrixkal}}$) für die Quantifizierungsspuren wieder.

Tabelle 7.20: Wiederfindungsraten der LC-MS/MS-Schnellmethode nach nicht-halogenorganischer Extraktion

Analyt	$WF_{\text{Standarkal}}$ [%]	$WF_{\text{Matrixkal}}$ [%]
Ergometrin	101,2	119,0
Ergotamin	59,4	109,3
Ergocornin	45,7	73,6
α -Ergokryptin	61,3	80,1
Ergocristin	47,1	66,3

Die Steigungen der Standard-, Matrix- und Wiederfindungskalibrierfunktionen sind in Bild 7.11 und Tabelle 7.21 dargestellt.

Tabelle 7.21: Vergleich der Steigungen der Kalibrierfunktionen für die LC-MS/MS-Schnellmethode

Steigung	Standard- kalibrierung	Matrix- kalibrierung	Wiederfindungs- kalibrierung
Ergometrin	78108	62694	72811
Ergotamin	36158	22474	18854
Ergocornin	22808	16686	11491
α -Ergokryptin	18002	14867	10920
Ergocristin	9074	7222	4224

Der Vergleich der Steigungen der Funktionen zeigt, dass es bei den Quantifizierungsübergängen aller fünf untersuchter Mutterkornalkaloide zu sehr deutlichen Suppressionseffekten kommt.

Die Methodenwiederfindung entspricht der Prozesseffizienz und errechnet sich aus dem Verhältnis von Wiederfindungskalibrierung zu Standardkalibrierung.

Zur Berechnung der Extraktionsausbeute werden die Schritte Matrix- und Wiederfindungskalibrierung verglichen.

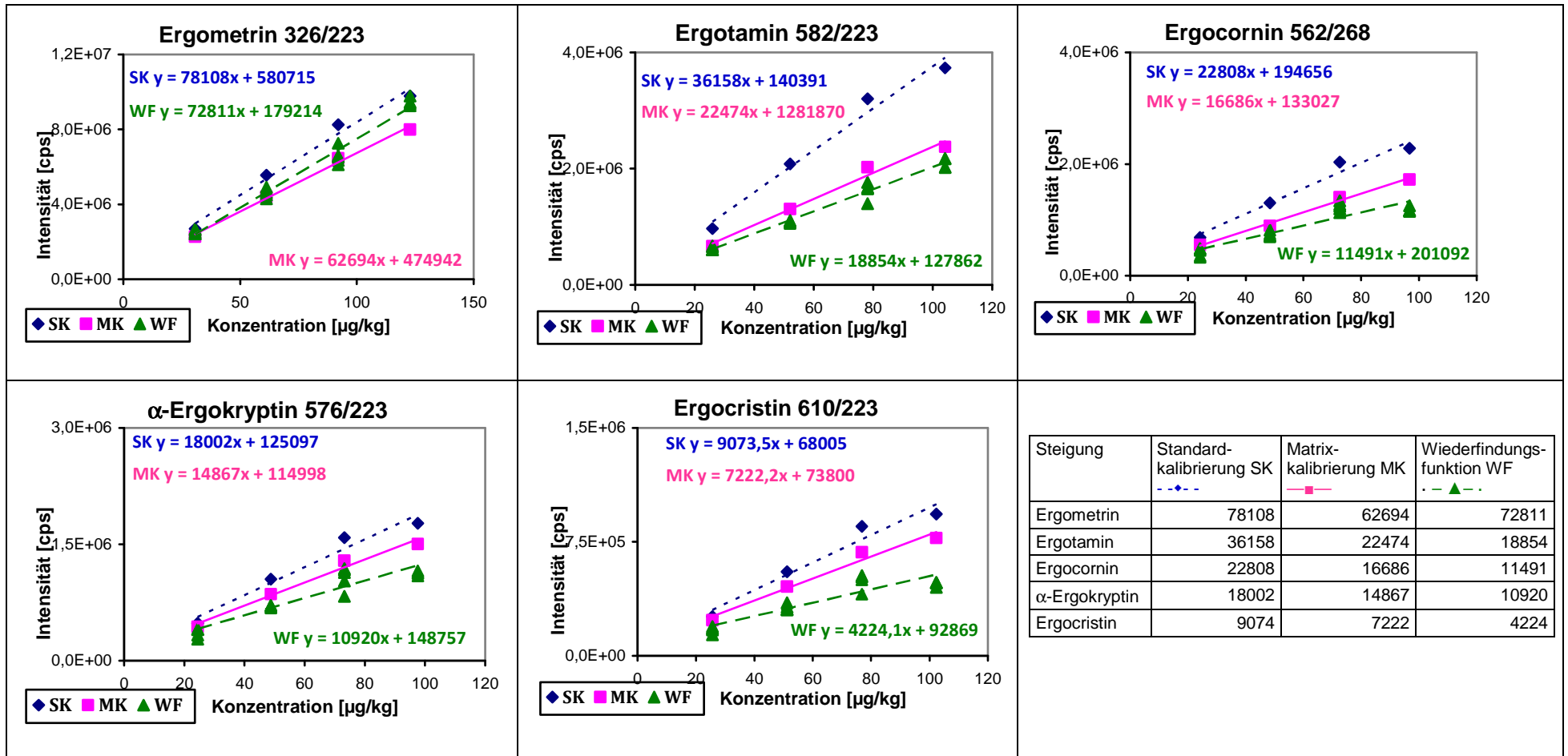


Bild 7.11: Vergleich zwischen Standardkalibrierung sowie Matrix- und Wiederfindungskalibrierung nach der LC-MS/MS-Schnellmethode

Durch Vergleich des Signals (hier den Steigungen als mittlere Signale über den Kalibrierbereich) der Standardkalibration mit der Matrixkalibration lässt sich der Matrixeffekt als prozentuale Abweichung von der Standardkalibrierung berechnen. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass es sich hierbei nur um eine näherungsweise Schätzung handelt, da nur die Steigungen, nicht aber die y-Achsenabschnitte berücksichtigt werden. Die exakt errechneten Wiederfindungen sind in Tabelle 7.20 dargestellt.

Die abgeschätzte Prozesseffizienz/Wiederfindung, Extraktionsausbeute und der Matrixeffekt der LC-MS/MS-Schnellmethode sind für die Quantifizierungsübergänge der fünf untersuchten Alkaloide in Tabelle 7.22 dargestellt.

Tabelle 7.22: Prozesseffizienz, Extraktionsausbeute und Matrixeffekt der LC-MS/MS-Schnellmethode

Analyt	Prozesseffizienz/ Wiederfindung [%]	Extraktions- ausbeute [%]	Matrixeffekt [%]
Ergometrin	93,2	97,3	-19,7
Ergotamin	52,1	83,9	-37,9
Ergocornin	50,4	68,9	-26,8
α -Ergokryptin	60,7	73,5	-17,4
Ergocristin	46,6	58,5	-20,4

7.5.3 Bestimmung der Präzisionsdaten

Die Bestimmung der Präzision unter Wiederhol- (n=10) und Zwischenbedingungen (n=18) wurde wie in Kap. 6.7.2 beschrieben durchgeführt.

Alle Präzisionsdaten wurden geprüft auf Normalverteilung (R/s- und David-Test), Ausreißer (Grubbs-Test) und Trends (Neumann-Test) unter Zugrundelegen eines α -Fehlers von 1 %.

Die in der Präzisionsstudie ermittelten Mittelwerte und Standardabweichungen für die LC-MS/MS-Schnellmethode sind in Bild 7.12 dargestellt.

Zur weiteren Beurteilung der Präzisionsdaten wurden Variationskoeffizienten sowie Horrat-Werte, modifiziert nach Thompson [Thompson und Lowthian, 1997; Thompson, 2000 a], berechnet. Diese sind in Tabelle 7.23 dargestellt.

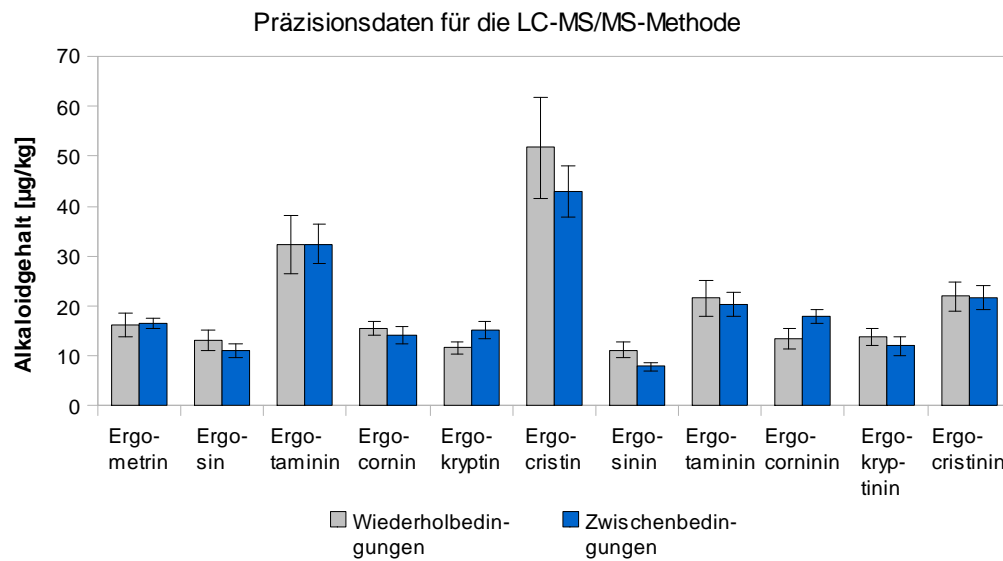


Bild 7.12: Vergleich der Präzisionsdaten unter Wiederhol- und Zwischenbedingungen der LC-MS/MS-Schnellmethode

Tabelle 7.23: Präzisionsdaten für die LC-MS/MS-Schnellmethode

Analyt	MW [µg/kg]	RSD [%]	Horrat
Wiederholbedingungen			
Ergometrin	16,2	14,3	0,6
Ergosin	13,2	15,3	0,7
Ergotamin	32,4	18,2	0,8
Ergocornin	15,5	8,7	0,4
Ergokryptin	11,7	10,6	0,5
Ergocristin	51,7	19,5	0,9
Ergosinin	11,2	13,1	0,6
Ergotaminin	21,6	16,9	0,8
Ergocorninin	13,5	14,5	0,7
Ergokryptinin	13,8	12,3	0,6
Ergocristinin	21,9	12,8	0,6
Zwischenbedingungen			
Ergometrin	16,6	7,0	0,3
Ergosin	11,0	12,6	0,6
Ergotamin	32,4	12,2	0,6
Ergocornin	14,2	11,3	0,5
Ergokryptin	15,1	11,5	0,5
Ergocristin	42,9	11,7	0,5
Ergosinin	7,9	11,7	0,5
Ergotaminin	20,2	11,9	0,5
Ergocorninin	18,0	8,0	0,4
Ergokryptinin	12,1	15,5	0,7
Ergocristinin	21,6	11,4	0,5

7.6 Kreuzvalidierung – Vergleich der verschiedenen Methoden

In der analytischen Chemie wird unter dem Begriff „Kreuzvalidierung“ der Vergleich einer analytischen Methode mit einer Referenzmethode bzw. der Vergleich zwischen zwei Detektionssystemen basierend auf einer Regressionsanalyse verstanden. Hierzu werden die Ergebnisse, die mit dem (neu entwickelten) analytischen Verfahren erzielt wurden, über die Ergebnisse des Referenzverfahrens aufgetragen. Liegt die Steigung bei $a=1$, so treten keine systematischen Fehler auf. Dies ist in der Realität selten der Fall, da es selbst bei Abwesenheit von systematischen Fehlern zum Auftreten von zufälligen Fehlern kommt. Ein Achsenabschnitt von $b=0$ zeigt, dass die Hintergrundsignale (Noise, Rauschen) identisch sind [Hibert und Gooding, 2005].

Bild 7.13 zeigt die Kreuzvalidierung der beiden Detektionssystemen LC-MS/MS und HPLC-FLD für die Alox-Methode. Hierbei wurde die HPLC-FLD-Detektion als Referenzverfahren festgelegt, da es Ziel der vorliegenden Arbeit war, eine Routine-taugliche Analysenmethode mit möglichst geringem apparativem Aufwand zu entwickeln.

Die Ergebnisse der Kreuzvalidierung der weiteren Verfahren sind in Tabelle 7.24 dargestellt. Die LC-MS/MS-Ergebnisse der Alox- und der LC-MS/MS-Schnellmethode wurden auf die Standardkalibrierung bezogen.

Tabelle 7.24: Vergleich der Ergebnisse der Kreuzvalidierung der verschiedenen Aufreinigungs- und Detektionsverfahren

Analyt	Steigung	y-Achsenabschnitt	Bestimmtheitsmaß (r^2)
Vergleich Alox-Methode: Abszisse HPLC-FLD; Ordinate LC-MS/MS			
Ergometrin	0,706	+2,207	0,9849
Ergotamin	0,858	+0,398	0,9853
Ergocornin	0,934	+7,290	0,9999
α -Ergokryptin	1,065	+5,838	0,9901
Ergocristin	1,068	+1,447	0,9886
Vergleich LC-MS/MS: Abszisse Alox-Methode; Ordinate LC-MS/MS-Schnellmethode			
Ergometrin	1,438	-8,347	0,9947
Ergotamin	0,725	-3,907	0,9272
Ergocornin	0,496	+1,104	0,9585
α -Ergokryptin	0,567	+2,969	0,9668
Ergocristin	0,443	+3,200	0,9083
Abszisse Alox-/HPLC-FLD-Methode Ordinate LC-MS/MS-Schnellmethode			
Ergometrin	1,009	-4,665	0,9669
Ergotamin	0,619	-4,003	0,9047
Ergocornin	0,462	+4,767	0,9550
α -Ergokryptin	0,614	+5,643	0,9913
Ergocristin	0,481	+3,329	0,9286

Der Vergleich der zwei Detektionssysteme (HPLC-FLD und LC-MS/MS) nach Alox-Aufreinigung zeigt Steigungen zwischen 0,706 und 1,068. Die Abweichungen von $a=1$ lassen sich durch die signalsuppressiven und signalpromovierenden Effekte erklären, die in Tabelle 7.14 dargestellt sind. Prinzipiell zeigen beide Detektionsverfahren gleichwertig gute Ergebnisse. Durch Quantifizierung mit Matrixkalibration lassen sich die Schwankungen minimieren. Die Steigungen liegen dann zwischen 0,805 und 0,976 (s. Bild 7.13).

Die Abweichungen sind für die Kreuzvalidierung der beiden LC-MS/MS-basierten Methoden wesentlich größer. Die Steigungen liegen zwischen 0,443 und 1,438, und für die Alox-

/HPLC-FLD- und LC-MS/MS-Schnellmethode zwischen 0,481 und 1,009, was sich ebenfalls mit den in Tabelle 7.14 dargestellten Matrixeinflüssen erklären lässt.

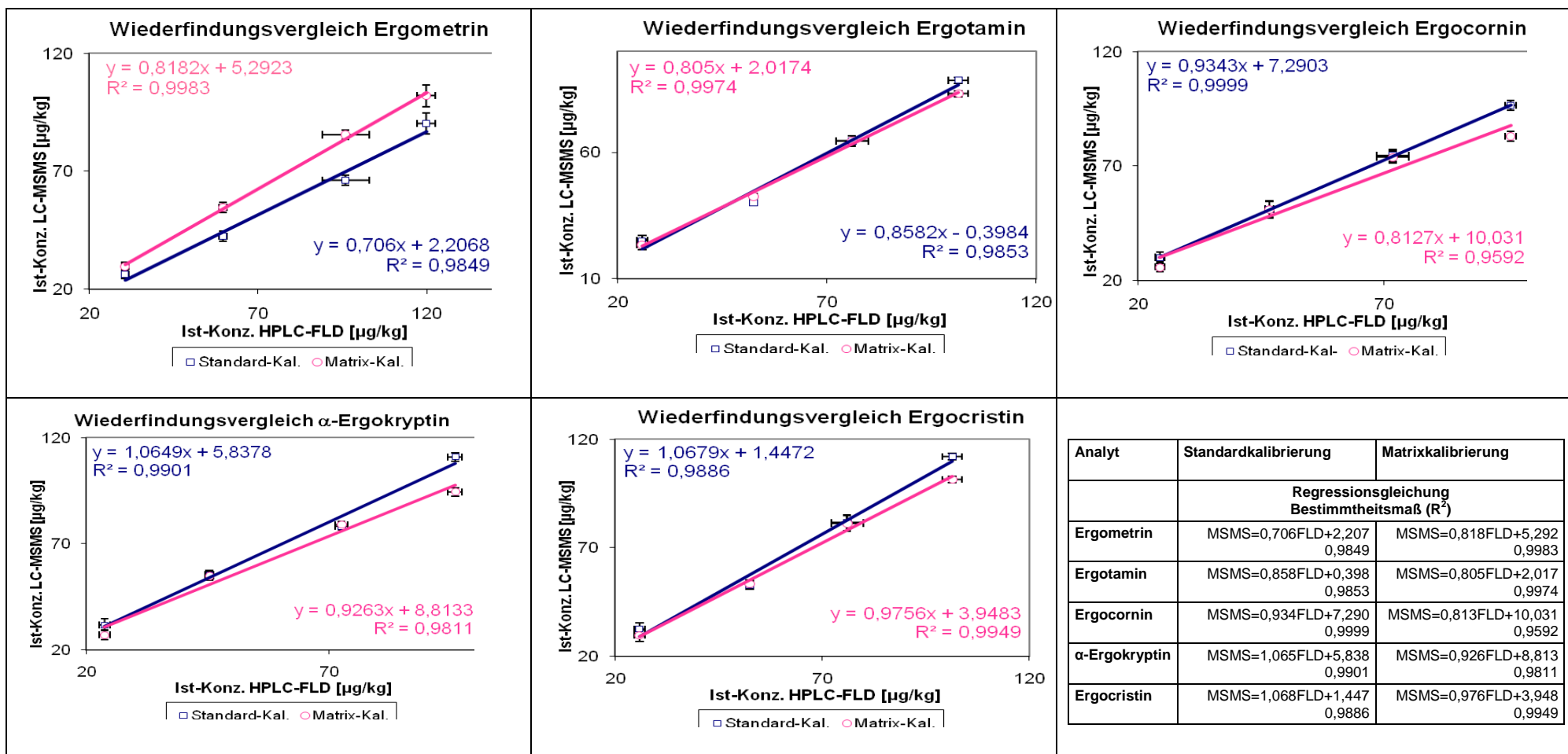


Bild 7.13: Kreuzvalidierung für die Alox-Methode mit den Detektionssystemen HPLC-FLD und LC-MS/MS

7.7 Gehalte in Lebensmitteln

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 130 Lebensmittel mit der Referenzmethode (mit Aufreinigung durch basisches Aluminiumoxid und HPLC-FLD-Analysensystem) auf ihren Gehalt an Mutterkornalkaloiden untersucht. Eine Übersicht der Belastungssituation der analysierten Proben aufgeschlüsselt nach dem ADV-Warenkode ist in Bild 7.14 dargestellt [ADV, 2008]. Der mittlere schwarze Balken des grauen Boxplots entspricht dem Median, die äußeren Balken markieren den Streubereich, charakterisiert durch das untere und obere Quartil. Die Whisker geben die maximalen Gehalte wieder.

Generell liegen die Werte der oberen Quartile unter 100 µg GA/kg, die einzige Ausnahme stellen die Brotvormischungen dar, mit einem oberen Quartil von 170 µg GA/kg. Auffällig sind jedoch die Höchstgehalte der Warengruppen Weizen (250 µg GA/kg), Getreidemehle (450 µg GA/kg) und Getreideschrote (740 µg GA/kg). Dies zeigt, dass die Gesamtbelastung der untersuchten Proben mit Mutterkornalkaloiden gering ist, jedoch auch gekennzeichnet ist durch einige wenige deutlich stärker belastete Proben.

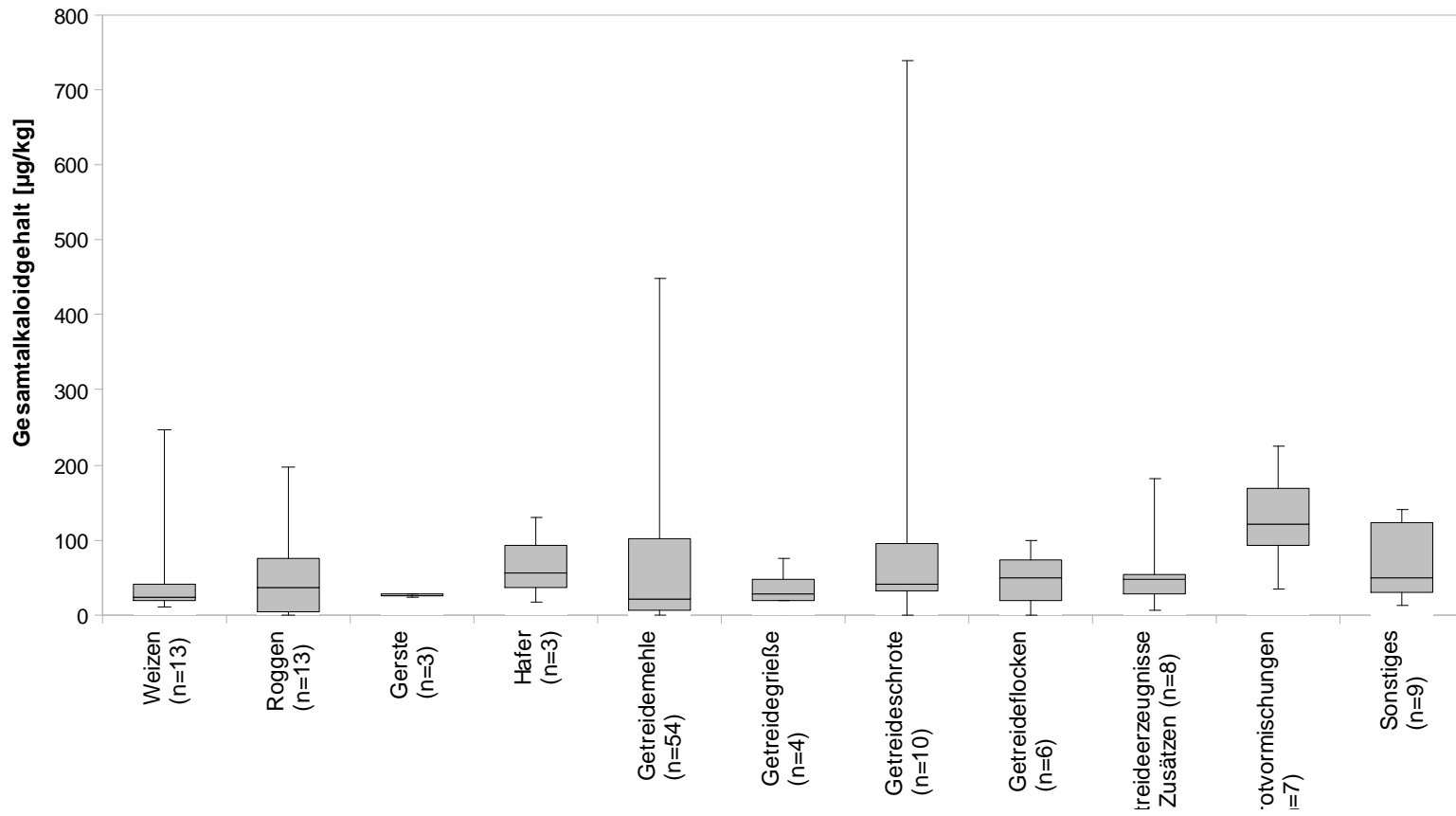


Bild 7.14: Belastung der untersuchten Proben mit Mutterkornalkaloiden, aufgeschlüsselt nach ADV-Warenguppen [ADV, 2008]

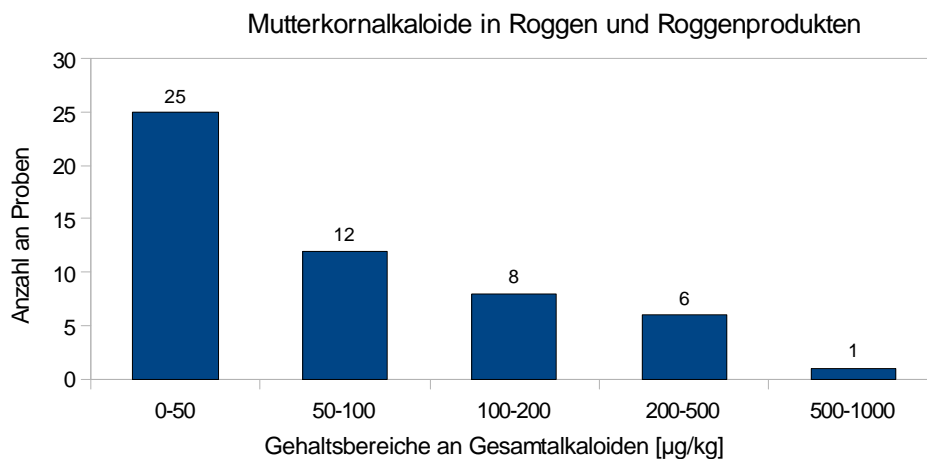


Bild 7.15: Gehaltsbereiche an Gesamtalkaloiden in Roggen und Roggenprodukten (n=52)

In Bild 7.15 ist die Belastungssituation von Roggenprodukten (Roggen, Roggenmehl, Roggenschrot und Roggenflocken) mit Mutterkornalkaloiden dargestellt.

Die früher geltende Höchstmenge der Interventionsrichtlinie [VO (EG) 824/2000, 2000] von 1000 µg GA/kg wird durch keine der untersuchten roggenbasierten Proben überschritten. Der höchste ermittelte Gesamtalkaloidgehalt liegt bei 740 µg/kg, der Mittelwert bei 96,6 µg/kg und der Median bei 62,8 µg/kg. Etwa 50 % der Proben weisen nur Spuren an Mutterkornalkaloiden mit Gehalten unter 50 µg GA/kg auf.

Im Vergleich zu bisher publizierten Belastungsdaten sind die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Mutterkornalkaloidgehalte in Roggen und Roggenprodukten gering. Scott et al. fanden in den Jahren 1985 bis 1991 mittlere Gesamtalkaloidgehalte von 216 µg/kg in 128 Roggenmehlen [Scott et al., 1992]. Lauber et al. analysierten 2003 30 Roggen- und Roggenproduktproben mit einem mittleren Alkaloidgehalt von 818 µg/kg. Im Gegensatz dazu lagen die mittleren Gehalte von 21 Proben im Jahr darauf nur bei 260 µg/kg [Lauber et al., 2005].

Verlässliche Daten zu den toxikologischen Endpunkten von Mutterkornalkaloiden sind kaum vorhanden. Schoch und Schlatter leiteten näherungsweise einen von ihnen als „No Toxic Effect Level“ von 1 µg/kg KG/T ab (s. 5.1.4) [Schoch und Schlatter, 1985].

Werden die Annahmen zugrunde gelegt, dass ein 70 kg schwerer Hochverzehrer (worst case) 250 g Roggenbrot am Tag zu sich nimmt, das zu 100 % aus Roggenmehl mit einem Gesamtalkaloidgehalt von 96,6 µg/kg besteht und einen mittleren Wassergehalt von 40 % aufweist, errechnet sich eine tägliche Aufnahme von 145 µg GA/70 kg KG am Tag oder 2,1 µg GA/kg KG am Tag. Unter Berücksichtigung des Medians reduziert sich dieser Wert auf 1,4 µg GA/kg KG am Tag.

Die mittlere Aufnahmemenge liegt damit um den Faktor 2 über dem „No Toxic Effect Level“, die mediane Aufnahmemenge um den Faktor 1,4.

Hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, dass der Alkaloidgehalt im Brot aufgrund der thermischen Belastung während des Backprozesses deutlich abnimmt [Scott und Lawrence, 1982] und der von Schoch und Schlatter publizierte „No Toxic Effect Level“ nicht systematisch in toxikologischen Studien abgeleitet wurde [Schoch und Schlatter, 1985].

Eine eindeutige Beurteilung der ermittelten Alkaloidgehalte kann entsprechend der Stellungnahme des BfR aus dem Jahr 2004 [BfR, 2004] erst durchgeführt werden, wenn belastbare Daten zu den toxikologischen Endpunkten vorliegen.

Im Sinne des vorbeugenden Gesundheitsschutzes sollte die Belastungssituation von Roggen weiter kritisch beobachtet werden, da das Vorkommen von Mutterkornalkaloiden besonders stark klimatischen Einflüssen unterliegt und daher saisonbedingt sehr variieren kann, wie die Publikation von [Lauber et al., 2005] zeigt: Im Jahr 2003 lag der mittlere Gesamtalkaloidgehalt bei 818 µg/kg und 2004 bei 260 µg/kg.

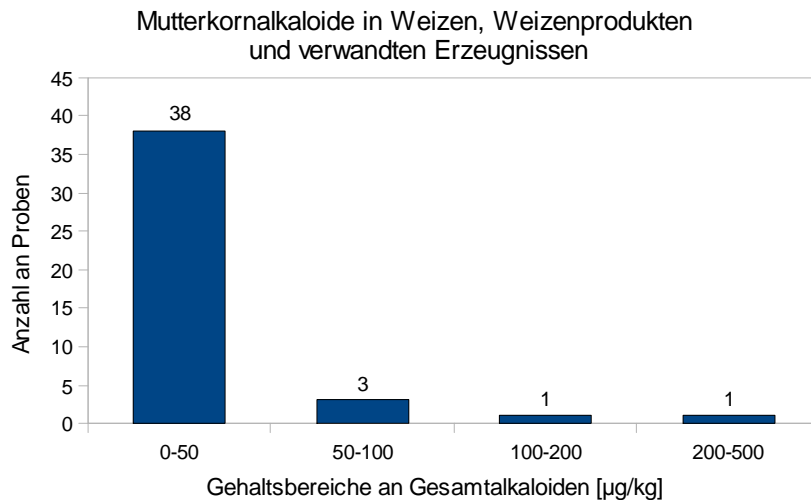


Bild 7.16: Gehaltsbereiche an Gesamtalkaloiden in Weizen und Weizenprodukten und verwandten Produkten (n=45)

In Bild 7.16 ist die Belastungssituation von Weizen, Weizenprodukten (Weizenmehl, Weizenbackschrot) und verwandtem Getreide dargestellt. Die letztgenannte Kategorie beinhaltet nahe Verwandte des Weizens wie Dinkel, Grünkern und Kamut und daraus hergestellte Mehle.

Weizen und Erzeugnisse daraus sind generell geringer mit Mutterkornalkaloiden belastet als Roggen, da die Wahrscheinlichkeit der Infektion mit dem Pilz durch den Selbstbestäubungsmechanismus der Pflanze deutlich reduziert ist. So liegt der höchste ermittelte Gesamtalkaloidgehalt dieser Gruppe bei 246,2 µg/kg, mit einem mittleren Gesamtalkaloidgehalt von 27,1 µg/kg und einem medianen Gesamtalkaloidgehalt von 18,0 µg/kg.

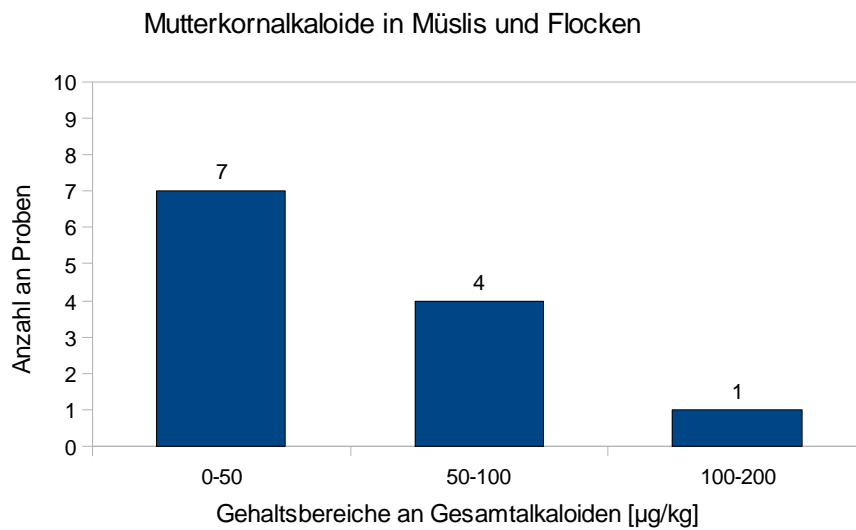


Bild 7.17: Gehaltsbereiche an Gesamtalkaloiden in Müsli und Flocken (n=12)

Ebenfalls sehr unauffällige Alkaloidgehalte wurden in der Produktgruppe der Müslis und Getreideflocken gefunden (Bild 7.17). Der höchste Gesamtalkaloidgehalt lag bei 182,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in einem ballaststoffreichen Müsli, bestehend aus Hafer, Weizen, Roggen, Dinkel und Gerste. Der Mittelwert lag bei 55,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, der Median bei 46,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Ein im Vergleich zur Belastungssituation von Roggen, Weizen und daraus hergestellten Produkten anderes Bild zeichnet sich in der Gruppe der sonstigen Getreide und Mehle (Buchweizen, Gerste, Hafer, Hirse, Mais) ab (s. Bild 7.18). Der höchste ermittelte Gesamtalkaloidgehalt von 213,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ wurde in einem Buchweizenmehl gefunden, der Mittelwert lag bei 96,1 und der Median bei 112,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Mit einer Anzahl von sechs Proben war der Gehaltsbereich von 100 bis 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ am häufigsten vertreten, während bei Roggen und Weizen die meisten Proben Gesamtalkaloidgehalte unter 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ aufwiesen.

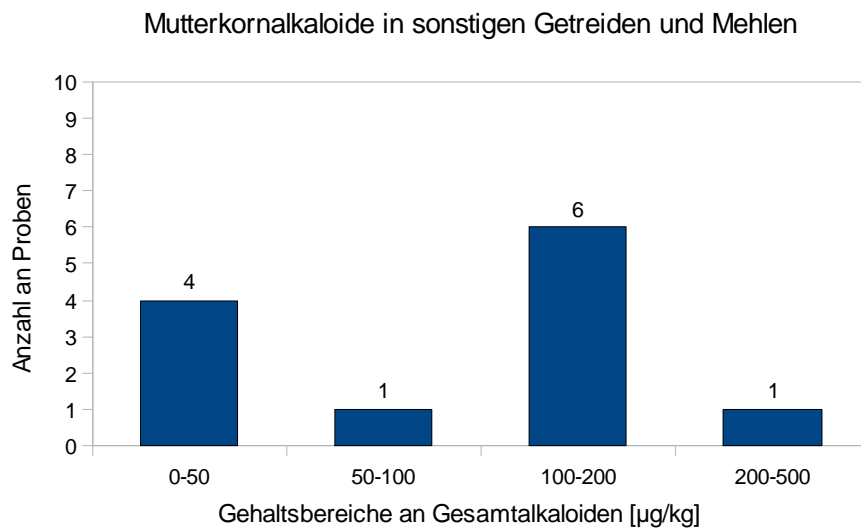


Bild 7.18: Gehaltsbereiche an Gesamtalkaloiden in sonstigen Getreiden und daraus hergestellten Mehlen (n=12)

Eine mögliche Erklärung könnte in dem Befall der Getreide mit dem parasitischen Brandpilz *Ustilago* liegen, der Gerste, Hafer und Mais befällt und ebenfalls in der Lage ist, Mutterkornalkaloide zu bilden. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass eine Stichprobenmenge von 12 zu gering ist um eine signifikante Aussage zu treffen.

Ein ähnliches Bild zeichnet sich auch in der Probengruppe der Brotbackmischungen ab (Bild 7.19). Auch hier weisen die meisten Proben einen Gesamtalkaloidgehalt zwischen 100 und 200 µg/kg auf. Der höchste Gesamtalkaloidgehalt von 224,2 µg/kg wurde in einer amerikanischen Roggenbrotbackmischung gefunden, der Mittelwert lag bei 116,2 und der Median bei 117,7 µg/kg.

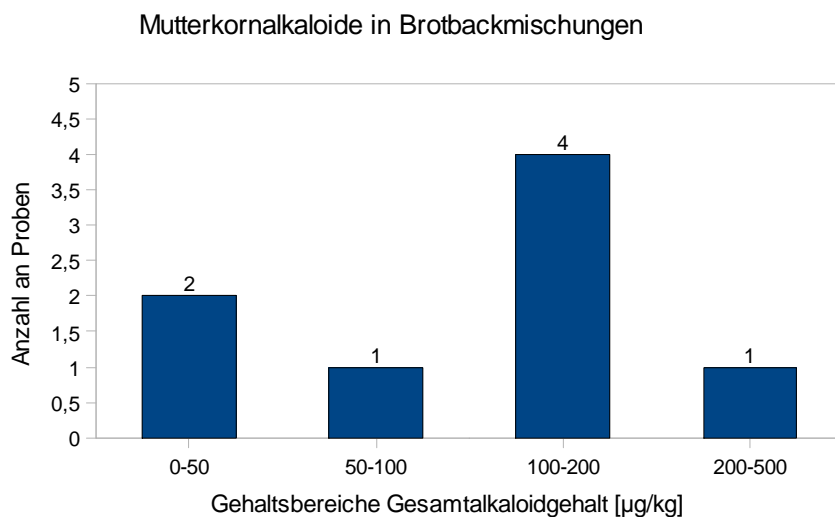


Bild 7.19: Gehaltsbereiche an Gesamtalkaloiden in Brotbackmischungen (n=8)

7.8 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zur besseren Übersicht sind die Ergebnisse der Validierungsstudien zu den im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Analysemethoden in den Tabellen 7.25 bis 7.29 dargestellt

Tabelle 7.25: Validierungsparameter der Analysemethode nach halogenorganischer Extraktion

Analyt	Analytische Grenzen nach DIN 32645			Wiederfindungsrate				Präzision	
	Leerwertmethode			13 µg/kg		27 µg/kg		RSD _r [%]	RSD _i [%]
	NG [µg/kg]	EG [µg/kg]	BG [µg/kg]	WF [%]	RSD [%]	WF [%]	RSD [%]		
Ergometrin	0,46	0,92	1,37	89,2	3,3	59,0	4,9	11,3	34,5
Ergometrinin	0,05	0,10	0,14	121,1	6,3	109,7	1,8	7,1	5,7
Ergosin	0,08	0,16	0,20	104,3	5,3	95,0	1,3	4,6	6,3
Ergotamin	0,07	0,14	0,20	90,2	4,8	78,3	1,4	7,2	6,1
Ergocornin	0,04	0,09	0,12	113,2	11,4	93,8	1,4	4,2	3,9
α-Ergokryptin	0,05	0,09	0,14	122,2	9,9	106,5	6,1	4,3	2,6
Ergocristin	0,15	0,29	0,44	65,7	10,9	96,3	5,2	4,8	5,0
Ergosinin	0,03	0,06	0,09	122,3	3,4	100,3	1,0	7,5	9,9
Ergotaminin	0,07	0,14	0,21	108,8	3,8	94,0	4,0	12,9	13,5
Ergocorninin	0,01	0,02	0,04	95,8	4,2	87,1	2,9	3,2	5,3
α-Ergokryptinin	0,01	0,02	0,03	92,4	8,5	79,2	4,5	3,5	3,7
Ergocristinin	0,03	0,06	0,09	89,8	4,4	70,4	3,0	7,8	8,7

Tabelle 7.26: Validierungsparameter für die Analysemethode nach nicht-halogenorganischer Extraktion (Alox-Methode) mit HPLC-FLD für Lebensmittel

Analyt	Analytische Grenzen nach DIN 32645						Wiederfindung		Präzision	
	Leerwertmethode			Kalibriermethode			WF [%]	RSD [%]	RSD _r [%]	RSD _i [%]
	NG [µg/kg]	EG [µg/kg]	BG [µg/kg]	NG [µg/kg]	EG [µg/kg]	BG [µg/kg]				
Ergometrin	1,10	2,20	3,30	8,1	16,2	25,5	99,2	3,7	7,4	7,7
Ergometrinin	0,18	0,36	0,55	—	—	—	—	—	n. e.	n. e.
Ergosin	0,19	0,37	0,55	—	—	—	—	—	5,1	9,8
Ergotamin	0,19	0,37	0,56	18,9	27,7	57,6	89,3	3,7	5,5	9,8
Ergocornin	0,07	0,13	0,19	11,9	23,7	36,5	98,6	2,8	4,8	8,4
α-Ergokryptin	0,05	0,09	0,14	18,7	27,3	55,9	99,8	2,5	5,6	10,9
Ergocristin	0,02	0,06	0,08	22,3	44,7	66,5	97,6	3,4	2,8	6,8
Ergosinin	0,06	0,11	0,18	—	—	—	—	—	4,4	12,1
Ergotaminin	0,04	0,09	0,13	—	—	—	—	—	6,5	14,9
Ergocorninin	0,05	0,10	0,16	—	—	—	—	—	6,5	6,5
α-Ergokryptinin	0,03	0,06	0,09	—	—	—	—	—	12,4	6,7
Ergocristinin	0,29	0,059	0,88	—	—	—	—	—	4,6	9,6

—: Da für Aufstockversuche nicht alle Analyten in ausreichender Menge zur Verfügung standen, wurden die Validierungsparameter nur für die zur Verfügung stehenden Leitalkaloide bestimmt.
n. e.: im Material nicht enthalten

Tabelle 7.27: Validierungsparameter für die Analysenmethode nach nicht-halogenorganischer Extraktion (Alox-Methode) mit LC-MS/MS-Detektion für Lebensmittel

Analyt	Analytische Grenzen nach DIN 32645						Wiederfindung ¹³	Präzision	
	Leerwertmethode			Kalibriermethode				WF [%]	RSD _r [%]
	NG [µg/kg]	EG [µg/kg]	BG [µg/kg]	NG [µg/kg]	EG [µg/kg]	BG [µg/kg]			
Ergometrin	0,14	0,28	0,47	11,9	23,9	33,8	80,9	14,7	14,2
Ergometrinin	0,09	0,18	0,31	—	—	—	—	n. e.	n. e.
Ergosin	0,12	0,24	0,40	—	—	—	—	11,9	12,4
Ergotamin	0,11	0,22	0,38	5,2	10,5	15,8	77,3	8,8	16,2
Ergocornin	0,09	0,18	0,30	14,8	29,6	39,5	80,4	7,6	16,2
α-Ergokryptin	0,10	0,20	0,34	9,5	19,0	26,9	92,7	10,9	14,6
Ergocristin	0,23	0,46	0,78	7,3	14,6	21,4	95,4	10,5	13,7
Ergosinin	0,20	0,40	0,68	—	—	—	—	10,0	11,1
Ergotaminin	0,08	0,16	0,28	—	—	—	—	12,8	14,5
Ergocorninin	0,17	0,34	0,55	—	—	—	—	12,9	16,1
α-Ergokryptinin	0,14	0,28	0,46	—	—	—	—	12,6	13,6
Ergocristinin	0,25	0,50	0,83	—	—	—	—	12,8	11,9

—: Da für Aufstockversuche nicht alle Analyten in ausreichender Menge zur Verfügung standen, wurden die Validierungsparameter nur für die zur Verfügung stehenden Leitalkaloide bestimmt.
n. e.: im Material nicht enthalten

Tabelle 7.28: Validierungsparameter für die Analysenmethode nach nicht-halogenorganischer Extraktion (Alox-Methode) mit HPLC-FLD-Detektion für Futtermittel

Analyt	Analytische Grenzen nach DIN 32645			Wiederfindung	
	Leerwertmethode			WF [%]	RSD [%]
	NG [µg/kg]	EG [µg/kg]	BG [µg/kg]		
Ergometrin	0,99	1,99	2,98	80,0	4,5
Ergosin	0,50	0,99	1,48	—	—
Ergotamin	0,55	1,10	1,65	78,9	3,8
Ergocornin	0,37	0,74	1,11	94,9	1,8
α-Ergokryptin	0,08	0,16	0,25	93,6	2,3
Ergocristin	0,04	0,08	0,12	74,2	2,2

—: Da für Aufstockversuche nicht alle Analyten in ausreichender Menge zur Verfügung standen, wurden die Validierungsparameter nur für die zur Verfügung stehenden Leitalkaloide bestimmt.

¹³ ausgewertet gegen Matrixkalibrierung

Tabelle 7.29: Validierungsparameter für die Analysenmethode nach nicht-halogenorganischer Extraktion (LC-MS/MS-Schnellmethode) für Lebensmittel

Analyt	Analytische Grenzen nach DIN 32645						Wiederfindung ¹³	Präzision	
	Leerwertmethode			Kalibriermethode				WF [%]	RSD _r [%]
	NG [µg/kg]	EG [µg/kg]	BG [µg/kg]	NG [µg/kg]	EG [µg/kg]	BG [µg/kg]			
Ergometrin	0,93	1,86	2,79	12,5	25,0	34,9	119,0	14,3	7,0
Ergometrinin	0,23	0,45	0,68	—	—	—	—	n. e.	n. e.
Ergosin	0,17	0,34	0,51	—	—	—	—	15,3	12,6
Ergotamin	0,17	0,34	0,50	26,3	52,5	66,9	109,3	18,2	12,2
Ergocornin	0,20	0,39	0,59	17,4	34,9	45,3	73,6	8,7	11,3
α-Ergokryptin	0,10	0,20	0,30	16,0	32,0	42,1	80,1	10,6	11,5
Ergocristin	0,31	0,61	0,92	20,6	41,3	53,1	66,3	19,5	11,7
Ergosinin	0,27	0,55	0,82	—	—	—	—	13,1	11,7
Ergotaminin	0,09	0,18	0,27	—	—	—	—	16,9	11,9
Ergocorninin	0,26	0,52	0,78	—	—	—	—	14,5	8,0
α-Ergokryptinin	0,33	0,66	0,99	—	—	—	—	12,3	15,5
Ergocristinin	0,40	0,79	1,19	—	—	—	—	12,8	11,4

—: Da für Aufstockversuche nicht alle Analyten in ausreichender Menge zur Verfügung standen, wurden die Validierungsparameter nur für die zur Verfügung stehenden Leitalkaloide bestimmt.
n. e.: im Material nicht enthalten

¹³ ausgewertet gegen Matrixkalibrierung

8 Diskussion

Ausgehend von dem von Scott und Lawrence publizierten Extraktionsmittel, bestehend aus Dichlormethan, Ethylacetat, Methanol, konzentriertem Ammoniumhydroxid im Verhältnis 50/25/5/1, v/v/v/v [Scott und Lawrence, 1980], wurden mehrere Methoden, die sich im verwendeten Extraktionsmittel, im Einsatz der Aufreinigung mit Aluminiumoxid und im Detektionssystem unterscheiden, erarbeitet und validiert.

Zudem wurde eine der Methoden nicht nur für Lebensmittel, sondern auch für die Untersuchung von Futtermitteln teilvalidiert.

8.1 Betrachtung der ermittelten analytischen Grenzen

Die mit der Alox-Methode gefolgt von der HPLC-FL-Detektion ermittelten Nachweisgrenzen (nach Leerwertmethode) lagen für Lebensmittel zwischen 0,02 µg/kg (Ergocristin) und 1,10 µg/kg (Ergometrin) und die entsprechenden Bestimmungsgrenzen zwischen 0,08 µg/kg und 3,30 µg/kg.

Für Futtermittel lagen die ermittelten Bestimmungsgrenzen zwischen 0,12 µg/kg (Ergocristin) und 2,98 µg/kg (Ergometrin).

Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit bisher publizierten analytischen Grenzen verschiedener HPLC-FLD-basierter Methoden:

Klug berichtete Nachweisgrenzen zwischen 0,6 und 4,0 µg/kg [Klug, 1986], ähnlich wie Storm et al. mit 0,2 bis 1,1 µg/kg [Storm et al., 2008]. Lombaert et al. erzielten Bestimmungsgrenzen von 4,0 µg/kg [Lombaert et al., 2003], Ware et al. von 2,8 bis 17,9 µg/kg [Ware et al. 2000].

Für die beiden LC-MS/MS-basierter Methoden lagen die Bestimmungsgrenzen (nach Leerwertmethode) zwischen 0,28 µg/kg (Ergotaminin) und 0,83 µg/kg (Ergocristinin) für die Alox-Methode und zwischen 0,09 µg/kg (Ergotaminin) und 2,79 µg/kg (Ergometrin) für die LC-MS/MS-Schnellmethode.

Mohamed et al. entwickelten eine inhouse-validierte LC-MS/MS-basierte Analysenmethode zur Bestimmung von Mutterkornalkaloiden in Lebensmitteln [Mohamed et al., 2006].

Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurden durch Mehrfachinjektion (n = 18) einer mit 3 mg/kg dotierten unbelasteten Roggenmehlprobe anhand der Signal-zu-Rausch-Methode¹⁴ ermittelt. Die Nachweisgrenze lag bei 7 und 11 µg/kg, die Bestimmungsgrenze bei 23 und 37 µg/kg.

Die hier erzielten Ergebnisse liegen deutlich unterhalb der von Mohamed et al. erzielten Ergebnisse [Mohamed et al., 2006], obwohl die Proben mit einer sehr hohen Alkaloidmenge dotiert wurden und durch Mehrfachinjektion lediglich die Präzision des Injektors überprüft wurde.

Bürk et al. ermittelten Bestimmungsgrenzen anhand der Signal-zu-Rausch-Methode zwischen 0,1 µg/kg (Ergometrin) und 1,0 µg/kg in Pumpnickel und Knäckebrot [Bürk et al., 2006]. Die hier ermittelten Ergebnisse liegen in einer vergleichbaren Größenordnung.

¹⁴ Die Bestimmungsgrenze wird festgelegt als die Konzentration, die ein zehnfach größeres Signal produziert als das Grundrauschen.

Zur weiteren Überprüfung der Eignung der Methoden wurden die Nachweis- und Bestimmungsgrenze entsprechend der [DIN 32645, 2008]-Kalibriermethode aus den Wiederfindungsversuchen extrapoliert. Die analytischen Grenzen nach HPLC-FL-Detektion lagen zwischen 8,1 µg/kg (Ergometrin) und 22,3 µg/kg (Ergocristin) für die Nachweisgrenze und zwischen 25,5 und 66,5 µg/kg für die Bestimmungsgrenze.

Für die LC-MS/MS lagen die Nachweisgrenzen zwischen 5,2 µg/kg (Ergotamin) und 14,8 µg/kg (Ergocornin) und die korrespondierenden Bestimmungsgrenzen zwischen 15,8 µg/kg und 39,5 µg/kg.

Für die LC-MS/MS-Schnellmethode lagen die Bestimmungsgrenzen zwischen 34,9 µg/kg (Ergometrin) und 66,9 µg/kg (Ergotamin).

Da es für Mutterkornalkaloide derzeit keine verbindlich geltenden Höchstmengen gibt, erweist sich die Beurteilung der ermittelten analytischen Grenzen als schwierig. Daher wurde auf Grundlage der früher geltenden Höchstmenge der Interventionsrichtlinie [VO (EG) 824/2000, 2000] von 0,05 % Sklerotien in Getreide, dem mittleren Alkaloidgehalt von 0,2 % [Guggisberg, 1954; Mielke, 2000] und der von der EFSA berichteten mittleren Alkaloidverteilung [EFSA, 2005] ein entsprechender Alkaloidhöchstgehalt abgeleitet (s. Tabelle 8.1).

Die hier ermittelten analytischen Grenzen erfüllen die Anforderungen zur Quantifizierung von Mutterkornalkaloiden in Getreiden und Mehlen mit einer Ausnahme; α-Ergokryptin ermittelt nach der Kalibriermethode.

Entsprechend eines mittleren α-Ergokryptingehaltes von 5 %, sollte die Bestimmungsgrenze für α-Ergokryptin bei 50 µg/kg liegen, wurde jedoch zu 56 µg/kg ermittelt. Da es sich jedoch hierbei lediglich, wie in Kap. 7.4.1 erläutert, um eine Näherung handelt und die Überschreitung gering ist, kann davon ausgegangen werden, dass die Anforderungen an die Methode erfüllt sind. Zudem sind entsprechend der [DIN 32645, 2008] lediglich die Ergebnisse ermittelt über die Leerwertmethode verbindlich.

Zur weiteren Beurteilung werden daher die Ergebnisse nach der Leerwertmethode herangezogen.

Tabelle 8.1: Ableitung von Alkaloidhöchstgehalten zur Beurteilung der nach [DIN 32645, 2008] ermittelten analytischen Grenzen

Analyt	Mittlere Alkaloidverteilung nach [EFSA, 2005] [%]	Abgeleiteter Höchstgehalt [µg/kg]
Ergometrin	5	50
Ergometrinin	2	20
Ergosin	4	40
Ergotamin	17	170
Ergocornin	4	40
α-Ergokryptin	5	50
Ergocristin	31	310
Ergosinin	2	20
Ergotaminin	8	80
Ergocorninin	2	20
α-Ergokryptinin	3	30
Ergocristinin	13	130

8.2 Betrachtung der ermittelten Wiederfindungsraten

Für die Wiederfindungsraten der Methode mit halogenorganischer Extraktion wurden Werte zwischen 59,0 % (Ergometrin) und 122,3 % (Ergosinin) erzielt.

Die mit der Alox-Methode gefolgt von der HPLC-FL-Detektion ermittelten Wiederfindungsraten für Lebensmittel lagen zwischen 89,3 % (Ergotamin) und 99,8 % (α -Ergokryptin).

Für Futtermittel lagen die Wiederfindungsraten zwischen 74,2 % (Ergocristin) und 94,9 % (Ergocornin).

Klug berichtete Wiederfindungen zwischen 61 und 97 % [Klug, 1986], Lombaert et al. von 74 bis 82 % [Lombaert et al., 2003], Ware et al. von 79 bis 96 % [Ware et al., 2000] und Storm et al. von 58 bis 65 % [Storm et al., 2008]. Damit liegen die hier erzielten Wiederfindungen in einer ähnlichen Größenordnung oder besser.

Die Wiederfindungen der beiden LC-MS/MS-basierten-Methoden lagen zwischen 77,8 % (Ergotamin) und 95,4 % (Ergocristin) für die Alox-Methode und zwischen 66,3 % (Ergocristin) und 119,0 % (Ergometrin) für die LC-MS/MS-Schnellmethode.

Die Erstellung einer Matrixkalibrierung im Vergleich zu der Standardkalibrierung zeigte, dass in der Ionenquelle für die Alox-Methode teilweise signalsuppressive Effekte zum Tragen kommen. Für die LC-MS/MS-Schnellmethode wurden deutliche signalsuppressive Effekte bestimmt. Die Ergebnisse zeigen sehr deutlich, dass sich Matrixeffekte durch die Kalibrierung gegen matrixbasierte Standards korrigieren lassen.

Mohamed et al. ermittelten Wiederfindungsraten zwischen 24 % (Ergometrin) und 92 % (α -Ergokryptin) durch Experimente mit drei Konzentrationsniveaus zwischen 3 und 15 mg/kg und jeweils drei Wiederholbestimmungen [Mohamed et al., 2006]. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die Experimente in einem wenig relevanten Konzentrationsbereich durchgeführt wurden, da als provisorische Beurteilungsgrundlage in Deutschland ein Summengehalt von 1 mg/kg (entsprechend 0,05 % Sklerotien) angenommen wird. In der Schweiz, in der die Methode entwickelt wurde, gilt ein Summengrenzwert von 0,2 mg/kg für Getreide, das ungemahlen an den Verbraucher abgegeben wird.

Bürk et al. berichteten Wiederfindungsraten in Roggenbrot und Pumpernickel zwischen 62 % (Ergometrin) und 97 % (Ergocornin) [Bürk et al., 2006].

8.3 Betrachtung der ermittelten Präzisionsdaten

Bisher gibt es für die Analytik von Mutterkornalkaloiden keine Vorgaben in Bezug auf die Methodenpräzision, weshalb andere, allgemeinere Bewertungskriterien herangezogen werden.

Die Horwitz-Funktion sowie das Horwitz-Ratio (Horrat-Werte) wurden von Horwitz aus Ringversuchsdaten abgeleitet und gelten daher streng genommen nur unter echten Laborvergleichsbedingungen und sollten dann unterhalb von 2,2 liegen [Horwitz et al., 1993; Kromidas, 2000]. Da die Horrat-Werte jedoch auch laborintern ein geeignetes Bewertungskriterium für Präzisionsdaten darstellen, wurden sie an diese Bedingungen angepasst. Unter Wiederholbedingungen sollte der Horrat-Wert unterhalb von 1,0 und unter Zwischenbedingungen unterhalb von 1,3 liegen [Thompson, 2000 b; AOAC, 2002].

Für die Wiederholpräzision der Methode nach halogenorganischer Extraktion wurde ein Variationskoeffizient RSD_r zwischen 3,2 % (Ergocorninin) und 12,9 % (Ergotamininin) mit Horrat-Werten zwischen 0,1 und 0,6 ermittelt. Die Präzision unter Zwischenbedingungen RSD_i lag zwischen 2,6 % (Ergokryptin) und 34,5 % (Ergometrin) mit entsprechenden Horrat-Werten von 0,1 bis 1,6.

Das Ergebnis für die Zwischenpräzision von Ergometrin, mit einem Variationskoeffizienten von 34,5 % und einem Horrat-Wert von 1,6, entspricht nicht den Kriterien nach [Thompson, 2000 b; AOAC, 2002], die einen Horrat-Wert von maximal 1,3 für geeignet erachten. Aufgrund seiner polareren Eigenschaften und des geringeren Molekulargewichtes im Vergleich zu den Ergopeptidalkaloiden erweist sich Ergometrin häufig als problematischer Analyt [Klug, 1986].

In Optimierungsversuchen zeigte sich, dass die Präzisionsdaten verbessert werden konnten, indem die selbstgepackte Aluminiumoxid-Kartusche durch eine kommerziell erhältliche Kartusche ersetzt wurde. Eine mögliche Erklärung wäre die dichtere Sorbenspackung und der konstantere Aktivierungsgrad des Aluminiumoxids.

Für die Wiederholpräzision der Alox-Methode mit HPLC-FL-Detektion wurden Variationskoeffizienten RSD_r zwischen 2,8 % (Ergocristin) und 12,4 % (α -Ergokryptinin) mit Horrat-Werten zwischen 0,1 (Ergocristin) und 0,6 (Ergokryptin) ermittelt. Die Zwischenvariationskoeffizienten RSD_i lagen zwischen 6,5 % (Ergocorninin) und 14,9 % (Ergotaminin) mit Horrat-Werten zwischen 0,3 und 0,7.

Bisher wurde die Präzision einer HPLC-FLD-basierten Analysenmethode für Mutterkornalkaloide nicht in solchem Umfang bestimmt. Ware et al. publizierten Variationskoeffizienten unter Wiederholbedingungen ($n=6$) zwischen 1,6 und 15,4 %, abgeleitet aus Wiederfindungsexperimenten [Ware et al., 2000]. Storm et al. berichteten ähnliche Ergebnisse ($n=8$) zwischen 8,4 und 13,0 % [Storm et al., 2008].

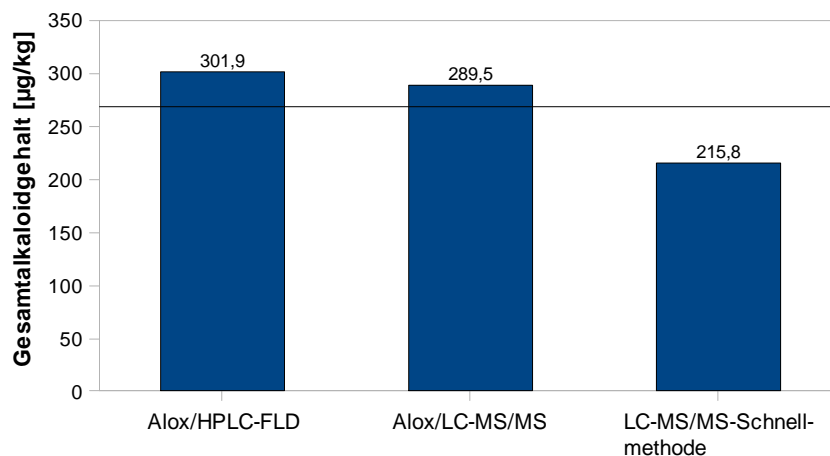
Mit der LC-MS/MS-Detektion lagen die Ergebnisse höher als mit der FL-Detektion, zwischen 7,6 % (Ergocornin) und 14,7 % (Ergometrin) mit Horrat-Werten zwischen 0,3 und 0,7 für die Wiederholpräzision und zwischen 11,1 % (Ergocristinin) und 16,2 % (Ergotamin, Ergocornin) mit Horrat-Werten zwischen 0,5 und 0,7 für die Zwischenpräzision.

Für die LC-MS/MS-Schnellmethode lagen die Ergebnisse der Präzisionsstudie noch etwas höher als bei der Alox-Methode mit den beiden verschiedenen Detektionssystemen. Die Wiederholpräzision RSD_r lag zwischen 8,7 % (Ergocornin) und 19,5 % (Ergocristin) mit Horrat-Werten zwischen 0,4 und 0,9. Die Zwischenpräzisionen RSD_i lagen zwischen 7,0 % (Ergometrin) und 15,5 % (α -Ergokryptinin). Die entsprechenden Horrat-Werte lagen zwischen 0,3 und 0,7.

In Bild 8.1 ist der Vergleich der mittleren Gesamtalkaloidgehalte der drei getesteten Methoden aus der Ermittlung der Präzisionsdaten dargestellt. Es zeigt sich, dass die LC-MS/MS-Schnellmethode niedrigere Gehalte liefert, bedingt durch die Suppressionseffekte, die auch durch die Matrixkalibrierung nicht vollständig ausgeglichen werden.

Mohamed et al. erzielten mit ihrer hausintern validierten LC-MS/MS-basierten Analysenmethode für Wiederhol- und Zwischenpräzision Variationskoeffizienten zwischen 8 und 17 % für die fünf Hauptalkaloide in einem Konzentrationsbereich zwischen 3 und 9 mg/kg [Mohamed et al., 2006].

Präzisionsvergleich verschiedener Analysen- und Detektionssysteme

**Bild 8.1: Mittelwertvergleich der Präzisionsdaten verschiedener Analysen- und Detektionssysteme**

8.4 Gehalte in Lebensmitteln

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 130 Getreide und Getreideprodukte auf ihren Mutterkornalkaloidgehalt untersucht. Von keiner der Proben wurde der in der Interventionsrichtlinie von 2000 [VO (EG) 824/2000, 2000] festgelegte, seit 2006 nicht mehr geltende Höchstgehalt von 1000 μg GA/kg Lebensmittel überschritten.

Die höchsten Mutterkornalkaloidbelastungen fanden sich in der Gruppe der Brotvormischungen mit mittleren Gesamtalkaloidgehalten von ca. 130 $\mu\text{g}/\text{kg}$ und in der Gruppe der Getreideschrote mit einem Mittelwert von etwa 120 μg GA/kg. In zweitgenannter Gruppe wurde auch der höchste Gesamtalkaloidgehalt von 740 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in einem Roggenschrot eines lokalen „Bio“-Bäckers gefunden.

Generell zeigte sich, dass wie in der Literatur beschrieben, Roggen und Roggenprodukte höhere Mutterkornalkaloidgehalte aufweisen als andere Getreide und daraus hergestellte Produkte.

Um konkretere Aussagen treffen zu können, sollten jedoch deutlich mehr Proben untersucht werden, da eine Probenanzahl von 130 nur begrenzt geeignet ist, signifikante Aussagen zu treffen.

9 Zusammenfassung und Ausblick

9.1 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mehrere Analysemethoden zur Bestimmung von zwölf Mutterkornalkaloiden in Getreiden und ausgewählten Getreideprodukten sowie Futtermitteln entwickelt.

In der bisher routinemäßig eingesetzten Methode werden das von Scott und Lawrence publizierte Extraktionsmittel, bestehend aus Dichlormethan, Ethylacetat, Methanol und Ammoniumhydroxid [Scott und Lawrence, 1980], und das von Klug entwickelte Aufreinigungssystem mit Weinsäure-imprägnierter Diatomeenerde und Ammoniakbegasung [Klug, 1986] verwendet. Da Bedarf an einer effizienteren Analysemethode insbesondere für die Deutsche Lebensmittelüberwachung besteht und eine Standardisierung im Rahmen der §-64-LFGB-Arbeitsgruppe „Mykotoxine“ angestrebt wird, war es notwendig, arbeitstechnisch bedenkliche Reagenzien (halogenorganische Lösemittel, Ammoniakbegasung) so weit wie möglich zu ersetzen.

Es wurde daher auf die Ammoniakbegasung und die Verwendung von Dichlormethan verzichtet und ein Extraktionsmittel bestehend aus Ethylacetat, Methanol und Ammoniumhydroxid etabliert. Die Detektion erfolgte nach Aufreinigung an basischem Aluminiumoxid und flüssigchromatographischer Trennung der Alkaloide mittels Fluoreszenzdetektor sowie Quadrupol-Tandem-Massenspektrometer. Die entwickelten Analysemethoden wurden in Bezug auf Arbeitsbereich, analytische Grenzen, Richtigkeit und Präzision hausintern erfolgreich validiert, wobei sich zeigte, dass mit der Fluoreszenzdetektion vergleichbare Ergebnisse wie mit der LC-MS/MS-Detektion erzielt werden konnten, da Mutterkornalkaloide durch ihre chromophoren Eigenschaften mit diesem System sehr sensitiv und selektiv analysiert werden können.

Darüber hinaus wurde die Einsetzbarkeit der Methode mit fluoreszenzbasierter Detektion in fünf Laboren der amtlichen Überwachung erfolgreich geprüft. Die Methode wurde in deren Routinebetrieb übernommen.

Durch Nutzung der hohen Empfindlichkeit und Selektivität des Tandem-Massenspektrometers konnte zudem eine sog. „Dilute-and-Shoot“-Analysemethode unter Verzicht der Aufreinigung erarbeitet werden. Die Validierung zeigte, dass diese Methode die allgemeinen Anforderungen an die Spurenanalytik erfüllt, darüber hinaus kann sie aufgrund ihrer Effizienz und schnellen Durchführbarkeit auch besonders gut als Screening-Methode eingesetzt werden.

Die Untersuchung von 130 Lebensmittelproben zeigte, dass der in Deutschland als provisorische Bewertungsgrundlage entsprechend der Interventionsrichtlinie [VO (EG) 824/2000, 2000] herangezogene Orientierungswert von 1000 Mikrogramm Gesamtalkaloide pro Kilogramm nicht überschritten wurde.

9.2 Ausblick

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten Analysemethoden wurden für Getreide und ausgewählte Getreideprodukte erfolgreich hausintern validiert und für Futtermittel teilvalidiert.

Die Arbeiten zur Standardisierung der Alox/HPLC-FLD-Methode im Rahmen der § 64 LFGB-AG sind unbedingt voranzutreiben. Ein entsprechender Vorringversuch wurde bereits erfolgreich durchgeführt. Eine Methodvalidierungsstudie wird abgeschlossen.

Um die Belastung der Lebensmittel und die Exposition des Verbrauchers zuverlässig abschätzen zu können, sollten ähnlich wie bei Ochratoxin A und den Fusarientoxinen in einem breit angelegten Bund-Länder-Projekt wesentlich höhere Anzahlen an Proben untersucht und mit Verbrauchsdaten korreliert werden. Da in den letzten drei Jahren ausgezeichnete Screening-Verfahren wie ELISA sowie Routine- und Referenzverfahren auf LC-MS/MS-Basis erarbeitet wurden, sind die analytischen Voraussetzungen für ein derartiges Projekt gegeben.

Für den Verbraucher hat jedoch hauptsächlich Brot eine große Relevanz, da Getreide und Mehle nicht unverarbeitet verzehrt werden. Erste Versuche zeigten, dass die entwickelten Methoden, besonders auch die nach halogenorganischer Extraktion, zur Bestimmung von Mutterkornalkaloiden in Brot geeignet sind, jedoch muss dies noch durch eine entsprechende Validierungsstudie belegt werden.

Um eine Expositionsabschätzung durchzuführen, muss der Gehalt von Mutterkornalkaloiden in Lebensmitteln durch Untersuchung einer deutlich größeren Anzahl an Proben ermittelt und mit Verzehrdaten korreliert werden. Die hier analysierte Anzahl an Lebensmitteln diente lediglich dem Beleg der Anwendbarkeit der Methoden und ist nicht ausreichend für eine belastbare Expositionsabschätzung.

10 Anhang

Probenaufreinigung nach halogenorganischer Extraktion

Chemikalien

Dichlormethan (CH_2Cl_2), p.a.

Ethylacetat ($\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$), p.a.

Methanol (CH_3OH), p.a.

Ammoniumhydroxidlösung (NH_4OH), 25 %, p.a.

Silanierungsreagenz, z. B. Pierce Surfasil

Basisches Aluminiumoxid 90 aktiv basisch (Al_2O_3 , 0,063–0,200 mm), für die Chromatographie

Acetonitril (CH_3CN), gradient grade

Ammoniumcarbaminat ($\text{NH}_4\text{COONH}_2$), p.a.

entmineralisiertes Wasser geeigneter Qualität (gemäß DIN ISO 3639)

Lösungen und Reagenzien

Extraktionsmittel:

Dichlormethan/Ethylacetat/Methanol/Ammoniumhydroxidlösung (50/25/5/1, v/v/v/v)

Silanierungslösung:

50 ml des Silanierungsreagenzes werden mit 950 ml Cyclohexan versetzt und gemischt.

Hilfsmittel

Direktverdrängerpipetten, z. B. Transferpette[®] in versch. Volumenausführungen
diverse Vollpipetten, (2,0 ml, 5,0 ml etc)

Dispenser (5–50 ml), z. B. Dispensette[®] für halogenhaltige Lösemittel

Eindampfstation, z. B. TurboVap[®] LV, TurboVap II

Laborschüttler, z. B. Vortexer[®]

Zentrifuge mit Einsätzen und Zentrifugenbechern

250-mL-PE-Zentrifugenbecher

Überkopfschüttler, z. B. Turbula[®]

Ultraschallbad, z. B. Elma Transsonic T 460

Reagenzglasstopfen aus Silikon

Haushalt-Aluminiumfolie

Mikrozentrifuge mit 2-mL-Zentrifugenröhrchen, z. B. Eppendorfszentrifuge 5415 C

Zentrifugenfilter Durapore PVDF 0,45 μm , 0,5 ml für die Eppendorfszentrifuge 5415 C, z. B.

Millipore Ultrafree-MC

12 mL SPE-Hülsen mit PE-Fritten

SPE-Vakuumstation

silanisierte Reagenzgläser mit einem Fassungsvermögen von 10 ml:

Die zuvor gründlich gereinigten Glasgeräte (z. B. Reagenzgläser) werden bis zum Rand mit Silanierungsreagenz gefüllt und 1 Minute stehen gelassen. Die Lösung ist nach Gebrauch zu filtrieren und aufzubewahren. Anschließend werden die Gläser mit Methanol gespült, wobei dieses ebenfalls mehrfach wiederverwendet werden kann. Zum Schluss werden die Gläser zweimal mit bidest. Wasser gespült und getrocknet.

Durchführung

20 g Probe werden auf 0,01 g genau in ein 250-ml-PE-Zentrifugengefäß eingewogen und nach der Zugabe von 100,0 ml des Extraktionsmittels für 45 min turbulent geschüttelt. Anschließend wird die Probe für 25 min bei 4500 g und 10 °C zentrifugiert. 8,0 ml des Überstandes werden auf eine mit 5,0 g basischem Aluminiumoxid gepackte Kartusche gegeben und eluiert. Um eine Analytkonzentrierung vor allem bei höheren Temperaturen zu vermei-

den, müssen die Säulen abgedeckt und die Kammer der Vakuumsstation mit dem Extraktionsmittel gesättigt werden.

Das Eluat wird in einem Reagenzglas aufgefangen, geschüttelt mit Hilfe eines Vortexers, ein Aliquot von 2,0 ml abgenommen und in ein 10 ml fassendes, silanisierendes Reagenzglas überführt. Die Lösung wird im Stickstoffstrom (45 °C, 30 min, Gasdruck 300 bis 700 mbar) bis zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand wird in 2,0 ml des HPLC-Laufmittels aufgenommen. Das Reagenzglas wird mit einem Silikonstopfen verschlossen und für 10 min im Ultraschallbad bei Raumtemperatur behandelt. Ca. 0,5 ml der Lösung werden mittels Zentrifugenfilter (0,45 µm, 0,5 ml) bei 20000 g und 10 °C filtriert. 10 µl des gereinigten Extraktes werden mittels HPLC-FLD analysiert.

Falls im Rahmen der Probenreinigung eine Unterbrechung erforderlich ist, können die zur Trockne eingeeengten Probenextrakte bei einer Temperatur von 4 °C einige Tage und bei einer Temperatur von -18 °C etwa zwei Wochen gelagert werden.

Probenaufreinigung nach nicht-halogenorganischer Extraktion (Alox-Methode)

Chemikalien

Ethylacetat (CH₃COOC₂H₅), p.a.

Methanol (CH₃OH), p.a.

Ammoniumhydroxidlösung (NH₄OH), 25 %, p.a.

Silanierungsreagenz, z. B. Pierce Surfasil

Acetonitril (CH₃CN), gradient grade

Ammoniumcarbaminat (NH₄COONH₂), p.a.

entmineralisiertes Wasser geeigneter Qualität (gemäß DIN ISO 3639)

Lösungen und Reagenzien

Weinsäurelösung:

0,25 g Weinsäure werden in 900 ml Wasser gelöst und auf 1 l aufgefüllt.

Stabilisierungslösung:

Gemisch aus Ethanol und Weinsäurelösung im Verhältnis 4 + 6 Volumenteile

Extraktionsmittel:

Ethylacetat/Methanol/Ammoniumhydroxidlösung (75/5/7, v/v/v/v)

Silanierungslösung:

50 ml des Silanierungsreagenzes werden mit 950 ml Cyclohexan versetzt und gemischt.

Hilfsmittel

basische Aluminiumoxid-Fertigsäulen, z. B. Sep-Pak[®] Alumina B Plus Kartuschen

Direktverdrängerpipetten, z. B. Transferpettoren[®] in versch. Volumenausführungen

diverse Vollpipetten, (2,0 ml, 5,0 ml etc)

Dispenser (5–50 ml), z. B. Dispensette[®] für halogenhaltige Lösemittel

Eindampfstation, z. B. Turbo-Vap[®] LV, Turbo-Vap II

Laborschüttler, z. B. Vortexer[®]

Zentrifuge mit Einsätzen und Zentrifugenbechern

250-ml-PE-Zentrifugenbecher

Überkopfschüttler, z. B. Turbula[®]

Ultraschallbad, z. B. Elma Transsonic T 460

Reagenzglasstopfen aus Silikon

Mikrozentrifuge mit 2-ml-Zentrifugenröhrchen, z. B. Eppendorfzentrifuge 5415 C

Zentrifugenfilter Durapore PVDF 0,45 µm, 0,5 ml für die Eppendorfcentrifuge 5415 C, z. B. Millipore Ultrafree-MC

SPE-Vakuumstation

silanierte Reagenzgläser mit einem Fassungsvermögen von 10 ml

Die zuvor gründlich gereinigten Glasgeräte (z. B. Reagenzgläser) werden bis zum Rand mit Silanisierungsreagenz gefüllt und 1 Minute stehen gelassen. Die Lösung ist nach Gebrauch zu filtrieren und aufzubewahren. Anschließend werden die Gläser mit Methanol gespült, wobei dieses ebenfalls mehrfach wiederverwendet werden kann. Zum Schluss werden die Gläser zweimal mit bidest. Wasser gespült und getrocknet.

Durchführung

20 g Probe werden auf 0,01 g genau in ein 250-ml-PE-Zentrifugengefäß eingewogen und nach der Zugabe von 100,0 ml des Extraktionsmittels für 45 min turbulent geschüttelt. Anschließend wird die Probe für 25 min bei 4500 g und 10 °C zentrifugiert.

Die Aluminiumoxid-Kartusche wird zusammen mit einem Vorratsgefäß auf eine Elutionsstation aufgesteckt. 5 ml des Überstandes werden in das Vorratsgefäß pipettiert und in ein Reagenzglas eluiert. Der Durchfluss sollte 1 Tropfen/s nicht überschreiten. Um eine Analytkonzentrierung vor allem bei höheren Temperaturen zu vermeiden, müssen die Säulen abgedeckt und die Kammer der Vakuumstation mit dem Extraktionsmittel gesättigt werden.

Das Eluat wird mit Hilfe eines Labormischers geschüttelt. 2,0 ml hiervon werden in ein silaniertes Reagenzglas oder 10-ml-Spitzkolben überführt und unter einem Stickstoffstrom bei 45 °C und einem Gasdruck von 300 bis 700 mbar bis zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wird in 2,0 ml des HPLC-Elutionsmittels aufgenommen und für 15 min bei Raumtemperatur im Ultraschallbad gelöst, wobei das Reagenzglas durch Parafilm oder einen Silikonstopfen verschlossen wird.

0,5 ml dieser Lösung werden in ein Zentrifugengefäß mit Filter gegeben und bei 20000 g und 10 °C filtriert. Diese Probenmesslösung wird in ein HPLC-Probenfläschchen überführt.

Probenaufreinigung nach nicht-halogenorganischer Extraktion (LC-MS/MS-Schnellmethode)

Chemikalien

Ethylacetat ($\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$), p.a.

Methanol (CH_3OH), p.a.

Ammoniumhydroxidlösung (NH_4OH), 25 %, p.a.

Silanierungsreagenz, z. B. Pierce Surfasil

Acetonitril (CH_3CN), gradient grade

Ammoniumcarbaminat ($\text{NH}_4\text{COONH}_2$), p.a.

entmineralisiertes Wasser geeigneter Qualität (gemäß DIN ISO 3639)

Lösungen und Reagenzien

Weinsäurelösung:

0,25 g Weinsäure werden in 900 ml Wasser gelöst und auf 1 l aufgefüllt.

Stabilisierungslösung:

Gemisch aus Ethanol und Weinsäurelösung im Verhältnis 4 + 6 Volumenteile

Extraktionsmittel:

Ethylacetat/Methanol/Ammoniumhydroxidlösung (75/5/7, v/v/v)

Silanierungslösung:

50 ml des Silanierungsreagenzes werden mit 950 ml Cyclohexan versetzt und gemischt.

Hilfsmittel

Direktverdrängerpipetten, z. B. Transferpette[®] in versch. Volumenausführungen
diverse Vollpipetten, (2,0 ml, 5,0 ml etc)

Dispenser (5–50 ml), z. B. Dispensette[®] für halogenhaltige Lösemittel

Eindampfstation, z. B. Turbo-Vap[®] LV, Turbo-Vap II

Laborschüttler, z. B. Vortexer[®]

Zentrifuge mit Einsätzen und Zentrifugenbechern

250-ml-PE-Zentrifugenbecher

Überkopfschüttler, z. B. Turbula[®]

Ultraschallbad, z. B. Elma Transsonic T 460

Reagenzglasstopfen aus Silikon

Mikrozentrifuge mit 2-ml-Zentrifugenröhrchen, z. B. Eppendorffzentrifuge 5415 C

Zentrifugenfilter Durapore PVDF 0,45 μm , 0,5 ml für die Eppendorffzentrifuge 5415 C, z. B.

Millipore Ultrafree-MC

SPE-Vakuumstation

Silanisierte Reagenzgläser mit einem Fassungsvermögen von 10 ml

Die zuvor gründlich gereinigten Glasgeräte (z. B. Reagenzgläser) werden bis zum Rand mit Silanierungsreagenz gefüllt und 1 Minute stehen gelassen. Die Lösung ist nach Gebrauch zu filtrieren und aufzubewahren. Anschließend werden die Gläser mit Methanol gespült, wobei dieses ebenfalls mehrfach wiederverwendet werden kann. Zum Schluss werden die Gläser zweimal mit bidest. Wasser gespült und getrocknet.

Durchführung

20 g Probe werden auf 0,01 g genau in ein 250-ml-PE-Zentrifugengefäß eingewogen und nach der Zugabe von 100,0 ml des Extraktionsmittels für 45 min turbulent geschüttelt.

2 ml des Rohextraktes werden in ein silanisiertes Reagenzglas oder 10-ml-Spitzkolben überführt und unter einem Stickstoffstrom bei 45 °C und einem Gasdruck von 300 bis 700 mbar bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird in 2,0 ml des HPLC-Elutionsmittels aufge-

nommen und für 15 min bei Raumtemperatur im Ultraschallbad gelöst, wobei das Reagenzglas durch Parafilm oder einen Silikonstopfen verschlossen wird.

0,5 ml dieser Lösung werden in ein Zentrifugengefäß mit Filter gegeben und bei 20000 g und 10 °C zentrifugiert und filtriert. Diese Probenmesslösung wird in ein HPLC-Probenfläschchen überführt.

HPLC-FLD

Geräte und Geräteeinstellungen

Hersteller: Agilent
Gerätename: Agilent 1100 System
Software: Chemstation for LC 3D, Rev. A.09.03
Module: Degasser VDS Optilab Degasys Ultimate DU4003 binäre Pumpe BIN-PUMP G1312 A
Autosampler ALS G1329A mit Thermostat ALS Therm G1330A
Säulenofen COLCOM G1316A
Fluoreszenzdetektor FLD G1321A
Säule: Phenomenex C6-Phenyl, 250 x 4,6 mm, 5 µm-Material
Laufmittel: Acetonitril/Ammoniumcarbammat-Puffer (0,2 g/l) (156:200, w/v)

Fluss:	Zeit [min]	Fluss [ml/min]
	0,1	0,8
	16,0	0,8
	16,1	1,5
	29,0	1,5
	29,1	0,8
	32,0	0,8

Säulentemperatur: 30 °C
Injektionsvolumen: 10 µl
Injektionsprogramm: Zweimaliges Nadelwaschen im HPLC-Laufmittel aus Vial a
Zweimaliges Nadelwaschen im HPLC-Laufmittel aus Vial b
10,0 µl der Probe aufziehen mit einer Geschwindigkeit von 60 µl/min
Injektion
Detektoreinstellung: Anregung 330 nm
Emission 415 nm

LC-MS/MS**Geräte und Geräteeinstellungen****HPLC**

Hersteller: Agilent
 Geräte name: Agilent 1100 System
 Software: Analyst 1.4.1
 Module: Degasser DEGASSER G1379A
 Kapillarpumpe CAPPUMP G1376A
 Autosampler ALS G1329A mit Thermostat ALS Therm G1330B
 Säulenofen COLCOM G1316A
 Säule: Phenomenex C6-Phenylsäule, 100 x 2,1 mm, 3-µm-Material

Laufmittel A: Acetonitril
 Laufmittel B: Ammoniumcarbamat-Puffer (0,2 g/l)

Gradient:	Zeit [min]	A [%]	B [%]	Fluss [µ/min]
	0,0	45	55	100
	6,0	45	55	100
	9,0	55	45	300
	20,0	55	45	300
	20,1	45	55	100
	22,0	45	45	100

Säulentemperatur: 30 °C
 Injektionsvolumen: 10 µl
 Injektionsprogramm: Zweimaliges Nadelwaschen im HPLC-Laufmittel aus Vial a
 Zweimaliges Nadelwaschen im HPLC-Laufmittel aus Vial b
 10,0 µl der Probe aufziehen mit einer Geschwindigkeit von 60 µl/min
 Injektion

MS/MS

Hersteller: Applied Biosystems
 Geräte name: API 4000
 Software: Analyst 1.4.1
 Quellenemperatur: 600 °C
 Curtain Gas: 14 psi
 Gas 1: 40 psi
 Gas 2: 30 psi
 CAD: 6 psi
 Eingangspotential: 10 V
 IS: 5500 V

Übergänge:

Verbindung	Übergang	Dwell Time [ms]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
Ergometrin	326,0 → 223,0	50	61	35	20
	326,0 → 208,1	30	71	37	20
Ergosin	548,4 → 223,0	50	81	59	18
	548,4 → 207,9	30	81	47	20
Ergotamin	582,3 → 223,0	50	61	49	18
	582,3 → 208,1	30	101	57	14
Ergocornin	562,4 → 267,9	50	71	45	12
	562,4 → 223,1	30	91	43	12
α-Ergokryptin	576,5 → 223,2	50	71	51	20
	576,5 → 208,0	30	71	63	18
Ergocristin	610,1 → 223,0	50	66	39	16
	610,1 → 208,0	30	101	57	14
Ergometrinin	326,0 → 223,0	50	66	25	32
	326,0 → 208,1	30	81	47	20
Ergosinin	548,4 → 530,2	50	66	23	32
	548,4 → 223,0	30	66	49	22
Ergotaminin	582,3 → 564,0	50	61	23	32
	582,3 → 223,0	30	61	49	18
Ergocorninin	562,3 → 544,4	50	71	25	18
	562,3 → 222,9	30	71	51	20
α-Ergokryptinin	576,3 → 558,4	50	71	25	18
	576,5 → 223,2	30	66	47	16
Ergocristinin	610,4 → 592,1	50	56	23	28
	610,4 → 223,0	30	66	39	16

11 Literatur

[ADV, 2008]

Bund/Länder-Arbeitsgruppe „ADV in der amtlichen Lebensmittel- und Veterinärüberwachung“, ADV-Kodierkataloge für die Übermittlung von Daten aus der amtlichen Lebensmittel- und Veterinärüberwachung sowie dem Lebensmittel-Monitoring, Katalog Nr. 3 (Version 1.15): Matrixkodes, Version 1.15, im Internet unter: http://www.bvl.bund.de/clin_027/nn_494194/DE/01__Lebensmittel/00__doks__download/adv__pdf.zip.html__nnn=true, 2008

[Alm, 2003]

T. Alm, The witch trials of Finnmark, Northern Norway, during the 17th century: Evidence for ergotism as a contributing factor, *Econ. Bot.*, 2003, 57, 403–416

[AOAC, 2002]

AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals, http://www.aoac.org/dietsupp6/Dietary-Supplement-web-site/slv_guidelines.pdf, 2002

[Aschmann und Maser, 2000]

C. Aschmann, E. Maser, Mutterkornalkaloide, in: H. Dunkelberg, T. Gebel, A. Hartwig [Hrsg.], *Handbuch der Lebensmitteltoxikologie: Belastungen, Wirkungen, Lebensmittelsicherheit, Hygiene*, Wiley-VCH, Weinheim, 2006, 541–563

[Baumann et al., 1985]

U. Baumann, H. R. Hunziker, B. Zimmerli, Mutterkornalkaloide in schweizerischen Getreideprodukten, *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.*, 1985, 76, 609–630

[Berde und Schild, 1978]

B. Berde, H. O. Schild [Hrsg.], Ergot alkaloids and related compounds, *handbook of experimental pharmacology*, Vol. 49, Springer-Verlag, Berlin, 1978

[BfR, 2004]

Bundesinstitut für Risikobewertung, Mutterkornalkaloide in Roggenmehl – Stellungnahme des BfR vom 22. Januar 2004, im Internet unter: http://www.bfr.bund.de/cm/208/mutterkornalkaloide_in_roggenmehl.pdf, 2004

[Bigal und Tepper, 2003]

M. E. Bigal, S. J. Tepper, Ergotamine and dihydroergotamine: A review, *Curr. Pain Headache*, 2003, 7, 55–62

[Blaney et al., 2000]

B. J. Blaney, R. A. McKenzie, J. R. Walters, L. F. Walters, L. F. Taylor, W. S. Bewg, M. J. Riley, R. Maryam, Sorghum ergot (*Claviceps africana*) associated with agalactia and feed refusal in pigs and dairy cattle, *Austr. Vet. J.*, 2000, 78, 102–107

[Bockhorn und Drinda, 2004]

I. Bockhorn, H. Drinda, Untersuchung von Mutterkornalkaloiden mit LC-MS/MS in Getreideprodukten des Handels, 26. Mykotoxin-Workshop, 2004, 51

[Botha et al., 2004]

C. J. Botha, T. W. Naudé, M. L. Moroe, G. E. Rottinghaus, Gangrenous ergotism in cattle grazing fescue (*Festuca elatior* L.) in South Africa, *J. S. Afr. Vet. Ass.*, 2004, 75, 45–48

[Browning, 2004]

R. Browning Jr., Effects on endophyte-infected tall fescue on indicators of thermal status and growth in hereford and senepol steers, *J. Anim. Sci.*, 2004, 82, 634–643

[Browning et al., 1998]

R. Browning Jr., M. L. Leite-Browning, H. M. Smith, T. Wakefield Jr., Effect of ergotamine and ergonovine on plasma concentrations of thyroid hormones and cortisol in cattle, *J. Anim. Sci.*, 1998, 76, 1644–1650

[Browning und Leite-Browning, 1997]

R. Browning Jr., M. L. Leite-Browning, Effect of ergotamine and ergonovine on thermal regulation and cardiovascular function in cattle, *J. Anim. Sci.*, 1997, 75, 176–181

[Burke und Rorie, 2002]

J. M. Burke, R. W. Rorie, Changes in ovarian function in mature beef cows grazing endophyte infected tall fescue, *Mol. Nutr. Food Res.*, 2002, 57, 1733–1742

[Bürk et al., 2006]

G. Bürk, W. Höbel, A. Richt, Ergot alkaloids in cereal products: Results from Bavarian Health and Food Safety Authority, *Mol. Nutr. Food Res.*, 2006, 50, 437–442

[Canadian Grain Commission, 2008]

Canadian Grain Commission, im Internet unter: http://www.grainscanada.gc.ca/pubs/ergot/ergot99_09-e.htm, Stand: September 2008

[Caporael, 1976]

L. R. Caporael, Ergotism: The Satan loosed in Salem?, *Science*, 1976, 192, 21-26

[Casy, 1994]

A. F. Casy, Mass spectrometry as an aid to the identification of ergots and dihydroergots: comparison of hard and soft ionization techniques, *J. Pharmaceut. Biomed.*, 1994, 12, 41-46

[Chervet und Plas, 1984]

J. P. Chervet, D. Plas, Fast separation of some ergot alkaloids by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, 1984, 295, 282–290

[Curtui et al., 2007]

V. Curtui, C. Gassen, L. Dewenter, E. Schneider, E. Usleber, Immunchemische Nachweisverfahren für Mutterkornalkaloide, Forschungsprojekt 03HS019, im Internet unter: <http://www.leaderplus.de/download/pdf/03HS019.pdf>, Stand: Juli 2008

[Digneau et al., 1986]

M. A. Digneau, H. B. Schiefer, R. Blair, Effects of feeding ergot-contaminated grain to pregnant and nursing sows, *J. Vet. Med. A*, 1986, 33, 757-766

[DIN 32645, 2008]

Deutsches Institut für Normung, DIN 32645: Chemische Analytik - Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen - Begriffe, Verfahren, Auswertung, Beuth-Verlag, Berlin, 2008

[DIN 38402-45, 2003]

Deutsches Institut für Normung, DIN 38402-45: Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung - Teil 45: Allgemeine Angaben: Ringversuche zur externen Qualitätskontrolle von Laboratorien, Beuth Verlag, Berlin, 2003

[DIN 38402-51, 1986]

Deutsches Institut für Normung, DIN 38402-51: Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung - Teil 51: Kalibrierung von Analyseverfahren, Auswertung von Analyseergebnissen und lineare Kalibrierfunktionen für die Bestimmung von Verfahrenskenngrößen, Beuth Verlag, Berlin, 1986

[DIN ISO 5725-2, 2002]

Deutsches Institut für Normung, DIN ISO 5725-2: Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen - Teil 2: Grundlegende Methode für Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision eines vereinheitlichten Messverfahrens, Beuth Verlag, Berlin, 2002

[DIN ISO 5725-3, 2003]

Deutsches Institut für Normung, DIN ISO 5725-3: Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen - Teil 3: Präzisionsmaße eines vereinheitlichten Messverfahrens unter Zwischenbedingungen, Beuth Verlag, Berlin, 2003

[van Dongen und de Groot, 1995]

P. W. J. van Dongen, A. N. J. A. de Groot, History of ergot alkaloids from ergotism to ergometrine, *Eur. J. Obstet. Gyn. Reprod. Biol.*, 1995, 60, 109–116

[Dragendorff und Podwysotszki, 1877]

G. Dragendorff, V. Podwysotszki, Über die Bestandtheile des Mutterkorns, *Arch. Exp. Path. Pharmakol.*, 1877, 6, 153–193

[Dusemund et al., 2006]

B. Dusemund, H.-J. Altmann, A. Lampen, Toxikologische Bewertung Mutterkornalkaloidkontaminierter Roggenmehle, *J. Verbr. Lebensm.*, 2006, 2, 150–152

[Eadie, 2004]

M. J. Eadie, Ergot of rye – the first specific for migraine, *J. Clin. Neurosci.*, 2004, 11, 4–7

[EFSA, 2005]

Europeans Food Safety Authority, Opinion of the scientific panel on contaminants in food chain on a request from the commission related to ergot as undesirable substance in animal feed, *EFSA J.*, 2005, 225, 1–27

[Fajardo et al., 1995]

J. E. Fajardo, J. E. Dexter, M. M. Roscoe, T. W. Nowicki, Retention of ergot alkaloids in wheat during processing, *Cereal Chem.*, 1995, 72, 291–298

[Fanali et al., 1992]

S. Fanali, M. Flieger, N. Steinerova, A. Nardi, Use of cyclodextrins for the enantioselective separation of ergot alkaloids by capillary zone electrophoresis, *Electrophoresis*, 1992, 13, 39–43

[FIV, 2009]

Eidgenössisches Département des Inneren, Verordnung des Eidgenössischen Départements des Inneren über Fremd- und Inhaltsstoffe in Lebensmitteln, in der Fassung vom 26.6.1995, zuletzt geändert am 27.3.2002, AS 2002, 955

[Flieger et al., 1997]

M. Flieger, M. Wurst, R. Shelby, Ergot alkaloids – Sources, structures and analytical methods, *Folia Microbiol.*, 1997, 42, 3–30

[Floss, 1976]

H.-G. Floss, Biosynthesis of ergot alkaloids and related compounds, *Tetrahedron*, 1976, 32, 873-912

[Forth, 1996]

W. Forth, Toxikologische Risikobewertung und -vermeidung: Rationalismen und Irrationalismen, *Zbl. Hyg.*, 1996, 199, 227–239

[Forth et al., 2001]

Exkurs: Mutterkornalkaloide, in: W. Forth, D. Henschler, W. Rummel, U. Förstermann, K. Starke [Hrsg.], *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, Urban und Fischer Verlag, München, Jena, 2001, 197–199

[Frach und Blaschke, 1998]

F. Frach, G. Blaschke, Separation of ergot alkaloids and their epimers and determination in sclerotia by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 1998, 808, 247–252

[Friend und MacIntyre, 1970]

D. W. Friend, T. M. MacIntyre, Effect of rye ergot on growth and N-retention in growing pigs, *Can. J. Comp. Med.*, 1970, 34, 198–202

[Funk et al., 2005]

W. Funk, V. Dammann, G. Donnevert., Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2005

[FuttMV, 2007]

Futtermittelverordnung, in der Fassung vom 24.5.2007, BGBl. I S. 770, zuletzt geändert am 15.12.2008, BGBl. I S. 2483

[Gabbai et al., 1951]

L. Gabbai, L. Lisbonne, F. Pourquier, Ergot poisoning at Pont St. Esprit, *Br. Med. J.*, 1951, 2, 650–651

[Griffith et al., 1978]

R. W. Griffith, J. Grauwiler, C. Hodel, K. H. Leist, B. Matter, Toxicologic considerations, in B. Berde, H. O. Schild [Hrsg.], *Ergot alkaloids and related compounds, handbook of experimental pharmacology*, Vol. 49, Springer-Verlag, Berlin, 1978

[Gröger und Erge, 1970]

D. Gröger, D. Erge, Zur Biosynthese der Peptidalkaloide von *Claviceps purpurea*, *Z. Naturforsch.*, 1970, 25 b, 196–199

[Groot et al., 1998]

A. N. J. A. de Groot, P. W. J. van Dongen, T. B. Vree, Y. A. Hekster, J. van Roosmalen, Ergot alkaloids: Current status and review of clinical pharmacology and therapeutics use compared with other oxytocics in obstetrics and gynaecology, *Drugs*, 1998, 56, 523–535

[Guggisberg, 1954]

H. Guggisberg, Mutterkorn: Vom Gift zum Heilstoff, S. Karger AG, Basel, 1954

[Hibbert und Gooding, 2005]

D. B. Hibbert, J. J. Gooding, *Data Analysis for Chemistry: An Introductory Guide for Students and Laboratory Scientists*, Oxford University Press, Oxford, New York, 2005

[Horwitz et al., 1993]

W. Horwitz, R. Albert, S. Nesheim, Reliability of mycotoxin assays – an update, *J. AOAC Int.*, 1993, 76, 461–491

[Ingelse et al., 1996 a]

B. A. Ingelse, J. C. Reijenga, H. A. Claessens, F. M. Everaerts, M. Flieger, Ergot alkaloids as novel chiral selectors in capillary electrophoresis, *J. High Resol. Chromatogr.*, 1996, 19, 225–226

[Ingelse et al., 1996 b]

B. A. Ingelse, M. Flieger, H. A. Claessens, F. M. Everaerts, Ergot alkaloids as chiral selectors in capillary electrophoresis – Determination of the separation mechanism, *J. Chromatogr. A*, 1996, 755, 251–259

[Jähnichen, 2005]

S. Jähnichen, Charakterisierung vaskulärer alpha-1-Adrenozeptoren und 5-HT-Rezeptoren als Zielstrukturen natürlicher und partialsynthetischer Ergoline, im Internet unter: http://www.diss.fu-berlin.de/diss/receive/FUDISS_thesis_00000001722, Stand: Dezember 2008

[Janssen et al., 2000 a]

G. B. Janssen, R. B. Beems, G. J. A. Speijers, H. P. van Egmond, Subacute toxicity of α -ergocryptine in Sprague-Dawley rats. 1: general toxicological effects, *Food Chem. Toxicol.*, 2000, 38, 679–688

[Janssen et al., 2000 b]

G. B. Janssen, R. B. Beems, L. H. Elvers, G. J. A. Speijers, Subacute toxicity of α -ergocryptine in Sprague-Dawley rats. 2: metabolic and hormonal changes, *Food Chem. Toxicol.*, 2000, 38, 689–695

[Kamphues und Drochner, 1991]

J. Kamphues, W. Drochner, Ergot in feed-the clarification of possible ergot-related infirmity cases, *Tierärztl. Prax.*, 1991, 19, 1–7

[Kaye, 1995]

B. H. Kaye, *Science and the detective: Selected reading in forensic science*, VCH-Verlag Weinheim, New York, Basel, Cambridge, 1995

[Keipert und Voigt, 1972]

S. Keipert, R. Voigt, Quantitative Dünnschichtchromatographie von Mutterkornalkaloiden, *J. Chromatogr.*, 1972, 64, 327–340

[Klein und Steinruck, 1987]

F. W. Klein, U. Steinruck, Untersuchungen mit Mutterkorn (*secale cornutum*) in der Hühnerfütterung, *Krafftfutter*, 1987, 9, 336–341

[Klug, 1986]

C. Klug, *Bestimmung von Mutterkornalkaloiden in Lebensmitteln*, Max von Pettenkofer-Institut des Bundesgesundheitsamtes, Berlin, 1986

[Klug et al., 1988]

C. Klug, W. Baltés, W. Krönert, R. Weber, Methode zur Bestimmung von Mutterkornalkaloiden in Lebensmitteln, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 1988, 186, 108–113

[Kopinski et al., 2007]

J. S. Kopinski, B. J. Blaney, J. A. Downing, J. F. McVeigh, S. A. Murray, Feeding sorghum ergot (*Claviceps africana*) to sows before farrowing inhibits milk production, *Austr. Vet. J.*, 2007, 85, 169–176

[Krěň et al., 1985]

V. Krěň, S. Pázoutová, V. Rylko, Z. Řeháček, Saprophytic production of clavine alkaloids and activity of 3-HMGC_oA-reductase, *Folia Microbiol.*, 1985, 31, 282–287

[Krěň und Cvak, 1999]

V. Krěň, L. Cvak, *Ergot: The genius Claviceps*, CRC Press, Boca Raton, London, 1999

[Kromidas, 2000]

S. Kromidas, *Handbuch Validierung in der Analytik*, Wiley-VCH-Verlag, Weinheim, 2000, 74

[Kromidas, 2006]

S. Kromidas [Hrsg.], *HPLC made to measure: A practical handbook for optimization*, Wiley-VCH, Weinheim, 2006

[KSU, 2008]

im Internet unter:

faculty.ksu.edu.sa/71879/Lectures/351/Alkaloids/Indole%20Alkaloids.ppt, Stand: Dezember 2008

[Larson et al., 1999]

B. T. Larson, D. L. Harmon, E. L. Piper, I. M. Griffis, L. P. Bush, Alkaloid binding and activation of D2 dopamine receptors in cell culture, *J. Anim. Sci.*, 1999, 77, 942–947

[Lehner et al., 2004]

A. F. Lehner, M. Craig, N. Fannin, L. Bush, T. Tobin, Fragmentation patterns of selected ergot alkaloids by electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.*, 2004, 39, 1275–1286

[Lehner et al., 2005]

A. F. Lehner, M. Craig, N. Fannin, L. Bush, T. Tobin, Electrospray(+) tandem quadrupole mass spectrometry in the elucidation of ergot alkaloids chromatographed by HPLC: screening of grass or forage samples for novel toxic compound, *J. Mass Spectrom.*, 2005, 40, 1484–1502

[Lin, 1993]

L. A. Lin, Detection of alkaloids in foods with a multi-detector high performance liquid chromatographic system, *J. Chromatogr.*, 1993, 632, 69–78

[Lochow-Petkus, 2008]

im Internet unter: <http://www.pollenplus.de/mutterkorn.php>, Stand: Juni 2008

[Lombaert, 2000]

G. A. Lombaert, Liquid chromatographic method for the determination of ergot alkaloids in cereal grains, in: M. W. Trucksess, A. E. Pohland [Hrsg.], *Mycotoxin protocols*, Humana Press Inc., New Jersey, 2001, 215–224

[Lombaert et al., 2003]

G. A. Lombaert, P. Pellaers, V. Roscoe, M. Mankotia, R. Neil, P.M. Scott, Mycotoxins in infant cereal foods from the Canadian retail market, *Food Add. Contam.*, 2003, 20, 494–504

[Lorenz, 1979]

K. Lorenz, Ergot on cereal grain, *CRC Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.*, 1979, 11, 311–354

[Lühe et al., 1999]

H. Lühe, W. Lühe, E. Schreiber, M. Funke, Beeinflussung des Mutterkornbesatzes von Winterroggen durch agrotechnische Maßnahmen und Sortenwahl, Abschlussbericht der Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft, 1999, 1–38

[Mainka et al., 2005 a]

S. Mainka, S. Dänicke, H. Böhme, J. Wolff, S. Matthes, G. Flachowsky, Comparative studies on the effect of ergot contaminated feed on performance and health of piglets and chickens, *Arch. Anim. Nutr.*, 2005, 59, 81–98

[Mainka et al., 2005 b]

S. Mainka, S. Dänicke, H. Böhme, K. H. Ueberschär, S. Polten, L. Hüther, The influence of ergot contaminated feed on growth and slaughtering performance, nutrient digestibility and carry over of ergot alkaloids in growing-finishing pigs, *Arch. Anim. Nutr.*, 2005, 59, 377–395

[Majerus, 2006]

P. Majerus, Überwachungsdaten zu Mutterkorn aus mehr als 20 Jahren, *J. Verbr. Lebensm.*, 2006, 2, 163–164

[Mantle, 1996]

P. G. Mantle, Detection of ergot (*Claviceps purpurea*) in a dairy feed component by gas chromatography and mass spectrometry, *J. Dairy Sci.*, 1996, 79, 1988–1991

[Masloff, 2006]

S. Masloff, Mutterkornalkaloide in Getreide und Getreideprodukten, *J. Verbr. Lebensm.*, 2006, 2, 153–156

[Matossian, 1982]

M. K. Matossian, Ergot and the Salem witchcraft affair, *Am. Sci.*, 1982, 70, 355–357

[Matossian, 1989]

M. K. Matossian, *Poisons in the past: molds, epidemics, and history*, Yale University Press, New Haven, 1989

[McMullen und Stoltenow, 2002]

M. McMullen, C. Stoltenow, Ergot, im Internet unter: <http://www.ag.ndsu.edu/pubs/plantsci/crops/pp551w.htm>, Stand: Oktober 2008

[Merck Index, 2001]

M. J. O'Neil, P. E. Heckelman, C. B. Koch, Merck Index: Encyclopedia of Chemicals, Drugs & Biologicals, Merck and Co., Inc., Whitehouse Station, New Jersey, 2001

[Meyers Lexikon Online, 2008]

im Internet unter: <http://lexikon.meyers.de/lexikon/Startseite>, Stand: Juni 2008

[Mitt. 2000/C312/01, 2000]

Europäische Kommission, Mitteilung der Kommission über die Merkmale der Waren, die für die Nahrungsmittelhilfe der Gemeinschaft bereitgestellt werden, ABl. C 312, 31.10.2000, 1–26

[Mohamed et al., 2006]

R. Mohamed, E. Gremaud, J. Richoz-Payot, J.-C. Tabet, P. A. Guy, Quantitative determination of five ergot alkaloids in rye flour by liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 2006, 1114, 62–72

[Molloy et al., 2003]

J. B. Molloy, C. J. Moore, A. G. Bruyeres, S.-A. Murray, B. J. Blaney, Determination of dihydroergosine in sorghum ergot using an immunoassay, *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51, 3916–3919

[Mothes und Silber, 1952]

K. Mothes, A. Silber, Über den natürlichen Befall der Roggenfelder durch Mutterkorn, *Pharmazie*, 1952, 7, 310–313

[Moubarak et al., 1996]

A. S. Moubarak, E. L. Piper, Z. B. Johnson, M. Flieger, HPLC method for the detection of ergotamine, ergosine, and ergine after intravenous injection of a single dose, *J. Agric. Food Chem.*, 1996, 44, 146–148

[Mühle, 1953]

S. Mühle, Vom Mutterkorn, Westarp Wissenschaften, Hohenwarsleben, 1953

[Mühle und Breuel, 2003]

E. Mühle, K. Breuel, Das Mutterkorn, Westarp Wissenschaften, Hohenwarsleben, 2003

[Müller et al., 2006]

C. Müller, H. S. Klaffke, W. Krauthause, R. Wittkowski, Determination of ergot alkaloids in rye and rye flour, *Mycotox. Res.*, 2006, 4, 197–200

[Panaccione, 2005]

R. Panaccione, Origins and significance of ergot alkaloid diversity in fungi, *FEMS Microbiol. Lett.*, 2005, 251, 9–17

[Peters-Volleberg et al., 1996]

G. W. M. Peters-Volleberg, R. B. Beems, G. J. A. Speijers, Subacute toxicity of ergometrine maleate in rats, *Food Chem. Toxicol.*, 1996, 34, 951–958

[Plattner, et al., 1983]

R. D. Plattner, S. G. Yates, J. K. Porter, Quadrupole mass spectrometry/mass spectrometry of ergot cyclol alkaloids, *J. Agric. Food Chem.*, 1983, 31, 785–789

[Plieninger et al., 1961]

H. Plieninger, R. Fischer, G. Keilich, H. D. Orth, Untersuchungen zur Biosynthese der Clavin-Alkaloide mit deuterierten Verbindungen, *Liebigs Ann. Chem.*, 1961, 642, 214–224

[Plieninger et al., 1964]

H. Plieninger, R. Fischer, V. Liede, Untersuchungen zur Biosynthese der Mutterkornalkaloide, II, *Liebigs Ann. Chem.*, 1964, 672, 223–231

[Plieninger et al., 1967]

H. Plieninger, H. Immel, A. Völkl, Synthese und Einbau eines ^{14}C - und ^3H -markierten 4-Dimethylallyl-tryptophans und eines ^{14}C -markierten 4-Dimethylallyltryptamins sowie Einbau eines ^{14}C -markierten Dimethylallyl-pyrophosphats, *Liebigs Ann. Chem.*, 1967 672, 223–229

[Plieninger et al., 1976]

H. Plieninger, E. Meyer, F. Sharif-Nassirian, E. Weidmann, Über die Biosynthese der Mutterkornalkaloide, V, Neue synthetische Zugänge zu möglichen Biosynthesevorstufen für Mutterkornalkaloide, *Liebigs Ann. Chem.*, 1976, 7-8, 1475–1486

[Plieninger et al., 1978]

H. Plieninger, E. Meyer, W. Maier, D. Gröger, Über die Biosynthese der Mutterkornalkaloide, VI, Über den Einbau von [4'-(E)- ^{13}C]4-(3-Methyl-2-butenyl)tryptophan in Clavinalkaloide und Lysergsäure, *Liebigs Ann. Chem.*, 1978, 5, 813–817

[Ramstad, 1968]

E. Ramstad, Chemistry of alkaloid formation in ergot, *Lloydia*, 1968, 31, 327–341

[Řeháček und Sajdl, 1990]

Z. Řeháček, P. Sajdl, Ergot alkaloids: Chemistry, biological effects, biotechnology, Elsevier Science Publishing Company, New York, Amsterdam, 1990

[Rensberg und Altenkirk, 1992]

S. J. van Rensberg, B. Altenkirk, *Claviceps purpurea* - Ergotism, in: I. F. H. Purchase [Hrsg.], *Mycotoxins*, Elsevier Scientific Publishing Company, New York, Amsterdam, 1974, 69–96

[Richter et al., 1988]

W. Richter, J. Rintelen, H. Fuchs, S. Komusinski, Zum Vorkommen von Mutterkorn in Getreide, *Schule Berat.*, 1988, 7, 1–5

[RL 2002/32/EG, 2002]

Europäisches Parlament und Europäischer Rat, Richtlinie 2002/32/EG vom 7. Mai 2002 über unerwünschte Stoffe in der Tierernährung, in der Fassung vom 07.5.2002, zuletzt geändert am 25.7.2008,

[Rottinghaus et al., 1993]

G. E. Rottinghaus, L. M. Schulz, P. F. Ross, N. S. Hill, An HPLC method for the detection of ergot in ground and pelleted feeds, *J. Vet. Diagn. Invest.*, 1993, 5, 242–247

[Römpf Online, 2007]

im Internet unter: <http://www.roempp.com/prod/index1.html>, Stand: Oktober 2007

[Saunders-Bush und Mayer, 2005]

E. Saunders-Bush, S. E. Mayer, 5-Hydroxytryptamine (Serotonin): Receptor agonists and antagonists, in: L. L. Brunton, J. S. Lazo, K. I. Parker [Hrsg.], *Goodman and Gilman's The pharmacological basis of therapeutics*, The McGraw-Hill Companies, Inc., Columbus, 2005, 297–315

[Schiff, 2006]

P. L. Schiff, Ergot and its alkaloids, *Am. J. Pharm. Educ.*, 2006, 70, 1–10

[Schnitzius et al., 2001]

J. M. Schitzius, N. S. Hill, C. S. Thompson, A. M. Craig, Semiquantitative determination of ergot alkaloids in seed, straw, and digesta samples using a competitive enzyme-linked immunosorbent assay, *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2001, 13, 230–237

[Schlegel und Zaborosch, 1992]

H. G. Schlegel, C. Zaborosch, *Allgemeine Mikrobiologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1992, 186-187

[Schoch und Schlatter, 1985]

U. Schoch, C. Schlatter, Gesundheitsrisiken durch Mutterkorn aus Getreide, Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg., 1985, 76, 631–644

[Scholten und Frei, 1979]

A. H. Scholten, R. W. Frei, Identification of ergot alkaloids with a photochemical reaction detector in liquid chromatography, J. Chromatogr., 1979, 176, 349–357

[Scott und Lawrence, 1980]

P. M. Scott, G. A. Lawrence, Analysis of ergot alkaloids in flour, J. Agric. Food Chem., 1980, 28, 1258–1261

[Scott und Lawrence, 1982]

P. M. Scott, G. A. Lawrence, Losses of ergot alkaloids during making of bread and pancakes, J. Agric. Food Chem., 1982, 30, 445–450

[Scott et al., 1992]

P. M. Scott, G. A. Lombaert, P. Pellaers, S. Bacler, J. Lappi, Ergot alkaloids in grain foods sold in Canada, J. AOAC Int., 1992, 75, 773–779

[Scott, 1993]

P. M. Scott, Gas chromatography of mycotoxins, in: V. Betina [Hrsg.], Chromatography of mycotoxins – techniques and applications, Elsevier Scientific Publishing B. V., Amsterdam, 1993, 406–408

[Scott, 2007]

P. M. Scott, Analysis of ergot alkaloids – a review, Mycotox. Res., 2007, 23, 113–121

[Shelby et al., 1997]

R. A. Shelby, J. Olsovská, V. Havlicek, M. Flieger, Analysis of ergot alkaloids in endophyte-infected tall fescue by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry, J. Agric. Food Chem., 1997, 45, 4674–4679

[Shelby und Kelley, 1990]

R. A. Shelby, V.C. Kelley, An immunoassay for ergotamine and related alkaloids, J. Agric. Food Chem., 1990, 38, 1130–1134

[Shelby und Kelley, 1991]

R. A. Shelby, V.C. Kelley, Detection of ergot alkaloids in tall fescue by competitive immunoassay with a monoclonal antibody, Food. Agric. Immunol., 1991, 3, 169–177

[Shelby und Kelley, 1992]

R. A. Shelby, V.C. Kelley, Detection of ergot alkaloids from *Claviceps* species in agricultural products by competitive ELISA using a monoclonal antibody, J. Agric. Food Chem., 1992, 40, 1090–1092

[Silberstein und McCrory, 2003]

S. D. Silberstein, D. C. McCrory, Ergotamine and dihydroergotamine: History, pharmacology, and efficacy, Headache, 2003, 43, 144–166

[Silber und Bischoff, 1954]

A. Silber, W. Bischoff, Stability of alkaloid content in various species of ergot, Pharmazie, 1954, 9, 46–61

[Spanjer et al., 2008]

M. C. Spanjer, P. M. Rensen, J. M. Scholten, LC-MS/MS multi-method for mycotoxins after single extraction, with validation data for peanut, pistachio, wheat, maize, cornflakes, raisins and figs, Food Add. Contam., 2008, 25, 472–489

[Speijers et al., 1992]

G. J. A. Speijers, M. A. M. Krajnc-Franken, F. X. R. van Leeuwen, L. H. J. C. Danse, J. G. Loeber, L. H. Elvers, H. H. M. Hoejenbos-Spithout, G. B. Janssen, Subacute toxicity of ergometrine maleate in rats (Report 618312001), Rijksinstituut voor volksgezondheid en milieuhygiene, Bilthoven, 1992

[Speijers et al., 1993]

G. J. A. Speijers, P. W. Wester, F. X. R. van Leeuwen, L. de la Fonteyne-Blankenstijn, W. Post, H. P. van Egmond, E. A. Sizoo, G. B. Janssen, Subchronic toxicity experiment with rats fed a diet containing ergotamine-tartrate (Report 618312002), Rijksinstituut voor volksgezondheid en milieuhygiene, Bilthoven, 1993

[Spiering et al., 2002]

M. J. Spiering, E. Davies, B. A. Tapper, J. Schmid, G. A. Lane, Simplified extraction of ergovaline and peramine for analysis of tissue distribution in endophyte-infected grass tillers, *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50, 5856-5862

[Stoll et al., 1949]

A. Stoll, A. Hofmann, F. Troxler, Über die Isomerie von Lysergsäure und Isolysergsäure – 14. Mitteilung über Mutterkornalkaloide, *Helv. Chim. Acta*, 1949, 32, 506-521

[Stoll et al., 1951]

A. Stoll, A. Hofmann, T. Petrzilka, Die Konstitution der Mutterkornalkaloide – Struktur des Peptidteils – III. 24. Mitteilung über Mutterkornalkaloide, *Helv. Chim. Acta*, 1951, 34, 1544-1576

[Stoll et al., 1954]

A. Stoll, T. Petrzilka, J. Rutschmann, A. Hofmann, H. H. Günthard, Über die Stereochemie der Lysergsäuren und der Dihydro-lysergsäuren – 37. Mitteilung über Mutterkornalkaloide, *Helv. Chim. Acta*, 1954, 37, 2039–2057

[Stoll et al., 1955]

A. Stoll, A. Hofmann, Amide der stereoisomeren Lysergsäuren und Dihydrolysergsäuren – 38. Mitteilung über Mutterkornalkaloide, *Helv. Chim. Acta*, 1955, 38, 421–433

[Storm et al., 2008]

I. D. Storm, P. H. Rasmussen, B. W. Strobel, H. C. Hansen, Ergot alkaloids in rye flour determined by solid-phase cation-exchange and high-pressure liquid chromatography with fluorescence detection, *Food Addit. Contam.*, 2008, 25, 338–346

[Strasburger, 2002]

P. Sitte, H. Ziegler, F. Ehrendorfer, A. Bresinsky, Strasburger - Lehrbuch der Botanik, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York, 1991

[Taschan et al., 2005]

H. Taschan, S. Arte, T. Hobbie, Mutterkorn und Mutterkornalkaloide in Getreide und Mehl, *Ern. Fokus.*, 2005, 11, 314–318

[Taylor, 2006]

P. J. Taylor, Method development and optimisation of LC-MS, in: A. Poletini [Hrsg.], Applications of LC-MS in Toxicology, Pharmaceutical Press, London, Grayslake, 2006, 23–39

[Thompson und Lowthian, 1997]

M. Thompson, P. J. Lowthian, The Horwitz Function Revisited, *J. AOAC Int.*, 1997, 80, 676–679

[Thompson, 2000 a]

M. Thompson, Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing, *Analyst*, 2000, 125, 385-386

[Thompson, 2000 b]

M. Thompson, Towards a unified model of errors in analytical measurement, *Analyst*, 2000, 125, 2020-2025

[Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft, 2000]

im Internet unter: <http://www.tll.de/ainfo/archiv/muko0200.pdf>, Stand: Juni 2008

[Uhlig et al., 2007]

S. Uhlig, T. Vikøren, L. Ivanova, K. Handeland, Ergot alkaloids in Norwegian wild grasses: a mass spectrometric approach, *Rapid Commun. Mass Sp.*, 2007, 21, 1651- 1660

[Verleysen und Sandra, 1998]

K. Verleysen, P. Sandra, Separation of chiral compounds by capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, 1998, 19, 2798-2833

[VO (EG) 824/2000, 2000]

Europäische Kommission, Verordnung VO (EG) 824/2000 vom 19. April 2000 über das Verfahren und die Bedingungen für die Übernahme von Getreide durch die Interventionsstellen sowie die Analysemethoden für die Bestimmung der Qualität, *ABl. L 20.4.2000*, 100, 31–50

[VO (EG) 1572/2006, 2006]

Europäische Kommission, Verordnung (EG) 1572/2006 der Kommission vom 18. Oktober 2006 zur Änderung der Verordnung (EG) 824/2000 über das Verfahren und die Bedingungen für die Übernahme von Getreide durch die Interventionsstellen sowie die Analysemethoden für die Bestimmung der Qualität, *ABl. L 20.10.2006*, 290, 29–34

[Votruba und Flieger, 2000]

J. Votruba, M. Flieger, Separation of ergot alkaloids by adsorption on silicates, *Biotechnol. Lett.*, 2000, 22, 1281-1285

[Walzel et al., 1997]

B. Walzel, B. Riederer, U. Keller, Mechanism of alkaloid cyclopeptide synthesis in the ergot fungus *Claviceps purpurea*, *Chem. Biol.*, 1997, 4, 223–230

[Ware et al., 1986]

G. M. Ware, A. S. Carman, O. J. Francis, S. S. Kuan, Liquid chromatographic determination of ergot alkaloids in wheat, *J. AOAC*, 1986, 69, 697–699

[Ware et al., 2000]

method for isolating ergot alkaloids, using a particle-loaded membrane extracting disk, *J. AOAC Int.*, 2000, 83, 1395–1399

[Weygand et al., 1962]

F. Weygand, H.-G. Floss, U. Mothes, Über den Mechanismus der Bildung der Mutterkornalkaloide aus Tryptophan und Mevalonsäure, *Tetrahedron Lett.*, 1962, 3, 873–877

[Weygand und Floss, 1963]

F. Weygand, H.-G. Floss, Die Biogenese der Mutterkornalkaloide, *Angew. Chem.*, 1963, 75, 202–210

[Weygand et al., 1964]

F. Weygand, H.-G. Floss, U. Mothes, D. Gröger, K. Mothes, Über die Biosynthese der Mutterkornalkaloide: Vergleich von zwei möglichen Zwischenprodukten, *Z. Naturforsch.*, 1964, 19 b, 783–788

[Whittemore et al., 1976]

C. T. Whittemore, R. C. F. Macer, J. K. Miller, P. G. Miller, Some consequences of the ingestion by young and growing pigs of feed contaminated with ergot, *Res. Vet. Sci.*, 1976, 20, 61–69

[WHO, 1990]

World Health Organisation, Environmental Health Criteria 105 – Selected Mycotoxins: Ochratoxins, Trichothecenes, Ergot, World Health Organization, Geneva, 1990

[Wikipedia, 2008]

im Internet unter: <http://de.wikipedia.org/wiki/Wikipedia:Hauptseite>, Stand: Juni 2008

[Wirth und Gloxhuber, 1994]

W. Wirth, C. Gloxhuber, Toxikologie, Urban und Fischer Verlag, München, 1994

[Wolff, 1983]

J. Wolff, H. D. Ocker, H. Zwingelberg, Bestimmung von Mutterkornalkaloiden in Getreide und Mahlprodukten durch HPLC, *Getr. Mehl Brot*, 1983, 37, 331–335

[Wolff, 1988]

J. Wolff, C. Neudecker, C. Klug, R. Weber, Chemische und toxikologische Untersuchungen über Mutterkorn in Mehl und Brot, *Z. Ernährungswiss.*, 1988, 27, 1–22

[Wolff, 1992]

J. Wolff, Mutterkorn in Getreide und Getreideprodukten, in: H.-D. Ocker [Hrsg.], Rückstände und Kontaminanten in Getreide, Behr's Verlag, Hamburg, 1992, 113–137

[Wolff und Richter, 1989]

J. Wolff, W. Richter, Chemische Untersuchungen an Mutterkorn. *Getreide, Mehl und Brot*, 1989, 43, 103–108

[Woods et al., 1966]

A. J. Woods, J. Bradley-Jones, P. G. Mantle, An Outbreak of gangrenous ergotism in cattle, *Vet. Rec.*, 1966, 78, 742–749

[Yates und Powell, 1988]

S. G. Yates, R. G. Powell, Analysis of ergopeptine alkaloids in endophyte-infected tall fescue, *J. Agric Food Chem.*, 1988, 36, 337–340

[Young, 1981 a]

J. C. Young, Variability in the content and composition of alkaloids found in Canadian Ergot. I. Rye, *J. Environ. Sci. Health*, 1981, B16, 83–110

[Young, 1981 b]

J. C. Young, Variability in the content and composition of alkaloids found in Canadian Ergot. II. Wheat, *J. Environ. Sci. Health*, 1981, B16, 381–393

[Young und Chen, 1982]

J. C. Young, Z.-J. Chen, Variability in the content and composition of alkaloids found in Canadian Ergot. III. Triticale and Barley, *J. Environ. Sci. Health*, 1982, B17, 93–107

12 Abkürzungsverzeichnis

5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
a	Steigung (Regressionsfunktion)
ACN	Acetonitril
Alox	Aluminiumoxid
b	y-Achsenabschnitt (Regressionsfunktion)
bidest	zweifach destilliert
BAGKF	Bundesanstalt für Getreide-, Kartoffel- und Fettforschung
BfEL	Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BG	Bestimmungsgrenze
BMELV	Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
C.	<i>Claviceps</i>
CE	Capillary Electrophoresis – Kapillarelektrophorese
cps	Counts per Second – Impulse pro Sekunde
d	day – Tag
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DMAP	Dimethylallylpyrophosphat
DMAT	Dimethylallyltryptophan
EC	Ergocornin
ECR	Ergocristin
EG	Erfassungsgrenze
EI	Electron Impact Ionisation – Elektronenstoßionisation
EK	Ergokryptin
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
EM	Ergometrin
ESI	Electrospray Ionisation – Elektrosprayionisation
ET	Ergotamin
EtOAc	Ethylacetat
EtOEt	Diethylether
EtOH	Ethanol
FIV	Fremd- und Inhaltsstoffverordnung des Eidgenössischen Départements des Innern, Schweiz
FLD	Fluoreszenzdetektion, Fluoreszenzdetektor
FuttMG	Futtermittelgesetzbuch, national
FuttMV	Futtermittelverordnung, national
GAG	Gesamtalkaloidgehalt
GC	Gaschromatographie, Gaschromatograph
GLP	Gute Landwirtschaftliche Praxis
HFBA	Heptafluorbuttersäure
Horrat	Horwitz Ratio – Horwitz-Quotient
HPLC	High Performance Liquid Chromatography – Hochleistungsflüssigchromatographie, Hochleistungsflüssigchromatograph
I	Intermediate conditions – Zwischenbedingungen
iv.	intravenös
k. A.	keine Angabe
KG	Körpergewicht
LC	Liquid Chromatography – Flüssigchromatographie, Flüssigchromatograph
LD ₅₀	mittlere letale Dosis
LFGB	Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch
LLE	Liquid Liquid Extraction – Flüssig-Flüssig-Extraktion

LOAEL	Lowest Observed Adverse Effect Level – niedrigste Dosis, bei der gerade ein schädigender Effekt beobachtet werden kann
LSD	Lysergsäurediethylamid
LVU	Laborvergleichsuntersuchung
Matrixkal	Matrixkalibrierung
MeOH	Methanol
MRM	Multiple Reaction Monitoring – Messmodus in der Tandem-Massenspektrometrie
MS	Massenspektrometrie, Massenspektrometer
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie, Tandem-Massenspektrometer
n	Anzahl
n. e.	nicht enthalten
NG	Nachweisgrenze
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level – maximale Dosis, bei der gerade noch kein schädigender Effekt beobachtet werden kann
NOEL	No Observed Effect Level, s. NOAEL – maximale Dosis, bei der gerade noch kein Effekt beobachtet werden kann
p. a.	pro analysis – zur Analyse
PNS	peripheres Nervensystem
p. o.	per os, peroral – durch den Mund
PE	Polyethylen
R	Reproducibility conditions – Vergleichsbedingungen
r	Repeatability conditions – Wiederholbedingungen
RSD	Relative Standard Deviation – relative Standardabweichung (Variationskoeffizient)
RSD _r	relative Standardabweichung unter Wiederholbedingungen
RSD _i	relative Standardabweichung unter Zwischenbedingungen
SPE	Solid Phase Extraction – Festphasenextraktion
SD	Standard Deviation – Standardabweichung
Standardkal	Standardkalibrierung
TDI	Tolerable Daily Intake – Tolerierbare tägliche Aufnahmemenge
WF	Wiederfindung
Zers.	Zersetzung
ZNS	zentrales Nervensystem

13 Abbildungsverzeichnis

Bild 4.1: „Endstadium einer vom Ergotismus geplagten Kreatur“, Matthias Grünewald, 1515, Isenheimer Altar, entnommen aus [Wikipedia: Mutterkorn, 2008]	14
Bild 4.2: Ergotismus convulsivus (links) und Ergotismus gangraenosus (rechts), Pieter Bruegel der Ältere, 1559, „Der Kampf zwischen Karneval und Fasten“ [Hagen, 2004]	15
Bild 5.1: Strukturelle Verwandtschaft von Mutterkornalkaloiden und Neurotransmittern [Forth et al., 2001]	18
Bild 5.2: Chemische Strukturen von Methysergid (a), Cabergolin (b) und Bromocriptin (c)	21
Bild 5.3: Ergotismus gangraenosus beim Menschen, entnommen aus [KSU, 2008]	24
Bild 5.4: Ergotismus gangraenosus beim Rind, entnommen aus [McMullen und Stoltenow, 2002]	26
Bild 5.5: Roggenähre mit zwei Sklerotien	28
Bild 5.6: Infektionszyklus von <i>Claviceps purpurea</i> , entnommen aus [Taschan et al., 2005]	30
Bild 5.7: Schematische Darstellung des Biosyntheseweges der Mutterkornalkaloide, nach [Panaccione, 2005]	33
Bild 5.8: Chemische Grundstruktur des Mutterkornalkaloid-Grundgerüsts [Guggisberg, 1954; Hofmann, 2000]	34
Bild 5.9: Chemische Struktur von D-Lyserg- und D-Isolysergsäure [Guggisberg, 1954; Stoll et al., 1954]	34
Bild 5.10: Keto-Enol-Tautomerie der "Ine" in die "Inine" [Stoll et al., 1949; Guggisberg, 1954]	35
Bild 5.11: Chemische Struktur der einfachen Lysergsäureamide [Stoll et al., 1955]	35
Bild 5.12: Chemische Struktur der Ergopeptide [Stoll et al., 1951; Krěn und Cvak, 1999]	35
Bild 5.13: Fragmentierung von Mutterkornalkaloiden in der Massenspektrometrie, nach [Lehner et al., 2004]	49
Bild 6.1: Zusammensetzung der untersuchten Proben nach Warengruppen	52
Bild 6.2: Prinzip zur Ermittlung des Matrixeffektes, modifiziert nach [Kromidas, 2006]	58
Bild 7.1: HPLC-FLD-Chromatogramme eines Standards (a) und einer Roggenschrotprobe (b)	62
Bild 7.2: LC-MS/MS-Totalionen-Chromatogramme eines Standards (a) und einer Roggenschrotprobe (b)	63
Bild 7.3: Aufreinigungseffizienz und prozentuale Wiederfindungen ausgewählter Mutterkornalkaloide unter Verwendung verschiedener Festphasenmaterialien	66
Bild 7.4: Ermittlung des Optimums an Ammoniumhydroxid im Extraktionsmittel	67
Bild 7.5: Vergleich der in der LVU angewendeten Analysemethoden anhand des Gesamtalkaloidgehaltes	71
Bild 7.6: Regressionsgeraden der Wiederfindungsfunktionen verschiedener Ergotalkaloide nach nicht-halogenorganischer Extraktion mit HPLC-FLD	75

Bild 7.7: Vergleich zwischen Standardkalibrierung sowie Matrix- und Wiederfindungskalibrierung mit Alox-Aufreinigung und LC-MS/MS-Detektion	76
Bild 7.8: Wiederfindungsfunktionen nach Alox-Aufreinigung und LC-MS/MS-Detektion	78
Bild 7.9: Vergleich der Präzisionsdaten unter Wiederhol- und Zwischenbedingungen der Alox-/HPLC-FLD-Methode	80
Bild 7.10: Vergleich der Präzisionsdaten unter Wiederhol- und Zwischenbedingungen der Alox-/LC-MS/MS-Methode	80
Bild 7.11: Vergleich zwischen Standardkalibrierung sowie Matrix- und Wiederfindungskalibrierung nach der LC-MS/MS-Schnellmethode	84
Bild 7.12: Vergleich der Präzisionsdaten unter Wiederhol- und Zwischenbedingungen der LC-MS/MS-Schnellmethode	86
Bild 7.13: Kreuzvalidierung für die Alox-Methode mit den Detektionssystemen HPLC-FLD und LC-MS/MS	89
Bild 7.14: Belastung der untersuchten Proben mit Mutterkornalkaloiden, aufgeschlüsselt nach ADV-Warengruppen [ADV, 2008]	91
Bild 7.15: Gehaltsbereiche an Gesamtalkaloiden in Roggen und Roggenprodukten (n=52)	92
Bild 7.16: Gehaltsbereiche an Gesamtalkaloiden in Weizen und Weizenprodukten und verwandten Produkten (n=45)	93
Bild 7.17: Gehaltsbereiche an Gesamtalkaloiden in Müsli und Flocken (n=12)	94
Bild 7.18: Gehaltsbereiche an Gesamtalkaloiden in sonstigen Getreiden und daraus hergestellten Mehlen (n=12)	95
Bild 7.19: Gehaltsbereiche an Gesamtalkaloiden in Brotbackmischungen (n=8)	95
Bild 8.1: Mittelwertvergleich der Präzisionsdaten verschiedener Analysen- und Detektionssysteme	103

14 Tabellenverzeichnis

Tabelle 5.1: Wirkungsprofil verschiedener Mutterkornalkaloidgruppen, nach [de Groot et al., 1998; van Dongen und de Groot, 1993]	18
Tabelle 5.2: Mutterkornalkaloidbeeinflusste Rezeptoren und deren Wirkung [Jähnichen, 2005; Saunders-Bush und Mayer, 2005, Wikipedia: 5-HT Receptor, 2008]	19
Tabelle 5.3: LD ₅₀ von Ergometrin und Ergotamin für verschiedene Nagetiere	25
Tabelle 5.4: Sklerotien-bildende Claviceps-Arten und ihre Alkaloide, nach [Römpf online: Ergot, 2007]	28
Tabelle 5.5: Vergleich der Alkaloidzusammensetzung von kanadischem und europäischem Mutterkorn [Young, 1981a und b, Young und Chen, 1982, EFSA 2005]	29
Tabelle 5.6: „Periodisches System“ der Ergopeptide [modifiziert nach Hofmann, 2000; Mühle und Breuel, 2003]	36
Tabelle 5.7: Molmassen und Schmelzpunkte ausgewählter Mutterkornalkaloide, entnommen aus [Merck Index, 2001; Römpf Online: Ergot-Alkaloide, 2007]	37
Tabelle 5.8: Löslichkeitsverhalten ausgewählter Mutterkornalkaloide, entnommen aus [Klug, 1986; Merck Index, 2001]	37
Tabelle 5.9: Belastungssituation von Lebensmitteln mit Mutterkorn (-alkaloiden)	39
Tabelle 5.10: Ausgewählte Extraktions- und Aufreinigungsmethoden zur Bestimmung von Mutterkornalkaloiden in verschiedenen Matrices	44
Tabelle 5.11: Zusammenfassung von HPLC-Systemen zur Analytik von Mutterkornalkaloiden	45
Tabelle 5.12: Wichtige Fragmentationen in der Massenspektrometrie von Mutterkornalkaloiden	50
Tabelle 6.1: Zusammensetzung der Kraftfuttermischung zur Bestimmung der Wiederfindung für Futtermittel	57
Tabelle 7.1: Kenndaten der Grundkalibrierungen der zwölf Mutterkornalkaloide des HPLC-FLD-Systems	64
Tabelle 7.2: Relative Responsefaktoren der „Ine“ im Verhältnis zu den korrespondierenden „Ininen“	65
Tabelle 7.3: Analytische Grenzen nach DIN 32645 (Leerwertmethode) für die Analysenmethode nach halogenorganischer Extraktion	68
Tabelle 7.4: Wiederfindungsraten nach halogenorganischer Extraktion	68
Tabelle 7.5: Ergebnisse der Wiederholbarkeits- und Homogenitätsstudie nach halogenorganischer Extraktion	69
Tabelle 7.6: Ergebnisse der Stabilitäts- und Präzisionsstudie unter Zwischenbedingungen nach halogenorganischer Extraktion	69
Tabelle 7.7: Charakterisierung der in der LVU angewandten Analysenmethoden	70
Tabelle 7.8: Ergebnisse der Laborvergleichsuntersuchung der § 64 LFGB-AG „Mykotoxine“ zur Bestimmung von Mutterkornalkaloiden in Roggenmehl	72
Tabelle 7.9: Analytische Grenzen nach DIN 32645 (Leerwertmethode) nach nicht-halogenorganischer Extraktion (Alox-Methode) für Lebensmittel	73

Tabelle 7.10: Analytische Grenzen nach DIN 32645 (Kalibriermethode) nach nicht-halogenorganischer Extraktion für Lebensmittel	73
Tabelle 7.11: Analytische Grenzen nach DIN 32645 (Leerwertmethode) nach nicht-halogenorganischer Extraktion für Futtermittel	74
Tabelle 7.12: Wiederfindungsraten der Methode nach nicht-halogenorganischer Extraktion mit LC-MS/MS	74
Tabelle 7.13: Vergleich der Steigungen der Kalibrierfunktionen für die Alox-Methode	77
Tabelle 7.14: Prozesseffizienz, Extraktionsausbeute und Matrixeffekt der Alox-/LC-MS/MS-Analysenmethode	77
Tabelle 7.15: Wiederfindungen von fünf Mutterkornalkaloiden in Futtermitteln	79
Tabelle 7.16: Präzisionsdaten für die Alox/HPLC-FLD-Methode	81
Tabelle 7.17: Präzisionsdaten für die Alox-/LC-MS/MS-Methode	81
Tabelle 7.18: Analytische Grenzen nach DIN 32645 (Leerwertmethode) nach nicht-halogenorganischer Extraktion (LC-MS/MS-Schnellmethode) für Lebensmittel	82
Tabelle 7.19: Analytische Grenzen nach DIN 32645 (Kalibriermethode) nach nicht-halogenorganischer Extraktion (LC-MS/MS-Schnellmethode) für Lebensmittel	82
Tabelle 7.20: Wiederfindungsraten der LC-MS/MS-Schnellmethode nach nicht-halogenorganischer Extraktion	83
Tabelle 7.21: Vergleich der Steigungen der Kalibrierfunktionen für die LC-MS/MS-Schnellmethode	83
Tabelle 7.22: Prozesseffizienz, Extraktionsausbeute und Matrixeffekt der LC-MS/MS-Schnellmethode	85
Tabelle 7.23: Präzisionsdaten für die LC-MS/MS-Schnellmethode	86
Tabelle 7.24: Vergleich der Ergebnisse der Kreuzvalidierung der verschiedenen Aufreinigungs- und Detektionsverfahren	87
Tabelle 7.25: Validierungsparameter der Analysenmethode nach halogenorganischer Extraktion	96
Tabelle 7.26: Validierungsparameter für die Analysenmethode nach nicht-halogenorganischer Extraktion (Alox-Methode) mit HPLC-FLD für Lebensmittel	96
Tabelle 7.27: Validierungsparameter für die Analysenmethode nach nicht-halogenorganischer Extraktion (Alox-Methode) mit LC-MS/MS-Detektion für Lebensmittel	97
Tabelle 7.28: Validierungsparameter für die Analysenmethode nach nicht-halogenorganischer Extraktion (Alox-Methode) mit HPLC-FLD-Detektion für Futtermittel	97
Tabelle 7.29: Validierungsparameter für die Analysenmethode nach nicht-halogenorganischer Extraktion (LC-MS/MS-Schnellmethode) für Lebensmittel	98
Tabelle 8.1: Ableitung von Alkaloidhöchstgehalten zur Beurteilung der nach [DIN 32645, 2008] ermittelten analytischen Grenzen	100

Für meine Eltern und Daniel

Wie ihr wisst:

L'essentiel est invisible pour les yeux.

Et quand je ferme mes yeux, je vois vous.

Danksagung

„Du gewinnst nie allein. Am Tag, an dem Du etwas anderes glaubst, fängst du an zu verlieren.“

Mika Häkkinen

Die vorliegende Dissertation wurde am Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) durchgeführt. An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Wittkowski danke ich ganz herzlich für die Bereitstellung des Themas, die Beurteilung dieser Arbeit und die spontane Hilfsbereitschaft auf den letzten Metern dieses Weges.

Frau Prof. Hartwig möchte ich ebenfalls für die Übernahme der Betreuung und die Beurteilung dieser Arbeit danken.

Herrn Prof. Usleber danke ich für die Übernahme der Tätigkeit als dritter Gutachter und die fachlichen Diskussionen.

Herrn Prof. Kroh danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Mein Dank gilt besonders meinen Kolleginnen und Kollegen des BfR, die mich so herzlich in ihren Arbeitskreis aufgenommen und stets mit Rat und Tat unterstützt haben:

Barbara, Gaby, Geli, Irena, vielen Dank.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei:

Herrn Dr. Kappenstein für das immer offene Ohr und die Aufmunterung, die er mir zukommen ließ,

Herrn Dr. Klaffke, durch ihn habe ich viel gelernt,

Herrn Krauthause für die Unterstützung im Labor, wir waren ein gutes Team, und

Herrn Dr. Weber, meinem Advocatus Diaboli, für die oft provokativen und dadurch so wichtigen Fragen.

Axel, Beate und Daniel möchte ich für die Unterstützung jeglicher Art zu jeder Zeit danken und für ihren unerschöpflichen Glauben an mich.

Billa und Susu möchte ich für die Ermutigung, die Hilfe, die Ablenkung und das manchmal ebenfalls nötige „Kopf hoch“ danken.