

Bestimmung von Fusarientoxinen in Lebensmitteln

Dissertation
vorgelegt von Dipl.-Lebensmittelchemiker Oliver Kappenstein

Von der Fakultät III – Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften
– Dr. rer. nat. –

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Berichterin: Prof. Dr. A. Hartwig
Berichter: Prof. Dr. R. Wittkowski
Berichter: Prof. Dr. Dr. E. Usleber
Vorsitzender: Prof. Dr. L. Kroh

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 14.12.2007

Berlin 2008
D 83

Impressum

Dissertationen

Vorgelegt von Oliver Kappenstein

Bestimmung von Fusarientoxinen in Lebensmitteln

Bundesinstitut für Risikobewertung
Pressestelle
Thielallee 88-92
14195 Berlin

Berlin 2008 (Dissertationen 01/2008)
221 Seiten, 80 Abbildungen, 84 Tabellen
€ 15,-

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

ISSN 1863-852X ISBN 3-938163-34-8

Inhalt

1	Zusammenfassung	7
2	Abstract	9
3	Einleitung und Problemstellung	11
3.1	Einleitung	11
3.2	Problemstellung	12
4	Theoretischer Teil	15
4.1	Trichothecen- und Zearalenon-produzierende Schimmelpilze	15
4.2	Trichothecene	17
4.2.1	Einteilung der Trichothecene	17
4.2.2	Physikalisch-chemische Eigenschaften der Typ A und Typ B Trichothecene	18
4.3	Zearalenon und dessen Metabolite	19
4.3.1	Physikalisch-chemische Eigenschaften	19
4.4	Toxikologie der Typ A und Typ B Trichothecene	20
4.4.1	Toxikokinetik: Aufnahme, Verteilung, Absonderung und Metabolismus	20
4.4.2	Toxische Wirkungen – Deoxynivalenol	21
4.4.3	Toxische Wirkungen – Nivalenol	23
4.4.4	Toxische Wirkungen – T-2 Toxin und HT-2 Toxin	24
4.4.5	Humantoxizität von Trichothecenen	25
4.5	Toxikologie von Zearalenon und Derivaten	26
4.5.1	Toxikokinetik: Aufnahme, Verteilung, Absonderung und Metabolismus	26
4.5.2	Humantoxizität von Zearalenon und dessen Derivaten	30
4.6	Risikoabschätzung der Fusarientoxine	30
4.6.1	Risikoabschätzung für die Trichothecene	31
4.6.2	Risikoabschätzung für die Summe der Typ A und Typ B Trichothecene	31
4.6.3	Risikoabschätzung einzelner Trichothecene	31
4.6.4	Risikoabschätzung für T-2 Toxin und HT-2 Toxin	32
4.6.5	Risikoabschätzung für Deoxynivalenol	32
4.6.6	Risikoabschätzung für Zearalenon und dessen Derivaten	33
4.7	Gesetzliche Regelungen von Fusarientoxinen	34
4.8	Vorkommen von Fusarientoxinen	36
4.9	Einfluss der Lebensmittelverarbeitung auf Fusarientoxine	39
4.9.1	Reinigung und Sortierung von Getreide	39
4.9.2	Trockenvermahlung von Getreide	39
4.9.3	Nassvermahlung von Getreide	39
4.9.4	Herstellung von Speiseöl	41
4.9.5	Herstellung von Brot, Gebäck, Geröstetem und Gefrorenem	41
4.9.6	Kochen und Konservenherstellung	42
4.9.7	Extrudierte Getreideerzeugnisse	42
4.9.8	Herstellung von Bier, Mälzen und Brauen	43
4.10	Analytik von Typ A und Typ B Trichothecenen	43
4.10.1	Extraktion	43

4.10.2	Aufreinigung	44
4.10.3	Gaschromatographische Methoden	45
4.10.4	Flüssigkeitschromatographische Methoden	46
4.10.5	Massenspektrometrische Methoden	47
4.11	Analytik von Zearalenon und dessen Derivaten	49
4.11.1	Extraktion und Aufreinigung	49
4.11.2	Gaschromatographische Methoden	50
4.11.3	Flüssigkeitschromatographische Methoden	50
4.11.4	Massenspektrometrische Methoden	51
4.12	Immunologische Methoden	51
5	Material und Methoden	53
5.1	Materialien und Chemikalien	53
5.1.1	Chemikalien	53
5.1.2	Biochemische Reagenzien und Hilfsmittel	53
5.1.3	Standardsubstanzen	53
5.1.4	Hilfsmittel	53
5.1.5	Geräte und Software	54
5.2	Probenmaterial	54
5.3	Probennahme und Homogenisierung	55
5.4	Enzym-Linked-Immunosobent-Assay – ELISA (Screeningverfahren)	55
5.4.1	Bestimmung von Zearalenon mittels dc-ELISA	55
5.4.2	Bestimmung von Deoxynivalenol mittels dab-ELISA	56
5.5	Extraktionsverfahren	56
5.5.1	Routineextraktionsverfahren für stärke- und faserhaltige Lebensmittel	56
5.5.2	Extraktionsverfahren für Säuglings- und Kleinkinder- Fertignahrung	56
5.6	Kombinierte Extraktion und Aufreinigung mit beschleunigter Lösungsmittlextraktion (ASE)	57
5.6.1	Methodenentwicklung einer ASE-Multi-Trichothecen-Methode	57
5.6.2	Modifizierung der ASE-Multi-Trichothecen-Methode	60
5.6.3	Chemische Modifikation der Aktivkohle	61
5.7	Aufreinigungsmethoden	63
5.7.1	Aufreinigung mittels Festphasenextraktion (SPE)	63
5.7.2	Aufreinigung mittels Extrelut-Kochsalzgemisch	64
5.7.3	Aufreinigung mittels Größenausschlusschromatographie (GPC)	65
5.7.3.1	Methodenentwicklung	66
5.7.3.2	Durchführung	67
5.7.4	Aufreinigung mittels Immunoaffinitätschromatographie-Säulen (IAC)	68
5.8	Analytische Erfassung mittels HPLC	68
5.8.1	Bestimmung von Deoxynivalenol mittels HPLC-UV/VIS bzw. DAD	68
5.8.2	Bestimmung von Zearalenon und dessen Derivaten mittels HPLC-FLD	69
5.9	Analytische Erfassung mittels LC-MS/MS	70
5.9.1	Grundlagen der Tandem-Massenspektrometrie	70
5.9.2	Messbedingungen für Typ A und Typ B Trichothecene	70
5.9.3	Messbedingungen für Zearalenon und dessen Derivate	72
5.9.4	Ionenpaar-Übergänge der massenspektrometrischen Methoden	73

6	Ergebnisse und Diskussion	75
6.1	Validierung von analytischen Methoden – Grundlagen und gesetzliche Vorgaben	75
6.2	Charakterisierung von Referenzmaterial bzw. Vergleichsmaterial	76
6.2.1	Homogenität der Vergleichsmaterialien	77
6.2.2	Stabilitätsuntersuchungen der Vergleichsmaterialien	77
6.2.3	Externe Validierung des Deoxynivalenol-Vergleichsmaterials	79
6.2.4	Externe Validierung des Zearalenon-Vergleichsmaterials	80
6.2.5	Laborvergleichsuntersuchungen	80
6.3	Probenhomogenität: Verteilung der Partikelgröße	83
6.3.1	Siebuntersuchung des Deoxynivalenol Vergleichsmaterials	84
6.3.2	Siebuntersuchung einer handelsüblichen Maisgrieß-Probe	86
6.4	Kreuzreaktivität in der Immunoaffinitätschromatographie	87
6.4.1	Deoxynivalenol Immunoaffinitätschromatographie-Säulen	88
6.4.2	T-2 Toxin-Immunoaffinitätschromatographie-Säulen	89
6.4.3	Zearalenon-Immunoaffinitätschromatographie-Säulen	90
6.5	Routinemethoden für Deoxynivalenol und Zearalenon	90
6.5.1	Bestimmung von Deoxynivalenol in Getreide und Getreideprodukten	90
6.5.1.1	Wellenlängenvergleich der UV-Detektion	91
6.5.2	Bestimmung von Zearalenon in Getreide und Getreideprodukten	94
6.6	Bestimmung von Deoxynivalenol und Zearalenon in Säuglings- und Kleinkinder-Fertignahrung	97
6.7	Bestimmung von Zearalenon in Konsum- und Säuglingsfolgemilch	99
6.8	ASE-Multi-Trichothecen-Methode	101
6.8.1	Nachweisgrenzen der LC-MS/MS-Methode	104
6.8.2	Matrixbelastung der ASE-Multi-Trichothecen-Methode	106
6.8.3	Matrixkalibrierung der ASE-Multi-Trichothecen-Methode	108
6.9	Größenausschlusschromatographie – Bestimmung von Fusarientoxinen in Speiseöl	112
6.10	Bestimmung von Typ A und Typ B Trichothecenen in Bier	116
6.11	Qualitätskontrollkarten der eingesetzten Enzym-Linked-Immunosobent-Assay	120
6.12	Methodenvergleich und Kreuzvalidierung	121
6.12.1	Vergleich der DON-Methoden	121
6.12.2	Kreuzvalidierung der DON-Routinemethoden	123
6.12.3	Kreuzvalidierung unterschiedlicher Massenspektrometer in der DON-Analytik	123
6.12.4	Kreuzvalidierung der eingesetzten Ionisierungstechniken (APCI – ESI)	124
6.12.5	Kreuzvalidierung der ASE-Multi-Trichothecen-Methode	125
6.12.6	Kreuzvalidierung der Zearalenon-Routinemethoden	125
6.13	Massenspektrometrie und Fragmentierung von Fusarientoxinen	126
6.13.1	Massenspektrometrie von Trichothecenen	126
6.13.2	Massenspektrometrie von Zearalenon und dessen Derivaten	129
6.13.3	Absicherungsverfahren in der Tandem-Massenspektrometrie	131
6.14	Belastung der Lebensmittel mit Fusarientoxinen	132
6.14.1	DON-Belastung von verschiedenen Lebensmittelgruppen	132

6.14.2	DON-Belastung von Bier	133
6.14.3	DON-Belastung von Getreide- und Getreideprodukten	134
6.14.4	DON-Belastung von Teigwaren	136
6.15	Abschätzung der DON-Aufnahme durch den deutschen Verbraucher	137
6.16	ZEA-Belastung von Lebensmitteln	139
6.16.1	ZEA-Belastung von Getreideprodukten	140
6.16.2	ZEA-Belastung von pflanzlichen Speiseölen	140
6.16.3	ZEA-Belastung von Säuglings- und Kleinkindernahrung	141
6.17	Nivalenol-Belastung von Lebensmitteln	143
6.18	T-2 Toxin- und HT-2 Toxin-Belastung von Lebensmitteln	143
7	Schlussfolgerung und Ausblick	147
8	Literaturverzeichnis	153
9	Anhang	183
9.1	Abschnitt I	183
9.2	Abschnitt II	186
9.2.1	Bestimmung von DON mittels dab-ELISA	186
9.2.2	Bestimmung von ZEA mittels dc-ELISA	190
9.3	Abschnitt III	194
10	Abkürzungen und Akronyme	209
11	Abbildungsverzeichnis	212
12	Tabellenverzeichnis	217
13	Danksagung	221

1 Zusammenfassung

Infolge der Häufigkeit des weltweiten Vorkommens von Fusarientoxinen insbesondere von Trichothecenenen (Typ A und Typ B) und Zearalenon (ZEA) (einschließlich Derivate) und deren toxikologischen Endpunkten resultiert ein erhöhtes Expositionsrisiko für den Menschen. Eine erste Risikobewertung für diese Toxine wurde von europäischen Gremien des „Wissenschaftlichen Lebensmittelausschusses“ (SCF) bzw. der „European Food Safety Authority“ (EFSA) und internationalen Gremien wie dem „Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives“ (JECFA) vorgenommen. Für Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZEA) wurden auf nationaler Ebene bereits Höchstmengen erlassen. Auf europäischer Ebene werden sowohl für diese Toxine als auch für weitere Fusarientoxine in naher Zukunft Höchstmengen festgesetzt.

Zur Kontrolle von Höchstmengen sind adäquate validierte Analysenverfahren dringend erforderlich. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung von robusten Analysemethoden, die mit hinreichender Selektivität und notwendiger Empfindlichkeit sowohl Typ A und Typ B Trichothecene als auch ZEA und dessen Derivate in unterschiedlichen Lebensmittelgruppen nachweisen können. Weiterhin sollten Produkte des Marktes auf Belastung mit den genannten Fusarientoxinen mit den entwickelten Methoden untersucht werden. Auf Grundlage einer repräsentativen Probenzahl sollte eine Expositionsabschätzung für DON und ZEA durchgeführt werden.

Zunächst wurden Untersuchungen zur Probenhomogenität und dem damit einhergehenden Probennahmefehler durchgeführt. Es zeigte sich, dass nach Vermahlung mittels Zentrifugalmühle durch ein Distanz-Ringsieb mit einer Lochweite von 1000 µm eine gute Homogenität erreicht werden konnte.

Weiterhin wurden ein Vergleichsmaterial für DON und ZEA hergestellt und die Homogenität statistisch abgesichert sowie die Stabilität der Materialien über einen Zeitraum von 17 Monaten belegt.

Die Vergleichsmaterialien wurden zur hausinternen Methoden-Validierung für die Laborvergleichsuntersuchungen im Rahmen des Verbundforschungsvorhabens und in Ringerversuchen auf europäischer Ebene eingesetzt. Hierdurch konnte zum einen gezeigt werden, dass die Materialien die Anforderungen an Referenzmaterialien und zum anderen die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Analysemethoden die Leistungskriterien von Referenzverfahren erfüllen.

Die bisherige Analytik von Typ A und Typ B Trichothecenen bestand grundsätzlich aus den zwei aufeinanderfolgenden Verfahrensschritten Extraktion und Aufreinigung. Um diesen zeitintensiven Arbeitsaufwand zu automatisieren, wurde ein automatisiert-kombiniertes Probenextraktions- und Aufreinigungsverfahren auf Grundlage der ASE Extraktionstechnik entwickelt und optimiert. Hierbei wurde durch das Einbringen eines Aktivkohlefilters in die Extraktionshülse erstmals eine Methode etabliert, die die Verfahrensschritte Extraktion und Aufreinigung miteinander verbindet und gleichzeitig sehr gute Validationsergebnisse liefert. Dieser kombiniert-automatisierte Analysenschritt bedingt eine wesentliche zeitliche Verkürzung der Probenaufarbeitung und Reduktion der Kosten der Einzelanalyse.

Darüber hinaus wurde die Gelpermeationschromatographie (GPC) für die Probenaufarbeitung zur Untersuchung von pflanzlichen Speiseölen eingesetzt. ZEA konnte nach GPC-Aufreinigung ohne weitere Aufreinigungsschritte mittels LC-ESI-MS/MS quantifiziert werden. Basierend auf der neuen Methodik konnte erstmals die Zearalenonbelastung von pflanzlichen Speiseölen insbesondere Maiskeimöl aufgezeigt werden. Dabei wurde deutlich, dass sowohl die Belastungshäufigkeit als auch die Belastungshöhe dieser Lebensmittelgruppe im Vergleich zu den stärke- und faserbasierenden Produkten deutlich höher war. Weiterhin

zeigten einige pflanzliche Speiseöle, und hier hauptsächlich Hanföl, eine eindeutige Belastung mit T-2 Toxin und HT-2 Toxin.

Für stärke- und faserbasierende Getreideprodukte wurden analytische Routineverfahren für DON mittels HPLC-UV und für ZEA mittels HPLC-FLD entwickelt. Biere wurden mit einer Multimethode auf Grundlage der LC-MS/MS auf Trichothecene (Typ A und B, ausgenommen Nivalenol) untersucht. Die Validierungsparameter der Methoden erfüllten die Leistungskriterien gemäß der EU-Richtlinie 2005/38/EG.

Die in der modernen Mykotoxinanalytik häufig eingesetzten DON-, T-2 Toxin- und ZEA-Immunoaffinitätsäulen (IAC) wurden im Rahmen dieser Arbeit auf Kreuzreaktivität mit strukturverwandten Toxinen getestet. Die eingesetzten DON IAC-Säulen zeigten eine deutliche Kreuzreaktivität gegenüber dem DON Metabolit Deepoxy-Deoxynivalenol (DOM-1). Die T-2 Toxin IAC-Säulen wiesen ebenfalls für HT-2 Toxin und d₃-T-2 Toxin eine gute Wiederfindung auf. Die ZEA-IAC-Säulen verschiedener Anbieter hatten für ZEA und die Gruppe der ZEA-Metabolite ebenfalls sehr gute Wiederfindungen. Somit konnte die Kreuzreaktivität der ZEA-IAC-Säulen für die Einführung des Zearalanons als Internen Standard für die Bestimmung von ZEA in Konsummilch bzw. pflanzlichen Speiseölen genutzt werden.

Die Untersuchungsergebnisse der Lebensmittel auf Fusarientoxine zeigten, dass Hartweizen und daraus hergestellte Erzeugnisse, insbesondere Teigwaren (Nudeln), am stärksten mit DON belastet waren. Die Maximalwerte für DON in Hartweizen und daraus hergestellten Erzeugnissen lagen bei 2.000 bis 3.000 µg/kg.

Die höchste Belastung mit Zearalenon wurde in Mais und daraus hergestellten Erzeugnissen, einschließlich Maiskeimöl, festgestellt. Maiskeimöle wiesen eine Belastung von bis zu 691 µg/kg auf. Die ZEA-Konzentrationen in Lebensmitteln aus anderen Getreidesorten lagen vorwiegend unter 10 µg/kg.

2 Abstract

Due to the frequent occurrence of type A and type B trichothecenes and zearalenone and its derivatives in foods and their toxicological end points a potential health risk results to human. A risk assessment for those mycotoxins has already been pointed out by European bodies “Scientific Committee on Food” (SCF) and the “European Food Safety Authority” (EFSA) and also by international bodies like the „Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives“ (JECFA).

At the level of national legislation, limits for deoxynivalenole (DON) and zearalenone (ZEA) in foods were adopted. In the foreseeable future at European level for those toxins and further Fusarium toxins a regulation will be expected.

Hence, it was the purpose of this work to develop robust analytical methods with sufficient selectivity and sensitivity for type A and type B trichothecenes as well as ZEA and its metabolites of a broad variety of foods. In addition, a survey concerning the contamination of foods of the market with Fusarium toxins was placed.

The sampling procedure represents an important source of error for the mycotoxin analysis. To minimise this influence, laboratory sub-samples have to be as homogeneous as possible. Within the scope of this work the analyte distribution of the milled and homogenised sub-sample has been exercised. As a result of these sieve experiments it has been proven that the application of a centrifugal mill and a distance ring sieve with a mesh width of 1000 µm provided a satisfying homogeneity.

Furthermore, two reference materials, one contaminated with DON and one contaminated with ZEA, have been produced with statistically ensured homogeneity. Stability has been documented over a period of 17 months. Both materials have been applied for inhouse method validation, for proficiency testing within the research project and for interlaboratory testing at European level. This proceeding provided two benefits; on one hand it could be proved that the two materials fulfill the requirements of certified reference materials and that the newly established analytical methods realised the performance criteria of reference methods.

The analysis of the type A and type B trichothecenes in foods involves three steps including sample extraction, clean-up, and detection. However, the conventional extraction and clean-up methods are expensive, time-consuming, and do not allow the simultaneous detection of type A and B trichothecenes because of their different polarity. Here, a new instrumental method, which allows a quick and efficient sample preparation for the analysis of trichothecenes, has been developed. This so-called accelerated solvent extraction (ASE) online clean-up method combines the extraction and clean-up process by addition of a charcoal filter (cleaning unit) to the ASE extraction cartridge (extraction unit). The resultant extracts could be directly applied to the liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS/MS). Thus, the ASE online clean-up method coupled with quantification by LC-MS/MS allowed the simultaneous detection of both types of trichothecenes. For each substance, recovery and relative standard deviation under repeatable conditions (RSD_r) fulfilled the requirements given by the EU regulation (2005/38/EG).

Furthermore, a new method for the determination of zearalenone in edible oils with size exclusion chromatography (SEC) followed by LC-MS/MS as well as HPLC-FLD was developed and validated. No further clean up step was necessary by using the SEC combined with LC-MS/MS determination.

Due to the development of this method ZEA exposure could be estimated whereas vegetable edible oils and here especially corn germ oil were of significant importance for human inges-

tion. Furthermore, mycotoxins were detected in another group of edible vegetable oils, T2 toxin and HT-2 toxin were mainly found in hemp oil.

Within the scope of this work, analytical routine procedures for starch- and fibre-based cereal products have been installed: an HPLC-UV system for the determination of DON and an HPLC-FLD system for ZEA. Type A and type B trichotecenes (except nivalenole) in beer have been analysed by with an LC-MS/MS multi method. Validation parameters of all established methods satisfied the requirements of EU directive 2005/38/EG.

Immuno affinity (IA) columns are widespread in mycotoxin analysis, e.g. DON-, T-2 toxin- and ZEA-IA columns, which have been examined for their capability of cross reacting with structure related toxins.

DON IA columns showed an important cross reactivity against the DON metabolite deepoxy-deoxynivalenole (DOM-1). T 2- IA columns of showed satisfying recovery rates for HT-2 toxin and d₃-T-2 toxin. Thus, cross reactivity of the used antibodies could be proven for these compounds. ZEA IA columns of different suppliers showed satisfying recovery rates for ZEA and its metabolites. Cross reactivity of ZEA IA columns has been utilised to establish an internal standard substance for the determination of ZEA in milk and vegetable oil.

In the period between October 2001 and March 2004, a total of 938 food samples, purchased from the Berlin market, were analysed. DON was found in most foods with an incidence of > 50 % containing cereals. The highest DON contamination was found in durum wheat and products thereof (including pasta). Median DON levels in durum and products containing durum were about 2-10 times higher than those of different commonly contaminated cereals, with maximum DON levels of 2000 to 3000 µg/kg.

The incidence of ZEA was much lower, typically at 20 - 30 %, higher percentages and levels were mainly found in maize and products thereof, in particular in corn germ oil. All other cereals usually contained much lower concentrations of ZEA (<10 µg/kg).

3 Einleitung und Problemstellung

3.1 Einleitung

Mykotoxine sind von Schimmelpilzen produzierte sekundäre Stoffwechselprodukte, die zu gesundheitlichen Schädigungen beim Menschen und höheren Tieren führen können (BENNET ET AL. (1987)). Sie werden sowohl während des Wachstums und der Lagerung von pflanzlichen Agrargütern als auch nach deren Verarbeitung gebildet (SMITH ET AL. (1994)). Mykotoxine werden von verschiedenen Pilzen unterschiedlicher Gattungen produziert, die ubiquitär verbreitet sind (MARTIN UND GILMAN (1976); SMITH ET AL. (1994); GAREIS (1999)).

Bereits während des 19. Jahrhunderts, insbesondere aber zum Ende des 2. Weltkrieges führte der Verzehr von Getreide, das aus verpilztem überwintertem Saatgut hervorging, zum Tode Hunderttausender in der damaligen Sowjetunion. Die Krankheit wurde unter dem Namen *Alimentäre Toxische Aleukie* (ATA) bekannt, weil sie zu starken Schädigungen der Blutbildung und des Immunsystems führt (GADJUSEK (1953); MAYER (1953); JOFFE (1960, 1962, 1971); LEONOV (1977)). Dafür verantwortlich waren vermutlich Mykotoxine der Trichothecen-Gruppe und hier insbesondere das T-2 Toxin bzw. das HT-2 Toxin, das von Feldpilzen der Gattungen *Fusarium* gebildet wird.

Die durch Fusarientoxine hervorgerufene Erkrankung, die mit einer Verminderung der Leukozytenzahl, einer Schädigung des Knochenmarks und Hautnekrosen einherging, war Grundlage für Forschungen zu Trichothecenen der Typ A und Typ B-Gruppen auf dem Sektor der biochemischen Kriegsführung. So wird berichtet, dass es einen militärischen Einsatz von Typ A Trichothecenen bei Zwischenfällen mit sogenanntem „gelbem Regen“ (Yellow Rain) in Laos (1975-81), Kambodscha (1979-81) und Afghanistan (1979-81) gegeben haben soll, wobei die Freisetzung jeweils durch Flugzeuge erfolgte. Die Anzahl der Todesfälle wurde auf über 6300 Tote in Laos, 1000 in Kambodscha und 3042 in Afghanistan geschätzt. Die Angriffe sollen sich in entlegenen Dschungelregionen zugetragen haben, was die Bestätigung der Angriffe und die Sicherstellung von Proben des Kampfstoffs äußerst schwierig gestaltete, womit es bis heute keine eindeutigen Beweise für einen solchen gezielten Einsatz von Trichothecenen gibt.

In Deutschland führten überdurchschnittlich hohe Niederschläge in den Sommermonaten der Jahre 1981, 1987, 1991, 1992 und 1998 zu einem starken Auftreten von Ährenfusariosen (AHRENS und FEHRMANN (1984); MATTHIES ET AL. (2000); MÜLLER ET AL. (1997); OBST (1990)). Mahl- und Backqualitäten ändern sich bei mit *Fusarium* befallenen Getreide, da der Pilz Stärkegranulat, Zellwände und Proteine des Endosperms zerstört (BECHTEL ET AL. (1985); DEXTER ET AL. (1996); NIGHTINGALE ET AL. (1999)). Die Auflauftrate infizierter Getreidekörner ist reduziert und das Erntegut ist mykotoxinbelastet (CHELKOWSKI und PERKOWSKI (1992); GILBERT UND TEKAUZ (1995); LEPSCHY VON GEISSENTHAL (1992)).

Obwohl Zearalenon selbst keine Steroidstruktur besitzt, wird es durch seine dosisabhängige östrogene Wirkung charakterisiert. Bei der Vielzahl der Publikationen, die sich mit den Auswirkungen hormonell aktiver Substanzen auf die Gesundheit von Nutztieren beschäftigen, werden Fruchtbarkeitsstörungen wie der Hyperöstrogenismus beim Schwein oder seltener beim Rind (DROCHNER (1990)) als Folge einer Kontamination mit dem Mykotoxin Zearalenon genannt (PALYUSIK (1977); ETIENNE und DOURMAD (1994) und BÖHM (1992, 2000)). Aufgrund der Struktur ist Zearalenon in der Lage, an Östrogenrezeptoren in Uterus, Hypothalamus und Hypophyse zu binden und dabei ausgeprägte östrogene Wirkungen zu entfalten. Diese Substanz kann insbesondere bei Schweinen zu Schwellungen der weiblichen Genitalien und zur Verminderung der Fertilität führen. Hauptsächlich präpubertäre weibliche Zuchtschweine reagieren empfindlich auf Zearalenon (DROCHNER (1998), DÄNICKE ET AL. (2000)). Chronische Intoxikationen können so zu erheblichen Fruchtbarkeitsstörungen führen (BAUER ET AL. 1987, LUSKY ET AL. 1997).

Die Wirkungen von Zearalenon auf den Menschen sind nicht vollständig geklärt. Bei Mädchen wird das frühzeitige Eintreten der Thelarche in bestimmten Regionen der Erde in Zusammenhang mit einer Zearalenon-Exposition gesehen. So wurden 1984 bei einem verstärkten Auftreten verfrühten Pubertätsbeginnes bei jungen Mädchen in Puerto Rico bei einem Teil der Patientinnen Zearalenon und dessen Derivate im Blut bestimmt. Zearalenon wurde im Gewebe der Gebärmutter Schleimhaut von 49 Frauen nachgewiesen. Es wurden endometrialer Drüsenkrebs, endometriale Hyperplastie und proliferative Endometrien festgestellt (TOMASZEWSKI ET AL. (1998)).

Alle diese Beispiele für akute bzw. chronische Erkrankungen bei Menschen, verursacht durch Fusarientoxine der Trichothecen-Gruppe als auch von Zearalenon und dessen Derivaten, bedingen die Notwendigkeit für die Überwachung dieser Verbindungen in den Grundnahrungsmitteln insbesondere aber in Lebensmitteln für Säuglinge und Kleinkinder. In der Europäischen Union wird derzeit über Höchstmengen für Deoxynivalenol, andere Trichothecene und Zearalenon beraten. In Deutschland wurden mit der am 4. Februar 2004 verkündeten Verordnung zur Änderung der Mykotoxin-Höchstmengenverordnung und der Diätverordnung Höchstmengen für Deoxynivalenol und Zearalenon in Lebensmitteln festgelegt.

3.2 Problemstellung

Wie einleitend dargelegt, sind die Fusarientoxine der Trichothecen-Gruppe als potenzielle Ursachen für eine Vielzahl von endemisch und akut verlaufenden Erkrankungen beim Menschen verantwortlich.

Aufgrund dieser Tatsache müssen europa- und weltweite gesetzliche Verordnungen für Trichothecene und Zearalenon zum Schutz der menschlichen Gesundheit festgesetzt werden. Aufbauend auf der Risikobewertung unter Berücksichtigung toxikologischer Erkenntnisse, Belastungsdaten der Lebensmittel und dem Ernährungsverhalten der Bevölkerung erfolgt die rechtliche Durchsetzung in der Festlegung von Höchstmengen. Zur Überwachung der festgesetzten Höchstmengen werden wiederum analytische Verfahren benötigt, die eine Begutachtung der betroffenen Lebensmittelgruppen zulässt.

Hierzu ist festzuhalten, dass in der Literatur unterschiedliche Methoden zur Bestimmung von Trichothecenen und Zearalenon in Lebens- und Futtermitteln beschrieben sind. Diese Methoden entsprechen aber nur in den seltensten Fällen den Anforderungen an gerichtsfeste analytische Verfahren und es ist oft nicht möglich, mehrere Verbindungen gleichzeitig zu bestimmen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb, neben den für diese Toxingruppe bekannten Verbindungen Deoxynivalenol und Zearalenon weitere Typ A und Typ B Trichothecene bzw. weitere Resorcyssäure-Lactone gemeinsam zu erfassen. Um diese Zielsetzung zu erreichen, wurden folgende Arbeitsschwerpunkte festgelegt:

- Charakterisierung von analysengerechten Labor-Teilproben unter Berücksichtigung der europäischen Vorgaben zur Probennahme
- Einsatz von neuartigen Techniken für die Extraktion der Toxine
- Aufreinigung von Rohextrakten aus unterschiedlichen Lebensmittelmatrizes
- Trennung und Detektion sowohl von Typ A und Typ B Trichothecenen als auch von Zearalenon und dessen Derivaten
- Methodvalidierung durch Laborvergleichsuntersuchungen und Ringversuche
- Erstellung von Referenzmethoden auf Basis der LC-MS/MS-Methodik

Ausgehend von diesen Arbeitsschwerpunkten sollten effiziente und moderne Analyseverfahren erstellt, optimiert und validiert werden. Neben diesen routinemäßig einsatzfähigen Methoden sollten ebenfalls Referenzmethoden entwickelt und die Verfahren kreuzvalidiert werden. Zuletzt sollte die Möglichkeit einer Multitoxin-Analytik eingehender betrachtet werden.

Im Falle der Extraktion als auch für die Aufreinigung der Analyten sollten bereits bestehende Verfahren und neuartige Techniken für entsprechend problemorientierte Fragestellungen erarbeitet und deren Effektivität und routinemäßige Anwendbarkeit klargestellt werden. Dabei sollte besonders die Störanfälligkeit der Verfahren durch begleitende Lebensmittelmatrix berücksichtigt werden.

Die hausintern validierten Methoden sollten durch Laborvergleichsuntersuchungen und Ringversuche über den Zeitraum des Verbundforschungsvorhabens kontrolliert werden, um eine funktionsfähige Analytik zu dokumentieren und die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

Die Trennungs- und Detektionssysteme sollten auf deren Empfindlichkeit und Selektivität untersucht werden. Unter anderem sollte ein Vergleich von Referenzverfahren (LC-MS/MS), Routineverfahren (HPLC-UV/VIS; HPLC-FLD) und immunochemischen Verfahren (ELISA) erstellt werden.

Die optimierten Analysemethoden sollten für die Datenerhebung im Verbundforschungsvorhaben „Vorkommen und Analytik wichtiger Fusarientoxine (Deoxynivalenol und Zearalenon), sowie deren Aufnahme durch den deutschen Verbraucher“ eingesetzt werden, um die Belastungssituation des deutschen Lebensmittel-Warenkorbs zu ermitteln und darüber hinaus notwendige Risikoabschätzungen durchzuführen.

4 Theoretischer Teil

4.1 Trichothecen- und Zearalenon-produzierende Schimmelpilze

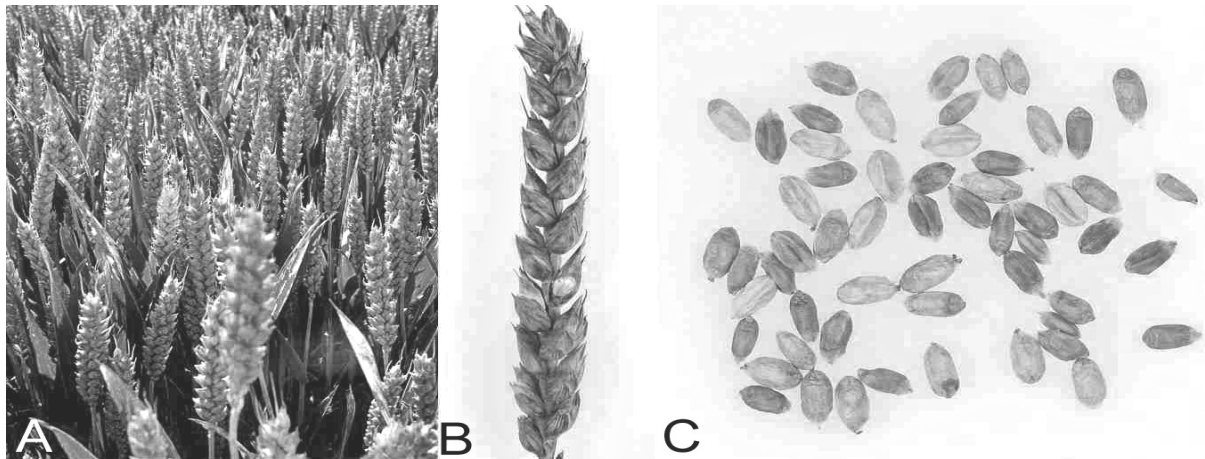
Das Wachstum der Getreidepflanze wird durch eine Vielzahl biotischer und abiotischer Faktoren des umgebenden ökologischen Systems bestimmt. Ein wichtiger Faktor ist der mikrobielle Befall des Getreides, zu dem auch die pilzliche Mikroflora gehört. Der häufigste Befall durch Schimmelpilze wird durch Vertreter der Gattungen *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Helminthosporium*, *Epicoccum* und *Microdochium* hervorgerufen (LACEY (1989)).

Pflanzenpathogene Pilze der Gattung *Fusarium* gehören zur natürlichen Mikroflora des Oberbodens. Zur Gruppe der *Fusarien* zählt man diejenigen Mykotoxine, die hauptsächlich von *Fusarium* spp. gebildet werden. Darunter fallen Trichothecene, Fumonisine, Moniliformin, Zearalenon, Butenolide sowie die zur Stoffklasse der zyklischen Oligopeptide zählenden Enniatine, Beauvericine und Fusaroproliferine. Am häufigsten unter den Ährenfusarien kommt *F. graminearum* vor, in feuchtkühlen Gebieten auch *F. culmorum*.

Tab. 1: Zusammenhang zwischen produziertem Mykotoxin und der Pilzgattung

Mykotoxin	Pilzgattung
Typ A Trichothecene	
T-2 Toxin	<i>F. tricinatum</i> , <i>F. culmorum</i> (<i>F. roseum</i>), <i>F. solani</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. sporotrichioides</i> und <i>Trichoderma lignorum</i>
HT-2 Toxin	<i>F. culmorum</i> (<i>F. roseum</i>), <i>F. poae</i> und <i>F. sporotrichioides</i>
T-2 Tetraol	<i>F. poae</i> und <i>F. sporotrichioides</i>
Neosolanol	<i>F. culmorum</i> (<i>F. roseum</i>), <i>F. solani</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. equiseti</i> und <i>F. averaceum</i>
Verrucarol	Produkt einer alkalischen Hydrolyse von Verrucarin A, welches aus <i>Myrothecium verrucaria</i> stammt
4,15-Diacetoxyscirpenol	<i>F. roseum</i> , <i>F. sambucinum</i> , <i>F. Tricinatum</i> und <i>F. equiseti</i>
15-Acetoxy-scirpenetriol	<i>F. roseum</i> und <i>F. sambucinum</i>
Typ B Trichothecene	
Nivalenol	<i>F. nivale</i> , <i>F. graminearum</i> und <i>F. crookwellense</i>
4-Deoxynivalenol	<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> und <i>F. roseum</i>
3-Acetyl-4-deoxynivalenol	<i>F. culmorum</i> und <i>F. graminearum</i>
15-Acetyl-4-deoxynivalenol	<i>F. graminearum</i>
Fusarenon X	<i>F. nivale</i> , <i>F. crookwellense</i> , <i>F. graminearum</i> und <i>F. equiseti</i>
Trichothecin	<i>F. roseum</i>
Zearalenon und Derivate	
Zearalenon	<i>F. culmorum</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. equiseti</i> und <i>F. cerealis</i>

Die Vertreter der Fusarien sind dadurch gekennzeichnet, dass sie zum Wachstum eine sehr hohe Wasseraktivität ($a_w > 0,85$) benötigen. Sie werden in der Gruppe der Feldpilze zusammengefasst. Eine mögliche Toxinkontamination durch *Fusarium* spp. hat häufig schon vor der Ernte stattgefunden (CHELKOWSKI ET AL. (1991)). Die Sporen werden mittels Wind, Wasserspritzer auf dem Boden oder über den Kontakt mit infizierten Pflanzenteilen (Fruchtfolge) übertragen. Äußerst kritisch für eine Infektion ist dabei die Zeit der Blüte (SUTY ET AL. (1996)), wobei ein feuchtwarmes Klima die Infektion begünstigt. Die Getreidekrankheit „Weißährigkeit“, die im englischsprachigen Raum als *Fusarium Head Blight* (FHB) bekannt ist, entsteht vor allem durch Befall mit *F. graminearum* (WIERSMA ET AL. (1996); SCHAAFSMA ET AL. (1993)) und *F. culmorum* (PERKOWSKI ET AL. (1996)). Diese Weißährigkeit zeigt Abb. 1.

Abb. 1: Fusarium Weißfährigkeit am Beispiel Weizen

A = ausgebleichte Ähre im Bestand;
 B = rötliche Sporenlager an befallenem Ährchen;
 C = ausgebleichte, befallene und gesunde Körner einer Ähre

Die Ausdehnung von FHB ist eng mit übermäßiger Feuchtigkeit zur Zeit der Blüte verknüpft. Der Zeitpunkt der Niederschläge ist wesentlich entscheidender als die Menge des Niederschlags nach der Infektion. *F. graminearum* wächst optimal bei einer Temperatur von 24 °C - 26 °C und einem a_w -Wert über 0,88. *F. culmorum* wächst optimal bei 21 °C und einem a_w -Wert über 0,87 (PITT UND HOCKING (1997)). Die geographische Verbreitung der beiden Arten steht im Zusammenhang mit dem Temperaturoptimum, da *F. graminearum* bevorzugt in wärmerem Klima auftritt. Die jeweilige Befallssituation wird neben der Witterung von der Fruchtfolge, der Bodenbearbeitung und der Sortenwahl des Getreides beeinflusst.

Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass die Sporen dieser Organismen über lange Zeiträume lebensfähig sind und bei unsachgemäßer Lagerung, Transport und Verarbeitung wieder auskeimen und zur Mykotoxinbildung führen können (BENNETT UND RICHARD (1996)).

Alle Fusarien können sowohl auf der Pflanze, als auch später bei der Lagerung ihre Toxine bilden. JIMENEZ ET AL. (1996) stellten für *F. graminearum* die höchste Zearalenonproduktion bei einem a_w -Wert von 0,97 und einer Temperatur von anfänglich 28 °C, gefolgt von 12 °C, fest. MIROCHA (1967) wies ebenfalls auf den positiven Effekt eines Temperaturabfalls hin.

Schimmelpilze der Gattung *Fusarium* verursachen in der Maispflanze zwei unterschiedliche Krankheitsbilder. Die erste, im englischsprachigen Raum als „Gibberella ear rot“ oder Rotkolbenfäule (englisch „red ear rot“) bezeichnet, beginnt an der Spitze des Maiskolbens und entwickelt ein rotes bis rosafarbenes Myzel, das einen großen Teil des Maiskolbens befällt. Dieser wird in Nordamerika hauptsächlich von *F. graminearum* verursacht (KOEHLER (1959); SMITH UND WHITE (1988); MILLER (1994)). In Europa ist diese Pflanzenkrankheit mit weiteren *Fusarium*-Arten verbunden, insbesondere *F. culmorum* (MILLER (1994); BOTTALICO (1998)). „Gibberella ear rot“ herrscht in kühleren Bereichen oder jenen mit höheren Niederschlagsvorkommen während der Wachstumsphase (KOEHLER (1959); SMITH UND WHITE (1988); BOCAROV-STANCIC ET AL. (1997); ELLEND ET AL. (1997)). Das zweite Erscheinungsbild der Fusariose auf der Maispflanze wird als Fusarien-Kolbenfäule (englisch „Fusarium ear rot“) bezeichnet. Dieses tritt normalerweise zufällig auf unterschiedlichen Maiskörnern, Gruppen von Maiskörnern oder an beschädigten Kernen auf und besteht aus einem weißen oder leicht rosafarbenen Myzel. Diese typischen Symptome werden von *F. proliferatum*, *F. subglutinans* oder *F. verticillioides* verursacht. Abb. 2 verdeutlicht die durch verschiedene *Fusarium*-Arten bedingten Mais-Kolbenfäule.

Abb. 2: Fusarium Mais-Kolbenfäule. Weißes (*F. poae*) bis rosa-purpur gefärbtes (*F. graminearum*), filzig wolliges Myzel



„Fusarium ear rot“ und „Gibberella ear rot“ bevorzugen unterschiedliche klimatische Bedingungen. Im Gegensatz zu „Gibberella ear rot“ kommt „Fusarium ear rot“ in wärmeren und trockeneren Bereichen häufiger vor (MILLER ET AL. (1994); BOTTALICO (1998)). Diese Tatsache ist mit verschiedenen Temperaturoptima für *F. graminearum* und *F. verticillioides* verbunden. „Gibberella ear rot“ bevorzugt eine hohe Luftfeuchtigkeit im Wachstum, gefolgt von gemäßigten Temperaturen und hohen Niederschlagsmengen während der Reifungszeit. „Fusarium ear rot“ bevorzugt im Allgemeinen ein warmes, trockenes Klima während der Reifungszeit (MARASAS ET AL. (2000)).

4.2 Trichothecene

4.2.1 Einteilung der Trichothecene

Trichothecene sind eine Gruppe von natürlich vorkommenden Sesquiterpenen, die in erster Linie von *Fusarium*-Arten, aber auch von Vertretern der Gattungen *Cephalosporium*, *Cryptospora*, *Cylindrocarpon*, *Stachybotrys*, *Myrothecium*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Trichothecium* und *Verticimonosporium* (SMITH ET AL. (1994)) gebildet werden. Diese Tetrazyklen besitzen, wie in den Abb. 3 und Abb. 4 dargestellt, als Grundstruktur ein 12,13-Epoxy-trichothec-9-en Ringsystem und sind in vier Gruppen aufgeteilt, die als Typ A-, Typ B-, Typ C- und Typ D-Trichothecene bezeichnet werden. In Abhängigkeit von der Anwesenheit einer makrozyklischen Brücke, unterscheidet man zwischen makrozyklischen und nicht-makrozyklischen Trichothecenen. Die nichtmakrozyklischen Typ B Trichothecene unterscheiden sich von den Typ A Trichothecenen durch eine α,β -ungesättigte Ketogruppe am C₈-Atom. Diese beiden Typen umfassen mehr als 150 der bisher isolierten und identifizierten Trichothecene. Ein weiterer Epoxid-Ring zwischen den C₇- und C₈- oder C₉- und C₁₀-Atomen charakterisiert die Typ C Trichothecene. Typ D Trichothecene sind zwischen den C₄- und C₁₅-Substituenten über einen makrozyklischen Ring verbunden. Epidemiologische Untersuchungen zeigten, dass die vorherrschenden Typ A und Typ B Trichothecene am weitesten in Getreide und Futtermitteln als natürlich vorkommende Toxine verbreitet sind. Wie viele sekundäre Stoffwechselprodukte werden auch Trichothecene auf dem biosynthetischen Isopren-Bildungsweg gebildet. Auf diesem Weg stellt das Trichodien eine wichtige intermediäre Verbindung dar und lässt sich vergleichbar den Steroiden auf die Mevalonsäure als Ausgangssubstanz zurückführen (UENO, 1985). Abb. 3 und Abb. 4 zeigen die grundlegende Strukturformel der Typ B und Typ A Trichothecene.

Abb. 3: Grundstruktur der Typ B Trichothecene: 12,13-Epoxy-trichothec-9-en (nach Cole et al. (2003)); siehe Anhang Abschnitt I, Tab. A-1)

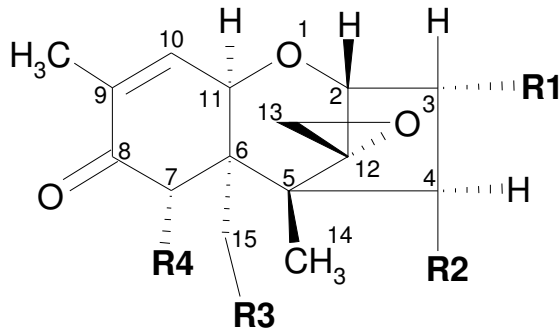
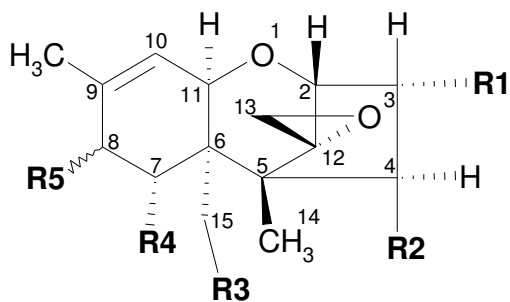


Abb. 4: Grundstruktur der Typ A Trichothecene: 12,13-Epoxy-trichothec-9-en (nach Cole et al. (2003)); siehe Anhang Abschnitt I, Tab. A- 2)



4.2.2 Physikalisch-chemische Eigenschaften der Typ A und Typ B Trichothecene

Auf Grund ihrer polaren Struktur sind Trichothecene gut löslich in Acetonitril, Methanol und Ethylacetat. WEI UND CHU (1986) zeigten, dass die Stabilität von Trichothecenen in Methanol, insbesondere derer, die eine Acetoxy-Gruppe aufweisen, einer Methanolyse unterliegen und lagerungsbedingte, UV-absorbierende (bei ca. 210 nm), bisher nicht identifizierte Nebenprodukte bilden. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Ester-Gruppen von Trichothecenen schon unter leicht alkalischen Bedingungen bzw. unter Einwirkung von Esterasen zu den korrespondierten Alkoholen reagieren können.

Der Hauptvertreter der Typ B Trichothecene ist das Deoxynivalenol. Es kristallisiert in farblosen Nadeln bei einem Schmelzpunkt von 151 - 153 °C. Die α , β -ungesättigte Ketogruppe der Typ B Trichothecene verursacht eine Absorption im kurzwelligen UV-Bereich. Das resultierende UV-Spektrum erweist sich jedoch als wenig charakteristisch. Die 12,13-Epoxy Gruppe ist sehr stabil gegenüber nucleophilen Reaktionen. Unter dem Einfluss von starken Säuren unterliegt die Trichothecen-Grundstruktur einer intramolekularen Umlagerung zu Apotrichothecenen. Die freien Hydroxylgruppen können derivatisiert (verestert) werden. Ein weiterer wichtiger Vertreter ist Nivalenol (NIV).

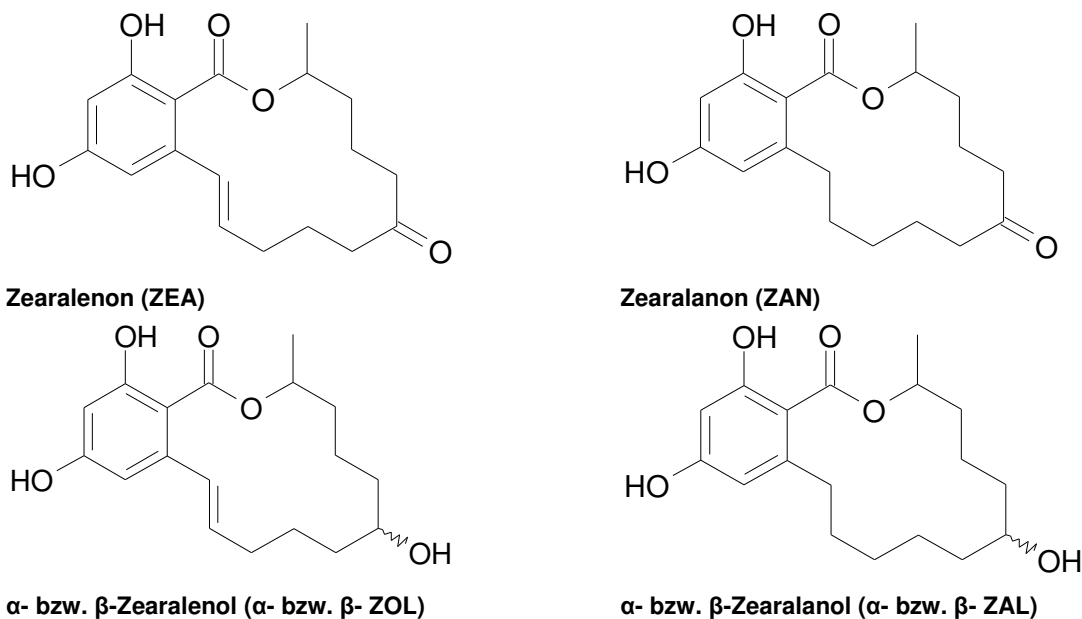
Die Hauptvertreter der Gruppe der Typ A Trichothecene sind T-2 Toxin und HT-2 Toxin. T-2 Toxin bildet weiße Nadeln mit einem Schmelzpunkt von 151 - 152 °C. GREENHALGH ET AL. (1984) berichteten über thermisch induzierte Isomerisierungsreaktionen von Deoxynivalenol in einem Temperaturbereich von 160 - 200 °C bei einer Erhitzungsdauer von einer Stunde. Untersuchungen von WIDESTRAND UND PETTERSSON (2001) zufolge unterliegen Lösungen von DON und NIV in Ethylacetat bei einer Lagerzeit von 24 Monaten bei 4 °C und nach zwölf Monaten bei 25 °C einer signifikanten Zersetzung. Diese Reaktionen werden in Lösungen von DON und NIV in Acetonitril nicht beobachtet. T-2 Toxin und HT-2 Toxin sind in Acetonitril aber auch in Ethylacetat innerhalb der genannten Bedingungen ebenfalls stabil.

4.3 Zearalenon und dessen Metabolite

4.3.1 Physikalisch-chemische Eigenschaften

Die Gruppe der Zearalenone werden in der Literatur oft als Resorcylsäurelactone (RAL) zusammengefasst. Gemäß IUPAC besitzt der Hauptvertreter Zearalenon (ZEA) folgende Nomenklatur $[(-)(3S,11E)-3,4,6,9,10\text{-Hexahydro-}14,16\text{-dihydroxy-}3\text{-methyl-}1H\text{-}2\text{-benzoxaclo-tetra-decin-}1,7(8H)\text{-dion}]$. ZEA bildet farblose, hautreizende Kristalle und besitzt einen Schmelzpunkt von 164 - 165 °C. Die Schmelzpunkte von α -Zearalenol (α -ZOL) bzw. β -Zearalenol (β -ZOL) betragen 168 - 169 °C bzw. 174 - 176 °C, der von Zearalanon 192 - 193 °C und von α -Zearalanol (α -ZAL) bzw. β -Zearalanol (β -ZAL) 145 - 147 °C bzw. 182 - 183 °C. ZEA ist in alkalischen Lösungen, Methanol, Acetonitril, Aceton, Ethern, Benzol und Ethanol gut löslich, in reinem Wasser unlöslich. Das UV-Spektrum von ZEA ist charakteristisch und besitzt in Methanol drei Absorptionsmaxima bei einer Wellenlänge von 314 nm, 274 nm und 236 nm. Die entsprechenden molaren Extinktionskoeffizienten [L/mol·cm] betragen $\epsilon_{314} = 6\,000 \pm 300$, $\epsilon_{274} = 13\,900 \pm 695$ und $\epsilon_{236} \pm 1\,500$ (POHLAND ET AL. (1982)). Für die Biotransformationsprodukte bestimmten BENNET UND SHOTWELL (1990) zusammen mit fünf weiteren Laboratorien die molaren Extinktionskoeffizienten von α -Zearalenol ($\epsilon_{236\text{ nm}} = 28\,538 \pm 558$) und β -Zearalenol ($\epsilon_{238\text{ nm}} = 24\,963 \pm B_B\,747$) in Methanol.

Abb. 5: Strukturformeln von Zearalenon und dessen Biotransformationsprodukten



SYDENHAM ET AL. (1996) erstellten Fluoreszenz-Spektren von ZEA und β -ZOL aus methanolischen Lösungen. Daraus resultierte eine Emissionswellenlänge von 460 nm und Anregungswellenlängen von 241 nm (40 %), 278 nm (80 %) und 315 nm (60 %). Für β -ZOL wurde ebenfalls eine Emissionswellenlänge von 460 nm ermittelt. Die Anregungswellenlängen wurden zu 278 nm (60 %) und 315 nm (80 %) bestimmt. Bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm weist ZEA eine leicht blaue Fluoreszenz auf. Diese charakteristische Eigenschaft wird für die Detektion in der Dünnschichtchromatographie als auch in der Flüssigchromatographie genutzt. Wie Abb. 5 verdeutlicht, besitzt ZEA die beiden diastereomeren Biotransformationsprodukte α -Zearalenol (α -ZOL) und β -Zearalenol (β -ZOL). Diese können durch Hydrierung der Ketofunktion an der C₇ Position gebildet werden. Neben α -Zearalanol (internationaler Freiname: Zeranol) und β -Zearalanol (internationaler Freiname: Taleranol) entstehen nach katalytischer Reduktion von ZEA weitere Diastereomere.

Die Grundstruktur von ZEA basiert auf einem Lacton-Gerüst und ist im kalten, alkalischen Milieu stabil. Bei längerer Exposition unter diesen Bedingungen wird der Lacton-Ring hydrolysiert.

Im Verlauf einer thermischen Lebensmittelzubereitung bleibt ZEA stabil. RYU ET AL. (2003) führten eine Studie zur Bestimmung der Hitzestabilität von ZEA durch. Der ZEA-Gehalt wurde während eines Erhitzungsprozesses bei verschiedenen Temperaturen (100 °C, 125 °C, 150 °C, 175 °C, 200 °C und 225 °C) in einer wässrigen Pufferlösung mit unterschiedlichen pH-Werten gemessen. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Reduktion von ZEA stieg mit wachsender Prozess-temperatur. Weniger als 23 % ZEA gingen verloren bis zu einer Temperatur von 125 °C, während 34 % - 68 % je nach eingestelltem pH-Wert nach 60-minütiger Erhitzungsdauer verloren gingen. Bei einer Temperatur von ≥ 175 °C wurden mehr als 92 % ZEA nach einer 60-minütigen Erhitzungsdauer zersetzt. Ungeachtet der unterschiedlich eingestellten pH-Werte wurde eine vollständige Toxinmengenreduktion von ZEA in weniger als 30 Minuten bei 225 °C erreicht. Bei einem pH Wert von 7 war ZEA am stabilsten, gefolgt von einem pH-Wert von 4 und 10.

4.4 Toxikologie der Typ A und Typ B Trichothecene

Ein Überblick der relevanten toxikologischen Daten zur Risikoabschätzung der Trichothecene wurde von dem European Commission Scientific Committee on Food (SCF) und dem Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), ERIKSEN UND ALEXANDER (1998) und SCHLATTER (2004) zusammengefasst.

4.4.1 Toxikokinetik: Aufnahme, Verteilung, Absonderung und Metabolismus

PRELUSKY ET AL. (1990) verabreichten Schweinen eine Einzelinjektion von 1 mg radioaktiv markiertem DON/kg KG. Dieses konnte daraufhin in allen Geweben nachgewiesen werden. Die höchsten Konzentrationen wurden in Niere, Leber, Urin und Galle gefunden. Die Halbwertszeit betrug 3,9 Stunden. Vier Stunden nach der Injektion konnten nur noch Spuren detektiert werden.

Nach einer Verabreichung von 10 mg/kg radioaktiv markiertem DON an Ratten, wurde 96 Stunden nach Verabreichung der Hauptteil der Radioaktivität im Faeces (64 %) und im Urin (25 %) nachgewiesen. Spuren an Radioaktivität wurden noch in der Leber und anderen Geweben erfasst. Ein Deepoxy-Metabolit wurde im Urin nach oraler Verabreichung nachgewiesen (IARC, 1993). Diese Deepoxidationsreaktion läuft wahrscheinlich in der Mikroflora des Darms ab. Dies konnte in vielen *in vitro*-Untersuchungen bestätigt werden, in denen DON mit der mikrobiologischen Flora von Mäusen oder Schweinen inkubiert wurde.

Das Muster der T-2 Toxin Toxizität ist vergleichbar mit dem Toxizitäts-Muster von DON. T-2 Toxin wird nach Verabreichung an verschiedenen Tieren rasch aufgenommen und im Organismus mit geringer bis keiner Akkumulation in die verschiedenen Organe verteilt. Die Halbwertszeit von T-2 Toxin beträgt im Plasma 20 Minuten.

YOSHIZAWA ET AL. (1983) bestimmten nach oraler Verabreichung von DON an Ratten Deepoxy-Deoxynivalenol (DOM-1) als zentralen Metabolit in Faeces. Dieser Deepoxy-Metabolit wurde später ebenfalls in Faeces, Urin, Blutplasma und Milch von laktierenden Kühen bestimmt. Der Metabolit konnte ebenfalls nachgewiesen werden, nachdem DON mit der Darm-Mikroflora von Kühen und Schweinen inkubiert wurde. SWANSON UND CORLEY (1989) konnten in Schafen und Kühen die Anwesenheit von konjugierten Glucuronid-Deoxynivalenol und DOM-1 in Ratten und Kühen nachweisen.

NIV wird hauptsächlich zu Deepoxy-Nivalenol biotransformiert. Männlichen Ratten wurden 5 mg NIV/kg KG oral mehrfach verabreicht. Dabei wurden 80 % des verabreichten NIV im Faeces und 1 % im Urin als Deepoxy-NIV ausgeschieden. 7 % des verabreichten NIV wurden nicht biotransformiert im Faeces wiedergefunden und ebenfalls zu 1 % im Urin (ONJI ET AL. (1989)). Diese Detoxifikationsreaktion kann auf eine mikrobiologische Aktivität zurückzuführen sein.

T-2 Toxin wird schnell durch eine Deacetylierung, Hydroxylierung, Glucuronid-Konjugation und Deepoxylierung metabolisiert. Den wichtigsten Biotransformationsweg stellt dabei die Deacetylierung der C₄-Acetylgruppe von T-2 Toxin dar. Dies führt zur Bildung von HT-2 Toxin. Diese Reaktion wird durch nicht spezifische Carboxyesterasen katalysiert und findet hauptsächlich in der Leber, aber auch im Blutplasma, dem Darm und weiteren Geweben statt (JOHNSEN ET AL. (1998); CONRADY-LORCK ET AL. (1989)). Diese, *in vivo* sehr schnell verlaufende Biotransformation hat zur Folge, dass die Toxizität von T-2 Toxin letztlich auf die Toxizität von HT-2 Toxin zurückzuführen ist. Dies wird dadurch deutlich, dass die akute Toxizität von T-2 und HT-2 Toxin in den gleichen Konzentrationsbereichen liegt.

4.4.2 Toxische Wirkungen – Deoxynivalenol

Nach heutigem Stand der Wissenschaft liefert eine auf zwei Jahre angelegte Fütterungsstudie mit B6C3F1 Mäusen von IVERSON ET AL. (1995) den Ansatzpunkt zur Risikoabschätzung von DON. Diese Mäuse wurden mit 0, 1, 5 oder 10 mg DON/kg Futter (entspricht ca. 0,1, 0,7 oder 1,5 mg/kg KG weibliche Mäuse und 0,1, 0,5 oder 1,1 mg/kg KG für männliche Mäuse) gefüttert. Die exponierten Mäuse zeigten eine konzentrationsabhängige geringere Gewichtszunahme als die Tiere der Kontrollgruppe. Bei den weiblichen Mäusen wurde eine statistisch signifikante, aber niedrige dosisgebundene Zunahme der IgA und IgG Konzentrationen (< 10 %) festgestellt. Ebenfalls wurde eine dosisabhängige Abnahme der präneoplastischen und neoplastischen Verletzungen der Leber in exponierten Mäusen im Vergleich zu der Kontrollgruppe beobachtet. Die Abnahme der Häufigkeit von Neoplasma war ein Ergebnis der verminderten Nahrungsaufnahme, da bekannt ist, dass eine Abnahme des Körpergewichtes zu einer Senkung der Tumorbildung bei Nagetieren führen kann. Eine signifikante Gewichtsreduktion wurde bei Mäusen, die die zwei höchsten Dosen erhielten (5 und 10 mg DON/kg) festgestellt. Diese Studie lieferte keinen Beweis für die Kanzerogenität von DON in Mäusen.

Tab. 2: Abgeleitete NOAEL's für DON (SCHLATTER ET AL. (2004))

Studie	Kritischer Effekt	NOAEL (mg/kg KG/Tag)	Literatur
Maus, Immuntoxizität	Erhöhte Infektionsanfälligkeit	0,25	TRYPHONAS ET AL. (1986)
Maus, Teratogenität	Fetale Skelettmissbildungen	0,50	KHERA ET AL. (1982)
Maus, Fruchtbarkeitsstörungen	Postnatale Sterblichkeit	0,37	KHERA ET AL. (1984)
Schwein, subchronisch (-100 Tage)	Reduziertes Gewicht	0,04	BERGSJØ ET AL. (1992)
Schwein, subchronisch (-100 Tage)	Reduziertes Gewicht, Leber- und Blutalbuminwerte	0,06	BERGSJØ ET AL. (1993)

Akute/subakute Toxizität

Anzeichen von akuter DON-Vergiftung beinhalten Erbrechen, Verweigerung der Futtermittelaufnahme, Gewichtsverlust und Diarrhö. Eine durch orale Aufnahme ermittelte „Minimale Brechreiz-Dosis“ (MED) von DON im Schwein konnte in verschiedenen Studien zu etwa 50 µg/kg KG bestimmt werden. Schweine sind gegenüber mit DON belastetem Futter empfindlich und eine reduzierte Futtermittelaufnahme konnte bei einer DON-Konzentration von 1 - 2 mg/kg beobachtet werden (TRENHOLM ET AL. (1989)). Die verweigerter Futtermittelaufnahme und das Erbrechen könnten durch die Wirkungen der serotoninergischen Aktivität im Nervensystem verursacht werden. Histologische Veränderungen im Gewebe verschiedener Spezies nach akuter Vergiftung mit DON schließen Nekrosen im gastrointestinalen Trakt, im Knochenmark, in lymphozytischen Geweben und in Eierstöcken ein. Fokale Veränderungen in Nieren und in Herzgeweben von Mäusen konnten ebenfalls beobachtet werden (WHO, 1990; TRENHOLM ET AL. (1989); IARC, 1993).

Subchronische/chronische Toxizität

Innerhalb von 28 Tagen wurde fünf bis sechs Wochen alten Ferkeln natürlich kontaminiertes Futter, das zwischen 0 bis 3,0 mg DON/kg (geschätzte durchschnittliche tägliche Aufnahme von 0, 0,05, 0,1 und 0,2 mg/kg KG) enthielt, gefüttert. Zusätzlich zu DON enthielt das Futtermittel 15-AcDON (etwa 20 % von DON). Eine Reduzierung der Körpertemperatur konnte innerhalb der ersten Wochen bei den behandelten Tieren beobachtet werden. Dies war in den darauf folgenden Wochen nicht mehr messbar. Zudem wurde eine reduzierte Futtermittelaufnahme nachgewiesen. Bedingt durch die verringerte Futtermittelaufnahme konnten verschiedene biochemische Veränderungen ebenfalls bestimmt werden. Wahrscheinlich zeigen jedoch die reduzierte Körpertemperatur, eine veränderte Magenphysiologie und geringere Konzentrationen von α -Globulin Auswirkungen der Toxine (ROTTER ET AL. (1994)) an. In einer analog angelegten Studie, in der innerhalb von zwei bis drei Wochen 4,0 mg/kg DON enthaltendes Futtermittel verabreicht wurde, konnte eine Abnahme in den Serumproteinen nachgewiesen werden (ROTTER ET AL. (1996)).

TRYPHONAS ET AL. (1986) fütterte Schweizer Webster Mäuse täglich mit 0, 0,25, 0,5 oder 1,0 mg DON/kg KG über einen Zeitraum von fünf Wochen. Es wurden keine histopathologischen Veränderungen in Thymus, Milz oder Lymphknoten festgestellt. Eine Exposition von bis zu 1,0 mg/kg KG führte zu einer signifikanten Reduktion von α_1 - und α_2 -Globulin in dem Serum, einer Zunahme im Gesamtalbumin, einer verringerten Futtermittelaufnahme und Gewichtsverlust. Eine signifikante Reduktion der Futtermittelaufnahme wurde erst ab der vierten Woche beobachtet. Eine verringerte Gewichtszunahme wurde ab der zweiten Woche deutlich. Mäuse, die mit 0,25 mg DON/kg KG gefüttert wurden, zeigten keine Veränderungen.

In zwei Fütterungsstudien erhielten junge Schweine natürlich kontaminiertes Futtermittel (0 - 4 mg DON/kg KG) in einem Zeitraum von drei Monaten. Dabei konnte eine verringerte Futtermittelaufnahme (gemessen am Energieumsatz) und ein Gewichtsverlust in den Gruppen beobachtet werden, die 1,7 mg DON/kg Futter oder mehr aufnahmen. Erhöhte Lebergewichte, verringerte Konzentrationen von Serumglobulin und -albumin und temporäre Abnahme von Serumkalzium- und Serumphosphor-Konzentrationen wurden beobachtet. (BERGSJØ ET AL. (1992, 1993)).

Genotoxizität/Teratogenität

KHERA ET AL. (1986) fütterten Kaninchen mit 0, 0,3, 0,6, 1,0, 1,6, 1,8 und 2,0 mg DON/kg KG ab dem ersten bis zum dreißigsten Tag der Trächtigkeit. Dabei wurde ein vermindertes Körpergewicht bei den Föten beobachtet, die von den Kaninchen mit einer täglichen DON-Aufnahme von 1,0 und 1,6 mg/kg KG stammten. Eine vollständige Resorption durch die Föten wurde in den zwei Gruppen beobachtet, die die höchsten Konzentrationen verabreicht bekamen. Die Dosis an DON, die bei weiblichen Kaninchen keine Wirkung hervorrief, hatte auch keine Auswirkung auf die Föten. Es wurden keine teratogenen Effekte während dieser

Untersuchung beobachtet (NOEL 0,6 mg/kg KG). Somit kann DON zu Beeinträchtigungen in der Reproduktion führen.

Immunotoxizität

DON verursacht dosisabhängig eine Zu- oder Abnahme der mitogenen B- und T-Zellen-Immunantwort der Lymphozyten in verschiedenen Spezies (PESTKA UND BONDY (1994)). Zelltests mit niedrigen DON-Konzentrationen (5 - 50 ng/mL) führten zu einer gesteigerten Produktion von IgA, während bei höheren Dosen von DON (100 - 200 mg/mL) die IgA-Produktion reduziert wurde. Jedoch zeigten einige Studien eine selektive Auswirkung auf verschiedene Subpopulationen von Lymphozyten an (FORSELL ET AL. (1986); PESTKA ET AL. (1989)).

Der Mechanismus der gesteigerten IgA-Sekretion kann durch eine Änderung in der Konzentration an Zytokinen hervorgerufen werden. Eine gesteigerte Sekretion von Interleukinen 2 (IL-2), IL-4 und IL-5 und eine Abnahme in der Sekretion von IL-6 wurden in Zelltests für DON nachgewiesen. Eine Zunahme der Konzentration der mRNA, die IL-2, IL-4 und IL-5 codiert, wurde bestimmt (AZCONE-OLIVEIRA ET AL. (1995); DONG ET AL. (1994)).

Die Störung von IgA kann durch die Wirkung der T-Zellen verursachenden Differenzierung von B-Zellen zu IgA sezernierenden Plasmazellen zurückzuführen sein. Fütterungsuntersuchungen mit Mäusen (25 mg DON/kg Futter) zeigten eine Steigerung der IgA-Produktion und erhöhte IgA sezernierende Zellen im Peyers-Plaue. Weiterhin wurde eine Differenzierung von Peyers-Plaue B-Zellen zu IgA sezernierenden Plasmazellen stimuliert (BONDY UND PESTKA (1991)).

Zehn Mäuse erhielten über einen Zeitraum von fünf Wochen 0, 0,25, 0,5 oder 1,0 mg DON/kg KG und wurden zusätzlich mit *Listeria monocytogenes* geimpft. Die Anzahl von Todesfällen stieg nicht (3, 3, 3 und 2), aber die durchschnittliche Letalität-Zeit, nachdem die Impfung erfolgte, reduzierte sich von 7,3 Tagen in der Kontrollgruppe auf 6,3, 5,5 und 5,3 Tage in den entsprechend behandelten Gruppen. Bei Mäusen, die eine Dosis von 0,25 mg/kg KG verabreicht bekamen, wurde keine Wirkung festgestellt. Das bedeutet, dass nach oraler Verabreichung von DON eine verringerte Resistenz gegenüber Infektionen beobachtet wurde. In einer weiteren Studie von HARA-KUDO ET AL. (1996) wurde bei männlichen Mäusen ebenfalls eine verringerte Resistenz gegenüber Salmonellen nach Verabreichung von DON festgestellt (NOAEL 0,25 mg/kg KG).

4.4.3 Toxische Wirkungen – Nivalenol

Das toxikologische Profil von NIV entspricht weitestgehend dem von DON und die allgemeine Toxizität und Immunotoxizität/Hämotoxizität in Tierversuchen scheinen ebenfalls die gleichen kritischen Wirkungen hervorzurufen (Tab. 2).

Tab. 3: Abgeleitete orale LOAEL's für NIV (SCHLATTER ET AL. (2004))

Studie	Kritischer Effekt	LOAEL (mg/kg KG/Tag)	Literatur
Maus, 2 Jahre (im Futter)	Wachstumsverzögerung, Leukopenie	0,7	Ohtsubo et al. (1989)
Maus, 1 Jahr (im Futter)	Wachstumsverzögerung, Leukopenie	0,7	Ryu et al. (1988)
Maus, während der Trächtigkeitsperiode (im Futter)	Intrauterine Wachstumsretardierung	1,4	Ito et al. (1988) (WHO, 1990)
Maus, 7. bis 15. Tag der Trächtigkeit (Sondenernährung)	Intrauterine Wachstumsretardierung	5,0	Ito et al. 1988 (WHO, 1990)

Das SCF legte die Untersuchungen von RYU ET AL. (1988) und OHTSUBO ET AL. (1989) für die Risikoabschätzung von NIV zu Grunde. In diesen Untersuchungen wurden weibliche C57BL/6CrSlc SPF Mäuse mit pulverförmigen *F. nivale* gefüttert. Die eingesetzten Konzentrationen betragen 0, 6, 12 und 30 mg/kg Futtermittel (0, 0,7, 1,4 und 3,5 mg NIV/kg KG) und wurden über einen Zeitraum von ein bzw. zwei Jahren verabreicht. Sowohl eine verringerte Körpergewichtszunahme als auch Futteraufnahme konnten in allen behandelten Gruppen beobachtet werden. Das absolute Gewicht der Leber wurde in der Gruppe, die 3,5 mg NIV/kg KG verabreicht bekam, signifikant reduziert. Das Gewicht der Nieren in den Gruppen, die 1,4 und 3,5 mg/kg KG verabreicht bekamen, war ebenfalls deutlich reduziert. Eine schwerwiegende Leukopenie wurde ebenfalls bei den Tieren beobachtet, die für ein Jahr geringe Konzentrationen verabreicht bekamen, wobei die Anzahl der weißen Blutkörperchen in der auf zwei Jahre angelegten Studie nicht beeinflusst wurde.

4.4.4 Toxische Wirkungen – T-2 Toxin und HT-2 Toxin

Zur Risikoabschätzung von T-2 Toxin und HT-2 Toxin legen sowohl SCF als auch JECFA die Studie von RAFAI ET AL. (1995) über die subakute Toxizität dieser Verbindungen zu Grunde.

In dieser Untersuchung wurden vier Gruppen von sieben Wochen alten Schweinen (ca. 9 kg) mit 0, 0,5, 1, 2 oder 3 mg T-2 Toxin/kg KG (entspricht 0,003, 0,006, 0,1 und 0,13 mg/kg KG/Tag) für drei Wochen gefüttert. T-2 Toxin wurde aus Kulturen von *F. tricinctum* extrahiert und mit einer Reinheit von > 90 % bestimmt. Am ersten und vierten Tag der Behandlung wurden die Schweine mit Pferdeglobulin immunisiert. Blutproben wurden am 7ten, 14ten und 21sten Tag entnommen. Die beiden höchsten Konzentrationen verursachten am 21ten Tag eine signifikante Reduktion der Anzahl an roten Blutkörperchen. Die Anzahl an Leukozyten, hauptsächlich T-Lymphozyten, verringerte sich in allen Gruppen. Eine Reduktion der Bildung von Antikörpern gegenüber den Pferdeglobulinen wurde ebenfalls in allen Gruppen und an allen Tagen beobachtet. Durch histopathologische Untersuchungen der lymphoiden Organe am Ende der Studie wurde eine konzentrationsabhängige Verarmung der lymphoiden Elemente im Thymus und der Milz beobachtet. Gerade bei der geringsten Dosis lag die Reduktion der Leukozytenanzahl bei 20 %, die Immunantwort auf das Pferdeglobulin wurde um 29 % reduziert und die blastogenetische Antwort der Lymphozyten wurde um 25 % reduziert. Die Futteraufnahme verringerte sich um 10 % ohne Auswirkung auf die Gewichtszunahme in dieser Gruppe. Daraus leitete sich ein LOAEL von 0,03 mg/kg KG ab.

Akute/Subakute Toxizität

Die akute und subakute Toxizität von T-2 Toxin und weiteren Trichothecenen in verschiedenen Tierspezies wird durch die Reduzierung von lymphoiden Zellen in Thymus, Knochenmark und Milz charakterisiert. In akut toxischen Konzentrationen besitzt T-2 Toxin diverse Wirkungen auf das Immunsystem wie eine verminderte Immunantwort von Lymphozyten auf Mitogene, eine reduzierte neutrophile Funktion, Nekrosen in lymphoiden Organen und Gewebe, Lymphopenie und Leukopenie und eine verringerte Antikörperbildung. In lymphozytischen Kulturen verschiedener Spezies, einschließlich denen des Menschen, inhibiert T-2 Toxin die Immunantwort auf beide B- und T-Mitogenzellen. Zudem zeigen weitere *in-vitro*-Untersuchungen, dass geringste Konzentrationen an T-2 Toxin, die mitogen induzierte lymphozytische Proliferation verstärken.

Kanzerogenität

Die karzinogene Wirkung von T-2 Toxin wurde durch die IARC 1993 evaluiert, mit dem Ergebnis, dass T-2 Toxin das Vorkommen von Lungen- und Leberadenomen erhöht. Die in Tab. 4 aufgeführte Studie von SCHIEFER ET AL. (1987) zeigte neben den genannten Wirkungen ebenfalls eine Steigerung der epithelialen Hyperplasie des Vormerdmagens bei männlichen und weiblichen Mäusen.

Immunotoxizität

Die für DON bereits dargestellten Immunotoxizitätsstudien von PESTKA UND BONDY (1994) und TAYLOR ET AL. (1989) zeigen analoge Ergebnisse für T-2 Toxin. Eine Exposition von geringen T-2 Toxin Konzentrationen führt zu einer Steigerung der IgA-Produktion. Diese erhöhte IgA-Konzentration kann auf eine verringerte aber auch eine gesteigerte IgG und IgM-Produktion zurückzuführen sein (PESTKA UND BONDY (1994); ATROSHI ET AL. (1994)). Eine erhöhte Bildung von Interleukinen durch Makrophagen (IL-1) und Lymphozyten (IL-2) wird ebenfalls durch eine T-2 Toxin Exposition hervorgerufen (PESTKA UND BONDY (1990, 1994)).

Unterschiedliche Studien mit T-2 Toxin belegen die Wirkung auf die Produktion von Antikörpern. Assays zur Bestimmung einer T-Lymphozyten-abhängigen Immunantwort (z. B. Immunantwort auf rote Blutzellen von Schafen) und T-Lymphozyten-unabhängigen Immunantwort (z. B. Dinitrophenyl Rinderserumalbumin) zeigen Effekte auf die humorale und zelluläre Immunantwort (RAFAI UND TUBOLY (1982); TAYLOR ET AL. (1989); WHO, 1990). Abhängig von der Konzentration und der Expositionsdauer wird bei Trichotheceen sowohl eine Immunglobulin-Suppression als auch Stimulation beobachtet (WHO, 1990, PESTKA UND BONDY (1994)).

Dermaltoxische Wirkung

T-2 Toxin verursacht Ödeme, intradermale Blutungen und Nekrosen auf der Haut. Bezüglich der Hautirritation von T-2 Toxin sind Schweine die empfindlichsten Spezies, aber auch andere Versuchstiere reagieren auf eine dermale Stimulation von T-2 Toxin. Dieser Effekt wird für einen biologischen Assay zur Detektion von Trichotheceen angewandt. Damit kann T-2 Toxin bis zu einer absoluten Menge von 0,2 µg bei einem Haut-Nekrosen-Assay bestimmt werden.

Tab. 4: Abgeleitete LOAEL's und NOAEL's für T-2 Toxin (SCHLATTER (2004))

STUDIE	KRITISCHER EFFEKT	NOAEL/LOAEL (MG/KG KG/TAG)	LITERATUR
MAUS, 16 MONATE	LUNGEN-ADENOM LEBER-ADENOM EPITHELIALE HYPERPLASIE DES VORDERMAGENS	0,23 (NOAEL) 0,23 (NOAEL) 0,23 (LOAEL)	Schiefer et al. (1987)
RATTEN, 4 WOCHEN	EPITHELIALE HYPERPLASIE DES VORDERMAGENS	0,5 (LOAEL)	Ohtsubo und Saito (1977)
MAUS, 5 TAGE	THYMUS RÜCKBILDUNG, VERRINGERTE ANZAHL AN T- UND B-ZELLEN	0,75 (LOAEL)	Smith et al. (1994)
AFFEN (15 TAGE SONDEN-ERNÄHRUNG)	LEUKOPENIE	0,1 (LOAEL)	Rukmini et al. (1980)
MAUS, ZWEI GENERATIONEN	EMBRYO- UND FETOTOXIZITÄT	0,45 (NOAEL)	Rousseux und Schiefer (1987)
RATTEN, EINZELNE DOSIS	NEUROTOXIZITÄT	0,4 (NOAEL)	Sirkka et al. (1992)

4.4.5 Humantoxizität von Trichotheceen

In China kam es Berichten von WANG ET AL. (1993) zufolge zu Ausbrüchen von Toxikosen nach der Aufnahme von belastetem Reis. 97 von 165 Personen erkrankten und litten nach dem Verzehr unter Übelkeit, Schwindel, Erbrechen, Unterleibsböhlungen, Schmerzen, Schüttelfrost und Durchfall. In dem entsprechenden Reis konnten 180 bis 420 µg/kg T-2 Toxin nachgewiesen werden. Weiterhin konnten *F. heterosporum* und *F. graminearum* nachgewiesen werden. Auf weitere Trichotheceen wurde der Reis nicht untersucht.

Über die alimentäre toxische Aleukie (ATA; engl.: alimentary toxic aleukia) wurde erstmals im Jahr 1913 aus Russland berichtet. Sie konnte in Zusammenhang mit dem Verzehr von *Fusarium*-infizierten Getreideprodukten gebracht werden. Der schwerste Ausbruch dieser Krankheit wurde aus dem Jahr 1944 berichtet. Die klinischen Symptome waren Leukopenie, Blutungen aus Nase und Kehle, Fieber, Erbrechen, Unterleibsschmerz und Durchfall. Epidemiologische Studien zeigten einen Zusammenhang zwischen dem Vorkommen dieser Krankheit und dem Verzehr von überwinterem Weizen. Extrakte dieser Weizenpartien wurden an der Haut von Tieren getestet und zeigten ein hohes toxisches Potenzial. In späteren Untersuchungen wurde T-2 Toxin in gelagerten Proben des infizierten Weizens nachgewiesen (BEARDALL UND MILLER (1994); JOFFE (1974)).

Schwere Lebensmittelvergiftungen traten 1989 in Kaschmir und Indien auf. Eine epidemiologische Studie schätzte die Zahl der Betroffenen auf 50.000 Menschen. Die Symptome wurden mit Unterleibsschmerzen, Erbrechen, Schleimhautirritationen, Blut im Stuhl und Diarrhö beschrieben. Dieses Krankheitsbild wurde mit dem Verzehr von infiziertem Weizen in Verbindung gebracht. Der betroffene Personenkreis verzehrte durchschnittlich ein bis sechs Brote, die 10 - 30 g Weizen enthielten. Das Brot wurde als "Kaugummi"-ähnliches Weizenbrot beschrieben. Daraus wurden 24 Proben Weizenfasern und Mehl untersucht. In elf Proben wurde DON in einem Konzentrationsbereich von 0,346 - 8,38 mg/kg, in zwei Proben NIV mit 0,03 - 0,10 mg/kg und in fünf Proben T-2 Toxin in einem Bereich von 0,55 - 4 mg/kg nachgewiesen. Daraus schätzten die Autoren einen NOAEL von 0,438 µg/kg KG unter der Annahme ab, dass ein mittlerer Verzehr von 67 g Weizenprodukt bei einem mittleren Körpergewicht von 52 kg stattfand. Die Proben wurden allerdings erst vier Monate nach der Epidemie analysiert. Aus diesem Grund konnte keine genaue Zuordnung der untersuchten Lebensmittel mit spezifischen Krankheitsbildern vorgenommen werden. In diesen Proben wurden weitere Trichothecene nachgewiesen und bildeten ebenfalls einen Beitrag zur Toxizität (BHAT ET AL. (1989); BEARDALL UND MILLER (1994)).

4.5 Toxikologie von Zearalenon und Derivaten

Einen Überblick der relevanten toxikologischen Daten zur Risikoabschätzung von Zearalenon wurde von dem European Commission Scientific Committee on Food (SCF, 2000) und dem Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA, 2000) und KUIPER-GOODMAN ET AL. 1987 zusammengefasst.

4.5.1 Toxikokinetik: Aufnahme, Verteilung, Absonderung und Metabolismus

Die Biotransformation von ZEA findet hauptsächlich in der Leber statt. Nach oraler Verabreichung wird ZEA sehr schnell absorbiert und bei Schweinen zu α -ZOL, β -ZOL, α -ZAL und β -ZAL biotransformiert. Diese werden anschließend mit Glucuronsäure konjugiert. Mengenmäßig stellen die Glucuronkonjugate von ZEA und α -Zearalenol die wichtigsten Metabolite in dieser Spezies dar. Ein abweichender Biotransformationsmechanismus wurde in Ratten nachgewiesen. Das frei vorkommende und das mit Glucuronsäure konjugierte ZEA sind dabei die dominierenden Biotransformationsprodukte gegenüber den Alkoholhomologen und deren Konjugaten (KUIPER-GOODMAN ET AL. (1987)).

Untersuchungen mit radioaktiv markierten ZEA zeigten eine Anreicherung der Radioaktivität in östrogenem Zielgewebe und in Fettgewebe, was auf eine Akkumulation im Fett hindeutet. MIDGALOF (1983) führten vergleichende Untersuchungen zur Biotransformation von ZEA in weiblichen Ratten, Hasen, Hunden, Affen und im Menschen durch. Dabei wurde die Halbwertszeit von ZEA im Menschen nach oraler Verabreichung zu 22 Stunden bestimmt. Der Abbau von ZEA ist bei Menschen und Hasen geringer, da sie in der Lage sind, ZEA hauptsächlich über den Urin auszuscheiden. Die ZEA-Konzentration im Blut ist dabei bei Men-

schen um ein Vielfaches größer als bei anderen Spezies. So konnte nach einmaliger oraler Verabreichung von ZEA nach vier Tagen noch eine geringe Konzentration im menschlichen Blut nachgewiesen werden.

ZEA und die Biotransformationsprodukte werden in den meisten Tierarten biliär abgesondert. Dabei wird der größte Teil der verabreichten Dosis innerhalb der ersten 72 Stunden abgebaut. Das strukturanaloge α -Zearalenol kann im Urin beim Hasen und Mensch nachgewiesen werden.

Biochemische Mechanismen

In einer Vielzahl von *in-vitro*-Systemen wurde gezeigt, dass ZEA und dessen Derivate an den Östrogenrezeptoren (ER) verschiedener Kompartimente wie Gebärmutter, Brustdrüse und Leber unterschiedlicher Tierspezies binden. ZEA bindet ebenfalls an den Hypothalamus-Östrogenrezeptor und beeinflusst somit die Hormonregulation wie am Beispiel von Affen und Nagetieren gezeigt wurde. Dabei zeigte ZEA bei Rhesusaffen eine ähnliche Wirkung wie nach der Verabreichung von 17β -Estradiol (Anabolikum; Steroidhormon). ZEA und die Biotransformationsprodukte fungieren als synthetische Östrogen-Agonisten (KUIPER-GOODMAN ET AL. (1987)).

KUIPER ET AL. (1998) zeigten, dass ZEA an menschlichen ER α - und ER β -Rezeptoren binden und diese aktivieren kann. Für den ER α -Rezeptor wurde gezeigt, dass ZEA einen vollständigen Antagonist und für den ER β -Rezeptor einen gemischten Agonist-Antagonist darstellt.

Weiterhin wurde gezeigt, dass ZEA und dessen Biotransformationsprodukte an Östrogen bindenden Proteinen im Zytosol verschiedener Spezies und Zelllinien wie Leber von Ratten, Rattengebärmutter, Brustdrüsen von Ratten, Mäusegebärmutter, Rindgebärmutter, menschlichen Brustkrebszellen und geschlechtsbindenden Proteinen im Blut binden. Die Verlagerung des ZEA-Rezeptor-Komplexes in den Zellkern führt dabei zur beginnenden Synthese derselben Proteine wie bei einem 17β -Estradiol-Rezeptor-Komplex aber mit einer 0,001- bis 0,07-fach geringeren Effektivität.

Akute/Subakute Toxizität

Sowohl nach oraler als auch nach interperitonealer Verabreichung zeigt ZEA eine geringe akute Toxizität in Mäusen, Ratten und Schweinen. Nach oraler Verabreichung konnte ein LD₅₀ zwischen 2.000 - 20.000 mg/kg KG ermittelt werden.

Schweine weisen eine sehr hohe Empfindlichkeit gegenüber Zearalenon auf. Eine auf acht Tage angelegte Fütterungsstudie mit vorpubertären Schweinen unter Verwendung einer Dosis von 0,02 mg/kg KG führte zur Schwellung der Vulva. Bei einer erhöhten Verabreichung von 0,1 und 0,2 mg/kg KG konnten neben der Vulvaschwellung auch eine Anschwellung des Gesäuges, eine Vergrößerung des Uterus und weitere hyperöstrogene Merkmale festgestellt werden (KUIPER-GOODMAN ET AL. (1987)).

In einem elftägigen Expositionszeitraum verfütterten BAUER ET AL. (1987) jeweils 0,01 mg ZEA /kg KG an weibliche Schweine. Nach Beendigung konnten Rötung und Schwellung der Vulva, Schwellung der Milchdrüsen und pathologische Funktionsgebilde auf den Ovarien beobachtet werden. ABELHAMID (1992) fütterte Hasen mit 0,5 und 1,0 mg ZEA/kg Futter (vier Monate alte Hasen) und 1,0 und 4,0 mg ZEA/kg Futter (acht Monate alte Hasen). Bei den vier Monate alten Hasen konnte eine erhöhte Körpergewichtszunahme, Futter- und Wasseraufnahme, ein erhöhter Hämoglobinanteil, Serumkalzium, Phosphor und Vitamin C beobachtet werden. In beiden Gruppen konnten histopathologische Veränderungen in der Leber, Niere, Lunge, Herz, Adrenalindrüsen, Milz und Uterus beobachtet werden.

Chronische/Subchronische Toxizität

Toxizitätsstudien, die in einem Zeitraum von 90 Tagen durchgeführt wurden, zeigten nach oraler Verabreichung gleiche Effekte. Sowohl in Versuchs- als auch in Haustieren wurde eine direkte Abhängigkeit von der Reaktion von ZEA bzw. dessen Biotransformationsprodukte mit dem ER beobachtet. Dabei scheinen Schweine und Schafe empfindlicher auf ZEA als Nagetiere zu reagieren. Durch Wiederholungsuntersuchungen mit einer definierten Exposition von unterschiedlichen Konzentrationen wurde ein NOEL von 40 mg/kg KG/Tag für Schweine aufgrund der östrogenen Wirkung bestimmt (KUIPER-GOODMAN ET AL. (1987)).

In einer von der NTP angelegten Langzeitstudie mit 50 B6C3F1 Mäusen wurden diese mit 0, 50 oder 100 mg ZEA/kg Futter (entspricht 0 mg/kg KG, 9 mg/kg KG oder 16 mg/kg KG bei männlichen und 0 mg/kg KG, 9 mg/kg KG oder 19 mg/kg KG bei weiblichen Mäusen) über zwei Jahre gefüttert. Bei den männlichen Mäusen konnte keine Wirkung festgestellt werden. Bei den weiblichen Versuchstieren konnten hyperöstrogene Effekte wie Bildung von Zysten in der Brustdrüse, Entzündungen im Gebärmutterhals und fokale Fibrosen der Gebärmutter beobachtet werden. Dabei wurde ein NOEL von ≤ 9 mg/kg KG bestimmt.

Becci ET AL. (1982) verabreichten 50 Ratten im Alter von bis zu zwei Jahren 0,1, 1,0 und 3,0 mg ZEA/kg KG. Dabei wurde die Abnahme des Körpergewichtes, die Gewichtszunahme einzelner Organe und eine Unterbrechung des weiblichen Zyklus beobachtet und ein NOEL von 0,1 mg/kg KG ermittelt. Diese gezeigten Effekte scheinen das Resultat der östrogenen Wirkung von ZEA zu sein.

McNUTT ET AL. (1928) und KOEN UND SMITH (1945) berichteten von durch verschimmelter Getreide hervorgerufenen hormonähnlichen Wirkungen auf Schweine. Die Isolierung dieser Substanz gelang STOB ET AL. (1962) und wurde von MIROCHA ET AL. (1968, 1971) als Lacton der 6-(10-hydroxy-6-oxo-1-undecenyl)- β -Resorcylsäure identifiziert.

PETERS (1972) stellte bezüglich der hormonellen Wirkung fest, dass α -Zearalenol das effektivste ZEA-Alkoholhomolog und wirksamer als ZEA, die am stärksten wirksame Keto-Form, ist.

Eine praktische Näherung für eine Risikoabschätzung ist durch die Bestimmung des „No Hormone Effect Levels“ (NHELs) möglich. Dabei ist zu berücksichtigen, dass der NHEL in voll entwickelten, kastrierten Tieren unter Verwendung eines quantifizierbaren Endpunktes, der durch eine physiologische und nicht durch eine toxikologische Wirkung zu erkennen ist, eingeschätzt wird. Für ZEA existiert kein NHEL, dafür konnte ein NHEL für α -Zearalanol abgeleitet werden. PAREKH UND COULSTON (1983) ermittelten bei Rhesusaffen einen NHEL von 225 μ g/kg KG/Tag nach oraler Verabreichung von α -Zearalanol über einen Zeitraum von zehn Tagen. Mäuse und Ratten wurden mit 5 mg/kg bis 45 mg/kg KG gefüttert und zeigten Anzeichen von Hyperestrogenismus. Zearalenon besitzt ebenfalls östrogene Wirkung im Schwein in einem Konzentrationsbereich von 0,02 mg/kg KG bis 0,1 mg/kg KG (KUIPER-GOODMAN ET AL. (1987)).

Kanzerogenität

Der Evaluierung der IARC, 1993, zufolge ist das karzinogene Potential von ZEA aufgrund einer nicht ausreichenden Datenlage nicht klassifizierbar.

Ratten wurden mit 0, 25 mg ZEA/kg oder 50 mg ZEA/kg über einen Zeitraum von 103 Wochen (0, 1 oder 2 mg/kg KG/Tag) gefüttert. Zwischen den Gruppen wurde kein signifikanter Unterschied in der Letalität beobachtet. Die folgenden nicht-neoplastischen Verletzungen wurden beobachtet: Entzündung der Prostata, testikuläre Atrophie, Zysten in Brustdrüsen von Männern, gesteigertes Aufkommen von hepatozellulären, zytoplasmatischen Vakuolen in männlichen Ratten und ein erhöhtes Vorkommen von chronisch-progressiver Nephropathie in beiden Geschlechtern und beiden Konzentrationen. Eine behandlungsgebundene

Zunahme an Tumoraufkommen wurde in der Studie nicht beobachtet. ZEA verursacht ein erhöhtes Vorkommen von hepatozellulären Adenoma in weiblichen Mäusen und Hirnanhangdrüsen-Adenoma in männlichen und weiblichen Mäusen. In Ratten wurde keine vermehrte Bildung von Adenoma beobachtet (NTP, 1982).

Genotoxizität/Teratogenität

KUIPER-GOODMAN ET AL. (1987) und das IARC, 1993, berichten über mögliche genotoxische Wirkung von ZEA und dessen Biotransformationsprodukte (KUIPER-GOODMAN ET AL. (1987)). Im Ames-Test konnte keine Genmutation bei *S. typhimurium* festgestellt werden. Auch in Tests wie dem SOS-Chromtest mit *E. coli* und DNS-Reparaturtests mit *E. coli* wurden nur negative Ergebnisse erzielt.

LI ET AL. (1992) fütterten Ratten mit 0,05 mg ZEA/kg Futtermittel für drei Wochen. Dabei konnte keine vermehrte DNS-Addukt-Bildung festgestellt werden. Untersuchungen von PFOHL-LESZKOWICK ET AL. (1995) zeigten jedoch die Bildung von DNS-Addukten in Mäusen nach einmaliger Gabe von 2 mg/kg KG nach interperitonealer Injektion oder nach oraler Verabreichung.

ZEA verursacht Veränderungen im Fortpflanzungstrakt von diversen Versuchstieren wie Mäusen, Ratten, Meerschweinchen, Hamstern und Kaninchen. Ausführliche Untersuchungen wurden von KUIPER-GOODMAN ET AL. (1987) beschrieben. Verschiedene östrogene Effekte, wie verminderte Fruchtbarkeit, gesteigerte embryonale Resorption, verändertes Gewicht der Nebenniere, Schilddrüse und Hirnanhangdrüse und Änderung der Serumkonzentration von Progesteron und Estradiol konnten beobachtet werden. Es konnte aber keine teratogene Wirkung in Mäusen, Ratten, Meerschweinchen und Kaninchen festgestellt werden. Dabei scheinen Schweine und Schafe gegenüber ZEA empfindlicher als Nagetiere zu sein.

Für Nagetiere konnte in verschiedenen Studien ein NOEL im Bereich von 0,1 - 10 mg/kg KG bestimmt werden. Schweine sind die empfindlichste Spezies in Bezug auf die Fortpflanzungstoxizität von Zearalenon. Für diese Spezies konnte ein NOAEL im Bereich von < 0,04 - 5 mg/kg KG bestimmt werden.

In einem Zelltest wurden Blastozyten von Mäusen in einem Medium, das 0, 70, 140, 280 und 560 µg/mL Zearalenon enthielt, kultiviert. Die Blastozyten, die in 280 µg ZEA/mL kultiviert wurden, zeigten eine signifikante, prozentuale Abnahme der voll entwickelten Blastozyten-Stufe im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Kein Embryo, der in 560 µg ZEA/mL kultiviert wurde, erreichte die frühe Phase der Blastozyten-Stufe. In vergleichbaren Untersuchungen wurden Rinder-Oozyten getestet, wobei keine Effekte beobachtet wurden (WALLACE UND RAJAMAHENDRAN (1993)).

In einer weiteren Studie wurden jungen Schweinen zwischen 3 bis 9 mg/kg Zearalenon verabreicht (dies entspricht 0,06, 0,1 und 0,2 mg/kg KG). Dabei zeigten sich während der Trächtigkeit Scheinschwangerschaften und darauf folgend eine Abnahme der Geburtenrate und verringerte Wurfgrößen von Jungtieren bei Konzentrationen von 0,1 und 0,2 mg/kg KG. Erst ab einer Konzentration von unter 0,06 mg/kg KG wurden keine Effekte beobachtet (YOUNG UND KING (1984)). Weitere Effekte bei jungen Sauen waren eine verlängerte Periodendauer, Scheinschwangerschaften und eine verminderte Anzahl an Nachwuchs. Diese Beobachtungen wurden von DIEKMAN UND GREEN (1992) auch bei höher verabreichten ZEA-Konzentrationen bestätigt.

BURSIAN ET AL. (1992) fütterten Nerze über einen Zeitraum von 24 Tagen mit 0, 10 und 20 mg ZEA/kg (entspricht 1,7 und 3,4 mg/kg KG/Tag). Dabei konnte eine signifikante Gewichtszunahme der Gebärmutter in beiden Expositionsgruppen festgestellt werden. Die Fütterung von 20 mg ZEA/kg führte zu bedeutend höheren Vulvaschwellungen im Vergleich zu der Kontrollgruppe. In einer zweiten Untersuchung wurde Nerzen ebenfalls 20 mg ZEA/kg

Futter gefüttert. Dabei konnte eine Zunahme der Trächtigkeitsdauer und eine Zunahme der Sterblichkeit der Neugeborenen innerhalb der ersten drei Wochen im Vergleich zu der Kontrollgruppe beobachtet werden.

4.5.2 Humantoxizität von Zearalenon und dessen Derivaten

ZEA wurde im Gewebe der Gebärmutterschleimhaut von 49 Frauen nachgewiesen. Es wurde 27-mal endometrialer Drüsenkrebs, elf-mal endometriale Hyperplastie und elf normal proliferative Endometrien mit ZEA-Konzentrationen von $47,8 \pm 6,5$ ng/mL, $167,0 \pm 17,7$ ng/mL und unterhalb der Nachweisgrenze festgestellt. In acht Fällen von Hyperplastie und in fünf Fällen des neoplastischen Endometrialgewebes wurde ZEA nicht nachgewiesen (TOMASZEWSKI ET AL. (1998)).

Es wird vermutet, dass ZEA oder der ähnlich wirksame Wachstumspromotor Zearalanol in Verbindung mit einer Epidemie von frühreifen pubertären Veränderungen in Kleinkindern auf Puerto Rico steht (SÁENZ DE RODRIGUEZ ET AL. (1984, 1985)). Zearalenon oder dessen Biotransformationsprodukte wurden im Blutplasma bestimmt. Die Autoren beschrieben eine hohe Belastungssituation von Fleisch durch Zearalanol in den entsprechenden Regionen. Spätere Studien der FDA konnten jedoch keinen verwendeten östrogenen Wachstumspromotor nachweisen. Natürliches Vorkommen von östrogen wirksamen Verbindungen wie z. B. Metabolite aus Pflanzen oder Mykotoxine konnten als Ursache nicht ausgeschlossen werden. FRENİ-TITULAER ET AL. (1986) ermittelten eine Korrelation zwischen den pubertären Veränderungen und dem Konsum von Fleisch- und Wurstwaren und von Sojasauce. Allerdings konnte dieser statistische Zusammenhang mehr als 50 Prozent der untersuchten Fälle nicht erklären.

SZUETZ ET AL. (1997) berichteten von einem erhöhten Auftreten einer frühen Thelarche in der südöstlichen Region von Ungarn. ZEA wurde in Konzentrationen von 18,9 bis 103,5 µg/mL im Blutserum der Patientinnen nachgewiesen. ZEA konnte ebenfalls in übrig gebliebenen Lebensmitteln dieser Patienten nachgewiesen werden.

4.6 Risikoabschätzung der Fusarientoxine

Für die Risikoabschätzung der Fusarientoxine (hier DON und ZEA) müssen die vorliegenden Belastungsdaten der einzelnen Lebensmittel in Verbindung mit den bekannten toxikologischen Wirkungen dieser Toxine bewertet werden. Dabei sind unter anderem regional unterschiedliche Verzehrverhalten als auch Personengruppen mit einer besonderen Ernährungssituation (z. B. diätetische Lebensmittel für die Ernährung von Säuglingen und Kleinkindern oder sogenannten Extremverzehrer) zu berücksichtigen.

Das internationale Lebensmittel-Monitoring-Program Global Environment Monitoring System (GEMS) wurde von dem United Nation Environment Programme (UNEP), der FAO (Food and Agriculture Organization) und der World Health Organization (WHO) ins Leben gerufen. Ziel des Programms ist es, auf internationaler Ebene Daten zur Verunreinigung von Lebensmitteln mit bestimmten chemischen Stoffen zu sammeln, diese zu bewerten, mögliche Risiken für den Verbraucher zu erkennen und den beteiligten Ländern und internationalen Organisationen eine Basis für Maßnahmen zur Risikobewertung zur Verfügung zu stellen. Dieses Programm stellt neben den SCOOP-Projekten innerhalb der europäischen Union die Grundlage zur Risikobewertung dar. Die SCOOP-Projekte haben das Ziel, die nahrungsbedingte Aufnahme einzelner Mykotoxine in der EU-Bevölkerung abzuschätzen. Für die Fusarientoxine resultierte daraus der SCOOP Task Report 3.2.10 aus dem Jahr 2003. Diese SCOOP-Daten werden unter anderem vom SCF, der europäischen Kommission für die Eva-

luierung einer Risikoabschätzung der öffentlichen Gesundheit, aufgrund der nahrungsbedingten Aufnahme verschiedener Toxine herangezogen.

4.6.1 Risikoabschätzung für die Trichothecene

Die ernährungsbedingte Aufnahme von DON, T-2 Toxin und HT-2 Toxin wurde unter anderem entsprechend der Empfehlung des 56. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) Report (Safety evaluation of certain mycotoxins in food) aus dem Jahr 2001 beurteilt.

4.6.2 Risikoabschätzung für die Summe der Typ A und Typ B Trichothecene

Aufgrund eines einheitlichen strukturellen Grundgerüsts der Trichothecene und möglicher Analogien in den toxikologischen Wirkungsmechanismen wurde zunächst für die Gesamtexposition bestimmter Trichothecene (DON, NIV, T-2 Toxin und HT-2 Toxin) eine kombinierte temporäre Tolerierbare Tägliche Aufnahme (tTDI) diskutiert.

In einer Stellungnahme aus dem Jahr 2002 bewertet das SCF die vorliegende toxikologische Datenlage bezüglich der einzelnen Trichothecene und hinsichtlich der Einführung eines Gruppen-TDI's für die Summe der Typ A und Typ B Trichothecene. Die verfügbaren Daten wurden als nicht ausreichend konsistent bewertet, um einen solchen Gruppen-TDI abzuleiten. Der toxikologisch diskutierte synergistische Wirkungsmechanismus der Typ A und Typ B Trichothecene, welcher einen erhöhten Sicherheitsfaktor zur Folge hätte, konnte zu diesem Zeitpunkt nicht belegt werden.

4.6.3 Risikoabschätzung einzelner Trichothecene

PRONK ET AL. (2002) erstellten eine Übersicht über toxikologische Endpunkte und das Vorkommen von NIV, FusX, DAS, NEO und 3- und 15-AcDON. Darin kommen die Autoren zu dem Schluss, dass die Ableitung eines TDI's aufgrund der unzureichenden toxikologischen Datenlage und der ungenügenden Datenlage bezüglich der Belastung der Lebensmittel mit FusX, DAS, 3-AcDON, 15-AcDON und NEO zu diesem Zeitpunkt nicht möglich ist. Für NIV wurde ein tTDI von 0,7 µg/kg KG ermittelt. Dieser beruht auf der Grundlage der signifikant auftretenden toxischen Effekte für NIV wie der allgemeinen Toxizität und der Immunotoxizität bei Mäusen (OHTSUBO ET AL. (1989); RYU ET AL. (1988)). Schlussfolglich wurde ein Monitoring für diese Toxine mit entsprechender analytischer Methodenentwicklung im unteren Belastungsbereich empfohlen.

Unter Anwendung eines LOAEL von 0,7 mg/kg KG aus Langzeitstudien mit Mäusen (OHTSUBO ET AL. (1989); RYU ET AL. (1988)) wurde ein tTDI von 0,7 µg/kg KG/Tag festgelegt. Dabei wurde ein Sicherheitsfaktor von 1.000 aufgrund der Verwendung des LOAEL und einer nicht ausreichenden Datenbasis festgesetzt (SCF, 2000b; SCF, 2002). Aus dem SCOOP Task 3.2.10 geht hervor, dass die nahrungsbedingte NIV-Aufnahme weit unterhalb des TDI's liegt.

4.6.4 Risikoabschätzung für T-2 Toxin und HT-2 Toxin

Zur Risikoabschätzung von T-2 Toxin und HT-2 Toxin legten sowohl das SCF (2001) als auch die JECFA (2000) die Studie von RAFAI ET AL. (1995) zur subakuten Toxizität dieser Verbindungen in Schweinen zugrunde. Daraus resultierte ein LOAEL von 0,03 mg/kg KG.

Mit einem Sicherheitsfaktor von 500 berechnete das SCF, 2001, einen temporären TDI (tTDI) von 0,06 µg T-2 Toxin/kg KG/Tag. Da die akute Toxizität von T-2 Toxin und HT-2 Toxin als nahezu gleich angesehen werden kann und T-2 Toxin *in vivo* schnell zu HT-2 Toxin biotransformiert, wird ein kombinierter tTDI für die Summe dieser Toxine als sinnvoll erachtet.

Die JECFA ermittelte für T-2 Toxin und HT-2 Toxin einen TDI von 0,017 µg/kg KG auf Basis einer kritischen Beurteilung der in Lebensmitteln gefundenen Konzentrationen und den GEMS- (*Food European regional diet*) Daten. Die JECFA, 2000, berechnete unter Berücksichtigung der GEMS-Verzehrsdaten für T-2 Toxin eine Gesamtaufnahme von 7,6 ng/kg KG/Tag, wobei Weizen und Gerste die Hauptaufnahmequelle darstellten. Die Gesamtaufnahme von HT-2 Toxin wurde zu 8,7 µg/kg KG/Tag ermittelt, wobei der höchste Eintrag über Weizen, Gerste und Hafer zu verzeichnen war.

Einer Risikoabschätzung von ERIKSEN ET AL. (2004) zufolge wurde für die skandinavischen Länder ein durchschnittlicher Summen-TDI von T-2 Toxin und HT-2 Toxin von 0,13 µg/kg KG abgeleitet.

Der SCOOP Task 3.2.10 berichtet über die Summe der beiden Toxine (T-2 Toxin und HT-2 Toxin) für einen kombinierten TDI von 0,06 µg/kg KG in den meisten Fällen eine Überschreitung. Dabei sollte berücksichtigt werden, dass die Anzahl positiver Proben für T-2 Toxin bei 20 % und für HT-2 Toxin bei 14 % liegt. Aufgrund dieser Tatsache wird die mittlere Toxinaufnahme stark von den Nachweisgrenzen der analytischen Methoden beeinflusst.

4.6.5 Risikoabschätzung für Deoxynivalenol

Die Langzeit-Fütterungsstudien von IVERSON ET AL. (1995) mit männlichen und weiblichen B6C3F1-Mäusen stellt zur Zeit den zentralen Ansatzpunkt für eine Risikoabschätzung und somit zur Berechnung eines TDI's von DON innerhalb der europäischen Union dar. Diese, auf einer chronisch toxikologisch basierenden Wirkung beruhende Studie führte zur Berechnung eines NOAEL's von 0,1 mg/kg KG/Tag. Dabei wurde keine erhöhte Tumorbildung oder ein anderes Anzeichen einer kanzerogenen Wirkung festgestellt.

Diese Studie wurde vom SCF, 1999, der JECFA, 2000, dem RIVM und dem Nordic Council of Ministers (ERIKSEN ET AL. (2004)) zur Risikoabschätzung von DON zugrunde gelegt. Unter Verwendung eines Sicherheitsfaktors von 100 wurde ein tTDI von 1 µg/kg KG berechnet. Dieser tTDI wurde zunächst als vorläufig festgelegt, da die genannte Studie nur an einer Tierspezies durchgeführt wurde, und da Unsicherheiten bezüglich des genauen Wirkungsmechanismus bestehen. Dieser tTDI umfasst außerdem auch weitere subchronische und reproduktionsbedingte Effekte und akut auftretende Brechreize von DON.

PIETERS ET AL. (1999) diskutieren ebenfalls auf dieser Grundlage eine erhöhte Exposition an DON für Kleinkinder zwischen ein bis vier Jahren. Dabei überschreiten 80 % der Einjährigen den einfachen tTDI und 20 % davon den zweifachen TDI. Die Aufnahme des 95sten Perzentils der Einjährigen beträgt dabei 3 µg/kg KG. In dieser Abschätzung stellt Brot sowohl für diese Gruppe als auch für Erwachsene den größten Beitrag der täglichen Aufnahme dar. In den skandinavischen Ländern (ERIKSEN ET AL. (2004)) wurde die Aufnahme von DON durch Getreide in einem Bereich von 0,3 - 0,5 µg/kg KG/Tag abgeschätzt. Für Verbraucher mit ei-

nem erhöhten Bedarf wurde der doppelte Bereich eingeräumt. Für die mittlere Bieraufnahme wurde ein Bereich von 0,1 - 0,2 µg/kg KG/Tag geschätzt. Aufgrund dieser Beurteilung ist eine Überschreitung des vorgeschlagenen tTDI durch Konsumenten mit einem erhöhten Verbrauch an Getreide, Getreideprodukte und Bier möglich.

Die JECFA berechnete unter Berücksichtigung der GEMS/European Food regional diets-Daten für DON eine Gesamtaufnahme von 1,4 µg/kg KG/Tag. Die wichtigste Aufnahmequelle für DON stellte dabei Weizen dar. In dem bereits genannten Report (Safety evaluation of certain mycotoxins in food) wurden weitere Risikoabschätzungen zur nahrungsbedingten Aufnahme von DON aus Argentinien, Schweden, Norwegen, Großbritannien und den USA dargelegt. Aus diesen Daten wurde deutlich, dass Säuglinge und Kleinkinder (1,5 - 12 Jahre) die Personengruppe mit der höchsten DON-Belastung darstellt.

Aus dem SCOOP Task 3.2.10 geht in Bezug auf einen TDI von 1 µg/kg KG für DON folgende Risikoabschätzung hervor:

mittlere DON-Aufnahme:

Hier lag die nahrungsbedingte Aufnahme von DON in den unterschiedlichsten Bevölkerungsgruppen weit unterhalb des TDI's. Die Gruppe der Säuglinge und Kleinkinder stellte eine Ausnahme dar, da hier der TDI nahezu ausgeschöpft wurde.

DON-Hochverzehrer:

Hier wurde innerhalb der Gruppe der Kleinkinder der TDI überschritten. Für die Gruppe der 13 bis 18 Jahre alten Jugendlichen lag die Aufnahme im Bereich des TDI's.

4.6.6 Risikoabschätzung für Zearalenon und dessen Derivaten

ERIKSEN ET AL. (2004) schätzten die hormonellen und kanzerogenen Wirkungsmechanismen von Zearalenon als die kritisch zu bewertenden Risiken ein. Wie Untersuchungen des US National Toxicology Program (NTP, 1982) zeigten, besitzt ZEA ein kanzerogenes Potenzial. Eine mathematische Annäherung zur Risikoabschätzung von ZEA wurde von KUIPER-GOODMANN ET AL. (1987) durchgeführt. ERIKSEN ET AL. (2004) stuften diese Risikoabschätzung als zuverlässig ein. Bei einem geschätzten Risiko von 1 zu 10^6 führt diese Extrapolation zu einer sicheren Aufnahmemenge von 0,05 µg ZEA/kg KG/Tag. Die zu Grunde liegenden Daten stammen aus der NTP-Studie.

Der Nachweis von DNS-Addukten in Mäusen (GROSSE ET AL. (1997)) lässt die Annahme zu, dass ZEA möglicherweise genotoxische Effekte hervorruft. Dieser genotoxische Effekt deutet an, dass keine Schwellenwertkonzentration für Zearalenon existiert. GRIFFIN ET AL. (1984) untersuchten die hormonellen Wirkungen von α-Zearalenol während einer 90-tägigen oralen Fütterungsstudie bei weiblichen Affen und bestimmten ein NHEL von < 50 µg/kg KG. Da dieses Versuchsmodell keine vollständige Bewertung zuließ, setzte das Nordic Council of Ministers einen Sicherheitsfaktor von 500 fest. Der ermittelte TDI beträgt 0,1 µg/kg KG/Tag.

Das α-Isomer ist das Hauptbiotransformationsprodukt von ZEA in Schweinen und Menschen. Daraus wurde abgeleitet, dass Ergebnisse aus Untersuchungen mit Schweinen – als empfindlichste Spezies – zur Risikoabschätzung für den Fortpflanzungseffekt von ZEA herangezogen werden. Auswirkungen auf die Fortpflanzung in Schweinen konnten bei einer Dosis von 0,06 mg/kg KG beobachtet werden. Unter Verwendung eines Sicherheitsfaktors von 500 konnte eine Aufnahme von 0,1 µg/kg KG/Tag bestimmt werden.

Die Berechnungen, die auf Grundlage von kanzerogenen, fortpflanzungsbedingten und hormonellen Wirkungen durchgeführt wurden, führen alle zu einem einheitlichen TDI-Bereich. ERIKSEN ET AL. (2004) und KUIPER-GOODMANN ET AL. (1987) gelangen dabei zu einem tTDI für ZEA von 0,1 µg/kg KG/Tag.

Die EU-Kommission beschloss, die Risikoabschätzung von ZEA auf Grundlage der Konzentration durchzuführen, die keine hormonelle Wirkung bei Schweinen mehr hervorruft, und stellte einen tTDI für ZEA von 0,2 µg/kg KG/Tag auf. Dies basiert auf einem NOEL von 40 mg/kg KG und einem LOEL von 200 mg/kg KG. Für die Berechnung des tTDI's wurde ein Sicherheitsfaktor von 200 zugrundegelegt.

Aus dem SCOOP Task 3.2.10 geht hervor, dass für die erwachsene Bevölkerung der Europäischen Union bei einer mittleren täglichen Aufnahme von ZEA der TDI nicht erreicht wird.

4.7 Gesetzliche Regelungen von Fusarientoxinen

Bis heute existieren keine weltweit bzw. europaweit einheitlichen Reglementierungen für Fusarientoxine. In einigen Ländern gibt es für einzelne Fusarientoxine rechtskräftige Höchstmengen bzw. Richtwerte. Die unterschiedlichen Reglementierungen der einzelnen Länder bzw. Gemeinschaften sind in den Tab. 5 bis Tab. 7 zusammengefasst.

Aufgrund der niedrigen Inzidenz von Fusarientoxinen in Reis wird in der EU-Kommission diskutiert, diese Produktgruppe nicht in diese Reglementierung aufzunehmen. Es wird ebenfalls in Erwägung gezogen, für 3-AcDON, 15-AcDON und NIV keine Höchstmengen festzusetzen (Verordnung (EG) Nr. 856/2005).

Tab. 5: Zusammenfassung von weltweiten Regelungen und Gesetzgebung für T-2 Toxin und HT-2 Toxin mit Angabe der Lebensmittelgruppe und der festgelegten Höchstmenge

Land, Institution	Lebensmittelgruppe	Höchstmenge [µg/kg]
Verordnung (EG) Nr. 856/2005	Unverarbeitetes Getreide ¹ und Getreideerzeugnisse	— ²
Russland ³	Getreide (Hart- und Weichweizengrieß)	100

¹ Zu dieser Kategorie zählen auch ähnliche, anders bezeichnete Erzeugnisse wie Grieß.

² Bis 1. Juli 2007 wird gegebenenfalls ein Höchstgehalt festgelegt werden. Bisher liegen nur wenige Daten über das Vorhandensein von T-2- und HT-2-Toxin vor. Aus Schätzungen der Aufnahme geht jedoch eindeutig hervor, dass das Vorhandensein von T-2- und HT-2-Toxin für die Gesundheit der Bevölkerung bedenklich sein kann. Deshalb ist es dringend erforderlich, eine empfindliche Methode zu entwickeln, mehr Daten über das Vorkommen zu erheben und die Faktoren zu untersuchen, die zum Vorkommen von T-2- und HT-2-Toxin in Getreide und Getreideerzeugnissen, vor allem in Hafer und Hafererzeugnissen, beitragen.

³ CREPPY, (2002)

Tab. 6: Zusammenfassung von weltweiten Regelungen und Gesetzgebung für Deoxynivalenol mit Angabe der Lebensmittelgruppe und der festgelegten Höchstmenge

Land, Institution	Lebensmittelgruppe	Höchstmenge [µg/kg]
Deutschland	Getreideerzeugnisse (Getreidekörner zum direkten Verzehr und verarbeitete Getreideerzeugnisse), ausgenommen Hartweizenerzeugnisse, Brot, Kleingebäck und Feine Backwaren	500
	Brot, Kleingebäck und Feine Backwaren	350
	Zur Herstellung von diätetischen Lebensmitteln für Säuglinge oder Kleinkinder dürfen keine Getreideerzeugnisse (Getreidekörner zum direkten Verzehr und verarbeitete Getreideerzeugnisse) verwendet werden	100
Verordnung (EG) Nr. 856/2005	Andere unverarbeitete Getreide ⁴ als Hartweizen, Hafer und Mais	1250
	Unverarbeiteter Hartweizen und Hafer	1750
	Unverarbeiteter Mais	— ⁵
	Getreidemehl, Maismehl, Maisgrits und Maisschrot	750
	Brot, Feine Backwaren, Kekse, Getreide-Snacks und Frühstückscerealien	500
	Teigwaren (trocken)	750
	Getreidebeikost und andere Beikost für Säuglinge und Kleinkinder ⁶	200
USA ⁷	Weizen und Weizenprodukte	Monitoring 1000
Russland ⁷	Getreide- und Getreideprodukte	1000
Österreich ⁷	Weizen	750

⁴ Die für ‚unverarbeitetes Getreide‘ festgelegten Höchstgehalte gelten für Getreide, das zur ersten Verarbeitungsstufe in Verkehr gebracht wird. Für Getreide, das gemäß der Verordnung (EG) Nr. 824/2000 der Kommission 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 100 vom 20.4.2000, S. 31), zuletzt geändert durch die Verordnung (EG) Nr. 777/2004 (ABl. L 123 vom 27.4.2004, S. 50), geerntet und übernommen wird, gelten die Höchstgehalte jedoch ab dem Wirtschaftsjahr 2005/2006. ‚Erste Verarbeitungsstufe‘: Jegliche physikalische oder thermische Behandlung des Korns außer Trocknen.

Verfahren zur Reinigung, Sortierung und Trocknung gelten nicht als ‚erste Verarbeitungsstufe‘, sofern das Getreidekorn selbst nicht physikalisch behandelt wird und das ganze Korn nach der Reinigung und Sortierung intakt bleibt.

⁵ Wird vor dem 1. Juli 2007 kein spezifischer Gehalt festgelegt, gilt ein Gehalt von 1750 µg/kg danach für unter dieser Nummer genannten Mais.

⁶ Getreidebeikost und andere Beikost für Säuglinge und Kleinkinder gemäß der Definition in Artikel 1 der Richtlinie 96/5/EG der Kommission vom 16. Februar 1996 über Getreidebeikost und andere Beikost für Säuglinge und Kleinkinder (ABl. L 49 vom 28.2.1996, S. 17), zuletzt geändert durch die Richtlinie 2003/13/EG (ABl. L 41 vom 14.2.2003, S. 33).

Der Höchstgehalt für Getreidebeikost und andere Beikost für Säuglinge und Kleinkinder bezieht sich auf die Trockenmasse.

⁷ CREPPY (2002)

Tab. 7: Zusammenfassung von weltweiten Regelungen und Gesetzgebung für Zearalenon mit Angabe der Lebensmittelgruppe und der festgelegten Höchstmenge

Land, Institution	Lebensmittelgruppe	Höchstmenge [µg/kg]
Deutschland	Getreide- und Getreideerzeugnisse (Getreidekörner zum direkten Verzehr und verarbeitete Getreideerzeugnisse)	50
	Zur Herstellung von diätetischen Lebensmitteln für Säuglinge oder Kleinkinder dürfen keine Getreideerzeugnisse (Getreidekörner zum direkten Verzehr und verarbeitete Getreideerzeugnisse) verwendet werden	20
Verordnung (EG) Nr. 856/2005	Andere unverarbeitete Getreide ⁸ als Mais	100
	Unverarbeiteter Mais	— ⁹
	Getreidemehl ausgenommen Maismehl	75
	Maismehl, Maisschrot, Maisgrits und raffiniertes Maisöl ¹⁰	—
	Brot, Feine Backwaren, Kekse	50
	— Snacks und Frühstückszerealien aus Mais	50
	— sonstige Getreide-Snacks und Frühstückszerealien	—
— Getreidebeikost für Säuglinge und Kleinkinder aus Mais	—	
— sonstige Getreidebeikost und andere Beikost für Säuglinge und Kleinkinder ¹¹	20	
Rumänien ⁷	Getreide, pflanzliche Speiseöle	30
Österreich ⁷	Getreide	60
Frankreich ⁷	Getreide, pflanzliche Speiseöle	200
Russland ⁷	Getreide, pflanzliche Speiseöle und Nüsse	1000

4.8 Vorkommen von Fusarientoxinen

Die wichtigste Quelle für Trichothecene und Zearalenon sind Getreide und Getreideprodukte. Das Auftreten dieser Toxine wurde von KUIPER-GOODMAN ET AL. (1987) auch in weiteren Pflanzenarten beschrieben. Das Vorkommen von Trichothecenen und Zearalenon wurde in vielen weltweiten Untersuchungen beschrieben. SCOTT ET AL. (1990) beschrieben die Inzidenz und Belastungssituationen durch Trichothecene in Nord-Amerika, Asien, Australien, Neuseeland, Süd-Amerika und mehreren europäischen Ländern und kommen zu dem Schluss, dass das häufigste auftretende Trichothecen DON darstellt. Ein Überblick über die weltweite Belastung von Getreide, Lebensmittel und Tiernahrung mit Fusarientoxinen wurde von PLACINTA ET AL. (1999) zusammengefasst. In diesem Artikel werden bedenkliche Belastungen durch DON in Norwegen, Deutschland, Polen, Japan, Neuseeland, USA, Kanada und Argentinien festgestellt. Die Konzentrationen von NIV und ZEA wurden als gering eingestuft. SCOTT ET AL. (1989) beschreiben ausführlich die weltweite Kontamination von Getreide und Tiernahrungsmitteln mit Trichothecenen. Diese Daten belegen ebenfalls die ubiquitäre Verteilung dieser Mykotoxine.

⁸ Die für ‚unverarbeitetes Getreide‘ festgelegten Höchstgehalte gelten für Getreide, das zur ersten Verarbeitungsstufe in Verkehr gebracht wird. Für Getreide, das gemäß der Verordnung (EG) Nr. 824/2000 der Kommission über das Verfahren und die Bedingungen für die Übernahme von Getreide durch die Interventionsstellen sowie die Analysemethoden für die Bestimmung der Qualität (ABl. L 100 vom 20.4.2000, S. 31), zuletzt geändert durch die Verordnung (EG) Nr. 777/2004 (ABl. L 123 vom 27.4.2004, S. 50), geerntet und übernommen wird, gelten die Höchstgehalte jedoch ab dem Wirtschaftsjahr 2005/2006. ‚Erste Verarbeitungsstufe‘: Jegliche physikalische oder thermische Behandlung des Korns außer Trocknen. Verfahren zur Reinigung, Sortierung und Trocknung gelten nicht als ‚erste Verarbeitungsstufe‘, sofern das Getreidekorn selbst nicht physikalisch behandelt wird und das ganze Korn nach der Reinigung und Sortierung intakt bleibt.

⁹ Werden bis 1. Juli 2007 keine spezifischen Gehalte festgelegt, gilt danach der Gehalt von

- 200 µg/kg für unverarbeiteten Mais,
- 200 µg/kg für Maismehl, Maisschrot, Maisgrits und raffiniertes Maisöl,
- 50 µg/kg für Mais-Snacks und Frühstückszerealien auf Maisbasis,
- 20 µg/kg für Getreidebeikost für Säuglinge und Kleinkinder aus Mais.

¹⁰ Zu dieser Kategorie zählen auch ähnliche, anders bezeichnete Erzeugnisse wie Grieß.

¹¹ Getreidebeikost und andere Beikost für Säuglinge und Kleinkinder gemäß der Definition in Artikel 1 der Richtlinie 96/5/EG der Kommission vom 16. Februar 1996 über Getreidebeikost und andere Beikost für Säuglinge und Kleinkinder (ABl. L 49 vom 28.2.1996, S. 17), zuletzt geändert durch die Richtlinie 2003/13/EG (ABl. L 41 vom 14.2.2003, S. 33). Der Höchstgehalt für Getreidebeikost und andere Beikost für Säuglinge und Kleinkinder bezieht sich auf die Trockenmasse.

Wie aus Tab. 8 ersichtlich, ist das Vorkommen von Fusarium Mykotoxinen innerhalb Europas im Vergleich zu den weltweit erhobenen Daten als nahezu gleich anzusehen (BOTTALICO (1998)). Das weltweit erhöhte Vorkommen von NIV mit 40 % im Vergleich zu dem europaweiten Vorkommen von NIV mit 16 % kann durch ein verstärktes Vorkommen von NIV in Japan begründet werden (YOSHIZAWA (1997)).

Tab.8: Welt- und europaweite Belastungssituatun durch Fusarientoxine (BOTTALCO (1998))

Toxin	Positive/untersuchte Proben				Spannweite [µg/kg]	
	n		%			
	Weltweit	Europa	Weltweit	Europa	Weltweit	Europa
DON	3491/7369	3771/6288	47	60	1 - 67000	4 - 67000
DAS	126/2103	49/1535	6	3	1 - 31500	20 - 31500
NIV	867/2181	745/4608	40	16	2 - 37900	3 - 7800
T-2 Toxin	350/4656	519/4383	8	12	1 - 38890	1 - 14000
ZEA	2277/18018	845/5745	13	15	2 - 275800	1 - 175000

Das natürliche Vorkommen von Zearalenon in einer Vielzahl von landwirtschaftlichen Erzeugnissen wie Gras und Getreide wurde bei BENNETT (1978), SCOTT ET AL. (1978), SHOTWELL ET AL. (1977) und im Detail auch bei SENTI (1979) beschrieben.

Zearalenon besitzt mehrere natürlich vorkommende Derivate. Des Weiteren existieren über 100 künstlich hergestellte Zearalenon-Derivate, die teilweise auch pharmakologisch genutzt werden (SHIPCHANDLER (1975)). Zeranol wurde bei Rindern, Schweinen und Schafen als Wachstumsförderer eingesetzt, ist in Deutschland aber seit 1989 verboten (HIDY ET AL. (1977); BORIES ET AL. (1992); KERCHER UND JONES (1992)).

DROCHNER (1989) erstellte eine Übersicht über das Vorkommen von Zearalenon in verschiedenen Futtermitteln. Daraus ging hervor, dass zwischen 9 - 17 % der untersuchten Futtermittel Zearalenonkontaminationen aufwiesen, wobei Mais eine der maßgeblichen Quellen darstellte.

KRAUSE (1985) zeigte, dass die Lagermenge und Lagerzeit von Futtermittel keinen Einfluss auf die Toxinbelastung besaß. MODI UND MÜLLER (1992) untersuchten Weizenkleie und fanden in 78 % der Proben Zearalenon. Darüber hinaus waren alle Kleieproben zusätzlich mit Deoxynivalenol kontaminiert.

BOTTALICO (1989) untersuchte Mais (infizierte Pflanzenkompartimente und kommerziell erhältliche Maiskörner) auf Fusariumbefall und Mykotoxinbelastung. Der Stichprobenplan umfasste die meisten italienischen Regionen und zusätzlich einige europäische Mittelmeerländer. In Süditalien wurden direkt aus Feldern Getreidehalme und verfaulte Maiskolben entnommen. Diese waren hauptsächlich mit ZEA, ZOL und DON kontaminiert.

Auf Grundlage europäischer Überwachungsdaten verfassten GAREIS ET AL. (1989) eine Übersicht über die Kontamination von Lebensmitteln mit natürlich vorkommenden Fusarium-Mykotoxinen. Das Vorkommen der fünf Typ A Trichothecene T-2 Toxin, HT-2 Toxin, DAS, MAS, und NEO konnte in diesen Untersuchungen bestätigt werden. T-2 Toxin, HT-2 Toxin und DAS wurden in Gerste, Mais, Weizen, Hafer und gemischtem Futtermittel nachgewiesen. Das Vorkommen von MAS konnte in Weizen und in Futtermittel belegt werden. Die häufigsten positiven Befunde für T-2 Toxin wurden in Hafer bestimmt. HT-2 Toxin wurde mehrfach in Gerste und in Hafer nachgewiesen. Für die Gruppe der Typ B Trichothecene stellte DON die höchste Kontamination in allen Getreidesorten dar. NIV, 3-AcDON und FusX wurden in Gerste, Hafer, Weizen und Futtermittel bestimmt. Die größten Inzidenzen wurden für Österreich in Mais, für Finnland und Deutschland in Weizen mit einem DON-Vorkommen größer als 90 % in den einzelnen Erntejahren ermittelt. ZEA wurde in nahezu allen Agrarprodukten wie Getreide und Futtermittel, aber auch in Mais- und Grassilage, Gras und Heu,

Bohnen und Erbsen, Sonnenblumen und importierten Sojabohnen nachgewiesen. Das größte Vorkommen von ZEA wurde in Mais aus Österreich und Frankreich und in Vorernte Weizen mit sichtbarem Fusariumbefall aus Deutschland nachgewiesen. Eine Co-Kontamination von zwei oder mehreren Typ A Trichothecenen wurde in finnischen, deutschen und sowjetischen Produkten beschrieben. Das gleichzeitige Vorkommen von T-2 Toxin und HT-2 Toxin wurde überwiegend in Hafer und gemischten Getreideprodukten nachgewiesen. Das gleichzeitige Auftreten von Typ A und Typ B Trichothecenen und Zearalenon konnte in unterschiedlichen Getreiden wie Gerste, Mais und Weizen bestimmt werden (GAREIS ET AL. (1989); TANAKA ET AL. (1988)).

KARPPANEN ET AL. (1985) berichten über das gleichzeitige Vorkommen von T-2 Toxin, HT-2 Toxin und DAS in finnischen Getreideprodukten. Weiter berichten die Autoren über eine Co-Kontamination von Typ A und Typ B Trichothecenen in gemischten Getreideprodukten und in Hafer.

Seit 1980 überwachten kanadische Gesundheitsbehörden Getreide und Lebensmittel auf den Gehalt an DON, nachdem DON erstmals (1979 - 1980) in Ontario-Weichweizen nachgewiesen wurde. Der Grad der Verunreinigung des Weizens variierte mit einer Inzidenz von 32 - 100 % innerhalb eines Jahres mit einem durchschnittlichen Mittelwert von 0,75 mg/kg aller positiven Proben. Aus Weizen hergestellte Lebensmittel wiesen eine Inzidenz von 9 - 90 % mit einer durchschnittlichen Konzentration von 0,07 - 0,58 mg/kg der positiven Stichproben auf. Eine gleich bleibende hohe Verunreinigung (13 - 100 % jährliche Inzidenz und jährlicher Mittelwert an positiven Proben von 0,16 - 1,4 mg/kg) des Ontario-Maises konnte ebenfalls festgestellt werden. Weitere Trichothecene wie NIV und HT-2 Toxin wurden selten in kanadischem Getreide gefunden (SCOTT (1997)).

Im SCOOP Task 3.2.10 aus dem Jahr 2003 wurde für Europa eine weit verbreitete Verteilung der Fusariantoxine in der Lebensmittelkette der europäischen Gemeinschaft festgestellt. Das häufigste Vorkommen von DON (89 %), NIV (35 %), 3-AcDON (27 %), T-2 Toxin (28 %) und ZEA (79 %) wurde in Rohmais bzw. weiterverarbeiteten Maisprodukten festgestellt. Das häufigste Vorkommen von HT-2 Toxin (41 %) wurde in Hafer festgestellt. LANGSET und RUNDBERGET (1999) untersuchten insgesamt 449 Getreideproben, darunter Gerste, Weizen und Hafer aus unterschiedlichen Regionen Norwegens in den Jahren 1996 bis 1998. DON und HT-2 Toxin wurden am häufigsten nachgewiesen, gefolgt von T-2 Toxin, NIV und Scirpentriol. Hafer stellte mit einer Inzidenz von 70 % und einer mittleren Konzentration aller positiven Proben von 115 µg/kg für HT-2 Toxin, für T-2 Toxin mit 30 % und 60 µg/kg, für DON mit 57 % und 104 µg/kg das am stärksten kontaminierte Getreide dar. Die Autoren stellten fest, dass der norwegische Hafer eine T-2 Toxin- und HT-2 Toxin-Belastung aufwies, die eine mögliche Gefahr für die menschliche Gesundheit von Hochverzellern darstellen könnte.

4.9 Einfluss der Lebensmittelverarbeitung auf Fusarientoxine

4.9.1 Reinigung und Sortierung von Getreide

Stark fusarienbefallene Getreidekörner sind verrunzelt und weisen ein geringeres Gewicht als gesunde Körner auf. Diese können durch physikalische Prozesse wie Gravitations-Separatoren oder Windsichtung von den gesunden Körnern getrennt werden. WOLFF (2003) zeigte bei der Getreidereinigung (Schwarz- und Weissreinigung) einen deutlichen Unterschied in der Entfernbarkeit zwischen DON und ZEA. ZEA war bei den durchgeführten Reinigungen im höheren Maße (80 % bis 90 %) zu entfernen als DON (ca. 10 %). Die Reduktion von DON korrelierte dabei nicht mit der Reduktion von ZEA in den einzelnen Stufen der Reinigung. Diese Beobachtungen sind darauf zurückzuführen, dass ZEA sich eher in der Epidermis des Getreidekorns befindet als das bei DON der Fall ist.

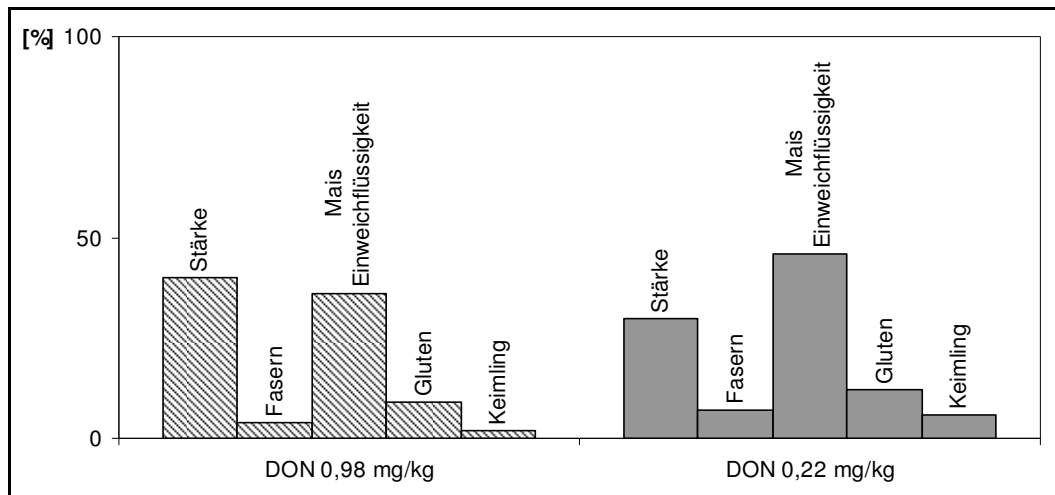
4.9.2 Trockenvermahlung von Getreide

Gereinigtes Getreide wird gewöhnlich in unterschiedliche Fraktionen vermahlen. Die meisten Mykotoxine tendieren dazu, sich in der Kleie bzw. in den äußeren Schichten anzureichern. Fraktionen wie Weißmehl oder Maisgrieß sind somit nur mit geringen Konzentrationen an Mykotoxinen kontaminiert. NOWICKI ET AL. (1988) berichteten, dass eine Abhängigkeit zwischen dem Grad des Pilzbefalls im Endosperm des Weizenkorns und der Verteilung von DON in die zerkleinerten Weizenfraktionen besteht. Dies wiederum ist von der Weizensorte abhängig. Bei einem geringen Pilzbefall sind die höchsten DON-Gehalte an der Getreideoberfläche zu finden und geringe Konzentrationen an DON können im verarbeiteten Weizenmehl nachgewiesen werden.

TRIGO-STOCKLI ET AL. (1996) untersuchten die Verteilung von DON und ZEA in Weizen unter Verwendung einer Buhler-Mühle. Beide Toxine konnten in hohen Konzentrationen in der Kleie festgestellt werden. PATEY UND GILBERT (1989) beschrieben die Verteilung von DON, NIV und ZEA in Weizen während der Trockenvermahlung. Generell konnte festgestellt werden, dass diese Mykotoxine in allen Fraktionen nachgewiesen wurden. Die höchsten Gehalte konnten in Kleie und Kern ermittelt werden. Bei Untersuchungen mit Mais wurden die höchsten Konzentrationen dieser Toxine in Kern- und Kleie-Fraktion bestimmt.

4.9.3 Nassvermahlung von Getreide

Der Nassvermahlungsprozess wird hauptsächlich für die Vermahlung von Mais herangezogen. Die entscheidenden Fraktionen für die Lebensmittelindustrie sind Maisstärke und Maiskeime für die Maiskeimölproduktion und Maissirup. Trichothecene sind wasserlöslich und werden somit bevorzugt in der Einweichflüssigkeit und der Glutenfraktion nachgewiesen. So gelangen 66 % T-2 Toxin in diesem Prozess aus Mais in die Einweichflüssigkeit bei gleichzeitigen geringen Konzentrationen in der Stärke und Sirupfraktion (LAUREN UND RINGROSE (1997), COLLINS UND ROSEN (1981)). Wie in Abb. 6 dargestellt, zeigten HAZEL UND PATEL (2004), dass im Fall von DON während der kommerziellen Nassvermahlung Rückstände von bis zu 30 % in der Stärke wiedergefunden wurden.

Abb. 6: Verteilung von DON in unterschiedlichen Maisfraktionen (HAZEL UND PATEL (2004))

LAUREN UND RINGROSE (1997) untersuchten die Konzentrationsverteilung von ZEA während der Nassvermahlung von Mais. Während die Autoren die geringsten Konzentrationen von ZEA in dem Waschwasser fanden, konnten hingegen höhere Konzentrationen in den Keimling-, Fasern- und Gluten-Fractionen ermittelt werden. In einem aus den Maiskeimlingen hergestellten Maiskeimöl konnte ein Gehalt von 4,6 mg/kg ZEA ermittelt werden. Der Zearalenon-Gehalt war mit zwei- bis dreifach höheren Konzentrationen in den festen Fraktionen (Keimlingen, Fasern und Gluten Fraktionen) sehr viel höher, als zuvor in dem eingesetzten Mais bestimmt werden konnte. Weiterhin wurde die Verteilung von DON und NIV durch den Nassvermahlungsprozess einer kommerziellen Nassvermahlungs-Anlage verfolgt. Die gut wasserlöslichen Typ B Trichothecene (DON und NIV) wurden in hohen Konzentrationen in dem Waschwasser gefunden. Nur geringe Mengen wurden in den Keimling-, Faser- und Gluten- Fraktionen nachgewiesen.

BENNETT UND ANDERSON (1978) untersuchten ebenfalls die Verteilung von ZEA während des Nass-Vermahlungsprozesses (Tab. 9) und erzielten dabei vergleichbare Ergebnisse.

Tab. 9: Zearalenon enthaltende Fraktionen nach einem Nassvermahlungs-Prozess (BENNETT UND ANDERSON (1978))

Fraktion	Zearalenon-Verteilung [%]
Gluten	49 - 56
Lösliches	17 - 26
Faser	15 - 19
Keimling	9 - 11
Stärke	Nicht nachweisbar

Durch die Nassvermahlung wurden keine signifikanten ZEA-Konzentrationen mehr in der Maisstärke nachgewiesen. Die Fraktion der Keimlinge enthält die ein- bis zweifach höhere Menge an ZEA als im Vergleich zum Ausgangsprodukt und besitzt 9 - 11 % der gesamten ZEA-Konzentration. Die Faserfraktion wies eine ein- bis dreifach höhere Konzentration als das originäre Mais Korn auf und enthielt ca. 15 - 19 % der gesamten ZEA-Konzentration.

Es ist bekannt, dass während einer längeren Lagerung von Mais die im Endosperm enthaltenen Lipide in den Keimling migrieren. Dieser „Extraktionsprozess“ kann dazu führen, dass ZEA im Keimling konzentriert vorliegt.

4.9.4 Herstellung von Speiseöl

Maiskeimöl wird als Nebenprodukt von zwei in der Maismehl-Industrie angewandten Verfahren produziert. Zum einen in der Stärkeindustrie, hier wird der Maiskeimling aus einem Nassentkeimungsprozess erhalten. Zum anderen in der Maismehlindustrie, hier wird der Keimling während eines trockenen Entkeimungsverfahrens gewonnen.

Bereits bei der Neutralisation von pflanzlichen Speiseölen mit Laugen werden 90 - 98 % der natürlich enthaltenen Aflatoxine durch irreversible Öffnung der Lacton-Bindung zerstört. Restliche Aflatoxine werden während der Bleichung abgetrennt. Aflatoxin war daher in raffinierten Ölen nicht zu finden. Es kann nur in unraffinierten Ölen vorkommen. Da Zearalenon wie die Aflatoxine einen Lactonring aufweisen, kann auch bei ZEA davon ausgegangen werden, dass dies durch Raffination und Bleichung im Produkt reduziert werden kann und möglicherweise nur in nativen Maiskeimölen nachweisbar ist. Für die Herstellung von Sojaöl werden die Sojabohnen zuerst einem Extrudierprozess unterzogen. Dies bewirkt die Denaturierung der Proteine, die Struktur der Saat wird gebrochen und das Herauslösen des Öls wird erleichtert (BOKISCH (1993)).

4.9.5 Herstellung von Brot, Gebäck, Geröstetem und Gefrorenem

SAMAR ET AL. (2001) stellten fest, dass der Fermentationsprozess den natürlich vorkommenden DON-Gehalt in argentinischem Brot reduzierte. Dabei wurden unterschiedliche Brote aus natürlich kontaminiertem Weizenmehl (DON 150 µg/kg) hergestellt. Der Teig wurde bei 30 - 50 °C fermentiert. Der maximale Verlust bei einer Fermentationstemperatur von 50 °C lag zwischen 41 - 46 %. Diese Daten stimmen mit Untersuchungen von NEIRA ET AL. (1997) überein. Dabei wurden durch traditionelle Backverfahren acht unterschiedliche Brote hergestellt, die alle eine signifikante Reduktion von DON aufwiesen. GREENHALGH ET AL. (1984) zeigten, dass sowohl in dotiertem als auch in natürlich kontaminiertem Weizen während des Brot-Herstellungsprozesses 80 % DON in den Produkten wiedergefunden wurden. ABBAS ET AL. (1985) bestimmten Verluste im Bereich von 19 - 69 %.

TANAKA ET AL. (1986) stellten fest, dass der Backprozess bei 170 °C keinen Einfluss auf den Gehalt an DON und NIV hatte. BOYACIOUGLU ET AL. (1993) untersuchten den Einfluss verschiedener Zusatz- und Hilfsstoffe wie Kaliumbromid, L-Ascorbinsäure, Natriumbisulfit, L-Cystein und Ammoniumphosphat bei unterschiedlichen Konzentrationen auf die Stabilität von DON. Die Reduktion lag ohne die Additiva bei 7 %. Bei Natriumbisulfit, L-Cystein und Ammoniumphosphat konnte eine Reduktion bis zu 40 % beobachtet werden.

BRETZ ET AL. (2005a, 2005b) bestimmten die Hitzestabilität von NIV unter typischen Lebensmittelherstellungsbedingungen und untersuchten den Rückstand auf mögliche NIV-Abbauprodukte. Nach einem Erhitzungsprozess unter leicht alkalischen Bedingungen wurde ein Gemisch aus drei NIV-Degenerationsprodukten nachgewiesen. Diese wurde mittels GC/MS und LC/MS charakterisiert. Die Strukturaufklärung erfolgte mittels 1D- und 2D-NMR-Untersuchungen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Bildung dieser NIV-Abbauprodukte ebenfalls in Erhitzungsexperimenten mit gespikten NIV in Mehl gebildet wurden.

4.9.6 Kochen und Konservenherstellung

LAUREN UND SMITH (2001) zeigten, dass DON und NIV über einen pH Bereich von 1 - 10 relativ stabil sind. Bedingungen von pH 12, hohe Salz-Gehalte und eine Temperatur von 80 °C über eine lange Zeit wurden benötigt, um eine Reduzierung der genannten Toxine zu erzielen. In Mais wurden DON und NIV um 60 - 100 % reduziert, bei einer Behandlung mit wässrigem Bikarbonat um 10-, 20- und 50-Gewichtsprozenten bei gleichzeitigem Erhitzen bei 80 - 110 °C in einem Zeitraum von 2 bis 12 Tagen. Im Vergleich dazu wurde ZEA auch bei einer 12-tägigen Behandlung bei 110 °C mit Bikarbonat-Lösungen nicht zerstört. KAMIMURA ET AL. (1981) zeigten, dass sich die Trichothecen-Konzentrationen von T-2 Toxin und DAS um 30 %, von DON und NIV um 40 % und von FusX und NEO um 60 % in japanischen Nudeln während des Kochprozesses bei 98 °C für zehn Minuten verringerten. Die Autoren gingen dabei von einem Extraktionsprozess dieser Toxine in das Kochwasser aus.

BOCKHORN ET AL. (2001) untersuchten 29 Teigwaren-Produkte. Dabei wurden sowohl die rohe Angebotsform, die gekochte, verzehrfertige Teigware und das Kochwasser auf den Gehalt an DON untersucht. Im Vergleich zu der rohen Angebotsform konnte in der gekochten Teigware eine 60 - 80 % geringere DON-Konzentrationen nachgewiesen werden. Ausgehend von der rohen Teigware konnten zwischen 34 - 84 % DON im Kochwasser bestimmt werden.

Im Verlauf einer thermischen Lebensmittelzubereitung ist ZEA stabil. Eine Studie von RYU ET AL. (2003) wurde zur Bestimmung der Hitzestabilität von ZEA durchgeführt. Der ZEA-Abbau wurde während eines Erhitzungsprozesses bei verschiedenen Temperaturen (100, 125, 150, 175, 200 und 225 °C) in einer wässrigen Pufferlösung mit unterschiedlichen pH-Werten gemessen. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Reduktion von ZEA stieg mit wachsender Prozess-temperatur. Bis zu einer Temperatur von 125 °C gingen weniger als 23 % ZEA verloren. Nach einer 60-minütigen Erhitzungsdauer wurden je nach eingestelltem pH-Wert 34 - 68 % zerstört. Nach 60 Minuten bei einer Temperatur von ≥ 175 °C wurden mehr als 92 % ZEA abgebaut. Unbeachtet der unterschiedlich eingestellten pH-Werte wurde eine vollständige Reduktion von ZEA in weniger als 30 Minuten bei 225 °C erreicht. Bei einem pH Wert von 7 war ZEA am stabilsten, gefolgt von einem pH-Wert von 4 und 10.

4.9.7 Extrudierte Getreideerzeugnisse

Dieser technologische Prozess wird benutzt, um eine Vielzahl von Lebensmitteln und Futtermitteln zu produzieren wie Frühstückszerealien, Snack-Produkte, Konditoreiwaren und Tiernahrung. Der Abbau der Mykotoxine kann während des Extrudierens durch unterschiedliche Faktoren erfolgen wie Temperatur oder auch der Gegenwart von alkalischen Verbindungen.

WOLF-HALL ET AL. (1999) zeigten, dass DON über den gesamten Prozess des Extrudierens stabil war. Es konnte kein signifikanter Verlust an DON in extrudierten MaisGrits und extrudiertem Trocken-Hundefutter festgestellt werden. RYU ET AL. (1999) untersuchten die Abnahme von ZEA in Mais-Grits während des Extrudierens. In diesen Untersuchungen wurde eine Reduktion von 65 bis 83 % von zugesetztem ZEA festgestellt. Diese Unterschiede ließen sich auf unterschiedliche Konfigurationen während dieses Prozesses erklären. Der Feuchtigkeitsgehalt der Ausgangsverbindungen spielte dabei keine Rolle. Der Verlust an ZEA war bei 120 °C größer als bei 160 °C. Die Behandlung von DON, NIV und 3-AcDON mit wässrigen Natriumbisulfit-Lösungen führte während des Extrudierprozesses zur Bildung von Sulfatsalzen. Diese waren unter sauren Bedingungen stabil. ACCERBI ET AL. (1999) untersuchten den Einfluss prozessbestimmender Parameter wie Feuchtigkeit, Temperatur und Natriumbisulfitzugabe auf den Gehalt an DON. Dafür wurde dotiertes Maismehl (5 mg/kg

DON) verwendet. Bei allen untersuchten Parametern konnte eine Verringerung des DON-Gehaltes erzielt werden.

4.9.8 Herstellung von Bier, Mälzen und Brauen

Die Veränderung von Trichothecenen in den einzelnen Prozessschritten der Bierherstellung wurden von HAZEL UND PATEL (2004), wie in Tab. 10 dargestellt, zusammengefasst.

Tab. 10: Veränderung von Trichothecenen in den einzelnen Prozessschritten der Bierherstellung (HAZEL UND PATEL (2004))

Prozess	Effekt auf die Trichothecene	Ursache
Malzbereitung		
- Weichen	Verringert DON Gehalt	Entfernen von wasserlöslichen Toxinen
- Keimen	Erhöht DON Gehalt	Erlaubt Pilzwachstum und Toxinbildung
- Darren	Keine Effekte	
Schroten der Malze	Vervierfachung der DON Konzentration	Enzymatische Spaltung von DON-Proteinkonjugaten
Gärung	Gegenwart von Trichothecenen kann die Funktion der Pilzstämmen für die Bierherstellung beeinträchtigen. Innerhalb der ersten 20 Stunden steigt DON Gehalt, gefolgt von DON Verlusten	Anstieg kann durch Metabolisierung von DON Vorläufern zu DON begründet sein
Gesamter Brauprozess	DON ist stabil Stark schäumende Biere besitzen höhere DON Konzentrationen	

SCOTT (1996) zeigte, dass DON in Bierwürze über den Gärungsprozess hinweg mit unterschiedlichen *Saccharomyces cerevisiae*-Stämmen stabil war, während ZEA zu 69 % zu β -ZOL und zu 8 % α -ZOL biotransformierte. OKOYE (1987) zeigte, dass ZEA aus natürlich kontaminiertem Mais während der Bierherstellung ein 50 %iges Carry-Over in das fertige Produkt aufwies.

4.10 Analytik von Typ A und Typ B Trichothecenen

Detaillierte Zusammenfassungen über Extraktionsverfahren, Aufreinigungsschritte, chromatographische Trenn- und Detektionstechniken (TLC-, HPTLC-, HPLC- und GC-Methoden) für die Analytik von Typ A und Typ B Trichothecenen wurden von SCOTT ET AL. (1993), LANGSETH ET AL. (1998), KRŠKA ET AL. (2001) und KOCH (2004) beschrieben. Unterschiedliche immunochemische Methoden, hauptsächlich „enzyme linked immunosorbent assay“ (ELISA), wurden von MORGAN (1989), CANDLISH (1991), DIETRICH ET AL. (1995), PARK UND CHU (1996) und SCHNEIDER ET AL. (2004) beschrieben.

4.10.1 Extraktion

Die Extraktion der Trichothecene aus der Lebensmittelmatrix erfolgt wie bei allen Mykotoxinen meist durch Flüssigextraktion. Die effektivsten Lösungsmittel zur Extraktion der polaren Trichothecene sind polare Lösungsmittel wie Methanol, Aceton, Acetonitril, Ethylacetat und Chloroform. Auch die Anwendung von Polyethylenglykol (PEG) in Wasser als Extraktionsmittel ist beschrieben. Moderne Analysenverfahren nutzen häufig Lösungsmittelgemische der genannten Lösungsmittel in Verbindung mit Wasser wie Acetonitril/Wasser (84/16, V/V). Dabei dient das Wasser zur Benetzung und Quellung der Lebensmittelmatrix, damit eine erhöhte Extraktionseffizienz des Lösungsmittelgemisches in dem hydrophilen Anteil der Matrix erzielt werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass bei Verwendung von Aceto-

nitril/Wasser-Mischungen sauberere Extrakte als bei Methanol/Wasser entstanden. TRENHOLM ET AL. (1985) untersuchten verschiedene Extraktionsverfahren für DON und kamen dabei zu dem Ergebnis, dass eine längere Extraktionszeit für natürlich kontaminierte Matrices als für gespikete Matrices notwendig war. Eine allgemeine Vorgehensweise für die Extraktion von Trichothecenen aus Lebensmitteln und Futtermitteln wurde unter Berücksichtigung der genannten Extraktionsmittel von TAKEDA ET AL. (1979) zusammengefasst. Dabei wurden koextrahierte Lipide mittels n-Hexan oder Isooctan entfernt. In vielen Fällen wurden Trichothecene mittels Chloroform aus dem Erstextrakt reextrahiert. Nach einem anschließenden Waschschrift mit Wasser konnten die Trichothecene einer weiteren Aufreinigung zugeführt werden.

Häufig werden mechanisch-turbulente Schüttelvorgänge oder Ultraturax-Geräte zur Extraktion von Trichothecenen eingesetzt. JOSEPHS ET AL. (1998) untersuchten die Anwendbarkeit und Optimierungsmöglichkeiten der Extraktion mit überkritischen Flüssigkeiten (SCF = supercritical fluid extraction) von DON und weiteren Typ B Trichothecenen mittels dotierten und natürlich kontaminierten Weizenmehlproben. Dabei wurden Wiederfindungen von $90,1 \pm 10,7$ % für dotierte Weizenproben und $53,0 \pm 3,2$ % für natürlich kontaminierte Weizenproben erzielt. KALINOSKI ET AL. 1986 beschrieben ebenfalls eine Extraktion mittels SFE mit überkritischen CO_2 . In dieser Methode wurde die SCF-Extraktionszelle online mit einem EI-Cl Triple Quadrupol Massenspektrometer verbunden. HUOPALAHTI ET AL. (1997) nutzten ebenfalls diese Technik zur Extraktion von DON, DAS und T-2 Toxin aus Futtermittel (Mais und Hafer). Für diese Extraktion wurden 30 mL überkritisches CO_2 (5 % MeOH) bei einer Extraktionstemperatur von 60 °C und einem Druck von 550 atm verwendet. Die durchgeführten Wiederfindungsuntersuchungen mit 250, 500 und 1500 µg/kg je Toxin in Mais- und Haferproben zeigten für DON eine maximale Wiederfindung von 95 % und für DAS und T-2 Toxin von 85 %. MATEO ET AL. (2001) stellten unterschiedliche Extraktionsverfahren für die Analytik von DON, NIV, 3-AcDON und 15-AcDON in Getreideprodukten gegenüber. Dabei wurden fünf Extraktionsmittel (Methanol/Wasser 50/50 und 70/30; V/V), Acetonitril/Wasser (84/16 und 75/25; V/V) und Ethylacetat/Acetonitril/Wasser (77/19/4; V/V/V), zwei SPE-Kartuschen (Kieselgel und Florisil[®]) und MycoSep 225 verwendet. Diese Untersuchungen ergaben, dass das Lösungsmittelgemisch Acetonitril/Wasser (84/16, V/V) in Kombination mit MycoSep[®] 225-Kartuschen die effektivsten Wiederfindungen bei geringem Anteil an koextrahierten Matrixbestandteilen aufwiesen.

4.10.2 Aufreinigung

Bereits 1968 setzte UENO (1980) Aktivkohlefilter ein, um Extrakte von Fusarienkulturen zu reinigen. ROMER ET AL. (1981) entwickelten eine spezifische Kartusche mit einer Aktivkohle/Aluminiumoxid-Mischung für die Aufreinigung von Lebensmittel- und Futtermittlextrakten für die Analytik von DON. Als Extraktionsmittel-Gemisch wurde Acetonitril/Wasser (84/16; V/V) verwendet. Für die Analytik weiterer Trichothecene (NIV, FusX, T-2 Toxin, HT-2 Toxin, NEO und DAS) erfolgte eine Weiterentwicklung dieser Kartuschen. ROMER (1986) verdoppelte den Anteil der Aktivkohle/Aluminiumoxid-Mischung und konnten somit für diese Trichothecene Wiederfindungen im Bereich von 90 - 99 % erzielen. CHANG ET AL. (1984) modifizierten die Romer-Methode zur Bestimmung von DON. Die Extraktion erfolgte ebenfalls mit Acetonitril/Wasser (84/16; V/V). Die Nachweisgrenze (S/N = 2/1) betrug 30 µg/kg. Die Ergebnisse dieser Methode wurden mit der GC-Methode von SCOTT (1982) verglichen und resultierten in einem Korrelationskoeffizient von 0,992. FERNANDEZ ET AL. (1994) nutzten ebenfalls das Acetonitril/Wasser- (84/16; V/V) Extraktionsgemisch mit nachgeschalteter Aufreinigung über eine weitere Aktivkohle/Aluminiumoxid/Celite-Mischung (7 g + 5 g + 3 g) zur Extraktion und Aufreinigung für eine anschließende HPTLC.

TRUCKSESS ET AL. (1984) entwickelten eine dünnschichtchromatographische Methode zur Bestimmung von DON in Getreide. Hierbei wurde der Extrakt ebenfalls über eine Säule mit einer Mischung aus Aluminiumoxid, Aktivkohle und Celite (0,5g + 0,7g + 0,3 g) gereinigt.

LANGSETH UND CLASEN (1992), KRŠKA ET AL. (2001) und KOCH (2004) verweisen darauf, dass die bisher veröffentlichten Methoden keine vollständige Erfassung der Typ A und B Trichothecene auf Grund der unterschiedlichen Polarität von dem polarsten NIV bis zum unpolaren T-2 Toxin ermöglichen. Dies führt zu unterschiedlichen Wiederfindungsergebnissen bei den genannten Trichothecen-Gruppen. Für die Aufreinigung der Extrakte werden Aktivkohle-Aluminiumoxid-Kartuschen, Mycosep[®]-, Kieselgel-, Florisil[®]-Säulen und Kombinationen von unterschiedlichen Füllungsmaterial herangezogen. Die Mycosep[®]-Kartuschen bestehen aus unterschiedlichen Adsorbentien mit Aktivkohle, Celite[®] und Ionenaustauschern. In den vergangenen Jahren kam die Immunoaffinitätschromatographie Säule (IAC) für die Trichothecene Analytik vermehrt zum Einsatz (CAHILL ET AL. (1999); KOTAL UND RADOVA (2002); PASCALE ET AL. (2003)). Der Prozess der Isolierung und Konzentrierung von Mykotoxinen wurde durch die Einführung der IAC-Säulen effizienter. CAHILL ET AL. (1999) belegten für die DON IAC-Säulen eine Selektivität von > 80 % und für 15-AcDON im Bereich von 40 - 50 %. Die in dieser Publikation untersuchten Antikörper wiesen keine Bindungsspezifität gegenüber 3-AcDON; NIV, T-2 Toxin und FusX auf. KOTAL UND RADOVA (2002) setzten die IAC-Technik zur Bestimmung von DON in Mais, Reis und Weizen ein. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 221 nm mittels UV-Detektor. Die Nachweisgrenze dieser Methode wurde zu 20 µg/kg berechnet.

Eine Alternative zu dem Immunoaffinitätssystem liegt in der Verwendung von sogenannten Molecular Imprinted Polymers (MIP). Bei diesen MIP's handelt es sich um chemisch synthetisierte Polymere mit einer hohen chemischen Stabilität. Bei der Herstellung der MIP's liegt das Zielmolekül (z. B. Mykotoxin) als „print molecule“ in Gegenwart der polymerisierbaren funktionellen Monomeren vor. Zuerst bilden die funktionellen Gruppen der Monomere eine Bindung zu dem entsprechenden Toxin aus. Der dabei entstandene Komplex wird daraufhin über eine Vernetzungsreaktion zu einem formbeständigen Polymer copolymerisiert. Diese Technik verwendeten WEISS ET AL. (2003) für die Herstellung von DON- und ZEA-MIP's. Über die Routineeinsetzbarkeit dieser Materialien liegen bisher keine fundierten Ergebnisse vor.

4.10.3 Gaschromatographische Methoden

Gaschromatographische Methoden sind in der Trichothecen-Analytik weit verbreitet. Da Trichothecene keine genügende Flüchtigkeit aufweisen, müssen sie durch Derivatisierungen in geeignete Verbindungen überführt werden. Die dafür notwendige Derivatisierung stellt dabei den kritischsten Schritt im Verlauf dieser Analytik dar (STEINMEYER ET AL. (1985); TIEBACH ET AL. (1985); GILBERT ET AL. (1985); SCOTT ET AL. (1993)).

Die Auswahl der Derivatisierungsreagenzien für die Analytik der Trichothecene reicht von Trimethylsilyl- (TMS) über Pentafluoropropinyl-, Heptafluorobutyryl-(HFBI) bis hin zu Trifluoroacetyl- und Coumaryl-Derivaten. Am häufigsten wurde die Silylierungsreaktion zur Bildung von TMS-Ethern an allen Hydroxylgruppen verwendet. Nach der Bildung der TMS-Derivate sind diese über einen langen Zeitraum stabil (KAMIMURA ET AL. (1981)). Die derivatisierten Trichothecene werden mittels Elektroneneinfangdetektor (ECD), Flammenionisationsdetektor (FID), Massenspektrometer (MS) oder Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) detektiert. KURODA ET AL. (1979) zeigten, dass der ECD empfindlicher gegenüber dem FID bei den Typ A und Typ B Trichothecen-TMS-Derivaten war. Für eine empfindliche EC-Detektion der Typ B Trichothecene ist die konjugierte Keto-Gruppe (C₈-Position) dieser Gruppe verantwortlich.

Die Bestimmung von TMS-Derivaten der Trichothecene nach einer Kapillar-Gaschromatographie mittels Massenspektrometrie stellt die am häufigsten verwendete Technik dar. Die Selektivität der Massenspektrometrie ermöglicht die Identifizierung der Trichothecene in Getreide, biologischen Flüssigkeiten und weiteren Matrices. Dabei wird die Elektronenstoßionisierung (EI) im Single oder Multiple Ion Monitoring eingesetzt (BLAAS ET AL. (1984); SYLVIA ET AL. (1986); YOSHIZAWA (1986); TIEBACH UND BLAAS (1988)). Der positive und negative chemische Ionisierungsmodus (CI) wurde ebenfalls in der Analytik von Trichothecen-TMS Derivaten eingesetzt (MIROCHA ET AL. (1986); TIEBACH ET AL. (1985)), wobei durch diesen Ionisierungsmodus eine höhere Spezifität und Nachweisempfindlichkeit gegenüber der EI erzielt werden konnte. Der Vorteil der GC-Technik in der Analytik von Trichothecenen liegt in einer simultanen Detektion mehrerer Trichothecene bei gleichzeitig geringen Nachweisgrenzen (WEINGÄRTNER ET AL. (1997)). Es wurde eine Vielzahl von Methoden veröffentlicht, welche eine Multi-Trichothecen-Analytik beschreiben. FURLONG UND SOARES (1995) trennten sieben Trichothecene (T-2 Toxin, HT-2 Toxin, T-2 Tetraol, T-2 Triol, DON, NIV und DAS) an einer Kapillarsäule mit anschließender Flammenionisationsdetektion der HFB-Derivate. Die Nachweisgrenzen reichten von 0,1 - 0,5 µg/g. Nachteile der GC-MS-Multimethoden lagen in der ungenügenden Reproduzierbarkeit und Wiederholbarkeit (PETTERSSON (1998)). Eine Übersicht über gaschromatographische Methoden ist in Tab. A-3 (Anhang, Abschnitt I) zusammengefasst.

4.10.4 Flüssigkeitschromatographische Methoden

Im Vergleich zu den Typ B Trichothecenen sind Typ A Trichothecene aufgrund der geringeren Anzahl freier Hydroxylgruppen und des Fehlens der Keton-Gruppe an dem C₈ Atom im Allgemeinen weniger polar. Aufgrund dieser Tatsache werden für diese Trichothecen-Gruppen verschiedene Methoden entwickelt. Die Technik der HPLC kombiniert mit UV- bzw. Dioden-Array-Detektoren (DAD) wurde in vielen Veröffentlichungen für die Analytik von Typ B Trichothecenen beschrieben (LAUREN UND GREENHALGH (1987); TRUCKSESS ET AL. (1996); CAHILL ET AL. (1999); KOTAL UND RADOVA (2002)).

LANIN UND NIKITIN (1991) untersuchten den Einfluss unterschiedlicher Eluenten zur Trennung der Typ B Trichothecene DON, NIV, 3-AcDON und 15-AcDON und 7-desoxyDON an einer Umkehrphasen-HPLC-Säule. Unter isokratischen Bedingungen resultierte die effektivste Trennleistung bei einem Elutionsgemisch Wasser/Tetrahydrofuran (76/24; V/V). Elutionen mit Acetonitril ergaben danach bessere Trennungen als Methanol, aber beide Lösungsmittel zeigten ungenügende Trennleistungen zwischen DON und 7-desoxyDON bzw. 3-AcDON und 15-AcDON. Die Trennung wurde häufig an Umkehrphasenmaterial (RP-C₁₈) durchgeführt. Dabei ist der Einsatz von Acetonitril (UV cut-off = 190 nm) im Vergleich zu Methanol (UV cut-off = 210 nm) in wässrigen Lösungen, aufgrund des geringeren cut off-Wertes für Acetonitril und einer höheren Transmission bei der Quantifizierungswellenlänge von 218 nm zu bevorzugen. Matrixbedingte Interferenzen sind bei einer Detektionswellenlänge von 218 nm oft zu beobachten und erfordern eine aufwendigere Probenvorbereitung. Wegen der sehr geringen UV-Absorption der Typ A Trichothecene, wurde die UV-Detektion nur für Typ B Trichothecene eingesetzt. Die Umkehrphasen-Flüssigkeitschromatographie wurde auch mit weiteren Detektionsmethoden gekoppelt, wie elektrochemischer Detektion und Fluoreszenzdetektion in Verbindung mit einer Nachsäulenderivatisierung.

CAHILL ET AL. (1999) nutzten zur Probenaufreinigung IAC-Säulen und detektierten DON mittels eines UV-Detektors. Dabei wurde eine Nachweisgrenze von 100 µg/kg erzielt. Bei einem Vergleich mit einer GC-ECD-Methode anhand von 28 natürlich kontaminierten Proben wurde ein Bestimmtheitsmaß von 0,982 erreicht. Der lineare Bereich dieser Methode wurde zu 100 bis 10.000 µg/kg bestimmt. TRUCKSESS ET AL. (1996) nutzten Aktivkohle/Aluminiumoxid/Celite-Kartuschen zur Probenaufreinigung mit nachfolgender Detektion bei einer Wellenlänge von 220 nm. Mit dieser Methode wurde eine Nachweisgrenze von < 500 µg/kg erzielt.

WALKER UND MEIER (1998) verwendeten einen DAD-Detektor zur Bestimmung von NIV, DON, 3-AcDON und 15-AcDON. OMURTAG UND YAZICIOGLU (2001) entwickelten eine Methode zur Bestimmung von T-2 Toxin in unterschiedlichen Getreideprodukten. Die Detektion von T-2 Toxin erfolgte bei einer Wellenlänge von 208 nm mit einer Nachweisgrenze von 25 ng pro Injektion. Zur Bestätigung positiver Befunde wurden die Ergebnisse mittels TLC abgesichert.

Für Typ A Trichothecene wurden ebenfalls Derivatisierungsreaktionen mit anschließender flüssigkeitschromatographischer Trennung und Fluoreszenzdetektion entwickelt. So beschrieben JIMENEZ ET AL. (2000) eine Derivatisierungsmethode zur Bestimmung von T-2 Toxin, HT-2 Toxin, NEO und DAS mit Coumarin-3-carbonylchlorid und folgender Fluoreszenzdetektion. Die Nachweisgrenzen dieser Methode lagen bei einem „Signal zu Rausch“-Verhältnis von „3 zu 1“ bei 10 ng/g für T-2 Toxin und für die anderen Typ A Toxine bei 15 ng/g. Die Linearität dieser Methode konnte für diese vier Trichothecene im Bereich von 10 – 2.000 ng bestimmt werden. DALL’ASTA ET AL. (2004) veröffentlichten ebenfalls eine Derivatisierung mittels Coumarin-3-carbonylchlorid von Typ A (T-2 Toxin, HT-2 Toxin und DAS) und B Trichothecenen (DON, NIV, FusX, 3-AcDON und 15-AcDON). Die Nachweisgrenzen (S/N = 3/1) lagen dabei in einem Bereich von 0,2 bis 1 ng/g. Die Bestimmung von T-2 Toxin über eine Derivatisierung mit 1-Anthroylnitril beschrieben PASCALE ET AL. (2003) mit anschließender Fluoreszenzdetektion (Anregungswellenlänge 381 nm, Emissionswellenlänge 470 nm). Die Extrakte wurden mittels T-2 Toxin IAC-Säule aufgereinigt bevor die Vorsäulen-Derivatisierung durchgeführt wurde. Die Nachweisgrenze dieser Methode wurde zu 0,005 µg/g bei einem „Signal zu Rausch“-Verhältnis von „3 zu 1“ ermittelt.

Ebenfalls wurden elektrochemische Detektoren zur Bestimmung von DON eingesetzt. SYLVIA ET AL. (1986) stellten eine zwölfmal höhere Empfindlichkeit im Vergleich zur UV-Detektion fest. Diese Methode konnte für T-2 Toxin nicht eingesetzt werden.

4.10.5 Massenspektrometrische Methoden

Eine Übersicht über eine generelle Anwendbarkeit der Massenspektrometrie beschrieben MIROCHA ET AL. (1986). Eine EI-Massenspektren-Bibliothek von Mykotoxinen, u.a. auch von Trichothecenen, wurden von DUSOLD ET AL. (1978) zusammengestellt.

Seitdem robuste und vor allem reproduzierbar arbeitende LC-MS-Systeme (HOFFMAN (2001) und NIESSEN UND STROOBANT (1999)) für die Kontaminanten- und Rückstandsanalytik zur Verfügung stehen, wird diese Technik auch für die Bestimmung von Trichothecenen eingesetzt. Eine tabellarische Zusammenfassung über LC-MS- bzw. LC-MS/MS-Methoden ist in Tab. A-4 (Anhang, Abschnitt I) aufgeführt.

MIROCHA ET AL. (1976) nutzten Trimethylsilyl-Ether-Derivate in der EI-GC/MS für die Trichothecenen-Analytik in Futtermitteln. Dabei wurde deutlich, dass eine starke Fragmentierung der Trichothecene durch die eingesetzten EI-Ionisierungsbedingungen entstand. Die daraus resultierenden Massenspektren zeigten eine Vielzahl von nicht zu charakterisierenden Fragmenten, während Molekülionen nur selten beobachtet wurden. Begründet wird die starke Fragmentierung dieser Verbindungen durch die funktionellen Gruppen wie Alkohole, Ketone, cyclische Ether und makrozyklische Ester, die eine Vielzahl von erdenklichen Fragmentierungswegen ermöglichen. Weitere Arbeitsgruppen nutzten sowohl die negativen als auch positiven CI-Ionisierungstechniken, wobei die Molekülionen bzw. Quasimolekülionen mit geringer Fragmentierung (BRUMLEY ET AL. (1985), KRISHNAMURTHY UND SARVER (1987), MILES UND GURPRASAD (1985), KOSTIAINEN (1988), ROACH ET AL. (1989) und BURROWS (1994)) gebildet wurden.

BRUMLEY ET AL. (1982) führten mittels Hydroxid-Ionen in der NCI-Massenspektrometrie Fragmentierungsstudien an Typ A und Typ B Trichothecenen durch und gelangten zu definierten und reproduzierbaren Fragmentierungsmustern. Ausgehend vom $[M-H]$ wurde am Beispiel von NIV gezeigt, dass in der Gruppe der Typ B Trichothecene ein grundlegendes Fragmentierungsmuster auf den Verlust von $[M-H -H_2O]$, $[M-H-CH_2O]$, $[M-H -H_2O -CH_2O]$, $[M-H -2H_2O -CH_2O]$ und $[M-H -H_2O -CH_2O-58]$ zurückzuführen war.

KOSTIAINEN (1988) untersuchte die chemische Ionisation mit positiver Polarität von zehn Trichothecenen unter Verwendung von Ammoniak und deuteriertem Ammoniak (N^2H_3) als Reaktantgas. Alle untersuchten Trichothecene zeigten in Ammonium-PCI-Massenspektren den Basispeak $[M+NH_4]^+$ des Quasimoleküliions. Weiterhin wurden unterschiedliche relative Intensitäten der $[M+H]^+$ Ionen bestimmt. Die Ammoniak-CI-Spektren der Trichothecene zeigten Massenverluste von m/z 18 ($=H_2O$); m/z 30 ($=CH_2O$), m/z 42 ($=CH_2CO$), m/z 60 ($=CH_3COOH$) und m/z 102 ($=(CH_3)_2CHCH_2COOH$). Die N^2H_3 CI-Spektren der Trichothecene zeigten Massenverluste von m/z 19 ($=H^2HO$); m/z 20 ($=^2H_2O$), m/z 60 ($=CH_3COOH$), m/z 61 ($=CH_3COO^2H$), m/z 101 ($=[(CH_3)_2CHCH_2COOH]^+$), m/z 102 ($=(CH_3)_2CHCH_2COOH$) und m/z 103 ($=(CH_3)_2CHCH_2COO^2H$).

Für die Bestimmung von Typ A Trichothecenen in Haferproben untersuchten RAZZAZI-FAZELI ET AL. (2002) die Anwendbarkeit der LC-APCI-MS im positiven Ionisierungsmodus. Dabei konnten für T-2 Toxin, HT-2 Toxin, Acetyl T-2 Toxin, DAS, MAS und NEO Nachweisgrenzen im Bereich von 50 bis 85 $\mu\text{g}/\text{kg}$ erzielt werden.

NIELSEN UND SMEDSGAARD (2003) entwickelten eine Screening LC-UV-MS Methode zur Bestimmung von sekundären Metaboliten aus Schimmelpilzen. Für die Fragmentierungsuntersuchungen wurde ein Micromass LCT-TOF Massenspektrometer mit einer Z-Spray ESI-Quelle verwendet. Das System operierte im positiven Ionisierungs-Modus. Zur Bestimmung der akkuraten Masse von Addukt- und Fragment-Ionen wurde ein hochauflösender orthogonal-Time of Flight Massenspektrometer (TOF-MS) eingesetzt.

HUOPALAHTI ET AL. (1997) beschrieben eine Extraktionsmethode für DON, DAS und T-2 Toxin mittels SCF (Supercritical Fluid Extraction) aus Futtermitteln (Mais und Hafer) mit anschließender LC-UV bzw. Ionenspray LC-MS Detektion. Die massenspektrometrische Detektion der Ammonium-Addukte erfolgte im Full Scan Modus, Selected Ion Monitoring Modus und Selected Reaction Monitoring (SRM) Modus. Im Full Scan Modus störten koeluiierende (fettlösliche) Matrixbestandteile die Detektion der Toxine. Die Zielanalyten konnten bis zu einer Konzentration von 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ sowohl in dem SIM- als auch im SRM-LC-MS Modus direkt aus dem SFE-Extrakt nachgewiesen werden. Mittels HPLC-UV Detektion konnte DON bis zu einer Konzentration von 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ direkt aus dem Extrakt bestimmt werden.

DALL'ASTA ET AL. (2004) entwickelten eine LC-ESI-MS Methode zur Bestimmung von Typ A und Typ B Trichothecenen. Um eine höhere Empfindlichkeit der Methode zu erreichen, nutzten die Autoren das $[M+Na^+]$ -Kation für die Detektion und setzten für eine reproduzierbare und stabile Ionisation dem Eluenten NaCl zu.

4.11 Analytik von Zearalenon und dessen Derivaten

4.11.1 Extraktion und Aufreinigung

Für die Extraktion von ZEA aus unterschiedlichen Matrices (Getreideprodukte, tierisches Gewebe, Urin, Milch) wurden problemspezifische Extraktionsmittel und -verfahren eingesetzt. Oft wurden Lösungsmittelgemische aus organischen Lösungsmitteln (Acetonitril, Methanol, Ethylacetat, Chloroform und Aceton) mit Wasser oder sauren Puffersystemen verwendet (KRSKA ET AL. (2001)).

Eine vielseitige Methode entwickelten MIROCHA ET AL. (1974) für die Isolierung, Identifizierung und Quantifizierung von ZEA in Mais und Gerste sowohl durch TLC als auch durch GC-MS. Dabei wurden zwei Extraktionen und zwei Aufreinigungsschritte verwendet. Die Extraktion wurde mittels Soxhlet-Apparatur oder mittels diskontinuierlicher Extraktion mit Ethylacetat als Extraktionsmittel durchgeführt. Der Extrakt wurde bis zur Trockene eingeeengt und der Rückstand in Chloroform gelöst. Anschließend folgte eine Flüssig-Flüssig-Verteilung von ZEA in eine alkalische Phase. Bei diesen Bedingungen durfte ZEA nicht zu lange dem alkalischen Milieu ausgesetzt sein, da ansonsten der Lacton-Ring im ZEA-Molekül hydrolysiert und die Öffnung der Ester-Bindung zur Zerstörung von ZEA führt. ZEA wurde daraufhin abermals in Chloroform aufgenommen. Ein oft verwendetes Extraktionsverfahren entwickelte EPPLEY (1968) mit einem Extraktionsgemisch Chloroform/Wasser (1/1; V/V). Die Aufreinigung erfolgte über eine NaSO₄-Kieselgel-NaSO₄-Kartusche mit sequentieller Elution von n-Hexan, Benzol und Benzol/Aceton (95/5; V/V).

LIU ET AL. (1985) extrahierten ZEA mittels Ultraturax aus Mais- und Weizenkörnern mit einem Methanol/Wasser-Gemisch (60/40; V/V). Nach der Entfernung von Methanol aus dem Extrakt wurde die wässrige Phase dreifach mit Ethylacetat extrahiert. Dieses wurde über NaSO₄ getrocknet und anschließend bis zur Trockene eingeeengt.

PALLARONI ET AL. (2002) untersuchten unterschiedliche Extraktionsverfahren auf deren Effektivität, ZEA aus Getreidematrix zu extrahieren. Diese Untersuchungen wurden mit Hilfe von zwei konventionellen Extraktionstechniken (Ultraturax[®] und Schütteln) und drei modernen Extraktionstechniken (Ultraschall, beschleunigte Lösungsmittelextraktion (ASE) und mikrowellenunterstützte Extraktion (MAE) durchgeführt. Für alle Extraktionsverfahren wurde das gleiche Lösungsmittelgemisch verwendet. Die erhaltenen Ergebnisse deuten an, dass die modernen Extraktionstechniken ZEA effizienter aus der Maismatrix extrahieren als die konventionellen Techniken. Vor allem die MAE war den anderen Techniken überlegen. Früher wurde vielfach zur Aufreinigung von ZEA-Extrakten die Flüssig-Flüssig-Extraktion eingesetzt, während heutzutage vermehrt RP-C₁₈-SPE-Kartuschen, MycoSep[®]-Säulen und IAC-Säulen verwendet werden.

LLORENS ET AL. (2002) untersuchten fünf unterschiedliche Extraktionsmittel und diverse Aufreinigungsschritte (C₁₈-SPE-Kartuschen, Kieselgel, Florisil[®], IAC-Säulen) für die Analytik von ZEA in Reis, Mais und Weizen. Ziel dieser Untersuchungen war die Ermittlung der effektivsten Aufreinigung bei gleichzeitig zufriedenstellenden Wiederfindungen. Dabei zeigte sich, dass eine Methanol/1 %ige NaCl-Mischung (80/20 oder 60/40; V/V) die effektivste Extraktion erzielte. Der Einsatz von Florisil[®] zeigte dabei höhere Wiederfindungen als C₁₈ SPE-Kartuschen. Die Verwendung von Kieselgel resultierte in unzureichenden Wiederfindungen. Die IAC-Säulen zeigten einen hohen Aufreinigungsgrad, besaßen aber vergleichsweise eine zu geringe Kapazität. SCHUHMACHER ET AL. (1998) prüften ebenfalls die Effektivität von IAC-Säulen im Vergleich zu herkömmlichen Clean-Up Verfahren. Im Vergleich zu Flüssig-Flüssig-Verteilungen zeichnen sich die IAC-Säulen durch eine einfache Handhabung aus. Die routinemäßige Anwendung der IAC-Säulen im rückstandsanalytischen Spurenbereich konnte in diesen Untersuchungen dargelegt werden.

GÖBEL UND LUSKY (2004) verwendeten zur gleichzeitigen Bestimmung von Aflatoxinen, Ochratoxin und Zearalenon in Getreide eine neue, kombinierte Misch-IAC-Säule mit Aflatoxin-Ochratoxin-Zearalenon-spezifischen Antikörpern. Die Extraktion dieser drei Mykotoxine erfolgte dabei mit Acetonitril/Wasser (60/40; V/V). Die Bestimmungsgrenze dieser Methode lag für ZEA bei 5 µg/kg in einem Wiederfindungsbereich von 86 bis 93 %. Die Mykotoxine wurden vor der Flüssigkeitschromatographischen Trennung mit Trifluoressigsäure derivatisiert und mittels FLD simultan detektiert.

4.11.2 Gaschromatographische Methoden

Es wurden ebenfalls gaschromatographische Methoden in der Literatur beschrieben. Dabei handelt es sich oft um Multitoxin-Methoden, mit denen neben ZEA auch Trichothecene bestimmt wurden. Die gaschromatographische Trennung dieser Dihydroxy-Verbindung benötigt eine Derivatisierung z. B. mittels TMS und eine anschließende Detektion mit Flammenionisierungs-Detektor (FID), Elektroneneinfang-Detektor (ECD) oder Massenspektrometrie.

Gaschromatographische Methoden in der Analytik von Zearalenon und dessen Derivate werden häufig im Zusammenhang mit einer folgenden massenspektrometrischen Detektion beschrieben. SCOTT ET AL. (1978) nutzten neben der HPLC-FLD-Technik die hochauflösende Massenspektrometrie im Single Ion Monitoring (SIM)-Modus zur Bestätigungsanalyse von ZEA in Maisproben. SCHWADORF UND MÜLLER (1992) nutzten die gaschromatographische Trennung von ZEA, α -ZOL und β -ZOL mit anschließender Detektion mittels Ion Trap Massenspektrometer. Nach einer Derivatisierung mit BSTFA konnte jedes Resorcyllsäurelacton-Toxin im Full Scan Modus mit einer Nachweisgrenze von 1 µg/kg detektiert werden. TANAKA ET AL. (2000) entwickelten eine GC-MS-Methode zur simultanen Bestimmung von Trichothecenen und Zearalenon. Der Reaktion zu TMS-Derivaten folgte die Detektion im SIM-Modus. Die Nachweisgrenze für ZEA in dieser Methode wurde zu 5 ng/g bestimmt.

4.11.3 Flüssigkeitschromatographische Methoden

Heutzutage stellt die Flüssigkeitschromatographie in Kombination mit Fluoreszenzdetektion die am meisten herangezogene Technik für die Analytik von Zearalenon dar. Die chromatographische Trennung über Umkehrphasen-Material mit anschließender Fluoreszenz-Detektion wird aufgrund der natürlichen Fluoreszenz des ZEA-Moleküls eingesetzt. Hierbei sind Anregungswellenlängen von 236 nm oder 285 nm und Emissionswellenlängen von 418 nm oder 440 nm gebräuchliche Fluoreszenzdetektoreinstellungen. Eine weitere Methode sieht die Nachsäulenderivatisierung mit Aluminiumchlorid für eine Verstärkung des Fluoreszenzsignals vor (HETMANSKI UND SCUDAMORE (1991)). Mit dieser Technik ist die Detektion im niedrigen Nachweisgrenzenbereich von 2 bis 20 µg/kg möglich. Zusätzlich zu dieser Detektion wurden Methoden mit elektrochemischer, UV- und DAD-Detektion ebenso verwendet. Durch zur Verfügung stehende routinetaugliche LC-MS-Systeme wurde in letzter Zeit vermehrt die Kopplung der HPLC mit der Massenspektrometrie auch für die Bestimmung von Zearalenon herangezogen.

LLORENS ET AL. (2002) setzten nach flüssigkeitschromatographischer Trennung an einer Umkehrphase sowohl die FLD- als auch DAD-Detektionstechnik ein. Generell zeigte sich eine höhere Empfindlichkeit bei der Fluoreszenzdetektion. Bei dieser Detektion zeigte die Kombination aus $\lambda_{\text{ex}}274/\lambda_{\text{em}}440$ nm ein höheres „Signal zu Rausch“-Verhältnis als $\lambda_{\text{ex}}236/\lambda_{\text{em}}420$ nm.

RANFFT ET AL. (1990) analysierten Mischfuttermittel mittels HPLC-FLD. Die Extraktion erfolgte mit Chloroform bei einem niedrigen pH-Wert. Eine weitere Aufreinigung erfolgte über die Gelpermeationschromatographie. Die Nachweisgrenze dieser Methode lag bei 2,5 µg/kg.

Einen Überblick der flüssigkeitschromatographischen Methoden ist in Tab. A-5 (Anhang, Abschnitt I) zusammenfasst. Die aufgelisteten HPLC-Methoden wurden für die Bestimmung von ZEA in Getreide, Lebensmittel und Futtermittel entwickelt und zeigen Nachweisgrenzen im unteren $\mu\text{g}/\text{kg}$ -Bereich (1,5 – 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

4.11.4 Massenspektrometrische Methoden

Als empfindliche und selektive Analysetechnik findet die moderne Tandem-Massenspektrometrie ein breites Anwendungsgebiet in der Analytik von anabol wirksamen makrozyklischen Lactonen. Eine tabellarische Zusammenfassung massenspektrometrischer Methoden zur Detektion von Zearalenon und dessen Metabolite ist nachfolgend (Tab. 11) dargestellt.

Tab. 11: Analytik von Zearalenon und Derivaten mittels LC-MS bzw. LC-MS/MS

Toxin	Matrix	Aufreinigung	Detektion	Literatur
ZEA; α -ZOL; β -ZOL; ZAN; α -ZAL; β -ZAL	Kläranlagen Abwasser	C18-SPE Kartusche	LC-APCI-MS/MS; negative Ionisierung	Lagana et al. (2001)
ZEA	Lebensmittel, Futtermittel	IAC-Säule; C18-SPE Kartusche	LC-APCI-MS positive Ionisierung	Rosenberg et al. (1998)
ZEA; ZAN	Getreide	IAC-Säule; C18-SPE Kartusche	LC-APCI-MS/MS; negative Ionisierung	Zöllner et al. (1999)
α - und β - Trenbolon; Zeranol	Rindermuskel und Leber	OASIS® HLB	LC-ESI-MS positive und negative Ionisierung	Hori und Nakazawa (2000)
ZEA; α -ZOL; β -ZOL; ZAN; α -ZAL; β -ZAL	Schweineurin und -gewebe	C18-SPE Kartusche	LC-APCI-MS/MS; negative Ionisierung	Zöllner et al. (2002)
ZEA; α -ZOL; β -ZOL	Fischgewebe	C18-SPEKartusche	LC-TISP-MS/MS; negative Ionisierung	Lagana et al. (2003)
ZEA; α -ZOL; β -ZOL	Rinderurin	C18-SPE Kartusche	LC-ESI-MS/MS negative Ionisierung	Launay et al. (2004)

4.12 Immunologische Methoden

PATEL ET AL. (2005) erstellten einen Überblick über die zur Zeit kommerziell erhältlichen immunologischen Techniken für Mykotoxine. Demnach sind für DON, T-2 Toxin und ZEA sowohl Immunoaffinitätschromatographie-Säulen (IAC) als auch ELISA-Techniken für Mikrotiterplatten verfügbar. In der Mykotoxinanalytik wurden seit Mitte der siebziger Jahre ELISA-Techniken entwickelt und erfolgreich eingesetzt. Diese werden nicht nur zum Screening, sondern vielmehr zur quantitativen Bestimmung herangezogen. Bei diesem immunologischen Verfahren sind aufwendige Aufreinigungsschritte nicht notwendig. Bei direkt kompetitiven dc-ELISA's wurde als Konjugat meist ein Trichothece, gebunden an Meerrettichperoxidase, als Markerenzym eingesetzt.

Für die Analytik unterschiedlicher Typ A und Typ B Trichothece wurden sowohl monoklonale als auch polyklonale Antikörper entwickelt. So wurden monoklonale Antikörper für ZEA (TESHIMA ET AL. (1990); DIXON ET AL. (1987)), DAS (PAULY ET AL. (1988)), DON (ZHANG ET AL. (1986a); USLEBER ET AL. (1991); NIESSEN ET AL. (1993)), FusX (MÄRTLBAUER ET AL. (1989)) und polyklonale Antikörper für DON (CASALE ET AL. (1988); NICOL ET AL. (1993); SINHA ET AL. (1995)) und T-2 Toxin bzw. DAS (ZHANG ET AL. (1986b)) herangezogen.

YU ET AL. (1999) berichten über den Einsatz von ELISA-Techniken in der Analytik von Heu, Silagen und Futtermitteln. Mit dieser Methode wurde nach Acetylierung des getrockneten Extraktes der „Gesamt-DON“-Gehalt als triacetyl-DON bestimmt. Mit diesem Verfahren kann-

ten neben DON auch 3-AcDON und 15-AcDON über Radioimmunoassay (RIA) und dc-ELISA erfasst werden.

BARNA-VETRO ET AL. (1994) entwickelten dc-ELISA's mit monoklonalen Antikörpern für die Quantifizierung von T-2 Toxin und ZEA in unterschiedlichen Getreideprodukten. Der lineare Messbereich des T-2 Toxin-Tests lag bei 100 bis 2000 ng/g und für ZEA bei 25 bis 400 ng/g.

5 Material und Methoden

5.1 Materialien und Chemikalien

5.1.1 Chemikalien

Falls nicht anders ausgewiesen, werden in den beschriebenen Methoden nur analysenreine Chemikalien (zur Analyse) und destilliertes bzw. bidestilliertes Wasser verwendet.

- Aceton (HPLC grade)
- Acetonitril (hypergrade)
- Ameisensäure (HCOOH; 100 %ig)
- Ammoniumacetat (NH₄CH₃COOH)
- Ammoniumformiat (NH₄COOH)
- Citronensäure-Monohydrat
- Cyclohexan
- Di-Natriumcarbonat (Na₂CO₃)
- Di-Natriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄)
- Essigsäure (CH₃COOH; Eisessig, 99 %ig)
- Ethylacetat
- Kaliumhydroxid (KOH)
- Methanol (gradient grade)
- Natriumchlorid (NaCl)
- Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃)
- Natriumhydroxid (NaOH)
- Salpetersäure (HNO₃; 65 %ig)
- Schwefelsäure (H₂SO₄; 96 %ig)
- 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
- Tween 20 (Sorbitanfettsäure)
- Wasserstoffperoxid (H₂O₂; 30 %ig)

5.1.2 Biochemische Reagenzien und Hilfsmittel

- DON-Antiserum¹
- DON-HRP-Konjugat¹
- ZEA-Antiserum¹
- ZEA-HRP-Konjugat¹
- Anti-Maus-IgG
- β-Glucuronidase/Arylsulfatase
- Casein für biochemische Zwecke
- Immunoaffinitätssäulen: DONtest[®] Fa. VICAM und DONPrep[®] Fa. Biopharm
- ZEAtest[®] Fa. VICAM, ZEAPrep[®] Fa. Biopharm, Red Rabbit T-2 Toxin test[®] Fa. VICAM

5.1.3 Standardsubstanzen

- *d*₄-α- und *d*₄-β-Zearalenol, RIVM, NL
- Zearalenon, Zearalanon, α- und β-Zearalenol und α- und β-Zearalanol, Fa. Sigma Aldrich[®] Typ A und Typ B Trichothecene, Fa. Sigma Aldrich[®]
- *d*₃-T-2 Toxin, Fa. Sigma Aldrich[®]

5.1.4 Hilfsmittel

- Mikrotiterplatten der Fa. Nunc[®]
- Diatomeenerde z. B. Extrelut[®] von VWR[®] oder HM-Isolut[®] von Separtis[®]
- SPE Station, Reservoir (10 mL) und Luer-Hähne
- Aktivkohle für die Lebensmittelanalytik der Fa. VWR[®]

¹ Wurden vom Arbeitskreis Prof. Usleber der Justus-Liebig-Universität Giessen und Prof. Märklbauer der Ludwig-Maximilians-Universität zur Verfügung gestellt.

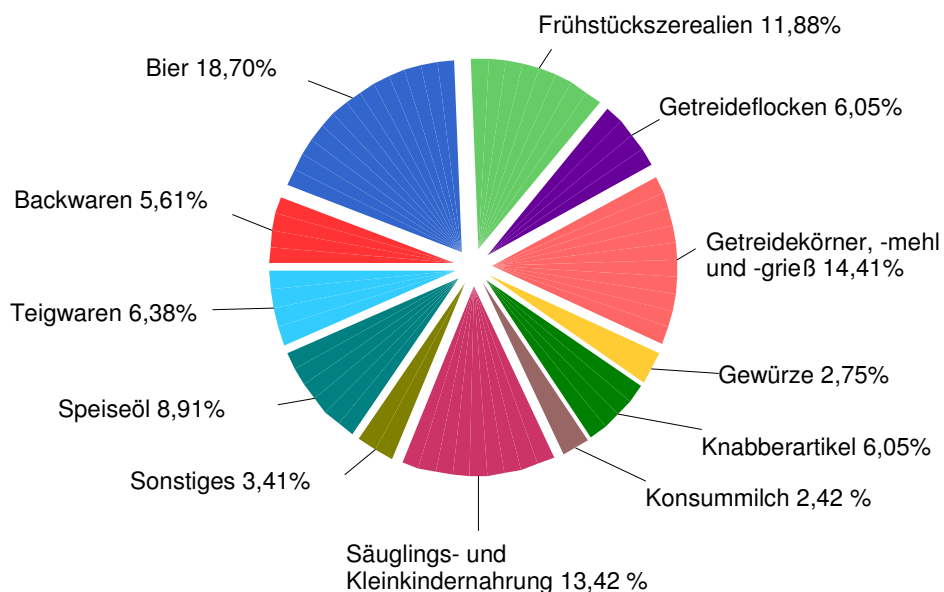
5.1.5 Geräte und Software

- Dynax Mikrotiterplatten-Reader M 500 mit Auswertungssoftware Biolinx 2.1
- Agilent HP 1100 mit Autosampler, quaternärer Pumpe mit Niederdruckgradientmischer, Fluoreszenzdetektor, Dioden-Array-Detektor, Optilab[®] Säulentermostat und Steuerungssoftware HP Chemstation
- Shimadzu HPLC Anlage LC-10 AV mit Autosampler, Zweikolbenpumpe mit Niederdruckgradientenmischer, Säulentermostat, Fluoreszenzdetektor, *dual*-UV/VIS-Detektor und Steuerungssoftware LC-Class[®]
- Applied Biosystems Tandem Massenspektrometer API 2000 und API 4000 mit Steuerungs- und Auswertsoftware Analyst 1.2 und 1.4
- ASE 300 Dionex[®]; beschleunigte Lösemittelextraktionsapparatur
- GILSON ABIMED GPC-Anlage für die Größenausschlusschromatographie wurde mit einer Säule (500 x 25 mm) mit folgendem Packungsinhalt betrieben: BIO-BEADS S-X3
- Siebmaschine Fa. RETSCH[®], mit verschiedenen Siebböden
- Zentrifugalmühle Fa. RETSCH[®], Distanz-Ringsieb mit einer Lochweite von 1.000

5.2 Probenmaterial

Das Untersuchungsmaterial wurde hauptsächlich im Lebensmitteleinzelhandel (Supermärkten, Reformhausläden und Drogeriemärkten) in Berlin und Umgebung im Zeitraum von Oktober 2001 bis März 2004 erworben. Für diesen Zeitraum resultierte ein Probenumfang von insgesamt 938 Proben. Davon stammen 24,7 % der Lebensmittel aus biologisch-ökologischem Anbau und 75,3 % aller Proben waren dem konventionellen Anbau zuzuordnen. In Abb. 7 ist die relative Beprobungsanzahl der Warengruppen dargestellt. Ausgehend von der Grundgesamtheit von 938 Proben wurden 809 auf DON und 722 auf ZEA untersucht.

Abb. 7: Verteilung des Untersuchungsmaterials nach ZEBS-Warengruppen



5.3 Probennahme und Homogenisierung

Um Handelsproben zu untersuchen werden diese je nach Konsistenz für die Analyse vorbereitet, wobei die Bearbeitung jeder Packung separat vorgenommen wurde, um eine Aussage über die einzelne Abpackung treffen zu können. Bei Packungsgrößen unter 100 g erfolgte bei körnigem Gut stets die Zusammenführung mehrerer Proben (mindestens 5 Stück) der Charge oder der angegebenen Haltbarkeitsdaten. Grobkörnige Materialien oder Stückgut wurden mittels Zentrifugalmühle soweit zerkleinert, dass die mittlere Partikelgröße kleiner 1 000 µm lag. Feinpulverige Proben wurden mittels Labormixer (z. B. Grindomix® 2.000) vermengt und somit homogenisiert. Bei Proben mit einem hohen Fettgehalt (Maischips, Flips, Kekse etc.) oder mit hohem Fruchtgehalt (wie Müsli mit Trockenobstzusatz) wurden diese zuvor bei mindestens -18 °C eingefroren und anschließend in einem Labormixer unter Zuhilfenahme von Trockeneis zerkleinert und somit homogenisiert.

Pastöse Säuglings- und Kleinkinderfertigmens wurden in einem Becherglas mittels Ultraturax® bei einer Geschwindigkeit von 20.000 U/min innerhalb von 5 Minuten zerkleinert und homogenisiert. Zusätzlich wurde der Wassergehalt der homogenisierten Laborprobe mittels Feuchtigkeitsanalysator bestimmt, da diese Matrix zu einem großen Anteil aus Wasser besteht und bei Säuglings- und Kleinkindernahrung gemäß EG-Verordnung 856/2005 die Angabe der Höchstgehalte bezogen auf die Trockenmasse erfolgen muss.

5.4 Enzym-Linked-Immunosorbent-Assay – ELISA (Screeningverfahren)

Die ausführlichen Methodenbeschreibungen sind im Anhang unter Abschnitt II dargestellt.

5.4.1 Bestimmung von Zearalenon mittels dc-ELISA

ZEA wird nach der Extraktion durch einen direktkompetitiven ELISA erfasst. Dieser wurde am Lehrstuhl für Milchhygiene der Ludwig-Maximilians-Universität München (MÄRTLBAUER UND DIETRICH (2003a)) und der Justus-Liebig-Universität Giessen (USLEBER ET AL. (2003a)) entwickelt. Der Test beruht auf einer direkten Reaktion eines spezifischen Antikörpers mit ZEA, der durch Immunisierung von Kaninchen mit einem ZEA-Proteinkonjugat erzeugt wurde.

Durchführung

Die Mikrotiterplatten wurden mit gefällttem Antiserum gegen ZEA (100 µL/Kavität) mindestens 3 Stunden inkubiert. Die freien Proteinbindungsstellen der Polystyrolplatten wurden mit 200 µL/Kavität 2 %igem Casein/PBS blockiert (30 Minuten bei Raumtemperatur), anschließend wurden die Platten dreifach mit Puffer gewaschen und durch Ausklopfen getrocknet. Daraufhin wurden nacheinander ZEA Kalibrationsstandards bzw. Probenextraktlösungen (50 µL/Kavität, jeweils in 10 %igem Methanol/ PBS) und einer Lösung, die eine konstante Menge ZEA-Konjugat enthielt (50 µL/Kavität; je nach Konz. 1 : 25 000 in 1 %igem Casein/PBS verdünnt) in die Kavitäten pipettiert. Bei Raumtemperatur betrug die Inkubationszeit 2 Stunden. Nicht gebundenes Toxin bzw. Toxin-Enzymkonjugat wurde nachfolgend durch einen Waschschriff entfernt.

Durch Zugabe von Substratlösung (100 µL/Kavität) erfolgt die Detektion des am Konjugat gebundenen Enzyms. Die resultierende Farbreaktion ist umso intensiver, je mehr Toxin-Enzymkonjugat gebunden wurde und ist somit umgekehrt proportional zur ZEA-Konzentration in der Probe. Nach 15 Minuten wird die Farbreaktion durch Zugabe von 1 molarer Schwefelsäure (100 µL/Kavität) gestoppt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

5.4.2 Bestimmung von Deoxynivalenol mittels dab-ELISA

DON wird nach der Extraktion durch einen Sandwich ELISA erfasst. Dieser wurde am Lehrstuhl für Milchhygiene der Ludwig-Maximilians-Universität München (MÄRTLBAUER UND DIETRICH (2003b)) und der Justus-Liebig-Universität Giessen (USLEBER ET AL. (2003b)) entwickelt. Der Test beruht auf einer direkten Reaktion eines spezifischen Antikörpers gegen DON, der durch Immunisierung von Kaninchen mit einem DON-Proteinkonjugat erzeugt wurde. Die Fixierung der DON-spezifischen Antikörper erfolgt an die zuvor an die Kavitäten der Polystyrol-Mikrotiterplatte gebundenen Anti-Maus-IgG-Antikörper.

Durchführung

Die Mikrotiterplatten wurden mit 100 µL/Kavität Anti-Maus-IgG-Lösung belegt und über Nacht bei ca. 25 - 28 °C inkubiert. Die so vorbereiteten Mikrotiterplatten wurden für die weitere Durchführung durch Ausschlagen getrocknet, mit 200 µL/Kavität 2 %igem Casein/PBS abgesättigt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin erfolgte ein drei- bis viermaliges Waschen der Platte und Ausschlagen. Die einzelnen Kavitäten der Mikrotiterplatten wurden mit gefälltem Antiserum gegen DON (100 µL/Kavität) belegt und mindestens eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Platten dreifach gewaschen und durch Ausklopfen getrocknet. Hiernach wurden nacheinander DON Kalibrationsstandards bzw. Probenextraktlösungen (50 µL/Kavität, jeweils in 10 %igem Methanol/PBS) und eine Lösung, die eine konstante Menge DON Meerrettichperoxidase-Konjugat enthält (50 µL/Kavität), in die Kavität pipettiert. Bei Raumtemperatur betrug die Inkubationszeit zwei Stunden. Nicht gebundenes Toxin bzw. Toxin-Enzymkonjugat wurde durch einen Waschschrift entfernt.

Durch Zugabe von Substratlösung (100 µL/Kavität) erfolgt die Detektion des gebundenen Enzyms. Die resultierende Farbreaktion ist umso intensiver, je mehr Toxin-Enzymkonjugat gebunden wurde und ist somit umgekehrt proportional zur DON-Konzentration in der Probe. Nach 20 - 30 Minuten wird die Farbreaktion durch Zugabe von ein molarer Schwefelsäure (100 µL/Kavität) gestoppt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

5.5 Extraktionsverfahren

5.5.1 Routineextraktionsverfahren für stärke- und faserhaltige Lebensmittel

20 g homogenisierte Labor-Teilprobe werden auf 1 mg genau in ein 250 mL Zentrifugegefäß eingewogen. Es werden 100 mL Extraktionsmittel (für DON: ACN/H₂O, 84/16; V/V und für ZEA: ACN/H₂O, 75/25; V/V) hinzugefügt und fest verschlossen. Das Extraktionsgefäß wird in den Überkopfschüttler eingespannt und für 60 Minuten turbulent geschüttelt. Zur Abtrennung der Schwebstoffe wird die Probe bei 3 500 G (Zentrifugentemperatur = 10 °C) für 20 Minuten zentrifugiert.

5.5.2 Extraktionsverfahren für Säuglings- und Kleinkinder-Fertignahrung

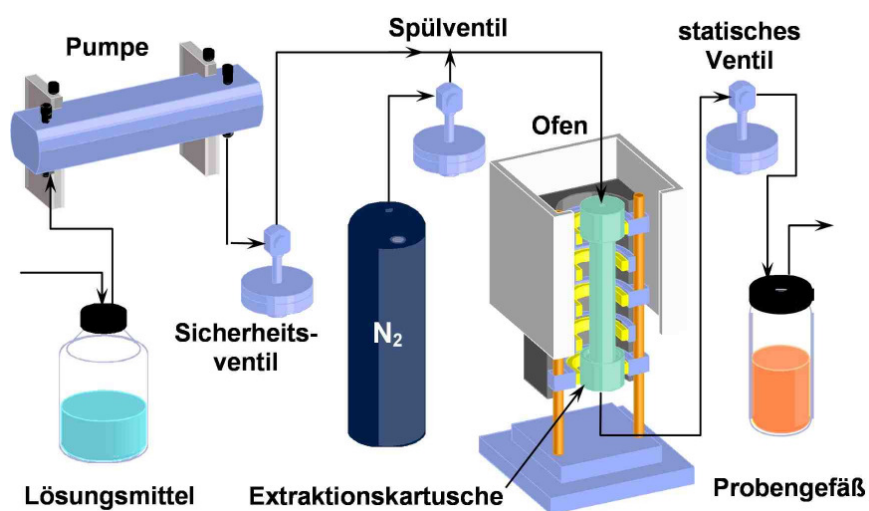
Exakt 25 g der homogenisierten Probe werden in ein 250 mL Zentrifugegefäß eingewogen und anschließend mit 100 mL Methanol versetzt. Daraufhin erfolgt die Extraktion mittels Ultraturax bei 15 000 U/min. für zwei Minuten. Anschließend werden diesem Extrakt 20 g Seesand zugesetzt und für 15 Minuten am Überkopfschüttler geschüttelt. Daraufhin wird diese Mischung quantitativ in einen Metall-Zentrifugenbehälter überführt und bei 3 500 G für 25 Minuten zentrifugiert.

5.6 Kombinierte Extraktion und Aufreinigung mit beschleunigter Lösungsmittelextraktion (ASE)

Prinzip

Die beschleunigte Lösungsmittelextraktion (ASE, engl.: Accelerated Solvent Extraction) setzt flüssige Extraktionsmittel zur Extraktion fester und pastöser Proben ein. Als Extraktionsmittel werden sowohl organische Lösungsmittel wie Acetonitril, Methanol oder Ethylacetat als auch wässrige Extraktionsmittel einschließlich Pufferlösungen eingesetzt. Die Extraktion erfolgt bei Raumtemperatur bis zu Temperaturen von 200 °C. Um die Lösungsmittel oberhalb ihres Siedepunktes als Flüssigkeit anwenden zu können, wird die Extraktion bei Drücken von 0,3–20 MPa durchgeführt. Bei erhöhten Temperaturen wird die Extraktionskinetik stark beschleunigt, die Desorption der Analyten von der Matrix sowie der Lösungsprozess verlaufen wesentlich schneller als bei Raumtemperatur. Üblicherweise wird bei der ASE eine Extraktion in 5–10 Minuten durchgeführt. Weiterhin bewirkt die erhöhte Temperatur eine bessere Löslichkeit der Analyten im Extraktionsmittel. Aus diesem Grund kann bei erhöhten Extraktionstemperaturen der Lösemittelverbrauch deutlich verringert werden. Der Einfluss des Extraktionsdruckes auf die Ausbeuten ist eher gering. Hingegen hat die Extraktionstemperatur über die Diffusionskoeffizienten einen deutlichen Einfluss auf die Kinetik der Extraktion und somit auch auf die Ausbeute.

Abb. 8: Schematischer Aufbau einer ASE-Apparatur (in Anlehnung an Dionex)



5.6.1 Methodenentwicklung einer ASE-Multi-Trichothecen-Methode

Für eine bessere Vergleichbarkeit mit etablierten DON-Methoden (Abschnitt 6.5.1) wurde die ASE-Multi-Trichothecen-Methode für eine Probeneinwaage von 20 g optimiert. Als Extraktionsmittel wurde das für die Trichothecen-Analytik oft zitierte Extraktionsmittelgemisch Acetonitril/Wasser-Gemisch (84/16; V/V) herangezogen. Im unteren Teil der Extraktionszelle wurden die für die Trichothecen-Aufreinigung häufig verwendete Aktivkohle bzw. entsprechende Sorbentien-Mischungen eingebracht. Den Aufbau der ASE-Extraktionszelle mit implementiertem Aktivkohle-Filter veranschaulicht Abb. 9 (nach einem Extraktionsprozess).

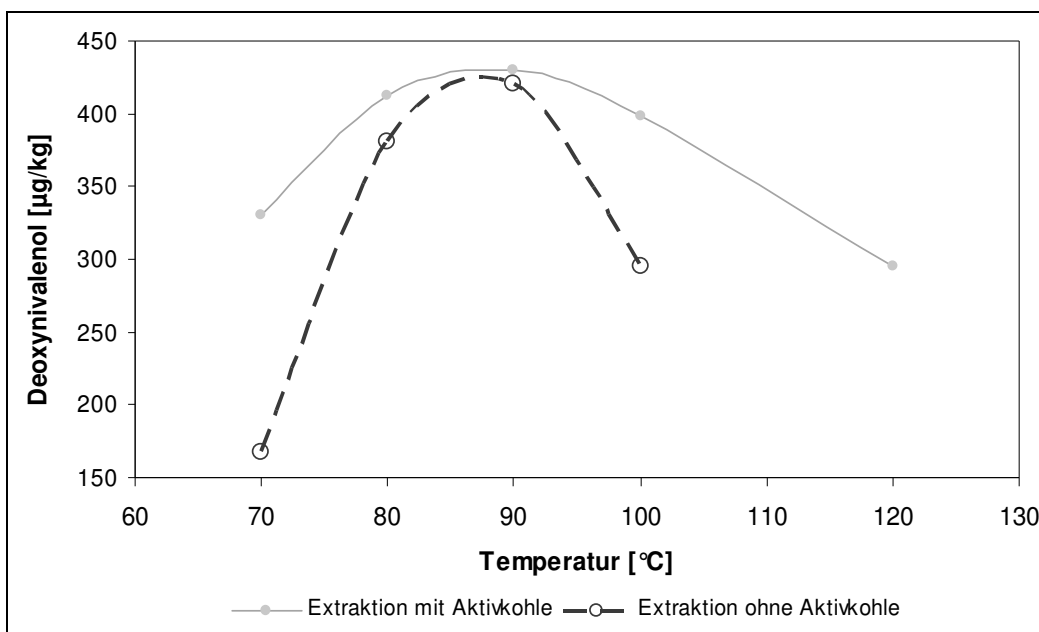
Abb. 9: ASE-Extraktionskartusche mit Aktivkohle und einer Vollkorn-Hartweizen-Probe nach einer Extraktion



Temperatur

Der zentrale Punkt zur Entwicklung dieser ASE-Multi-Trichotheccen-Methode bestand in der Bestimmung der optimalen Extraktionstemperatur. Zum einen galt es, die bestmögliche Extraktionseffizienz des Analyten aus der Matrix in das Lösungsmittel zu ermitteln; zum anderen war die Adsorptionsaktivität der verwendeten Aktivkohle bei entsprechender Extraktionstemperatur gegenüber dem Analyten als auch gegenüber der Matrix ein entscheidender Punkt. Nur bei einer Optimierung dieser beiden Bedingungen konnte diese Methode optimal eingesetzt werden. Die Bestimmung der optimalen Extraktionstemperatur wurde mit dem natürlich kontaminierten Vergleichsmaterial DON 311 durchgeführt. Wie aus Abb. 10 hervorgeht, ist das Extraktionsmaximum sowohl bei der Extraktion mit Aktivkohlefilter (durchgehende Linie) als auch ohne Aktivkohlefilter (gestrichelte Linie) in einem Temperaturbereich zwischen 85 - 90 °C zu finden. Somit wurde für diese Methode eine optimale Extraktionstemperatur von 85 °C ermittelt.

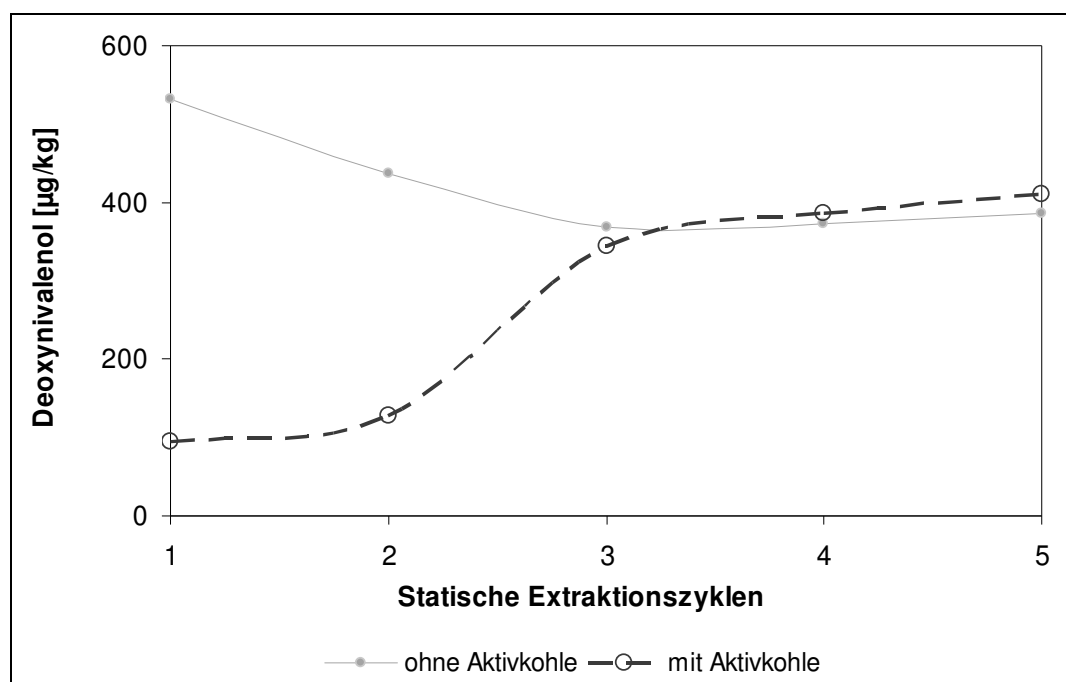
Abb. 10: Optimierung der Extraktionstemperatur unter Verwendung des Vergleichsmaterials DON 311 (n=2)



Statische Extraktionszyklen

Die Zyklen mit statischer Extraktion dienen dazu, während der Extraktion einen Teil des Extraktes durch frisches Lösungsmittel zu ersetzen. Somit haben nacheinander geschaltete statische Extraktionszyklen eine ähnliche Effizienz wie eine kontinuierliche dynamische Extraktion. Gemäß der Theorie der ASE-Extraktion tritt nach jedem statischen Zyklus ein Konzentrationsgradient von der Matrix bzw. vom Aktivkohlefilter zum Extraktionsmittel bis zur Gleichgewichtseinstellung auf. Die Anzahl der programmierten Zyklen (hier 5) werden durch das Spülvolumen (hier 130 % bei verwendeter 100 mL Zelle) dividiert. Nach Ablauf der ersten statischen Extraktionszeit werden entsprechende Anteile an Spülvolumen (hier 26 mL) in die Zelle und der Teil an Extrakt in das Probengefäß gefördert. Durch die programmierte Zyklenzahl vervielfacht sich entsprechend die Extraktionszeit.

Abb. 11: Optimierung der statischen Extraktionszyklenzahl (n=2)

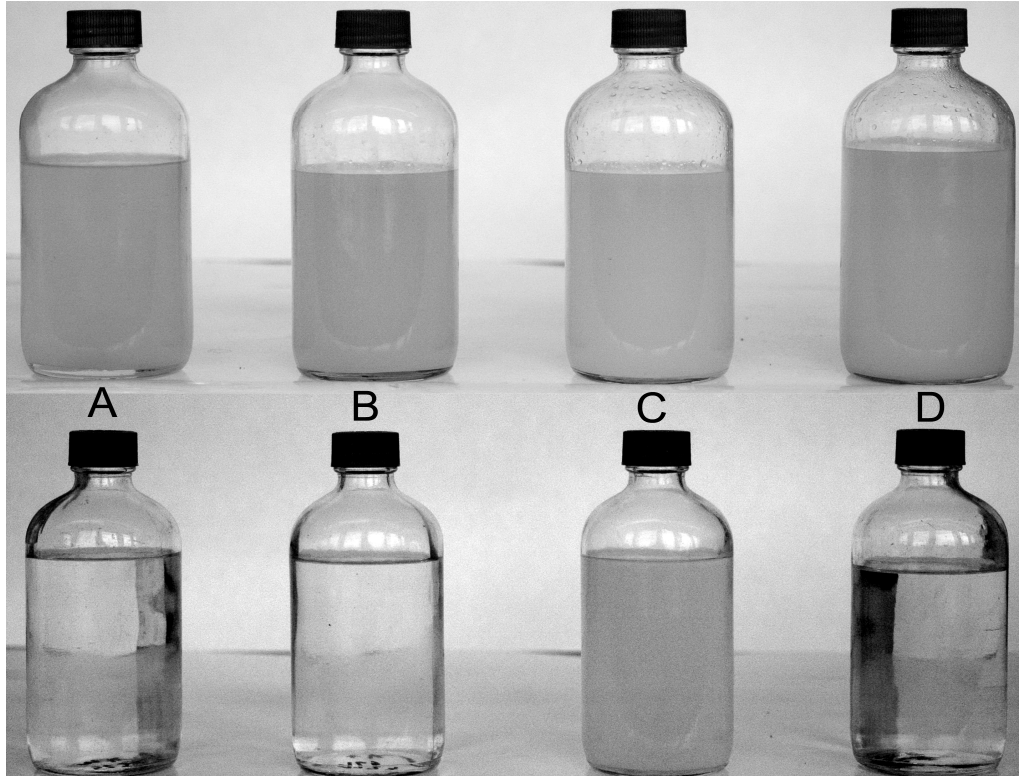


In Vorversuchen zur Bestimmung der Anzahl der statischen Extraktionszyklen wurden unterschiedliche Anzahlen von Zyklen (1 bis 5 Zyklen) untersucht. Bei Untersuchungen ohne Einsatz des Aktivkohlefilters (durchgezogene Funktion) wurden in allen Extrakten ähnliche DON-Konzentrationen, unabhängig von der Zyklenanzahl, ermittelt. Unter Verwendung des Aktivkohlefilters (gestrichelte Funktion) zeigte sich, dass bei den ersten beiden Extraktionszyklen eine um den Faktor vier geringere DON Konzentration bestimmt wurde. Ab vier programmierten Extraktionszyklen trat ein sogenannter Steady-State-Bereich auf. Dies bedeutet, dass bei den Extraktionszyklen vier bis fünf nur noch geringfügige Änderungen beobachtet wurden. Bei fünf Extraktionszyklen wurde die maximale DON-Konzentration nachgewiesen. Die Dauer der gesamten Extraktion bei gleichzeitiger Aktivkohlereinigung beträgt 35 Minuten (5 Zyklen à 5 Minuten Extraktionszeit; 5 Minuten Vorheizzeit und 5 Minuten Heizzeit). Abb. 12 veranschaulicht deutlich den Unterschied zwischen einer herkömmlichen ASE-Extraktion und der ASE-Extraktion mit implementiertem Aktivkohlefilter.

Vergleicht man die über den ASE-Aktivkohlefilter aufgereinigten Extrakte (Abb.12; untere Reihe) mit Extrakten einer herkömmlichen Extraktion (Abb. 12; obere Reihe), so sind diese Extrakte klar und weisen keine Trübungen auf. Bei komplexen Matrices wie Weizenkeimpulver (siehe Abb.12; Extrakt C) wurden leichte Trübungen beobachtet. Eine Erklärung hierfür ist in einem erhöhten Fettanteil der Probe zu finden, da dieser Bestandteil durch eine Extraktionstemperatur von 85 °C effizienter aus der Probe gelöst und auch nicht durch den Aktiv-

kohlefilter gebunden wurde. Die Emulsion wurde nach dem Erkalten des Extraktes gebrochen, und eine Lipidphase war in der Extraktionsflasche erkennbar.

Abb. 12: ASE Probengefäße mit Probenextrakten nach Extraktion ohne Aktivkohleaufreinigung (obere Reihe) und mit Aktivkohleaufreinigung (untere Reihe)



A = Maisgrieß; B = Vollkornweizenmehl; C = Getrocknetes Weizenkeimpulver; D = Vollkorn-Haferflocken

Spülvolumen

Die Ermittlung des Spülvolumens erfolgte anhand zweier Gesichtspunkte. Das angestrebte Gesamtextraktionsvolumen sollte nicht 200 mL überschreiten und nach der eigentlichen Hauptextraktion sollten in zwei anschließenden Extraktionen derselben Zelle keine Spuren von DON mehr nachweisbar sein. Diese Bedingung wurde bei einem Spülvolumen von 130 % (bezogen auf 100 mL Extraktionszelle) erfüllt.

Gasspülzeit

Die Gasspülzeit wurde bei der Methodenentwicklung soweit erhöht, dass nach dem Extraktionsprozess der Aktivkohlefilter keine spürbare Feuchtigkeit mehr aufwies. Dies war bei der eingestellten Extraktionstemperatur von 85 °C nach 180 Sekunden der Fall.

5.6.2 Modifizierung der ASE-Multi-Trichotheccen-Methode

Im Rahmen der Methodenentwicklung wurden weitere Aufreinigungsmaterialien der Aktivkohle beigemischt. Als Grundlage dafür diente der Einsatz von MultiSep®-Säulen. Außer der Aktivkohle enthält dieses Kartuschensystem Aluminiumoxid und Celite. Neben der Multi-Sep®-Säulen-Mischung wurden die in nachstehender Tab. 12 aufgeführten Mischungen, bestehend aus Aktivkohle, neutralem Aluminiumoxid und Celite, selbst hergestellt.

Tab. 12: Modifizierung der ASE-Multi-Trichothecen-Methode mit unterschiedlichen Aktivkohle-, Aluminiumoxid- und Celite-Mischungen

	Mischung 1	Mischung 2	Mischung 3	Mischung 4
Aktivkohle	7 Teile	7 Teile	8 Teile	1 Teile
Al ₂ O ₃	5 Teile	3 Teile	4 Teile	1 Teile
Celite	3 Teile	5 Teile	4 Teile	1 Teile

Zur Untersuchung der Extraktions- und Aufreinigungseffizienz wurde das Vergleichsmaterial DON 311 verwendet. Die Mischungen 1 bis 4 und die MultiSep[®]-Säulen-Mischung wurden wie bereits für Aktivkohle beschrieben eingesetzt. Jeweils 5 g dieser Mischungen wurden als Filter in die Extraktionszelle eingesetzt und 20 g Probenmaterial vermengt mit 8 g Diatomeenerde in die Extraktionskartusche befüllt. Die Extraktion erfolgte wie in Tab. 12 beschrieben.

Die erhaltenen Extrakte wiesen deutliche Trübungen und Farbpigmentierungen auf und konnten nur nach einer weiteren Aufreinigung über IAC-Säulen der flüssigkeitschromatographischen Trennung zugeführt werden. Somit waren die Mischungen eins bis vier und die für einen direkten Einsatz in der beschriebenen Methode nicht geeignet.

5.6.3 Chemische Modifikation der Aktivkohle

Unter Aktivkohle versteht man Kohlenstoffstrukturen aus kleinsten Graphit-Kristallen und amorphem Kohlenstoff mit mikroporöser Struktur und einer inneren Oberfläche zwischen 500 und 1.500 m²/g. Aktivkohle ist ein stark hydrophobes Material, bestehend aus planaren Schichten aus Kohlenstoffatomen mit hexagonaler Struktur (FALBE UND REGITZ (1990)).

Weiterhin wird angenommen, dass innerhalb der Aktivkohle Oberflächenstrukturen unterschiedlicher Carbonyl-Funktionen vorhanden sind (YANG (2003)). Im wässrigen Milieu besitzen diese saure Eigenschaften und können somit als Kationenaustauscher fungieren (PURI UND MARK (1970); MATTSON (1971); BOEHM (2002)). Eine weitere Möglichkeit zur Aufreinigung von Probenextrakten besteht in der Verwendung von modifizierter Aktivkohle. Dabei werden durch chemische Behandlungen die Sorbenteneigenschaften der Aktivkohle verändert. So zeigten GARTEN ET AL. (1957), NOH UND SCHWARZ (1990) und BOEHM (2002), dass durch Behandlung mit oxidierenden Reagenzien, wie nachfolgend beschrieben, zusätzliche austauschfähige Gruppen in die Aktivkohle eingeführt werden konnten.

Modifikation mit Natriumhydroxid

Die Zugabe von Hydroxidionen bewirkt eine Verstärkung des polaren Charakters der Aktivkohle, indem die zusätzlichen Hydroxylgruppen in das aromatische System eingeführt wurden. Auf diese Weise können die Wechselwirkungen zu polaren Matrixbestandteilen über Dipol-Dipol-Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen intensiviert werden.

Modifikation mit Salpetersäure

Die eingesetzte Salpetersäure wurde als Oxidationsmittel zur Aktivkohle zugegeben. Hierbei wurden die funktionellen Gruppen wie Aldehyde, Ketone, Lactone und Anhydride zu den entsprechenden Carbonsäuren oxidiert. Durch diese Modifikation erhält die Aktivkohle eine Kationenaustauscherfunktion.

Modifikation mit Schwefelsäure

Die Modifikation der Aktivkohle mit konzentrierter Schwefelsäure beruht einerseits auf der Oxidation funktioneller Gruppen zu endständigen Carbonsäuren und andererseits auf der Bildung von Sulfonsäure-Gruppen. Dadurch wurde ebenfalls eine Aktivkohle mit starker und schwacher Kationenaustauscherfunktion erzeugt.

In nachstehender Tab. 13 sind die DON-Konzentrationen der unterschiedlichen Aktivkohle Modifikationen der nicht behandelten Aktivkohle gegenübergestellt. Zur Überprüfung des Einflusses der Modifikation auf DON bzw. der Matrix wurde das Vergleichsmaterial DON 311 (siehe Kapitel 6.2) eingesetzt.

Tab. 13: Gegenüberstellung des Extraktions- und Aufreinigungsverhaltens von DON mit herkömmlicher und modifizierter Aktivkohle

Modifikation	n	Aktivkohle [g]	Konz. [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	RSDr [%]
keine	12	5,0	331,0	8,4
NaOH	2	5,0	361,8	2,7
HNO ₃	2	5,0	354,3	10,3
H ₂ SO ₄	2	5,0	n.n.	-

Wie nachfolgend bei den Homogenitätsuntersuchungen in Abschnitt 6.2.1 beschrieben, besitzt das Vergleichsmaterial DON 311 eine Konzentration von 370,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bei einer RSD von 11,2 %. In Abschnitt 6.2.3 werden die Ergebnisse externer Validierung (Laboratorien des VFV) des Vergleichsmaterials DON 311 beschrieben. Dabei wurde ein Mittelwert von 330,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ mit einem RSD_r von 4,8 % und einem RSD_R von 14,7 % bestimmt. Vergleicht man diese Werte mit den in Tab. 13 aufgeführten Mittelwerten und RSD_r, so liegen die dort erzielten Schwankungen im Bereich der Materialunsicherheit. Ein visueller Vergleich der erhaltenen Extrakte zeigte bei den unterschiedlichen Aktivkohle Modifikationen im Vergleich zu der nicht behandelten Aktivkohle keine Unterschiede. Die Modifikation der Aktivkohle mit Natriumhydroxid und Salpetersäure führt im Vergleich zur unbehandelten Aktivkohle zu vergleichbaren DON-Konzentrationen. Hingegen ist bei der Modifikation mit Schwefelsäure ein vollständiger Verlust an DON zu beobachten. Dies konnte nur durch die zusätzlich eingeführten Sulfonsäure-Gruppen erklärt werden.

Aufgrund dieses Befundes wurde für die routinemäßige ASE-Multi-Trichothecen-Methode die unbehandelte Aktivkohle eingesetzt.

Durchführung der optimierten Methode

Zum Schutz der Metallfritten wurden auf den Boden der Extraktionszelle zuerst zwei Glasfaserfilter gesetzt. Darauf wurden exakt 5 g Aktivkohle eingewogen und ebenfalls mit einem Glasfaserfilter bedeckt. Damit eine homogene und dichte Aktivkohle-Packung entsteht, wurde die so vorbereitete Extraktionskartusche auf einen Vortex[®]-Mixer unter gleichzeitiger langsamer Kompression der Aktivkohleschicht durch einen entsprechenden Stößel geschüttelt. 20 g Probe wurden auf 1 mg genau mit 8 g Diatomeenerde vermischt und in die mit Aktivkohlefilter bestückte Extraktionszelle überführt. Unter Anwendung der in Tab. 14 angegebenen Parameter wurde mit dem Extraktionsgemisch (ACN/H₂O; 84/16; V/V) extrahiert. Der erhaltene Extrakt wurde in einen 200 mL Messkolben überführt und mit Extraktionsmittelgemisch bis zur Marke befüllt. Davon wurden exakt 5 mL bei 45 °C unter Stickstoffstrom abgedampft.

Tab. 14: Zusammenfassung der Extraktionsparameter der ASE-Multi-Trichothecen-Methode

Vorheizzeit	5 min	Spülvolumen	130 %	Druck	150 bar
Heizzeit	5 min	Gasspülzeit	180 s	Temperatur	85 °C
Extraktionszeit	5 min	Statische Zyklen	5		

5.7 Aufreinigungsmethoden

5.7.1 Aufreinigung mittels Festphasenextraktion (SPE)

Aufreinigung mittels Aktivkohle

Die Extraktreinigung über analysenreiner Aktivkohle wurde ausschließlich für die ASE-Multi-Trichothecen-Methode (siehe Abschnitt 5.6 und 6.8) angewandt. Das Prinzip der Aufreinigung über Aktivkohle wurde bereits im Abschnitt 5.6.3 dargelegt.

Aufreinigung mittels MultiSep®

Die Extraktreinigung mit MultiSep®-Kartuschen wurde ausschließlich für die routinemäßige Analytik für DON in Getreide und Getreideprodukten eingesetzt.

Das eingesetzte Sorbens besteht aus Aktivkohle, Celite und neutralem Aluminiumoxid. Bei den Materialien, Celite und neutralem Aluminiumoxid, handelte es sich um polare Normalphasenmaterialien, die mit DON (bzw. Trichothecen) über Dipol-Dipol-Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen wechselwirken.

Aufreinigung über Extrelut

Das Aufreinigungsverfahren mittels Extrelut-Säule wurde zur Bestimmung von DON und weiteren Trichothecen in Bier und bierähnlichen Getränken herangezogen.

Prinzip

Die Aufreinigung mittels Extrelut, einer hochporösen Diatomeenerde (verkieselte Algen), beruht auf einer Vergrößerung der Flüssigkeitsoberfläche. Hierfür wurde der polare Probenextrakt auf das Material gegeben um eine größtmögliche Verteilung in die Poren zu erlangen. Das organische Extraktionsmittel (Ethylacetat) wurde zur Elution des Analyten auf die Säule gegeben. Aufgrund der Oberfläche des Extreluts besitzen beide Phasen eine besonders große Phasengrenzfläche zueinander, wodurch die Extraktion des Analyten in den Eluent besonders begünstigt wurde.

Durchführung

Für diese Methode ist keine vorherige Extraktion notwendig. Die Probenvorbereitung beinhaltet lediglich das Entgasen der Biermatrix mittels Magnetrührer über einen Zeitraum von 16 Stunden. Die Bierprobe sollte nach diesem Vorgang nur noch geringe Anteile an Kohlendioxid (Schaumbildung!) aufweisen. Von der vorbereiteten Probe werden mittels Vollpipette 3 mL auf die Extrelutsäule mit geöffnetem Luer-Hahn pipettiert. Nach vollständiger Aufgabe der Bierprobe auf der Extrelut-Säule wurde diese für 20 Minuten stehen gelassen. Anschließend wird mit 8 mL Ethylacetat in die Vorlage eluiert. Das aufgefangene Ethylacetat wird unter Stickstoffstrom bei 45 °C abgedampft. Der getrocknete Rückstand kann bis zur weiteren Untersuchung bei 4 °C aufbewahrt werden.

5.7.2 Aufreinigung mittels Extrelut-Kochsalzgemisch

Diese Aufreinigungstechnik wurde wie nachfolgend beschrieben ausschließlich für die Bestimmung von ZEA in Konsum- und Säuglingsfolgemilch eingesetzt.

Prinzip

Auf Grund der großen Oberfläche des Extreluts besitzen beide Phasen eine besonders große Phasengrenze, wodurch eine effektive Extraktion des Analyten in den Eluent gewährleistet wird. Unterstützt wird dieser Prozess durch den Aussalzungseffekt des eingebetteten Kochsalzes. Die zugesetzten Ionen hydratisieren effektiver die aufgegebene Milch-Matrix als die Analytmoleküle, denen auf diese Weise die Hydrathülle entzogen und dadurch die Wasserlöslichkeit herabgesetzt wurde. Somit wurde die Verteilung von ZEA in den Eluenten (Ethylacetat/Aceton-Gemisch) gesteigert.

Durchführung

- Proteinpräzipitation

Vor der enzymatischen Hydrolyse erfolgt die Proteinpräzipitation. In ein 50 mL PP Zentrifugengefäß wurden 10 mL der homogenisierten Milchprobe und 10 mL Aceton pipettiert. Daraufhin wurde der PP Zentrifugenbehälter für 10 Minuten turbulent geschüttelt und anschließend bei 5.000 G und 10 °C zentrifugiert. Anschließend wird das Aceton unter Stickstoffstrom bei 50 °C abgeblasen.

- Enzymatische Hydrolyse

Die hydrolytische Spaltung möglicher ZEA-Konjugate wird durch das eingesetzte Enzymgemisch β -Glucuronidase/Arylsulfatase gewährleistet. Die β -Glucuronidase spaltet Glucuronide in Glucuronsäure und das Aglykon ZEA oder dessen Metabolite (α -Zearalenol, β -Zearalenol, Zearalanon, α -Zearalanol und β -Zearalanol). Die Arylsulfatase spaltet Sulfat-ester von phenolischen Verbindungen wie die von Steroid-Sulfaten.

In Tab. 15 wurden einige Methoden zusammengestellt, die in der ZEA-Analytik bereits Anwendung fanden und die enzymatische Hydrolyse für die Freisetzung von konjugierten ZEA bzw. den Biotransformationsprodukten nutzten. In Anlehnung an die Tab. 15 wurden die enzymatischen Hydrolysen möglicher ZEA-Konjugate durchgeführt.

Der Rückstand wird mit verdünnter Essigsäure auf einen pH von 4,5 - 5,0 eingestellt. Anschließend werden 100 μ L β -Glucuronidase/Arylsulfatase Gemisch zugesetzt. Die enzymatische Hydrolyse wird im Wasserbad bei 37 °C innerhalb von 16 Stunden durchgeführt.

- Extraktreinigung

Das resultierende enzymatische Hydrolysat wird quantitativ auf eine NaCl-Extrelutsäule (Zusammensetzung: 15 g Extrelut und 5 g Kochsalz) überführt. Damit die Probe vollständig auf das Extrelut aufziehen kann, wird diese für 20 Minuten auf der Säule stehen gelassen. Daraufhin wird die Probe mit 100 mL eines Aceton/Ethylacetat-Gemischs (50/50; V/V) in ein TurboVap® Gefäß eluiert (Tropfgeschwindigkeit = 2 Tropfen pro Sekunde) und anschließend im TurboVap 500 bei 45 °C eingeengt. Der erhaltene Rückstand wird quantitativ in ein Reagenzglas überführt. Dieser Schritt wurde aufgrund einer effektiveren Probenbehandlung und besserer Wiederfindungen eingeführt. Der Rückstand wird unter Stickstoffstrom bis zur Trockene eingeengt, in 10 % MeOH/PBS-Puffergemisch gelöst und wie unter Abschnitt 5.7.4 beschrieben mittels IAC aufgereinigt.

Tab. 15: Zusammenstellung von Methoden zur Bestimmung von ZEA in tierischen Sekreten und Geweben

Toxin	Matrix	Enzymatik	Literatur
ZEA; α -ZOL; β -ZOL	Milch	130 000 Units β -Glucuronidase und 3 100 Units Sulfatase/mL; 16 Stunden bei 37 °C	Scott und Lawrence (1988)
ZEA	Milch	1 360 Units β -Glucuronidase pH 4,5 - 5; 2 Stunden bei 37 °C	Hagler et al. (1980)
ZEA; α -ZOL	Milch	10 000 Units pH 4,5; 2 Stunden bei 37 °C	Mirocha et al. (1981)
ZEA; α -ZOL; β -ZOL	Milch, Blut, Plasma, Urin	5 000 U β -Glucuronidase; pH 5,6 - 6,6; 16 Stunden bei 37 °C	Prelusky et al. (1989)
α -ZOL	Tierische Leber	25 μ L β -Glucuronidase/Arylsulfatase; 16 Stunden bei 37 °C	Fang et al. (2002)

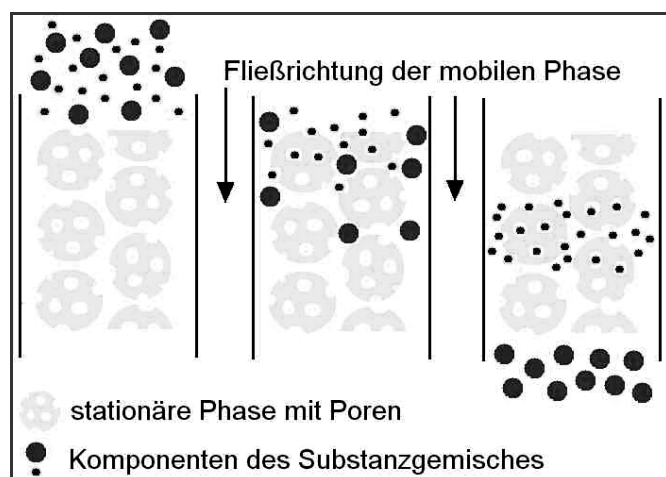
5.7.3 Aufreinigung mittels Größenausschlusschromatographie (GPC)

Prinzip

Das GPC-Aufreinigungsverfahren wurde für die Bestimmung von ZEA in pflanzlichem Speiseöl entwickelt. Weiterhin wurde mit dieser Technik eine Methode zur Bestimmung von Typ A und Typ B Trichotheceinen in Getreideölen entwickelt.

In der GPC erfolgt die Trennung der Analyten, laut Definition, durch die molekulare Größe, nicht durch die molekulare Masse. Hierfür werden alle weiteren Interaktionen (ionische Wechselwirkung, Adsorption) mit der stationären Phase unterdrückt, so dass die Systemselektivität allein von der unterschiedlichen Zugänglichkeit der gelösten Substanz in die Poren des Gels abhängt. Die Elution einer Substanz wird nur von der Molekülgröße bestimmt und ist weitgehend unabhängig von der Elutionsgeschwindigkeit und von der Konzentration in der Probe. Die stationäre Phase besteht aus Perlen, mit einem heteroporösen gequollenen Netzwerk, dessen Porengrößenverteilung über mehrere Größenordnungen variiert, so dass die Fraktionierung nach molekularer Größe erfolgt.

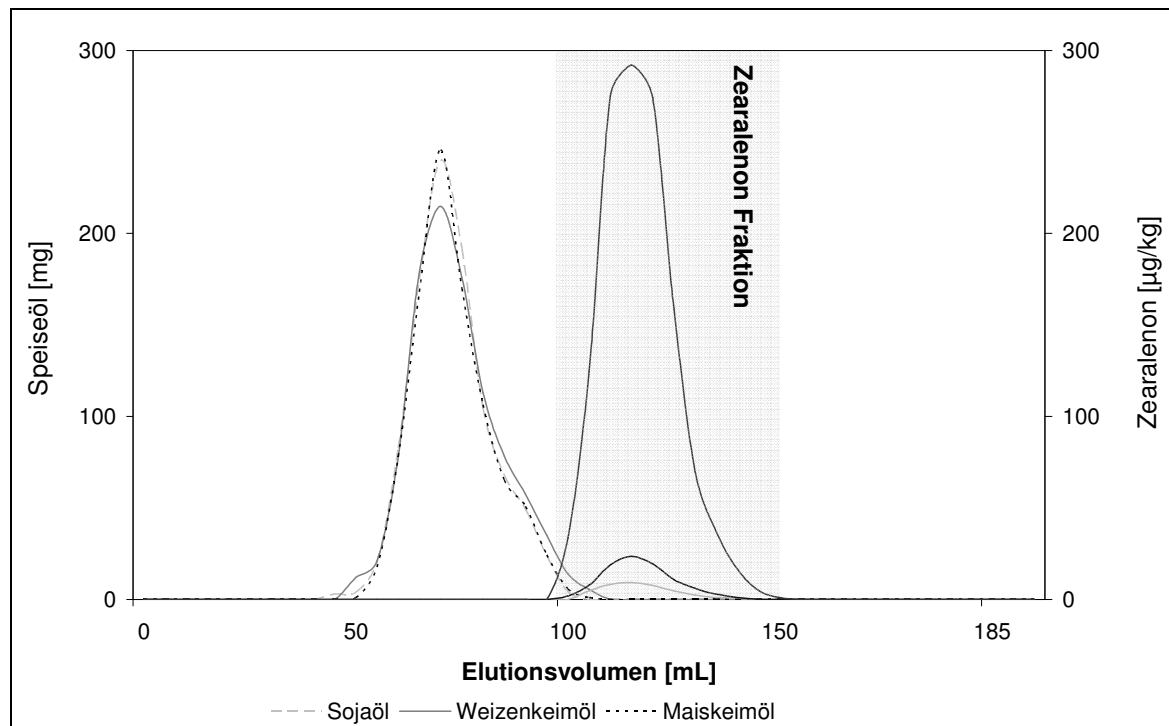
Die mobile Phase mit der gelösten Substanz wird auf das Gel gegeben, wobei die Substanz in alle Teile des Netzwerkes diffundieren kann, die aufgrund ihrer Größe nicht versperrt sind. Folglich dringen die kleinen Moleküle des Gelösten tiefer ein und werden länger in der Säule retardiert als die größeren Moleküle. Solche Moleküle, die größer sind als die größten Poren des gequollenen Gels, können die Gelkörner nicht durchdringen, eluieren an diesen vorbei und verlassen die Säule zuerst.

Abb. 13: Schematische Darstellung zum Prinzip der Gelpermeationschromatographie

5.7.3.1 Methodenentwicklung

Zur Bestimmung des Elutionsvolumens von ZEA und den Trichothecenen bei der verwendeten Größenausschlusschromatographie (Bio-Beads S-X3 Material) musste eine volumendefinierte Fraktionierung durchgeführt werden, da das benutzte GPC-System keinen Detektor aufwies. In einem Zeitraum von einer Stunde wurde jede Minute (entspricht 5 mL) fraktioniert. In den jeweiligen Einzelfractionen wurden mittels LC-MS/MS die Analytkonzentrationen bestimmt und durch Addition der Fraktionsvolumina ein Trennungs-Chromatogramm rekonstruiert. Abb. 14 verdeutlicht, dass bis zu einem Elutionsvolumen von 100 mL nahezu die gesamte Lipidfraktion von der Säule eluiert.

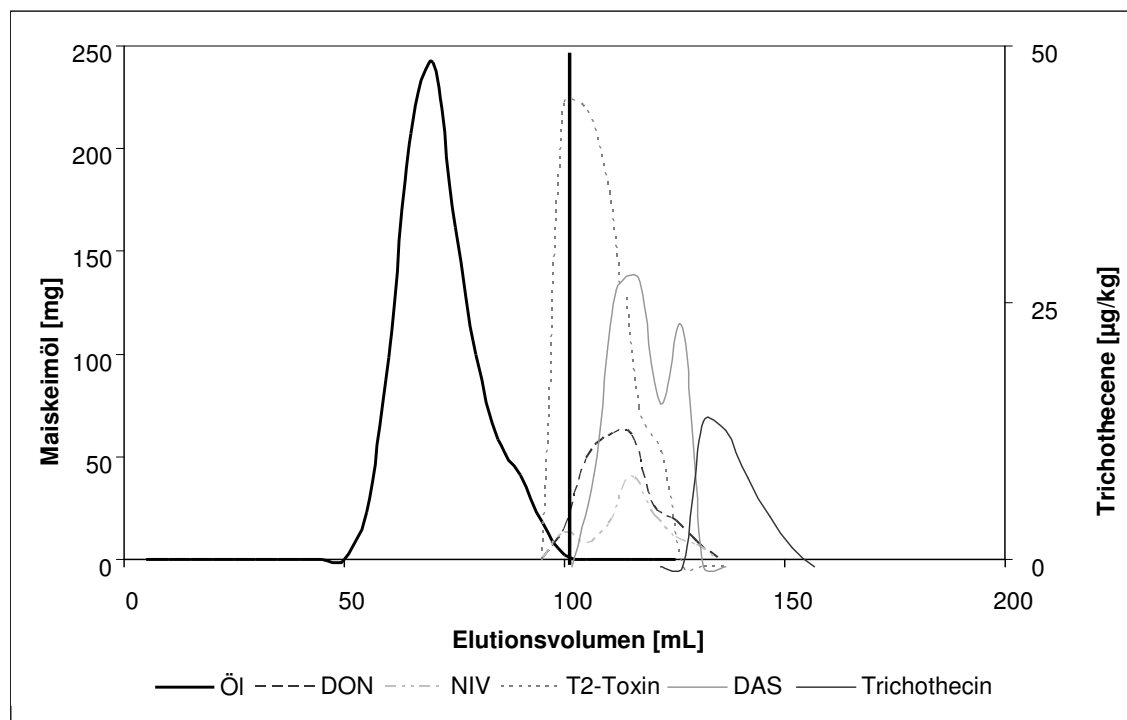
Abb. 14: GPC-Fraktionierung von Zearalenon in natürlich kontaminierten Speiseölproben



Zur Darstellung des Elutionsvolumens für ZEA in Speiseölen wurde natürlich kontaminiertes Maiskeimöl, Weizenkeimöl und Sojaöl herangezogen. Die Analyt enthaltende Fraktion begann bei 100 mL zu eluieren und endet bei einem Elutionsvolumen von 150 mL. Für das angewandte GPC-System sind in der Abb. 15 beispielhaft sowohl die polaren Typ B Trichothecene DON, NIV und Trichothecin als auch die im Vergleich weniger polaren Typ A Trichothecene T-2 Toxin und DAS dargestellt.

Vergleicht man die Elutionsvolumen der Fusarientoxine in Abb. 14 und Abb. 15, so ist deutlich zu erkennen, dass diese bei einem Elutionsvolumen von 100 mL bis 150 mL eluierten. Somit wurde gewährleistet, dass mit dieser Methode neben ZEA und dessen Derivate ebenfalls Typ A und Typ B Trichothecene in einem Aufarbeitungsschritt erfasst wurden. Es bleibt zu prüfen, in wie weit weitere Mykotoxine wie Ochratoxine, Aflatoxine und Fumonisine ebenfalls in diesen Aufarbeitungsschritt mit einbezogen werden können.

Abb. 15: GPC-Fraktionierung von Typ A und Typ B Trichothecenen in einer gespikten Maiskeimölprobe



5.7.3.2 Durchführung

Es wurden 4,00 g Probe auf 0,01 g in ein 20 mL Messkolben eingewogen. Das vorgelegte Öl wurde im GPC-Elutionsmittel Cyclohexan/Ethylacetat (1/1, V/V) aufgelöst. Anschließend wurden 50 µL α -d₄-Zearalenol (Interner Standard) hinzugefügt, mit dem GPC-Elutionsmittel bis zur Marke aufgefüllt und ein Aliquot des gelösten Öls in ein Probenvial für die GPC überführt.

Dabei wurde die Lipid-enhaltende erste Fraktion mit einem Elutionsvolumen von 100 mL (entspricht hier 20 Minuten) verworfen. Die darauf folgende Fraktion wurde mit einem Elutionsvolumen von 50 mL (entspricht hier 10 Minuten) in einen vorgelegten Spitzkolben eluiert. Das Eluat wurde mittels Vakuumrotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. Der erhaltene Rückstand wurde in 1 mL Methanol gelöst. Diese Lösung wurde in ein Vorratsgefäß, das 10 mL Tween/PBS-Puffer enthielt, überführt und über die IAC-Säule eluiert. Diese zusätzliche IAC Aufreinigung war für die Bestimmung von ZEA mittels HPLC-FLD notwendig, für die Detektion von ZEA mittels LC-MS/MS konnte der GPC-Extrakt direkt eingesetzt werden. Der GPC-Extrakt führte in den FLD-Chromatogrammen zu einer zu großen Matrixbelastung, um eine eindeutige ZEA-Bestimmung durchführen zu können. Die Aufreinigung mittels GPC erfolgte unter den in Tab. 16 aufgeführten Parametern.

Tab. 16: Aufreinigungsparameter der verwendeten Größenausschlusschromatographie-Anlage

	Elutionsvolumen [mL]	Zeit [min]
Verwerfen	100	20
Auffangen	50	10
Gesamt	150	30

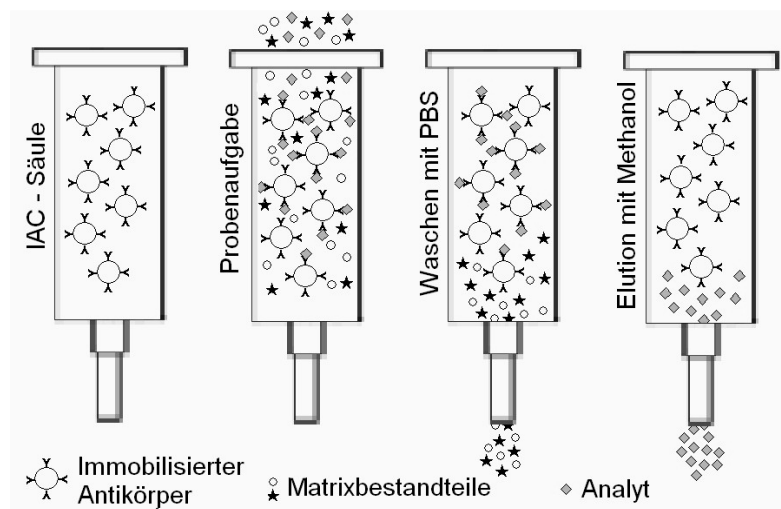
5.7.4 Aufreinigung mittels Immunoaffinitätschromatographie-Säulen (IAC)

Die Aufreinigung der Extrakte und Analytkonzentrierung mittels Immunoaffinitätschromatographie-Säulen wurde im Rahmen dieser Arbeit routinemäßig eingesetzt.

Prinzip der Aufreinigung

Entsprechend der Firmenbeschreibung von VICAM[®], Biopharm[®] und RedRabbit[®] wurden die jeweiligen IAC-Säulen für Deoxynivalenol, Zearalenon und T-2 Toxin behandelt. Die Analyten wurden aus der Probe mit unterschiedlichen Extraktionsverfahren und Lösungsmittelgemischen extrahiert. Der Extrakt wurde unter Stickstoffstrom abgedampft, der Rückstand mit PBS-Puffer gelöst und auf einer analytspezifischen Immunoaffinitätschromatographie-Säule gereinigt. Die Analyten wurden mit Methanol eluiert, das durch Verdampfen entfernt wurde. Der Prozess für die IAC-Aufreinigung ist in Abb. 16 dargestellt. Der Rückstand wurde in Methanol-Wasser aufgenommen und konnte direkt zur chromatographischen Analyse eingesetzt werden.

Abb. 16: Schematische Darstellung der Aufreinigung mittels IAC-Säulen



5.8 Analytische Erfassung mittels HPLC

5.8.1 Bestimmung von Deoxynivalenol mittels HPLC-UV/VIS bzw. DAD

Shimadzu VP HPLC Anlage mit Autosamplern, zwei Zweikolbenpumpen für Hochdruckgradientenmischung, Säulenthermostat und UV/VIS Detektor.

Durchfluss: 0,85 mL/min

Säulentemperatur: 35 °C

Trennsäule: 250 x 4,6 mm Mischphase Phenomenex[®] Phenylhexyl mit 100 Å, 5 µm mit entsprechender 20 mm Vorsäule

Injektionsmethode: normale Injektion (100 µL)

Isokratische Elution: Acetonitril/Wasser (5/95; V/V) für 30 Minuten

Detektoreinstellungen	Wellenlänge (nm)	AUFS
Quantifizierung	218	0,005
Bestätigung	236	0,005

Agilent 1100 HPLC-Anlage mit Autosamplern, Kapillarpumpe, Säulenthermostat und DAD-Detektor.

Durchfluss: 0,85 mL/min
 Säulentemperatur: 35 °C
 Trennsäule: 250 x 4,6 mm Mischphase Phenomenex® Phenylhexyl mit 100 Å, 5 µm mit entsprechender 20 mm Vorsäule
 Injektionsmethode: normale Injektion (100 µL)
 Isokratische Elution: Acetonitril/Wasser (5/95; V/V) für 30 Minuten

Detektoreinstellungen	Wellenlänge (nm)	AUFS
Quantifizierung	218	0,005
Bestätigung	236	0,005

5.8.2 Bestimmung von Zearalenon und dessen Derivaten mittels HPLC-FLD

Shimadzu VP HPLC Anlage mit System Controller SCL-10 AVP, Autosamplern (SIL-10A), zwei Zweikolbenpumpen für Hochdruckgradientenmischung, Säulenthermostat (CTO-10AC) und Fluoreszenz-Detektor (RF-10AXL).

Durchfluss: 0,85 mL/min
 Säulentemperatur: 40 °C
 Trennsäule: 250 x 4,6 Nucleosil Protect 1 mit 100 Å, 5 µm mit entsprechender 10 mm Vorsäule
 Laufmittel: Eluent A = Acetonitril
 Eluent B = dest. Wasser (1 % Essigsäure)

Gradient:

Zeit [Minuten]	Eluent B [%]
0,00	60
30,00	20
30,01	20
35,00	60
35,01	60
45,00	60

Detektoreinstellungen	Wellenlänge (nm)
Extinktion	274
Emmission	446

5.9 Analytische Erfassung mittels LC-MS/MS

5.9.1 Grundlagen der Tandem-Massenspektrometrie

In der heutigen Spurenanalytik werden vor allem das Elektrospray-Interface (ESI), das Atmospheric-pressure-chemical-ionisation-Interface (APCI) und das Atmospheric-pressure-photo-ionisation-Interface (APPI) eingesetzt. Diese Interfaceformen zeichnen sich vor allem durch eine schonende Ionisierung aus. Dadurch werden in den Massenspektren oft nur Adduktionen mit Protonen bzw. einfach geladenen Kationen beobachtet.

Hinter der Öffnung (Orifice) befindet sich ein schwaches Vakuum, in dem ungeladene Gasmoleküle entfernt werden, während der Ionenstrahl durch den Skimmer und Bündelungsquadrupol fokussiert wird. Die entstandenen Ionen werden weiter durch angelegte Potenzialdifferenzen in Richtung der Linsensysteme des Massenspektrometers gezogen. Bis zum Analysator wird das Hochvakuum schrittweise aufgebaut. Als Analysatoren werden meistens ein bzw. zwei Quadrupolsegmente oder eine Ionenfalle eingesetzt. Mit dieser Geräteanordnung können sowohl positive als auch negative Ionen erzeugt und detektiert werden. Um die Selektivität und Spezifität noch weiter für die Analytik der Verbindungen zu erhöhen, wird neben der LC-MS mit Quellfragmentierungen oder der Aufnahme der massenspektrometrischen Daten im SIM vermehrt die Tandemmassenspektrometrie mit der Flüssigkeitschromatographie gekoppelt. Hierbei erfolgt in einem zweiten Quadrupolsegment (Linac-Zelle) unter Zuhilfenahme eines Reaktantgases wie Stickstoff oder Argon eine kollisionsinduzierte Fragmentierung (CID). Die resultierenden Ionen können anschließend in einem folgenden, dritten Quadrupol selektiert werden. Mit dieser Geräteanordnung können unterschiedliche Experimente durchgeführt werden.

Prinzip der Messung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit zwei unterschiedlichen Generationen von Massenspektrometern gearbeitet. Die Analysatoren API 2000 und das API 4000 stammen von der Fa. Applied Biosystems® Sciex MDS. Ein wichtiger Unterschied dieser beiden Geräte besteht in der Geometrie der Interfaces. Bei dem API 2000 ist das Spray horizontal zur Eintrittsöffnung (Orifice) des Massenanalysators gerichtet, bei dem API 4000 besteht eine vertikale Ausrichtung.

Für die Bestimmung der Trichothecene erfolgte zunächst eine chromatographische Trennung an einer Phenylhexyl-Mischphase. Die Ionisierung erfolgte, mit Ausnahme von NIV (negative Ionisierung), im positiven Ionisierungs-Modus sowohl mit Turboionspray® (ESI, TIS) als auch mit der APCI-Kopplung. Für die Bestimmung von Zearalenon und dessen Derivaten wurde eine chromatographische Trennung an einer RP C₁₈-Phase entwickelt. Die Ionisierung erfolgte hier ausschließlich im positiven Modus mittels Turboionspray®.

5.9.2 Messbedingungen für Typ A und Typ B Trichothecene

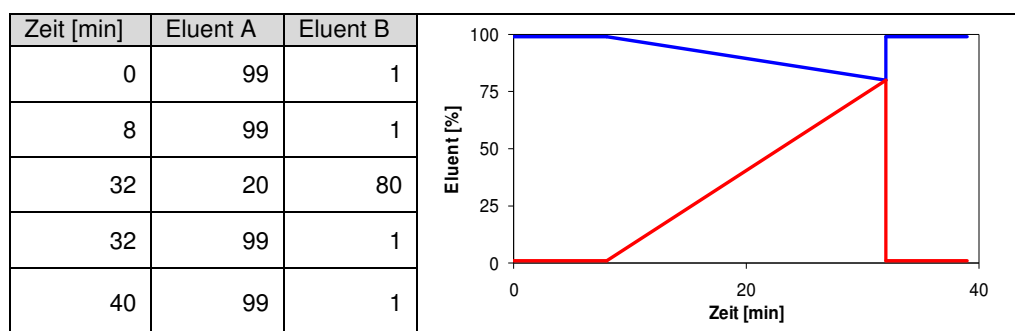
Angelehnt an die jeweiligen Fragestellungen wurde eine entsprechende flüssigkeitschromatographische Trennung und anschließende Detektion entwickelt und optimiert. So wurden die Tandem-Massenspektrometer API 2000 und API 4000 der Fa. Applied Biosystems Sciex® eingesetzt, um mögliche systematische Abweichungen der unterschiedlichen Generation an Ionisierungstechniken zu erkennen. Weiterhin wurde an der API 4000 die Ionisierung der Analyten sowohl mit APCI- als auch mit ESI-Ionisierungstechnik durchgeführt.

Aufgrund methodischer Gesichtspunkte wurde einerseits eine schnelle LC-MS/MS-Methode (< 10 Minuten) entwickelt, um dem großen Probenaufkommen für die DON-Analytik gerecht zu werden. Andererseits wurde für die ASE-Multi-Trichothecen-Methode eine Trennung aller

Typ A und Typ B Trichothecene, einschließlich der Stellungsisomere 3-AcDON und 15-AcDON, angestrebt.

API 4000 – ASE-Multi-Trichothecen-Methode

Durchfluss: 0,2 mL/min; Säulentemperatur: 40 C
 Trennsäule: 125 x 2 Phenomenex® Phenylhexyl; 100 A, 5 µm mit entsprechender 20 mm Vorsäule
 Injektionsmethode: normale Injektion (25 µL)
 Gradientenprogramm:
 für APCI: Eluent A: Acetonitril
 Eluent B: dest. Wasser
 für ESI: Eluent A: Acetonitril (0,1 % Ameisensäure; 10mM Ammoniumacetat)
 Eluent B: dest. Wasser (0,1 % Ameisensäure; 10mM Ammoniumacetat)



Interface Sprayeinstellungen:

APCI			
<i>Periode 1</i>			
Aufnahmebedingungen	MRM	Temperatur	250 °C
Polarität	negativ	Gas 1	55 psi
Angelegte Hochspannung	- 4,5 kV	Gas 2	60 psi
Curtain Gas	15 psi	Nebulizer Gas	5 psi
<i>Periode 2</i>			
Aufnahmebedingungen	MRM	Temperatur	350 °C
Polarität	positiv	Gas 1	35 psi
Angelegte Hochspannung	5,5 kV	Gas 2	60 psi
Curtain Gas	14 psi	Nebulizer Gas	5 psi
ESI			
<i>Periode 1</i>			
Aufnahmebedingungen	MRM	Temperatur	275 °C
Polarität	negativ	Gas 1	50 psi
Angelegte Hochspannung	- 4,5 kV	Gas 2	60 psi
Curtain Gas	12 psi		
<i>Periode 2</i>			
Aufnahmebedingungen	MRM	Temperatur	550 °C
Polarität	positiv	Gas 1	50 psi
Angelegte Hochspannung	5,5 kV	Gas 2	60 psi
Curtain Gas	10 psi		

API 4000 – Deoxynivalenol Methode

Durchfluss: 0,2 mL/min
 Säulentemperatur: 40 °C
 Trennsäule: 125 x 2 Phenomenex® Phenylhexyl; 100 Å, 5 µm mit entsprechender
 20 mm Vorsäule
 Injektionsmethode: normale Injektion (25 µL)
 Isokratische Elution: Methanol/Wasser (60/40; V/V) für 10 Minuten

Interface Sprayeinstellungen:

APCI			
Aufnahmebedingungen	MRM	Temperatur	315 °C
Polarität	positiv	Gas 1	65 psi
Angelegte Hochspannung	5,5 kV	Gas 2	20 psi
Curtain Gas	10 psi	Nebulizer Gas	5 psi
ESI			
Aufnahmebedingungen	MRM	Temperatur	400 °C
Polarität	positiv	Gas 1	50 psi
Angelegte Hochspannung	5,5 kV	Gas 2	50 psi
Curtain Gas	10 psi		

API 2000 – Deoxynivalenol Methode

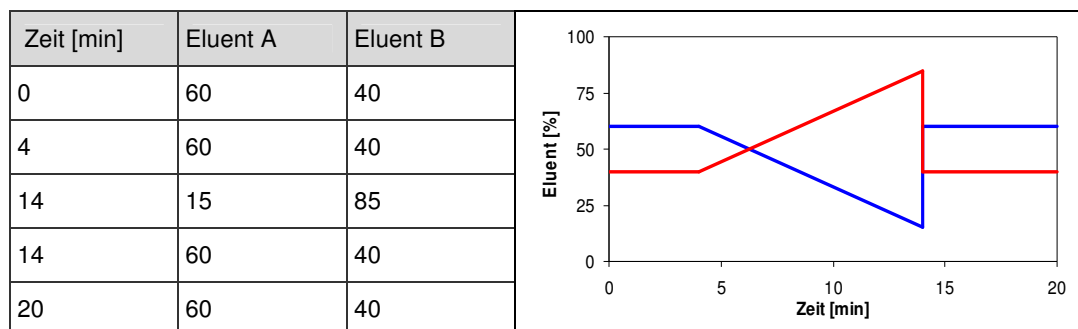
Durchfluss: 0,2 mL/min
 Säulentemperatur: 35 °C
 Trennsäule: 125 x 2 Nucleosil Protect; 100 Å, 5 µm mit entsprechender
 20 mm Vorsäule
 Injektionsmethode: normale Injektion (25 µL)
 Isokratische Elution: Acetonitril/Wasser (60/40; V/V) für 10 Minuten

Interface Sprayeinstellungen:

APCI			
Aufnahmebedingungen	MRM	Temperatur	400 °C
Polarität	positive	Gas 1	60 psi
Angelegte Hochspannung	5,5 kV	Gas 2	60 psi
Curtain Gas	11 psi	Nebulizer Gas	6 psi

5.9.3 Messbedingungen für Zearalenon und dessen Derivate

Durchfluss: 0,2 mL/min
 Säulentemperatur: 35 °C
 Trennsäule: 125 x 2 Nucleosil Protect; 100 Å, 5 µm mit entsprechender
 20 mm Vorsäule
 Injektionsmethode: normale Injektion (20 µL)
 Gradientenprogramm:
 Eluent A: dest. Wasser (0,1 % Ameisensäure; 10mM Ammoniumacetat)
 Eluent B: Acetonitril (0,1 % Ameisensäure)



Interface Sprayeinstellungen:

ESI			
Aufnahmebedingungen	MRM	Temperatur	550 °C
Polarität	positiv	Gas 1	60 psi
Angelegte Hochspannung	5,5 kV	Gas 2	60 psi
Curtain Gas	15 psi		

5.9.4 Ionenpaar-Übergänge der massenspektrometrischen Methoden

Gemäß der Entscheidung der Kommission (2002/657/EG) zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates, betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen, müssen Bestätigungsmethoden für organische Rückstände oder Kontaminanten Aufschluss über die chemische Struktur des Analyten liefern. Der massenspektrometrische Nachweis muss mit MS-Verfahren wie der Aufzeichnung von Full-Scan-Massenspektren oder der Einzelmassenregistrierung (SIM), sowie MS-MSⁿ-Verfahren wie dem Selected Reaction Monitoring (SRM) oder anderen geeigneten MS- oder MS-MSⁿ-Verfahren in Kombination mit entsprechenden Ionisierungsarten durchgeführt werden. Erfolgt die massenspektrometrische Bestimmung mittels Fragmentografie, muss das Molekül-Ion vorzugsweise eines der ausgewählten diagnostischen Ionen sein (Molekül-Ion, charakteristische Addukte des Molekül-Ions, charakteristische Fragment-Ionen und alle ihre Isotopen-Ionen). Im Rahmen dieser Arbeit wurde aufgrund dieser Tatsache für die Typ A und Typ B Trichothecene nachstehende Tab. 18 und für ZEA und dessen Metabolite die in Tab. 17 aufgeführten Übergänge etabliert.

Tab. 17: MRM-Ionen-Übergänge von Zearalenon und dessen Derivaten im positiven Ionisierungsmodus

MRM	Ionenübergänge (m/z)	
	Quantifizierung	Bestätigung
ZEA	319 → 283	319 → 231
ZAN	321 → 303	321 → 207
α- und β-ZOL	321 → 285	321 → 303
α- und β-ZAL	323 → 305	323 → 287
d4-α- und d4-β-ZAL	325 → 307	325 → 289

Tab. 18: MRM-Ionen-Übergänge von Typ A und Typ B Trichothecenen

	MRM	Ionenübergänge (m/z)	
		Quantifizierung	Bestätigung
Periode 1 negativ Polarität [M-H] ⁻	NIV	311 → 281	–
Periode 2 positive Polarität [M+H] ⁺	DON	297 → 249	297 → 231
	Fus X	355 → 247	355 → 205
	15-AcDON	339 → 321	339 → 261
	3-AcDON	339 → 231	339 → 203
	VOL	267 → 249	267 → 231
	15-AcSCP	325 → 265	325 → 307
	DAS	367 → 349	367 → 307
	HT-2 Toxin	425 → 263	425 → 215
	NEO	383 → 365	383 → 323
	3 α AcDAS	409 → 349	409 → 247
	T-2 Toxin	467 → 305	467 → 245
	d ₃ -T-2 Toxin	470 → 308	470 → 245

6 Ergebnisse und Diskussion

6.1 Validierung von analytischen Methoden – Grundlagen und gesetzliche Vorgaben

Validierung ist die Bestätigung durch Untersuchung bzw. die Erbringung eines effektiven Nachweises, dass die jeweiligen Anforderungen eines bestimmten Verwendungszwecks erfüllt sind.

Eine analytische Methode wird durch die Leistungskriterien Genauigkeit, Nachweisgrenze, Bestimmungsgrenze, Linearität, Präzision, Konzentrationsbereich, Wiederfindung, Wiederholbarkeit, Vergleichbarkeit, Robustheit, Selektivität und Empfindlichkeit charakterisiert. Diese Kriterien müssen im Rahmen einer Methodvalidierung bestimmt werden und beruhen auf den DIN 5725, DIN 32645 und ISO 8466.

Weiterhin basiert die Validierung in der analytischen Chemie auf internen (laborintern) und externen (zwischen verschiedenen Laboratorien) Qualitätsüberprüfungen.

Leistungskriterien sind Anforderungen an ein Leistungsmerkmal, nach denen beurteilt werden kann, ob die Analysemethode für den Zweck geeignet ist und zuverlässige Ergebnisse liefert. Zusätzlich sind die in Tab. 1 zusammengefassten Leistungskriterien für die Fusarien-toxin-Analytik gemäß der Richtlinie 2005/38/EG zu erfüllen.

Tab. 19: Leistungskriterien für Fusarientoxine gemäß Richtlinie 2005/38/EG

	Konzentration [µg/kg]	RSDr [%]	RSDR [%]	Wdf. [%]
DON	> 100	≤ 20	≤ 40	70 - 110
	< 500	≤ 20	≤ 40	70 - 120
ZEA	< 50	≤ 40	≤ 50	60 - 120
	> 50	≤ 20	≤ 40	70 - 120
T-2 Toxin	50 - 250	≤ 40	≤ 60	60 - 130
	> 250	≤ 30	≤ 50	60 - 130
HT-2 Toxin	100 - 200	≤ 40	≤ 60	60 - 130
	> 200	≤ 30	≤ 50	60 - 130

In Anlehnung an die Entscheidung der Kommission (2002/657/EG) zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend der Durchführung von Analysemethoden und der Auswertung von Ergebnissen, gültig für Rückstände in Erzeugnissen tierischen Ursprungs, wurden die aufgeführten Leistungskriterien für quantitative Analysemethoden im Rahmen dieser Arbeit diskutiert. Dies gilt namentlich für die LC-FLD, LC-UV/VIS und die massenspektrometrische Detektion nach vorheriger flüssigkeitschromatografischer Trennung.

Zielstandardabweichung nach Horwitz

Zur Bewertung von durchgeführten Ringversuchen und Laborvergleichsuntersuchungen wird die Zielstandardabweichung nach Horwitz eingesetzt. Auf Grundlage zahlreicher methodenprüfender Ringversuche leitet HORWITZ (1982) eine Funktion ab, mit der in Abhängigkeit der Konzentration des gesuchten Analyten eine relative Zielstandardabweichung berechnet werden kann:

$$RSD_R = 2^{[1-0,5 \cdot \log(C)]} \text{ bzw. } RSD_R (\text{Horwitz}) = \sigma_R = 0,02 \cdot c^{0,8495}$$

RSD_R Relative Zielstandardabweichung nach Horwitz
 c Median oder Gesamtmittelwert, eingesetzt als relative Konzentration
 (z. B. 1 µg/kg entsprechen einer relativen Konzentration von 10⁻⁶ kg/kg)

THOMPSON und LOWTHIAN (1995) und (2000) zeigten, dass die Präzision in Laborvergleichsuntersuchungen ebenfalls einer Funktion dieses Typs folgt.

Der Wert einer Zielstandardabweichung wird folgendermaßen berechnet:

$$s_R = \left(\frac{RSD_R}{100} \right) \cdot C$$

s_R Zielstandardabweichung nach Horwitz
 RSD_R Relative Zielstandardabweichung nach Horwitz
 C Median oder Gesamtmittelwert, eingesetzt in üblicher Konzentration.

Horrat-Wert

Zur Objektivierung von Analyseergebnissen können Regeln herangezogen werden, die zunächst zur Bewertung methodenprüfender Ringversuche entwickelt wurden. So haben BOYER ET AL. (1985) im Rahmen ihrer Arbeiten über die Ergebnisse methodenprüfender Ringversuche festgestellt, dass bei nur sehr wenigen Ringversuchsergebnissen der doppelte Betrag, der nach der Horwitz-Formel berechneten Vergleichsstandardabweichung überschritten wurde. Aufgrund dieser Beobachtung wird der Quotient aus methodischer Vergleichsstandardabweichung und der nach Horwitz berechneten Standardabweichung als Horrat-Wert (Horrat-ratio) bezeichnet und zur Bewertung methodenprüfender Ringversuche herangezogen. Demzufolge wird ein Ringversuchsergebnis als zufriedenstellend bewertet, wenn nach Ausschluss von nicht mehr als 2/9 (22,2 %) der Laboratorien ein Horrat-Wert von 2 nicht überschritten wird (HORWITZ (1995)). THOMPSON UND LOWITHAN (1997) stellten bei der Überprüfung der Horwitz-Funktion fest, dass in 95 % aller ausgewerteten Fälle sogar ein Horrat-Wert unter 1,5 zu erwarten ist.

Formel: Berechnung des Horrat-Wertes

$$\text{Horrat-Wert: } Ho_R = \frac{RSD_R(\text{gemessen})}{RSD_R(\text{Horwitz})}$$

6.2 Charakterisierung von Referenzmaterial bzw. Vergleichsmaterial

Ein Referenzmaterial ist ein Material, dessen Eigenschaft(en) mit einer validierten Methode bestätigt wurde(n), so dass es zur Kalibrierung eines Gerätes oder zur Überprüfung einer Messmethode verwendet werden kann. Vergleichs- bzw. Referenzmaterialien dienen zur Erhöhung der Zuverlässigkeit und der Verbesserung der Vergleichbarkeit analytischer Resultate (z.B. für Qualitätssicherungssysteme im Rahmen der Akkreditierung von Laboratorien gemäß ISO 17025).

Für die Herstellung von Vergleichsmaterial wurden Produkte des Handels herangezogen. Für das DON-Vergleichsmaterial (DON 311) wurden Vollkorn-Hartweizennudeln (aus 100 % Durum-Weizen) und für das ZEA Vergleichsmaterial (ZEA 185) wurden Mais-Knusperflakes ausgewählt. Von diesen wurden jeweils 5 kg einer Charge (entspricht 10 Packungen à 500 g) vereinigt und in einer Mühle zerkleinert und homogenisiert. Diese Homogenmaterialien wurden jeweils in einem 10 L Kunststoff-Container bei Umgebungstemperatur aufbewahrt.

6.2.1 Homogenität der Vergleichsmaterialien

Zur Überprüfung der Homogenität wurden aus den genannten Containern für DON 311 zwölf und für ZEA 185 zehn 20 g Einheiten als Labor-Teilproben entnommen und durch das jeweilige validierte Routineverfahren (siehe Abschnitt 5.8.1 und Abschnitt 5.8.2) untersucht. Jeder Extrakt wurde zweimal analysiert (A und B). Unter Berücksichtigung der Wiederholbarkeit der angewandten Analysemethoden wurde die Homogenität der Vergleichsmaterialien durch einen Horrat-Wert von 0,6 für DON 311 und 0,8 für ZEA 185 belegt (Tab. 20).

Tab. 20: Prüfung auf Homogenität der DON- bzw. ZEA-Vergleichsmaterialien

		DON 311 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]		ZEA 185 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	
		A	B	A	B
		373,3	374,0	34,3	35,3
		349,0	351,0	26,2	27,6
		323,0	322,5	33,9	34,7
		299,0	298,0	25,3	27,2
		373,5	372,5	16,9	17,7
		329,5	328,0	30,5	31,0
		428,0	429,5	24,4	26,0
		398,0	400,5	34,0	34,4
		408,0	407,5	31,1	33,1
		414,0	415,0	19,9	20,4
		406,0	408,0		
		341,5	347,0		
Mittelwert	[$\mu\text{g}/\text{kg}$]	370,7		28,2	
Median	[$\mu\text{g}/\text{kg}$]	373,3		29,0	
Spannweite	[$\mu\text{g}/\text{kg}$]	130,2		18,4	
R	[$\mu\text{g}/\text{kg}$]	117,6		17,3	
sr	[$\mu\text{g}/\text{kg}$]	41,5		6,1	
RSDr	[%]	11,2		21,6	
sr (Horwitz)	[$\mu\text{g}/\text{kg}$]	68,9		7,7	
RSDr (Horwitz)	[%]	18,6		27,4	
Hor		0,6		0,8	

Für die Qualitätskontrollkarten der Stabilitätsuntersuchungen, Methodvalidierungen und Laborvergleichsuntersuchungen wurden zur Berechnung der Grundkenndaten der Vergleichsmaterialien eine Vorperiode für DON 311 von 12 und für ZEA 185 von 10 Wertepaaren (jeder Extrakt wurde zweifach analysiert) für die Berechnung der Mittelwertlinie (μ), der zweifachen ($2s$ Bereich; $\mu \pm 2s$) und dreifachen ($3s$ Bereich; $\mu \pm 3s$) Standardabweichung zugrunde gelegt.

6.2.2 Stabilitätsuntersuchungen der Vergleichsmaterialien

Die Stabilitätsuntersuchungen der Vergleichsmaterialien waren in die routinemäßige Bearbeitung des Verbundforschungsvorhabens eingebunden und wurden monatlich durchgeführt. Die folgenden Abbildungen zeigen die Qualitätskontrollkarten zu den Stabilitätsuntersuchungen für die Vergleichsmaterialien für DON und ZEA.

Abb. 17 : Qualitätskontrollkarte zur Stabilitätsuntersuchung des Vergleichsmaterials ZEA 185

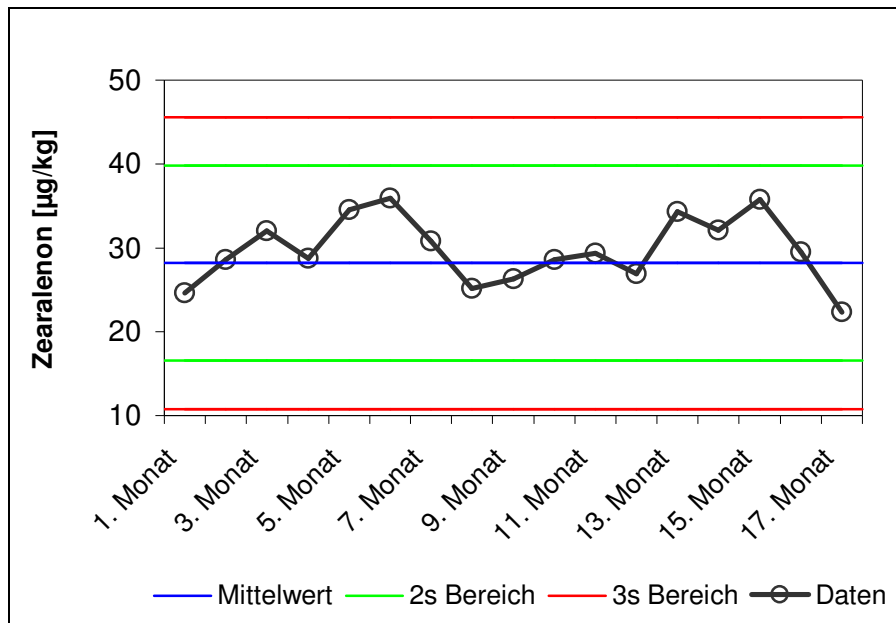
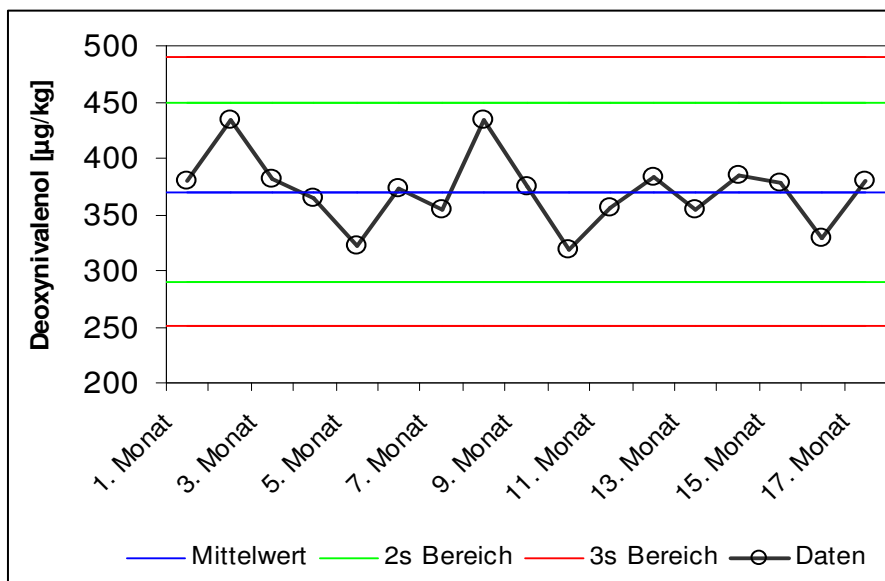


Abb. 18: Qualitätskontrollkarte zur Stabilitätsuntersuchung des Vergleichsmaterials DON 311

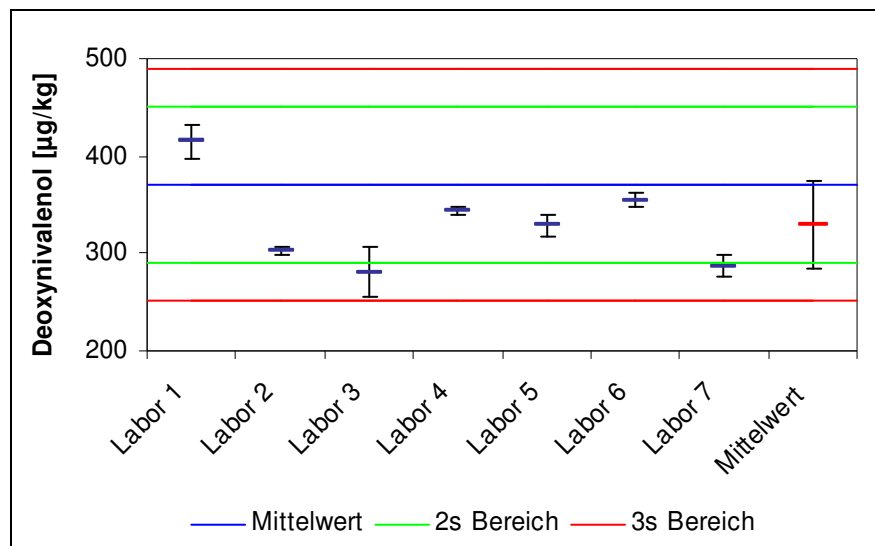


Über einen Zeitraum von eineinhalb Jahren wurde die Stabilität der Vergleichsmaterialien verfolgt (Abb. 18 und Abb. 19). Dabei wurde in beiden Materialien kein auffälliger Trend wie Abbau der Analyten beobachtet. Somit konnte das Vergleichsmaterials DON 311 und ZEA 185 zu hausinternen Methodenentwicklungen, Kreuzvalidierung von Methoden und Laborvergleichsuntersuchungen eingesetzt werden.

6.2.3 Externe Validierung des Deoxynivalenol-Vergleichsmaterials

Bei dem Vergleichsmaterial DON 311 handelte es sich um eine Vollkorn-Teigware. Wie aus den Voruntersuchungen hervorging, lag die mittlere DON-Konzentration bei 370,2 µg/kg.

Abb. 19: Qualitätskontrollkarte zu den Laborvergleichsuntersuchungen des Vergleichsmaterials DON 311



Tab. 21: Zusammenfassung der Ergebnisse der Laborvergleichsuntersuchung mit Vergleichsmaterial DON 311 (n = 7)

DON [µg/kg]							
	Analyse 1		Analyse 2		MW	s	RSD
	A	B	A	B	[µg/kg]	[µg/kg]	[%]
Labor 1	410,0	411,0	420,0	419,0	415,0	4,5	1,1
Labor 2	324,2	316,2	284,6	283,9	302,2	18,2	6,0
Labor 3	298,0	282,0	266,0	278,0	281,0	11,4	4,1
Labor 4	339,0	336,0	343,0	355,0	343,3	7,2	2,1
Labor 5	300,1	307,2	354,3	352,2	328,4	24,9	7,6
Labor 6	346,7	356,9	356,7	356,9	354,3	4,4	1,2
Labor 7	294,4	298,4	270,1	284,3	286,8	10,9	3,8
n	7						
Mittelwert	[µg/kg]		330,1				
Median	[µg/kg]		330,1				
R	[µg/kg]		44,5				
s _r	[µg/kg]		15,7				
RSD _r	[%]		4,8				
R	[µg/kg]		137,3				
S _R	[µg/kg]		48,5				
RSD _R	[%]		14,7				
SR (Horwitz)	[µg/kg]		62,41				
RSD _R (Horwitz)	[%]		18,90				
HO _R			0,8				

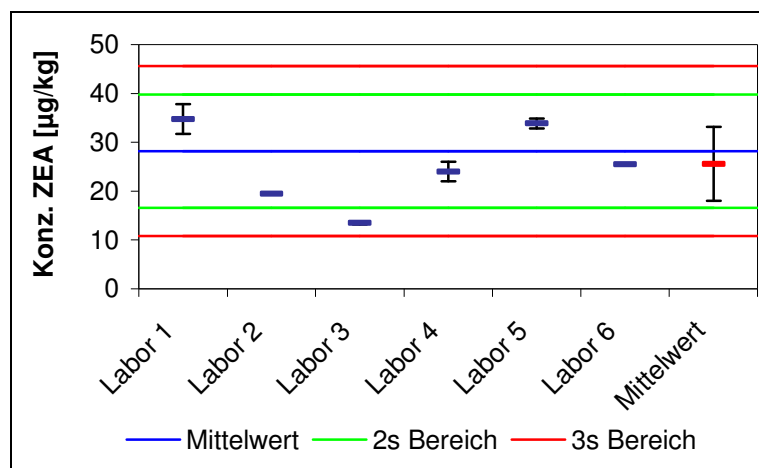
Wie Tab. 21 und Abb. 19 zeigen, lag der Mittelwert aller Mittelwerte der teilnehmenden Laboratorien innerhalb des ermittelten Vertrauensbereiches bei 330,1 µg/kg. Die Werte aller teilnehmenden Laboratorien lagen innerhalb des 2 s Streubereichs, ausgenommen Labor 3 und 7. Diese lagen zwischen dem unteren 2 s- und 3 s-Streubereich. Somit kann die Homogenität des Vergleichsmaterials festgestellt werden. Weiterhin zeigen diese Ergebnisse, dass die eingesetzte Analytik innerhalb des VFV im Rahmen der vorgegebenen Streuung annähernd gleiche Ergebnisse liefern. Ein Horrat-Wert von 0,8 zeigt eine zufriedenstellende Zwischen-Labor-Genauigkeit.

6.2.4 Externe Validierung des Zearalenon-Vergleichsmaterials

Die am Verbundforschungsvorhaben teilnehmenden Laboratorien bestimmten für die Charakterisierung bzw. externe Validierung die ZEA-Konzentrationen des vorliegenden Vergleichsmaterials. Bei dem Vergleichsmaterial ZEA 185 handelt es sich um Knusperflakes, einer Matrix, der extrudierter Maisgrieß zu Grunde lag. Wie aus den Voruntersuchungen hervorgeht, lag die mittlere ZEA-Konzentration bei 28,2 µg/kg.

Wie Tab. 22 und Abb. 20 zeigen, lag der Mittelwert aller Mittelwerte der teilnehmenden Laboratorien bei 25,2 µg/kg. Die Werte aller teilnehmenden Laboratorien lagen innerhalb des 2 s Streubereichs, ausgenommen Labor 3. Somit kann die Homogenität des Vergleichsmaterials festgestellt werden. Weiterhin zeigen diese Ergebnisse, dass die eingesetzten Analyseverfahren innerhalb des VFV im Rahmen der vorgegebenen Streuung gleiche Ergebnisse liefern. Ein Horrat-Wert von kleiner zwei (hier 1,2) weist auf eine zufriedenstellende Zwischen-Labor-Genauigkeit hin.

Abb. 20: Qualitätskontrollkarte der Laborvergleichsuntersuchung des Vergleichsmaterials ZEA 185



6.2.5 Laborvergleichsuntersuchungen

Über den Zeitraum des Verbundforschungsvorhabens wurden halbjährlich Laborvergleichsuntersuchungen für DON und ZEA durchgeführt. Dieses Vorgehen wurde eingeführt, um eine ständige Qualitätskontrolle der teilnehmenden Laboratorien und um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse für die abschließende Risikoabschätzung zu gewährleisten. Für die Laborvergleichsuntersuchungen wurden unterschiedliche, analyttypische natürlich kontaminierte Matrices über einen breiten Konzentrationsbereich herangezogen.

Tab. 22: Zusammenfassung der Ergebnisse der Laborvergleichsuntersuchung des Vergleichsmaterials ZEA 185 (n = 6)

ZEA [$\mu\text{g}/\text{kg}$]		Analyse 1		Analyse 2		MW	s	RSD
		A	B	A	B	[$\mu\text{g}/\text{kg}$]	[$\mu\text{g}/\text{kg}$]	[%]
Labor 1		33,0	31,0	36,0	39,0	34,8	0,1	0,6
Labor 2		19,6	19,4	19,4	19,3	19,4	3,0	8,7
Labor 3		14,0	13,2	13,5	13,10	13,5	0,3	2,6
Labor 4		22,0		26,0		24,0	2,0	8,3
Labor 5		34,3	32,1	34,8	34,2	33,9	0,0	0,0
Labor 6		25,5	25,5	25,5	25,5	25,5	1,0	3,1
n		6						
Mittelwert	[$\mu\text{g}/\text{kg}$]	25,2						
Median	[$\mu\text{g}/\text{kg}$]	25,5						
R	[$\mu\text{g}/\text{kg}$]	5,0						
s_r	[$\mu\text{g}/\text{kg}$]	1,8						
RSD_r	[%]	7,1						
R	[$\mu\text{g}/\text{kg}$]	24,8						
s_R	[$\mu\text{g}/\text{kg}$]	8,7						
RSD_R	[%]	34,4						
s_R (Horwitz)	[$\mu\text{g}/\text{kg}$]	7,0						
RSD_R (Horwitz)	[%]	27,8						
Ho_r		1,2						

In den Tab. 23 und Tab. 24 sind die aus dem Verbundforschungsvorhaben resultierenden RSD_r und RSD_R literaturbekannten Ringversuchs- bzw. Laborvergleichsuntersuchungsdaten gegenübergestellt. Eine detaillierte Darstellung der Ergebnisse der Laborvergleichsuntersuchungen aus dem Verbundforschungsvorhaben ist im Anhang in Tab. A-7 und Tab. A-8 (Anhang, Abschnitt III) zusammengestellt.

Die aufgeführten Matrizes decken dabei einen breiten Produktgruppenbereich ab. Damit wurde sichergestellt, dass die unterschiedlichen Verfahren für ein breites Matrixspektrum einsatzfähig waren und im Rahmen der jeweiligen Streuung annähernd gleiche Ergebnisse lieferten. Die erzielten RSD_r und RSD_R des VFV resultierten aus unterschiedlichsten Verfahren wie ELISA, HPLC-UV/VIS, HPLC-FLD (DON-Derivatisierung) und LC-MS/MS mit unterschiedlichen methodenspezifischen Extraktions- und Aufreinigungstechniken.

Die ermittelten RSD_R des Verbundforschungsvorhabens liegen zwischen 16,9 % bis 35,0 % und somit innerhalb der geforderten 40 % (Richtlinie 2005/38/EG). Diese relativ hohe Variabilität kann durch die unterschiedlich angewandten Methoden wie ELISA, HPLC-UV und LC-MS/MS erklärt werden. Die resultierten RSD_r des Verbundforschungsvorhabens liegen bis auf zwei Probenmatrizes (Kinderkekse und Nudeln) ebenfalls innerhalb der geforderten 20 %.

Tab. 23: Wiederhol- und Vergleichsstandardabweichungen unterschiedlicher Ringversuche bzw. Laborvergleichsuntersuchungen für DON

Literatur	Matrix	n	Mittelwert aller Mittelwerte	RSDr [%]	RSDR [%]
Gilbert et al. (1992)	Weizen-Extrakt	12	1,5 µg/mL	7	14
	Weizen	15	618 µg/kg	8	25
	Mais	13	566 µg/kg	9	28
	Weizen	15	541 µg/kg	9	8
	Mais	15	363 µg/kg	13	25
	Weizen	6	673 µg/kg	5	1
Ware et al. (1986)	Mais	6	42 µg/kg	8	7
	Weizen	9	120 µg/kg	48	52
Petterson (1995)	Weizen	9	447 µg/kg	25	31
	Weizen	9	675 µg/kg	23	41
	Weizen	9	266 µg/kg	30	54
	Weizen	9	637 µg/kg	31	41
	Gerste	10	824 µg/kg	-	45
Schumacher et al. (1997)	Hafer	10	56 µg/kg	16	68
	Hafer	10	161 µg/kg	37	37
	Lösung	8	10 µg/mL	-	21
Food Standard Agency (2005)	Hafermehl	10	1768 µg/kg	3,1	13,8
	Reismehl	11	457 µg/kg	6,5	11,5
	Reismehl	10	85 µg/kg	14,1	14,8
	Weizenmehl	12	678 µg/kg	6,0	16,3
	Polenta	11	123 µg/kg	6,4	23,1
VFV HS055	Frühstückszerealien	12	217 µg/kg	13,2	26,3
	Vollkorn-Nudeln	6	371 µg/kg	7,1	34,4
	Vollkornweizenmehl	6	106 µg/kg	9,2	20
	Vollkornweizenmehl	6	108 µg/kg	12,4	19,2
	Weizenmehl Typ 405	6	257 µg/kg	6,8	22,3
	Nudeln	6	231 µg/kg	14,4	17,7
	Kinderkeks	6	285 µg/kg	20,7	31,9
	Nudeln	6	155 µg/kg	21	35
	Weizenmehl Typ 405	6	398 µg/kg	10,5	16,9
Vollkorn-Nudeln	6	890 µg/kg	14,3	28,7	
Vollkornweizenmehl	7	1040 µg/kg	7,1	13,3	

Tab. 24: Wiederhol- und Vergleichsstandardabweichungen unterschiedlicher Ringversuche bzw. Laborvergleichsuntersuchungen für ZEA

Literatur	Matrix	n	Mittelwert aller Mittelwerte [µg/kg]	RSDr [%]	RSDR [%]
Bennet et al. (1985)	Mais	11	114	-	12,8
		10	591	-	22,4
		10	2910	-	32,5
		9	3008	-	41,2
		11	256	-	37,1
Josephs et al. (2001)	Mais	28	73	-	41,0
		28	291	-	41,0
§ 35 LMBG Methoden	Roggenmehl	15	24	10,7	17,6
		16	56	10,7	20,4
		15	84	14,4	20,7
	Weizenmehl	15	26	9,6	20,8
		15	57	4,0	21,0
		16	107	9,6	21,8
VFV HS055	Mais-Chips	6	41	10,3	28,7
	Maismehl	6	13	18,9	57,6
	Vollkornweizenmehl	6	23	7,0	14,4
	Knusperflakes	6	25	7,1	34,4
	Müsli	6	19	6,3	23,2
	Maisgrieß	6	37	9,3	22,9
	Vollkornweizenmehl	6	55	7,6	17,0
	Knusperflakes	6	6	21,7	33,3
Weizenmehl Typ 405	6	3	9,7	35,5	

Stellvertretend für das Verbundforschungsvorhaben nahm das BfR an dem internationalen Ringversuch der Food Standard Agency (FSA) zur Validierung einer DON-Methode für einen Konzentrationsbereich von 100 - 2000 µg/kg in Getreide- und Getreideerzeugnissen teil (siehe Abschnitt 6.12.1). Die dabei erzielten Wiederhol- und Vergleichsstandardabweichungen erfüllten ebenfalls die Leistungskriterien nach Richtlinie 2005/38/EG. Für die Herstellung von Referenzmaterial (Weizen und Mais) wurden in der BCR-Studie von GILBERT ET AL. (1992) HPLC- und GC-Methoden eingesetzt. Dabei wurden ebenfalls zufriedenstellende Ergebnisse erzielt. Die Untersuchungen von PETERSSON (1995) zeigten hingegen eine sehr hohe Varianz der Ergebnisse. Dies wurde auf erhebliche Probleme während der Derivatisierung für die gaschromatographische Bestimmung zurückgeführt.

Die Untersuchungen von BENNETT ET AL. (1985) stützten sich auf HPLC-FLD Bestimmungen von ZEA in Mais (sowohl natürlich kontaminiert als auch aufgestockte Proben) in einem Konzentrationsbereich von 50 - 4000 ng/g. Für ZEA wurden Wiederfindungen von 77,8 % (1000 ng/g) bis 123 % (50 ng/g) bestimmt. Drei Laboratorien berichteten weiterhin von falsch positiven ZEA-Befunden. In den Untersuchungen von JOSEPHS ET AL. (2001) wurden ebenfalls unterschiedliche Methoden zur ZEA-Bestimmung in Mais eingesetzt und resultierten in RSD_R von 41 %.

In der § 35 LMBG Methoden zur Bestimmung von ZEA in Getreide- und Getreideerzeugnissen des damaligen BgVV (heute BfR bzw. BVL) wurden natürlich kontaminierte Weizen- und Roggenmehlproben in einem Konzentrationsbereich von 20 bis 100 µg/kg eingesetzt.

Im Rahmen der Laborvergleichsuntersuchungen des VFV wurden unterschiedliche Matrices in einem Konzentrationsbereich von 3,1 bis 55,3 µg/kg untersucht. Dabei lagen die erzielten Wiederholstandardabweichungen innerhalb der geforderten 50 % (für Konzentrationen kleiner 50 µg/kg) bzw. 40 % (für Konzentrationen größer als 50 µg/kg) (Richtlinie 2005/38/EG). Die Vergleichsstandardabweichungen lagen bis auf eine Maismehlprobe (57,6 %) innerhalb der beschriebenen Leistungskriterien ($RSD_R \leq 50$ %). Dabei zeigen die RSD_R des VFV eine große Varianz von 14,4 bis 57,6 %, was wiederum auf die unterschiedlichen Methoden (ELISA, HPLC-FLD und LC-MS/MS), die diversen komplex zusammengesetzten Matrices und den relativ geringen Konzentrationen (bis in den Bereich der NWG) zurückzuführen war. Beim Vergleich dieser RSD_R mit den Ergebnissen der § 35 LMBG Methode konnte in einem Bereich von 17,6 bis 21,8 % eine geringere Varianz festgestellt werden. Dies war auf die einheitlich vorgeschriebene Methodik und einen Konzentrationsbereich von 20 bis 100 µg/kg zurückzuführen.

6.3 Probenhomogenität: Verteilung der Partikelgröße

WHITAKER ET AL. (1974, 1983 und 1994) konnten in unterschiedlichen Untersuchungen zeigen, dass die Varianz der Aflatoxin-Ergebnisse für Mais, Erdnüsse und Baumwollsaamen sehr groß ist. WHITAKER ET AL. (2000) und (2002) zeigten bei DON-Untersuchungen an Weizen, dass die Varianz der Untersuchungsergebnisse signifikant niedriger lagen, als die oben beschriebenen Ergebnisse der Aflatoxin-Analytik. Dieser Umstand wurde durch die unterschiedliche Verteilung der kontaminierten Kerne mit den genannten Mykotoxinen in dem jeweiligen Probengut erklärt.

In weiteren Untersuchungen bestimmten WHITAKER ET AL. (2000) den Einfluss der Probenmenge der Gesamtprobe, Sub-Proben und die Anzahl der Probennahme-Anteile auf die Reduzierung der Varianz auf die DON-Ergebnisse bei einer vorgelegten 0,454 kg Probe mit einer relativen Standardabweichung von 13,4 % der DON-Analyse bei einer Konzentration von 5 mg/kg. Die relative Standardabweichung bezogen auf Probennahme, Probenbearbeitung und Analyse wurde mit 6,3 %, 10,0 % und 6,3 % bestimmt. Demzufolge stellte bei die-

sen Untersuchungen mit einer Probenmenge von 0,454 kg die Probeninhomogenität den geringsten Anteil an dem gesamten Fehler dar (WHITAKER ET AL. (2002)).

Bei der Probennahme werden ausgehend von einer Gesamtprobe sogenannte Sub-Proben (Unter-Proben) entnommen und führen letztendlich zu einer Labor-Teilprobe. Das analytisch-chemisch determinierte Begriffspaar *Inhomogenität-Homogenität* wird definiert durch eine statistisch bedingte Konzentrationsfunktion. Unter inhomogenen Materialien versteht man Stoffe, deren chemische Zusammensetzung in Teilportionen von Feststoffen (Schüttgut, körnige oder pulverförmige Stoffe), also in räumlichen Dimensionen, nicht konstant ist. Für die Probennahme ist wesentlich, dass Inhomogenitäten als reale Konzentrationsunterschiede nur dann nachgewiesen werden können, wenn sie den Analysenfehler überschreiten (DANZER ET AL. (2001)).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Siebuntersuchungen beispielhaft an DON-kontaminierten Materialien durchgeführt, um das mechanische Schüttgutverhalten der zuvor homogen hergestellten Labor-Teilprobe zu charakterisieren. Durch leichte Erschütterung und Bewegungen der dispersen Labor-Teilprobe kann es sowohl während der Lagerung als auch in Vorbereitung auf die Analyse zu einem Partikelgrößengradient innerhalb des jeweiligen Lagergefäßes kommen. Die Siebuntersuchungen wurden mit einer Siebmaschine der Fa. RETSCH® durchgeführt. Dabei wurden die Siebböden mit den Maschenweiten 45 µm, 63 µm, 125 µm, 250 µm, 500 µm und 1000 µm eingesetzt. Jeder Siebvorgang wurde mit 100 g Probe durchgeführt, wobei die nachstehenden Geräteeinstellungen für den Siebvorgang festgelegt wurden:

Tab. 25: Definierte Geräteeinstellungen für die Siebmaschine der Fa. RETSCH®

Zeit	90 Minuten
Amplitude	90
Intervall	ja
Intervalldauer	10 Sekunden

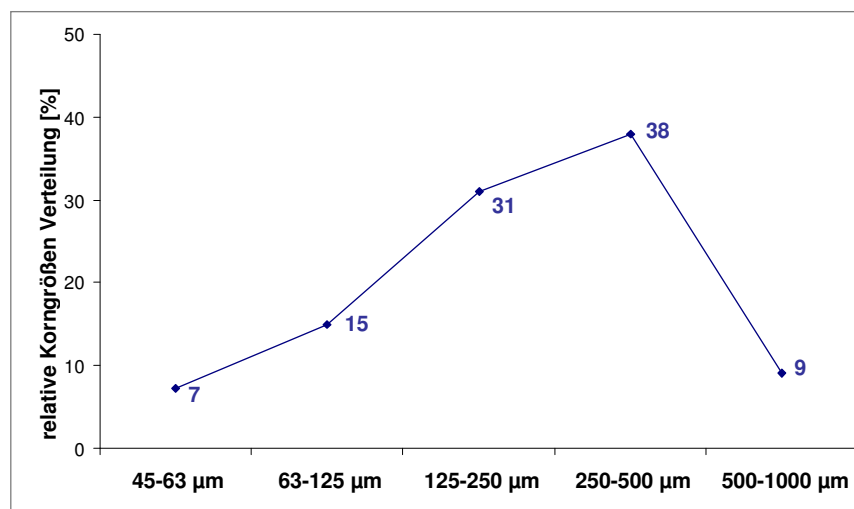
Für die Untersuchung der Partikelgrößenverteilung in einer Labor-Teilprobe wurde zum einen DON 311 und zum anderen ein handelsüblicher Maisgrieß herangezogen. Die Maisgrießprobe wurde als Untersuchungsgut ausgewählt, da dieses einen breiten Partikelgrößenbereich aufwies. Eine weitere Verarbeitung des Maisgrießes durch die Zentrifugalmühle führte zu einer sichtbaren Verschiebung des genannten Partikelgrößenbereichs (siehe Abb. 23). Die Proben wurden in der handelsüblichen Angebotsform der RETSCH® Zentrifugalmühle zugeführt. Die vorherige Vermahlung der Proben erfolgte mittels Distanz-Ringsieb mit einer Lochweite von 1.000 µm. Somit wurde gewährleistet, dass die Labor-Teilproben eine Partikelgröße von ≤ 1.000 µm aufwiesen.

6.3.1 Siebuntersuchung des Deoxynivalenol Vergleichsmaterials

Wie aus nachstehender Abbildung ersichtlich, lagen 84 % der homogenisierten Labor-Teilprobe DON 311 im Bereich zwischen 63 bis 500 µm vor.

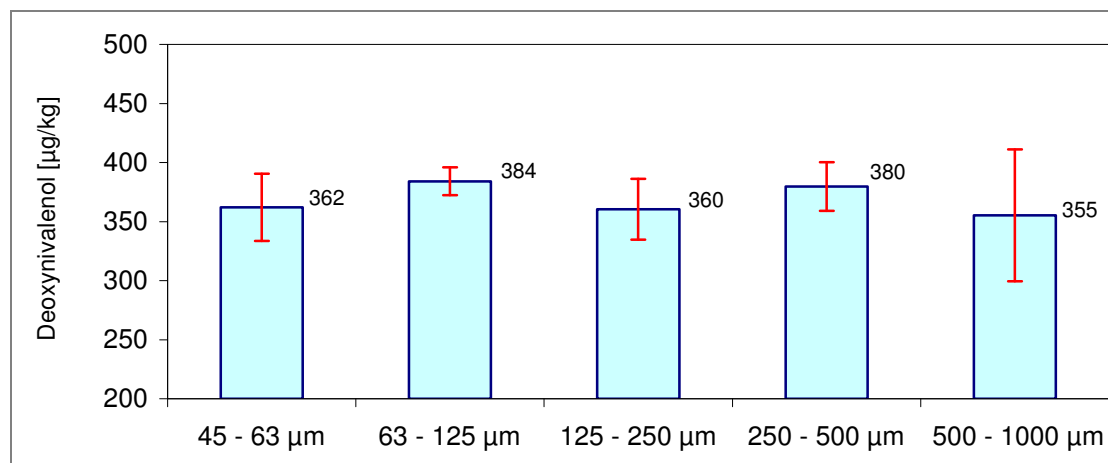
Die Partikelgrößenverteilung (Abb. 21) des homogenisierten DON-Vergleichsmaterials zeigt eine deutlich rechtsschiefe Verteilung. In nachfolgender Abb. 22 sind die DON-Konzentrationen der einzelnen Siebfraktionen mit den resultierenden RSD_r -Fehlerbalken dargestellt.

Abb. 21: Verteilung der Partikelgröße von DON 311 nach Zerkleinerung und Homogenisierung mittels RETSCH® Zentrifugalmühle (n = 3)



Alle Siebfraktionen weisen eine DON-Konzentration (Abb. 22) im Bereich des mittleren DON-Gehaltes auf. Die Streuung der Fehler liegt innerhalb der vorgegebenen Fehlergrenzen. Somit kann das Vergleichsmaterial über den fraktionierten Partikelgrößenbereich als homogen angesehen werden. Die relativen Standardabweichungen der DON-Analysen der unterschiedlichen Siebfraktionen lagen zwischen 3 - 16 %. Werden diese mit der relativen Standardabweichung von 11,3 % (n = 12) aus der Vorperiode (siehe Abschnitt 6.2.1) verglichen, so wurde kein signifikanter, auf Inhomogenität der Siebfraktion zurückzuführender Unterschied festgestellt.

Abb. 22: Verteilung der DON-Konzentrationen der einzelnen Siebfraktionen des Vergleichsmaterials DON 311 (n = 3) nach Zerkleinerung und Homogenisierung mittels RETSCH® Zentrifugalmühle



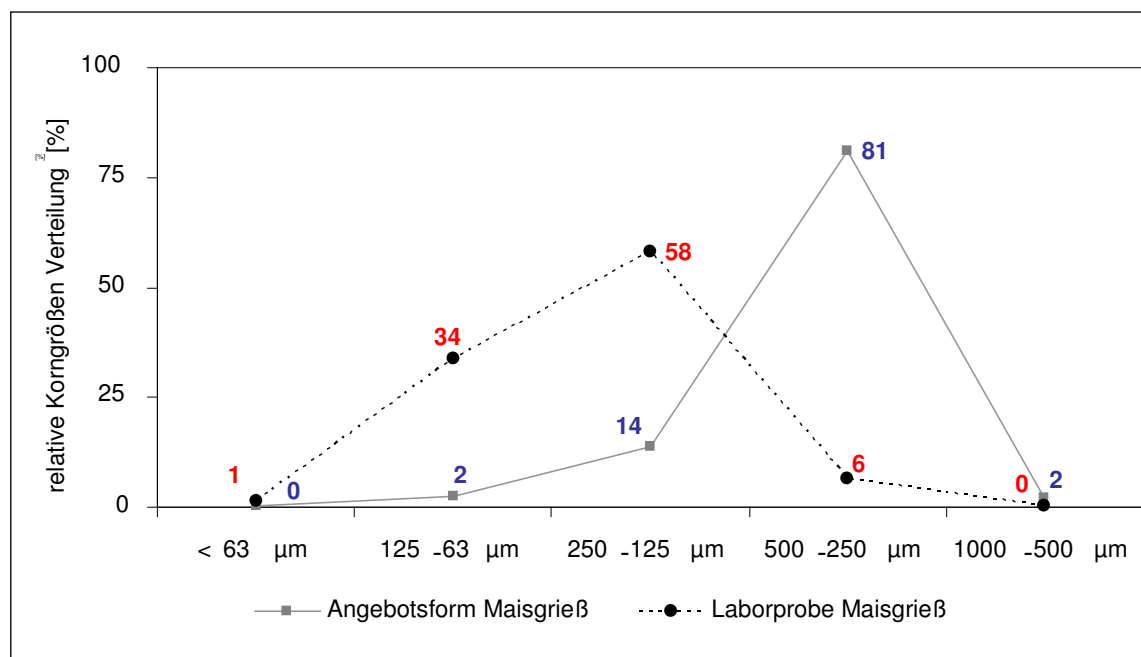
Es bleibt zu diskutieren, dass die Siebfraktionen 45 - 63 µm, 63 - 125 µm, 125 - 250 µm und 250 - 500 µm deutlich geringere relative Standardabweichungen aufwiesen als die Siebfraktion 500 - 1000 µm bzw. zu der in der Vorperiode erhaltenen relativen Standardabweichung. Dieser Umstand kann auf die enger gefassten Partikelgrößenbereiche und der damit verbundenen Extraktionseigenschaften der jeweiligen Siebfraktion zurückzuführen sein. Es ist somit belegbar, dass eine Reduktion der Streuung des gesamten Analysenfehlers durch einen definierten Vermahlungsgrad mit einer Zentrifugalmühle mit einer bestimmten Feinheit (z. B. 500 µm) erreicht werden kann.

6.3.2 Siebuntersuchung einer handelsüblichen Maisgrieß-Probe

Um auch einen Bezug für die im Einzelhandel durchgeführten Einzelpackungsbeprobungen zu ermitteln, wurde ein handelsüblicher Maisgrieß für die weitergehenden Untersuchungen der Partikelgrößen-Verteilung eingesetzt. Entsprechend der oben aufgeführten Siebparameter wurde sowohl die Angebotsform des Maisgrießes als auch die nach Vermahlung mittels Zentrifugalmühle erhaltene Labor-Teilprobe jeweils dreifach der Siebanalyse zugeführt.

Wie aus nachstehender Abb. 23 ersichtlich, liegen 95 % der Angebotsform (durchgezogene Funktion) im Bereich zwischen 125 - 500 µm vor. 98 % der vermahlenden und homogenisierten Labor-Teilprobe (gestrichelte Funktion) liegen in einem Bereich zwischen 63 - 500 µm vor.

Abb. 23: Relative Verteilung der Partikelgröße einer Maisgrieß-Probe in der handelsüblichen Angebotsform und nach Vermahlung und Homogenisierung mittels RETSCH® Zentrifugalmühle (n = 3)



Nachstehende Tab. 26 stellt die Verteilung der unterschiedlichen Partikelgrößen einer Maisgrieß-Probe in der handelsüblichen Angebotsform und der homogenisierten Labor-Teilprobe gegenüber.

Tab. 26: Gegenüberstellung der Partikelgrößen einer Maisgrieß-Probe in der handelsüblichen Angebotsform und der homogenisierten Labor-Teilprobe (n = 3)

	Angebotsform	Labor-Teilprobe		
	Mittelwert [µg/kg]	RSDr [%]	Mittelwert [µg/kg]	RSDr [%]
ungesiebt	194,7	15,2	213,2	9,9
1.000 - 500 µm	155,4	46,4	-*	-*
500 - 250 µm	127,8	20,7	179,8	11,0
250 - 125 µm	264,5	7,2	205,4	7,4
125 - 63 µm	215,9	17,0	201,5	9,2
Gesamt	191,7	27,7	200,0	7,2

* Die Ausbeute der Siebfraktion war zu gering.

Werden die Mittelwerte (Gesamt) der handelsüblichen Angebotsform und der Labor-Teilprobe Maisgrieß verglichen, so ist festzustellen, dass unter Berücksichtigung der ermittelten Varianz ein nahezu gleicher DON-Gehalt in der belassenen und der zerklei-

nerth/homogenisierten Probe von ca. 200 µg/kg bestimmt wurde. Die Mittelwerte der unterschiedlichen Siebfraktionen der Angebotsform teilen sich in zwei Partikelgrößenbereiche: Einerseits in den Partikelgrößenbereich 1000 - 250 µm mit Konzentrationen im Bereich von 150 µg/kg, andererseits in den Partikelgrößenbereich 250 - 63 µm mit Konzentrationen im Bereich von 250 µg/kg. Werden die relativen Standardabweichungen betrachtet, so konnte bei dem handelsüblich vorliegenden Maisgrieß in nahezu allen Siebfraktionen (außer Fraktion 250-125 µm) eine erhöhte RSD festgestellt werden. Die RSD in den unterschiedlichen Fraktionen der Labor-Teilprobe unterlagen keinen signifikanten Schwankungen (zwischen 9,2 bis 11,0 %). Daraus lässt sich die Notwendigkeit ableiten, dass selbst bei Matrices, die eine Partikelgrößenverteilung unter 1000 µm (wie das Beispiel Maisgrieß zeigt, siehe Abb. 22) besitzen, einer weiteren Vermahlung und Homogenisierung im Labormaßstab zu unterziehen sind, um eine homogene Toxinverteilung bezogen auf die Partikelgrößenverteilung zu gewährleisten.

Weiterhin ist darauf hinzuweisen, dass durch das Vermahlen einer Probe mittels Zentrifugalmühle mit einer Lochweite von 1000 µm eine einheitliche Partikelgrößen-Verteilung erzielt wurde, die das daraus resultierende Quellvermögen standardisiert. In Bezug auf das jeweilige Extraktionsmittel kann somit ein gleichmäßiger Übergang (Extraktionseffizienz) des Analyten von der Matrix in die Lösungsmittelphase gewährleistet werden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass nach der Vermahlung mittels einer Zentrifugalmühle durch ein Distanz-Ringsieb mit einer Lochweite von 1000 µm die resultierende Partikelgrößen-Verteilung eine zufriedenstellende Homogenität in der Untersuchungsprobe garantiert. Werden diese Untersuchungen im Hinblick auf durchzuführende Vergleichsuntersuchungen und Ringversuche ausgewertet, so ist festzuhalten, dass durch geeignete Standardisierung der Partikelgrößenverteilung die Gefahr der Entmischung der Probe durch mechanische Einflüsse der Teilchendispersion wie durch Segregation durch Erschütterungen beim Transport und der damit ggf. verbundenen Toxin-Umverteilung, entgegengewirkt werden kann. Diese Feststellung kann durch die durchgeführten Vergleichsuntersuchungen mit DON 311 belegt werden, da die Ergebnisse der teilnehmenden Laboratorien ebenfalls im Bereich des bestimmten Mittelwerts (Tab. 21 und Abb. 20) liegen. Dabei besitzen die einzelnen Laboratorien relative Standardabweichungen im Bereich zwischen 1,1 bis 7,6 %.

6.4 Kreuzreaktivität in der Immunoaffinitätschromatographie

DIETRICH ET AL. (1995) charakterisierten aus einer Hybridom-Zellkultur stammende monoklonale Antikörper u.a. für ZEA, T-2 Toxin, DAS, 3-AcDON und Fus X und verglichen diesbezüglich ihrer Eigenschaften mit polyklonalen Antikörpern. Dabei wurde die Spezifität der monoklonalen ZEA-Antikörper eine Kreuzreaktivität gegenüber ZAN (182,7 %), α-ZAL (82,9 %), β-ZAL (74,1 %), α-ZOL (133,7 %) und β-ZOL (24,5 %) festgestellt. Die T-2 Toxin-Antikörper zeigen eine Kreuzreaktivität gegenüber Acetyl T-2 Toxin (114 %) und HT-2 Toxin (0,7 %).

CHU ET AL. (1979) entwickelten polyklonale T-2 Toxin-Antikörper nach Immunisierung von Hasen mit Rinderserumalbumin-T-2-hemisuccinat. Die gewonnenen Antikörper zeigten eine große Bindungsaffinität gegenüber T-2 Toxin, geringere gegenüber HT-2 Toxin und geringste gegenüber T-2 Triol. Kreuzreaktionen dieser Antikörper gegen NEO, T-2 Tetraol, 8-Acetyl-NEO waren nur sehr schwach. Für DAS, Trichodermin, DON und Verrucaric A zeigten diese keine Kreuzreaktionen. Die Empfindlichkeit dieses Assays lag in einem Bereich von 1 - 20 ng Analyt pro Kilogramm.

Hinsichtlich einer Multitoxin-Analytik war es daher für die vorliegende Arbeit wichtig, die Kreuzreaktivität der verwendeten IAC-Säulen zu charakterisieren.

Die zurzeit kommerziell verfügbaren DON-, T-2 Toxin- und ZEA-IAC-Säulen wurden auf die Fähigkeit getestet, mit weiteren Fusarientoxinen oben beschriebene Kreuzreaktivitäten einzugehen.

Für diese Untersuchungen wurden Toxin-Standardlösungen mit den entsprechenden Pufferlösungen (bezogen auf die jeweiligen Herstellerangaben) verdünnt und direkt (ohne Anwesenheit von Matrix) auf die IAC appliziert. Neben diesen direkten Aufgaben wurden diese Untersuchungen in bestimmten Fällen auch in Anwesenheit von Matrix durchgeführt, um eine routinemäßige Analysentauglichkeit einer eventuell vorhandenen Kreuzreaktivität zu belegen.

6.4.1 Deoxynivalenol Immunoaffinitätschromatographie-Säulen

In nachfolgender Tabelle sind die Wiederfindungsergebnisse der Kreuzreaktivität Untersuchungen zwischen verschiedenen DON-IAC-Säulen und De-epoxy-DON (DOM-1) wiedergegeben.

Tab. 27: Untersuchung der Kreuzreaktivität von DOM-1 an DON-IAC-Säulen (n = 2)

DON IAC	Konz. [µg/kg]	DOM-1 Wdf. [%]	
Biopharm®	200	104	108
VICAM®	200	57	56,5

Nach Tab. 27 wurde bei Biopharm® IAC-Säulen DOM-1 zu 100 % zurückgehalten. Dahingegen zeigten die VICAM® IAC-Säulen geringere Wiederfindungen im Bereich von 57 %. Somit ließ sich feststellen, dass der Zielanalyt DON in den VICAM® IAC-Säulen eingesetzten Antikörper spezifischer gebunden wurde als das in den Biopharm® IAC-Säulen der Fall war. Demnach wäre ein Einsatz von DOM-1 als Internen Standard bei gleichzeitiger Nutzung von BIOPHARM® IAC-Säulen möglich.

Tab. 28: Untersuchung der Kreuzreaktivität von Typ B Trichothecenen an BIOPHARM® DON-IAC-Säulen ohne Matrix (n = 2)

	Konz. [ng/mL]	Wdf. [%]	
NIV	100	20,1	18,0
FusX	100	-	-
3-AcDON	100	89,3	76,1
15-AcDON	100	62,1	65,3

Tab. 29: Untersuchung der Kreuzreaktivität von Typ B Trichothecenen an BIOPHARM® DON-IAC-Säulen mit Matrix (n = 2)

	Matrix	Konz. [ng/mL]	Wdf. [%]
NIV	Weizen	100	12,0
	Maisgrieß	1 000	3,1
FusX	Weizen	100	1,4
	Maisgrieß	1 000	2,3
3-AcDON	Weizen	100	1,2
	Maisgrieß	1 000	1,6
15-AcDON	Weizen	100	28,0
	Maisgrieß	1 000	5,2

Gegenüber den Typ A Trichothecenen T-2 Toxin, HT-2 Toxin, DAS, VOL, 3-AcDAS, 15-AcSCP und dem Typ B Trichothecen Trichothecin wurden keine Kreuzreaktionen der Biopharm® DON-IAC-Säulen beobachtet. Die Tab. 28 und Tab. 29 verdeutlichen ebenfalls,

dass mittels Biopharm® DON-IAC-Säulen die Erfassung der aufgeführten Typ B Trichothecene zusätzlich zu DON nicht möglich war.

6.4.2 T-2 Toxin-Immunoaffinitätschromatographie-Säulen

Werden die Befunde der untersuchten Kreuzreaktivität betrachtet, so wurde zunächst die spezifische Bindung der T-2 Toxin-Antikörper gegenüber dem Zieltoxin bestätigt (Tab. 30 und 31)

Tab. 30: Wiederfindung von Typ A Trichothecenen an VICAM® T-2 Toxin-IAC-Säulen ohne Matrix (n = 2)

	Konz. [ng/mL]	Charge 1		Charge 2	
		Wdf. [%]	RSD _r [%]	Wdf. [%]	RSD _r [%]
T-2 Toxin	100	89,0	2,3	99,5	3,5
HT-2 Toxin	100	92,5	2,7	129,5	4,2
3-AcDAS	100	7,05	2,1	0,6	0

Die Kreuzreaktivität von HT-2 Toxin konnte anhand der zufriedenstellenden Wiederfindungen belegt werden. Die resultierende mittlere Wiederfindung von HT-2 Toxin ohne Matrix beträgt 92,5 % (Tab. 30). Bei weiteren Untersuchungen in Gegenwart von Matrix belaufen sich diese im Mittel auf 75 % bei einer gleichzeitigen mittleren Wiederfindung von 100 % von T-2 Toxin (Tab. 31).

Ein weiteres Typ A Trichothecen, das eine geringe Kreuzreaktivität mit den untersuchten IAC-Säulen aufweist, war 3-AcDAS mit einer Wiederfindung von kleiner als 10 %.

Tab. 31: Wiederfindung von Typ A Trichothecenen bei VICAM®-T-2 Toxin-IAC-Säulen mit Matrix ausgehend von Extrakten aus der ASE-Multi-Trichothecen-Methode (n = 2)

	Matrix	Konz. [µg/kg]	Wdf. [%]	RSD _r [%]
T-2 Toxin	Maisgrieß	50	100	13,0
	Vollkorn-Haferflocken	100	83	6,0
	Weizen	500	86	19,3
HT-2 Toxin	Maisgrieß	50	55	5,5
	Vollkorn-Haferflocken	100	71	2,1
	Weizen	500	100	3,0
3 Ac DAS	Maisgrieß	50	3	4,0
	Vollkorn-Haferflocken	100	2	4,3
	Weizen	500	3	10,0

Die Analytik von Typ A Trichothecenen stellt hohe Anforderungen bezüglich der nachzuweisenden T-2 Toxin Konzentration. Der entsprechende Konzentrationsbereich befindet sich im Spurenbereich von < 100 µg/kg. In diesem Konzentrationsbereich sollten zufriedenstellende Wiederfindungen sowohl für T-2 Toxin als auch für den Internen Standard d₃-T-2 Toxin gefunden werden. Wie Tab. 32 verdeutlicht, erfüllt d₃-T-2 Toxin diese Anforderung in einem Konzentrationsbereich von 10 µg/kg bis 50 µg/kg bei den verwendeten VICAM®-T-2 Toxin-IAC-Säulen.

Tab. 32: Wiederfindung von d₃-T-2 Toxin an VICAM®-T-2 Toxin-IAC-Säulen ohne Matrix (n=3)

	Konzentration [µg/kg]	Wiederfindungen [%]	RSD _r [%]
d ₃ -T-2 Toxin	10	99,9	0,05
	25	105,2	0,03
	50	100,4	0,04

6.4.3 Zearalenon-Immunoaffinitätschromatographie-Säulen

Zur Prüfung der Kreuzreaktivität von Zearalenon und dessen Derivaten wurden IAC-Säulen der Firmen Biopharm[®], Red Rabbit[®] und VICAM[®] verwendet. Für diesen Zweck wurde eine Mix-Lösung von Zearalenon und dessen Derivaten hergestellt. Diese wurde direkt eingesetzt und den Herstellerangaben entsprechend aufgebracht.

Tab. 33: Untersuchung der Kreuzreaktivität von ZEA und dessen Derivate an IAC-Säulen unterschiedlicher Hersteller (n = 3)

	Biopharm [®]			Red Rabbit [®]		VICAM [®]	
	Konz. [ng/mL]	Wdf. [%]	RSDr [%]	Wdf. [%]	RSDr [%]	Wdf. [%]	RSDr [%]
ZEA	400	98,0	4,0	86,5	4,5	106,0	5,2
ZAN	400	155,5	40,5	85,5	1,5	94,0	1,8
α-ZAL	400	102,0	13,0	87,5	0,5	94,0	0,6
β-ZAL	400	89,0	1,0	65,5	0,5	77,0	0,8
α-ZOL	400	94,5	2,5	73,5	0,5	88,5	0,7
β-ZOL	400	94,5	0,5	61,0	3,0	78,0	4,9

Die zur Routineanalytik herangezogenen IAC-Säulen der Fa. Biopharm[®] und VICAM[®] zeigen für Zearalenon und den Derivaten sehr gute Wiederfindungen. Die IAC-Säulen der Firma Red Rabbit[®] zeigten in der Tendenz geringere Wiederfindungen. Lediglich für ZAN zeigten sich Auffälligkeiten bei den IAC-Säulen der Fa. Biopharm[®] mit einer mittleren Wiederfindung von 155,5 % und einer relativen Standardabweichung von 40,5 %. Dieser Befund stellt im Vergleich zu den weiter aufgeführten Wiederfindungen einen Extremwert dar. Eine Erklärung für diese Abweichung könnte in produktionsbedingten Chargenunterschieden zu finden sein. Die Ergebnisse zur Kreuzreaktivität waren im Hinblick auf Metabolisierungs- und Carry-Over-Untersuchungen von Zearalenon von Bedeutung, da neben dem natürlich vorkommenden Zearalenon auch das α-ZOL und die aufgeführten Stoffwechselprodukte ebenfalls mit dieser Technik erfasst wurden. Weiterhin war die Bestimmung der Kreuzreaktivität von unterschiedlichen Zearalenon-Derivaten für den Einsatz eines Internen Standards wie d₄-α-ZOL für die Methodenentwicklung erforderlich. Daraus resultierten die Methoden zur Bestimmung von ZEA in Konsummilch und in pflanzlichen Speiseölen.

6.5 Routinemethoden für Deoxynivalenol und Zearalenon

6.5.1 Bestimmung von Deoxynivalenol in Getreide und Getreideprodukten

Die im Rahmen dieser Arbeit etablierte, in der Routineanalytik eingesetzte DON-Methode sieht zunächst eine Extraktion mittels Acetonitril/Wasser-Gemisch (84/16; V/V) durch turbulentes Schütteln vor. Für den ersten Aufreinigungsschritt wurde ein aliquoter Anteil des Extraktes über die MultiSep[®] Säule eluiert. Der daraus resultierende Extrakt wurde unter Stickstoffstrom eingeeengt. Der Rückstand wurde in Wasser gelöst und über eine DON IAC-Säule gereinigt. Der erhaltene Extrakt wurde abermals unter Stickstoffstrom eingedampft. Dieser Rückstand konnte direkt für die HPLC-UV- bzw. LC-MS/MS-Detektion eingesetzt werden.

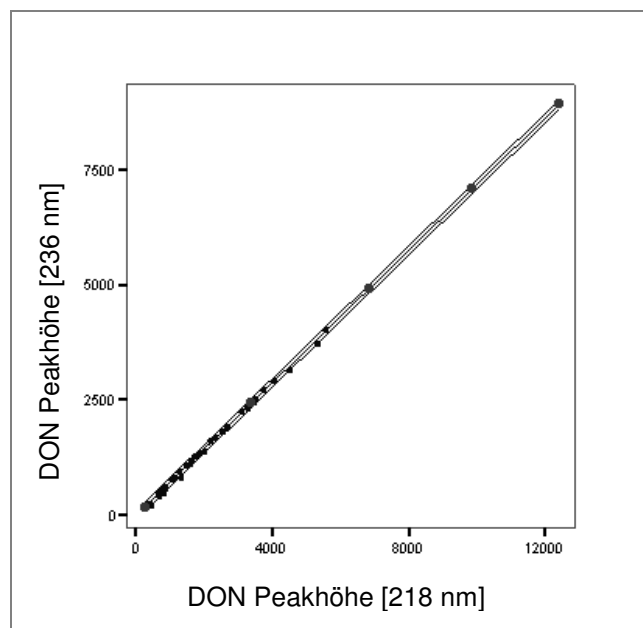
Durch die Keto-Gruppe an dem C₈-Atom ist die Detektion von DON im niedrigen UV-Wellenlängenbereich bei einem Absorptionsmaximum von 218 nm möglich. Dies setzt für das chromatographische System allerdings den beschriebenen, zweifach gereinigten Extrakt voraus. Mit dieser Methode wurden neben einfacheren Probenmatrizes wie Getreidekörner (Weizen, Roggen, Hafer etc.) ebenfalls komplex verarbeitete Getreideprodukte (Müsli, Cornflakes, Getreideriegel, Teigwaren etc.) untersucht.

6.5.1.1 Wellenlängenvergleich der UV-Detektion

Gemäß der Entscheidung 2002/657/EG der Kommission wird das LC-UV/VIS Messverfahren nur als geeignete Bestätigungsmethode betrachtet, wenn mindestens zwei verschiedene Chromatographie-Systeme oder eine zweite unabhängige Nachweismethode verwendet werden. Dies führte zur Etablierung eines zweiten, unabhängigen Nachweisverfahrens für die Quantifizierung von DON, der LC-MS/MS. Gleichwohl wurde die DON-Analytik mittels LC-UV/VIS durchgeführt. Durch die Einführung einer Bestätigungswellenlänge (236 nm) neben der Quantifizierungswellenlänge (218 nm) konnte die Selektivität dieses Verfahrens erhöht werden. Bei einigen Probenextrakten wie Frühstückszerealien traten matrixbedingte Interferenzen bei der Detektion von DON auf. Aus diesem Grund wurde das eingesetzte chromatographische Detektions-System in dem analytspezifischen UV-Wellenlängenbereich optimiert. Die Chromatogramme zeigten eine verbesserte Selektivität, bei einer höheren Wellenlänge, die sich bereits in der Flanke des UV-Spektrums (siehe Abb. 25) und nicht im Absorptionsmaximum von DON befand. Mit der erhöhten Selektivität und der damit einhergehenden geringeren Matrixstöranfälligkeit konnten selbst Extrakte komplexer Lebensmittel vermessen werden, ohne dabei erhebliche Empfindlichkeitsverluste in der Detektion hinnehmen zu müssen.

Für die nachfolgend zusammengefassten Berechnungen des 218 nm zu 236 nm Verhältnisses am Retentionszeitpunkt für DON wurden die Rohdaten der Peakhöhen herangezogen.

Abb. 24: Korrelation zwischen der Hauptwellenlänge 218 nm und der Bestätigungswellenlänge 236 nm anhand *dual*-UV-Detektor bei einem Vorhersageintervall von 95 % (Korrelationskoeffizient von 0,999; n = 50)



Es zeigte sich, dass die Ergebnisse bei matrixunbeeinflussten Messungen stets bei Vergleich der Spuren von 218 und 236 nm im Verhältnis von 0,71 vorlagen (Abb. 24). Die Korrelation dieser beiden Messwellenlängen konnte durch mehrfache Messungen über einen Konzentrationsbereich von 10^3 nachgewiesen werden. Für die Bestimmung des Verhältnisses zwischen den Wellenlängen 218 und 236 nm wurden fünf Kalibrationspunkte in einem Kalibrationsbereich von 50 – 2000 ng/mL und 50 Proben unterschiedlicher Matrix herangezogen. Somit konnte sichergestellt werden, dass dieses Verhältnis über den gesamten Kalibrationsbereich konstant ist. Die Bestimmung erfolgte anhand der routinemäßig eingesetzten Shimadzu HPLC-*dual* UV-Detektion. Zur Absicherung der Analytspezifität dieses Verhältnis-

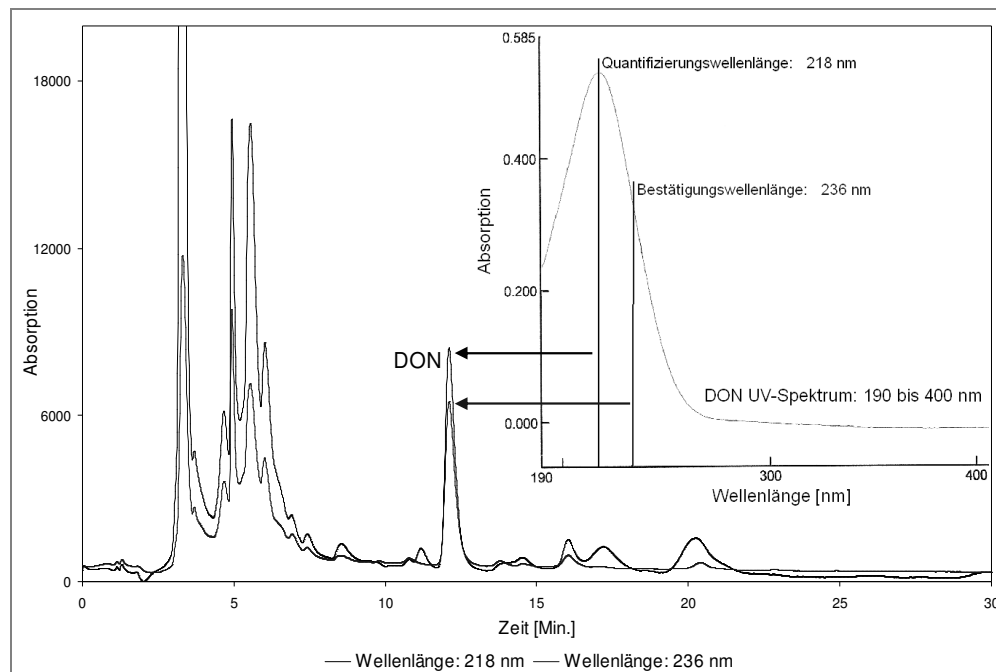
ses wurden diese Untersuchungen ebenfalls an einem Dioden-Array-Detektor (Agilent® HPLC 1100) durchgeführt.

Tab. 34: Gegenüberstellung des Wellenlängenvergleichs bei *dual* UV- und DAD-Detektor

	dual-UV-Detektor	Dioden-Array-Detektor
n	50	36
Verhältnis 218 nm/236 nm		
Mittelwert	0,71	0,74
RSDr [%]	8,7	6,2

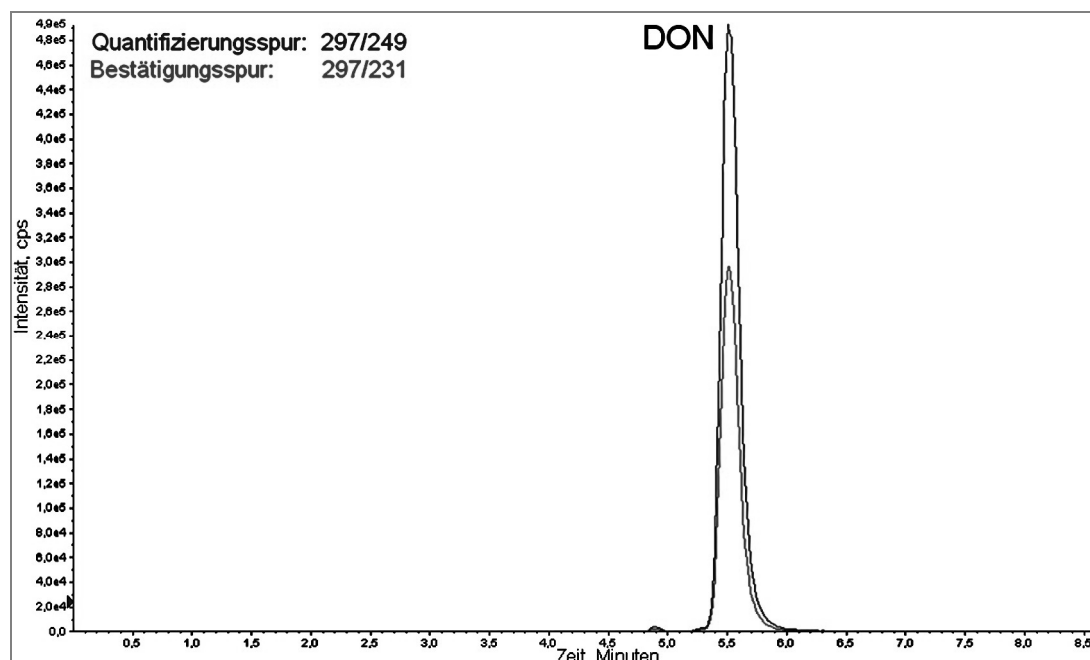
Das in Tab. 34 berechnete Verhältnis 218 nm zu 236 nm beträgt für den dual-UV-Detektor 0,71. In Untersuchungen mit einem Dioden-Array-Detektor konnte ein Verhältnis von 0,74 ermittelt werden. Mit diesem Verhältnis konnte zum Retentionszeitpunkt von DON eine Aussage darüber getroffen werden, inwieweit eine Matrixbeeinflussung vorlag. In komplexen Matrices wie Frühstückszerealien, bei denen in der Quantifizierungswellenlänge (218 nm) der DON-Peak durch Matrixbestandteile beeinflusst wurde, verschob sich das Verhältnis drastisch. Insgesamt ermöglicht die beschriebene duale Wellenlängen-Detektion ohne zusätzlichen apparativen Aufwand eine Überprüfung der Detektion im niedrigen UV-Wellenlängenbereich. Mit Hilfe dieses Verfahrens wurde eine Vorselektion von Proben durchgeführt, die notwendigerweise durch das spezifische LC-MS/MS-Referenzverfahren abgesichert wurden.

Abb. 25: HPLC-dual-UV Chromatogramm der Wellenlängen 218 nm und 236 nm bei einer natürlich kontaminierten Vollkorn Hartweizengrieß Teigware (629 µg/kg)



Zur Steigerung der Selektivität wurde neben der Detektion erstmalig in der DON-Analytik als Trennsäule eine Phenyl-Hexyl-Mischphase eingesetzt. Mit diesem Säulenmaterial konnte bei isokratischer Elution und einem Acetonitril-Anteil von 5 % eine deutliche DON-Abtrennung von coelueierenden Matrixsubstanzen erzielt werden (Abb. 25). Hierbei war bei der Wellenlänge 236 nm eine deutlich geringere Matrixbelastung zu verzeichnen. Als Vergleichsverfahren und zur Absicherung der HPLC-UV-Messungen wurde für die routinemäßige DON-Analytik für einen effektiven Probendurchsatz eine LC-MS/MS-Methode entwickelt.

Abb. 26: LC-ESI-MS/MS MRM-Overlay-Chromatogramm einer natürlich kontaminierten Vollkorn-Hartweizengrieß-Teigware (629 µg/kg)



Das abgebildete Chromatogramm (Abb. 26) zeigt eine natürlich kontaminierte Vollkorn-Hartweizengrieß-Teigware. Es ist deutlich zu erkennen, dass keine matrixbedingten Interferenzen auftraten. Dies veranschaulicht, dass bei komplex zusammengesetzten Matrices wie Vollkorn-Teigwaren die zweifache Aufreinigung zu sehr sauberen Extrakten führt. Dies konnte weiterhin durch das in Abb. 25 dargestellte HPLC-UV Chromatogramm verdeutlicht werden. Dadurch wurde eine chromatographische LC-MS/MS-Methode mit einer Gesamtlaufzeit von unter zehn Minuten für einen hohen Probendurchsatz ermöglicht.

Die Wiederfindungsuntersuchungen wurden sowohl für die HPLC-UV als auch für die LC-MS/MS-Bestimmung durchgeführt. Die daraus resultierenden Ergebnisse sind in den Tab. 35 zusammengefasst.

Tab. 35: Wiederfindungsuntersuchungen der routinemäßig eingesetzten DON Methode (n = 5)

Matrix	Konz. [µg/kg]	HPLC-UV		LC-MS/MS	
		Wdf. [%]	RSD _r [%]	Wdf. [%]	RSD _r [%]
Vollkorn-Haferflocken	25	98,2	12,2	100,9	11,9
Schoko-Müsli	100	102,7	1,7	100,1	1,8
Müsli-Riegel	250	104,9	2,8	107,0	2,4
Cornflakes	500	98,7	1,5	101,2	1,7
Kinderkeks	1000	97,1	2,5	99,6	2,2

Die Wiederfindungsuntersuchungen wurden mit den in Tab. 35 aufgelisteten Matrices in einem Konzentrationsbereich von 25 bis 1.000 ng/mL durchgeführt. Abgeleitet aus der Steigung der Wiederfindungsfunktion resultierte für die LC-MS/MS-Methode eine mittlere Wiederfindung von 99,8 % und für die HPLC-UV-Methode eine mittlere Wiederfindung von 99,6 %. Für beide Verfahren lagen die RSD_r in einem Bereich von 1,5 bis 12,2 % und somit deutlich unter 20 %. Ein Pearson-Korrelationskoeffizient von 1,000 kennzeichnet die gegebene Linearität im beschriebenen Konzentrationsbereich.

6.5.2 Bestimmung von Zearalenon in Getreide und Getreideprodukten

Gemäß der Entscheidung 2002/657/EG der Kommission wird das LC-FLD-Messverfahren nur als geeignete Bestätigungsmethode für Moleküle betrachtet, die eine natürliche Fluoreszenz zeigen, und Moleküle, die eine Fluoreszenz nach Transformation oder Derivatisierung zeigen. Im Rahmen der Validierung einer § 35 LMBG-Methode durch einen Ringversuch (Teilnehmerzahl = 16) wurde eine Methode zur Bestimmung von ZEA in Getreide- und Getreideerzeugnissen etabliert. Die Analytik beruht dabei auf der Extraktion von ZEA mittels Acetonitril/Wasser-Gemisch (75/25; V/V), durch turbulentes Schütteln in einem Zeitraum von einer Stunde. Ein aliquoter Anteil des Extrakts wurde in ein vorgelegtes TWEEN-PBS-Puffersystem aufgenommen. Von der resultierenden Lösung wurde ebenfalls ein aliquoter Anteil über eine IAC-Säule aufgereinigt. Die chromatographische Trennung erfolgte isokratisch über ein C₁₈-Umkehrphasenmaterial mit anschließender FLD-Detektion.

Diese Methode diente als Bezugsmethode zur routinemäßigen Durchführung der ZEA-Untersuchungen innerhalb des Forschungsprojektes. Eine Änderung der validierten Parameter der § 35 LMBG ZEA-Methode wurde bei der flüssigkeitschromatographischen Trennung vorgenommen, da neben ZEA auch dessen Derivate erfasst werden sollten. Das nachfolgende, durch Gradientenelution erstellte Chromatogramm veranschaulicht die Trennung der Diastereomere α - und β -ZAL bzw. α - und β -ZOL an einer RP-Phase. Weiterhin lag für ZEA und ZAN eine Basislinientrennung vor (Abb. 27).

Abb. 27: HPLC-FLD-Chromatogramm einer Maisgrießprobe aufgestockt mit Zearalenon und dessen Derivaten (je 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

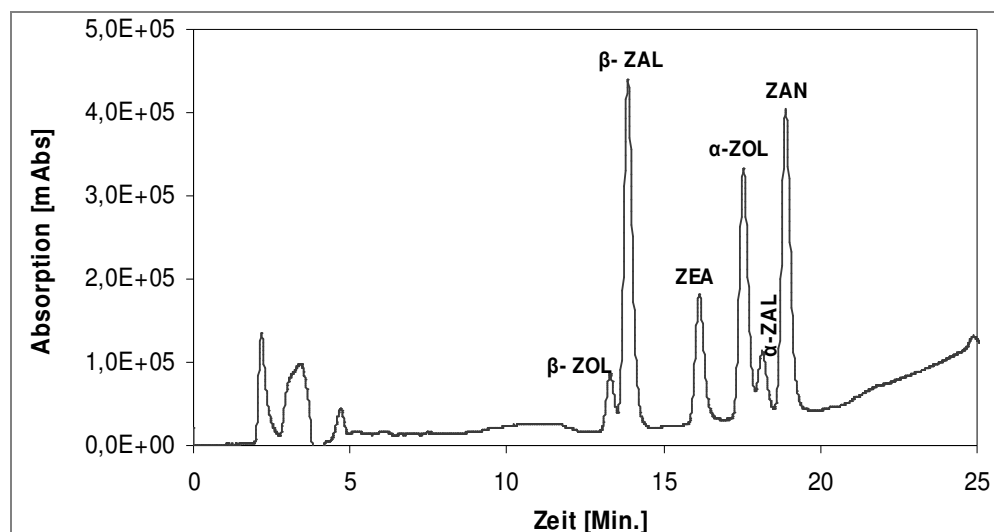
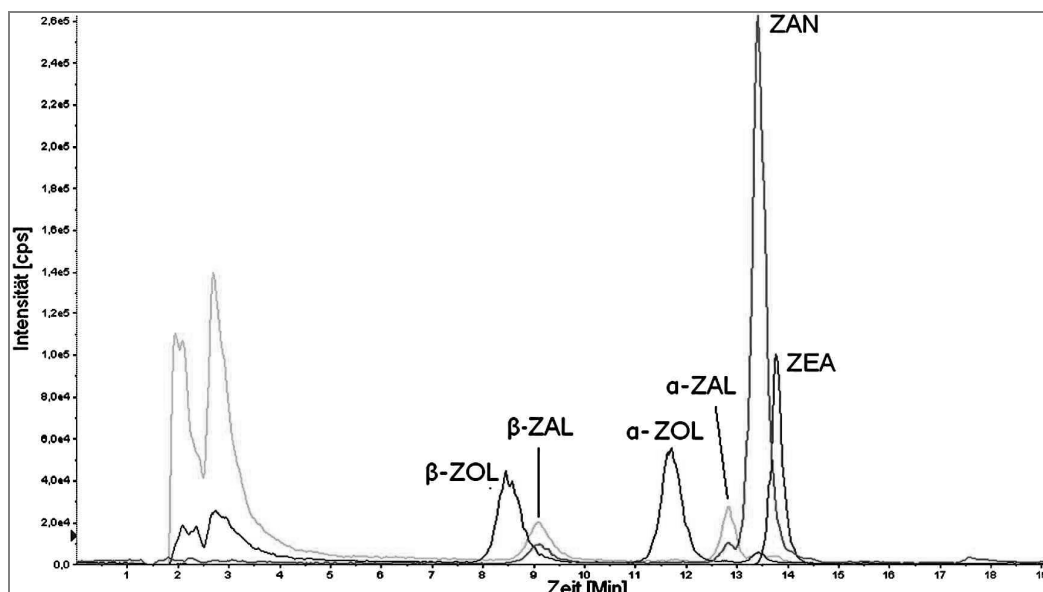


Abb. 28 verdeutlicht, dass die chromatographische Trennung der Diastereomere α - und β -ZOL und α - und β -ZAL durch das entwickelte Gradientensystem ermöglicht wurde. Ebenso konnte eine Trennung zwischen ZON und ZAN erzielt werden.

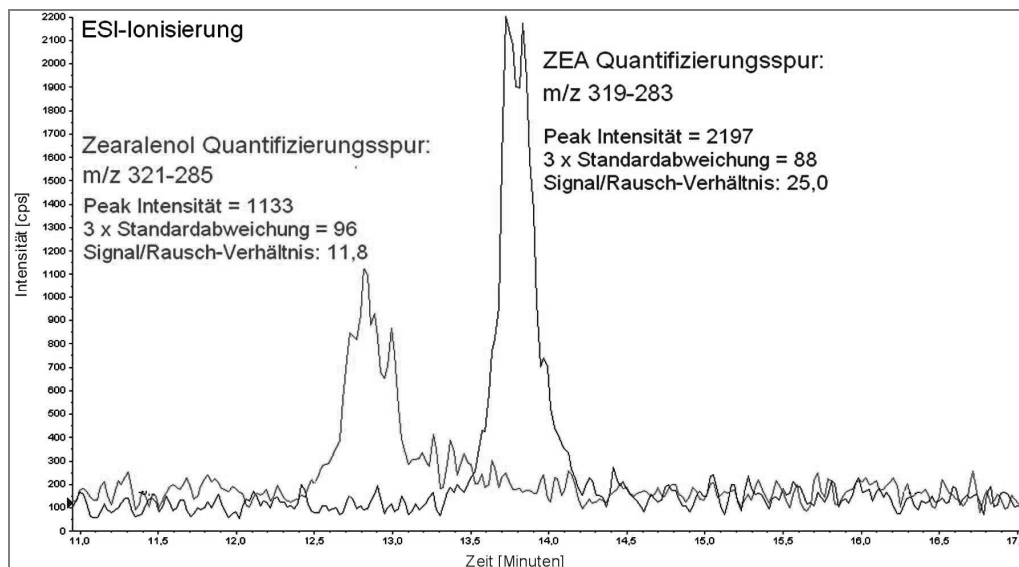
Bei der LC-MS/MS-Methode wurde aus diesem MRM-Overlay-Chromatogramm ersichtlich, dass ein sogenanntes Cross-Talking zwischen der ZAN-Quantifizierungsspur und der Quantifizierungsspur der Zearalenole deutlich zu erkennen ist. Somit war es erforderlich, ein chromatographisches System zu etablieren, das die Trennung von Zearalenon und dessen Isomeren gewährleistet.

Abb. 28: MRM-Overlay-Chromatogramm (LC-ESI-MS/MS) einer aufgestockten Maismehlprobe (je 100 µg/kg)



Die Bestimmung der Nachweisgrenzen des Quantifizierungsionenübergangs und des Bestätigungionenübergangs von Zearalenon und dessen Derivaten wurde mit der „Signal zu Rausch“-Methode ($S/N = 3/1$) durchgeführt. Die Linearität der LC-ESI-MS/MS konnte für diese Toxingruppe in einem Bereich von $2 \cdot 10^1$ ng/mL bis $1 \cdot 10^3$ ng/mL festgestellt werden.

Abb 29: Bestimmung der Nachweisgrenze von Zearalenon und α-Zearalenol mittels „Signal zu Rausch“-Methode



Tab. 36: Nachweisgrenzen von ZEA und dessen Metaboliten der LC-ESI-MS/MS-Methode

	Quantifizierungs- Ionenübergang [µg/kg]	Bestätigungs- Ionenübergang [µg/kg]
ZEA	0,3	0,4
ZAN	0,2	0,3
α-ZAL	0,5	1,5
β-ZAL	1,2	2,0
α-ZOL	0,9	1,2
β-ZOL	1,2	3,0

Im Rahmen der Validierung der § 35 LMBG-Methode für die Bestimmung von ZEA wurden Wiederfindungsuntersuchungen bei einer Konzentration von 50 µg/kg durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tab. 37 zusammengefasst.

Tab. 37: Ergebnisse der Wiederfindungsuntersuchungen von ZEA im Rahmen der Validierung einer § 35 LMBG ZEA-Methode (n = 3)

Matrix	n	Konzentration [µg/kg]	Wiederfindungs- bereich [%]	Mittlere Wie- derfindung [%]
Roggenmehl	16	50	69 - 170	106
Weizenmehl	16	50	67 - 145	99

Neben diesen, wurden weitere Wiederfindungsuntersuchungen von ZEA und dessen Derivaten in Maisprodukten durchgeführt. Sowohl für Maisgrieß als auch für Maismehl wurden diese Untersuchungen für die unten aufgeführten Resorcylsäure-Lactone bei 10 µg/kg, 50 µg/kg und 100 µg/kg durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tab. 38 zusammengefasst. Eine ausführliche Darstellung dieser Wiederfindungsuntersuchungen ist im Anhang, Abschnitt III in Tab. A-10 aufgeführt.

Tab. 38: Wiederfindungsfunktionen von Zearalenon und dessen Derivate für die ZEA-Routinemethode

	Wiederfindungsfunktion	Mittlere Wiederfindung [%]	Korr.koeff.
ZEA	$y = 0,839 \cdot x + 1,315$	83,9	1,000
ZAN	$y = 0,528 \cdot x + 1,906$	52,8	0,999
α-ZAL	$y = 0,718 \cdot x + 12,173$	71,8	1,000
β-ZAL	$y = 0,843 \cdot x + 4,982$	84,3	1,000
α-ZOL	$y = 0,684 \cdot x + 6,090$	68,4	1,000
β-ZOL	$y = 0,654 \cdot x + 9,084$	65,4	1,000

Für Zearalenon wurde ausgehend von der Wiederfindungsfunktion in einem Konzentrationsbereich von 10 - 200 µg/kg eine mittlere Wiederfindung von 83,9 % berechnet. Innerhalb der § 35 LMBG-Methoden-Validierung wurde für ZEA eine mittlere Wiederfindung von 106 % bzw. 99 % in Weizen- bzw. Roggenmehl bestimmt. Die Diastereomere α- und β-ZAL bzw. α- und β-ZOL zeigten im unteren Konzentrationsbereich (10 µg/kg) sehr hohe Wiederfindungen. Dies kann unter anderem durch die Anwesenheit von coelueierenden Matrixsubstanzen erklärt werden. Bei den Wiederfindungskonzentrationen 50 µg/kg und 200 µg/kg wurden zufriedenstellende Wiederfindungen im Bereich von 70 bis 109 % ermittelt.

Die geringen Wiederfindungen (zwischen 55 bis 68 %) von ZAN könnten durch Konkurrenzreaktionen an den eingesetzten polyklonalen Antikörpern erklärt werden. Die Berechnung der Korrelationskoeffizienten der ermittelten Wiederfindungsfunktionen bestätigte die Linearität der detektierten Toxine über den validierten Konzentrationsbereich (Tab. 38).

6.6 Bestimmung von Deoxynivalenol und Zearalenon in Säuglings- und Kleinkinder-Fertignahrung

Für die komplex zusammengesetzte Matrix Säuglings- und Kleinkinder-Fertignahrung wurde im Rahmen dieser Arbeit eine effektive Methode zur simultanen Extraktion von DON und ZEA mit abschließender LC-MS/MS-Detektion entwickelt. Bei einem durchschnittlichen Wassergehalt von 80 % der untersuchten Fertigenüs und den sich daraus ableitbaren niedrigen Toxinkonzentrationen wurde die Methodenentwicklung ausschließlich auf die Technik der LC-MS/MS bezogen. Dementsprechend wurden die Wiederfindungen in einem Konzentrationsbereich von 10 - 100 µg/kg durchgeführt. Gemäß der EG-Verordnung 856/2005 werden die Ergebnisse von mykotoxinbelasteten Säuglings- und Kleinkinderprodukten auf die Trockenmasse bezogen angegeben. Daher wurde der Wassergehalt (Tab. 39) der vorliegenden Proben bestimmt. Weiterhin konnte durch dieses Vorgehen ein Vergleich zu den in Pulverform angebotenen Säuglings- und Kleinkinderbreien getätigt werden.

Tab. 39: Wassergehalt der untersuchten Säuglings- und Kleinkinder-Fertigenüs (n = 76)

Mittelwert	82,8 %
Median	83,4 %
Max	89,4 %
Min	75,5 %
Spannweite	13,9 %

Die Effektivität dieser Methode beruht auf der gleichzeitigen Extraktion beider Analyten (DON und ZEA) mittels Methanol in Kombination mit dem Extraktionshilfsmittel Seesand. Die resultierenden DON- bzw. ZEA-IAC-Extrakte liefern in Kombination mit LC-MS/MS die nachfolgend dargestellten Chromatogramme Abb. 30 und Abb. 31).

Abb. 30: MRM-Overlay-Chromatogramm (LC-APCI-MS/MS) von DON einer natürlich kontaminierten Säuglings- und Kleinkindernahrungs-Probe (Vollkorn Fruchtebrei: 3,7 µg/kg)

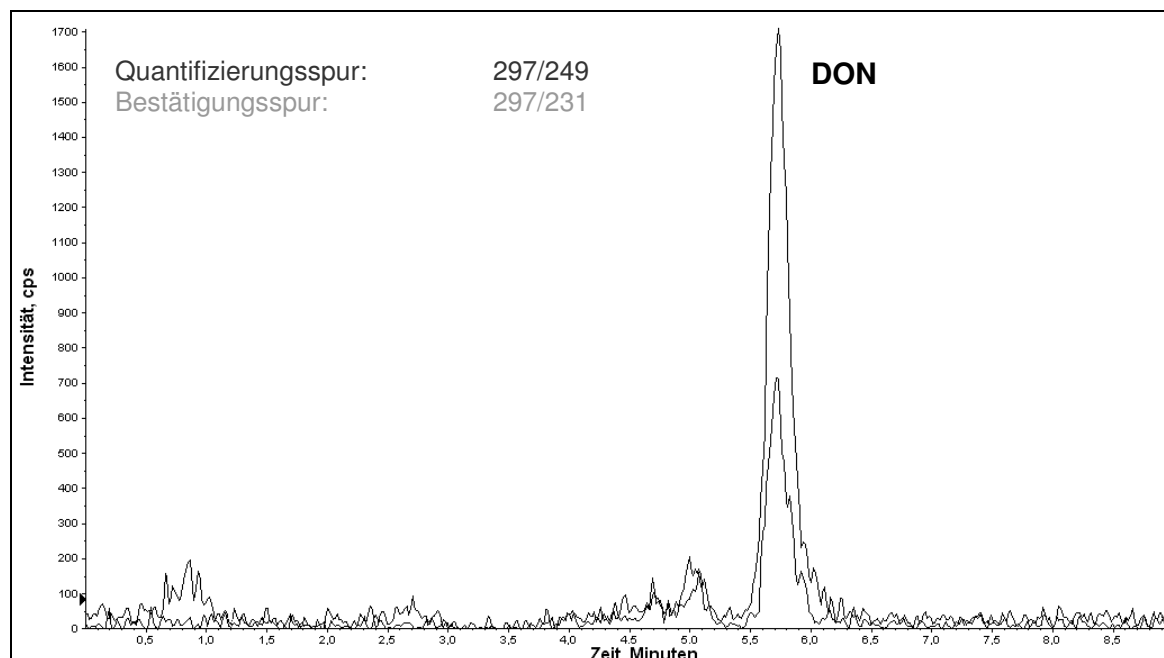
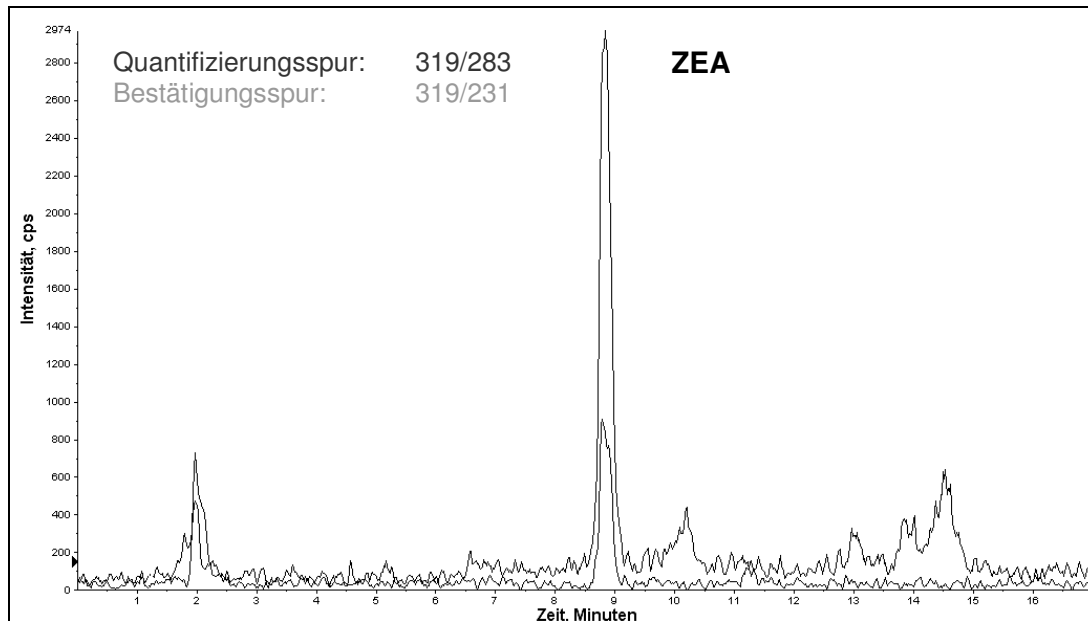


Abb. 31: MRM-Overlay-Chromatogramm (LC-ESI-MS/MS) von Zearalenon einer natürlich kontaminierten Säuglings- und Kleinkindernahrungs-Probe (Obstbrei: 3,8 µg/kg)



Beide Chromatogramme verdeutlichen durch eine geringe Matrixbelastung, dass die Aufreinigung über IAC-Säulen für diese komplex zusammengesetzte Matrix als sehr gut zu betrachten war. Dies wurde umso deutlicher, da die hier dargestellten Chromatogramme für DON (Abb. 30) und ZEA (Abb. 31) aus natürlich kontaminierten Matrices (Vollkornfrüchtebrei und Obstbrei) resultieren und nur geringste Toxinkonzentrationen aufwiesen.

Tab. 40: Ergebnisse der Wiederfindungsuntersuchungen von DON und ZEA in Säuglings- und Kleinkindernahrungs-Proben an drei unterschiedlichen Matrices (n = 3)

	Matrix	Konz. [µg/kg]	Wdf. [%]	RSD _r [%]
DON	Milch-Mehrkornbrei	10	83,9	0,6
	Schinkennudeln mit Gemüseallerlei	50	76,2	1,2
	Zartes Gartengemüse	100	77,6	0
ZEA	Milch-Mehrkornbrei	10	81,8	4,7
	Schinkennudeln mit Gemüseallerlei	50	82,6	1,2
	Zartes Gartengemüse	100	83,0	1,7

Die Wiederfindungsfunktionen von DON und ZEA besitzen annähernd gleiche Steigungen von 0,77 und 0,83 (Tab. 41). Dies deutet darauf hin, dass eine gemeinsame Extraktion beider Toxine mittels Methanol in Kombination mit dem Einsatz von Seesand als Extraktionshilfsmittel durchführbar war.

Tab. 41: Wiederfindungsfunktionen von DON und ZEA aus den Wiederfindungsuntersuchungen in Säuglings- und Kleinkindernahrungs-Proben

	Wiederfindungsfunktion	Mittlere Wdf. [%]	Korr. koef.
DON	$y = 0,770 \cdot x + 0,308$	77,0	1,000
ZEA	$y = 0,831 \cdot x + 0,185$	83,1	1,000

Ausgehend von diesem Extrakt konnten beide Toxine mit den jeweiligen IAC-Säulen aufgereinigt werden. In dem validierten Konzentrationsbereich von 10^2 wurde die Linearität der Methode mit einem Korrelationskoeffizienten von jeweils 1,000 bestätigt. Beide Toxine zeigten im Konzentrationsbereich von kleiner 100 µg/kg einen RSD_r < 20 %.

Die somit belegte Anwendbarkeit der neu entwickelten Methode für die gleichzeitige Extraktion von DON und ZEA aus Säuglings- und Kleinkinder-Fertignahrung ist zeitsparend und kostengünstig.

6.7 Bestimmung von Zearalenon in Konsum- und Säuglingsfolgemilch

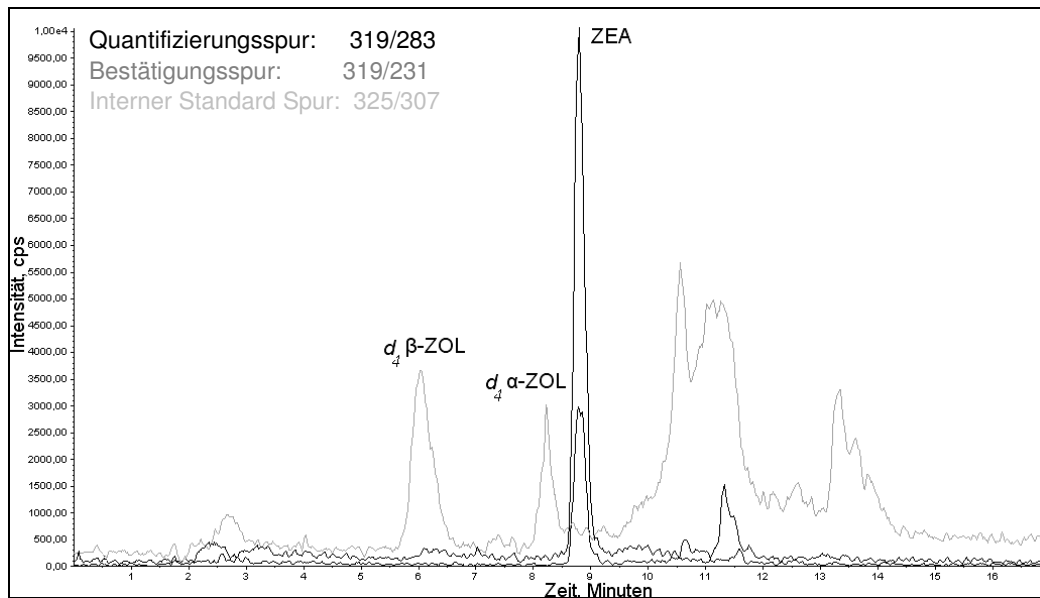
Zur Überprüfung der im Rahmen des SCOOP Task 3.2.10 veröffentlichten ZEA-positiven Konsummilchproben wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Methode zur Bestimmung von Zearalenon in Konsum- und Säuglingsfolgemilch entwickelt. Dafür wurden als interne Standards die deuterierten Diastereomere d_4 - α - und d_4 - β -ZOL herangezogen. Die zweistufige Aufreinigung wurde an einer NaCl/Extrelut-Säule, gefolgt von einer ZEA IAC-Säule durchgeführt und mittels LC-ESI-MS/MS detektiert.

PRELUSKY ET AL. (1989) beschrieben eine Methode zur Bestimmung von Zearalenon und den Derivaten α - und β -ZOL in geringen Volumina von biologischen Flüssigkeiten wie Milch, Blut, Plasma, Urin und Gallenflüssigkeit mittels HPLC-FLD. Die Extraktion und Isolation der Toxine aus diesen Matrices erfolgte anhand einer Serie von pH-kontrollierten Flüssig-Flüssig-Verteilungen. Die Wiederfindungen dieser Methode in Milch lagen zwischen 75 % und 84 %. Die Nachweisgrenze dieser Methode für ZEA und α -Zearalenon betrug 1 ng/mL, für β -Zearalenon 5 ng/mL. SCOTT und LAWRENCE (1988) entwickelten eine Methode zur Bestimmung von Zearalenon und dessen Metaboliten in Milch. Die Extraktion erfolgte mit Acetonitril gefolgt von einer Flüssig-Flüssig-Verteilung mit Dichlormethan. Die Aufreinigung erfolgte an einer Aminopropyl-SPE-Säule und anschließender Bestimmung mit HPLC-FLD. Eine mittlere Wiederfindung für ZEA lag bei 84 %, für α -Zearalenol bei 93 % und für β -Zearalenol bei 90 % in einem Konzentrationsbereich von 0,5 - 20 ng/mL. ZÖLLNER ET AL. (2002) entwickelten eine Methode zur Bestimmung von ZEA und dessen Metaboliten in Urin und tierischem Gewebe.

Für die Probenaufarbeitung wurde ein Clean-Up über eine RP-C₁₈-SPE-Kartusche durchgeführt mit anschließender LC-APCI-MS/MS-Detektion im negativen Ionisierungsmodus. Zuvor wurden der Urin bzw. die Probenextrakte mit β -Glucuronidase/Arylsulfatase für 15 Stunden bei 37 °C einer hydrolytischen Spaltung unterzogen. Bei einem Konzentrationsniveau von 5 μ g/kg lagen die Wiederfindungen für ZEA, α -Zearalenol, β -Zearalenol, Zearalanon, α -Zearalanol und β -Zearalanol bei 80 %, 74 %, 68 %, 85 %, 55 % und 75 %. Die Nachweisgrenzen dieser Verbindungen lagen im Bereich von 0,1 bis 1 μ g/kg.

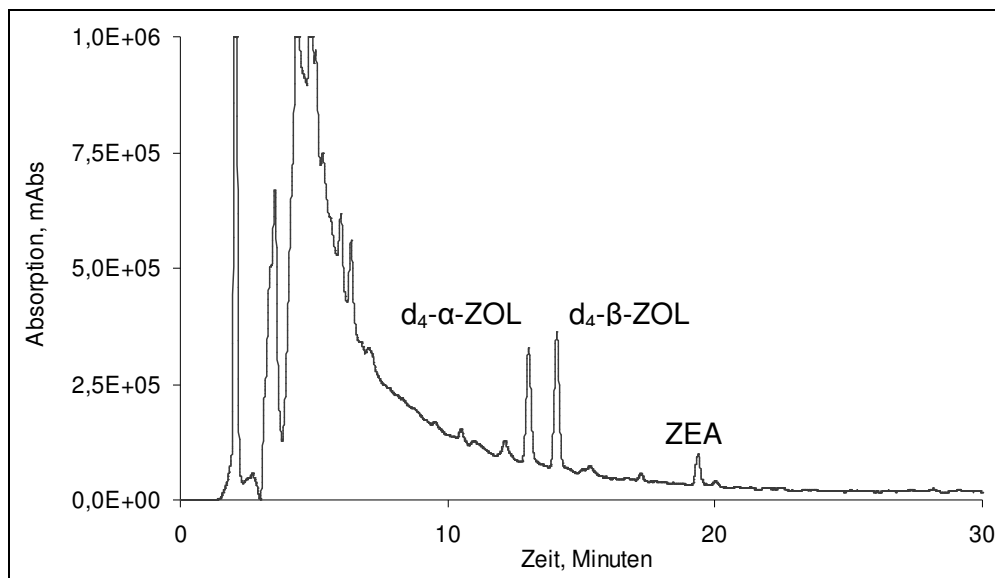
USLEBER ET AL. (1992) etablierten einen direkt-kompetitiven Enzym-Immunotest (EIA) mittels polyklonalen Antikörpern. Die relative Kreuzreaktivität dieses Assays mit ZEA, α -Zearalenol, β -Zearalenol, Zearalanon, α -Zearalanol und β -Zearalanol lag bei 100 %, 37,3 %, 7,2 %, 59,2 %, 5,3 %, und 3,9 %. Dieser ELISA wurde eingesetzt zur Bestimmung dieser Toxine in biologischen Flüssigkeiten wie Serum, Milch, Urin und Faeces. Diese Matrices wurden sowohl mit als auch ohne β -Glucuronidase vor der Analyse behandelt.

Abb. 32 zeigt ein MRM-Overlay-Chromatogramm einer mit Zearalenon und den Internen Standards aufgestockten Vollmilchprobe.

Abb. 32: MRM-Overlay-Chromatogramm (LC-ESI-MS/MS) einer Vollmilchprobe aufgestockt mit 50 µg/L

Wie das Overlay-Chromatogramm (Abb. 32) verdeutlicht, wurden die als Interne Standards eingesetzten Diastereomere d_4 - α - und d_4 - β -ZOL innerhalb einer Ionenspur (m/z 325→307) detektiert. Aufgrund der Retentionszeit (in Bezug auf ZEA) wurde für die Quantifizierung von ZEA d_4 - α -ZOL als Interner Standard herangezogen.

Die abgebildeten HPLC-FLD- und LC-MS/MS-Chromatogramme (Abb. 32 und Abb. 33) verdeutlichen, dass nach Aufreinigung über die Kochsalz/Extrelut-Mischung und der darauf folgenden IAC-Säule Extrakte mit einer ausreichend geringen Matrixbelastung resultierten.

Abb. 33: HPLC-FLD-Chromatogramm einer Vollmilchprobe aufgestockt mit 50 µg/L

Weiterhin zeigte das HPLC-FLD-Chromatogramm, dass die als Interne Standards eingesetzten Diastereomere d_4 - α -ZOL und d_4 - β -ZOL deutlich basisliniengetrennt vorlagen.

Die Wiederfindungsuntersuchungen dieser Methode wurden in einem Konzentrationsbereich von 10 µg/L bis 100 µg/L durchgeführt und lieferten für die Matrizes Kinderfolgemilch (10 µg/L), haltbare Vollmilch 3,5 % Fett (10 µg/L), fettarme Frischmilch (50 µg/L), haltbare

Vollmilch 1,5 % Fett (50 µg/L) und frische Vollmilch (100 µg/L) die in Tab. 42 zusammengefassten Ergebnisse.

Tab. 42: Wiederfindungsfunktionen der HPLC-FLD- und LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von ZEA in unterschiedlichen Konsum- und Säuglingsfolgemilch-Proben (n = 2)

	Wiederfindungsfunktion	Mittlere Wdf. [%]	Korr.koeff.
HPLC-FLD	$y=0,7691 \cdot x + 1,7475$	77	0,999
LC-MS/MS	$y=0,6327 \cdot x + 3,3378$	63	0,992

Eine detaillierte Aufstellung der Wiederfindungsuntersuchungen ist in Tab. A-11 (Anhang) zu finden. Über einen Konzentrationsbereich von 10^2 konnte für die Bestimmung von ZEA mittels HPLC-FLD eine mittlere Wiederfindung von 77 % und mittels LC-MS/MS eine mittlere Wiederfindung von 63 % bestimmt werden.

6.8 ASE-Multi-Trichothecen-Methode

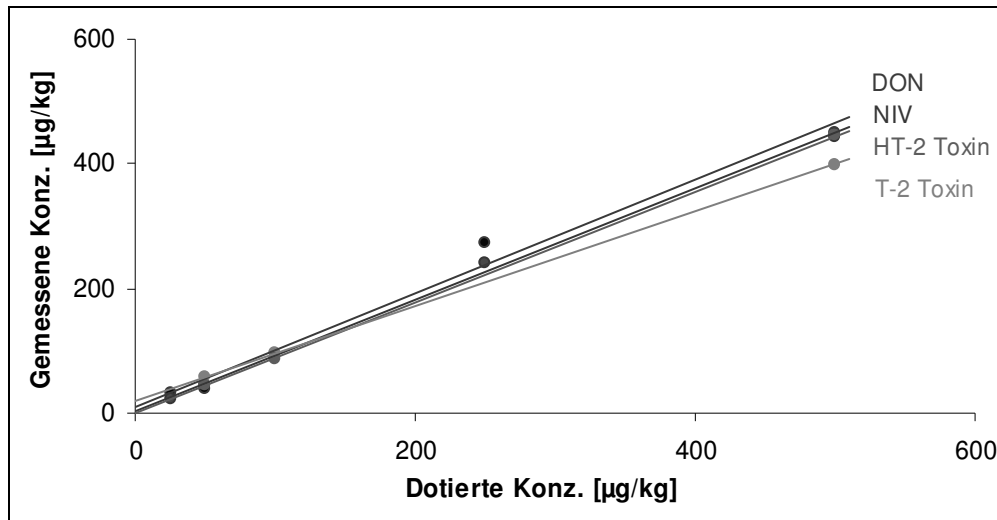
In Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig die ASE-Technik für die Extraktion von Typ A und Typ B Trichothecenen aus Getreide und Getreideprodukten eingesetzt. Durch die Implementierung eines Aktivkohlefilters in die ASE-Extraktionszelle konnte darüber hinaus ein effektives, zeitsparendes und kostengünstiges Aufreinigungsverfahren innerhalb des Extraktionssystems eingeführt werden.

Für die Fusarientoxine der Trichothecen-Gruppe sind bislang keine Methoden bekannt, die als Extraktionsverfahren die ASE einsetzen. PALLARONI UND VAN HOLST (2003) stellten in vergleichenden Untersuchungen unterschiedlicher Extraktionstechniken fest, dass unter zu Hilfenahme von natürlich kontaminierten Maisproben bei festgelegtem Lösungsmittelgemisch die herkömmlichen Extraktionstechniken wie Schütteln im Vergleich zu alternativen Extraktionstechniken wie Ultraschall-Extraktion, MAE (Microwave Assistent Extraction) und PFE (Pressurized Fluid Extraction) eine geringere Effizienz aufwiesen, ZEA zu extrahieren. Unter den alternativen Extraktionstechniken zeigte die MAE die höchste Effizienz.

Wiederfindungsuntersuchungen

Eine detaillierte Aufstellung der Wiederfindungsuntersuchungen ist im Anhang in Tab A-12 (Anhang, Abschnitt III) hinterlegt. Für die Typ B Trichothecene wurden diese Untersuchungen an den Matrices Weizenkörner (500 µg/kg), Vollkorn-Haferflocken (250 µg/kg), Maisgrieß (50 µg/kg) und Weizenmehl Typ 550 (25 µg/kg) durchgeführt. Für das DON-Biotransformationsprodukt DOM-1 wurden lediglich Wiederfindungsuntersuchungen bei einer Konzentration von 100 µg/kg bei den Matrices Vollkorn-Haferflocken und Maisgrieß durchgeführt. Für Typ A Trichothecene wurden diese Untersuchungen an Weizenkörnern (500 µg/kg), Vollkorn-Haferflocken (100 µg/kg) und Maisgrieß (50 µg/kg) durchgeführt. Die daraus ermittelten Wiederfindungsfunktionen sind beispielhaft in Abb. 34 für DON, NIV, HT-2 Toxin und T-2 Toxin dargestellt.

Abb. 34: Darstellung ausgewählter Wiederfindungsfunktionen von Typ A und Typ B Trichothecenen der ASE-Multi-Trichothecen-Methode



Die Ergebnisse der Wiederfindungsuntersuchungen für die ASE-Multi-Trichothecen-Methode der Typ A und Typ B Trichothecene sind in Tab. 43 zusammengefasst.

Die Steigungen der resultierenden Wiederfindungsfunktionen liegen im Bereich von 0,76 (T-2 Toxin) bis 1,29 (NEO). Damit wurde ein mittlerer Wiederfindungsbereich über alle untersuchten Trichothecene in einem Bereich von 76 bis 129 % ermittelt. Für den untersuchten Konzentrationsbereich von 50 µg/kg bis 500 µg/kg wurde ein Korrelationskoeffizient von größer 0,992 berechnet. Somit ist diese Methode als hinreichend linear zu betrachten.

Wie gezeigt werden konnte, bewegen sich die Wiederfindungen ab einer Konzentration von 100 µg/kg im Bereich von 100 % innerhalb eines entsprechenden Streubereichs. Die Wiederfindungen im unteren Konzentrationsbereich (25 und 50 µg/kg) führten tendenziell zu größeren Abweichungen. Dies wurde insbesondere bei 15-AcSCP und NEO in der Matrix Mais bei einer aufgestockten Konzentration von 50 µg/kg mit Wiederfindungen von 149 bzw. 138 % deutlich.

Tab. 43: Zusammenfassung der Wiederfindungsfunktionen der Typ A und Typ B Trichothecene im Rahmen der Validierung der ASE-Multi-Trichothecen-Methode

	Wiederfindungsfunktion	Mittlere Wdf. [%]	Korr.koeff.
DON	$y=0,91 \cdot x + 9,76$	91	0,992
NIV	$y=0,89 \cdot x + 3,99$	89	0,999
FusX	$y=0,93 \cdot x + 7,60$	93	0,999
3-AcDON	$y=0,98 \cdot x + 2,09$	98	0,998
15-AcDON	$y=1,10 \cdot x + 5,69$	110	1,000
T-2 Toxin	$y=0,76 \cdot x + 20,74$	76	1,000
HT-2 Toxin	$y=0,89 \cdot x + 0,15$	89	1,000
DAS	$y=0,84 \cdot x + 9,65$	84	1,000
Verrucarol	$y=0,98 \cdot x + 0,11$	98	1,000
15-AcSCP	$y=1,15 \cdot x + 2,56$	115	0,998
NEO	$y=1,29 \cdot x + 4,68$	129	1,000
3 AcSCP	$y=0,86 \cdot x + 8,55$	86	1,000
T2-Triol	$y=1,01 \cdot x + 0,73$	101	1,000

Werden die resultierenden mittleren Wiederfindungen der Typ B Trichothecene von 89 bis 110 % mit den Leistungskriterien gemäß RL 2005/38/EG (siehe Tab. 19) für DON von 70 bis 110 % (bzw. 120 %) und die resultierenden mittleren Wiederfindungen der Typ A Trichothecene

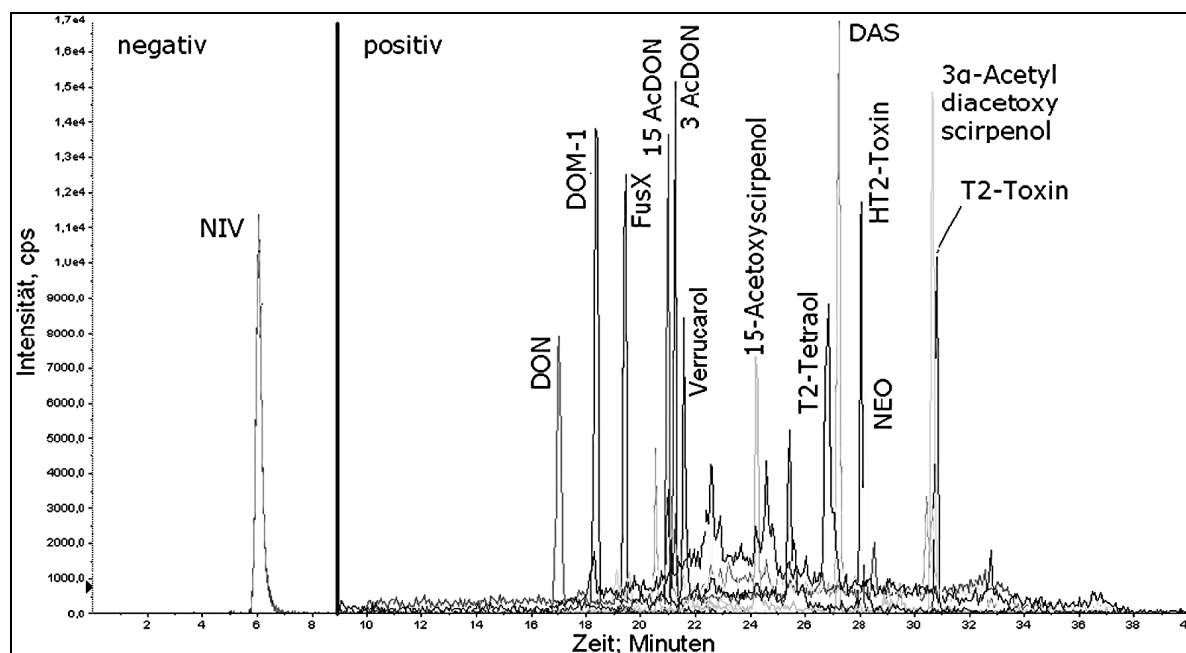
cene von 76 bis 129 % mit den Leistungskriterien gemäß Richtlinie 2005/38/EG (siehe Tab. 19) für T-2 Toxin und HT-2 Toxin von 60 bis 130 % verglichen, so kann über den validierten Konzentrationsbereich diese Methode als sehr gut betrachtet werden.

Demnach ist das eingesetzte Extraktionsmittel Acetonitril/Wasser-Gemisch (84/16; V/V) in Verbindung mit der neu entwickelten und optimierten ASE-Methode in der Lage, das gesamte Typ A und Typ B Trichothecen-Spektrum mit sehr guten Wiederfindungsergebnissen zu extrahieren.

Für DOM-1 wurden bei einem Konzentrationsniveau von 100 µg/kg mittlere Wiederfindungen von 106 % (Vollkorn-Haferflocken) und 103 % (Maisgrieß) bestimmt (siehe Tab. A-12 Anhang, Abschnitt III). Zum Zeitpunkt dieser Arbeit waren keine isotope-markierte Typ B Trichothecen-Standards für den Einsatz in der instrumentellen Analytik vorhanden. Zurzeit steht die Nutzung von DOM-1 als möglicher Interner Standard für die instrumentelle Typ B Trichothecen Analytik zur Diskussion. Aus diesem Grund verdeutlichen diese Ergebnisse, dass mit der entwickelten ASE-Multi-Trichothecen-Methode der Einsatz von DOM-1 als Interner Standard für die Gruppe der Typ B Trichothecene in Betracht gezogen werden kann. Dies wird ebenfalls aus dem nachstehenden Chromatogramm (Abb. 35) deutlich, da DOM-1 zwischen DON und FusX eluiert. Für die Gruppe der Typ A Trichothecene wurde das isotope-markierte d_3 -T-2 Toxin als Interner Standard eingesetzt. Diese Verbindung zeigt die gleiche Retentionszeit von T-2 Toxin, wurde aber aus darstellungsbedingten Gründen nicht in dem Chromatogramm (Abb. 35) abgebildet.

Das aufgeführte Chromatogramm setzt sich aus zwei aufeinander folgenden Perioden zusammen. Die erste, neunminütige Periode bestand aus einer Aufzeichnung der Ionen im negativen Modus. Die zweite Periode wurde unter positiver Polarität aufgezeichnet. Diese Technik konnte aufgrund der großen Retentionszeitunterschiede zwischen NIV und den weiteren Trichothecenen etabliert werden. Aufgrund der empfindlicheren Ionenspur m/z 311→281 wurde NIV unter negativer Polarität detektiert.

Abb. 35: MRM-Overlay-Chromatogramm (LC-APCI-MS/MS) einer aufgestockten Weizenmehl-Probe (je 100 µg/kg)



Weiterhin wird aus dem Chromatogramm deutlich, dass die Stellungsisomeren 3-AcDON und 15-AcDON durch das eingesetzte Gradientensystem voneinander getrennt wurden. Bei diesen Stellungsisomeren konnte ein so genanntes „Cross-Talking“ der Ionenspuren auftreten. Die 15-AcDON Ionenspuren m/z 339→321 und m/z 339→261 weisen neben diesem Trichothecen einen deutlichen Peak bei der Retentionszeit von 3-AcDON auf. In dem umgekehrten Fall wurde dies nicht beobachtet. Dies bedeutet, dass diese Isomere chromatographisch voneinander getrennt werden mussten, um diese eindeutig qualitativ zu identifizieren und daraus folgend quantitativ erfassen zu können.

Nach Einführung der ASE-Multi-Trichothecen-Methode wurde das Vergleichsmaterial DON 311 auf die Anwesenheit weiterer Trichothecene untersucht. Dabei wurden neben DON ebenfalls NIV und HT-2 Toxin nachgewiesen. Somit konnte DON 311 für Wiederholbarkeitsuntersuchungen für diese beiden Toxine herangezogen werden. Dafür wurden acht Extrakte hergestellt, die jeweils zweifach untersucht wurden.

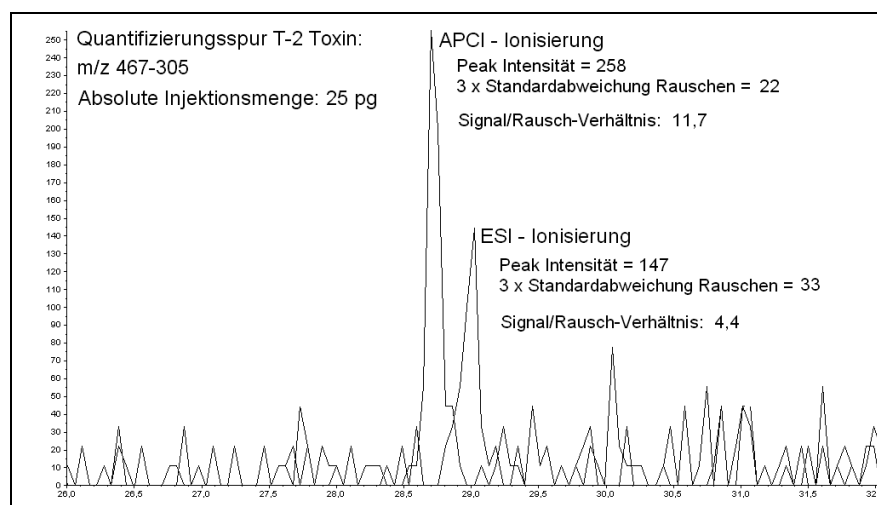
Tab. 44: Ergebnisse der Wiederholbarkeitsuntersuchung von NIV und HT-2 Toxin für die ASE-Multi-Trichothecen-Methode anhand des Vergleichsmaterials DON 311 (n = 8)

	NIV [µg/kg]	HT-2 Toxin [µg/kg]
Mittelwert	28,9	6,6
Median	28,8	6,7
STABW	11,5	0,8
RSD _r	39,8	11,9
r	32,5	2,2
s _r	91,9	6,2

Aus Tab. 44 geht hervor, dass das für DON hergestellte Vergleichsmaterial DON 311 eine mittlere NIV-Konzentration von 28,9 µg/kg und eine mittlere HT-2 Toxin-Konzentration von 6,6 µg/kg aufweist. Für NIV wurde ein RSD_r von 39,8 % und für HT-2 Toxin ein RSD_r von 11,9 % berechnet. Folglich liegt bei einer Konzentration von < 100 µg/kg der RSD_r für HT-2 Toxin unter den geforderten 40 % (Richtlinie 2005/38/EG; siehe Tab.). Mit dem vorliegenden natürlich kontaminierten Vergleichsmaterial kann neben DON ebenfalls HT-2 Toxin für die Methodencharakterisierung herangezogen werden.

6.8.1 Nachweisgrenzen der LC-MS/MS-Methode

Für die LC-MS/MS-Methode wurde im Folgenden die Nachweisgrenzen zweier verschiedene Verfahren in Tab. 45 gegenübergestellt. Dabei wurde für die Typ A Trichothecene ein linearer Bereich von $0,2 \cdot 10^1$ ng/mL bis $1 \cdot 10^3$ ng/mL und für die Typ B Trichothecene $0,2 \cdot 10^1$ ng/mL bis $2 \cdot 10^3$ ng/mL ermittelt. Das „Signal zu Rausch“-Verhältnis wird hier durch die dreifache Standardabweichung des Rauschens im Verhältnis zur Peakintensität berechnet.

Abb. 36: Bestimmung der Nachweisgrenze mit der „Signal zu Rausch“-Methode für T-2 Toxin**Tab. 45: Bestimmung der Nachweisgrenzen der Typ A und Typ B Trichothecene in der Tandem-Massenspektrometrie für den Quantifizierungs- und den Bestätigungs-Ionenübergang mittels „Signal zu Rausch“-Methode (S/N = 3/1)**

	ESI		APCI	
	Quantifizierungs- Übergang NWG [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	Bestätigungs- Übergang NWG [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	Quantifizierungs- Übergang NWG [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	Bestätigungs- Übergang NWG [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
T-2 Toxin	1,6	2,3	0,2	0,6
d3-T-2 Toxin	2,3	2,5	1,8	6,5
HT-2 Toxin	1,7	2,5	0,2	1,2
DAS	3,0	-	0,4	1,5
T-2 Tetraol	-	-	3,8	7,5
T-2 Triol	3,3	-	-	-
Verrucarol	5,0	6,0	2,7	3,3
15-AcSCP	25,0	30,0	2,5	5,6
3-AcSCP	0,4	0,8	0,1	0,6
NEO	2,7	3,3	0,4	0,8
Trichothecin	1,4	2,0	0,4	0,5
DON	0,8	1,5	0,8	1,9
3-AcDON	2,3	11,1	0,7	18,1
15-AcDON	2,4	6,3	12,5	16,7
FusX	0,9	2,8	0,2	1,0
NIV	0,6	-	0,2	-
DOM-1	0,6	0,7	0,3	0,4

Werden die Nachweisgrenzen der APCI- und ESI-Ionisierungstechnik gegenübergestellt, so wird deutlich, dass die APCI-Ionisierungstechnik signifikant niedrigere Nachweisgrenzen liefert. Dies wurde auf ein geringeres Untergrundrauschen der jeweiligen Ionenübergänge bei der APCI-Ionisierungstechnik zurückgeführt.

Werden die notwendigen Forderungen von SCF und SCOOP-Task 3.2.10 einer selektiven und empfindlichen Analysenmethode für die Bestimmung von T-2 Toxin und HT-2 Toxin in Getreide- und Getreideerzeugnissen unter Berücksichtigung der hier beschriebenen Nachweisgrenzen zugrunde gelegt, so konnte gezeigt werden, dass die ASE-Multi-Trichothecen-Methode bei gegebener Selektivität zugleich die notwendige Empfindlichkeit zeigt.

Die im Rahmen von SCCOP-Task 3.2.10 angewandten Analysenmethoden wiesen vergleichsweise hohe Nachweisgrenzen (Bereich 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bis 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$) für T-2 Toxin und HT-2 Toxin auf. Für T-2 Toxin lagen 21 % und für HT-2 Toxin lagen 12 % aller untersuchten Proben oberhalb der Nachweisgrenze. Somit wurde die Expositionsabschätzung für T-2 Toxin

und HT-2 Toxin in einem nicht unerheblichen Umfang durch die methodisch bedingten Nachweisgrenzen beeinflusst.

Neben der „Signal zu Rausch“-Methode wurden die Nachweisgrenzen der Quantifizierungs-Übergänge ebenfalls durch die indirekte Kalibrieremethode gemäß DIN 32645 bestimmt. Die daraus abgeleiteten Nachweisgrenzen wurden in nachfolgender Tab. 46 für die APCI- und ESI-Ionisierungstechnik gegenübergestellt.

Tab. 46: Bestimmung der Nachweisgrenzen der Typ A und Typ B Trichothecene in der Tandem-Massenspektrometrie für die Quantifizierungs-Ionenübergänge mittels Kalibrieremethode

	Quantifizierungs-Ionenübergang NWG [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	
	APCI	ESI
T-2 Toxin	1,9	0,8
HT-2 Toxin	1,8	3,6
DAS	0,7	1,6
15-AcSCP	2,9	-
3-AcSCP	0,7	1,4
NEO	3,5	-
DON	5,1	2,2
3-AcDON	1,7	7,8
15-AcDON	8,3	4,6
FusX	3,4	8,8
NIV	2,0	5,4

Beim Vergleich der in Tab. 45 und Tab. 46 dargestellten Ergebnisse konnte festgestellt werden, dass die Kalibrierfunktions-Methode erwartungsgemäß geringfügig höhere Nachweisgrenzen lieferte.

6.8.2 Matrixbelastung der ASE-Multi-Trichothecen-Methode

Die Nachweisempfindlichkeit einiger Analysensysteme (z. B. ELISA, HPLC-UV, GC, und LC-MS) kann durch coextrahierte Substanzen aus einer Probe beeinflusst werden. Diese „Matrix-Effekte“ können sich im Vergleich mit einfachen Analyt-Lösungen in reinen Lösungsmitteln in verstärkten (Promotion) oder abgeschwächten (Suppression) Signalintensitäten ausdrücken.

Zur Beurteilung der Extrakte nach Extraktion und Aufreinigung durch die ASE-Multi-Trichothecen-Methode wurden diese mittels HPLC-UV bei einer Wellenlänge von 218 nm detektiert. Dafür wurde ebenfalls das Vergleichsmaterial DON 311 eingesetzt.

Dieses Chromatogramm (Abb. 37) verdeutlicht, dass die Matrixbelastung durch die ASE-Multi-Trichothecen-Methode für eine UV-Detektion von DON bei einer Wellenlänge von 218 nm deutlich zu groß war. Der Aufreinigungsgrad war für das routinemäßig angewandte HPLC-UV System demnach nicht ausreichend. In nachfolgender Abb. 38 wurde derselbe Extrakt über eine DON-IAC-Säule aufgereinigt.

Abb. 37: HPLC-UV-Chromatogramm des Vergleichsmaterials DON 311 nach Aufarbeitung der ASE-Multi-Trichotheceen-Methode bei einer Wellenlänge von 218 nm

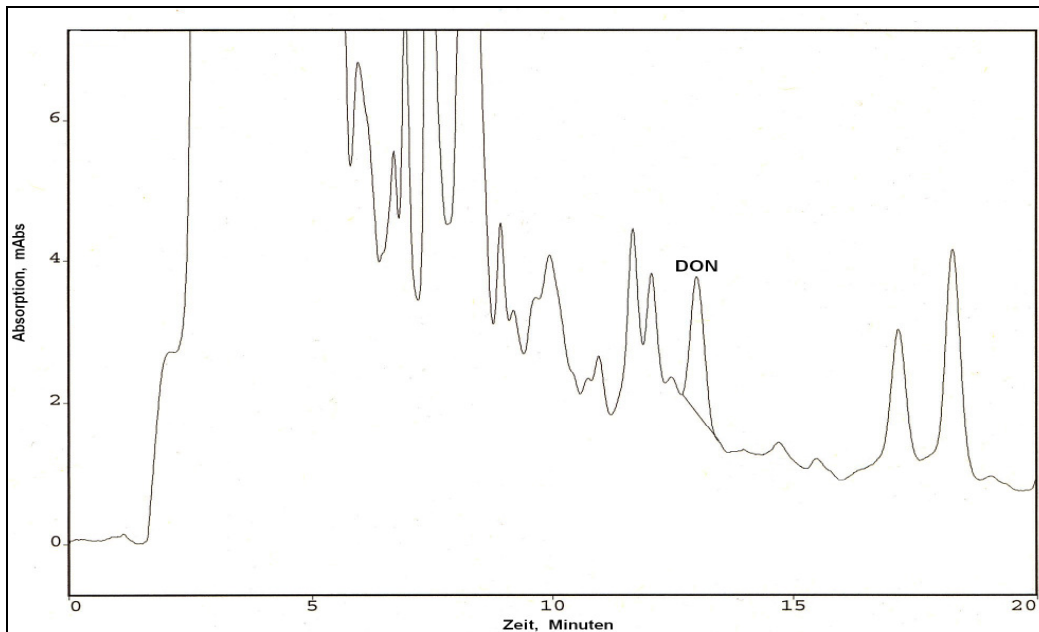
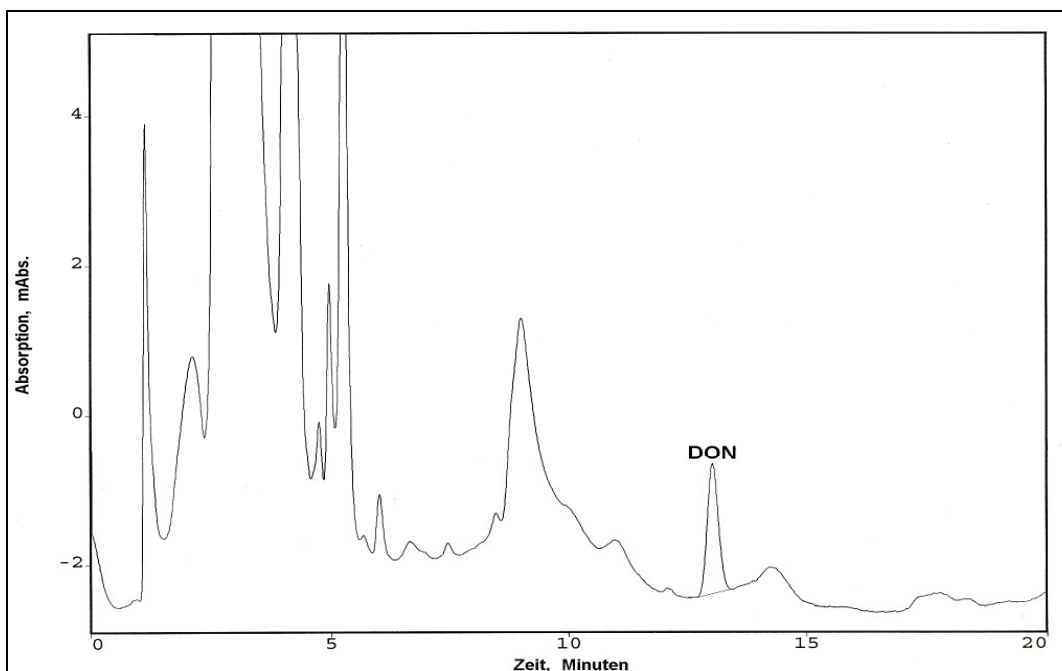


Abb. 38: HPLC-UV-Chromatogramm des Vergleichsmaterials DON 311 nach Aufarbeitung der ASE-Multi-Trichotheceen-Methode und IAC-Aufreinigung bei einer Wellenlänge von 218 nm



Nach einer weiteren Aufreinigung über eine IAC-Säule war eine deutlich verringerte Matrixbelastung zu beobachten. Somit war eine Kombination aus ASE-Aktivkohlefilter-Aufreinigung und anschließender IAC-Aufreinigung notwendig, um eine routinemäßige UV-Detektion von DON bei einer Wellenlänge von 218 nm zu ermöglichen.

6.8.3 Matrixkalibrierung der ASE-Multi-Trichothecen-Methode

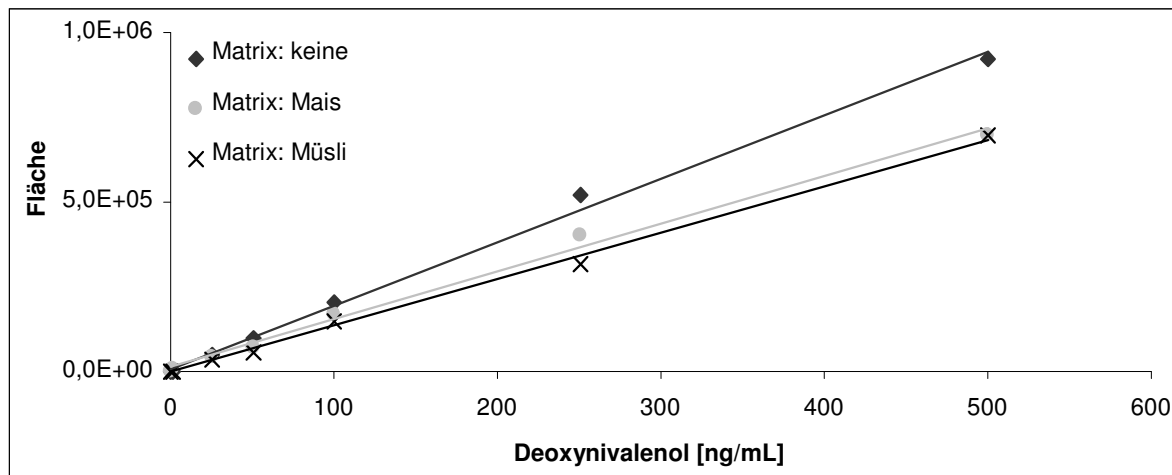
Auswirkungen auf die Signalintensität eines Massenspektrometers können durch coextrahierte Matrixbestandteile verursacht werden, die die Effizienz der Ionisierung beeinflussen. Diese „Matrix-Effekte“ können durch einen Vergleich der Signalintensitäten von Standardlösungen in reinem Lösungsmittel mit den Signalintensitäten entsprechender Matrixlösungen nachgewiesen werden. KEBARLE UND TANG (1993) zeigten, dass die Basizität bzw. Azidität co-eluierender Matrixbestandteile in der Gasphase größer war als die der Zielanalyten und somit der Protonentransfer im Ionisierungsprozess wahrscheinlicher wurde, was in einer geringeren Ionisierung der Analyten resultierte. MATUSZEWSKI ET AL. (1998) beschrieben ein häufigeres Vorkommen von Ionen-Suppression bei der ESI-Ionisierung gegenüber der Ionisierung mittels APCI.

Matrixbedingte Störungen sind in der Fusarientoxin-Analytik mit LC-MS bekannt. So konnten PALLARONI ET AL. (2001) zeigen, dass bei der chemischen Ionisierung (LC-APCI-MS) der Zielanalyten DON, NIV und ZEA in Gegenwart von Matrixbestandteilen von Gerste, Hafer, Weizenmehl und Mais Unterschiede bestanden. Dabei unterdrückten Matrixbestandteile der Gerste das MS-Signal für die genannten Mykotoxine. Vergleichbare Effekte wurden von ESKOLA ET AL. (2001) für die Analytik mittels GC-MS beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung von matrixunterstützten Kalibrationen für die Analytik von Trichothecenen Matrixeffekte unterdrückt werden konnten. Die Autoren zeigten bei gaschromatographischen Untersuchungen (Detektion mittels ECD bzw. MS), dass in Gegenwart von Extrakten mit Getreidematrix höhere Signalintensitäten der Trichothecen-Kalibrationsstandards entstanden als ohne Matrix. Ebenfalls PLATTNER UND BENNETT (1983) untersuchten DON und ZEA in Getreide-Rohextrakten mittels Tandem Massenspektrometer bei positiver und negativer chemischer Ionisierung (Direkteinlass-CI-MS/MS). Dabei diskutierten die Autoren bei der Verdampfung der komplexen Matrix in Gegenwart von CI-Reaktantgas (Isobutan) in die CI-Quelle einen signifikanten Einfluss auf die CI-Reaktionsbedingungen. Dieser Effekt führt zu Abweichungen in der Intensität der Molekül- und Fragment-Ionen im Vergleich zu den entsprechenden äquimolar injizierten Reinsubstanzen. Dies wurde auf erhöhte Mengen an Matrix zurückgeführt, die zu einer Abweichung der normalen CI-Quellen Leistung führten.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde zur weiteren Charakterisierung der Methode für die massenspektrometrische Detektion eine Matrixkalibrierung durchgeführt. Dafür wurden die Ionisierungsquellen ESI und APCI eingesetzt. Durch dieses Vorgehen sollte der Matrixeinfluss während des Ionisierungsprozesses bewertet werden.

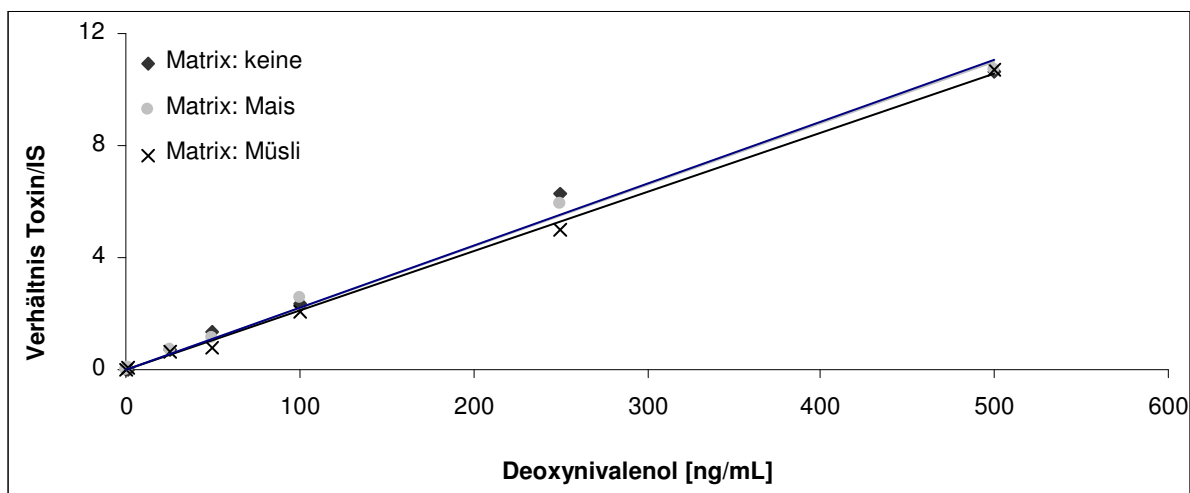
Für die Matrix-Kalibration der ASE-Multi-Trichothecen-Methode wurden Mais und ein Müsli bestehend aus Hafer-, Weizen-, Dinkel- und Gersteflocken herangezogen. Im Folgenden sind die Kalibrationsfunktionen der Matrixkalibration von DON (mittels ESI) und T-2 Toxin (mittels APCI) beispielhaft dargestellt, wobei sowohl mit als auch ohne Internen Standard (d_3 - T - 2 Toxin) gearbeitet wurde. Die Untersuchungen der Matrixeinflüsse auf die Kalibration wurden für Typ B Trichothecene in einem Konzentrationsbereich von $5 \cdot 10^2$ und für Typ A Trichothecene in einem Konzentrationsbereich von $2,5 \cdot 10^2$ durchgeführt. Die resultierenden Kalibrationsfunktionen sind für die jeweiligen Trichothecen-Gruppen für die APCI- und ESI-Ionisierungstechnik in den Tab. 47 und Tab. 48 zusammengefasst.

Abb. 39: Matrixkalibrierung (LC-ESI-MS/MS) von DON mittels Mais- bzw. Müsli-Matrix (die Kalibrationsfunktion wurde mittels externer Kalibration erstellt)



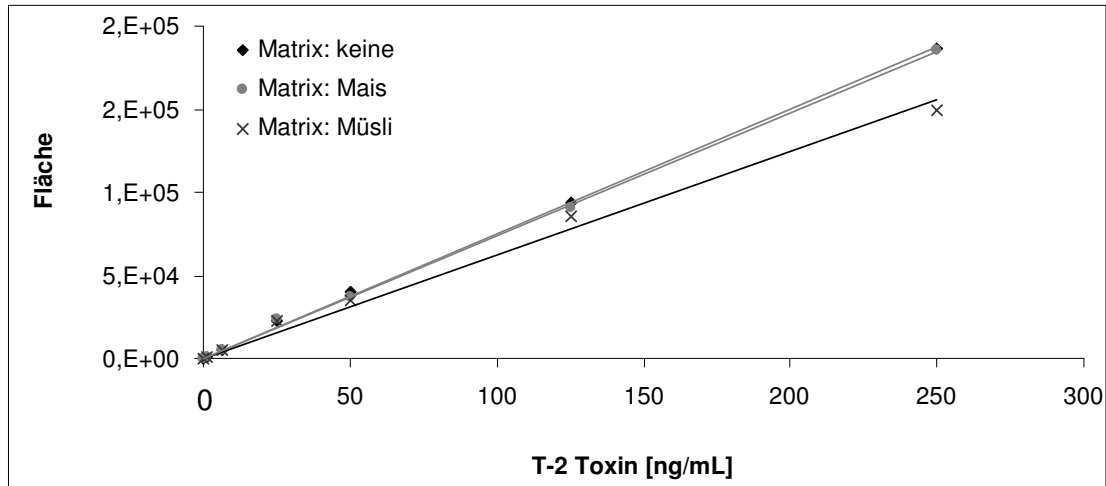
Die DON-Matrixkalibrierung (Abb. 40) verdeutlicht für die ESI-Ionierungsquelle für beide Matrices eine Suppression. Diese Suppressionseffekte wurden bereits von SPANJER (2004) für Matrices wie Erdnüsse und Cornflakes unter Verwendung einer ESI-Ionisierung mit positiver Polarität beschrieben. BISELLI UND HUMMERT (2005) beschrieben Suppressionseffekte für die Matrix Sojabohnenmehl aber auch Promotionseffekte für die Matrix Mehl unter Verwendung einer ESI-Ionisierung mit negativer Polarität.

Abb. 40: Matrixkalibrierung (LC-ESI-MS/MS) von DON mittels Mais- bzw. Müsli-Matrix (Die Kalibrationsfunktion wurde mittels Interner Kalibration erstellt.)



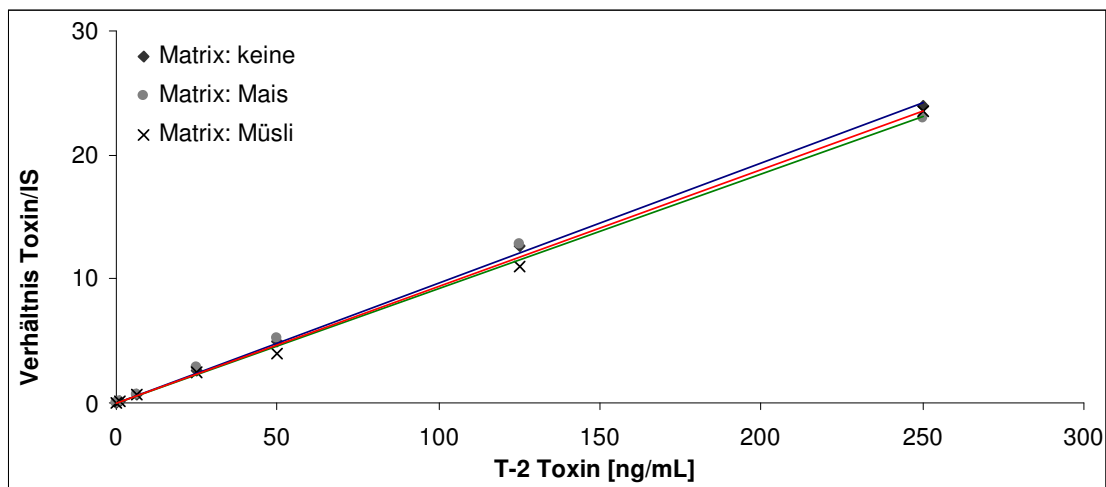
Im Rahmen der Matrixkalibrierung wurde d_3 -T-2 Toxin als Interner Standard für die Typ A und Typ B Trichothecene eingesetzt. Daraus resultierte die in Abb. 41 aufgestellte Matrixkalibrierung. Hierbei wurde deutlich, dass dieser Interne Standard die aufgetretenen Matrixeffekte, unter anderem auch für DON ausglich.

Abb. 41: Matrixkalibrierung (LC-APCI-MS/MS) von T-2 Toxin mittels Mais- bzw. Müsli-Matrix (Die Kalibrationsfunktion wurde mittels externer Kalibration erstellt.)



Die Matrixkalibrierung von T-2 Toxin mittels APCI-Ionisierungstechnik deutet lediglich für das Probenmaterial Müsli eine geringe matrixbedingte Suppression an (Abb. 42). Unter Anwendung der Kalibrierung mit Internen Standards (bezogen auf d_3 -T-2 Toxin) wurde dieser Suppressionseffekt erwartungsgemäß ausgeglichen (Abb. 43).

Abb. 42: Matrixkalibrierung (LC-APCI-MS/MS) von T-2 Toxin mittels Mais- bzw. Müsli-Matrix (die Kalibrationsfunktion wurde mittels Interner Kalibration erstellt)



Werden die Steigungen der Matrixkalibrationsfunktionen zwischen den in reinen Lösungsmitteln (Eluent) und den mit Matrix angereicherten (Müsli bzw. Mais) Toxinstandards verglichen, so ist deutlich zu erkennen, dass sowohl für die APCI- als auch für die ESI-Ionisierungstechnik die in den Eluenten hergestellten Toxinstandards zu größeren Steigungen führten, als die mit Matrix angereicherten. Dies deutet auf einen matrixbedingten Suppressionseffekt hin.

Tab. 47: Regressionsgleichungen der externen Matrixkalibration für Typ B Trichothecene

Toxin	Matrix	APCI		ESI	
		Linearität	Korrel.koeff.	Linearität	Korrel.koeff.
NIV	keine	$y = 5073 \cdot x - 2809$	1,000	$y = 175 \cdot x - 390$	1,000
	Mais	$y = 4340 \cdot x + 15576$	0,999	$y = 139 \cdot x + 53$	1,000
	Müsli	$y = 3967 \cdot x + 4318$	0,997	$y = 127 \cdot x - 242$	1,000
DON	keine	$y = 1789 \cdot x - 403$	1,000	$y = 1870 \cdot x + 9141$	0,998
	Mais	$y = 1106 \cdot x + 2801$	1,000	$y = 1412 \cdot x + 10863$	0,998
	Müsli	$y = 1241 \cdot x + 2076$	0,994	$y = 1374 \cdot x - 1935$	0,999
FusX	keine	$y = 1930 \cdot x + 559$	1,000	$y = 1480 \cdot x + 8209$	0,999
	Mais	$y = 1682 \cdot x + 2164$	0,999	$y = 1052 \cdot x + 3893$	1,000
	Müsli	$y = 1395 \cdot x + 20609$	0,999	$y = 1054 \cdot x - 1122$	0,999
3-AcDON	keine	$y = 7076 \cdot x + 6097$	1,000	$y = 1015 \cdot x + 7276$	0,997
	Mais	$y = 6194 \cdot x + 1865$	1,000	$y = 659 \cdot x - 410$	1,000
	Müsli	$y = 4984 \cdot x + 7843$	0,991	$y = 653 \cdot x - 1293$	1,000
15-AcDON	keine	$y = 2123 \cdot x + 875$	1,000	$y = 823 \cdot x + 9638$	1,000
	Mais	$y = 1859 \cdot x + 4377$	1,000	$y = 482 \cdot x + 9060$	0,992
	Müsli	$y = 1468 \cdot x + 22678$	0,993	$y = 477 \cdot x + 5518$	0,998

Für die Typ B Trichothecene liegen die Korrelationskoeffizienten der in Tab. 47 zusammengefassten Kalibrationsfunktionen für die APCI-Ionisierungstechnik in einem Bereich von 0,993 bis 1,000 und für die ESI-Ionisierungstechnik in einem Bereich von 0,992 bis 1,000.

Weiterhin geht aus Tab. 47 hervor, dass die Steigungen der Kalibrationsfunktionen aus reinem Lösungsmittel hergestellten Toxin-Standards im Vergleich zu den mit Matrix (Mais bzw. Müsli) angereicherten Toxin-Standards größere Steigungen zu verzeichnen haben. Dies konnte sowohl bei der APCI- als auch bei der ESI-Ionisierungstechnik beobachtet werden.

Dies lässt für die Gruppe der Typ B Trichothecene den Schluss zu, dass für das untersuchte Probenmaterial eine matrixbedingte Suppression vorlag.

Tab. 48: Regressionsgleichungen der externen Matrixkalibration für Typ A Trichothecene

Toxin	Matrix	APCI		ESI	
		Linearität	Korrel.koeff.	Linearität	Korrel.koeff.
T-2 Toxin	keine	$y = 740 \cdot x + 1507$	1,000	$y = 789 \cdot x + 2993$	0,997
	Mais	$y = 734 \cdot x + 859$	1,000	$y = 807 \cdot x + 1408$	0,999
	Müsli	$y = 601 \cdot x + 3510$	0,997	$y = 787 \cdot x - 525$	0,997
HT-2 Toxin	keine	$y = 1492 \cdot x + 908$	1,000	$y = 401 \cdot x + 257$	1,000
	Mais	$y = 1072 \cdot x - 1169$	0,999	$y = 383 \cdot x + 1202$	0,999
	Müsli	$y = 1209 \cdot x + 8794$	0,994	$y = 337 \cdot x + 1735$	0,996
3-AcSCP	keine	$y = 7467 \cdot x - 6339$	1,000	$y = 17672 \cdot x + 62022$	0,999
	Mais	$y = 7132 \cdot x - 5255$	1,000	$y = 16527 \cdot x + 42485$	0,999
	Müsli	$y = 5427 \cdot x + 3635$	0,994	$y = 17343 \cdot x - 9634$	0,999
NEO	keine	$y = 270 \cdot x + 70$	0,999	-	-
	Mais	$y = 260 \cdot x - 555$	0,998	-	-
	Müsli	$y = 209 \cdot x + 1828$	0,990	-	-
DAS	keine	$y = 3422 \cdot x + 6852$	0,998	$y = 1312 \cdot x + 6357$	0,999
	Mais	$y = 3364 \cdot x - 2100$	1,000	$y = 1362 \cdot x - 7$	1,000
	Müsli	$y = 2602 \cdot x + 16455$	0,990	$y = 1428 \cdot x - 3739$	0,999
15-AcDAS	keine	$y = 688 \cdot x + 2026$	0,999	-	-
	Mais	$y = 662 \cdot x - 429$	0,996	-	-
	Müsli	$y = 512 \cdot x + 3376$	0,997	-	-

Für NEO und 15-AcDAS wurde keine Matrixkalibrierung bei der ESI-Ionisierungstechnik durchgeführt, da beide Toxine eine zu geringe Empfindlichkeit aufwiesen. Die Korrelationskoeffizienten der in zusammengefassten Kalibrationsfunktionen liegen für die APCI-Ionisierungstechnik in einem Bereich von 0,990 bis 1,000 und für die ESI-Ionisierungstechnik in einem Bereich von 0,997 bis 1,000.

Wie aus Tab. 48 hervorgeht, weisen die Steigungen der Kalibrationsfunktionen aus reinem Lösungsmittel hergestellten Toxin-Standards im Vergleich zu den mit Maismatrix angereicherten Toxin-Standards annähernd gleiche Steigungen auf. Dies konnte sowohl bei der APCI- als auch bei der ESI-Ionisierungstechnik beobachtet werden. Im Vergleich dazu weisen die Steigungen der Kalibrationsfunktionen aus Müslimatrix angereicherten Toxin-Standards teilweise geringere Steigungen auf. Diese Beobachtung gilt allerdings nicht für die ESI-Ionisierungstechnik für die Toxine 3-AcSCP und DAS. Somit konnte für dieses Probenmaterial eine matrixbedingte Suppression festgestellt werden.

Weiterhin wurden auf den Internen Standard d_3 -T-2 Toxin bezogene Kalibrationsfunktionen berechnet. Beispielhaft sind in den Abb. 41 (ESI; Verhältnis DON/ d_3 -T-2 Toxin) und Abb. 43 (APCI; Verhältnis: T-2 Toxin/ d_3 -T-2 Toxin) diese Kalibrationsfunktionen wiedergegeben. Die Steigungen dieser Kalibrationsfunktionen der Typ A und Typ B Trichothecene zeigten, wie bei dem Einsatz von Internen Standards bei der LC-MS/MS üblich, innerhalb eines Ionisierungsverfahrens keinen signifikanten Unterschied. Die berechneten Korrelationskoeffizienten dieser Kalibrationsfunktionen liegen für die Typ B Trichothecene in einem Bereich von 0,990 bis 1,000 und für die Typ A Trichothecen von 0,995 bis 1,000 und sind somit als linear zu betrachten.

Die mit Internen Kalibrationsstandard ermittelten Kalibrierfunktionen verdeutlichen die Minimierung der Varianz der Steigung dieser Regressionsgeraden im Vergleich zu den mit Externem Standard ermittelten Kalibrierfunktionen. Dies kann anhand der relativen Standardabweichungen der Steigungen der mit und ohne Matrix berechneten Regressionsgeraden verdeutlicht werden. So lagen bei den externen Kalibrierfunktionen der Typ A und Typ B Trichothecene sowohl bei der ESI-Ionisierungstechnik als auch bei der APCI-Ionisierungstechnik die relativen Standardabweichungen der Steigungen in einem Bereich von 10 bis 20 %. Nach Interner Kalibration lagen die relativen Standardabweichungen der Steigung der matrixkalibrierten Regressionsgeraden von Typ A und Typ B Trichothecen in einem Bereich von 3 bis 10 %.

6.9 Größenausschlusschromatographie – Bestimmung von Fusarientoxinen in Speiseöl

Das Problem dieser Aufgabenstellung lag in der Auswahl und Optimierung eines geeigneten Aufreinigungsverfahrens für ZEA und weiteren Fusarientoxinen in pflanzlichen Speiseölen. Bislang sind in der Analytik von Fusarientoxinen wenige Veröffentlichungen bekannt, die über die Möglichkeit der Gelpermeationschromatographie als Probenaufarbeitung berichten. Die nachstehend beschriebenen Methoden zur Analytik von Mykotoxinen in Lebens- und Futtermitteln wurden auf der Grundlage von stärke- und faserbasierenden Getreideprodukten entwickelt.

HAGAN UND TIETJEN (1975) entwickelten eine dünnschichtchromatographische Methode zur Trennung von Öl und verschiedenen Mykotoxinen. In einem ersten dünnschichtchromatographischen Entwicklungsschritt wurde die Lipidfraktion abgetrennt. Erst anschließend erfolgt die eigentliche Trennung der Mykotoxine (u.a. auch Zearalenon). MALAIYANDI UND BARRETTE (1978) beschrieben eine Methode zur Bestimmung von Zearalenon in Maiskeimöl mit mehrmaliger Flüssig-Flüssig-Partitionierung und anschließender Aufreinigung über ein Silica-Gel (Typ G-60). Das in Benzol gelöste Maiskeimöl wurde hierbei mit 1 %iger Natronlauge extrahiert, die anschließend mit Chloroform extrahiert wurde. Diese Methode wies bei einer Dotierungskonzentration von 250 µg/kg eine Wiederfindung von 66 % und bei einer Dotierungskonzentration von 1.000 µg/kg eine Wiederfindung von 87 % auf.

So entwickelten HETMANSKI UND SCUDAMORE (1989) eine Methode zur Bestimmung von 14 unpolaren Mykotoxinen u.a. Zearalenon, Zearalenol, Ochratoxin A und Ochratoxin B und

Aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂. Diese Methode basiert auf der Extraktion von Getreideerzeugnissen (Lebensmittel und Tierfutter) durch Dichlormethan/Salzsäure (10/1; V/V) und einer anschließenden Aufreinigung über eine Bio-Beads S-X3 Größenausschluss-Säule mit einem Dichlormethan/Ethylacetat/Ameisensäure-Eluenten (49,9/49,9/0,2; V/V/V) bei einem Durchfluss von 4 mL/min. Bei diesen GPC-Bedingungen eluierten die genannten Mykotoxine in einem Elutionsvolumen von 81 bis 130 mL. Sowohl für Zearalenon (Konzentration = 40 µg/kg) als auch für Zearalenol (Konzentration = 200 µg/kg) erzielte diese Methode eine mittlere Wiederfindung (n = 3) von 84 % bei der Dotierung auf Weizenmatrix.

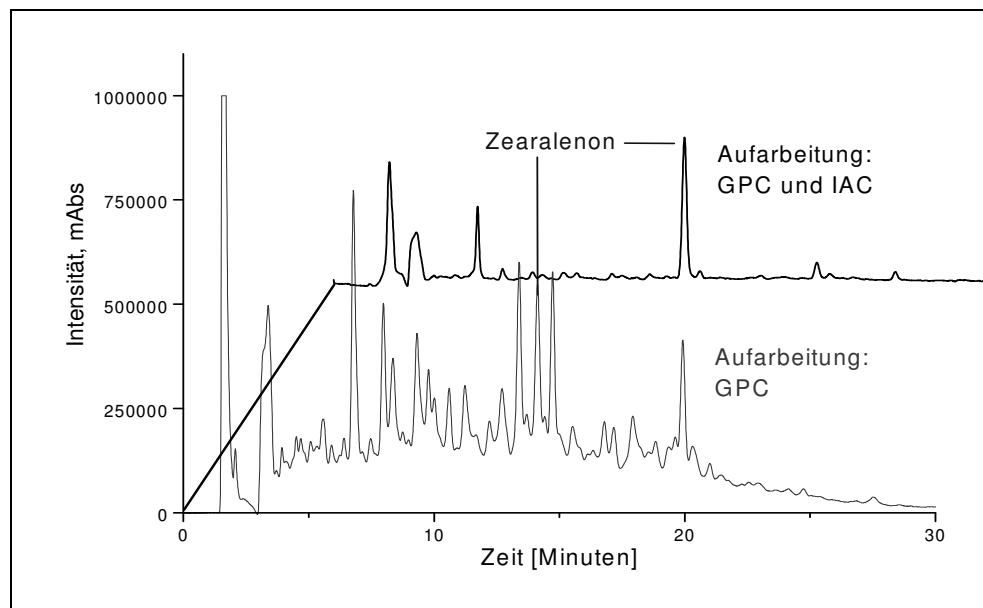
DUNNE ET AL. (1993) beschrieben eine Aufreinigung über GPC für Zearalenon, Ochratoxin A und B und Aflatoxin B₁, B₂, G₁. Dabei wurde die Extraktion und Aufreinigung vergleichbar zu der oben beschriebenen Methode von HETMANSKI UND SCUDAMORE (1989) durchgeführt. Die Wiederfindungsversuche wurden in Extrakten von Weizen-, Maiskörnern, und Palmenkernen vorgenommen. Dabei wurde für Zearalenon in Maiskörnern eine Wiederfindung von 49,7 %, in Palmenkernen von 17,2 % und in Weizenkörnern von 71,6 % ermittelt. Ebenfalls KOTAL ET AL. (1999) beschrieben eine Methode zur Bestimmung von sieben Trichothecenen (DON, NIV, T-2 Tetraol, FusX, DAS, T-2 Toxin und HT-2 Toxin) mittels GPC. Dabei erfolgte die Extraktion mit einem Acetonitril/Methanol-Gemisch (1:1; V/V) bzw. Acetonitril/Wasser-Gemisch (1:1; V/V). Ein Extrakt-Aliquot wurde eingeengt und der Rückstand in Chloroform gelöst. Anschließend wurde bei einem Durchfluss von 0,6 mL/min über eine Bio-Beads S-X3 Säule mit Dichlormethan/Ethylacetat (1/1; V/V) eluiert. Dabei wurde die erste 8 mL Fraktion verworfen, die folgende 7 mL Fraktion gesammelt. Die chromatographische Trennung und Detektion erfolgte über GC-ECD nach vorheriger Derivatisierung mittels Trifluoressigsäureanhydrid. Bei einer Wiederfindungskonzentration von jeweils 2 mg/kg Trichothecenen konnten Wiederfindungen im Bereich von 72 - 105 % bestimmt werden. Die Nachweisgrenzen der einzelnen Trichothecene bewegten sich im Bereich von 40 - 200 µg/kg.

RADOVA ET AL. (1998) setzten die GPC-Technik für eine Multi-Toxin-Methode für Typ A und Typ B Trichothecene ein. Für die GPC-Trennung wurde Bio-Beads S-X3 Material verwendet mit Chloroform als mobiler Phase (Durchfluss = 0,6 mL/min). Die Detektion der Trichothecene erfolgte mittels GC-ECD. Mit dieser GPC-Aufreinigung konnte die Matrix nur bis zu einem gewissen Grad entfernt werden, da nur bei einer dotierten Konzentration von 2000 µg/kg je Trichothecenen gute Wiederfindungen (86 - 97 %) verzeichnet wurden. Durch verbleibende Matrixbestandteile im Injektor und am Säuleneingang wurde der routinemäßige Einsatz dieser Methode erschwert.

RANFFT ET AL. (1990) beschrieben eine Methode zur simultanen Bestimmung von ZEA und OTA in Getreide nach Extraktion mit Chloroform und anschließender Aufreinigung über GPC. Die mittlere Wiederfindung wurde für ZEA zu 97 % in einem Konzentrationsbereich von 3,5 bis 85 µg/kg bestimmt.

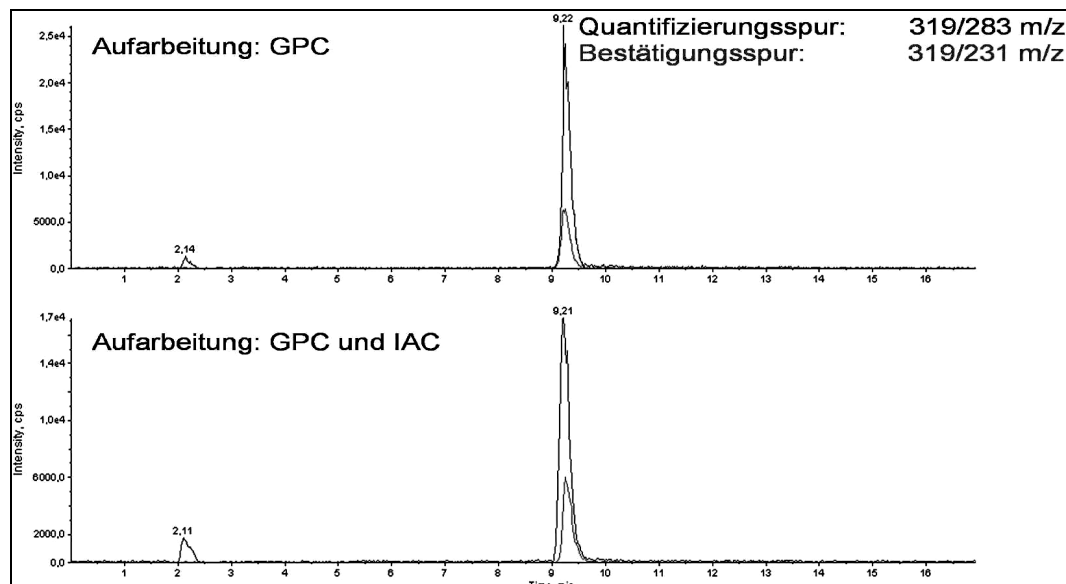
Durch die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode wurden erstmals Zearalenon, dessen Metabolite und Typ A und Typ B Trichothecene in überwiegend lipidhaltiger Matrix nachgewiesen und quantifiziert. Durch geeignete Vorversuche wurde das in Abb. 14 (Abschnitt 5.7) dargestellte Fraktionierungsbild für die Mykotoxine erhalten.

Abb. 43: HPLC-FLD-Overlay-Chromatogramm einer natürlich kontaminierten Maiskeimölprobe mit (schwarz) und ohne (rot) anschließender Aufreinigung über IAC



In Abb. 43 ist deutlich zu erkennen, dass nach erfolgter GPC-Aufreinigung (unteres Chromatogramm) und anschließender Fluoreszenz-Bestimmung für diese Detektion ein weiterer Aufreinigungsschritt notwendig (siehe oberes Chromatogramm) war, da die Störungen durch Matrixeinflüsse zu groß waren. Dies war bei einer GPC nachfolgenden LC-MS/MS-Bestimmung nicht notwendig (Abb. 44).

Abb. 44: MRM-Overlay-Chromatogramme (LC-ESI-MS/MS) einer natürlich kontaminierten Maiskeimölprobe mit ausschließlicher GPC-Aufreinigung (oberes Chromatogramm) und mit nachgeschalteter ZEA-IAC-Säulen-Aufreinigung (unteres Chromatogramm)



Wiederfindungsuntersuchungen

Die Wiederfindungsuntersuchungen von ZEA wurden in Maiskeim-, Soja- und Weizenkeimöl durchgeführt und sind in nachfolgender Tabelle für beide eingesetzten Detektionsverfahren zusammengefasst.

Tab. 49: Ergebnisse der Wiederfindungsuntersuchungen von Zearalenon in drei verschiedenen Speiseölen (n = 3)

	NWG [µg/kg]	Speiseöl	Konz. [µg/kg]	Wdf. [%]	RSD [%]
LC-MS/MS	0,3	Weizenkeimöl	20	85	2,6
		Sojaöl	100	90	2,9
		Maiskeimöl	500	98	1,4
HPLC-FLD	3	Weizenkeimöl	20	88	5,8
		Sojaöl	100	79	2,7
		Maiskeimöl	500	88	0,7

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode zur Bestimmung von ZEA in pflanzlichen Speiseölen zeigte für die GPC-Aufreinigung mit folgender LC-MS/MS-Bestimmung eine mittlere Wiederfindung von 99,4 % über einen Konzentrationsbereich von 10^3 . Die nacheinander eingesetzte Aufreinigung von GPC und IAC-Säule für die Bestimmung mittels HPLC-FLD zeigte eine mittlere Wiederfindung von 88,2 % über einen Konzentrationsbereich von $2 \cdot 10^2$. (Tab. 50). Die relativen Standardabweichungen beider Methoden lagen in einem Bereich von kleiner 10 % und erfüllen somit die Leistungskriterien gemäß Richtlinie 2005/38/EG für ZEA.

In Anbetracht der Polarität der Typ A und Typ B Trichothecene wurden geringe Konzentrationen in der Matrix pflanzliche Speiseöle erwartet. Die für ZEA entwickelte GPC-Methode wurde auf die Bestimmung von Trichothecenen in Speiseölen übertragen. Eine detaillierte Aufstellung der Wiederfindungsuntersuchungen ist im Anhang unter Tab. A-14 (Anhang, Abschnitt III) zusammengestellt.

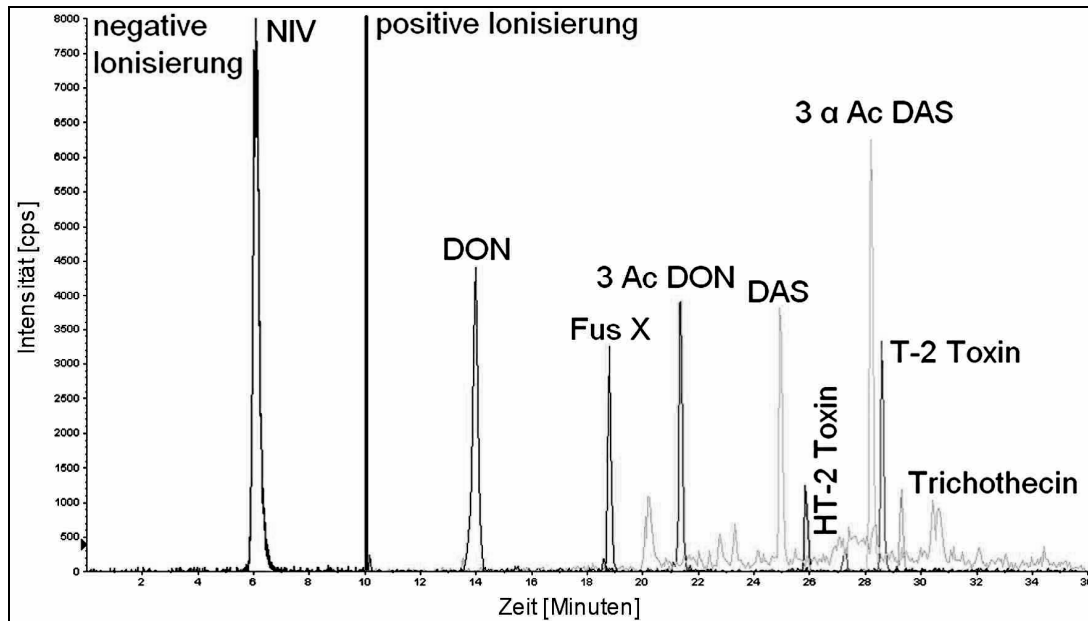
Tab. 50: Wiederfindungsfunktionen der HPLC-FLD- und der LC-MS/MS-Methoden zur Bestimmung von ZEA in pflanzlichem Speiseöl

	Wiederfindungsfunktion	Mittlere Wdf. [%]	Korr. Koeff.
LC-MS/MS	$y=0,994 \cdot x - 6,941$	99,4	1,000
HPLC-FLD	$y=0,882 \cdot x - 10,846$	88,2	0,999

Die Zusammenfassung der Wiederfindungsergebnisse zu den entsprechenden Wiederfindungsfunktionen in Tab. A-16 (Anhang, Abschnitt III) zeigt, dass VOL, DON, NIV Trichothecin und DAS gute mittlere Wiederfindungen in einem Bereich von 65 bis 120 % über alle untersuchten Matrices erzielten. Sowohl für die Typ B Trichothecene 3-AcDON, 15-AcDON und FusX als auch für die Typ A Trichothecene 3-AcSCP, 15-AcetoxyDAS, HT-2 Toxin und T-2 Toxin konnten Wiederfindungen von 29 - 78 % bei teilweise sehr großen relativen Standardabweichungen bis 60 % (Tab. A-14, Anhang Abschnitt III) nachgewiesen werden. Somit besitzt diese Methode einen sehr großen Streubereich. Dies kann dadurch erklärt werden, dass diese Methode für die Bestimmung von ZEA in Speiseölen entwickelt und optimiert wurde. Der Fraktionierungsbereich der GPC-Technik wurde auf ZEA optimiert und dementsprechend bestand die Möglichkeit, dass das resultierende Elutionsfenster in der GPC für die aufgeführten Trichothecene nicht im Optimum lag. Dies wird aus Abb. 15 (Abschnitt 5.7) ebenfalls deutlich. Trichothecene sind polare Verbindungen und somit in dieser lipidreichen Matrix und dem verwendeten Lösungsmittelgemisch Cyclohexan/Ethylacetat schwer löslich. Dieser Umstand kann dazu führen, dass wie gezeigt diese Methode zu einer höheren Streuung neigt.

Trotzdem konnte mit dieser Technik in Hanfölenproben eine Vielzahl von Trichothecenen nachgewiesen werden (Abb. 45). Durch Verwendung des Internen Standards konnten die unbefriedigenden Wiederfindungen in der Berechnung des Gehaltes berücksichtigt werden.

Abb. 45: MRM-Overlay-Chromatogramm (LC-APCI-MS/MS) einer natürlich kontaminierten, kaltgepressten Hanfölsprobe



6.10 Bestimmung von Typ A und Typ B Trichothecenen in Bier

SCOTT ET AL. (1993) entwickelten eine Methode zur Bestimmung von DON, NIV, α -ZOL, β -ZOL und ZEA in Bier mittels GC-MS nach vorheriger Heptafluorobutrylimidazol-Derivatisierung. Wiederfindungsuntersuchungen im Konzentrationsbereich von 5 - 20 ng/mL lagen im Bereich von 90 bis 103 %. Die Nachweisgrenzen der Methode wurden zu 0,1 - 1,5 ng DON/mL, 0,01 - 0,3 ng NIV/mL, 2,5 - 3ng α -ZOL und β -ZOL und 1,5 - 2 ng ZEA/mL bestimmt. In 29 von 50 untersuchten Bieren konnte DON nachgewiesen werden. Von den positiven Proben lagen 9 über 5 ng/mL bis hin zu 50 ng/mL. NIV konnte ebenfalls in drei Proben nachgewiesen werden (0,1 - 0,84 ng/mL). ZEA und dessen Derivate konnten in keiner der untersuchten Bierproben quantitativ bestimmt werden. SCOTT (1996) untersuchte mögliche Veränderungen von ZEA und DON innerhalb des Brauprozesses. Dabei konnte der Übergang dieser Mykotoxine aus kontaminiertem Getreide in Bier bestätigt werden. DON, das während des Brauprozesses erhalten bleibt, wurde mit hoher Inzidenz in kanadischen und europäischen Bieren nachgewiesen.

Bei einem durchschnittlichen Stammwürzegehalt von 10 % und den daraus abzuleitenden niedrigen DON-Konzentrationen in der Biermatrix wurde für die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode die Technik der LC-MS/MS für einen selektiven und empfindlichen Nachweis von DON gewählt. In die Methodenentwicklung wurde sowohl ein einzelner Extrelut[®]-Aufreinigungsschritt als auch eine kombinierte Aufreinigung mittels Extrelut[®]- und IAC-Säulen untersucht. Die Wiederfindungsuntersuchungen wurden in verschiedenen Biermatriizes (Hefeweizen, Ale, Vollbier Pils und Starkbier) in einem Konzentrationsbereich von 10 bis 100 μ g/L durchgeführt.

Tab. 51: Ergebnisse der Wiederfindungsuntersuchung von DON in vier unterschiedlichen Bier-Matrizes (n = 3)

Matrix	Konz. [µg/L]	Aufreinigung	Wdf. [%]	RSD _r [%]
Hefeweizen, hell	100	Extrelut [®]	81,4	16,7
		Extrelut [®] /IAC	72,2	11,1
Ale	10	Extrelut [®]	81,9	9,0
		Extrelut [®] /IAC	79,1	4,9
Vollbier Pils	50	Extrelut [®]	88,9	4,2
		Extrelut [®] /IAC	74,9	1,9
Starkbier Dunkel Bock	50	Extrelut [®]	80,0	3,8
		Extrelut [®] /IAC	72,1	6,7

In Tab. 51 sind die Wiederfindungsergebnisse der Extrelut[®]-Aufreinigung und der kombinierten Extrelut[®]- und IAC-Aufreinigung gegenübergestellt. Dabei weist der ausschließlich über Extrelut[®] aufgereinigte Extrakt eine höhere mittlere Wiederfindung von 81 % gegenüber einer mittleren Wiederfindung von 71 % bei der kombiniert eingesetzten Aufreinigung auf. Dabei wurde deutlich, dass der zeitintensive, zweite Aufreinigungsschritt über die DON-IAC-Säulen letztendlich zu sauberen Extrakten führte. Dies wurde insbesondere dadurch belegt, dass diese Extrakte ebenfalls mittels HPLC-UV untersucht werden konnten.

Tab. 52: Mittlere Wiederfindungen der unterschiedlichen Aufreinigungsverfahren zur Bestimmung von DON in Bier

	Wiederfindungs-funktion	Mittlere Wdf. [%]	Korrel. koeff.
Extrelut [®]	$y=0,81 \cdot x + 0,90$	81,0	0,998
Extrelut [®] und IAC	$y=0,71 \cdot x + 0,92$	71,0	1,000

Für eine deutliche Darstellung der breiten Anwendungsmöglichkeit dieser effektiven Extrelut[®]-Aufreinigung wurden für eine Charakterisierung der Methode weitere Typ A und Typ B Trichothecene herangezogen. Für die in nachstehender Tab. 53 zusammengefassten Toxine wurden dabei Wiederfindungs-untersuchungen durchgeführt.

Tab. 53: Wiederfindungsuntersuchungen von Typ A und Typ B Trichothecen in Bier (ohne NIV)

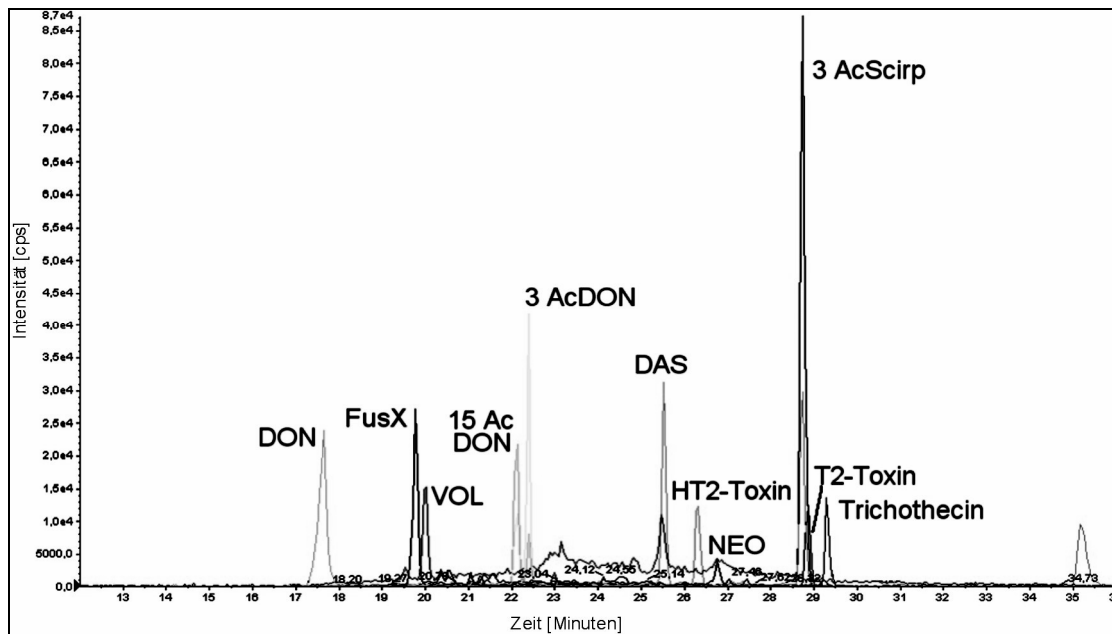
	Wiederfindungsfunktion	Mittlere Wdf. [%]	Korrel. koeff.
T-2 Toxin	$y=0,72 \cdot x - 2,83$	72	0,998
HT-2 Toxin	$y=0,86 \cdot x + 0,06$	86	0,998
3 AcScirp	$y=0,82 \cdot x - 3,23$	82	0,999
DAS	$y=0,78 \cdot x - 5,03$	78	1,000
Trichothecin	$y=0,76 \cdot x - 3,34$	76	1,000
VOL	$y=0,62 \cdot x + 8,01$	62	0,977
NEO	$y=0,85 \cdot x + 2,56$	85	0,998
FusX	$y=0,72 \cdot x + 2,31$	72	0,999
15-AcDON	$y=0,70 \cdot x + 2,84$	70	1,000
3-AcDON	$y=0,79 \cdot x + 6,51$	79	1,000

Die Ergebnisse der Wiederfindungsuntersuchungen (Tab. 53 und Tab. A-18, Anhang, Abschnitt III) zeigten überwiegend zufriedenstellende Resultate. Es wurde ein mittlerer Wiederfindungsbereich von 62 bis 86 % der untersuchten Trichothecene bestimmt. Allein die Ergebnisse der Wiederfindungen für Nivalenol sind mit durchschnittlich 3,1 % unbefriedigend. Ein Grund kann darin liegen, dass NIV die polarste Verbindung innerhalb der Typ B Trichothecene ist und während der 20-minütigen Verweildauer auf der Extrelut[®]-Säule sehr stark an das Sorbens adsorbiert und somit nicht mehr eluiert werden konnte bzw. die Elutionsstärke des Lösungsmittels zum Brechen der Adsorption ungenügend war.

Für DON wurden Wiederfindungen im Bereich von 80,0 bis 88,9 % (nur Extrelut) und 72,1 bis 79,1 % (Extrelut in Verbindung mit IAC-Säule) erzielt. Werden die RSD_r für DON für die Wiederfindungsuntersuchungen betrachtet, so liegen diese im Bereich 100-500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ innerhalb der Vorgabe von einer $RSD_r \leq 20 \%$ gemäß Richtlinie 2005/38/EG. Für T-2 Toxin wurden Wiederfindungen im Bereich von 57,7 bis 70,5 % und für HT-2 Toxin von 87,3 - 101,6 % erzielt. Betrachtet man die RSD_r für die durchgeführten Wiederfindungsuntersuchungen für HT-2 Toxin im Konzentrationsbereich von 100 - 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ und für T-2 Toxin im Konzentrationsbereich von 50 - 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$, so lagen diese innerhalb den genannten Vorgaben ($RSD_r \leq 40 \%$). Die untersuchten und hier aufgeführten Leistungskriterien in der Analytik von Fusarientoxinen wurden mit dieser Methode im vollen Umfang erfüllt.

Somit ist diese Methode für die gleichzeitige Bestimmung von Typ A und Typ B Trichothecenen, ausgenommen NIV, in Verbindung mit einem Tandem-Massenspektrometer geeignet.

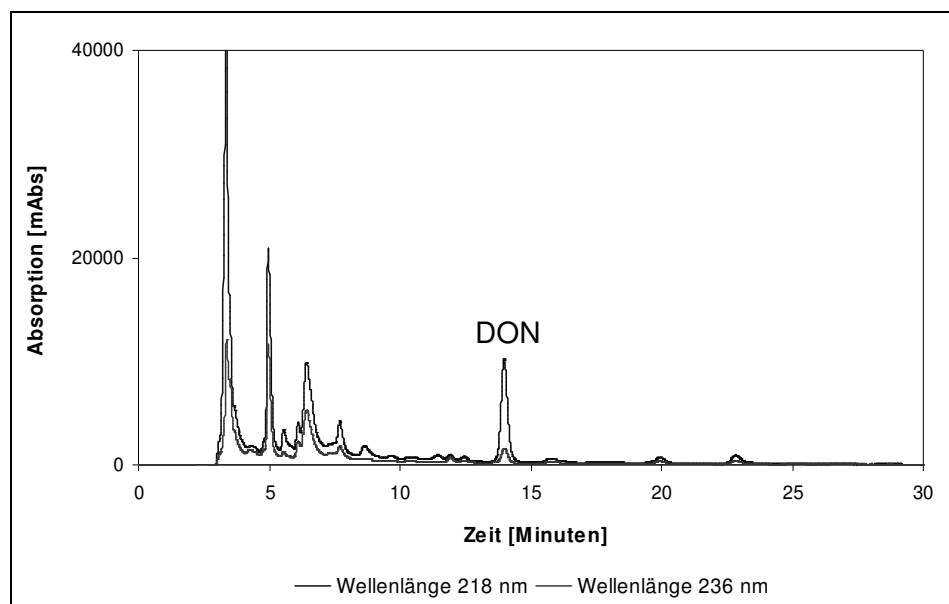
Abb. 46: MRM-Overlay-Chromatogramm (LC-APCI-MS/MS) einer aufgestockten Schwarzbier-Probe (50 $\mu\text{g}/\text{L}$ je Toxin) nach einfacher Extrelut Aufreinigung



Die Bestimmung von DON konnte nach zweifacher Aufreinigung über Extrelut[®]-Festphasenextraktion und anschließendem IAC-Säulen Clean-Up ebenfalls mit HPLC-UV durchgeführt werden. Ein entsprechendes Chromatogramm einer natürlich kontaminierten Probe (Hefeweizenbier) ist nachfolgend in Abb. 47 dargestellt.

Wie Abb. 47 verdeutlicht, ist DON nach zweifacher Aufreinigung durch Extrelut und IAC-Säule mittels UV-Detektion bei den Wellenlängen 218 nm und 236 nm bestimmbar. Das Chromatogramm derselben Biermatrix nach einer einfachen Aufreinigung über eine Extrelut Säule zeigte eine zu große Matrixbelastung, als dass eine routinemäßige HPLC-UV-Methode zu etablieren wäre. Es wurde deutlich, dass der zeitintensive, zweite Aufreinigungsschritt über die DON IAC-Säulen letztendlich zu saubereren Extrakten führte, die zuletzt mittels einfachen HPLC-UV-Systemen analysierbar wären.

Abb. 47: Overlay-Chromatogramm (HPLC-dual-UV) einer natürlich kontaminierten Bier-Probe (Hefeweizenbier, hell) nach Aufreinigung mittels Extrelut und anschließender IAC-Säule



Zur weiteren Charakterisierung von Leistungsparametern der Biermethode wurden Wiederholbarkeitsuntersuchungen anhand von natürlich kontaminiertem Starkbier durchgeführt. Die Ergebnisse der Validierungsdaten sind in Tab. 54 zusammengefasst. Eine statistische Auswertung mittels ANOVA (Tab. A-19, Anhang, Abschnitt III) zeigt für die Standardabweichung unter Wiederholbedingungen ein zufriedenstellendes Ergebnis.

Tab. 54: Ergebnisse der Wiederholbarkeitsuntersuchungen von DON in natürlich kontaminiertem Starkbier (n = 10) mittels LC-MS/MS

	Tag 1	Tag 2	Tag 3
	33,7	34,7	34,2
	32,3	25,7	29,0
	35,8	33,8	34,8
	41,2	39,0	40,1
	32,0	37,3	34,7
	39,0	38,5	38,8
	31,7	39,3	35,5
	35,2	38,8	37,0
	30,3	31,5	30,9
	31,8	35,3	33,6
Mittelwert	[µg/kg]	34,9	
Median	[µg/kg]	34,8	
Spannweite	[µg/kg]	15,5	
STABW	[µg/kg]	3,6	
VK	[%]	10,2	
Grubbs Ausreißer Test		Keine Ausreißer	
r	[µg/kg]	10,2	
s _r	[µg/kg]	3,6	
RSD _r	[%]	10,2	
S _r (Horwitz)	[µg/kg]	9,3	
RSD _r (Horwitz)	[%]	26,5	
Ho _r		0,4	

6.11 Qualitätskontrollkarten der eingesetzten Enzym-Linked-Immunosobent-Assay

Die ELISA-Techniken wurden sowohl für Screening-Untersuchungen unterschiedlicher Lebensmittelkategorien als auch zur quantitativen Analyse eingesetzt. Für die Qualitätssicherung der verwendeten DON- und ZEA-ELISA's wurde bei jeder durchgeführten ELISA eine Qualitätskontroll-Reihe mitgeführt. Diese QC-Reihe bestand aus vier Kavitäten (siehe auch Methoden M1 und M2 im Anhang unter Abschnitt II). Als Matrix für die ZEA dc-ELISA wurde ZEA 185 und für die DON dab-ELISA DON 311 eingesetzt. Somit konnte für beide ELISA eine Kontrollkarte mit den in Tab. A-20 (Anhang, Abschnitt III) beschriebenen Kontrollgrenzen eingesetzt werden. Im Zeitraum dieser Untersuchungen wurden die zur Verfügung gestellten Antikörper und Antiseren für die DON- und ZEA- Untersuchungen ausschließlich aus einer Charge verwendet.

Im Verlauf der durchgeführten DON ELISA wurden wie in Abb. 48 dargestellt die positive 3 s Kontrollgrenze einmal und die positive 2 s Kontrollgrenze fünfmal überschritten. Die negative 2 s Kontrollgrenze wurde einmal unterschritten. Die Stabilitätsuntersuchungen von DON 311 (siehe Abb. 48) zeigten über den gesamten Zeitraum keine Tendenzen. Somit ist die hier feststellbare abnehmende Tendenz auf methodische Umstände (Alterung der monoklonalen Antikörper oder der Anti-Maus-IgG-Antiserum) zurückzuführen. Da es sich hierbei um eine halbquantitative Analysentechnik („Screeningverfahren“) handelt, sind die Über- bzw. Unterschreitungen der 2 s- und 3 s-Kontrollgrenzen aus diesem Grund als nicht gravierend zu beurteilen. Die Kreuzvalidierung der ELISA-Technik mit der HPLC-UV bzw. LC-MS/MS (siehe Abschnitt 6.12.1) zeigt indes gute Ergebnisse.

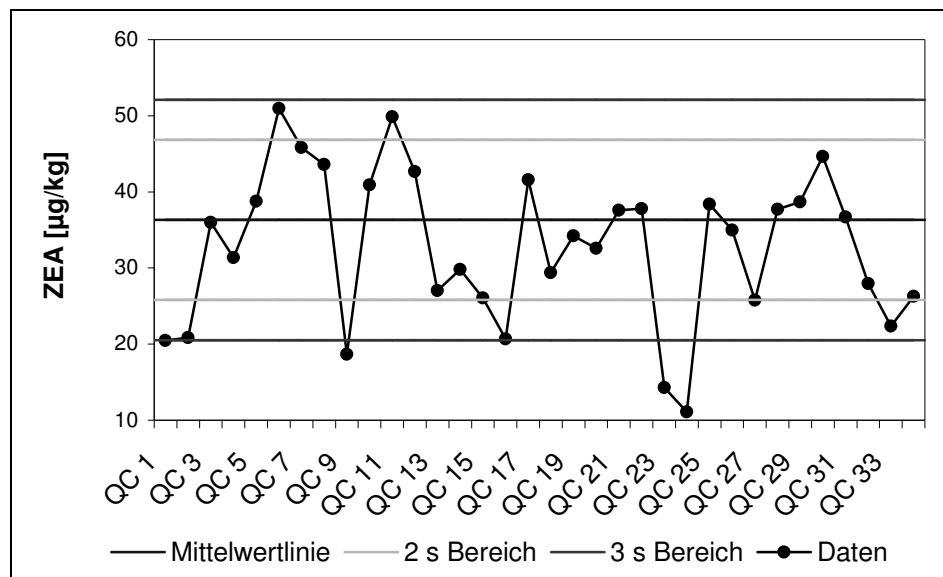
Abb. 48: Qualitätskontrollkarte der DON-ELISA mit Vergleichsmaterial DON 311



Die ZEA-Qualitätskontrollkarte zeigt über den gesamten Verlauf der ELISA-Untersuchungen im Rahmen der vorgegebenen Kontrollgrenzen sehr streuende Ergebnisse. Es wurde keine auffällige Tendenz über diesen Zeitraum festgestellt. Somit können lagerungsbedingte Effekte bei den ZEA-Antikörpern und -Konjugaten ausgeschlossen werden. Aus der ZEA-Kontrollkarte geht hervor, dass die untere 3 s Kontrollgrenze viermal und die 2 s-Kontrollgrenze dreimal unterschritten wurde. Eine Überschreitung der oberen 2 s-Kontrollgrenze konnte in zwei Fällen beobachtet werden. Wie bereits in Abschnitt 6.4.3 (IAC-Säulen) diskutiert, sind neben den Isomerverbindungen von ZEA ebenfalls eine Vielzahl von Matrixbestandteilen für mögliche ZEA-Überbefunde verantwortlich. Da es sich hierbei um eine halbquantitative Analysentechnik („Screeningverfahren“) handelt, sind die Über- bzw. Unterschreitungen der 2 s- und 3 s-Kontrollgrenzen als nicht zu drastisch zu beurteilen, zei-

gen aber auch die Limitierungen dieses Verfahrens. Die Kreuzvalidierung (siehe Abschnitt 6.12.5) der HPLC-FLD und LC-MS/MS mit der ELISA zeigt durch die Steigung der Mittelwertlinie ebenfalls die Neigung zu Überbefunden an.

Abb. 49: Qualitätskontrollkarte der ZEA-ELISA mit Vergleichsmaterial ZEA 185



6.12 Methodenvergleich und Kreuzvalidierung

6.12.1 Vergleich der DON-Methoden

Im Rahmen dieses Verbundforschungsvorhabens wurde neben der routinemäßig angewandten (siehe Kapitel 6.5) DON-Analytik eine neue Methode zur Bestimmung von Trichothecenen (siehe Kapitel 4.8) entwickelt. Für eine weitere Qualitätsabsicherung wurde an einem internationalen Ringversuch teilgenommen. Für einen Vergleich der beschriebenen Methoden wurde das bereits validierte Vergleichsmaterial DON 311 (siehe Abschnitt 6.2) herangezogen.

DON-Ringversuch FSA

Für eine weitere Qualitätsabsicherung wurde an einem internationalen Ringversuch (N = 14) der Food Standards Agency (FSA) für die Bestimmung von DON in Getreide und Getreideerzeugnissen teilgenommen (FSA, (2005)). Die Validierung dieser Methode erfolgte anhand der in Tab. 55 aufgeführten Matrices und den deskriptiv-statistischen Leistungsparametern. Die Ergebnisse der Wiederfindungsuntersuchungen sind in Tab. 55 zusammengefasst.

Tab. 55: Zusammenfassung der Ergebnisse des DON Ringversuchs durchgeführt von der Food Standard Agency (FSA, 2005)

		Hafermehl	Reismehl 1	Reismehl 2	Weizenmehl	Polenta	Frühstückszerealien
MW	[µg/kg]	1768,4	457,5	85,4	678,2	123,1	217,2
n		10	11	10	12	11	12
r	[µg/kg]	153,8	83,6	33,7	113,7	22,1	80,6
sr	[µg/kg]	54,92	29,9	12,0	40,6	7,9	28,8
RSDr	[%]	3,1	6,5	14,1	6,0	6,4	13,2
Hor		0,3	0,6	1,0	0,5	0,4	1,0
R	[µg/kg]	685,3	146,9	35,5	309,3	79,6	160,0
sR	[µg/kg]	244,76	52,5	12,7	110,5	28,4	57,1
RSD	[%]	13,8	11,5	14,8	16,3	23,1	26,3
HoR		0,9	0,6	0,7	1,0	1,1	1,3

Die hier vorgestellte Methode wurde für die Bestimmung von DON in einem Konzentrationsbereich von 100 µg/kg bis 2000 µg/kg in Getreide und Getreideprodukten in diesem Ringversuch validiert. Diese Methode ist somit für die Überwachung von Getreide und Getreideprodukten zur Einhaltung der europäischen Höchstmengen von 750 µg/kg für verarbeitetes Getreide und 1250 µg/kg Rohgetreide gemäß Richtlinie 2005/38/EG anwendbar. Werden die in Tab. 55 aufgeführten RSD_R 's und Horrat-Werte mit denen aus dem Forschungsprojekt (siehe Abschnitt 6.2.5) erhaltenen verglichen, so liegen diese in einem akzeptablen Bereich.

Tab. 56: Ergebnisse der Wiederfindungsuntersuchungen des FSA-DON-Ringversuchs

Matrix	n	Konz. [µg/kg]	Wdf. [%]	Mittlere Wdf. [%]
Hafermehl	12	2000	30 - 90	78
Reismehl	12	500	52 - 100	84
Weizenmehl	12	1000	54 - 106	82
Polenta	12	200	49 - 111	87
Frühstückszerealien	11	500	57 - 94	74

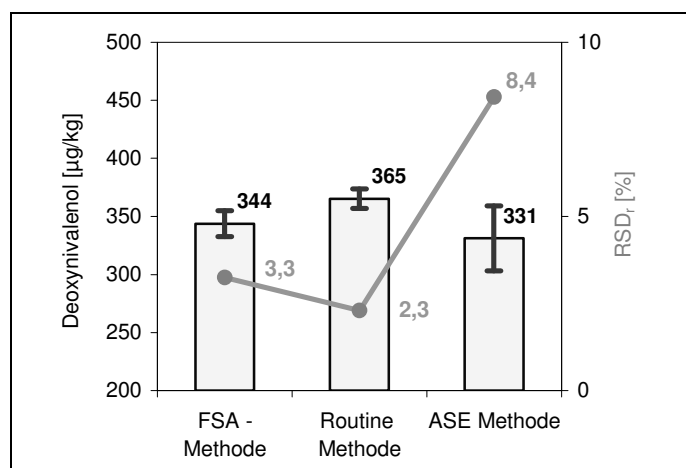
Die Ergebnisse der Wiederfindungsuntersuchungen zeigten für alle Matrices hinreichende Ergebnisse bezüglich der mittleren Wiederfindung.

Vergleich der eingesetzten DON-Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedliche Methoden zur Bestimmung von DON in Getreide und Getreideprodukten angewandt. Zum Vergleich der Leistungscharakteristika wurden vom Vergleichsmaterial DON 311 mit den jeweiligen Methoden entsprechend zwölf Extrakte hergestellt. Jeder dieser Extrakte wurde zweimal untersucht.

Wie aus Abb. 50 hervorgeht, lieferten die vorgestellten Methoden im Rahmen der jeweiligen Streuung sehr gute übereinstimmende Ergebnisse. Die hier erzielten Mittelwerte von DON 311 liegen im Streubereich des Materials. Wie aus Abschnitt 6.2.1 hervorgeht, wurde aus den Vorversuchen zur Homogenitäts- und Stabilitätsprüfung eine mittlere DON-Konzentration für DON 311 von 371 µg/kg mit einem RSD von 11,2 % ermittelt. Durch die externe Validierung (siehe Abschnitt 6.2.3) der teilnehmenden Laboratorien des Verbundforschungsvorhabens wurde eine mittlere DON-Konzentration für DON 311 von 330 µg/kg mit einem RSD von 4,2 % ermittelt. In der Richtlinie 2005/38/EG der Kommission wird für die RSD_r ein Wert von ≤ 20 % gefordert. Die hier vorgestellten Methoden besitzen einen RSD_r von 3,3 % (Ringversuch Methode), 2,3 % (Routine-Methode), und 8,4 % (ASE-Multi-Trichotheceen-Methode) und erfüllen somit die geforderten Leistungskriterien gemäß Richtlinie 2005/38/EG.

Abb. 50: Vergleich der FSA-DON-Methode, DON-Routine-Methode und ASE-Multi-Trichotheceen-Methode anhand des Vergleichsmaterials DON 311 (n = 12)



6.12.2 Kreuzvalidierung der DON-Routinemethoden

In der instrumentellen Analytik versteht man unter Kreuzvalidierung den Vergleich von analytischen Methoden bzw. Detektionstechniken gegenüber einer Referenzmethode oder einem Referenz-Detektions-System. Hierzu wird eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt. Der entscheidende Punkt bei der Kreuzvalidierung ist die Identifizierung von systematischen Fehlern. Die Ergebnisse aus den unterschiedlichen Systemen werden zur Berechnung der Steigung a , des Abszissenabschnitts b (Offset), des Korrelationskoeffizienten r (bzw. Bestimmtheitsmaß r^2) und der Regressionsgeraden (Regressionsgeraden: $y=a \cdot x + b$) herangezogen. Somit kann aus den Daten der resultierenden Regressionsgeraden eine qualitative und objektive Aussage über auftretende systematische Fehler getroffen werden. Besteht eine zu große Abweichung von $b = 0$ bei dem Abszissenabschnitt, so kann dies auf ein zu großes Untergrundsignal (Rauschen) einer der Methoden zurückzuführen sein. Bei einer von $a = 1$ stark abweichenden Steigung liegt ein systematischer Fehler bei einer der angewandten Methoden vor. In der Praxis werden häufig signifikante Unterschiede des Abszissenabschnitts von 0 und signifikante Unterschiede der Steigung von 1 festgestellt. Zur Bestimmung signifikanter Unterschiede wurden für a und b bei einem Vorhersageintervall von 95 % die jeweiligen Vertrauensgrenzen berechnet.

Die Kreuzvalidierungen und die Regressionsanalyse der routinemäßig durchgeführten Analysenmethoden ELISA, HPLC-UV und LC-MS/MS für die Analytik von DON sind nachfolgend in Tab. 57 zusammengefasst. Die entsprechenden Regressionsgeraden sind in den Abb. A-1 und Abb. A-2 (Anhang; Abschnitt III) hinterlegt. Zum Vergleich der angewandten Methoden wurde die Tandem-Massenspektrometrie als Referenzmethode zugrunde gelegt.

Tab. 57: Kreuzvalidierung der DON-Bestimmung zwischen LC-MS/MS als Referenzverfahren und HPLC-UV bzw. ELISA

Referenzverfahren	Vergleichendes Verfahren	n	Gleichung	r
LC-MS/MS	HPLC-UV	356	LC-MS/MS=20,32+091 · HPLC-UV	0,96
LC-MS/MS	ELISA	313	LC-MS/MS=24,22+090 · ELISA	0,98

Ein Abszissenanschnitt von 20,32 bei der UV-Detektion und 24,22 bei der Bestimmung mittels ELISA im Vergleich zur LC-MS/MS deutet auf ein leicht erhöhtes Untergrundsignal der UV-Detektion bzw. ELISA-Technik im Vergleich zur LC-MS/MS-Methode hin. Eine Steigung der Regressionsgeraden von 0,91 (UV-Detektion) bzw. 0,90 (ELISA) deutet darauf hin, dass keine signifikant systematischen Fehler der angewandten Analysetechniken zugrunde liegen. Ein Korrelationskoeffizient von 0,893 (ELISA) bzw. 0,973 (HPLC-UV) und ein Bestimmtheitsmaß von 0,80 (ELISA) bzw. 0,95 (HPLC-UV) geben an, dass die verwendeten Methoden zur Bestimmung von DON vergleichbare Ergebnisse liefern und somit über den dargestellten Konzentrationsbereich linear sind.

6.12.3 Kreuzvalidierung unterschiedlicher Massenspektrometer in der DON-Analytik

In Abb. A-3 (Anhang; Abschnitt III) ist ein Kreuzvergleich zwischen zwei unterschiedlichen Generationen, an Massenspektrometer dargestellt. Dabei wurde die Regressionsgerade $API\ 2000 = 0,19 + 1,25 \cdot API\ 4000$ für die jeweils eingesetzte APCI-Ionisierungstechnik ermittelt. Die geometrische Konstruktion der APCI-Ionisationsquellen der API 2000 bzw. der API 4000 unterscheiden sich in Bezug auf das MS-Einlass-System in einer orthogonalen und einer off-axis Sprühanordnung.

Ein Abszissenabschnitt (Offset) von 0,19 bei der API 4000 deutet darauf hin, dass beide Generationen der APCI Ionisierungstechniken innerhalb dieser Methode ein vergleichbares Untergrundsignal aufweisen. Dies kann auf den Einsatz der IAC-Säulen zurückzuführen sein,

da dadurch für die Massenspektrometrie eine größtmögliche Aufreinigung erzielt wurde. Die Steigung der Regressionsgeraden von 1,25 zeigt, dass die Ergebnisse der API 2000 im Vergleich zur API 4000 in der Tendenz leicht überzeichnen. Ein Korrelationskoeffizient von 0,983 und ein Bestimmtheitsmaß von 0,967 belegen, dass die eingesetzten unterschiedlichen Generationen an APCI Ionisierungstechniken für die Bestimmung von DON übereinstimmende Ergebnisse liefern.

6.12.4 Kreuzvalidierung der eingesetzten Ionisierungstechniken (APCI – ESI)

Die Kreuzvalidierungen der eingesetzten Ionisierungstechniken wurden ausschließlich an der API 4000 durchgeführt. Als Grundlage für diese Untersuchung dienten die Extrakte der DON-Routinemethode, der ASE-Multi-Trichotheccen-Methode und der DON-Bier-Methode. Demnach konnten diese Untersuchungen an unterschiedlichen Matrices und Analyten (DON, NIV und HT-2 Toxin) durchgeführt werden. Die ermittelten Regressionsgeraden sind in Abb. A-4 bis Abb. A-7 (Anhang, Abschnitt III) aufgeführt und in nachfolgender Tab. 58 zusammengefasst.

Tab. 58: Kreuzvalidierung zwischen den eingesetzten ESI- und APCI-Ionisierungstechniken für DON, NIV und HT-2 Toxin bei unterschiedlichen Methoden

Analyt	Methode	n	Gleichung	r
DON	Routinemethode	42	$APCI = 0,94 \cdot ESI + 31,25$	0,98
DON	Bier-Methode	126	$APCI = 1,13 \cdot ESI + 0,40$	0,90
NIV	ASE-Multi-Trichotheccen-Methode	74	$APCI = 1,23 \cdot ESI + 1,47$	0,98
HT-2 Toxin	ASE-Multi-Trichotheccen-Methode	21	$APCI = 1,30 \cdot ESI + 0,57$	0,92

Die Kreuzvalidierung zwischen der APCI- und ESI-Ionisierungstechniken für DON innerhalb der Routinemethode erzielte einen Korrelationskoeffizient von 0,98. Die Steigung der Regressionsgeraden von 0,94 veranschaulicht, dass keine systematischen Fehler in Form von matrixbedingten Suppressions- oder Promotionseffekten der beiden Ionisierungstechniken durch die DON-Routinemethode über einen großen Konzentrationsbereich zu erwarten sind. Wird dieses Ergebnis mit der Kreuzvalidierung der DON-Bestimmung in Bier verglichen, bei der ein Korrelationskoeffizient von 0,90 und einer Steigung der Regressionsgeraden von 1,13 erreicht wurde, so ist festzustellen, dass unabhängig von den jeweiligen Aufreinigungsschritten und somit von den Probenextrakten keine matrixbedingten Suppressions- oder Promotionseffekte zu erwarten sind. Die für diese Untersuchungen eingesetzten Extrakte resultierten aus der in Abschnitt 5.7.1 erläuterten Aufreinigungsmethode mittels einer Extrelut[®]-Säule. Dabei ist festzuhalten, dass diese Kreuzvalidierung in einem für diesen Analyten sehr niedrigen Konzentrationsbereich (zwischen NWG bis 30 µg/L; Absolut NWG bis 3,6 µg) ermittelt wurde.

NIV wurde mit beiden Ionisierungstechniken im negativen Ionisierungsmodus über die Ionenspur m/z 311→281 detektiert. Aus Tab 58 geht hervor, dass die Kreuzvalidierung von NIV einen Abszissenabschnitt von 1,47 aufweist. Dies verdeutlicht, dass unter den negativen Ionisierungsbedingungen ein nur sehr geringes Untergrundsignal vorhanden war. Mit einem Korrelationskoeffizient von 0,98 liefern beide Ionisierungstechniken übereinstimmende Ergebnisse. Eine Anzahl von 21 positiven HT-2 Toxin Proben sind für eine statistisch signifikante Kreuzvalidierung zu gering, so dass hierfür weitere Daten erhoben werden müssen. Mit einem Korrelationskoeffizient von 0,98 (Tab. 58) liefern beide Ionisierungstechniken zufrieden stellende Übereinstimmungen für den Konzentrationsbereich von NWG bis 20 µg/kg.

6.12.5 Kreuzvalidierung der ASE-Multi-Trichothece-Methode

Die Kreuzvalidierung der neu entwickelten ASE-Multi-Trichothece-Methode gegenüber der routinemäßig angewandten DON-Analytik belegt durch die Regressionsgerade ASE-Multi-Trichothece-Methode = 0,75 Routinemethode + 3,05 anhand von natürlich kontaminierten Matrices die Anwendbarkeit dieser Methode (siehe Abb. A-8 Anhang; Abschnitt III). Bei der Kreuzvalidierung zwischen der routinemäßigen DON-Bestimmung und der neu entwickelten ASE-Multi-Trichothece-Methode wurden ein Bestimmtheitsmaß von 0,97 und ein Korrelationskoeffizient von 0,98 erzielt. Hier kann von einer sehr guten Korrelation gesprochen werden. Die Steigung der Regressionsgeraden von 0,75 deutet an, dass die routinemäßig eingesetzte DON-Methode im Vergleich zu der ASE-Multi-Trichothece-Methode zu leichten Überbefunden tendiert. Dieser Befund wird aufgrund der höheren Selektivität des Massenspektrometers erklärt. Durch die Kreuzvalidierung mit natürlich kontaminierten Matrices, über einen Konzentrationsbereich von der Nachweisgrenze bis zu 1500 µg/kg wurde die Linearität beider Verfahren bestätigt. Sie liefern im Rahmen des Vorhersageintervalls annähernd gleiche Ergebnisse.

6.12.6 Kreuzvalidierung der Zearalenon-Routinemethoden

Nachfolgend sind die Kreuzvalidierungen und die Regressionsanalyse der routinemäßig durchgeführten Analysenmethoden ELISA, HPLC-UV und LC-MS/MS für die Analytik von ZEA in Tab. 59 zusammengefasst. Die zu Grunde liegenden Abbildungen sind im Anhang, Abschnitt III unter Abb. A-9 und Abb. A-10 hinterlegt. Als Referenzmethode wurde die Tandem-Massenspektrometrie der ELISA-Methode und der Routine HPLC-FLD-Methode gegenüber.

Tab. 59: Kreuzvalidierung der HPLC-Routinemethode gegenüber der ELISA-Technik und der Referenzdetektion LC-MS/MS

Referenzverfahren	Vergleichendes Verfahren	n	Gleichung	Korr. koeff.
LC-ESI-MS/MS	HPLC-FLD	200	LC-MS/MS=2,69+1,05·FLD	0,98
LC-ESI-MS/MS	ELISA	71	LC-MS/MS=21,57+0,90·ELISA	0,93

Ein Abszissenanschnitt (Offset) von 2,69 bei der FLD-Detektion im Vergleich zur LC-MS/MS deutet darauf hin, dass die Untergrundsignale beider Methoden im Rahmen der Konfidenzgrenzen annähernd vergleichbar sind. Wird die Bestimmung von ZEA mittels ELISA und LC-MS/MS verglichen, so resultiert ein Abszissenanschnitt (Offset) von 21,57. Dies deutet auf ein leicht erhöhtes Untergrundsignal bzw. Rauschen der ELISA-Technik hin. Eine Steigung von 1,05 in Bezug auf die FLD-Detektion bzw. von 0,90 in Bezug auf die ELISA-Technik deutet an, dass keine signifikanten systematischen Fehler der angewandten Analysetechniken zugrunde liegen.

6.13 Massenspektrometrie und Fragmentierung von Fusarientoxinen

Tandem-Massenspektrometer als Detektionstechnik erlauben neben einer empfindlichen quantitativen Detektion die gleichzeitige selektive Identifizierung von Fusarientoxinen.

Zuerst erfolgte das Einmessen (Tuning) der zu detektierenden Substanzen. Hierfür wurden konzentrierte Tuninglösungen (Fusarientoxine gelöst in Acetonitril/Wasser unter Zusatz von Ammoniumacetat und Ameisensäure) der Typ A und Typ B Trichothecene bzw. Zearalenon und Derivaten (~5 µg/mL) durch eine Spritzenpumpe direkt in die Turboionsprayquelle eingebracht. Von diesen Ionen wurden Vorläuferionenspektren aufgezeichnet, in denen das Quasimolekülion stets als stärkstes Signal ermittelt wurde, wobei hierfür die einzelnen Optiken des Massenspektrometers jeweils optimiert wurden. Um eine höhere Spezifität zu erreichen, wurden beim Tandem-Massenspektrometer durch schonende Fragmentierung im CID-Quadrupol (LINAC[®] Zelle) charakteristische Fragmente des Moleküls gebildet. So wurden vom Quasimolekülion durch CID (Collision induced dissoziation) die entsprechenden Produktionen erzeugt und diese im Produktionenscan aufgezeichnet.

6.13.1 Massenspektrometrie von Trichothecenen

Die in Tab. 60 beispielhaft zusammengefassten Fragmentierungsmuster von Trichothecenen gehen auf Daten von NIELSEN UND SMEDSGAARD (2003) (dunkelgrau unterlegt), BERGER ET AL. (1999) (hellgrau unterlegt) und den in Rahmen dieser Arbeit (nicht unterlegt) ermittelten Fragmentierungen zurück. Dabei wird neben den ermittelten Fragmenten auch die zugehörige relative Fragmentierungshäufigkeit in Bezug auf das dominierende Fragment (100 %) dargestellt. Eine vollständige Zusammenfassung aller untersuchten Trichothecene befindet sich im Anhang, Abschnitt III, Tab. A-21.

Tab. 60: Vergleich der Fragmentierungsmuster ausgewählter Trichothecene anhand von Literaturdaten und den im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Fragmentierungen

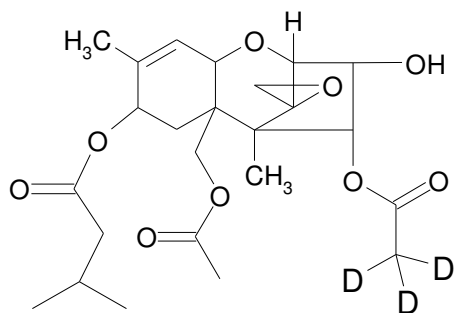
Verbindung (Molekulare Masse)	Ionisierung	Basis-Peak [100 %]	Monoisotopen-Ionen (m/z) in % des Basis-Peaks
DON (296)	ESI, positiv	231	249 (95), 297 (60), 203 (55)
	APCI, positiv	297	231 (5), 249 (25), 261 (10), 267 (15), 279 (20)
	ESI, positiv	249	279 (93), 261 (47), 231 (50), 203 (33)
HT-2 Toxin (424)	ESI, positiv	263	245 (60), 215 (55), 442 (30), 197(30)
	APCI, positiv	425	245 (5), 263 (10), 323 (10), 355 (10), 442 (20)
	ESI, positiv	425	407 (32), 365 (6), 323 (9), 289 (20), 263 (43), 245 (22), 233 (24), 215 (36)
T-2 Toxin (466)	ESI, positiv	489	215 (55), 305 (45), 484 (38), 245 (35)
	APCI, positiv	335	197 (5), 215 (15), 227 (5), 245 (20), 257 (5), 275 (10), 287 (5), 305 (45), 337 (40), 365 (50), 397 (35), 467 (65), 484 (40)
	ESI, positiv	305	467 (48), 449 (9), 407 (7), 365 (27), 275 (17), 257 (30), 245 (68), 215 (51), 197 (19), 185 (24)
d3-T-2 Toxin (470)	ESI, positiv	308	471 (62), 453 (12), 368 (26), 275 (16), 245 (84), 227 (18), 215 (53), 197 (26)

Dunkelgrau: NIELSEN UND SMEDSGAARD (2003); Hellgrau: BERGER ET AL. (1999); Farblos: inhouse

Fragmentierung von T-2 Toxin und des deuterierten Analogon.

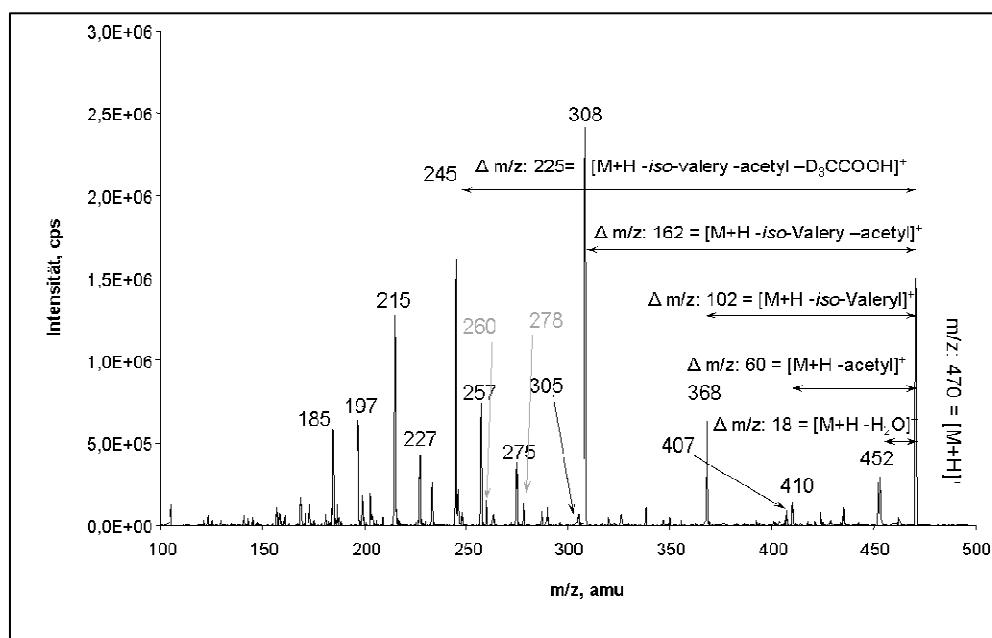
Aus der Produktspezifikation der Fa. SIGMA-ALDRICH[®] geht die Strukturformel von *d*₃-T-2 Toxin (Abb. 51) hervor. Demnach sind die drei Deuteriumatome an der Acetyleinheit des 15 C-Atoms der Trichothecen-Grundstruktur lokalisiert.

Abb. 51: Strukturformel von d_3 -T-2 Toxin entsprechend den Produktspezifikation der Fa. Sigma-Aldrich®.



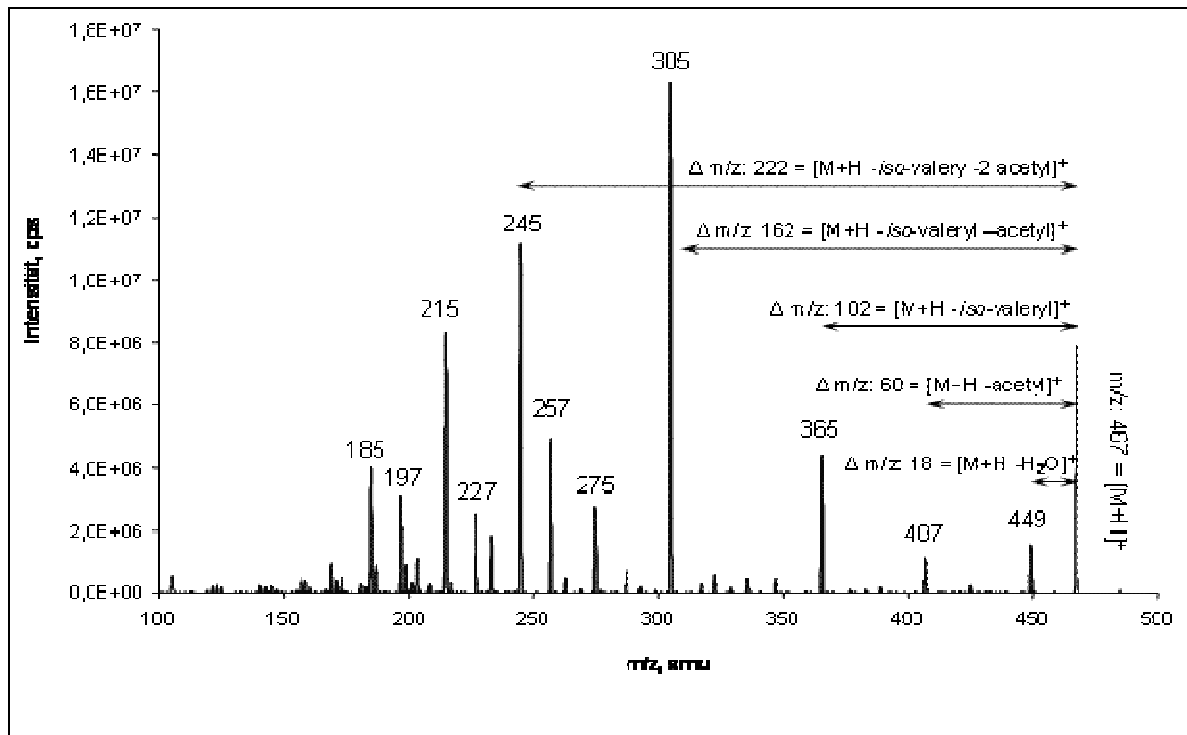
In den folgenden Abb. 52 und Abb. 53 sind die Produkt-Ionen-Spektren von T-2 Toxin und d_3 -T-2 Toxin gegenübergestellt.

Abb. 52: Massenspektrum von d_3 -T-2 Toxin erstellt im Product-Ionen-Scan-Modus



Die markierten Fragment-Ionen m/z 407 und m/z 305 in Abb. 52 verdeutlichen, dass neben den d_3 -T-2 Toxin Fragmenten m/z 410 bzw. m/z 308 ebenfalls diese T-2 Toxin Fragmente auftraten. Die markierten Fragment-Ionen m/z 260 und m/z 278 in Abb. 52 verdeutlichen im Vergleich mit Abb. 53, dass ebenfalls in dem typischen Fragmentierungsbereich (m/z 185 bis m/z 275) der Typ A Trichothecene, unter Anwendung des dreifach deuterierten T-2 Toxins (Abb. 52), Fragment-Ionen mit dieser Deuterium-Gruppe resultieren.

Abb. 53: Massenspektrum von T-2 Toxin erstellt im Product-Ionen-Scan-Modus

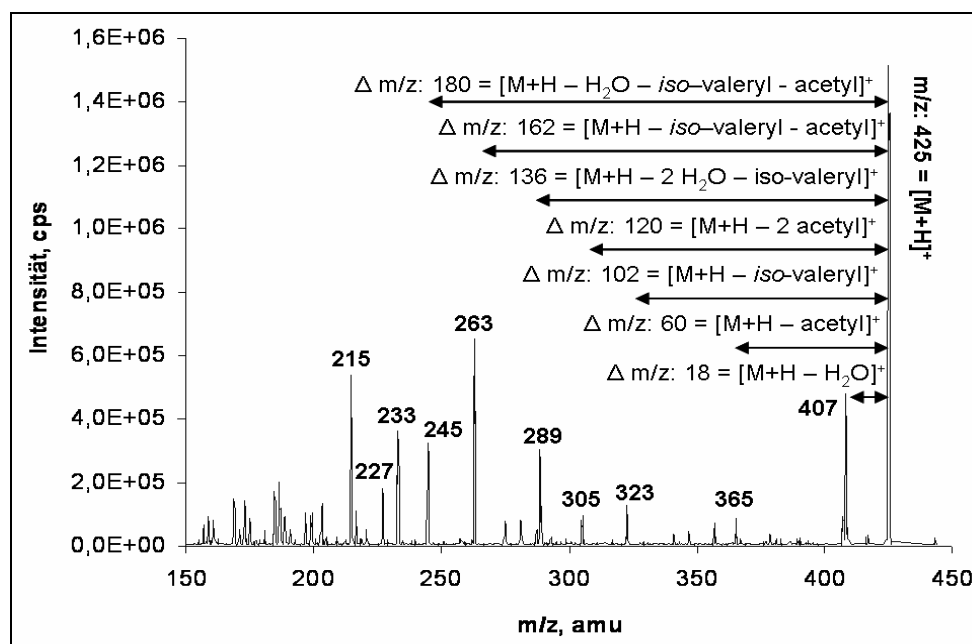


Werden die erhaltenen Massenspektren verglichen, so fällt auf, dass ausgehend von dem Molekülion m/z 467 bis zu dem Fragment m/z 245 im Massenspektrum von d_3 -T-2 Toxin alle drei Deuteriumatome eine Verschiebung um drei Masseneinheiten verursachen. Das bedeutet, dass die Fragment-Ionen m/z 452, m/z 410, m/z 368 und m/z 308 jeweils die drei Deuteriumionen besitzen. Unterhalb von m/z 245 treten nur noch die für Trichothecene typischen Fragmentmuster (siehe Tab. 60) auf. Vergleicht man die Massenspektren von T-2-Toxin und d_3 -T-2-Toxin, so ist in dem Massenbereich von m/z 300 bis m/z 470 bei den Fragmenten m/z 449 bzw. m/z 453, m/z 407 bzw. m/z 410, m/z 365 bzw. m/z 368 und m/z 305 bzw. m/z 308 jeweils ein um 3 amu verschobener Fragmentierungsmechanismus. Das lässt darauf schließen, dass sich die drei Deuterium-Atome zusammen an einem Kohlenstoff-Atom befinden. In dem Massenbereich von 180 bis 300 werden hingegen ausschließlich die für die Gruppe der Trichothecene typischen, übereinstimmenden Fragmente (m/z 275, m/z 257, m/z 245, m/z 227, m/z 215, m/z 197, m/z 185) gefunden.

Fragmentierung von HT-2 Toxin

Für HT-2 Toxin (Abb. 54) ergibt sich ein ähnliches Fragmentierungsmuster wie bei T-2 Toxin (Abb. 53). Dies wird durch die Massenverluste von $\Delta m/z$ 18, $\Delta m/z$ 60, $\Delta m/z$ 102 und $\Delta m/z$ 162 deutlich. Weiterhin konnten im Massenbereich von m/z 200 bis 300 die für die Gruppe der Trichothecene typischen Fragment-Ionen 215, 227, 233, 245, 263, 289 bestimmt werden. Diese beispielhaft dargestellten Produkt-Ionen-Spektren bestätigen die oben erwähnten Daten von KOSTIAINEN (1988) und BURROWS (1994).

Abb. 54: Massenspektrum von HT-2 Toxin erstellt im Product-Ionen-Scan-Modus



6.13.2 Massenspektrometrie von Zearalenon und dessen Derivaten

Ein Überblick über die Fragmentierungen von Zearalenon und dessen Metabolite ist in nachfolgender Tab. 61 zusammengefasst. Darin werden die Daten von NIELSEN UND SMEDSGAARD (2003) (dunkelgrau unterlegt) und LAGANA ET AL. (2001) (hellgrau unterlegt) und den in dieser Arbeit (nicht unterlegt) ermittelten Fragmenten gegenübergestellt. Eine ausführliche Zusammenstellung der Fragmentierung der Zearalenon-Derivate befindet sich im Anhang unter Abschnitt III (Tab. A-22).

Tab. 61: Fragmentierung von Zearalenon und Derivaten

Verbindung/ (Molekulare Masse)	Ionisierung	Basis-Peak [100 %]	Monoisotopen-Ionen (m/z) in % des Basis Peaks
Zearalanon (320)	ESI, positiv	303	321 (22), 277 (5)
	APCI, negativ	161	319 (20), 275 (30), 233 (26), 205 (90), 189 (20), 149 (38), 137 (54), 107 (86)
	ESI, positiv	302	321 (3), 285 (3), 207 (16), 189 (22)

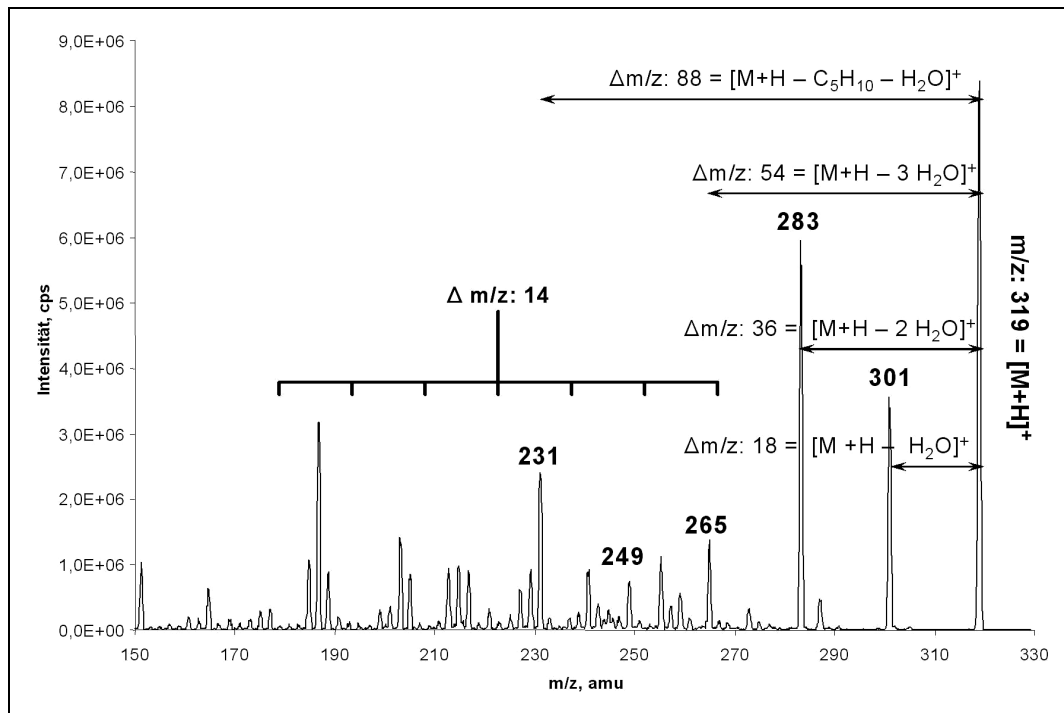
Dunkelgrau: Nielsen und Smedsgaard (2003); Hellgrau: Lagana et al. (2001); farblos: inhouse

Fragmentierung von Zearalenon und den Derivaten

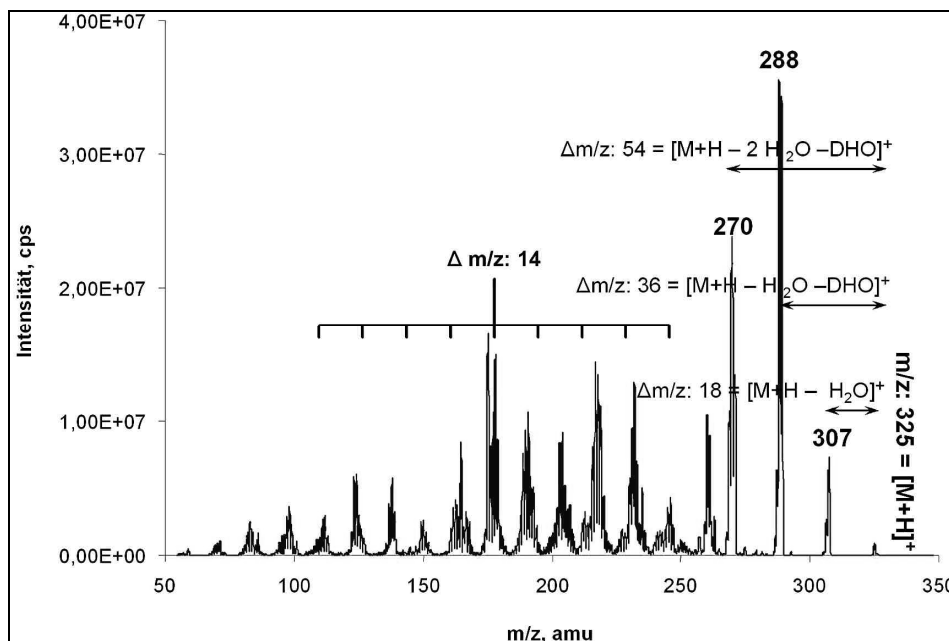
Bei ZEA handelt es sich um eine makrozyklische Verbindung bestehend aus einem aliphatischen Ring mit Lactongruppe und einem aromatischen Kern. Für die Fragmentierung kann daraus abgeleitet werden, dass resultierende Peaks im Massenbereich von 50 bis 150 amu aus dem aliphatischen Teil des Moleküls stammen, während im Massenbereich von 160 amu bis $[M+H]^+$ die resultierenden Fragmente den aromatischen Ring beinhalten.

In dem Massenbereich zwischen 260 bis 180 amu kann eine sogenannte „Lattenzaun“-Peakserie (213-215-217) in allen Massenspektren von Zearalenon und dessen Isomeren beobachtet werden (Abb. 55 bis Abb. 57). Diese Peak-Gruppen liegen jeweils 14 Masseneinheiten auseinander. Diese homologe Ionenserie lässt sich auf eine an einem Phenyl-Rest gebundene Alkylkette zurückführen, was für die Fragmentation bedeutet, dass bei der vorliegenden Resorcyssäure-Lacton-Grundstrukturen zuvor ein Ringbruch erfolgen musste.

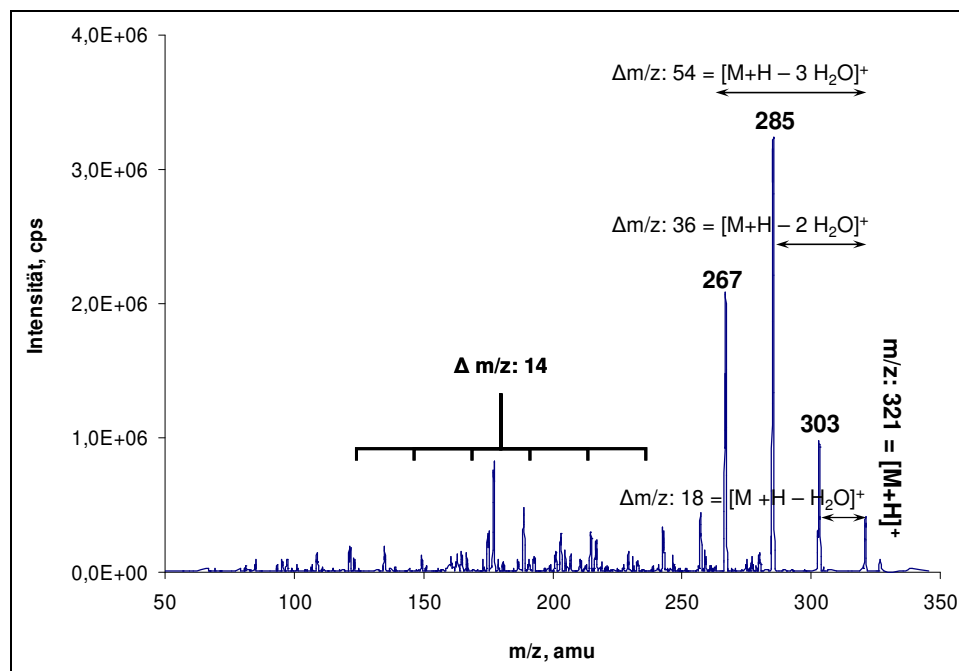
Abb. 55: Massenspektrum von ZEA erstellt im Product-Ionen-Scan-Modus



Für eine differenzierte Betrachtung des Fragmentierungsverhaltens wurden die Verbindungen d_4 - β -Zearalenol (Abb. 56) und β -Zearalenol (Abb. 57) gegenübergestellt.

Abb. 56: Massenspektrum von d_4 - β -Zearalenol erstellt im Product-Ionen-Scan-Modus

Vergleicht man die Fragmentierungsmuster ausgehend von dem Quasimolekölion der jeweiligen Verbindung, so wird deutlich, dass bei dem Internen Standard d_4 - β -Zearalenol (Abb. 56) die Wasserabspaltung zu m/z 307 ein Massenverlust von 18 amu, aber die folgenden Wasserabspaltungen zu m/z 288 und m/z 270 einen Massenverlust von 19 amu beinhalten. Dies bedeutet, dass bei der Fragmentierung von β -Zearalenol (Abb. 57) im Massenbereich von m/z 270 bis m/z 325 lediglich ein Deuteriumatom in Form von Wasser von der Grundstruktur des Resorcyllsäure-Lactons abstrahiert wurde.

Abb. 57: Massenspektrum von β -Zearalenol erstellt im Product-Ionen-Scan-Modus

6.13.3 Absicherungsverfahren in der Tandem-Massenspektrometrie

Das Absicherungsverfahren basiert auf der Auswertung der erfassten Ionen-Übergänge, die während eines chromatographischen Laufes aufgenommen werden. Wie Tab. 17 und Tab. 18 verdeutlichen, werden bei den angewandten massenspektrometrischen Methoden für jeden Analyten ein Quantifizierungs- und ein Bestätigungs-Ionenübergang (ein Vorläufer-Ion mit zwei Produkt-Ionen) aufgezeichnet. Der Ionenpaar-Quotient aus beiden Übergängen ist ein analytspezifischer Parameter wie die Retentionszeit und kann nach Vergleich von Positivbefunden mit aus Kalibrationen (in reinem Lösemittel) gewonnenen Daten als weitere Bestätigung eingesetzt werden.

In einem Tandem-Massenspektrometer entstehen die aufgezeichneten Ionenübergänge durch kollisionsinduzierte Fragmentierung. Die absolute Intensität eines Analyten ist von dem Gasdruck in der Kollisionszelle (hier Linac[®]-Zelle), der Geometrie der Kollisionszelle und der Aufenthaltszeit in der Zelle abhängig. Aus diesen gerätespezifisch bedingten Gründen kann die Fragmentierung der Analyten leichten Schwankungen unterliegen. Somit ist das Ionen-Verhältnis für jeden Analyten für jedes Gerät (auch bei gleichen Geräten) zu bestimmen und sollte für jede Messung ermittelt werden, um diesen Parameter optimal zu nutzen.

Die aus den Kalibrationsstandards über einen Konzentrationsbereich von 10^3 ermittelten Verhältnisse wurden statistisch ausgewertet und Daten aus Wiederfindungsuntersuchungen gegenübergestellt, wie in Tab. 62 dargestellt.

Tab. 62: Verhältnis zwischen Quantifizierungs- und Bestätigungs-Ionenübergang für Kalibrationsdaten und Wiederfindungsuntersuchungen

	Kalibrationsdaten (n = 9)		Wiederfindung (n = 3)	
	Mittelwert	STABW	Mittelwert	STABW
ZEA	0,30	8	0,29	7
DON	0,25	4	0,28	4
Fus X	0,58	2	0,56	5
15-AcDON	0,85	3	0,80	6
3-AcDON	0,013	10	0,010	11
VOL	1,80	16	1,71	7
DAS	0,50	12	0,52	9
3- α -AcDAS	3,11	3	3,18	3
HT-2 Toxin	3,16	13	2,90	4
T-2 Toxin	1,12	10	1,16	3

Werden die berechneten Ionen-Verhältnisse (Tab. 62) zwischen den Kalibrationsdaten und den Daten aus den Wiederfindungsuntersuchungen verglichen, so ist festzustellen, dass die Abweichung der jeweiligen Mittelwerte zwischen 2 % (3- α -AcDAS) bis 23 % (3-AcDON) lag. Innerhalb einer Datenreihe wurden Standardabweichungen von 2 - 16 % (Kalibrierungsdaten) bzw. 3 - 11 % (Daten aus Wiederfindungsuntersuchungen) ermittelt. Diese Daten zeigen, dass positive Befunde durch dieses erweiterte Absicherungsverfahren zusätzlich bestätigt werden können. Dieses analytenspezifische Ionen-Verhältnis kann demnach als Leistungskriterium in der Tandem-Massenspektrometrie eingesetzt werden und die Leistungskriterien bezüglich der Absicherung von massenspektrometrischen Analysen gemäß der Entscheidung der Kommission (2002/657/EG) ergänzen.

6.14 Belastung der Lebensmittel mit Fusarientoxinen

Neben der Entwicklung und Validierung neuer Analysemethoden wurde ein beträchtlicher Teil an Marktproben im Rahmen dieser Arbeit analysiert. Ausgehend von insgesamt 938 Lebensmittelproben wurden 809 auf DON und 722 auf ZEA untersucht. Dieser Probenumfang stellte einen Beitrag für den im Verbundforschungsvorhaben erzielten Gesamtprobenumfang von 5.212 Proben dar. Davon entfielen 4.965 auf DON und 4.826 auf ZEA. Das nachweisliche Vorkommen der Toxine wurde für DON mit 75 % und für ZEA mit 18 % Proben größer als die NWG bestimmt. Weiterhin verteilte sich der gesamte Probenumfang auf 16,6 % ökologisch und 82,6 % konventionell angebaute Lebensmittel.

Für DON waren demnach Getreide, Getreidemehle und -grieße, Biere, Teigwaren und Frühstückszerealien Untersuchungsschwerpunkte. Für Zearalenon wurden schwerpunktmäßig Getreidemehle und -grieße (hauptsächlich Maisprodukte), pflanzliche Speiseöle sowie Säuglings- und Kleinkindernahrung untersucht. Die Auswertung der Gesamtdaten erfolgte auf Grundlage des ZEBS-Warencodes (Version 1.03 vom 05.07.2001). Eine ausführliche Darstellung der Gesamtergebnisse wurde im Abschlussbericht des Verbundforschungsvorhabens 00HS 055 dargestellt. Ausgehend von diesen Einteilungen werden im Folgenden die im Rahmen dieser Arbeit hauptsächlich untersuchten Lebensmittelgruppen diskutiert.

6.14.1 DON-Belastung von verschiedenen Lebensmittelgruppen

Seit Februar 2004 gilt gemäß der Mykotoxin-Höchstmengenverordnung für DON in Getreideerzeugnissen (Getreidekörner zum direkten Verzehr und verarbeitete Getreideerzeugnisse), ausgenommen Hartweizenerzeugnisse, eine Höchstmenge von 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, für Brot, Kleingebäck und Feine Backwaren eine Höchstmenge von 350 $\mu\text{g}/\text{kg}$ und für Getreideerzeugnisse (Getreidekörner zum direkten Verzehr und verarbeitete Getreideerzeugnisse), die

zur Herstellung von diätetischen Lebensmitteln für Säuglinge oder Kleinkinder verwendet werden, eine Höchstmenge von 100 µg/kg.

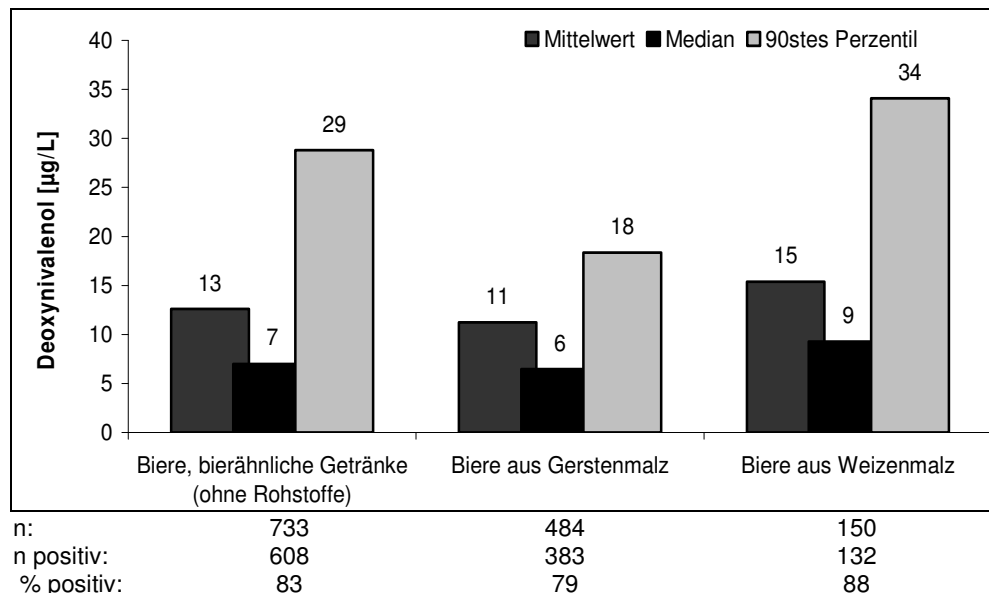
Bereits im SCOOP-Task 3.2.10 wurden für die einzelnen Getreidearten das Vorkommen und die Belastung von DON beschrieben. Elf EU-Mitgliedsstaaten lieferten für das Vorkommen und die Belastung von DON in Weizen und Weizenmehlen 6.358 Proben. Von diesen lagen 61 % oberhalb der Nachweisgrenze und wiesen eine Spannweite in einem Bereich von 2 bis 5000 µg/kg auf. Die gewichteten Mittelwerte der einzelnen Mitgliedsstaaten reichten von 8 µg/kg (Belgien) bis 1.427 µg/kg (Schweden). Von 520 untersuchten Maisprodukten lagen 89 % oberhalb der Nachweisgrenze. Die dabei nachgewiesenen Mittelwerte lagen zwischen 19 bis 1.056 µg/kg.

6.14.2 DON-Belastung von Bier

MOLTO ET AL. (2000) untersuchten 50 Biere mittels GC-ECD auf den Gehalt an DON, NIV, 3-AcDON, 15-AcDON, NEO und DAS. Dabei wurde in 44 % der Proben DON nachgewiesen. Hiervon waren 18 % der Proben mit mehr als 20 ng DON/mL Bier kontaminiert. Die Spannweite der positiven Proben lag bei 4 ng/mL bis 221 ng/mL. Weitere Trichothecene konnten nicht nachgewiesen werden.

RUPRICH und OSTRY (1995) untersuchten 77 handelsübliche Bierproben mittels ELISA. In 23 % der Bierproben wurde kein DON nachgewiesen (LOD = 6 µg DON/L Bier). Die anderen Proben enthielten Konzentrationen im Bereich von 7 µg/L bis 70 µg/L. Der Median wurde zu 12,6 µg/L bestimmt.

Abb. 58: DON-Belastung in Bieren



Das Vorkommen von DON in 797 untersuchten Bieren lag bei 77 % (größer als die NWG). Werden die in Abb. 58 dargestellten DON-Konzentrationen (Median bei 6 µg/L bis 9 µg/L) mit den Untersuchungen von MOLTO ET AL. (2000) verglichen, so wird deutlich, dass die eingesetzten analytischen Verfahren und damit die Nachweisgrenzen einen wichtigen Einfluss bei der Expositionsabschätzung darstellten. Auch konnten die dort beschriebenen Konzentrationen von 221 ng/mL in den hier vorliegenden Untersuchungen nicht bestätigt werden. Hingegen sind die Ergebnisse von RUPRICH UND OSTRY (1995) mit den hier vorliegenden Befunden vergleichbar. So fanden die Autoren ebenfalls eine Inzidenz von 77 %. Der Median lag

allerdings bei 12,6 µg/L, was gleichermaßen auf eine für diesen Konzentrationsbereich relativ hohe Nachweisgrenze von 6 µg DON/L Bier zurückzuführen war.

6.14.3 DON-Belastung von Getreide- und Getreideprodukten

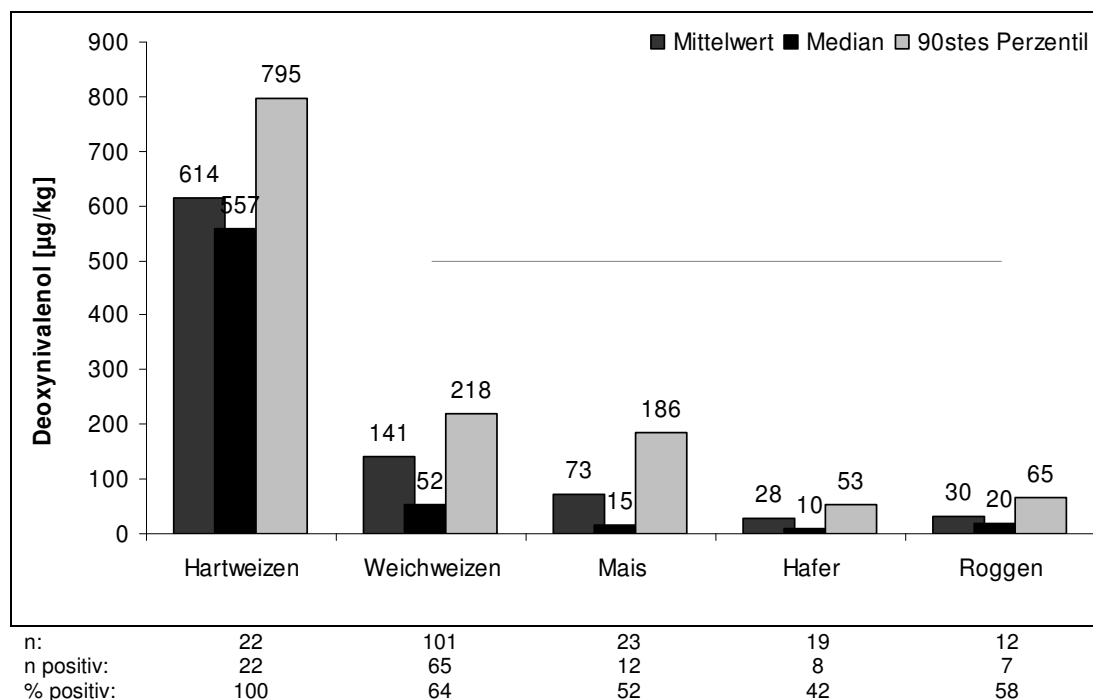
RASMUSSEN ET AL. (2003) untersuchten dänische Getreide und Getreideprodukte. In den Jahren 1998 bis 2001 wurden 190 Proben auf DON, NIV, T-2 Toxin und HT-2 Toxin in Weizen, Durum-Weizen und Roggen untersucht. Für DON wurde eine Inzidenz von 78 % über diese Jahre festgestellt. Die größten DON-Konzentrationen wurden in Weizen und Roggen aus dem Erntejahr 1998 festgestellt. Für DON wurde eine mittlere Belastung von 191 µg/kg in Weizen und 99 µg/kg in Roggen ermittelt. Für Durum-Weizen wurde über den gesamten Zeitraum die höchste DON-Konzentration mit einem Mittelwert und Median von über 1100 µg/kg nachgewiesen. Dabei lagen 70 % der untersuchten Durum-Weizen-Proben oberhalb von 500 µg/kg.

LORI ET AL. (2003) untersuchten Durum-Weizen-Proben aus Argentinien in zwei aufeinander folgenden Erntejahren. Im ersten Erntejahr zeigten von 40 untersuchten Proben 55 % eine DON-Kontamination und 10 % lagen oberhalb von 2000 µg/kg (Richtlinien der USA und Kanada). Im zweiten Erntejahr wurde in 47 von 60 (78 %) untersuchten Proben DON nachgewiesen. 31 % dieser Proben zeigten Konzentrationen über 2000 µg/kg.

MANTHEY ET AL. (2004) untersuchten die Durum-Weizen-Ernte 2001. Dabei wurden DON-Konzentrationen in einem Bereich von der NWG bis 23 µg/g bestimmt.

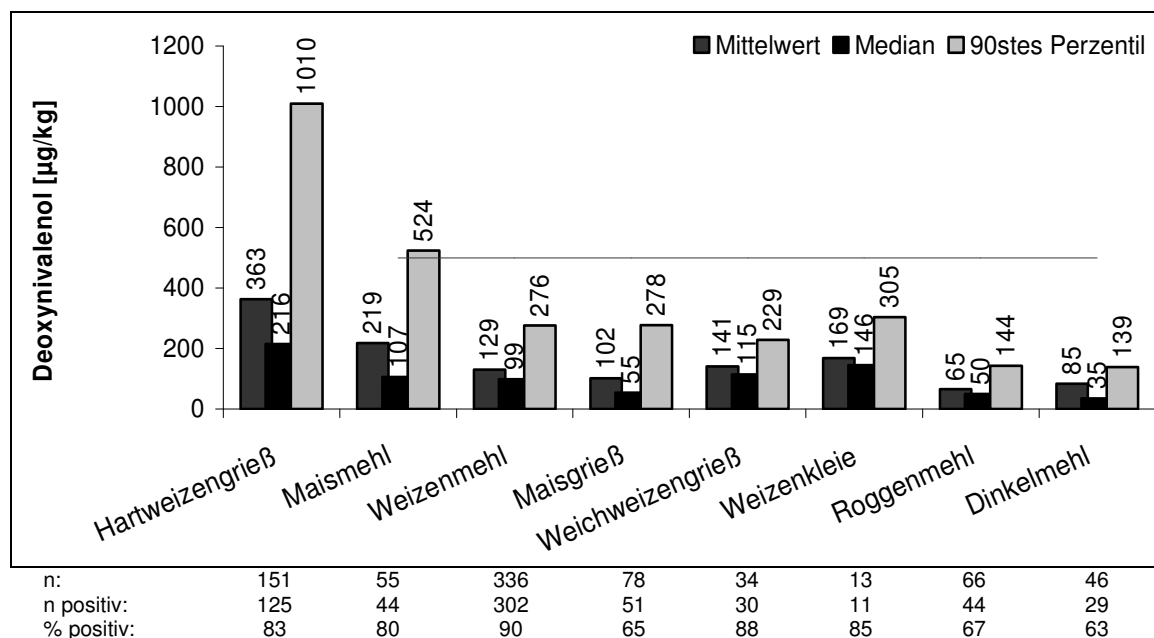
CIRILLO ET AL. (2003) untersuchten das Vorkommen von DON im italienischen Einzelhandel. Von 202 untersuchten Proben (Brot, Teigwaren, Frühstückszerealien, Biskuit, Säuglings- und Kleinkindernahrung) wiesen 84 % eine DON-Kontamination auf. Die Konzentrationen reichten von 7 bis 930 µg/kg bei einem Median von 65 µg/kg. Weiterhin wurde in vielen Säuglings- und Kleinkindernahrungsproben eine DON-Konzentration von 7 bis 16,6 µg/kg bestimmt.

Abb. 59: DON-Belastung in verschiedenem Getreide



Weitere Getreidekörner wie Buchweizen, Gerste, Reis, Dinkel und Hirse weisen ebenfalls sehr geringe Belastungen auf. Insgesamt besitzt die Produktgruppe Getreidekörner eine Inzidenz von 49 %. In Abb. 59 wird deutlich, dass die Durum-Hartweizen-Körner sowohl im Mittelwert als auch im Median eine Belastung von über 500 µg/kg aufweisen. Diese Produktgruppe ist in der Mykotoxin-Höchstmengenverordnung ausgenommen.

Abb. 60: DON-Belastung in verschiedenen Getreidemehlen und -grießen



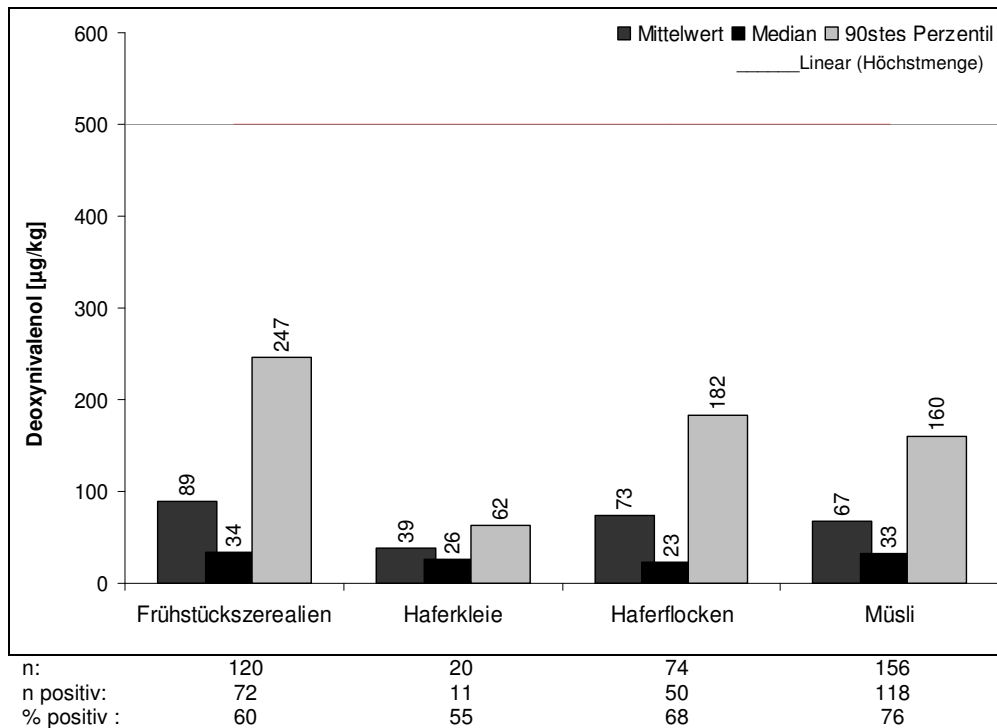
Auch in Abb. 60 wird abermals die besondere Stellung der Produktgruppe Hartweizen deutlich. Dabei weist diese Produktgruppe im Median eine doppelt so hohe Belastung auf wie die weiteren aufgeführten Produktgruppen. Wird der Hartweizengrieß mit den in Abb. 59 aufgeführten Hartweizenkörnern direkt verglichen, so wird ersichtlich, dass die durchgeführten Getreidereinigungsschritte (Schwarz- und Weißreinigung) eine offensichtliche Reduzierung der DON-Kontamination um den Faktor 2 bewirken.

In Bezug auf beide Produktgruppen Getreidekörner und Getreidemehle und -grieße wurde deutlich, dass die Höchstmenge von 500 µg/kg nur im 90sten Perzentil von Maismehl überschritten wurde. Dies bedeutet, dass ca. 10 % der untersuchten Maismehle eine DON-Konzentration oberhalb von 500 µg/kg aufweisen.

SCHOLLENBERGER ET AL. (1999) untersuchten 237 Getreideprodukte wie Brot, Teigwaren, Frühstückszerealien und Säuglings- und Kleinkindernahrung in den ersten sechs Monaten des Jahres 1998. Dabei wurde eine Inzidenz für DON von 71 %, HT-2 Toxin von 18 %, T-2 Toxin von 4 %, für 3-AcDON und 15-AcDON zu je 4 %, und zu 2 % bestimmt bei einer mittleren Belastung von 103, 16, 14, 17, 24 und 109 µg/kg der positiven Proben.

SCHOLLENBERGER ET AL. (2002) untersuchten Weizenmehlproben von Getreidemühlen und aus dem Einzelhandel. Die Untersuchungen von DON, NIV, 3- und 15-AcDON, HT-2 Toxin, T-2 Toxin und FusX wurden sowohl in Vollkorngetreidemehl als auch in Weißmehl durchgeführt. In allen untersuchten Mehltypen wurde DON als das am häufigsten auftretende Toxin nachgewiesen. Bei der Gruppe der Frühstückszerealien ist die Trichothecen-Belastung überaus abhängig von der eingesetzten Getreideart und deren Verarbeitungsprozess.

Abb. 61: DON-Belastung in Zerealien

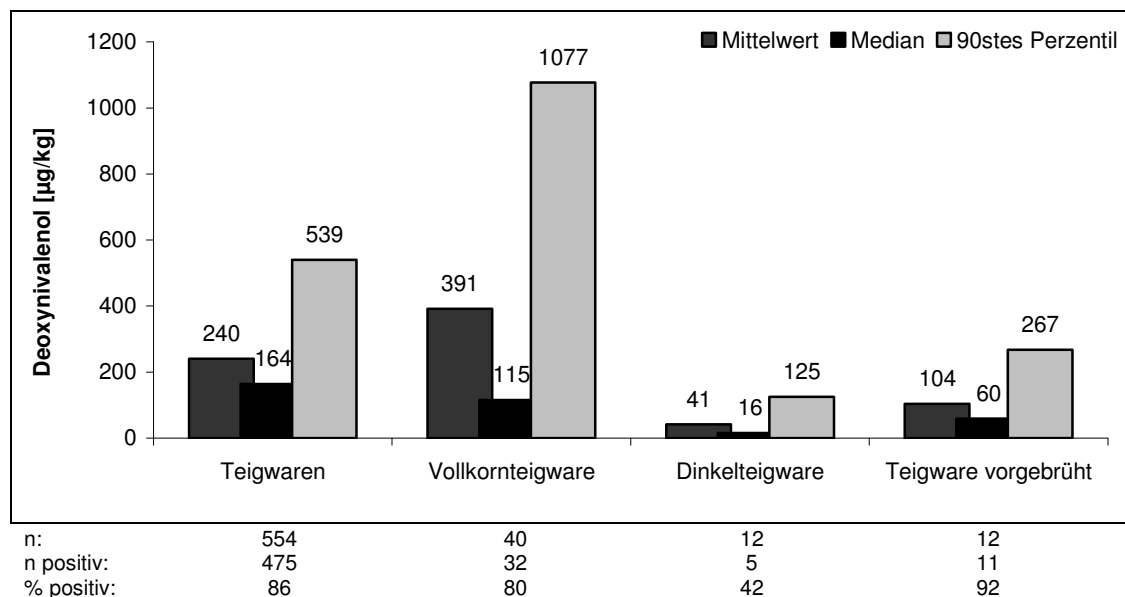


Die in Abb. 61 dargestellten Produkte weisen eine Median-Belastung von 23 µg/kg bis 34 µg/kg auf. Auch die 90sten Perzentilen liegen deutlich unter der Höchstmenge von 500 µg/kg.

6.14.4 DON-Belastung von Teigwaren

BOCKHORN ET AL. (2001) untersuchten 29 Teigwaren auf deren DON-Gehalt. Dabei lagen 90 % der Proben unter 500 µg/kg. Weiterhin wurde der DON-Verlust während des Kochprozesses untersucht. In diesen Untersuchungen wurde eine 60 - 80 %ige DON-Verringerung in der fertig zubereiteten Angebotsform bestimmt.

VISCONTI ET AL. (2004) untersuchten die DON-Veränderung in Durum-Weizen während des Herstellungs- und Verarbeitungsprozesses von Spaghetti. Dazu wurde natürlich kontaminierter Durum-Weizen mit Konzentrationen von 0,3 bis 13,1 µg/g verwendet. Im Verlauf der genannten Prozesse wurde eine fortlaufende DON-Reduktion beobachtet. In Bezug auf den nicht gereinigten Weizen pendelt sich das Mittel von DON bei 77 % in gereinigten Weizen, 37 % in Grieß, 33 % in Spaghetti und 20 % in gekochten Spaghetti ein. Weiterhin wurde beobachtet, dass eine erhöhte DON-Verteilung in das Kochwasser bei einem höheren „Wasser zu Spaghetti-Verhältnis“ stattfand. Bezüglich der Belastungssituation von Nudeln des deutschen Marktes legten MAJERUS ET AL. (2002) in einer Pilotstudie erste Ergebnisse vor. Sie berichteten, dass bei 44 Proben 64 % nachweislich mit DON belastet waren. Bei den Nudeln lag die mittlere Belastung bei 472 µg/kg DON, bei einem Median von 297 µg/kg und einem Maximum bei 3.020 µg/kg.

Abb. 62: DON-Belastung in verschiedenen Teigwaren

Die Gruppe der Teigwaren stellt im Rahmen des Verbundforschungsvorhabens eine besondere Produktgruppe dar, da diese nicht in der verzehrfertigen Angebotsform (im gekochten Zustand) untersucht wurden.

Von insgesamt 554 untersuchten Teigwaren lagen 86 % oberhalb der NWG bei einem Median von 164 µg/kg. Aus Abb. 62 wird deutlich, dass die vorgebrühten Teigwaren im Vergleich zu den Teigwaren und Vollkornteigwaren im Median eine zwei- bis dreifach geringere DON-Belastung zeigten. Diese Tatsache bestätigen die Ergebnisse von BOCKHORN ET AL. (2001) und VISCONTI ET AL. (2004).

6.15 Abschätzung der DON-Aufnahme durch den deutschen Verbraucher

LINDTER ET AL. (2005) errechneten auf Grundlagen der im Verbundforschungsvorhaben erhobenen DON-Gehalte in Lebensmitteln eine verteilungsbasierte Expositionsabschätzung der Aufnahme von DON durch den deutschen Verbraucher. Damit ließen sich aus der Expositionsschätzung auch Ansätze zur Risikokommunikation und Optionen für ein Risikomanagement ableiten.

Methodik

Für die Modellierung der Aufnahmeabschätzung wurde das Produkt aus Verzehrsmenge und Konzentration der Fusarientoxine im Lebensmittel gebildet und auf das Körpergewicht bezogen. Die Resorptionsrate wurde dabei mit 100 % angesetzt, was einem Worst-Case-Ansatz für diesen Parameter entsprach. Die Parameter „Verzehrsmenge“ und „Konzentration“ wurden dabei auf die entsprechenden Lebensmittelkategorien definiert. Für jede Lebensmittelkategorie wurde eine Verteilung der Verzehrdaten und der Kontaminationsdaten simuliert und mit Hilfe des Programmes @Risk für Excel miteinander verknüpft. Die Verzehrsmenge wurde als mittlere lebenslange Aufnahmemenge modelliert. Dies bedeutet, dass die intraindividuelle Variabilität über Wochentage, saisonale Schwankungen u. a. nicht berücksichtigt und auf individueller Ebene der Mittelwert über alle Protokolltage inklusive Nichtverzehrstage gebildet wurde.

Das Körpergewicht wurde nicht als separater dritter Parameter in die Simulation einbezogen, sondern auf individueller Ebene mit den Verzehrsmengen verknüpft.

Verzehrsdaten

Für die Ermittlung der Verzehrsmengen wurde auf die Daten der Nationalen Verzehrsstudie (NVS) zurückgegriffen. Mit der Erhebungsmethode eines 7-Tage-Wiegeprotokolls steht ein geeignetes Instrument zur Verfügung, um langfristige Expositionen zu berechnen. Aufgrund der betrachteten Lebensmittelgruppen ist der Effekt von seltener als einmal pro Woche verzehrten Lebensmitteln als gering einzustufen.

Körpergewicht und soziodemografische Merkmale

Angaben über das Körpergewicht wurden ebenfalls der NVS entnommen und auf individueller Ebene mit den Verzehrsmengen in Beziehung gesetzt. Aufgrund der Stichprobengröße der NVS von 23.209 Befragten wurde von einer repräsentativen Verteilung hinsichtlich des Körpergewichtes in der Stichprobe für die deutsche Bevölkerung ausgegangen. Die Mediane und die 95sten Perzentile der jeweiligen Bevölkerungsgruppen hinsichtlich des Alters sind in Abb. 63 dargestellt.

Aus Abb. 63 wird zunächst eine altersbezogene DON-Aufnahme innerhalb der verschiedenen Altersgruppen deutlich. Hier wird evident, dass der Durchschnittsverbraucher in keiner der betrachteten Altersgruppen den TDI von 1 µg/kg KG und Tag überschreitet, wohingegen in nahezu allen Untergruppen und der Gesamtbevölkerung mehr als 5 % der Bevölkerung den TDI überschreiten.

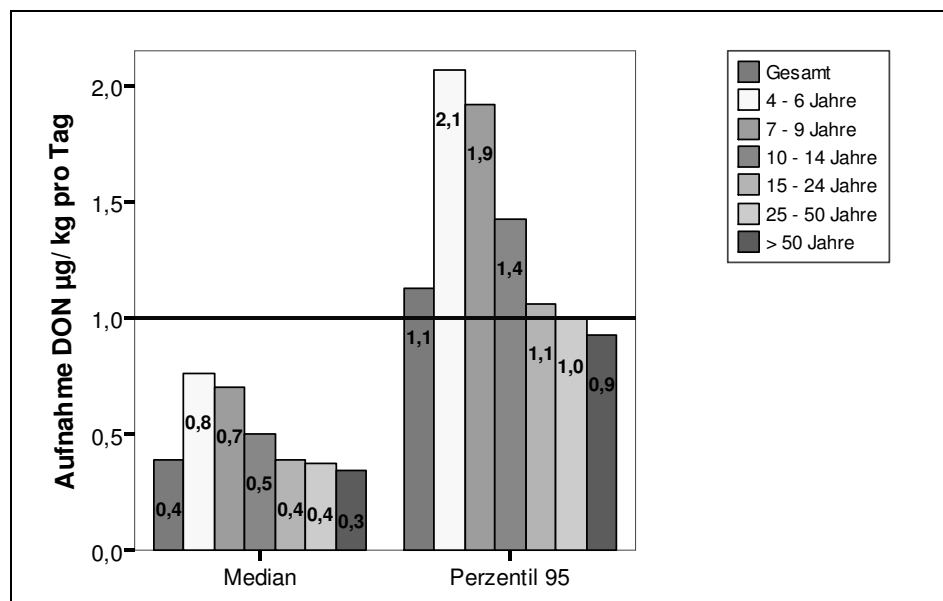
Diese, aus dem Verbundforschungsvorhaben erhaltene Risikoabschätzung unterstreicht somit die eingangs diskutierten Daten von PIETERS ET AL. (2002), ERIKSEN (1998) und der JECFA (2001). Aus dem SCOOP-Task 3.2.10 ging in Bezug auf einen TDI von 1 µg/kg KG hervor, dass bei einer mittleren, nahrungsbedingten Aufnahme von DON in den unterschiedlichsten Bevölkerungsgruppen die Exposition unterhalb des TDI's lag. Die Gruppe der Säuglinge und Kleinkinder stellt eine Ausnahme dar, da hier der TDI nahezu ausgeschöpft wurde.

Bei den DON-Hochverzellern (95stes Perzentil) wird bei der Gruppe der Kleinkinder der TDI überschritten. Für die Gruppe der 13- bis 18-jährigen liegt die Aufnahme im Bereich des TDI's. PIETERS ET AL. (2002; 2004) diskutieren ebenfalls auf dieser Grundlage eine erhöhte Exposition von Kleinkindern an DON zwischen 1 und 4 Jahren. Dabei überschritten 80 % der Einjährigen den einfachen tTDI und 20 % davon den zweifachen TDI. Die Aufnahme des 95 %sten Perzentils der Einjährigen beträgt dabei 3 µg/kg KG. In dieser Abschätzung stellt Brot sowohl für diese Gruppe als auch für Erwachsene den größten Beitrag der täglichen Aufnahme.

In den skandinavischen Ländern wurde die Aufnahme von DON durch Getreide in einem Bereich von 0,3 bis 0,5 µg/kg KG/Tag abgeschätzt. Für Verbraucher mit einer erhöhten Verzehrsmenge wurde der doppelte Bereich eingeräumt. Für die mittlere Bieraufnahme wurde ein Bereich von 0,1 bis 0,2 µg/kg KG/Tag abgeschätzt. Aufgrund dieser Beurteilung war eine Überschreitung des vorgeschlagenen tTDI's durch Konsumenten mit erhöhtem Verzehr an Getreide, Getreideprodukten und Bier möglich.

Die JECFA (2000) berechnete unter Berücksichtigung der GEMS/European Food regional diets Daten für DON eine Gesamtaufnahme von 1,4 µg/kg KG/Tag. Die wichtigste Aufnahmequelle für die DON-Belastung stellte dabei Weizen dar. In dem bereits genannten Report (Safety evaluation of certain mycotoxins in food) wurden weitere Risikoabschätzungen zur nahrungsbedingten Aufnahme von DON aus Argentinien, Schweden, Norwegen, Großbritannien und den USA dargelegt. Aus diesen Daten wurde deutlich, dass Säuglinge und Kleinkinder (1,5 bis 12 Jahren) die Personengruppe mit den höchsten DON-Belastungen darstellten.

Abb. 63: Aufnahmemenge von DON durch den deutschen Verbraucher



6.16 ZEA-Belastung von Lebensmitteln

Seit Februar 2004 gilt gemäß der Mykotoxin-Höchstmengenverordnung für ZEA in Getreide- und Getreideerzeugnissen (Getreidekörner zum direkten Verzehr und verarbeitete Getreideerzeugnisse) eine Höchstmenge von 50 µg/kg und für Getreideerzeugnisse (Getreidekörner zum direkten Verzehr und verarbeitete Getreideerzeugnisse), die zur Herstellung von diätetischen Lebensmitteln für Säuglinge oder Kleinkinder dienen, eine Höchstmenge von 20 µg/kg.

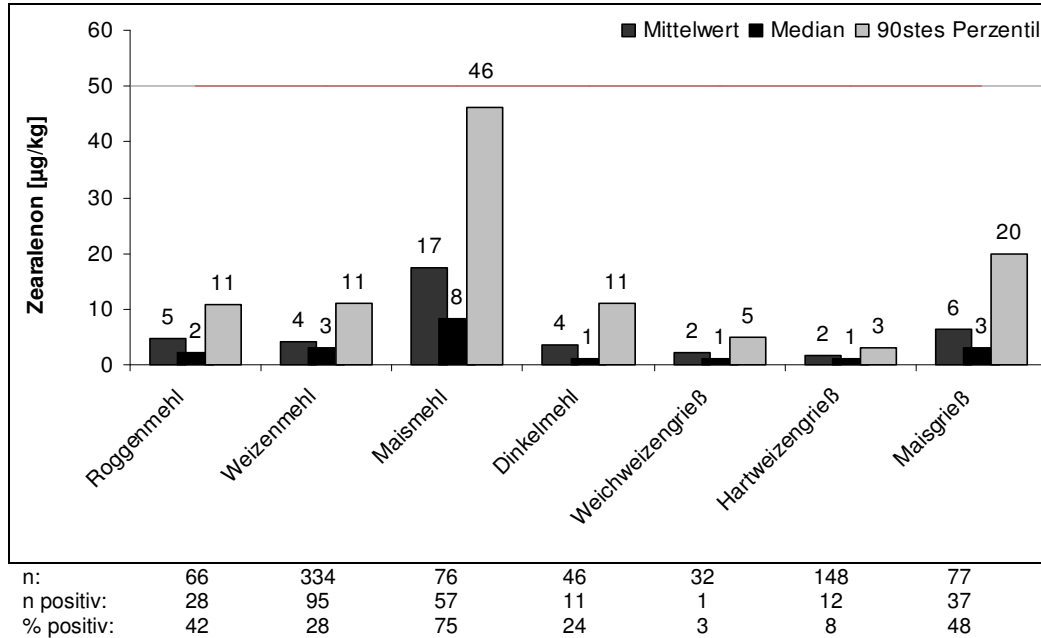
Im SCOOP-Task 3.2.10 wurden 5.018 Stichproben auf ZEA untersucht. Von diesen lagen 1.594 oberhalb der Nachweisgrenze (32 % positiv). Beispielhaft sind im Folgenden Daten für Mais, Hafer und daraus hergestellten Produkten dargestellt und diskutiert. Sieben Länder lieferten Daten über Maisprodukte mit einer analysierten Gesamtzahl von 1.265 Proben. Von 824 untersuchten Maiskörnern lagen 79 % oberhalb der Nachweisgrenze und die Mittelwerte erstreckten sich von 5,2 µg/kg (Österreich) bis zu 627 µg/kg (Italien). Unterschiedliche Maisfraktionen wie Maiskleber, Maisstärke, Maismehl und Maisgrieß lieferten mittlere Konzentrationen von 0,83 µg/kg (Frankreich) bis zu 1.328 µg/kg (Italien). Cornflakes, Polenta, Maisbrot, Popcorn und süßer Mais wurden zur Produktgruppe der auf Mais basierenden Lebensmittel zusammengefasst. Für diese lieferten vier Länder Daten. Von 246 Stichproben waren 53 % positiv, bei einem Mittelwert zwischen 0,83 µg/kg (Frankreich) und 26,8 µg/kg (Vereinigtes Königreich). Somit waren Mais und Maisprodukte die Lebensmittel mit der höchsten ZEA-Inzidenz und -Belastung. Vier europäische Länder lieferten Daten über das Vorkommen und die Belastungssituation von ZEA in Hafer und Haferprodukten. Von insgesamt 377 untersuchten Produkten lagen 20 % oberhalb der Nachweisgrenze. Die resultierten Mittelwerte reichten von 1,4 µg/kg (Norwegen) bis zu 640 µg/kg (Finnland).

Im Rahmen des Verbundforschungsvorhabens wurden vergleichsweise geringe positive ZEA-Befunde festgestellt. Dies geht aus dem Abschlussbericht des Verbundforschungsvorhabens 00 HS055 hervor.

6.16.1 ZEA-Belastung von Getreideprodukten

In Abb. 64 ist die Zearalenon-Belastung der untersuchten Getreidemehle dargestellt.

Abb. 64: ZEA-Belastung in Getreidemehl



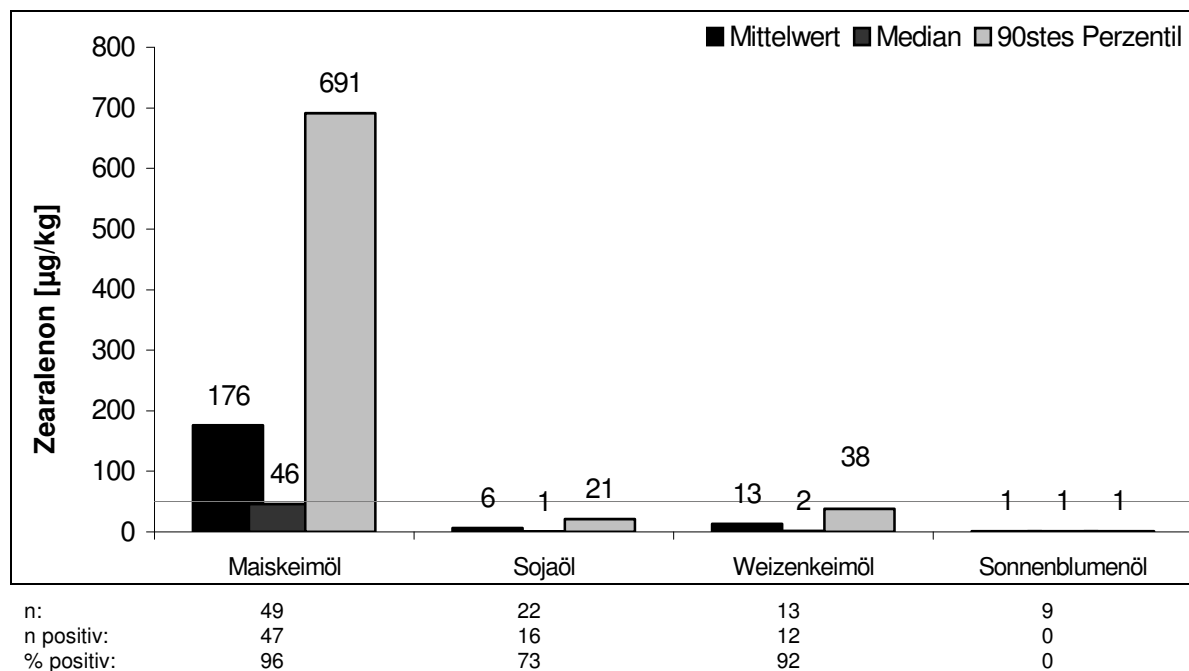
Aus Abb. 64 wird deutlich, dass lediglich Maismehl mit einer Inzidenz von 75 % und einem 90sten Perzentil von 46 µg/kg gegenüber den anderen aufgeführten Getreidemehlen auffällig war. Die Höchstmenge von 20 µg/kg wird im Median und 90sten Perzentil in allen relevanten Lebensmittelgruppen nicht überschritten. Diese Ergebnisse bezüglich Maismehl- und -grieß decken sich mit den Untersuchungen von USLEBER ET AL. (1998). Bei dieser zwar nicht repräsentativen Studie waren bei 10 Proben 80 % ZEA positiv, wobei aber die Belastungen im Mittel von 530 µg/kg sehr viel höher lagen. SCUDAMORE (2004) berichtete bei einer Untersuchung von Zearalenon in Handelsprodukten des Marktes in Großbritannien von einer Inzidenz von 3 % bei Mehlen (Spannweite 8,7 - 23,4 µg/kg) und bei Maisgrieße von 25 % (Polentagrieße, Spannweite 19,5 - 99,0 µg/kg ZEA).

6.16.2 ZEA-Belastung von pflanzlichen Speiseölen

Berichten von LAUREN UND RINGROSE (1997) und BENNETT UND ANDERSON (1978) zufolge, konnten deutliche Mengen an ZEA nach der Nassvermahlung von Mais innerhalb der resultierenden Keimlings-Fraktion nachgewiesen werden. In weiterführenden Untersuchungen produzierten LAUREN UND RINGROSE (1997) ausgehend von der Keimlings-Fraktion Maiskeimöl und bestimmten eine zwei- bis dreifach höhere ZEA-Konzentration als im Rohstoff Mais. Weiterführende Daten über die Belastung und das Vorkommen von ZEA in pflanzlichen Speiseölen waren bislang nicht belegt.

Durch die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Daten konnte erstmals die Belastungssituation von ZEA in pflanzlichen Speiseölen (Abb. 65) ermittelt werden.

Abb. 65: ZEA-Belastung in pflanzlichen Speiseölen



Hinsichtlich der ZEA-Belastung in pflanzlichen Ölen ergab sich ein deutlicher Befund. Dabei lagen 96 % der Maiskeimöle, 73 % der Sojaöle und 92 % der Weizenkeimöle oberhalb der NWG. Besondere Auffälligkeit zeigte die Gruppe der Maiskeimöle. Hier lag der Median mit 46 µg/kg sehr nahe an der ZEA-Höchstmenge von 50 µg/kg. Somit überschritten annähernd 50 % der untersuchten Maiskeimöle diese Höchstmenge. Das 90ste Perzentil von 691 µg/kg verdeutlicht, dass in einzelnen Maiskeimölen sehr hohe ZEA-Belastungen vorlagen. Diese konnten den ökologisch hergestellten Maiskeimölen zugeordnet werden. Weitere pflanzliche Speiseöle wie Sonnenblumenöl zeigten keine Belastung mit Zearalenon.

Aus dem Scoop-Task 3.2.10 geht weiterhin hervor, dass das französische Gesundheitsministerium (CSHPF) im Jahr 1999 eine Empfehlung für ZEA in pflanzlichen Speiseölen mit einer Höchstmenge von 200 µg/kg aussprach. Das CSHPF empfahl, weitere Daten zu erfassen, um ein mögliches Risiko genauer abschätzen zu können.

Ausgehend von dieser Empfehlung von 200 µg/kg konnte festgestellt werden, dass 25 % (75stes Perzentil) der untersuchten Maiskeimöle oberhalb dieser Konzentration lagen.

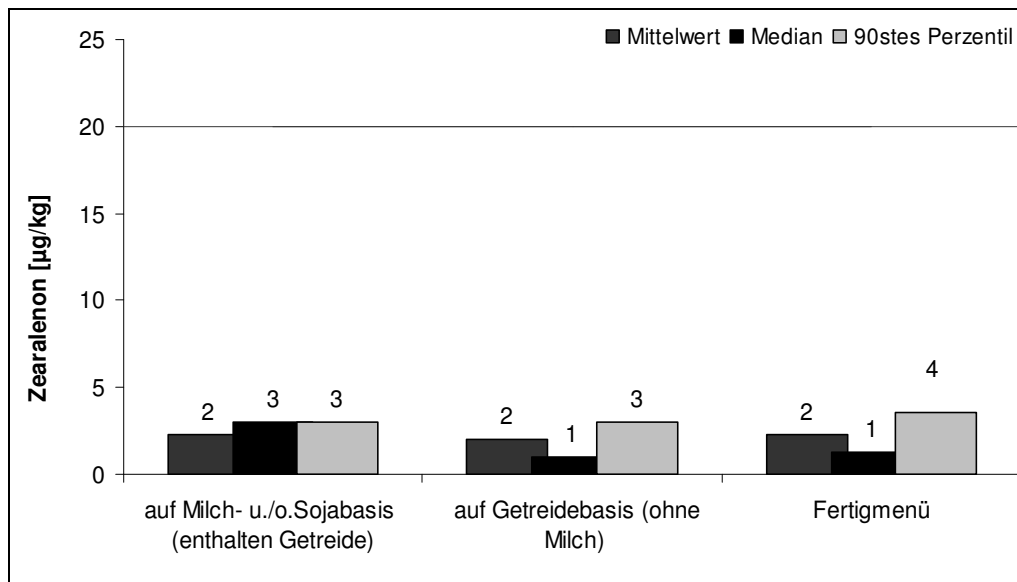
6.16.3 ZEA-Belastung von Säuglings- und Kleinkindernahrung

LOMBAERT ET AL. (2003) untersuchten 363 Säuglings- und Kleinkindernahrungsproben auf Getreidebasis. Die Stichproben schlossen Getreide wie Hafer, Gerste, Soja und Reis, Getreidemischungen für die Säuglingsernährung, Kekse und Fertiggerichte ein. Dabei wurden die Mykotoxine DON, NIV, HT-2 Toxin, ZEA, OTA, Fumonisine B₁ und B₂ und fünf Mutterkornalkaloide analysiert. Auf Sojabasis hergestellte Getreideerzeugnisse (diese enthalten in der Regel Mais) besaßen die höchsten Inzidenzen von DON (100 %), ZEA (46 %) und Fumonisinen (75 %). Insgesamt wurde DON in 63 % aller analysierten Proben (einschließlich maishaltiger Produkte) gefunden. Diese Untersuchungsergebnisse demonstrieren das ubiquitäre Vorkommen von synchron auftretenden Mykotoxinen in getreidebasierter Säuglings- und Kleinkindernahrung.

CIRILLO ET AL. (2003) beschrieben ein erhöhtes Vorkommen von DON in Säuglings- und Kleinkindernahrung in einem Konzentrationsbereich von 0,007 - 0,166 µg/kg.

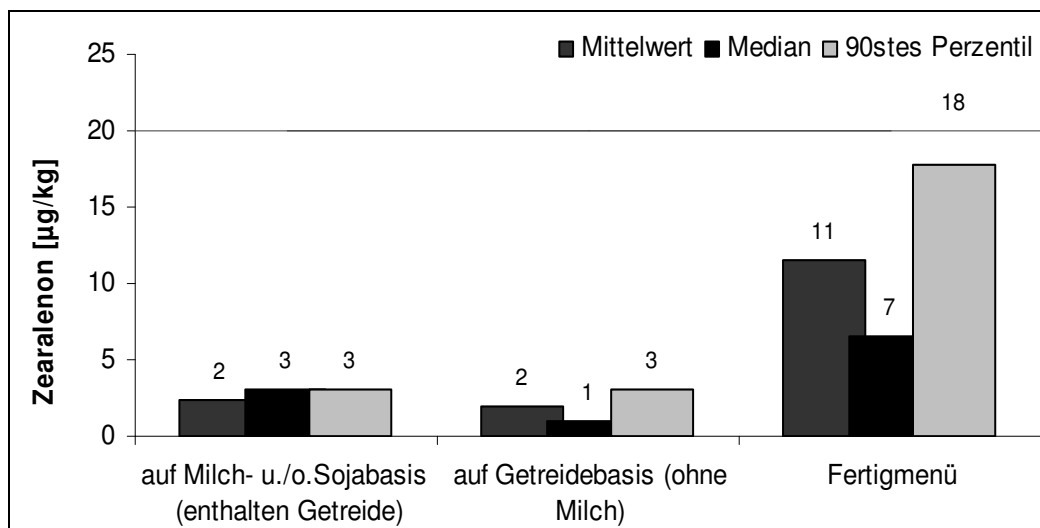
SCHOLLENBERGER ET AL. (1998) untersuchten 237 handelsübliche Getreideprodukte auf den Gehalt an Trichothecenen (DON, 3- AcDON und 15-AcDON, NIV, FusX, T-2 Toxin und HT-2 Toxin) mittels GC-MS, unter anderem auch in Säuglings- und Kleinkindernahrung. Dabei wurden das geringste Vorkommen und die niedrigsten Konzentrationen in Säuglings- und Kleinkindernahrung festgestellt. ZEA, α -ZOL, und β -ZOL wurden in keiner der untersuchten Säuglings- und Kleinkindernahrung nachgewiesen.

Abb. 66: ZEA-Belastung von Säuglings- und Kleinkindernahrung bezogen auf die handelsübliche Angebotsform



Aus Abb. 66 wird deutlich, dass im Vergleich zu 58 % positiven Fertighenü-Proben die weiteren untersuchten Säuglings- und Kleinkindernahrungen mit einer Inzidenz von 2 % bzw. mit 7 % deutlich geringer ausfallen.

Abb. 67: ZEA-Belastung von Säuglings- und Kleinkindernahrung bezogen auf die Trockenmasse



Für eine einheitliche Darstellung der Ergebnisse für Säuglings- und Kleinkindernahrung wurden diese Datensätze auf die jeweilige Trockenmasse gemäß SANCO/0023/2004 – rev. 1 bezogen. Den Fertighenüs wurde ein Trockenmassen-Faktor von 5 (mittlere Trockenmasse in Gläschenware 20 %) zugrunde gelegt. Somit kann neben der festgestellten erhöhten Inzi-

denz von 58 % weiterhin ein deutlich höherer Median von 7 µg/kg und 90stes Perzentil von 18 µg/kg festgestellt werden.

6.17 Nivalenol-Belastung von Lebensmitteln

Die ASE-Multi-Trichothecen-Methode lieferte für 76 untersuchte 61 positive Proben oberhalb der Nachweisgrenze. Die resultierenden deskriptiv-statistischen Lagemaße sind in Tab. 63 zusammengefasst.

Tab. 63: NIV-Belastung der untersuchten Getreideprodukte (n = 76)

	NIV [µg/kg]
Mittelwert	19,2
Median	3,7
90stes Perzentil	41,8
Max	374,8

Im Vergleich zu DON wurde ein relativ geringes Belastungsniveau der untersuchten Lebensmittel für NIV bei einem Median von 3,7 µg/kg festgestellt. Ein NIV-Vorkommen von 80 % bei 76 untersuchten Getreideprodukten weist jedoch eine Analogie zu der Inzidenz von DON auf.

Im bereits erwähnten Scoop-Task 3.2.10 wurden 4.166 Proben auf NIV untersucht. Davon lagen 16 % oberhalb der Nachweisgrenze. Von 2.166 Weizenproben lagen 303 (14 %) oberhalb der Nachweisgrenze. Diese Daten wurden von sieben Mitgliedsstaaten geliefert. Die Mittelwerte reichten von 1,7 µg/kg (Vereinigtes Königreich) bis 199 µg/kg (Finnland) bei einem gewichteten Mittelwert von 24 µg/kg. Vier Mitgliedsstaaten lieferten einen Umfang von insgesamt 545 Haferproben. Davon lagen 21 % der untersuchten Haferprodukte über der Nachweisgrenze. Die Mittelwerte reichten von 10 µg/kg (Schweden und Norwegen) bis zu 197,2 µg/kg (Österreich). Der gewichtete Mittelwert lag hier bei 56 µg/kg.

6.18 T-2 Toxin- und HT-2 Toxin-Belastung von Lebensmitteln

Für die Bewertung der Typ A Trichothecene T-2 Toxin und HT-2 Toxin wurden die Toxinkonzentrationen aus der ASE-Multi-Trichothecen-Methode für stärke- und faserbasierende Getreideprodukte und der GPC-Methode für lipidreiche Getreideprodukte herangezogen. Die Abb. 68 und Abb. 69 veranschaulichen die T-2 Toxin-Belastung der untersuchten Proben.

Wie aus den Abb. 68 und Abb. 69 hervorgeht, sind die eher unpolaren Typ A Trichothecene T-2 Toxin und HT-2 Toxin auch in pflanzlichen Speiseölen quantifizierbar. Hier waren vor allem die Hanföle besonders in den Blickpunkt einer Toxinbelastung geraten. Allerdings dürfte diese Produktgruppe hinsichtlich einer Expositionsabschätzung von Typ A Trichothecen eher als gering einzustufen sein.

Abb. 68: T-2 Toxin-Belastung ausgewählter Lebensmittelgruppen

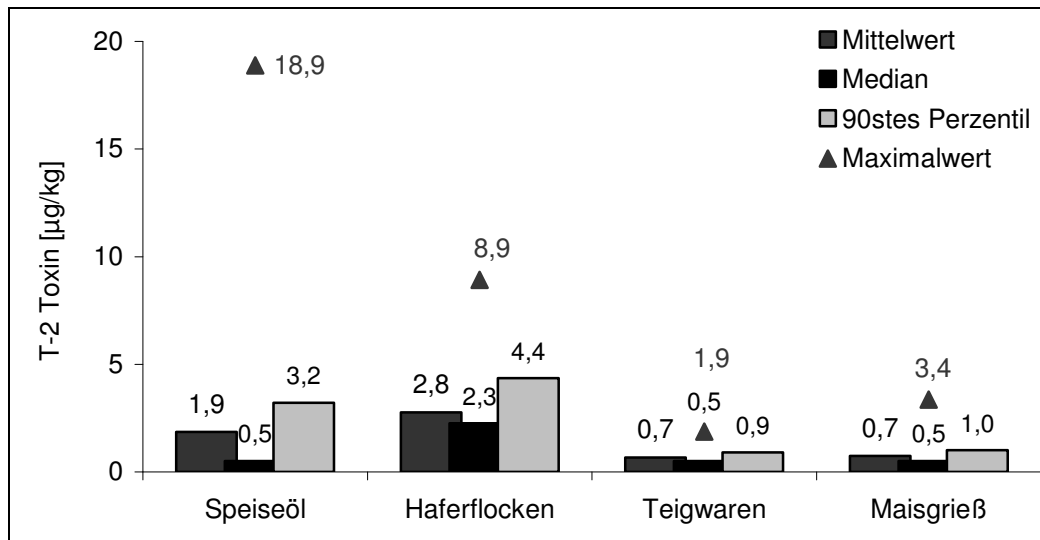
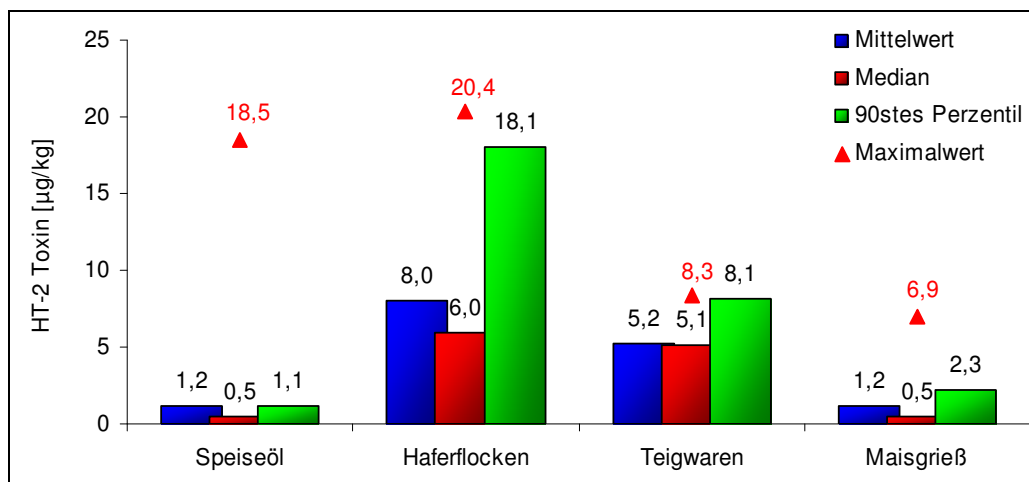


Abb. 69: HT-2 Toxin-Belastung ausgewählter Lebensmittelgruppen



Einen zusammenfassenden Überblick der deskriptiv statistischen Daten bezüglich der T-2 Toxin- und HT-2 Toxin-Belastung der 115 untersuchten Proben zeigt Tab. 64.

Tab. 64: T-2 Toxin- und HT-2 Toxin-Belastung der untersuchten Getreideprodukte (n = 115)

	HT-2 Toxin [µg/kg]	T-2 Toxin [µg/kg]
n > NWG	54	34
% positiv	47	30
Mittelwert	2,7	1,3
Median	0,5	0,5
Maximalwert	20,4	18,9
90stes Perzentil	7,3	2,6

Die genannten Toxine wiesen in Haferflocken den höchsten Median auf, zeigten aber ebenfalls für T-2 Toxin mit einem Median von 5,1 µg/kg in der Produktgruppe Teigwaren die besondere Stellung von Hartweizen. Sowohl der SCOOP-Task 3.2.10 als auch die JECFA bestätigen das vermehrte Vorkommen dieser Toxine in Haferprodukten. Werden die untersuchten Proben betrachtet, so liegt der Median bei 0,5 µg/kg (halbe Nachweisgrenze). Daraus wird ersichtlich, dass die zu bestimmenden Konzentrationen im unteren µg/kg-Bereich lie-

gen. Somit muss für eine abschließende Risikobewertung eine Analytik mit möglichst niedrigen Nachweisgrenzen (hier 1 µg/kg) entwickelt werden.

Im SCOOP-Task 3.2.10 wurde darauf hingewiesen, dass die übermittelten Belastungsdaten der Lebensmittel aus nicht ausreichend empfindlichen Methoden (Nachweisgrenzen im Bereich von 10 bis 30 µg/kg) stammten. Die Anzahl der Proben, die oberhalb der Nachweisgrenze lagen, betrug ca. 20 %. Somit war die Berechnungsgrundlage für eine Risikoabschätzung stark von der Methode bzw. Nachweisgrenze abhängig.

7 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit lag in der Erarbeitung und Etablierung von geeigneten Analysen-Methoden für Typ A und Typ B Trichothecene bzw. Zearalenon und dessen Derivate in unterschiedlichen Matrices. Darüber hinaus sollten diese validierten Methoden zur Ermittlung von einzelnen Belastungsdaten der unterschiedlichen Lebensmittelgruppen herangezogen werden.

In der Mykotoxinanalytik stellen die Probennahme und die Inhomogenität der Labor-Teilprobe einen großen Fehleranteil dar. Durch falsche Probennahme oder durch die Entnahme inhomogener und nicht repräsentativer Labor-Teilproben können Fehler von 50-200 % auftreten. Die für die analytische Bestimmung notwendige Labor-Teilprobe muss demnach eine größtmögliche Homogenität aufweisen, um diesen Fehler gering zu halten. Infolgedessen nahmen die ersten Untersuchungen Bezug auf die Verteilung der Partikelgrößen der zerkleinerten und homogenisierten Labor-Teilproben. Dabei konnte bei den durchgeführten Siebuntersuchungen zusammenfassend belegt werden, dass nach Vermahlung mittels Zentrifugalmühle durch ein Distanz-Ringsieb mit einer Lochweite von 1.000 µm eine zufriedenstellende Homogenität erreicht wurde. Dies konnte durch die Untersuchung anhand unterschiedlicher Matrices wie Vollkorn-Teigwaren und Maisgrieß belegt werden.

In der modernen Mykotoxinanalytik werden häufig immunologische Verfahren angewandt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die eingesetzten IAC-Säulen auf deren Fähigkeit der Analytspezifität bzw. deren Fähigkeit, Kreuzreaktion mit weiteren strukturverwandten Verbindungen einzugehen, getestet. Dafür wurden die zum Zeitpunkt dieser Arbeit kommerziell verfügbaren DON, T-2 Toxin und ZEA-IAC-Säulen herangezogen. Zum Zeitpunkt der Untersuchungen lagen von den Firmen Biopharm[®] und VICAM[®] DON-IAC-Säulen vor. Die in den jeweiligen Produktspezifikationen beschriebenen Wiederfindungen der entsprechenden Zielanalyten wurden in diesen Untersuchungen bestätigt. Die Kreuzreaktivitätsuntersuchungen zeigten, dass die DON-IAC-Säulen aller Hersteller mit weiteren Typ B Trichothecenen keine zufriedenstellenden Ergebnisse lieferten. Die eingesetzten Biopharm[®] DON IAC-Säulen zeigten eine deutliche Kreuzreaktivität gegenüber dem DON Metabolit Deepoxy-Deoxynivalenol (DOM-1). Somit bestand die Möglichkeit, diese Verbindung als Internen Standard für die Biopharm[®] IAC-Säulen gestützte DON-Analytik einzusetzen.

Die T-2 Toxin IAC-Säulen der Fa. VICAM[®] zeigten für HT-2 Toxin und d_3 -T-2 Toxin zufriedenstellende Wiederfindungen. Somit konnte für diese Verbindungen die Kreuzreaktivität der eingesetzten Antikörper belegt werden. Weitere Typ A Trichothecene zeigten keine ausreichenden Wiederfindungen. Demzufolge ermöglichten die VICAM[®] T-2 Toxin IAC-Säulen nur die gleichzeitige, selektive Aufreinigung von T-2 Toxin und HT-2 Toxin in einem Verfahrensschritt.

Die ZEA-IAC-Säulen der Fa. VICAM[®], RedRabbit[®] und Biopharm[®] zeigten für ZEA und die Gruppe der ZEA-Metabolite zufriedenstellende Wiederfindungen. Die Kreuzreaktivität der ZEA-IAC-Säulen wurde für die Einführung eines Internen Standards für die Bestimmung von ZEA in Konsummilch bzw. pflanzlichen Speiseölen genutzt.

Die Validierung von analytischen Methoden in der Rückstands- und Spurenanalytik kann unter Zuhilfenahme von zertifizierten Referenzmaterialien (certified reference materials – CRM) oder hausintern validierten Vergleichsmaterialien durchgeführt werden. Im Zeitraum des Verbundforschungsvorhabens stand ein solches CRM bzw. Vergleichsmaterial für die genannten Fusarientoxine nicht zur Verfügung. Aufgrund dieser Tatsache wurden im Rahmen dieser Arbeit Vergleichsmaterialien für DON und ZEA hergestellt. Dabei wurden der Belastungssituation entsprechende, analyttypische Matrices ausgewählt. Für DON wurde eine Vollkorn-Hartweizengrieß-Teigware und für ZEA sogenannte Knusperflakes (extrudiertes Maisgrieß) herangezogen. Nachdem die Homogenität der Vergleichsmaterialien belegt

wurde, konnte über einen Zeitraum von 17 Monaten die Stabilität dieser Materialien kontrolliert und festgestellt werden. Weiterhin wurde eine externe Validierung der Vergleichsmaterialien durch die am Verbundforschungsvorhaben beteiligten Laboratorien durchgeführt. Der Befund dieser Untersuchungen zeigte für beide Vergleichsmaterialien im Rahmen der Materialstreuung zufriedenstellende Ergebnisse. Dies konnte durch einen Horrat-Wert von 1,2 (ZEA-Vergleichsmaterial) und 0,8 (DON-Vergleichsmaterial) belegt werden. Die Vergleichsmaterialien dienten ferner als Grundlage zur Methodenentwicklung und Optimierung. So wurde das DON-Vergleichsmaterial für einen Methodenvergleich zwischen der ASE-Multi-Trichothecen-Methode, der DON-Routinemethode und der FSA-Ringversuchs Methode herangezogen. Durch dieses Vorgehen konnte belegt werden, dass unter Berücksichtigung der Streuung des Materials die aufgeführten Methoden annähernd gleiche Ergebnisse lieferten.

Zur Durchführung des Verbundforschungsvorhabens und dem damit einhergehenden hohen Probenaufkommen wurden für Deoxynivalenol und Zearalenon routinetaugliche Analysemethoden weiterentwickelt und validiert.

Für die Bestimmung von Deoxynivalenol mittels HPLC-UV wurde neben der empfindlichen Hauptwellenlänge (218 nm) eine zweite selektivere Bestätigungswellenlänge (236 nm) eingeführt. Dieses analytspezifische Verhältnis bzw. Responsefaktor wurde sowohl an einem UV/VIS-Detektor als auch an einem DAD-Detektor untersucht und in einem Bereich von 0,71 bis 0,74 bestimmt. Durch die Verhältnisbildung über den gesamten kalibrierten Konzentrationsbereich (25 - 2000 µg/kg) der aufgezeichneten Wellenlängen konnte eine zusätzliche Absicherung der Ergebnisse erfolgen. Weiterhin wurde zur Gewährleistung eines großen Probendurchsatzes eine LC-MS/MS-Methode mit einer Chromatographiezeit von zehn Minuten entwickelt.

Für die Bestimmung von Zearalenon wurde die validierte § 35 LMBG-Methode „Bestimmung von Zearalenon in Getreide und Getreideerzeugnisse“ dahingehend optimiert, dass durch eine Gradientenelution die Trennung von Zearalenon, Zearalanon und den Diastereomeren α - und β -Zearalenol und α - und β -Zearalanol erzielt wurde. Somit konnten die für die Massenspektrometrie eingesetzten deuterierten Internen Standards d_4 - α - und d_4 - β -Zearalenol als organische Interne Standards α - und β -Zearalenol in der Fluoreszenz-Detektion genutzt werden.

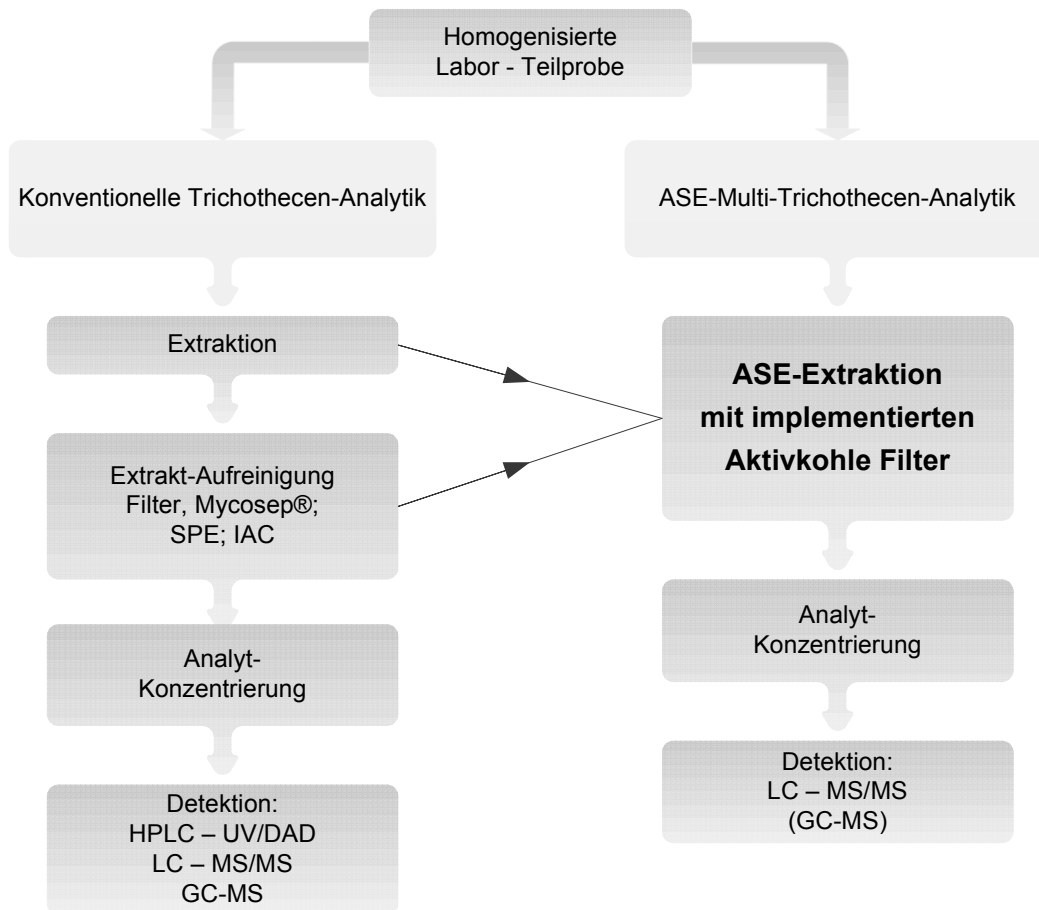
Abgeleitet von einem durchschnittlichen Stammwürzegehalt von 10 % in Bier wurden niedrige Konzentrationen an Deoxynivalenol und weiteren Typ A und Typ B Trichothecenen in dieser Matrix erwartet. Für die Matrix Bier wurde ebenfalls das empfindliche und selektive LC-MS/MS-Verfahren zur Detektion herangezogen. Dadurch wurde eine einfache und schnelle durchführbare Bestimmung der genannten Toxine in Bier und bierähnlichen Produkten möglich. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode beruhte dabei auf einer Festphasenextraktion der Toxine mittels Ethylacetat an einer Extrelut[®]-Säule nach vorherigem Entgasen der Biermatrix. Die Validierungsparameter der Methode erfüllten sowohl für Typ A Trichothecen als auch für Typ B Trichothecene, mit Ausnahme von NIV, die Leistungskriterien gemäß der Richtlinie 2005/38/EG.

Bisher bestand die Analytik von Typ A und Typ B Trichothecenen grundsätzlich aus den zwei aufeinander folgenden Verfahrensschritten Extraktion und Aufreinigung.

Aufgrund dieser Tatsache wurde im Rahmen dieser Arbeit ein automatisiert-kombiniertes Probenextraktions- und Aufreinigungsverfahren auf Grundlage der Accelerated Solvent Extraction (ASE) Extraktionstechnik entwickelt und optimiert. Durch die Implementierung eines Aktivkohlefilters in das ASE-Extraktionssystem wurde erstmals eine Methode etabliert, die sehr gute Wiederfindungsergebnisse (RSD < 20 %) über ein breites Trichothecen-Spektrum von dem polarsten Typ B Trichothecen NIV bis hin zu den weniger polaren Typ A Trichothecen T-2 Toxin lieferten. Dabei wurden die aufgeführten Trichothecene spezifisch über einen breiten Konzentrationsbereich mit der notwendigen Empfindlichkeit mittels LC-

MS/MS nachgewiesen und quantifiziert. Abb. 70 veranschaulicht schematisch die bisher angewandten Arbeitsschritte einer konventionellen Trichothecen-Analytik und stellt diese der neu entwickelten ASE-Multi-Trichothecen-Analytik gegenüber.

Abb. 70: Schematischer Vergleich zwischen der konventionellen Trichothecen-Analytik und der neu entwickelten ASE-Multi-Trichothecen-Analytik



Dieser schematische Vergleich (Abb. 70) zwischen den bisher angewandten Analysentechniken und der hier etablierten ASE-Multi-Trichothecen-Methode veranschaulicht, dass die Extraktion und die Probenaufreinigung in einem Arbeitsschritt durchführbar sind. Dieser kombinierte-automatisierte Analysenschritt bedeutet eine wesentliche zeitliche Verkürzung der Probenaufarbeitung (Extraktions- und Aufreinigungszeit von 35 Minuten) und Reduktion der Kosten der Einzelanalyse (Verbrauchsmaterialkosten, Personalkosten). Neben Aktivkohle und Diatomeenerde wurden keine weiteren kostenintensiven Verbrauchsmaterialien wie IAC-Säulen, Mycosep®-Säulen oder SPE-Kartuschen benötigt.

Die ASE-Multi-Trichothecen-Methode bedingt allerdings eine leistungsfähige chromatographische Trennung und eine selektive und empfindliche Detektion mit der Tandem-Massenspektrometrie. Inwieweit diese Aufarbeitungstechnik in Verbindung mit einer GC-MS-Methode einsatzfähig ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

Die heutzutage für die instrumentelle Spuren- und Rückstandsanalytik verfügbaren Koppelungstechniken zwischen HPLC und Tandem-Massenspektrometrie wurden herangezogen, um selektive, empfindliche und schnelle Detektions-Systeme zu entwickeln. Die selektive Trennung der Typ A und Typ B Trichothecene, charakterisiert durch die Trennung der Stellungsisomere 3-AcDON und 15-AcDON, wurde dabei auf einer Phenyl-Hexyl-Mischphasen-

Säule durchgeführt. Die selektive Trennung von Zearalenon und dessen Derivate, insbesondere durch die Trennung der Diastereomere α - und β -ZOL bzw. α - und β -ZAL wurde an einer RP-C₁₈-HPLC-Säule durchgeführt. Die massenspezifische Detektion der Analyten wurde durch empfindliche Quantifizierungsübergänge und durch ein selektives Bestätigungionenpaar durchgeführt.

Im Vergleich zu den übrigen Systemen zeichnete sich dieses System durch sehr niedrige Nachweisgrenzen sowohl für die Trichothecene als auch Zearalenon und dessen Derivaten aus. Die oft in der Literatur für LC-MS beschriebene Matrixsuppression wurde durch eine Matrixkalibrierung der Trichothecene überprüft. Diese Untersuchungen beruhten auf den Extrakten der ASE-Multi-Trichothecen-Methode. Bei den durchgeführten Messungen konnten nur geringe Suppressionswirkungen in den Matrices Maisgrieß und Müsli beobachtet werden. Wie gezeigt, konnten diese geringfügigen matrixbedingten Suppressionen durch den Einsatz des Internen Standards *d*₃-T2-Toxin weitgehend beseitigt werden.

Weiterhin wurden die Quantifizierungs- und die Bestätigungsübergänge für ein erweitertes Absicherungsverfahren herangezogen. Dieses basiert auf der Auswertung der erfassten Ionenpaar-Übergänge die während eines chromatographischen Laufes aufgenommen werden. Der Ionenpaar-Quotient aus beiden Übergängen ist ein analytspezifischer Parameter. Damit können Positivbefunde mit aus Kalibrations-Daten (in reinem Lösemittel) gewonnenen mittleren Ionenpaar-Quotient verglichen und abgesichert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die aus den Kalibrationsstandards (Konzentrationsbereich 10P^{3P}) ermittelten Verhältnisse statistisch ausgewertet und Daten aus Wiederfindungsuntersuchungen gegenübergestellt. Der Vergleich zeigt, dass positive Befunde durch dieses erweiterte Absicherungsverfahren zusätzlich bestätigt werden können. Dieses analytspezifische Ionen-Verhältnis kann demnach als Leistungskriterium in der Tandem-Massenspektrometrie eingesetzt werden und die Leistungskriterien bezüglich der Absicherung von massenspektrometrischen Analysen, gemäß der Entscheidung der Kommission (2002/657/EG), ergänzen.

Den bisherigen Mittelpunkt in den Untersuchungen von Fusarientoxin belasteten Getreideerzeugnissen bildeten die stärke- und faserbasierenden Produktgruppen. Untersuchungen auf die Belastungshäufigkeit und -höhe in pflanzlichen Speiseölen wurden bisher nur in geringem Umfang durchgeführt. Aufgrund dieser Tatsache wurde im Rahmen dieser Arbeit die Technik der Gelpermeationschromatographie (GPC) als Probenvorbereitungs- und Aufreinigungstechnik in die Analytik der Fusarientoxine eingeführt. Dabei standen pflanzliche Speiseöle im Mittelpunkt der Untersuchungen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass ZEA nach erfolgter GPC-Aufreinigung ohne weitere Aufreinigungsschritte direkt mittels LC-ESI-MS/MS quantifiziert werden konnte. Im Vergleich dazu, konnte mit diesen Extrakten nur nach einer IAC-Aufreinigung die Quantifizierung von ZEA mittels HPLC-FLD erfolgen. Im Rahmen des Verbundforschungsvorhabens konnte durch die neu entwickelte GPC-Methode erstmals eine umfassende ZEA-Belastung von pflanzlichen Speiseölen und hier speziell von Maiskeimöl dokumentiert werden. Dabei wurde deutlich, dass sowohl Belastungshäufigkeit und Belastungshöhe in Speiseölen im Vergleich zu den stärke- und faserbasierenden Produktgruppen sich auffällig zeigte. Des Weiteren wurde gezeigt, dass eine Exposition von T-2 Toxin und HT-2 Toxin ebenfalls durch pflanzliche Speiseöle, und hier hauptsächlich Hanföl, vorhanden war.

In weiterführenden Untersuchungen könnte unter zu Hilfenahme der Gelpermeationschromatographie geprüft werden, inwieweit weitere Mykotoxine das Belastungs-Spektrum von pflanzlichen Speiseölen charakterisieren. Insbesondere gilt dies für Fumonisine, die hauptsächlich in Mais nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen sollten ebenfalls die lipophilen Mykotoxine der Ochratoxin- und Aflatoxin-Gruppe einschließen.

Die durchgeführten Kreuzvalidierungen der entwickelten Methoden dienten der Identifizierung von systematischen Fehlern der neu entwickelten Methoden bzw. den unterschiedli-

chen Detektionssystemen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die erarbeiteten LC-MS/MS-Referenzverfahren sowohl für DON als auch für ZEA gegenüber den routinemäßig eingesetzten HPLC-UV- bzw. HPLC-FLD-Verfahren und den immunologischen Verfahren (ELISA) sehr gute Korrelationen aufzeigten. Weiterhin konnte für die DON-Analytik gezeigt werden, dass unterschiedliche Generationen an Massenspektrometern und Ionisierungstechniken ebenfalls sehr gute Korrelationen aufwiesen. Anhand von DON, NIV und HT-2 Toxin konnte gezeigt werden, dass die ESI- und APCI-Ionisierungstechniken ebenfalls durch zufriedenstellende Korrelationen im Rahmen der gegebenen Vertrauensbereiche vergleichbare Ergebnisse lieferten und somit die Analytunabhängigkeit in der Ionisierungstechnik dargelegt wurde. Diese Tatsache konnte durch die ASE-Multi-Trichothecen-Methode und Bier-Trichothecen-Methode für DON über einen großen Konzentrationsbereich unterstrichen werden. Die Kreuzvalidierungen für die Gruppe der Trichothecene und für Zearalenon zeigten eine sehr gute Leistungsfähigkeit der entwickelten Systeme.

Neben den analytischen Fragestellungen wurden mit den im Rahmen dieser Arbeit validierten Methoden zwischen Oktober 2001 und Juli 2004 insgesamt 938 Proben aus dem Berliner Raum untersucht. Davon wurden 809 auf DON und 722 auf ZEA untersucht. Dieser Probenumfang stellte einen wichtigen Beitrag für den im Verbundforschungsvorhaben „Analytik und Vorkommen wichtiger Fusariantoxine (Deoxynivalenol und Zearalenon) sowie Aufnahme dieser Toxine durch den deutschen Verbraucher“ erzielten Gesamtprobenumfang von 5.212 Proben dar. Die höchsten ZEA-Belastungen wurden in Mais und Maiseerzeugnissen wie Maisgrieß festgestellt. Dabei stellte Maiskeimöl hinsichtlich Belastungshäufigkeit (96 %) und Belastungshöhe (Median 46 µg/kg; 90stes Perzentil 691 µg/kg) eine besonders auffällige Produktgruppe dar. Hierbei lagen die Belastungswerte im Median im Bereich der Höchstmenge von 50 µg/kg und das 90ste Perzentil überschritt die Höchstmengen um den Faktor 13. Weitere augenfällige Belastungsdaten bezüglich Zearalenon wurden in Säuglings- und Kleinkinderfertiernahrung beobachtet. Dabei wurde durch eine Evidenzprüfung untersucht, welche möglichen Zearalenon-Eintragsquellen vorhanden waren. Die primäre Zearalenon eintragende Zutat wurde dabei als Maiskeimöl identifiziert und die Belastungshöhe der zugesetzten Maiskeimöle wurde als problematisch hinsichtlich der Höchstmenge von 20 µg Zearalenon/kg Zutat erachtet.

Die höchsten Belastungen an Deoxynivalenol wurden in der Warengruppe Hartweizen und den daraus hergestellten Produkten wie Hartweizengrieß und Teigwaren bestimmt. Hartweizenerzeugnisse wie Weizengrieß zeigten für Deoxynivalenol eine Median-Belastung von 216 µg/kg (90stes Perzentil bei 1 010 µg/kg). Für Teigwaren wurde eine Median-Belastung im Bereich von 16 - 246 µg/kg (90stes Perzentil im Bereich von 125 µg/kg bis 1077 µg/kg) belegt. Die Produktgruppe Bier und bierähnliche Erzeugnisse zeigte eine Median-Belastung im Bereich von 6 µg/kg bis 11 µg/kg und lag, durch einen durchschnittlichen Stammwürzegehalt von 10 %, circa um den Faktor acht bis zehn unterhalb der Belastungssituation von Speisegetreide und Getreideerzeugnissen.

Da die Ergebnisse der ZEA-Belastungssituation deutlich zeigten, dass kein erhöhtes Risiko für den Verbraucher bestand, wurde in Zusammenarbeit mit der Fachgruppe „Expositionsschätzung und -standardisierung“ nur eine verteilungsbasierte Abschätzung der Aufnahme von Deoxynivalenol durch den deutschen Verbraucher vorgenommen.

Für die Modellierung der Aufnahmeabschätzung des deutschen Verbrauchers wurde das Produkt aus Verzehrsmenge und Konzentration an Deoxynivalenol im Lebensmittel gebildet und auf das Körpergewicht bezogen. Für die Ermittlung der Verzehrsmengen wurde auf die Daten der Nationalen Verzehrstudie zurückgegriffen. Daraus leitete sich für Deoxynivalenol eine alterskorrelierende Toxinaufnahme des deutschen Verbrauchers ab.

Dabei wurde deutlich, dass die Median-Belastung der 4- bis 6-Jährigen, 7- bis 9- Jährigen und 10- bis 14-Jährigen den TDI von 1 µg/kg KG und Tag nicht überschritten, diesen aber in

einem Bereich von 40 bis 80 % ausschöpften. Wird eine Worst-case-Belastung (95stes Perzentil) hingegen zugrunde gelegt, so überschritten in nahezu allen untersuchten Altersgruppen mehr als 5 % der Bevölkerung den TDI in einem Bereich von 110 - 210 %. Die dafür verantwortlichen Lebensmittelgruppen wurden als Brot und Brötchen sowie Teigwaren identifiziert, da diese, neben einer hohen Verzehrsmenge in den dargelegten Altersgruppen ebenfalls eine hohe Belastungshäufigkeit und Belastungshöhe an Deoxynivalenol aufwiesen.

Weiterführende Untersuchungen bezüglich T-2 Toxin und HT-2 Toxin sollten eine orientierende Belastungssituation dieser Toxine dokumentieren. Die Ergebnisse zeigten, dass diese überwiegend in Hafer und Haferprodukten nachzuweisen sind. Weiterhin wurde die besondere Stellung von Hartweizengrieß in Bezug auf eine Gesamt-Trichothecen-Belastung durch einen Median für T-2 Toxin von 5,1 µg/kg in der Produktgruppe Teigwaren deutlich. Somit untermauern die hier vorliegenden Ergebnisse den Befund aus dem SCOOP-Task 3.2.10, dass in weiteren Forschungsprojekten spezifische und empfindliche analytische Methoden für diese Typ A Trichothecene entwickelt werden müssen.

T-2 Toxin und HT-2 Toxin konnte erstmals auch in pflanzlichen Speiseölen quantifiziert werden. Diese Befunde zeigen, dass zukünftige Untersuchungen hinsichtlich der Belastungssituation von Lebensmittel auch auf diese Produktgruppe ausgeweitet werden müssen.

8 Literaturverzeichnis

- ABBAS, H.K.; MIROCHA, C.J.; PAWLOSZY, R.J.; PUSCH, D.J. (1985) Effect of cleaning, milling, and baking on deoxynivalenol in wheat. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50, 482 - 486
- ABELHAMID, A. (1992) Influence of zearalenone on some metabolic, physiological and pathological aspects of female rabbits at two different ages. *Arch. Tierernähr.*, 42, 63 - 70
- ACCERBI, M.; RINALDI, V.E.; NG, P.K. (1999) Utilization of highly deoxynivalenol-contaminated wheat via extrusion processing. *J. Food Prot.*, 62, 1485 - 1487
- AHRENS, W.; FEHRMANN, H. (1984) Attack of wheat by *Septoria nodorum* and *Fusarium ear blight*. 1. Crop loss analysis. *J. Plant Disease and Protection*, 91, 42 - 58
- ALEXANDER, N.J.; MCCORMICK, S.P.; LARSON, T.M.; JURGENSON, J.E. (2004) Expression of Tri15 in *Fusarium sporotrichioides*. *Curr. Genet.*, 45, 157 - 162
- ATROSHI, F.; RIZZO, A.F.; VEIJALAINEN, P.; LINDBERG, L.A.; HONKANEN-BUZALSKI, T.; ANDERSSON, K.; HIRVI, T.; SALONIEMI, H. (1994) The effect of dietary exposure to DON and T-2 toxin on host resistance and serum immunoglobulins of normal and mastitic mice. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutrition*, 71, 223 - 233
- AZCONE-OLIVEIRA, J.I.; OUYANG, Y.L.; WARNER, R.L.; LINZ, J.E.; PESTKA, J.J. (1995) Effects of Vomitoxin (Deoxynivalenol) and Cycloheximid on IL-2, 4, 5 and 6 secretion and mRNA levels in Murine CD4+ cells. *Food Chem. and Toxic.*, 33, 433 - 441
- AZIZ, N.H.; ATTIA, E.S.; FARAG, S.A. (1997) Effect of gamma-irradiation on the natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins in wheat, flour and bread. *Nahrung*, 41, 34 - 37
- BAARS, A.J.; VAN APELDOORN, M.; WOUTERS, M. (1999). Appendix 1 Toxicology. In: PIETERS, M.N.; FIOLET, D.C.M.; BAARS, A.J. (1999) Deoxynivalenol. Derivation of concentration limits in wheat and wheat containing products. RIVM report 388802008, Rijks Instituut voor Volksgezondheid en Milieu, Bilthoven, The Netherlands
- BAGNERIS, R.W.; GAUL, J.A.; WARE, G.M. (1986) Liquid chromatographic determination of zearalenone and zearalenol in animal feeds and grains, using fluorescence detection. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 69, 894 - 898
- BARNA-VETRO, I.; GYONGYOSI, A.; SOLTI, L. (1994) Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay of *Fusarium* T-2 and zearalenone toxins in cereals. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 729 - 731
- BAUER, J.; HEINRITZI, K.; GAREIS, M.; GEDEK, B. (1987) Veränderungen am Genitaltrakt des weiblichen Schweines nach Verfütterung praxisrelevanter Zearalenonmengen. *Tierärztl. Praxis*, 15, 33 - 36
- BEARDALL, J.M.; MILLER, J.D. (1994) Diseases in humans with mycotoxins as possible causes. In: MILLER, J.D.; TRENHOLM, H.L. (Hrsg.) *Mycotoxins in Grain. Compounds other than aflatoxins*, Eagan press, St. Paul, Minnesota, USA 487 - 539
- BECCI, P.J.; VOSS, K.A.; HESS, F.G.; GALLO, M.A.; PARENT, R.A.; STEVENS, K.R.; TAYLOR, J.M. (1982) Long-term carcinogenicity and toxicity study of zearalenone in the rat. *J. Appl. Toxicol.*, 2, 247 - 254
- BECHTEL, D.B.; KALEIKU, L.A.; GAINES, R.L.; SEITZ, L.M. (1985): The effects of *Fusarium graminearum* infection on wheat kernels. *Cereals Chem.*, 62, 191 - 197
- BENNETT, G.A.; ANDERSON, R.A. (1978) Distribution of aflatoxin and/or zearalenone in wet-milled corn products: a review. *J. Agric. Food Chem.*, 26, 1055 - 1060
- BENNETT, G.A.; SHOTWELL, O.L.; KWOLEK, W.F. (1985) Liquid chromatographic determination of alpha-zearalenol and zearalenone in corn: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 68, 958 - 961

- BENNETT, J.W. (1987) Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and mycopathologia. *Mycopathologia* 100, 3 - 5
- BENNETT, G.A.; SHOTWELL, O.L. (1990) Criteria for determining purity of *Fusarium* mycotoxins. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 73, 270 - 275
- BENNETT, G.A.; RICHARD, J.L. (1996) Influence of processing on *Fusarium* mycotoxins in contaminated grains. *Food Technol.*, 50, 235 - 238
- BERGER, U.; OEHME, M.; KUHN, F. (1999) Quantitative determination and structure elucidation of type A- and B-trichothecenes by HPLC/ion trap multiple mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 4240 - 4245
- BERGER, U. (2000) Structure Elucidation and Quantification of trichothecenes and bisphenol diglycidyl ether derivatives in food by HPLC combined with multiple mass spectrometry, Dissertation Universität Basel
- BERGSJØ, B.; MATRE, T.; NAFSTAD, I. (1992) Effects of diets with graded levels of deoxynivalenol on performance in growing pigs. *J. Vet. Med. A*, 39, 752 - 758
- BERGSJØ, B.; LANGSETH, W.; NAFSTAD, I.; HØGSET JANSEN, J.; LARSEN, H.J.S. (1993) The effects of naturally deoxynivalenol-contaminated oats on the clinical condition, blood parameters, performance and carcass composition of growing pigs. *Vet. Res. Commun.*, 17, 283 - 294
- BERNHOF, A.; MODESTAS, K.; LANGSETH, W.; ÅKESSON, C.P.; OSWALD, I.P.; LARSEN, H.J.S. (2000) A study on immunotoxicity of HT-2 and T-2 toxins in minipigs. X International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, Brazil. Poster
- BHAT, R.V.; RAMAKRISHNA, Y.; BEEDU, S.R.; MUNSHI, K.L. (1989) Outbreak of trichothecene mycotoxicosis associated with consumption of mold-damaged wheat products in Kashmir valley India. *Lancet*, 341, 35 - 37
- BILGRAMI, K.S.; MASOOD, A.; RAHMAN, M.F. (1995) Cumulative effect of T-2 toxin and vitamin C on chromosomal abnormalities in the bone marrow cells of mice (*Mus musculus*). *Cytobios.*, 81, 171 - 174
- Bily, A.C.; Reid, L.M.; Savard, M.E.; Reddy, R.; Blackwell, B.A.; Campbell, C.M.; Krantis, A.; Durst, T.; Philogene, B.J.; Arnason, J.T.; Regnault-Roger, C. (2004) Analysis of *Fusarium graminearum* mycotoxins in different biological matrices by LC/MS. *Mycopathologia*, 157, 117 - 126
- BISELLI, S.; HUMMERT, C. (2005) Development of a multicomponent method for *Fusarium* toxins using LC-MS/MS and its application during a survey for the content of T-2 toxin and deoxynivalenol in various feed and food samples. *Food Addit. Contam.*, 22, 752 - 760
- BIAAS, W.; KELLERT, M.; STEINMEYER, S.; TIEBACH, R.; WEBER, R. (1984) Determination of deoxynivalenol and nivalenol in cereals at the microgram/kilogram range. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 179, 104 - 108
- BOCAROV-STANCIC, A.; SKRINJAR, M.; MASIC, Z.; PAVCOV, S.; GOLOSIN, B. (1997) Natural occurrence of *Fusarium* spp. and fusariotoxins in Yugoslav corn kernels. *Cereal Res. Comm.*, 34, 581 - 582
- BOCKHORN, I.; BOCKHORN, A.; POHLER, S. (2001) Deoxynivalenol (DON) in raw and cooked pasta. *Mycotoxin Res.*, 17, 67 - 70
- BÖHM, J. (1992) Über die Bedeutung der Mykotoxine Desoxynivalenol, Zearalenon und Ochratoxin A für landwirtschaftliche Nutztiere. *Arch. Tierernähr.*, 42, 95 - 111
- BÖHM, J. (2000) Fusarientoxine und ihre Bedeutung in der Tierernährung. *Übers. Tierernähr.*, 26, 95 - 132

- BOEHM, H.P. (2002) Surface oxides on carbon and their analysis: a critical assessment, *Carbon*, 40, 145 - 149
- BOKISCH, M. (1993) *Nahrungsfette und -öle*. Stuttgart: Ulmer
- BONDY, G.S.; PESTKA, J.J. (1991) Dietary exposure to the trichothecene vomitoxin (deoxynivalenol) stimulates terminal differentiation of Peyer's patch B cells to IgA secreting plasma cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 108, 520 - 530
- BORIES, G.F.; SUTRA, J.F.P.; TULLIEZ, J.E. (1992) Metabolism and disposition of (H3) zearanol implanted in the pig. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 284
- BOTTALICO, A.; LOGRIECO, A.; VISCONTI, A. (1989) Fusarium species and their mycotoxins in infected corn in Italy. *Mycopathologia*, 107, 85 - 92
- BOTTALICO, A.; LOGRIECO, A.; RITIENI, A.; MORETTI, A.; RANDAZZO, G.; CORDA, P. (1995) Beauvericin and fumonisin B, in preharvest Fusarium moniliforme maize ear rot in Sardinia. *Food Add. Contam.*, 12, 599 - 607
- BOTTALICO, A. (1998) Fusarium diseases of cereals: species complex and related mycotoxin profiles, in Europe. *J. Plant Pathol.*, 80, 85 - 103
- BOYACIOGLU, D.; HETTIARACHCHY, N.S.; D'APPLONIA, B.L. (1993) Additives affect Deoxynivalenol flour during bread baking. *J. Food Sci.*, 58, 416 - 418
- BRETZ, M.; GÖCKLER, S.; HUMPF, H.-U. (2005a) Isolierung und Strukturaufklärung von thermischen Abbauprodukten des Mykotoxins Nivalenol. *Mycotoxin Research*, 21, 15 - 17.
- BRETZ, M.; KNECHT, A.; GÖCKLER, S.; HUMPF, H.-U. (2005b) Isolation and structural elucidation of the Fusarium mycotoxin nivalenol. *Molecular Nutrition and Food Research*, 49, 309 - 316
- BRUMLEY, W.C.; TRUCKSESS, M.W.; ADLER, S.H.; COHEN, C.; WHITE, K.; SPHON, J.A. (1985) Negative Ion Chemical Ionization Mass Spectrometry of Deoxynivalenol (DON): Application to Identification of DON in Grains and Snack Foods after Quantitation/Isolation by Thin-Layer Chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 33, 326 - 330
- BRUMLEY, W.C.; ANDRZEJEWski, D.; TRUCKSESS, M.W.; SPHON, J.A. (1982) Negative ion chemical ionization mass spectrometry of trichothecenes: Novel fragmentation under OH-conditions. *Biomed. Mass Spectrom.*, 451 - 458
- BUBIEN, J.K.; LUNDEEM, G.; TEMPLETON, C. WOODS, W.T. (1989) Effects on the circulatory system. In: BEASLEY., V.R. (Hrsg.) *Trichothecene Mycotoxicosis: Pathophysiological effects*. Vol. 1. Boca Raton: CRC Press, 32 - 33
- BURROWS, E.P. (1994) *Biol. Mass Spectrom.* 23, 492 - 498
- BUNNER, D.L.; MORRIS, E.R. (1988) Alteration of multiple cell membrane functions in L-6 myoblasts by T-2 toxin: an important mechanism of action. *Toxicol. Appl. Microbiol.*, 92, 113 - 121
- BURSIAN, S.J.; AULERICH, R.J.; CAMERON, J.K.; AMES, N.K.; STEFICEK, B.A. (1992) Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicate in reducing the toxicity of dietary zearalenone to mink. *J. Appl. Toxicol.*, 12, 85 - 90
- CAHILL, L.M.; KRUGER, S.C.; MCALICE, B.T.; RAMSEY, C.S.; PRIOLI, R.; KOHN, B. (1999) Quantification of deoxynivalenol in wheat using an immunoaffinity column and liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 859, 23 - 28
- CANDLISH, A.A.G. (1991) 223–246. In: Smith J.E., Henderson R.S. (Hrsg.) *Mycotoxins and Animal Foods: The Determination of Mycotoxins in Animal Feeds by Biological Methods*. CRC Press, Boca Raton

- CASALE, W.L.; PESTKA, J.J.; HART, L.P. (1988) Enzym-linked immunosorbent assay employing monoclonal antibody specific for deoxynivalenol (vomitoxin) and several analogues. *J. Agr. Food Chem.*, 36, 663 - 668
- CAZZANIGA, D.; BASILICO, J.C.; GONZALEZ, R.J.; TORRES, R.L.; DE GREEF, D.M. (2001) Mycotoxins inactivation by extrusion cooking of corn flour. *Lett. Appl. Microbiol.*, 33, 144 - 147
- CHANG, H.L.; DEVRIES, J.W.; LARSON, P.A.; PATEL, H.H. (1984) Rapid determination of deoxynivalenol (vomitoxin) by liquid chromatography using modified Romer column cleanup. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 67, 52 - 54
- CHELKOWSKI, J.; PERKOWSKI, J. (1992) Mycotoxins in cereal grain (part 15). Distribution of deoxynivalenol in naturally contaminated kernels. *Mycotoxin Research*, 8, 27 - 30
- CHELKOWSKI, J.; BATEMAN, G.L.; MIROCHA, C.J. (1999) Identification of toxigenic *Fusarium* species using PCR assays. *J. Phytopathol.*, 147, 307 - 311
- CHOI, C.Y.; NAKAJIMA-ADACHI, H.; KAMINOGOWA, S.; SUGITA-KONISHI, Y. (2000) Nivalenol inhibits total and antigen-specific IgE production in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 165, 94 - 98
- CHU, F.S.; GROSSMAN, S.; WEI, R.D.; MIROCHA, C.J. (1979) Production of antibody against T-2 toxin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 37, 104 - 108
- CIRILLO, T.; RITIENI, A.; VISIONE, M.; COCCHIERI, R.A. (2003) Evaluation of conventional and organic Italian foodstuffs for deoxynivalenol and fumonisins B (1) and B (2). *J. Agric. Food Chem.*, 51, 8128 - 8131
- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (2002). Joint FAO/WHO food standards programme, November 2002. Discussion paper on Deoxynivalenol, CX/FAC 03/35 URL [http://www.mykotoxin.de/Dokumente/Codex %20DON %2012.02.pdf](http://www.mykotoxin.de/Dokumente/Codex%20DON%2012.02.pdf) TH. Stand 24.04.2004.
- COLE, RICHARD J.; SCHWEIKERT, MILBRA A. [Ed.] (2003) *Handbook of Secondary Fungal Metabolites* TH Vol. I-III. Harcourt Publishers Ltd
- COLLINS, G.J.; ROSEN, J.D. (1981) Distribution of T-2 Toxin in Wet-Milled Corn Products. *J. Food Sci.*, 46, 877 - 879
- CONRADY-LORCK, S.; STRUGALA, G.J.; FENG, X.C.; FICHTL, B. (1989) Intestinal metabolism of T-2 toxin, a major trichothecene mycotoxin. *Prog. Pharmacol. Clin. Pharmacol.*, 7, 319 - 326
- CORING SYSTEM DIAGNOSTIX GMBH (Hrsg.) MultiSepPTMP DON Bestimmung von DON und den DON-Acetyl-Metaboliten in Mais, Weizen, Mehl und Hafer über HPLC. Coring System, Diagnostix GmbH, Magdalenenstr. 21, 64579 Gernsheim a. Rhein, Deutschland
- COORAY, R.; JONSSON, P. (1990) Modulation of resistance to mastitis pathogens by treatment of mice with T-2 toxin. *Food Chem. Toxicol.*, 28, 687 - 692
- CORLEY, R.A.; SWANSON, S.P.; BUCK, W.B. (1985) Glucuronide conjugates of T-2 toxin and metabolites in swine bile and urine. *J. Agric. Food Chem.*, 33, 1085 - 1089
- CORLEY, R.A.; SWANSON, S.P.; GULLO, G.J.; JOHNSON, L.; BEASLEY, V.R.; BUCK, W.B. (1986) Disposition of T-2 toxin, a trichothecene mycotoxin in intramuscularly dosed swine. *J. Agric. Food Chem.*, 34, 868 - 875
- CORRIER, D.E.; ZIPPRIN, R.L. (1986a) Immunotoxic effects of T-2 toxin on cell-mediated immunity to listeriosis in mice: comparison with cyclophosphamide. *Am. J. Vet. Res.*, 47, 1956 - 1960

- CORRIER, D.E.; ZIPRIN, R.L. (1986b) Enhanced resistance to listeriosis induced in mice by preinoculation treatment with T-2 mycotoxin. *Am. J. Vet. Res.*, 47, 856 - 858
- CORRIER, D.E.; ZIPRIN, R.L.; MOLLENHAUER, H.H. (1987) Modulation of cell-mediated resistance to listeriosis in mice given T-2 toxin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 89, 323 - 331
- COSGRIFF, T.M.; BUNNER, D.R.; WANNEMACHER, R.W.; HODGSON, L.A.; DINTERMAN, R.E. (1986) The hemostatic derangement produced by T-2 toxin in *Cynomolgus* monkeys. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 82, 532 - 539
- COTE, L.M.; DAHLEM, A.M.; YOSHIKAWA, T.; SWANSON, S.P.; BUCK, W.B. (1986) Excretion of deoxynivalenol and its metabolite in milk, urine, and feces of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 69, 2416 - 2423
- COURT, M.H.; GREENBLATT D.J. (1997a) Molecular basis for deficient acetaminophen glucuronidation in cats. An interspecies comparison of enzyme kinetics in liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.*, 53, 1041 - 1047
- COURT, M.H.; GREENBLATT, D.J. (1997b) Biochemical basis for deficient paracetamolglucuronidation in cats: an interspecies comparison of enzyme constraint in liver microsomes. *J. Pharm. Pharmacol.*, 49, 446 - 449
- COURT, M.H.; GREENBLATT D.J. (2000) Molecular genetic basis for deficient acetaminophen glucuronidation by cats: UGT1A6 is a pseudogene, and evidence for reduced diversity of expressed hepatic UGT1A isoforms. *Pharmacogenetics*, 10, 355 - 369
- CREPPY, E.E. (2002) Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol. Lett.*, 127, 19 - 28
- DÄNICKE, S.; VALENTA, H.; UEBERSCHÄR, K.H.; (2000) Risikoabschätzung und Vermeidungsstrategien bei der Fütterung In: Risikofaktoren für die Fusariumtoxinbildung in Futtermitteln und Vermeidungsstrategien bei der Futtermittelerzeugung und Fütterung. *Landbauforschung Völknerode, Sonderheft 216*, 35 - 138
- DALCERO, A.; MAGNOLI, C.; CHIACCHIERA, S.; PALACIOS, G.; REYNOSO, M. (1997) Mycoflora and incidence of aflatoxin B1, zearalenone and deoxynivalenol in poultry feeds in Argentina. *Mycopathologia*, 137, 179 - 184
- DALL'ASTA, C.; GALAVERNA, G.; BIANCARDI, A.; GASPARINI, M.; SFORZA, S.; DOSSENA, A.; MARCHELLI, R. (2004) Simultaneous liquid chromatography-fluorescence analysis of type A and B trichothecenes as fluorescent derivatives via reaction with coumarin-3-carbonyl chloride. *J. Chromatogr. A.*, 1047, 241 - 247
- DALL'ASTA, C.; SFORZA, S.; GALAVERNA, G.; DOSSENA, A.; MARCHELLI, R. (2004) Simultaneous detection of type A and type B trichothecenes in cereals by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry using NaCl as cationization agent. *J. Chromatogr. A.*, 1054, 389 - 395
- DANZER, K.; HOBERT, H.; FISCHBACHER, C.; JAGEMANN K.-U. (2001) *Chemometrik: Grundlagen und Anwendungen*. 1. Aufl. Berlin: Springer
- DEIJNS, A.J.; EGMOND, H.P. VAN; SPEIJERS, G.A.J.; LOVEREN, H. VAN. (1994) Immunotoxiciteit van natuurlijke toxinen. Overzicht. Bilthoven: Rijks Instituut voor Volksgezondheid en Milieu, 16 - 17 (RIVM-rapport 388802007)
- DENICOLA, D.B.; REBAR, A.H.; CARLTON, W.W. (1978) T-2 toxin mycotoxicosis in the guinea-pig. *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 16, 601 - 609
- DEXTER, J.E.; CLEAR, R.M.; PRESTON, K.R. (1996) Fusarium head blight: Effect on the milling and baking of some Canadian wheats. *Cereal Chem.*, 73, 695 - 701
- DIAZ, G.J.; SQUIRES, E.J.; JULIAN, R.J.; BOERMANS, H.J. (1994) Individual and combined effects of T-2 toxin and DAS in laying hens. *Poultry Sci.*, 35, 393 - 405

- DIEKMAN, M.A.; GREEN, M.L. (1992) Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. *J. Anim. Sci.*, 70, 1615 - 1627
- DIETRICH, R.; SCHNEIDER, E.; USLEBER, E.; MÄRTLBAUER, E. (1995) Use of monoclonal antibodies for the analysis of mycotoxins. *Nat.Toxins.*, 3, 288 - 293
- DIXON, D.E.; WARNER R.L.; RAM B.P.; HART, L.P.; PESTKA J.J. (1987) Hybridoma Cell Line Production of a Specific Monoclonal Antibody to the Mycotoxins Zearalenone and a-Zearalenol. *J. Agric. Food Chem.*, 35, 122 - 126
- DOKO, M.B.; CANET, C.; BROWN, N.; SYDENHAM, E.W.; MPUCHANE, S.; SIAME, B.A. (1996) Natural co-occurrence of fumonisins and zearalenone in cereals and cereal-based foods from Eastern and Southern Africa. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 3240 - 3243
- DONG, W.; AZCONA-OLIVERA, J.I.; BROOKS, K.H.; LINZ, J.E.; PESTKA, J.J. (1994) Elevated gene expression and production of interleukins 2, 4, 5, and 6 during exposure to vomitoxin (deoxynivalenol) and cycloheximide in the EL-4 thymoma. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 127, 282 - 290
- DROCHNER, W. (1989) The occurrence of Fusarium toxins in feed. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.*, 96, 350 - 352
- DROCHNER, W. (1990) Aktuelle Aspekte zur Wirkung von Phytohormonen, Mykotoxinen und ausgewählten schädlichen Pflanzeninhaltsstoffen auf die Fruchtbarkeit beim weiblichen Rind. *Übers. Tierernährung*, 18, 177 - 196
- DROCHNER, W. (1998) Mykotoxine von Feldpilzen in der Schweinehaltung, Vorkommen und Auswirkungen auf Leistung und Gesundheit. In: *Mycosorb - Mykotoxin Vortrags-Veranstaltung (Alltech, 13. – 15.10.1998)*, 11 - 16
- DUGYALA, R.P.; KIM, Y.P.; SHARPA, R.P. (1994) Effects of aflatoxin B1 and T-2 toxin on the granulocyte-macrophage progenitor cells in mouse bone marrow cultures. *Immunopharmacol.*, 27, 57 - 65
- DUNNE, C.; MEANEY, M.; SMYTH, M.; TUINSTRA, L.G. (1993) Multimycotoxin detection and clean-up method for aflatoxins, ochratoxin and zearalenone in animal feed ingredients using high-performance liquid chromatography and gel permeation chromatography. *J. Chromatogr.*, 629, 229 - 235
- DUSOLD, L.R.; DREIFUSS, P.A.; POHLAND A.E.; SPHON J.A. (1978) Mycotoxins Mass Spectral Data Bank, U.S. Food and Drug Administration, Bureau of Foods, Division of Chemistry and Physics. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C.
- EDWARDS, S.; CANTLEY, T.C.; ROTTINGHAUS, G.E.; OSWEILER, G.D.; DAY, B.N. (1987) The effects of zearalenone on reproduction in swine. I. The relationship between ingested zearalenone dose and anestrus in non-pregnant, sexually mature gilts. *Theriogenology*, 28, 43 - 49
- EHLING, G.; COCKBURN, A.; SNOWDON, P.; BUCHHAUS, H. (1997) The significance of the Fusarium toxin deoxynivalenon (DON) for human and animal health. *Cereal Res. Commun.*, 25, 433 - 447
- ELLEND, N.; BINDER, J.; KRŠKA, R.; HORVATH, E.M. (1997) Contamination of Austrian corn with Fusarium toxins in autumn 1996. *Cereal Res. Comm.*, 25, 359 - 360
- EPPLEY, R.M. (1968) Screening method for zearalenone, aflatoxin and ochratoxin. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 51, 74
- ERIKSEN, G.S.; ALEXANDER, J. (Hrsg.), Fusarium toxins in cereals – a risk assessment. *Tema Nord 1998: 502*. Nordic Council of Ministers, Copenhagen

- ESKOLA, M.; PARIKKA, P.; RIZZO, A. (2001) Trichothecenes, ochratoxin A and zearalenone contamination and Fusarium infection in Finnish cereal samples in 1998. *Food Addit. Contam.*, 18, 707 - 718
- ESKOLA, M.; KOKKONEN, M.; RIZZO, A. (2002) Application of manual and automated systems for purification of ochratoxin a and zearalenone in cereals with immunoaffinity columns. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 41 - 47
- ETIENNE, M.; DOURMAD (1994) Effects of zearalenone or glucosinoides in the diet on reproduction in sows: A review *Livestock production. Science*, 40, 99 - 113
- EUROPÄISCHE GEMEINSCHAFT. Verordnung (EG) Nr. 466/2001 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln, 8. März 2001, zuletzt geändert durch die Verordnung (EG) Nr. 856/2005 in Bezug auf Fusarientoxine. vom 6. Juni 2005
- EUROPÄISCHE GEMEINSCHAFT. Verordnung (EG) Nr. 856/2005 der Kommission vom 06. Juni 2005 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 466/2001 in Bezug auf Fusarientoxine (Abl. Nr. L143/3; 07.06.2005)
- EUROPÄISCHE GEMEINSCHAFT. Verordnung (EG) Nr. 401/2006 der Kommission vom 22. Februar 2006 zur Festlegung von Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Kontrolle des Mykotoxingehaltes von Lebensmitteln (Abl. Nr. L70/12; 09.03.2006)
- EUROPÄISCHE GEMEINSCHAFT. Entscheidung 2002/657/EG der Kommission vom 14. August 2002 zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen. *Umwelt-online. Regelwerk zum Arbeits-, Umweltschutz, Gefahrguttransport- und Technikrecht.* URL [HThttp://www.umwelt-online.de/TH](http://www.umwelt-online.de/TH). Stand: 24.05.2004
- EUROPÄISCHE GEMEINSCHAFT. Richtlinie 2005/38/EG der Kommission vom 6. Juni 2005 zur Festlegung der Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Kontrolle des Gehalts an Fusarientoxinen in Lebensmitteln In: *Amtsblatt der Europäischen Union.* L143/18, 07.06.2005
- EUROPÄISCHE KOMMISSION. SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD (SCF, 1999) Opinion on Fusarium Toxins – Part 1: Deoxynivalenol (DON) (expressed on 2 December 1999), URL [HThttp://europa.eu.int/comm/dg24/health/sc/scf/out44_en.html](http://europa.eu.int/comm/dg24/health/sc/scf/out44_en.html)TH. Stand: 24.04.2004
- EUROPÄISCHE KOMMISSION. SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD (SCF, 2000a). Opinion on Fusarium Toxins – Part 2: Zearalenone (expressed on 22 June 2000). URL [HThttp://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out65_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out65_en.pdf)TH. Stand: 25.04.2004
- EUROPÄISCHE KOMMISSION. SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD (SCF, 2000b). Opinion on Fusarium Toxins Part 4: Nivalenol (expressed on 19 October 2000). URL [HThttp://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out74_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out74_en.pdf)TH. Stand: 25.04.2004
- EUROPÄISCHE KOMMISSION. SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD (SCF, 2001). Opinion on Fusarium toxins, part 5: T-2 toxin and HT-2 toxin (adopted by the SCF on 30 May 2001). URL [HThttp://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out88_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out88_en.pdf)TH. - Stand: 24.04.2004
- EUROPÄISCHE KOMMISSION. SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD (SCF, 2002) Opinion of the Scientific Committee on Food on Fusarium toxins. Part 6: Group evaluation of T-2 toxin, HT-2 toxin, nivalenol and Deoxynivalenol (expressed on 27 February 2002). URL [HThttp://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out123_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out123_en.pdf)TH. Stand: 28.04.2004

- FAIFER, G.C.; ZABAL, O.; GODOY, H.M. (1992) Further studies on the hematopoietic damage produced by a single dose of T-2 toxin in mice. *Toxicology*, 75, 169 - 174
- FALBE, J., REGITZ, M. (Hrsg.) (1990) *Römpp Lexikon Chemie*. 6 Bde. 9. Aufl. Stuttgart: Thieme, 5070
- FANG, X.; CHEN, J.; GUO, D.; WANG, G. (2002) Detection and identification of zearanol in chicken or rabbit liver by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J. AOAC Int.*, 85, 841 - 847
- FAZEKAS, B.; TAR, A. (2001) Determination of zearalenone content in cereals and feedstuffs by immunoaffinity column coupled with liquid chromatography. *J. AOAC Int.*, 84, 1453 - 1459
- FERNANDEZ, C.; STACK, M.E.; MUSSEY, S.M. (1994) Determination of deoxynivalenol in 1991 U.S. winter and spring wheat by high-performance thin-layer chromatography. *J. AOAC Int.*, 77, 628 - 630
- FOOD STANDARDS AGENCY (2005) Information Bulletin on Methods of Analysis and Sampling for Foodstuffs. URL http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/mb_059_jun2005.pdf, Stand: 01.08.2005
- FORSELL, J.H.; KATEBY, J.R.; YOSHIZAWA, T.; PESTKA J.J. (1985) Inhibition of mitogen-induced blastogenesis in human lymphocytes by T-2 toxin and its metabolites. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 1524 - 1526
- FORSELL, J.H.; PESTKA, J.J. (1985) Relation of 8-ketotrichothecene and zearalenone analog structure to inhibition of mitogen-induced human lymphocyte blastogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50, 1304 - 1307
- FORSELL, J.H.; WITT, M.F.; TAI, J.-H.; JENSEN, R.; PESTKA, J.J. (1986) Effects of 8-week exposure of the B6C3F1-mouse to dietary deoxynivalenol (vomitoxin) and zearalenone. *Fd. Chem. Toxicol.*, 24, 213 - 219
- FRENI-TITULAER, L.W.; CORDERO, J.F.; HADDOCK, L.; LEBRON, G.; MARTINEZ, R.; MILLS, J.L. (1986) Premature thelarche in Puerto Rico. A search for environmental factors. *Am. J. Disease Child.*, 140, 1263 - 1267
- FRICKE, R.F.; JORGE, J. (1991) Methylthiazolidine-4-carboxylate for treatment of acute T-2 toxin exposure. *J. Appl. Toxicol.*, 11, 135 - 140
- FRIEND, D.W.; THOMPSON, B.K.; TRENHOLM, H.L.; BOERMANS, H.J.; HARTIN, K.E.; PANICH, P.L. (1992) Toxicity of T-2 toxin and its interaction with deoxynivalenol when fed to young pigs. *Can. J. Anim. Sci.*, 72, 703 - 711
- FURLONG, E.B.; SOARES, L.M.V. (1995) Gas chromatographic method for quantification and confirmation of trichothecenes in wheat. *J. AOAC Inter.*, 78, 386 - 390
- GADJUSEK, D.C. (1953) Acute infectious hemorrhagic fevers and mycotoxicosis in the Union of Soviet Socialist Republics. In: *Med. Sci. Publ. No. 2*, Walter Reed Army Med. Center, Washington D.C. 82 - 106
- GAREIS, M.; BAUER, J.; ENDERS, C.; GEDEK, B. (1989) Contamination of cereals and feed with *Fusarium* mycotoxins in European countries. In: Chelkowski, J. (Hrsg.) *Fusarium: Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity*. Amsterdam: Elsevier; 441 - 472
- GAREIS, M. (1999) Mykotoxine und Schimmelpilze. Forschungsreport Ernährung-Landwirtschaft-Forsten 20, 4 - 5
- GARTEN, V.A., WEISS, D.E., WILLIS, J.B. (1957) A new interpretation of the Acidic and Basic structures in Carbons. 2. The Chromene-carbonium ion couple in Carbon., *Australian J.Chem.*, 10, 309 - 328

- GHEDIRA-CHEKIR, L.; MAAROUFI, K.; ZAKHAMA, A.; ELLOUZ, F.; DHOUB, S.; CREPPY, E.E.; BACHA, H. (1998) Induction of a SOS repair system in lysogenic bacteria by zearalenone and its prevention by vitamin E. *Chem. Biol. Interact.*, 113, 15 - 25
- GILBERT, J.; STARTIN, J.R.; CREWS, C. (1985) Optimisation of conditions for the trimethylsilylation of trichothecene mycotoxins. *J. Chromatogr.*, 319, 376 - 381
- GILBERT, J. (1989) Current views on the occurrence and significance of Fusarium toxins. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.*, 18, 89 - 98
- GILBERT, J.; BOENKE, A.; WAGSTAFFE, P.J. (1992) Deoxynivalenol in wheat and maize flour reference materials. 1. An intercomparison of methods. *Food Addit. Contam.*, 9, 71 - 81
- GILBERT, J.; TEKAUZ, A. (1995): Effects of Fusarium head blight and seed treatment on germination, emergence, and seedling vigour of spring wheat. *Can. J. Plant Pathol.*, 17, 252 - 259
- GÖBEL, R.; LUSKY, K. (2004) Simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in grains by new immunoaffinity column/liquid chromatography. *J. AOAC Int.*, 87, 411 - 416
- GRANDONI, K.M.; GENTRY, P.A.; HOLUB, B.J.; YAGEN, B. (1992) Trichothecene mycotoxins inhibit phosphoinositide hydrolysis in bovine platelets stimulated with platelet activating factor. *Toxicol.*, 72, 51 - 60
- GREENHALGH, R.; GILBERT, J.; KING, R.R.; BLACKWELL, B.A. (1984) Synthesis, characterization and occurrence in bread and cereal products of an isomer of 4-deoxynivalenol (vomitoxin). *J. Agric. Food. Chem.*, 32, 1416 - 1420
- GROSSE, Y.; CHEKIR-GHEDIRA, L.; HUC, A.; OBRECHT-PFLUMIO, S.; DIRHEIMER, G.; BACHA, H.; PFOHL-LESZKOWICZ, A. (1997) Retinol, ascorbic acid and α -tocopherol prevent DNS adduct formation in mice treated with the mycotoxins ochratoxin A and zearalenone. *Cancer Lett.*, 114, 225 - 229
- GROTEN, J.P.; FERON, V.J.; SÜHNEL, J. (2001) Toxicology of simple and complex mixtures. *Trends Pharmacol. Sci.*, 22, 316 - 322
- HAGAN, S.N.; TIETJEN, W.H. (1975) A convenient thin layer chromatographic cleanup procedure for screening several mycotoxins in oils. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 58, 620 - 621
- HAGLER, W.M.; DANKO, G.; HORVATH, L.; PALYUSIK, M.; MIROCHA, C.J. (1980) Transmission of zearalenone and its metabolite into ruminant milk. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.*, 28, 209 - 216
- HARA-KUDO, Y.; KASUGA, F.; SUGITA-KONISHI, Y.; KUMAGAI, S. (1996) Decreased host resistance on oral Salmonella enteritis infection following deoxynivalenol treatment. In: Miraglia, M.; Brera, C.; Onori, S. (Hrsg.) IX International IUPAC symposium on mycotoxins and phycotoxins (Rom 27. - 31.05.1996)
- HASCHEK, W.M. (1989) Mutagenicity and carcinogenicity of T-2 toxin. In: Beasley, V.R. (Hrsg.) Trichothecene Mycotoxicosis: Pathophysiological effects. Vol. 1, Boca Raton: CRC Press, 32 - 33
- HAZEL, C.M.; PATEL, S. (2004) Influence of processing on trichothecene levels. *Toxicol. Lett.*, 153, 51 - 59.
- HETMANSKI, M.T.; SCUDAMORE, K.A. (1989) A simple quantitative HPLC method for determination of aflatoxins in cereals and animal feedstuffs using gel permeation chromatography clean-up. *Food Addit. Contam.*, 6, 35 - 48

- HETMANSKI, M.T.; SCUDAMORE, K.A. (1991) Detection of zearalenone in cereal extracts using high-performance liquid chromatography with post-column derivatization. *J. Chromatogr.*, 588, 47 - 52
- HIDY, P.H.; BALDWIN, R.S.; GREASHAM, R.L.; KEITH, C.L.; MCMULLEN, J.R. (1977) Zearalenone and some derivatives: production and biological activities. *Adv. Appl. Microbiol.*, 22, 59 - 82
- HINOSHITA, F.; SUZUKI, Y.; YOKOYAMA, K.; HARA, S.; YAMADA, A.; OGURA, Y.; HASHIMOTO, H.; TOMURA, S.; MARUMORO, F.; UENO, Y. (1997) Experimental IgA nephropathy induced by a low-dose environmental mycotoxin, nivalenol. *Nephron*, 75, 469 - 478
- HOERR F.J.; CARLTON W.W.; YAGEN B. (1980) The toxicity of T-2 toxin and diacetoxyscirpenol in combination for broiler chickens. *Food Cosmet. Toxicol.*, 19, 185 - 188
- HOFFMANN, E. DE; STROOBANT, V. (2001) *Mass spectrometry. Principles and Applications*. 2. Aufl. Chichester: Wiley
- HOLLADAY, S.D.; BLAYLOCK, B.L.; COMMENT, C.E.; HEINDEL, J.J.; LUSTER, M.I. (1993) Fetal thymic atrophy after exposure to T-2 toxin: Selectivity for lymphoid progenitor cells. *Tox. Appl. Pharmacol.*, 121, 8 - 14
- HORI, M.; NAKAZAWA, H. (2000) Determination of trenbolone and zeranol in bovine muscle and liver by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 882, 53 - 62
- HORWITZ, W. (1982) Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs, *Anal. Chem.*, 54, 67 - 76
- HORWITZ, W. (1995) Protocol for the design, conduct and interpretation of method performance studies. (Technical Report). *Pure Appl. Chem.*, 67, 331 - 343
- HORWITZ, W., ALBERT, R. (1995) Precision in analytical measurements: Expected values and consequences in geochemical analyses, *Fresen. J. Anal. Chem.*, 351, 507 - 513
- HSIA, C.C.; WU, L.L.; LU, X.U.; LI, Y.S. (1988) Natural occurrence and clastogenic effects of nivalenol, deoxynivalenol, 3-acetyl-deoxynivalenol, 15-acetyldeoxynivalenol and zearalenone in corn from a high risk area of oesophageal cancer. *Cancer Detec. Prev.*, 13, 79 - 86
- HUOPALAHTI, R.P.; EBEL, J.; HENION, J.D. (1997) Supercritical fluid extraction of mycotoxins from feeds with analysis by LC/UV and LC/MS. *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.*, 20, 537 - 551
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC; 1993) Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Lyon: IARC, 1993. 397 - 444 (IARC, monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, 56)
- ITO, Y.; OHTSUBO, K.; ISHII, K.; UENO, Y. (1986) Effects of nivalenol on pregnancy and fetal development in mice. *Mycotoxin Res.*, 2, 71 - 77
- ITO, Y.; UENO, Y.; TANAKA, T.; NAKAMURA, K.; OHTSUBO, K. (1988) Embryotoxicity of oral Nivalenol in mice. *Jpn. Assoc. Mycotoxicol.*, 27, 33 - 36
- IVERSON, F.; AMSTRONG, C.; NERA, E.; TRUELOVE, J.; FERNIE, S.; SCOTT, P.M.; STAPLEY, R.; HAYWARD, S.; GUNNER, S. (1995) Chronic feeding study of deoxynivalenol in B6C3F1 male and female mice. *Teratogen. Carcin. Mut.*, 15, 283 - 306
- JECFA (1988) Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. Cambridge: Univ. Press, 1988 (WHO Food Additives Series; 23)
- JECFA (2000) Safety evaluation of certain food additives. Geneva: IPCS/WHO, 2000 (WHO Food Additives Series, 44)

- JECFA (2001) Summary and Conclusions of the Fifty-sixth meeting Geneva, 6-15 February 2001. Mycotoxins.
URL, <http://www.fao.org/waicent/faoinfo/economic/esn/jecfa/jecfa56.pdf>.
Stand: 24.04.2004
- JI, X.; NING, K.Y.; LIANG, Y.; WANG, D.; SHI, G. (1994) Effects of sterigmatocystin and T-2 toxin on the induction of unscheduled DNS synthesis in primary cultures of human gastric epithelial cells. *Nat. Toxins*, 2, 115 - 119
- JIMÉNEZ, M., MANEZ, M., HERNANDEZ, E. (1996) Influence of water activity and temperature on the production of zearalenone in corn by three *Fusarium* species. *Int. J. Food Microbiol.*, 29, 417 - 421
- JIMÉNEZ, M.; HUERTA, T.; MATEO, R. (1997) Mycotoxin production by *Fusarium* species isolated from bananas. *Appl. Environ. Microb.*, 63, 364 - 369
- JIMÉNEZ, M.; MATEO, J.J.; MATEO, R. (2000) Determination of type A trichothecenes by high-performance liquid chromatography with coumarin-3-carbonyl chloride derivatisation and fluorescence detection. *J. Chromatogr. A*, 870, 473 - 481
- JOFFE, A.Z. (1960). The mycoflora of overwintered cereals and its toxicity. *Bull. Res. Council. Israel*, 9, 101 - 126
- JOFFE, A.Z. (1962). Biological properties of some toxic fungi isolated from overwintered cereals. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 16, 201 - 221.
- JOFFE, A.Z. (1971). Alimentary toxic aleukia. In: KADIS ET AL. (Hrsg.) *Microbiol. toxins*, Vol VII. Academic Press, New York: 139 - 189.
- JOFFE, A.Z. (1974) Toxicity of *Fusarium poae* and *Fusarium sporotrichioides* and its relation to alimentary toxic aleukia. In: PURCHASE, I.F.H., (Hrsg.) *Mycotoxins*. Amsterdam: Elsevier, 229 - 262
- JOHNSEN, H.; ODDEN, E.; JOHNSEN, B.A.; FONNUM, F. (1988) Metabolism of T-2 toxin by blood cell carboxylesterases. *Biochem. Pharmacol.*, 37, 3193 - 3197
- JOSEPHS, R.D.; KRŠKA, R.; GRASSERBAUER, M.; BROEKAERT, J.A. (1998) Determination of trichothecene mycotoxins in wheat by use of supercritical fluid extraction and high-performance liquid chromatography with diode array detection or gas chromatography with electron capture detection. *J. Chromatogr. A*, 795, 297 - 304
- JOSEPHS, R.D.; SCHUHMACHER, R.; KRŠKA, R. (2001) International interlaboratory study for the determination of the *Fusarium* mycotoxins zearalenone and deoxynivalenol in agricultural commodities. *Food Addit. Contam.*, 18, 417 - 430
- KALINOSKI, H.T.; UDSETH, H.R.; WRIGHT, B.W.; SMITH, R.D. (1986) Supercritical fluid extraction and direct fluid injection mass spectrometry for the determination of trichothecene mycotoxins in wheat samples. *Anal. Chem.*, 58, 2421 - 2425
- KAMIMURA, H.; NISHIJIMA, M.; YASUDA, K.; SAITO, K.; IBE, A.; NAGAYAMA, T.; USHIYAMA, H.; NAOI, Y. (1981) Simultaneous detection of several *Fusarium* mycotoxins in cereals, grains, and foodstuffs. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 64, 1067 - 1073
- KANAI, K.; KONDO, E. (1984) Decreased resistance to mycobacterial infection in mice fed a trichothecene compound (T-2 toxin). *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, 37, 97 - 104
- KARPPANEN, E., RIZZO, A., BERG, S., LINDFORS, E. AND AHO, R. (1985) *Fusarium* mycotoxins as a problem in Finnish feeds and cereals. *J. Agric. Sci. Finland*, 57, 195 - 206
- KAWASAKI, Y.; UCHIDA, O.; SEKITA, K.; MATSUMOTO, K.; OCHIAI, T.; USOI, A.; NAKAJI, Y.; FUROYA, L.; KUROKAWA, Y.; TOBE, M. (1990) Single and repeated oral administration toxicity studies of nivalenol in F344 rats. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, 31, 144

- KEBARLE, P., TANG, L. (1993) From Ions in Solutions to Ions in the Gas Phase. *Anal. Chem.* 65, 972 - 986A
- KERCHEER, C.J.; JONES, R.R. (1992) Combinations of hormone and hormone-like implants for growing-finishing beef steers. *J. Anim. Sci.* 43, 151 - 154
- KHERA, K.S.; ARNOLD, D.L.; WHALEN, C.; ANGERS, G.; SCOTT, P.M. (1984) Vomitoxin (4-deoxynivalenol): effects on reproduction of mice and rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 74, 345 - 356
- KHERA, K.S.; WHALEN, C.; ANGERS, G. (1986) A teratology study on Vomitoxin (4-deoxynivalenol) in rabbits. *Food Chem. Toxicol.*, 24, 421 - 424
- KHERA, K.S.; WHALEN, C.; ANGERS, G.; VESONDER, R.F.; KUIPER-GOODMAN, T. (1982) Embryotoxicity of 4-deoxynivalenol (Vomitoxin) in mice. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, 29, 487 - 491
- KOCH, P. (2004) State of the art of trichothecenes analysis. *Toxicol. Lett.*, 153, 109 - 112
- KOEHLER, B. (1959) Corn ear rots in Illinois. *Univ. Ill. Agric. Exp. Stn. Bull.* 639
- KOEN, J.S.; SMITH, H.C. (1945) An unusual case of genital involvement in swine associated with eating moldy corn. *Vet. Med.*, 1945, 40, 131 - 133
- KOSTIAINEN, R. (1988) Characterization of trichothecenes by tandem mass spectrometry using reactive collisions with ammonia. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, 16, 197 - 200
- KOTAL, F.; HOLADOVA, K.; HAJŠLOVA, J.; POUŠTKA, J.; RADOVA, Z. (1999) Determination of trichothecenes in cereals. *J. Chromatogr. A*, 830, 219 - 225
- KOTAL, F.; RADOVA, Z. (2002) A Simple Methode for Determination of Deoxynivalenol in Cereals and Flours. *Czech J. Food Sci.*, 20, 63 - 68
- KRAUSE, H.-P. (1985) Untersuchungen zum Vorkommen der Mykotoxine Aflatoxin B1, B2, G1, G2 und Zearalenon im Schweinefutter (Fertigfuttermittel und betriebseigene Mischungen) im Raum Süd-Schleswig-Holstein. Berlin, Freie Univ., Tierärztl. Ambulanz, Diss.
- KRISHNAMURTHY, T.; SARVER, E. W. (1987) Mass spectral investigations on trichothecene mycotoxins IV – collisionally activated dissociation mass spectra (negative ion) of some macrocyclic trichothecenes. *Biol. Mass Spectrom.*, 15
- KRSKA, R.; BAUMGARTNER, S.; JOSEPHS, R. (2001) The state-of-the-art in the analysis of type-A and -B trichothecene mycotoxins in cereals. *Fresen. J. Anal. Chem.*, 371, 285 - 299
- KUBENA, L.F.; HUFF, W.E.; HARVEY, R.B., PHILLIPS T.D.; ROTTINGHAUS, G.E. (1989) Individual and combined toxicity of deoxynivalenol and T-2 toxin in broiler chicks. *Poultry Sci.*, 68, 622 - 626
- KUIPER-GOODMAN, T.; SCOTT, P.M.; WATANABE, H. (1987) Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regul. Toxicol. and Pharm.*, 7, 253 - 306
- KUIPER, G.G.; LEMMEN, J.G.; CARLSSON, B.; CORTON, J.C.; SAFE, S.H.; SAAG, P.T. VAN DER; BURG, B. VAN DER; GUSTAFSSON, J.A. (1998) Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinol.*, 139, 4252 - 4263
- KURODA, H.; MORI, T.; NISHIOKA, C.; OKASAKI, H.; TAKAGI, M. (1979) Studies on the gas chromatographic determination of trichothecene mycotoxins in food. *J Food Hyg. Soc. Jpn.*, 20, 137 - 142
- LACEY, J. (1991) Natural occurrence of mycotoxins in growing and conserved forage crops. In: SMITH, J.E.; HENDERSON, R.S. (Hrsg.) *Mycotoxins and Animal Foods*, Boca Raton: CRC Press, 363 - 414

- LAFARGE-FRAYSSINET, C.; DECLOITRE, F.; MOUSSET, S.; MARTIN, M.; FRAYSSINET, C. (1981) Induction of DNS single-strand breaks by T2 toxin, a trichothecene metabolite of *Fusarium*: effect on lymphoid organs and liver. *Mutat. Res.*, 88, 115 - 123
- LAFARGE-FRAYSSINET, C.; CHAKOR, K.; LAFONT, P.; FRAYSSINET, C. (1990) Transplacental transfer of T2toxin: pathological effect. *J. Environ. Pathol. Oncol.*, 10, 64 - 68
- LAGANA, A.; FAGO, G.; MARINO, A.; SANTARELLI, D. (2001) Development of an analytical system for the simultaneous determination of anabolic macrocyclic lactones in aquatic environmental samples. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 15, 304 - 310
- LAGANA, A.; CURINI, R.; D'ASCENZO, G.; LEVA, I. DE; FABERI, A.; PASTORINI, E. (2003) Liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the identification and determination of trichothecenes in maize. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 17, 1037 - 1043
- Lake, B.G.; Phillips, J.C.; Walters, D.G.; Bayley, D.L.; Cook, M.W.; Thomas, L.V.; Gilbert, J.; Startin, J.R.; Baldwin, N.C.; Bycroft, B.W. (1987) Studies on the metabolism of deoxynivalenol in the rat. *Food Chem. Toxicol.*, 25, 589 - 592
- LAMBERT, L.A.; HINES, F.A.; EPPLEY, R.M. (1995) Lack of initiation and promotion potential of deoxynivalenol contamination in barley and oats. *Food Chem. Toxicol.*, 33, 217 - 222
- LANGSETH, W.; CLASEN, P.E. (1992) Automation of a clean-up procedure for determination of trichothecenes in cereals using a charcoal-alumina column. *J. Chromatogr.*, 603, 290 - 293
- LANGSETH, W.; BERNHOFT, A.; RUNDBERGET, T.; KOSIAK, B.; GAREIS, M. (1998) Mycotoxin production and cytotoxicity of *Fusarium* strains isolated from Norwegian cereals. *Mycopathologia*, 144, 103 - 113
- LANGSETH, W.; RUNDBERGET, T. (1999) The occurrence of HT-2 toxin and other trichothecenes in Norwegian cereals. *Mycopathologia*, 147, 157 - 165
- Lanin, S.N.; Nikitin, Y.S.; Petrenko, V.V. (1989) *Zh. Anal. Khim.*, 44, 2235
- LANIN, S.N.; NIKITIN, Y.S. (1991) Retention data for five ketotrichothecenes in reversed-phase high-performance liquid chromatography with different eluent systems. *J. Chromatogr.*, 558, 81 - 88
- LAUNAY, F.M.; YOUNG, P.B.; STERK, S.S.; BLOKLAND, M.H.; KENNEDY, D.G. (2004) Confirmatory assay for zearanol, taleranol and the *Fusarium* spp. toxins in bovine urine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Addit. Contam.*, 21, 52 - 62
- LAUREN, D.R.; GREENHALGH, R. (1987) Simultaneous analysis of nivalenol and deoxynivalenol in cereals by liquid chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 70, 479 - 483
- LAUREN, D.R.; RINGROSE, M.A. (1997) Determination of the fate of three *Fusarium* mycotoxins through wet-milling of maize using an improved HPLC analytical technique. *Food Addit. Contam.*, 14, 435 - 443
- LAUREN, D.R.; SMITH, W.A. (2001) Stability of the *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone in ground maize under typical cooking environments. *Food Addit. Contam.*, 18, 1011 - 1016
- LAUTRAITE, S.; PARENT-MASSIN, D.; RIO, B.; HOELLINGER, H. (1995) Comparison of toxicity induced by T-2 toxin on human and rat granulo-monocytic progenitors with an in vitro model. *Hum. Exp. Toxicol.*, 14, 672 - 678
- LAUTRAITE, S.; PARENT-MASSIN, D.; RIO, B.; HOELLINGER, H. (1996) Comparison of toxicity induced by HT-2 toxin on human and rat granulo-monocytic progenitors with an in vitro model. *Hum. Exp. Toxicol.*, 15, 208 - 213.
- LEATHERMAN, D.L.; MIDDLEBROOK, J.L. (1993) Effect of emetine on T-2 toxin-induced inhibition of protein synthesis in mammalian cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 266, 741 - 748

- LEONOV, A.N. (1977). Current view of the chemical nature of factors responsible for alimentary toxic aleukia. In: Rodricks, J.V., Hesseltime, C.W. & Mehlman, M.A. (Hrsg.) Mycotoxins in human and animal health. Pathotox Publishers INC., Park Forest South, Illinois: 323 - 328.
- LEPSCHY VON GEISSENTHAL, J. (1992): Fusarientoxine in Getreide – ihre Entstehung und Vorbeugungsmaßnahmen. *Gesunde Pflanze*, 44, 35 - 39
- LI, D.; CHEN, S.; RANDEPATH, K. (1992) Natural dietary ingredients (oats and alfalfa) induce covalent DNS modifications (I-compounds) in rat liver and kidney. *Nutr. Cancer*, 17, 205 - 216
- LI, G.; SHINOZUKA, J.; UETSUKA, K.; NAKAYAMA, H.; DOI, K. (1997) T-2 toxin-induced apoptosis in intestinal crypt epithelial cells of mice. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 49, 447 - 450
- LINDTNER, O.; KENNTNER, N.; WAGNER, C.; BAUCH, A.; VESPERMANN, A.; PYDDE, E.; BRÄUNIG, J.; HEINEMEYER, G. (2005) Nachwuchsgruppe "Probabilistische Expositionsabschätzung" im BfR
- LIU, M.T.; RAM, B.P.; HART, L.P.; PESTKA, J.J. (1985) Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the mycotoxin zearalenone. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50, 332 - 336
- LLORENS, A.; MATEO, R.; MATEO, J.J.; JIMENEZ, M. (2002) Comparison of extraction and clean-up procedures for analysis of zearalenone in corn, rice and wheat grains by high-performance liquid chromatography with photodiode array and fluorescence detection. *Food Addit. Contam.*, 19, 272 - 281
- LOMBAERT, G.A.; PELLAERS, P.; ROSCOE, V.; MANKOTIA, M.; NEIL, R.; SCOTT, P.M. (2003) Mycotoxins in infant cereal foods from the Canadian retail market. *Food Addit. Contam.*, 20, 494 - 504
- LORI, G.A.; SISTERNA, M.N.; HAIDUKOWSKI, M.; RIZZO, I. (2003) *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol contamination in the durum wheat area of Argentina. *Microbiol. Res.*, 158, 29 - 35
- LUSKY, K.; TESCH D.; GÖBEL, R.; HAIDER, W. (1997) Gleichzeitige Verabreichung der Mykotoxine Ochratoxin A und Zearalenon über das Futter an Schweine – Einfluß auf Tiergesundheit und Rückstandsverhalten. *Tierärztl. Umsch.* 52, 212 - 221
- LUTSKY, I.; MOR, N.; YAGEN, B.; JOFFRE, A.Z. (1978) The role of T-2 toxin in experimental alimentary toxic aleukia: a toxicity study in cats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 43, 111 - 124
- MACDONALD, E.J.; COVAN, K.R.; SMITH, T.K. (1988) Effect of acute oral doses of T-2 toxin on tissue concentrations of biogenic amines in the rat. *J. Anim. Sci.*, 66, 434 - 441
- MADHYASTHA, M.S.; MARQUARDT, R.R.; ABRAMSON, D. (1994) Structure-activity relationships and interactions among trichothecene mycotoxins as assessed by yeast bioassay. *Toxicon*, 32, 1147 - 1152
- MAJERUS, P.; CURTUI, V.; OTTENEDER, H.; USLEBER, E. (2002) Deoxynivalenol in Lebensmitteln: Ergebnisse einer Pilotstudie. *Mycotoxin Research*, 18 A, 32 - 34
- MÄRTLBAUER, E.; HACK, R.; TERPLAN, G. (1989) Preparation and characterization of polyclonal and monoclonal antibodies against fusarenon-X. *Food Agric. Immunol.*, 1, 137 - 146
- MÄRTLBAUER, E.; DIETRICH, R. (2003a) Bestimmung von Zearalenon mittels dc-ELISA. Persönliche Mitteilung
- MÄRTLBAUER, E.; DIETRICH, R. (2003b) Bestimmung von Deoxynivalenol mittels dab-ELISA. Persönliche Mitteilung

- MALAIYANDI, M.; BARRETTE, J. P.; WAVROCK, P. L. (1976) Bis-diazotized benzidine as a spray reagent for detecting zearalenone on thin layer chromatoplates. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 59, 959 - 962
- MALAIYANDI, M.; BARRETTE, J.P. (1978) A high pressure liquid chromatographic method for the quantitation of sub-microgram amounts of zearalenone (F-2) in agricultural products. *J. Environ. Sci. Health B*, 13, 381 - 400
- MANTHEY, F.A.; WOLF-HALL, C.E.; YALLA, S.; VIJAYAKUMAR, C.; CARLSON, D. (2004) Microbial loads, mycotoxins, and quality of durum wheat from the 2001 harvest of the northern plains region of the United States. *J. Food Prot.*, 67, 772 - 780
- MARASAS, W.F.O.; BARNBURG, J.R.; SMALLEY, E.B.; STRONG, F.M.; RAGLAND, W.L.; DEGURSE, P.E. (1969) Toxic effects on trout, rats and mice of T-2 toxin produced by the fungus *Fusarium tricinctum*. *Toxicol. Appl. pharmacol.*, 15, 471 - 482
- MARASAS, W.F.O.; MILLER, J.D.; VISCONTI, A. (2000) Fumonisin B1. *Environ. Health Critic.*, 219, 1 - 150
- MARTIN, P.M.D.; GILMAN, G.A. (1976) A consideration of the mycotoxin hypothesis with special reference to the mycoflora of maize, sorghum, wheat and groundnuts. Tropical Products Institute, London.
- MARTINS, M.L.; MARTINS, H.M. (2001) Determination of deoxynivalenol in wheat-based breakfast cereals marketed in Portugal. *J. Food Prot.*, 64, 1848 - 1850
- MATEO, J.J.; LLORENS, A.; MATEO, R.; JIMENEZ, M. (2001) Critical study of and improvements in chromatographic methods for the analysis of type B trichothecenes. *J. Chromatogr. A*, 918, 99 - 112
- MATSUMOTO, H.; ITO, T.; UENO, Y. (1978) Toxicological approaches to the metabolites of *Fusaria*. XII. Fate and distribution of T-2 in mice. *Jpn. J. Exp. Med.*, 48, 393 - 399
- MATTHIES, A.; FLATTER, A.; SEMAR, M.; BLEIHOLDER, H.; OPPITZ, K. (2000) *Fusarium* in wheat: Importance and toxin production in the field - possibilities and limits of fungicide treatments. Proceedings of the 22rd Mycotoxin-Workshop Bonn 2000, Mycotoxin Research 16A, 6 - 10
- MATTSON, J.S., MARK, H.B. (1971) *Activated Carbon*. New York: Marcel Dekker
- MATUSZEWSKI, B.K., CONSTANZER, M.L., CHAVEZ-ENG, C.M. (1998) Matrix Effect in Quantitative LC/MS/MS Analyses of Biological Fluids: A Method for Determination of Finasteride in Human Plasma at Picogram Per Milliliter Concentrations, *Anal. Chem.*, 70, 882 - 889
- MAYER, C.F. (1953). Endemic panmyelotoxicosis in the Russian grain belt. Part I. The clinical aspects of alimentary toxic aleukia (ATA). A comprehensive review. *Milit. Surg.* 113: 173 - 189.
- MCNUTT S.H.; PURWIN P.; MURRAY, C. (1928) Vulvovaginitis in swine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 73, 484
- MENNA, M.E.DI; LAUREN, D.R.; HARDACRE, A. (1997) *Fusaria* and *Fusarium* toxins in New Zealand maize plants. *Mycopathologia*, 139, 165
- MIDGALOF, B.H. (1983) Biotransformation of zearanol: Disposition and metabolism in the female rat, rabbit, dog, monkey and man. *Xenobiotica*, 13, 209 - 211
- MILES, W.F.; GURPRASAD, N.P. (1985) Oxygen negative chemical ionization mass spectrometry of trichothecenes. *Biological Mass Spectrometry*. 12, 652 - 658
- MILLER, J.D. (1994) Epidemiology of *Fusarium* diseases of cereals. In: Miller, J.D.; Trenholm, H.L. (Hrsg.) *Mycotoxins in Grain: Compounds Other than Aflatoxin*. St. Paul: Eagan-Press, 19 - 36

- MILLS, J.T. (1990) Mycotoxins and toxigenic fungi on cereal grains in western Canada. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 68, 982 - 986
- MINERVINI, F.; DONG, W.; PESTKA, J.J. (1993) In vitro vomitoxin exposure alters IgA and IgM secretion by CH12LX B cells. Relationship to proliferation and macromolecular synthesis. *Mycopathologia*, 121, 33 - 40
- MIROCHA, C.J. (1967) Estrogenic metabolite produced by *Fusarium graminearum* in stored corn. *Appl. Microbiol.*, 15, 497
- MIROCHA, C.J.; HARRISON, J.; NICHOLS, A.A.; MCCLINTOCK, M. (1968) Detection of a fungal estrogen (F-2) in hay associated with infertility in dairy cattle. *Appl. Microbiol.*, 16, 797 - 798
- MIROCHA, C.J.; Christensen, C.M.; Nelson, G.H. (1971) F-2 (Zearalenone); estrogenic mycotoxin from *Fusarium*. In: MIROCHA, R.J. (Hrsg.) *Microbial toxins*, New York: Academic Press, 107 - 138
- MIROCHA, C. J.; SCHAUERHAMER, B.; PATHRE, S. V. (1974) Isolation, detection and quantitation of zearalenone in maize and barley. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 57, 1104 - 1110
- MIROCHA, C.J.; PATHRE, S.V.; SCHAUERHAMER, B.; CHRISTENSEN, C.M. (1976) Natural occurrence of *Fusarium* toxins in feedstuff. *Appl. Environ. Microbiol.*, 32, 553 - 556
- MIROCHA, C.J.; PATHRE, S.V.; ROBISON, T.S. (1981) Comparative metabolism of zearalenone and transmission into bovine milk. *Food Cosmet. Toxicol.*, 19, 25 - 30
- MIROCHA, C.J.; PANTHRE, S.V.; PAWLOSKEY, R.J.; HEWETSON D.W. (1986) Mass spectra of selected trichothecenes. In: COLE, R.J. (Hrsg.). *Modern Methods in the Analysis and Structure Elucidation of Mycotoxins*. New York: Academic Press; 353 - 392
- MODI, R.; MÜLLER, H.-M. (1992) Ergosteringehalt und Toxizität von Weizen und Weizenkleie. 14. Mykotoxin-Workshop Gießen, 16 - 17
- MOLTO, G.A.; GONZALEZ, H.H.; RESNIK, S.L.; PEREYRA-GONZALEZ, A. (1997) Production of trichothecenes and zearalenone by isolates of *Fusarium* spp. from Argentinian maize. *Food Addit. Contam.*, 14, 263 - 268
- MOLTO, G.; SAMAR, M.M.; RESNIK, S.; MARTINEZ, E.J.; PACIN, A. (2000) Occurrence of trichothecenes in Argentinean beer: a preliminary exposure assessment. *Food Addit. Contam.*, 17, 809 - 813
- MORGAN, M.R.A. (1989) Mycotoxin immunoassays: with special reference to ELISAs. *Tetrahedron*, 45, 2237 - 2249
- MÜLLER, H. M.; REIMAN, J.; SCHUMACHER, U.; SCHWADORF, K. (1997) *Fusarium* toxins in wheat harvested during six years in an area of southwest Germany. *Natural Toxins*, 5, 24 - 30
- NAGAYAMA, S.; KAWAMURA, O.; OHTANI, K.; RYU, J.C.; LATUS, D.; SUDHEIM, L.; UENO, Y. (1988) Application of an enzyme-linked immunosorbent assay for screening of T-2 toxin-producing *Fusarium* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 1302 - 1303
- NASEEM, S.M.; PACE, J.G.; WANNEMACHER, R.W. (1995) A high-performance liquid chromatographic method for determining [³H] T-2 and its metabolites in biological fluids of the cynomolgous monkey. *J. Anal. Toxicol.*, 19, 151 - 156
- NEIRA, M.S.; PACIN, A.M.; MARTINEZ, E.J.; MOLTO, G.; RESNIK, S.L. (1997) The effects of bakery processing on natural deoxynivalenol contamination. *Int. J. Food Microbiol.*, 37, 21 - 25
- NICOL, M.J.; LAUREN, D.R.; MILES, C.O.; JONES, W.T. (1993) Production of a monoclonal antibody with specificity for deoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol, and 15-acetyldeoxynivalenol. *Food Agric. Immunol.* 5, 199 - 209

- NIELSEN, K.F.; THRANE, U. (2001) Fast methods for screening of trichothecenes in fungal cultures using gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 929, 75 - 87
- NIELSEN, K.F.; SMEDSGAARD, J. (2003) Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology. *J. Chromatogr. A*, 1002, 111 - 136
- NIESSEN, L.; BÖHM-SCHRAML, M.; VOGEL, H.; DONHAUSER, S. (1993) Deoxynivalenol in commercial beer – screening for the toxin with an indirect competitive ELISA. *Mycotoxin Research.*, 9, 99 - 109
- NIESSEN, W. (1999) *Liquid chromatography – mass spectrometry*. New York: Marcel Dekker
- NIGHTINGALE, M.J.; MARCHYLO, B.A.; CLEAR, R.M.; DEXTER, J.E.; PRESTON, K.R. (1999) Fusarium head blight: Effect of fungal proteases on wheat storage proteins. *Cereal Chem.*, 76, 150 - 158
- NOH, J.S., SCHWARZ, S.A. (1990) Effect of HNO₃ treatment on the surface acidity of activated carbons, *CARBON*, 28, 675 - 682
- NOWICKI, T.W.; GABA, D.G.; DEXTER, J.E.; MATSUO, R.R.; CLEAR, R.M. (1988) Retention of the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol in wheat during processing and cooking of spaghetti and noodles. *J. Cereal Sci.*, 8, 189 - 202
- NTP (1982) Carcinogenesis bioassay of zearalenone in F 344/N rats and B6C3F1 mice (feed study). Bethesda: Dep. of Health and Human Services (National Toxicology Program, Technical Report; 235, NIH Publication No. 83 – 1791)
- OBST, A. (1994) Untersuchungen zur Epidemiologie und Bekämpfung des Ährenparasiten *Fusarium graminearum* an Weizen. *Mitt. der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem* 301, 73
- OHTSUBO, K.; SAITO, M. (1977) Chronic effects of trichothecene toxins. In: Rodricks, J.V.; Hesseltine, C.W.; Mehlman, M.A.; (Hrsg.) *Mycotoxins in human and animal health*. Park Forest South: Pathotox Publishers, 255 - 262
- OHTSUBO, K.; RYU, L.C.; NAKAMURA, K.; IZUMIYAMA, N.; TANAKA, T.; YAMAMURA, H.; KOBAYASHI, T.; UENO Y. (1989) Chronic toxicity of nivalenol in female mice: a 2 year feeding study with *Fusarium nivale* Fn 2b moulded rice. *Food Chem. Toxicol.*, 27, 591 - 598
- OKOYE, Z.S. (1987) Stability of zearalenone in naturally contaminated corn during Nigerian traditional brewing. *Food Addit.Contam.*, 4, 57 - 59
- OLDHAM, J.W.; ALLRED, L.E.; MILO, G.E.; KINDIG, O.; CAPEN, C.C. (1980) The toxicological evaluation of the mycotoxins T-2 and T-2 tetraol using human fibroblasts in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 52, 159 - 168
- ONJI, Y.; DOHI, Y.; AOKI, Y.; MORIYAMA, T.; NAGAMI, H.; UNO, M.; TANAKA, T.; YAMAZOE, Y. (1989) Deepoxynivalenol: a new metabolite of nivalenol found in the excreta of orally administered rats. *J. Agric. Food Chem.*, 37, 478 - 481
- ONJI, Y.; AOKI, Y.; TANI, N.; UMEBAYASHI, K.; KITADA, Y.; DOHI, Y. (1998) Direct analysis of several *Fusarium* mycotoxins in cereals by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 815, 59 - 65
- PALLARONI, L., HOLST, C. VON, ANKLAM, E. (2001) In: 23. Mykotoxin-Workshop (Wien 28. – 30.05.2001)
- PALLARONI, L.; VON HOLST, C.; ESKILSSON, S.; BJORKLUND, E. (2002) Microwave-assisted extraction of zearalenone from wheat and corn. *Anal. Bioanal. Chem.*, 374, 161-166

- PALLARONI, L.; HOLST, C. VON (2003) Comparison of alternative and conventional extraction techniques for the determination of zearalenone in corn. *Anal. Bioanal. Chem.*, 376, 908 - 912
- PALYIUSIK, M. (1977) *Mykotoxikosen*. Wien. Tierärztl. Monatsschr., 64, 259 - 266
- PAREKH, C. K.; COULSTON, F. (1983) Determination of the hormonal no-effect level of zeranol in non-human primates. In: MEISSONER, E.; MITCHELL-VIGNERON, J. (Hrsg.) *Anabolics in Animal Production (OIE Symposium. Public health aspects, analytical methods and regulations, Paris 15. – 17.02.1983)*
- PARENT-MASSIN, D.; PARCHMENT, R.E. (1998) Haematotoxicity of mycotoxins. *Synthèse Scientifique. Rev. Méd. Vét.*, 149, 591 - 598
- PARK, J.J.; CHU, F.S. (1996) Assessment of immunochemical methods for the analysis of trichothecene mycotoxins in naturally occurring moldy corn. *J. AOAC Int.*, 79, 465 - 471
- PASCALE, M.; HAIDUKOWSKI, M.; VISCONTI, A. (2003) Determination of T-2 toxin in cereal grains by liquid chromatography with fluorescence detection after immunoaffinity column clean-up and derivatization with 1-anthrolylnitrile. *J. Chromatogr. A*, 989, 257 - 264
- PATEL, J.R.; BHAGWAT, A.A.; SANGLAY, G.C.; SOLOMON, M.B. (2005) In: DIAZ, D. *The Mycotoxin Blue Book*. Nottingham University Press. 279 - 294
- PATEY, A.L.; GILBERT, J. (1989) Fate of Fusarium mycotoxins in cereals during food processing and methods for their detoxification. In: *Fusarium mycotoxins, taxonomy and pathogenicity*, Chelkowski, J. (ed.), 399 - 420. Elsevier Science Publishers B.V.
- PAULY, J. U.; BITTER-SUERMAN, D.; DOSE, K. (1988) Production and characterization of a monoclonal antibody to the trichothecene mycotoxin diacetoxyscirpenol. *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, 369, 487 - 492
- PERKOWSKI, J.; KIECANA, I.; SCHUMACHER, U.; MÜLLER, H.M.; CHELKOWSKI, J.; COLINSKI, P. (1996) Head blight and biosynthesis of Fusarium toxins in barley kernels field inoculated with *Fusarium culmorum*. *Eur. J. Plant Pathol.*, 102, 491 - 496
- PESTKA, J.J.; TAI, J.-H.; WITT, M.F.; DIXON, D.E.; FORSELL, J.H. (1987) Suppression of immune response in the B6C3F1 mouse after dietary exposure to the Fusarium mycotoxins deoxynivalenol (vomitoxin) and zearalenone. *Fd. Chem. Toxicol.*, 25, 297 - 304
- PESTKA, J. J.; MOORMAN, M.A.; WARNER, R.L. (1989) Dysregulation of IgA production and IgA nephropathy induced by the trichothecene vomitoxin. *Food Chem.Toxicol.*, 27, 361 - 368
- PESTKA, J.J.; BONDY, G.S. (1994) Immunotoxic effect of mykotoxins. In: MILLER, J.D.; TRENHOLM, H.L. *Mycotoxins in grain. Compounds other than Aflatoxin*. St. Paul: Eagan Press, 339 - 358
- PESTKA, J.J.; YAN, D.; KING, L.E. (1994) Flow cytometric analysis of the effects of in vitro exposure to vomitoxin (deoxynivalenol) on apoptosis in murine T, B and IgA+ cells. *Food Chem.Toxicol.*, 32, 1125 - 1136
- PETERS, C.A. (1972) Photochemistry of zearalenone and its derivatives. *J. Med. Chem.*, 15, 867
- PETTERSSON, H. (1993) Nivalenol production by *Fusarium poae*. *Mycotoxin Research*, 25, 855 - 858
- PETTERSSON, H. (1995) Nordic intercomparison of Trichothecene analysis, *Landbauforsch. Völk.* 157, 151 - 154

- PETTERSSON, H. (1998) Intercomparison of trichothecene analysis and feasibility to produce certified calibrants and reference material. Brüssel: European Commission, 164 S. (EU Report EN 18214, BCR Information)
- PFOHL-LESZKOWICZ, A.; CHEKIR-GHEDIRA, L.; BACHA, H. (1995) Genotoxicity of zearalenone, an estrogenic mycotoxin: DNS adduct formation in female mouse tissues. *Carcinogenesis*, 16, 2315 -2320
- PIETERS, M. N.; FIOLET, D. C.; BAARS, A. J. (1999) Deoxynivalenol, derivation of concentration limits in wheat and wheat containing food products. Bilthoven: Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM-report 388802-018)
- PIETERS, M.N.; FREIJER, J.; BAARS, B.J.; FIOLET, D.C.; VAN KLAVEREN, J.; SLOB, W. (2002) Risk assessment of deoxynivalenol in food: concentration limits, exposure and effects. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 504, 235 - 248
- PIETERS, M.N.; BAKKER, M.; SLOB, W. (2004) Reduced intake of deoxynivalenol in The Netherlands: a risk assessment update. *Toxicol. Lett.*, 153, 145 - 153
- PITT, J.I.; HOCKING, A.D. (1997) *Fungi and Food Spoilage*. 2. Aufl. Cambridge: Academic Press
- PLACINTA, C.M.; D'MELLO, J.B.F.; MACDONALD, A.M.C. (1999) A review of world contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 78, 21 - 37
- PLATTNER, R.D.; BENNETT, G.A. (1983) Rapid detection of *Fusarium* mycotoxins in grains by quadrupole mass spectrometry/mass spectrometry. *J. Assoc. Off. Anal.Chem.*, 66, 1470 - 1477
- PLATTNER, R.D. (1999) HPLC/MS analysis of *Fusarium* mycotoxins, fumonisins and deoxynivalenol. *Nat. Toxins.*, 7, 365 - 370
- POHLAND, A.E.; SCHULLER, P.L.; STEYN, P.S.; EGMOND, H. P. VAN (1982) Physicochemical data for some selected mycotoxins. *Pure appl.Chem.*, 54, 2219 - 2284
- PRELUSKY, D.B.; WARNER, R.M.; TRENHOLM, H.L. (1989) Sensitive analysis of the mycotoxin zearalenone and its metabolites in biological fluids by high-performance liquid chromatography alpha. *J. Chromatogr.*, 494, 267 - 277
- PRELUSKY, D.B.; HARTIN, K.E.; TRENHOLM, H.L. (1990) Distribution of deoxynivalenol in cerebral spinal fluid following administration to swine and sheep. *J. Environ. Sci. Health B*, 25, 395 - 413
- PRONK, M.E.J.; SCHOTHORST, R.C.; EGMOND, H.P. VAN (2002) Toxicology and occurrence of nivalenol, fusarenon X, diacetoxyscirpenol, neosolaniol and 3- and 15-acetyldeoxynivalenol: a review of six trichothecenes. Bilthoven: Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM-report 388802024/2002)
- PUNG, O.J.; LUSTER, M.I.; HAYES, H.T.; RADER, J. (1984) Influence of steroidal and nonsteroidal sex hormones on host resistance in mice: increased susceptibility to *Listeria monocytogenes* after exposure to estrogenic compounds. *Infect Immun.*, 46, 301 - 307
- PURI, B. P. (1970) Surface complexes on carbon. In: WALKER, P. L. (Hrsg.) *Chemistry and Physics of Carbon*, 6. Aufl. New York: Marcel Dekker
- RADOVÁ, Z.; HOLADOVÁ, K.; HAJŠLOVÁ, J. (1998) Comparison of two clean-up principles for determination of trichothecenes in grain extract. *J. Chromatogr. A*, 829, 259 - 267
- RAFAI, P.; TUBOLY, S. (1982) Effect of T-2 toxin on adrenocortical function and immunereponse in growing pigs. *Zbl. Vet. Med.*, B29, 558 - 565

- RAFAL, P.; TUBOLY, S.; BATA, A.; TILLY, P.; VANYI, A.; PAPP, Z.; JAKAB, L.; TURY, E. (1995) Effect of various levels of T-2 toxin in the immune system of growing pigs. *Vet. Rec.*, 136, 511 - 514
- RAFAL, P.; BATA, A.; VANYI, A.; PAPP, Z.; BRYDL, E.; JAKAB, L.; TUBOLY, S.; TURY, E. (1995a) Effect of various levels of T-2 toxin on the clinical status, performance and metabolism of growing pigs. *Vet. Rec.*, 136, 485 - 489.
- RAFAL, P.; TUBOLY, S.; BATA, A.; TILLY, P.; VANYI, A.; PAPP, Z.; JAKAB, L.; TURY, E. (1995b) Effect of various levels of T-2 toxin in the immune system of growing pigs. *Vet. Rec.*, 136, 511 - 514
- RAJAKYLÄ, E.; LAASASENAHO, K.; SAKKERS, P.J. (1987) Determination of mycotoxins in grain by high-performance liquid chromatography and thermospray liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.*, 384, 391 - 402
- RANFFT, K.; GERSTL, R.; MAYER, G. (1990) Determination and occurrence of zearalenone in cereals and mixed feeds. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 191, 449 - 453
- RASMUSSEN, P.H.; GHORBANI, F.; BERG, T. (2003) Deoxynivalenol and other Fusarium toxins in wheat and rye flours on the Danish market. *Food Addit. Contam.*, 20, 396 - 404
- RAZZAZI-FAZELI, E.; BÖHM, J.; LUF, W. (1999) Determination of nivalenol and deoxynivalenol in wheat using liquid chromatography-mass spectrometry with negative ion atmospheric pressure chemical ionisation. *J. Chromatogr. A.*, 854, 45 - 55
- RAZZAZI-FAZELI, E.; RABUS, B.; CECON, B.; BÖHM, J. (2002) Simultaneous quantification of A-trichothecene mycotoxins in grains using liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.*, 968, 129 - 142
- RAZZAZI-FAZELI, E.; BÖHM, J.; JARUKAMJORN, K.; ZENTEK, J. (2003) Simultaneous determination of major B-trichothecenes and the de-epoxy-metabolite of deoxynivalenol in pig urine and maize using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.*, 796, 21 - 33
- R-BIOPHARM GMBH (Hrsg) Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Zearalenon, Ridascreen ZEA Art Nr R R5502, r-Biopharm GmbH, Landwehrstr. 54, 64293 Darmstadt, Deutschland
- R-BIOPHARM GMBH (Hrsg) Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Deoxynivalenol, Ridascreen DON Art Nr R R5906, r-Biopharm GmbH, Landwehrstr. 54, 64293 Darmstadt, Deutschland
- R-BIOPHARM GMBH, Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von T-2 Toxin, Ridascreen T-2 Toxin Art Nr R 3801, r-Biopharm GmbH, Landwehrstr. 54, 64293 Darmstadt, Deutschland
- RIO, B.; LAUTRAITE, S.; PARENT-MASSIN, D. (1997) In vitro toxicity of trichothecenes on human erythroblastic progenitors. *Hum. Exp. Toxicol.*, 16, 673 - 679
- RIZZO, A.; ATROSHI, R.; HIRVI, T.; SALONIEMI, H. (1992) The hemolytic activity of deoxynivalenol and T-2 toxin. *Nat. Toxins*, 1, 106 - 110
- RIZZO, A.; ATROSHI, F.; AHOTUPA, M.; SANKARI, S.; ELOVAARA, E. (1994) Protective effect of antioxidants against free radical-mediated lipid peroxidation induced by DON or T-2 toxin. *J. Vet. Med. A.*, 41, 81 - 90
- ROACH, J.A.; SPHON, J.A.; EASTERLING, J.A.; CALVEY, E.M. (1989) Capillary supercritical fluid chromatography/negative ion chemical ionization mass spectrometry of trichothecenes. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, 18, 64 - 70
- RODERIKS, J.V.; HASSELTINE, C.W.; MELHAM, M.A. (1977) *Mycotoxins in Human and Animal Health*. Park Forest South: Pathotox Publishers

- ROMER, T.R.; GREAVES, D.E.; GIBSON, G.E. (1981) (6th AOAC Annual Spring Workshop Ottawa 12. – 14.05.1981)
- ROMER, T.R. (1986) Use of small charcoal/alumina cleanup columns in determination of trichothecene mycotoxins in foods and feeds. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 69, 699 - 703
- ROSENBERG, E.; KRŠKA, R.; WISSIACK, R.; KMETOV, V.; JOSEPHS, R.; RAZZAZI-FAZELI, E.; GRASSERBAUER, M. (1998) High-performance liquid chromatography-atmospheric-pressure chemical ionization mass spectrometry as a new tool for the determination of the mycotoxin zearalenone in food and feed. *J. Chromatogr. A*, 819, 277 - 288
- ROSENSTEIN, Y.; LAFARGE-FRAYSSINET, C. (1983) Inhibitory effect of Fusarium T-2 toxin on lymphoid DNS and protein synthesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 70, 283 - 288
- ROTTER, R.G.; THOMPSON, B.K.; TRENHOLM, H.L.; PRELUSKY, D.B.; HARTIN, K.E.; MILLER, J.D. (1992) A preliminary examination of potential interactions between deoxynivalenol (DON) and other selected Fusarium metabolites in growing pigs. *Can. J. Anim. Sci.*, 72, 107 - 116
- ROTTER, B.A.; THOMPSON, B.K.; LESSARD, M.; TRENHOLM, H.L.; TRYPHONAS, H. (1994) Influence of low-level exposure to Fusarium mycotoxins on selected immunological and hematological parameters in young swine. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 23, 117 - 124
- ROTTER, B.A.; PRELUSKY, D.B.; PESTKA, J.J. (1996) Toxicology of desoxynivalenol (Vomitoxin). *J. Toxicol. Environ., Health*, 48, 1 - 34
- ROUSSEUX, C.G.; SCHIEFER, H.B.; HANCOCK, D.S. (1986) Reproductive and teratological effects of continuous low-level dietary T-2 toxin in female CD-1 mice for two generations. *J. Appl. Toxicol.*, 6, 179 - 184
- ROUSSEUX, C.G.; SCHIEFER, H.B. (1987) Maternal toxicity, embryoletality and abnormal fetal development in CD-1 mice following one oral dose of T-2 toxin. *J. Appl. Toxicol.*, 7, 281 - 288
- RUKMINI, C.; PRASAD, J.S.; RAO, K. (1980) Effects of feeding T-2 toxin to rats and monkeys. *Food Cosmet. Toxicol.*, 18, 267 - 269
- RUPRICH, J.; OSTRY, V. (1995) Determination of the mycotoxin deoxynivalenol in beer by commercial elisa tests and estimation of the exposure dose from beer for the population in the Czech Republic. *Cent. Eur. J. Public Health*, 3, 224 - 229
- RYU, D.; HANNA, M.A.; BULLERMAN, L.B. (1999) Stability of zearalenone during extrusion of corn grits. *J. Food Prot.*, 62, 1482 - 1484
- RYU, D.; HANNA, M.A.; ESKRIDGE, K.M.; BULLERMAN, L.B. (2003) Heat stability of zearalenone in an aqueous buffered model system. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 1746 - 1748
- RYU, J.C.; OHTSUBO, K.; IZURNIYARNA, N.; NAKAMURA, K.; TANAKA, T.; YAMARNURA, H.; UENO Y. (1988) The acute and chronic toxicities of nivalenol in mice. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 11, 38 - 47
- RYU, J.C.; OHTSUBO, K.; IZUMIYARNA, N.; MORI, M.; TANAKA, T.; UENO, Y. (1987) Effects of nivalenol on the bone marrow in mice. *J. Toxicol. Sci.*, 12, 11 - 21
- SÀENZ DE RODRIGUEZ, C.A. (1984) Environmental hormone contamination in Puerto Rico. *New Engl. J. Medicine*, 310, 1741 - 174
- SÀENZ DE RODRIGUEZ, C.A.; BONGIOVANNI, A.M.; CONDE DE BORREGO, L. (1985) An epidemic of precocious development in Puerto Rican children. *J. of Pediatrics*, 107, 393 - 396
- SAMAR, M.M.; NEIRA, M.S.; RESNIK, S.L.; PACIN, A. (2001) Effect of fermentation on naturally occurring deoxynivalenol (DON) in Argentinean bread processing technology. *Food Addit. Contam.*, 18, 1004 - 1010

- SCHAAFSMA, A.W.; MILLER, J.D.; SAVARD, M.E.; EWING R.J. (1993) Ear rot development and mycotoxin production in corn in relation to inoculation method, corn hybrid and species of *Fusarium*. *Can. J. Plant Pathol.*, 15, 185 - 192
- SCHIEFER, B.B.; ROUSSAUX, C.G.; HANDCOCK, D.S.; BLAKELY, B.R. (1987) Effects of low-level longterm oral exposure to T-2 toxin in CD-1 mice. *Food Chem. Toxicol.*, 25, 593 - 601
- SCHLATTER, J. (2004) Toxicity data relevant for hazard characterization. *Toxicol. Lett.*, 153, 83 - 89
- SCHNEIDER, L.; PICHLER, H.; KRŠKA, R. (2000) An enzyme linked immunoassay for the determination of deoxynivalenol in wheat based on chicken egg yolk antibodies. *Fresen. J. Anal. Chem.*, 367, 98 - 100
- SCHNEIDER, E.; CURTUI, V.; SEIDLER, C.; DIETRICH, R.; USLEBER, E.; MÄRTLBAUER, E. (2004) Rapid methods for deoxynivalenol and other trichothecenes. *Toxicol. Lett.*, 153, 113 - 121
- SCHOENTAL, R.; JOFFE, A.Z.; YAGEN, B. (1979) Cardiovascular lesions and various tumors found in rats given T-2 toxin, a trichothecene metabolite of *Fusarium*. *Cancer Res.*, 39, 2179 - 2189
- SCHOLLENBERGER, M.; JARA, H.T.; SUCHY, S.; DROCHNER, W.; MÜLLER, H.M. (2002) *Fusarium* toxins in wheat flour collected in an area in southwest Germany. *Int. J. Food Microbiol.*, 72, 85 - 89
- SCHOLLENBERGER, M.; LAUBER, U.; JARA, H.T.; SUCHY, S.; DROCHNER, W.; MÜLLER, H.M. (1998) Determination of eight trichothecenes by gas chromatography-mass spectrometry after sample clean-up by a two-stage solid-phase extraction. *J. Chromatogr. A*, 815, 123 - 132
- SCHOLLENBERGER, M.; SUCHY, S.; JARA, H.T.; DROCHNER, W.; MÜLLER, H.M. (1999) A survey of *Fusarium* toxins in cereal-based foods marketed in an area of southwest Germany. *Mycopathologia*, 147, 49 - 57
- SCHOTHORST, R.C.; JEKEL, A.A. (2001) Determination of trichothecenes in wheat by capillary gas chromatography with flame ionisation detection. *Food Chem.*, 73, 111 - 117
- SCHUMACHER, R.; KRŠKA, R.; WEINGÄRTNER, J.; GRASSERBAUER, M. (1997) Interlaboratory comparison study for the determination of the *Fusarium* mycotoxins deoxynivalenol in wheat and zearalenone in maize using different methods. *Fresen. J. Anal. Chem.*, 359, 510 - 515
- SCHUHMACHER, R.; KRŠKA, R.; GRASSERBAUER, M.; EDINGER, W.; LEW, H. (1998) Immunoaffinity columns versus conventional clean-up: a method-comparison study for the determination of zearalenone in corn. *Fresen. J. Anal. Chem.*, 360, 241 - 245
- SCHUHMACHER, R.; BERTHILLER, F.; BUTTINGER, G.; KRŠKA, R. (2005) Quantitative Bestimmung von A-Trichothecenen, B-Trichothecenen und Zearalenon in Getreide mittels LC/MS/MS. *ALVA Mitteilungen*, 2, 34 - 37
- SCHWADORF, K.; MÜLLER, H.M. (1991) Determination of nivalenol, deoxynivalenol, 3-alpha-acetyl-deoxynivalenol, and 15-alpha-acetyl-deoxynivalenol in naturally contaminated cereals by gas chromatography – Electron capture detection (ECD) in comparison with ion-trap detection (ITD). *Chromatographia*, 32, 137 - 142
- SCHWADORF, K.; MÜLLER, H.M. (1992) Determination of alpha- and beta-zearalenol and zearalenone in cereals by gas chromatography with ion-trap detection. *J. Chromatogr.*, 595, 259 - 267

- SCOOP (2003) Collection of occurrence data of Fusarium toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU Member States. Brüssel: Directorate – General Health and Consumer Protection, 606 S. (Reports on tasks for scientific cooperation, Report of experts participating in Task 3.2.10, April 2003)
- SCOTT, P.M.; PANALAKS, T.; KANHERE, S.; MILES, W.F. (1978) Determination of zearalenone in cornflakes and other corn-based foods by thin layer chromatography, high pressure liquid chromatography, and gas-liquid chromatography/high resolution mass spectrometry. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 61, 593 - 600
- SCOTT, P.M. (1982) Assessment of quantitative methods for determination of trichothecenes in grains and grain products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 65, 876 - 883
- SCOTT, P.M.; LAWRENCE, G.A. (1988) Liquid chromatographic determination of zearalenone and alpha- and beta-zearalenols in milk. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 71, 1176 - 1179
- SCOTT, P.M.; LOMBAERT, G.A.; Pellaers, P.; BACLER, S.; KANHERE, S.R.; SUN, W.F.; LAU, P.Y.; WEBER, D. (1989) Application of capillary gas chromatography to a survey of wheat for five trichothecenes. *Food Addit. Contam.*, 6, 489 - 500
- SCOTT, P.M. (1990). Trichothecenes in grains. *The American Association of Cereal Chemists, Cereal Foods World.*, 35, 661 - 666.
- SCOTT, P.M.; KANHERE, S.R.; WEBER, D. (1993) Analysis of Canadian and imported beers for Fusarium mycotoxins by gas chromatography-mass spectrometry. *Food Addit. Contam.*, 10, 381 - 389
- SCOTT, P.M. (1996) Mycotoxins transmitted into beer from contaminated grains during brewing. *J. AOAC Int.*, 79, 875 - 882
- SCOTT, P.M. (1997) Multi-year monitoring of Canadian grains and grain-based foods for trichothecenes and zearalenone. *Food Addit. Contam.*, 14, 333 - 339
- SCUDAMORE, K. A. (2004) Occurrence of Mycotoxins in UK Food Commodities 247 - 252. In: Logrieco, A.; VISCONTI, A. (ed.) *An overview on Toxicogenic Fungi and Mycotoxins in Europe*. Dordrecht: Kluwer
- SENTI, F.R. (1979) Global perspectives on mycotoxins. In: *Perspective on mycotoxins*, FAO, Rome, 15 - 120
- SHIFRIN, V.L.; ANDERSON, P. (1999) Trichothecene mycotoxins trigger ribotoxic stress response that activates c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase and induces apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 274, 13985 - 13992
- SHINOZUKA, J.; SUZUKI, M.; NOGUCHI, N.; SUGIMOTO, T.; UETSUKA, K.; NAKAYAMA, H.; DOI, K. (1998) T-2 toxin-induced apoptosis in hematopoietic tissues of mice. *Toxicol. Pathol.*, 26, 674 - 681
- SHIPCHANDLER, M.T. (1975) Chemistry of Zearalenone and some of its derivatives. *Heterocycles*, 3, 471 - 520
- SHOTWELL, O.L.; GOULDEN, M.L.; BENNETT, G.A.; PLATTNER, R.D.; HESSELTINE, C.W. (1977) Survey of 1975 wheat and soybeans for aflatoxin, zearalenone, and ochratoxin. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 60, 778 - 783
- SILVA, C.M.; VARGAS, E.A. (2001) A survey of zearalenone in corn using Romer Mycosep 224 column and high performance liquid chromatography. *Food Addit. Contam.*, 18, 39 - 45
- SINHA, R.C.; SAVARD, M.E.; LAU, R. (1995) Production of monoclonal antibodies for the specific detection of deoxynivalenol and 15-acetyldeoxynivalenol by ELISA. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 1740 - 1744

- SIRKKA, U.; NIEMINEN, S.A.; YLITALO, P. (1992) Acute neurobehavioural toxicity of trichothecene T-2 toxin in the rat. *Pharmacol. Toxicol.*, 70, 111 - 114
- Smith, B.J., Holladay, S.D.; Blaylock, B.L. (1994) Hematopoietic alterations after exposure to T-2 mycotoxin. *Toxicon*, 32, 1115 - 1123
- SMITH, D. R.; WHITE, D. G. (1988) Diseases of corn. In: SPRAGUE, G. F.; DUDLEY, J. W. (Hrsg.) *Corn and Corn Improvement*, 3. Aufl., Madison: American Society of Agronomy, 687 - 766
- SPANJER, M. (2003) pers. Mitt. Single run LC-MS/MS analysis of mycotoxins subject to actual and upcoming EU legislation in one sample extract. 2. World Mycotoxin Forum. (Noordwijk aan Zee 17. – 18.02.2003)
- STANFORD, G.K.; HOOD, R.D.; HAYES, A.M. (1975) Effect of prenatal administration of T-2 toxin to mice. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 10, 743 - 746
- STEINMEYER, S.; TIEBACH, R.; WEBER, R. (1985) Gaschromatographische Untersuchung von Cerealien auf Deoxynivalenol und Nivalenol nach Derivatisierung zu den Heptafluorbutyraten. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 181, 198 - 199
- STOB, M.; BALDWIN, R.S.; TUIE, J.; ANDREWS, F.N.; GILLETTE, K.G. (1962) Isolation of an anabolic uterotrophic compound from corn infested with *Gibberella zeae*. *Nature*, 196, 1318
- SUTY, A.; MAULER-MACHNIK, A.; COURBON, R. (1996) New findings on the epidemiology of *Fusarium* ear blight on wheat and its control with tebuconazole. In: *Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference 1996 (Pests and Diseases Farnham)*
- SWANSON, S. P.; CORLEY, R.A. (1989) The distribution, metabolism and excretion of trichothecene mycotoxins. In: BEASLEY, V.R. (Hrsg.) *Trichothecene Mycotoxicosis: Pathophysiological effects*, Vol.1, Boca Raton: CRC Press, 32 - 33
- SYDENHAM, E.W.; THIEL, P.G.; VLEGGAR, R. (1996) Physicochemical data for some selected *Fusarium* toxins. *J. AOAC Int.*, 79, 1365 - 1379
- SYLVIA, V.L.; PHILLIPS, T.D.; CLEMENT, B.A.; GREEN, J.L.; KUBENA, L.F.; HEIDELBAUGH, N.D. (1986) Determination of deoxynivalenol (vomitoxin) by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr.*, 362, 79 - 85
- SZUETZ, P.; MESTERHAZY, A.; FALKAY, G.Y.; BARTOK, T. (1997) Early telearche symptoms in children and their relations to zearalenon contamination in foodstuffs. *Cereals Res. Com.*, 25, 429 - 436
- TAKEDA, Y.; ISOHATA, E.; AMANO, R.; UCHIYAMA, M. (1979) Simultaneous extraction and fractionation and thin layer chromatographic determination of 14 mycotoxins in grains. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 62, 563 - 568
- TANAKA, T.; HASEGAWA, A.; MATSUKI, Y.; LEE, U.S.; UENO, Y. (1985) Rapid and sensitive determination of zearalenone in cereals by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr.*, 328, 271 - 278
- TANAKA, T.; HASEGAWA, A.; YAMAMOTO, S.; MATSUKI, Y.; UENO, Y. (1986) Residues of *Fusarium* mycotoxins, nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone, in wheat and processed food after milling and baking. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, 27, 653 - 655
- TANAKA, T.; HASEGAWA, A.; YAMAMOTO, S.; LEE, U.S.; SUGIURA, Y.; UENO, Y. (1988) World-wide contamination of cereals by the *Fusarium* mycotoxins, nivalenol, deoxynivalenol, and zearalenone. 1. Survey of 19 countries. *J. Agric. Food Chem.*, 36, 979 - 983
- TANAKA, T.; HASEGAWA, A.; YAMAMOTO, S.; SUGIURA, Y.; UENO, Y. (1988) A case report on a minor contamination of nivalenol in cereals harvested in Canada. *Mycopathologia*, 101, 157 - 160

- TANAKA, T.; YONEDA, A.; INOUE, S.; SUGIURA, Y.; UENO, Y. (2000) Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereals by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 882, 23 - 28
- TAYLOR, M.J.; PANG, V.F.; BEASLEY, V.R. (1989) The immunotoxicity of Trichothecene mycotoxins. In: BEASLEY, V.R. (Hrsg.) *Trichothecene Mycotoxicosis: Pathophysiological effects*, Vol. 2, Boca Raton: CRC Press, 1 - 37
- TAYLOR, M.J.; SMART, R.A.; SHARMA, R.P. (1989) Relationship of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis with chemically induced immunomodulation. I. Stress-like response after exposure to T-2 toxin. *Toxicology*, 56, 179 - 195
- TESHIMA, R.; KAWASE, M.; TANAKA, T.; HIRAI K.; SATO, M.; SAWADA, M.; IKEBUCHI, H.; ICHINOE, M.; TERAOT, T. (1990) Production and Characterization of a Specific Monoclonal Antibody against Mycotoxin Zearalenone. *J. Agric. Food Chem.*, 38, 1618 - 1622
- THIMM, N.; HANDL, J.; BINDER, E.M. (2001) HPLC-MS-Method for A-Trichothecenes. *Mycotoxin Res.*, 17, 206 - 209
- THOMPSON, W.L.; WANNEMACHER, R.W. (1986) Structure-function relationships of 12,13- epoxytrichothecene mycotoxins in cell culture: comparison to whole animal lethality. *Toxicon*, 24, 985 - 994
- THOMPSON, W.L.; WANNEMACHER, R.W. (1990) In vivo effects of T-2 mycotoxin on synthesis of proteins and DNS in rat tissues. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 105, 483 - 491
- THOMPSON, M.; LOWTHIAN, P.J. (1995) A Horwitz-like function describes precision in a proficiency test. *Analyst*, 120, 271 - 272
- THOMPSON, M.; LOWTHIAN, P.J. (1997) The Horwitz function revisited. *J. AOAC Int.*, 80, 676 - 679
- THOMPSON, M.; LOWTHIAN, P.J. (2000) Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing. *Analyst*, 125, 385 - 386
- THURMAN, E. M., MILLS M. S. (1998) *Solid-Phase Extraction: Principles and Practice*. 1. Aufl. New York: Wiley
- THUVANDER, A.; WIKMAN, C.; GADHASSON, I. (1999) In vitro exposure of human lymphocytes to trichothecenes: Individual variation in sensitivity and effects of combined exposure on lymphocyte function. *Fd. Chem. Toxicol.*, 37, 639 - 648
- TIEBACH, R.; BLAAS, W.; KELLERT, M.; STEINMEYER, S.; WEBER, R. (1985) Confirmation of nivalenol and deoxynivalenol by on-line liquid chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-mass spectrometry. Comparison of methods. *J. Chromatogr.*, 318, 103 - 111
- TIEBACH, R.; BLAAS, W. (1988) Direct coupling of a gas chromatography to an ion trap detector. *J. Chromatogr.*, 454, 372 - 381
- TIMBRELL, J.A. (1991) *Principles of Biochemical Toxicology*. London: Taylor & Francis
- TOMASZEWSKI, J.; MITURSKI, R.; SEMCZUK, A.; KOTARSKI, J.; JAKOWICKI, J. (1998) Tissue zearalenone concentration in normal, hyperplastic and neoplastic human endometrium. *Ginekol Pol.*, 69, 363 - 366
- TRENHOLM, H.L.; WARNER, R.M.; PRELUSKY, D.B. (1985) Assessment of extraction procedures in the analysis of naturally contaminated grain products for deoxynivalenol (vomitoxin). *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 68, 645 - 649
- TRENHOLM, H.L., FRIEND, D.W., HAMILTON, R.M.G., PRELUSKY, D.B.; FOSTER, B.C. (1989) Lethal toxicity and nonspecific effects. In: BEASLEY, V.R. (Hrsg.) *Trichothecene Mycotoxicosis: Pathophysiological effects*, Vol. 1, Boca Raton: CRC Press, 107 - 141

- TRIGO-STOCKLI, D.M.; DEYOE, C.W.; SATUMBAGA, R.F.; PEDERSEN, J.R. (1996) Distribution of Deoxynivalenol and Zearalenone in Milled Fractions of Wheat. *Cereal Chem.*, 73, 388 - 391
- TRUCKSESS, M.W.; NESHEIM, S.; EPPLEY, R.M. (1984) Thin layer chromatographic determination of deoxynivalenol in wheat and corn. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 67, 40 - 43.
- TRUCKSESS, M.W.; READY, D.W.; PENDER, M.K.; LIGMOND, C.A.; WOOD, G.E.; PAGE, S.W. (1996) Determination and survey of deoxynivalenol in white flour, whole wheat flour, and bran. *J. AOAC Int.*, 79, 883 - 887
- TRYPHONAS, H.; IVERSON, F.; YING SO, E.A.; MGGUIRE, P.F.; O'GRADY, L.; CLAYSON, D.B.; SCOTT, P.M. (1986) Effects of deoxynivalenol (vomitoxin) on the humoral and cellular immunity of mice. *Toxicol. Lett.*, 30, 137 - 150
- TSENG, T.C.; TU, J.C.; SOO, L.C. (1995) Natural occurrence of mycotoxins in *Fusarium* infected beans. *Microbios.*, 84, 21 - 28
- TSUDA, S.; KOSAKA, Y.; MURAKAMI, M.; MATSUO, H.; MATSUSAKA, N.; TANIGUCHI, K.; SASAKI, Y.F. (1998) Detection of nivalenol genotoxicity in cultured cells and multiple mouse organs by the alkaline single-cell gel electrophoresis assay. *Mutat. Res.*, 415, 191 - 200
- TUTELVAN, V.A.; KRAVCHENKO, L.V.; KUZMINA, E.E.; AVRENIEVA, L.I.; KUMPULAINEN, L.T. (1996) Dietary selenium protects against acute toxicity of T-2 toxin in rats. *Food Addit. Cont.*, 7, 821 - 827
- UENO, Y. (1980) Trichothecene mycotoxins mycology, chemistry and toxicology. In: DRAPER, H.H. (Hrsg.) *Advances in nutritional Research*. New York: Plenum Press, 301 - 353
- UENO, Y. (1985) The toxicology of mycotoxins. *Crit. Rev.Toxicol.*, 14, 99 - 132
- USLEBER, E.; MÄRTLBAUER, E.; DIETRICH, R.; TERPLAN, G. (1991) Direct enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of the 8-ketotrichothecene mycotoxins deoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol, and 15-acetyldeoxynivalenol in buffer solutions. *J. Agr. Food Chem.*, 39, 2091 - 2095
- USLEBER, E.; RENZ, V.; MÄRTLBAUER, E.; TERPLAN, G. (1992) Studies on the application of enzyme immunoassays for the *Fusarium* mycotoxins Deoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol and Zearalenone. *J. Vet. Med. B*, 39, 617 - 627
- USLEBER, E.; SCHNEIDER, E.; MÄRTLBAUER, E. (1998) Untersuchungen zum Vorkommen von Desoxynivalenol, Zearalenon und Fumonisin in Speisegetreide. *Proceedings 20. Mykotoxin Workshop, Detmold*, 131 - 135
- USLEBER, E.; CURTUI, V. SEIDLER, C. (2003a) Bestimmung von Zearalenon mittels dc-ELISA. Persönliche Mitteilung.
- USLEBER, E.; CURTUI, V. SEIDLER, C. (2003b) Bestimmung von Deoxynivalenol mittels dab-ELISA. Persönliche Mitteilung.
- Verordnung zur Änderung der Mykotoxin-Höchstmengenverordnung und der Diätverordnung vom 04.02.2004 BGBl.I 2004, 151.
- Verordnung über diätetische Lebensmittel (Diätverordnung) vom 28.04.2005 BGBl. I, 1161.
- Verordnung zur Änderung der Nährwert-Kennzeichnungsverordnung vom 5.5.1999, BGBl I, 924
- VELAZCO, V.; FAIFER, G.C.; GODOY, H.M. (1996) Differential effects of T-2 toxin on bone marrow and spleen erythropoiesis in mice. *Fd. Chem. Toxicol.*, 34, 371 - 375.

- VESONDER, R.F.; GOLINSKI, P.; PLATTNER, R.; ZIETKIEWICZ, D.L. (1991) Mycotoxin formation by different geographic isolates of *Fusarium crookwellense*. *Mycopathologia*, 113, 11-14.
- VICAM (Hrsg.), DONtest HPLC, VICAM, 313 Pleasant Street, Watertown MA, 02472 USA
- VICAM (Hrsg.), DONtest TAG, VICAM, 313 Pleasant Street, Watertown MA, 02472 USA
- VICAM (Hrsg.), T-2 Toxintest HPLC, VICAM, 313 Pleasant Street, Watertown MA, 02472 USA
- VICAM (Hrsg.), T-2 Toxintest TAG, VICAM, 313 Pleasant Street, Watertown MA, 02472 USA
- VICAM (Hrsg.), ZEANtest HPLC, VICAM, 313 Pleasant Street, Watertown MA, 02472 USA
- VICAM (Hrsg.), ZEAtest TAG, VICAM, 313 Pleasant Street, Watertown MA, 02472 USA
- VISCONTI, A.; HAIDUKOWSKI, E. M.; PASCALE, M.; SILVESTRI, M. (2004) Reduction of deoxynivalenol during durum wheat processing and spaghetti cooking. *Toxicol. Lett.*, 153, 181 - 189
- VISCONTI, A.; PASCALE, M. (1998) Determination of zearalenone in corn by means of immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A*, 815, 133 - 140
- VOYKSNER, R.D.; HAGLER, W. M.; SWANSON, S.P. (1987) Analysis of some metabolites of T-2 toxin, diacetoxyscirpenol and deoxynivalenol by thermospray high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, 394, 183 - 199
- WALKER, F.; MEIER, B. (1998) Determination of the *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol, and 15-O-acetyl-4-deoxynivalenol in contaminated whole wheat flour by liquid chromatography with diode array detection and gas chromatography with electron capture detection. *J. AOAC Int.*, 81, 741 - 748
- WALLACE, C.; RAJAMAHENDRAN, R. (1993) Effect of zearalenone on in-vitro early development of mouse embryos and on the maturation of bovine oocytes. *J. Anim. Sci.*, 71, 223
- WANG, L.; FITZPATRICK, D.W.; WILSON, J.R. (1993) Effect of dietary T-2 toxin on biogenic monoamines in discrete areas of the rat brain. *Food Chem. Toxicol.*, 31, 191 - 197
- WANG, Z.G.; FENG, J.N.; TONG, Z. (1993) Human toxicosis caused by moldy rice contaminated with *Fusarium* and T-2 toxin. *Biomed. Environ. Sci.*, 6, 65 - 70
- WARE, G.M.; THORPE, C.W. (1978) Determination of zearalenone in corn by high pressure liquid chromatography and fluorescence detection. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 61, 1058 - 1062
- WARE, G.M.; FRANCIS, O.J.; CARMAN, A.S.; KUAN, S.S. (1986) Gas chromatographic determination of deoxynivalenol in wheat with electron capture detection: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 69, 899 - 901
- WEAVER, G.A.; KURTZ, H.J.; BARESV, F.Y.; CHI, M.S.; MIROCHA, C.J.; BEHRENS, J.C.; ROBISON, T.S. (1978) Acute and chronic toxicity of T-2 mycotoxin in swine. *Vet. Rec.*, 103, 531 - 535
- WEI, R.-D.; CHU, F.S. (1986) Instability of Some Trichothecenes in Methanol. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 69, 902
- WEINGÄRTNER, J.; KRŠKA, R.; PRAZNIK, W.; GRASSERBAUER, M.; LEW, H. (1997) Use of Mycosep multifunctional clean-up columns for the determination of trichothecenes in wheat by electron-capture gas-chromatography. *Fresen. J. Anal. Chem.*, 357, 1206 - 1210

- WEISS, R.; FREUDENSCHUSS, M.; KRŠKA, R.; MIZAIKOFF, B. (2003) Improving methods of analysis for mycotoxins: molecularly imprinted polymers for deoxynivalenol and zearalenone. *Food Addit. Contam.*, 20, 386 - 395
- WHITAKER, T.B.; DICKENS, J.W.; MONROE, R.J. (1974) Variability of aflatoxin test results. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 51, 214
- WHITAKER, T.B.; WHITTEN, M.E. (1977) Evaluation of cottonseed aflatoxin testing programs. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 54, 436 - 444
- WHITAKER, T.B.; DICKENS, J.W. (1983) Evaluation of a testing program for aflatoxin in corn. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 66, 1055 - 1058
- WHITAKER, T.B.; GIESBRECHT, F.G.; WU, J.; HAGLER, W.M.; DOWELL, F.E. (1994) Predicting the distribution of aflatoxin test results from farmers' stock peanuts. *J. AOAC Int.*, 77, 659 - 666
- WHITAKER, T.B.; HAGLER, W.M.; GIESBRECHT, F.G.; JOHANSSON, A.S. (2000) Sampling, Sample Preparation, and Analytical Variability Associated with Testing Wheat for Deoxynivalenol. *J. AOAC Int.*, 83, 1285 - 1292
- WHITAKER, T.B.; HAGLER, W.M. JR.; GIESBRECHT, F.G.; JOHANSSON, A.S. (2002) Sampling wheat for deoxynivalenol. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 504, 73 - 83
- WHITAKER, T.B.; WHITTEN, M.E. (1976) Variability associated with testing cottonseed for aflatoxin. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 53, 502 - 505
- WORLD HEALTH ORGANISATION (1990). Selected mycotoxins: Ochratoxins, Trichothecenes, Ergot. Geneva: WHO 119 S. (Environmental Health Criteria 105)
- WIDESTRAND, J.; PETTERSSON, H. (2001) Effect of time, temperature and solvent on the stability of T-2 toxin, HT-2 toxin, deoxynivalenol and nivalenol calibrants. *Food Add. Contam.*, 18, 987 - 992
- WIERSMA, J.V.; PETERS, E.L.; HANSON, M.A.; BOUVETTE, R.J.; BUSCH, R.H. (1996) Fusarium head blight in hard red spring wheat: cultivar responses to natural epidemics. *Agron. J.*, 88, 223 - 230
- WILLIAMS, K.C.; BLANEY, B.J. (1994) Effect of the mycotoxins nivalenol and zearalenone in maize naturally infected with *Fusarium graminearum* on the performance of growing and pregnant pigs. *Austr. J. Agricult. Res.*, 45, 1265 - 1279
- WILSON, C.A.; EVERARD, D.M.; SCHOENTAL, R. (1982) Blood pressure changes and cardiovascular lesions found in rats given T-2 toxin, a trichothecene secondary metabolite of certain microfungi. *Toxicol. Lett.*, 10, 339 - 341
- WOLFF, J. (2003) pers. Mitt. 25. Mykotoxin Workshop. (Giessen 19. - 21.05.2003)
- WOLF-HALL, C.E.; HANNA, M.A.; BULLERMAN, L.B. (1999) Stability of deoxynivalenol in heat-treated foods. *J. Food Prot.*, 62, 962 - 964
- YABE, T.; HASHIMOTA, H.; SEKIJIMA, M.; DDEGAWA, M.; HASHIMOTO, Y.; TASHIRO, F.; UENO, Y. (1993) Effects of nivalenol on hepatic drug-metabolizing activity in rats. *Food Chem. Toxicol.*, 31, 573 - 581
- YAGEN, B.; BIALER, M. (1993) Metabolism and pharmacokinetics of T-2 toxin and related trichothecenes. *Drug Metabol. Rev.*, 25, 281 - 323
- YAMAMURA, H.; KOBAYASHI, T.; RYU, L.C.; UENO, Y. (1989) Subchronic feeding studies with nivalenol in C57BL/6 mice. *Food. Chem. Toxicol.*, 27, 585 - 590
- YAMASHITA, A.; YOSHIZAWA, T.; AIURA, Y.; SANCHEZ, P.C.; DIZON, E.I.; ARIM, R.H.; SARDJONO C.T. (1995) Fusarium mycotoxins (fumonisins, nivalenol, and zearalenone) and aflatoxins in corn from Southeast Asia. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 59, 1804 - 1807

- YANG, G.-H.; JARVIS, B.B.; CHUNG, Y.-J.; PESTKA, J.J. (2000) Apoptosis induction by satratoxins and other trichothecene mycotoxins: Relationship to ERK, p38 MAPK, and SAPK/JNK activation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 164, 149 - 160
- YANG, R.T. (2003) *Adsorbents – Fundamentals and Applications*. 1. Aufl. New York: Wiley
- YANG, S.; XIA, O.J. (1988) Papiloma of the forestomach induced by Fusarium T-2 toxin. *Chin. J. Oncol.*, 10, 339 - 341
- YAROM, R.; YAGEN, B. (1986) T-2 toxin effect on the ultrastructure of myocardial microvasculature. *J. Exp. Path.*, 67, 55 - 63
- YAROM, R.; BERGMANN, F.; YAGEN B. (1987) Cutaneous injury by topical T-2 toxin: involvement of microvessels and mast cells. *Toxicol.*, 25, 167 - 174
- YAROM, R.; SHERMAN, Y.; BERGMANN, F.; SINTOV, A.; BERMAN, L.D. (1987) T-2 toxin effect on rat aorta: Cellular changes in vivo and growth of smooth muscle cells in vitro. *Exp. Mol. Pathol.*, 47, 143 - 153
- YOSHIZAWA, T.; MIROCHA, C.J.; BEHRENS, J.C.; SWANSON, S.P. (1981) Metabolic fate of T-2 toxin in a lactating cow. *Food Cosmet. Toxicol.*, 19, 31 - 39
- YOSHIZAWA, T.; TAKEDA, H.; OHIM, T. (1983) Structure of a novel metabolite from deoxynivalenol, a trichothecene mycotoxin, in animals. *Agric. Biol. Chem.*, 47, 2133 - 2135
- YOSHIZAWA, T. (1986) *Methods in Molecular Biology*, 157, In: Trucksess, M. W.; POHLAND, A. E. (Hrsg.) *Mycotoxin Protocols*. Totowa: HTHumana PressTHT
- YOSHIZAWA, T. (1997) Geographic difference in Trichothecene occurrence in Japanese wheat and barley. *Bull. Inst. Compr. Agric. Sci. Kinki University*, 5, 23 - 30
- YOUNG, L.G.; KING, G.J. (1984) Zearalenone and swine reproduction. *J. American Vet. Med. Assoc.*, 185, 334 - 335
- YU, W.; YU, F.Y.; UNDERSANDER, D.J.; CHU, F.S. (1999) Immunoassays of selected mycotoxins in hay, silage and mixed feed. *Food Agric. Immunol.*, 11, 307 - 319
- Zhang, G.S.; Schubring, S.L.; Chu, F.S. (1986a) Improved method for production of antibodies against T-2 toxin and diacetoxyscirpenol in rabbits. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51, 132 - 137
- ZHANG, G.S.; LI, S.W.; CHU, F.S. (1986b) Production and characterization of antibodies against deoxynivalenol triacetate. *J. Food Prot.*, 49, 336 - 339
- ZÖLLNER, P.; JODLBAUER, J.; LINDNER, W. (1999) Determination of zearalenone in grains by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry after solid-phase extraction with RP-18 columns or immunoaffinity columns. *J. Chromatogr. A*, 858, 167 - 174
- ZÖLLNER, P.; BERNER, D.; JODLBAUER, J.; LINDNER, W. (2000) Determination of zearalenone and its metabolites alpha- and beta-zearalenol in beer samples by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 738, 233 - 241
- ZÖLLNER, P.; JODLBAUER, J.; KLEINOVA, M.; KAHLBACHER, H.; KUHN, T.; HOCHSTEINER, W.; Lindner, W. (2002) Concentration levels of zearalenone and its metabolites in urine, muscle tissue, and liver samples of pigs fed with mycotoxin-contaminated oats. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 2494 - 2501

9 Anhang

9.1 Abschnitt I

Tab. A-1: Nomenklatur von Typ B Trichothecenen (nach Cole ET AL. 2003)

Name	IUPAC	R 1	R 2	R 3	R 4	MG
DON	3 α ,7 α ,15-Trihydroxy-12,13-epoxytrichothec-9-en-8-on	OH	H	OH	OH	296,126
3-AcDON	3 α -Acetoxy-7 α ,15-dihydroxy-12,13,-epoxytrichothec-9-en-8-on	OCOCH ₃	H	OH	OH	338,137
15-AcDON	15-Acetoxy-3 α ,7 α -dihydroxy-12,13,-epoxytrichothec-9-en-8-on	OH	H	OCOCH ₃	OH	338,137
NIV	3 α ,4 β ,7 α ,15-Tetrahydroxy-12,13-epoxytrichothec-9-en-8-on	OH	OH	OH	OH	312,121
FusX	4 β -Acetoxy-3 α ,7 α ,15 α -Trihydroxy-12,13-epoxytrichothec-9-en-8-on	OH	OCOCH ₃	OH	OH	354,121
VOL	4 β ,15-Dihydroxy-12,13,-epoxytrichothec-9-en	H	H	H	H	266,152

Tab. A-2: Nomenklatur von Typ A Trichothecenen (nach Cole ET AL. 2003)

Name	IUPAC	R 1	R 2	R 3	R 4	R 5	MW
T-2 Tetraol	3 α ,4 β ,8 α ,15-Tetrahydroxy-12,13-epoxytrichothec-9-en	OH	OH	OH	H	OH	298,142
T-2 Toxin	3 α -Hydroxy-4 β ,15-diacetoxy-8 α -[3-methylbutyryloxy]-12,13-epoxytrichothec-9-en	OH	OCOCH ₃	OCOCH ₃	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃)	466,220
HT-2 Toxin	3 α ,4 β -Dihydroxy-15-acetoxy-8 α -[3-methylbutyryloxy]-12,13-epoxytrichothec-9-en	OH	OH	OCOCH ₃	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃)	424,210
NEO	4 β ,15 α -Diacetoxy-3 α ,8 α -dihydroxy-12,13,-epoxytrichothec-9-en	OH	OCOCH ₃	OCOCH ₃	H	OH	382,163
DAS	4 β ,15-Diacetyl-3 α -hydroxy-12,13-epoxytrichothec-9-en-8-on	OH	OCOCH ₃	OCOCH ₃	H	H	366,168
15-AcSCP	15-Acetoxy-3 α ,4 β -dihydroxy-12,13-epoxytrichothec-9-en-8-on	OH	OH	OCOCH ₃	H	H	324,157
T T-2 Triol	3 α ,4 β ,15-Trihydroxy-8 α -[3-methylbutyryloxy]-12,13-epoxytrichothec-9-en	OH	OH	OH	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃)	382,199

Tab. A-3: Gaschromatographische Methoden in der Trichothecen-Analytik

Toxine	Derivatisierung	Detektion	Literatur
DON; NIV; 3-AcDON; 15-AcDON; Fus-X	Sylon BTZ	GC-ECD	WEINGAERTNER ET AL. (1997)
DON; NIV; Fus-X; 3 und 15-AcDON; HT-2 Toxin; T-2 Toxin	TFAA Derivate	GC-MS	SCHOLLENBERGER ET AL. (1998)
DON; NIV; 3-AcDON; DAS; Fus-X; NEO; HT-2 Toxin ; T-2 Toxin	TMS Derivate	GC-FID	SCHOTHHORST UND JEKEL (2001)
DON; NIV; Fus-X; 3 und 15-AcDON; HT-2 Toxin; T-2 Toxin	TFA Derivate	GC-MS	SCHWADORF UND MÜLLER (1991)
DON; 3-AcDON; NIV; FusX; T-2 Toxin; NEO; DAS; (ZEA)	TMSI-/TMCS- ethylacetat	GC-MS	TAKANA ET AL. (2000)
DON; 3-AcDON; FusX; DAS; 15 MAS; T-2 Toxin; Scirpentriol	–	GC-MS	ONJI ET AL. (1998)
DON; NIV; FusX; HT-2 Toxin; T-2 Toxin; DAS; T-2 Tetraol	TFA Derivate	GC-ECD	KOTAL ET AL. (1999)
DON; NIV; 3 und 15-AcDON	DMAP Derivate	GC-ECD	WALKER UND MEIER (1998)
DON; NIV; FusX; HT-2 Toxin; T-2 Toxin; DAS; T-2 Tetraol; T-2 Triol; NEO; 15 Aceto- xyscirpenol; 4-Acetoxy-scirpentriol	PFPF Derivate	GC-EI-MS/MS; GC-NICI- MS/MS	NIELSEN UND THRANE (2001)

Tab. A-4: HPLC-MS Methoden in der Trichothecen-Analytik

Toxine	Extraktion	Aufreinigung	Detektion	Literatur
DON; DAS; HT-2 Toxin; T2-Toxin	ACN	Entfetten mit n- Hexan; SPE Bond Elute NH ₂	LC-MS, pos	RAJAKYLÄ ET AL.(1987)
DON	ACN/Wasser (1/1; V/V)	MycoSep™ 225 Säule	LC-APCI-MS; pos und neg LC-ESI-MS; neg	PLATTNER (1999)
DON ; FusX ; 3-AcDON	ACN/Wasser (84/16; V/V)	MycoSep™	LC-MS, pos	BERGER ET AL. (2000)
T-2 Toxin; HT-2 Toxin; DAS	ACN/Wasser (84/16; V/V)	MycoSep™	LC-ESI-MSD; pos	THIMM ET AL. (2001)
DON; NIV; 3-AcDON; FusX	ACN/Wasser (84/16; V/V)	Carbograph-4 SPE	LC-TISP-MS/MS; pos und neg LC-APCI-MS/MS; pos und neg	LAGANA ET AL. (2003)
DON; NIV; 3-AcDON; 15-AcDON; Fus X; DOM-1	ACN/Wasser (84/16; V/V)	MycoSep™ 227 Säule	LC-APCI-MS, neg	RAZZAZI-FAZELI ET AL. (2003)
DON; T-2 Toxin HT-2 Toxin; ZEA;	ACN/Wasser (85/15; V/V)	Trichothecene/ZEA MycoSep™	LC-ESI-MS/MS; Pos und neg	BISELLI und HUM- MERT (2005)
NIV; DON; 3-AcDON; 15-AcDON; FusX; DAS; T-2 Toxin; HT-2 Toxin und ZEA	ACN/Wasser (84/16; V/V)	MycoSep™ 226 Säule	LC-Q-Trap- MS/MS ; Neg/pos/neg	SCHUMACHER ET AL. (2005)

Tab. A-5: Analytik von Zearalenon in Getreide und Getreideprodukten

Extraktion	Aufreinigung	Trennung und Detektion	Literatur
CHCl ₃ /Wasser	Flüssig/Flüssig-Verteilung; CHCl ₃	TLC; kurzwelliges UV-Licht	Epply (1968)
CHCl ₃ /Wasser	Flüssig/Flüssig-Verteilung; Hexan und CHCl ₃	TLC; Bis-diazo-Benzidin	Malaiyandi et al. (1976)
MeOH	Flüssig/Flüssig-Verteilung; CHCl ₃	GLC-MS; Trimethylsil.-Derivat	Scott et al. (1978)
CHCl ₃ Wasser	Flüssig/Flüssig-Verteilung; Benzol	RP HPLC-FLD	Ware und Thorpe (1978)
CHCl ₃ B/ Wasser	Flüssig/Flüssig-Verteilung CHCl ₃	RP HPLC-FLD	Bagneris et al. (1986)
ACN/ Wasser	IAC-Säulen	RP HPLC-FLD	Visconti und Pascale (1998)
ACN	IAC-Säulen	RP HPLC-FLD	Schuhmacher et al. (1998)
ACN/ Wasser	MycoSep® 224	RP HPLC-FLD	Silva und Vargas (2001)
MeOH/ Wasser	IAC-Säulen	RP HPLC-FLD	Fazekas und Tar (2001)
ACN/ Wasser	ASPEC IAC-Säulen	RP HPLC-FLD	Eskola et al. (2002)

Tab. A-6: Analytik von Zearalenon und Derivaten mittels LC-MS bzw. LC-MS/MS

Toxin	Matrix	Aufreinigung	Detektion	Literatur
ZEA; α-ZOL; β-ZOL; ZAN; α-ZAL; β-ZAL	Kläranlagen Abwasser	CB ₁₈ -SPE _B Kartusche	LC-APCI-MS/MS; negative Ionisierung	Lagana et al. (2001)
ZEA	Lebensmittel, Futtermittel	IAC - Säule; CB ₁₈ -SPE Kartusche	LC-APCI-MS positive Ionisierung	Rosenberg et al. (1998)
ZEA; ZAN	Getreide	IAC - Säule; C ₁₈ -SPE Kartusche	LC-APCI-MS/MS; negative Ionisierung	Zöllner et al. (1999)
α- und β-Trenbolon; Zeranol	Rindermuskel und Leber	OASIS® HLB	LC-ESI-MS positive und negative Ionisierung	Hori und Nakazwa (2000)
ZEA; α-ZOL; β-ZOL; ZAN; α-ZAL; β-ZAL	Schweineurin und -gewebe	CB ₁₈ -SPE _B Kartusche	LC-APCI-MS/MS; negative Ionisierung	Zöllner et al. (2002)
ZEA; α-ZOL; β-ZOL	Fischgewebe	CB ₁₈ -SPE _B Kartusche	LC-TISP-MS/MS; negative Ionisierung	Lagana et al. (2003)
ZEA; α-ZOL; β-ZOL	Rinderurin	CB ₁₈ -SPE Kartusche	LC-ESI-MS/MS negative Ionisierung	Launay et al. (2004)

9.2 Abschnitt II

9.2.1 Bestimmung von DON mittels dab-ELISA

Chemikalien

- dest. Wasser oder bidest. Wasser geeigneter Qualität
- Casein für biochem. Zwecke
- Natriumcarbonat (Na_2CO_3) z. A.
- Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) z. A.
- Natriumchlorid (NaCl) z. A.
- Tween 20 (Sorbitanfettsäureester)
- *di*-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) z. A.
- Anti-Maus IgG (Rb a Mo Immunoglobulin) 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in Bicarbonatpuffer verdünnt
- DON-Antiserum (monoklonaler Antikörper) MAK DON 1H8 (in PBS mit 0,1 % Natriumazid); Konzentration 240 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Volumen 2 mL, Lagerung im Kühlschrank bei 4 °C
Arbeitskonzentration: 60 ng/mL (entspricht einer Verdünnung von 1:4 000)
- DON-HS-HRP vom 20.06.2002 (1:35 000 in 1 % Casein/PBS-Lsg.): Lagerung bei -18 °C
- Kalium-*di*-hydrogenphosphat (KH_2PO_4) z. A.
- Citronensäure-Monohydrat z. A.
- 1,0 molare Kalilauge (1 mol/L KOH)
- Perhydrol bzw. Wasserstoffperoxid (30 %ig) z. A.
- 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin z. A.
- Aceton z. A.
- Methanol z. A.
- 1,0 molare Schwefelsäure (1,0 mol/L H_2SO_4)

Puffer und Lösungen

- a) Bicarbonatpuffer: pH 9,6 (9,4 - 9,8)
1,59 g Natriumcarbonat
+ 2,93 g Natriumhydrogencarbonat
ad 1 000 mL mit dest. Wasser
Haltbarkeit: bei 4 °C ca. 1 Monat
- b) Waschlösung: NaCl/Tween 20
8,55 g Natriumchlorid
+ 0,25 mL Tween 20
ad 1 000 mL mit dest. Wasser
Haltbarkeit: bei 4 °C ca. 6 Monate
- c) Phosphatpuffer (PBS) pH 7,0 - 7,5
6,79 g Natriumchlorid
+ 1,47 g *di*-Natriumhydrogenphosphat
+ 0,43 g Kalium-*di*-hydrogenphosphat
ad 1 000 mL mit dest. Wasser
Haltbarkeit: bei 4 °C ca. 1 Monat
- d) Wasserstoffperoxidpuffer (H_2O_2 -Puffer): pH 3,9 - 4,0
8,81 g Citronensäure-Monohydrat
+ 40 mL 1M KOH
+ 160 mL dest. Wasser
werden mit 1M KOH auf pH 3,9 - 4,0 eingestellt
+ 65 μL H_2O_2
Haltbarkeit: Im Dunkeln bei 25 °C ca. 2 Wochen

- e) 4%ige Caseinat-Lösung
4,00 g Casein werden in 100 mL Wasser aufgeschlämmt und unter Rühren bei 40–50 °C 3 h gelöst. Zur vollständigen Lösung wird über Nacht weitergerührt.
(1 Tablette KOH zusetzen und warten bis das Casein gelöst ist. Anschließend mit 85%iger Phosphorsäure neutralisieren).
Haltbarkeit: im Dunkeln bei 4 °C ca. 3 Wochen
- f) 1%ige Caseinat-/PBS-Lösung
Die 4%ige Caseinlösung wird mit PBS 1 : 2 verdünnt.
(10 mL Caseinlösung + 10 mL mit Wasser auffüllen)
Haltbarkeit: bei 4 °C max. 3 - 4 Tage; vorzugsweise sollte die Lösung stets frisch hergestellt werden.
- g) 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Lösung
50,4 mg 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
+ 1,0 mL Aceton
+ 9,0 mL Methanol
Haltbarkeit: Im Dunkeln bei 25 °C ca. 3 Wochen
- h) DON-Konjugat: DON-HS-HRP vom 20.06.2002
In 250 µL dest. Wasser lösen
1 : 100 Verdünnung in PBS (10 µL + 990 µL)
Haltbarkeit: im Dunkeln und bei 4 °C ca. 4 Wochen
17,2 µL davon in 1 % Casein/PBS-Lsg

Reagenzien

Hinweis: Bei allen Reagenzien ist eine längere Haltbarkeit nicht gegeben. Daher müssen diese Lösungen immer frisch angesetzt werden!

- a) Anti-Maus IgG (DAKO), für 10 µg/mL Plattenbelegung:
Konzentration im Anti-Maus-IgG von DAKO 2,7 mg/mL
Für 6 Platten: 222 µL Anti-Maus-IgG in 60 mL Bicarbonatpuffer verdünnen
- b) Antikörperlösung (für Platten)
5 µL DON MAK DON1H8 werden in 20 mL Bicarbonatpuffer gegeben und durch Behandlung mittels Vortexer homogen verteilt.
Endverdünnung: 1 : 4 000
- c) Absättigungslösung (2 % Caseinat-Lösung)
gleiche Teile der 4 %igen Caseinlösung und des PBS-Puffers werden gemischt.
(je 10 mL Lösung)
- d) Konjugatlösung
10 µL des vorverdünnten Konjugates vom 07.02.2002 werden in 15 mL der 1 %igen Caseinat/PBS-Lösung gegeben und durch Behandlung mittels Vortexer homogen verteilt.
Endverdünnung: 1 : 150 000
- e) Substratlösung
20 Teile [10 mL] Wasserstoffperoxidpuffer
+ 1 Teil [0,5 mL] 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Lösung
- f) Extraktionslösung
50 mL; 10 % Methanol/PBS
- g) Verdünnungslösung für die Standards/Proben
10 % Methanol/PBS

Hilfs- und Messmittel

- Kolbenhubpipetten (Firma Eppendorf) verschiedene Größen
- Multikanalkolbenhubpipette (12 Kanal)
- ELISA-Platten mit 96 Kavitäten von Greiner oder Nunc [Cert. Maxisorp Fa 6 Bestell-Nr. 439454]
- ELISA-Reader Dynatech MR 5000 mit Auswertesoftware und 450 nm Filter
- Taumler mit Feuchtkammer
- Vortexer z. B. Ikamag
- Beckmann Zentrifuge mit Einsätzen und Zentrifugengefäßen
- Filter (Schleicher & Schüll Faltenfilter 595, Durchmesser 10 cm)

Durchführung

Beschichtung der Platte mit Anti-Maus-IgG und Absättigung

Die Platte wird mit 100 µL/Kavität Anti-Maus-IgG belegt und über Nacht bei ca. 25 - 28 P^oC im Taumler inkubiert (die so vorbereiteten Platten können bei 4 °C abgedeckt bis zu 2 Wochen gelagert werden).

Belegung der ELISA-Platten mit Antikörpern

Die mit Anti-Maus-IgG vorbereiteten Platten werden auf Raumtemperatur gebracht und gut ausgeschlagen. Es erfolgt kein Waschschrift!

Zum Absättigen werden 2 %ige Caseinat-PBS-Lösung 200 µL/Kavität verwendet und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgt ein drei- bis viermaliges Waschen der Platte und anschließendes Ausschlagen. Die Antikörperlösungen werden wie oben beschrieben hergestellt. Von dieser Lösung werden in jede Kavität 100 µL gegeben. Die so beschichtete Platte wird bei Raumtemperatur für 1 h lichtgeschützt in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach der Inkubierung wird die Platte drei- bis viermal gewaschen und ausgeschlagen. Anschließend werden alle Kavitäten dreimal mit Waschlösung gespült und durch Ausschlagen gut getrocknet.

Herstellung der Probelösung

5 g Probe werden auf 1 mg genau in einen Jodzahlkolben eingewogen, mit 50 mL Extraktionslösung versetzt, der Kolben verschlossen und mindestens 30 Minuten auf dem Magnetrührer extrahiert. Das Homogenat wird möglichst vollständig in einen Zentrifugenbecher überführt und 15 Minuten bei 3000 U/min und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und durch einen 595-Faltenfilter filtriert. Dieses Filtrat wird unverdünnt eingesetzt (Faktor 10). Ausgehend von dem vorliegenden Filtrat werden: in der ersten Verdünnungsstufe 80 µL Filtrat mit 320 µL 10 % MeOH/PBS versetzt (Faktor 50) und in der zweiten Verdünnungsstufe 80 µL Filtrat mit 720 µL 10 % MeOH/PBS versetzt (Faktor 100).

Diese Lösungen können zur Bestimmung direkt eingesetzt werden.

Standardlösungen

Der Deoxynivalenol-Standard (ca. 1 mg) wird so gelöst, dass sich eine Konzentration von 1,0 ng/mL ergibt (z. B. werden 1 mg Deoxynivalenol mittels Acetonitril in einen 50 mL Kolben überführt und zur Marke aufgefüllt. [$\hat{=}$ 20 µg/mL]; davon werden 50 µL auf 100 mL verdünnt [$\hat{=}$ 10 ng/mL]). Für den ELISA wird die Kalibrationskurve ausgehend von einer ca. 30 µg/mL Arbeitslösung in Methanol hergestellt. Diese Lösung ist bei 4 °C ca. 6 Monate haltbar. Es werden 100 µL dieser Arbeitslösung mit 900 µL 10 % MeOH/PBS verdünnt. Diese Verdünnung (1 : 10) stellt den ersten Kalibrationsstandard (St 1) mit einer Konzentration von ca. 100 ng/mL dar. Daraus werden die folgenden Standards durch 1 : 3 Verdünnung (300 µL + 600 µL) hergestellt: Die Herstellung der DON ELISA-Stammlösung (31,2 µg/mL) ist in nachstehender Tabelle zusammengefasst:

Standard		Verdünnung	Gehalt [ng/mL]
St 1	33 µL (V 1 : 10) auf 1 mL 10 % MeOH/PBS	Unverdünnt	103,0
St 2	300 µL St 1 + 600 µL 10 % MeOH/PBS	1 : 3	34,3
St 3	300 µL St 2 + 600 µL 10 % MeOH/PBS	1 : 9	11,4
St 4	300 µL St 3 + 600 µL 10 % MeOH/PBS	1 : 27	3,8
St 5	300 µL St 4 + 600 µL 10 % MeOH/PBS	1 : 81	1,3
St 6	300 µL St 5 + 600 µL 10 % MeOH/PBS	1 : 243	0,4

Ausgehend von dieser Tabelle werden die Standards (St 1 bis St 6) mit je 50 µL/Kavität auf die Platte gebracht. Hier erfolgt pro Standard eine vierfache Bestimmung.

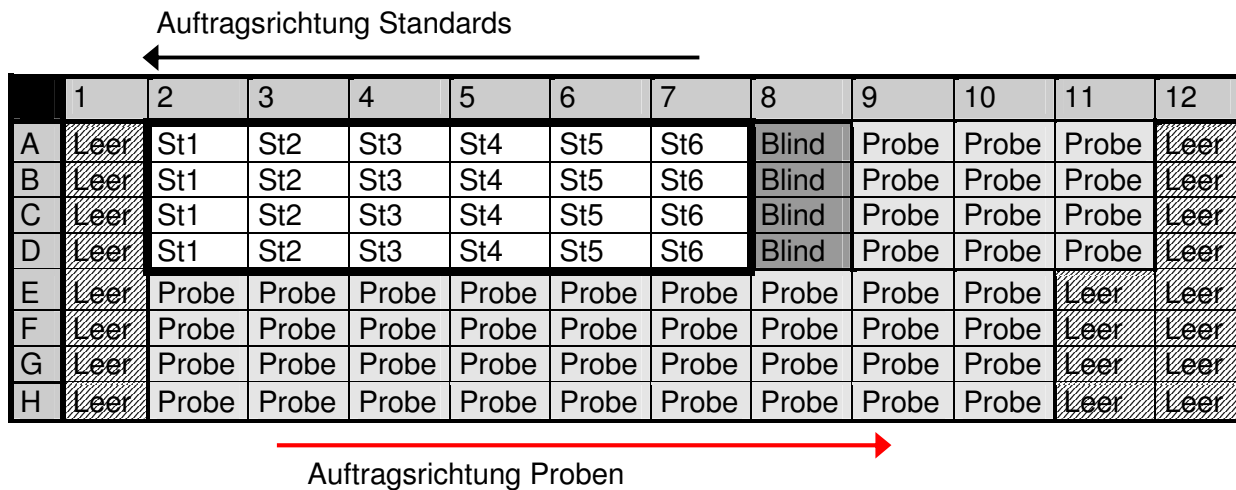
Durchführung der Immunreaktion

Auf die vorbereitete ELISA-Platte werden jeweils 50 µL Blindwert, Standardverdünnungen und Probenverdünnungen aufgebracht, wobei für jeden Wert mindestens eine Vierfachbestimmung durchzuführen ist. Anschließend werden die Kavitäten mit je 50 µL Konjugatlösung versetzt, abgedeckt und die so beschickte Platte für mind. 2 h lichtgeschützt und unter leichter Bewegung bei 28 - 30 P^oC inkubiert. Anschließend werden die Kavitäten dreimal mit Waschlösung gründlich gewaschen und sehr sorgfältig ausgeschlagen.

Farbreaktion und Messung

In die getrockneten Kavitäten werden jeweils 100 µL Substratlösung gegeben und zur vollständigen Farbentwicklung für ca. 30 Minuten lichtgeschützt und unter leichter Bewegung entwickelt. Nach ausreichender Farbentwicklung wird die Reaktion mit je 100 µL einer einmolaren Schwefelsäure pro Kavität gestoppt, wobei darauf zu achten ist, dass das Stoppen der Reaktion in gleicher Reihenfolge erfolgt wie die Zugabe des Substrats! Nach 3-minütigem Mischen wird die Platte im ELISA-Reader bei 450 nm vermessen und mittels zugehöriger Software ausgewertet.

Belegungsplan für die ELISA-Platten



9.2.2 Bestimmung von ZEA mittels dc-ELISA

Chemikalien

- dest. Wasser
- Casein für biochem. Zwecke
- Natriumcarbonat (Na_2CO_3) z. A.
- Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) z. A.
- Natriumchlorid (NaCl) z. A.
- Tween 20 (Sorbitanfettsäureester)
- *di*-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) z. A.
- Kalium-*di*-hydrogenphosphat (KH_2PO_4) z. A.
- Citronensäure-Monohydrat z. A.
- 1,0 molare Kalilauge (1 mol/L KOH)
- Perhydrol bzw. Wasserstoffperoxid (30 %ig) z. A.
- 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin z. A.
- Aceton z. A.
- Methanol z. A. 1,0 molare Schwefelsäure (1,0 mol/L H_2SO_4)
- ZEA-Antiserum B37 gefällt (1 mL)
Lagerung bei $< 18\text{ }^\circ\text{C}$
portionieren in 100 μL Aliquote
häufiges Einfrieren und Auftauen vermeiden
1 : 10 Zwischenverdünnung (Kühlschrank mind. 4-6 Wochen haltbar)
Arbeitskonzentration: 1 : 4 000 in Bicarbonat verdünnt
- ZEA-Oxim-HRP vom 07.02.2002 (1:50 000 in 1 % Caseinat-/PBS-Lösung):
Lagerung bei $-18\text{ }^\circ\text{C}$

Puffer und Lösungen

- a) Bicarbonatpuffer: pH 9,6 (9,4 - 9,8)
1,59 g Natriumcarbonat
+ 2,93 g Natriumhydrogencarbonat
ad 1 000 mL mit dest. Wasser
Haltbarkeit: bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ ca. 1 Monat
- b) Waschlösung: NaCl/Tween 20
8,55 g Natriumchlorid
+ 0,25 mL Tween 20
ad 1 000 mL mit dest. Wasser
Haltbarkeit: bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ ca. 6 Monate
- c) Phosphatpuffer (PBS) pH 7,0 - 7,5
6,79 g Natriumchlorid
+ 1,47 g *di*-Natriumhydrogenphosphat
+ 0,43 g Kalium-*di*-hydrogenphosphat
ad 1 000 mL mit dest. Wasser
Haltbarkeit: bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ ca. 1 Monat
- d) Wasserstoffperoxidpuffer (H_2O_2 -Puffer): pH 3,9 - 4,0
8,81 g Citronensäure-Monohydrat
+ 40 mL 1M KOH
+ 160 mL dest. Wasser
werden mit 1M KOH auf pH 3,9 - 4,0 eingestellt
+ 65 μL H_2O_2
Haltbarkeit: im Dunkeln bei $25\text{ }^\circ\text{C}$ ca. 2 Wochen

- e) 4%ige Caseinat-Lösung
4,0 g Casein werden in 100 mL Wasser aufgeschlämmt und unter Rühren bei 40 - 50 °C 3 h gelöst. Zur vollständigen Lösung wird über Nacht weitergerührt.
(1 Tablette KOH zusetzen und warten bis das Casein gelöst ist. Anschließend mit 85 %iger Phosphorsäure neutralisieren).
Haltbarkeit: Im Dunkeln bei 4 °C ca. 3 Wochen
- f) 1%ige Caseinat-/PBS-Lösung
Die 4 %ige Caseinat-Lösung wird mit PBS-Puffer 1 : 2 verdünnt.
(10 mL Caseinlösung + 10 mL mit Wasser auffüllen)
Haltbarkeit: bei 4 °C max. 3 - 4 Tage; vorzugsweise sollte die Lösung stets frisch hergestellt werden.
- g) 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Lösung
50,4 mg 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
+ 1,0 mL Aceton
+ 9,0 mL Methanol
Haltbarkeit: Im Dunkeln bei 25 °C ca. 3 Wochen
- h) ZEA-Konjugat: ZEA-Oxim-HRP vom 07.02.2002
In 250 µL Aqau dest. lösen
1 : 100 Verdünnung in PBS
Haltbarkeit: dunkel und bei 4 °C ca. 1 Woche
(10 µL + 990 µL)
10 µL in 1 % Casein/PBS-Lsg

Reagenzien

Hinweis: Bei allen Reagenzien ist eine längere Haltbarkeit nicht gegeben. Daher müssen diese Lösungen immer frisch angesetzt werden!

- i) Antikörperlösung (für 2 Platten)
5 µL ZEA Antiserum B 37 werden in 20 mL Bicarbonatpuffer gegeben und durch Behandlung mittels Vortexer homogen verteilt.
Endverdünnung: 1 : 4 000
- a) Absättigungslösung (2 % Caseinat-Lösung)
gleiche Teile der 4 %igen Caseinat-Lösung und des PBS-Puffers werden gemischt.
(je 10 mL Lösung)
- a) Konjugatlösung
10 µL des vorverdünnten Konjugates vom 07.02.2002 werden in 15 mL der 1 %igen Caseinat/PBS-Lösung gegeben und durch Behandlung mittels Vortexer homogen verteilt.
Endverdünnung: 1 : 150 000
- b) Substratlösung
20 Teile [10 mL] Wasserstoffperoxidpuffer
+ 1 Teil [0,5 mL] 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Lösung
- c) Extraktionslösung
25 mL 84 % Acetonitril, 16 % dest. Wasser
- d) Verdünnungslösung für die Standards/Proben
in 5 % Acetonitril/PBS verdünnt

Hilfs- und Messmittel

- Kolbenhubpipetten (Firma Eppendorf) verschiedene Größen
- Multikanalkolbenhubpipette (12 Kanal)
- ELISA-Platten mit 96 Kavitäten von Greiner oder Nunc [Cert. Maxisorp Fa 6 Bestell-Nr. 439454]
- ELISA-Reader Dynatech MR 5000 mit Auswertesoftware und 450 nm Filter
- Taumler mit Feuchtkammer
- Vortexer z. B. Ikamag
- Beckmann Zentrifuge mit Einsätzen und Zentrifugenbechern
- Filter (Schleicher & Schüll Faltenfilter 595, Durchmesser 10 cm)

Durchführung

Belegung der ELISA-Platten mit Antikörpern und Absättigung

Gemäß den Angaben wird eine Antikörperlösung hergestellt. Von dieser Lösung werden in jede Kavität 100 µL gegeben. Die so beschickte Platte wird bei Raumtemperatur über Nacht oder für mind. 3 h bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert (die so vorbereiteten Platten können bei 4 °C abgedeckt bis zu zwei Wochen gelagert werden).

Nach der Inkubierung wird die Platte sorgfältig ausgeschlagen (es erfolgt kein Waschschrift), mit Absättigungslösung (je 200 µL/Kavität) beschichtet und weitere 30 Minuten im Taumler mit feuchter Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden alle Kavitäten dreimal mit Waschlösung gespült und durch Ausschlagen gut getrocknet.

Herstellung der Probelösung

5 g Probe werden auf 1 mg genau in einen Jodzahlkolben eingewogen, mit 25 mL Extraktionslösung versetzt, der Kolben verschlossen und mindestens 45 Minuten auf dem Magnetrührer extrahiert (Verdünnung 1 : 5). Das Homogenat wird möglichst vollständig in einen Zentrifugenbecher überführt und 15 Minuten bei 3000 U/min und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und durch einen 595-Faltenfilter filtriert. In der ersten Verdünnungsstufe werden 100 µL Filtrat mit 1580 µL PBS versetzt. Dies wird als „unverdünnter“ Extrakt (Faktor 84) eingesetzt. Davon ausgehend werden folgende Verdünnungen hergestellt:

100 µL der ersten Verdünnung werden mit 300 µL 5 % Acetonitril/PBS versetzt (Verdünnung 1 : 4) und durch Behandlung mittels Vortexer homogen verteilt (Faktor 336). Von dieser Lösung werden abermals 100 µL entnommen und mit 300 µL 5 % Acetonitril/PBS versetzt und geschüttelt (Verdünnung 1 : 4; Faktor 1344).

Diese Lösungen können direkt zur Bestimmung eingesetzt werden.

Standardlösungen

Der Zearalenon Standard (ca. 1 mg) wird so gelöst, dass sich eine Konzentration von 1,0 ng/mL ergibt (z. B. werden 1 mg Zearalenon mittels Acetonitril in einen 50 mL Kolben überführt und zur Marke aufgefüllt. [$\hat{=}$ 20 µg/mL]; davon werden 50 µL auf 100 mL verdünnt [$\hat{=}$ 10 ng/mL]. Diese Lösung ist bei 4 °C ca. 6 Monate haltbar.

Aus dieser Stammlösung werden folgende Standards durch 1 : 3 Verdünnung (200 µL + 400 µL) hergestellt:

Standard	Verdünnung	Gehalt [µg/mL]
St 1	unverdünnt	1 000
St 2	1 : 3	333,3
St 3	1 : 9	111,1
St 4	1 : 27	37,0
St 5	1 : 81	12,3
St 6	1 : 243	4,1

Ergänzung: Soll als Standard der HPLC-Standard Zearalenon (1940 ng/mL) verwendet werden, so muß im ersten Schritt eine Verdünnung in 5 % Acetonitril/PBS hergestellt werden (52 µL auf 10 mL). Diese Lösung hat einen Gehalt von 10,088 µg/mL und ist bei 4 °C 6 Monate haltbar. Aus dieser Lösung wird immer frisch eine 1 : 10 Verdünnung (100 µL + 900 µL 5 % Acetonitril/PBS) hergestellt. Diese Lösung hat einen Gehalt von 1008,8 pg/mL. Aus dieser wird dann gemäß Tabelle immer im Verhältnis 1 : 3 (200 µL Standard + 400 µL 5 % Acetonitril/PBS) verdünnt.

Durchführung der Immunreaktion

Auf die vorbereitete ELISA-Platte werden jeweils 50 µL Blindwert, Standardverdünnungen und Probenverdünnungen aufgebracht, wobei für jeden Wert mindestens eine Vierfachbestimmung durchzuführen ist. Anschließend werden die Kavitäten mit je 50 µL Konjugatlösung versetzt, abgedeckt, und die so beschickte Platte für mind. 2 h lichtgeschützt und unter leichter Bewegung bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden die Kavitäten dreimal mit Waschlösung gründlich gewaschen und sehr sorgfältig ausgeschlagen.

Farbreaktion und Messung

In die getrockneten Kavitäten werden jeweils 100 µL Substratlösung gegeben und zur vollständigen Farbentwicklung für 20 Minuten lichtgeschützt und unter leichter Bewegung entwickelt. Nach ausreichender Farbentwicklung wird die Reaktion mit je 100 µL einer ein molaren Schwefelsäure pro Kavität gestoppt, wobei darauf zu achten ist, dass das Stoppen der Reaktion in gleicher Reihenfolge erfolgt wie die Zugabe des Substrats! (z. B. bei beiden Zugaben von der Reihe A nach H).

Nach dreiminütigem Mischen wird die Platte im ELISA-Reader bei 450 nm vermessen und mittels zugehöriger Software die Bestimmung ausgewertet.

Belegungsplan für die ELISA-Platten

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Leer	St1	St2	St3	St4	St5	St6	Blind	Probe	Probe	Probe	Leer
B	Leer	St1	St2	St3	St4	St5	St6	Blind	Probe	Probe	Probe	Leer
C	Leer	St1	St2	St3	St4	St5	St6	Blind	Probe	Probe	Probe	Leer
D	Leer	St1	St2	St3	St4	St5	St6	Blind	Probe	Probe	Probe	Leer
E	Leer	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Leer	Leer
F	Leer	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Leer	Leer
G	Leer	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Leer	Leer
H	Leer	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Leer	Leer

← Auftragsrichtung Standards

→ Auftragsrichtung Proben

9.3 Abschnitt III

Tab. A-7: Zusammenfassung der Ergebnisse der durchgeführten Laborvergleichsuntersuchungen für DON

		Vollkorn- weizenmehl	Vollkorn- weizenmehl	Weizenmehl Typ 405	Nudeln	Kinderkeks	Nudeln	Weizenmehl Typ 405	Vollkorn- nudeln	Vollkorn- weizenmehl
n		6	6	6	6	6	6	6	6	7
Mittelwert	[µg/kg]	106	108	257	231	285	155	398	890	1040
Median	[µg/kg]	108,5	115	272	231,5	258	144	368	895,4	1010,5
S	[µg/kg]	19,6	18,5	48,3	35,6	91,9	52,7	80,6	231,8	126,7
RSD _R	[%]	18,5	17,1	18,8	15,4	32,2	34	20,2	26	12,2
Dixon Ausreißer Test		Keine	Keine	Keine	Keine	Keine	Keine	Keine	Keine	Keine
Grubbs Ausreißer Test		Keine	Keine	Keine	Keine	Keine	Keine	Keine	Keine	Keine
r	[µg/kg]	27,7	37,9	49,5	94	166,7	92	117,7	361,4	208,6
s _r	[µg/kg]	9,8	13,4	17,5	33,2	58,9	32,5	41,6	127,7	73,7
RSD _r	[%]	9,2	12,4	6,8	14,4	20,7	21	10,5	14,3	7,1
R	[µg/kg]	60	58,6	162,2	116	257,5	153,4	190,5	723,6	390,8
s _R	[µg/kg]	21,2	20,7	57,3	41	91	54,2	67,3	255,7	138,1
RSD _R	[%]	20	19,2	22,3	17,7	31,9	35	16,9	28,7	13,3
s_R (Horwitz)	[µg/kg]	24,63	50,66	45,61	46,72	63,28	39,87	74,6	150	165,36
RSD_R (Horwitz)	[%]	22,29	19,62	19,98	19,9	18,86	20,47	18,32	16,18	15,91
Ho_R		0,9	0,8	1,1	0,9	1,4	1,4	0,9	1,7	0,8

Tab. A-8: Zusammenfassung der Ergebnisse der durchgeführten Laborvergleichsuntersuchungen für ZEA

		Maischips	Maismehl	Vollkorn- weizenmehl	Vollkorn- weizenmehl	Weizenmehl Typ 405	Müsli	Maisgrieß	Knusper- flakes
n		6	6	6	6	6	6	6	6
Mittelwert	[µg/kg]	40,9	13,2	22,9	55,3	3,1	3,4	19,0	36,7
Median	[µg/kg]	45,0	9,9	23,5	56,5	3,2	2,5	20,4	38,6
STABW	[µg/kg]	11,6	6,7	3,2	9	0,3	4,3	8,3	1,9
RSD _R	[%]	28,2	50,8	14	16,3	10,5	22,8	22,5	31,8
Dixon Ausreißer Test		Keine	Keine	Keine	Keine	Keine	Keine	Keine	Keine
Grubbs Ausreißer Test		Keine	Keine	Keine	Keine	Keine	Keine	Keine	Keine
r	[µg/kg]	11,9	7,1	4,5	11,9	0,8	3,4	9,6	3,7
s _r	[µg/kg]	4,2	2,5	1,6	4,2	0,3	1,2	3,4	1,3
RSD _r	[%]	10,3	18,9	7	7,6	9,7	6,3	9,3	21,7
R	[µg/kg]	32,8	21,5	9,3	26,6	3,1	12,4	23,8	5,7
s _R	[µg/kg]	11,6	7,6	3,3	9,4	1,1	4,4	8,4	2
RSD _R	[%]	28,7	57,6	14,4	17	35,5	23,2	22,9	33,3
s_R (Horwitz)	[µg/kg]	10,6	4,26	6,46	13,68	1,32	5,7	9,73	2,16
RSD_R (Horwitz)	[%]	25,89	30,42	28,26	24,74	37,44	28,89	26,28	34,32
Ho_R		1,1	1,6	0,5	0,7	0,9	0,7	0,9	0,9

Tab. A-9: Zusammenfassung der Ringversuchsergebnisse für die § 35 Methode „Bestimmung von Zearalenon in Getreidemehl“

		Roggenmehl			Weizenmehl		
		20 µg/kg	50 µg/kg	70 µg/kg	20 µg/kg	50 µg/kg	70 µg/kg
MW	[µg/kg]	24,4	56,3	83,6	25,9	57,0	107,3
n		15	16	15	15	15	16
Grubbs Ausreißer Test		Keine	Keine	Keine	Keine	Keine	Keine
n _i		15	16	15	15	15	16
r	[µg/kg]	7,2	16,8	33,5	6,9	6,5	29,0
s _r	[µg/kg]	2,6	6,0	12,0	2,5	2,3	10,4
RSD _r	[%]	10,7	10,7	14,4	9,6	4,0	9,6
R	[µg/kg]	12,2	32,2	48,4	15,0	33,6	56,6
s _R	[µg/kg]	4,3	11,5	17,3	5,4	12,0	23,4
RSD _R	[%]	17,6	20,4	20,7	20,8	21,0	21,8
S_R (Horwitz)	[µg/kg]	6,82	13,88	19,08	7,19	24,02	14,04
RSD_R (Horwitz)	[%]	27,99	24,67	23,32	27,72	22,39	24,62
Ho_R		0,6	0,8	0,9	0,8	0,9	1,0

Tab. A-10: Wiederfindungsuntersuchungen der HPLC-FLD-Methode von Zearalenon und den Isomeren in Maisprodukten (n=2)

	Konz. [µg/kg]	Maisgrieß		Maismehl	
		Wdf. [%]	RSD _r [%]	Wdf. [%]	RSD _r [%]
ZEA	10	84,7	7,2	123,7	37,4
	50	85,3	6,6	86,3	15,5
	200	100,9	32,5	68,7	8,7
ZAN	10	64,8	7,0	49,5	10,5
	50	67,6	4,7	55,9	12,0
	200	55	2,5	52,3	13,4
α-ZAL	10	137,3	6,1	131,1	4,0
	50	91,3	1,4	76,5	4,4
	200	80,3	19,3	63,5	6,1
β-ZAL	10	163	4,7	146,5	9,1
	50	98,6	0,9	82,6	6,8
	200	70,8	0,4	70,1	12,0
α-ZOL	10	199,7	0,7	201,4	11,4
	50	107,7	1,4	99,2	3,0
	200	91,5	26,5	70,0	6,1
β-ZOL	10	161,7	2,6	148,7	6,3
	50	108,8	4,7	76,4	7,3
	200	95,7	25,5	79,0	11,5

Tab. A-11: Wiederfindungsuntersuchungen von Zearalenon in unterschiedlichen Konsum- und Säuglingsfolgemilch Proben (n=2)

Matrix	Konzentration [µg/L]	HPLC-FLD	LC-MS/MS
Kinderfolgemilch	10	82,5	87,0
Haltbare Vollmilch; 3,5 % Fett	10	103,0	125,0
Fettarme Frischmilch	50	81,6	84,9
Haltbare Vollmilch; 1,5 % Fett	50	80,4	84,6
FrISCHE Vollmilch	100	78,4	85,7

Tab. A-12: Wiederfindungsergebnisse der ASE-Multi-Trichothecen-Methode für die Typ B Trichothecene (n=3)

	Matrix	Konzentration [µg/kg]	Wdf. [%]	RSD _r [%]
DON	Weizen	500	90,0	1,1
	Vollkorn-Haferflocken	250	109,5	4,1
	Maisgrieß	50	74,0	12,2
	Weizenmehl Typ 550	25	124,5	8,4
NIV	Weizen	500	88,5	1,7
	Vollkorn-Haferflocken	250	96,5	0,57
	Maisgrieß	50	88,5	2,87
	Weizenmehl Typ 550	25	89,5	0,6
Fus X	Weizen	500	93,0	1,1
	Vollkorn-Haferflocken	250	104,5	1,4
	Maisgrieß	50	90,5	1,7
	Weizenmehl Typ 550	25	115,0	0
3-AcDON	Weizen	500	97,0	2,1
	Vollkorn-Haferflocken	250	103,0	0,9
	Maisgrieß	50	84,5	1,7
	Weizenmehl Typ 550	25	114,5	2,1
15-AcDON	Weizen	500	108,5	0,4
	Vollkorn-Haferflocken	250	110,5	4,0
	Maisgrieß	50	85,5	1,7
	Weizenmehl Typ 550	25	99,0	1,0
DOM-1	Vollkorn-Haferflocken	100	105,5	1,3
	Maisgrieß	100	102,5	1,5

Tab. A-13: Wiederfindungsergebnisse der ASE-Multi-Trichothecen-Methode für die Typ A Trichothecene (n=3)

	Matrix	Konzentration [µg/kg]	Wdf. [%]	RSD _r [%]
T2-Toxin	Weizen	500	79,8	6,0
	Vollkorn-Haferflocken	100	95,6	2,9
	Maisgrieß	50	118,5	6,0
HT-2 Toxin	Weizen	500	89	4,3
	Vollkorn-Haferflocken	100	88	0,6
	Maisgrieß	50	91,2	0,9
DAS	Weizen	500	86,5	1,5
	Vollkorn-Haferflocken	100	89,6	0,1
	Maisgrieß	50	111,8	3,0
VOL	Weizen	500	98,2	1,6
	Vollkorn-Haferflocken	100	97,0	0,4
	Maisgrieß	50	99,9	3,9
15-AcSCP	Weizen	500	115,9	6,5
	Vollkorn-Haferflocken	100	100,9	1,1
	Maisgrieß	50	149,8	2,0
NEO	Weizen	500	128,3	4,1
	Vollkorn-Haferflocken	100	114	4,3
	Maisgrieß	50	138	10,1
3-AcDAS	Weizen	500	87,3	4,5
	Vollkorn-Haferflocken	100	93,5	2,8
	Maisgrieß	50	103,8	2,1
T-2 Triol	Weizen	500	101,5	2,9
	Vollkorn-Haferflocken	100	100,4	7,6
	Maisgrieß	50	105,7	2,0

Tab. A-14: Wiederfindungsuntersuchungen von Typ A und Typ B Trichotheceinen in unterschiedlichen Speiseölen (n = 3)

	Konz. [µg/kg]	Maiskeimöl		Weizenkeimöl		Sojaöl	
		Wdf. [%]	RSD [%]	Wdf. [%]	RSD [%]	Wdf. [%]	RSD [%]
VOL	50	122,1	1,5	77,4	5,8	100,5	4,7
	250	104,9	10,3	85,7	5,1	91,0	10,4
	500	106,4	30,4	84,1	3,2	93,4	6,9
DON	50	166,4	5,9	68,9	0,1	164,3	20,3
	250	124,0	3,6	37,7	10,1	102,7	4,0
	500	122,0	6,5	64,6	45,8	108,3	17,8
NIV	50	141,2	5,0	96,8	8,6	166,2	17,4
	250	114,1	3,0	100,2	6,2	114,9	6,1
	500	121,8	15,3	90,4	12,8	98,7	11,6
15-AcSCP	50	144,9	3,2	122,6	9,9	139,1	8,2
	250	60,7	6,3	83,3	1,9	68,0	2,6
	500	59,2	7,7	82,7	2,5	66,0	10,2
Trichothecein	50	94,8	6,2	71,1	8,7	46,8	8,8
	250	58,3	8,6	69,9	15,7	67,5	12,5
	500	71,7	15,5	81,6	18,2	83,1	19,2
3-AcDON	50	59,5	8,5	56,4	17,1	50,1	76,2
	250	53,3	10,9	52,1	26,0	56,6	48,7
	500	37,5	64,8	61,1	49,7	60,1	53,4
15-AcDON	50	32,8	8,2	35,1	5,0	53,7	2,8
	250	44,9	33,3	30,1	30,5	45,6	32,8
	500	21,5	69,8	31,2	13,7	49,8	34,1
FusX	50	59,2	13,0	41,8	1,2	57,4	47,3
	250	52,7	25,4	46,3	11,3	66,2	16,2
	500	35,8	42,5	46,3	8,4	61,2	20,1
DAS	50	110,3	6,9	130,4	6,2	140,5	20,7
	250	93,9	5,8	108,3	16,8	110,6	18,4
	500	87,0	2,5	95,0	31,9	93,6	5,3
3-AcDAS	50	106,0	8,8	99,2	5,1	112,3	31,6
	250	101,8	32,3	49,7	13,8	66,3	41,0
	500	90,5	55,2	39,4	53,0	61,7	42,0
HT-2 Toxin	50	43,1	0,7	44,1	3,9	48,8	1,8
	250	37,4	15,8	31,2	1,3	32,4	10,7
	500	34,4	32,0	32,0	12,2	31,0	4,8
T-2 Toxin	50	60,8	4,2	69,9	2,3	74,6	13,5
	250	49,2	26,3	43,7	3,8	49,4	15,5
	500	44,3	9,0	36,6	24,9	44,5	6,1

Tab. A-15: Ergebnisse der Wiederfindungsuntersuchungen von Typ A und Typ B Trichotheceinen in pflanzlichen Speiseölen (Maiskeimöl, Weizenkeimöl und Sojaöl; n = 3)

Toxin	Matrix	Wiederfindungs- funktion	Mittlere Wdf. [%]	Korrel. koeff.
VOL	Maiskeimöl	$y = 1,048 \cdot x + 5,7$	105	1,000
	Weizenkeimöl	$y = 0,847 \cdot x - 1,5$	85	1,000
	Sojaöl	$y = 0,927 \cdot x + 0,9$	93	1,000
DON	Maiskeimöl	$y = 1,172 \cdot x + 21,9$	117	1,000
	Weizenkeimöl	$y = 0,652 \cdot x - 23,4$	65	0,966
	Sojaöl	$y = 1,026 \cdot x + 20,0$	103	0,997
NIV	Maiskeimöl	$y = 1,200 \cdot x + 1,5$	120	0,999
	Weizenkeimöl	$y = 0,893 \cdot x + 12,1$	89	0,998
	Sojaöl	$y = 0,908 \cdot x + 45,7$	91	0,998
15-AcSCP	Maiskeimöl	$y = 0,500 \cdot x + 40,0$	50	0,995
	Weizenkeimöl	$y = 0,784 \cdot x + 18,6$	78	1,000
	Sojaöl	$y = 0,581 \cdot x + 34,8$	58	0,998
Trichothecein	Maiskeimöl	$y = 0,698 \cdot x - 2,2$	70	0,989
	Weizenkeimöl	$y = 0,832 \cdot x - 15,8$	83	0,997
	Sojaöl	$y = 0,876 \cdot x - 31,1$	88	0,996

Fortsetzung Tab. A-15: Ergebnisse der Wiederfindungsuntersuchungen von Typ A und Typ B Trichothecenen in pflanzlichen Speiseölen (Maiskeimöl, Weizenkeimöl und Sojaöl; n = 3)

Toxin	Matrix	Wiederfindungs- funktion	Mittlere Wdf. [%]	Korrel. koeff.
3-AcDON	Maiskeimöl	$y = 0,345 \cdot x + 24,8$	35	0,971
	Weizenkeimöl	$y = 0,620 \cdot x - 10,6$	62	0,996
	Sojaöl	$y = 0,613 \cdot x - 7,8$	61	1,000
15-AcDON	Maiskeimöl	$y = 0,193 \cdot x + 27,2$	19	0,807
	Weizenkeimöl	$y = 0,308 \cdot x + 0,7$	31	0,999
	Sojaöl	$y = 0,496 \cdot x - 2,2$	50	0,998
FusX	Maiskeimöl	$y = 0,326 \cdot x + 26,5$	33	0,963
	Weizenkeimöl	$y = 0,468 \cdot x - 2,0$	47	1,000
	Sojaöl	$y = 0,614 \cdot x + 3,0$	61	0,998
DAS	Maiskeimöl	$y = 0,842 \cdot x + 17,0$	84	0,999
	Weizenkeimöl	$y = 0,907 \cdot x + 28,5$	91	0,998
	Sojaöl	$y = 0,879 \cdot x + 37,2$	88	0,996
3-AcDAS	Maiskeimöl	$y = 0,884 \cdot x + 17,6$	88	0,998
	Weizenkeimöl	$y = 0,326 \cdot x + 36,7$	33	0,997
	Sojaöl	$y = 0,561 \cdot x + 27,1$	56	1,000
HT-2 Toxin	Maiskeimöl	$y = 0,334 \cdot x + 6,8$	33	0,999
	Weizenkeimöl	$y = 0,307 \cdot x + 4,7$	31	0,999
	Sojaöl	$y = 0,290 \cdot x + 9,3$	29	1,000
T-2 Toxin	Maiskeimöl	$y = 0,423 \cdot x + 12,1$	42	0,999
	Weizenkeimöl	$y = 0,328 \cdot x + 21,7$	33	0,998
	Sojaöl	$y = 0,411 \cdot x + 18,2$	41	1,000

Tab. A-16: Wiederfindungsuntersuchungen der Typ A und Typ B Trichothecene in Bier (n = 3)

	Matrix	Konz. [µg/L]	Wdf. [%]	RSD [%]
T-2 Toxin	Pils	10	57,7	9,2
	Schwarzbier	50	61,6	12,6
	Weißbier	100	70,5	2,4
HT-2 Toxin	Pils	10	101,6	6,8
	Schwarzbier	50	80,8	15,9
	Weißbier	100	87,3	4,4
3-AcDAS	Pils	10	61,4	13,4
	Schwarzbier	50	70,9	10,2
	Weißbier	100	79,4	1,1
DAS	Pils	10	21,7	15,4
	Schwarzbier	50	70,7	18,9
	Weißbier	100	72,9	6,4
Trichothecin	Pils	10	48,1	29,6
	Schwarzbier	50	66,7	12,4
	Weißbier	100	72,7	5,2
VOL	Pils	10	103,3	6,6
	Schwarzbier	50	91,7	18,5
	Weißbier	100	66,7	11,2
NEO	Pils	10	94,7	1,41
	Schwarzbier	50	95,4	7,65
	Weißbier	100	86,0	8,97
FusX	Pils	10	87,8	6,4
	Schwarzbier	50	79,1	6,4
	Weißbier	100	73,6	11,4
15-AcDON	Pils	10	92,5	4,9
	Schwarzbier	50	77,9	4,7
	Weißbier	100	72,4	7,4
3-AcDON	Vollbier Pils	10	140,8	1,8
	Schwarzbier	50	93,3	5,4
	Weißbier	100	85,3	6,8
NIV	Pils	10	3,3	0,0
	Schwarzbier	50	3,0	9,1
	Weißbier	100	2,9	7,2

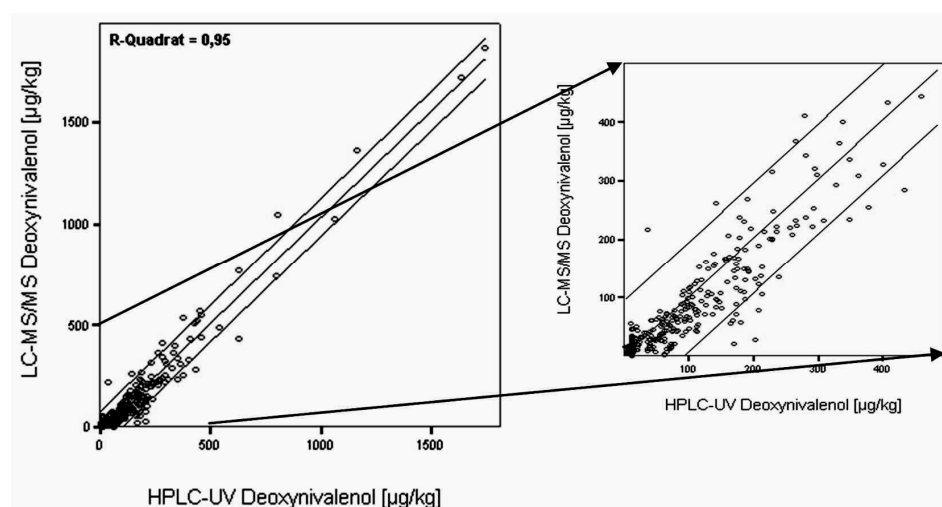
Tab. A-17: ANOVA-Berechnung Bieruntersuchung

Ergebnis der ANOVA-Analyse für die Einzeltage				
Gruppen	Anzahl	Summe	Mittelwert	Varianz
Tag 1	10	343	34,3	12,38
Tag 2	10	353,9	35,39	18,37
Tag 3	10	348,6	34,86	11,12

ANOVA						
Streuungs- ursache	Quadrat- summen (SS)	Freiheits- grade (df)	Mittlere Quad- ratsumme (MS)	Prüfgröße (F)	P-Wert	kritischer F-Wert
Unterschiede zwischen den Gruppen	5,942	2	2,971	0,21290533	0,80957656	3,354131195
Innerhalb der Gruppen	376,773	27	13,9545556			
Gesamt	382,715	29				

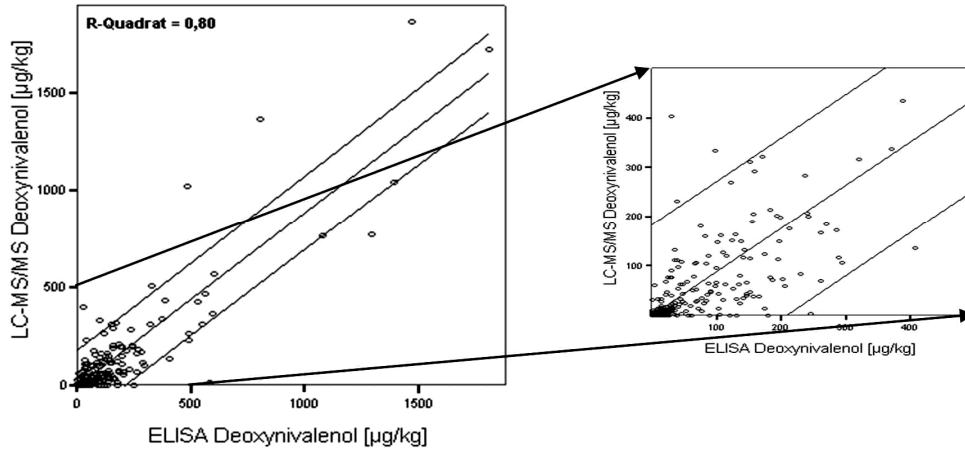
Tab. A-18: Vorperioden für die DON- und ZEA-ELISA-Qualitätskontrollkarten

		DON 311 [µg/kg]	ZEA 185 [µg/kg]
n		14	12
Mittelwert		326,6	36,3
Median		303,2	35,4
sr	[µg/kg]	85,8	5,5
2 s Bereich		171,6	11,0
3 s Bereich		256,5	16,5
r	[µg/kg]	242,7	15,5
RSDr	[%]	26,3	15,2
sr (Horwitz)	[µg/kg]	61,8	9,57
RSDr (Horwitz)	[%]	18,9	26,36
Ho _r		1,4	0,6

Abb. A-1: Kreuzvalidierung für die DON-Bestimmung zwischen LC-MS/MS und HPLC-UV mit einem Vorhersageintervall von 95 % ($LC-MS/MS=20,32+0,91 \cdot HPLC-UV$)

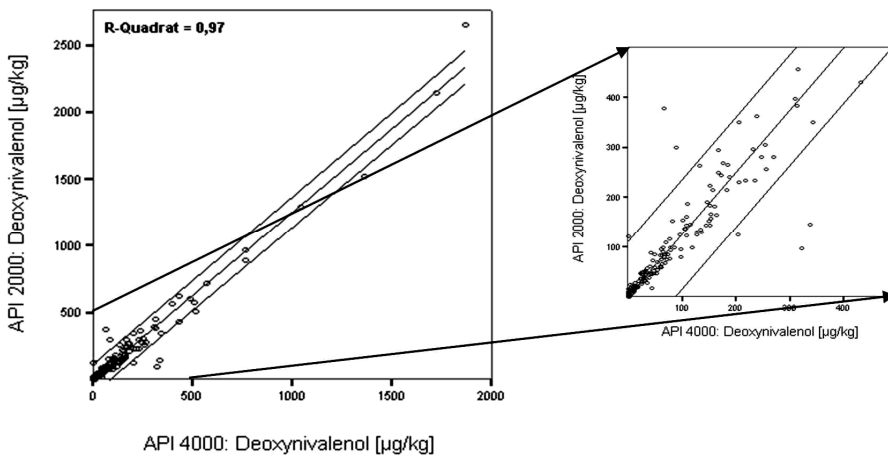
n = 356	Regressionsgerade	Untere 95 %	Obere 95 %
Abszissenabschnitt	20,32	15,26	25,40
Steigung	0,91	0,88	0,93
Korrelationskoeffizient: 0,97		Bestimmtheitsmaß: 0,95	

Abb. A-2: Kreuzvalidierung für die DON-Bestimmung zwischen ELISA und LC-MS/MS mit einem Vorhersageintervall von 95 %



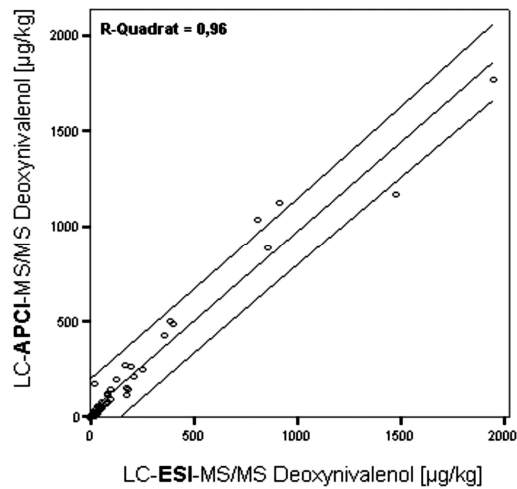
n = 313	Regressionsgerade	Untere 95 %	Obere 95 %
Abszissenabschnitt	24,22	13,11	35,34
Steigung	0,90	0,85	0,95
Korrelationskoeffizient: 0,89		Bestimmtheitsmaß: 0,80	

Abb. A-3: Kreuzvalidierung für die DON-Bestimmung mittels LC-APCI-MS/MS zwischen API 2000 und API 4000 mit einem Vorhersageintervall von 95 % API2000=0,19+1,25·API4000



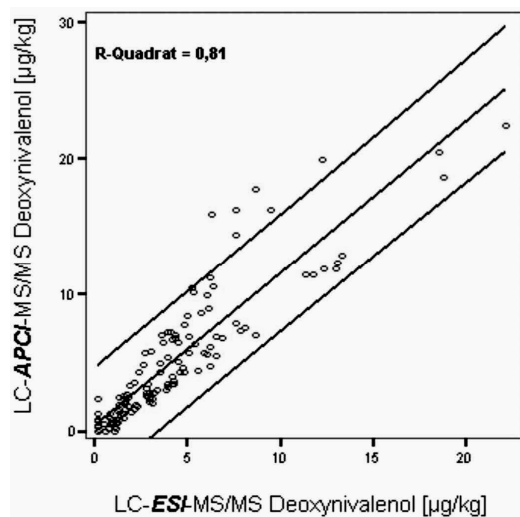
n = 194	Regressionsgerade	Untere 95 %	Obere 95 %
Abszissenabschnitt	0,19	-8,67	9,05
Steigung	1,25	1,21	1,28
Korrelationskoeffizient: 0,98		Bestimmtheitsmaß: 0,97	

Abb. A-4: Kreuzvalidierung für die DON-LC-MS/MS-Bestimmung der ASE-Multi-Trichothecen-Methode mittels den ESI- und APCI-Ionisierungstechniken mit einem Vorhersageintervall von 95 %



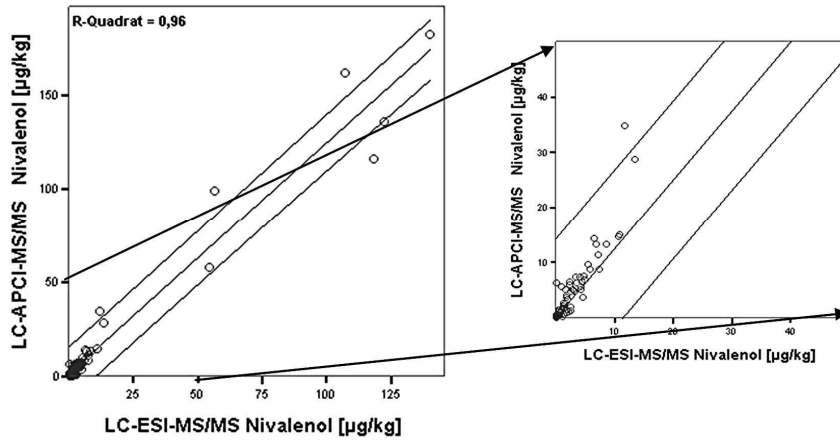
n = 43	Regressionsgerade	Untere 95 %	Obere 95 %
Abszissenabschnitt	31,25	2,24	60,26
Steigung	0,94	0,88	1,00
Korrelationskoeffizient: 0,98		Bestimmtheitsmaß: 0,96	

Abb. A-5: Kreuzvalidierung für die DON LC-MS/MS-Bestimmung in Bier zwischen der ESI- und der APCI-Ionisierungstechnik bei einem Vorhersageintervall von 95 %. APCI=1,13 ESI+040



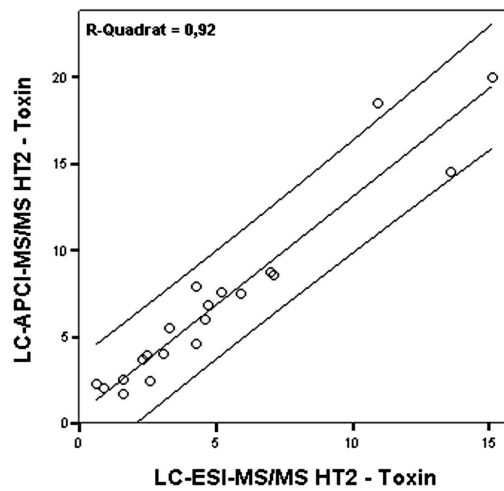
n = 126	Regressionsgerade	Untere 95 %	Obere 95 %
Abszissenabschnitt	0,40	-0,158	0,959
Steigung	1,13	1,028	1,226
Korrelationskoeffizient: 0,90		Bestimmtheitsmaß: 0,81	

Abb. A-6: Kreuzvalidierung für die NIV LC-MS/MS-Bestimmung zwischen der ESI- und der APCI-Ionisierungstechnik bei einem Vorhersageintervall von 95 %. $APCI=1,23 \cdot ESI+1,47$



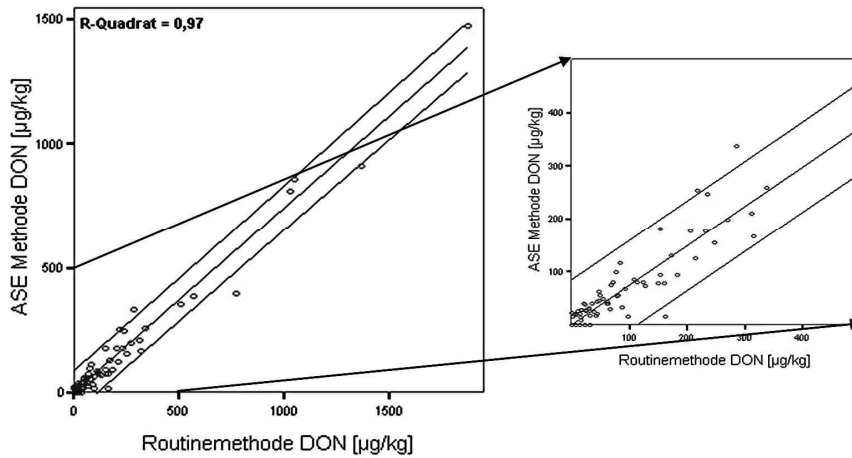
n = 74	Regressionsgerade	Untere 95 %	Obere 95 %
Abszissenabschnitt	1,47	-0,27	3,20
Steigung	1,23	1,17	1,29
Korrelationskoeffizient: 0,98		Bestimmtheitsmaß: 0,96	

Abb. A-7: Kreuzvalidierung für die HT-2 Toxin LC-MS/MS-Bestimmung zwischen der ESI und APCI-Ionisierungstechnik bei einem Vorhersageintervall von 95 %. $APCI=1,30 \cdot ESI+0,57$



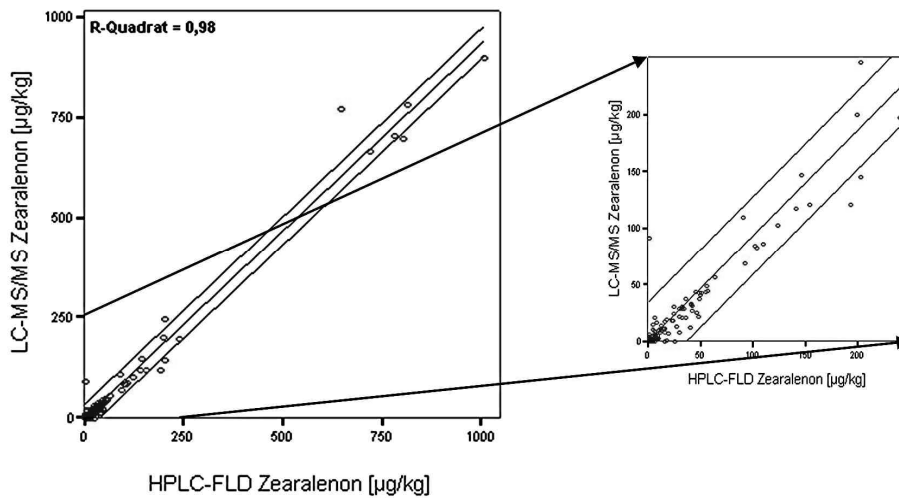
n = 21	Regressionsgerade	Untere 95 %	Obere 95 %
Abszissenabschnitt	0,23	-0,28	0,74
Steigung	1,30	1,19	1,40
Korrelationskoeffizient: 0,98		Bestimmtheitsmaß: 0,95	

Abb. A-8: Kreuzvalidierung für die DON LC-MS/MS-Bestimmung zwischen der DON Routineanalytik und der ASE-Multi-Trichothece-Methode bei einem Vorhersageintervall von 95 %



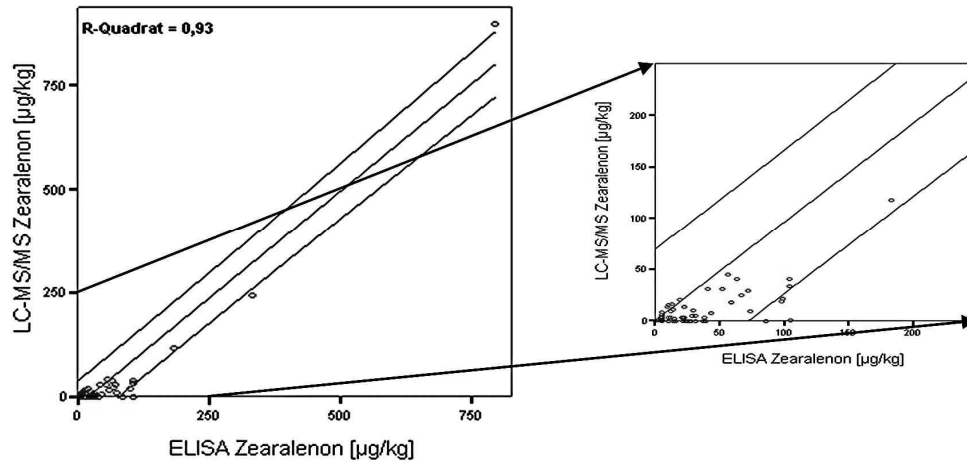
n = 79	Regressionsgerade	Untere 95 %	Obere 95 %
Abszissenabschnitt	3,05	-7,97	14,06
Steigung	0,75	0,71	0,77
Korrelationskoeffizient: 0,98		Bestimmtheitsmaß: 0,97	

Abb. A-9: Kreuzvalidierung für die ZEA-Bestimmung zwischen HPLC-FLD und LC-ESI-MS/MS (API 4000) bei einem Vorhersageintervall von 95 %. LC-MS/MS=2,69+1,05·FLD



n = 200	Regressionsgerade	Untere 95 %	Obere 95 %
Abszissenabschnitt	2,69	0,03	5,34
Steigung	1,05	1,03	1,07
Korrelationskoeffizient: 0,99		Bestimmtheitsmaß: 0,98	

Abb. A-10: Kreuzvalidierung für die ZEA-Bestimmung zwischen ELISA und LC-MS/MS bei einem Vorhersageintervall von 95 % LC-MS/MS=21,57+0,90·ELISA



n = 71	Regressionsgerade	Untere 95 %	Obere 95 %
Abzissenabschnitt	21,57	14,89	28,25
Steigung	0,90	0,84	0,96
Korrelationskoeffizient: 0,96		Bestimmtheitsmaß: 0,93	

Tab. A-19: Fragmentierung von Typ A und Typ B Trichotheenen

Verbindung Mono Isotopenmasse	Ionisierung	Basis-Peak [100 %]	Vorherrschende Monoisotopen Ion in % des Basis Peaks
NIV 312,121	ESI, positiv	336	247 (40), 381 (30), 189 (30), 277 (30)
	APCI, positiv	313	205 (5), 247 (50), 253 (20), 265 (30), 277 (15), 283 (20), 295 (65), 309 (10), 327 (35)
	ESI, positiv ESI, negativ	205 281	313 (59), 295 (14), 277(21), 265 (22), 247 (57), 229 (60), 175 (89), 125 (64) 311 (61), 263 (5), 243 (10), 205 (7), 187 (7), 175 (31)
FusX 354,132	ESI, positiv	247	229 (70), 205 (70), 337 (70), 355 (70), 418 (70)
	APCI, positiv	355	307 (5), 325 (5), 337 (15), 355 (32), 337 (21), 319 (6), 295 (12), 277 (33), 247 (86), 229 (86), 205 (76), 201 (61), 137 (43)
	ESI, positiv ESI, negativ	175 353	331 (6), 293 (10), 263 (65), 245 (9), 233 (9), 215 (7), 205 (24)
DON 296,126	ESI, positiv	231	249 (95), 297 (60), 203 (55)
	APCI, positiv	297	231 (5), 249 (25), 261 (10), 267 (15), 279 (20)
	ESI, positiv	249	279 (93), 261 (47), 231 (50), 203 (33)
DOM-1 280,135	ESI, positiv	233	281 (64), 263 (17), 245 (34), 227 (36), 215 (85), 199 (44), 137 (61), 109 (66)
3-AcDON 338,137	ESI, positiv	231	213 (75), 203 (55), 175 (50), 279 (40), 137 (38)
	APCI, positiv	339	279 (10), 311 (10), 321 (5)
	ESI, positiv ESI, negativ	231 307	339 (39), 321 (10), 291 (26), 279 (23), 261 (23), 249 (17), 213 (33), 203 (59) 337 (80), 295 (6), 277 (18), 247 (26), 217 (19), 173 (50)
15-AcDON 338,137	ESI, positiv	261	361(50),321(48),231(42),361(40)
	APCI, positiv	339	231 (5), 249 (10), 261 (90), 279 (20), 291 (10), 321 (45), 356 (15)
	ESI, positiv ESI, negativ	261 113	339 (18), 321 (98), 297 (38), 279 (33), 249 (31), 231 (61), 213 (23), 203 (37), 137 (88) 337 (63), 319 (6), 307 (8), 291 (5), 277 (15), 135 (14)
	15-AcSCP 324,157	ESI, positiv	306
	ESI, positiv	325	343 (5), 307 (11), 279 (4), 265 (71), 247 (5)

Fortsetzung Tab. A-19: Fragmentierung von Typ A und Typ B Trichothecen

Verbindung Mono Isotopenmasse	Ionisierung	Basis- Peak [100 %]	Vorherrschende Monoisotopen Ion in % des Basis Peaks
DAS 366,167	ESI, positiv	307	289 (90), 247 (60), 299 (55), 349 (52)
	APCI, positiv	367	307 (10), 349 (45), 384 (30)
	ESI, positiv	367	349 (45), 307 (48), 289 (8), 247 (16), 229 (10), 201 (6)
3-AcDAS 408,178	ESI, positiv	431	229 (50), 247 (38), 201 (30), 289 (20)
	ESI, positiv	349	409 (24), 391 (4), 367 (17), 307 (40), 289 (54), 247 (94), 229 (53), 211 (17), 201 (38)
NEO 382,162	ESI, positiv	405	245 (90), 400 (60), 215 (60), 395 (45)
	APCI, positiv	335	197(5), 215 (15), 245 (15), 275 (15), 287 (5), 293(5), 305 (45), 323 (10), 337 (35), 365 (40), 383 (15), 397 (15),
	ESI, positiv	383	365 (33), 323 (29), 305 (18), 275 (9), 245 (17), 215 (8)
T-2 Triol 382,199	ESI, positiv	145	215(98), 400(45), 169(75), 159(72), 187(70)
	APCI, positiv	383	215 (5), 233 (5), 281 (5)
	ESI, positiv	383	315 (64), 301 (43), 285 (16), 247 (77), 233 (52), 215 (16), 165 (30)
HT-2 Toxin 424,209	ESI, positiv	263	245(60), 215(55), 442(30), 197(30)
	APCI, positiv	425	245 (5), 263 (10), 323 (10), 355 (10), 442 (20)
	ESI, positiv	425	407 (32), 365 (6), 323 (9), 289 (20), 263 (43), 245 (22), 233 (24), 215 (36)
T-2 Toxin 466,220	ESI, positiv	489	215 (55), 305 (45), 484 (38), 245(35)
	APCI, positiv	335	197 (5), 215 (15), 227 (5), 245 (20), 257 (5), 275 (10), 287 (5), 305 (45), 337 (40), 365 (50), 397 (35), 467 (65), 484(40)
	ESI, positiv	305	467 (48), 449 (9), 407 (7), 365 (27), 275 (17), 257 (30), 245 (68), 215 (51), 197 (19), 185 (24)
d ₃ -T2-Toxin 470,5	ESI, positiv	308	471 (62), 453 (12), 368 (26), 275 (16), 245 (84), 227 (18), 215 (53), 197 (26)
T2-Tetraol 298,141	ESI, positiv	299	281 (23), 263 (20), 251 (10), 245 (9), 233 (13), 215 (17)
VOL 266,151	ESI, positiv	231	159 (70), 249 (70), 185 (70), 330 (30), 308 (25)
	APCI, positiv	299	219 (5), 231 (5), 249 (45), 267 (35), 281 (40)
		267	249 (55), 237 (4), 231 (24), 219 (14), 213 (7), 203 (5), 185 (4)
Trichothecin 332,162	ESI, positiv	211	229 (70), 201(65), 159 (60), 333 (20)
	ESI, positiv ESI, negativ	333 135	247 (52), 229 (69), 217 (6), 211 (67), 203 (22), 201 (31) 331 (4), 263 (29), 245 (24), 215 (37), 201 (17), 189 (86), 187 (13)

Tab. A-20: Fragmentierung von Zearalenon, Zearalanon, α - β -Zearalanol, α - β -Zearalenol und d_4 - β -Zearalenol

Verbindung Mono Isotopen- masse	Ionisierung	Basis- Peak [100 %]	Vorherrschende Monoisotopen Ion in % des Basis Peaks
α -ZAL 322,178	ESI, positiv	305	287 (30), 261 (10), 207 (8)
	APCI, negativ	277	321 (35), 259 (36), 205 (41), 189 (53), 177 (30), 161 (92), 145 (38), 135 (76), 122 (50), 107 (68)
	ESI, positiv	305	323 (4), 287 (59), 277 (29), 269 (19), 261 (17), 207 (24), 167 (44)
β -ZAL 322,178	ESI, positiv	305	287 (28), 167 (10), 277 (10)
	APCI, negativ	161	321 (22), 277 (58), 259 (30), 205 (48), 189 (50), 175 (30), 145 (44), 133 (98), 122 (76), 107 (89)
	ESI, positiv	305	323 (1), 287 (61), 277 (47), 269 (21), 261 (9), 207 (28), 167 (41)
ZAN 320,162	ESI, positiv	303	321 (22), 277 (5)
	APCI, negativ	161	319 (20), 275 (30), 233 (26), 205 (90), 189 (20), 149 (38), 137 (54), 107 (86)
	ESI, positiv	302	321 (3), 285 (3), 207 (16), 189 (22)
α -ZOL 320,162	ESI, positiv	285	303 (35), 267 (20), 257 (10)
	APCI, negativ	160	319 (24), 187 (42), 174 (57), 144 (44), 130 (72)
	ESI, positiv	285	321 (13), 303 (30), 267 (64), 257 (14), 177 (25)
β -ZOL 320,162	ESI, positiv	285	267 (52), 229 (40), 303 (40)
	APCI, negativ	130	319 (12), 188 (50), 174 (54), 160 (98), 144 (53)
	ESI, positiv	285	321 (25), 303 (66), 267 (25), 259 (10)
ZEA 318,147	ESI, positiv	301	283 (92), 319 (35)
	APCI, negativ	131	317 (21), 187 (32), 175 (98), 160 (35), 149 (36)
	ESI, positiv	319	301 (44), 283 (72), 265 (20), 231 (31), 187 (36)
β -ZOL- d_4 324,17	ESI, positiv	288	325 (3), 307 (21), 270 (67), 232 (36), 217 (40)

10 Abkürzungen und Akronyme

15-AcDON	15-Acetyl-4-deoxynivalenol
15-AcSCP	15-Acetoxy-scirpenetriol
3-AcDON	3-Acetyl-4-deoxynivalenol
3- α -AcDAS	3- α -Acetyldiacetoxy-scirpenol
ANOVA	Analysis of Variance
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization (Chemische Ionisation unter Atmosphärendruck)
APPI	Atmospheric Pressure Photo Ionization (Photo Ionisation unter Atmosphärendruck)
ASE	Beschleunigte Lösungsmittlextraktion
ATA	Alimentäre Toxische Aleukie
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BgVV	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
BMVEL	Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft (inzwischen: Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz; BMELV)
CAD	Collision Activated Dissociation
CI	Chemical Ionization (Chemische Ionisation)
CID	Collision Induced Dissociation
CRM	Certified Reference Material (Zertifiziertes Referenzmaterial)
CUR	Curtain Gas (Vorhang Gas)
DAD	Dioden Array Detektor
DAS	4,15-Diacetoxy-scirpenol
DOM-1	Deepoxydeoxynivalenol
DON	4-Deoxynivalenol
EFSA	European Food Safety Authority
EI	Electron Impact
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay (Enzymimmunotest)
ER	Estrogen receptor (Östrogen Rezeptor)
ESI (TISP)	Elektrospray Interface (Turboionen-Spray)
EU	Europäische Union
F.	Fusarium
FAO	Food and Agriculture Organisation of the United Nations
FDA	Food and Drug Administration, USA
FHB	<i>Fusarium</i> Head Blight
FLD	Fluoreszenzdetektor
FSA	Food Standards Agency, UK
FusX	Fusarenon X
G	Schleuderziffer
GC	Gaschromatographie
GC-ECD	Kopplung der Gaschromatographie mit einem Elektroneneinfang-Detektor
GC-MS	Kopplung der Gaschromatographie mit einem Massenspektrometer
GEMS	Global Environment Monitoring System
Ho	Horrat-Wert
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPTLC	Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie
HRP	Meerrettichperoxidase
IAC	Immunoaffinitätschromatographie
IARC	International Agency for Research on Cancer, USA
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
i. v.	intravenöse Injektion
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives

KG	Körpergewicht
Korr.koeff.	Pearsonscher Korrelationskoeffizient
LC-MS	Kopplung der Flüssigkeitschromatographie mit einem Massenspektrometer
LC-MS/MS	Kopplung der Flüssigkeitschromatographie mit einem Tandem Massenspektrometer
LD ₅₀	Letale Dosis bei 50 % der Versuchstiere; Maß für die akute Toxizität
LMBG	Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz, abgelöst durch das Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB)
MAE	Microwave Assisted Extraction (Mikrowellenunterstützte Extraktion)
MAS	Monoacetoxyscirpenol
MED	Minimale Brechreiz Dosis
MF	Moniliformin
MIP	Molecular Imprinted Polymers
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem Massenspektrometrie
MG	Molekular Gewicht
MW	Mittelwert
m/z	Masse/Ladungs-Verhältnis
Δm	Massendifferenz
MRM	Multiple Reaction Monitoring
n	Anzahl
NEO	Neosolaniol
NHEL	No Hormone Effect Level
NIV	Nivalenol
NOAEL	No observed averese effect level (maximale Dosis einer Substanz, bei der noch kein schädlicher Effekt beobachtet werden kann)
NOEL	No effect Level: maximale Dosis ohne toxische Folgen
NVS	Nationale Verzehrsstudie
NWG	Nachweisgrenze
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
r	Wiederholbarkeit
R	Vergleichbarkeit
r ²	Bestimmtheitsmaß
RIVM	National Institute for Public Health and the Environment, NL
RSD	relative Standardabweichung
RSD _r	relative Standardabweichung unter Wiederholbarkeitsbedingungen
RSD _R	relative Standardabweichung unter Vergleichbarkeitsbedingungen
RAL	Resorcylsäurelacton
RIVM	Rijksintituut voor Volksgezondheid en Milieu; NL
s _r	Standardabweichung unter Wiederholbarkeitsbedingungen
s _R	Standardabweichung unter Vergleichbarkeitsbedingungen
SCF	Scientific Committee on Food
SCOOP	Scientific Cooperation Task
SFE	Supercritical Fluid Extraction (Extraktion mit überkritischem Gas)
SIM	Selected Ion Monitoring (Scannen einzelner Massenspuren)
S/N	Signal-to-noise (Signal/Rausch-Verhältnis)
SPE	Solid Phase Extraction (Festphasenextraktion)
SRM	Single Ion Monitoring (Aufnahme einer einzelnen Massenspur)
STABW	Standardabweichung
TDI	Tolerable daily intake (Tolerierbare tägliche Aufnahme)
TLC	Thin Layer Chromatography (Dünnschichtchromatographie)
UNEP	United Nation Environment Programm
US NTP	National Toxicology Program United States of America
UV/VIS	UV/VIS-spektralphotometrischer Detektor

VOL	Verrucarol
VFV	Verbundforschungsvorhaben
VO	Verordnung
Wdf.	Wiederfindung
WHO	World Health Organisation
ZAN	Zearalanon
ZEA	Zearalenon
ZEBS	Zentrale Erfassungs- und Bewertungsstelle für Umweltchemikalien des Bundesgesundheitsamtes
α -ZAL	α -Zearalanol
α -ZOL	α -Zearalenol
β -ZAL	β -Zearalanol
β -ZOL	β -Zearalenol

11 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Fusarium Weißährigkeit am Beispiel Weizen	16
Abb. 2:	Fusarium Mais-Kolbenfäule. Weißes (<i>F. poae</i>) bis rosa-purpur gefärbtes (<i>F. graminearum</i>), filzig wolliges Myzel	17
Abb. 3:	Grundstruktur der Typ B Trichothecene: 12,13-Epoxy-trichothec-9-en (nach Cole et al. (2003)); siehe Anhang Abschnitt I, Tab. A-1)	18
Abb. 4:	Grundstruktur der Typ A Trichothecene: 12,13-Epoxy-trichothec-9-en (nach Cole et al. (2003)); siehe Anhang Abschnitt I, Tab. A- 2)	18
Abb. 5:	Strukturformeln von Zearalenon und dessen Biotransformationsprodukten	19
Abb. 6:	Verteilung von DON in unterschiedlichen Maisfraktionen (Hazel und Patel (2004))	40
Abb. 7:	Verteilung des Untersuchungsmaterials nach ZEBS-Warengruppen	54
Abb. 8:	Schematischer Aufbau einer ASE-Apparatur (in Anlehnung an Dionex)	57
Abb. 9:	ASE-Extraktionskartusche mit Aktivkohle und einer Vollkorn-Hartweizen- Probe nach einer Extraktion	58
Abb. 10:	Optimierung der Extraktionstemperatur unter Verwendung des Vergleichsmaterials DON 311 (n=2)	58
Abb. 11:	Optimierung der statischen Extraktionszyklenzahl (n=2)	59
Abb. 12:	ASE Probengefäße mit Probenextrakten nach Extraktion ohne Aktivkohleaufreinigung (obere Reihe) und mit Aktivkohleaufreinigung (untere Reihe)	60
Abb. 13:	Schematische Darstellung zum Prinzip der Gelpermeationschromatographie	65
Abb. 14:	GPC-Fraktionierung von Zearalenon in natürlich kontaminierten Speiseölproben	66
Abb. 15:	GPC-Fraktionierung von Typ A und Typ B Trichothecenen in einer gespikten Maiskeimölprobe	67
Abb. 16:	Schematische Darstellung der Aufreinigung mittels IAC-Säulen	68
Abb. 17 :	Qualitätskontrollkarte zur Stabilitätsuntersuchung des Vergleichsmaterials ZEA 185	78
Abb. 18:	Qualitätskontrollkarte zur Stabilitätsuntersuchung des Vergleichsmaterials DON 311	78
Abb. 19:	Qualitätskontrollkarte zu den Laborvergleichsuntersuchungen des Vergleichsmaterials DON 311	79
Abb. 20:	Qualitätskontrollkarte der Laborvergleichsuntersuchung des Vergleichsmaterials ZEA 185	80
Abb. 21:	Verteilung der Partikelgröße von DON 311 nach Zerkleinerung und Homogenisierung mittels RETSCH® Zentrifugalmühle (n = 3)	85
Abb. 22:	Verteilung der DON-Konzentrationen der einzelnen Siebfractionen des Vergleichsmaterials DON 311 (n = 3) nach Zerkleinerung und Homogenisierung mittels RETSCH® Zentrifugalmühle	85

Abb. 23:	Relative Verteilung der Partikelgröße einer Maisgrieß-Probe in der handelsüblichen Angebotsform und nach Vermahlung und Homogenisierung mittels RETSCH® Zentrifugalmühle (n = 3)	86
Abb. 24:	Korrelation zwischen der Hauptwellenlänge 218 nm und der Bestätigungswellenlänge 236 nm anhand dual-UV-Detektor bei einem Vorhersageintervall von 95 % (Korrelationskoeffizient von 0,999; n = 50)	91
Abb. 25:	HPLC-dual-UV Chromatogramm der Wellenlängen 218 nm und 236 nm bei einer natürlich kontaminierten Vollkorn Hartweizengrieß Teigware (629 µg/kg)	92
Abb. 26:	LC-ESI-MS/MS MRM-Overlay-Chromatogramm einer natürlich kontaminierten Vollkorn-Hartweizengrieß-Teigware (629 µg/kg)	93
Abb. 27:	HPLC-FLD-Chromatogramm einer Maisgrießprobe aufgestockt mit Zearalenon und dessen Derivaten (je 100 µg/kg)	94
Abb. 28:	MRM-Overlay-Chromatogramm (LC-ESI-MS/MS) einer aufgestockten Maismehlprobe (je 100 µg/kg)	95
Abb. 29:	Bestimmung der Nachweisgrenze von Zearalenon und α -Zearalenol mittels „Signal zu Rausch“-Methode	95
Abb. 30:	MRM-Overlay-Chromatogramm (LC-APCI-MS/MS) von DON einer natürlich kontaminierten Säuglings- und Kleinkindernahrungs-Probe (Vollkorn Fruchtbrei: 3,7 µg/kg)	97
Abb. 31:	MRM-Overlay-Chromatogramm (LC-ESI-MS/MS) von Zearalenon einer natürlich kontaminierten Säuglings- und Kleinkindernahrungs-Probe (Obstbrei: 3,8 µg/kg)	98
Abb. 32:	MRM-Overlay-Chromatogramm (LC-ESI-MS/MS) einer Vollmilchprobe aufgestockt mit 50 µg/L	100
Abb. 33:	HPLC-FLD-Chromatogramm einer Vollmilchprobe aufgestockt mit 50 µg/L	100
Abb. 34:	Darstellung ausgewählter Wiederfindungsfunktionen von Typ A und Typ B Trichotheceinen der ASE-Multi-Trichotheceinen-Methode	102
Abb. 35:	MRM-Overlay-Chromatogramm (LC-APCI-MS/MS) einer aufgestockten Weizenmehl-Probe (je 100 µg/kg)	103
Abb. 36:	Bestimmung der Nachweisgrenze mit der „Signal zu Rausch“-Methode für T-2 Toxin	105
Abb. 37:	HPLC-UV-Chromatogramm des Vergleichsmaterials DON 311 nach Aufarbeitung der ASE-Multi-Trichotheceinen-Methode bei einer Wellenlänge von 218 nm	107
Abb. 38:	HPLC-UV-Chromatogramm des Vergleichsmaterials DON 311 nach Aufarbeitung der ASE-Multi-Trichotheceinen-Methode und IAC-Aufreinigung bei einer Wellenlänge von 218 nm	107
Abb. 39:	Matrixkalibrierung (LC-ESI-MS/MS) von DON mittels Mais- bzw. Müsli-Matrix (die Kalibrationsfunktion wurde mittels externer Kalibration erstellt)	109
Abb. 40:	Matrixkalibrierung (LC-ESI-MS/MS) von DON mittels Mais- bzw. Müsli-Matrix (Die Kalibrationsfunktion wurde mittels Interner Kalibration erstellt.)	109

Abb. 41:	Matrixkalibrierung (LC-APCI-MS/MS) von T-2 Toxin mittels Mais- bzw. Müsli-Matrix (Die Kalibrationsfunktion wurde mittels externer Kalibration erstellt.)	110
Abb. 42:	Matrixkalibrierung (LC-APCI-MS/MS) von T-2 Toxin mittels Mais- bzw. Müsli-Matrix (die Kalibrationsfunktion wurde mittels Interner Kalibration erstellt)	110
Abb. 43:	HPLC-FLD-Overlay-Chromatogramm einer natürlich kontaminierten Maiskeimölprobe mit (schwarz) und ohne (rot) anschließender Aufreinigung über IAC	114
Abb. 44:	MRM-Overlay-Chromatogramme (LC-ESI-MS/MS) einer natürlich kontaminierten Maiskeimölprobe mit ausschließlicher GPC-Aufreinigung (oberes Chromatogramm) und mit nachgeschalteter ZEA-IAC-Säulen-Aufreinigung (unteres Chromatogramm)	114
Abb. 45:	MRM-Overlay-Chromatogramm (LC-APCI-MS/MS) einer natürlich kontaminierten, kaltgepressten Hanfölprobe	116
Abb. 46:	MRM-Overlay-Chromatogramm (LC-APCI-MS/MS) einer aufgestockten Schwarzbier-Probe (50 µg/L je Toxin) nach einfacher Extrelut Aufreinigung	118
Abb. 47:	Overlay-Chromatogramm (HPLC-dual-UV) einer natürlich kontaminierten Bier-Probe (Hefeweizenbier, hell) nach Aufreinigung mittels Extrelut und anschließender IAC-Säule	119
Abb. 48:	Qualitätskontrollkarte der DON-ELISA mit Vergleichsmaterial DON 311	120
Abb. 49:	Qualitätskontrollkarte der ZEA-ELISA mit Vergleichsmaterial ZEA 185	121
Abb. 50:	Vergleich der FSA-DON-Methode, DON-Routine-Methode und ASE-Multi-Trichothecen-Methode anhand des Vergleichsmaterials DON 311 (n = 12)	122
Abb. 51:	Strukturformel von d3-T-2 Toxin entsprechend den Produktspezifikation der Fa. Sigma-Aldrich®.	127
Abb. 52:	Massenspektrum von d3-T-2 Toxin erstellt im Product-Ionen-Scan-Modus	127
Abb. 53:	Massenspektrum von T-2 Toxin erstellt im Product-Ionen-Scan-Modus	128
Abb. 54:	Massenspektrum von HT-2 Toxin erstellt im Product-Ionen-Scan-Modus	129
Abb. 55:	Massenspektrum von ZEA erstellt im Product-Ionen-Scan-Modus	130
Abb. 56:	Massenspektrum von d4-β-Zearalenol erstellt im Product-Ionen-Scan-Modus	130
Abb. 57:	Massenspektrum von β-Zearalenol erstellt im Product-Ionen-Scan-Modus	131
Abb. 58:	DON-Belastung in Bieren	133
Abb. 59:	DON-Belastung in verschiedenem Getreide	134
Abb. 60:	DON-Belastung in verschiedenen Getreidemehlen und -grießen	135
Abb. 61:	DON-Belastung in Zerealien	136
Abb. 62:	DON-Belastung in verschiedenen Teigwaren	137
Abb. 63:	Aufnahmemenge von DON durch den deutschen Verbraucher	139
Abb. 64:	ZEA-Belastung in Getreidemehl	140

Abb. 65:	ZEA-Belastung in pflanzlichen Speiseölen	141
Abb. 66:	ZEA-Belastung von Säuglings- und Kleinkindernahrung bezogen auf die handelsübliche Angebotsform	142
Abb. 67:	ZEA-Belastung von Säuglings- und Kleinkindernahrung bezogen auf die Trockenmasse	142
Abb. 68:	T-2 Toxin-Belastung ausgewählter Lebensmittelgruppen	144
Abb. 69:	HT-2 Toxin-Belastung ausgewählter Lebensmittelgruppen	144
Abb. 70:	Schematischer Vergleich zwischen der konventionellen Trichothecen-Analytik und der neu entwickelten ASE-Multi-Trichothecen-Analytik	149
Abb. A-1:	Kreuzvalidierung für die DON-Bestimmung zwischen LC-MS/MS und HPLC-UV mit einem Vorhersageintervall von 95 %	200
Abb. A-2:	Kreuzvalidierung für die DON-Bestimmung zwischen ELISA und LC-MS/MS mit einem Vorhersageintervall von 95 %	201
Abb. A-3:	Kreuzvalidierung für die DON-Bestimmung mittels LC-APCI-MS/MS zwischen API 2000 und API 4000 mit einem Vorhersageintervall von 95 %	201
Abb. A-4:	Kreuzvalidierung für die DON-LC-MS/MS-Bestimmung der ASE-Multi-Trichothecen-Methode mittels den ESI- und APCI-Ionisierungstechniken mit einem Vorhersageintervall von 95 %	202
Abb. A-5:	Kreuzvalidierung für die DON LC-MS/MS-Bestimmung in Bier zwischen der ESI- und der APCI-Ionisierungstechnik bei einem Vorhersageintervall von 95 %. APCI=1,13 ESI+040	202
Abb. A-6:	Kreuzvalidierung für die NIV LC-MS/MS-Bestimmung zwischen der ESI- und der APCI-Ionisierungstechnik bei einem Vorhersageintervall von 95 %. APCI=1,23·ESI+1,47	203
Abb. A-7:	Kreuzvalidierung für die HT-2 Toxin LC-MS/MS-Bestimmung zwischen der ESI und APCI-Ionisierungstechnik bei einem Vorhersageintervall von 95 %.	203
Abb. A-8:	Kreuzvalidierung für die DON LC-MS/MS-Bestimmung zwischen der DON Routineanalytik und der ASE-Multi-Trichothecen-Methode bei einem Vorhersageintervall von 95 %	204
Abb. A-9:	Kreuzvalidierung für die ZEA-Bestimmung zwischen HPLC-FLD und LC-ESI-MS/MS (API 4000) bei einem Vorhersageintervall von 95 %. LC-MS/MS=2,69+1,05·FLD	204
Abb. A-10:	Kreuzvalidierung für die ZEA-Bestimmung zwischen ELISA und LC-MS/MS bei einem Vorhersageintervall von 95 % LC-MS/MS=21,57+0,90·ELISA	205

12 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Zusammenhang zwischen produziertem Mykotoxin und der Pilzgattung	15
Tab. 2:	Abgeleitete NOAEL's für DON (Schlatter et al. (2004))	21
Tab. 3:	Abgeleitete orale LOAEL's für NIV (Schlatter et al. (2004))	23
Tab. 4:	Abgeleitete LOAEL's und NOAEL's für T-2 Toxin (Schlatter (2004))	25
Tab. 5:	Zusammenfassung von weltweiten Regelungen und Gesetzgebung für T-2 Toxin und HT-2 Toxin mit Angabe der Lebensmittelgruppe und der festgelegten Höchstmenge	34
Tab. 6:	Zusammenfassung von weltweiten Regelungen und Gesetzgebung für Deoxynivalenol mit Angabe der Lebensmittelgruppe und der festgelegten Höchstmenge	35
Tab. 7:	Zusammenfassung von weltweiten Regelungen und Gesetzgebung für Zearalenon mit Angabe der Lebensmittelgruppe und der festgelegten Höchstmenge	36
Tab.8:	Welt- und europaweite Belastungssituatuon durch Fusarientoxine (Bottalco (1998))	37
Tab. 9:	Zearalenon enthaltende Fraktionen nach einem Nassvermahlungs-Prozess (Bennett und Anderson (1978))	40
Tab. 10:	Veränderung von Trichothecenen in den einzelnen Prozessschritten der Bierherstellung (Hazel und Patel (2004))	43
Tab. 11:	Analytik von Zearalenon und Derivaten mittels LC-MS bzw. LC-MS/MS	51
Tab. 12:	Modifizierung der ASE-Multi-Trichothecen-Methode mit unterschiedlichen Aktivkohle-, Aluminiumoxid- und Celite-Mischungen	61
Tab. 13:	Gegenüberstellung des Extraktions- und Aufreinigungsverhaltens von DON mit herkömmlicher und modifizierter Aktivkohle	62
Tab. 14:	Zusammenfassung der Extraktionsparameter der ASE-Multi-Trichothecen-Methode	62
Tab. 15:	Zusammenstellung von Methoden zur Bestimmung von ZEA in tierischen Sekreten und Geweben	65
Tab. 16:	Aufreinigungsparameter der verwendeten Größenausschlusschromatographie-Anlage	67
Tab. 17:	MRM-Ionen-Übergänge von Zearalenon und dessen Derivaten im positiven Ionisierungsmodus	73
Tab. 18:	MRM-Ionen-Übergänge von Typ A und Typ B Trichothecenen	74
Tab. 19:	Leistungskriterien für Fusarientoxine gemäß Richtlinie 2005/38/EG	75
Tab. 20:	Prüfung auf Homogenität der DON- bzw. ZEA-Vergleichsmaterialien	77
Tab. 21:	Zusammenfassung der Ergebnisse der Laborvergleichsuntersuchung mit Vergleichsmaterial DON 311 (n = 7)	79
Tab. 22:	Zusammenfassung der Ergebnisse der Laborvergleichsuntersuchung des Vergleichsmaterials ZEA 185 (n = 6)	81
Tab. 23:	Wiederhol- und Vergleichsstandardabweichungen unterschiedlicher Ringversuche bzw. Laborvergleichsuntersuchungen für DON	82

Tab. 24:	Wiederhol- und Vergleichsstandardabweichungen unterschiedlicher Ringversuche bzw. Laborvergleichsuntersuchungen für ZEA	82
Tab. 25:	Definierte Geräteeinstellungen für die Siebmaschine der Fa. RETSCH®	84
Tab. 26:	Gegenüberstellung der Partikelgrößen einer Maisgrieß-Probe in der handelsüblichen Angebotsform und der homogenisierten Labor-Teilprobe (n = 3)	86
Tab. 27:	Untersuchung der Kreuzreaktivität von DOM-1 an DON-IAC-Säulen (n = 2)	88
Tab. 28:	Untersuchung der Kreuzreaktivität von Typ B Trichothecenen an BIOPHARM® DON-IAC-Säulen ohne Matrix (n = 2)	88
Tab. 29:	Untersuchung der Kreuzreaktivität von Typ B Trichothecenen an BIOPHARM® DON-IAC-Säulen mit Matrix (n = 2)	88
Tab. 30:	Wiederfindung von Typ A Trichothecenen an VICAM® T-2 Toxin-IAC-Säulen ohne Matrix (n = 2)	89
Tab. 31:	Wiederfindung von Typ A Trichothecenen bei VICAM®-T-2 Toxin-IAC-Säulen mit Matrix ausgehend von Extrakten aus der ASE-Multi-Trichothecen-Methode (n = 2)	89
Tab. 32:	Wiederfindung von d3-T-2 Toxin an VICAM®-T-2 Toxin-IAC-Säulen ohne Matrix (n=3)	89
Tab. 33:	Untersuchung der Kreuzreaktivität von ZEA und dessen Derivate an IAC-Säulen unterschiedlicher Hersteller (n = 3)	90
Tab. 34:	Gegenüberstellung des Wellenlängenvergleichs bei dual UV- und DAD-Detektor	92
Tab. 35:	Wiederfindungsuntersuchungen der routinemäßig eingesetzten DON Methode (n = 5)	93
Tab. 36:	Nachweisgrenzen von ZEA und dessen Metaboliten der LC-ESI-MS/MS-Methode	96
Tab. 37:	Ergebnisse der Wiederfindungsuntersuchungen von ZEA im Rahmen der Validierung einer § 35 LMBG ZEA-Methode (n = 3)	96
Tab. 38:	Wiederfindungsfunktionen von Zearalenon und dessen Derivate für die ZEA-Routinemethode	96
Tab. 39:	Wassergehalt der untersuchten Säuglings- und Kleinkinder-Fertigmilch (n = 76)	97
Tab. 40:	Ergebnisse der Wiederfindungsuntersuchungen von DON und ZEA in Säuglings- und Kleinkindernahrungs-Proben an drei unterschiedlichen Matrices (n = 3)	98
Tab. 41:	Wiederfindungsfunktionen von DON und ZEA aus den Wiederfindungsuntersuchungen in Säuglings- und Kleinkindernahrungs-Proben	98
Tab. 42:	Wiederfindungsfunktionen der HPLC-FLD- und LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von ZEA in unterschiedlichen Konsum- und Säuglingsfolgemilch-Proben (n = 2)	101
Tab. 43:	Zusammenfassung der Wiederfindungsfunktionen der Typ A und Typ B Trichothecene im Rahmen der Validierung der ASE-Multi-Trichothecen-Methode	102

Tab. 44:	Ergebnisse der Wiederholbarkeitsuntersuchung von NIV und HT-2 Toxin für die ASE-Multi-Trichothecen-Methode anhand des Vergleichsmaterials DON 311 (n = 8)	104
Tab. 45:	Bestimmung der Nachweisgrenzen der Typ A und Typ B Trichothecene in der Tandem-Massenspektrometrie für den Quantifizierungs- und den Bestätigungs-Ionenübergang mittels „Signal zu Rausch“-Methode (S/N = 3/1)	105
Tab. 46:	Bestimmung der Nachweisgrenzen der Typ A und Typ B Trichothecene in der Tandem-Massenspektrometrie für die Quantifizierungs-Ionenübergänge mittels Kalibriermethode	106
Tab. 47:	Regressionsgleichungen der externen Matrixkalibration für Typ B Trichothecene	111
Tab. 48:	Regressionsgleichungen der externen Matrixkalibration für Typ A Trichothecene	111
Tab. 49:	Ergebnisse der Wiederfindungsuntersuchungen von Zearalenon in drei verschiedenen Speiseölen (n = 3)	115
Tab. 50:	Wiederfindungsfunktionen der HPLC-FLD- und der LC-MS/MS-Methoden zur Bestimmung von ZEA in pflanzlichem Speiseöl	115
Tab. 51:	Ergebnisse der Wiederfindungsuntersuchung von DON in vier unterschiedlichen Bier-Matrizes (n = 3)	117
Tab. 52:	Mittlere Wiederfindungen der unterschiedlichen Aufreinigungsverfahren zur Bestimmung von DON in Bier	117
Tab. 53:	Wiederfindungsuntersuchungen von Typ A und Typ B Trichothecen in Bier (ohne NIV)	117
Tab. 54:	Ergebnisse der Wiederholbarkeitsuntersuchungen von DON in natürlich kontaminiertem Starkbier (n = 10) mittels LC-MS/MS	119
Tab. 55:	Zusammenfassung der Ergebnisse des DON Ringversuchs durchgeführt von der Food Standard Agency (FSA, 2005)	121
Tab. 56:	Ergebnisse der Wiederfindungsuntersuchungen des FSA-DON-Ringversuchs	122
Tab. 57:	Kreuzvalidierung der DON-Bestimmung zwischen LC-MS/MS als Referenzverfahren und HPLC-UV bzw. ELISA	123
Tab. 58:	Kreuzvalidierung zwischen den eingesetzten ESI- und APCI-Ionisierungstechniken für DON, NIV und HT-2 Toxin bei unterschiedlichen Methoden	124
Tab. 59:	Kreuzvalidierung der HPLC-Routinemethode gegenüber der ELISA-Technik und der Referenzdetektion LC-MS/MS	125
Tab. 60:	Vergleich der Fragmentierungsmuster ausgewählter Trichothecene anhand von Literaturdaten und den im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Fragmentierungen	126
Tab. 61:	Fragmentierung von Zearalenon und Derivaten	129
Tab. 62:	Verhältnis zwischen Quantifizierungs- und Bestätigungs-Ionenübergang für Kalibrationsdaten und Wiederfindungsuntersuchungen	132
Tab. 63:	NIV-Belastung der untersuchten Getreideprodukte (n = 76)	143

Tab. 64:	T-2 Toxin- und HT-2 Toxin-Belastung der untersuchten Getreideprodukte (n = 115)	144
Tab. A-1:	Nomenklatur von Typ B Trichothecenen (nach Cole et al. 2003)	183
Tab. A-2:	Nomenklatur von Typ A Trichothecene n (nach Cole et al. 2003)	183
Tab. A-3:	Gaschromatographische Methoden in der Trichothecenen-Analytik	184
Tab. A-4:	HPLC-MS Methoden in der Trichothecenen-Analytik	184
Tab. A-5:	Analytik von Zearalenon in Getreide und Getreideprodukten	185
Tab. A-6:	Analytik von Zearalenon und Derivaten mittels LC-MS bzw. LC-MS/MS	185
Tab. A-7:	Zusammenfassung der Ergebnisse der durchgeführten Laborvergleichsuntersuchungen für DON	194
Tab. A-8:	Zusammenfassung der Ergebnisse der durchgeführten Laborvergleichsuntersuchungen für ZEA	195
Tab. A-9:	Zusammenfassung der Ringversuchsergebnisse für die § 35 Methode „Bestimmung von Zearalenon in Getreidemehl“	196
Tab. A-10:	Wiederfindungsuntersuchungen der HPLC-FLD-Methode von Zearalenon und den Isomeren in Maisprodukten (n=2)	196
Tab. A-11:	Wiederfindungsuntersuchungen von Zearalenon in unterschiedlichen Konsum- und Säuglingsfolgemilch Proben (n=2)	196
Tab. A-12:	Wiederfindungsergebnisse der ASE-Multi-Trichothecenen-Methode für die Typ B Trichothecene (n=3)	197
Tab. A-13:	Wiederfindungsergebnisse der ASE-Multi-Trichothecenen-Methode für die Typ A Trichothecene (n=3)	197
Tab. A-14:	Wiederfindungsuntersuchungen von Typ A und Typ B Trichothecenen in unterschiedlichen Speiseölen (n = 3)	198
Tab. A-15:	Ergebnisse der Wiederfindungsuntersuchungen von Typ A und Typ B Trichothecenen in pflanzlichen Speiseölen (Maiskeimöl, Weizenkeimöl und Sojaöl; n = 3)	198
Tab. A-16:	Wiederfindungsuntersuchungen der Typ A und Typ B Trichothecene in Bier (n = 3)	199
Tab. A-17:	ANOVA-Berechnung Bieruntersuchung	200
Tab. A-18:	Vorperioden für die DON- und ZEA-ELISA-Qualitätskontrollkarten	200
Tab. A-19:	Fragmentierung von Typ A und Typ B Trichothecenen	205
Tab. A-20:	Fragmentierung von Zearalenon, Zearalanon, α - β -Zearalanol, α - β -Zearalenol und d4 - β -Zearalenol	207

13 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich bei der Erstellung der vorliegenden Dissertation mit Rat und Tat unterstützt haben:

Frau Prof. Dr. rer. nat. A. Hartwig für die freundliche Übernahme des Prüfungsvorsitzes;

Herrn Prof. Dr. rer. nat. R. Wittkowski für die Themenstellung sowie für die fachliche Unterstützung und Hilfe bei der Anfertigung der Dissertation;

Herrn Prof. Dr. vet. E. Usleber für die Übernahme der Tätigkeit als dritter Berichterstatter und die stets sehr gute Zusammenarbeit im Forschungsprojekt;

Herrn Dr. H. St. Klaffke, Herrn Dr. R. Weber und Herrn R. Tiebach für die Betreuung im BfR und die stets fruchtbaren Diskussionen über Themen jeglicher Art

und Frau I. Mehlitz, Frau B. Gabriel und Herrn H.J. Spott für die Hilfe und Unterstützung bei der Laborarbeit.

Gedankt sei auch allen Korrekturlesern, die sich durch diese Seiten gekämpft haben.

Weiterhin möchte ich dem Arbeitskreis Prof. E. Märtlbauer, insbesondere Herrn Dr. R. Dietrich und dem Arbeitskreis Prof. E. Usleber, insbesondere Frau C. Seidler und Herrn Dr. V. Curtui für die freundliche Bereitstellung der DON- und ZEA-ELISA's danken.

Und natürlich danke ich allen, die hier nicht namentlich aufgeführt sind, die sich aber jederzeit freundlich und hilfsbereit gezeigt haben und so zu einer unvergesslichen und konstruktiven Arbeitsatmosphäre in der Fachgruppe beigetragen haben.

Die vorliegende Dissertation wurde im Rahmen des Forschungsprojektes „Analytik und Vorkommen wichtiger Fusarientoxine (Deoxynivalenol, Zearalenon) sowie Aufnahme dieser Toxine durch den deutschen Verbraucher“ vom Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) finanziell gefördert.

Nun möchte ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern danken, denen ich mein Interesse an den Naturwissenschaften verdanke und die mir durch ihre Unterstützung meinen Werdegang ermöglicht haben.

Ich widme diese Arbeit meinen Eltern Dana und Dieter, meinem Bruder Christian und meinen Freunden, die mich auf meinem wissenschaftlichen Lebenszug durch Deutschland begleitet und gefördert haben.

Berlin, den 10.01.2008
Oliver Kappenstein