

**NACHWEIS DER FUSARIENTOXINE
DEOXYNIVALENOL UND ZEARALENON
IN LEBENSMITTELN**

CAROLINE SEIDLER

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2007

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2007

© 2007 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde,
Professur für Milchwissenschaften der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. E. Usleber

Nachweis der Fusarientoxine Deoxynivalenol und Zearalenon in Lebensmitteln

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades beim

Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

CAROLINE SEIDLER

Tierärztin aus Dresden (Sachsen)

Gießen 2007

**Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Usleber

2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Petzinger

Tag der mündlichen Prüfung: 25.04.2007

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
2	SCHRIFTTUM.....	3
2.1	Allgemeines zu DON und ZEA.....	3
2.2	Physikalisch-chemische Eigenschaften.....	5
2.2.1	DON.....	5
2.2.2	ZEA.....	6
2.3	Toxizität und Risikobewertung.....	8
2.3.1	DON.....	8
2.3.2	ZEA.....	16
2.4	Metabolismus von DON und ZEA nach oraler Aufnahme.....	19
2.4.1	DON.....	19
2.4.2	ZEA.....	20
2.4.3	Carry over von DON und ZEA.....	22
2.5	Bildung und Vorkommen von DON und ZEA.....	23
2.6	Nachweis von DON und ZEA	29
2.6.1	Extraktion und Reinigung.....	29
2.6.2	Biologische Nachweisverfahren.....	32
2.6.3	Physikalisch-chemische Nachweisverfahren.....	32
2.6.3.1	Dünnschichtchromatographie (DC).....	32
2.6.3.2	Flüssigkeitschromatographie.....	34
2.6.3.3	Gaschromatographie.....	37
2.6.4	Immunologische Verfahren.....	39
2.7	Gesetzliche Grundlagen für Höchstgrenzen für DON und ZEA in Deutschland, der Europäischen Union und anderen Ländern.....	42

3	MATERIAL UND METHODEN.....	44
3.1	Materialien und Geräte.....	44
3.1.1.	Chemikalien und Biochemika.....	44
3.1.2	Mykotoxine.....	45
3.1.3	Immunreagenzien.....	45
3.1.4.	Puffer und Lösungen.....	46
3.1.5	Geräte und Hilfsmittel.....	46
3.1.6	Enzymimmuntests.....	47
3.1.7	Hochdruckflüssigkeitschromatographie.....	47
3.1.8	Probenmaterial.....	48
3.2	Methoden.....	49
3.2.1	Etablierung der enzymimmunologischen Untersuchungsverfahren.....	49
3.2.1.1	Enzymimmuntest für den Nachweis von DON.....	49
3.2.1.1.1	Herstellung und Überprüfung des Toxinstandards.....	49
3.2.1.1.2	Herstellung und Überprüfung eines DON-Enzymkonjugates.....	50
3.2.1.1.3	Überprüfung zweier Testsysteme für den Nachweis von DON (auf Basis polyklonaler bzw. monoklonaler Antikörper).....	52
3.2.1.1.3.1	Überprüfung der Sensitivität und Reproduzierbarkeit der Verfahren.....	54
3.2.1.1.3.2	Überprüfung der Spezifität der Verfahren.....	54
3.2.1.2	Enzymimmuntest für den Nachweis von ZEA.....	55
3.2.1.2.1	Herstellung und Überprüfung der Toxinstandards.....	55
3.2.1.2.2	Herstellung und Überprüfung eines ZEA-Enzymkonjugates.....	56
3.2.1.2.3	Überprüfung des Testsystems für den Nachweis von ZEA.....	58
3.2.1.2.3.1	Überprüfung der Sensitivität und Reproduzierbarkeit des Verfahrens.....	58
3.2.1.2.3.2	Überprüfung der Spezifität des Verfahrens.....	58
3.2.1.3	Erarbeitung geeigneter Extraktionsverfahren.....	59
3.2.1.3.1	Extraktion von DON.....	59
3.2.1.3.2	Extraktion von ZEA.....	60
3.2.1.4	Untersuchung mittels HPLC.....	61
3.2.1.4.1	Nachweis von DON mittels HPLC.....	61
3.2.1.4.2	Nachweis von ZEA mittels HPLC.....	63

3.2.1.4.3	Vergleich der Methoden (EIA und HPLC) zum Nachweis von DON und ZEA.....	65
3.2.2	Untersuchung von getreidehaltigen Lebensmittelproben und Konsummilch auf DON und ZEA.....	66
3.2.2.1	Nachweis von DON.....	66
3.2.2.2	Nachweis von ZEA.....	67
3.2.3	Auswertungskriterien.....	67
3.2.4	Berechnung der täglichen Aufnahme von DON bzw. ZEA durch den Verbraucher.....	68
4	ERGEBNISSE.....	72
4.1	Etablierung der Untersuchungsverfahren.....	72
4.1.1	Enzymimmuntest für den Nachweis von DON.....	72
4.1.1.1	Überprüfung der Toxinstandards.....	72
4.1.1.2	Überprüfung des Toxinkonjugates.....	73
4.1.1.3	Überprüfung zweier Testsysteme für den Nachweis von DON.....	76
4.1.1.3.1	Sensitivität und Reproduzierbarkeit.....	76
4.1.1.3.2	Spezifität.....	77
4.1.2	Enzymimmuntest für den Nachweis von ZEA.....	78
4.1.2.1	Überprüfung der Toxinstandards.....	78
4.1.2.2	Überprüfung des Toxinkonjugates.....	78
4.1.2.3	Überprüfung des Testsystems für den Nachweis von ZEA.....	80
4.1.2.3.1	Sensitivität und Reproduzierbarkeit.....	80
4.1.2.3.2	Spezifität	81
4.1.3	Probenvorbereitungsverfahren.....	81
4.1.3.1	Sensitivität und Reproduzierbarkeit der Verfahren.....	81
4.1.3.1.1	DON.....	81
4.1.3.1.2	ZEA.....	84

4.1.4	Untersuchung mittels HPLC.....	86
4.1.4.1	Nachweis von DON.....	86
4.1.4.2	Nachweis von ZEA.....	89
4.1.5	Methodenvergleich EIA und HPLC zum Nachweis von DON.....	93
4.1.6	Methodenvergleich EIA und HPLC zum Nachweis von ZEA.....	95
4.2	Untersuchung von getreidehaltigen Lebensmitteln und von Konsummilch auf DON und ZEA mittels EIA und HPLC.....	95
4.2.1	DON.....	95
4.2.2	ZEA.....	107
4.2.3	Zusammenfassende Darstellung der Belastung von Lebensmitteln mit DON und ZEA.....	108
4.3	Abschätzung der täglichen Aufnahme von DON.....	110
5.	DISKUSSION.....	112
5.1	Anwendbarkeit des eingesetzten EIA-Testverfahrens für DON.....	113
5.2.	Methodenvergleich EIA und HPLC für DON.....	113
5.3	Anwendbarkeit des eingesetzten EIA-Testverfahrens für ZEA.....	114
5.4	Methodenvergleich EIA und HPLC für ZEA.....	115
5.5	Belastung der Lebensmittel mit den Mykotoxinen DON und ZEA.....	116
5.5.1	Vorkommen von DON und ZEA in verschiedenen Lebensmittelgruppen....	116
5.5.2	Vergleich der DON-Ergebnisse in ökologisch und konventionell hergestellten Lebensmitteln.....	118
5.5.3	Mykotoxinbelastung über vier Jahre betrachtet.....	119
5.6	Vorkommen von DON und ZEA in Konsummilch.....	119

5.7	Abschätzung der Gefährdung des Verbrauchers durch DON und ZEA belastete Lebensmittel.....	120
6.	ZUSAMMENFASSUNG.....	123
7.	SUMMARY.....	125
8.	LITERATURVERZEICHNIS.....	126
9.	DANKSAGUNG.....	156
10.	EIDESSTAATLICHE ERKLÄRUNG.....	157

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ADI	Acceptable Daily Intake (erlaubte Tagesdosis)
AK	Antikörper
DAD	Diodenarraydetektor
DC	Dünnschichtchromatographie
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
DOM-1	Deepoxydeoxynivalenol
DON	Deoxynivalenol
EFSA	European Food Safety Authority
ECD	Elektroneneinfangdetektor
EIA	Enzyme Immunoassay, Enzymimmuntest
EU	Europäische Union
FAO	Food and Agriculture Organisation of the United Nations
FD	Fluoreszenzdetektion
FID	Flammenionisationsdetektion
GC	Gaschromatographie
HFBA	Heptafluorbutyrylsäureanhydrid
HFBI	Heptafluorbutyrylimidazol
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography (Hochdruckflüssigkeitschromatographie)
HPP	Höchste Plausible Portionsgröße
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase)
HS	Hemisuccinat
IAC	Immunoaffinity Column (Immunoaffinitäts-Säule)
IDT	Ion Trap Detector
IgA	Immunglobulin A
IgE	Immunglobulin E
IgM	Immunglobulin M
KGW	Körpergewicht
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
JECFA	Joint FAO/WHO Experts Committee on Food Additives
LC	Liquid Chromatography (Flüssigkeitschromatographie)

ABKÜRZUNGEN

LOEL	Low Observed Effect Level
MAK	Monoklonale Antikörper
Max	Maximalwert
max	maximal
Med	Median
Min	Minimalwert
MeOH	Methanol
MPP	Mittlere Plausible Portionsgröße
MS	Massenspektrometrie
MTT	Methylthiazoltetrazolium
MW	Mittelwert
NICI	Negative Ion Chemical Ionization
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level
NOEL	No Observed Effect Level
NPP	Niedrigste Plausible Portionsgröße
NWG	Nachweisgrenze
PAK	Polyklonale Antikörper
PBS	Phosphate Buffered Saline (Natriumphosphat-Puffer)
PCB	Polychlorierte Biphenyle
PMTDI	Provisional Maximum Tolerable Daily Intake
Pos	Positiv
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
RP	Reverse Phase
SCF	Scientific Committee on Food
SIM	Selected Ion Monitoring
TDI	Tolerable Daily Intake (tolerierbare tägliche Aufnahme)
TFAA	Trifluoressigsäureanhydrid
TM	Trockenmasse
TMS	Trimethylsilylimidazol
U	Unit (Enzymeinheit)
VK	Variationskoeffizient
Vol	Volumen
VO	Verordnung
v/v	Volume per Volume

ABKÜRZUNGEN

WFR	Wiederfindungsrate
WHO	World Health Organisation
ZEA	Zearalenon
3TP	3-Tagesportion Prospektive Studie
4WR	4-Wochenration Retrospektive Studie
90P	90stes Perzentil

1 EINLEITUNG

Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZEA) sind Mykotoxine, die von verschiedenen Fusarienarten, z.B. *Fusarium graminearum*, gebildet werden können. Vor allem ungünstige Witterungsverhältnisse, wie z.B. hohe Feuchtigkeit und relativ niedrige Temperaturen im Sommer aber auch landwirtschaftliche Maßnahmen können den Befall der Pflanzen mit Fusarien bzw. Toxinbildung (OBST et al., 2000) begünstigen. So kam es in den vergangenen Jahren immer wieder zu regional sehr hohen Belastungen des deutschen Getreides mit Fusarientoxinen (ELLNER, 1999). Generell werden DON und teilweise auch ZEA in Mitteleuropa häufig und in relativ hohen Konzentrationen in Lebensmitteln nachgewiesen (European Commission, SCOOP 2003; USLEBER et al., 1998, 2000).

Das zu den Trichothecenen gehörende Mykotoxin DON führt vor allem beim Schwein zu Erbrechen, verminderter Nahrungsaufnahme, Gewichtsverlust, Veränderung von Blutwerten und negativer Beeinflussung des Immunsystems (PESTKA & DONG, 1994; PRELUSKY et al., 1994; TRENHOLM et al., 1994). Das Mykotoxin ZEA, das häufig zusammen mit DON vorkommt, ist durch seine östrogenartige Wirkung gekennzeichnet. Es führt nach Aufnahme insbesondere beim Schwein zu pathologischen Veränderungen am äußeren und inneren Genitaltrakt und zu Fertilitätsstörungen (EWALD et al., 1991; DACASTO et al., 1995).

Da DON und ZEA sehr stabile Verbindungen sind, kann mit Fusarientoxinen kontaminiertes Speisegetreide in die Nahrungskette gelangen. Um einer Belastung des Verbrauchers vorzubeugen, wurden in Deutschland Höchstmengen für eine Reihe von Fusarientoxinen festgelegt. Vor kurzem wurden EU-weit Höchstmengen für DON und ZEA in Lebensmitteln erlassen (Juli 2006, VO 856/2005).

Vor allem die Lebensmittelgruppen Brot bzw. Brötchen, Mehl, Speisegetreide und Frühstückszerealien, Teigwaren, Säuglings- und Kleinkindernahrung sowie Bier sind aufgrund der hohen Verzehrsmengen im Hinblick auf den Schutz des Verbrauchers vor diesen Toxinen wichtig. Untersuchungen mit repräsentativen Probenzahlen und vereinfachten Untersuchungsverfahren zur Belastung dieser Lebensmittelgruppen, vor allem der Säuglings- und Kleinkindernahrung, mit DON und ZEA fehlen derzeit noch. Zum Übergang von DON und ZEA in die Milch liegen teilweise widersprüchliche Angaben vor, bzw. ältere Literaturangaben wurden zunehmend angezweifelt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, zuverlässige und praktikable Methoden zum Routine-Nachweis von DON und ZEA in Lebensmitteln auf Getreidebasis zu erarbeiten, sowie die Belastung der genannten Lebensmittelgruppen mit diesen Toxinen in einer großen Probenzahl zu ermitteln. Darüber hinaus sollten empfindliche Routinetests für DON und ZEA in Konsummilch erarbeitet werden, um eine erste Abschätzung einer potentiellen Kontamination zu ermöglichen.

2 SCHRIFTTUM

2.1 Allgemeines zu DON und ZEA

Im Rahmen einer Untersuchung von stark mit Fusarien belastetem Getreide (Gerste, Weizen) fanden MOROOKA et al. (1972) *Fusarium roseum* als vorherrschende Fusarienart vor. Aus Kulturfiltrat isolierten sie neben dem bereits bekannten Nivalenol ein neues Mykotoxin, das sie zunächst als Rd-Toxin bezeichneten. Ein Jahr später klärten YOSHIZAWA und MOROOKA (1974) die Trichothecenstruktur dieses Mykotoxins auf und nannten die Substanz, abgeleitet vom Nivalenol, Deoxynivalenol. VESONDER et al. (1973) isolierten unabhängig von dieser Studie im gleichen Jahr DON aus mit *Fusarium graminearum* infiziertem Mais. Aufgrund der emetischen Wirkung auf Schweine nach oraler Aufnahme gaben sie ihm den Namen „Vomitoxin“, der heute noch in der Literatur als Synonym für DON verwendet wird.

Bereits in den späten 20er Jahren des letzten Jahrhunderts wurde über das Auftreten von Vulvovaginitiden bei weiblichen Schweinen im Zusammenhang mit Futtermitteln berichtet (McNUTT et al., 1928). Im Jahr 1962 isolierten STOB et al. (1962) eine Substanz aus Kulturen von *Fusarium graminearum*, die nach Applikation an ovariectomierten Mäusen eine Größenzunahme des Uterus hervorrief und bei weiblichen Jungschweinen zu einer Vergrößerung von Vulva und Gesäuge führte. Kurze Zeit später gelang URRY et al. (1966) die Aufklärung der chemischen Struktur dieser nun als Zearalenon bezeichneten Substanz.

In den darauffolgenden Jahren nahmen die Kenntnisse über die Bedeutung östrogenartiger Substanzen in Lebensmitteln bei der Entstehung verschiedener Krankheitsbilder zu. Neben ZEA kommen auch verschiedene von Pflanzen gebildete Phytoöstrogene (Isoflavone in Soja und Klee) als mögliche Ursache in Frage. Eine Reihe von Pestiziden, wie z.B. die DDT-Analoga Methoxychlor und Chlordecon oder PCB's besitzen ebenfalls schwach östrogene Wirkung (KUIPER-GOODMAN et al., 1987). Nach wie vor dürfte aber ZEA aus toxikologischer und wirtschaftlicher Sicht die wichtigste natürlich vorkommende östrogenartige Substanz sein.

DON und ZEA waren, aufgrund der aus der Toxizität und Häufigkeit ihres weltweiten Vorkommens in Lebens- und Futtermitteln resultierenden Expositionsproblematik für den gesundheitlichen Verbraucherschutz, in den letzten Jahren Gegenstand ausführlicher Bewertungen durch mehrere internationale Gremien (Joint FAO/WHO Experts Committee on

Food Additives, JECFA, Wissenschaftlicher Lebensmittelausschuss, SCF bzw. European Food Safety Authority, EFSA).

2.2 Physikalisch-chemische Eigenschaften

2.2.1 DON

DON (3 α ,7 α ,15-Trihydroxy-12,13-epoxytrichothec-9-en-8-on) gehört zur Gruppe der Trichothecene. Die zu dieser Gruppe gehörenden Mykotoxine sind durch ihr trizyklisches Grundgerüst mit einer für die Toxizität verantwortlichen Epoxygruppe an C-12 und C-13 und einer Doppelbindung zwischen C-9 und C-10 charakterisiert (MIROCHA & CHRISTENSEN, 1974). In der Zwischenzeit sind mehr als 60 verschiedene, natürlich vorkommende Trichothecene bekannt. Die chemische Struktur der Mykotoxine variiert sowohl in der Position und in der Anzahl der Hydroxylgruppen als auch in der Position und Anzahl der über Esterbindungen verknüpften Seitenketten. Die von Fusarien gebildeten Trichothecene stellen relativ einfache Alkohole mit kurzketten Estern dar (ISHII, 1983; DESJARDINS et al., 1993). Die nicht makrozyklischen Trichothecene werden je nach ihrer Substitution an C-8 in Typ A- und Typ B-Trichothecene eingeteilt. Die Typ A-Trichothecene weisen an C-8 unterschiedliche Substituenten auf, während die Typ B-Trichothecene an C-8 eine Ketogruppe besitzen. Zur Gruppe der B-Trichothecene gehören Nivalenol, DON und ihre Acetylerster (Abbildung 1, Tabelle 1). Der R₁-Rest des DON (Tabelle 1) verleiht diesem eine gute Löslichkeit in polaren Lösungsmitteln wie Wasser, Methanol und Ethanol (POHLAND et al., 1984; CANADY et al., 2001). DON ist in Wasser, Säuren und organischen Lösungsmitteln weitgehend stabil (SHEPHERD und GILBERT, 1988), hitzestabil bis 120 °C und sehr stabil gegen nucleophile Angriffe (CANADY et al., 2001; KRŠKA et al., 2001).

Nachfolgend sind wichtige chemisch-physikalische Eigenschaften von DON aufgeführt (Angaben nach SYDENHAM et al., 1996):

Summenformel:	C ₁₅ H ₂₀ O ₆
Chemisch- wissenschaftlicher Name:	3 α ,7 α ,15-Trihydroxy-12,13-epoxytrichothec-9-en-8-on
Synonyme:	Vomitoxin Rd-Toxin
Molekulargewicht:	296,32
Max. Absorption in Ethanol:	219 nm
Schmelzpunkt:	150 °C – 153 °C

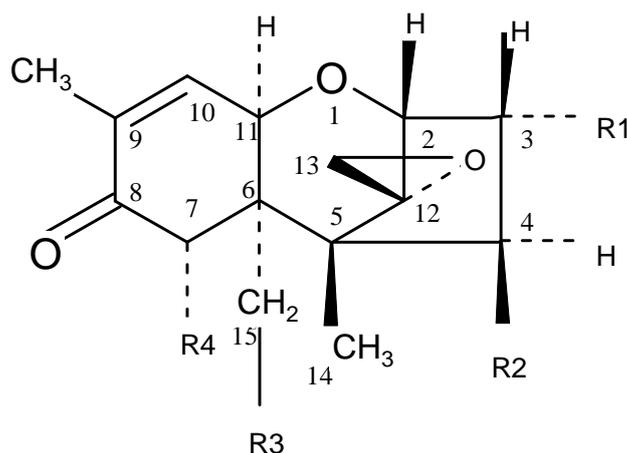


Abbildung 1: Strukturformel des Typ B-Trichothecengrundgerüsts (Seitenketten siehe Tabelle 1)

Tabelle 1: Auflistung der Seitenketten einiger nicht makrozyklischer Typ B-Trichothecene

Toxin	Seitenkette			
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Deoxynivalenol	OH	H	OH	OH
3-Acetyldeoxynivalenol	OCOCH ₃	H	OH	OH
15-Acetyldeoxynivalenol	OH	H	OCOCH ₃	OH
3,15-Diacetyldeoxynivalenol	OCOCH ₃	H	OCOCH ₃	OH
Nivalenol	OH	OH	OH	OH
Fusarenon X	OH	OCOCH ₃	OH	OH

2.2.2 ZEA

Trotz seiner östrogenartigen Eigenschaft gehört ZEA (6-(10-Hydroxy-6-oxo-trans-undecenyl)-β-Resorcylsäurelaktone) zu den nichtsteroidalen Mykotoxinen der Stoffgruppe der phenolischen Makrolide (Abbildung 2, Tabelle 2). ZEA weist eine geringe Löslichkeit in Wasser auf, während es in Aceton, Acetonitril, Alkoholen, Chloroform und wässrigen Alkalien gut löslich ist (KUIPER-GOODMAN et al., 1987). ZEA besitzt eine starke UV-Absorption, mit Absorptionmaxima in Methanol bei λ 236 nm, 274 nm, 316 nm (YOSHIZAWA, 1983). Nachfolgend sind wichtige chemisch-physikalische Eigenschaften von ZEA aufgeführt (Angaben nach URRY et al., 1966; SYDENHAM et al., 1996):

Summenformel:	$C_{18}H_{22}O_5$
Chemisch-wissenschaftlicher Name:	6-[(10 S)-10-hydroxy-6-oxo-trans-1-undecenyl]- β -Resorcylsäurelakton
Synonym:	F-2 Toxin
Molekulargewicht :	318,37
Max. Absorption Methanol:	236 nm, 274 nm, 316 nm
Schmelzpunkt :	164 °C – 165 °C

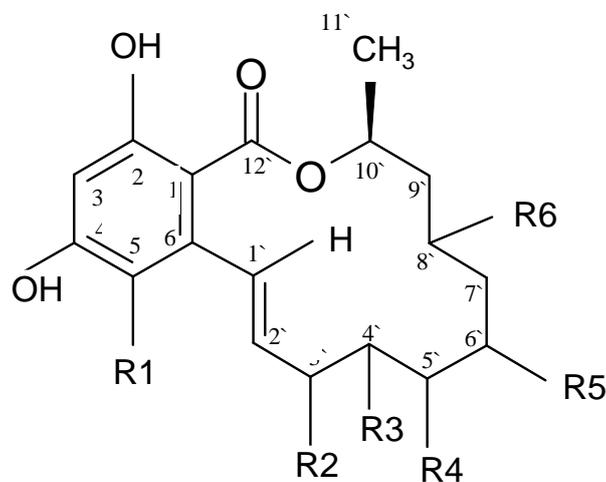


Abbildung 2: Grundgerüst des ZEA (Seitenketten in Tabelle 2)

Tabelle 2: Seitenketten des ZEA und einiger Analoga

Toxin	Seitenketten						$C_{1'}$ - $C_{2'}$ -Bindung
	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6	
Zearalenon	H	H_2	H_2	H_2	=O	H_2	CH=CH
α -Zearalenol	H	H_2	H_2	H_2	OH H	H_2	CH=CH
β -Zearalenol	H	H_2	H_2	H_2	H OH	H_2	CH=CH
Zearalanon	H	H_2	H_2	H_2	=O	H_2	CH_2 - CH_2
α -Zearalanol	H	H_2	H_2	H_2	OH H	H_2	CH_2 - CH_2
β -Zearalanol	H	H_2	H_2	H_2	H OH	H_2	CH_2 - CH_2

2.3 Toxizität und Risikobewertung

2.3.1 DON

Der toxische Effekt von DON auf zellulärer Ebene beruht auf der Hemmung der Proteinbiosynthese durch Bindung an die Ribosomen während der Elongations- und Terminationsphase (UENO et al., 1983). Dabei bindet DON an die 60 S-Untereinheit der eukariotischen Ribosomen und interferiert mit der Peptidyltransferase, was zu einer Störung der Proteinbiosynthese führt (ROTTER & PRELUSKY, 1996). Diese Wirkung ist in erster Linie von einer intakten Doppelbindung zwischen C-9 und C-10, sowie einer Epoxidgruppe an C-12, C-13 abhängig (EHRlich & DAIGLE, 1987). Die Öffnung des 12,13-Epoxidringes (=Deepoxydeoxynivalenol, DOM-1, Abbildung 3) führt zu einem vollständigen Verlust der Toxizität von DON (ROTTER & PRELUSKY, 1996).

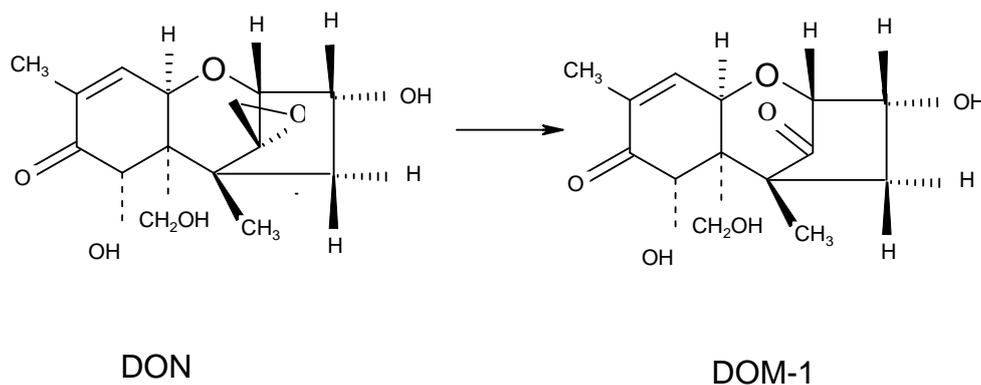


Abbildung 3: De-epoxidation von DON zu DOM-1 (nach KING et al., 1984)

Die toxischen Eigenschaften von DON sind wie für alle Trichothecene vor allem durch chronische immuntoxische Wirkungen gekennzeichnet. Hauptsymptom einer chronischen Aufnahme ist eine reduzierte Gewichtszunahme bei Jungtieren, wobei das Schwein besonders empfindlich reagiert. Die betroffenen Organsysteme sind je nach Tierart unterschiedlich. Zahlreiche Fütterungsstudien mit DON-belastetem Material bei Schweinen und Mäusen belegen die oben angegebenen Schadwirkungen. Rinder und Geflügel scheinen dagegen relativ unempfindlich auf DON zu reagieren (Tabelle 3, siehe auch Tabellen 7-9).

Tabelle 3: Leistungsparameter bei verschiedenen Tierarten nach experimenteller Aufnahme von DON

Tierart	Gehalt DON (mg/kg Futter)	Befunde	Referenz
Maus	≥2 ab 25	Gewichtszunahme ↓ Futteraufnahme ↓	FORSELL et al. (1986)
Maus	0,1	Gewichtszunahme ↓	IVERSON et al. (1995)
Broiler	1,87	auf Futteraufnahme keinen Einfluss kein Erbrechen auslösbar	HULAN et al. (1982)
Broiler	18	auf Futteraufnahme und Gewichtszunahme keinen Einfluss	KUBENA et al. (1984)
Broiler	ab 116	Futteraufnahme ↓	MORAN et al. (1982)
Huhn	1,58 + ZEA	Futteraufnahme ↓ New Castle und K 88 AK ↓	DÄNICKE et al. (2001)
Schwein	3	Futteraufnahme ↓ Gewichtszunahme ↓	PRELUSKY et al. (1994)
Milchkuh	66 (in TM)	auf Futteraufnahme keinen Einfluss	COTE (1986)
Milchkuh	6 (in TM)	auf Futteraufnahme keinen Einfluss	CHARMLEY et al. (1993)

↓ : Abnahme, ↑ : Anstieg, AK: Antikörper, TM: Trockenmasse

Organische Veränderungen nach DON-Applikation zeigen sich in eher unspezifischen Veränderungen der Organe ohne einheitliches Bild des gewebeschädlichen Potentials von DON. Erst nach hoher Exposition von DON-Dosen zeigten sich bei der Maus histopathologische Veränderungen (FORSELL et al., 1986, FORSELL et al., 1987, Tabelle 4)

Tabelle 4: Minimal erforderliche Dosen zur Gewebeschädigung in B6C3F1-Mäusen nach einmaliger Verabreichung von DON (nach FORSELL et al., 1987)

Gewebe	DON (mg/kg KGW)	
	Oral	Intraperitoneal
Darm, Milz, Thymus, Knochenmark	100	60
Niere	1000	1000
Herz	100	100

Neben Reduktion der Gewichtszunahme und Emesis sind in Fütterungsstudien auch zytotoxische Eigenschaften des DON auf das hämatologische System untersucht worden (Tabelle 5).

Tabelle 5: Fütterungsstudien zu immunologischen und hämatologischen Wirkungen von DON

Tierart	DON (mg/kg Futter)	Befunde	Referenz
Maus	2-10 ≥ 10	IgM ↓; IgA ↑ Leukozyten, Lymphozyten, Monozyten ↓ Neutrophile Granulozyten ↑; Erythrozyten ↓	FORSELL et al. (1986)
Maus	25	IgE ↑↑, auch während toxinfreier Zeit IgA ↑ nur während der Exposition IgG nicht verändert	PESTKA & DONG (1994)
Broiler	18	Hämoglobin und Hämatokrit ↓	KUBENA et al. (1984)
Schwein	1 3	Gesamtprotein ↑ Albumin-Globulin-Faktor ↑ α-Globulin ↓, Cortison ↑	PRELUSKY et al. (1994)
Schwein	3	Albumin ↑, α-Globulin ↓ Albumin-Globulin-Faktor ↑ Leukozyten ↓, Neutrophile Granulozyten ↑	ROTTER et al. (1994a)

↓ : Abnahme, ↑ : Anstieg, ↑↑ : starker Anstieg

Ein wesentliches Merkmal zytotoxischer Effekte von DON bei der Maus liegt in der relativen Verschiebung der Immunglobulingehalte. Insbesondere IgA und IgE sind stark erhöht. Das Krankheitsbild ähnelt dabei der IgA-Nephropathie beim Menschen, weshalb PESTKA & DONG (1994) hier Analogien in der Wirkung von DON vermuteten. Die Mechanismen der toxischen Wirkung von DON sind bisher noch nicht geklärt. PESTKA & ZHOU (2002) vermuteten aber, dass DON unter anderem auf den Tumornekrosefaktor α wirken könnte, woraus weitere toxische Effekte resultieren.

Verschiedene in vitro Untersuchungen zeigten die hämotoxische Wirkung von DON (Tabelle 6). Bei Konzentrationen von 200 μ g DON/ml Zellmedium (10 h Inkubation) konnte eine fast vollständige Hämolyse von Rattenerthrozyten beobachtet werden. DON-Konzentrationen von 130 μ g/ml Zellmedium zeigten dagegen sogar nach elf Stunden Inkubation keine signifikanten hämolytischen Effekte. In Anwesenheit von Antioxidantien (Mannitol, Histidin, α -Tocopherol) wurde eine Abnahme der Hämolyseaktivität beobachtet,

was auf eine zusätzliche Beteiligung von freien Radikalen bei der Hämolyse schließen lässt (RIZZO et al., 1992). Auch die Lymphozytenproliferation wird von DON beeinflusst. Eine mykotoxininduzierte Immunsuppression kann sich dabei dosisabhängig in einer Depression der Synthese oder Aktivität der Lymphozyten ausdrücken (BEREK et al., 2001; THUVANDER et al., 1999; MEKY et al., 2001).

Tabelle 6: *In vitro* Untersuchungen zu zytotoxischen Eigenschaften von DON

Spezies	Zellart	Konzentration	Wirkung	Referenz
Maus	peritoneale Makrophagen	1 ng/ml >100 ng/ml	Hemmung Phagozytose, mikrobizide Wirkung, Superoxidationproduktion Reduktion der Phagosomen- und Lysosomenfusion	AYRAL et al. (1992)
Maus	EL-4 Thymoma und CD 4 ⁺ T Zellen	500 ng/ml	Überproduktion von Cytokinen durch Hemmung des zytoplasmatischen Inhibitors	OUYANG et al. (1996)
Ratte	Lymphozyten	90 ng/ml	50 % Hemmung der Blastogenese	ATKINSON & MILLER (1984)
Ratte	Vorläuferzellen (Granulozyten-Monozyten)	296 ng/ml 148 – 222 ng/ml	100 % Zelltod Hemmung der Zellproliferation	LAUTRAITE et al. (1997)
Ratte	Erythrozyten	130 µg/ml 200 µg/ml 250 µg/ml	kaum Hämolyse nach 11 Stunden fast 100 % Hämolyse nach 10 Stunden fast 100 % Hämolyse nach 7 Stunden	RIZZO et al. (1992)
Mensch	Lymphozyten	220 ng/ml	50 % Hemmung der Blastogenese	ATKINSON & MILLER (1984)
Mensch	periphere mononukleäre Blutzellen	100 ng/ml	Hemmung mitogener Lymphozytenproliferation	BEREK et al. (2001)
Mensch	Vorläuferzellen (Granulozyten-Monozyten)	50 ng/ml 74 – 296 ng/ml 22 ng/ml	Hemmung der Aktivität der natürlichen Killerzellen 100 % Zelltod 66%-ige Hemmung der Zellproliferation	LAUTRAITE et al. (1997)
Mensch	Lymphozyten	216 ng/ml von 200 ng/ml bis 400 ng/ml	50%-ige Hemmung der Zellproliferation Beeinflussung der Zytokinproduktion der Lymphozyten	MEKY et al. (2001)
Mensch	Vorläuferzellen der Blutbildung (Granulozyten/Makrophagen)	318 µg/ml 95,4 µg/ml	Vollständige Wachstumshemmung Hemmung > 80 %	PARENT-MASSIN et al. (1994)
Mensch	Lymphozyten		Hemmung der Lymphozytenproliferation und der IgA – Produktion	THUVANDER et al. (1999)

Zur toxikologischen Risikobewertung von DON für den Menschen wurden Daten aus Tierversuchen mit verschiedenen Spezies herangezogen. Vor allem die Ermittlung der tolerierbaren Tagesaufnahme (Tolerable Daily Intake, TDI) für Menschen spielte in verschiedenen internationalen Gremien eine Rolle und führte zur Ausarbeitung ausführlicher Dokumente zur Bewertung von DON. Folgende Dokumente seien bezüglich ihrer wesentlichen Aussagen kurz dargestellt:

Joint FAO/WHO Experts Committee on Food Additives (JECFA): Im Auftrag der JECFA wurde eine Evaluierung verschiedener Mykotoxine vorgenommen, aus der eine ausführliche Arbeit über DON entstand (CANADY et al., 2001). In diesem Dokument wird in sehr umfassender Weise das bisherige Wissen zu DON zusammengetragen und bewertet. Die Zusammenfassung dieser Evaluierung ergab eine – vorläufige – maximal tolerierbare Tagesaufnahme („Provisional Maximum Tolerable Daily Intake“, PMTDI) für DON von 1 µg/kg Körpergewicht. Diese Bewertung wurde von der JECFA auf ihrem 56. Meeting in Genf (5.-15. Februar, 2001) übernommen.

Das Scientific Committee on Food (SCF, wissenschaftlicher Lebensmittelausschuss der Europäischen Union) veröffentlichte in zwei Dokumenten [Opinion on Fusarium Toxins. Part 1: Deoxynivalenol (DON) und Opinion of the Scientific Committee on Food on Fusarium toxins. Part 6: Group evaluation of T-2 toxin, HT-2 toxin, nivalenol and deoxynivalenol] eine Risikobewertung für DON, die im Wesentlichen identisch mit derjenigen der JECFA ist. Diese Bewertung stellt innerhalb der EU die Grundlage für weitergehende Diskussionen, insbesondere im Hinblick auf Höchstmengen, dar. In diesen beiden Dokumenten wurde zunächst (1999) eine vorläufige, 2002 dann eine entgeltliche tolerierbare Tagesaufnahme (TDI) für DON von 1 µg DON/kg Körpergewicht und Tag festgelegt.

Sowohl JECFA als auch SCF beziehen sich bei der Festlegung des TDI beim Menschen auf die von IVERSON et al. (1995) durchgeführte Studie bei Mäusen, wobei unter den darin festgestellten Effekten von DON das Kriterium „reduzierte Gewichtszunahme“ entscheidend war. Interessant hierbei ist zu erwähnen, dass das in der Studie verwendete Kontrollfutter vermutlich nicht frei von DON war, sondern als < 10 µg/kg beschrieben wurde. Die erste Fütterungsgruppe enthielt DON in einer Dosis von ca. 100 µg/kg KGW, die Gruppen zwei bzw. drei ca. 500 µg/kg bzw. 1000 µg/kg KGW. Schon bei der Aufnahme von 100 µg/kg KGW zeigte sich eine leicht reduzierte Gewichtszunahme.

In mehreren anderen Studien an der Maus wurde eine in der Größenordnung ähnliche kritische Dosis für das Merkmal „reduzierte Gewichtszunahme durch DON“ festgestellt (Tabelle 7).

Tabelle 7: Zahlenwerte zu Literaturangaben für „low observed effect level“ (LOEL) bzw. „no observed effect level“ (NOEL) für DON aus toxikologischen Studien bei Mäusen; Kriterium: reduzierte Gewichtszunahme (nach JECFA, 2001)

Referenz	Reduzierte Gewichtszunahme Maus mg DON/kg Körpergewicht und Tag	
	LOEL	NOEL
IVERSON et al. (1995)	0,5	0,1
ARNOLD et al (1986)	0,9	
ARNOLD et al (1986)	1,3	0,75
ROBANNA-BARNAT et al. (1987)	0,35	
FORSELL et al. (1986)	0,28	0,07
PESTKA et al. (1986)	0,7	0,28
BILGRAMI et al. (1993)	0,006	
HUNDER et al. (1991)	1,3	0,14
ROTTER et al (1994b)	0,37 (männl.)	0,81 (weibl.)

Im Vergleich zu Mäusen scheinen aber Schweine, wie bereits erwähnt, empfindlicher auf DON zu reagieren, wie zahlreiche Studien zeigten. Sowohl SCF (Tabelle 8) als auch JECFA berücksichtigten bei der Festlegung des TDI für DON – nach schriftlicher Diskussion – allerdings keine der publizierten Studien beim Schwein, obwohl hier aus den Merkmalen „Erbrechen“ bzw. „reduzierte Gewichtszunahme“ deutlich niedrigere NOEL-Werte ableitbar gewesen wären (Tabellen 9 und 10).

Tabelle 8: Vom wissenschaftlichen Lebensmittelausschuss (SCF) der EU gewürdigte Studien zur Toxizität („no observed adverse effect level“, NOAEL) von DON und zur Festlegung des TDI (SCF 1999 bzw. 2002)

Studie	Kritischer Effekt	NOAEL (mg/kg KGW und Tag)	Referenz
Maus, chronisch (2 Jahre)	Reduziertes Gewicht	0,1	IVERSON et al. (1995)
Maus, Immuntoxizität	Erhöhte Infektanfälligkeit	0,25	TRYPHONAS et al. (1986)
Maus, Teratogenität	Fetale Skelettmissbildungen	0,5	KHERA et al. (1982)
Maus, Fruchtbarkeitsstörungen	Postnatale Sterblichkeit	0,375	KHERA et al. (1984)
Schwein, subchronisch (~100 Tage)	Reduziertes Gewicht	0,04	BERGSJØ et al. (1992)
Schwein, subchronisch (~100 Tage)	Leber- und Blotalbuminwerte	0,06	BERGSJØ et al. (1993)

Tabelle 9: Zahlenwerte zu Literaturangaben für low observed effect level (LOEL) bzw. no observed effect level (NOEL) für DON aus toxikologischen Studien bei Schweinen, Kriterium: Erbrechen (nach JECFA, 2001)

Referenz	Emesis beim Schwein mg DON/kg Körpergewicht und Tag	
	LOEL	NOEL
FORSYTH et al. (1977)	0,100	0,075
YOUNG et al (1983)	0,070	0,035
PESTKA et al. (1987)	0,050	0,025
PRELUSKY & TRENHOLM (1993)	0,050	0,025
YOUNG et al. (1983)	0,800	0,600
FRIEND et al. (1984)		0,420

Tabelle 10: Zahlenwerte zu Literaturangaben für low observed effect level (LOEL) bzw. no observed effect level (NOEL) für DON aus toxikologischen Studien bei Schweinen, Kriterium: Reduzierte Gewichtszunahme (nach JECFA, 2001)

Referenz	Reduzierte Gewichtszunahme beim Schwein mg DON/kg Körpergewicht und Tag	
	LOEL	NOEL
TRENHOLM et al. (1984)	0,080	
POLLMANN et al. (1985)	0,090	0,040
HARVEY et al. (1996)	0,060	
FRIEND et al. (1992)	0,100	
ROTTER et al. (1994a)	0,080	
ROTTER et al. (1995)	0,260	
BERGSJØ et al. (1992)	0,160	0,080
BERGSJØ et al. (1993)	0,100	0,040
FOSTER et al. (1986)	0,190	
PRELUSKY et al. (1994)	0,090	
PRELUSKY (1997)	0,170	
LUSKY et al. (1998)		0,040
GÖTZ-SCHRÖM et al. (1998)		0,048

2.3.2 ZEA

ZEA und seine Metaboliten sind Östrogenagonisten und binden an den Östrogenrezeptoren der Zellen. Die Bindungsaffinität ist dabei abhängig von der Tierspezies. ZEA hat beim Schwein wahrscheinlich die größte Affinität an die Östrogen-Rezeptoren (ERIKSEN & ALEXANDER, 1998). Der ZEA-Östrogen-Rezeptor-Komplex aktiviert die DNA zur Bildung von m-RNA und r-RNA, somit wird in den Ribosomen der Zellen die Proteinbiosynthese angeregt (KUIPER-GOODMAN et al., 1987). Durch diesen östrogenartigen Effekt besitzt ZEA eine anabole Wirkung, die zu einer Gewichtszunahme führen kann. So kam es nach Fütterung zearalenonhaltigen Futters an Schweine zu einer größeren Gewichtszunahme im Vergleich zu den Kontrolltieren (ZÖLLNER et al., 2002). Auch alle anderen ZEA-Analoga besitzen in unterschiedlichem Ausmaß östrogenartige Wirkungen. Dabei besitzt das α -Zearalanol (Synonyme: Zearanol oder Ralgro) deutlich höhere Wirksamkeit als ZEA, weshalb es in einigen Ländern auch gezielt als Leistungsförderer bei Mastrindern eingesetzt wird.

Inbesondere Ferkel und weibliche Sauen sind vom ZEA-induzierten Hyperöstrogenismus betroffen. Symptome bei weiblichen Zuchtsauen sind verringerte Fruchtbarkeit, erhöhte Raten

an Totgeburten. Ferkel zeigen Schwellungen von Vulva und Gesäuge, sowie Bewegungsstörungen (Zittern, Grätschen der Hintergliedmaßen). Die Wirkung von ZEA beim Schwein wurde in zahlreichen Fütterungsstudien belegt (BAUER et al., 1987; VANYI et al., 1994; LEITNER et al., 2001). Unklar ist derzeit noch die minimale hormonell wirksame Dosis. Diese wurde zumeist im Bereich zwischen 250 µg/kg und 1000 µg/kg im Futter festgestellt. Im Gegensatz zu anderen Untersuchungen kamen BAUER et al. (1987) zum Ergebnis, dass bereits sehr niedrige ZEA-Konzentrationen (50 µg/kg) im Futter bei Ferkeln negative Auswirkungen haben.

Zur Prüfung eines möglichen Zusammenhangs zwischen dem Vorkommen von ZEA in Futtermitteln und dem Auftreten von Fruchtbarkeitsstörungen wurde in einer epidemiologischen Studie als Markersubstrat die Gallenflüssigkeit von Zuchtsauen mit Fertilitätsstörungen unbekannter Genese auf ZEA und Metaboliten untersucht. In nahezu allen Gallen konnten ZEA bzw. ZEA-Metaboliten, vor allem in glucuronidierter Form, nachgewiesen werden. Ein ursächlicher Zusammenhang zwischen ZEA-Gehalten in der Galle und Betriebsproblemen hinsichtlich Fruchtbarkeitsstörungen konnte jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden (MEYER et al., 2000).

Rinder reagieren weniger sensitiv auf die östrogenen Effekte von ZEA. Klinische Erscheinungen können jedoch ab einem Gehalt von 12 – 14 mg/kg KGW auftreten (KUIPER-GOODMAN et al., 1987). Wissenschaftler aus Australien und Neuseeland kamen allerdings zum Ergebnis, dass ZEA im Weidegras verantwortlich für Fruchtbarkeitsprobleme bei Schafen war (REED et al., 2004).

Geflügel scheint weitgehend unempfindlich gegenüber ZEA zu sein. Hormonelle und andere negative Wirkungen konnten auch bei hohen Dosen (50 mg/kg KGW) nicht beobachtet werden (KUIPER-GOODMAN et al., 1987).

Gesicherte Daten bezüglich der Wirkung von ZEA beim Menschen liegen nicht vor. Einige Autoren vermuteten allerdings einen Zusammenhang zwischen dietärer ZEA-Aufnahme und Hyperplasien des Endometriums (TOMASZEWSKI et al., 1998) oder sexueller Frühreife bei Pubertierenden (SAENZ DE RODRIGUEZ, 1985; SZUETS et al., 1997). Klare kausale Zusammenhänge existieren für diese Befunde jedoch nicht. Generell muss aber davon ausgegangen werden, dass ZEA beim Menschen ähnliche Wirkung besitzt wie beim Tier.

Eine Risikobewertung von ZEA wurde, analog zu DON, von mehreren internationalen Gremien durchgeführt. In zwei Dokumenten ist die Evaluierung und Bewertung von ZEA durch JECFA bzw. die Codex Alimentarius Kommission für Lebensmittelzusatzstoffe und Kontaminanten beschrieben (Report of the 32nd Session of the Codex Committee on Food Additives and Contaminants. Beijing, People`s Republic of China, 20-24 March 2000, JOINT FAO/WHO Food Standards Programme Codex Alimentarius Commission. Twenty-fourth Session Geneva, Switzerland, 2-7 July 2001 und Eriksen et al., 2000). Zusammenfassend wird aufgrund der östrogen wirksamen Eigenschaften eine vorläufige maximal tolerierbare Tagesaufnahme (PMTDI) vorgeschlagen. Basis dieses PMTDI sind hormonelle Effekte beim weiblichen Schwein, zugrunde gelegt wurden die Ergebnisse einer 15-Tage-Studie bei weiblichen Schweinen (EDWARDS et al., 1987) in der ein NOEL-Wert für ZEA von 40 µg/kg Körpergewicht ermittelt wurde. Aufgerundet und unter Verwendung eines Sicherheitsfaktors von 100 ergab sich daraus ein PMTDI von 0,5 µg/kg Körpergewicht.

Unter Berücksichtigung anderer Ergebnisse und Risikobewertungen, insbesondere für α -Zearalanol empfehlen die Autoren, dass dieser PMTDI alle Zearalenon-Analoga einschließen sollte. In der JECFA-Evaluation 646 (WHO Food Additives Ser 23) zu Zeranol wird für den Wachstumsförderer eine erlaubte Tagesdosis (ADI) von 0-0.0005 mg/kg Körpergewicht (d.h. ebenfalls 0,5 µg/kg Körpergewicht) festgelegt. Der Einsatz von Zeranol ist allerdings in der Europäischen Union nicht erlaubt.

ZEA wurde des Weiteren im Jahr 2000 durch den SCF bewertet (Opinion of the Scientific Committee on Food on Fusarium Toxins Part 2: Zearalenone (ZEA) 22 June SCF/CS/CNTM/MYC/22 Rev 3 Final). Abweichend von der JECFA-Bewertung wird hier trotz identischer Datenlage eine vorläufige tolerierbare Tagesaufnahme (tTDI) von 0,2 µg/kg Körpergewicht und Tag festgelegt. Der niedrigere TDI resultiert aus einem vom SCF gewählten, höheren Sicherheitsfaktor von 200 (JECFA: 100), der einer „als mit Defiziten belasteten Datenlage“ Rechnung trägt. Dieses Defizit ist, ähnlich wie für DON beschrieben, darauf zurückzuführen, dass zwar Studien vorliegen, die einen niedrigeren TDI rechtfertigen würden (insbesondere BAUER et al., 1987), diese aufgrund von Kritikpunkten am Studiendesign aber nicht berücksichtigt wurden. SCF schätzt im gleichen Dokument die Aufnahme von ZEA durch den Verbraucher für verschiedene europäische Länder auf 0,02-0,06 µg/kg Körpergewicht und Tag.

2.4 Metabolismus von DON und ZEA nach oraler Aufnahme

2.4.1 DON

Hauptmetabolit von DON im tierischen Organismus scheint vor allem die deepoxidierte Form (DOM-1) zu sein, wie aus einigen Untersuchungen von Plasma, Urin und Faeces verschiedener Tierspezies hervorgeht (BAUER, 1995; CÔTÉ et al., 1985; ERIKSEN & PETTERSSON., 2003; KOLLARCZIK et al., 1994). Für die Metabolisierung zu DOM-1 werden vor allem die Mikroorganismen im Darm und Pansen verantwortlich gemacht, wie *in vivo* durch Fütterungsstudien an Schweinen (LAUBER et al., 2000; ERIKSEN et al., 2002) und Rindern (CÔTÉ, 1985) nachgewiesen wurde. Dabei zeigten verschiedene Fütterungs- und *in vitro* Studien auch, dass die Mikroorganismen im Darm in der Lage sind sich an das Toxin zu adaptieren und an der Umwandlung zu DOM-1 mitzuwirken (LAUBER et al., 2000; ERIKSEN et al., 2002). *In vitro* durchgeführte Versuche an Darmsegmenten vom Schwein (KOLLARCZIK et al., 1994) bestätigten diese Ergebnisse. Vor allem in den kaudalen Darmabschnitten fand die Deepoxidierung des Toxins statt. Auch bei *in vitro*-Versuchen an Pansenflüssigkeit zeigte sich eine Beteiligung der Mikroflora an der Metabolisierung des DON zu DOM-1 (KING et al., 1984; CÔTÉ et al., 1986). Diese Transformation ging mit einem Verlust der Toxizität einher, was anhand eines MTT-Zellkulturtests, mit Schweinenierenzellen als Zielzellen, nachgewiesen werden konnte (KOLLARCZIK et al., 1994). ERIKSEN & PETTERSSON (2003) fanden im Gegensatz dazu diese Eigenschaft der Deepoxidierung von DON nicht in humanen Faeces, was die Frage aufwirft, ob man toxikologische Studien von Tieren auf den Menschen übertragen kann. Sowohl DON als auch DOM-1 werden im Organismus weiter in die glucuronidierten Formen umgewandelt (CÔTÉ, 1985; MEKY et al., 2003).

Die Ausscheidung von DON beim Rind erfolgt überwiegend über den Urin, vor allem als glucuronidiertes DOM-1. Daneben wurden geringere Konzentrationen unverändertes DON sowie nicht glucuronidiertes DOM-1 festgestellt (CÔTÉ, 1985). Auch bei anderen Spezies scheint die Hauptausscheidung von DON über den Urin zu erfolgen (JECFA, 2001).

2.4.2 ZEA

Der Metabolismus von ZEA ist relativ komplex und umfasst neben einer Spaltung der Doppelbindung an C1-C2 (Umwandlung der „-enon“ bzw. „-enol“ in die „-anon“ bzw. „-anol“-Formen) und der Reduktion der 6-Ketogruppe (Umwandlung der „-on“ in die „-ol“-Formen) Glucuronidierungs- sowie Sulfatierungsreaktionen (KUIPER-GOODMAN et al., 1987; ERASMUSON et al., 1994, Abbildung 4). Hierbei existieren tierartenspezifische Unterschiede hinsichtlich der bevorzugt gebildeten Metaboliten.

Beim *Schwein* kommt es nach einer raschen Absorption des Toxins zu einer Metabolisierung in der Leber, anschließender biliärer Exkretion und einer Rückresorption des Toxins aus dem Darm. Auf diese Weise zirkuliert das Toxin lange Zeit im Organismus, was seine lange Plasmaeliminations-Halbwertszeit ($t_{1/2el}$) von 86,6 h erklärt (BIEHL et al., 1993). Die operative Unterbrechung der enterohepatischen Rezirkulation bewirkte die Reduktion in $t_{1/2el}$ auf 3,34 h. Hauptmetaboliten sind glucuronidiertes ZEA und α -Zearalenol (BIEHL et al., 1993; MIROCHA et al., 1981; BAUER et al., 1987). In anderen Studien wurde ebenfalls vor allem α -Zearalenol nachgewiesen, zu einem geringen Teil auch β -Zearalenol und ZEA, ebenfalls als Glucuronide. Die Metaboliten α -Zearalanol (Zeranol) und β -Zearalanol (Taleranol) konnten dagegen nicht detektiert werden (ZÖLLNER et al., 2002). Im Muskelgewebe dagegen wurden relativ hohe Anteile des nichtglucuronidierten α -Zearalanol (Zeranol) und α -Zearalenol zusammen mit Spuren von β -Zearalanol (Taleranol) und ZEA gefunden. Die Autoren schließen daraus, dass der Metabolismus von ZEA nicht nur auf den hepatischen und gastrointestinalen Weg beschränkt ist (ZÖLLNER et al., 2002). Im Widerspruch hierzu fand sich in Untersuchungen der Gallen von Zuchtsauen β -Zearalenol als bedeutender Metabolit neben α -Zearalenol und ZEA (MEYER et al., 1997). Neben der Leber spielt auch die Darmmukosa des Duodenums eine große Rolle bei der Konjugation und Reduktion von ZEA (BIEHL et al., 1993; OLSEN et al., 1987). Dieser Aspekt ist in Hinsicht des Zirkulierens im enterohepatischen Kreislauf und der Reabsorption des Toxins wichtig und konnte in *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen dargestellt werden (BIEHL et al., 1993). Auch eine Beteiligung der natürlich vorkommenden Mikroflora im Darm konnte in einer *in vitro*-Studie nachgewiesen werden. Vor allem in den caudalen (Caecum, Colon, Rectum) Segmenten des Darms fanden die Umwandlungen der Toxine statt, dabei wurde ZEA zu seinen Metaboliten α -Zearalenol und einer weiteren, nicht weiter charakterisierten Substanz hydrolysiert (KOLLARCZIK et al., 1994).

Beim *Wiederkäuer* findet eine Metabolisierung von ZEA zu α -Zearalenol in der Leber statt. Im Gegensatz zum Schwein wurde aber hier zudem β -Zearalenol als Metabolit gefunden, wenn auch im geringeren Umfang (DÄNICKE, 2000; KIESSLING et al., 1984). In Fütterungsstudien bei männlichen Schafen waren Rückstände von ZEA bzw. ZEA-Metaboliten nur in der Galle zu finden, wobei β -Zearalenol mit 68 % überwog. Der Anteil α -Zearalenol lag bei 8 % und ZEA bei 24 % vor. In allen anderen untersuchten Organen und Körperflüssigkeiten lagen die Gehalte an ZEA bzw. ZEA-Metaboliten unter der Nachweisgrenze (DÄNICKE et al., 2002).

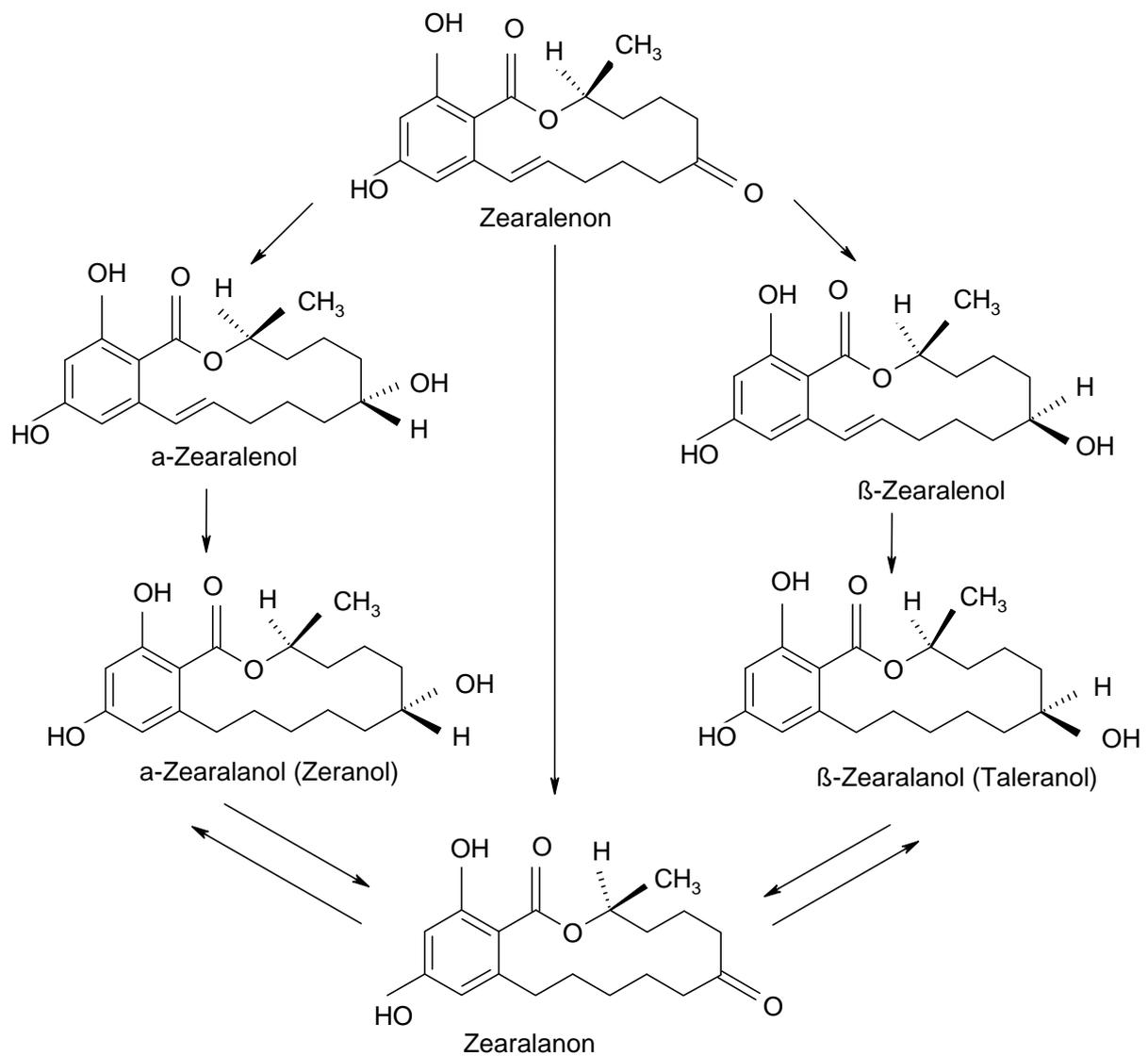


Abbildung 4: ZEA und seine *in vivo*-Hauptmetaboliten bei Schwein und Rind (konjugierte Formen sind nicht dargestellt) (nach ERASMUSON et al., 1994)

2.4.3 Carry over von DON und ZEA

Nach einmaliger Verabreichung von DON (1 mg/kg KGW i.v.) an Schweine zeigte sich eine schnelle Verteilung des DON in alle Gewebe (nach 33 min) mit den höchsten Konzentrationen in Plasma, Niere, Leber, Urin und Galle. Es kam aber zu einer schnellen Abnahme, so dass von einer extensiven Aufnahme und Speicherung in den Organen und Geweben nicht auszugehen ist (PRELUSKY & TRENHOLM, 1991). Im Gegensatz zu DON kann es zu einer Anreicherung der ZEA-Metaboliten Zeranol und α -Zearalenol in der Rückenmuskulatur von Schweinen kommen (ZÖLLNER et al., 2002).

Ein möglicher Übergang von DON und DOM-1 in die Milch wurde in einigen Fütterungsstudien überprüft (VUDATHALA et al., 1994; CÔTÉ et al., 1985; CHARMLEY et al., 1993; PRELUSKY et al., 1984). DON wurde nach einmaliger oraler Applikation (920 mg/Kuh) in Konzentrationen bis max. 4 ng/ml Milch gefunden, DOM-1 wurde in dieser Studie nicht untersucht (PRELUSKY et al., 1984). Nach fünftägiger Fütterung von mit *F. graminearum* beimpften Mais (66 mg DON/kg Futter; 0,7 mg DON/kg KGW) wurden in der Milch DOM-1-Gehalte bis zu 26 ng/ml nachgewiesen (CÔTÉ et al., 1985). Insgesamt scheint ein Übergang von DON bzw. DON-Metaboliten aufgrund der vorliegenden Ergebnisse sehr gering zu sein. Studien zur Metabolisierung von ZEA bei Milchkühen ergaben, dass ZEA und seine Analoga in toxikologisch nicht relevanten Konzentrationen in der Milch ausgeschieden werden (SHREEVE et al., 1979; HAGLER et al., 1980; MIROCHA et al., 1981). Im Gegensatz zu allen früheren Befunden wurde jedoch im Rahmen des SCOOP-Projektes „Fusariantoxine“ (2003) aus Großbritannien über eine Belastung der Konsummilch mit ZEA (max. 5,5 $\mu\text{g/l}$) und einigen Analoga (max. 12,5 $\mu\text{g/l}$) berichtet.

In Fütterungsstudien an Legehennen (4 - 5 μg DON/kg Futter über 20-190 d) konnte kein Übergang von DON in Eier (Nachweisgrenze 10 $\mu\text{g/kg}$) nachgewiesen werden (EL-BANNA et al., 1983). Dagegen konnten bei einmaliger Gabe von 2,2 mg DON nach 24 h DON-Gehalte in den Eiern nachgewiesen werden (1,9 $\mu\text{g}/60$ g Ei), die aber rasch wieder absanken. Bei Fütterung über 6 Tage war der Gehalt in den Eiern höher (4,2 $\mu\text{g}/60$ g Ei), sank aber schnell nach Gabe toxfreier Futters (PRELUSKY et al., 1987). Ein Übergang von ZEA in die Eier war ebenfalls nicht festzustellen (DÄNICKE et al., 2001). Auch bei Eiern ist somit nicht von einem relevanten carry-over auszugehen.

2.5 Bildung und Vorkommen von DON und ZEA

Der Befall von Getreide mit *Fusarium* wird durch feuchtes Wetter in der Wachstumsperiode, vor allem während der Blüte, begünstigt. Als weitere begünstigende Faktoren eines *Fusarium*-Befalls gelten enge Mais-Getreidefruchtfolgen, pfluglose Bodenbearbeitung und übermäßige Stickstoffversorgung. Bei sachgemäßer, trockener Lagerung geht die Bildung von Fusarientoxinen im Lager nicht weiter. Fusarientoxine können in allen Getreidearten vorkommen, besonders aber in Mais und Weizen (DÄNICKE & VALENTA, 1999). Die Belastung von Getreide mit den Mykotoxinen DON und ZEA ist aufgrund des ubiquitären Vorkommens von *F. graminearum* und *F. culmorum* ein weltweites Problem, in vielen Ländern der Erde konnten DON und ZEA im Getreide nachgewiesen werden (TANAKA et al., 1988; JECFA, 2001) (Tabelle 11).

ADLER et al. (1990) untersuchten 132 Fusarienstämmen auf ihr Toxinbildungsvermögen. Als im Kulturversuch toxinogen erwiesen sich dabei Isolate folgender Arten: *F. graminearum*, *F. culmorum* für DON und ZEA sowie *F. sambucinum* für ZEA. Auch JIMENEZ et al. (1996) fanden *F. graminearum* als am häufigsten vorkommenden Toxinbildner für ZEA. Die höchste Toxinausbeute für ZEA wurde bei Inkubationszeiten von 30 Tagen erreicht, wobei es gewisse Unterschiede zwischen den einzelnen Isolaten gab. Für *F. graminearum* fand sich die höchste ZEA-Toxinbildung bei Bebrütungsbedingungen von 28 °C für 2 Wochen und anschließender Inkubation bei 12 °C. Bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C wurde kein ZEA nachgewiesen. In einer Studie von ENGELHARDT et al. (1986) fanden sich keine Hinweise auf den Einfluss einer niedrigen Temperatur auf die Toxinbildung, eine optimale Inkubationstemperatur lag auch hier zwischen 27 und 28 °C. Die Bildung von Trichothecenen kann *in vitro* durch Zugabe bestimmter natürlich vorkommender Pflanzenmetaboliten gehemmt werden, das Pilzwachstum ist dadurch aber nicht beeinflusst (DESJARDINS et al., 1993).

Tabelle 11: Toxinbildende Fusarienpilze

Fusarium-Spezies	Toxin	Referenz
<i>F. graminearum</i>	DON, ZEA, 3-AcDON, 15-AcDON	ADLER et al. (1990) ENGELHARDT et al. (1986) JIMENEZ et al. (1996) LAUREN et al. (1992) MIROCHA et al. (1994)
<i>F. culmorum</i>	DON, ZEA, 3-AcDON, 15-AcDON, Nivalenol, Fusarenon X	ADLER et al. (1990) BAKAN et al. (2001) JIMENEZ et al. (1996) MIROCHA et al. (1994)
<i>F. tricinctum</i>	DON, ZEA, 3-AcDON	ENGELHARDT et al. (1986)
<i>F. sambucinum</i>	ZEA	ADLER et al. (1990)
<i>F. oxysporum</i>	ZEA	JIMENEZ et al. (1996)

Die Belastung des Getreides mit dem Mykotoxinen DON und ZEA legt den Schluss nahe, dass auch die daraus hergestellten Lebensmittel belastet sind und die Gesundheit der Menschen gefährden können. Um eine fundierte Risikoabschätzung vorzunehmen, sind schon einige Untersuchungen an Lebensmitteln vorgenommen worden (Tabellen 12 und 13). In den meisten durchgeführten Untersuchungen waren Weizen und Produkte aus Weizen höher mit DON belastet als andere Getreidearten (DÖLL et al., 2000; MAJERUS et al., 2002). In der Gruppe der Weizenmehle konnten wiederum Vollkornprodukte, Kleie und Produkte mit hohem Aschegehalt (Type 550, 1050) als am höchsten belastet gefunden werden (SCHOLLENBERGER et al., 2002a; USLEBER et al., 2000). Mit ZEA belastet sind vor allem Mais und daraus hergestellte Produkte, wie Maismehl oder Polenta (BASSEN & THIELERT, 2000; USLEBER & MÄRTLBAUER, 1998). Ein weiterer Unterschied ist in ökologischer und konventioneller Anbauweise des Getreides zu sehen, dabei sind, wie die Ergebnisse einiger Arbeiten zeigen, ökologisch hergestellte Produkte geringer belastet (BASSEN & THIELERT, 2000; DÖLL et al., 2000; USLEBER et al., 2000). Im Gegensatz dazu fanden MARX et al. (1995) ökologisch angebaute Getreide höher mit DON und ZEA belastet als Konventionelle. Außerdem sind Schwankungen in der Belastung der Getreide mit den Mykotoxinen DON und ZEA zwischen den einzelnen Untersuchungsjahren zu sehen, so war 1998 ein „schlimmes“ Jahr mit hohen Toxinwerten (DÖLL et al., 2000; ELLNER, 2000;

BASSEN & THIELERT, 2000; SCHOLLENBERGER et al., 2002a), wohingegen 1999 weniger belastete Proben zu finden waren (ELLNER et al., 2000; SCHOLLENBERGER et al., 2002a).

Durch Fermentationsprozesse während des Brotbacken kann es zu einer Reduktion des DON-Gehaltes kommen, wenn Temperaturen von über 30 °C gewählt werden (SAMAR et al., 2001). Backen bei Temperaturen von rund 200 °C führt zu einer partiellen Umwandlung von DON in ein Isomer, wobei allerdings der überwiegende Teil des Toxins in unveränderter Form nachweisbar bleibt (SCOTT et al., 1983; SCOTT et al., 1984; WOLFF, 2005). Durch Kochen von Teigwaren kann der DON-Gehalt gesenkt werden, da ein Teil des Toxins in das Kochwasser übergeht (BOCKHORN et al., 2001).

Tabelle 12: Vorkommen von DON in Lebensmitteln

Probenart	n	Region	Jahr	Methode (NWG)	Pos (%)	Kontaminationshöhe in µg/kg			Referenz
						Med	MW	Max	
Diverse Lebensmittel	447	Baden Württemberg		HPLC (40 µg/kg)	33		500-900	BASSEN & THIELERT (2000)	
Nudeln	29	Berlin	2001	HPLC-DAD GC-MS	55		200-400	840 BOCKHORN et al. (2001)	
Roggenmehl	13	Hessen und	2001	HPLC	85	91*	86*	167 MAJERUS et al. (2002)	
Weizenmehl	81	Rheinland-Pfalz		(10-40 µg/kg)	73	161*	124*	497	
Weizengrieß	22				86	626*	587*	1260	
Flakes	23			EIA	30	194*	129*	598	
Brot	32			(50-100 µg/kg)	34	90*	87*	197	
Nudeln	44				64	472*	297*	3020	
Säuglingsnahrung auf Getreidebasis	70				17	104	104	283	
Weizenmischbrot	10	Tübingen	1999	HPLC	30			SCHMIDT & THIELERT	
Weizenmehl	10			HPLC	70			521 (2001)	
Roggenmehl	10				10				
Weizenmehl Type 405	28	Stuttgart	1999	GC-MS	100	239*	156*	965 SCHOLLENBERGER et al.	
Weizenmehl Type 550	13			(2-12 µg/kg)	92	234*	157*	756 (2002a)	
Vollkornweizenmehl	19				100	404*	284*	1379	
Weizen	115	Baden Württemberg	1998, 2000	GC-MS	96	471*	196*	7730 SCHOLLENBERGER et al.	
Weizenmehl	60	Stuttgart	1999	(2-12 µg/kg)	98	292*	199*	1380 (2002b)	
Brot	141	Stuttgart	1998		90	134*	100*	690	
Nudeln	67	Stuttgart	1998, 1999		91	322*	106*	4840	
Weizen	41	Deutschland	2000, 2001	GC-MS (7 µg/kg)	95		309	24 SCHOLLENBERGER et al.	
Hafer	17				71		170	720 (2006)	
Mais	41				100		849	3820	
Bier	32	Niederlande	2000, 2001	GC-FID (25 µg/L)	3			41 SCHOTHORST & JEKEL.	
	9	Deutschland			0			(2003)	
	9	Belgien			22			36	
Mehl	27	Hessen		EIA		230	249	612 TASCHAN et al. (2000)	
Malz	32			(3,7-18,5 µg/kg)		96	119	451	
Bier	150	Deutschland und Importware				33	36	123	

Fortsetzung Tabelle 12

Probenart	n	Region	Jahr	Methode (NWG)	Pos (%)	Kontaminationshöhe in µg/kg			Referenz
						Med	MW	Max	
Weizenmehl Type 405	42	München	1999	EIA (111 µg/kg)	71	200*	200*	330	USLEBER et al. (2000)
Weizenmehl Type 550	9				33	400*	410*	420	
Weizenmehl Type 1050	11				91	340*	370*	760	
Brotbackmischung	14				79	200*	210*	320	
Vollkornmehl	20				65	270*	300*	430	
Körnerweizen	8				75	270*	280*	430	
Weizenkleie	20				85	700*	830*	2100	
Roggenmehl und -körner	7				29	120*	120*	120	
Gerste	10	München	1997	EIA (30 µg/kg)	90		105 ± 134	440	USLEBER & MÄRTLBAUER
Mais	10				80		548 ± 326	880	(1998)
Roggen	10				70		51,1 ± 18,3	86	
Weizen	20				85		143 ± 118	370	
Weizen, Roggen, Gerste und Produkte	48	Sachsen-Anhalt	2001	HPLC (70 µg/kg)	33			400	WOESE et al. (2001)

*: aus den positiven Proben berechnet; *konv.*: konventionell, *ökol.*: ökologisch; *HPLC*: Hochdruckflüssigkeitschromatographie, *EIA*: Enzymimmunttest; *GC-MS*: Gaschromatographie-

Massenspektrometrie; *ohne Zeichen*: keine Angaben, *NWG*: Nachweisgrenze; *Pos*: Positive; *Med*: Median; *MW*: Mittelwert; *Max*: Maximalwert

Tabelle 13: Vorkommen von ZEA in Lebensmitteln

Probenart	n	Region	Jahr	Methode (NWG)	Pos (%)	Kontaminationshöhe in µg/kg			Referenz
						Med	MW	Max	
Diverse Lebensmittel	359	Baden Württemberg		HPLC (2,5-5 µg/kg)	10			59 (Mais)	BASSEN & THIELERT (2000)
Weizenmehl Type 405	28	Stuttgart	1999	HPLC (1 µg/kg)	11	1*	1*	2	SCHOLLENBERGER et al. (2002a)
Weizenmehl Type 550	13				31	4*	4*	8	
Vollkornweizenmehl	19				79	6*	4*	24	
Weizenkörner	115	Baden-Württemberg	1998, 2000	HPLC (1 µg/kg)	71	8*	15*	158	SCHOLLENBERGER et al. (2002b)
Weizenmehl	60	Stuttgart	1999		38	3*	5*	24	
Weizen	41	Deutschland	2000, 2001	HPLC (1 µg/kg)	63		15		SCHOLLENBERGER et al. (2006)
Hafer	17				24		21		
Mais	41				85		48	860	
Weizen	20	München	1996, 1997	EIA (5 µg/kg)	30	10*	9*	12	USLEBER & MÄRTLBAUER (1998)
Gerste	10				30	5,5*	5,7*	6,4	
Roggen	10				40	6,5*	7,6*	12	
Mais	10				80	48*	55*	92	
Weizenmehle, Roggen, Brot	12	Sachsen-Anhalt		HPLC (20 µg/kg)	0	< 20	< 20	< 20	WOESE (2001)

*: aus den positiven Proben berechnet; *konv.*: konventionell; *ökol.*: ökologisch; *HPLC*: Hochdruckflüssigkeitschromatographie; *EIA*: Enzymimmunttest; *GC-MS*: Gaschromatographie-Massenspektrometrie; *ohne Zeichen*: keine Angaben; *NWG*: Nachweisgrenze; *Pos*: Positive, *Med*: Median, *MW*: Mittelwert, *Max*: Maximalwert

2.6 Nachweis von DON und ZEA

2.6.1 Extraktion und Reinigung

Methoden zur Extraktion von DON und ZEA aus Probenmatrix werden durch die Löslichkeitseigenschaften dieser Toxine, aber auch durch die Charakteristika der jeweiligen Nachweisverfahren bestimmt. Die Extraktion des relativ polaren DON erfolgt durch mechanisches Schütteln in Wasser (CAHILL et al., 1999), Wasser/Acetonitril oder Wasser/Methanol (90:10, v/v) (CURTUI et al., 2003), während das eher unpolare ZEA besser in Acetonitril/Wasser (80:20 - 90:10, v/v) (DE SAEGER et al., 2003; SILVA & VARGAS, 2001) oder Methanol/Wasser (50:50, v/v) (DE SAEGER et al., 2003) extrahierbar ist. In früheren Versuchen wurde ZEA in Chloroform extrahiert (BAGNERIS et al., 1986; BENNETT et al., 1985).

Als Clean-up-Verfahren kommen Festphasen-Extraktion, Flüssig-Flüssig-Partitionierungen oder die Reinigung mittels Immunaффinitätssäulen (IAC) in Frage.

Für die Festphasen-Extraktion gibt es eine Reihe von stationären Phasen, wie z. B. Kieselgel, Aluminiumoxid, Florosil (Magnesiumsilikat), Aktivkohle und Octadecylsilan (silanisiertes Kieselgel; C18-Reverse Phase Säulen), wobei zum Clean-up von DON zumeist Aktivkohle verwendet wird (ROMER, 1986; CROTEAU et al., 1994; FERNANDEZ et al., 1994; SCHAAFSMA et al., 1998; WALKER & MEIER, 1998). Der Einsatz von Florosil als stationäre Phase wird ebenfalls beschrieben (TANAKA et al., 2000). Als Vorteil der Festphasen-Extraktion mittels dieser stationären Phasen werden gute Reinigungswirkung und Wiederfindung genannt (BASSEN & THIELERT, 2000). Nachteile sind die hohe Zeitaufwendigkeit, der hohe Lösungsmittelverbrauch und die geringe Automatisierbarkeit (BASSEN & THIELERT, 2000). Mycosep-Säulen, die eine Mischung von verschiedenen Medien enthalten, bieten im Gegensatz dazu nach Ansicht einiger Autoren (BASSEN & THIELERT, 2000; KRŠKA et al., 2001) eine sehr gute Reinigungswirkung und Wiederfindung. Sie kommen in der Analytik von Mykotoxinen sehr häufig zum Einsatz (BERGER et al., 1999; RAZZAZI-FAZELI et al., 1999, RUPP, 2002; TRUCKSESS et al., 1996).

Für die Analytik von ZEA sind in der Literatur vor allem Flüssig-Flüssig-Partitionierungen mit Methylenchlorid beschrieben (BAGNERIS et al., 1986; BENNETT et al., 1985).

Durch die Entwicklung spezifischer Antikörper und ihren Einsatz in IAC`s ist eine selektive Aufreinigung des Probenmaterials möglich. Verschiedene Säulen sind speziell für DON und ZEA im Handel, die sich aber hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften unterscheiden. Vorteile sind ihre meist hohe Spezifität (>80 % Bindung von DON) (CAHILL et al., 1999) und Sensitivität sowie eine gute Automatisierbarkeit der Methode mit dem Nachteil, dass die Säulen relativ teuer sind und die Qualität mit der Güte der Antikörper steht und fällt (BASSEN & THIELERT, 2000).

Eine Übersicht über die in der Literatur beschriebenen Extraktions- und Reinigungsverfahren für DON bzw. ZEA ist in Tabelle 14 zusammengestellt.

Tabelle 14: Extraktions- und Aufreinigungsverfahren für DON und ZEA aus verschiedenen Probenmaterialien

Toxin	Probenmaterial (Menge)	Extraktion		Referenz
		Extraktionsmittel	Vol. (ml) Dauer (min)	
DON	Nudeln (10 g)	Acetonitril/Wasser 84:16, v/v	40 90	Romer-Säule, abdampfen, auflösen in mobiler Phase HPLC (2001)
DON	Weizen (50 g)	10 g Polyethylenglycol + Wasser	200	DONtest-HPLC Säule, eluieren mit Methanol, abdampfen, auflösen in Acetonitril/Wasser 10:90, v/v (1999)
DON	Getreideprodukte Brot (50 g)	Methanol/Wasser 70:30, v/v	150	Ammoniumsulfat+Kieselgurde ChemElute Säule (Varian), eluieren mit Ethylacetat, abdampfen, lösen in Dichlormethan/Methanol 3:1, v/v
	Babynahg. (50 g)		200	
DON	Getreide	Acetonitril/Wasser 3:1, v/v		Florosil-Trennsäule MARX et al. (1995)
DON	Futter-/ Lebensmittel (25 g)	Acetonitril/Wasser 84:16, v/v	100	60 Aktivkohle/Aluminiumsäule, eluieren mit Acetonitril/Wasser 84:16, v/v ROMER (1986)
DON	Bier (10 ml), entgast			1. ChemElute (Varian) Säule, eluieren mit Ethylacetat, 2. Mycosep 227- und Mycosep 216-Säulen (Romer Labs), beide übereinander gepackt, eluieren mit Acetonitril/Wasser 90:10, v/v SCHOTTHORST & JEKEL (2003)
DON	Milch (3 ml)	Essigsäure/Wasser 5:95, v/v	0,3 15	1. Extrelut-Säule, eluieren mit Methanol/Acetonitril 6:94; v/v, 2. Aktivkohle/Aluminiumsäule, eluieren mit Acetonitril/Wasser 21:4; v/v VUDATHALA et al. (1994)
DON	Weizenmehl (5-10 g)	Acetonitril/Wasser 84:16, v/v	50	5 Mycosep-Säule WALKER & MEIER (1998)
ZEA	Mais (25 g)	Methanol/Wasser 50:50, v/v	100	30 1. C 18 Festphasenextraktionssäule, eluieren mit Methanol, 2. Florosil, eluieren mit Methanol DE SAEGER et al. (2003)
ZEA	Mais, (20 g)	Acetonitril/Wasser 90:10, v/v	50	30 ZearalaTest-Säule, eluieren in Methanol
ZEA	Getreide	Acetonitril/Wasser 3:1, v/v		Florosil-Trennsäule, Probenaliquot (10 g) in Chloroform gelöst, mit Natronlauge ausgeschüttelt, abzentrifugiert, Rücktitration der NaOH-Phase in neutralen Bereich mittels Phosphorsäure MARX et al. (1995)
ZEA	Mais (25 g)	Acetonitril/Wasser 84:16, v/v	100	5 Mycosep-224 Säule, abdampfen, lösen in Methanol/Wasser 80:20, v/v SILVA & VARGAS (2001)
ZEA	Bier (50 ml), entgast	Ohne weitere Extraktion	30	RP 18 SPE-Säule, eluieren mit Ammoniumacetat in Methanol/Wasser 70:30, v/v ZÖLLNER et al. (2000)

Vol: Volumen

2.6.2 Biologische Nachweisverfahren

Generell sind biologische Nachweisverfahren unter Verwendung von Tieren für Mykotoxine heute nicht mehr gebräuchlich und finden insbesondere in der Routineanalytik keine Verwendung mehr. Zellkulturtests sind aufgrund ihrer Unspezifität für den gezielten Nachweis von einzelnen Mykotoxinen in Lebens- und Futtermittel ungeeignet. Veröffentlichungen aus den 80er Jahren berichten über Nachweisverfahren an Mäusen (BURMEISTER et al., 1980) und in Hühnerembryonen (PRELUSKY et al., 1987), die aber unspezifisch sind und eine geringe Empfindlichkeit aufweisen. Weiterentwicklungen aus den letzten Jahren arbeiten mit Zellkulturlinien. HANELT et al. (1994) entwickelten z.B. einen MTT (Methylthiazoltetrazolium)-Zellkulturtest zum Screening auf Mykotoxine, der auf dem hemmenden Einfluss der Toxine auf metabolisch aktive Zellen (Schweinenierenzellen, He-La-Zellen, Madin-Darbin-Zellen aus der Hundeniere) beruht. Dieser Test ist schnell und einfach durchführbar und kann für viele verschiedene Probenmaterialien eingesetzt werden. Die Nachweisgrenze des Testsystems liegt bei 0,8 µg/ml. MITTERBAUER et al. (2003) entwickelten eine kostengünstige Methode zum Nachweis von ZEA auf Basis eines Hefe Bio-Nachweises. Als Indikator diente der *Saccharomyces cerevesiae* Stamm YZRM7, der nicht in der Lage ist ohne ein Pyrimidin-Biosynthese-Gen, das durch humane Östrogenrezeptoren in Anwesenheit von exogener östrogenen Substanz exprimiert wird, zu wachsen. Weniger als 1 µg ZEA/l Medium ist nötig, um den Stamm zum Wachsen zu bringen. Ein vorheriges Reinigen des Probenmaterials ist nicht notwendig. Ein Nachteil des Tests ist die Erfassung aller östrogen wirksamen Substanzen einer Probe (z.B. Phytoöstrogene) und die Möglichkeit daraus resultierender falsch-positiven Aussagen.

2.6.3 Physikalisch-chemische Nachweisverfahren

2.6.3.1 Dünnschichtchromatographie

In der Dünnschichtchromatographie (DC) kommt es zur Trennung von Stoffen aus einer flüssigen mobilen Phase heraus an eine Festphase (stationäre Phase). Als stationäre Phasen dienen beispielsweise Aluminiumoxid oder Kieselgel. Die Art des Fließmittels hängt von der Polarität der zu trennenden Substanzen ab. Günstig sind oft Mischungen aus einer stärker und einer schwächer polaren Komponente, deren Mischungsverhältnis verändert werden kann. Die Detektion wird entweder anhand der Eigenfarbe des Toxins oder durch Einsatz von

Fluoreszenzzusätzen sowie UV-Licht oder aber nach Derivatisierung, durchgeführt. Die qualitative Auswertung erfolgt über die ermittelten R_f -Werte, die die Lage einer Substanz im Chromatogramm beschreiben:

$$R_f = \frac{\text{Entfernung Start-Substanzfleckmitte}}{\text{Entfernung Start-Laufmittelfront}}$$

Die Entwicklung von Deoxynivalenol erfolgt zumeist mit Chloroform/Methanol-Gemischen (KAMIMURA et al., 1981; YUWAI et al., 1994) oder Chloroform/Aceton-Gemischen (FERNANDEZ et al., 1994; MARX et al., 1995) als Laufmittel. Die Detektion erfolgt aufgrund fehlender Eigenfluoreszenz, nach Derivatisierung, zumeist mit Aluminiumchloridlösungen, die mit funktionellen Gruppen des Toxins spezifische Farb- oder Fluoreszenzkomplexe bilden. Die Detektion von ZEA erfolgt ohne vorherige Derivatisierung unter UV-Licht bei 365 nm Wellenlänge. Vorteile dieses Untersuchungsverfahrens sind die schnelle und kostengünstige Durchführung, durch Kombination verschiedener Derivatisierungsverfahren können auch mehrere Mykotoxine simultan erfasst werden (KAMIMURA et al., 1981). Nachteile der DC sind die oft geringe Selektivität und Sensitivität (ERIKSEN & ALEXANDER, 1998). Einige Anwendungen mittels DC sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

Tabelle 15: Anwendung dünnenschichtchromatographischer Methoden zum Nachweis von DON und ZEA. Detektion: UV-Licht bei 365 bzw. 254 nm Wellenlänge (stationäre Phase: Kieselgel 60 G)

Toxin	Probenmaterial	Mobile Phase	Derivatisierung	Rf-Wert	NWG (ng/g)	Referenz
DON	Getreide, Lebensmittel	Chloroform/Methanol, 93/7	Aluminiumchlorid	0,2	50	KAMIMURA et al. (1981)
DON	Weizen	Chloroform/Aceton/Propanol, 8/1/1	Aluminiumchlorid	0,78	40	FERNANDEZ et al. (1994)
DON	Getreide	Chloroform/Methanol, 9/1	Aluminiumchlorid	k. A.	k. A.	YUWAI et al. (1994)
DON	Getreide	1. Chloroform/Aceton/Isopropanol, 8/1/1, 2. Toluol/Ethylacetat/Ameisensäure, 6/3/1	Aluminiumchlorid	k. A.	k. A.	MARX et al. (1995)
DON	Mais, Getreide	Chloroform/Methanol, 94/6	Aluminiumchlorid	k. A.	200	SCHAAFSMA et al. (1998)
ZEA	Getreide, Lebensmittel	1. Chloroform/Methanol 93/7 2. Toluol/Aceton/Methanol, 5/3/2	Unter UV-Licht betrachten	0,6 0,8	50	KAMIMURA et al. (1981)
ZEA	Mais, Getreide	Chloroform/Methanol, 98/2		k. A.		SCHAAFSMA et al. (1998)

NWG: Nachweisgrenze, k. A.: keine Angaben

2.6.3.2 Flüssigkeitschromatographie

Unter Flüssigkeitschromatographie (LC) versteht man alle Verfahren, die mit flüssiger mobiler Phase in einer Säule oder in einer planaren Schicht durchgeführt werden. Eine Form der LC ist die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC), bei der ein Probenextrakt in einem flüssigen Lösungsmittel zum Auftrennen von einem Eluenten durch eine stationäre Phase transportiert wird, an das zum Erreichen der erforderlichen hohen Drücke ein Pumpensystem angeschlossen ist. Als mobile Phasen kommen für DON Methanol/Wasser im Verhältnis 15:85 (v/v) (LAUREN & AGNEW, 1991) oder 14:86 (v/v) (LAUREN &

GREENHALGH, 1987) und für ZEA Methanol/Acetonitril/Wasser (1:1,6:2, v/v) (BENNETT et al., 1985), Acetonitril/Wasser (50:50, v/v) (De SAEGER et al., 2003) zum Einsatz. Die Detektion der Toxine erfolgt bei ZEA mittels Fluoreszenzdetektion (BENNETT et al., 1985). Bei DON erfolgt die Messung mittels UV-Detektion bei einer Wellenlänge von 218 nm (CAHILL et al., 1999). Eine Qualifizierung der Toxine erfolgt durch Vergleich der Retentionszeiten mit denen der Standardtoxine, eine Quantifizierung durch Berechnung der Peakfläche oder Peakhöhe. In neueren Untersuchungen wird die Messung der ZEA und DON-Gehalte auch mittels der Massenspektrometrie durchgeführt (DON: RAZAZZI-FAZELI et al., 1999 und 2003; PLATTNER & MARAGOS, 2003; ZEA: JODLBAUER et al., 2000), was in Nachweisgrenzen von bis 0,5 ng/g (ZEA) resultierte (JODLBAUER et al., 2000). Im Vergleich mit einer GC-Methode für DON zeigte sich für die HPLC eine ausreichende Empfindlichkeit (Nachweisgrenze 100 ng/g) der Methode (CAHILL et al., 1999). Durch Anwendung einer Tandemmassenspektrometrie (LC-MS/MS) mit negativer oder positiver Ionisation konnten ohne komplizierte Probenaufreinigung für DON Nachweisgrenzen von < 50 ng/g erzielt werden (PLATTNER & MARAGOS, 2003). Derzeit sind LC-MS/MS Methoden für Trichothecene als Referenzverfahren im Bereich Lebensmittelhygiene in Entwicklung.

In Tabelle 16 sind einige Untersuchungen der letzten Jahre zusammengefasst.

Tabelle 16: Anwendung hochdruckflüssigkeitschromatographischer Methoden zum Nachweis von DON und ZEA

Toxin	Proben	Stationäre Phase (Säule, mittl. Partikel ϕ)	Mobile Phase	Fluß, ml/min	t_R (min)	Quant., Wellenl., nm	NWG (ng/g)	WFR (%)	Referenz
DON	Lebensmittel aller Art	RP-18	Acetonitril/Wasser 15:85 (v/v)	0,7	k. A.	k. A.	40	k. A.	BASSEN & THIELERT (2000)
DON	Weizen	C18, ϕ 3 μ m	Methanol	0,25		IT-MS	0,1	86	BERGER et al. (1999)
DON	NudeIn	Hypersil ODS	Wasser/Acetonitril 93:7 (v/v)	0,7	k. A.	UV, 220 + 230	k. A.	k. A.	BOCKHORN et al. (2001)
DON	Weizen	C18 Novapak (150 x 3,9 mm, 4 μ m)	Acetonitril/Wasser 10:90, (v/v)	0,6	k. A.	UV, 218	100	90	CAHILL et al. (1999)
DON	Getreide	Chrompak CP Shper C8	Methanol/Wasser 15:85 (v/v)	1,0	13	UV, 222	30	83-94	LAUREN & AGNEW (1991)
DON	Weizen	RP C18	Wasser/Acetonitril/ Methanol 82:9:9 (v/v/v)	1,0		APCI-MS	40	86	RAZZAZI-FAZELI et al. (1999)
DON	Schweineurin Mais	Polar-RP C18 Säule	Wasser/Acetonitril/ Methanol	1,0		MS		83,8 81,5	RAZZAZI-FAZELI et al. (2003)
DON	Weizenmehl Weizenkleie	C18 Novapak (300x3,9 mm, 5 μ m)	Methanol/Wasser 17:83 (v/v)	k. A.	k. A.	UV, 220	50	82,4	RUPP (2002)
DON	Milch	CSC-Nucl. 120A/ODS reversed-phase C ₁₈ (5 μ m)	Acetonitril/ Wasser 96:4 (v/v)	1,0	k. A.	UV, 220	5	57,1	VUDATHALA et al. (1994)
DON	Weizenmehl	Nucleosil RP 18, 250x4 mm, 5 μ m	Acetonitril/Wasser 10:90 (v/v)	k. A.	k. A.	DAD, 220, 230	1000	92-97	WALKER & MEIER (1998)
ZEA	Lebensmittel aller Art	RP-18	Acetonitril/Wasser/ Essigsäure 99:99:2 (v/v)	1,0	k. A.	k. A.	2,5 - 5,0	k. A.	BASSEN & THIELERT (2000)
ZEA	Mais	Zorbax Reverse Phase C8 oder C18	Methanol/Acetonitril/ Wasser, 1:1,6:2 (v/v)	2,0	5,5	FD: λ_{ex} variabel λ_{em} 418	k. A.	77,8- 123	BENNETT et al. (1985)
ZEA	Mais	Discovery C ₁₈ (25 cm x 4,6 mm) ϕ 5 μ m	Acetonitril/ Wasser 50:50 (v/v)	1,0	~11	λ_{ex} = 274 λ_{em} = 440	k. A.	89- 110	De SAEGER et al. (2003)
ZEA	Getreide	Zorbax ODS	Methanol/ 1% wässrige Essigsäure 62:38 (v/v)	1,0	15	FID: λ_{ex} =280 λ_{em} =460	10	72	LAUREN & AGNEW (1991)
ZEA	Mais	Spherisorb ODS 2	0,1 % Orthophosphorsäure: Acetonitril 55:45 (v/v)	0,5	k. A.	λ_{ex} = 274 λ_{em} = 440	10	85	SCUDAMORE & PATEL (2000)
ZEA	Mais	C18 ϕ 5 μ m	Methanol/Wasser 80:20 (v/v)	0,5	k. A.	λ_{ex} = 280 λ_{em} = 465	k. A.	99,4	SILVA & VARGAS (2001)
ZEA	Bier	LiChrospher 60 (5 μ m)	Methanol/Wasser 65:35 (v/v)	0,5	10,08	MS/MS	0,03	104	ZÖLLNER et al. (2000)

NWG: Nachweisgrenze, WFR: Wiederfindungsrate, t_R : Retentionszeit; Quant.: Quantifizierung, Wellenl.: Wellenlänge

2.6.3.3 Gaschromatographie

Bei der Gaschromatographie (GC) erfolgt die Trennung der Stoffe in der gasförmigen Phase. Ein gegebenenfalls flüssiges Ausgangsgemisch wird für die Analyse verdampft. Die einzelnen Komponenten werden vom Detektor qualitativ und quantitativ in Form eines Peaks erfasst. Als Detektoren können dabei Flammenionisations- (FID) (SCHOTTHORST & JEKEL, 2003), Stickstoff/Phosphor (NPD)- oder Elektroneneinfangdetektoren (ECD, CROTEAU et al., 1994; LOMBAERT, 2002; WALKER & MEIER, 1998) sowie die Massenspektrometrie (MS) (WEGMÜLLER & STEINER, 1994) dienen. Dabei ist eine einwandfreie Identifizierung der Toxine mit der MS möglich, die aus anorganischen oder organischen Substanzen in geeigneter Weise Ionen erzeugen, diese Ionen nach ihrer Masse und Ladung trennen und sie mit einem Registrierungssystem nach Masse und Häufigkeit qualitativ und quantitativ erfassen kann. Die GC ist weit verbreitet in der Analyse der Trichothecene (LOMBAERT, 2002), da es sich hierbei um nicht fluoreszierende Analyten handelt, die ebenfalls eine schlechte UV-Absorption besitzen (KRSKA et al., 2001). Die Flüchtigkeit der Trichothecene wird hierbei durch Derivatisierung an Trimethylsilyl-, pentafluorpropionyl-, Heptafluorbutyryl- oder Trifluoracetyl-derivate erhöht. TANAKA et al. (2000) entwickelten eine kapillare Gaschromatographie mit ECD, die sehr sensitiv ist und 8-keto-Trichothecene im ppt-Bereich detektiert.

In Tabelle 17 sind neuere Untersuchungen mittels GC dargestellt.

Tabelle 17: Anwendung gaschromatographischer Methoden zum Nachweis von DON und ZEA in Getreide und Lebensmitteln bzw. Kulturmedien

Toxin	Derivatisierungsreagenz	Probenmaterial	Detektion	WFR (%)	Nachweisgrenze	Referenz
DON	HFBA	Mais	ECD	73-108	50 ng/g	CROTEAU et al. (1994)
DON	HFBI	Getreideprodukte Brot Säuglingsnahrung	NICI/MS	90	20 ng/g	LOMBAERT (2002)
	TFAA	Getreide	ECD			
DON	TMS	Bier	FID	87,9-92	25 µg/l	SCHOTTHORST & JEKEL (2003)
DON	HFBA	Weizenmehl	ECD	91-103	30 ng/g	WALKER & MEIER (1998)
DON	TFAA	Getreide, Magermilchpulver, Säuglingsnahrung	MS	60-100	20 ng/g	WEGMÜLLER & STEINER (1994)
DON	TMS	Getreide Mais	MS/SIM	86 84	10 ng/g	WEGMÜLLER & STEINER (1994)
ZEA		Getreide Mais		94 93	5 ng/g	
IDT:	Ion trap detector		ECD			Elektroneneinfangdetektor
TFAA:	Trifluoressigsäureanhydrid		HFBA			Heptafluorbutyrylsäureanhydrid
HFBI:	Heptafluorbutyrylimidazol		TMS			Trimethylsilylimidazol
MS:	Massenspektrometer		SIM			Selected Ion Monitoring
FID:	Flammenionisationsdetektor		NICI			negative ion chemical ionization

2.6.4 Immunologische Verfahren

In den letzten Jahren wurden zahlreiche immunologische Verfahren zum Nachweis von Mykotoxinen entwickelt. Die Immuntests sind im Gegensatz zu physikalisch-chemischen Verfahren einfacher und schneller durchführbar und hinsichtlich des apparativen Aufwandes kostengünstiger. Unterschieden werden kann zwischen radioimmunologischen, die kaum noch eingesetzt werden, und enzymimmunologischen Verfahren. In der Routineanalytik bereits erprobte Enzymimmuntests existieren für Aflatoxin, Ochratoxin A, Zearalenon, T-2 Toxin und Diacetoxyscirpenol, die Korrelation der enzymimmunologischen Verfahren (Enzymimmunoassay, EIA) mit physikalischen Verfahren (DC, HPLC) liegt dabei zwischen 0,93 und 0,99 (MÄRTLBAUER et al., 1991; LOMBAERT, 2002). Vorteil der EIAs ist bei ausreichender Spezifität, die Möglichkeit zur quantitativen Detektion einzelner Trichothecene (LOMBAERT, 2002).

Mykotoxine sind niedermolekulare Substanzen (Molekulargewicht < 1000) und können dadurch nur im kompetitiven Testprinzip nachgewiesen werden. Das Prinzip besteht dabei in einer Konkurrenz von markiertem und freiem Antigen um eine begrenzte Anzahl von Antikörperbindungsstellen. Zur Produktion spezifischer Antikörper gegen DON oder ZEA wurden verschiedene Toxin-Proteinkonjugate synthetisiert und zur Immunisierung von Kaninchen (RENZ, 1989; USLEBER et al.; 1991 und 1992; SCHMITT et al., 1996) oder Mäusen (DIETRICH et al., 1995; RAMESH et al., 1995) eingesetzt. SCHNEIDER et al. (2000) gewannen Antikörper gegen DON aus Eiern immunisierter Hühner.

Beim **direkten kompetitiven EIA** sind die Antikörper direkt oder über Anti-Ig-Antikörper (Doppelantikörpertechnik, DASP) an ein Trägermaterial (Mikrotiterplatte) gebunden und dienen als Festphase. Freies und enzymmarkiertes Antigen konkurrieren um die freien Bindungsstellen der Antikörper. Nach einer ausreichenden Inkubationszeit werden in einem Waschschrift die nicht gebundenen Reagenzien entfernt, bevor Substrat (Chromogen) zugegeben wird. Je mehr freies Antigen in der Probe vorhanden ist, umso weniger enzymmarkiertes Antigen kann an die Antikörper binden. Somit besteht ein umgekehrt proportionales Verhältnis zwischen dem Substratumsatz durch das enzymgebundene markierte Antigen und der Menge an freiem Antigen in der Probe.

Beim **indirekten kompetitiven EIA** wird Antigen-Protein-Konjugat auf ein Trägermaterial (Mikrotiterplatte) gebunden und dient als Festkörperphase. Die Probe wird mit spezifischen

Antikörpern inkubiert, dabei konkurrieren die freien Antigene der Probe mit denen der Festphase um die Antikörperbindungsstellen. Nach einem Waschschrift (Entfernen ungebundener Reagenzien) wird enzymmarkierter Antikörper (gegen die Immunglobuline der Tierart, von der die spezifischen Antikörper stammen) hinzugefügt, nach ausreichender Inkubation und einem weiteren Waschschrift wird Substrat (Chromogen) zugegeben. Der Substratumsatz durch das enzymgebundene Toxin-Konjugat ist wiederum umgekehrt proportional zur freien Antigenmenge der Probe.

Zusätzlich zu diesen Methoden, die als Mikrotiterplatten oder Röhrchentests konzipiert sind, wurden Teststreifenverfahren entwickelt, die ein noch schnelleres Screening der Proben auf Mykotoxine zuließen. Monoklonale oder polyklonale Antikörper werden hierzu auf einer Teststreifenmembran aufgetragen, die in Verbindung mit dem entsprechenden Konjugat nach dem Prinzip des kompetitiven EIA reagieren. Die Farbintensität des Beschichtungspunktes wird visuell im Bezug auf die Negativkontrolle beurteilt (SCHNEIDER et al., 1991). In neueren Testsystemen konkurriert das auf dem Teststreifen immobilisierte Antigen-Konjugat mit dem freien Toxin der Probe um die Bindungsstellen des goldmarkierten Antikörpers der in den Teststreifen integriert ist. Bei einer toxinfreien Probe wandert der goldmarkierte Antikörper infolge von Kapillarkräften bis zum immobilisierten Konjugat, wird dort gebunden und bewirkt eine Verfärbung der Testbande, diese wird im Vergleich zu einer Kontrollbande ausgewertet (Rida®Quick DON, r-biopharm). Dieses Testsystem bietet nur eine qualitative Aussage über das Vorhandensein von Mykotoxinen und kann zur Vorselektion des Probenmaterials eingesetzt werden.

Neben in der wissenschaftlichen Literatur beschriebenen EIAs (Tabelle 18) sind seit einigen Jahren von verschiedenen Firmen (Eurodiagnostika, Neogen, Romer®Labs, Tecna, R-Biopharm) kommerzielle Testkits zum Nachweis von DON und ZEA erhältlich. Dabei liegen bei diesen Testkits die Nachweisgrenzen zwischen 4 µg/kg und 1 mg/kg für DON, sowie 0,25 und 50 µg/kg für ZEA, wobei unterschiedliche Matrices berücksichtigt werden. Die Angaben zu Kreuzreaktionen variieren zwischen den einzelnen Anbietern stark.

Tabelle 18: Untersuchung von Getreide und Lebensmitteln auf DON und ZEA unter Verwendung enzymimmunologischer Verfahren

Toxin	Probenmaterial	EIA-Methode	Kreuzreaktionen (%)	WFR (%)	NWG (µg/kg)	Referenz
DON	Weizen	indirekt	k. A.	104-120	160	SCHNEIDER et al. (2000)
DON	Lebensmittel auf Getreidebasis	direkt	DON (100) 3acDON (100) 15acDON (100) 3,15acDON (100) 3,7,15triacDON (100)	95-133	30	USLEBER & MÄRTLBAUER (1998)
DON	Weizen	direkt	DON (100) 3acDON (10.000) 15acDON (110) NIV (6,3) FusX (1,4)	71,2-79,9	200	USLEBER et al. (1992)
ZEA	Mais, Weizen, Schweinefutter	indirekt	α -Zearalenol (50) β -Zearalenol (12) α -Zearalanol (6) β -Zearalanol (3)	k. A.	k. A.	LIU et al. (1985)
ZEA	Lebensmittel auf Getreidebasis	direkt	ZEA (100) α -Zearalenol (37) β -Zearalenol (7,2) Zearalanon (60) α -Zearalanol (5,3) β -Zearalanol (3,9)	70-110	5	USLEBER & MÄRTLBAUER (1998)
ZEA	Weizen Milch	direkt	ZEA (100) α -Zearalenol (37,3) β -Zearalenol (7,2) Zearalanon (59,2) α -Zearalanol (5,3) β -Zearalanol (3,9)	82,9-100,7	20	USLEBER et al. (1992)

WFR: Wiederfindungsrate; NWG: Nachweisgrenze, k. A.: Keine Angaben

2.7 Gesetzliche Grundlagen für Höchstgrenzen für DON und ZEA in Deutschland, der Europäischen Union und anderen Ländern

Für die Festlegung von Höchstgrenzen für DON und ZEA gibt es im Moment noch keine weltweit geltenden Richtlinien. Seit Februar 2004 liegen in Deutschland (Verordnung zur Änderung der Mykotoxin-Höchstmengenverordnung und der Diätverordnung, 04.02.2004) Grenzen für verschiedene Produktgruppen vor (Tabelle 19). Diese werden prinzipiell ab 01.07.2006 durch die Änderungsverordnung (856/2005) zur Verordnung 466/2001 in Bezug auf Fusarientoxine ersetzt, wobei diese EU-weit gültigen Grenzwerte teilweise erheblich über den nationalen Höchstmengen liegen (Tabelle 20). Die FAO (Food and Agriculture Organisation of the United Nations) ist seit Jahren mit der Erarbeitung von Kontrollen und Vorsorgemaßnahmen in Hinblick auf die Kontamination von Lebensmitteln durch Mykotoxine befasst. 1995 wurde eine Zusammenstellung über Regelungen, Toleranzgrenzen, Probennahme und Analyse auf globaler Ebene unter dem Namen „FNP 64-World-wide Regulations for Mycotoxins“ veröffentlicht. Die Festsetzung von Höchstmengen für Mykotoxine in Lebensmitteln beruht auf toxikologischen Studien und Bewertungen. Die aus diesen Studien abgeleiteten tolerierbaren täglichen Höchstmengen liegen für DON bei 1 µg/kg KGW/d (JECFA, 2001) und für ZEA als vorläufiger TDI (tolerable daily intake) bei 0,5 µg/kg KGW/d (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2000). Diese Werte wurden von der SCF nur für DON übernommen, für ZEA wurde durch die Wahl eines höheren Sicherheitsfaktors ein TDI von 0,2 µg/kg ermittelt (siehe 2.3).

Offizielle Daten aus Kanada von 1999, basierend auf Schätzungen für sechs Getreideprodukte für 60 kg schwere Erwachsene, zeigen eine tägliche Aufnahme von ZEA von 0,985 µg/Tag oder 0,016 µg/kg KGW/Tag, die Angaben für Kleinkinder im Alter von 6 - 9 Monaten, belaufen sich auf 0,521 µg/Tag oder 0,060 µg/kg KGW/Tag. Schätzungen der JECFA über die durchschnittliche Aufnahme von ZEA reichen von 1,5 µg – 3,5 µg/Tag.

Tabelle 19: Auszug aus der Mykotoxinhöchstmengen-VO (Deutschland)

Toxin	Produkt	Höchstmenge (µg/kg)
DON	Getreideerzeugnisse (Getreidekörner zum direkten Verzehr und verarbeitete Getreideerzeugnisse) ausgenommen Hartweizenerzeugnisse, Brot, Kleingebäcke und feine Backwaren	500
	Brot, Kleingebäcke und feine Backwaren	350
	Diätetische Lebensmittel für Säuglings- und Kleinkindernahrung (Getreidekörner zum direkten Verzehr und verarbeitete Getreideerzeugnisse)	100
ZEA	Getreideerzeugnisse (Getreidekörner zum direkten Verzehr und verarbeitete Getreideerzeugnisse)	50
	Diätetische Lebensmittel für Säuglings- und Kleinkindernahrung (Getreidekörner zum direkten Verzehr und verarbeitete Getreideerzeugnisse)	20

Tabelle 20: Auszug aus der Verordnung (EG) Nr. 856/2005 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 466/2001, gültig ab 1.7.2006

Toxin	Produkt	Höchstmenge (µg/kg)
DON	Andere unverarbeitete Getreide als Hartweizen, Hafer und Mais	1250
	Unverarbeiteter Hartweizen und Hafer	1750
	Unverarbeiteter Mais	1750
	Getreidemehl, einschließlich Maismehl, Maisgrits und Maisschrot	750
	Brot, Feine Backwaren, Kekse, Getreide-Snacks und Frühstückszerealien	500
	Teigwaren (trocken)	750
	Getreidebeikost und andere Beikost für Säuglinge und Kleinkinder (auf Trockenmasse bezogen)	200
ZEA	Andere unverarbeitete Getreide als Mais	100
	Unverarbeiteter Mais	200
	Getreidemehl ausgenommen Maismehl	75
	Maismehl, Maisschrot und Maisgrits und raffiniertes Maisöl	200
	Brot, Feine Backwaren, Kekse	50
	-Snacks und Frühstückszerealien aus Mais	50
	-sonstige Getreide-Snacks und Frühstückszerealien	50
	Getreidebeikost für Säuglinge und Kleinkinder aus Mais	20
Getreidebeikost und andere Beikost für Säuglinge und Kleinkinder (auf Trockenmasse bezogen)	20	

3 MATERIAL UND METHODEN**3.1 Materialien und Geräte****3.1.1 Chemikalien und Biochemika**

Aceton reinst	(Merck KGaA, 1.00013)
Acetonitril reinst	(Merck KGaA, 1.15500)
Acetonitril	(Merck KGaA, 1.00030)
Bernsteinsäureanhydrid	(Sigma Chemie GmbH, 23969-0)
Butylboronsäure	(Sigma Chemie GmbH, 16324-4)
Carboxymethoxylamin-Hemihydrochlorid	(Sigma Chemie GmbH, C-13408)
Casein-Natriumsalz	(Sigma Chemie GmbH, C-8654)
Citronensäure-1-monohydrat	(Merck KGaA, 1.00244)
Chloroform	(Merck KGaA, 1.02445)
di-Cyclohexylcarbodiimid	(Sigma Chemie GmbH, 080002)
di-Natriumhydrogenphosphat	(Merck KGaA, 1.06586)
Ethylacetat p.a.	(Merck KGaA, 1.09623)
β-Glucuronidase mit Sulfatase	(Sigma Chemie GmbH, G-7017)
Kaliumdihydrogenphosphat	(Merck KGaA, 1.04817)
Kaliumhydroxidplättchen	(Merck KGaA, 1.05021)
Meerrettichperoxidase	(Roche Diagnostics, 814407)
Methanol	(Merck KGaA, 1.06007)
Methanol	(Merck KGaA, 1.06009)
Natriumcarbonat	(Merck KGaA, 1.06392)
Natriumchlorid	(Merck KGaA, 1.06404)
Natriumhydrogencarbonat	(Merck KGaA, 1.06329)
Natriumhydroxidplättchen	(Merck KGaA, 1.06498)
N-Hydroxy-Succimid	(Sigma Chemie GmbH, H-7377)
Ortho-Phosphorsäure 85 %	(Merck KGaA, 100563)
Polyethylenglycol 8000	(Sigma Chemie GmbH, P-2139)
Pyridin	(Sigma Chemie GmbH, P-3776)
Salzsäure	(Riedel-de-Haen GmbH, 30721)
Schwefelsäure	(Merck KGaA, 1.00731)
Stickstoff	(Messer GmbH, 0335)
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin	(Sigma Chemie GmbH, T- 2885)

Tween 20 (Sigma Chemie GmbH, P-1379)

Wasserstoffperoxid (Merck KGaA, 1.07209)

Alle verwendeten Reagenzien entsprachen mindestens p.a.-Qualität.

3.1.2 Mykotoxine

Deoxynivalenol (Sigma Aldrich GmbH, D-0156)

Deepoxydeoxynivalenol (Biopure Corporation, 002033)

3-Acetyldeoxynivalenol (Sigma Aldrich GmbH, A-6116)

15-Acetyldeoxynivalenol (Sigma Aldrich GmbH, A-1556)

Fusarenon X (Sigma Aldrich GmbH, F-6011)

Nivalenol (Sigma Aldrich GmbH, N-7769)

Zearalenon (Sigma Aldrich GmbH, Z-2125)

α -Zearalenol (Sigma Aldrich GmbH, Z-0166)

β -Zearalenol (Sigma Aldrich GmbH, Z-2000)

Zearalanon (Sigma Aldrich GmbH, Z-0167)

α -Zearalanol (Sigma Aldrich GmbH, Z-0292)

β -Zearalanol (Sigma Aldrich GmbH, Z-0417)

3.1.3 Immunreagenzien

Deoxynivalenol-EIA:

Antikörper: *polyklonal*: Antiserum gegen DON¹ (USLEBER et al., 1991)
(IgG-Rohfraktion, mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung gefällt)

Kaninchen-Anti-Maus IgG (DAKO A/S, Z 0259)

monoklonal: DON-KLH I MAK 1H8¹

Konjugat: Deoxynivalenol-Hemisuccinat-Meerrettichperoxidase-Konjugat
(DON-HS-AE-HRP, siehe 3.2.1.2)

¹ Die hier aufgeführten Antikörper zur Durchführung direkter kompetitiver EIA wurden am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Ludwig-Maximilians-Universität München entwickelt und für diese Arbeit freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. E. Märklbauer und Herrn Dr. R. Dietrich zur Verfügung gestellt.

Zearalenon-EIA:

- Antikörper: *polyklonal*: Antiserum gegen Zearalenon¹ (USLEBER et. al., 1992)
(IgG-Rohfraktion, mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung gefällt)
- Konjugat: Zearalenon-Oxim-Aktivester-Meerrettichperoxidase-Konjugat
(ZEA-Oxim-AE-HRP, siehe 3.2.2.2)

3.1.4 Puffer und Lösungen

0,05 mol/l Bicarbonatpuffer (pH 9,6)

Enzymsubstrat/Chromogenlösung:

Substratlösung für Meerrettichperoxidase: 0,2 mol/l Citratpuffer (pH 3,95) mit Zusatz von 3,15 mmol/l H₂O₂

Chromogenlösung (Tetramethylbenzidinlösung: 1 mmol/l 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidinlösung in neun Teilen Methanol und einem Teil Aceton)

Gebrauchsfertig: 20 Teile Citratpuffer mit H₂O₂-Zusatz und ein Teil Tetramethylbenzidinlösung

1 mol/l Schwefelsäure (H₂SO₄)

0,01 mol/l phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS, pH 7,2: 0,01 mol/l Phosphatpuffer mit 0,12 mol/l Natriumchlorid)

1 % bzw. 2 % Casein/PBS (1 g bzw. 2 g Natrium-Caseinat in 100 ml PBS)

Waschlösung (0,15 mol/l Natriumchlorid-Lösung mit Zusatz von 0,025 % Tween 20)

3 mol/l Natronlauge

3.1.5 Geräte und Hilfsmittel

Moulinette	(Krupps GmbH, Art. 724)
Getreidemühle 3600	(Perten Instruments GmbH)
Erlenmeyerkolben in verschiedenen Größen	
Papierfaltenfilter	(Schleicher & Schuell, 5155506)
Heiz- und Ultraschallbad Sonorex Super 10 P	(Bandelin electronic GmbH & Co. KG)
Heizrührer MR 3001	(Heidolph GmbH)

Mikrotiterplattentaumelgerät Polymax 1040	(Heidolph GmbH)
Mehrstellenrührgerät	(IKA® Werke GmbH & Co. KG)
pH-Meter inoLab Level 1 mit Sen Tix HW Elektrode	(WTW GmbH)
Sartorius Waage Master Pro LA	(Sartorius AG)
Sartorius Waage Basic plus	(Sartorius AG)
Variable Pipetten 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	(Eppendorf Gerätebau GmbH)
Variable 12-Kanal-Pipette 10-100 µl, 30-300 µl	(Eppendorf Gerätebau GmbH)
Vortex Genie 2	(Scientific Industries Inc.)
Zentrifuge Sepatech Varifuge RF	(Heraeus-Christ GmbH)
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	(Heraeus-Christ GmbH)
Vakuum-Rotationsverdampfer	(Heidolph Laborota 4003)
Dialysierschläuche	(SERVA Electrophoresis GmbH)

3.1.6 Enzymimmuntests

ELISA-Auto-Reader Tecan Sunrise	(Tecan GmbH, Crailsheim)
ImmunoPlate MaxiSorp	(Nunc GmbH, 439454)
Photometer UV 1601	(Shimadzu Deutschland GmbH)
Software: RIDAWIN Version 1.38	(R-Biopharm AG, Darmstadt)

3.1.7 Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Immunaффinitätssäule: DON PREP	(R-Biopharm AG, P 50B)
Easy-Extract Zearalenone	(R-Biopharm AG, RP 90)
Vorsäule: Licrospher RP 18 (5 µm) 4x4 mm	(Merck KGaA, 1.50957)
Säule: Licrospher RP 18 (5µm) 125x4 mm	(Merck KGaA, 1.50943)
Pumpenserie P 580	(DIONEX GmbH)
Probengeber Modell ASI 100/ ASI 100 T	(DIONEX GmbH)
Photodiode PDA 100 Array detector	(DIONEX GmbH)
Fluoreszenzdetektor RF 2000	(DIONEX GmbH)
Säulenthermostat STH 583	(DIONEX GmbH)
Fraktionkollektor 202	(Gilson SAS)
Fraktioncontroller 201-202	(Gilson SAS)

3.1.8 Probenmaterial

Im Zeitraum von 2001 bis 2004 wurden in mittelhessischen und überregionalen Läden (Supermärkte, Reformhäuser, Naturkostläden, Bäckereien) insgesamt 1154 (Tabelle 21, Abbildung 5) verschiedene Lebensmittel auf Getreidebasis gekauft. Zur Untersuchung von Konsummilch auf ZEA und seine Analoga mittels EIA wurden 105 Proben im Einzelhandel gekauft und bis zur Untersuchung bei -18 °C gelagert. Die Proben wurden gemäß dem ADV-Kodierkatalog für die Übermittlung von Daten aus der amtlichen Lebensmittel- und Veterinärüberwachung sowie Lebensmittelmonitoring (Katalog Nr. 3: Matrixkodes) gruppiert. Diese Codes sind in Fachkreisen als ZEBS-Codes bekannt. Im Folgenden wird daher die Bezeichnung ZEBS-Code verwendet.

Tabelle 21: Produktgruppen und Anzahl der Proben

Probenart	ZEBS-Code	n
Milch	01...	105
Speisegetreide	15...	26
Getreidemehle, Feine Backwaren, Müsli	16...	246
Brot, Kleingebäcke	17...	161
Chips und andere Knabbererzeugnisse	18...	11
Teigwaren	22..	255
Bier, bierähnliche Getränke, Rohstoffe für die Bierherstellg.	36...	96
Säuglings- und Kleinkindernahrung (getreidehaltig)	48...	231
Fertiggerichte (getreidehaltig)	50...	23

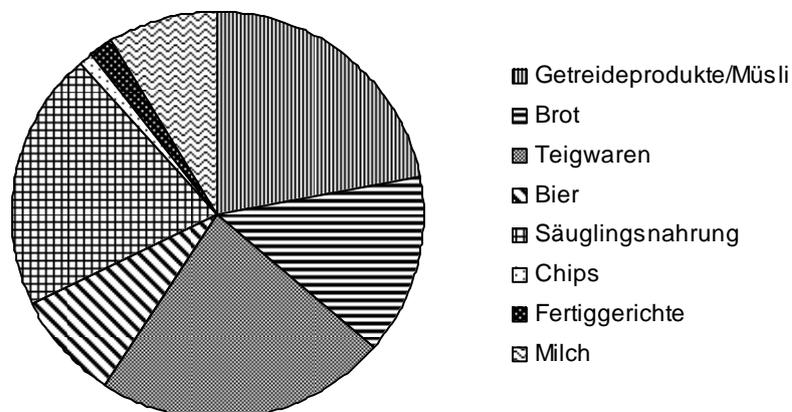


Abbildung 5: Prozentualer Anteil der verschiedenen Produktgruppen an der Gesamtanzahl der untersuchten Lebensmittelproben (Untersuchungen mittels DON- und ZEA-EIA)

3.2 Methoden

Die Untersuchungen getreidehaltiger Lebensmittel bzw. Konsummilch auf DON und ZEA wurden mittels Enzymimmuntest-Verfahren (Enzyme Immunoassay, EIA) sowie teilweise mittels HPLC durchgeführt, wobei die EIA-Verfahren für die Untersuchung von Lebensmittelproben unterschiedlicher Matrices etabliert und optimiert wurden.

3.2.1 Etablierung der enzymimmunologischen Untersuchungsverfahren

3.2.1.1 Enzymimmuntests für den Nachweis von DON

3.2.1.1.1 Herstellung und Überprüfung des Toxinstandards

DON

Ein Standardfläschchen mit lyophilisiertem DON (nomineller Gehalt 1 mg) wurde in 1 ml Methanol gelöst und die tatsächliche Konzentration dieser Stammlösung mittels einer Zwischenverdünnung in Methanol (z.B. 1 Teil Stammlösung + 49 Teile Methanol, nominelle Konzentration $c = 20 \mu\text{g/ml}$) nach Aufnahme eines UV-Spektrums (190-400 nm) im Absorptionsmaximum (218 nm) überprüft. Für die Standardkalibrierung von DON in Methanol wurde der von SCOTT et al. (1984) bzw. BENNETT & SHOTWELL (1990) publizierte Wert des molaren Extinktionskoeffizienten (ϵ), aufgerundet als $\epsilon = 6400$, verwendet. Die Berechnung der Konzentration erfolgte nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz unter Benutzung des molaren Extinktionskoeffizienten und des Molekulargewichts (296,3) von DON:

$$c \text{ (mg/ml)} = \frac{E \times M}{\epsilon}$$

E	Extinktion bei 218 nm
M	Molekulargewicht
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient

Die tatsächliche Konzentration der DON-Stammlösung wurde anhand dieser Messung ermittelt. Durch Verdünnung der Stammlösung mit PBS wurden Arbeits-Standardlösungen hergestellt. Als Negativkontrolle (Blank, BLK) diente PBS. Diese Standardlösungen wurden nicht länger als einen Tag verwendet.

Deepoxydeoxynivalenol

Bei der verwendeten Standardlösung für Deepoxydeoxynivalenol (DOM-1) handelt es sich um einen zertifizierten Standard der Firma Biopure mit einem Gehalt von 25,2 µg DOM-1 gelöst in 1 ml Acetonitril. Dieser Standard wurde wie vom Hersteller geliefert eingesetzt.

3.2.1.1.2 Herstellung und Überprüfung eines DON-Enzymkonjugates

Herstellung

Da DON keine zur direkten Kopplung an Proteine verwendbaren reaktiven Gruppen besitzt, erfolgte zunächst eine Derivatisierung an Bernsteinsäureanhydrid. Dazu wurden 10 mg DON (gelöst in 250 µl Pyridin) durch Zugabe von 170 mg Bernsteinsäureanhydrid und Erhitzen im Wasserbad (100 °C, 3 h) selektiv an der 3-OH-Gruppe derivatisiert. Das Reaktionsgemisch wurde unter Stickstoff abgedampft und der Rückstand in 10 ml Chloroform aufgenommen. Nach Ausschütteln mit 0,01 mol/l HCl (3 x 10 ml) wurden die Chloroformphasen im Rotationsverdampfer eingedampft und der Rückstand in 1 ml Methanol aufgenommen. Nachfolgend erfolgte die Kopplung an HRP mittels Aktiver Estermethode. Bei dieser Reaktion entsteht in einem ersten Schritt aus Toxinderivat und N-Hydroxysuccinimid unter Vermittlung von Dicyclohexylcarbodiimid als Katalysator ein aktiver Ester. Im zweiten Reaktionsschritt wurde im wässrigen Milieu das Toxinderivat kovalent an die ε-Aminogruppen des Proteins gebunden. Zur Synthese des aktiven Esters wurden DON-HS (2,25 mg), N-Hydroxysuccinimid (4,35 mg) und Dicyclohexylcarbodiimid (15,58 mg) in einem molarem Verhältnis von 1:5:10 in Dimethylformamid (600 µl bzw. 200 µl) gelöst. Nach einer Reaktionszeit von 16 h bei 20 °C wurde die Reaktionsmischung langsam zur Meerrettichperoxidase (30 mg HRP gelöst in 7 ml 0,13 mol/l NaHCO₃) gegeben und 2 h bei 20 °C unter Rühren inkubiert. Anschließend wurde der Kopplungsansatz 4 x 12 h gegen PBS (5 l) dialysiert.

Überprüfung

Die Überprüfung des Derivatisierungserfolges von DON zu DON-HS erfolgte photometrisch und mittels HPLC anhand einer DON-Kalibrierungskurve.

Photometrische Überprüfung: Die Abschätzung der DON-HS-Konzentration erfolgte durch Messung der UV-Absorption im UV-Maximum (218 nm) und Berechnung unter Benutzung des Molekulargewichtes von DON (296,3) und des molekularen Extinktionskoeffizienten für DON (6400) (siehe 3.2.1.1).

Überprüfung mittels HPLC: Ein Aliquot des DON-HS wurde unter nachfolgend aufgeführten Parametern untersucht und mittels einer DON-Kalibrierungskurve quantifiziert.

HPLC Parameter: Laufmittel: A) Acetonitril/Wasser 10:90 (v/v)
 B) Acetonitril/Wasser 10:90 (v/v) mit 40 µl Eisessig
 Flussrate: 1ml/min
 Säule: Merck Licrospher 100, RP-18, 5 µm, 125-4 mm mit
 entsprechender Vorsäule
 Säulentemperatur: 25 °C
 Detektion: UV/DAD 218 nm

Die Überprüfung des Kopplungserfolges des DON-HS zu DON-HS-HRP erfolgte durch Ermittlung der UV-Spektren äquimolarer Mengen des Toxin-Protein-Konjugates und des entsprechenden unmodifizierten Proteins in einem Bereich von 190 – 600 nm und der Berechnung der Differenz:

$$\text{Extinktion}_{\text{Konjugat}} \text{ bei Wellenlänge X} - \text{Extinktion}_{\text{Protein}} \text{ bei Wellenlänge X}$$

Die Quantifizierung des Toxin-Protein-Konjugates erfolgte photometrisch anhand einer Eichkurve für Meerettichperoxidase (HRP), die durch Messung der Extinktion in einem Konzentrationsbereich von 0,05 – 1 mg/ml PBS bei 403 nm erstellt wurde.

Durch Austitration des Konjugates in zwei EIA-Testsystemen wurden die geeignetsten Antiserum-Konjugat-Verdünnungspaare ermittelt:

EIA auf Basis polyklonaler Antikörper: Mikrotiterplatten wurden mit gefälltem Antiserum gegen DON in zwei verschiedenen Verdünnungen (1:4000 und 1:6000 in Bicarbonatpuffer, pH 9,6; 100 µl/Kavität) beschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur

inkubiert und mit 2 % Casein/PBS (200 µl/Kavität) abgesättigt. Nach einem Waschschrift wurden in die Kavitäten der linken Plattenhälfte DON-Toxin-Standardlösung und in die Kavitäten der rechten Hälfte PBS (jeweils 50 µl/Kavität) sowie Toxin–HRP–Konjugat in zwei verschiedenen Verdünnungen (1:75.000 und 1:100.000 in 1 % Casein/PBS, 50 µl/Kavität) pipettiert und 2 h inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden pro Kavität 100 µl Enzymsubstrat/Chromogenlösung pipettiert und die Farbreaktion nach 10-20 min mit 1 mol/l Schwefelsäure (100 µl/Kavität) gestoppt und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Für die weiteren Versuche wurden diejenigen Antiserum- und Konjugatverdünnungen ausgewählt, die im toxinfreien Ansatz Extinktionen von 0,8 - 1,2 Einheiten ergaben und den größten Extinktionsunterschied (B/B₀) zwischen toxinfreiem (B₀) und toxinhaltigem (B) Ansatz aufwiesen.

EIA auf Basis monoklonaler Antikörper: Mikrotiterplatten wurden mit Anti-Maus-IgG (10 µg/ml in Bicarbonatpuffer, pH = 9,6) beschichtet, über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und mit 2 % Casein/PBS (200 µl/Kavität) abgesättigt. Nach einem Waschschrift wurden je Kavität 100 µl des monoklonalen Antikörpers gegen DON (60 ng/ml in 1 % Casein/PBS) pipettiert und die Platten für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde auf die linke Seite der Platte Standardlösung, auf die rechte Hälfte PBS (jeweils 50 µl/Kavität), sowie Toxin–HRP–Konjugat in verschiedenen Verdünnungsstufen (1:25.000 – 1:100.000; in 1 % Casein/PBS, 50 µl/Kavität) auf die Platte pipettiert. Die Platten wurden 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend gewaschen. Danach wurden pro Kavität 100 µl Enzymsubstrat/Chromogenlösung pipettiert und die Farbreaktion nach 10-20 min mit 1 mol/l Schwefelsäure (100 µl/Kavität) gestoppt. Die Absorptionsmessung und Auswertung wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

3.2.1.1.3 Überprüfung zweier Testsysteme für den Nachweis von DON (auf Basis polyklonaler bzw. monoklonaler Antikörper)

Durchführung

Zwei EIAs wurden auf ihre Eignung zur Untersuchung von Lebensmittelproben hin getestet. Dabei handelte es sich um kompetitive EIAs, die zum einen auf monoklonalen Antikörpern gegen DON und zum anderen auf polyklonalen Antikörpern gegen DON sowie auf dem in 3.2.1.1.2 beschriebenen DON-HS-HRP basieren.

Durchführung des EIA auf Basis polyklonaler Antikörper: Mikrotiterplatten wurden mit gefälltem Antiserum gegen DON (100 µl/Kavität in Bicarbonatpuffer, pH = 9,6) beschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert (eine Aufbewahrung nicht verbrauchter Platten erfolgte bis zu 4 Wochen bei 4 °C). Freie Proteinbindungsstellen wurden mit 2 % Casein/PBS (200 µl/Kavität) 30 min bei Raumtemperatur abgesättigt. Nach einem Waschschrift wurden Standardlösung (sechs Toxinstandards von 2,1 bis 500 ng/ml sowie Negativkontrolle in PBS bzw. 10 % MeOH/PBS) bzw. Probenextraktionslösung im Vierfachansatz und Toxin–HRP–Konjugat (in 1 % Casein/PBS) (jeweils 50 µl/Kavität) pipettiert. Die Platten wurden 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend erneut gewaschen. Danach wurden pro Kavität 100 µl Enzymsubstrat/Chromogenlösung pipettiert und die Farbreaktion nach 10-20 min mit 1 mol/l Schwefelsäure (100 µl/Kavität) gestoppt. Nach Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm erfolgte die quantitative Auswertung des Tests unter Verwendung einer Software (RIDAWIN). Die verwendeten Verdünnungen der Immunreagenzien sowie Toxinstandardkonzentrationen sind in Tabelle 22 aufgeführt.

Durchführung des EIA auf Basis monoklonaler Antikörper: Mikrotiterplatten wurden mit Anti-Maus-IgG (100 µl/Kavität in Bicarbonatpuffer, pH = 9,6) beschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ausschlagen der Platten wurden freie Proteinbindungsstellen mit 2 % Casein/PBS (200 µl/Kavität) 30 min bei Raumtemperatur abgesättigt. Nach einem Waschschrift wurden je Kavität 100 µl des monoklonalen Antikörpers gegen DON (in 1 % Casein/PBS) pipettiert und die Platten für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden je 50 µl Standardlösung (sechs Toxinstandards von 0,41 bis 100 ng/ml in PBS) bzw. Probenextraktionslösung im Vierfachansatz und Toxin–HRP–Konjugat (in 1 % Casein/PBS) pipettiert. Die Platten wurden 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend erneut gewaschen. Danach wurden pro Kavität 100 µl Enzymsubstrat/Chromogenlösung pipettiert und die Farbreaktion nach 10-20 min mit 1 mol/l Schwefelsäure (100 µl/Kavität) gestoppt. Die Absorptionsmessung und die Auswertung erfolgten wie oben beschrieben. Die verwendeten Verdünnungen der Immunreagenzien sowie Toxinstandardkonzentrationen sind in Tabelle 22 aufgeführt.

Tabelle 22: Verwendete Antiseren, Toxin-HRP-Konjugate und Toxin-Standards zum enzymimmunologischen Nachweis von DON

DON-EIA	Antiserum (Verdünnungen)	Toxin-HRP-Konjugat (Verdünnung)	Toxinstandardlösungen
polyklonale AK	DON AS 143 Pool (1:6000 in Bicarbonatpuffer)	DON-HS-HRP 1:75.000 in 1 % Casein/PBS	2,1/6,2/18,5/55,5/166,6/ 500 ng/ml in Methanol/PBS (10:90, v/v)
monoklonale AK	DON-KLH-MAK 1HB (60 ng/ml in 1% Casein/PBS) auf in mit Anti-Maus-IgG (10 µg/ml in Bicarbonatpuffer, DAKO 0259) beschichteten Platten	DON-HS-HRP 1:35.000 in 1 % Casein/PBS	0,41/1,23/3,7/11,1/33,3/ 100 ng/ml in PBS

3.2.1.1.3.1 Überprüfung der Sensitivität und Reproduzierbarkeit der Verfahren

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit sowie der Sensitivität der EIAs wurden die Testparameter Nachweisgrenze (NWG) und 50 %-Dosis der Standardkurven herangezogen. Dazu wurden 30 Standardkurven ausgewertet. Als NWG wurde jeweils die Konzentration gewertet, deren Extinktion ein Drittel der 50 %-Dosis betrug. Dieser Wert entsprach annähernd der 70 %-Dosis der Standardkurve.

3.2.1.1.3.2 Überprüfung der Spezifität der Verfahren

Um die Spezifität der monoklonalen Antikörper gegen DON gegenüber anderen Trichothecenen im Testsystem zu überprüfen, wurden die Mykotoxine Deepoxydeoxynivalenol, 3-Acetyldeoxynivalenol, 15-Acetyldeoxynivalenol, Fusarenon X und Nivalenol in Konzentrationen von 0,2 ng/ml bis 10 µg/ml in Methanol/PBS (10:90, v/v) im Test eingesetzt. Die Berechnung der relativen Kreuzreaktion erfolgte anhand der

ermittelten 50 %-Dosis, unter Berücksichtigung des Molekulargewichtes, nach folgender Formel:

$$\text{relative Kreuzreaktion (\%)} = \frac{50 \text{ \%-Dosis [DON]} \times \text{Molekulargewicht}}{50 \text{ \%-Dosis [Testtoxin]} \times \text{Molekulargewicht}} \times 100$$

Eine Überprüfung der Spezifität der polyklonalen Antikörper erfolgte schon in früheren Arbeiten (USLEBER, 1991; GEßLER, 1997) und wurde hier nicht wiederholt.

3.2.1.2 Enzymimmuntest für den Nachweis von ZEA

3.2.1.2.1 Herstellung und Überprüfung der Toxinstandards

ZEA

Lyophilisierter ZEA-Standard (nomineller Gehalt 1 mg) wurde in 1 ml Methanol gelöst. Die tatsächliche Konzentration dieser Stammlösung wurde mittels einer Zwischenverdünnung in Methanol (z.B. 1 Teil Stammlösung + 49 Teile Methanol, nominelle Konzentration $c = 20 \mu\text{g/ml}$) nach Aufnahme eines UV-Spektrums (190-400 nm) im Absorptionsmaximum (274 nm) überprüft. Der molare Extinktionskoeffizient für ZEA in Methanol bei 274 nm beträgt 13.900 (VDLUFA, 1991), das Molekulargewicht von ZEA ist 318,4. Die Berechnung der Konzentration erfolgte nach 3.2.1.1.

Die tatsächliche Konzentration der ZEA-Stammlösung wurde anhand dieser Messung ermittelt. Durch Verdünnung mit Methanol/PBS (10:90, v/v) oder Acetonitril/PBS (5:95; v/v) wurden Arbeits-Standardlösungen hergestellt. Als Negativkontrolle (Blank, BLK) wurde Methanol/PBS (10:90, v/v) oder Acetonitril/PBS (5:95; v/v) verwendet. Diese Standardlösungen wurden nicht länger als einen Tag verwendet.

ZEA-Analoga

α -Zearalenol bzw. β -Zearalenol (nomineller Gehalt 1 mg) wurde in 1 ml Methanol gelöst. Die tatsächliche Konzentration der Stammlösung wurde mittels einer Zwischenverdünnung in Methanol (z.B. 1 Teil Stammlösung + 49 Teile Methanol, nominelle Konzentration

$c = 20 \mu\text{g/ml}$) nach Aufnahme eines UV-Spektrums (190-400 nm) im Absorptionsmaximum überprüft. Die Molekulargewichte bzw. die molaren Extinktionskoeffizienten betragen für α -Zearalenol 320,4 und 28538 bei 236 nm bzw. für β -Zearalenol 320,4 und 24943 bei 238 nm in Methanol (BENNETT & SHOTWELL, 1990). Die Berechnung der Konzentration erfolgte nach 3.2.1.1. Die tatsächliche Konzentration der α -Zearalenol- bzw. β -Zearalenol-Stammlösungen wurde anhand dieser Messung ermittelt. Zearalanon, α -Zearalanol und β -Zearalanol, für die in der Literatur keine Angaben über die molaren Extinktionskoeffizienten existieren, wurden jeweils der lyophilisierte Standard mit 2 ml Methanol aufgelöst. Diese Lösungen wurden mit einem nominellen Gehalt von 0,5 mg/ml verwendet.

3.2.1.2.2 Herstellung und Überprüfung eines ZEA-Enzymkonjugates

Herstellung

Da ZEA zur direkten Kopplung an Proteine keine verwendbaren reaktiven Gruppen besitzt, erfolgte eine Derivatisierung zu einem Oxim. Dazu wurden 25 mg ZEA (gelöst in 500 μl Pyridin) durch Zugabe von 50 mg Carboxymethyloxim-Hemihydrochlorid und Erhitzen im Schüttelwasserbad (60 °C, 24 h) derivatisiert. Das Reaktionsgemisch wurde unter Stickstoff abgedampft und der Rückstand in 2 ml Methanol und 2 ml A. dest. aufgenommen. Nach Ausschütteln in Chloroform (3 x 8 ml) wurden die Chloroformphasen gepoolt und im Rotationsverdampfer eingedampft. Der Ansatz des Aktivesters erfolgte durch Lösen von ZEA-Oxim (4,6 mg), N-Hydroxysuccinimid (8,6 mg) und Dicyclohexylcarbodiimid (31 mg) in einem molaren Verhältnis von 1:5:10 in Dimethylformamid (Gesamt: 0,7 ml). Nach einer Reaktionszeit von 16 h bei 20 °C wurde die Reaktionsmischung langsam zur Meerrettichperoxidase-Lösung (44 mg HRP in 8 ml 0,13 mol/l NaHCO_3) gegeben und 2 h bei 20 °C inkubiert. Anschließend wurde der Kopplungsansatz 3 x 12 h gegen PBS (5 l) dialysiert.

Überprüfung

Die Überprüfung des Derivatisierungserfolges von ZEA zu ZEA-Oxim erfolgte durch Abschätzung der ZEA-Oxim-Konzentration. Dafür wurde das UV-Spektrum (190 – 400 nm) gemessen und die Absorption bei 236, 274 und 313 nm ermittelt. Die Berechnung der ZEA-Oxim-Konzentration erfolgte nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz (siehe 3.2.1.1) unter Benutzung des Molekulargewichtes von ZEA (318,4) und der molekularen

Extinktionskoeffizienten bei 236 (= 29700), 274 (= 13900) und 313 nm (= 6020). Für jedes Maximum wurde eine Berechnung nach 3.2.1.1 durchgeführt und hieraus der Mittelwert gebildet.

Die Überprüfung der Kopplung von ZEA-Oxim zu ZEA-Oxim-HRP erfolgte durch Ermittlung der UV-Spektren äquimolarer Mengen des Toxin-Protein-Konjugates und des entsprechenden unmodifizierten Proteins in einem Bereich von 190 – 600 nm und der Berechnung der Differenz:

$$\text{Extinktion}_{\text{Konjugat}} \text{ bei Wellenlänge X} - \text{Extinktion}_{\text{Protein}} \text{ bei Wellenlänge X}$$

Die Quantifizierung des Toxin-HRP-Konjugates erfolgte photometrisch anhand einer Eichkurve für Meerrettichperoxidase (HRP), die durch Messung der Extinktion in einem Konzentrationsbereich von 0,05 – 1 mg/ml PBS bei 403 nm erstellt wurde.

Durch Austitration des Konjugates in einem EIA-Testsystem wurden die geeignetsten Antiserum-Konjugat-Verdünnungspaare ermittelt:

Mikrotiterplatten wurden mit Antiserum gegen ZEA beschichtet (1:4000 in Bicarbonatpuffer, pH = 9,6; 100 µl/Kavität), über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Freie Proteinbindungsstellen wurden mit 2 % Casein/PBS 30 min bei Raumtemperatur abgesättigt. Nach einem Waschschrift wurden in die Kavitäten der linken Plattenhälfte ZEA-Toxin-Standardlösung (1 ng ZEA/ml MeOH/PBS, 10:90, v/v) und in die Kavitäten der rechten Hälfte PBS sowie das Toxin-HRP-Konjugat in verschiedenen Verdünnungen (1:3000 - 1:150.000 in 1 % Casein/PBS,) (jeweils 50 µl/Kavität) auf die Platten pipettiert. Anschließend wurden die Platten bei Raumtemperatur 2 h inkubiert und erneut gewaschen. Danach wurden 100 µl Substrat/Chromogenlösung zupipettiert und die Farbreaktion nach 10-20 min mit 1 mol/l Schwefelsäure (100 µl/Kavität) gestoppt. Für die weiteren Versuche wurden diejenigen Antiserum- und Konjugatverdünnungen ausgewählt, die im toxinfreien Ansatz Extinktionen von 0,8 - 1,2 Einheiten ergaben und den größten Extinktionsunterschied (B/B0) zwischen toxinfreiem (B0) und toxinhaltigem (B) Ansatz aufwiesen.

3.2.1.2.3 Überprüfung des Testsystems für den Nachweis von ZEA

Der Nachweis von ZEA erfolgte mit einem kompetitiven Enzymimmuntest. Mikrotiterplatten wurden mit Antiserum gegen ZEA beschichtet (1:4000 in Bicarbonatpuffer, pH = 9,6; 100 µl/Kavität), über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und zur weiteren Aufbewahrung bei 4 °C gelagert. Die beschichteten Platten wurden ausgeschlagen und zur Blockierung der freien Proteinbindungsstellen mit 2 % Casein/PBS für 30 min bei Raumtemperatur abgesättigt. Nach einem Waschschrift wurden Standardlösung (sechs Toxinstandards von 0,0041 bis 1 ng/ml ng/ml in 10 % Methanol/PBS oder 5 % Acetonitril/PBS, je nach Probenextraktion), Probenlösung sowie Toxin-HRP-Konjugat (1:150.000 in 1 % Casein/PBS) auf die Platten pipettiert (je 50 µl/Kavität). Anschließend wurden die Platten bei Raumtemperatur 2 h inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden 100 µl Substrat/Chromogenlösung zupipettiert und die Farbreaktion nach 10-20 min mit 1 mol/l Schwefelsäure (100 µl/Kavität) gestoppt. Die Absorptionsmessung erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm, die Auswertung wurde wie unter 3.2.1.3.1 durchgeführt.

3.2.1.2.3.1 Überprüfung der Sensitivität und Reproduzierbarkeit des Verfahrens

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit und Sensitivität des Enzymimmuntests wurden die Testparameter Nachweisgrenze und 50 %-Dosis der Standardkurve herangezogen, wobei jeweils eine Vierfachbestimmung der Standardkonzentration vorlag. Dazu wurden 30 Standardkurven ausgewertet. Als NWG wurde jeweils die Konzentration gewertet, deren Extinktion ein Drittel der 50 %-Dosis betrug.

3.2.1.2.3.2 Überprüfung der Spezifität des Verfahrens

Um die Kreuzreaktivität der ZEA-Analoga im Testsystem zu überprüfen, wurden die Mykotoxine α -Zearalenol, β -Zearalenol, Zeralanon, α -Zearalanol und β -Zearalanol in Konzentrationen von 2,4 pg/ml bis 10 ng/ml in MeOH/PBS (10:90, v/v) im Testsystem (3.2.1.2.3) eingesetzt. Die Berechnung der relativen Kreuzreaktion erfolgte anhand der

ermittelten 50 %-Dosis, unter Berücksichtigung des Molekulargewichtes, nach folgender Formel:

$$\text{relative Kreuzreaktion (\%)} = \frac{50 \text{ \%-Dosis [ZEA]} \times \text{Molekulargewicht}}{50 \text{ \%-Dosis [Testtoxin]} \times \text{Molekulargewicht}} \times 100$$

3.2.1.3 Erarbeitung geeigneter Extraktionsverfahren

3.2.1.3.1 Extraktion von DON

Zur Ermittlung einer geeigneten Extraktionsmethode für die verschiedenen Probenmatrices (Säuglings- und Kleinkindernahrung, Teigwaren, Mehle, Brot und Bier) wurden zwei Verfahren getestet und die Extrakte anschließend in den EIA auf Basis monoklonaler Antikörper eingesetzt (Tabelle 23).

Zur Ermittlung der Reproduzierbarkeit der Probenvorbereitung wurden einige natürlich mit DON kontaminierte Proben mehrfach extrahiert und im Test eingesetzt.

Die Proben wurden jeweils vor der Extraktion in einer Getreidemühle oder Moulinette zu feinem Pulver (< 1 mm Partikelgröße) zerkleinert. Brot wurde zu diesem Zweck in kleine Würfel (1 x 1 x 1 cm) geschnitten und nach Ermittlung des Feuchtgewichtes im Trockenschrank ca. 16 h bei 40 °C getrocknet. Vor dem Mahlen wurde, zur Ermittlung des Trocknungsfaktors, rückgewogen und der jeweilige Trocknungsverlust notiert. Bier wurde vor der Extraktion 30 min im Ultraschallbad entgast.

Die Extraktionsmethoden wurden bezüglich der ermittelten Wiederfindungsraten und Variationskoeffizienten künstlich mit DON kontaminierter Proben (5 – 50 ng/g) sowie dem Intraassay-Variationskoeffizienten der einzelnen Verdünnungsstufen einer Probe, und der daraus resultierenden Nachweisgrenze für DON in Lebensmitteln, verglichen.

Tabelle 23: Extraktionsansätze für Lebensmittel im DON-Enzymimmuntest

	Extraktion A	Extraktion B	
		Getreide und Getreideprodukte	Bier
Probenmenge	5 g	5 g	2 ml
Extraktion	50 ml Methanol/PBS 10:90 (v/v)	50 ml Methanol/PBS 10:90 (v/v)	-
	30 min Magnetrührer Zentrifugieren (1500 x g, 15 min) Filtrieren	30 min Magnetrührer Zentrifugieren (1500 x g, 15 min) Filtrieren	-
Clean up	-	2 ml Rohextrakt (bzw. Bier) + 4 ml Ethylacetat mischen (Vortex), zentrifugieren, obere Phase in Rundkolben überführen, untere Phase nochmals mit 4 ml Ethylacetat versetzen, zentrifugieren, zweite Ethylacetatphase zu erster geben, abdampfen, Rückstand in 1 ml PBS aufnehmen	
Verdünnung	In Methanol/PBS 10:90 (v/v)	In PBS	

A: einfache Extraktion; B: Extraktion und Flüssig-Flüssig-Partitionierung in Ethylacetat

3.2.1.3.2 Extraktion von ZEA

Zur Bestimmung von ZEA in getreidehaltigen Lebensmitteln wurden zwei verschiedene Extraktions-Verfahren anhand von künstlich kontaminierten Lebensmittelproben jeder Gruppe getestet und nach den in 3.2.1.3.1 beschriebenen Kriterien verglichen.

Die Proben wurden zunächst, wie unter 3.2.1.3.1 beschrieben, in einer Moulinette oder einer Getreidemühle zerkleinert. Brot wurde vor dem Mahlen wie beschrieben getrocknet, das Bier wurde entgast. Anschließend erfolgte die Extraktion mit den nachfolgend beschriebenen Verfahren:

Extraktion mittels Methanol/A. dest: Zur Extraktion wurden jeweils 5 g der Probe mit 25 ml Methanol/A. dest. (70:30; v/v) 30 min auf einem Magnetrührer extrahiert und der Extrakt anschließend über einen Papier-Faltenfilter filtriert. Zur Untersuchung gelangte das in PBS verdünnte Filtrat (1 Teil Filtrat + 6 Teile Methanol/PBS, 10:90, v/v) sowie weitere Verdünnungen dieses Gemisches in Methanol/PBS (10:90; v/v).

Extraktion mittels Acetonitril/A. dest.: Jeweils 5 g der Probe wurden in 25 ml Acetonitril/A. dest. (84:16; v/v) 30 min auf einem Magnetrührer extrahiert und der Extrakt über einen Papier-Faltenfilter filtriert. Der filtrierte Extrakt wurde zur Untersuchung im EIA mit PBS auf eine Konzentration von 5 % Acetonitril eingestellt. Weitere Verdünnungen wurden in Acetonitril/PBS (5:95; v/v) angelegt und eingesetzt.

Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit wurden zusätzlich einige künstlich mit ZEA kontaminierte Proben mehrfach extrahiert und im Test eingesetzt.

Zur Bestimmung der Wiederfindungsraten wurden einige Proben jeder Lebensmittelgruppe künstlich mit ZEA versetzt und wie oben beschrieben extrahiert. Dabei wurden Proben durch Zugabe von Standardlösung auf verschiedene ZEA-Gehalte (0,5 ng/g – 40 ng/g) eingestellt.

3.2.1.4 Untersuchung mittels HPLC

Zur Überprüfung der eingesetzten EIA-Methoden, vor allem der Probenextraktion, wurde ein Teil der Proben zusätzlich mittels HPLC untersucht.

3.2.1.4.1 Nachweis von DON mittels HPLC

Probenvorbereitung und Extraktion getreidehaltiger Proben

Für die Probenaufbereitung wurden die Proben wie zuvor beschrieben (3.2.1.3.1) getrocknet und gemahlen. Anschließend wurden je 20 g Probe mit 100 ml A. dest. und 4 g Polyethylenglycol (PEG 8000) versetzt und 30 min auf einem Magnetrührer extrahiert, zentrifugiert (11.000 x g, 15 min, 20 °C) und über einen Papier-Faltenfilter filtriert. Zur weiteren immunaffinitätschromatographischen Aufreinigung des Filtrates wurden 5 ml langsam auf die entsprechende Säule (3.1.7) gegeben (Flussgeschwindigkeit max. 1 Tropfen/sec), diese mit 5 ml Tween-PBS (1:1000, v/v) und danach mit 10 ml A. dest. nachgewaschen (1-2 Tropfen/sec) und anschließend mit Luft trockengesaugt. Das Toxin

wurde mit 1 ml Methanol eluiert und anschließend das Methanol unter Stickstoffstrom im Wasserbad bei 40 °C abgedampft. Der Rückstand wurde in 200 µl mobile Phase (Acetonitril/Wasser, 10:90, v/v) aufgenommen und 50 µl davon in das HPLC-System injiziert (Analysebedingungen wie unten stehend).

Für die Probenaufbereitung von Bier wurden 200 ml der Bierprobe entgast. Acht ml der Probe wurden mit 1 mol/l Natriumcarbonatlösung auf einen pH-Wert von 6,8 - 7,2 eingestellt und anschließend zentrifugiert (11.000 x g, 15 min, 15 °C) und 5 ml des Überstandes, wie beschrieben, über die Immunaффinitätssäule aufgereinigt. Das Toxin wurde mit 2 ml Methanol eluiert und das Methanol unter Stickstoffstrom im Wasserbad bei 40 °C abgedampft. Der Rückstand wurde in 200 µl mobile Phase (Acetonitril/Wasser, 5:95, v/v) aufgenommen und ebenfalls 50 µl in das HPLC-System injiziert.

HPLC-Analysebedingungen

Stationäre Phase:	Trennsäule RP 18 125 mm x 4 mm (5 µm) mit Vorsäule RP 18 4 mm x 4 mm (5 µm)
mobile Phase:	Acetonitril/Wasser (5:95; v/v)
Säulentemperatur:	40 °C
Flussgeschwindigkeit:	1,5 ml/min
Injektionsvolumen:	50 µl
Retentionszeit für DON:	~ 5,6 min.
Detektion:	UV/DAD, Quantifizierung bei 218 nm

Zur Überprüfung dieser Methode wurden einzelne natürlich mit DON kontaminierte Proben mehrmals in der HPLC untersucht um die Reproduzierbarkeit zu ermitteln.

Probenvorbereitung für die Untersuchung von Konsummilch

Die Untersuchung von Milch erfolgte zusätzlich auch auf den Metaboliten Deepoxydeoxynivalenol (DOM-1). Die Probenextraktion wurde wie folgt durchgeführt: 25 ml der zu untersuchenden Milchprobe wurden mit 25.000 Einheiten β -Glucuronidase (enthält auch Sulfatase) 2 h bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Die Milch wurde anschließend in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, zentrifugiert (2000 x g, 15 min, 20 °C) und das Fett mit einer Pasteurpipette entfernt. Ein Teil (20 ml) der entfetteten Milch wurde in ein 50 ml Becherglas überführt und der pH-Wert mit NaOH (3 mol/l) auf $7,0 \pm 0,1$ eingestellt. Die

Aufreinigung der Toxine erfolgte mittels Immunaффinitätssäule gemäß Herstellerangaben, mit geringfügigen Modifikationen: Eine wie oben beschrieben vorbehandelte Milchprobe wurde langsam (Flussrate maximal 1 Tropfen/sec) auf eine vorbereitete IAC-Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule in zwei Schritten mit jeweils 10 ml A. dest. gewaschen (1-2 Tropfen/sec). Die Toxine wurden mit 2 ml Methanol eluiert (0,5-1 Tropfen/sec), das Methanol bei 60 °C unter Stickstoff abgedampft und der Rückstand in 200 µl Acetonitril/Wasser (10:90, v/v) aufgenommen. Ein Teil (50 µl, entsprechen 5 ml Milch) dieses Extraktes wurde in das HPLC-System injiziert.

HPLC-Analysenbedingungen

Stationäre Phase:	Trennsäule RP 18 125 mm x 4 mm (5 µm) mit Vorsäule RP 18 4 mm x 4 mm (5 µm)
mobile Phase:	Acetonitril/Wasser (10:90; v/v)
Säulentemperatur:	25 °C
Flussgeschwindigkeit:	1,0 ml/min
Injektionsvolumen:	50 µl
Retentionszeit für DON:	~ 5,6 min.
Detektion:	UV/DAD, Quantifizierung bei 218 nm

Eine Überprüfung der HPLC-Methode erfolgte unter Verwendung künstlich mit DON bzw. DOM-1 kontaminierten Probenmaterials.

3.2.1.4.2 Nachweis von ZEA mittels HPLC

Probenvorbereitung und Extraktion getreidehaltiger Proben

Zur Untersuchung auf ZEA wurden 25 g Probe mit 100 ml Acetonitril/Wasser (75:25; v/v) 30 min auf einem Magnetrührer extrahiert und anschließend über einen Papier-Faltenfilter filtriert. Zehn ml des Filtrats wurden mit 40 ml Tween 20/PBS (0,1 %, v/v) verdünnt und zentrifugiert (3452 x g, 15 min, 20 °C). Vom Überstand wurden je 20 ml über eine Immunaффinitätssäule aufgereinigt, indem das Gemisch aufgetragen wurde (Flussgeschwindigkeit max 1 Tropfen/sec) und anschließend mit 10 ml Tween 20/PBS (1:1000, v/v) sowie mit 10 ml A. dest. gewaschen (1-2 Tropfen/sec) wurde. ZEA wurde mit 5 ml Methanol eluiert, anschließend das Methanol im Rotationsverdampfer (50 °C)

abgedampft und der Rückstand in 250 µl mobile Phase (Methanol/A.dest, 75:25; v/v) aufgenommen. Für die Untersuchung von Bier wurden 200 ml der Probe 30 min im Ultraschallbad entgast und anschließend 8 ml der entgasten Probe zu pH-Wert-Einstellung (6,8-7,2) mit 80 µl 1 mol/l Natriumcarbonatlösung versetzt. Nach einem Zentrifugierschritt (11.000 x g; 15 min, 15 °C) erfolgte eine weitere Aufarbeitung über die Immunaффinitätssäule wie oben bereits beschrieben. Anschließend erfolgte die Untersuchung mittels HPLC unter Einhaltung folgender Analysenbedingungen:

HPLC-Analysenbedingungen

Stationäre Phase:	Trennsäule RP 18 125 mm x 4 mm (5 µm) mit Vorsäule RP 18 4 mm x 4 mm (5 µm)
mobile Phase:	Methanol/Wasser (75:25, v/v)
Säulentemperatur:	25 °C
Flussgeschwindigkeit:	0,9 ml/min
Injektionsvolumen:	50 µl
Detektion:	Fluoreszenz, λ_{ex} 274 nm, λ_{em} 446 nm

Probenvorbereitung für die Untersuchung von Konsummilch

Zur Probenextraktion von Milch wurden zunächst 25 ml Milch mit 25.000 U β -Glucuronidase/Sulfatase versetzt und bei 37 °C 2 h im Schüttelwasserbad inkubiert. Die Probe wurde anschließend in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und mit Acetonitril versetzt (Endkonzentration Acetonitril 20 %). Der pH-Wert wurde mit NaOH-Lösung (3 mol/l) auf pH 10-11 eingestellt, der Ansatz zentrifugiert (2000 x g, 15 min, 20 °C) und das Milchlipp mit einer Pasteurpipette entfernt. Ein Teil (20 ml) der so behandelten Probe wurde über ein Papierfilter filtriert, das Filtrat in ein 50 ml Becherglas überführt und der pH-Wert mit HCl (1 mol/l) auf $7 \pm 0,2$ eingestellt. Die so vorbehandelte Probenlösung wurde vollständig mittels Immunaффinitätssäule nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Toxine wurden mit Methanol eluiert, das Lösungsmittel bei 60 °C unter Stickstoff abgedampft, und der Rückstand mit 200 µl Methanol aufgenommen. Für die HPLC-Analyse wurden 50 µl des Extrakts (entsprechend 5 ml Milchprobe) in das System injiziert.

HPLC-Analysenbedingungen

In Milch erfolgte neben der Detektion von Zearalenon zusätzlich eine Untersuchung auf ZEA-Analoga (α -Zearalenon, β -Zearalenon, Zearalanol, α -Zearalanol, β -Zearalanol). Die Identifizierung der Toxine erfolgte mittels Fluoreszenz-Detektion ($\lambda_{\text{ex}} = 274 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 446 \text{ nm}$) unter den hier angegebenen chromatographischen Bedingungen:

stationäre Phase:	Trennsäule RP-18 125-4 mm (5 μm) mit Vorsäule RP 18 4 mm x4 mm (5 μm)
mobile Phase:	Methanol/Acetonitril/Wasser 40:20:40 (v/v/v) (Fließmittel A, ZEA, Zearalanon, α -Zearalenol und α -Zearalanol) Acetonitril/Wasser 40:60 (v/v) (Fließmittel B, β -Zearalenol und β -Zearalanol) beide Fließmittel pH 3 (85 % o-Phosphorsäure)
Flussrate:	1 ml/min
Säulentemperatur:	25 °C

Die Quantifizierung der Toxine erfolgte mittels externer Standards (Standardkurven mit 6 Konzentrationen, 2 Injektionen/Konzentration).

Eine Überprüfung der HPLC-Methode erfolgte unter Verwendung künstlich mit ZEA kontaminierten Probenmaterials. Zusätzlich zu ZEA wurden auch die Wiederfindungsraten für die Analoga bestimmt.

3.2.1.4.3 Vergleich der Methoden (EIA und HPLC) zum Nachweis von DON und ZEA

Zur Validierung der Ergebnisse der EIAs für DON bzw. ZEA erfolgte die zeitnahe Untersuchung der gleichen Probenmaterialien mittels HPLC. Für verschiedene Probenmatrices wurde jeweils die Übereinstimmung der Ergebnisse beider Methoden (lineare Regression) bestimmt.

3.2.2 Untersuchung von getreidehaltigen Lebensmittelproben und Konsummilch auf DON und ZEA

Zur Einschätzung der Mykotoxinbelastung in getreidehaltigen Produkten des deutschen Marktes wurden Getreide, Getreidekörner, Mehle, Brot, Teigwaren, Frühstückszerealien und Säuglingsnahrung- und Kleinkindernahrung untersucht. Zudem wurden Chips und Bier in die Untersuchung einbezogen. Aufgrund der Verzehrsmengen von Milch und Milcherzeugnissen und aufgrund der Bedeutung von Milch in der Säuglingsernährung hätte eine mögliche Belastung von Milch mit DON und ZEA hohe Relevanz. Deshalb wurde Konsummilch ebenfalls in die Untersuchungen auf DON und ZEA einbezogen. Alle Proben wurden mindestens zweimal in die Testsysteme eingesetzt.

3.2.2.1. Nachweis von DON

Untersuchung mittels EIA:

Zur Extraktion von DON aus getreidehaltigen Lebensmitteln wurden, wie in Tabelle 23 zusammengefasst, 5 g Probe mit 50 ml MeOH/PBS (10:90, v/v) gemischt und 30 min auf einem Magnetrührer gerührt. Nach anschließender Zentrifugation (1500 x g, 15 min) erfolgte die Filtration durch einen Papierfaltenfilter. Zwei ml dieses Rohextraktes bzw. 2 ml entgastes Bier wurden mit 4 ml Ethylacetat gut vermischt und unter oben angegebenen Bedingungen zentrifugiert. Die Ethylacetat-Phase wurde in einen Rundkolben überführt, die wässrige Phase nochmals mit Ethylacetat versetzt und zentrifugiert. Die zweite Ethylacetatphase wurde zur ersten in den Rundkolben gegeben, das Ethylacetat im Wasserbad abgedampft und der verbliebene Rückstand in 1 ml PBS aufgenommen. Der Extrakt wurde im unter 3.2.1.1.3 beschriebenen EIA-Testsystem auf Basis monoklonaler Antikörper als unverdünntes Extrakt, sowie 1:4 und 1:16 in PBS verdünnt eingesetzt.

Untersuchung mittels HPLC:

Die Untersuchung einzelner Proben erfolgte wie unter 3.2.1.4.1 beschrieben.

3.2.2.2 Nachweis von ZEA

Untersuchung mittels EIA:

Zur Extraktion von ZEA in getreidehaltigen Lebensmitteln wurden 5 g Probe mit 25 ml Acetonitril/A. dest. (84:16; v/v) gemischt, 30 min auf einem Magnetrührer gerührt und über einen Papier-Faltenfilter filtriert. Ein Aliquot des Filtrates wurde zur Untersuchung im EIA auf eine Konzentration von 5 % Acetonitril/PBS eingestellt. Weitere Verdünnungen wurden in Acetonitril/PBS (5:95; v/v) angelegt und ebenfalls in den EIA eingesetzt.

Zur Untersuchung von Milch wurde zur Freisetzung etwaiger konjugierter ZEA-Analoga 1 ml Milch mit β -Glucuronidase + Sulfatase (1000 U β -Glucuronidase/ml Milch) versetzt und 2 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 3 mol/l NaOH-Lösung auf einen pH-Wert von 7 sowie auf einen Gehalt von 10 % Methanol eingestellt und im Testsystem eingesetzt. Zur Durchführung des kompetitiven direkten EIA (3.2.1.2.3) wurden ZEA-Standardlösungen und eventuelle erforderliche Probenverdünnungen in 10 % Methanol/Vollmilch angesetzt. Die hierzu verwendete Vollmilch war, wie mittels HPLC-Analyse ermittelt, frei von ZEA bzw. ZEA-Analoga.

Untersuchung mittels HPLC:

Die Proben wurden mittels HPLC, wie in 3.2.1.4.2 beschrieben, untersucht.

3.2.3 Auswertungskriterien

Zur Auswertung der Ergebnisse der Untersuchung der Lebensmittelproben auf DON und ZEA mittels EIA und HPLC wurden die Proben nach den ZEBS-Codes in den Warengruppen sortiert und jede Gruppe separat ausgewertet. Aus statistischen Gründen wurden alle Proben in die Auswertung mit einbezogen, das heißt auch Proben mit Gehalten unterhalb der Nachweisgrenzen. Diese Proben mit DON- bzw. ZEA-Gehalten unter der Nachweisgrenze wurden dabei jeweils mit der halben Nachweisgrenze bewertet. Zur statistischen Auswertung wurden der Mittelwert (+/- Standardabweichung), der Median (50stes Perzentil) und das 90ste Perzentil herangezogen.

Zur Berücksichtigung des Trocknungsverlustes von Brot und Brötchen wurde für diese Erzeugnisse aus den ermittelten Toxin-Gehalten (DON bzw. ZEA) der feuchtekorrigierte Wert nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Gehalt Toxin in Brot und Brötchen} = \text{Gemessener Gehalt Toxin in getrocknetem Probenmaterial} \times (\text{Gewicht nach Trocknung} / \text{Gewicht vor Trocknung})$$

Einen Faktor, der für die Ermittlung der Belastungssituation mit einer vegetationsabhängigen natürlichen Kontaminante von Bedeutung ist, stellt der Vergleich der Kontamination über mehrere Erntejahre hinweg dar. Die Untersuchungen begannen im August 2001 und endeten im Sommer 2004. Da für Getreide davon auszugehen ist, dass ab August eines Jahres in immer dominierenderem Umfang die neue Ernte desselben Jahres in die Lebensmittelproduktion gelangt, wurde die Einteilung für die Jahresvergleiche in „Erntejahre“ statt in Kalenderjahre vorgenommen. Erntejahr I umfasst somit den Zeitraum vom 1. August 2001 bis 31. Juli 2002, Erntejahr II den Zeitraum vom 1. August 2002 bis 31. Juli 2003 und Erntejahr III den Zeitraum vom 1. August 2003 bis 31. Juli 2004.

3.2.4 Berechnung der täglichen Aufnahme von DON bzw. ZEA durch den Verbraucher

Eine Berechnung der Aufnahme von DON bzw. ZEA durch den Verbraucher konnte hier nur beispielhaft durchgeführt werden, da in den Untersuchungen nicht alle Lebensmittelgruppen berücksichtigt werden konnten. Zur Errechnung wurde vor allem auf Verzehrdaten aus dem Forschungsprojekt "Belastung des Verbrauchers und der Lebensmittel mit Ochratoxin A" (CHOLMAKOW-BODECHTEL et al., 2000) zurückgegriffen. Da für eine wissenschaftliche Bewertung unter Berücksichtigung der Risikobewertung (tolerierbare Tagesaufnahme, TDI) die Toxinaufnahme je Kilogramm Körpergewicht anzugeben ist, wurde die Berechnung wie folgt durchgeführt:

$$\text{Toxinaufnahme/kg KGW} = \frac{\text{Lebensmittelbelastung} \times \text{Lebensmittelverzehr}}{\text{Körpergewicht}}$$

Für die Berechnungen wurden die Körpergewichte von Konsumenten aus der Publikation „Standards zur Expositionsabschätzung – Bericht des Ausschusses für Umwelthygiene“ der „Arbeitsgemeinschaft der leitenden Medizinalbeamtinnen und -beamten der Länder“ aus dem Jahr 1995 verwendet. Die dort angegebenen Körpergewichte weiblicher bzw. männlicher Konsumenten sowie die Verzehrsmengen sind in Tabelle 24 zusammengestellt.

Tabelle 24: Zur Berechnung der Toxinaufnahme verwendete Körpergewichte für die Gesamtbevölkerung sowie für männliche und weibliche Konsumenten*

Altersstufe	Gesamt	4-6 Jahre	7-9 Jahre	10 - u.14 Jahre	14-24 Jahre	25-50 Jahre	über 50 Jahre
KGW bei	35-40	5 Jahre	8 Jahre	12 Jahre	19	35-40	55-60
weiblich	60,8	18,5	25,5	41,0	58,0	60,8	67,5
männlich	76,6	18,5	26,1	39,8	68,0	76,6	76,0

*Abgeleitet aus „Standard zur Expositionsabschätzung“

Im Rahmen der erwähnten „Ochratoxin-Studie“ wurden Verzehrprotokolle repräsentativer Verbrauchergruppen erhoben und daraus zwei Datensätze gebildet:

Lebensmittelverzehr aus „4-Wochenration retrospektive Studie“ (4WR)

Lebensmittelverzehr aus „3-Tagesportion prospektive Studie“ (3TP)

Die Datensätze 4WR und 3TP enthielten, separat für weibliche und männliche Konsumenten, jeweils folgende Unterteilung:

Niedrigste Plausible Portionsgröße (NPP)

Mittler Plausible Portionsgröße (MPP)

Höchste Plausible Portionsgröße (HPP)

Die Verzehrdaten (NPP, MPP, HPP) aus dem Datensatz 4WR wurden jeweils durch Multiplikation mit den Medianwerten bzw. den Werten für das 90ste Perzentil der Belastungsdaten für DON und ZEA in Lebensmittels nach dem in Tabelle 25 gezeigtem System verknüpft. Hieraus ergaben sich die vier Aufnahmeszenarien. Bester anzunehmender Fall (best case), mittlerer anzunehmender Fall (mean case), schlechtester anzunehmender Fall (bad case) und schlimmster anzunehmender Fall (worst case).

Tabelle 25: Berechnung verschiedener Aufnahmeszenarien für DON und ZEA durch Multiplikation der Verzehrdaten aus dem Ochratoxin A-Projekt mit den Belastungsdaten für DON und ZEA.

	Niedrigste plausible Portion NPP	Mittlere plausible Portion MPP	Mittlere plausible Portion MPP	Höchste plausible Portion HPP
Medianwert Toxingehalt	Best case	Mean case		
90stes Perzentil Toxingehalt			Bad case	Worst case

Zur Berechnung der Aufnahmewerte wurden das Mean Case- und das Bad Case-Szenario mit den Verzehrdaten der 4WR-Studie herangezogen. Da die MPP-Daten auf den Medianwerten der Verzehrdaten beruhen, dürfte diesen Datensätzen die höchste Aussagefähigkeit zukommen, und da die verfügbaren Datensätze für NPP und HPP teilweise Inkonsistenzen aufwiesen (Tabelle 26).

Tabelle 26: Verzehrsmengen Lebensmittel für Erwachsene (g/Tag)*

	NPP	MPP	HPP
Weißbrot und Baguette	13,5112	15,2261	15,5616
Mischbrot	45,3746	38,6451	57,9676
Vollkornbrot	23,0656	43,2667	60,5734
Mehrkornbrot	12,9251	23,2373	33,5876
Knäckebrötchen	1,7588	2,6052	2,6052
Sonstiges Brot	0,5195	2,0991	2,7988
Roggenbrötchen	7,0242	6,3894	6,3894
Vollkornbrötchen	7,0292	5,4902	5,4902
Mehrkornbrötchen	3,5411	3,1834	3,1834
Sonstiges Brötchen	21,3436	16,934	16,9340
Kuchen und Gebäcke	27,8053	22,3868	30,0745
Haferflocken	1,9836	5,0358	5,0358
Müsli	5,5511	8,477	8,4770
Sonstiges Frühstückscerealien	0,777	1,6645	1,6645
Vollkornnudeln	1,1071	17,6958	26,5437
Nudeln ohne Füllung	6,6694	32,2307	48,3460
Nudeln mit Füllung (50....)	1,141	5,8644	9,3830
Reis (auch Milchreis)	3,676	14,4044	14,4044
Grießbrei	0,2915	1,8494	1,8494
Sonst. Getreide	0,1772	2,6763	3,5713
Waffeln	2,3455	4,4051	6,6076
Knabbergebäck	5,8335	4,0688	4,0688
Malzbier	11,682	2,2153	2,2153
Alkoholfreies Bier, Lightbier	11,6998	11,8087	11,8087
Weizenbier, Weißbier	20,6585	25,8967	25,8967
Starkbier, Bockbier	2,1557	5,7541	5,7541
Sonstiges Bier	145,9612	69,1132	69,1132

*übertragen aus dem Projekt: „Ochratoxin A: Belastung der Lebensmittel und Aufnahme des Verbrauchers“.

NPP = niedrigste plausible Portion

MPP = mittlere plausible Portion

HPP = höchste plausible Portion

4 ERGEBNISSE

4.1 Etablierung der Untersuchungsverfahren

4.1.1 Enzymimmuntest für den Nachweis von DON

4.1.1.1 Überprüfung der Toxinstandards

Die Messung des Spektrums des in Methanol gelösten DON (Messung innerhalb von 30 min nach Lösen) ergab ein typisches Spektrum mit einem Absorptionsmaximum bei 219 nm (Abbildung 6).

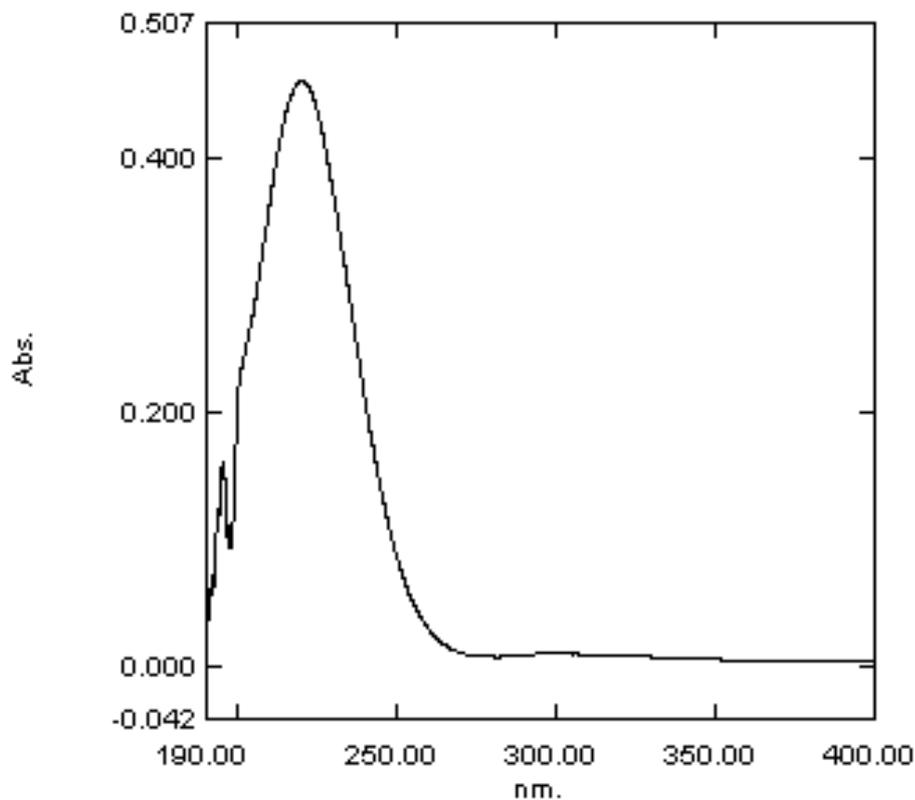


Abbildung 6: UV-Spektrum einer DON-Standardlösung (20 µg DON/ml Methanol)

Die Überprüfung der Toxine DON bzw. DOM-1 mittels HPLC ergab Retentionszeiten von 3,8 min für DON bzw. 7,0 min für DOM-1. Die mittels DAD gewonnenen Spektren dieser Peaks zeigten Absorptionsmaxima bei 218 nm für DON bzw. 219 nm für DOM-1 (Abbildung 7).

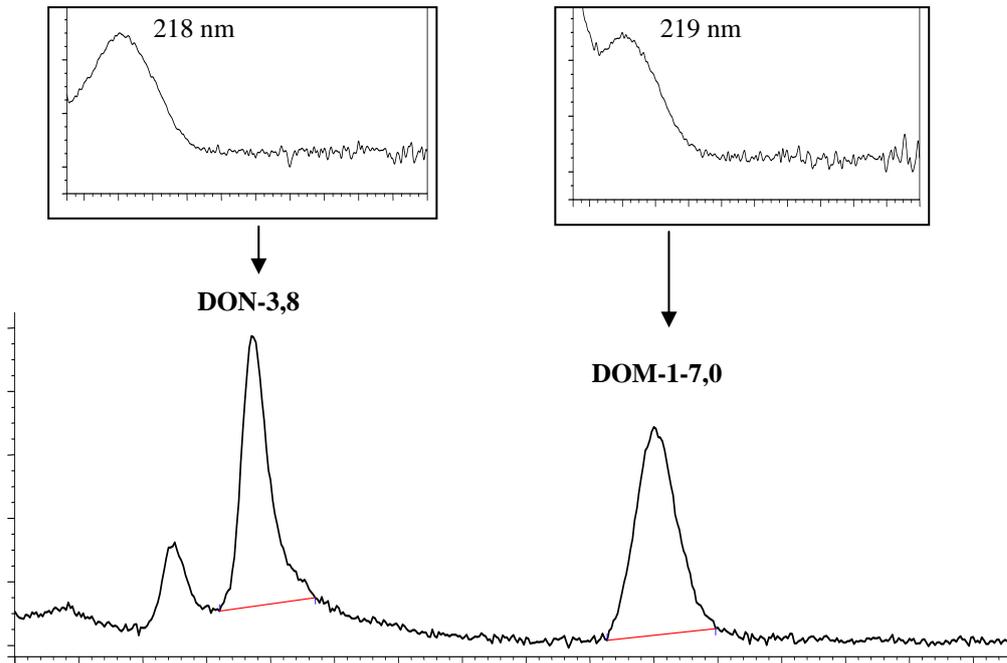


Abbildung 7: Chromatogramm einer Standardmischung von DON und DOM-1; Kleine Kästchen: UV-Spektrum im Peakmaximum von DON (3,8 min) bzw. DOM-1 (7,0 min)

4.1.1.2 Überprüfung des Toxinkonjugats

Die Derivatisierung von DON zu DON-Hemisuccinat (DON-HS) wurde spektrophotometrisch (Abbildung 8) und mittels HPLC überprüft und quantifiziert. Dabei wurde eine Ausbeute von ca. 4,7 mg DON-HS ermittelt. Ebenso wie DON wies DON-HS eine Maximumabsorption bei 220 nm auf, wobei das Gesamtspektrum durch aus der Derivatisierung stammende Verunreinigungen überlagert wurde.

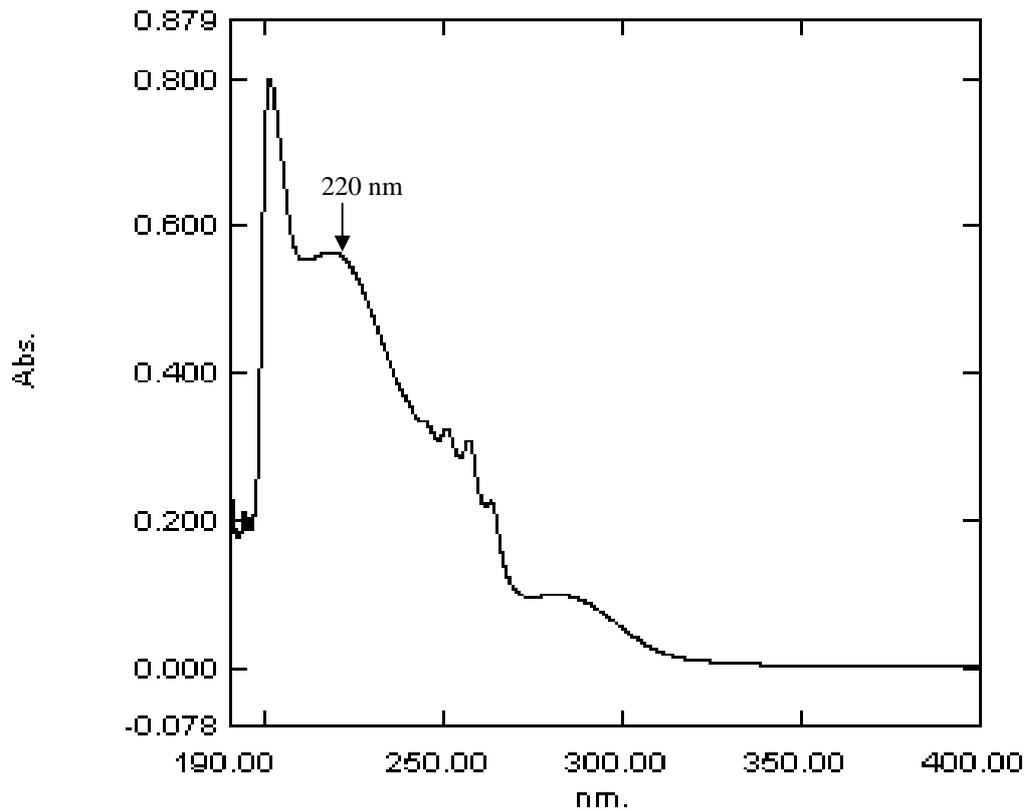


Abbildung 8: UV-Spektrum von DON-Hemisuccinat in Methanol

Bei der Überprüfung mittels HPLC zeigten sich deutliche Unterschiede im chromatographischen Verhalten des Derivates gegenüber dem Ausgangstoxin (Tabelle 27). Die Quantifizierung des DON-HS anhand einer DON-Standard-Kalibrierungskurve ergab eine Gesamtausbeute von 4,7 mg DON-HS (= 47 % der eingesetzten DON-Menge).

Tabelle 27: Retentionszeiten von DON bzw. DON-Hemisuccinat in der HPLC

	Retentionszeit (min) in Laufmittel	
	A	B
DON	3,77	3,93
DON-HS	3,80	19,98

A) Acetonitril/Wasser 10:90 (v/v), B) Acetonitril/Wasser 10:90 (v/v) mit 40 µl Eisessig

Zur Überprüfung der Kopplung wurde das Spektrum (190 – 500 nm) des ungekoppelten Reinenzyms (HRP) von dem des Konjugates (DON-HS-HRP) subtrahiert. Das

Differenzspektrum zeigte ein Absorptionsmaximum bei 210 nm (Abbildung 9). Eine Bestimmung der Kopplungsrate des gebundenen DON war aber durch Überlagerungen des HRP und des DON im Bereich von 220 – 250 nm nicht möglich.

Die Quantifizierung des HRP-Gehaltes des DON-HRP-Konjugates ergab eine Konzentration von 3 mg HRP/ml.

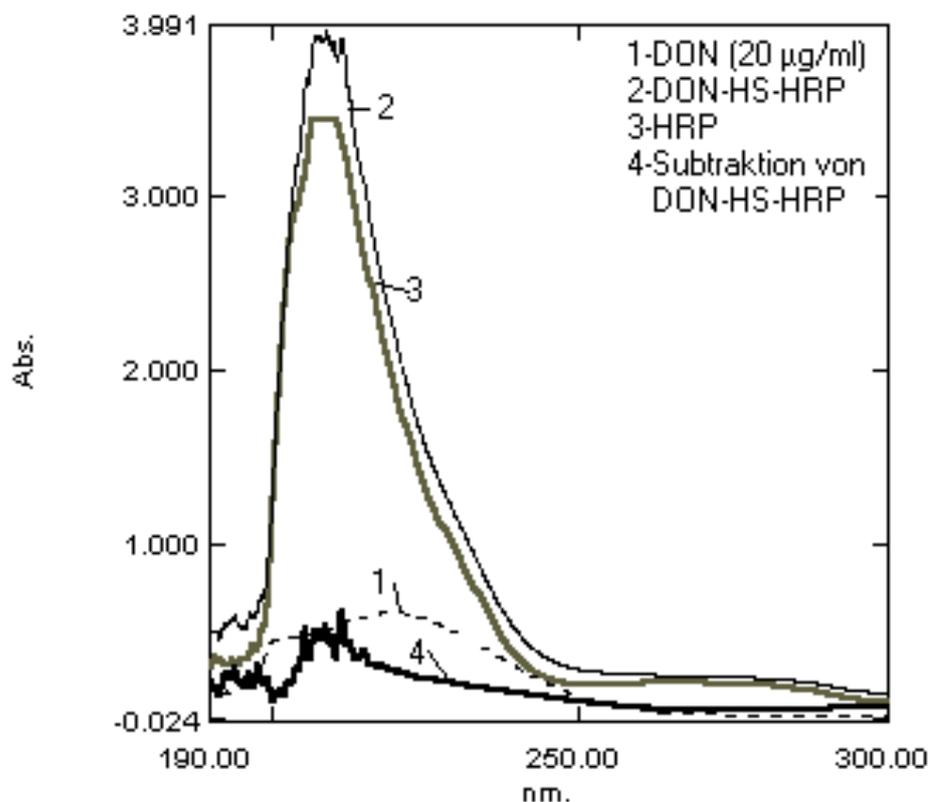


Abbildung 9: UV-Spektren des aus DON-HS und HRP synthetisierten Toxin-Enzym-Konjugates. Zum Vergleich sind das reine Toxin- und Proteinspektrum sowie das aus der Subtraktion der Spektren von Konjugat und reinem Protein errechnete Differenzspektrum eingezeichnet.

Die durchgeführten Hemmtitrationen mit den beiden EIA-Testsystemen (EIA PAK und EIA MAK) ergaben als optimale Verdünnungen 1:6000 (polyklonaler Antikörper) und 1:75.000 (Toxinkonjugat) bzw. für den Test mittels monoklonaler Antikörper gegen DON die Toxinkonjugatverdünnung von 1:35.000 (28,5 ng/ml) und die Antikörperkonzentration von 60 ng/ml.

4.1.1.3 Überprüfung zweier Testsysteme für den Nachweis von DON

4.1.1.3.1 Sensitivität und Reproduzierbarkeit

Der Vergleich der beiden eingesetzten Testverfahren auf Basis von polyklonalen (PAK) bzw. monoklonalen (MAK) Antikörpern ergab die in Tabelle 28 zusammengefassten Charakteristika. Es zeigte sich, dass der EIA unter Verwendung der MAK eine höhere Empfindlichkeit aufwies (Nachweisgrenze 2,1 ng/ml im Gegensatz zu 3,7 ng/ml mit PAK) und eine Verringerung der Variationskoeffizienten um 26 % erzielt werden konnte (Interassay). Aus diesem Grund wurde für weitere Untersuchungen dieses Testsystem herangezogen. Zur Veranschaulichung des Messbereiches ist in Abbildung 10 eine typische Standardkurve des monoklonalen Testsystems für DON abgebildet.

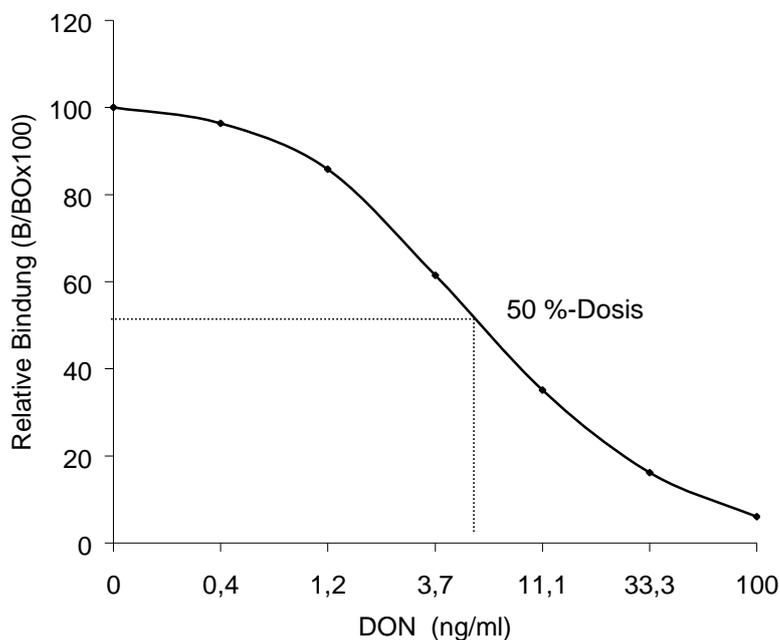


Abbildung 10: Typische Standardkurve des enzymimmunologischen Verfahrens zum Nachweis von DON mittels monoklonaler Antikörper. Die 50 %-Dosis der Standardkurve lag bei 4,7 ng/ml.

Tabelle 28: Charakteristika der Standardkurven der enzymimmunologischen Verfahren zum Nachweis von DON nach Auswertung von 30 Tests, aus einem Zeitraum von jeweils 2 Monaten, Vergleich Enzymimmuntest unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern (MAK) bzw. polyklonalen Antikörpern (PAK)

	Nachweisgrenze		50 % Dosis	
	EIA (MAK)	EIA (PAK)	EIA (MAK)	EIA (PAK)
Mittelwert, ng/ml	2,1	3,7	7,4	13
Standardabweichung, ng/ml	0,4	1,0	1,5	3,4
Variationskoeffizient, %	20	27	20	27
Median, ng/ml	2,0	3,3	7,1	12
Minimalwert, ng/ml	1,4	2,4	4,9	8,5
Maximalwert, ng/ml	3,3	6,3	11	22

4.1.1.3.2 Spezifität

Die Überprüfung der Spezifität der monoklonalen Antikörper für DON ergab die in Tabelle 29 aufgeführten Kreuzreaktionen mit anderen Typ-B-Trichotheceen. Insbesondere 3-AcetylDON wurde mit einer Kreuzreaktion von ca. 600 % sehr stark erfasst und kann somit zu einer Überschätzung des Toxingehaltes (ausgedrückt als DON-Konzentration) führen. Die relative Kreuzreaktivität für 15-AcetylDON betrug 65 %.

Tabelle 29: Relative Kreuzreaktionen des DON-Antikörpers mit anderen Typ-B-Trichotheceen

Toxin	Molekulargewicht	Deoxynivalenol-EIA	
		50 % Dosis (nmol/l)	Kreuzreaktion (%)
Deoxynivalenol	296,3	6,3	100
Deepoxydeoxynivalenol	280,3	231,2	2,6
3-Acetyldeoxynivalenol	338,4	1,2	630
15-Acetyldeoxynivalenol	338,4	11,1	65
Fusarenon X	354,4	3162,5	0,24
Nivalenol	312,3	297,1	2,2

4.1.2 Enzymimmuntest für den Nachweis von ZEA

4.1.2.1 Überprüfung der Toxinstandards

Nach Messung der Spektren zeigte sich, dass die verwendete ZEA-Standardlösung die erwarteten UV-Absorptionsmaxima bei 236, 274, 316 aufwies. Hinweise auf Verunreinigungen ergaben sich nicht.

4.1.2.2 Überprüfung des Toxinkonjugats

Die Überprüfung der Derivatisierung von ZEA zu ZEA-Oxim durch Messung (in Methanol) der Absorption in den drei UV-Maxima (236, 273, 313 nm, Abbildung 11) ergab eine Konzentration an ZEA-Oxim von 11,21 mg/ml (Mittelwert aus drei Einzelwerten, berechnet aus den drei Absorptionsmaxima). Die Gesamtausbeute lag somit bei 22,4 mg, entsprechend ca. 90 % der eingesetzten ZEA-Menge.

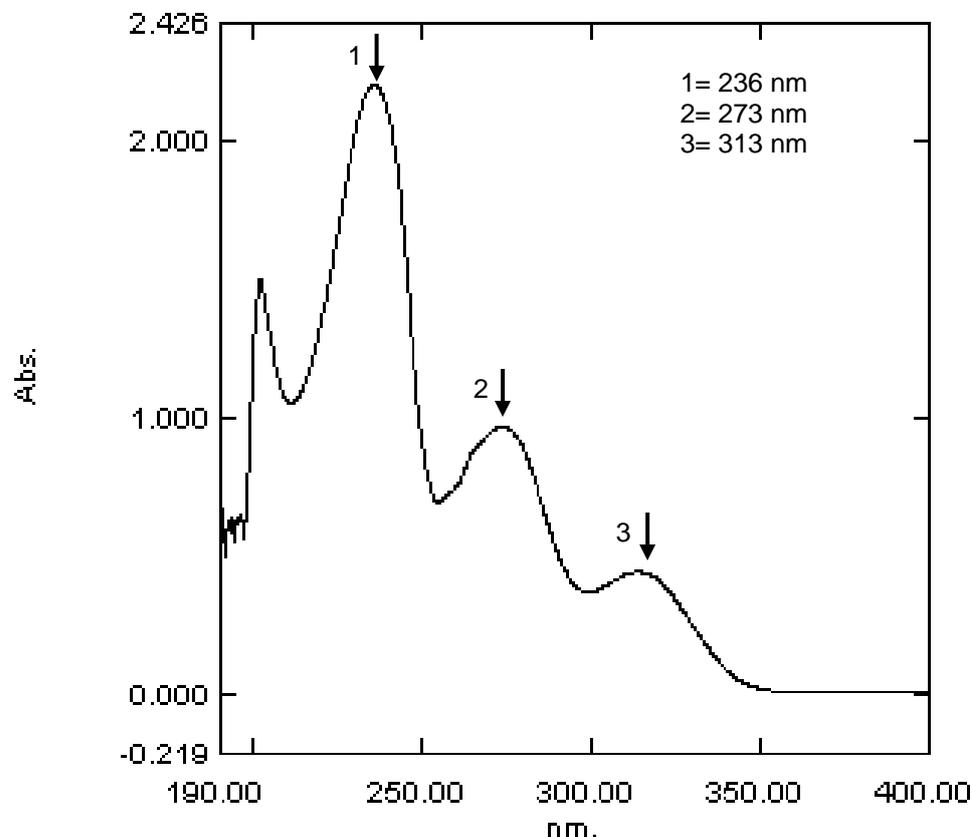


Abbildung 11: UV-Spektrum ZEA-Oxim (5 µg/ml Chloroform)

Das UV-Spektrum (190 – 300 nm) des Reinenzyms (HRP) wurde von dem des Konjugates (ZEA-Oxim-HRP) subtrahiert. Das Differenzspektrum zeigte qualitativ das Absorptionsspektrum von ZEA (Abbildung 12). Die Quantifizierung des ZEA-Oxim-HRP-Konjugates ergab Konzentrationen von 1,06 mg ZEA/ml und 3,5 mg HRP/ml, die hieraus ermittelte molare Kopplungsrate betrug 7,6:1 (ZEA:HRP).

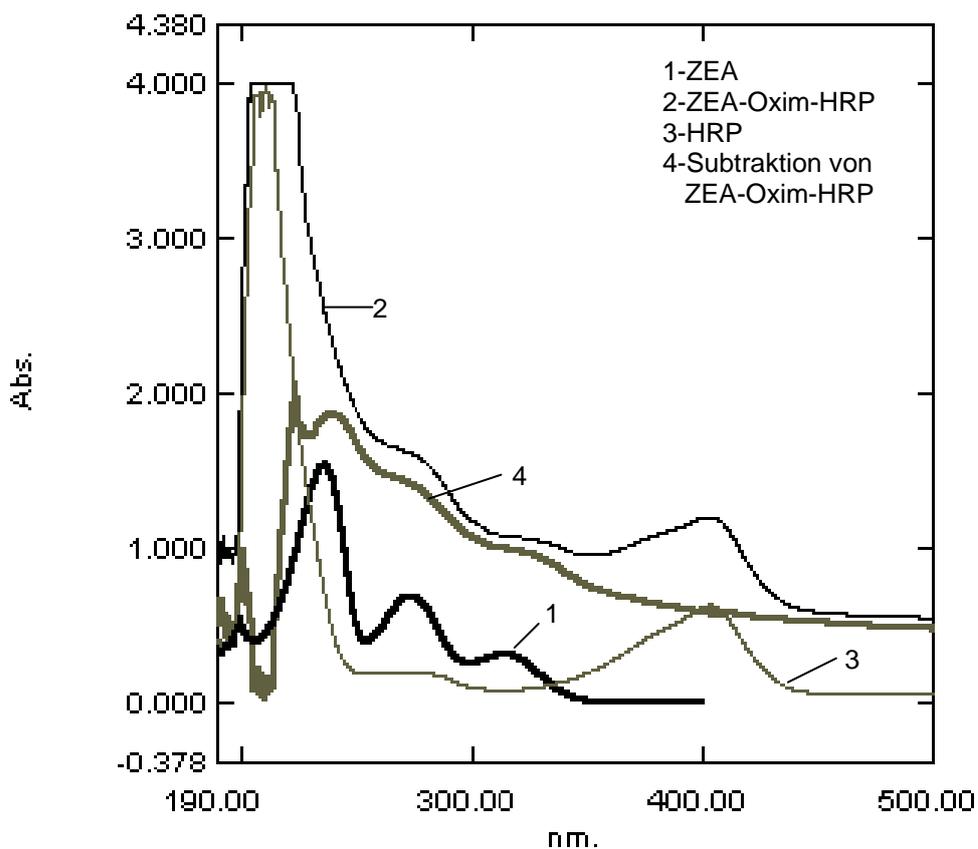


Abbildung 12: UV-Spektrum des aus ZEA-Oxim und HRP synthetisierten Toxin-Enzym-Konjugates. Zum Vergleich sind das reine Toxin- bzw. Protein-Spektrum sowie das aus der Subtraktion von Konjugat und reinem Protein errechnete Differenzspektrum eingezeichnet.

Die durchgeführte Hemmtitration zur Ermittlung der optimalen Verdünnungen an Immunreagenzien ergab Werte von 1:4000 (Antikörper) und 1:150.000 (Toxinkonjugat) für den EIA.

4.1.2.3 Überprüfung des Testsystems für den Nachweis von ZEA

4.1.2.3.1 Sensitivität und Reproduzierbarkeit

Die Auswertung der Standardkurven des EIA ergab die in Tabelle 30 zusammengefassten Charakteristika. Zur Veranschaulichung des Messbereiches ist in Abbildung 13 eine typische Standardkurve des Testsystems für ZEA abgebildet.

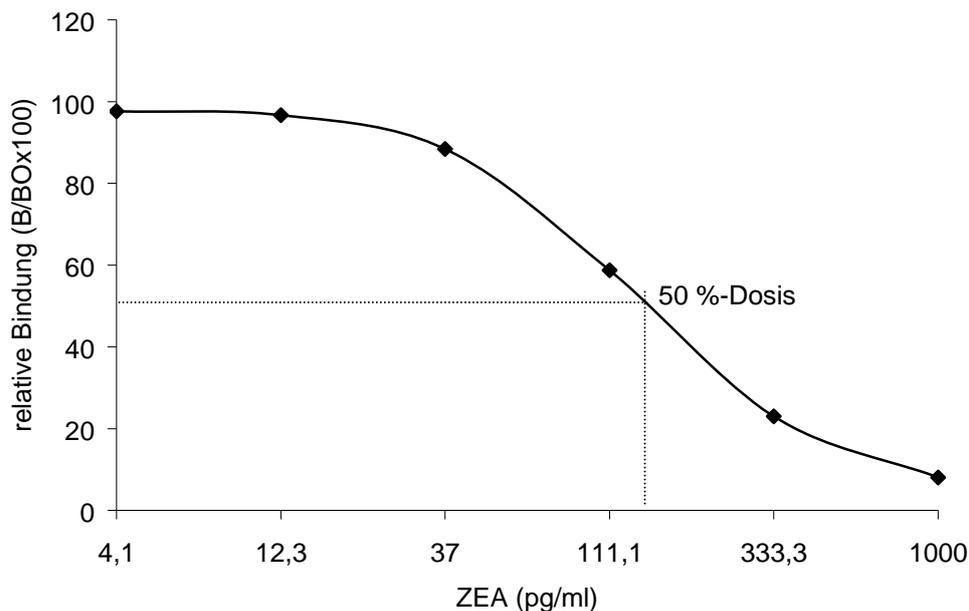


Abbildung 13: Typische Standardkurve des enzymimmunologischen Verfahrens zum Nachweis von ZEA. Die 50 %-Dosis der Standardkurve lag bei 147 pg/ml.

Tabelle 30: Charakteristika der Standardkurven des enzymimmunologischen Verfahrens zum Nachweis von ZEA nach Auswertung von 30 Tests aus einem Zeitraum von ca. 2 Monaten.

	Nachweisgrenze	50 % Dosis
Mittelwert, pg/ml	47	141
Standardabweichung, pg/ml	7,0	21
Variationskoeffizient, %	15	15
Median, pg/ml	47	141
Minimalwert, pg/ml	35	104
Maximalwert, pg/ml	58	173

4.1.2.3.2 Spezifität

Die Überprüfung der Spezifität des EIA-Testsystems für ZEA ergab die in Tabelle 31 aufgeführten Kreuzreaktionen mit ZEA-Analoga. Alle Analoga konnten mit dem EIA erfasst werden. Insbesondere α -Zearalenol wurde mit einer relativen Kreuzreaktion von 88 % stark erfasst.

Tabelle 31: Relative Kreuzreaktionen des ZEA-Antiserums mit strukturverwandten Analoga

Toxin	Molekulargewicht	Zearalenon-EIA	
		50 % Dosis (nmol/l)	Kreuzreaktion (%)
Zearalenon	318,4	192,7	100
α -Zearalenol	320,4	220,0	88
β -Zearalenol	320,4	436,0	44
Zearalanon	320,4	323,6	60
α -Zearalanol	322,4	395,2	53
β -Zearalanol	322,4	830,7	25

4.1.3 Probenvorbereitungsverfahren

4.1.3.1 Sensitivität und Reproduzierbarkeit der Verfahren

4.1.3.1.1 DON

Der Vergleich der zwei Extraktionsmethoden (Tabelle 32) zeigte, dass die Extraktion mit zusätzlicher Flüssig-Flüssig-Partitionierung (Extraktion B) durch Verringerung von Matrixstöreffekten zu einer Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit führte. Extraktion A, bei der Probenrohextrakte lediglich in Pufferlösung verdünnt wurden, ergab dagegen in einigen Matrices unbefriedigende Ergebnisse. Die Nachweisgrenzen nach Methode B für verschiedene Produktgruppen, die bei einer mittleren Nachweisgrenze von 2,1 ng/ml (Tabelle 28) und unter Berücksichtigung der minimalen Verdünnungsfaktoren sowie einem zusätzlichen Sicherheitsfaktor von 20 % für die Variabilität der Probenmatrix innerhalb einer Produktgruppe berechnet wurden, sind in Tabelle 32 zusammengefasst. Durch Verwendung der Flüssig-Flüssig-Partitionierung konnten die Probenextrakte ohne die Notwendigkeit einer weiteren Verdünnung in den EIA eingesetzt werden. Damit führte die Extraktion mittels MeOH/PBS und anschließender Flüssig-Flüssig-Partitionierung mit Ethylacetat zu ausreichenden Nachweisgrenzen, die sogar für Säuglingsnahrungsmittel deutlich unter der

entsprechenden Höchstmenge (100 µg/kg) lagen. Die Überprüfung der Probenmatrix-Einflüsse durch die Bestimmung der Wiederfindungsraten zeigte ebenfalls, dass die Methode B (Flüssig-Flüssig-Partitionierung) besser geeignet ist als Methode A. Bei Verwendung der Extraktion A (mittels MeOH/PBS) lagen die Intraassay-Variationskoeffizienten einzelner Probenverdünnungen so hoch (bis zu 45 %), dass die erzielten Ergebnisse als zu ungenau zu betrachten waren. Dieser Effekt trat vor allem bei Lebensmitteln komplexerer Matrices auf und konnte durch Verwendung der zusätzlichen Flüssig-Flüssig-Partitionierung mit Ethylacetat (Extraktion B) minimiert werden.

Tabelle 32: Nachweisgrenzen des EIA für DON in verschiedenen Probenmatrices bei Verwendung unterschiedlicher Extraktionen

Probenmatrix	Nachweisgrenze (µg/kg bzw. µg/l)	
	Extraktion A	Extraktion B
Getreide, Getreidemehle	100	15
Teigwaren	100	15
Brot	n.d.	15
Säuglings- und Kleinkindernahrung	100	15
Bier	n.d.	2

A: einfache Extraktion mittels MeOH-PBS; B: Extraktion in MeOH-PBS und Flüssig-Flüssig-Partitionierung in Ethylacetat; n.d.: nicht durchgeführt

Die mittels Extraktion B erreichten Wiederfindungsraten lagen zwischen 80 – 112 % (Tabelle 33).

Tabelle 33: Wiederfindungsraten für DON in verschiedenen Probenmatrixen mittels EIA (Extraktion B)

Probenart	n	Toxinzusatz (ng/g)	Wiederfindung	
			Mittelwert (%)	VK (%)
Mehle	11	100	96	39
Teigwaren	13	100	91	22
	6	200	106	24
Brot	4	50	85	13
	9	100	101	17
	5	200	82	10
Säuglings- und Kleinkindernahrung	10	50	102	18
	16	100	111	29
	39	300	110	15
	3	500	112	12
Bier	4	10	83	6
	10	20	91	16

VK: Variationskoeffizient

Die Bestimmung der Reproduzierbarkeit ergab für verschiedene Probenmatrixen die in Tabelle 34 zusammengefassten Ergebnisse. Die Variationskoeffizienten lagen stets unter 10 % und zeigten daher eine gute Wiederholbarkeit der Ergebnisse in diesem Verfahren.

Tabelle 34: Ergebnisse von Mehrfachuntersuchungen natürlich mit DON kontaminierter Proben mittels EIA (nach Extraktion B)

Replikant-Nr.	Messwert DON, µg/kg		
	Getreide-Milchbrei	Haferflakes	Weizentostbrot
1	73	41	136
2	74	38	136
3	76	36	133
4	68	37	142
5	80	40	-
Mittelwert, µg/kg	74	38	137
Standardabweichung, µg/kg	4	2	4
Variationskoeffizient, %	6	5	3

4.1.3.1.2 ZEA

Mit einer mittleren Nachweisgrenze von 50 pg/ml (siehe Tabelle 30) resultierte unter Berücksichtigung des minimalen Probenextraktionsfaktors (84) eine theoretische Nachweisgrenze von ca. 3-4 ng/g (Bier 1 ng/ml). Durch Verwendung eines zusätzlichen Sicherheitsfaktors von 2 zur Berücksichtigung der Variabilität verschiedener Probenmatrices innerhalb einer Produktgruppe ergaben sich Nachweisgrenzen für ZEA von < 6 µg/kg (Bier < 2 µg/l). Es konnten somit in Bezug auf die Höchstmengen ausreichend niedrige Nachweisgrenzen erzielt werden.

Eine Probenextraktion für ZEA unter Verwendung von 70 % MeOH/A. dest. erwies sich als nicht geeignet, da Störeinflüsse durch Probenmatrix die Nachweissicherheit beeinträchtigten. Dagegen konnten nach Extraktion mit 84 % Acetonitril/A. dest. gute Ergebnisse erzielt werden.

Die Überprüfung der Probenmatrix-Einflüsse ergab die in den Tabellen 35 und 36 dargestellten Ergebnisse. Die Wiederfindungsraten lagen zwischen 79 und 130 %. Es zeigte sich, dass bei Verwendung der Extraktion mit Acetonitril/A. dest. eine bessere Reproduzierbarkeit der Methodik erreicht wurde. In den weiteren Arbeiten wurde daher ausschließlich die Extraktion mit 84 % Acetonitril/A. dest. eingesetzt.

Tabelle 35: Wiederfindung von ZEA in künstlich kontaminierten Lebensmitteln mittels EIA (extrahiert in 84 % Acetonitril/A. dest.)

Probenart	n	Toxinzusatz (ng/g bzw. ml)	Wiederfindung	
			Mittelwert (%)	VK (%)
Mehle	19	20	129	19
Nudeln	21	20	86	24
Brot	11	20	96	19
Säuglings- und Kleinkindernahrung	12	20	89	17
	38	40	96	18
Bier	11	0,5	101	8

VK: Variationskoeffizient

Tabelle 36: Wiederfindung von ZEA in künstlich kontaminierten Lebensmitteln mittels EIA (extrahiert in 70 % Methanol/A. dest.)

Probenart	n	Toxinzusatz (ng/g)	Wiederfindung	
			Mittelwert (%)	VK (%)
Mehle	10	10	110	24
	6	20	98	10
Säuglings-und Kleinkindernahrung	5	10	103	36
	9	20	101	22
	8	40	93	27

VK: Variationskoeffizient

Unter Berücksichtigung der Probenverdünnung und der Messwert-Streuung für ZEA-freie Milchproben ergab sich eine Nachweisgrenze in Konsummilch von 0,6 µg/l (ZEA-Äquivalente). Aufgrund der ausgeprägten Kreuzreaktionen (4.1.2.3.2) konnte mittels EIA nicht nur ZEA, sondern auch alle Analoga in Konzentrationen unter 2 µg/l nachgewiesen werden.

Die Bestimmung der Reproduzierbarkeit des Untersuchungsverfahrens ergab für verschiedene Probenmatrices die in Tabelle 37 zusammengefassten Ergebnisse. Die Variationskoeffizienten lagen stets unter 10 %.

Tabelle 37: Ergebnisse von Mehrfachuntersuchungen künstlich mit ZEA kontaminierter Proben mittels EIA

Replikant-Nr.	Messwert ZEA, µg/kg		
	Weizenmehl Type 405	Spinatnudeln	Getreide-Milchbrei
1	28	32	23
2	30	32	25
3	30	33	24
4	29	28	24
Mittelwert, µg/kg	29	31	24
Standardabweichung, µg/kg	1,0	2,2	0,8
Variationskoeffizient, %	3,3	7,1	3,4

Die Überprüfung der Wiederfindung unter Verwendung künstlich mit ZEA kontaminierter Milchproben ergab im EIA zufrieden stellende Ergebnisse bei Variationskoeffizienten um 20 % (Tabelle 38).

Tabelle 38: Wiederfindung von ZEA in künstlich kontaminierten Milchproben mittels EIA

ZEA Zusatz ($\mu\text{g/l}$)	n	Wiederfindung (%)	Variationskoeffizient (%)
0,8	12	102	20
1,0	7	114	21

4.1.4 Untersuchung mittels HPLC

4.1.4.1 Nachweis von DON

Zur Überprüfung der Ergebnisse der verwendeten EIA-Methoden wurden einige Lebensmittel stichprobenartig parallel mittels HPLC untersucht. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der HPLC-Methoden lagen für DON sehr niedrig (Tabelle 39). In Abbildung 14 ist ein typisches HPLC-Chromatogramm für DON dargestellt. Die Retentionszeit für DON lag bei ~ 5,6 min. Unter den angegebenen Bedingungen lag, wie in Vorversuchen ermittelt, die Nachweisgrenze für DON-Standardtoxin bei 1 ng absolut (injiziert), die Nachweisgrenze lag unter Berücksichtigung der Probenextraktionsfaktoren für Getreideproben bei 10 $\mu\text{g/kg}$, für Brotproben bei 7 $\mu\text{g/kg}$ und für Bierproben bei 2 $\mu\text{g/l}$.

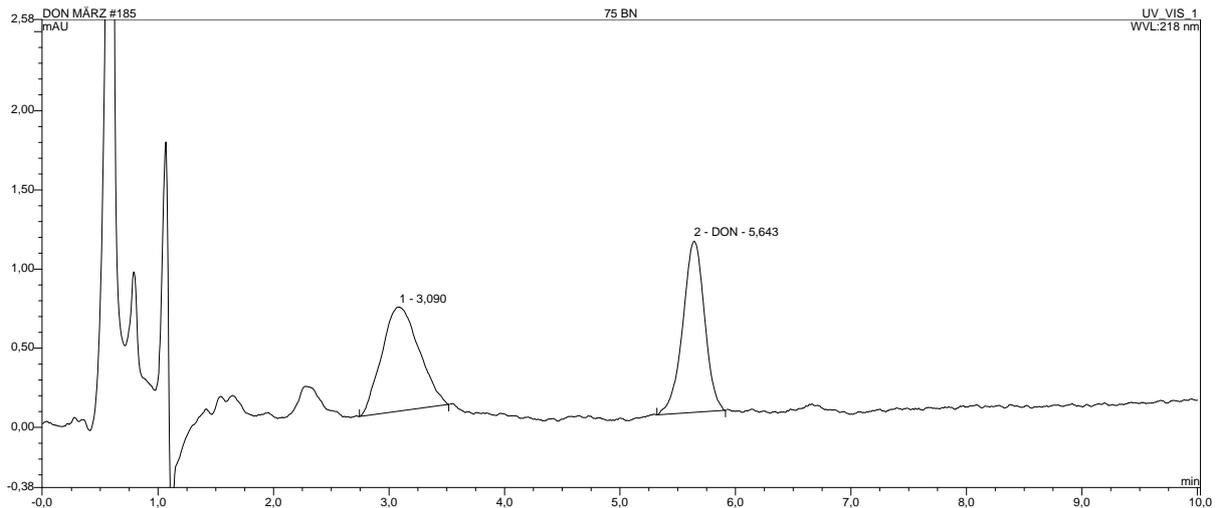


Abbildung 14: Chromatogramm einer natürlich mit DON kontaminierten Säuglingsnahrungsmittelprobe (Kindergrieß). Die DON-Konzentration betrug 97 µg/kg.

Tabelle 39: Nachweisgrenzen für DON in verschiedenen Probenmatrices (HPLC)

Probenart	(µg/kg bzw. µg/l)	
	Nachweisgrenze*	Bestimmungsgrenze**
Getreide, Getreidemehle	5	10
Teigwaren	5	10
Brot	3,5	7
Säuglings- und Kleinkindernahrung	5	10
Bier	1	2

*Signal/Rausch-Verhältnis 3:1; ** Signal/Rausch-Verhältnis 6:1

Die Bestimmung der Reproduzierbarkeit ergab für verschiedene Probenmatrices die in Tabelle 40 zusammengefassten Ergebnisse. Die Standardabweichungen und Variationskoeffizienten lagen bei maximal 12 % und zeigten somit eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in diesem Verfahren an.

Tabelle 40: Ergebnisse von Mehrfachuntersuchungen natürlich mit DON kontaminierter Proben mittels HPLC

Replikant-Nr.	Messwerte DON, $\mu\text{g}/\text{kg}$		
	Roggenbrötchen	Grießmilchbrei	Hartweizennudeln
1	27	56	184
2	24	61	206
3	26	66	186
4	26	49	-
5	-	52	-
Mittelwert, $\mu\text{g}/\text{kg}$	26	57	192
Standardabweichung, $\mu\text{g}/\text{kg}$	1,3	7	12
Variationskoeffizient, %	5	12	6

-: nicht durchgeführt

Die in Tabelle 41 angegebenen Wiederfindungsraten lagen in allen Lebensmittelmatrices zwischen 80 % und 90 %. Dabei waren die Variationskoeffizienten mit < 10 % sehr niedrig.

Tabelle 41: Wiederfindungsraten für DON in verschiedenen Probenmatrices mittels HPLC

Probenart	n	Toxinzusatz (ng/g)	Wiederfindung	
			Mittelwert (%)	VK (%)
Getreide, Getreidemehle	8	25-200	90	8
Nudeln	5	100-500	85	7
Brot	3	100	82	10
	3	200	80	2,5
	4	500	82	4,5
Säuglings- und Kleinkindernahrung	10	30-500	87	8
Bier	8	20-100	93	5

VK: Variationskoeffizient

Die Untersuchung von Konsummilch erfolgte simultan auf DON und seinen Hauptmetaboliten DOM-1, da die verwendeten Immunaффinitätssäulen, wie in Vorversuchen ermittelt, auch ausreichende Bindung für DOM-1 aufwiesen und somit beide Verbindungen gleichzeitig aus Probenmaterial isoliert werden konnten. Unter den beschriebenen

chromatographischen Bedingungen lag die Nachweisgrenze für DON bzw. DOM-1 jeweils bei ca. 1 ng absolut injizierter Menge, entsprechend ca. 0,2 µg/l Milch (Signal/Rausch-Verhältnis 3:1). Die Bestimmungsgrenze (Signal/Rausch-Verhältnis 10:1) lag für beide Toxine bei jeweils ca. 1 µg/l. Ab einer injizierten Menge von ca. 2 ng war neben der Detektion bei 218 nm eine zusätzliche Überprüfung der Peakidentität durch Auswertung des UV-Absorptionsspektrums zur Retentionszeit von DON bzw. DOM-1 möglich.

Eine Überprüfung der HPLC-Methode für Konsummilch unter Verwendung künstlich mit DON bzw. DOM-1 kontaminierten Probenmaterials (Tabelle 42) ergab mittlere Wiederfindungsraten von 97 % (DON) bzw. 84 % (DOM-1).

Tabelle 42: Wiederfindung von DON bzw. DOM-1 in künstlich kontaminierter Konsummilch (HPLC)

Toxin- Zugabe (µg/l)	DON			DOM-1		
	n	Wiederfindung (%)	VK (%)	n	Wiederfindung (%)	VK (%)
1,0	2	110	1,3	2	85	7,4
2,5	3	95	2,2	3	86	1,8
5,0	4	93	3,0	4	82	5,6
10	2	97	2,2	2	86	1,6

VK: Variationskoeffizient

4.1.4.2 Nachweis von ZEA

Zur Überprüfung der Ergebnisse des EIA für ZEA, wurden Lebensmittel stichprobenartig ausgewählt und mittels HPLC nachuntersucht (Abbildung 15). Die Nachweisgrenzen der HPLC-Methode sind in Tabelle 43 angegeben. Hieraus ist ersichtlich, dass mittels HPLC sehr niedrige Nachweisgrenzen und damit eine ausreichende Testsensibilität erreicht werden konnte. Unter den angegebenen Bedingungen lag, wie in Vorversuchen ermittelt, die Nachweisgrenze für ZEA-Standardtoxin bei 15 pg absolut (injiziert), unter Berücksichtigung der Probenextraktionsfaktoren für Säuglingsnahrungsproben bei 2 µg/kg.

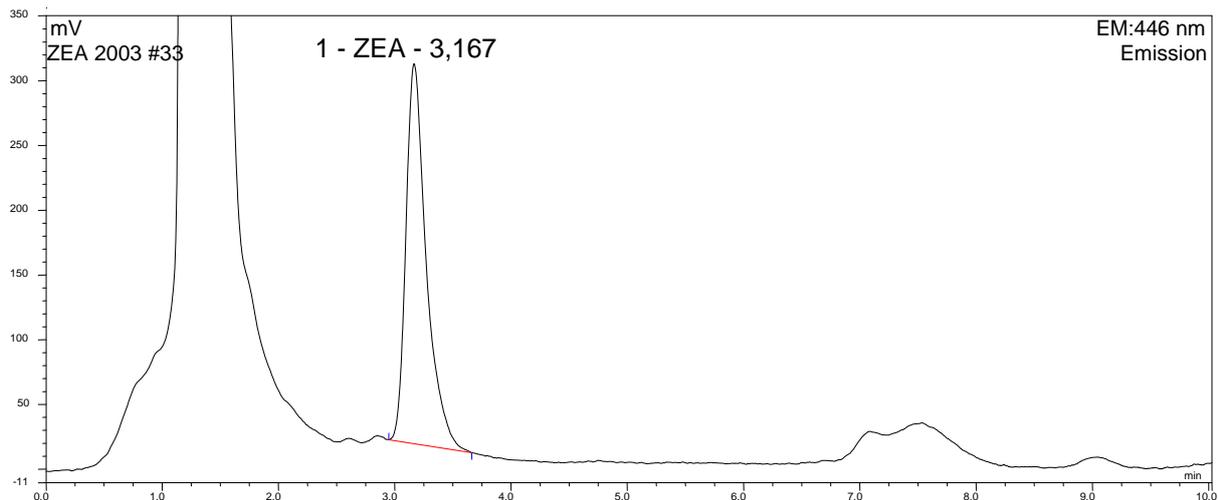


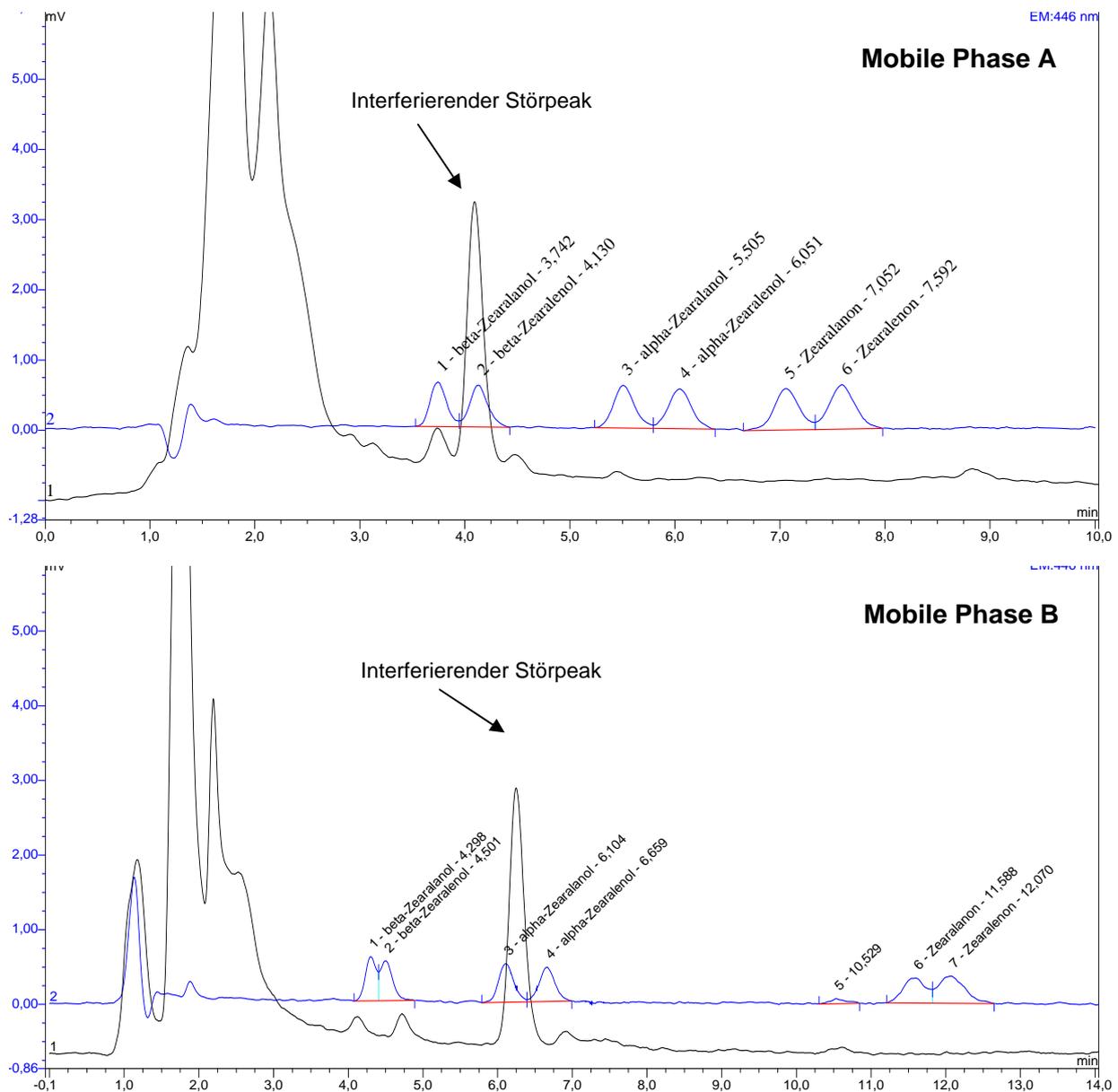
Abbildung 15: Chromatogramm (Fluoreszenzdetektion) einer natürlich mit ZEA kontaminierten Säuglingsnahrungsmittelprobe (Konzentration 2,7 µg/kg)

Tabelle 43: Nachweisgrenzen- und Bestimmungsgrenze für ZEA in verschiedenen Probenmatrices (Untersuchung mittels HPLC)

Probenart	µg/kg bzw. µg/l	
	Nachweisgrenze*	Bestimmungsgrenze**
Getreide, Getreidemehle	1	2
Teigwaren	1	2
Brot	1	2
Säuglings- und Kleinkindernahrung	1	2
Bier	1	2

* Signal/Rauschverhältnis 3:1; **Signal/Rausch-Verhältnis 6:1

Bei der Etablierung der HPLC-Methodik zur Untersuchung von Konsummilch bereiteten anfänglich einige in Milch offensichtlich häufig vorkommende Störsubstanzen Probleme, die auf der Immunaффinitätsäule binden und ähnliches chromatographisches Verhalten wie einige ZEA-Analoga aufwiesen. Durch die Untersuchung jedes Extraktes unter zwei verschiedenen chromatographischen Bedingungen konnten diese Störpeaks aufgrund von Retentionszeitverschiebungen jedoch einwandfrei als nicht ZEA bzw. ZEA-Analoga identifiziert werden (Abbildung 16).

**Abbildung 16:**

Chromatogramme eines Konsummilchextraktes:

oben: Störpeak zur Retentionszeit von β -Zeaxanthinol

unten: Störpeak zur Retentionszeit von α -Zeaxanthinol

Zum Vergleich sind jeweils Chromatogramme einer Standardmischung (β -Zeaxanthinol, β -Zeaxanthinol, α -Zeaxanthinol, α -Zeaxanthinol, Zeaxanthanon, ZEA) eingezeichnet. Durch Verschiebung der Retentionszeit des Störpeaks konnte nachgewiesen werden, dass es sich nicht um ZEA oder ein ZEA-Analogon handelt.

In der beschriebenen HPLC-Methode zum Nachweis von ZEA und ZEA-Analoga in Konsummilch ergaben sich die in Tabelle 44 zusammengefassten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen.

Tabelle 44: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für ZEA und ZEA-Analoga in Konsummilch (HPLC)

Toxin	Nachweisgrenze* (ng/ml)	Bestimmungsgrenze** (ng/ml)
Zearalenon	0,05	0,10
α -Zearalenol	0,04	0,07
β -Zearalenol	0,33	0,65
Zearalanon	1,3	2,5
α -Zearalanol	2	4
β -Zearalanol	4	10

* Signal/Rausch-Verhältnis 3:1; **Signal/Rausch-Verhältnis 6:1

Die Überprüfung der Probenmatrix-Einflüsse ergab die in Tabelle 45 dargestellten Wiederfindungsraten, die zwischen 89 und 102 % lagen.

Tabelle 45: Bestimmung von ZEA in künstlich kontaminierten Lebensmitteln mittels HPLC

Probenart	n	Toxinzusatz (ng/g)	Wiederfindungsrate	
			Mittelwert (%)	VK (%)
Getreide, Getreidemehle	13	5-50	102	7
Brot	2	10 - 20	98	17
Säuglings- und Kleinkindernahrung	5	10	99	5,7
Bier	6	0,5 - 4	89	9

VK: Variationskoeffizient

Bei der Untersuchung von Konsummilch wurden zusätzlich zu ZEA auch die Wiederfindungsraten der Analoga bestimmt, diese lagen zwischen 91 % und 104 % (Variationskoeffizienten von 8-14 %) und damit in einem akzeptablen Bereich (Tabelle 46).

Tabelle 46: Wiederfindungsraten für ZEA und ZEA-Analoga in künstlich kontaminierter Konsummilch (HPLC)

Toxin	Zusatz ($\mu\text{g/l}$)	N	Mittlere Wiederfindung (%)	Variationskoeffizient (%)
Zearalenon	0,1-0,5	12	91	8
α -Zearalenol	0,07-0,35	7	97	12
β -Zearalenol	0,65-3,2	6	98	12
Zearalanon	2,5-12,5	6	92	12
α -Zearalanol	4-20	6	104	14
β -Zearalanol	10-50	5	101	12

4.1.5 Methodenvergleich EIA und HPLC zum Nachweis von DON

Der Vergleich der EIA- und der HPLC-Methode für DON ergab gute Übereinstimmungen in den Ergebnissen, mit Korrelationskoeffizienten (r^2) von 0,993 in Brot und Brötchen, 0,957 in Säuglings- und Kleinkindernahrung, sowie 0,823 in Bier (Tabellen 47 - 49).

Tabelle 47: Methodenvergleich EIA und HPLC für DON in Bier

Probe Nr.	Messwert DON, $\mu\text{g/l}$	
	EIA	HPLC
1	12,6	10,0
2	23,3	26,0
3	17,0	15,4
4	9,3	6,3
5	14,0	10,0
6	15,3	14,0
7	16,1	12,1
8	2,0	<2
9	10,3	5,2
10	18,8	15,3
11	5,9	7,2
12	10,2	8,5
13	18,2	20,1
14	41,0	29,0
	r^2	0,823

Tabelle 48: Methodenvergleich EIA und HPLC für DON in Brot und Brötchen

Probe Nr.	Messwert DON, µg/kg	
	EIA	HPLC
1	44,8	46,8
2	48,8	46,3
3	19,8	17,5
4	104,8	118,3
5	156,7	157,5
6	<15	<7
7	61,0	64,9
8	116,1	111,9
9	281,0	309,3
10	76,8	80,1
11	<15	<7
12	27,5	20,4
13	91,7	95,3
14	173,0	166,6
15	24,3	25,6
16	22,7	22,7
17	25,2	23,0
	r²	0,993

Tabelle 49: Methodenvergleich EIA und HPLC für DON in Säuglings- und Kleinkindernahrung auf Getreidebasis

Probe Nr.	Messwert DON, µg/kg	
	EIA	HPLC
1	56,6	61,9
2	90,2	94,8
3	37,9	54,4
4	<15	<10
5	59,3	56,2
6	91,6	90,2
7	<15	<10
8	46,4	45,8
9	60,4	72,2
10	48,7	30,5
11	<15	7,1
12	<15	<10
13	<15	5,1
14	23,8	26,3
15	<15	<10
16	15	11
17	105,8	99,1
	r²	0,957

4.1.6 Methodenvergleich EIA und HPLC zum Nachweis von ZEA

Aufgrund der wenigen über der Nachweisgrenze liegenden Ergebnisse für natürlich kontaminiertes Probenmaterial war ein Vergleich der Methoden schwierig. Die meisten positiven Proben im Enzymimmuntest lagen nahe der Bestimmungsgrenze (6 µg/kg). Im höheren Konzentrationsbereich (> 10 µg/kg) waren die Resultate im EIA und der HPLC sehr gut vergleichbar.

4.2 Untersuchung von getreidehaltigen Lebensmitteln und von Konsummilch auf DON und ZEA mittels EIA und HPLC

4.2.1 DON

Getreide/ -mehle und Getreideerzeugnisse

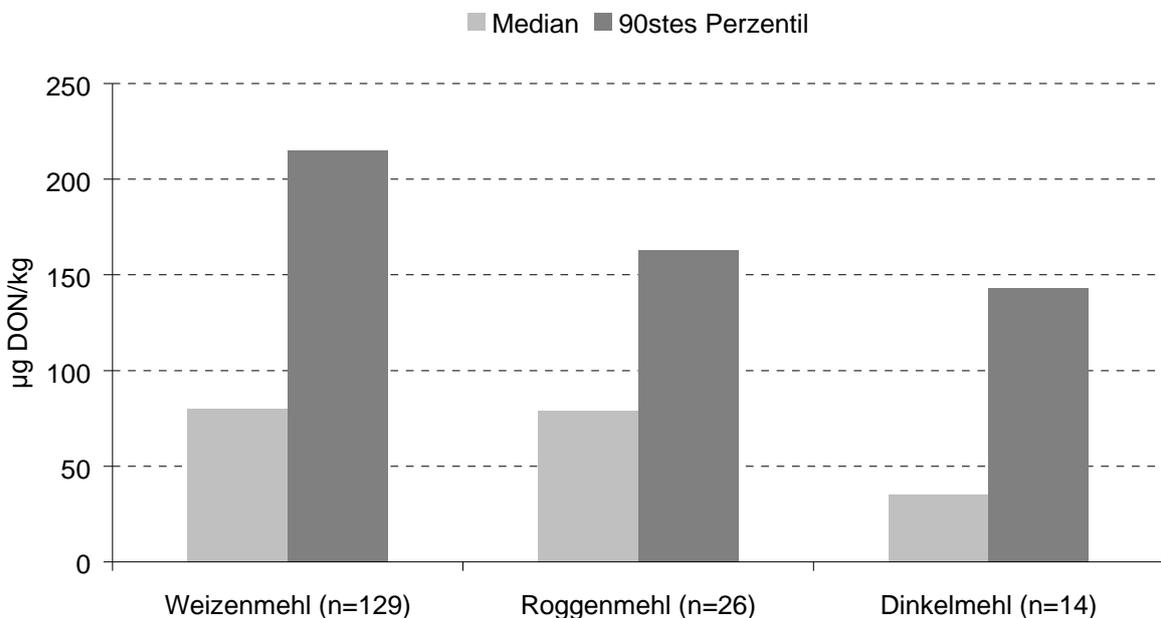
Die Untersuchung von Speisegetreide (n=26) ergab 50 % DON-positive Proben mit einem Median von 25 µg/kg und einem 90sten Perzentil von 176 µg/kg. Hierbei wiesen Dinkelkörner die niedrigste DON-Belastung mit einem Median von 7 µg/kg und einem 90sten Perzentil von 27 µg/kg auf. In Körnermais (Speisegetreide) wurde zwar der DON-Maximalwert innerhalb dieser Produktgruppe gefunden (483 µg DON/kg), doch mit einem Median von 28 µg/kg und einem 90sten Perzentil von 223 µg/kg lagen die Werte noch unter den DON-Gehalten in Getreidemischungen die einen Median von 172 µg/kg und ein 90stes Perzentil von 330 µg/kg aufwiesen. Alle ermittelten DON-Werte lagen aber deutlich unter der deutschen Höchstmenge von 500 µg DON/kg.

In der Gruppe der Getreidemehle waren 88 % der untersuchten 180 Proben, die sich in Weizenmehle, Roggenmehle, Dinkelmehle und sonstige Mehle unterteilten, DON-positiv mit einem Median von 79 µg/kg und einem 90sten Perzentil von 216 µg/kg (Tabelle 50). Unterschiede zwischen Weizen- und Roggenmehlen zeigten sich weniger im Median, sondern im 90sten Perzentil, das für Weizenmehl bei 215 µg/kg und für Roggenmehl bei 163 µg/kg lag. Dinkelmehle waren im Gegensatz dazu weniger belastet, wiesen aber auch Maximalwerte von 253 µg/kg auf (Abbildung 18). Es war bei allen Mehlarnten ersichtlich, dass vor allem Vollkornmehle eine höhere Belastung aufwiesen, was sich im Median und dem 90sten Perzentil zeigte. Abnehmende DON-Belastungen zeigten sich in der Reihenfolge Weizen > Roggen > Dinkel. Die Höchstgrenze von 500 µg DON/kg wurde aber in keinem Fall erreicht.

Tabelle 50: DON-Belastung in Getreidemehlen

Probenart	ZEBS-CODE	n	n pos	% pos	µg/kg				
					MW	Med	Max	Min	90 P
Mehle gesamt	16 xxxx	180	159	88	103	79	487	5	216
Roggenmehl gesamt		26	25	96	84	79	216	25	163
Type 997	160103	13	13	100	71	58	167	34	111
Type 1150	160104	8	7	88	102	83	216	25	200
Vollkorn	160108	5	5	100	89	88	158	50	132
Weizenmehl gesamt		129	115	89	106	80	440	5	215
Type 405	160112	75	66	88	88	55	440	5	187
Type 550	160113	16	13	81	89	74	205	5	179
Type 1050	160116	16	14	88	132	107	396	20	254
Vollkorn	160120	22	22	100	160	145	411	48	234
Dinkelmehl gesamt		14	10	71	70	35	253	7	143
Type 630 + 1050	160131/...33	5	2	40	62	18	253	7	162
Vollkorn	160134	9	8	89	75	68	150	18	132
andere Mehle	160126/...28	3	2	67	30	25	57	7	51
Brotbackmischungen	161x	8	8	100	210	165	487	65	385

MW: Mittelwert; Max: Maximalwert; pos: positiv; Med: Median; Min: Minimalwert; 90 P: 90stes Perzentil

**Abbildung 18:** Vorkommen von DON in Mehl

In Getreideerzeugnissen (n=66) zeigte sich ein ähnliches Bild mit einer DON-Vorkommenshäufigkeit in Proben von 31 %. Der Median lag bei 25 µg/kg und einem 90sten Perzentil von 197 µg/kg. Am höchsten belastet war hierbei Weizenkleie, mit einem Median von 132 µg/kg und einem 90sten Perzentil von 304 µg/kg. Trotz eines niedrigen Median von 54 µg/kg lag das 90ste Perzentil bei Weizengrieß bei 427 µg/kg, was auf einzelne Maximalwerte von bis zu 643 µg/kg zurückzuführen war. Der hohe Wert für das 90ste Perzentil in der Gruppe der „Anderen Grieße“ ist auf den hohen Anteil von Maisgrießproben zurückzuführen, da auch Mais teilweise hoch mit DON belastet ist (USLEBER & MÄRTLBAUER, 1998) (Abbildung 19). Auch in Getreideerzeugnissen war eine höhere Belastung in reinen Weizenprodukten zu erkennen, mit sinkendem Weizenanteil im Erzeugnis sank auch der DON-Gehalt. In dieser Produktgruppe wurde mit einzelnen Maximalwerten von z.B. 643 µg/kg die Höchstmenge von 500 µg/kg deutlich überschritten.

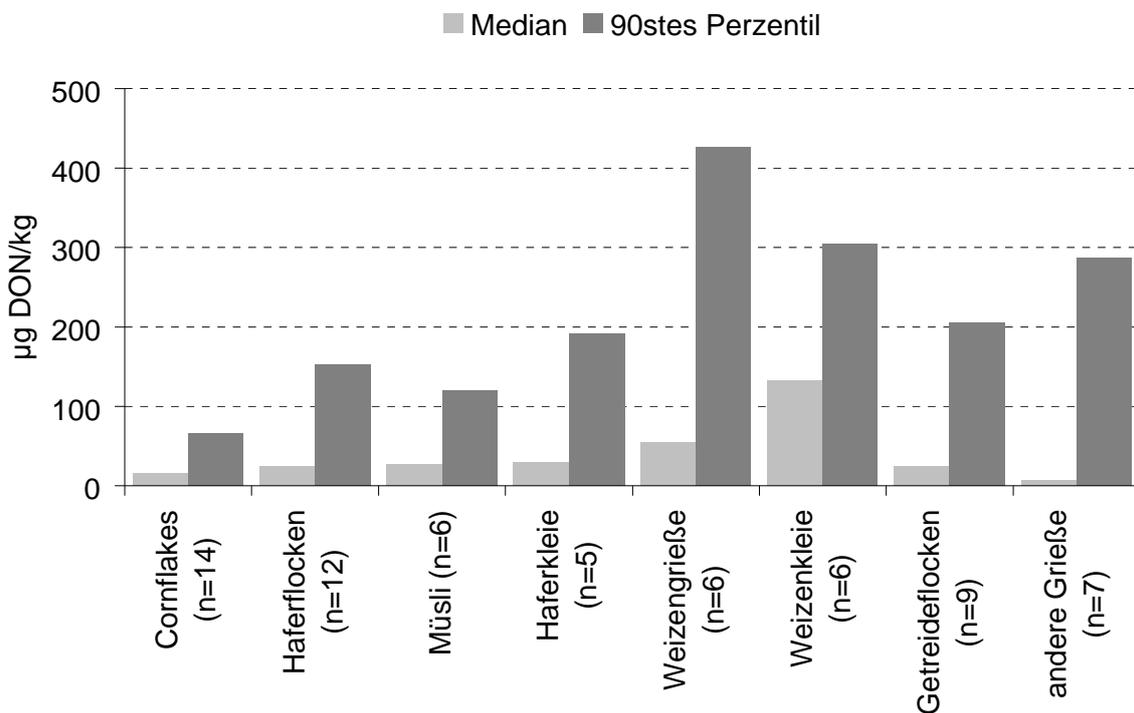


Abbildung 19: Vorkommen von DON in verschiedenen Getreideerzeugnissen

Bei einem Vergleich der DON-Belastung über den Untersuchungszeitraum von 3 Jahren war ersichtlich, dass es tendenziell zu einer Abnahme der Belastung in Bezug auf Median und

90stes Perzentil ab 2002 kam (Abbildung 20). Einzelne Maximalwerte erreichten oder überschritten den Höchstwert von 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Getreidegrieß 648 $\mu\text{g}/\text{kg}$, Maisgrieß 629 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

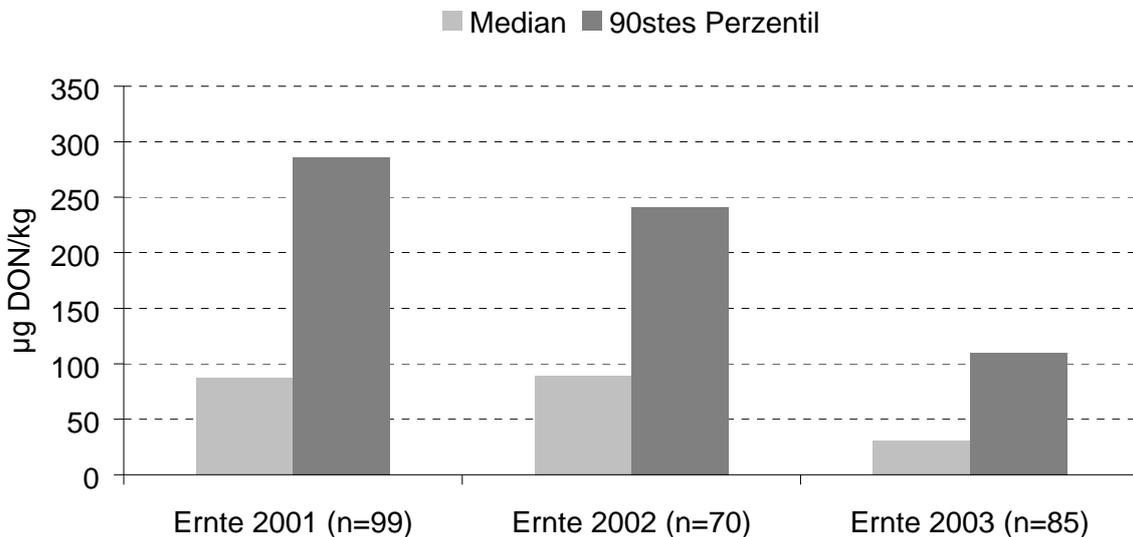


Abbildung 20: DON-Belastung in Getreidemehlen und Getreideerzeugnissen über den Zeitraum von drei Erntejahren

Tendenziell war auch ein Unterschied in den DON-Gehalten in Produkten aus ökologischer und konventioneller Herstellung zu erkennen, wobei die ökologisch hergestellten Erzeugnisse im Median (54 $\mu\text{g}/\text{kg}$, konventionell: 77 $\mu\text{g}/\text{kg}$) niedriger belastet waren. Auch im Bezug auf das 90ste Perzentil war eine höhere Belastung konventionell hergestellter Erzeugnisse ersichtlich (226 $\mu\text{g}/\text{kg}$, ökologisch: 177 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (Abbildung 21).

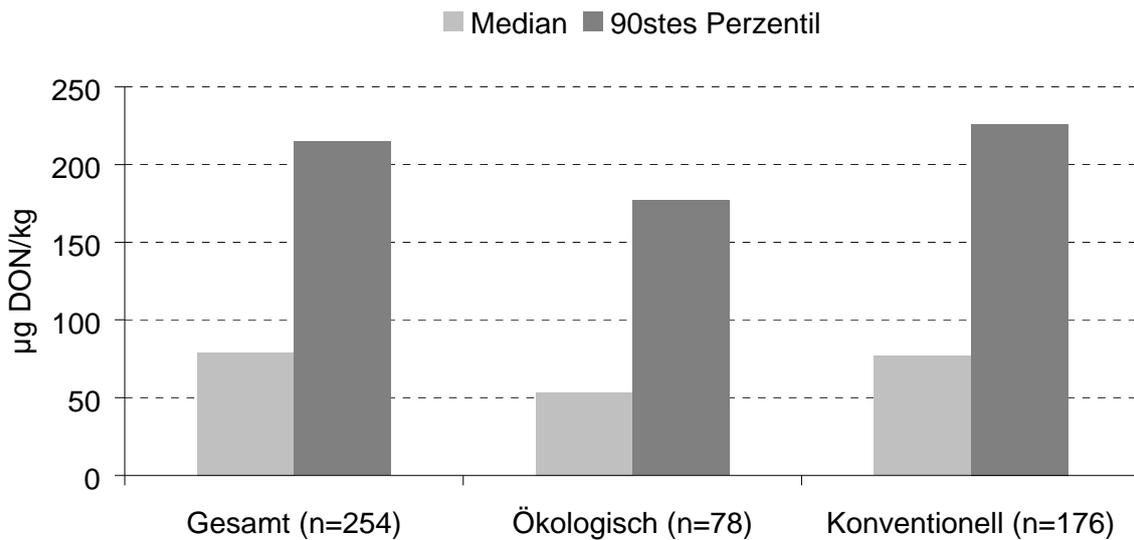


Abbildung 21: Vergleich der DON-Gehalte in Getreidemehlen und Getreideerzeugnissen aus ökologischer bzw. konventioneller Produktionsweise

Brot und Brötchen

In der Gruppe der Brote und Brötchen wurde ebenfalls eine Unterteilung nach ZEBS-Code vorgenommen. Aufgrund geringer Probenzahlen wurden einzelne Gruppen zur Auswertung zusammengefasst. Wie in der Tabelle 51 ersichtlich wird, waren alle Brotsorten zu fast 100 % mit DON belastet, allerdings wurde nur in einzelnen Proben eine Überschreitung der Höchstmenge von 350 µg DON/kg festgestellt. Im Bezug auf Median und 90stes Perzentil lagen aber alle Gruppen unter der Höchstmenge. Es zeigte sich tendenziell eine höhere Belastung in den überwiegend aus Weizen hergestellten Erzeugnissen, mit sinkendem Weizenanteil reduzierten sich die festgestellten DON-Gehalte, wie beispielsweise am Medianwert für Weizenbrot (76 µg/kg) bzw. für Roggenbrot (39 µg/kg) erkennbar ist.

Brot und Brötchen wurden ausschließlich in den Jahren 2003 und 2004 untersucht. Über diesen Zeitraum hinweg zeigte sich kein deutlicher Unterschied in der DON-Belastung der untersuchten Proben, sowohl im Median (2003: 56 µg/kg, 2004: 62 µg/kg) als auch im 90sten Perzentil (2003: 122 µg/kg, 2004: 133 µg/kg). Aufgrund des geringen Anteils an Brotprodukten aus ökologischer Herstellung konnte hierzu kein Vergleich angestellt werden.

Tabelle 51: DON in Brot und Brötchen

Probenart	ZEBBS-CODE	n		%		µg/kg			
		n	pos	pos	MW	Med	Max	Min	90 P
Brot/Brötchen gesamt		161	157	98	68	58	375	7	163
Roggenbrot	170200	9	9	100	36	39	63	7	62
Roggenvollkornbrot/Roggenschrotmischbrot	170204/ 307	4	4	100	74	63	122	48	109
Roggenmischbrot	170300/ 305	28	28	100	59	58	88	11	86
Roggenbrötchen	171501	20	20	100	70	58	178	24	136
Weizenbrot/ Weizentostbrot	170101/ 400	19	19	100	92	76	309	23	159
Weizenvollkornbrot	170106	3	3	100	55	65	86	15	82
Weizenmischbrot	170301	11	11	100	61	51	105	10	95
Weizenbrötchen	171101	11	11	100	116	70	375	20	361
Mehrkornbrot	170620	5	5	100	43	50	57	19	55
Mehrkornbrötchen	171802	12	12	100	60	57	110	20	98
Vollkornbrötchen	171803	15	15	100	86	72	222	17	165
Sonnenblumenkernbrot	170627	5	5	100	62	53	88	48	83
Spezialbrot	170702/ 708/ 800/ 808	11	8	73	66	30	282	5	144
Sonstige Brote	170609/ 170629	5	4	80	42	38	76	12	68
andere Brötchen		3	3	100	105	142	155	18	152

MW: Mittelwert; Max: Maximalwert; Pos: positiv; Med: Median; Min: Minimalwert; 90 P: 90stes Perzentil

Teigwaren

Bei den untersuchten Teigwaren ließ sich in Teigwaren aus Hart- oder Weichweizen ohne Ei, Eierteigwaren sowie Vollkorn-Teigwaren, sowie in Teigwaren aus anderen Getreiden (Dinkel, Soja) unterscheiden. Extra bewertet wurde die Gruppe der vorgebrühten Teigwaren (Tabelle 52). DON war in allen Gruppen nachweisbar. Gering belastet waren Teigwaren aus Dinkel, mit einem Median von 15 µg/kg und einem 90sten Perzentil von 108 µg/kg. Die hohe DON-Belastung von Teigwaren aus Weizen ist auf die Verwendung von Hartweizen (Durum) zurückzuführen, der für einen Befall mit *F. graminearum* relativ anfällig ist. Maximalwerte von über 3000 µg DON/kg Teigware wurden in der Gruppe der Vollkornteigwaren gefunden. In der deutschen Mykotoxin-Höchstmengen-VO wurden Hartweizenerzeugnisse nicht geregelt.

Tabelle 52: DON-Belastung in Teigwaren

Probenart	ZEBS-CODE	n	n pos	% pos	µg/kg				
					MW	Med	Max	Min	90 P
Teigwaren gesamt		255	236	93	246	177	3214	5	543
eifreie Teigwaren	220100	113	101	89	198	141	1320	5	491
Teigwaren mit Ei	220200/ 300	108	108	100	309	249	1161	29	623
Vollkornteigwaren	220503	20	17	85	304	108	3214	7	460
vorgebrühte Teigwaren	220507	9	8	89	77	35	342	11	134
Dinkel-Teigwaren	220500	5	2	40	50	15	130	15	108

MW: Mittelwert; Max: Maximalwert; Pos: positiv; Med: Median; Min: Minimalwert; 90 P: 90stes Perzentil

Über den Zeitraum der 3 Erntejahre gesehen, war eine Abnahme der DON-Belastung in Teigwaren zu beobachten (Abbildung 22). Im Vergleich zu 2001 (Median: 249 µg/kg, 90stes Perzentil: 909 µg/kg) waren 2003 die DON-Gehalte im Median (100 µg/kg) und im 90sten Perzentil (371 µg/kg) um mehr als die Hälfte niedriger.

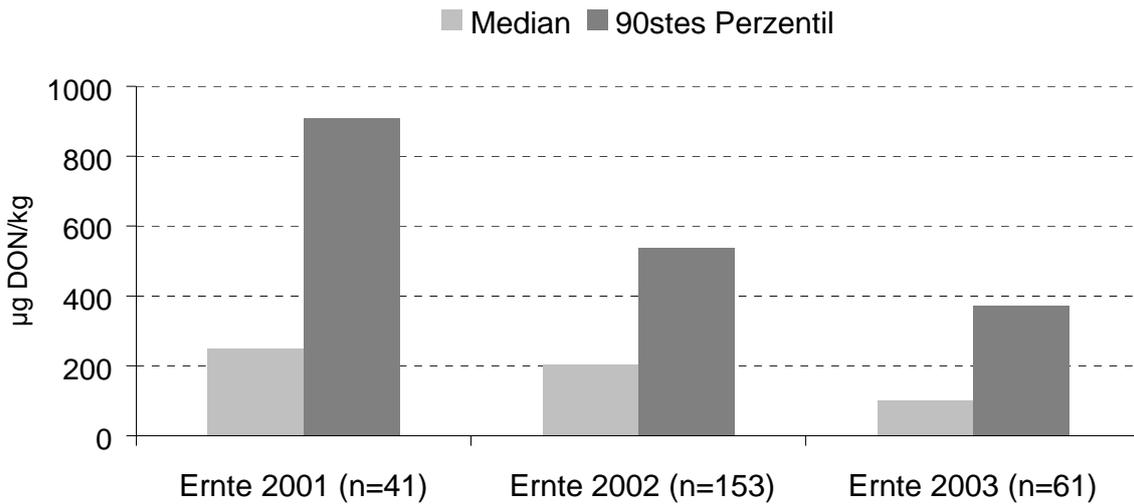


Abbildung 22: Vergleich der DON-Belastung in Teigwaren über den Zeitraum von drei Erntejahren

Beim Vergleich von Teigwaren auf ökologischer und konventioneller Basis wurde eine deutlich höhere Belastung der konventionell hergestellten Erzeugnisse festgestellt, sowohl im Median (konventionell: 228 µg/kg, ökologisch: 76 µg/kg) als auch im 90sten Perzentil (konventionell: 567 µg/kg, ökologisch: 248 µg/kg) (Abbildung 23).

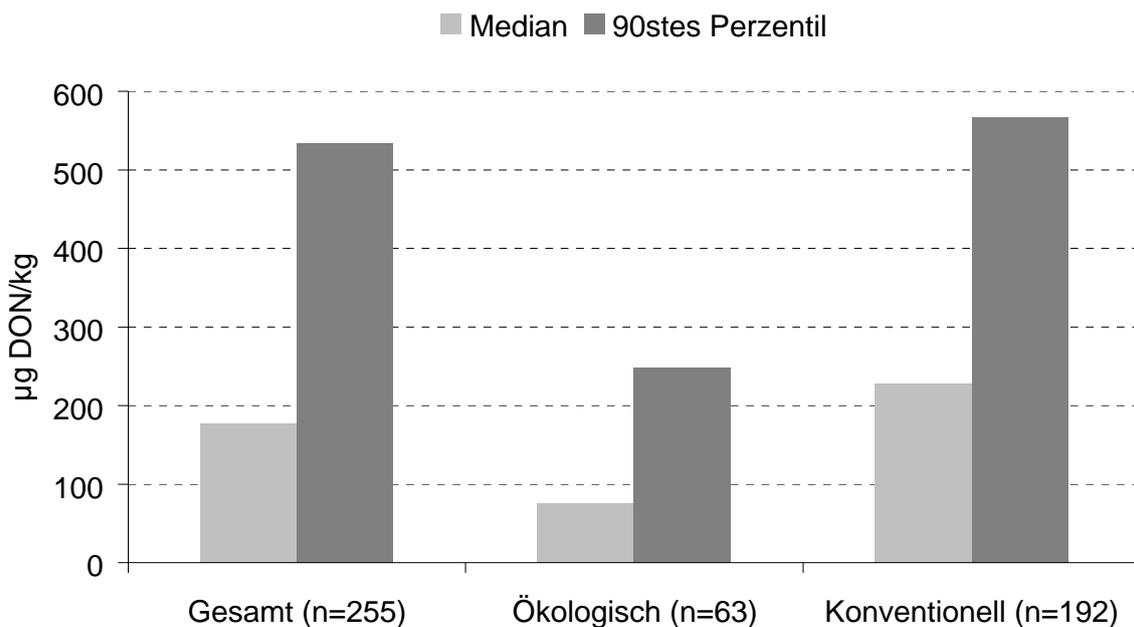


Abbildung 23: Vergleich der DON-Gehalte in Teigwaren aus ökologischer bzw. konventioneller Produktionsweise

Säuglings- und Kleinkindernahrung auf Getreidebasis

Bei der Untersuchung von Säuglings- und Kleinkindernahrung auf Getreidebasis wurden in 61 % aller Proben positive Ergebnisse erhalten, der Median lag mit 33 µg/kg deutlich unterhalb der Höchstmenge (100 µg/kg) nach Mykotoxin-Höchstmengen VO, das 90ste Perzentil mit 99 µg/kg aber sehr dicht dran (Tabelle 53). In Vollkornprodukten lag der Median mit 21 µg/kg deutlich unterhalb der vorgeschriebenen 100 µg/kg, überschritt aber diese Höchstmenge im 90sten Perzentil mit 150 µg/kg deutlich. Einzelne Maximalwerte überschritten den Höchstwert bis um das Doppelte (Vollkornprodukt: 220 µg/kg, Brei 198 µg/kg).

Tabelle 53: DON in Säuglings- und Kleinkindernahrung auf Getreidebasis

Probenart	ZEBS-CODE	n	n pos	% pos	µg/kg				
					MW	Med	Max	Min	90 P
Säuglingsnahrung gesamt		231	141	61	41	33	220	5	99
Milchfertigbrei mit Obst	480103	26	22	85	53	49	110	15	88
Milchfertigbrei mit sonstigen Zusätzen	480104	139	60	43	37	22	198	5	90
Hafer- und Grießprodukte	480202/ 203	9	5	56	30	32	87	7	53
Mehrkornprodukte	480204	11	9	82	47	42	99	7	85
Getreidebrei	480206	28	16	57	35	24	147	5	78
Backwaren (Kekse)	480207	37	21	57	40	34	130	5	98
Vollkornprodukte	480208	15	8	53	58	21	220	7	150

MW: Mittelwert; Max: Maximalwert; Pos: positiv; Med: Median; Min: Minimalwert; 90 P: 90stes Perzentil

Über den Untersuchungszeitraum von 3 Jahren gesehen, zeigte sich eine Abnahme der Toxinbelastung von 2001 zu 2003 im Median und dem 90sten Perzentil (Abbildung 24).

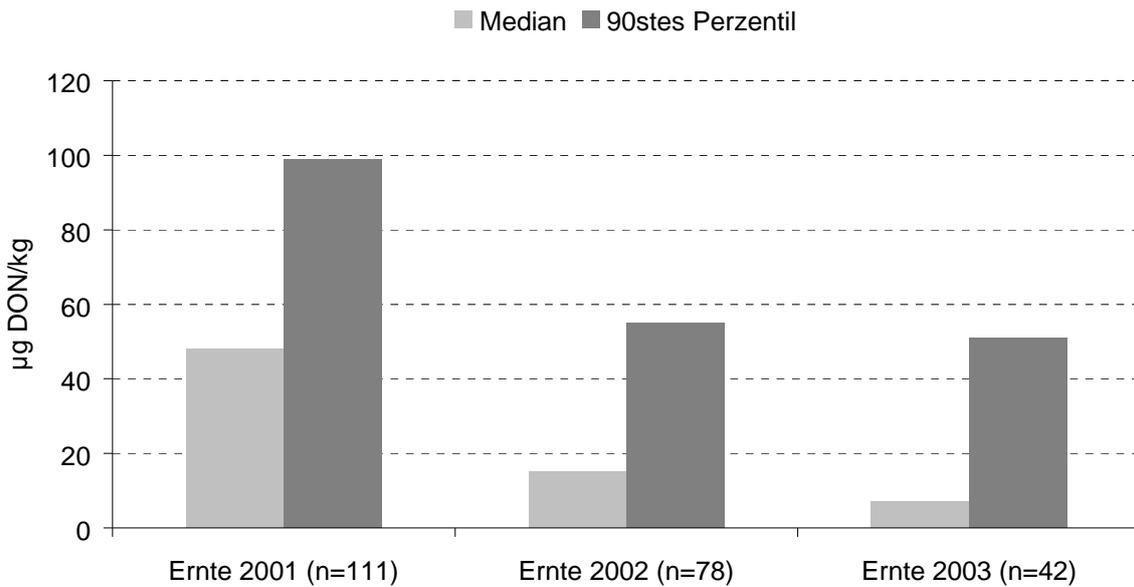


Abbildung 24: DON in Säuglings- und Kleinkindernahrung auf Getreidebasis über den Zeitraum von drei Erntejahren

Zwischen ökologisch und konventionell hergestellten Erzeugnissen zeigte sich im Median eine höhere Belastung der konventionell hergestellten Erzeugnisse. Allerdings waren auch in ökologisch hergestellten Erzeugnissen höher mit DON belastete Proben vertreten (Abbildung 25). Hier lag das 90ste Perzentil mit einem Wert von 110 µg/kg sogar über der festgesetzten Höchstmenge von 100 µg/kg.

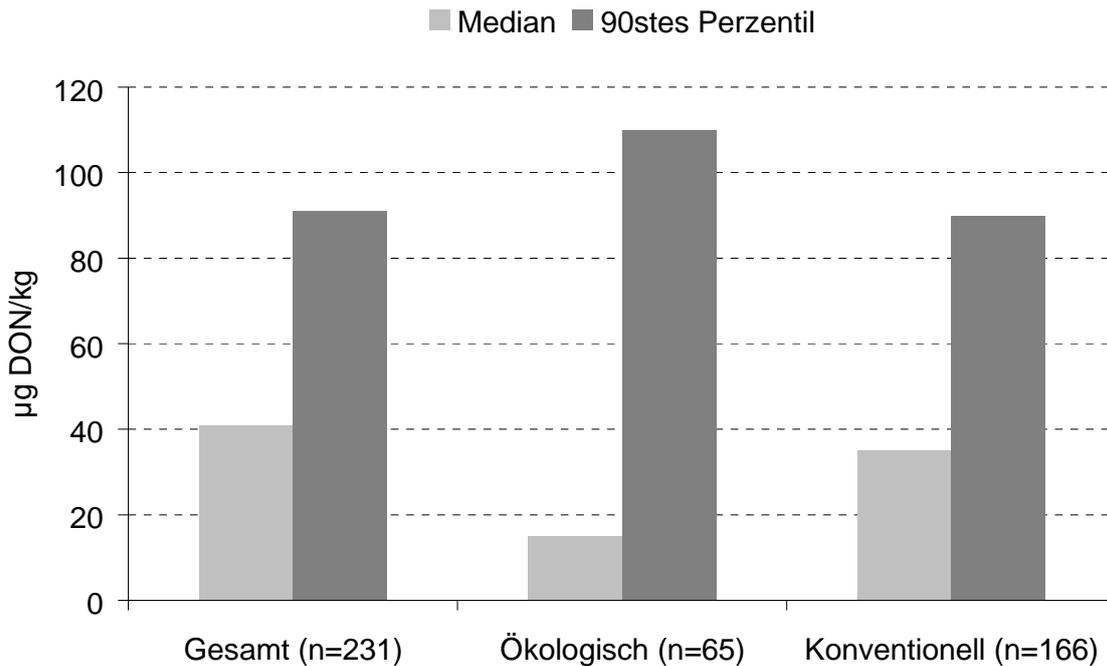


Abbildung 25: Vergleich der DON-Belastung zwischen ökologisch und konventionell hergestellter Säuglings- und Kleinkindernahrung

Bier

Es wurde in fast allen untersuchten Bierproben DON (95 %) nachgewiesen, allerdings in zumeist niedrigen Konzentrationen. Der Median lag in verschiedenen Biersorten zwischen 4,4 und 13,7 µg/l, das 90ste Perzentil zwischen 5,2 und 21,5 µg/l. Der Maximalwert betrug 35 µg/l in einem Schwarzbier. Am höchsten belastet waren dabei in Bezug auf den Median die Weizenbiere, im 90sten Perzentil die Schwarzbiere (Tabelle 54). Am niedrigsten belastet waren alkoholfreie Biere und sogenannte „Light“-biere. Höchstmengen für DON in Bier existieren derzeit nicht.

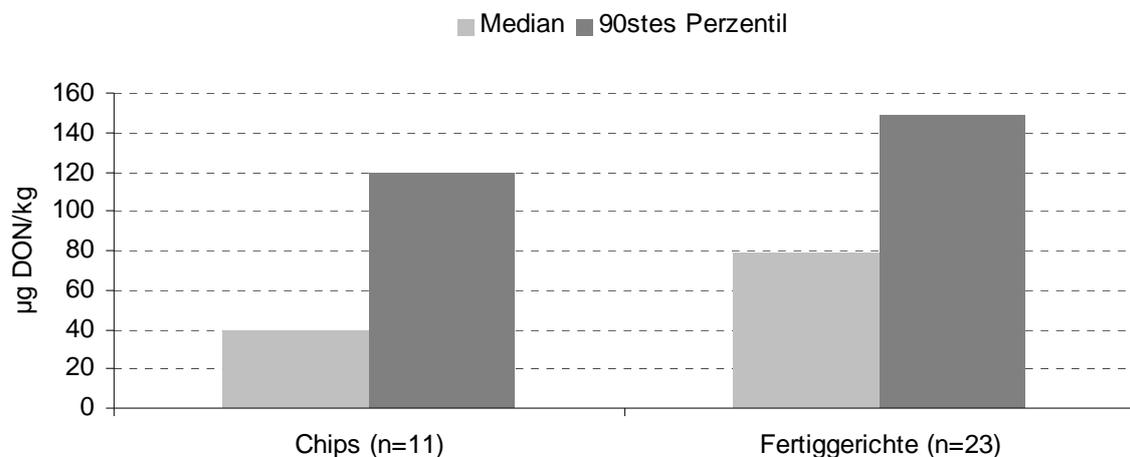
Tabelle 54: DON-Belastung in Bier

Probenart	ZEBS-CODE	n	n pos	% pos	µg/L				
					MW	Med	Max	Min	90 P
Bier gesamt		96	91	95	8,2	6,0	34,5	1,0	15,4
Weizenbier	360502	8	6	75	10,1	13,7	15,4	1,0	15,3
Hefeweizen	360513	17	17	100	9,9	7,6	3,0	2,0	18,4
Schwarzbier	360602	6	6	100	10,2	5,0	35,0	4,0	21,5
Pils	360603	44	43	98	8,5	5,7	31,0	1,0	16,8
Export	360604	9	7	78	6,3	6,4	10,4	1,0	10,1
Alkoholfrei/Lightbier	360607/608	12	12	100	4,3	4,4	8,1	2,6	5,2

MW: Mittelwert; Max: Maximalwert; Pos: positiv; Med: Median; Min: Minimalwert; 90 P: 90stes Perzentil

Knabbererzeugnisse (Chips) sowie Fertiggerichte

In der Gruppe der Chips waren 55 % der 11 untersuchten Proben DON-positiv mit einem Median von 39 µg/kg und einem 90sten Perzentil von 120 µg/kg sowie einem Maximalwert von 183 µg/kg. Diese Belastung ist durch die Verwendung von Mais zur Herstellung der Chips zu erklären, der im Allgemeinen höher mit DON belastet ist (USLEBER & MÄRTLBAUER, 1998). Bei den untersuchten getreidehaltigen Fertiggerichten waren mit einer Vorkommenshäufigkeit von 91 % fast alle Proben mit DON belastet. Hier betrug der Median 79 µg/kg und das 90ste Perzentil 149 µg/kg (Abbildung 26).

**Abbildung 26:** Belastung von Chips und Fertiggerichten mit DON

Konsummilch

Eine Untersuchung von 32 Konsummilchproben aus dem Einzelhandel mittels HPLC ergab für keine Probe Hinweise auf eine Belastung mit DON bzw. den Metaboliten DOM-1.

4.2.2 ZEA

Die Belastung der Lebensmittel mit ZEA war mit einer Nachweishäufigkeit über alle untersuchten Lebensmittel hinweg von 14 % gering. Die ZEA-Gehalte in positiven Proben bewegten sich im Median bei ca. 7 µg/kg, das 90ste Perzentil lag bei maximal 13 µg/kg, somit insgesamt nahe an der Nachweisgrenze (6 µg/kg). Eine Ausnahme bildeten hierbei maishaltige Chips mit einem 90sten Perzentil von 35 µg/kg und Maximalwerten um 41 µg/kg. In der Gruppe der Speisegetreide und Getreidemehle war zwar nahezu die Hälfte aller untersuchten Proben mit ZEA belastet, aber auch hier lagen die Werte nahe der Nachweisgrenze. Einzelne Maximalwerte waren in Kleie- (19 µg/kg) und Maisprodukten (Maisgrieß: 23 µg/kg) zu finden. In Säuglings- und Kleinkindernahrungsmitteln auf Getreidebasis wurde ZEA nur in 4 % der Proben nachgewiesen. Die gemessenen Maximalwerte für ZEA in diesen Erzeugnissen lagen bei 9 µg/kg. Abbildung 27 zeigt die Verteilung der ZEA-positiven Proben in den einzelnen Produktgruppen.

Bei der Untersuchung von 105 Konsummilchproben aus dem Einzelhandel mittels EIA wurde in keiner Probe ZEA oder seine Analoga in Konzentrationen über der Nachweisgrenze gefunden. Durch die Vorbehandlung mit Glucuronidase/Sulfatase konnten auch konjugierte Metaboliten erfasst werden. Eine Nachuntersuchung von 32 Proben mittels HPLC ergab ebenfalls keine Hinweise auf eine Kontamination von Konsummilch mit ZEA.

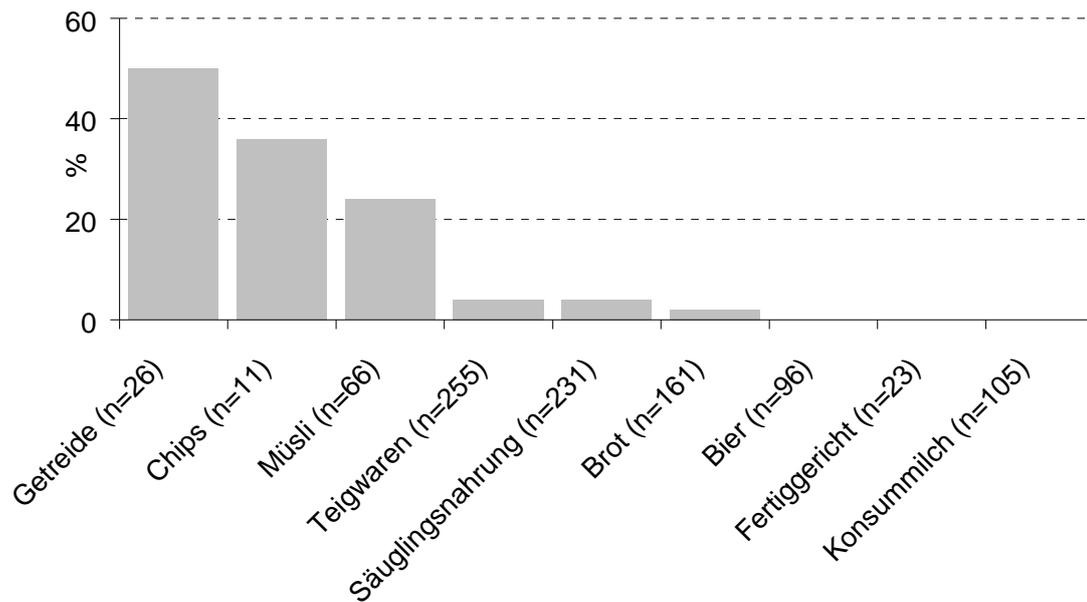


Abbildung 27: Prozentualer Anteil ZEA-positiver Proben in verschiedenen Produktgruppen

4.2.3. Zusammenfassende Darstellung der Belastung von Lebensmitteln mit DON und ZEA

Über alle untersuchten Produktgruppen hinweg wurde eine hohe Nachweishäufigkeit von DON (81 %), für ZEA dagegen eine niedrige Vorkommenshäufigkeit (14 %) festgestellt. Für beide Toxine lagen jedoch in der überwiegenden Mehrzahl die gefundenen Gehalte unterhalb der festgesetzten Höchstmengen. Relativ hoch mit DON belastet waren die getreidehaltigen Säuglingsnahrungsmittel. Hier lag der Median bei ca. 50 % der Höchstmenge, das 90ste Perzentil überschritt sogar die Höchstmenge. Auch Erzeugnisse aus Hartweizen (Teigwaren, Grieß) sowie Kleieprodukte waren höher mit DON belastet. Bei der Belastung der Lebensmittel mit ZEA standen vor allem aus Mais hergestellte Erzeugnisse im Vordergrund, wobei jedoch die Höchstmengen für ZEA nicht erreicht wurden.

Zusammenfassend sind in den Tabellen 55 und 56 die Ergebnisse zu den Untersuchungen von Lebensmitteln auf DON und ZEA dargestellt.

Tabelle 55: Vorkommen von DON in Lebensmitteln

Probenart	ZEBs- CODE	n	n pos	% pos	µg/kg				
					MW	Med	Max	Min	90stes Perz
Untersuchte Proben gesamt		1086	857	79					
Konsummilch	01...	32	0	0	0	0	0	0	0
Speisegetreide	15...	26	13	50	68	25	483	7	176
Getreideprodukte, Backwaren, Müsliprodukte	16...	246	190	77	96	65	643	5	213
Brot, Kleingebäck	17...	161	157	98	68	58	375	5	163
Chips und ähnliche Knabbererzeugnisse	18...	11	6	55	54	39	183	7	120
Teigwaren	22...	255	236	93	246	177	3214	5	543
Bier, bierähnliche Getränke und Rohstoffe für die Bierherstellung	36...	96	91	95	8	6	35	1	15
Säuglings- und Kleinkindernahrung (getreidehaltig)	48...	231	141	61	41	33	220	5	99
Fertiggerichte (getreidehaltig)	50...	23	22	96	82	79	223	7	149
Sonstige		5	1	20	35	25	93	5	66

MW: Mittelwert; Med: Median; Max: Maximalwert; Min: Minimalwert; Pos: positiv; 90stes Perz: 90stes Perzentil

Tabelle 56: Vorkommen von ZEA in Lebensmitteln

Probenart	ZEBs- CODE	n	n pos	% pos	µg/kg				
					MW	Med	Max	Min	90stes Perz
Untersuchte Proben gesamt		1159	152	13					
Konsummilch	01...	105	0	0	0	0	0	0	0
Speisegetreide	15...	26	14	54	7	7	14	3	12
Getreideprodukte, Backwaren, Müsliprodukte	16...	246	108	44	6,5	3,0	29,8	0,1	13,4
Brot, Kleingebäck	17...	161	3	2	2,0	2,0	9,0	2,0	2,0
Chips und ähnliche Knabbererzeugnisse	18...	11	4	36	13,2	3,0	41	3,0	35,0
Teigwaren	22...	255	11	4	3,5	3,0	41	3,0	3,0
Bier, bierähnliche Getränke und Rohstoffe für die Bierherstellung	36...	96	0	0					
Säuglings- und Kleinkindernahrung (getreidehaltig)	48...	231	10	4	2,9	3,0	8,8	0,1	3,0
Fertiggerichte (getreidehaltig)	50...	23	0	0					
Sonstige		5	2	40	7,3	3,0	14	3,0	13,8

MW: Mittelwert; Med: Median; Max: Maximalwert; Min: Minimalwert; Pos: positiv; 90stes Perz: 90stes Perzentil

4.3 Abschätzung der täglichen Aufnahme von DON

Auf der Basis der ermittelten Belastung wichtiger Lebensmittelgruppen mit DON wurde eine Abschätzung der hieraus resultierenden täglichen DON-Aufnahme durch den deutschen Verbraucher vorgenommen. Tabelle 57 zeigt die Lebensmittelbelastungen mit DON, die dieser Berechnung zu Grunde lagen. Für die Berechnung wurde jeweils der Medianwert (mean case) bzw. das 90ste Perzentil (bad case) herangezogen. Die für diese Lebensmittel relevanten Verzehrdaten sind unter 3.2.8 aufgeführt.

Tabelle 57: DON-Gehalte verschiedener Lebensmittel als Basis für die Abschätzung der täglichen Aufnahme des deutschen Verbrauchers

Lebensmittel	n	Mittelwert (µg/kg)	Median (µg/kg)	90stes Perzentil (µg/kg)
Weißbrot/Baguette	19	92	76	159
Mischbrot	39	59	57	87
Roggenbrötchen	20	70	58	136
Weizenbrötchen	11	116	70	361
Mehrkornbrötchen	12	60	57	98
Vollkornbrötchen	15	86	72	165
Haferflocken	19	42	18	98
Müsli	8	40	16	93
Sonstige Frühstückszerealien	40	61	25	162
Vollkornnudeln	20	304	108	460
Nudeln ohne Füllung	224	248	190	555
Grießbrei	10	118	42	255
Knabbergebäck	11	54	39	120
Weißbier	17	9,9	7,6	18,4
Pils	44	8,5	5,7	16,8
Alkoholfreies Bier	12	4,3	4,4	5,2

Die errechneten Toxinaufnahmen für DON im 4WR-Modell für den „mean case“ und den „bad case“ sind in den Tabellen 58 und 59 zusammengefasst. Aus diesen Daten wird deutlich, dass die mittlere DON-Aufnahme Erwachsener bei rund 0,2 µg/kg Körpergewicht und Tag und damit bei 20 % des TDI lag. Im „bad-case“-Szenario verdreifachte sich die Toxinaufnahme auf rund 0,6 µg/kg Körpergewicht und Tag und lag damit nah am TDI.

Tabelle 58: Übersicht über die DON-Aufnahme Erwachsener in $\mu\text{g}/\text{kg}$ KGW pro Tag

	Geschlecht			Weiblich			Männlich		
	Gesamt	Weiblich	Männlich	14-24 Jahre	25-50 Jahre	> 50 Jahre	14-24 Jahre	25-50 Jahre	> 50 Jahre
Mean Case	0,21	0,22	0,24	0,19	0,23	0,21	0,42	0,23	0,21
Bad Case	0,64	0,68	0,70	0,58	0,72	0,60	1,26	0,67	0,65

Tabelle 59: Übersicht über die DON-Aufnahme von Kindern in $\mu\text{g}/\text{kg}$ KGW pro Tag

	Weiblich			Männlich		
	4-6 Jahre	7-9 Jahre	10-14 Jahre	4-6 Jahre	7-9 Jahre	10-14 Jahre
Mean Case	0,69	0,43	0,33	0,72	0,58	0,38
Bad Case	2,14	1,31	0,98	2,19	1,73	1,12

Aufgrund des niedrigen Körpergewichts bei relativ hohem Verzehr DON-belasteter Lebensmittel lag die DON-Aufnahme bei Kindern wesentlich höher. In der Altersgruppe 4-6 Jahre lag bereits die mittlere Tagesaufnahme nahe am TDI-Wert. In den Altersgruppen unter 24 Jahren lag die Ausschöpfung des TDI im Mittel zwischen 20 % und 70 %. Im „bad case“-Szenario ergab sich eine DON-Aufnahme aller Altersstufen unter 14 Jahren über dem TDI. Die Ausschöpfung des TDI (Mittelwert männlich und weiblich) lag zwischen 92 % (14-24 Jahre) und 217 % (4-6 Jahre).

In allen Altersgruppen wurde die DON-Aufnahme über den Verzehr relativ weniger Lebensmittelgruppen bestimmt, insbesondere durch Brot, Brötchen und Teigwaren. Allein diese drei Lebensmittel hatten für alle Verbrauchergruppen einen Anteil an der DON-Gesamtaufnahme von über 50 %.

5 DISKUSSION

Fusarientoxine in Getreide stellen ein weltweites Problem dar, sowohl aus gesundheitlicher als auch aus wirtschaftlicher Sicht. In Deutschland sind DON und ZEA von besonderer Bedeutung. Um einer gesundheitlichen Gefährdung des Verbrauchers vorzubeugen, wurden in Deutschland im Februar 2004 Höchstmengen für DON und ZEA (Tabelle 19) in einer Reihe von Lebensmitteln festgelegt (Mykotoxin-Höchstmengen VO). Diese wurde zwar vor kurzem durch europäische Höchstmengen nach Verordnung (EG) Nr. 466/2001 ersetzt (Tabelle 20), mit teilweise wesentlich höheren Grenzwerten. Da in der Zeit der experimentellen Arbeiten zu dieser Arbeit jedoch allein die deutschen Höchstmengen für die Lebensmittelindustrie verbindlich waren, wird im Folgenden bei der Diskussion der Ergebnisse vor allem Bezug auf die nationalen Regelungen genommen.

Zur Kontrolle der Höchstmengen stehen für die Analyse eine Reihe von Methoden zur Verfügung. Chromatographische Verfahren, insbesondere LC-MS/MS oder GC-MS (BASSEN & THIELERT, 2000; BOCKHORN et al., 2001; SCHMIDT & THIELERT, 2000; MAJERUS et al., 2002; SCHOLLENBERGER et al., 2002a/b) sind für einen hohen Probendurchsatz derzeit noch wenig geeignet. Seit einigen Jahren werden enzymimmunochemische Verfahren zur Routineuntersuchung von Fusarientoxinen in Getreide eingesetzt (USLEBER & MÄRTLBAUER, 1998; BIRZELE et al., 2000; DÖLL et al., 2000; HORN et al., 2000; TASCHAN et al., 2000; USLEBER et al., 2000). Die Untersuchung komplexerer Probenmatrices wie z.B. Säuglingsnahrung wurde für diese Verfahren bisher nicht beschrieben, wissenschaftliche Arbeiten im Themenbereich dieser Arbeit befassten sich zumeist mit dem Nachweis von DON und ZEA in einfachen Matrices wie Getreide oder Getreidemehlen. Es bestand daher die Notwendigkeit, eine praktikable EIA-Methode, auch für komplexere Matrices, zu etablieren, mit der eine große Probenanzahl untersucht werden konnte, um einen Überblick über die Belastung von Lebensmitteln des deutschen Marktes mit den Mykotoxinen DON und ZEA zu erhalten. Diese Arbeiten standen im Kontext eines vom Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz geförderten Verbundforschungsprojektes.

5.1 Anwendbarkeit des eingesetzten EIA-Testverfahrens für DON

Der in dieser Arbeit validierte und zur Untersuchung eingesetzte Enzymimmuntest für DON zeigte eine ausreichende Sensitivität und Spezifität für den Nachweis dieses Toxins in verschiedenen Lebensmitteln. Die mit dieser Testmethode erreichten Nachweisgrenzen von 15 µg/kg (Speisegetreide, Getreideerzeugnisse) lagen weit unterhalb der Höchstmengen (500 µg/kg), und deutlich unter den in anderen Arbeiten beschriebenen Nachweisgrenzen (DÖLL et al., 2000; HORN et al., 2000). Auch im Hinblick auf tolerierbare Tagesaufnahme für DON und Verzehrsmengen wichtiger Lebensmittel war eine Analytik im relevanten Konzentrationsbereich gegeben. Die Nachweisgrenze in Säuglingsnahrung auf Getreidebasis lag ebenfalls deutlich unter der festgesetzten Höchstmenge von 100 µg/kg (diätetische Lebensmittel und Säuglingsnahrung).

Durch Extraktion der Proben in Methanol/PBS und anschließender Flüssig-Flüssig-Partitionierung in Ethylacetat konnten störende Matrixeinflüsse fast gänzlich eliminiert werden. Dies resultierte gegenüber der Verwendung von ungereinigten Extrakten in einer deutlich verbesserten Nachweisgrenze von 15 µg/kg in festen Matrices und von 2 µg/l in flüssigem Probenmaterial. Die Wiederfindungsraten von künstlich mit DON kontaminierten Proben konnten zudem durch Einsatz der Flüssig-Flüssig-Extraktion als Reinigungsverfahren verbessert werden und erreichten Werte von 80 – 120 %, bei einem mittleren Variationskoeffizienten über alle Lebensmittel hinweg von 18%. Dies ist im Rahmen eines Routineverfahrens als ausreichend anzusehen, erfüllt zudem die Vorgaben der EU-Verordnung (EG) Nr. 401/2006 bezüglich der analytischen Leistungskriterien eines Analyseverfahrens im Konzentrationsbereich von unter 500 µg/kg.

5.2 Methodenvergleich EIA und HPLC für DON

Der Vergleich des EIA für DON mit einer HPLC-Methode für DON zeigte eine ähnliche Sensitivität der HPLC, was auch schon frühere Untersuchungen zeigten (USLEBER & MÄRTLBAUER, 1998). Die Nachweisgrenzen in der HPLC lagen bei 10 µg/kg (Getreide, Getreideerzeugnisse) bzw. bei 2 µg/l (Bier), im EIA bei 15 µg/kg (Getreide, Getreideerzeugnisse) sowie bei 2 µg/l (Bier). Die Übereinstimmung der Ergebnisse für verschiedene Lebensmittelgruppen war generell hervorragend und lag in einem Bereich, der

für Vergleichsuntersuchungen mit identischen Untersuchungsverfahren erzielt werden kann. Bei DON-Gehalten nahe der Nachweisgrenze kam es allerdings im EIA zum Teil zu einer Überschätzung der Gehalte, die EIA-Ergebnisse lagen tendenziell etwas höher als die HPLC-Ergebnisse, was auch in anderen Studien beobachtet werden konnte (USLEBER & MÄRTLBAUER, 1998). Grund hierfür kann die Miterfassung der kreuzreagierenden DON-Analoga durch den gruppenspezifischen Antikörper sein, wie vor allem 3-Acetyldeoxynivalenol mit einer Kreuzreaktion von 630 % im DON-EIA. Allerdings kommen 3-Acetyldeoxynivalenol und 15-Acetyldeoxynivalenol in Getreide typischerweise nur in hoch kontaminierten Proben und in geringen Anteilen von unter 5 % vor, so dass sich die Überschätzung des absoluten DON-Gehaltes in Grenzen hält (GEßLER, 1997). Durch die Verwendung der Flüssig-Flüssig-Partitionierung mit Ethylacetat konnten die Matrixeinflüsse im EIA minimiert werden, so dass kaum falsch positive Ergebnisse erzielt wurden. Wichtig ist die richtige Interpretation der gewonnenen Ergebnisse sowie – insbesondere bei sehr hoch belasteten Proben - eine Überprüfung mit anderen analytischen Nachweisverfahren (z.B. HPLC-UV). Ein wesentlicher Vorteil der EIA-Methodik liegt in der einfachen Probenvorbereitung und dem hohen Probendurchsatz, so dass sich das Untersuchungsverfahren gut als Screeningverfahren eignet.

5.3 Anwendbarkeit des eingesetzten EIA-Testverfahrens für ZEA

Der beschriebene Enzymimmuntest zeigte eine ausreichende Sensitivität und Spezifität für den Nachweis von ZEA in verschiedenen Lebensmitteln. Die Empfindlichkeit des Testsystems lag mit einer Nachweisgrenze von 6 µg/kg deutlich unter den für ähnliche Testsysteme in der Literatur angegebenen Werten von 20 µg/kg (DÖLL, 2000). Vergleichbare Nachweisgrenzen beschrieben USLEBER & MÄRTLBAUER (1998) mit 5 µg/kg. Es wurde somit eine ausreichende Sensitivität erreicht, um die Höchstmenge für ZEA von 50 µg/kg in Getreide bzw. Getreideerzeugnissen und von 20 µg/kg in diätetischen Nahrungsmitteln zu unterschreiten.

Die Wiederfindungsraten in künstlich mit ZEA kontaminierten Proben lagen zwischen 79 % und maximal 130 %, zumeist jedoch im Bereich um 90 %. Es zeigte sich das mit der Extraktion in 84 % Acetonitril/PBS sehr gute Wiederfindungsraten sowie – im Vergleich zu einer Extraktion mit 70 % Methanol/PBS - bessere Variationskoeffizienten für

Mehrfachuntersuchungen erreicht wurden, so dass diese Extraktion als Standardverfahren eingesetzt wurde. Die Reproduzierbarkeit der Gesamtmethode war über alle Lebensmittelgruppen hinweg (Variationskoeffizient 24 %) deutlich besser als die in Verordnung (EG) Nr. 401/2006 aufgeführten Anforderungen für Methoden zur Bestimmung von ZEA (Variationskoeffizient 40 % bei Wiederfindungsraten von 60-120 %).

5.4 Methodenvergleich EIA und HPLC für ZEA

Ein Methodenvergleich zwischen EIA und HPLC für natürlich belastete Lebensmittel war im Vergleich zu DON aufgrund der sehr geringen Zahl deutlich mit ZEA kontaminierter Probenmaterialien nur eingeschränkt möglich. Die wenigen positiven Proben wiesen ZEA-Gehalte nahe der Bestimmungsgrenze des EIA (6 µg/kg) auf. Dieses im Hinblick auf die Toxinbelastung der Lebensmittel sehr erfreuliche Ergebnis war analytisch gesehen problematisch, da in diesem Bereich qualitativ zwar ein sicherer Nachweis gegeben ist, quantitativ jedoch im EIA Überschätzungen der Toxingehalte möglich sind. So waren einige der um 6 µg/kg liegenden Ergebnisse im EIA in der HPLC als <2 µg/kg getestet worden. Im höheren Konzentrationsbereich (>10 µg/kg) dagegen waren die Resultate im EIA und der HPLC sehr gut vergleichbar (Beispiel ZEA in einer „Chipsprobe“: EIA 38 µg/kg, HPLC 41 µg/kg). Grundsätzlich sind höhere Messwerte im EIA im Vergleich zur HPLC möglich, bedingt durch die ausgeprägten Kreuzreaktionen des Testsystems mit allen bekannten ZEA-Analoga. Vor allem α -Zearalenon zeigt eine hohe Kreuzreaktivität von 87 % mit dem gruppenspezifischen Antikörper im ZEA-EIA, aber auch die anderen Verbindungen wiesen erhebliche Kreuzreaktionen auf. Dies ist als charakteristisch für Antikörper gegen ZEA anzusehen, wie auch die Arbeiten anderer Autoren zeigen (LIU et al., 1985; USLEBER und MÄRTLBAUER, 1998). Allerdings sind diese Analoga in Getreideerzeugnissen wahrscheinlich von untergeordneter Bedeutung. Ein weiterer Grund könnte in der Tatsache liegen, dass für EIA und HPLC zwei verschiedene Probenvorbereitungsverfahren eingesetzt worden waren, so dass geringe Toxingehaltsunterschiede durch Homogenitätsschwankungen im Probenmaterial möglich waren.

5.5 Belastung der Lebensmittel mit den Mykotoxinen DON und ZEA

Die Untersuchung von Lebensmitteln auf DON und ZEA erfolgte unter verschiedenen Aspekten. Primär sollten möglichst alle relevanten Produktgruppen untersucht werden, um ein Bild über die Gesamtsituation der Belastung der Lebensmittel mit diesen Toxinen zu erhalten. Zudem wurden, soweit dies das auf dem Markt befindliche Probenspektrum zuließ, Erzeugnisse aus ökologischer und konventioneller Produktionsweise vergleichend geprüft. Schließlich wurden die meisten Lebensmittelgruppen über den Zeitraum von vier Jahren gekauft und untersucht, um Änderungen im Gehalt der Mykotoxine zwischen den verschiedenen Jahren zu erfassen. Letzteres muss allerdings aufgrund der Tatsache, dass Getreide vor der Verarbeitung zu Lebensmitteln unterschiedlich lange, teilweise über Jahre hinweg gelagert werden, vorsichtig beurteilt werden.

5.5.1 Vorkommen von DON und ZEA in verschiedenen Lebensmittelgruppen

DON war in fast allen getreidehaltigen Lebensmittelgruppen mit einer hohen Häufigkeit, die zwischen 55 % und 98 % lag, zu finden, wie schon in anderen Studien festgestellt wurde (ELLNER, 2001; SCHOLLENBERGER et al., 2002b). Im Gegensatz dazu war der Anteil ZEA-positiver Proben relativ gering (0 % - 54 %), wie teilweise auch von anderen Autoren berichtet wurde (USLEBER et al., 1998; BASSEN & THIELERT, 2000; ELLNER, 2001; WOESE, 2001; KIRCHHEIM et al., 2002; SCHOLLENBERGER et al., 2002b). In Bier und getreidehaltigen Fertiggerichten wurde kein ZEA nachgewiesen.

Die Untersuchung von Speisegetreide und wenig verarbeiteten Getreideerzeugnissen (Grieß, Mehle etc.) ergab für DON vor allem eine hohe quantitative Belastung von Weizen, gefolgt von Roggen und Dinkel. Dieses Muster war sowohl in Getreidekörnern als auch in den daraus hergestellten Mehlen zu finden. Hier nimmt der DON-Gehalt mit zunehmendem Ausmahlungsgrad ab. Diese DON-Verteilung wurde ebenfalls in anderen Studien gefunden (BASSEN & THIELERT, 2000; DÖLL et al., 2000; MAJERIUS et al., 2002). Die Höchstmenge für DON (500 µg/kg) wurde nur in einzelnen Proben überschritten, insbesondere in Kleie- und Grießprodukten sowie in Vollkornprodukten, was mit Ergebnissen anderer Untersuchungen übereinstimmt (USLEBER et al., 2000; MAJERUS et al., 2002; SCHOLLENBERGER et al., 2002a). ZEA wurde in diesen Erzeugnissen nur selten

nachgewiesen, nur Mais wies eine etwas höhere Belastungshäufigkeit auf, bei insgesamt niedriger Konzentration selbst in kontaminierten Proben.

Brot und Brötchen waren mit einer DON-Nachweishäufigkeit von 98 % sehr häufig belastet. Dabei lagen die ermittelten DON-Werte im Median und 90sten Perzentil unter der festgesetzten Höchstgrenze von 350 µg/kg, nur einzelne Werte überschritten die Höchstmenge. In anderen Untersuchungen wurden ebenfalls DON-Belastungen in 90 % der Proben gefunden, 5 % der Brotproben lagen über der Höchstgrenze von 350 µg/kg mit Maximalwerten von 690 µg/kg (SCHOLLENBERGER et al., 2002b). Die Belastung von Brot und Brötchen mit ZEA war praktisch vernachlässigbar und entsprach damit den Befunden für Mehle.

Die höchsten DON-Belastungen wurden bei der Untersuchung von Teigwaren gefunden, mit einem Median von 177 µg/kg, einem 90sten Perzentil von 543 µg/kg und Maximalwerten von über 3000 µg/kg. In anderen Studien waren die Teigwaren ebenfalls hoch mit DON belastet (MAJERUS et al., 2002; SCHOLLENBERGER et al., 2002b). Als Ursache hierfür ist die Verwendung von höher belastetem Hartweizengrieß zur Herstellung der Teigwaren (MAJERUS et al., 2002) zu nennen. DON-Gehalte vorgebrühter Nudeln lagen unter denen roher Teigwaren, was andere Untersuchungen bestätigt, dass ein Teil des DON während des Kochens ins Wasser übergeht (BOCKHORN et al., 2001). Die ZEA-Belastungshäufigkeit war mit 4 % positiver Proben und 90stem Perzentil von 3 µg/kg (entsprechend der Nachweisgrenze) sehr niedrig, die Maximalwerte lagen bei 40 µg/kg und damit immer noch unter der Höchstmenge (50 µg/kg).

Rund 60 % der untersuchten Proben von Säuglingsnahrung (mit Getreidezusätzen, >6. Lebensmonat) waren mit DON belastet. Die meisten Proben waren, bezogen auf den Median, nur im niedrigen Konzentrationsbereich belastet, einzelne DON-Gehalte lagen aber weit über der festgesetzten Höchstgrenze von 100 µg/kg, was schon vorangegangene Studien zeigten, die ebenfalls Maximalwerte in Säuglingsnahrungen von 505 und 537 µg/kg fanden (BASSEN & THIELERT, 2000). Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass vor allem bei diesen Produktgruppen auf die Verwendung niedrig belasteter Rohware gedrängt werden muss. ZEA wurde hingegen nur in wenigen Proben mit einer Nachweishäufigkeit von 4 % und einem Maximalgehalt von 8,8 µg/kg gefunden, was frühere Untersuchungen bestätigt, in denen ZEA nur vereinzelt nachgewiesen wurde (BASSEN & THIELERT, 2000).

Die Untersuchung von Bier auf DON ergab bei einer Nachweisgrenze von 2 µg/l eine Nachweishäufigkeit von 95 %, allerdings bei einer sehr geringen Belastungshöhe von 6 µg/l im Median und 15 µg/l im 90sten Perzentil. In einer früheren Studie von MOLTO et al. (1995) wurden, bei einer vergleichbaren Nachweisgrenze von 2 µg/l, in 20 % aller Proben DON-Gehalte >20 % gefunden mit einem Mittelwert von 14,3 µg/l. TASCHAN et al. (2000) erhielten sogar Maximalwerte von 123 µg/l (NWG 3,7 µg/l). Dagegen fand WOESE (2001) bei einer im Vergleich sehr hohen Nachweisgrenze von 70 µg/l keine Belastung von Bier mit DON.

Die Untersuchung von Knabbererzeugnissen (Chips und ähnliches) ergab zwar eine relativ niedrige Belastung mit DON, dagegen eine vergleichsweise hohe Belastung mit ZEA. Ursache hierfür dürfte, wie frühere Studien gezeigt haben (BASSEN & THIELERT, 2000; USLEBER & MÄRTLBAUER, 1998), die häufige Verarbeitung von Mais in diesen Erzeugnissen sein.

5.5.2 Vergleich der DON-Ergebnisse in ökologisch und konventionell hergestellten Lebensmitteln

Hinweise auf eine höhere Belastung von Getreideerzeugnissen aus konventioneller Produktionsweise mit DON im Vergleich zu ähnlichen Produkten aus ökologischer Produktionsweise ergaben sich schon in einigen früheren Arbeiten (BASSEN & THIELERT, 2000; DÖLL et al., 2000). Dieser Unterschied wurde auch in der vorliegenden Arbeit festgestellt. Deutliche Unterschiede zeigten sich dabei im Median der ermittelten DON-Gehalte, das 90ste Perzentil lag aber nicht in allen Fällen unter denen der in konventionell ermittelten DON-Gehalte. Das bedeutet, dass konventionelle Erzeugnisse häufig eine höhere Grundbelastung mit DON aufweisen, Belastungsspitzen jedoch bei beiden Produktionsweisen auftreten können. Derartige Unterschiede erklären sich aus den Untersuchungen von OBST et al. (2000), die fünf verschiedene Risikofaktoren für die DON-Belastung von Weizen identifiziert hatten: ungünstige Wetterbedingungen, Fusarien-anfällige Sorten, Mais als Vorfrucht, Einsatz bestimmter Pestizide sowie nicht-wendende Bodenbearbeitung. Während die Wetterbedingungen unabhängig von der Produktionsweise zu erhöhten DON-Gehalten führen können, sind die anderen Risikofaktoren in der ökologischen Produktionsweise typischerweise nicht oder zumindest deutlich seltener anzutreffen.

5.5.3 Mykotoxinbelastung über vier Jahre betrachtet

Der Fusariumbefall von Getreide und anderen Pflanzen, und somit die Mykotoxinbildung, ist, wie im vorhergehenden Kapitel ausgeführt, von verschiedenen Faktoren abhängig (OBST et al., 2000; DÄNICKE & VALENTA, 1999), wobei klimatische Schwankungen von Jahr zu Jahr einen nicht unerheblichen Einfluss besitzen. Ein Aspekt dieser Arbeit war aus diesem Grund, Daten zur Mykotoxinbelastung von Lebensmitteln über einen langen Zeitraum zu sammeln, um Schwankungen im Mykotoxingehalt über die Jahre zu erkennen. Die Daten umfassen die Jahre 2001 bis 2004. Es zeigte sich, dass vor allem im Jahr 2001 Lebensmittel stark mit DON belastet waren und Werte im Median von 249 µg/kg (Teigwaren) und im 90sten Perzentil von 909 µg/kg (Teigwaren) erreicht wurden, in der Literatur beschriebene Werte für das „schlimme Fusarien-Jahr“ 1998 wurden aber nicht erreicht (KIRCHHEIM et al., 2002; ELLNER, 1999; DÖLL et al., 2000). In Säuglingsnahrungsprodukten wurden ebenfalls hohe Werte (Median 55 µg/kg, 90stes Perzentil 120 µg/kg) gefunden, die nahe am Höchstwert (100 µg/kg) lagen oder diesen überschritten. Andere Autoren fanden in diesem Jahr ebenfalls höhere DON-Gehalte im Lebensmittel (ELLNER, 2001; SCHOLLENBERGER et al., 2002a). 2002 und 2003 kam es in den untersuchten Proben zu einer leichten Abnahme der DON-Belastung, was deutlich in Teigwaren zu erkennen war (Median 172 µg/kg, 90stes Perzentil 525 µg/kg). Andere Autoren fanden für 2002 ebenfalls hohe DON-Belastungswerte in Lebensmitteln (MEISTER, 2003). Erst ab 2004 konnten Rückgänge in den Gehalten festgestellt werden, was ebenfalls am deutlichsten in Teigwaren zu erkennen war (Median 22 µg/kg, 90stes Perzentil 81 µg/kg). Letzteres ist auf Bemühungen der entsprechenden Lebensmittelindustrie zurückzuführen, die DON-Belastung dieser Produkte zu senken.

5.6 Vorkommen von DON und ZEA in Konsummilch

DON und DOM-1 konnte in keiner der untersuchten Konsummilchproben nachgewiesen werden, so dass sich keine Hinweise auf eine Kontamination von Konsummilch mit diesen Mykotoxinen bzw. ihren Glucuroniden ergab. Diese Ergebnisse sind konsistent mit publizierten Ergebnissen früherer Fütterungsversuche (PRELUSKY et al., 1984; CÔTÉ et al., 1986; CHARMLEY et al., 1993) bei Kühen. Die carry-over Raten für DON in Milch einzelner Tiere nach einmaliger oder wiederholter Gabe hoher Dosen DON lagen stets unter 0,1 %, zumeist sogar unter 0,01 %. Eine Belastung von Milch mit DON bzw. DOM-1 in

Konzentrationen um 1 µg/l ist daher erst ab mittleren DON-Gehalten in Futtermitteln ab 5-10 mg/kg zu erwarten (PRELUSKY et al., 1984), eine Belastung über 10 µg/l erst bei mehr als 50 mg DON/kg im Futtermittel (CÔTÉ et al., 1986). Derart hohe DON-Konzentrationen im Futter sind in Einzelfällen zwar durchaus möglich, entsprechen aber keinesfalls der Normalbelastung der Futtermittel in Deutschland. Da Konsummilch einen „Pool“ vieler milcherzeugender Betriebe darstellt, minimiert sich das Belastungsrisiko zusätzlich.

Auch ZEA und seine Analoga waren in keiner untersuchten Konsummilchprobe nachweisbar, was mit anderen Untersuchungen zum Übergang von ZEA in Milch übereinstimmt. Fütterungsstudien zur Metabolisierung von ZEA bei Milchkühen in den 80er Jahren ergaben, dass ZEA und seine Analoga in toxikologisch nicht relevanten Konzentrationen in der Milch ausgeschieden werden (SHREEVE et al., 1979; HAGLER et al., 1980; MIROCHA et al., 1980). Im Gegensatz zu allen früheren Befunden wurde jedoch im Rahmen des SCOOP-Projektes „Fusarientoxine“ (2003) aus Großbritannien über eine Belastung der Konsummilch mit ZEA (max. 5,5 µg/l) und einigen Analoga (max. 12,5 µg/l) berichtet (Final report SCOOP Task 3.2.10-Part B). Die eigenen durchgeführten HPLC- Untersuchungen zeigten aber, dass Milch häufig Störsubstanzen enthält, die in HPLC-Systemen mit Fluoreszenzdetektion leicht als ZEA bzw. ZEA-Metaboliten fehlinterpretiert werden können, so dass davon ausgegangen werden kann, dass es sich bei den berichteten Befunden aus Großbritannien um solche unspezifischen Störsubstanzen handeln könnte.

5.7 Abschätzung der Gefährdung des Verbrauchers durch DON- und ZEA-belastete Lebensmittel

Eine erhöhte Belastung der Lebensmittel mit den Mykotoxinen DON und ZEA geht mit einer potentiellen Gefährdung des Verbrauchers einher. Nach toxikologischer Bewertung wurden daher tolerierbare tägliche Höchstmengen für die Aufnahme dieser Toxine abgeleitet (JECFA, 2001; CANADY et al., 2001), die für DON bei 1 µg/kg KGW und für ZEA bei 0,5 µg/kg KGW liegen. Abweichend davon wählte die SCF (2001) für ZEA eine vorläufige tolerierbare Tagesaufnahme von 0,2 µg/kg.

Für ZEA kann – mit Ausnahme von maishaltigen Erzeugnissen – grundsätzlich von einer nur unerheblichen Toxinaufnahme über die Nahrungsmittel ausgegangen werden. Selbst Hochverzehrer von maishaltigen Erzeugnissen dürften kaum eine ZEA-Aufnahme oberhalb des TDI erreichen. Dies ist zunächst verwunderlich, da ZEA in ungereinigtem Rohgetreide durchaus häufiger nachzuweisen ist. Allerdings scheinen die müllereitechnischen Reinigungs- und Bearbeitungsschritte geeignet zu sein, ZEA effektiv aus Mehlen zu eliminieren (WOLFF, 2005). Da sich das Toxin vor allem in Mühlen-Nebenprodukten und -Abfallprodukten wie beispielsweise den so genannten „Stäuben“ oder „Kleinweizen“ wiederfindet, muss allerdings dafür Sorge getragen werden, dass diese ZEA-angereicherten Produkte sachgerecht entsorgt werden und insbesondere nicht in Lebens- oder Futtermittel gelangen.

Für DON liegt die mittlere tägliche Aufnahme des deutschen Verbrauchers im Mittel noch unterhalb des TDIs von $1 \mu\text{g}/\text{kg}$, und zwar zwischen $0,2 \mu\text{g}$ und $0,4 \mu\text{g}/\text{kg}$ Körpergewicht im Median (Median Toxinbelastung und Median Verzehrsmengen). Jedoch liegt die Aufnahme aller Verbrauchergruppen, insbesondere von Kindern, in einem „bad-case“-Szenario (90stes Perzentil Toxinbelastung und Median Verzehrsmengen) mit $1\text{-}2,2 \mu\text{g}/\text{kg}$ Körpergewicht bereits am oder über dem TDI.

Die errechnete Exposition zeigt in Bezug auf die nunmehr gültigen nationalen Regelungen, dass die tatsächliche Aufnahme des deutschen Verbrauchers im Normalfall unterhalb der zulässigen Grenzen liegt. Die Ergebnisse zeigen aber auch, dass insbesondere das Problemtoxin DON nur bei konsequenter Fortführung von Kontroll- und Selektionsmaßnahmen seitens der Lebensmittelindustrie und bei anhaltender Kontrolltätigkeit seitens der staatlichen Lebensmittelüberwachung dauerhaft in den Griff zu bekommen ist.

Es wurde aufgrund der Ergebnisse der Lebensmitteluntersuchungen deutlich, dass die bis vor kurzem in Deutschland geltenden Höchstmengen grundsätzlich und auch auf ihrem Niveau sinnvoll sind. Die DON-Aufnahme des Verbrauchers lag überhaupt nur deshalb noch unterhalb des TDI, weil die DON-Belastung der Lebensmittel *de facto* deutlich geringer war als dies die Mykotoxin-Höchstmengenverordnung zugelassen hätte. Eine Erhöhung der Höchstmengen insbesondere für DON, wie dies vor kurzem durch Änderungsverordnung zu Verordnung EG 466/2001 geschehen ist, kann einen Anreiz zur Vermarktung höher mit DON belasteter Ware bieten und damit das Risiko einer fortwährenden Überschreitung der aus Verbraucherschutzgründen akzeptablen Aufnahme dieses Toxins bedeuten.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Erarbeitung geeigneter enzymimmunochemischer (EIA) Methoden zur Untersuchung von getreidehaltigen Lebensmitteln auf die Mykotoxine Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZEA), sowie mit der Bestimmung der Gehalte dieser Toxine in Lebensmitteln des deutschen Marktes in den Jahren 2001 bis 2004. Es wurden insgesamt 1154 Lebensmittelproben auf Getreidebasis untersucht. Ein Teil der Proben wurde zur Überprüfung der EIA-Systeme zusätzlich mittels zweier HPLC-Methoden untersucht.

Komplexere Matrices wie Säuglingsnahrung, Müsli, Kekse und Chips konnten im EIA für DON durch Verwendung einer Flüssig-Flüssig-Partitionierung zur Extraktreinigung untersucht werden. Für den Nachweis von ZEA war eine Verdünnung des Rohextraktes ausreichend zur Untersuchung mittels EIA. Die erzielten Nachweisgrenzen im EIA für DON (15 µg/kg in Getreide und Getreideprodukten, 2 µg/l in Bier) und ZEA (6 µg/kg in Getreide und Getreideprodukten, 2 µg/l in Bier) lagen deutlich unterhalb der bis vor kurzem geltenden nationalen Höchstmengen (DON: 100 µg/kg Säuglingsnahrung, 350 µg/kg Brot/Brötchen, 500 µg/kg Getreide/Getreideerzeugnisse, ZEA: 20 µg/kg Säuglingsnahrung, 50 µg/kg Getreide/Getreideerzeugnisse) für diese Toxine. Wiederfindungsraten von 80 % - 112 % für DON sowie 86 % - 129 % für ZEA in künstlich im relevanten Konzentrationsbereich kontaminierten Proben sowie Variationskoeffizienten unterhalb der Anforderungen der VO EG 401/2006 belegten die Einsetzbarkeit der EIA-Methoden auch für komplexere Matrices. Die durchgeführten Vergleichsuntersuchungen zeigten ebenfalls eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse der EIA-Methoden und der HPLC-Methoden.

DON war in getreidehaltigen Lebensmitteln sehr häufig nachweisbar (81 %), dagegen waren Lebensmittel deutlich seltener mit ZEA belastet (14 %). Die Belastungshöhe der Lebensmittel mit DON und ZEA lag aber mit wenigen Ausnahmen unterhalb der Höchstmengen. In den Jahren 2001 und 2002 waren Säuglingsnahrungsmittel relativ häufig mit DON kontaminiert, in 2003 deutlich seltener. Erzeugnisse aus Hartweizen (Teigwaren, Grieß) sowie Speisekleie waren im Untersuchungszeitraum höher mit DON belastet und konnten bei Hochverzellern zur Überschreitung der tolerierbaren Tagesdosis für DON (TDI 1 µg/kg Körpergewicht und Tag) führen. Mit ZEA waren vor allem Mais und Maiseerzeugnisse kontaminiert, obwohl auch hier die Höchstmengen nicht erreicht wurden.

In Konsummilch konnte weder DON noch ZEA sowie ihre Analoga oberhalb der Nachweisgrenzen nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse zeigten in Bezug auf die nunmehr gültigen europäischen Regelungen, dass die Belastung der Lebensmittel zwar durchschnittlich weit unterhalb der zulässigen Höchstmengen lag, dass allerdings die DON-Aufnahme des deutschen Verbrauchers durchaus im Bereich nahe des toxikologisch begründeten TDI lag. Dagegen war die abgeschätzte Belastung des Verbrauchers mit ZEA durch getreidehaltige Lebensmittel in der Regel vernachlässigbar gering.

7 SUMMARY

This thesis describes the development of enzyme immunoassays (EIA) suitable for the routine analysis of cereal based foods for the mycotoxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZEA). These methods were used to determine the levels of these toxins in foods from the German retail market in a time period from 2001 to 2004. A total of 1154 food samples were analysed for DON and ZEA by EIA. Additionally, a representative percentage of these samples were also analysed using two HPLC methods for evaluation purposes.

Cereals, flour, but also complex sample matrices such as infant formulae, muesli, cookies and snacks were successfully analysed by the DON-EIA after liquid-liquid partitioning of aqueous raw extracts with ethyl acetate. For analysis of ZEA by EIA, dilution of raw extracts (acetonitrile/water) with buffer solution was sufficient to eliminate matrix effects. The detection limits of the DON-EIA (15 µg/kg for cereals and cereal products, 2 µg/l for beer) and the ZEA-EIA (6 µg/kg for cereals and cereal products, 2 µg/l for beer) were all well below the (recently replaced by European Union regulations) German maximum permitted limits (DON: 100 µg/kg in cereals for infant food; 350 µg/kg for bread and rolls, 500 µg/kg for cereals and other cereal products; ZEA: 20 µg/kg in cereals for infant foods, 50 µg/kg in cereals and cereal products). Recoveries obtained for spiked samples in a range of 80 %-120 % for DON and 86 % - 129 % for ZEA and relative standard deviations well below the requirements stated in European Union regulation 401/2006 demonstrated the suitability of the EIA-Methods for general routine analysis. Comparison studies with HPLC also showed good agreement between the results.

DON was frequently found in all cereal-based foods (81 %), while frequency of ZEA was much lower (14 %). However, the levels of DON and ZEA were in most cases below the maximum permitted levels. In samples purchased in the years 2001 and 2002, cereal-containing infant foods were frequently contaminated with DON, but less frequently in 2003. Products made from durum wheat (pasta, wheat grits) and from wheat bran showed higher levels of DON and could have resulted in an excess over the tolerable daily intake of DON (TDI 1 µg/kg body weight and day) in high consumers of these products. Elevated contamination with ZEA was mostly found in maize and products thereof, but in most cases well below the maximum permitted level.

Consumers' milk was essentially free of DON and ZEA and their respective metabolites.

Considering the new regulations for DON and ZEA as set according to European Union regulation 466/2001, the contamination of foods from the German market was on average far below the maximum permitted levels. However, the overall DON intake of the German consumer was estimated to be near the toxicology-based TDI value. In contrast, the estimated ZEA intake through cereal-based foods was found to be negligible in most cases.

8 LITERATURVERZEICHNIS

Arbeitsgemeinschaft der leitenden Medizinalbeamtinnen und –beamten der Länder (1995):

Standards zur Expositionsabschätzung – Bericht des Ausschusses für Umwelthygiene.

Behörde für Arbeit, Gesundheit und Soziales, Hamburg

<http://www.uke.uni-hamburg.de/institute/biometrie/downloads/institut-medizinische-biometrie-epidemiologie/AUH.pdf>

ADLER, A., H. LEW und W. EDINGER (1990):

Vorkommen und Toxigenität von Fusarien auf Getreide und Mais aus Österreich

Sonderdruck aus: Die Bodenkultur-Journal für landwirtschaftliche Forschung, 41. Band,

Heft 2, 145-152

ARNOLD, D.L., P.F. MCGUIRE, E.A. NERA, K.F. KARPINSKY, M.G. BICKIS, Z.Z. ZAWIDZKA, S. FERNIE und R.F. VESONDER (1986):

The toxicity of orally administered deoxynivalenol (vomitoxin) in rats and mice

Food Chem. Toxicol. **24**, 935-941

ATKINSON, H.A.C. und K. MILLER (1984):

Inhibitory effect of deoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol and zearalenone on induction of rat and human lymphocyte proliferation

Toxicol. Lett. **23**, 215-221

AYRAL, A.M., N. DUBECH, J. LE BARS und L. ESCOULA (1992):

In vitro effect of diacetoxyscirpenol and deoxynivalenol on microbicidal activity of murine peritoneal macrophages

Mycopathologia **120**, 121-127

BAGNERIS, R. W., J. A. GAUL und G. M. WARE (1986):

Liquid chromatographic of determination of zearalenone and zearalenol in animal feeds and grains, using fluorescence detection

J. Assoc. Off. Anal. Chem **69**, 894-898

BAKAN, B., L. PINSON, B. CAHAGNIER, D. MELCION, E. SEMON und D. RICHARD-MOLARD (2001):

Toxicogenic potential of *Fusarium culmorum* strains isolated from french wheat
Food. Addit. Contam. **18**, 998-1003

BASSEN, B. und G. THIELERT (2000):

Fusarientoxine (DON und ZEA) in Lebensmitteln
Mycotoxin Res. **16 A**, 75-78

BAUER, J. (1995):

Zum Metabolismus von Trichothecenen beim Schwein
Dtsch. Tierärztl. Wschr. **102**, 50-52

BAUER, J., K. HEINRITZI, M. GAREIS und B. GEDEK (1987):

Veränderungen am Genitaltrakt des weiblichen Schweines nach Verfütterung
praxisrelevanter Zearalenonmengen
Tierärztl. Prax. **15**, 33-36

BENNETT, G.A. und O.L. SHOTWELL (1990):

Criteria of determining purity of *Fusarium* mycotoxins
J. Assoc. Off Anal. Chem. **73**, 270-275

BENNETT, G. A., O. L. SHOTWELL und W. F. KWOLEK (1985):

Liquid chromatographic determination of α -zearalenol and zearalenone in corn:
Collaborative Study
J. Assoc. Off. Anal. Chem. **68**, 958-961

BEREK, L., I.B. PETRI, A. MESTERHAZY, J. TEREN und J.MOLNAR (2001):

Effects of mycotoxins on the human immune functions in vitro
Toxicol. in Vitro **15**, 25-30

BERGER, U., M. OEHME und F. KUHN (1999):

Quantitative determination and structure elucidation of type A- and type B-trichothecenes by HPLC/ion trap multiple mass spectrometry
J. Agric. Food Chem. **47**, 4240-4245

BERGSJØ, B., W. LANGSETH, I. NAFSTAD, J.H. JANSEN und H.J. LARSEN (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

BERGSJØ, B., T. MATRE und I. NAFSTAD (1992):

Effects of diets with graded levels of deoxynivalenol on performance in growing pigs
Zentralbl. Veterinärmed. **A 39**, 752-758

BIEHL, M., D.B. PRELUSKY, G.D. KORITZ, K.E. HARTIN, W.B. BUCK und H.L. TRENHOLM (1993):

Billiary excretion and enterohepatic cycling of zearalenone in immature pigs
Toxicol. Appl. Pharmakol. **121**, 152-159

BILGRAMI, K.S., M.F. RAHMAN, A. MASOOD und S.S. SHAY (1993):

DON induced histopathological abnormalities in mice (*Mus musculus*)
Natl. Acad. Sci. Lett. (India) **16**, 161-162

BIRZELE, B., A. PRANGE und J. KRÄMER (2000):

Deoxynivalenol and ochratoxin A in German wheat and changes in relation to storage parameters
Food Addit. Contam. **12**, 1027-1035

BOCKHORN, I., A. BOCKHORN und S. POHLER (2001):

Deoxynivalenol (DON) in raw and cooked pasta
Mycotoxin Res. **17 A**, 67-70

BURMEISTER, H.R., R.F. VESONDER und W.F. KWOLEK (1980):

Mouse bioassay for Fusarium metabolites: Rejection or acceptance when dissolved in drinking water

Appl. Environ. Microbiol. **39**, 957-961

CAHILL, L.M., S.C. KRUGER, B.T. McALICE, C. S. RAMSEY, R. PRIOLI und B. KOHN (1999):

Quantification of deoxynivalenol in wheat using an immunoaffinity column and liquid chromatography

J. Chromatogr. **859**, 23-28

CHARMLEY, E., H.L. TRENHOLM, B.K. THOMPSON, D. VUDATHALA, J.W.G. NICHOLSON, D.B. PRELUSKY und L.L. CHARMLEY (1993):

Influence of level of deoxynivalenol in the diet of dairy cows on feed intake, milk production, and its composition

J. Dairy Sci. **76**, 3580-3587

CHOLMAKOW-BODECHTEL, C., J. WOLFF, M. GAREIS, H. BRESCH, G. ENGEL, P. MAJERUS, H. ROSNER und R. SCHNEIDER (2000):

Ochratoxin A: Representative food consumption survey and epidemiological analysis

Arch. Lebensmittelhyg. **51**, 111-115

CÔTÉ, L.M. (1987):

Lack of hepatic microsomal metabolism of deoxynivalenol and its metabolite, DOM-1

Food Chem. Toxicol. **25**, 291-295

CÔTÉ, L.M., A.M. DAHLEM, T. YOSHIZAWA, S.P. SWANSON und W.B. BUCK (1985):

Excretion of deoxynivalenol and its metabolite in milk, urine and faeces of lactating dairy cows

J. Dairy Sci. **69**, 2416-2423

CÔTÉ, L.M., J. NICOLETTI, S.P. SWANSON und W.B. BUCK (1986):

Production of deepoxydeoxynivalenol (DOM-1), a metabolite of deoxynivalenol, by in vitro rumen incubation

J. Agric. Food Chem. **34**, 458-460

CROTEAU, S.M., D. B. PRELUSKY und H. L. TRENHOLM (1994) :

Analysis of trichothecene mycotoxins by gas chromatography with electron capture detection

J. Agric. Food Chem. **42**, 928-933

CURTUI, V., C. SEIDLER, R. DIETRICH, E. MÄRTLBAUER, E. SCHNEIDER und E. USLEBER (2003):

Bestimmung von Deoxynivalenol in Brot und Bier

Mycotxin Res. **19**, 144-148

CURTUI, V., C. SEIDLER, E. SCHNEIDER und E. USLEBER (2005):

Bestimmung von Deoxynivalenol und Deepoxy-Deoxynivalenol in Milch

Mycotoxin Res. **21**, 40-42

DACASTO, M., P. ROLANDO, C. NACHTMANN, L. CEPPA und C. NEBBIA (1995):

Zearalenone mycotoxicosis in piglets suckling sows fed contaminated grain

Vet. Human Toxicol. **37**, 359-361

DÄNICKE, S., D. GÄDEKEN, K.-H. UEBERSCHÄR, U. MEYER und H. SCHOLZ (2002):

Effects of fusarium toxin contaminated wheat and of a detoxifying agent on performance of growing bulls, on nutrient digestibility in wethers and on the carry over of zearalenone

Arch. Anim. Nutr. **56**, 245-261

DÄNICKE, S., K.-H. UEBERSCHÄR, I. HALLE, S. MATTHES, H. VALENTA und G. FLACHOWSKY (2001):

On the effects of fusarium toxin contaminated maize in laying hen feeding

Mycotoxin Res. **17 A**, 62-66

DÄNICKE, S. und A. VALENTA (1999):

Mykotoxine im Futter - Gefahr für landwirtschaftliche Nutztiere ?

Verbraucherministerium Forschungsreport (www.verbraucherministerium.de)

DÄNICKE, S., H. VALENTA und K.-H. UEBERSCHÄR (2000):

Risikoabschätzung und Vermeidungsstrategien bei der Fütterung, in Risikofaktoren für die Fusariumtoxinbildung in Futtermitteln und Vermeidungsstrategien bei der Futtermittelerzeugung und Fütterung

Landbauforschung Völkenrode, Wissenschaftliche Mitteilungen der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Sonderheft **216**

DE SAEGER, S., L. SIBANDA und C. van PETEGHEM (2003):

Analysis of zearalenone and α -zearalenol in animal feed using high-performance liquid chromatography

Anal. Chim. Acta **487**, 137-143

DESJARDINS, A.E., T.M. HOHN und S.P. McCORMICK (1993):

Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* Species: chemistry, genetics, and significance
Microbiol. Rev. **57**, 595-604

DIETRICH, R., E. SCHNEIDER, E. USLEBER und E. MÄRTLBAUER (1995):

Use of monoclonal antibodies for the analysis of mycotoxins

Nat. Toxins **3**, 288-293

DÖLL, S., H. VALENTA, U. Kirchheim, S. DÄNICKE und G. Flachowsky (2000):

Fusarium mycotoxins in conventionally and organically grown grain from Thuringia/Germany

Mycotoxin Res. **16 A**, 38-41

EDWARDS, S., T.C. CANTLEY, G.E. ROTTINGHAUS, G.D. OSWEILER und B.N. DAY (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

EHRlich K.C. und K.W. DAIGLE (1987):

Protein synthesis inhibition by 8-oxo-12,13-epoxytrichothecenes

Biochem. Biophys. Acta **923**, 206-213

EL-BANA, A.A., R.M.G. HAMILTON, P.M. SCOTT und H.L. TRENHOLM (1983):

Nontransmission of deoxynivalenol (vomitoxin) to eggs and meat in chickens fed deoxynivalenol-contaminated diets

J. Agric. Food Chem. **31**, 1381-1384

ELLNER, F. M. (1999):

1998- Ein Jahr für Fusariumtoxine

Mycotoxin Res. **15 A**,

ELLNER, F. M. (2000):

Occurrence of Fusarium toxins in the 1999's harvest

Mycotoxin Res. **16 A**, 21-25

ELLNER, F. M. (2001):

Fusarium toxins in cereals – results from eight German Federal States in 2000

Mycotoxin Res. **17 A**, 41-44

ENGELHARDT, G., M. SCHUSTER, J. LEPSCHY und P. R. WALLNÖFER (1986):

Production of mycotoxins by Fusarium species isolated in Germany

Originalarbeit

ERASMUSON, A.F., B.G. SCAHILL und D.M. WEST (1994):

Natural zearanol (α -zearalenol) in the urine of pasture-fed animals

J. Agric. Food Chem. **42**, 2721-2725

ERIKSEN, G.S. und J. ALEXANDER (1998):

Fusarium toxins in cereals - a risk assessment

Nordic Council of Ministers, Copenhagen

ERIKSEN, G.S. und H. PETTERSSON (2003):

Lack of de-epoxydation of type B trichothecenes in incubates with human faeces
Food Addit. Contam. **20**, 579-582

ERIKSEN, G.S., H. PETTERSSON, K. JOHNSON und J.E. LINDBERG (2002):

Transformation of trichothecenes in ileal digesta and faeces from pigs
Arch. Anim. Nutr. **56**, 263-274

EWALD, C., A. REHM und C. HAUPT (1991):

Mykotoxine als Risikofaktor für das Entstehen von Krankheiten und
Leistungsminderung in Schweinebeständen - eine epidemiologische Studie
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **104**, 161-166

FERNANDEZ, C., M. E. STACK und S. M. MUSSER (1994):

Determination of deoxynivalenol in 1991 U.S. winter and spring wheat by high
performance thin-layer chromatography
J. AOAC Int. **77**, 628-630

FORSELL, J. H., R. JENSEN, J.-H. TAI, M. WITT, W.S. LIN und J.J. PESTKA (1987):

Comparison of acute toxicities of deoxynivalenol (vomitoxin) and 15-
acetyldeoxynivalenol in the B6C3F₁ mouse
Food Chem. Toxicol. **25**, 155-162

FORSELL, J.H., M. F. WITT und J.-H. TAI (1986):

Effects of 8-week exposure of the B6C3F₁ mouse to dietary deoxynivalenol (vomitoxin)
and zearalenone
Food Chem. Toxicol. **24**, 213-219

FORSYTH, D. M., T. YOSHIZAWA, N. MOROOKA und J. TUIITE (1977):

Emetic and refusal activity of deoxynivalenol to swine
Appl. Environ. Microbiol. **34**, 547-552

FOSTER, B.C., H.L. TRENHOLM, D.W. FRIEND, B.K. THOMPSON und K.E. HARTIN (1986) :

Evaluation of different sources of deoxynivalenol (vomitoxin) fed to swine
Can. J. Anim. Sci. **66**, 1149-1154

FRIEND, D.W., B.K. THOMPSON, H.L. TRENHOLM, H.J. BOERMANS, K.E. HARTIN und P.L. PANICH (1992):

Toxicity of T-2 toxin and its interaction with deoxynivalenol when fed to young pigs
Can. J. Anim. Sci. **72**, 703-711

GEßLER, R. (1997):

Vergleichende Untersuchungen zum Nachweis von Mykotoxinen in Gerste unter Verwendung enzymimmunchemischer Verfahren
Diss. med. vet., München

GÖTZ-SCHRÖM, S., M. SCHOLLENBERGER, U. LAUBER, H.-M. MÜLLER und W. DROCHNER (1998):

Wirkung von reinem Deoxynivalenol bei Läufer Schweinen - Ergebnisse
In: Proceedings of the 20th workshop on mycotoxins, Bundesanstalt für Getreide-, Kartoffel- und Fettforschung, Detmold, Germany, 171-175

HAGLER, W.M., Gy. DANKO, L. HORVATH, M. PALYUSIK und C.J. MIROCHA (1980):

Transmission of zearalenone and its metabolite into ruminant milk
Acta Vet. Acad. Sci. Hung. **28**, 209-216

HANELT, M., M. GAREIS und B. KOLLARCZIK (1994):

Cytotoxicity of mycotoxins evaluated by the MTT-cell culture assay
Mycopathologia **128**, 167-174

HARVEY, R.B., T.S. EDRINGTON, L.F. KUBENA, M.H. ELISSALDE, H.H. CASPER, G.E. ROTTINGHAUS und J.R. TURK (1996):

Effects of dietary fumonisin B1-containing culture material, deoxynivalenol-contaminated wheat, or their combination on growing barrows
Am. J. Vet. Res. **57**, 1790-1794

HORN, F., G. HANSCHMANN, G. GEBHART, A. JOHN, A. & H. MIETKE (2000):

Untersuchung von Weizen sächsischer Herkunft auf Fusarien und die Toxine Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZEA)
Mycotoxin Res. **16 A**, 42-45

HUNDER, G., K. SCHUMANN, G. STRUGALA, J. GROPP, B. FICHTL und W. FORTH (1991):

Influence of subchronic exposure to low dietary deoxynivalenol, a trichothecene mycotoxin, on intestinal absorption of nutrients in mice
Food Chem. Toxicol. **29**, 809-814

HULAN, H.W. und F.G. PROUDFOOT (1982):

Effects of feeding vomitoxin contaminated wheat on the performance of broiler chickens
Poult. Sci. **61**, 1653-1659

ISHII, K. (1983):

Chemistry and bioproduction of non-macrocyclic trichothecenes
In: UENO, Y.: Trichothecenes, p.7-19
Elsevier, Amsterdam

IVERSON, F., C. ARMSTRONG, E. NERA, J. TRUELOVE, S. FERNIE, P. SCOTT, R. STAPLEY, S. HAYWARD und S. GUNNER (1995):

Chronic feeding study of deoxynivalenol in B6C3F1 male and female mice
Teratog. Carcinog. Mutagen. **15**, 285-306

JIMENEZ, M., M. MANEZ und E. HERNANDEZ (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

JODLBAUER, J, P. ZÖLLNER und W. LINDNER (2000):

Determination of zearalenone and its metabolites in urin and tissue samples of cow and pig by LC-MS/MS

Mycotoxin Res. **16 A**, 174-178

KAMIMURA, H., M. NISHIJIMA, K. YASUDA, K. SAITO, A. IBE, T. NAGAYAMA, H. USHIYAMA und Y. NAOI (1981):

Simultaneous detection of several *Fusarium* mycotoxins in cereals, grains, and foodstuffs

J. Assoc. Off. Anal. Chem. **64**, 1067-1073

KHERA, K.S., D.L. ARNOLD, C. WHALEN, G. ANGERS und P.M. SCOTT (1984):

Vomitoxin (4-deoxynivalenol): Effects on reproduction of mice and rats

Toxicol. Appl. Pharmacol. **74**, 345-356

KHERA, K.S., C. WHALEN, G. ANGERS, R.F. VESONDER und T. KUIPER-GOODMAN (1982):

Embryotoxicity of 4-deoxynivalenol (vomitoxin) in mice

Bull. Environ. Contam. Toxicol. **29**, 487-491

KIESSLING, K.-H., H. PETTERSSON, K. SANDHOLM und M. OLSEN (1984):

Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria

Appl. Environ. Microbiol. **47**, 1070-1073

KING, R.R., R.E. McQUEEN, D. LEVESQUE und R. GREENHALGH (1984):

Transformation of deoxynivalenol (vomitoxin) by rumen microorganisms

J. Agric. Food Chem. **32**, 1181-1183

KIRCHHEIM, U., H. HARTUNG, L. HEROLD und B. MEIXNER (2002):

Monitoring of *Fusarium* toxins in cereals and feedstuffs from Thuringia (1998-2001)

Mycotoxin Res. **18 A**, 28-31

KOLLARCZIK, B., M. GAREIS und M. HANELT (1994):

In vitro transformation of the Fusarium mycotoxins deoxynivalenol and zearalenone by the normal gut microflora of pigs

Nat. Toxins **2**, 105-110

KRSKA, R., S. BAUMGARTNER und R. JOSEPHS (2001):

The state-of-the-art in the analysis of type -A and -B trichthecene mycotoxins in cereals

Fresenius J. Anal. Chem. **371**, 285-299

KUBENA, L.F., S.P. SWANSON, R.B. HARVEY, O.J. FLETCHER, L.D. ROWE und T.D. PHILLIPS (1984):

Effects of feeding deoxynivalenol (vomitoxin)-contaminated wheat to growing chicks

Poult. Sci. **64**, 1649-1655

KUIPER-GOODMAN, T., P.M. SCOTT und H. WATANABE (1987):

Risk Assessment of the mycotoxin zearalenone

Regul. Toxikol. Pharmacol. **7**, 253-306

LAUBER, U., T. DILLENBURGER, M. SCHOLLENBERGER, H.M. MÜLLER und W. DROCHNER (2000):

Transformation von Deoxynivalenol durch die Darmflora des Schweines- In vitro Untersuchungen zur Adaptation in Abhängigkeit von der Darreichungsform

Mycotoxin Res. **16 A**, 166-169

LAUREN, D. R. und M. P. AGNEW (1991)

Multitoxin screening method for fusarium mycotoxins in grains

J. Agric. Food Chem. **39**, 502-507

LAUREN, D.R. und R. GREENHALGH (1987):

Simultaneous analysis of nivalenol and deoxynivalenol in cereals by liquid chromatography

J. Assoc. Off. Anal. Chem. **70**, 479-483

LAUREN, D.R., S.T. SAYER und M.E. di MENNA (1992):

Trichothecene production by *Fusarium* species isolated from grain and pasture throughout New Zealand
Mycopathologia **120**, 167-176

LAUTRAITE, S., D. PARENT-MASSIN, B. RIO und H. HOELLINGER (1997):

In vitro toxicity induced by deoxynivalenol (DON) on human and rat granulomonocytic progenitors
Cell Biol. Toxicol. **13**, 175-183

LEITNER, S., A. BUCHER, J. BÖHM und C. ROSENKRANZ (2001):

Gewebespezifische Veränderungen bei geschlechtsreifen Sauen nach Aufnahme von Zearalenonhaltigem Futter
Mycotoxin Res. **17 A**, 37-40

LIU, M.T., B. P. RAM, L. P. HART und J. J. PESTKA (1985):

Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the mycotoxin zearalenone
Appl. Environ. Microbiol. **50**, 332-336

LOMBAERT, G.A. (2002):

Methods for the determination of deoxynivalenol
Mycotoxins and Food Safety, edited by Trucksess et al., Kluwer Academic/Plenum Publishers, 141-153

LUSKY, K., R. GOBEL, D. TESCH, G. TENNER, W. HAIDER, M. KRUGER und A. LIPPERT (1998):

Studies on the effects of ochratoxin A and deoxynivalenol toxicity on the health of pigs and tissue residue concentrations
Tierärztl. Umsch. **53**, 623-633

MÄRTLBAUER, E., R. DIETRICH und G. TERPLAN (1991):

Erfahrungen bei der Anwendung von Immunoassays zum Nachweis von Mykotoxinen in Lebensmitteln
Arch. Lebensmittelhyg. **42**, 3-6

MAJERUS, P., V. CURTUI, H. OTTENEDER und E. USLEBER (2002):

Deoxynivalenol in Lebensmitteln: Ergebnisse einer Pilotstudie

Mycotoxin Res. **18 A**, 32-34

MARX, H., B. GEDEK und B. KOLLARCZIK (1995):

Vergleichende Untersuchungen zum mykotoxikologischen Status von ökologisch und konventionell angebautem Getreide

Z. Lebensm. Unter. Forsch. **201**, 83-86

Mc NUTT, S.H., P. PURWIN und C. MURRAY (1928):

Vulvovaginitis in swine; preliminary report

J. Amer. Vet. Med. **73**, 448-492

MEISTER, U. (2003):

Fusarium toxins in bread cereals of the land Brandenburg - comparison of integrated/ecological cultivation of 2000 to 2002

Mycotoxin Res. **19**, 157-161

MEKY, F.A., L.J. HARDIE, S.W. EWANS und C.P. WILD (2001):

Deoxynivalenol-induced immunomodulation of human lymphocyte proliferation and cytokine production

Food Chem. Toxicol. **39**, 827-836

MEKY, F.A., P.C. TURNER, A.E. ASHCROFT, J.D. MILLER, Y. L. QIAO, M.J. ROTH und C.P. WILD (2003):

Development of a urinary biomarker of human exposure to deoxynivalenol

Food Chem. Toxicol. **41**, 265-273

MEYER, K., E. USLEBER, E. MÄRTLBAUER und J. BAUER (1997):

Nachweis von Zearalenon-Metaboliten in Gallen von Zuchtsauen mit Fertilitätsstörungen

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **110**, 281-283

MEYER, K., E. USLEBER, E. MÄRTLBAUER und J. BAUER (2000):

Vorkommen von Zearalenon, α -und β -Zearalenol in Gallen von Zuchtsauen in Relation zum Fruchtbarkeitsgeschehen

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **113**, 374-379

MIROCHA, C.J. und C.M. CHRISTENSEN (1974):

Fungus metabolites toxic to animals

Ann. Rev. Phytopathol. **12**, 303-330

MIROCHA, C.J., S.V. PATHRE und T.S. ROBISON (1981):

Comparative metabolism of zearalenone and transmission into bovine milk

Food Cosmet. Toxicol. **19**, 25-30

MIROCHA, C.J., W. XIE, Y. XU, R.D. WILCOXSON, R.P. WOODWARD, R.H. ETEBARIAN und G. BEHELE (1994):

Production of trichothecene mycotoxins by *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* on barley and wheat

Mycopathologia **128**, 19-23

MITTERBAUER, R., H. WEINDORFER, N. SAFAIE, R. KRŠKA, M. LEMMENS, P. RUCKENBAUER, K. KUHLER und G. ADAM (2003):

A sensitive and inexpensive yeast bioassay for mycotoxin zearalenone and other compounds with estrogenic activity

Appl. Environ. Microbiol. **69**, 805-811

MOLTO, G., M.M. SAMAR, S. RESNIK, E.J. MARTINEZ und A. PACIN (2000):

Occurrence of trichothecenes in Argentinian beer: a preliminary exposure assessment

Food Addit. Contam. **17**, 809-813

MORAN, E.T., Jr., B. HUNTER, P. PERKET, L.G. YOUNG und L.G. MCGIRR (1982):

High tolerance of broilers to vomitoxin from corn infected with *Fusarium graminearum*

Poult. Sci. **61**, 1828-1831

MOROOKA, N., N. URATSUJI, T. YOSHIZAWA und H. YAMAMOTO (1972):

Studies on the toxic substances in barley infected with *Fusarium* spp.

J. Food Hyg. Soc. Jpn. **13**, 368-375

OBST, A., J. LEPSCHY, R. BECK, G. BAUER und A. BECHTEL (2000):

The risk of toxins by *Fusarium graminearum* in wheat - interactions between weather and agronomic factors

Mycotoxin Res. **16 A**, 16-20

OLSEN, M., H. PETTERSSON, K. SANDHOLM, A. VISCONTI und K.H. KISSLING (1987):

Metabolism of zearalenone by sow intestinal mucosa in vitro

Food Chem. Toxicol. **25**, 681-683

OYANG, Y.L., S. LI und J.J. PESTKA (1996):

Effects of vomitoxin (deoxynivalenol) on transcription factor NF- κ B/Rel binding activity in murine EL-4 Thymoma and primary CD 4⁺ T cells

Toxicol. Appl. Pharm. **140**, 328-336

PARENT-MASSIN, D., R. FUSELIER und D. THOUVENOT (1994):

In vitro toxicity of trichothecenes on human haematopoietic progenitors

Food Addit. Contam. **11**, 441-447

PESTKA, J.J und W. DONG (1994):

Progressive serum IgE elevation in the B6C3F1 mouse following withdrawal of dietary vomitoxin (deoxynivalenol)

Fundam. Appl. Toxicol. **22**, 314-316

PESTKA, J.J. und H.-R. ZHOU (2002):

Effects of tumor necrosis factor type 1 and 2 receptor deficiencies on anorexia, growth and IgA dysregulation in mice exposed to the trichothecene vomitoxin

Food Chem. Toxicol. **40**, 1623-1631

PLATTNER, R.D. und C.M. MARAGOS (2003):

Determination of deoxynivalenol and nivalenol in corn and wheat by liquid chromatography with electrospray mass spectrometry

J. AOAC Int. **86**, 61-65

POHLAND, A., C. THORPE und J. SPHON (1984):

The analytical chemistry of deoxynivalenol

In Kerato und Ueno: Toxigenic fungi, 217-230

POLLMAN, D.S., B.A. KOCH, L.M. SEITZ, H.E. MOHR und G.A. KENNEDY (1985):

Deoxynivalenol-contaminated wheat in swine diets

J. Anim. Sci. **60**, 239-247

PRELUSKY, D. (1997):

Effect of intraperitoneal infusion of deoxynivalenol on feed consumption and weight gain in the pig

Nat. Toxins **5**, 121-125

PRELUSKY, D. B., R.G. GERDES, K.L. UNDERHILL, B.A. ROTTER, P. Y. JUI und H.L. TRENHOLM (1994):

Effects of low-level dietary deoxynivalenol on haematological and clinical parameters of pigs

Nat. Toxins **2**, 97-104

PRELUSKY, D.B., R.M.G. HAMILTON, H.L. TRENHOLM und J.D. MILLER (1986):

Tissue distribution and excretion of radioactivity following administration of ¹⁴C – labeled deoxynivalenol to white leghorn hens

Fundam. Appl. Toxicol. **7**, 635-645

PRELUSKY, D.B. und H.L. TRENHOLM (1991):

Tissue distribution of deoxynivalenol in swine dosed intravenously

J. Agric. Food Chem. **39**, 748-751

PRELUSKY, D.B. und H.L. TRENHOLM (1993):

The efficacy of various classes of anti-emetics in preventing deoxynivalenol-induced vomiting in swine

Nat. Toxins **1**, 296-302

PRELUSKY, D.B., H.L. TRENHOLM, R.B.G. HAMILTON und J.D. MILLER (1987):

Transmission of ¹⁴C deoxynivalenol to eggs following oral administration to laying hens

J. Agric. Food Chem. **35**, 182-186

PRELUSKY, D.B., H.L. TRENHOLM, G.A. LAWRENCE, P.M. SCOTT (1984):

Nontransmission of deoxynivalenol (vomitoxin) to milk following oral administration to dairy cows

J. Environ. Sci. Health B **19**, 593-609

RAMESH, C.S., M.E. SAVARD und R. LAU (1995):

Production of monoclonal antibodies for the specific detection of deoxynivalenol and 15-acetyldeoxynivalenol by ELISA

J. Agric. Chem. **43**, 1740-1744

RAZZAZI-FAZELI, E., J. BÖHM, K. JARUKAMJORN und J. ZENTEK (2003):

Simultaneous determination of major B-trichohecenones and the de-epoxy-metabolite of deoxynivalenol in pig urine and maize using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry

J. Chromatogr. **796**, 21-33

RAZZAZI-FAZELI, E., J. BÖHM und W. LUF (1999):

Determination of nivalenol and deoxynivalenol in wheat using liquid chromatography-mass spectrometry with negative ion atmospheric pressure chemical ionisation

J. Chromatogr. **854**, 45-55

REED, K.F.M., J.R. WALSH, N.M. McFARLANE und M. SPRAGUE (2004):

Zearalenone and its presence in pasture

Animal production in Australia 25, 140-143: Proceedings of the 25th Biennial Conference of Australian Society of Animal Production

RENZ, V. (1989):

Entwicklung und Anwendung eines enzymimmunologischen Nachweisverfahrens für Zearalenon

Diss. med. vet. München

RIZZO, A.F., F. ATROSHI, T. HIRVI und H. SALONIEMI (1992):

The hemolytic activity of deoxynivalenol and T-2 toxin

Nat. Toxins **1**, 106-110

ROBBANNA-BARNAT, S., B. LORIDON-ROSA, H. COHEN, C. LAFARGE-FRAYSSINET, G.A. NEISH und C. FRAYSSINET (1987):

Protein synthesis inhibition and cardiac lesions associated with deoxynivalenol ingestion in mice

Food Addit. Contam. **4**, 49-56

ROMER, T.R. (1986):

Use of Charcoal/Alumina cleanup columns in determination of trichothecene mycotoxins in foods and feeds

J. Assoc. Off. Anal. Chem. **69**, 699-703

ROTTER, B.A. und D.B. PRELUSKY (1996):

Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin)

J. Toxicol. Environ. Health **48**, 1-34

ROTTER, B.A., B.K. THOMPSON und M. LESSARD (1995):

Effects of deoxynivalenol-contaminated diet on performance and blood parameters in growing swine

Can. J. Anim. Sci. **75**, 297-302

ROTTER, B.A., B.K. THOMPSON, M. LESSARD, H. L. TRENHOLM und H. TRYPHONAS (1994a):

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., B.K. THOMPSON und G. ROTTER (1994 b):

Optimization of the mouse bioassay for deoxynivalenol as an alternative to large animal studies

Bull. Environ. Contam. Toxicol. **52**, 642-647

RUPP, H.S. (2002):

Determination of deoxynivalenol in whole wheat flour and wheat bran

J. AOAC Int. **85**, 1355-1359

SAENZ de RODRIGUEZ, C.A., A.M. BONGIOVANNI und L. CONDE de BORREGO (1985):

An epidemic of precocious development in Puerto Rican children

J. Pediatr. **107**, 393-396

SAMAR, M.M., M.S. NEIRA, S.L. RESNIK und A. PACIN (2001):

Effect of fermentation on naturally occurring deoxynivalenol (DON) in Argentinean bread processing technology

Food Addit. Contam. **18**, 1004-1010

SCHAAFSMA, A.W., R.W. NICOL, M.E. SVARD, R.C. SINHA, L.M. REID und G. ROTTINGHAUS (1998):

Analysis of Fusarium toxins in maize and wheat using thin layer chromatography

Mycopathologia **142**, 107-113

SCHMIDT, S. und G. THIELERT (2001):

Fusariotoxine (DON und ZEA) in Mehl und Brot

Mycotoxin Res. **17A**, 49-52

SCHMITT, K., E. MÄRTLBAUER, E. USLEBER, R. GESSLER, J. LEPSCHY und D. ABRAMSON (1996):

Detection of acetylated deoxynivalenol by enzyme-linked immunosorbent assay

American Chemical Society **23**, 314-321

SCHNEIDER, E., R. DIETRICH, E. MÄRTLBAUER, E. USLEBER und G. TERPLAN (1991):

Detection of aflatoxins, trichothecenes, ochratoxin A and zearalenone by test strip enzyme immunoassay: a rapid method for screening cereals for mycotoxins
Food Agric. Immun. **3**, 185-193

SCHNEIDER, L., H. PICHLER und R. KRŠKA (2000):

An enzyme linked immunoassay for the determination of deoxynivalenol in wheat based on chicken egg yolk antibodies
Fresenius J. Anal. Chem. **367**, 98-100

SCHOLLENBERGER, M., H. T. JARA, S. SUCHY, W. DROCHNER und H. M. MÜLLER (2002a):

Fusarium toxins in wheat flour collected in an area in southwest Germany
Int. J. Microbiol. **72**, 85-92

SCHOLLENBERGER, M., H. M. MÜLLER und W. DROCHNER (2002b):

Fusarium toxins in different food samples.
Mycotoxin Res. **18 A**, 39-42

SCHOLLENBERGER, M., H. M. MÜLLER, M. RÜFFLE, S. SUCHY, S. PLANK und W. DROCHNER (2006):

Natural occurrence of 16 Fusarium toxins in grains and feedstuffs of plant origin from Germany.
Mycopathologia **161**, 43-52

SCHOTHORST, R.C. und A.A. JEKEL (2003):

Determination of trichothecenes in beer by capillary gas chromatography with flame ionisation detection
Food Chem. **82**, 475-479

SCOTT, P. M. (1984):

Effects of food processing on mycotoxins
J. Food Prot. **47**, 489-499

SCOTT, P. M., KANHERE, S. R., LAU, P.-Y., DEXTER, J. E., and GREENHALGH, R. (1983):

Effects of experimental flour milling and bread-baking on retention of deoxynivalenol (vomitoxin) in hard red spring wheat
Cereal Chemistry **60**, 421-424

SCOTT, P. M., KANHERE, S. R., DEXTER, J. E., BRENNAN, P. W., and TRENHOLM, H. L. (1984):

Distribution of the trichothecene mycotoxin deoxynivalenol (vomitoxin) during the milling of naturally contaminated hard red spring wheat and its fate in baked products
Food Addit. Contam. **1**, 313-323

SCUDAMORE, K.A. und S. PATEL (2000):

Survey for aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and fumonisins in maize imported into the United Kingdom
Food. Addit Contam. **17**, 407-416

SHEPARD, M. J. und J. GILBERT (1988):

Long-term storage stability of deoxynivalenol standard reference solution
J. Agric. Food Chem. **36**, 305-308

SHREEVE, B.J., D.S.P. PATTERSON und B.A. ROTTER (1979):

The carry over of aflatoxin, ochratoxin and zearalenone from naturally contaminated feed to tissues, urine and milk of dairy cows
Food Cosmet. Toxicol. **17**: 151-152

SILVA, C.M.G. und E.A. VARGAS (2001):

A survey of zearalenone in corn using Romer Mycosep™ 224 column and high performance liquid chromatography
Food Addit. Contam. **18**, 39-45

STOB, M., R.S. BALDWIN, J. TUIITE, F.N. ANDREWS und K.G. GILLETTE (1962):

Isolation of an anabolic, uterotrophic compound from corn infected with *Giberella zeae*
Nature **196**, 1318

SYDENHAM, E.W., P.G. THIEL und R. VLEGGAR (1996):

Physicochemical data for some selected *Fusarium* toxins

J. AOAC Int. **79**, 1365-1379

SZUETS, P., A. MESTERHAZY, G.Y. FALKAY und T. BARTOK (1997):

Early telearche symptoms in children and their relations to zearalenon contamination in foodstuffs

Cereals Res. Com. **25**, 429-436

TANAKA, T., A. HASEGAWA, S. YAMAMOTO, U.-S. LEE, Y. SUGIURA und Y. UENO (1988):

Worldwide 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., A. YONEDA, S. INOUE, Y. SUGIURA und Y. UENO (2000):

Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereals by gas chromatography-mass spectrometry

J. Chromatogr. **882**, 23-28

TASCHAN, H., G. PUCHTINGER, U. WALLER und T. PUCHTINGER (2000):

Deoxynivalenol in grain products

Mycotoxin Res. **16 A**, 26-29

THUVANDER, A., C. WIKMAN und I. GADHASSON (1999):

In vitro exposure of human lymphocytes to trichothecenes: Individual variation in sensitivity and effects of combined exposure on lymphocyte function

Food Chem. Toxicol. **37**, 639-648

TOMASZEWSKI, J., R. MITURSKI, A. SEMCZUK, J. KOTARSKI und J. JAKOWICKI (1998):

Tissue zearalenone concentration in normal, hyperplastic and neoplastic human endometrium

Ginekol. Pol. **69**, 363-366

TRENHOLM, H.L., B.C. FOSTER, L.L. CHARMLEY, B.K. THOMPSON, K.E. HARTIN, R.W. COPPOCK und M.A. ALBASSAM (1994):

Effects of feeding diets containing *Fusarium* (naturally) contaminated wheat or pure deoxynivalenol (DON) in growing pigs

Can. J. Animal. Sci. **74**, 361-369

TRENHOLM, H.L., R.M. HAMILTON, D.W. FRIEND, B.K. THOMPSON und K.E. HARTIN (1984):

Feeding trials with vomitoxin (deoxynivalenol)-contaminated wheat: Effects on swine, poultry, and dairy cattle

J. Am. Vet. Med. Assoc. **185**, 527-531

TRUCKSESS, M.W., D.E. READY, M.K. PENDER, C.A. LIGMOND, G.E. WOOD und S.W. PAGE (1996):

Determination and survey of deoxynivalenol in white flour, whole wheat flour, and bran

J. AOAC Int. **79**, 883-887

TRYPHONAS, H., F. IVERSON, Y. SO, E.A. NERA, P.F. MCGUIRE, L. O'GRADY, D.B. CLAYSON und P.M. SCOTT (1986):

Effects of deoxynivalenol (vomitoxin) on the humoral and cellular immunity of mice

Toxicol. Lett. **30**, 137-150

UENO, Y., F. TASHIRO und T. KOAYASHI (1983):

Species differences in zearalenone-reductase activity

Food Chem. Toxicol. **21**, 167-173

URRY, W.H., H.L. WEHRMEISTER, E.B. HODGE und P.H. HIDY (1966):

The structure of zearalenone

Tetrahedron Lett. **27**, 3109-3114

USLEBER, E., J. LEPSCHY und E. MÄRTLBAUER (2000):

Deoxynivalenol in Mehlproben des Jahres 1999 aus dem Einzelhandel

Mycotoxin Res. **16 A**, 30-33

USLEBER, E. und E. MÄRTLBAUER (1998):

A limited survey of cereal foods from German market for *Fusarium* toxins
(deoxynivalenol, zearalenone, fumonisins)
Arch. Lebensmittelhyg. **49**, 42-45

USLEBER, E., E. MÄRTLBAUER, R. DIETRICH und G. TERPLAN (1991):

Direct enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of the
8-ketotrichothecene mycotoxins deoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol and
15-decetyldeoxynivalenol in buffer solutions
J. Agric. Food Chem. **39**, 2091-2095

USLEBER, E., V. RENZ, E. MÄRTLBAUER und G. TERPLAN (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., E. SCHNEIDER und E. MÄRTLBAUER (1998):

Untersuchungen zum Vorkommen von Deoxynivalenol, Zearalenon und Fumonisinen
in Speisegetreide.
In J. Wolff & T. Betsche (Eds.), Proceedings des 20. Mykotoxin-Workshop (131-135),
Detmold

VANYI, A., A. BATA, R. GLAVITS und F. KOVACS (1994):

Perinatal oestrogen syndrome in swine
Acta Vet. Hung. **42**, 433-446

VDLUFA:

Methodenbuch Band III-Futtermittel
3. Auflage von 1976
ISBN 3-922712-14-2

VESONDER, R.F., A. CIEGLER und A.H. JENSEN (1973):

Isolation of the emetic principle from *Fusarium*-infected corn
Appl. Microbiol. **26**, 1008-1010

VUDATHALA, D.K., D.B. PRELUSKY und H.L. TRENHOLM (1994):

Analysis of trace levels of deoxynivalenol in cow's milk by high pressure liquid chromatography

J. Liq. Chromatogr. **17**, 673-683

WALKER, F. und B. MEIER (1998):

Determination of the Fusarium mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol in contaminated whole wheat flour by liquid chromatography with diode array detection and gas chromatography with electron capture detection

Food Chem. Contam. **81**, 741-748

WEGMÜLLER, F. und W. STEINER (1994):

Fusarientoxine in Cerealien und cerealienhaltigen Nahrungsmitteln-Methode zur Bestimmung der wichtigsten Trichothecene und erste Ergebnisse

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **85**, 553-565

WOESE, K. (2001):

Monitoring of deoxynivalenol and zearalenone in cereals and cereal products from the state of Saxony-Anhalt, Germany

Mycotoxin Res. **17 A**, 45-48

WOLFF, J. (2005):

Effekte von Be- und Verarbeitung auf die Deoxynivalenol- und Zearalenongehalte in Getreide und Getreideprodukten

Mycotoxin Res. **21**, 246-250

YOSHIZAWA, T (1983):

Buchzitat, Fusarium metabolites other than trichothecenes

In Ueno, Y.: Trichothecenes-Chemicals, Biological and Toxicological Aspects.

Development in Food Science 4, Elsevier Science Publisher B.V., Amsterdam

YOSHIZAWA, T. und N. MOROOKA (1974):

Acute toxicities of new trichothecene mycotoxins: deoxynivalenol and its monoacetate

J. Food Hyg. Soc. Jpn. **15**, 261-269

YOSHIZAWA, T., T. SHIROTA und N. MOROOKA (1977):

Deoxynivalenol and its acetate as feed refusal principles in rice cultures of *Fusarium roseum* No. 117 (ATCC 28114)

J. Food Hyg. Soc. **19**, 178-184

YOUNG, L.G., L. McGIRR, V.E. VALLI, J.H. LUMSDEN und A. LUN (1983):

Vomitoxin in corn fed to young pigs

J. Anim. Sci. **57**, 655-664

YUWAI, K.E., K. S. RAO, K. SINGH, T. TANAKA und Y. UENO (1994):

Occurrence of nivalenol, deoxynivalenol, and zearalenone in imported cereals in Papua, New Guinea

Nat. Toxins **2**, 19-21

ZÖLLNER, P., D. BERNER, J. JODLBAUER und W. LINDNER (2000):

Determination of zearalenone and its metabolites α - and β -zearalenone in beer samples by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

J. Chromatogr. **738**, 233-241

ZÖLLNER, P., J. JODLBAUER, M. KLEINOVA, H. KAHLBACHER, T. KUHN, W. HOCHSTEINER und W. LINDNER (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

Monographien zur Risikobewertung - Verordnungen:

CANADY, R.A., R.D. COKER, S.K. EGAN, R. KRŠKA, T. KUIPER-GOODMAN, M. OLSEN, J. PESTKA, S. RESNIK und J. SCHLATTER (2001):

Deoxynivalenol - First draft prepared by the Fifty-sixth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), FAO Food And Nutrition Paper 74, FAO/WHO 2001

<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je01.htm>

ERIKSEN, G.S., J. PENNINGTON, J. SCHLATTER, J. ALEXANDER und A. THUVANDER (2000):

Zearalenon - First draft prepared by the Fifty-third meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), World Health Organization, Geneva, 2000 IPCS

<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v44jec14.htm>

BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT (2005):

ADV-Kodierungskataloge für die Übermittlung von Daten aus der amtlichen Lebensmittel- und Veterinärüberwachung sowie dem Lebensmittelmonitoring („ZEBS-Code“)

<http://www.bvl.bund.de>

BUNDESMINISTERIUM FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ, ERNÄHRUNG UND LANDWIRTSCHAFT (2004):

Verordnung zur Änderung der Mykotoxin-Höchstmengenverordnung und der Diätverordnung vom 4. Februar 2004

Bundesgesetzblatt, Jahrgang 2004 Teil I Nr. 5, ausgegeben zu Bonn am 12. Februar 2004

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (2000):

Report of the thirty-second Session of the Codex Committee on Food Additives and Contaminants. Beijing, VR China, Position Paper on Zearalenone, Joint FAO/WHO Food Standards Programme Codex Alimentarius Commission (2001): Twenty-fourth Session Geneva, Switzerland

<http://www.codexalimentarius.net/web/archives.jsp?year=01>

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (2003):

Discussion paper on Deoxynivalenol, 35. Session Codex Committee on Food Additives and Contaminants, Arusha Tansania, 17.-21. März 2003. CX7FAC 03/35, November 2002

<http://www.codexalimentarius.net/web/archives.jsp?year=03>

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (2004):

Joint FAO/WHO Food Standards Programme Codex Alimentarius Commission (2004): Twenty-seventh Session Geneva, Switzerland

EUROPEAN COMMISSION; SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD (1999):

Opinion on Fusarium toxins, Part 1: Deoxynivalenol (DON)
SCF/CS/CNTM/MYC/19 Final

EUROPEAN COMMISSION; SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD (2000):

Opinion of the Scientific Committee on Food on Fusarium Toxins, Part 2: Zearalenone (ZEA)
SCF/CS/CNTM/MYC/22 Rev 3 Final

EUROPEAN COMMISSION; SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD (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
SCF/CS/CNTM/MYC/27 Final

EUROPEAN COMMISSION, SCOOP (2003):

Reports on Tasks 3.2.10. Collection of occurrence data of Fusarium toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU Member States. April 2003, Directorate General Health and Consumer Protection

<http://europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/task3210.pdf>

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, EFSA (2004):

Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Deoxynivalenol (DON) as undesirable substance in animal feed (Question N° EFSA-Q-2003-036)

http://www.efsa.eu.int/science/contam/contam_opinions/478/opinion05_contam_ej73_deoxynivalenol_v2_enl.pdf

9 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ewald Usleber für die Überlassung des Themas sowie für sein unermüdliches Interesse und seine Unterstützung bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit.

Herrn Dr. Valeriu Curtui danke ich herzlich für die hervorragende Betreuung, die vielen Anregungen und die Sorgfalt bei der Durchsicht dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dr. Elisabeth Schneider und Herrn Dr. Ulrich Groß für die freundschaftliche Unterstützung bei der Korrektur und die wertvollen Vorschläge zur Verbesserung des Manuskriptes bedanken.

Mein Dank gilt ebenso allen Mitarbeitern der Professur für Milchwissenschaften, insbesondere Frau Renate Stumpf, Frau Margit Keßler und Frau Claudia Kress möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit danken.

Abschließend möchte ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, meinem Partner sowie meinen Freunden für die Geduld und Toleranz während dieser Zeit herzlich danken.

10. EIDESSTAATLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5157-2



9 783835 195157 0

