

SONDERDRUCK

Mykotoxine in Gewürzen

Validierte Methode zur Simultan-Bestimmung von Aflatoxinen und Ochratoxin A in Paprika- bzw. Chiligewürz

Maria Barricelli, Rita Kupfer und Bettina Börner

Neben dem seit 2006 in der EU für einige Gewürzsorten festgesetzten Höchstgehalt für Aflatoxine B1, B2, G1 und G2 ist seit dem 1. Juli 2010 für Paprika und Chili auch ein Höchstgehalt für Ochratoxin A gültig. Um diese Höchstgehalte zu überprüfen, wurde eine Methode entwickelt, mit der eine Simultan-Bestimmung aus diesen Matrices möglich ist.

Gewürzpflanzen bereichern mit ihren Aroma-, Bitter- und Scharfstoffen unsere Nahrung geschmacklich und regen den Appetit an. Sie aktivieren die Absonderung von Speichel, Magen- und Darmsäften und fördern so die Verdauung, sind also von wichtiger ernährungsphysiologischer Bedeutung. Besonders häufig im Gebrauch sind Gewürze aus den Tropen und Subtropen [1].

Gewürz-Import nach Deutschland

Gewürze gehören zum festen Bestandteil der mitteleuropäischen Küche. So werden in Deutschland ca. 550 g Gewürze pro Kopf und Jahr verwendet [2]. Die Statistik weist für das Jahr 2009 einen Import von rund 85 000 t nach Deutschland aus, wobei mengenmäßig Pfeffer und Paprika deutlich an der Spitze liegen, gefolgt von

Muskatnuss, Kümmel, Koriander und Ingwer [3]. Paprika und Chili sind jedoch oft mit Aflatoxinen und Ochratoxin A belastet.

Mykotoxine

Mykotoxine sind natürliche sekundäre Stoffwechsel-Endprodukte von Schimmelpilzen. Schimmelpilze zählen zu den bedeutendsten Verderbern unserer Lebensmittel.

Aflatoxine und Ochratoxin A sind natürlich vorkommende Mykotoxine, die für den Menschen stark toxisch sind. Aflatoxine werden von Schimmelpilzen der Gattungen *Aspergillus* in verschiedenen Lebens- und Futtermitteln gebildet. Sie sind laut Stellungnahme des SCF (Scientific Committee for Food) vom 23. September 1994 als genotoxische Karzinogene einzustufen. Dabei handelt es sich bei Aflato-



Maria Barricelli

» Zur Person

Staatl. geprüft. Lebensmittelchemikerin; verantwortlich für den Bereich Mykotoxine «

Tab. 1 Einstellungen der Parameter der Ionenquelle

Polarity	ES+
Cone Voltage	28 V
Source Temperature	100 °C
Desolvation Temperature	400 °C
Desolvation Gas	450 l/h
Cone Gas	100 l/h

Tab. 2 MRM-Experimente der Funktion 1

Channel	Reaction	Dwell [s]	Cone [V]	Collision
1	404 > 239	0,2	28	24
2	404 > 357,9	0,2	28	14

Inter Channel Delay: 0,05 s; RT Window: 3–9 min



Rita Kupfer

Dipl.-Lebensmittelchemikerin, von Juli 2009 bis Ende August 2010 als Praktikantin der Lebensmittelchemie am LLBB tätig

xin B1 um die bei weitem giftigste Verbindung [4]. Ochratoxin A wird von Schimmelpilzen der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium* auf Getreide, Kaffee, Gewürzen und anderen Lebensmitteln gebildet. Das wissenschaftliche Gremium für Kontaminanten in der Lebensmittelkette der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) hat in einem aktualisierten wissenschaftlichen Gutachten zu Ochratoxin A in Lebensmitteln vom 4. April 2006 Ochratoxin A als ein Mykotoxin mit nephrotoxischen und genotoxischen Eigenschaften eingestuft. Aufgrund unvollständiger Daten war die Einstufung von Ochratoxin A als Nierenkarzinogen beim Menschen jedoch nicht zu rechtfertigen [5].

Untersuchungen

Seit 1987 werden unterschiedliche Gewürzproben im Rahmen der amtlichen

Überwachung in Berlin auf ihre Gehalte an Aflatoxinen und Ochratoxin A untersucht. Dabei fiel auf, dass insbesondere Gewürzpaprika gefolgt von Chiligewürz am häufigsten gleichzeitig mit Aflatoxinen und Ochratoxin A belastet waren. Grüner, weißer und schwarzer Pfeffer waren nur wenig bis gar nicht mit diesen Mykotoxinen kontaminiert, genau wie Ingwer und Muskat.

Methodik

Ausgehend von unseren Untersuchungsergebnissen wurde es zur Überprüfung der Höchstgehalte für Aflatoxine und Ochratoxin A in Paprika- bzw. Chiligewürz notwendig, eine Methode zu entwickeln, die effizient die zur Verfügung stehenden Einzelmethoden ersetzt. Dazu sollte insbesondere die Isolierung beider Mykotoxine aus der Matrix in einem Arbeitsschritt erfolgen. Hierzu standen uns Immunoaffinitätssäulen der Fa. *LCTech GmbH*, Dorfen (Afla-OtaClean™) zur Verfügung, die eine gleichzeitige Isolierung von Aflatoxinen und Ochratoxin A u. a. aus Gewürzen ermöglichen. Die Methode wurde auf der Basis des uns von der Fa. *LCTech GmbH* zur Verfügung gestellten Benutzer-Handbuches zu den genannten Immunoaffinitätssäulen „Afla-Ota-CLEAN™ Immunoaffinitätssäulen für die Analytik von Aflatoxin B/G und Ochratoxin A Perfect Sample Preparation“ [6] entwickelt und für die Matrix Paprikagewürz validiert. Im Folgenden wird die vollständig validierte Methode vorgestellt.

Literatur

- | | | |
|---|--|---|
| [1] Franke W: Nutzpflanzenkunde. 3. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart (1985). | Aflatoxinen, Ochratoxin A und Patulin, S. 45–50. http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/reports/scf_reports_35.pdf | LC-MS/MS nach Reinigung über Immunoaffinitätssäulen. Deut Lebensm-Rundsch 103 (1), 1–3 (2007). |
| [2] afz-journal: Die Fleischerei, Lebensmittelpraxis. Blick/ff-delikat. | [5] The EFSA Journal 365 , 1–56 (2006). | [8] Verordnung (EG) Nr. 401/2006 der Kommission vom 23. Februar 2006 zur Festlegung der Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Kontrolle des Mykotoxingehalts von Lebensmitteln. ABl. Nr. L 70 vom 09.03.2006, S. 12. |
| [3] Quelle: Amtliche Außenhandelsstatistik 2009, vorläufige Ergebnisse. | [6] Benutzer-Handbuch Afla-OtaCLEAN™: Immunoaffinitätssäulen für die Analytik von Aflatoxin B/G und Ochratoxin A. LCTech GmbH, Dorfen, Deutschland, Stand: Oktober 2009. | |
| [4] Berichte des Wissenschaftlichen Lebensmittelausschusses, fünfunddreißigste Folge, Stellungnahme des Wissenschaftlichen Lebensmittelausschusses zu | [7] <i>Barricelli et al.</i> : Bestimmung von Ochratoxin A in Gewürzen mittels | |

Probenaufarbeitung

10 g Paprikapulver werden in einen 250 ml Zentrifugenbecher eingewogen, mit 20 ml Wasser versetzt und mindestens 10 min quellen gelassen. Dann werden 80 ml Methanol und 25 ml Hexan dazugegeben und 2 min mit einem Ultra-Turrax bei mittlerer Stufe homogenisiert. Dieses Extraktionsgemisch wird 10 min bei ca. 8 000 U kühl zentrifugiert. Anschließend wird der komplette Überstand über einen Faltenfilter filtriert. Mit einer Vollpipette wird dann vom Filtrat die Hexanphase durchstoichen und 5 ml methanolischer Extrakt entnommen. Dieser wird in einen 50-ml-Messzylinder überführt, mit 30 ml Phosphatpufferlösung (PBS pH 7,3) verdünnt und vollständig über die mit 5 ml PBS-Puffer konditionierte Immunoaffinitätssäule Afla-CLEAN™ gegeben. Dabei ist ein Vorratsbehälter für die IAC zu verwenden. Die Tropfgeschwindigkeit sollte 1–2 ml/min betragen. Die Säule wird anschließend mit 10 ml Osmosewasser bei 2 ml/min gewaschen und 2 min trocken gesaugt. Die gebundenen Mykotoxine werden mit 3 x 1 ml Methanol (1–2 ml/min) eluiert. Dabei muss der erste Milliliter Methanol mindestens 5 min auf die IAC-Säule einwirken. Das Eluat wird in einem 10-ml-Zentrifugenglas mit NS aufgefangen und unter Stickstoff bei 55 °C bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wird mit 1 ml eines Gemisches aus 80 Vol% Osmosewasser/0,1 % Essigsäure und 20 Vol% Acetonitril/0,1 % Essigsäure aufgenommen (Ultraschall!) und der HPLC-NSD bzw. HPLC-MS/MS nach Filtration durch einen 0,2 µl Spritzenfilter zugeführt. Die Quantifizierung erfolgte jeweils durch externe Kalibrierung.

Quantifizierung des Ochratoxin A durch HPLC-MS/MS [7]

Die HPLC/MS/MS-Anlage setzte sich aus einer HPLC-Anlage der Serie Alliance 2695 mit quaternärer Pumpe, Autosampler, Mikrodegasser und Säulenthermostat und einem Massenspektrometer

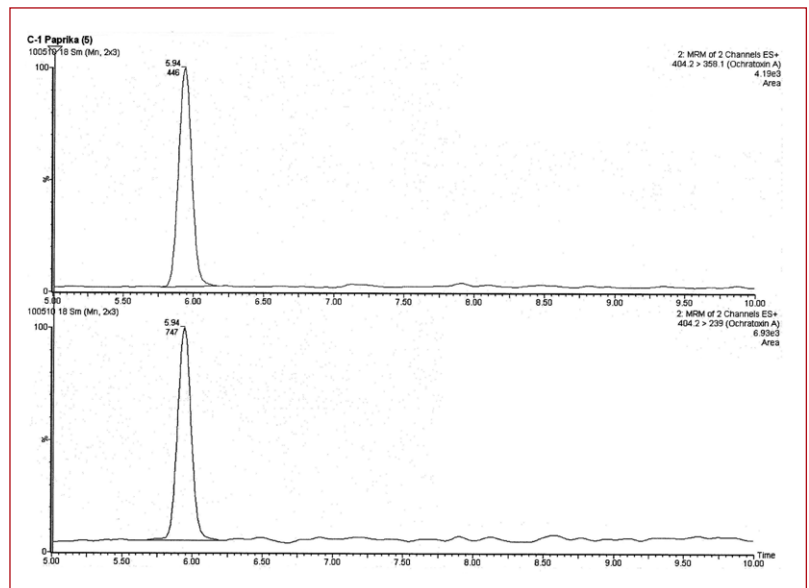


Abb. 1
LC-MS/MS-Chromatogramm einer dotierten analytischen Paprikapulver-Probe (ca. 5 µg/kg Ochratoxin A)

Quattro Micro der Firma Waters (Eschborn) zusammen.

Verwendet wurde eine HPLC-Säule Kromasil 100 C18 der Firma Phenomenex (Aschaffenburg) mit einer Länge von 75 mm, einem Innendurchmesser von 3,1 mm, einer Partikelgröße von 4 µm und einer Porengröße von 80 µm. Als Vorsäule wurde ein Security-Cartridge-System von Phenomenex (Aschaffenburg) benutzt, das ebenfalls hochreines C-18-Material enthält (2 mm Länge, 2 mm Durchmesser).

HPLC-Bedingungen

Eluent A: 50 % 0,1 % Essigsäure, Eluent B: 50 % Acetonitril, isokratisch, Flussrate: 0,2 ml/min, Säulentemperatur: 30 °C, Injektionsvolumen: 25 µl

MS/MS-Parameter

Das Massenspektrometer wurde mit der Electrospray-Ionenquelle (ESI+) zur Ionisierung des Analyten bestückt und im Multiple Reaction Monitoring Modus (MRM) betrieben.

Als Quantifizierungsspur wird für Ochratoxin A das Ionenmassenpaar 404/239 *m/z*, als Bestätigungsspur das Ionenmassenpaar 404/357,9 *m/z* herangezogen.

Anschrift der Autorinnen

Maria Barricelli
Maria.Barricelli@Landeslabor-BBB.de

Rita, Kupfer
Bettina Börner
Landeslabor
Berlin-Brandenburg
Fb II-3
Invalidenstr. 60
10557 Berlin

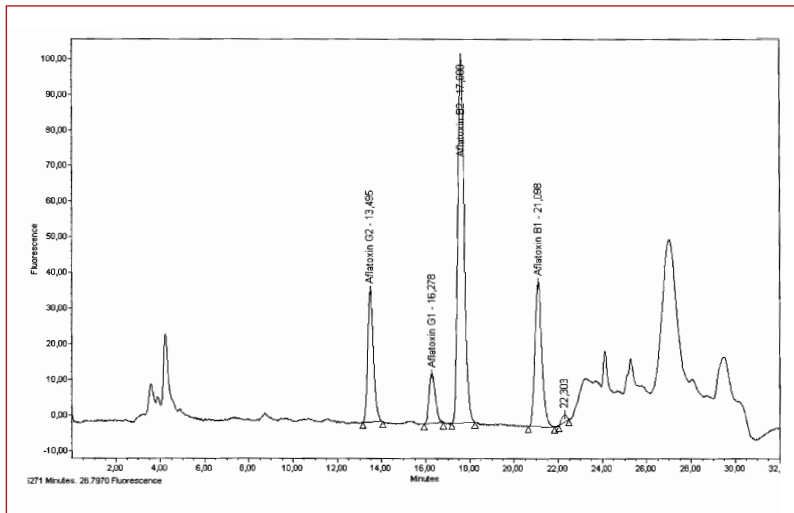


Abb. 2
Chromatogramm einer dotierten analytfreien Probe Paprikapulver (ca. 5 µg/kg je Aflatoxin)

Quantifizierung der Aflatoxine mittels HPLC-FLD nach fotochemischer NSD

Die Chromatografie erfolgte mit einer HPLC-Anlage der Fa. Waters, die sich aus einem Waters Autosampler 717 plus, einer Waters HPLC-Pumpe 510, einem Waters Multi λ-Fluoreszenz-Detektor 2475 und einem Säulentermostat zusammensetzte. Verwendet wurde eine HPLC-Säule Kromasil-100, RP 18 mit einer Länge von 250 mm, einem Innendurchmesser von 4,6 mm und einer Korngröße von 5 µm. Eine Vorsäule war mit dem gleichen Material (20 x 4,6 mm) gefüllt. Die Detektion erfolgte über den Fluoreszenz-Detektor

nach fotochemischer Nachsäulenderivatisierung mit einem fotochemischen Reaktor UVE™ der Fa. LCTech GmbH, Dorfen.

HPLC-Parameter

Flussrate: 0,96 ml/min, Eluent A: Osmosewasser, Eluent B: Acetonitril/Methanol 1:1, Injektionsvol.: 50 µl, Säulentemperatur: 35°C

Validierung

Die Anwendbarkeit der Methode wurde durch Aufarbeitung und Analyse einer mit Aflatoxinen und Ochratoxin A dotierten analytfreien Probe Paprikapulver im Bereich von ca. 1–25 µg/kg je Mykotoxin überprüft. Es wurden die Nachweis- und Bestimmungsgrenze nach DIN 32645 und die mittlere Wiederfindung ermittelt.

Untersuchung von zertifiziertem Referenzmaterial

Die Anwendbarkeit dieser Methode ist durch Aufarbeitung von zertifizierten Materialien (Paprikapulver FAPAS Test Material T1753, Chilipulver T0475) bestätigt worden. Die ermittelten Gehalte lagen im zertifizierten Bereich. Sie wird nun zur Bestimmung von Ochratoxin A in Paprika- und Chilipulver routinemäßig eingesetzt.

Fazit

Mit der oben beschriebenen kombinierten Immunoaffinitätssäule können in nur einem Aufarbeitungsschritt die Aflatoxine B1, B2, G1, G2 und Ochratoxin A aus der Matrix Paprika- und Chiligewürz isoliert werden. Die Effizienz des Labors kann dadurch erhöht werden.

Die ermittelten Bestimmungsgrenzen reichen aus, um die von der EU festgesetzten Höchstgehalte zu überprüfen. Weiterhin werden von der beschriebenen Analysenmethode die in Anhang II der VO (EG) Nr. 401/2006 der Kommission zur Festlegung der Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Kontrolle des Mykotoxingehalts von Lebensmitteln geforderten Wiederfindungsraten erreicht [8].

Gradientenelution:			
Zeit [min]	Flow [ml/min]	%A	%B
0	0,96	65	35
17	0,96	60	40
18	0,96	20	80
25	0,96	20	80
26	0,96	65	35
32	0,96	65	35

Parameter des Fluoreszenzdetektors
 λ_{Ex} : 365 nm, λ_{Em} : 435 nm, PMT Gain: 100, Attenuation: 64

Tab. 3 Ermittelte Nachweis- und Bestimmungsgrenzen und Wiederfindungen

Analyt	Nachweisgrenze [µg/kg]	Bestimmungsgrenze [µg/kg]	Mittlere Wiederfindung [%]
Aflatoxin B1	1	4	93
Aflatoxin B2	1	4	95
Aflatoxin G1	1	3	93
Aflatoxin G2	2	7	74
Ochratoxin A	2	4	99