

Aus dem Institut für Hygiene und Technologie
der Lebensmittel tierischen Ursprungs
(Lehrstuhl Prof. Dr. E. Märtlbauer)
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

**Untersuchung zum Vorkommen und zur Häufigkeit
von Deoxynivalenol in Lebensmitteln**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Bernd Ulrich Spindelböck
aus
München

München 2004

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer
Korefferent: Univ.-Prof. Dr. H. Eisgruber

Tag der Promotion: 23. Juli 2004

Eine wirkliche Wissenschaft ist nicht ein System von *Antworten*. Im Gegenteil, sie ist ein System von Problemen, die stets offen bleiben. Die Grundaxiome einer Wissenschaft sind Teilbestimmungen der Probleme.

Paul Valéry (1871 - 1945)

Für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	SCHRIFTTUM	3
2.1	Allgemeines	3
2.1.1	Physikalisch-chemische Eigenschaften	3
2.1.2	Biologische Eigenschaften	5
2.1.3	Bildung, Entstehung und Metabolismus	10
2.1.4	Vorkommen von DON in Lebensmitteln und Aufnahme durch den Verbraucher	13
2.1.5	Vermeidung und Detoxifikation	17
2.2	Analytik von DON	18
2.2.1	Extraktion und Reinigung	18
2.2.2	Nachweisverfahren	19
3	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	23
3.1	Materialien und Geräte	23
3.1.1	Chemikalien und Biochemika	23
3.1.2	Puffer und Lösungen	24
3.1.3	Immunreagenzien	24
3.1.4	Geräte	25
3.1.5	Sonstiges	25
3.2	Methodik	27
3.2.1	Kompetitiver direkter Enzymimmuntest zum Nachweis von DON	27
3.2.1.1	Durchführung	28
3.2.1.2	Sensitivität	28

II

3.2.1.3	Spezifität	28
3.3	Ergebnisse	31
3.3.1	Nachweis von DON in Lebensmitteln mittels Enzymimmuntests	31
3.3.1.1	Orientierende Vorversuche	31
3.3.1.1.1	Extraktion	32
3.3.1.1.2	Neutralisationstests	34
3.3.1.2	Nachweis von DON in einfachen Probenmatrices	34
3.3.1.2.1	Mehle	34
3.3.1.2.2	Teigwaren	37
3.3.1.2.3	Andere einfache Probenmatrices	39
3.3.1.3	Nachweis von DON in komplexen Probenmatrices	39
3.3.1.3.1	Getreidehaltige Säuglings- und Kleinkindernahrung	39
3.3.1.3.2	Andere komplexe Probenmatrices	41
3.3.2	Nachweis von DON in Lebensmitteln mittels HPLC	43
3.3.3	Analytik von Bieren	46
3.3.4	Vorkommen von Deoxynivalenol in Lebensmitteln des deutschen Marktes in den Jahren 2001 - 2003	53
3.3.4.1	Produktgruppen mit erhöhter Deoxynivalenolbelastung	61
3.3.4.2	Produktgruppen mit mittlerer Deoxynivalenolbelastung	63
3.3.4.3	Säuglings- und Kleinkindernahrung	64
3.3.4.4	Biere und bierähnliche Getränke	64
3.3.4.5	Vergleich von ökologischen und konventionellen Produkten	67
3.3.4.6	Grenzwertüberschreitungen	68
4	DISKUSSION	69
4.1	Analytik	69

III

4.2	Vorkommen	73
4.3	Belastung des deutschen Verbrauchers	76
5	ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY	78
6	LITERATURVERZEICHNIS	80

IV

Abkürzungsverzeichnis

3-AcDON	3-Acetyldeoxynivalenol
15-AcDON	15-Acetyldeoxynivalenol
3,15-DiAcDON	3,15-Diacetyldeoxynivalenol
BMVEL	Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft
cd-EIA	Kompetitiver direkter Enzymimmuntest
DON	Deoxynivalenol
FAO	Food and Agriculture Organisation of the United Nations
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HRP	Meerrettichperoxidase
IAC	Immunaффinitätschromatographie
KGW	Körpergewicht
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
LC	Flüssigkeitschromatographie
Max	Maximalwert
Min	Minimalwert
MS	Massenspektrometrie
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
RIVM	Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu; NL
SPR	Surface Plasmon Resonance (Oberflächenplasmon-Resonanz)
TDI	Tolerierbare tägliche Aufnahme
TMB	Tetramethylbenzidin
VK	Variationskoeffizient
VO	Verordnung
WHO	World Health Organisation
WFR	Wiederfindungsrate
ZEA	Zearalenon
ZEBS	Zentrale Erfassungs- und Bewertungsstelle für Umweltchemikalien des Bundesgesundheitsamtes

1 EINLEITUNG

Fusarien sind die wichtigsten toxinbildenden Schimmelpilze der nördlichen Hemisphäre. Als sogenannte Feldpilze infizieren sie verschiedene Getreidearten wie Mais, Weizen, Gerste, und Hafer, aber auch andere pflanzliche Produkte bereits auf dem Feld während der Ährenblüte. Enorme Ertragseinbußen für die Landwirtschaft können die Folge sein. Neben verminderter Qualität des Getreides und dem “Gushing”-Problem bei der Bierherstellung, birgt verschimmeltetes Getreide aber noch weitere Risiken, da diese Schimmelpilze auch Mykotoxine produzieren.

Deoxynivalenol (DON, Vomitoxin, 4-Deoxynivalenol, Rd-Toxin, Dehydronivalenol) gehört zu den Trichothecenen, der wichtigsten von Fusarien gebildeten Mykotoxingruppe. Es wird als sekundärer Stoffwechselmetabolit vorwiegend von *Fusarium graminearum* und *Fusarium culmorum* gebildet und ist, wie andere Trichothecene auch, chemisch und physikalisch sehr stabil. Dadurch übersteht es die Bearbeitungsprozesse von Getreide weitgehend unbeschadet und findet sich somit in der Nahrung von Mensch und Tier wieder. Durch DON-kontaminierte Futtermittel hervorgerufene akute Mykotoxikosen äußern sich bei Tieren durch Nahrungsverweigerung und Erbrechen (D’MELLO et al., 1999). Akute Vergiftungen wurden auch bei Menschen beschrieben, nach Aufnahme hoher Dosen kam es zu Übelkeit, Verdauungsstörungen, Schwindelgefühl und Kopfschmerzen (JECFA, 2001). Bei der im Rahmen des vorbeugenden Verbraucherschutzes wichtigen toxikologischen Bewertung einer chronischen Exposition stehen jedoch wie bei allen Trichothecenen die immunsuppressiven Eigenschaften (MEKY et al., 2001) des Toxins im Vordergrund. Darüber hinaus wird auch eine Beteiligung des Toxins bei der Pathogenese von IgA-Nephropathien (PESTKA, 2003) diskutiert.

Eine ständige Überwachung der Lebens- und Futtermittelproduktion ist daher sinnvoll. Im Rahmen der Europäischen Union wird derzeit über Grenzwerte für Deoxynivalenol und andere Trichothecene beraten. In Deutschland wurden mit der am 04.02.2004 verkündeten Verordnung zur Änderung der Mykotoxin-Höchstmengenverordnung und der Diätverordnung Höchstmengen für DON in Lebensmitteln festgelegt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Belastung von im Raum München erworbenen Lebensmitteln mit Deoxynivalenol zu ermitteln. Um einen hohen Probendurchsatz und hohe Nachweisempfindlichkeiten zu gewährleisten, wurden zum Nachweis von Deoxynivalenol Enzymimmuntests eingesetzt, wobei die Anwendbarkeit des Verfahrens anhand von künstlich und natürlich kontaminierten Lebensmitteln intensiv validiert wurde. Zur punktuellen Bestätigung positiver Proben wurde auch ein Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)-Verfahren etabliert. Einen Schwerpunkt bei den Untersuchungen zum Vorkommen von Deoxynivalenol in Lebensmitteln in den Jahren 2001 bis 2003 bildeten Teigwaren, Mehle, Biere und Kleinkindernahrung.

Diese Arbeit wurde durch das Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft im Rahmen des Verbundprojektes “Analytik und Vorkommen wichtiger Fusarientoxine (Deoxynivalenol, Zearalenon) sowie Aufnahme dieser Toxine durch den deutschen Verbraucher” (Az BLE 00HS 055) gefördert.

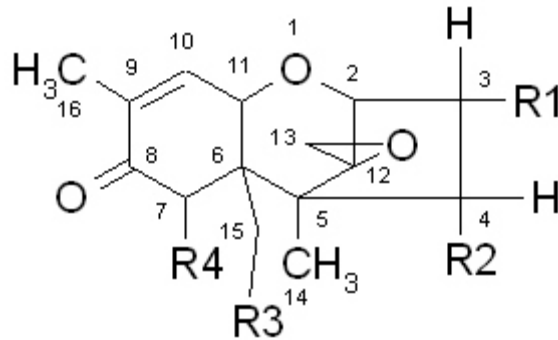
2 SCHRIFTTUM

2.1 Allgemeines

Seit der Entdeckung von DON Anfang der Siebziger Jahre hat sich eine Vielzahl von Publikationen mit den physikalisch-chemischen und biologischen Eigenschaften des Toxins, dessen Nachweisbarkeit, sowie dem weltweiten Vorkommen in Futter- und Lebensmitteln befasst. Der derzeitige Stand der Forschung wurde in jüngster Zeit in einer ganzen Reihe von Gutachten verschiedener nationaler und internationaler Gremien, wie z.B. des gemeinsamen FAO/WHO Experten-Kommittes (JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES; JECFA, 2001), des niederländischen Rijksintituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM; PIETERS et al., 1999 und 2001), sowie des wissenschaftlichen Lebensmittelausschusses (SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD; SCF, 1999 und 2002) der Europäischen Union zusammengefasst.

2.1.1 Physikalisch-chemische Eigenschaften

Deoxynivalenol ($3\alpha,7\alpha,15$ -trihydroxy-12,13-epoxytrichothec-9-en-8-on) ist ein chemisch und physikalisch stabiles Molekül, welches während Lagerung, Erhitzen, Mahlprozessen und anderen Produktionsschritten von Lebens- und Futtermitteln nicht zerstört wird (SCF, 1999). Es gehört zu den Trichothecenen, einer großen Gruppe von Mykotoxinen, die eine gemeinsame 12,13-spiroepoxy-Sesquiterpenoid-Grundstruktur (Abb. 1) aufweisen. Die Epoxidgruppe wird für die Toxizität der Verbindungen verantwortlich gemacht, Unterschiede im toxischen Potential der jeweiligen Verbindungen sind auf die verschiedenen Substituenten am Ringsystem zurückzuführen. Derzeit sind etwa 170 unterschiedliche Trichothecene bekannt, die sich anhand ihrer charakteristischen funktionellen Seitenketten in vier Gruppen einteilen lassen (Typ A - D), wobei das natürliche Vorkommen von Typ C und D zu vernachlässigen ist (KRSKA et al., 2001). Typ B Trichothecene, zu denen auch Deoxynivalenol gehört, besitzen an C-8 eine Carbonylgruppe (Abb. 1). Iso-Deoxynivalenol, ein Isomer von DON, weist hingegen an C-8 statt der Carbonyl- eine Hydroxylgruppe auf, De-epoxy-Deoxynivalenol (DOM-1) stellt ein mikrobielles Abbauprodukt des Toxins dar. Einen Überblick über die Substituenten einiger Typ



Toxin	R1	R2	R3	R4
Deoxynivalenol	OH	H	OH	OH
Iso-Deoxynivalenol*	OH	H	OH	=O
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

* Hydroxylgruppe an C8

Summenformel:	C ₁₅ H ₂₀ O ₆
Molekulargewicht:	296,3
Schmelzpunkt:	151 - 153 °C
Absorptionsmaximum:	218 nm
Molarer Extinktionskoeffizient (ε) in Methanol (218 nm):	6400

Abbildung 1: Strukturformel wichtiger Typ B Trichothecene, sowie physikalisch-chemische Eigenschaften von Deoxynivalenol

B Trichothecene gibt Abb. 1, weitere Details zur Struktur von Trichothecenen sind bei KRŠKA et al. (2001) zu finden

2.1.2 Biologische Eigenschaften

Deoxynivalenol gilt als häufige Ursache von Mykotoxikosen bei landwirtschaftlichen Nutztieren, wobei grundsätzlich Monogastrier, insbesondere Schweine, empfindlicher sind als Tiere mit einem Vormagensystem. Eine perorale DON-Aufnahme induziert bei Schweinen ab Konzentrationen von 0,05 - 0,2 mg/kg Körpergewicht (KGW) Erbrechen (daher der Name Vomitoxin). Ab einer Dosis von 1 - 2 mg DON/kg Futter zeigten junge Schweine Nahrungsverweigerung (Anorexie), wahrscheinlich als Folge einer erhöhten zentralen Serotoninausschüttung (PRELUSKY, 1996). Längere Aufnahme (sieben Wochen) eines mit DON belasteten Futters (4 mg DON/kg Futter) resultierte in Wachstumsdepression und Gewichtsverlust (FRIEND et al., 1986). Ähnliche Beobachtungen wurden auch in neueren Arbeiten (DÖLL et al., 2003; DÄNICKE et al., 2004) gemacht. Basierend auf den verfügbaren Literaturdaten wurde von DERSJANT-LI et al. (2003) eine Berechnung veröffentlicht, dass ein DON-Gehalt von 0,6 mg/kg Futtermittel eine 5 %ige Reduktion der Gewichtszunahmen beim Schwein zur Folge hat, wobei zwischen den beiden Parametern eine lineare Beziehung besteht. Die ökonomische Bedeutung von Mykotoxinen in der Tierproduktion wurde auch von D'MELLO et al. (1999) und CONCOVÁ et al. (2003) diskutiert.

DON verhindert die Proteinbiosynthese auf ribosomaler Ebene, sowie die DNA- und RNA-Synthese (SCF, 1999). Durch eine Inhibition der Lymphozytenproliferation, bzw. Hemmung der Makrophagenaktivität wirkt DON immunsuppressiv (SZKUDELSKA et al., 2002). DON weist nach derzeitigem Kenntnisstand weder karzinogene noch mutagene Eigenschaften auf, jedoch wurden verstärkt Transformationen von Mäuse-Embryozellen und klastogene Eigenschaften von Hamsterzellen beobachtet (ERIKSEN und ALEXANDER, 1998). Embryotoxische Eigenschaften bei Mäusen wurden ab Konzentrationen von 1 mg/kg KGW, das Zusammenwachsen und Fehlen von Rippen ab 0,5 mg/kg KGW und eine erhöhte postnatale Sterblichkeitsrate ab 0,375 mg/kg KGW beobachtet. Fertilitätsstörungen konnten bei Ratten erst bei Dosen von 2 mg/kg KGW festgestellt werden (PIETERS et al., 1999).

Eine umfangreiche Zusammenstellung und detaillierte Bewertung von älteren Arbeiten zur Toxizität von DON wurden in den Gutachten des SCF (1999), sowie der JECFA (2001) vorgenommen. Einen Überblick zu dem Vorkommen, der Bioverfügbarkeit und der Wirkung von Trichothecenen auf die menschliche Gesundheit, sowie epidemiologische Berichte über Massenerkrankungen geben CREPPY (2002) und SUDAKIN (2003). Im folgenden sind daher nur einige aktuellere Forschungsarbeiten zur biologischen Wirkung von DON aufgeführt.

Eine IgA-Überproduktion, sowie die daraus resultierende Ablagerung von Immunkomplexen im Nierenmesangium, ist Ursache der menschlichen IgA-Nephropathie. Diese ist für 20 - 40 % der weltweiten Glomerulonephritiden verantwortlich. PESTKA und ZHOU (2000) konnten zeigen, dass eine orale DON-Aufnahme von 10 ppm über zwölf Wochen bei Mäusen eine autoreaktive Serum-IgA-Überproduktion mit einem Geschlechtsdimorphismus zu Ungunsten der Männchen, sowie Hämaturie induzierte. In weiteren Arbeiten ergaben sich Hinweise darauf, dass die Überproduktion von IgA *in vivo* durch Änderung der Zytokinbildung von Makrophagen und T-Helferzellen vermittelt wird, wobei die Expression von Interleukinen (insbesondere IL-6) und TNZ- α hochreguliert wird. Andererseits wird die Expression von Proteinen (GRP78/BiP (ER) und p58 (IPK)), die der Aufrechterhaltung der Zellhomöostase und Verhütung von Apoptose dienen, unterdrückt. Eine Schlüsselrolle spielt hierbei, wie anhand einer Makrophagen-Zelllinie gezeigt werden konnte, die Induktion von Cyclooxygenase-2 (COX-2)-Genen (MOON und PESTKA, 2003). Diese selektive Wirkung auf die Expression von COX-2 konnte auch für andere Typ B Trichothecene verifiziert werden, jedoch nicht für Typ A und D Trichothecene (MOON et al., 2003). Die Rolle des tumor necrosis factor- α (TNF- α) und speziell des TNF-Rezeptors 1 bei der krankhaften IgA-Hochregulierung wurde anhand von TNF-Rezeptor 1 und 2-Knockout Mäusen bei PESTKA und ZHOU (2002) überprüft. Ein Zusammenhang zwischen den Beobachtungen bei Mäusen und der menschlichen IgA-Nephropathie wird derzeit intensiv diskutiert (PESTKA, 2003). Beim Schwein konnte inzwischen eine positive Korrelation zwischen dem IgA-Serumspiegel und einer DON-Aufnahme gezeigt werden (DROCHNER et al., 2003).

In vitro

Anhand von menschlichen Darmepithelzelllinien (HT-29-D4) untersuchten MARESCA et al. (2002) die Aufnahme von niedermolekularen Nahrungsbausteinen unter Einfluss von DON. Ab Konzentrationen von 2,96 µg/ml wurde selektiv der Transport von D-Glucose und D-Galaktose behindert, Konzentrationen über 29,6 µg/ml verursachten lokale Zellablösungen, Proteinverlust, Zellmorphologieveränderungen, eine erhöhte LDH-Aktivität und nach 48 h Apoptose. Demzufolge könnte die mangelnde Gewichtszunahme bei Versuchstieren, nach Aufnahme von DON, einerseits auf eine reduzierte Futteraufnahme, aber andererseits auch auf die mangelnde Resorption der Nahrungsbestandteile zurückzuführen sein.

Mit Hilfe von verschiedenen Testverfahren bestimmten CHAROENPORNSOOK et al. (1998) die 50 % Hemmungsdosis von verschiedenen Mykotoxinen, darunter auch DON, auf Rinder-Monozyten. Die Hemmungsdosis der durch mitogen-wirkende Substanzen induzierten Proliferation lag im Bereich von 0,04 bis 0,09 µg/ml. Es wurde vermutet, dass auch *in vivo* die humorale und zelluläre Immunsuppression von Rindern durch diese Mykotoxine induziert wird. Die dosisabhängige Zytotoxizität von DON (0,05 - 5 µg/ml) und sieben anderen *Fusarium*-Mykotoxinen konnte auch bei menschlichen Monozyten gezeigt werden, DON hatte zudem einen hohen Hemmeffekt auf die natural-killer-cell-Aktivität (BEREK et al., 2001). Die Proliferation von stimulierten menschlichen Lymphozyten unter DON-Einfluss wurde auch von MEKY et al. (2001) mittels MTT-Testverfahren überprüft, die 50 %-Hemmungsdosis lag bei 216 ng/ml. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch MINERVINI et al. (2004) bei Verwendung einer humanen erythroleukämischen Zelllinie (K 562).

In vivo

Charakteristisch für akute Intoxikationen mit DON sind bei Schweinen Vomitus, Anorexie, Gewichtsverlust und Diarrhoe, bei längerer Exposition wurden Gewebnekrosen des Gastrointestinaltraktes, des Knochenmarks und des lymphatischen Gewebes beobachtet. Auch bei DON-Fütterungsversuchen (0,05 - 1 mg/kg KGW) mit Mäusen und Ratten konnte konzentrationsabhängig Vomitus festgestellt werden (SCF, 1999). Der Einfluss von DON auf

das Immunsystem scheint, ähnlich wie bei anderen Trichothecenen, über die Apoptose-Induktion von lymphatischem Gewebe über Kortikosteroide, IL-1 β und möglicherweise auch über ACTH abzulaufen (ZHOU et al., 2000; ISLAM und PESTKA, 2003).

Dass die schädigenden Wirkungen von DON sich nicht nur in einer reduzierten Futteraufnahme, sondern zumindest bei höheren Dosen auch in metabolischen und hormonellen Störungen äußern, konnte von SZKUDELSKA et al. (2002) gezeigt werden. Nach dreimaliger intrakutaner Applikation von 1 mg DON/kg KGW wurde bei Ratten ein gleichzeitiger Anstieg des Insulins und des Glucagons, der Glucose und der freien Fettsäuren im Blut festgestellt. Eine Schädigung der B-Zellen des Pankreas durch das Toxin wurde diskutiert.

Bei Fütterungsversuchen über drei Monate, bei denen jungen Schweinen 0,08 - 0,16 mg DON/kg KGW (entspricht 2 - 4 mg/kg Futter) verabreicht wurden, konnten verminderte Zunahmen, höhere Lebergewichte, sowie ein Abfall der Serumproteine und Albumin festgestellt werden. Zeitweise waren ein Abfall des Hämatokrits, des Kalzium- und Phosphorgehaltes im Serum nachweisbar (BERGSØ et al., 1993). Viele Tierversuche zeigten, dass natürlich mit DON kontaminiertes Futter scheinbar toxischer wirkte, als mit Reinsubstanz versetztes (FRIEND et al., 1986). So konnten auch in einem umfangreichen Fütterungsversuch, bei dem Absatzferkel entweder getreidefreies (ergo DON-freies), oder mit natürlich kontaminiertem Weizen versetztes bzw. getreidefreies, mit reinem DON versetztes Futter (4 mg DON/kg) erhielten, Einbußen hinsichtlich der Futteraufnahme und des Wachstums nur bei Fütterung von natürlich kontaminiertem Weizen beobachtet werden (DILLENBURGER et al., 2000). Als hypothetisch mögliche Gründe für dieses Ergebnis wurden die Kontamination des Futters mit "maskierten Toxinen", wie DON-Pflanzenmetabolite (2.1.3) bzw. mit anderen Schimmelpilzmetaboliten, insbesondere anderen Trichothecenen, sowie Unterschiede im Futtermanagement genannt (LAUBER et al., 2001).

In einer Langzeitstudie über zwei Jahre wurden Mäuse mit DON (0,1 - 1,5 mg/kg KGW) gefüttert. Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte bei einer Dosierung von 5 und 10 mg/kg Futter weder verringerte Lebensdauer, noch biologisch relevante Veränderungen im Blutbild oder von klinisch-chemischen Parametern festgestellt werden. Auch die Neoplasierate war nicht

erhöht. Eine signifikant verminderte Zunahme und bei Weibchen ein erhöhter IgA- und IgG-Spiegel war jedoch bei diesen DON-Konzentrationen erkennbar. Ebenso wurden Veränderungen des Thymus, der Milz, des Herzens und der Leber beobachtet (IVERSON et al., 1995).

Aufgrund des in dieser Langzeitstudie beobachteten “No Observed Adverse Effect Levels” von 0,1 mg/kg KGW bei Mäusen und unter Verwendung eines Sicherheitsfaktors von 100 leitete das SCF (1999) für den Menschen eine tolerierbare Tagesaufnahme (“Tolerable Daily Intake”, TDI) von 1 µg je kg Körpergewicht ab. Da neben DON in Lebensmitteln jedoch oft auch andere Trichothecene, wie z.B. Nivalenol, T-2 Toxin, bzw. Fusarientoxine (Fumonisin, Fusarsäure, Zearalenon) gefunden werden (LANGSETH und RUNDBERGET, 1999; THUVANDER et al., 1999; MAY et al., 2000; MEYER et al., 2002; LOGRIECO, et al., 2003), stellt sich die Frage, inwieweit die Toxizität der Einzeltoxine durch additive und synergistische Wechselwirkungen beeinflusst wird. Ein solcher Synergismus der Einzeltoxine wurde in einem weiteren Gutachten des SCF (2002) jedoch als unwahrscheinlich eingestuft, wobei allerdings auch die limitierte Datenlage zu diesem Themenkomplex bemängelt wurde.

Aus dem asiatischen Raum wurde über eine akute Mykotoxikose bei Menschen berichtet. Nach dem Verzehr von verschimmeltem Getreide traten Übelkeit, Erbrechen, Verdauungsstörungen, Schwindelgefühl, Diarrhoe und Kopfschmerz auf. In den stark mit *Fusarien*-Spezies kontaminierten Getreideproben konnten neben DON (3 - 93 mg/kg) auch andere Trichothecene nachgewiesen werden, allerdings mit weitaus niedrigerer Inzidenz und in deutlich geringeren Konzentrationen (JECFA 2001). Bei einer anderen Epidemie in Indien konnten zusätzlich die Symptome Völlegefühl, akutes Abdomen, Schlundirritationen und Blut im Stuhl beobachtet werden. Auch hier wurden im verzehrten Lebensmittel noch andere Toxine nachgewiesen (ERIKSEN und ALEXANDER, 1998).

2.1.3 Bildung, Entstehung und Metabolismus

Deoxynivalenol-bildende Schimmelpilze

DON wird von Fungi imperfecti der Gattung *Fusarium* gebildet, in Mitteleuropa vornehmlich von *F. graminearum* Schwabe (perfekte Form: *Gibberella zae*) und *F. culmorum* (LOGRIECO et al., 2003). Aber auch *F. avenaceum*, *F. poae* und *Microdochium nivale* (ehemals *F. nivale*) sind in der Lage, DON zu produzieren (ERIKSEN und ALEXANDER, 1998). Fusarien sind potente Pflanzenschädlinge, welche nach Infektion der Getreideähren zur Blütezeit (Anthese), Ährenfäulnis ("partielle Taubährigkeit", ear- oder head blight, scab) verursachen. Eine Reihe von Faktoren beeinflussen die Häufigkeit des Befalls mit *Fusarien*-Spezies. Entscheidend für eine Infektion ist vor allem der Zeitpunkt des Niederschlags - Regenmenge, lokale Temperaturen oder die Luftfeuchtigkeit scheinen hingegen nur eine untergeordnete Rolle (BARTELS und RODEMANN, 2003) zu spielen. Eine direkte Korrelation zwischen Toxingehalt und Befallsrate der Getreidekörner mit Fusarien wird unterschiedlich diskutiert (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2002).

Fusarien-Spezies. sind aber auch in der Lage, nach der Ernte DON zu produzieren, solange die Wasseraktivität in den Getreidekörnern hoch genug ist. Das Wachstumsoptimum für *F. graminearum* liegt bei 25 °C, der niedrigste zum Wachstum benötigte a_w -Wert (Wasseraktivität des Substrates) bei 0,88. *F. culmorum* wächst hingegen bis zu a_w -Werten von 0,87 und optimal bei 21 °C (JECFA, 2001). Die genannten Fusarien treten ubiquitär vor allem in den gemäßigten Breiten der nördlichen Hemisphäre auf, Vorkommen werden aber auch aus Asien, Teilen Afrikas und Südamerikas gemeldet.

Metabolismus von DON und Carry-over

Prinzipiell gibt es für Pflanzen und Tiere zur Metabolisierung von Mykotoxinen die Möglichkeit der Transformation und der Konjugation. Die Biodegradation von DON in Pflanzen wurde anhand von Mais-, Weizen- und Süßkartoffel-Zellkulturen beleuchtet. Einen Überblick dazu gibt KARLOVSKY (1999). Der Hauptmetabolit scheint 3- β -D-Glucopyranosyl-4-deoxynivalenol,

ein Glykosidkonjugat von DON zu sein, daneben existieren mindestens noch zwei weitere Abbauprodukte, die jeweils ein niedrigeres Molekulargewicht als DON aufweisen (SEWALD et al., 1992; ENGELHARDT et al., 1999). Erst jüngst gelang es POPPENBERGER et al. (2003) aus *Arabidopsis thaliana* (Acker-Schmalwand) eine UDP-Glykosyltransferase zu isolieren, die in der Lage ist, DON durch Anheftung eines Glucose-Moleküls an C3 zu inaktivieren. Zur Identifizierung des Abbauproduktes mittels LC-MS wurde ein synthetisch hergestelltes DON-3-Glucosid verwendet (BERTHILLER et al., 2003).

Auch Mikroorganismen spielen in der Biotransformation von Mykotoxinen eine große Rolle. *In vitro* sind einige Hefestämme (*Saccharomyces cerevisiae* spp., *Kluyveromyces marxianus*) in der Lage, DON abzubauen (BÖHM et al., 1999), wobei aber große Unterschiede in der Abbauleistung der einzelnen Stämmen existieren (BÖHM et al., 2000; ŠTYRIAK et al., 2001). Das Interesse an Hefestämmen, respektive an zellwandständigen Enzymen, die in der Lage sind Mykotoxine abzubauen, ist vor allem in der Futtermittelindustrie sehr hoch (ADAM et al., 2001; DÄNICKE et al., 2002). Von VÖLKL et al. (1997) wurde der Bakterienstamm HOH107 beschrieben, der nach taxonomischen Gesichtspunkten eine neue Gattung der Proteobakterien darstellt. Dieser ist in der Lage, DON unter anaeroben Bedingungen mit Hilfe eines weiteren Bakterienisolates (HOH110) abzubauen. Die dabei entstehenden Produkte wurden als X1-DON (Molekulargewicht [MG] 310 Da), X2-DON und L1-DON (MG 278 Da) bezeichnet. Mittels Kernresonanzspektroskopie konnte gezeigt werden, dass das X1-DON am C2-Atom des Trichothecen-Skelettes eine zusätzliche Hydroxyl-Gruppe aufweist, sowie die Hydroxyl-Gruppe am C3 zur Ketogruppe oxidiert wurde. Die genaue Struktur der Verbindungen konnte aber nicht aufgeklärt werden.

Zur Metabolisierung von DON im tierischen Organismus, insbesondere beim Schwein wurden in jüngerer Zeit eine ganze Reihe von Untersuchungen veröffentlicht (RAZZAZI et al., 2002; ERIKSEN et al., 2003; RAZZAZI-FAZELI et al., 2003; VALENTA et al., 2003; BILY et al., 2004). Acetylierte DON-Analoga wie 3-Acetyl- und 15-AcetylDON werden im Magen durch Abspaltung der Acetylgruppen rasch und vollständig zu DON reduziert (ERIKSEN et al., 2003). Bei einmaliger Applikation von DON kann das Toxin bereits kurze Zeit (5 - 20 min) nach peroraler Aufnahme im Serum nachgewiesen werden, danach ist innerhalb einiger Stunden ein

rascher Abfall des Serumspiegels an freiem DON zu beobachten (BILY et al., 2004). Ein Großteil des Toxins (45 - 68 %) wird über den Urin ausgeschieden (PRELUSKY et al., 1988; ERIKSEN et al., 2003). Als Metabolite sind im wesentlichen nur DON-Glucuronide und das durch mikrobielle Deepoxidation im Dickdarm entstehende De-epoxy-deoxynivalenol (DOM-1) nachzuweisen. Das durchschnittliche Verhältnis von DON zu DOM-1 im Schweine-Urin liegt bei etwa 18 zu 1 (RAZZAZI-FAZELI et al., 2003). Dass die Fähigkeit zur Deepoxidierung bei unter experimentellen Bedingungen gehaltenen Schweinen induziert werden kann, konnte von PETERSON und ERIKSEN (2003) gezeigt werden. DON-Glucuronide konnten sowohl bei Milchkühen, Schafen und Ratten als auch beim Schwein im Urin nachgewiesen werden, wobei bei letzter Tierart sehr unterschiedliche Angaben zum Anteil des Glucuronids (5 - 50 %) an der Gesamttoxinquantität existieren (RAZZAZI et al., 2002; PETERSON und ERIKSEN, 2003).

Bei Wiederkäuern wird ein Großteil des DON bereits im Pansen zu DOM-1 detoxifiziert, weshalb diese Tiergruppe weniger empfindlich auf DON-Kontaminationen reagiert als Monogastrier. So konnte bei Mastbullen nach Aufnahme von fusarienkontaminiertem Futter (2,2 mg DON und 0,1 mg ZEA pro kg Totalration) keine negativen Auswirkungen festgestellt werden (DÄNICKE et al., 2002).

Über den Metabolismus von DON beim Menschen liegen nur wenige Angaben vor. DON-deepoxidierende Mikroorganismen konnten im Stuhl von jeweils fünf Frauen und Männern nicht nachgewiesen werden. Jedoch wurde die Deacetylierung von 3-AcDON zu DON bewiesen (ERIKSEN und PETERSON, 2003).

Die Gefahr der Übertragung (carry-over) von DON in Lebensmittel tierischer Herkunft wird, aufgrund der Nahrungsverweigerung der Tiere bei hoch kontaminiertem Futter und der raschen Metabolisierung und Eliminierung von DON, als gering betrachtet (POLLMANN et al., 1985). Bei Schweinen, die natürlich kontaminiertes Futter (3,5 mg DON und 0,18 mg ZEA/kg) erhielten, konnte der höchste DON-Gehalt in den Gallen, gefolgt von den Lebern, festgestellt werden. In der Skelettmuskulatur wurden nur vereinzelt Werte knapp über der Nachweisgrenze gefunden (BAUER et al., 2000).

2.1.4 Vorkommen von DON in Lebensmitteln und Aufnahme durch den Verbraucher

Viele Untersuchungen der letzten Jahre zeigten, dass DON weltweit als vorherrschendes Trichothecen häufig in den Getreidesorten Weizen, Gerste, Mais, weniger in Hafer, Reis, Roggen und Triticale vorkommt. Für Länder des mittleren Ostens, Lateinamerikas und Europas konnte Weizen als Hauptquelle von DON identifiziert werden. Es sind sowohl Winter-, Sommer-, als auch Hart- und Weichweizen-Sorten betroffen (JECFA, 2001). In Tab. 1 ist eine Auswahl von aktuellen Berichten über das Vorkommen von DON in Lebensmitteln und in Getreide zur Futtermittelproduktion zusammengestellt. Da klimatische Einflüsse eine massive Rolle beim Befall der Ernte mit Fusarien spielen, wurden demzufolge, abhängig vom jeweiligen Erntejahr, starke Unterschiede in der DON Belastung festgestellt (JECFA, 2001; DÖLL et al., 2002; KIRCHHEIM et al., 2002; RASMUSSEN et al., 2003). So lag beispielsweise die durchschnittliche DON-Belastung von Weizenproben, die im Rahmen der besonderen Ernteermittlung in Deutschland gezogen wurden, im Jahr 2001 bei 69 µg/kg, 2002 hingegen fast doppelt so hoch (136 µg/kg; WOLFF, 2003).

Mehrere Untersuchungen deuten darauf hin, dass möglicherweise Produkte aus ökologischer Landwirtschaft einen geringeren Kontaminationsgrad und eine geringere Kontaminationshäufigkeit aufweisen, als Produkte aus konventionellem Anbau (SCHOLLENBERGER et al., 2002 und 2003; BASSEN und THIELERT, 2000; DÖLL et al., 2002; KIRCHHEIM et al., 2002).

Die tägliche DON-Aufnahme des Menschen wird üblicherweise über die durchschnittliche Toxinkonzentration in Lebensmitteln und deren durchschnittlicher Verzehrsmenge rechnerisch ermittelt. Derzeitige Schätzungen deuten darauf hin, dass die tägliche DON-Aufnahme in Abhängigkeit von den jeweiligen regionalen Ernährungsmustern der Bevölkerung zwischen 0,77 und 2,4 µg/kg KGW pro Tag beträgt (JECFA, 2001). CIRILLO et al. (2003) errechneten anhand des durchschnittlichen Nudel- und Brotkonsums eine DON-Belastung der italienischen Bevölkerung von 7,88 µg pro Tag und Kopf. Das niederländische RIVM wies darauf hin, dass insbesondere Kinder im Alter von einem bis vier Jahren als Risikogruppe anzusehen sind

(PIETERS et al., 1999). Die tägliche Aufnahme von DON wurde in dieser Altersstufe bei Jungen auf 11,7 µg und für Mädchen auf 8,3 µg geschätzt. Dies stellt laut dieser Studie eine Ausschöpfung des TDI von 1 µg/kg KGW dar. In einer Folgestudie des RIVM wurde darauf hingewiesen, dass bei der in einer Erhebung festgestellten durchschnittlichen DON-Belastung des niederländischen Weizens mit 446 µg/kg bei 80 % der einjährigen Kinder mit einer Überschreitung des einfachen TDI zu rechnen ist bzw. bei 20 % der Kinder sogar der zweifache TDI überschritten würde. Für vierjährige Kinder lagen diese Werte bei 50 bzw. 5 % (PIETERS et al., 2001).

In Mais aus chinesischen Provinzen mit einer hohen Speiseröhrenkrebsrate bei Menschen ist DON, neben anderen Trichothecenen, sowie Zearalenon, häufig in hohen Konzentrationen nachgewiesen worden (HSIA et al., 1988). Zur Untermauerung dieser epidemiologischen Befunde wurde von MEKY et al. (2003) ein Verfahren entwickelt, das basierend auf dem Gehalt an DON und dessen Hauptmetaboliten im Urin Aussagen über die tatsächliche DON-Aufnahme exponierter Personen ermöglichen soll. Es wurden Probanden aus zwei chinesischen Provinzen, eine davon mit deutlich erhöhter Speiseröhren-Krebsrate, untersucht. Die Mittelwerte der elf Probanden aus der höher exponierten Provinz betrug 37, die der vier weniger exponierten 12 ng DON/ml Urin. Aufgrund dieser Werte und basierend auf Metabolismus-Studien in der Ratte wurde die tägliche DON-Aufnahme der untersuchten Personen auf 1,1 - 7,4 µg/kg/d bzw. auf 0,3 - 1,4 µg/kg/d geschätzt.

Tabelle 1: Natürliches Vorkommen von DON in Getreide und Lebensmitteln

Probenmaterial	n	% positiv	Ursprungsland	DON-Gehalt (µg/kg)	Referenz
Hafer	178	78	Norwegen	63 ¹⁾	LANGSETH und RUNDBERGET (1999)
Weizen	169	15		16 ¹⁾	
Gerste	102	20		34 ¹⁾	
Lebensmittel	447	33	Baden-Württemberg	k.A.	BASSEN und THIELERT (2000)
Weizen	11444	57	Argentinien, Brasilien,	1 - 5700 ³⁾	JECFA (2001)
Mais	5349	41	Canada, China, England,	3 - 3700 ³⁾	
Gerste	1662	59	Finnland, Deutschland, Italien,	4 - 9000 ³⁾	
Hafer	864	68	Niederlande, Norwegen,	4 - 760 ³⁾	
Roggen	295	49	Schweden, Uruguay, USA	13 - 240 ³⁾	
Reis	154	27		6 - 5100 ³⁾	
Weizen	196	65	Thüringen	1380 ¹⁾	DÖLL et al. (2002)
Roggen	69	28		450 ¹⁾	
Weizen konv.		40 - 71	Thüringen	270 - 610 ²⁾	KIRCHHEIM et al. (2002)
Weizen ökol.		23 - 54		140 - 460 ²⁾	
Triticale konv.	1172	60 - 75		490 - 1550 ²⁾	
Roggen konv.		6 - 34		160 - 370 ²⁾	
Gerste konv.		23 - 51		150 - 160 ²⁾	

Fortsetzung Tabelle 1:

Natürliches Vorkommen von DON in Getreide und Lebensmitteln

Probenmaterial	n	% positiv	Ursprungsland	DON-Gehalt (µg/kg)	Referenz
Weizenmehl konv. Weizenmehl ökol.	36 24	100 96	Südwest-Deutschland	394 ¹⁾ / 295 ²⁾ 131 ¹⁾ / 120 ²⁾	SCHOLLENBERGER et al. (2002)
Getreide, Lebensmittel	202	84	Italien	19 - 65 ²⁾	CIRILLO et al. (2003)
Kleinkindernahrungsmittel	363	63	Nordamerika, Europa	32 - 150 ¹⁾	LOMBAERT et al. (2003)
Weizenmehl Roggenmehl Hartweizenmehl	88 69 33	85 59 100	Dänemark Dänemark Schweden	32 ¹⁾ / 10 ²⁾ 17 ¹⁾ / 10 ²⁾ 1153 ¹⁾ / 1224 ²⁾	RASMUSSEN et al. (2003)

- 1): Mittelwert
 2): Median
 3): Kontaminationsbereich
 % positiv: Prozentsatz der auf DON positiv getesteten Proben
 ges.: gesamte Probenanzahl
 k.A.: keine Angaben
 konv.: Produkte aus konventioneller Landwirtschaft
 n: Anzahl der Proben
 ökol.: Produkte aus ökologischer Landwirtschaft

2.1.5. Vermeidung und Detoxifikation

Weit verbreitet ist die Annahme, dass es möglich ist, durch den Einsatz von Fungiziden die DON-Kontamination des Getreides zu verhindern bzw. zu reduzieren. Die richtige Formulierung und Dosierung, vor allem aber der richtige Zeitpunkt zum Ausbringen ist kritisch abzuwägen, denn auch gegenteilige Effekte sind beobachtet worden (GAREIS und CEYNOWA, 1994, RAMIREZ et al., 2004). Das Zeitfenster zum Ausbringen der Fungizide bewegt sich während der Anthese im Rahmen von etwa vier Tagen (BARTELS und RODEMANN, 2003). Eine große Rolle spielt auch die Fruchtfolge auf dem Feld, respektive die vorangegangene Ackerfrucht (besonders anfällig ist Weizen nach der Vorfrucht Mais), das Bodenmanagement und die Bodenbearbeitung, sowie eine optimierte Lagerung nach der Ernte (BARTELS und RODEMANN, 2003). Ein Augenmerk liegt in letzter Zeit auch auf der Züchtung von fusarienresistenten Getreidesorten (MAGAN et al., 2002; MENNITI et al., 2003). Einen Überblick zum aktuellen Stand bei Weizen findet sich bei BARTELS und RODEMANN (2003).

Das Einsilieren stellt eine Möglichkeit zur Detoxifizierung von DON-kontaminiertem Tierfutter dar. Eine Übersicht dazu findet sich bei RICHTER et al. (2002). Eine weitere Möglichkeit zur Verringerung kann in der Zugabe von detoxifizierenden Substanzen gesehen werden (DÄNICKE et al., 2002). Um eine Resorption zu verhindern, kann das Toxin während der Passage durch den Verdauungstrakt sowohl an eine Substanz gebunden werden, als auch durch ein Additiv in ein weniger schädliches Produkt umgewandelt werden. Übliche Bestandteile dieser Futterbeimengungen sind Extrakte von Hefezellwänden, Bentonite oder bestimmte Mikroorganismen. Eindeutige Beweise zur Wirksamkeit dieser Absorbentien stehen jedoch noch weitgehend aus (DÄNICKE et al., 2002; DÄNICKE und DÖLL, 2003).

Müllereitechnische Prozesse (Sieben, Mahlen) tragen zur Verminderung des DON Gehalts im Getreide bei, da die Pilzhyphen vor allem in den äußeren Schichten des Getreidekorns zu finden sind. Durch das Aussieben und Entfernen der Mehlstäube können die befallenen, im spezifischen Gewicht meist niedrigeren Partikel aussortiert werden und dadurch der Gehalt an DON gesenkt werden (SCHOLLENBERGER et al., 2002). Es gibt Hinweise, dass der Herstellungsprozess bei Broten, sowie das Kochen von Nudeln eine weitere Reduktion des Toxingehalts zur Folge

haben. So wurden in Broten im Vergleich zum Ausgangsmehl zwischen 10 und 49 % geringere DON-Gehalte festgestellt (WOLFF, pers. Mitteilung). Nach der Zubereitung von Nudeln konnten bis zu 84 % des DON-Gehaltes der Rohware im Kochwasser nachgewiesen werden (NOWICKI et al., 1988; BOCKHORN et al., 2001).

2.2 Analytik von DON

Zum Nachweis von DON existiert eine breite Palette an physikalisch-chemischen und immunchemischen Methoden, die sich in ihrer Spezifität, Sensitivität und im Arbeitsaufwand, insbesondere im Hinblick auf den routinemäßigen Einsatz, unterscheiden. Prinzipiell sind für den physikalisch-chemischen Nachweis des Toxins meist aufwendige Reinigungsschritte nach der Extraktion nötig, während bei der Verwendung von Enzymimmuntests vielfach eine einfache Verdünnung des Rohextraktes bereits zu akzeptablen Ergebnissen führt. Eine umfassende Übersicht zu den gängigen Nachweismethoden für Typ A- und B-Trichothecene wurde von KRŠKA et al. (2001) veröffentlicht. Die folgenden Ausführungen beschränken sich deshalb auf einige grundlegende Anmerkungen, sowie aktuelle Entwicklungen im Bereich der DON-Analytik

2.2.1 Extraktion und Reinigung

Prinzipiell bereitet die Extraktion von DON aufgrund dessen hoher Polarität keine großen Probleme, wobei allerdings schon TRENHOLM et al. (1985) darauf hinwiesen, dass bei natürlich kontaminierten Proben die Extraktionseffizienz durch längere Extraktionszeiten gesteigert werden kann. Üblicherweise werden zur Extraktion von DON aus Lebens- und Futtermitteln Methanol/Wasser- (CZERWIECKI und WILCZYNSKA, 2003; LOMBAERT et al., 2003) und insbesondere Acetonitril/Wasser-Gemische (LANGSETH und RUNDBERGET, 1999; CIRILLO et al., 2003; PLATTNER und MARAGOS, 2003; BILY et al., 2004) eingesetzt. MATEO et al. (2001), die die Effektivität von fünf verschiedenen Extraktionslösungen bei Mais und Weizen überprüften, erhielten die besten Ergebnisse bei Verwendung eines Acetonitril/Wasser-Gemisches (84/16).

Für die physikalisch-chemischen Nachweisverfahren ist eine weitere Reinigung des Rohextraktes notwendig. Hierzu wurden in der Literatur eine ganze Reihe von verschiedenen Säulenmaterialien, wie z.B. Kieselgel, Florisil, Aluminiumoxid, Aktivkohle, C₁₈-Kartuschen, eingesetzt. In jüngerer Zeit wurde in einer ganzen Reihe von Publikationen die Verwendung der von der Fa. Romer entwickelten MycoSep-Säulen propagiert, die ein schnelles Clean-up des Extraktes ermöglichen (RUPP, 2002; RASMUSSEN et al., 2003; RAZZAZI-FAZELI et al., 2003). Daneben setzen sich aber auch immer mehr die in der Aflatoxin-Analytik bereits lange etablierten Immunaффinitätssäulen durch (CZERWIECKI und WILCZYNSKA, 2003; MEKY et al., 2003; VALENTA et al., 2003). Eine weiteres, in der Entwicklung befindliches Alternativverfahren zum Clean-up wurde von WEISS et al. (2003) beschrieben. Bei den sog. "molecularly imprinted polymers" wird eine spezifische "Maske" um das DON-Molekül polymerisiert. Mit dieser "Maske" können HPLC-Säulen gefüllt und nach Entfernung des DON-Moleküls als stationäre Phase verwendet werden. Die Vorteile sollen in der thermischen, mechanischen und chemischen Stabilität des Materials liegen.

2.2.2 Nachweisverfahren

Umfangreiche Übersichten zum Nachweis von DON mittels biologischer, physikalisch-chemischer und immunologischer Methoden finden sich bei GESSLER (1997), sowie bei KRŠKA et al. (2001). Biologische Verfahren werden aufgrund ihrer fehlenden Spezifität heute nur mehr bei speziellen Fragestellungen eingesetzt, kürzlich wurde von WIDESTRAND et al. (2003) ein Zellkulturtest zum Nachweis von Trichothecenen in Getreide beschrieben; der 50 %-Wert für DON lag bei 263 ng/ml.

Die jahrelang in der DON-Analytik dominierenden gaschromatographischen Verfahren (GC), bei denen das Toxin nach Derivatisierung mit Trimethylsilyl-Derivaten (CIRILLO et al., 2003) bzw. Acylierung mit reaktiven Flourverbindungen wie Heptafluorbutyrylimidazol (LOMBAERT et al., 2003) mittels Elektroneneinfangdetektoren (ECD) bzw. massenspektrometrisch nachgewiesen wurden, haben in den letzten Jahren an Bedeutung verloren, da aufgrund des hohen Arbeitsaufwandes der Probendurchsatz in der Regel recht niedrig ist.

Hochdruckflüssigkeitschromatographische (HPLC) Verfahren spielten im Gegensatz zur Gaschromatographie lange Zeit nur eine untergeordnete Rolle, da DON aufgrund der fehlenden Fluoreszenzeigenschaften und der schwachen UV-Absorption nur mit großem Extraktionsaufwand in ausreichender Empfindlichkeit nachgewiesen werden konnte. Dies änderte sich durch die kommerzielle Verfügbarkeit von Immunaффinitätssäulen, aber auch durch die Einführung neuer Festphasen wie den MycoSep-Säulen. Durch Kopplung der HPLC mit der Massenspektrometrie (LC-MS) wurden zudem die Sensitivität und Spezifität der Analysen deutlich verbessert (KAPPENSTEIN et al., 2002; PLATTNER und MARAGOS, 2003; BILY et al., 2004).

In der Deoxynivalenol-Analytik werden seit Jahren erfolgreich immunchemische Verfahren nicht nur als Screening-Methode, sondern auch zur quantitativen Bestimmung eingesetzt. Das gebräuchlichste Messverfahren stellt der ELISA dar, da mit dieser Methode eine weitgehend einfache Probenaufbereitung gewährleistet ist. Weitere Vorteile sind die vergleichsweise niedrigen Betriebskosten, eine relativ kurze Messdauer und somit ein hoher Probendurchsatz. ELISAs zum Nachweis von DON sind kommerziell von verschiedenen Firmen, wie beispielsweise von r-Biopharm, Neogen, Transia erhältlich.

Mit dem Ziel extrem kurze Analysenzeiten zu realisieren, wurde von MARAGOS und PLATTNER (2002) ein Fluoreszenz-Polarisations-Immunoassay (FPI) entwickelt. Dieses System macht sich die Depolarisation von polarisiertem Licht zunutze, das durch Verdrängen des Tracers von den Antikörperbindungsstellen durch den Analyten induziert wird. Die Messzeit betrug 2 min, allerdings lag die Nachweisgrenze für DON in Mais und Weizen relativ hoch (0,5 mg/kg).

SCHNERR et al. (2002), wie auch TÜDÖS et al. (2003) beschrieben einen auf dem Phänomen der Oberflächenplasmonresonanz (engl. "surface plasmon resonance"; SPR) basierenden indirekt kompetitiven Enzymimmuntest. Mit diesem Verfahren kann der Reaktionsablauf (Antigen-Antikörper-Bindung) in Echtzeit verfolgt werden, so dass wiederum kurze Testzeiten realisiert werden können. Tab. 2 gibt einen Überblick zu einigen neueren Arbeiten auf dem Gebiet der DON-Analytik.

Tabelle 2: Auswahl einiger aktueller Verfahren zum Nachweis von DON in Lebens- und Futtermitteln

Matrix	Extraktion	Aufreinigung	Messverfahren	Toxine	LOD/LOQ (µg/kg)	WFR (%)	Referenz
Zerealien	MeOH/H ₂ O (70/30)	ChemElut®	GC-MS	DON, NIV HT-2.	k.A./20	91	LOMBAERT et al. (2003)
Weizen	PBS	-	cd - ELISA	DON, 3-AcDON	50/k.A.	89	MARAGOS & McCORMICK (2000)
Mais, Reis, Weizen	CH ₃ CN/H ₂ O (84/16)	MycoSep 225	GC-ECD	DON, NIV u.a	5 / 25	72,9 - 96,8	MATEO et al. (2001)
Weizenmehl	CH ₃ CN/H ₂ O (84/16)	Multisep bzw. IA-Säulen	LC-APCI-MS/MS	DON	5 / 10	k.A.	KAPPENSTEIN et al. (2002)
Weizen, Mais	PBS	-	FPI	DON	k.A. /500.	71,2 - 94,6	MARAGOS & PLATTNER (2002)
Weizenmehl, -kleie	CH ₃ CN/H ₂ O (84/16)	MycoSep 225 + IA-Säulen	HPLC-UV	DON	50/k.A.	82	RUPP (2002)

Fortsetzung Tabelle 2: Auswahl einiger aktueller Verfahren zum Nachweis von DON in Lebens- und Futtermitteln

Matrix	Extraktion	Aufreinigung	Messverfahren	Toxine	LOD/LOQ (µg/kg)	WFR (%)	Referenz
Weizen	MeOH/H ₂ O (10/90) mit 6 % (w/v) PVP	MycoSep	SPR Assay	DON	390	104	SCHNERR et al. (2002)
Gerste, Roggen, Weizen	MeOH	IA-Säule	HPLC-UV	DON	10/50	60 - 69	CZERWIECKI & WILCZYNSKA (2003)
Mais	CH ₃ CN/H ₂ O (84/16)	MycoSep 227	LC-ACPI-MS	DON, NIV u.a.	k.A./50.	82	RAZZAZI-FAZELI et al. (2003)
Weizen	H ₂ O; CH ₃ CN	-	SPR- Immunoassay	DON	100.	k.A.	TÜDÖS et al. (2003)
Mais, Weizen	CH ₃ CN/H ₂ O (84/16)	-	LC-MS/MS	DON, NIV	50 / k.A.	k.A.	PLATTNER & MARAGOS (2003)

APCI: Atmospheric Pressure Chemical Ionisation
 EA: Ethylacetat
 LOD: Nachweisgrenze
 NIV: Nivalenol
 WFR: Wiederfindungsrate

DAD: Diodenarray Detektor
 k.A.: keine Angaben
 LOQ: Bestimmungsgrenze
 PVP: Polyvinylpyrrolidon

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Chemikalien und Biochemika

3-Acetyldeoxynivalenol (Sigma-Aldrich, A-6166)

15-O-Acetyl-4-Deoxynivalenol (Sigma-Aldrich, A-1556)

α -Glucosidase (α -D-Glucosidglucohydrolase; Sigma-Aldrich, G-0660)

β -Glucosidase (β -D-Glucosidglucohydrolase; Sigma-Aldrich, G-0395)

Aceton p.a. (Riedel-de Haën, 32201)

Acetonitril LiChrosolv[®] (Merck, 1.00030)

Casein (Sigma-Aldrich, C-8654)

Chloramin T Trihydrat (Merck, 8.18705)

Citronensäure-Monohydrat p.a. (Merck, 1.00242)

Deoxynivalenol (DON; Sigma-Aldrich, D-0156)

Dextranase (1,6- α -D-Glucan 6-glucohydrolase; Sigma-Aldrich, D-8144)

3,15-Diacetyldeoxynivalenol (eigene Herstellung; GESSLER, 1997)

Ethylacetat p.a. (Merck, 1.09623)

Fusarenon X (Sigma-Aldrich, F-6011)

n-Heptan p.a. (Merck, 1.04379)

Kaliumhydroxid p.a. (Riedel-de Haën, 30614)

Kaliumdihydrogenphosphat p.a. (Riedel-de Haën, 30407)

Methanol p.a. (Merck, 1.06009)

Methanol Chromasolv[®] (Riedel-de Haën, 34860)

Natriumazid (Merck, 1.06688)

Natriumcarbonat p.a. (Riedel-de Haën, 31432)

Natriumchlorid p.a. (J.T. Baker, 278)

Natriumhydrogencarbonat p.a. (Riedel-de Haën, 31437)

di-Natriumhydrogenphosphat p.a. (Riedel-de Haën, 30427)

Nivalenol (Sigma-Aldrich, N-7769)

Schwefelsäure p.a. (Merck, 1.00731)

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (Sigma-Aldrich, T-2885)

Tween 20 (Sigma-Aldrich, P-1379)

Wasserstoffperoxid 30 % p.a. (Merck, 7209)

3.1.2 Puffer und Lösungen

Bicarbonatpuffer: 0,05 mol/l, pH 9,6

Casein-PBS -Lösung: 1 % bzw. 2 % (w/v) Natrium-Caseinat in PBS

Citratpuffer: 0,21 mol/l mit 3,15 mmol/l H₂O₂, pH 3,95

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS): 0,01 mol/l Phosphatpuffer mit Zusatz
von 0,12 mol/l Natriumchlorid, pH 7,3

Phosphatpuffer: 0,1 mol/l, pH 7,4

Tetramethylbenzidin-Lösung (TMB): 1 mmol/l 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
in 5 ml Aceton und 45 ml Methanol

Substrat-Chromogen-Lösung: 20 Teile Citratpuffer mit H₂O₂-Zusatz und ein Teil TMB-Lösung

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

3.1.3 Immunreagenzien

Kaninchen-anti-MausIgG-Antikörper (DAKO, Z0259)

Folgende Immunreagenzien wurden am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch entwickelt und standen für diese Arbeit zur Verfügung:

Monoklonaler Antikörper (MAK DON-KLH I 1H8) gegen Deoxynivalenol; mittels Protein A-Affinitätschromatographie aufgereinigt

Toxin-Enzymkonjugat: DON-Carbodiimidazol-Meerrettichperoxidase-Konjugat (DON-HRP)

3.1.4 Geräte

Enzymimmuntests (EIA):

Mikrotiterplattenlesegerät Sunrise Remote Control (Tecan)

Mikrotiterplattentaumelgerät (Heidolph)

Variable Pipetten 10 - 100 µl, sowie 100 - 1000 µl (Eppendorf)

Variable Zwölfkanalpipette 50 - 200 µl (Titertek Plus)

Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte mit der Software Ridasoft, Version 1.23 (r-Biopharm)

Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Pumpen: LC-10AT (Shimadzu)

Probeninjektor: SIL-10A (Shimadzu)

Säulen: Vorsäule: LiChroCART 4-4
 LiChrospher[®] 100 RP-18 (5 µm) (Merck, 1.50957)
 Analytische Säule: LiChroCART 250-4
 LiChrospher[®] 100 RP-18 (5 µm) (Merck, 50983)

Säulenofen: CTO-10AC (Shimadzu)

Detektor: Diodenarray-Detektor SPD-M10A (Shimadzu)

Datenverarbeitung: Softwareprogramm Class-LC 10; Version 1.41 B (Shimadzu)

3.1.5 Sonstiges

Beutelwalkmischer (Stomacher 80, Colworth)

Centricon[®] YM-30 (Millipore, 4208)

Einwegfilter Millex[®]-GV₄ 0,22 µm (Millipore, SLGVL040S)

Filterpapier: Nr. 595½, Ø 110mm (Schleicher & Schuell)

Immunaффinitätschromatographiesäulen (DONprep, r-Biopharm)

Kühlzentrifuge (Varifuge 3.0R, Heraeus)

Mehrfachmagnetrührgerät (ES 5, Janke & Kunkel)

Mikrotiterplatten (96-Loch; Nunc Immuno-Plate, 439454)

Mixgerät (Waring Blendor, 8010) mit Glasaufsätzen

pH Meter pH 526 (WTW, E163694)

Spektrophotometer UV-1602 (Shimadzu)

Ultraschallbad (Bandelin, RK 510 H)

Vakuum-Rotationsverdampfer (Heidolph, VV 2001)

Vakuumstation (Chromabond[®], Macherey-Nagel)

3.2 Methodik

Anhand von Probenmaterial aus Lebensmittelgeschäften in München und dem Umland wurde die Anwendbarkeit entwickelter Testsysteme und Extraktionsverfahren zur Analytik von DON überprüft. Festes Probenmaterial wurde mit Hilfe eines Mixgerätes zerkleinert und in verschließbaren Plastikbehältern bei Raumtemperatur gelagert. Bierproben wurden nach dem Öffnen untersucht und Rückstellproben bei -20 °C eingefroren. Zur routinemäßigen Analyse der Proben diente ein direkter kompetitiver Enzymimmuntest.

3.2.1 Kompetitiver direkter Enzymimmuntest zum Nachweis von DON

Basierend auf am Institut vorhandenen poly- und monoklonalen Antikörpern und Toxin-Enzymkonjugaten wurden verschiedene EIA-Varianten überprüft, wobei jeweils die optimalen Immunreagenzienkonzentrationen mittels Schachbretttitration bestimmt wurden. Es zeigte sich, dass v.a. im Hinblick auf die Reproduzierbarkeit (intra-assay, inter-assay) und die Flexibilität der Analysen die auf einer "Double Antibody Solid Phase"-Technik (DASP) (MÄRTLBAUER et al., 1988) basierenden EIA's deutliche Vorteile aufwiesen. Dabei werden spezifisch gegen DON gerichtete Antikörper an einen zweiten, gegen Maus IgG gerichteten, und als Festphase dienenden Antikörper gebunden. Danach konkurrieren bei diesem direkten, kompetitiven Enzymimmuntest (cd-EIA) freies und enzymmarkiertes Antigen (simultane Inkubation) um die freien Antikörperbindungsstellen. Durch Waschen der Mikrotiterplatten zwischen den einzelnen Reaktionsschritten werden nicht gebundene Reagenzien entfernt.

3.2.1.1 Durchführung

Mikrotiterplatten wurden mit Kaninchen-anti-Maus-Antikörpern (10 µg/ml Bicarbonatpuffer; 100 µl/Kavität) für 16 - 20 h bei Raumtemperatur beschichtet und danach bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank gelagert (maximal vier Wochen). Zur Testdurchführung wurden die Platten mit einer 2 % Casein/PBS-Lösung abgesättigt, gewaschen und die Restflüssigkeit ausgeschlagen. Anschließend wurde der monoklonale Antikörper (MAk) DON-KLH I 1H8 in einer Konzentration von 60 ng/ml PBS (100 µl/Kavität) zugegeben und für 1 h inkubiert. Nach

einem Waschschrift wurde in jede Kavität jeweils 50 µl Standard- oder Probenlösung (in 10 % v/v Methanol/PBS) und mit Meerrettichperoxidase markiertes Antigen (DON-HRP; 1:20.000 in 1% Casein/PBS) zugegeben. Für die Erstellung einer Standardkurve wurden DON-Konzentrationen im Bereich von 0,412 bis 100 ng/ml im Vierfachansatz verwendet, von den Probenlösungen wurden gegebenenfalls Verdünnungsreihen angelegt. Nach 1 h Inkubation wurden die Platten erneut gewaschen, Substrat/Chromogenlösung zugegeben und abschließend die Farbentwicklung mit 1 mol/l Schwefelsäure gestoppt, sowie die Absorption bei 450 nm gemessen. Zur Auswertung wurden die für die jeweiligen Toxinstandardkonzentrationen ermittelten Extinktionswerte (B) prozentual zur Extinktion des antigenfreien Ansatzes (B₀) umgerechnet.

3.2.1.2 Sensitivität

Eine Übersicht zu den Standardkurvencharakteristika gibt Tab. 3, wobei 50 an verschiedenen Tagen durchgeführte Tests ausgewertet wurden. Die Nachweisgrenze, ausgedrückt als die dem 70 %-Wert der Standardkurve entsprechende Toxinkonzentration, lag im Mittel bei 3,7 ng/ml, die 50 % Hemmungsdosis betrug durchschnittlich 8,4 ng/ml. Damit zählt das Testsystem zu den empfindlichsten bislang beschriebenen EIA's zum Nachweis von DON. Eine typische Standardkurve des kompetitiven, direkten EIA zum Nachweis von DON ist in Abb. 2 dargestellt.

3.2.1.3 Spezifität

Zur Abklärung der Spezifität des Testsystems (Tab. 4) wurden die Kreuzreaktionen des verwendeten MAk zu strukturell verwandten Typ B-Trichotheceen ermittelt. Dazu wurden Verdünnungsreihen der Testtoxine 15-Acetyldeoxynivalenol, 3,15-Diacetyldeoxynivalenol, Nivalenol und Fusarenon X (Ausgangskonzentrationen ab 2,5 µg/ml bzw. bei 3-Acetyldeoxynivalenol 62,5 ng/ml) und die erhaltenen Standardkurven verglichen. Nach Messung des 50 %-Wertes wurde die relative Kreuzreaktion wie folgt ermittelt:

$$\text{relative Kreuzreaktion (\%)} = \frac{50 \text{ \%-Wert (DON in mol/l)}}{50 \text{ \%-Wert (Testtoxin in mol/l)}} \times 100$$

Tabelle 3: Charakteristika der Standardkurven des enzymimmunologischen Verfahrens zum Nachweis von DON (Auswertung von 50 an unterschiedlichen Tagen durchgeführten EIA's)

	50 %-Dosis (ng/ml)	B/B ₀ bei 3,7 ng/ml in (%)
Mittelwert	8,43	69,1
Standardabweichung	2,43	6,59
Variationskoeffizient	28,8	9,54
Minimalwert	4,6	55,3
Maximalwert	15,1	83,8

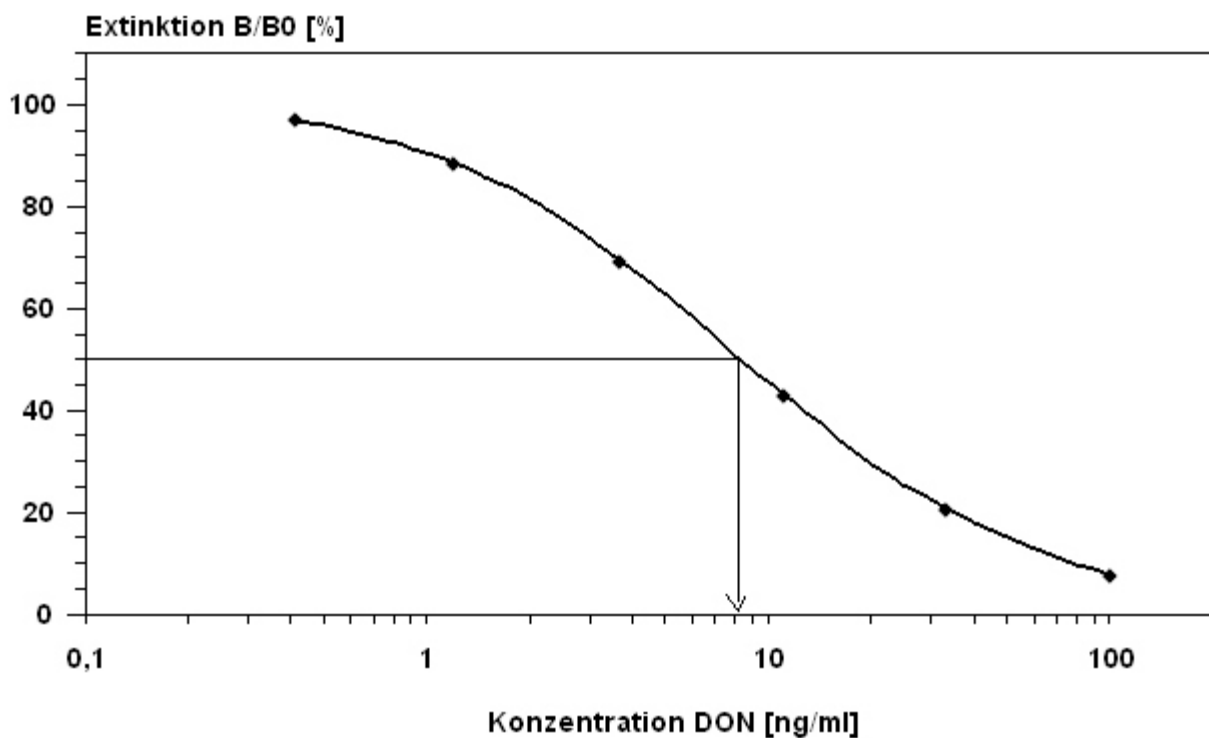


Abbildung 2: *Typische Standardkurve des enzymimmunologischen Verfahrens zum Nachweis von Deoxynivalenol. Die Extinktionswerte des antigenfreien Ansatzes lagen üblicherweise im Bereich von 0,8 - 1,2.*

Tabelle 4: Relative Kreuzreaktionen des zum Nachweis von DON verwendeten MAk 1H8 mit anderen Typ B-Trichothecenen im kompetitiven, direkten EIA

	MG ¹	50 % Dosis	relative Kreuzreaktion (%)
DON	296	27,3 nmol/l	100
3-AcDON	338	5,0 nmol/l	546
15-AcDON	338	1,66 µmol/l	1,64
3,15-DiAcDON	380	70,5 nmol/l	38,7
Nivalenol	312	1,61 µmol/l	1,70
Fusarenon X	354	> 17,7 µmol/l	< 0,15

¹ Molekulargewicht

Signifikante Kreuzreaktionen des MAk DON-KLH I 1H8 konnten lediglich mit 3-AcDON und zu 3,15-DiAcDON festgestellt werden. Da aber beide Toxine *in praxi* in Lebensmitteln aus Getreide im Vergleich zu DON üblicherweise nur in sehr geringen Dosen vorkommen (SCHOLLENBERGER et al., 1999), war keine wesentliche Beeinflussung der Messwerte für die getesteten Lebensmittel zu erwarten. Zur Kontrolle wurden stichprobenartig DON-positive, repräsentative Proben aus dem vorhandenen Untersuchungsmaterial mit einem spezifischen cd-EIA auf 3-AcDON (USLEBER et al., 1991) getestet. Von 30 Proben erwiesen sich zehn, vornehmlich Mais-haltige Produkte, als geringfügig kontaminiert (2 - 4 µg/kg), der Median aller Proben lag unter der Nachweisgrenze des Verfahrens (2 µg/kg).

3.3 Ergebnisse

Im Zeitraum von November 2001 bis Mitte 2003 wurden am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch der tierärztlichen Fakultät München im Rahmen des Forschungsauftrages „Analytik und Vorkommen wichtiger Fusarientoxine (Deoxynivalenol und Zearalenon) sowie Aufnahme dieser Toxine durch den deutschen Verbraucher“ des Bundesministeriums für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft (BMVEL), Lebensmittel auf die genannten Fusarientoxine untersucht. Die Ziele des Forschungsvorhabens umfassten die Etablierung, Optimierung und Validierung der Analytik der genannten Fusarientoxine, sowie die Identifizierung der mit DON und ZEA belasteten Lebensmittel. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Schwerpunkt auf die Extraktion von DON aus getreidehaltigen Lebensmitteln und auf die Optimierung der Untersuchungsverfahren, im Hinblick auf die effiziente Untersuchung unterschiedlichster Probenmatrices, gelegt. Konnten die Proben nach einfacher Extraktion ohne zusätzliche Probenaufreinigung mittels EIA zuverlässig analysiert werden, wurde von einfachen, andernfalls von komplexen Probenmatrices gesprochen, bei denen verschiedene Modifikationen der Extraktionsmethode erforderlich waren. Die Effektivität der Extraktionen wurde anhand der Wiederfindungsraten bei künstlich kontaminierten Proben überprüft, die Reproduzierbarkeit des Verfahrens wurde sowohl anhand künstlich, als auch natürlich kontaminierter Proben evaluiert.

3.3.1 Nachweis von DON in Lebensmitteln mittels Enzymimmuntests

3.3.1.1 Orientierende Vorversuche

Aufgrund früherer Erfahrungen zur Extraktion von DON aus Lebensmitteln (USLEBER, 1991), sowie empirischer Daten zur Kompatibilität von organischen Lösungsmitteln mit den EIA-Verfahren, wurde auf den Einsatz des häufig in der DON-Analytik verwendeten Acetonitrils verzichtet. Die Untersuchungen konzentrierten sich hingegen auf eine Verwendung von Methanol-A.dest.-Gemischen. Zur Ermittlung der optimalen Zusammensetzung des Extraktionsmittels wurde in orientierenden Vorversuchen eine mit DON natürlich kontaminierte Weizenmehlprobe (Type 405) mit ansteigenden Volumenanteilen Methanol in A. dest. (10/90;

20/80;40/60 v/v) nach der in 3.3.1.1.1 beschriebenen Methode extrahiert. Vor der Untersuchung im EIA wurden die Extrakte gegebenenfalls mit PBS auf eine Konzentration von 10 % Methanol im Extraktionsmittel verdünnt. Die Auswertung erfolgte wie in 3.2.1.1 beschrieben.

Die Mittelwerte der mit den jeweiligen Extraktionsmethoden im EIA erhaltenen DON-Konzentrationen variierten mit einer Standardabweichung von 30,3 µg/kg, respektive einem Variationskoeffizienten von 3,8 %, um den Mittelwert von 791 µg/kg. Somit erschien es sinnvoll, für die weiteren Versuche als Extraktionsmittel das 10/90 Methanol/A. dest.-Gemisch zu verwenden, da somit der niedrigste Verdünnungsfaktor und damit auch die niedrigste Nachweisgrenze erreicht werden konnte. Daneben wurde auch mit unterschiedlichen Extraktionszeiten experimentiert, wobei sich ein Zeitraum von 30 min als optimal erwies.

3.3.1.1.1 Extraktion

Das Probenmaterial wurden mit Hilfe eines Mixgerätes zerkleinert und anschließend bis zur Analyse in verschließbaren Plastikbehältern bei Raumtemperatur gelagert. Zur Analyse wurde standardmäßig folgende Routinemethode verwendet:

Je 5 g repräsentatives Probenaliquot wurde in ein Becherglas eingewogen und mit 50 ml Methanol/A. dest. (10/90 v/v) 30 min mittels Magnetrührer extrahiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (15 min, 1.800 x g) wurde die Probe filtriert, das Filtrat bei Bedarf mit MeOH/PBS (10/90) verdünnt und im Vierfachansatz in den kompetitiven, direkten EIA zum Nachweis von DON eingesetzt. Bei Proben mit einem niedrigeren Aschegehalt als Mehl wurde bei der Extraktion PBS anstatt A. dest. verwendet.

Um die Haltbarkeit der gewonnenen Extrakte bei Kühlschranktemperatur zu überprüfen, wurden exemplarisch 13 getreidehaltige Produkte an verschiedenen Tagen extrahiert und analysiert. Die zuerst gewonnenen Extrakte wurden durchschnittlich 7 Tage in verschließbaren Reagenzgläsern bei 4 - 8 °C gelagert und zusammen mit am Tag der Messung frisch hergestellten Extrakten enzymimmunologisch analysiert. Im Mittel betrug die DON-Konzentration der frischen Extrakte 95,9 % des für die gelagerten Proben gemessenen Wertes. Tendenziell konnten somit leicht

erhöhte DON-Werte bei längerer Lagerung festgestellt werden, wobei keine Korrelation zwischen Lagerungsdauer und der Zunahme bestand. Als Ursache kommt möglicherweise ein partielles Verdampfen des Extraktionsmittels in Frage. Damit konnte gezeigt werden, dass die gewonnenen Extrakte mittelfristig gelagert werden können, ohne das Analyseergebnis von DON übermäßig zu verfälschen. Die Messwerte können aus Abb. 3 entnommen werden.

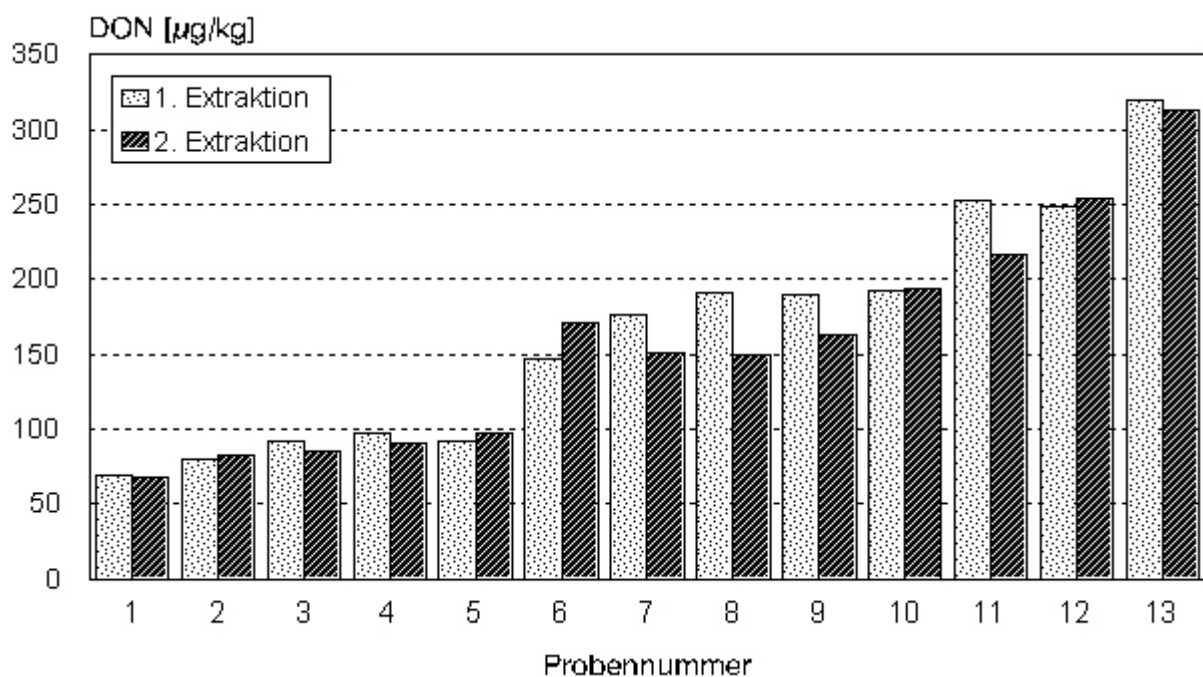


Abbildung 3: *Vergleichende Messungen jeweils eines, bis zur Analyse bei 4 - 8 °C gelagerten (1. Extraktion), und eines frischen Extraktes (2. Extraktion) verschiedener Getreideprodukte (durchschnittliche Lagerdauer 7 Tage).*

3.3.1.1.2 Neutralisationstests

Um zu überprüfen, inwieweit mit dieser Methode extrahierte Probeninhaltsstoffe eine Beeinflussung der mittels EIA erhaltenen Analysenergebnisse (Probenmatrixeffekte) verursachen, wurde eine natürlich kontaminierte Mehlprobe mit 10 % MeOH/A. dest. extrahiert und basierend auf stöchiometrischen Berechnungen mit MAk DON-KLH I 1H8 im Überschuss versetzt. Als Kontrollen dienten zum einen ein unbehandelter Probenextrakt, zum anderen ein mit einem irrelevanten MAk (HB-L₁I MAk 1F8 gegen *B. cereus* Diarrhoetoxin) versetzter Extrakt. Nach 15 min Vorinkubation wurden die verschiedenen Ansätze in Centricon[®] YM-30-Einheiten (Porenweite 30 kDa) überführt, zentrifugiert (10 min, 3.700 x g) und anschließend die Filtrate im DON-EIA untersucht. Aufgrund des hohen Molekulargewichts können die MAk, sowie Komplexe aus diesen mit dem Antigen, den Filter nicht passieren und verbleiben somit im Retentat. Freies DON (MG 296 Da) dagegen wird nicht an der Passage gehindert. Nach dieser Methode wurden auch Bier- sowie Teigwarenproben mit den genannten MAk's inkubiert, ultrafiltriert und mittels EIA gemessen.

Die Filtrate der mit dem MAk DON-KLH I 1H8 vorbehandelten Proben (Tab. 5) erwiesen sich ausnahmslos als negativ - ein Beleg dafür, dass eine Beeinflussung des EIA-Systems durch die Extrakte dieser Probenmatrices nicht auftritt, zumal auch die Messergebnisse der mit dem irrelevanten MAk versetzten Filtrate denen der unbehandelten Proben entsprachen.

3.3.1.2 Nachweis von DON in einfachen Probenmatrices

Wie schon erwähnt, wurden Produktgruppen pragmatisch im Hinblick auf den nötigen Extraktionsaufwand in einfache und schwierige Probenmatrices unterteilt, wobei Lebensmittel, die mittels der unter 3.3.1.1.1 erwähnten Methode extrahiert werden konnten und zuverlässige Ergebnisse im cd-EIA lieferten, in die Kategorie einfache Matrices eingestuft wurden. Die Zuverlässigkeit der Analysen wurde hierbei punktuell mittels Neutralisationstests bzw. durch Reinigung der Rohextrakte mittels Flüssig-Flüssig-Verteilungschromatographie überprüft (3.3.1.3.1). Als einfache Probenmatrices, bei denen der Rohextrakt ohne weitere Aufreinigung

Tabelle 5: Ergebnisse des Neutralisationstests zur Überprüfung von Probenmatrixeffekten

	zugesezter MAk	Zugabe von MAk	Konzentration DON im Filtrat (ng/ml)
Mehlprobe	MAk DON-KLH I 1H8	+	nicht nachweisbar
	MAk HB-L ₁ I 1F8*	+	559
	unbehandelter Extrakt	-	611
Teigwarenprobe	MAk DON-KLH I 1H8	+	nicht nachweisbar
	MAk HB-L ₁ I 1F8*	+	228
	unbehandelter Extrakt	-	192
Bierprobe	MAk DON-KLH I 1H8	+	nicht nachweisbar
	MAk HB-L ₁ I 1F8*	+	39,6
	unbehandelter Extrakt	-	40,9

*: gegen *B. cereus* Diarrhoetoxin (Kontrolle)

in den EIA eingesetzt werden konnte, erwiesen sich neben Körnergetreide insbesondere Mehle und Teigwaren. Da Mehle auch einen Schwerpunkt bei den Untersuchungen zur Belastung des deutschen Verbrauchers mit DON darstellten, wurden bei dieser Matrix detailliertere Studien zur Wiederfindbarkeit von DON durchgeführt, bei anderen Probenmatrices wie z.B. Teigwaren konnte auf umfangreiches Datenmaterial von anderen Projektpartnern des oben erwähnten Forschungsverbundes zurückgegriffen werden.

3.3.1.2.1 Mehle

Zur Überprüfung der Wiederfindungsraten wurde eine Weizenmehlprobe (Type 405) mit DON-Standard (in Methanol) in Konzentrationen von 250 bzw. 500 µg/kg artifiziell kontaminiert und am darauffolgenden Tag mit der in 3.3.1.1.1 beschriebenen Methode extrahiert. Dieser Rohextrakt wurde dann direkt ohne weitere Aufreinigung mittels kompetitivem, direktem EIA (cd-EIA) analysiert. Da DON-freies Material nicht zur Verfügung stand, wurde die

Ausgangskontamination (Mittelwert 145 µg/kg) der Probe vom Messergebnis subtrahiert. Zur Auswertung kamen nur Ergebnisse, die im linearen Bereich der Standardkurve lagen. Die Wiederfindungsrate (WFR) wurde anhand folgender Formel ermittelt:

$$\text{Wiederfindungsrate (\%)} = \frac{\text{Testergebnis der dotierten Probe} - \text{Leerwert}}{\text{Dotierung}} \times 100$$

Anhand der dotierten Weizenmehlproben (Tab. 6) konnte die Zuverlässigkeit des Verfahrens demonstriert werden. Die durchschnittliche Wiederfindungsrate für DON lag bei 97,2 %, der durchschnittliche Variationskoeffizient betrug 10,8 %.

Daneben wurde die Reproduzierbarkeit des Verfahrens anhand einer natürlich kontaminierten Mehlprobe (Type 405) überprüft. Hierzu wurde die Mehlprobe an verschiedenen Tagen mehrmals extrahiert und analysiert. Die Ergebnisse, die nur eine geringe Streuung (Variationskoeffizient 3,3 %) aufwiesen, bestätigten die Reproduzierbarkeit der Extraktionsmethode.

Tabelle 6: Wiederfindungsraten für DON in Weizenmehl (Type 405), sowie Ergebnisse der Mehrfachuntersuchung einer natürlich kontaminierten Mehlprobe

Anzahl (n)	Toxinzusatz (µg/kg)	$\bar{x} \pm s$ (µg/kg)	VK (%)	WFR (%)
5	250	251 ± 24,7	9,8	100,4
5	500	470 ± 55,6	11,8	94,0
7	-	734 ± 23,9	3,3	-

\bar{x} : Mittelwert

VK : Variationskoeffizient

s : Standardabweichung

WFR : Wiederfindungsrate

3.3.1.2.2 Teigwaren

Teigwarenproben wurden nach der Standardmethode (3.3.1.1.1) extrahiert und analysiert. Im Rahmen der Untersuchungen zum Vorkommen von Deoxynivalenol in Lebensmitteln (3.3.4) wurden auch Fertiggerichte untersucht, wobei sich die Analyse auf den Teigwarenanteil beschränkte, solange es sich nicht um ein bereits vom Hersteller gemischtes Produkt handelte. Bei farbintensiven Proben (gefärbte Nudeln, Zugabe von Tomatensaucenpulver, o.ä.) konnte auf die in 3.3.1.3.1 beschriebene Methode zurückgegriffen werden. Da wie oben erwähnt, Daten zu Wiederfindungsraten (üblicherweise > 80 %) von DON in Teigwaren bereits vorlagen, beschränkten sich die eigenen Untersuchungen auf die Überprüfung der Reproduzierbarkeit des Verfahrens unter Verwendung natürlich kontaminierter Proben.

Dazu wurden aus dem vorhandenen Probenmaterial 18 natürlich mit DON-kontaminierte Teigwarenprodukte (180 - 1030 μg DON/kg) ausgewählt, mehrfach extrahiert und analysiert (üblicherweise an drei verschiedenen Tagen). Die Ergebnisse sind in Abb. 4 dargestellt. Die

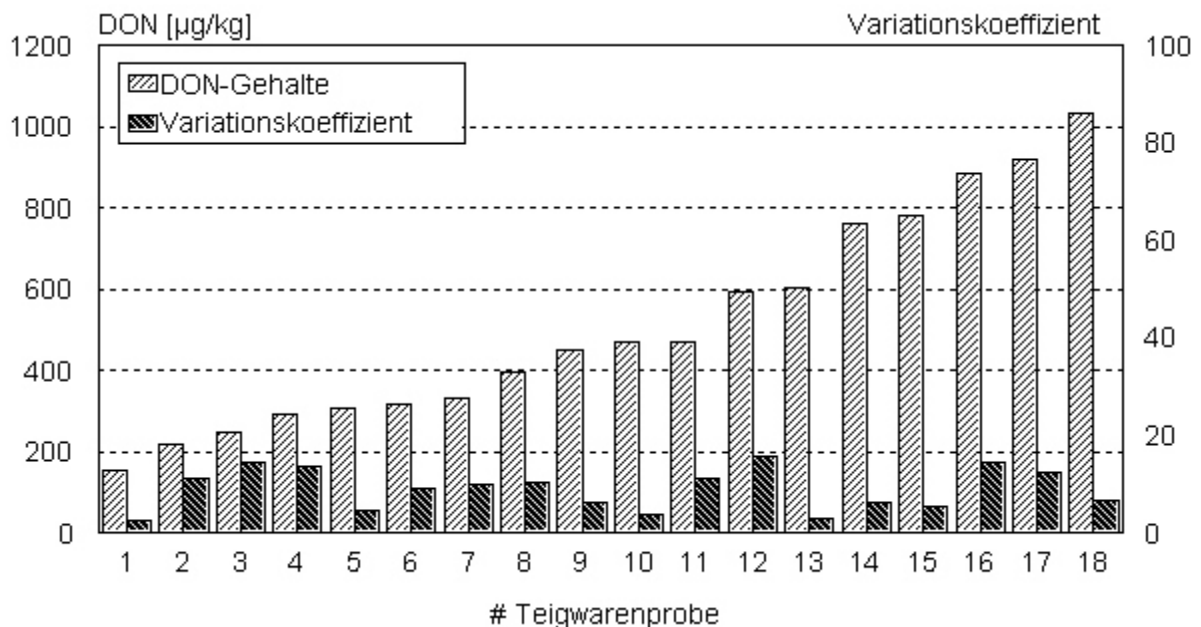


Abbildung 4: *Mehrfachuntersuchung von verschiedenen natürlich kontaminierten Teigwaren*

Mehrfachuntersuchung der Proben untermauerte die Reproduzierbarkeit des Verfahrens, der durchschnittliche Variationskoeffizient lag bei 8,9 %, wobei sowohl bei niedrig als auch bei hoch kontaminierten Proben ähnliche Streubreiten der Ergebnisse festgestellt wurden. Diese Daten belegten im übrigen auch die homogene Verteilung von DON im Untersuchungsmaterial: die in dieser Untersuchungsreihe erhaltenen Ergebnisse zeigten im Vergleich zur Analyse dotierter Proben (CURTUI, 2002; pers. Mitteilung) keine höhere Streuung.

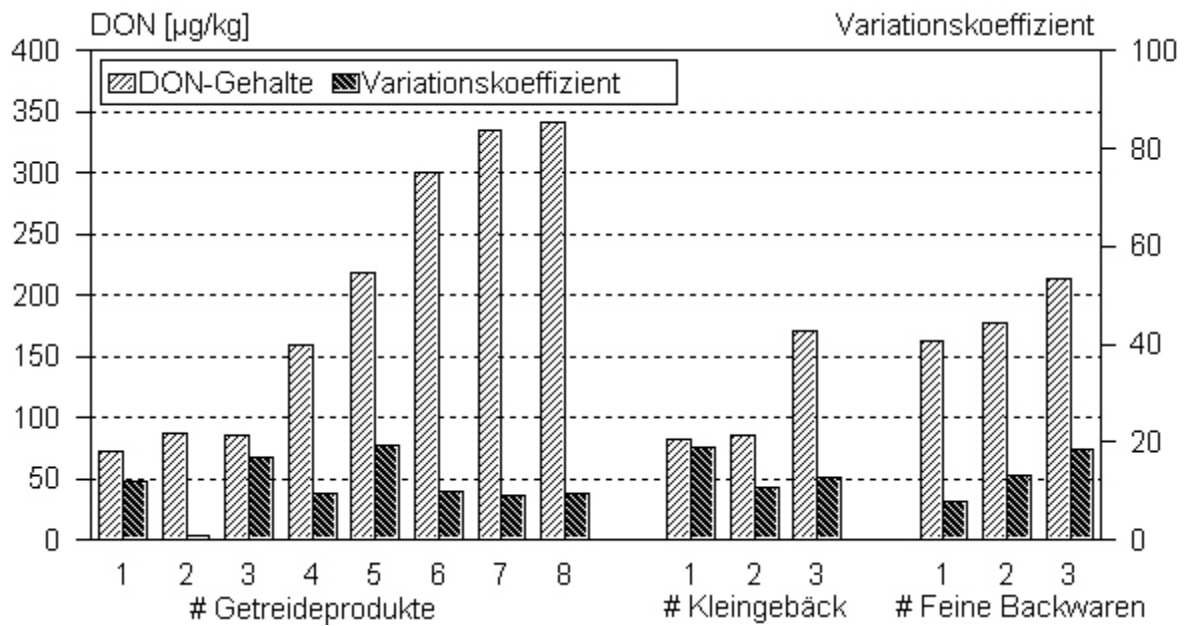


Abbildung 5: *Reproduzierbarkeit der DON-Analyse: Mehrfachuntersuchung ($n \geq 3$) natürlich kontaminierter Getreideprodukte, Kleingebäcke und feiner Backwaren*

3.3.1.2.3 Andere einfache Probenmatrices

Prinzipiell konnten Proben aus den Produktgruppen Getreide, Broterzeugnisse, Getreideflocken, Frühstückszerealien und Knabbererzeugnisse größtenteils mittels der Standardmethode analysiert werden. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse für verschiedene natürlich kontaminierte Proben aus den Gruppen Getreideprodukte, Kleingebäck und feine Backwaren ist in Abb. 5 dargestellt. Der durchschnittliche Variationskoeffizient betrug 10,2 %.

Unter Berücksichtigung des Extraktionsfaktors (Verdünnung 1:10) und des 70 % B/B₀-Wertes der Standardkurve (3.2.1.2) lag die Nachweisgrenze für DON in einfachen Probenmatrices bei 60 µg/kg. Die Richtigkeit der mit dieser einfachen und schnellen Methode erzielten Ergebnisse wurde auch durch Laborvergleichsuntersuchungen, die im Rahmen des Forschungsvorhabens durchgeführt wurden (sechs beteiligte Labors), bestätigt.

3.3.1.3 Nachweis von DON in komplexen Probenmatrices

Bei Produkten, die entweder schwer zu extrahieren waren (starke Quellfähigkeit) oder deren Inhaltsstoffe im EIA unspezifische Reaktionen hervorriefen und somit das Messergebnis verfälschten, musste eine alternative Probenaufarbeitung entwickelt werden, um ein effizientes Screening mittels EIA zu ermöglichen.

3.3.1.3.1 Getreidehaltige Säuglings- und Kleinkindernahrung

Bei diesen Produkten stieß das oben dargestellte Routineverfahren an seine Grenzen, da von den stark quellfähigen Probenmatrices ein Großteil des Extraktionsmittels gebunden wurde und somit nur sehr wenig Filtrat gewonnen werden konnte. Zudem wurden bei verschiedenen Produkten starke, den EIA störende Probenmatrix-Interferenzen nachgewiesen, so dass mit der Standardmethode keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt werden konnten. Dies wird verdeutlicht durch die hohen, nicht mehr akzeptablen Variationskoeffizienten (6,7 - 40,4 %) dieser Untersuchungsreihen (Ergebnisse nicht dargestellt).

Frühere Untersuchungen am Institut zum immunchemischen Nachweis von anderen Mykotoxinen hatten gezeigt, dass mittels Flüssig-Flüssig-Verteilungschromatographie gereinigte Extrakte komplexer Lebens- und Futtermittel problemlos mittels EIA analysiert werden konnten. Aufgrund des polaren Charakters von DON bot sich als organisches Lösungsmittel Ethylacetat an, orientierende Versuche an natürlich kontaminierten, einfachen Probenmatrices zeigten, dass bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion nur relativ geringfügige Verluste des Analyten im Bereich von < 20 % auftraten. In weiteren Vorversuchen mit Säuglings- und Kleinkindernahrung wurde die Effizienz verschiedener Parameter (Volumenverhältnis von Extrakt zu Ethylacetat bzw. Anzahl der Extraktionsschritte) überprüft. Diese Versuche resultierten in der im Folgenden beschriebenen Methode:

Jeweils 5 g Probe wurden mit 50 ml 10 % Methanol/PBS (1 + 9 v/v) für 30 min auf dem Magnetrührer extrahiert. Danach wurden 4 g dieses Ansatzes jeweils zweimal mit 5 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Nach jedem Ausschütteln folgte ein Zentrifugationsschritt (10 min, 1.800 x g, 4 °C) und das Überführen des Überstandes mittels Pasteurpipetten in einen Spitzkolben. Der so gewonnene Überstand wurde am Rotationsverdampfer vollständig zur Trockene eingengt und in 2 ml Methanol/PBS (1 + 9 v/v) aufgenommen. Bei besonders fettreichen Proben (z.B. Milchbrei mit und ohne Zusätze) wurde diese Lösung noch mittels n-Heptan (1,5 ml) entfettet.

Zur Bestimmung der Wiederfindungsraten dieses Clean-up-Verfahrens wurde eine Vollkornbreiprobe mit DON-Standard in Konzentrationen von 40 bis 120 µg/kg artifiziell kontaminiert, mittels Flüssig-Flüssig-Verteilung extrahiert und im EIA untersucht. Da diese Probenaufbereitung einen Konzentrierungsfaktor von 2 beinhaltet, konnte die Nachweisgrenze im Vergleich zu dem bei einfachen Probenmatrices etablierten Direkteinsatz der Rohextrakte auf 30 µg DON/kg gesenkt werden. Der zusätzliche Clean-up Schritt führte nur zu geringen Verlusten des Analyten, die durchschnittliche Wiederfindungsrate lag im überprüften Konzentrationsbereich von 40 bis 120 µg DON/kg bei 82,9 %. Die Wiederholpräzision der Methode lag im für immunchemische Methoden üblichen Bereich (durchschnittlicher Variationskoeffizient 8,4 %), wobei bei höheren DON-Konzentrationen tendenziell niedrigere Streubreiten zu verzeichnen waren.

Tabelle 7: Wiederfindungsraten für DON in künstlich kontaminierter Säuglings- und Kleinkindernahrung (Hirse-Vollkornbrei)

Toxinzusatz ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Anzahl	$\bar{x} \pm s$ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	VK (%)	WFR (%)
40	5	$33,5 \pm 5,0$	15,0	83,8
80	5	$64,4 \pm 2,7$	4,3	80,5
120	3	$101,2 \pm 5,4$	5,3	84,3

\bar{x} : Mittelwert

VK : Variationskoeffizient

s : Standardabweichung

WFR : Wiederfindungsrate

Zur weiteren Validierung des Verfahrens wurden elf Proben von Säuglings- und Kleinkindernahrung an verschiedenen Tagen insgesamt dreimal untersucht. Dabei handelte es sich um Proben aus den Produktgruppen Milchbrei mit und ohne Zusätze, sowie Grieß- und Getreidebreie. Die Ergebnisse sind in Tab. 8 dargestellt. Die Messungen dieser Proben wiesen Variationskoeffizienten zwischen 3,9 und 18,9 (durchschnittlich 12,6 %) auf. Die im Vergleich zur Routinemethode höhere Schwankungsbreite der Analysen ist zum Teil auf den zusätzlichen Reinigungsschritt, andererseits aber auch auf die relativ niedrige Kontamination der Proben (33 - 104 $\mu\text{g}/\text{kg}$) zurückzuführen. Messungen negativer Proben konnten reproduzierbar wiederholt werden.

3.3.1.3.2 Andere komplexe Probenmatrices

Grundsätzlich wurde im Lauf der in 3.3.4 beschriebenen Untersuchungen zum Vorkommen von DON in Lebensmitteln ungewöhnliche (z.B. Nuss-Nougatcremes, Kleieprodukte), bzw. sehr heterogene Probenmatrices (z.B. Kekse mit hohem Schokoladenanteil, Müsli mit Trockenfrüchten) zuerst vergleichend mit den in 3.3.1.1.1 bzw. in 3.3.1.3.1 beschriebenen Methoden (Direkteinsatz der Rohextrakte, bzw. Flüssig-Flüssig-Verteilung) untersucht. Differierten beide Ergebnisse um mehr als 40 % wurde von einer unspezifischen Beeinflussung

Tabelle 8: Reproduzierbarkeit der DON-Analysen bei Mehrfachuntersuchung (n =3) von Säuglings- und Kleinkindernahrung

Probennummer	Mittelwert (µg/kg)	Standardabweichung (µg/kg)	Variationskoeffizient (%)
1	< 30	-	-
2	< 30	-	-
3	< 30	-	-
4	< 30	-	-
5	33,3	6,1	18,3
6	42,7	8,1	18,9
7	43,3	2,5	5,8
8	54,3	8,4	15,4
9	76,7	10,4	13,6
10	77,7	9,5	12,2
11	104	4,0	3,9

des Testsystems durch die jeweilige Probenmatrix ausgegangen. Diese und Proben ähnlicher Zusammensetzung wurden dann nur noch nach Ausschütteln des Rohextraktes mit Ethylacetat in den EIA eingesetzt. Neben Säuglings- und Kleinkindernahrung wurden grundsätzlich auch andere stark quellfähige Proben, wie z.B. Kleieprodukte, nach der oben beschriebenen Methode (3.3.1.3.1) extrahiert. Bei sonstigen problematischen Proben (farbintensiv, fettreich) wurde die genannte Methode dadurch modifiziert, dass 2 ml des gefilterten Rohextraktes mit 3 ml Ethylacetat zweimal ausgeschüttelt, eingengt und mittels EIA gemessen wurden. Schwer lösliche und schwer homogenisierbare Proben (Nuss-Nougatcremes, Cremewaffeln und Karamel enthaltende Proben) wurden im Beutelwalkmischer (15 min) extrahiert. Mittels Flüssig-Flüssig-Verteilung wurden dann 2 ml des Extraktes zweimal mit 5 ml Ethylacetat (zwecks besserer Phasentrennung) ausgeschüttelt. Auf die Konzentrierungsmöglichkeit wurde

hier verzichtet, jedoch war gelegentlich ein Entfettungsschritt, wie unter 3.3.1.3.1 beschrieben, nötig.

3.3.2 Nachweis von DON in Lebensmitteln mittels HPLC

Zur Bestätigung der EIA-Messwerte wurden einige Proben vergleichend auch mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) analysiert. Basierend auf den bei einem Projektpartner im Rahmen des Forschungsauftrages gemachten Erfahrungen zur HPLC-Analyse von DON wurden zur Probenaufarbeitung kommerziell verfügbare Immunaффinitätschromatographiesäulen (IA-Säulen) eingesetzt. Um sicherzustellen, dass während der Probenextraktreinigung unter den verwendeten Bedingungen keine Verluste auftraten, wurden im Rahmen der Methodenentwicklung alle anfallenden Fraktionen (Probendurchlauf, Waschlösungen, Eluat) parallel mittels EIA kontrolliert. Zur Herstellung der Rohextrakte wurde Methanol/PBS (1 + 9 v/v), das sich bereits bei der Validierung der analytischen Screening-Verfahren (3.3.1.1) bewährt hatte, verwendet. Im Folgenden sind die wesentlichen Parameter dieses Analyseverfahrens dargestellt:

Clean-up über IAC-Säulen:

- Auftrag von 20 ml Rohextrakt (entsprechend einem Probenäquivalent von 2 g; 3.3.1.1.1)
- Waschen mit 10 ml PBS
- Trocknen der Säulen mittels Vakuum
- Elution mit 3 ml Methanol
- Einengen des Eluates im Rotationsverdampfer; Rückstand in 0,25 ml Fließmittel aufnehmen

HPLC-Bedingungen:

Stationäre Phase:	Vorsäule:	LiChroCART 4-4 (5 µm)
	Analytische Säule:	LiChroCART 250-4 (5 µm)
Mobile Phase:	Acetonitril/Wasser (12/88; v/v)	
Flussgeschwindigkeit:	1 ml/min; isokratisch	

Injektionsvolumen: 50 μ l
Detektion: Diodenarray (Messwellenlänge bei 218 nm)

Zur Erstellung einer Eichgeraden wurde DON-Standard (gelöst in MeOH) unter einem Stickstoff-Strom eingengt, in einem Aliquot Fließmittel aufgenommen und jeweils 50 μ l im Konzentrationsbereich von 250 - 2000 ng/ml mittels Probengeber injiziert. Die Retentionszeit (R_t) von DON betrug unter diesen Bedingungen 6,4 min (Abb. 6). Anhand der für die Standardlösung erhaltenen Peakflächen wurden Regressionsgeraden erstellt, deren Geradengleichungen zur Quantifizierung der Proben herangezogen wurden. Die Nachweisgrenze, ermittelt über ein Signal:Rausch-Verhältnis von 3:1, betrug für DON-Standardtoxin 8 ng (absolut injiziert), für Probenmaterialien unter Berücksichtigung des Extraktionsfaktors 40 μ g/kg. Ab DON-Gehalten von > 1 ppm in der Probe waren unter den oben skizzierten Bedingungen im Probendurchlauf der IAC-Säule größere Mengen an nicht gebundenem Toxin nachweisbar (Überladung der IAC-Säule), bei geringer belasteten Proben traten hingegen beim IAC-Clean-up keine mittels EIA messbaren Toxinverluste auf.

Abb. 7 zeigt ein typisches Chromatogramm einer Lebensmittelprobe, in diesem Fall von einer Tortilla-Chips-Probe. Bei der vergleichenden Untersuchung von 16 Proben (Getreidemehle, Teigwaren, Kleingebäck, Brotvormischungen, Haferflocken, Kindernahrung und Frühstückszerealien) mittels EIA und HPLC wurde eine sehr gute Übereinstimmung der Analysenergebnisse festgestellt (Abb. 8), der Kontaminationsbereich lag bei 63 bis 646 μ g DON/kg.

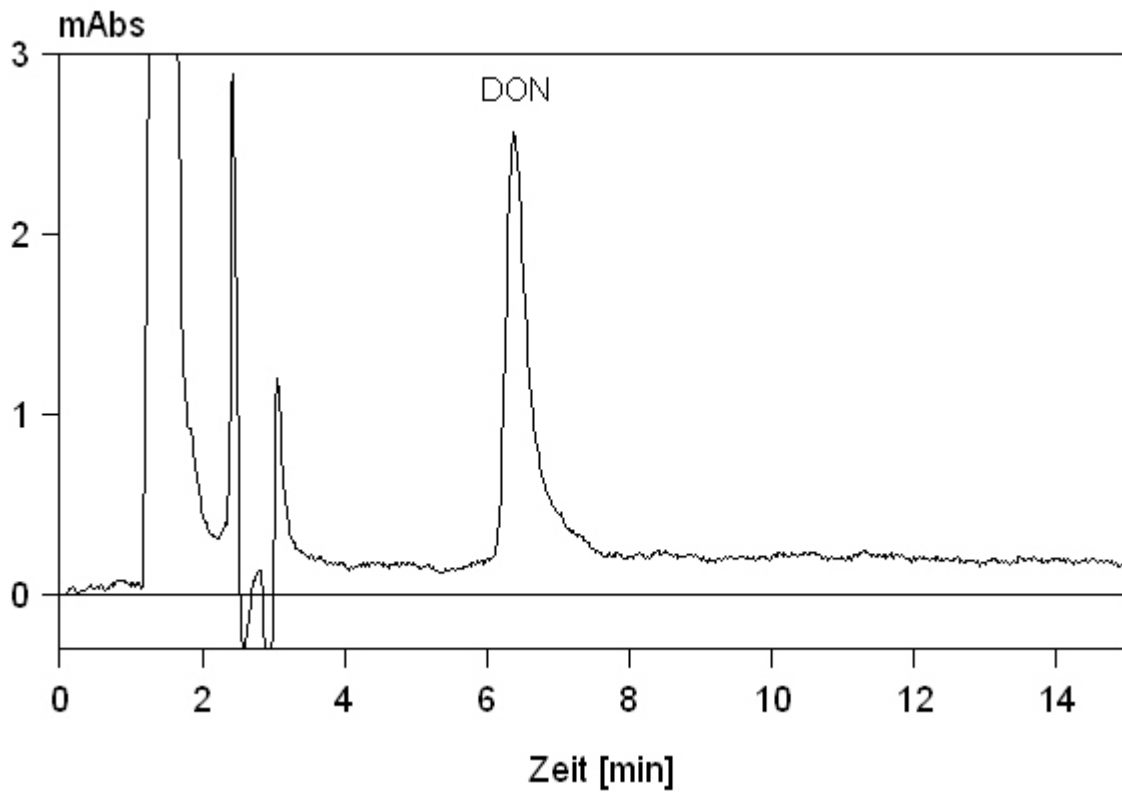


Abbildung 6: HPLC-Chromatogramm eines DON-Standards (100 ng); Retentionszeit 6,39 min

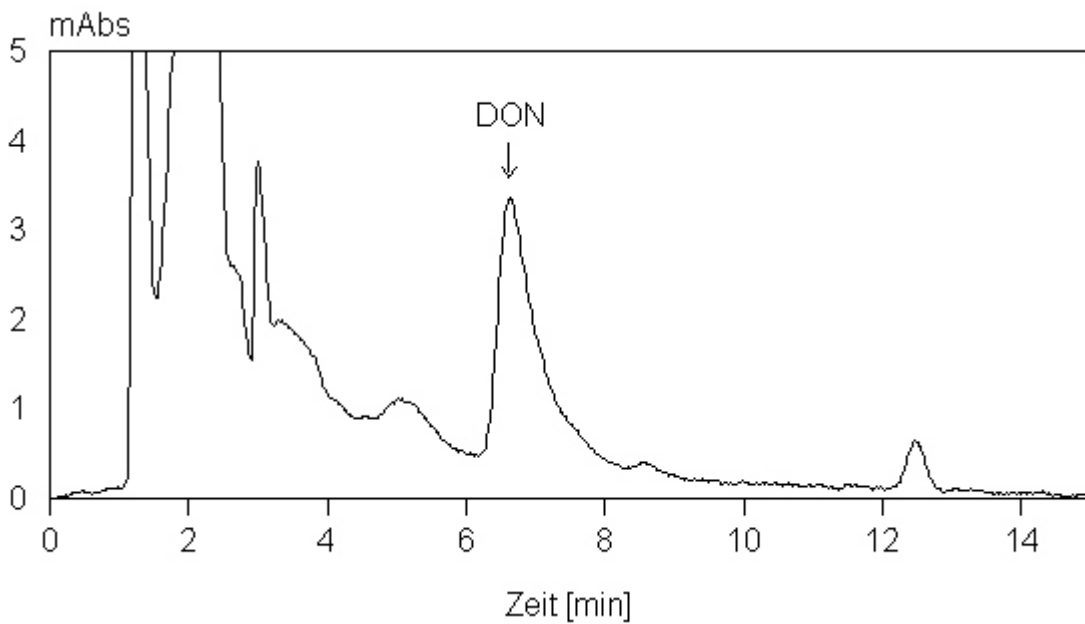


Abbildung 7: HPLC-Chromatogramm einer Tortilla-Chips-Probe (DON-Gehalt: 383 µg/kg)

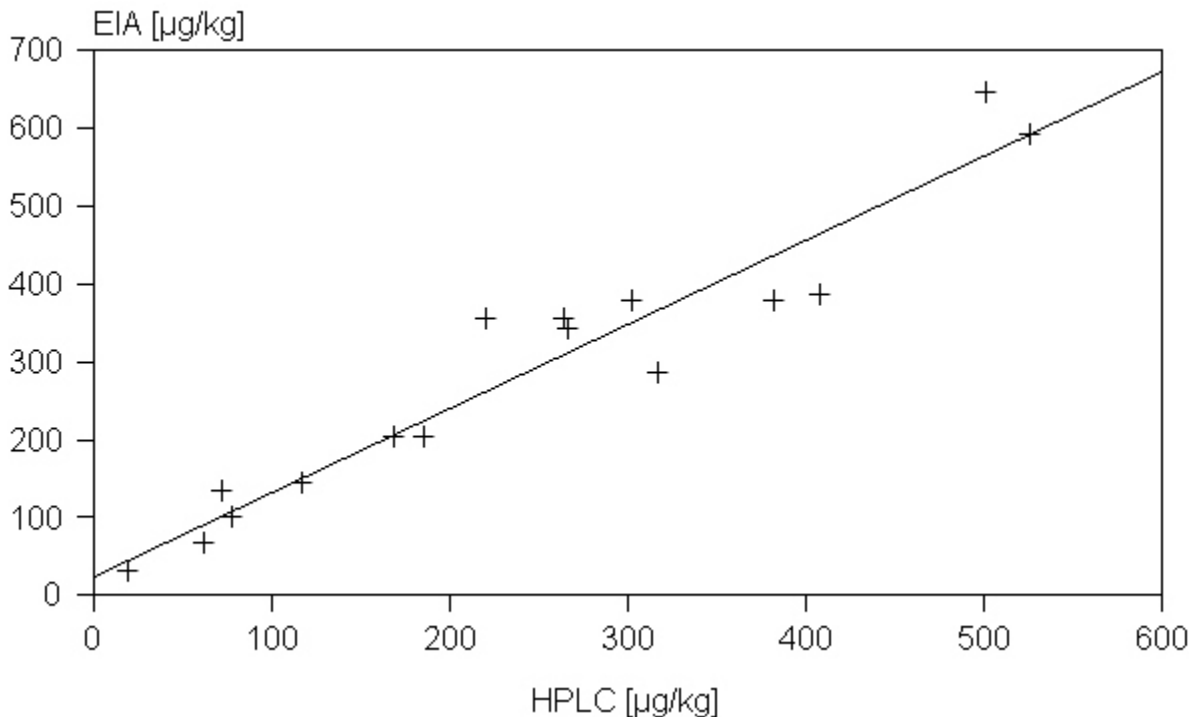


Abbildung 8: *Korrelation zwischen den mittels EIA und HPLC ermittelten DON-Gehalten natürlich kontaminierter Zerealien-haltiger Proben (n = 16). Die Geradengleichung lautet: $y = 1,0837 x + 22,8985$ (Korrelationskoeffizient: 0,9595; r^2 : 0,9206)*

3.3.3 Analytik von Bieren

Im Rahmen der Entwicklung eines Verfahrens zur Analyse von Bierproben auf DON wurde in einer ersten Untersuchungsreihe überprüft, inwieweit der Direkteinsatz der Proben in den EIA als einfachste und schnellste Methode realisierbar ist. Dazu wurden die Proben direkt nach Einstellen des pH auf 6,8 - 7,0 mit Phosphatpuffer (0,1 mol/l) in den EIA eingesetzt. In orientierenden Vorversuchen mit je einer Bierprobe der Sorten Helles Vollbier, Hefe-Weizen und Pils konnte in allen Proben eine natürliche Kontamination mit DON nachgewiesen werden. Um diese Ergebnisse abzusichern, wurde mit der am höchsten kontaminierten Probe ein Neutralisationstest durchgeführt (3.3.1.1.2). Die Resultate aus diesem Test bestätigten, dass die im EIA ermittelten Messwerte durch DON, oder durch kreuzreagierende DON-Derivate,

verursacht wurden und nicht auf einem Probenmatrixeffekt beruhen. Auf einen zusätzlichen Extraktionsschritt zur Eliminierung von Probenmatrixeffekten konnte somit verzichtet werden. Aus mehreren orientierenden Versuchen zur Probenaufbereitung ging folgende Methode als geeignetste hervor:

Die Proben wurden mittels Ultraschall (15 min) entgast, danach im Verhältnis 4:3 mit 0,1 mol/l Phosphatpuffer (pH 7,4) versetzt und direkt bzw. in Verdünnungsstufen (in Methanol/PBS 1 + 9 v/v) in den EIA (3.2.1.1) eingesetzt.

Die bei der Untersuchung von dotierten Bierproben (10 - 80 µg DON/l) erzielten Ergebnisse sind in Tab. 10 zusammengefasst. Da durch die fehlende Probenaufarbeitung keine Analytenverluste auftraten, konnte das zugesetzte Toxin praktisch vollständig wiedergefunden

Tabelle 10: Wiederfindungsraten von DON in künstlich kontaminierten Bierproben bei Direkteinsatz der Proben bzw. nach Extraktion mit Ethylacetat (EA)

Aufreinigung	Anzahl	Toxinzusatz (ng/ml)	$\bar{x} \pm s$ (µg/l)	VK (%)	WFR (%)
- (Direkteinsatz der Proben)	3	10	10,7 ± 0,4	3,8	106,7
	3	20	22,2 ± 2,5	11,4	111,2
	3	40	35,2 ± 1,8	5,2	87,9
	3	80	88,0 ± 10,7	12,1	110,0
Flüssig-Flüssig Verteilung mit EA	4	10	8,6 ± 1,0	11,9	85,8
	3	20	18,9 ± 2,3	11,9	94,5
	4	40	37,8 ± 3,7	9,8	94,4
	3	80	75,0 ± 3,0	4,0	93,7

\bar{x} : Mittelwert

VK : Variationskoeffizient

s : Standardabweichung

WFR : Wiederfindungsrate

werden, die Nachweisgrenze des Verfahrens lag bei 5 µg/l. Auch bei der Untersuchung von verschiedenen, natürlich kontaminierten Biersorten konnte die Wiederholpräzision (Variationskoeffizienten 3,8 - 13,3 %) der Methode bestätigt werden. Zur weiteren Verifizierung der Analysenergebnisse wurde, in Anlehnung an die für schwierige Probenmatrices etablierte Methode (3.3.1.3.1), ein Clean-up der Bierproben über Flüssig-Flüssig-Verteilungschromatographie durchgeführt. Dazu wurden 1,5 ml des bereits erwähnten Bier-Phosphatpuffer-Ansatzes mit 4 ml Ethylacetat zweimal extrahiert, eingengt, in 0,75 ml 10 % MeOH/PBS aufgenommen und mittels EIA analysiert.

Bedingt durch den Konzentrierungsschritt konnte nach Flüssig-Flüssig-Verteilungschromatographie eine Verbesserung der Nachweisgrenze auf 3 µg/l erreicht werden. Bei dotierten Bierproben wurden ebenfalls hohe Wiederfindungsraten von 86 - 94 % (durchschnittlich 92,1%; Tab. 10) erreicht werden. Tab. 11 gibt Aufschluss über die Reproduzierbarkeit des Analyseverfahrens, die Wiederholpräzision (VK 3,8 bis 13,3 %) der Methode konnte bestätigt werden. Im Kontaminationsbereich der untersuchten Proben zwischen 11 und 120 µg/l betrug der VK im Mittel 9,3 %, wobei im mittleren Konzentrationsbereich die Werte am niedrigsten lagen.

Tabelle 11: Reproduzierbarkeit der Analysemethode bei verschiedenen natürlich kontaminierten Biersorten (Direkteinsatz)

Bezeichnung	Anzahl	$\bar{x} \pm s$ (µg/l)	VK (%)
Bier mit vermindertem Alkoholgehalt	4	10,9 ± 1,3	12,2
Weizen-Doppelbock dunkel	4	19,1 ± 2,5	13,3
Weizen-Bock hell	4	37,4 ± 2,7	7,1
Vollbier hell	4	41,1 ± 2,8	6,7
Weizenbier hell	4	58,7 ± 2,3	3,8
Pils ¹	4	120,5 ± 15,3	12,7

¹: hierbei handelte es sich um eine Bierprobe aus einem Ringversuch

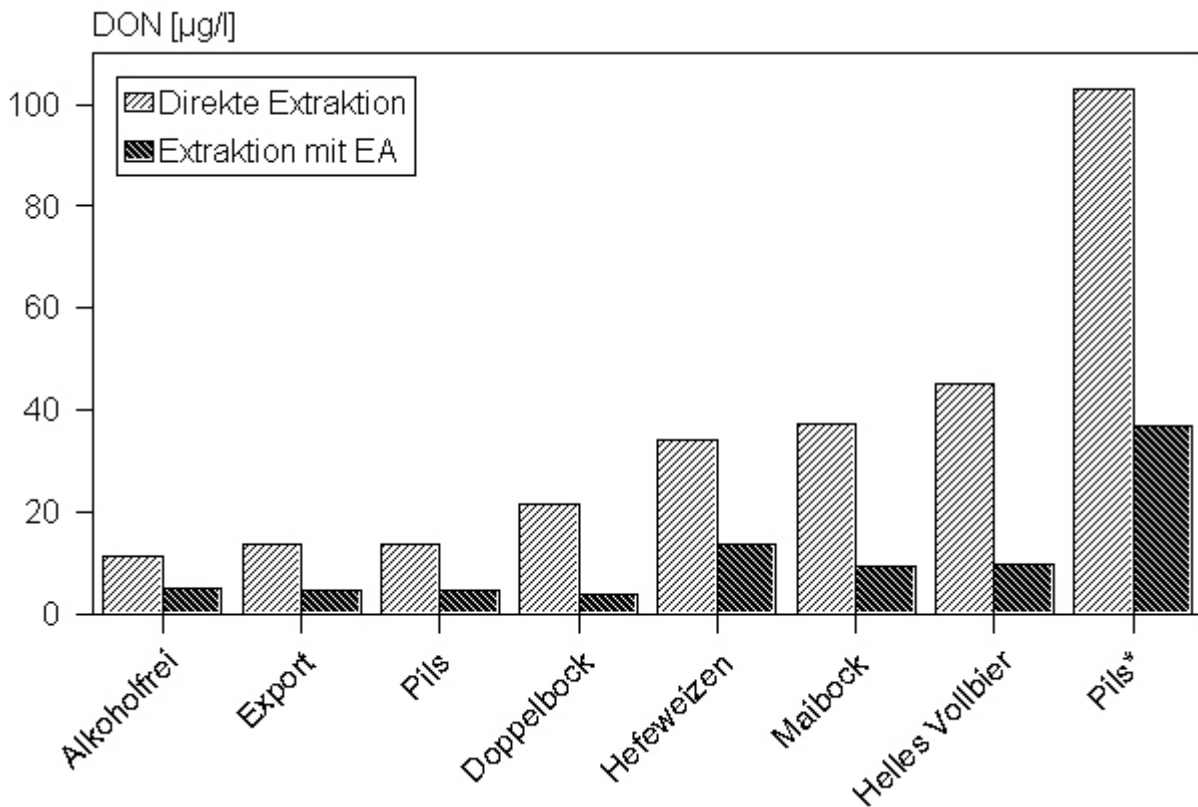


Abbildung 9: *Vergleich der bei Direkteinsatz, bzw. nach Extraktion mit Ethylacetat mittels EIA gemessenen DON Konzentrationen in acht verschiedenen Bierproben. Die mit einem * gekennzeichnete Probe stammte aus einem Ringversuch*

Bei der vergleichenden Analyse von acht natürlich kontaminierten Proben mit den beiden Verfahren trat jedoch eine ausgeprägte Diskrepanz der Ergebnisse (Abb. 9) auf. Nach Ethylacetat-Extraktion konnten nur mehr zwischen 18,6 und 44,7 % (Mittelwert: 31,5 %) der bei Direkteinsatz der Proben gemessenen Toxinkonzentrationen festgestellt werden, wobei eine Korrelation zwischen der Kontaminationshöhe und dem prozentualen Verhältnis der beiden Analysemethoden nicht erkennbar war. Diese Diskrepanz der Analyseverfahren ließ sich methodisch nicht erklären, da die ermittelten Wiederfindungsraten bei Direkteinsatz der Proben nur geringfügig höher als die nach Flüssig-Flüssig-Verteilung ermittelten Werte (durchschnittlich 12 %; Tab. 10). Da die in 3.3.1.1.2 erwähnten Neutralisationstests bewiesen hatten, dass beim Direkteinsatz der Bierproben eine unspezifische Beeinflussung des Testsystems nicht auftrat, ließen sich die differierenden Ergebnisse nur dadurch erklären, dass

bei der Bierherstellung (Gärung) in Ethylacetat unlösliche, mit den MAk kreuzreagierende DON-Derivate bzw. -Abbauprodukte entstehen. Aus diesem Grund wurden weiterführende Analysen mittels HPLC unternommen.

Dazu wurden 15 ml Probe mittels Ultraschall entgast, mit 10 ml 0,1 mol/l Phosphatpuffer versetzt und über IAC-Säule gereinigt. Das Eluat (3 ml Methanol) wurde am Rotationsverdampfer eingengt, in 0,25 ml Fließmittel aufgenommen und mittels HPLC wie in 3.3.2 beschrieben analysiert.

In Abb. 10 ist das Chromatogramm der bereits im Neutralisationstest verwendeten Bierprobe dargestellt. Durch Vergleich der Retentionszeiten mit Deoxynivalenol Standard konnte der Peak bei 6,3 min als DON identifiziert werden. Auch das UV-Absorptionsspektrum dieses Peaks war mit dem des Standards identisch.

Zur Abklärung der beschriebenen differierenden Analyseergebnisse für Bierproben wurde ein HPLC-Lauf fraktioniert (0,5 min/Fraktion) aufgefangen, in PBS verdünnt (1:2) und in den cd-EIA eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Form eines Immunogramms in Abb. 11 dargestellt. Es zeigte sich, dass die Fraktionen nach 5,5 und 7 min im DON-EIA eine deutliche Hemmung bewirkten. Vergleicht man das Immunogramm mit dem HPLC-Chromatogramm, kann man, unter Berücksichtigung einer leichten zeitlichen Verzögerung der Fraktionen gegenüber letzterem, Parallelen feststellen. Auffällig ist, dass die maximale Hemmung (etwa 71 % im Vergleich zum Leerwert) im Immunogramm bei 5 - 5,5 min liegt, während der auch in der HPLC identifizierbare DON-Peak eine geringere Hemmung verursachte. Dadurch konnte gezeigt werden, dass das IAC-Eluat neben DON noch eine weitere im EIA kreuzreagierende Substanz X (Rt: 4,9 min) enthielt, die allerdings unter den verwendeten HPLC-Bedingungen nicht von einem Probenmatrix-Peak abgetrennt werden konnte. Dem Peak bei 8,3 min des Chromatogramms konnte im Immunogramm dagegen kein Äquivalent gegenübergestellt werden.

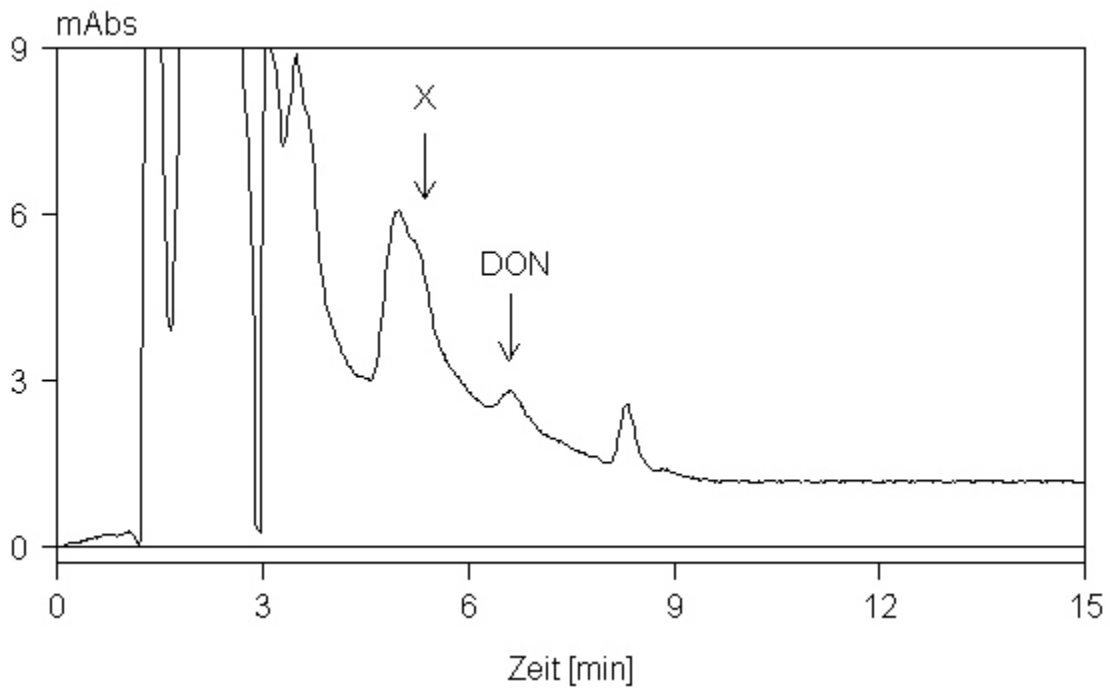


Abbildung 10: Chromatogramm einer Bierprobe (Vollbier hell) mit einem DON-Gehalt von $12,3 \mu\text{g/l}$. Der Lauf wurde in Fraktionen á $0,5 \text{ ml}$ aufgefangen und mittels EIA nachuntersucht (siehe Abb. 11)

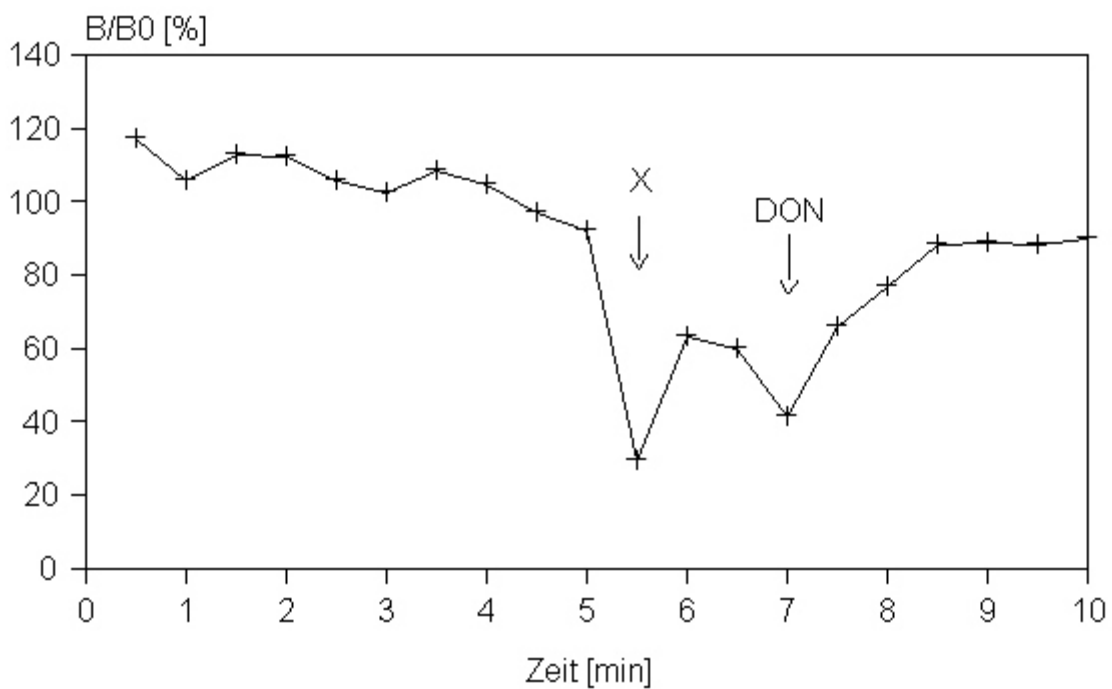


Abbildung 11: Immunogramm der Probe aus Abb.10. Gezeigt ist die durch die Fraktionen hervorgerufene Hemmung der Antigen/Antikörper-Reaktion im DON-EIA

Diese Ergebnisse zeigten, dass in Bier neben freiem DON zumindest eine weitere kreuzreagierende Substanz (DON-Analogon) nachzuweisen ist. In weiteren Versuchen wurde versucht, die im EIA stark reagierende Substanz X zu identifizieren. Die polareren Eigenschaften dieser Substanz (Rt kürzer als DON) legten den Verdacht nahe, dass es sich dabei um das verschiedentlich in der Literatur als Pflanzenmetabolit erwähnte (SEWALD et al., 1992; ENGELHARDT et al., 1999; KARLOVSKY, 1999) Deoxynivalenol-Glucosid handeln könnte.

Um diese Hypothese abzuklären, wurde untersucht, ob nach einer enzymatischen Behandlung des Bieres Änderungen in der Retentionszeit bzw. der Peakfläche der Substanz X zu beobachten sind. Dazu wurden die Bierprobe mit jeweils 10 U/ml α - und β - Glucosidase (einzeln, bzw. in Kombination), sowie mit 10 U/ml Dextranase versetzt. Vor Enzymzugabe wurde die Probe mittels Phosphatpuffer auf pH-Werte um 6,8 - 7,0 eingestellt. Diese Ansätze wurden bei 37 °C für 2, 4, 6, bzw. 8 h oder bei Zimmertemperatur über Nacht inkubiert.

Die Behandlung der Bierprobe mit den verschiedenen zuckerspaltenden Enzymen führte weder im EIA noch in der HPLC zu einer Änderung der Resultate (Ergebnisse nicht dargestellt). Somit erscheint es als unwahrscheinlich, dass es sich bei der fraglichen Substanz um das in der Literatur beschriebene DON-Zucker-Addukt handelt.

3.3.4 Vorkommen von Deoxynivalenol in Lebensmitteln des deutschen Marktes in den Jahren 2001 - 2003

Zur Identifizierung deoxynivalenolbelasteter Produkte des deutschen Marktes wurde eine breit gefächerte Auswahl an Zerealien-haltigen Lebensmitteln untersucht. Die Produkte wurden in Groß- und Einzelhandelsgeschäften im Großraum München gekauft, wobei darauf geachtet wurde, möglichst viele Arten von Geschäften (Supermärkte, Reformhäuser, Ökoläden, Kaufhäuser, etc.) und eine möglichst große Bandbreite der Produkte abzudecken. Nach einem ersten Überblick zur Belastung der Lebensmittel wurden Produkte teilweise gezielt gekauft, um höher belastete, in der Aufnahmemenge des Verbrauchers relevante Produktgruppen zu charakterisieren und chargenabhängige Veränderungen registrieren zu können. Insgesamt wurden im Zeitraum von Dezember 2001 bis Juli 2003 539 Proben auf Deoxynivalenol untersucht. Die Proben wurden nach dem Code der Zentralen Erfassungs- und Bewertungsstelle für Umweltchemikalien des Bundesgesundheitsamtes (ZEBS-Codierung) erfasst und nach Produktober- und Untergruppen sortiert. Einen Überblick über die Verteilung der Produktobergruppen gibt Abb. 12.

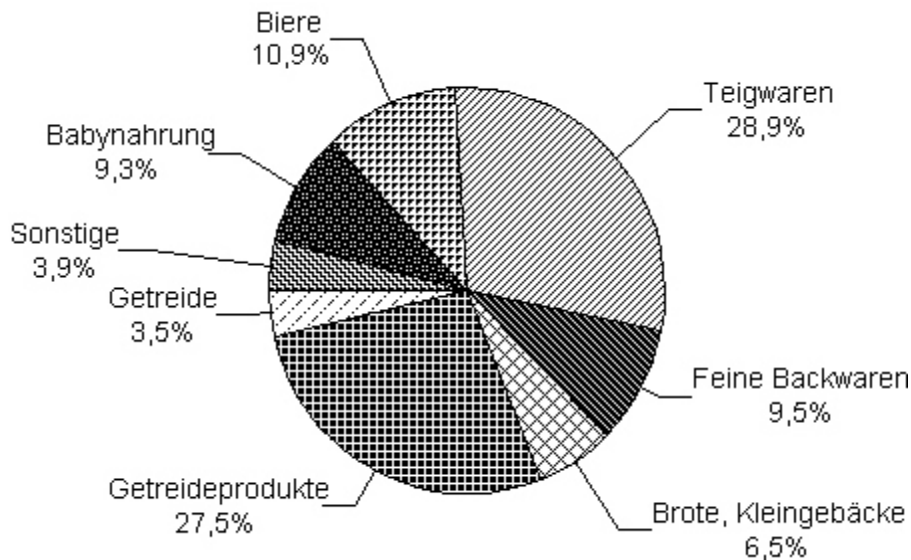


Abbildung 12: *Prozentualer Anteil der verschiedenen Produktobergruppen an der Gesamtmenge der untersuchten Proben*

In Abb. 13 sind die Anteile der positiven Proben an der jeweiligen Produktobergruppe dargestellt. Durchschnittlich waren 72,0 % der Proben mit Deoxynivalenol belastet, die Anteile positiver Proben variierten je nach Produktgruppe zwischen 15,8 und 98,3 %. Ein positiver Probenanteil von mehr als 50 % war bei feinen Backwaren (66,7 %), Getreideprodukten und Backvormischungen (75,7 %), Teigwaren (77,6 %), Broten/Kleingebäcken (82,9 %), sowie bei Bieren und bierähnlichen Getränken (98,3 %) festzustellen.

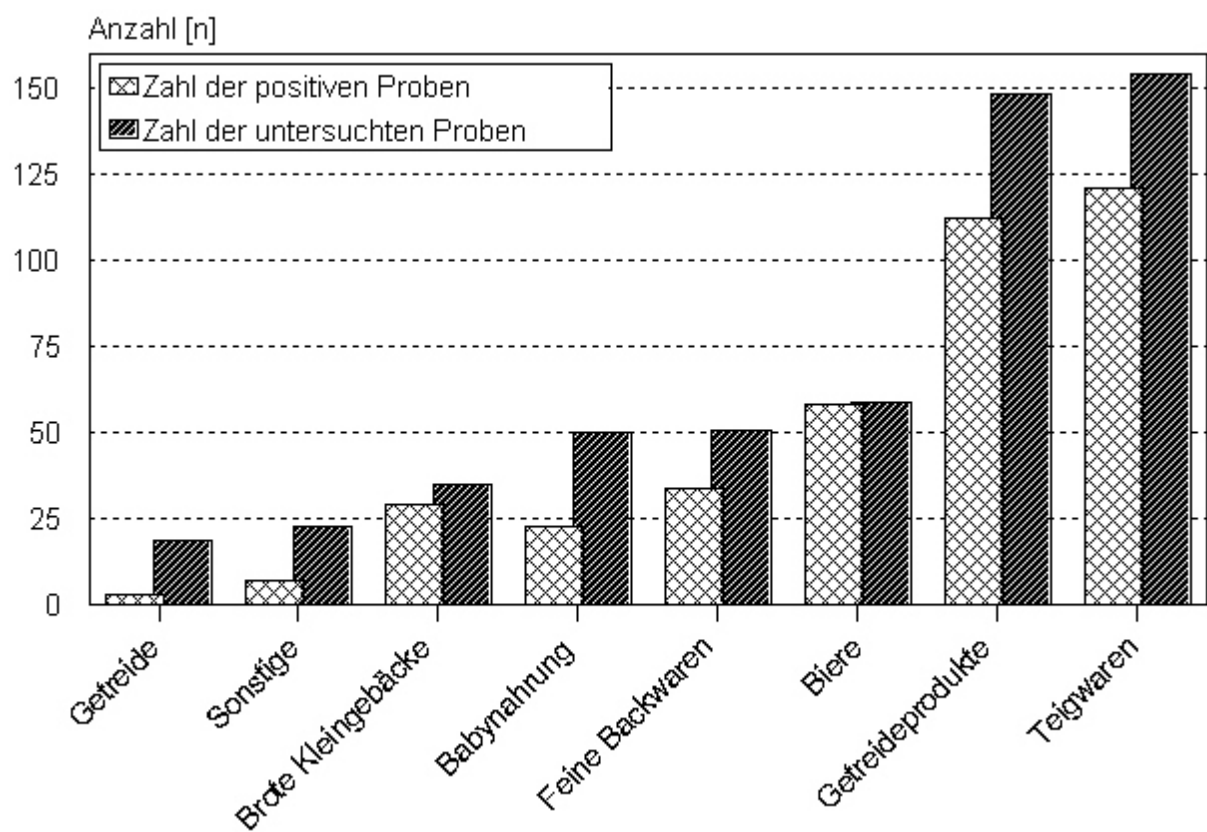


Abbildung 13: *Prozentualer Anteil DON-positiver Proben an der Gesamtzahl der untersuchten Produkte*

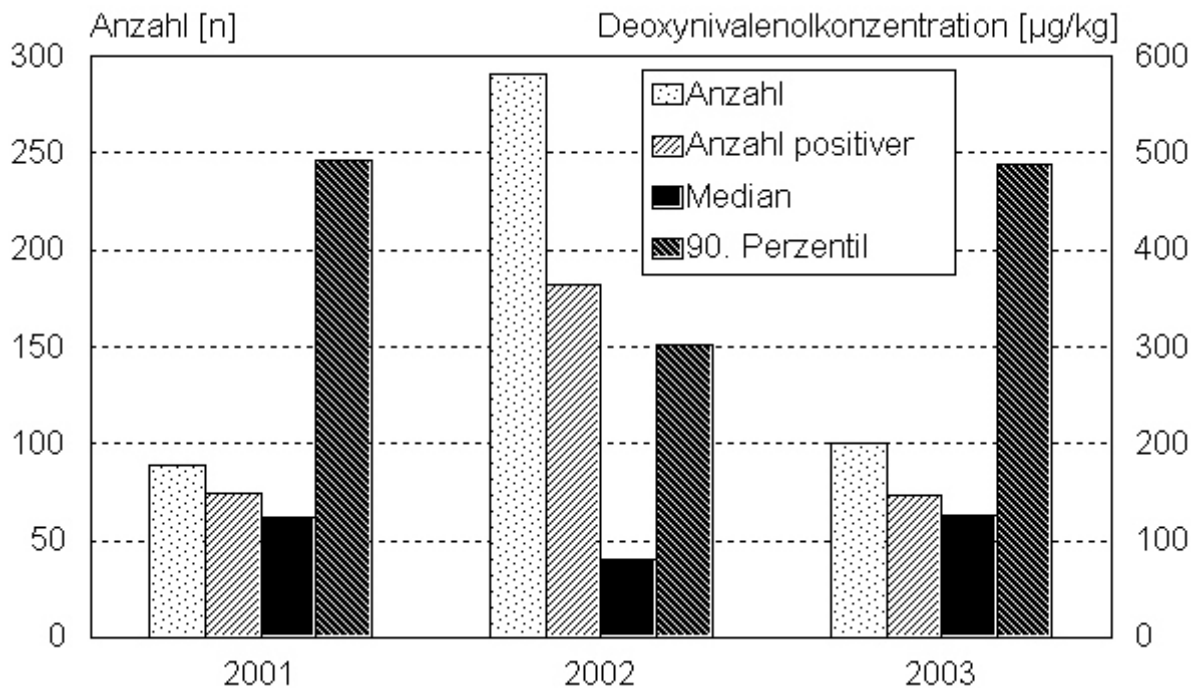


Abbildung 14: *DON-Belastung von Handelsprodukten in den einzelnen Untersuchungs-jahren. Biere wurden nur im Jahr 2003 untersucht und sind daher in dieser Darstellung nicht berücksichtigt.*

Abb. 14 gibt anhand des Medians und des 90. Perzentils einen Überblick über die DON-Belastung der Proben im Untersuchungszeitraum. Für die Auswertung der Untersuchungsergebnisse wurden aus mathematisch-statistischen Gründen alle Proben, in denen DON nicht nachweisbar war, mit einem Toxingehalt entsprechend der halben Nachweisgrenze des Untersuchungsverfahrens berücksichtigt. In den Jahren 2001 - 2003 wurde eine relativ konstante Belastung der Lebensmittel mit DON beobachtet, der Median lag im Bereich von 79 - 123 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Die absolut höchsten DON-Konzentrationen konnten in Teigwaren (1760 $\mu\text{g}/\text{kg}$) und in Weizenmehl (1053 $\mu\text{g}/\text{kg}$) gefunden werden. Auch die weiteren hoch kontaminierten Proben stammten vornehmlich aus der Gruppe der Teigwaren. Daneben waren unter anderem auch eine Maismehl-Probe (885 $\mu\text{g}/\text{kg}$) sowie ein Vollkornknäckebrötchen (757 $\mu\text{g}/\text{kg}$) stark belastet. Bei Säuglings- und Kleinkindernahrung wurden Maximalwerte von 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ gefunden, bei Bier betrug die höchste gemessene DON-Konzentration 58,7 $\mu\text{g}/\text{l}$. Da bei den beiden letzteren Produktgruppen bedingt durch variierende Analysebedingungen niedrigere Nachweisgrenzen im EIA erzielt werden konnten, werden diese Lebensmittel im folgenden separat betrachtet.

Die Unterteilung nach Produktobergruppen mittels ZEBS-Code wurde gewählt, um einen groben Überblick über die Verteilung der untersuchten Produkte zu vermitteln. Jedoch sind beispielsweise in der Gruppe 'Getreideprodukte' unter anderem Mehle, Grieß, Getreideflocken, Kleie, Müsli und Frühstückszerealien gelistet. Deshalb ist eine detailliertere Darstellung in Abb. 15 gewählt. Die für die einzelnen Produktuntergruppen ermittelte Deoxynivalenol-Belastung ist in Abb. 16 in Form des jeweiligen Medians dokumentiert, wobei nur Produktgruppen berücksichtigt sind, von denen mehr als 15 Proben untersucht wurden. Die Ergebnisse für alle untersuchten Produktgruppen sind in Tab. 12 aufgeführt.

In Reis konnte kein DON nachgewiesen werden. Auch bei anderen Getreiden und im Folgenden nicht einzeln aufgeführten Produktgruppen (u.a. diätetische Lebensmittel, Nuss-Nougatcreme) konnten bei stichprobenartigen Untersuchungen kaum nennenswerte Kontaminationen festgestellt werden. Detaillierte Darstellungen können jedoch der Tab. 12 entnommen werden.

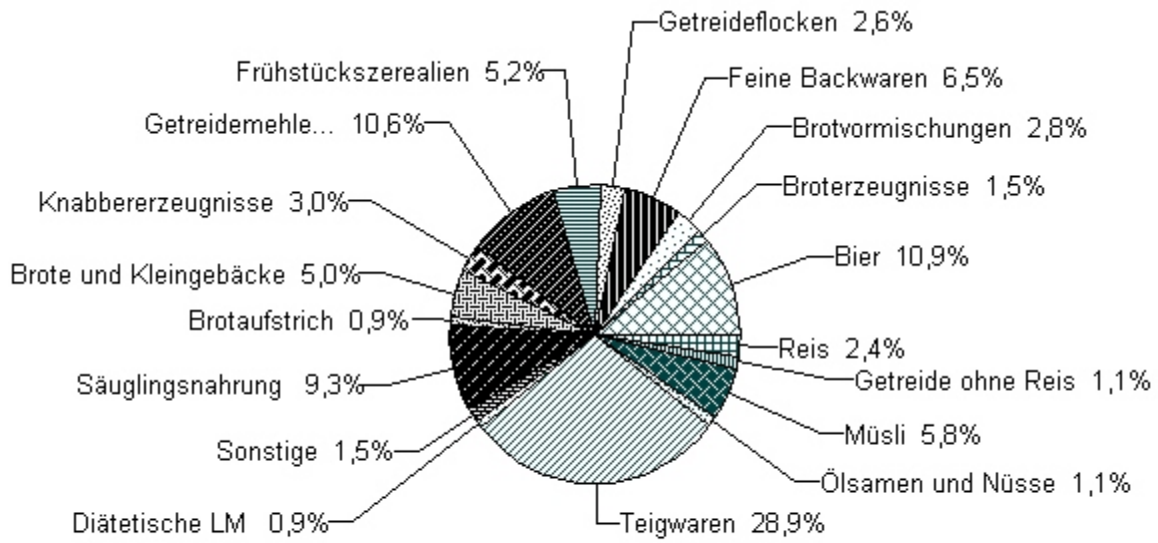


Abbildung 15: *Prozentualer Anteil der verschiedenen Produktuntergruppen an der Gesamtmenge der untersuchten Proben*

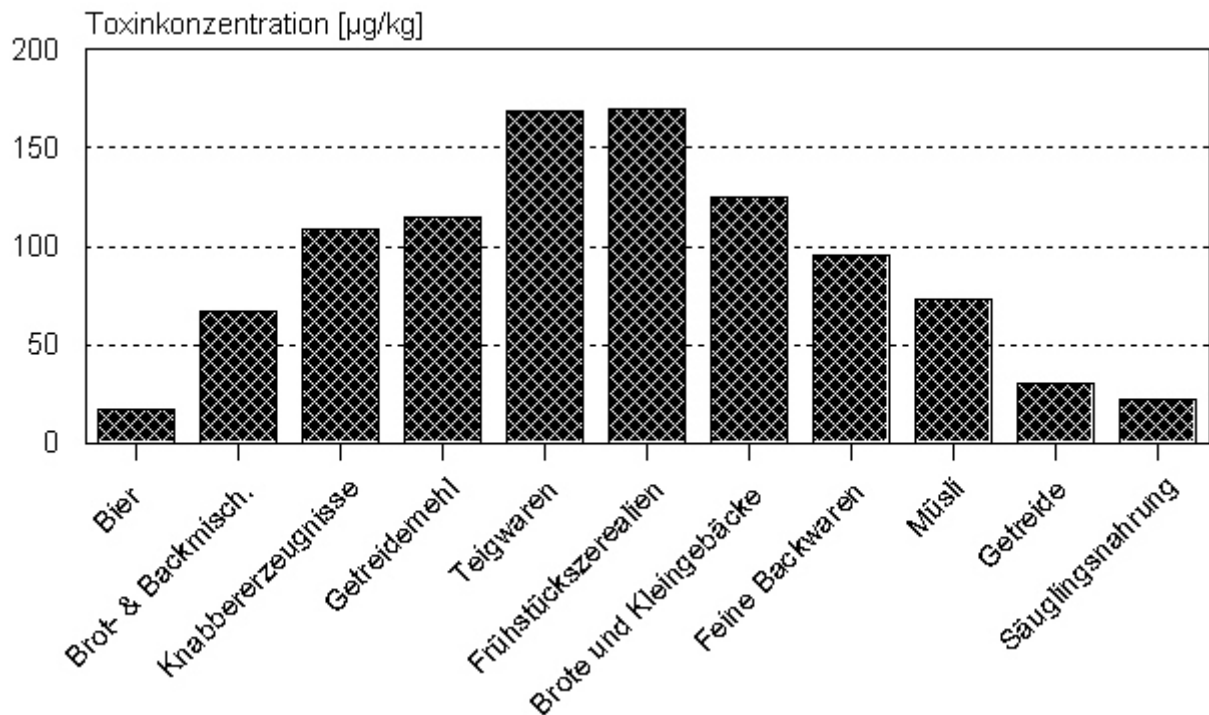


Abbildung 16: *Belastung der einzelnen Produktgruppen mit DON (50. Perzentil)*

Tabelle 12: Deoxynivalenol-Belastung von Lebensmitteln in den Untersuchungsjahren 2001 - 2003

Produktgruppe (ZEBS-Codes)	n	n positiv	% positiv	Mittelwert (µg/kg)	Median (µg/kg)	Maximalwert (µg/kg)	90. Perzentil (µg/kg)
Bier und bierähnliche Getränke (360000-369999)	59	58	98,3	21,0	17,4	58,7	37,6
Brote und Kleingebäcke (170000- 171999)	27	22	81,5	172	125	757	360
Broterzeugnisse (172000-179999)	8	8	100,0	345	323	600	524
Brotvormischungen und Backmischungen (161200- 169999)	15	8	53,3	87,4	67	334	169
Diätetische LM glutenfrei (490500)	5	2	40,0	27,9	15	67	51
Feine Backwaren (180000- 181499)	35	23	65,7	108	95	384	222
Frühstückszerealien (160600- 160899)	28	25	89,3	194	170	472	337

Fortsetzung Tabelle 12: Deoxynivalenol-Belastung von Lebensmitteln in den Untersuchungsjahren 2001 - 2003

Produktgruppe (ZEBS-Codes)	n	n positiv	% positiv	Mittelwert (µg/kg)	Median (µg/kg)	Maximalwert (µg/kg)	90. Perzentil (µg/kg)
Getreideflocken (160900-160999)	14	10	71,4	162	86	627	49
Getreidemehl, -griess und -schrot (160100-160399)	57	48	84,2	183	115	1053	366
Getreide mit Reis (150000- 159999)	19	3	15,8	38,6	30	134	67,2
Knabbererzeugnisse (181500- 181802)	16	11	68,8	129	109	394	272
Müsli (161108-161199)	31	19	61,3	85,1	73	361	137
Nuss-Nougatcreme (400604)	5	1	20,0	18,8	15	34	26,4
Ölsamen und Nüsse (230400- 239999)	6	2	33,3	35,7	30	63	62

Fortsetzung Tabelle 12: Deoxynivalenol-Belastung von Lebensmitteln in den Untersuchungsjahren 2001 - 2003

Produktgruppe (ZEBS-Codes)	n	n positiv	% positiv	Mittelwert (µg/kg)	Median (µg/kg)	Maximalwert (µg/kg)	90. Perzentil (µg/kg)
Säuglings- und Kleinkindernahrung (480000- 489999)	50	23	46,0	43	22,5	150	104
Teigwaren (220000- 229999+500102+500113)	156	121	77,6	238	169	1760	534
Rest (div. ZEBS-Codes)	8	4	50,0	101	64,5	219	205
Gesamt	539	388	72,0	144	80	1760	343

% positiv: Prozentsatz der auf DON positiv getesteten Proben

n: Anzahl der Proben

n positiv: Anzahl der auf DON positiv getesteten Proben

3.3.4.1 Produktgruppen mit erhöhter Deoxynivalenolbelastung

Als kritisch wurden diejenigen Produktgruppen eingestuft, deren Median höher als 100 µg/kg lag. Betroffen hiervon waren Teigwaren, Frühstückszerealien, Getreidemehle, Brote und Kleingebäcke, sowie Knabbererzeugnisse, welche nachfolgend detaillierter behandelt werden. Bei der ebenfalls hoch belasteten Produktgruppe Broterzeugnisse (z.B. Semmelbrösel) lag die untersuchte Probenanzahl (n = 8; Tab. 12) zu niedrig, um fundierte Aussagen zu treffen.

Bei Teigwaren wurde nicht zwischen dem Eieranteil oder dem Ausgangsgetreide unterschieden. Ebenso fielen hierunter Fertiggerichte aus Teigwaren. Solange eine separate Trennung der Saucen vom Hersteller aus gegeben war, wurde lediglich der Teigwarenanteil vermessen, andernfalls das gesamte Produkt. Der Anteil an positiven Proben (77,6 %) war über die drei Untersuchungsjahre relativ konstant, die höchste Belastung mit einem 90. Perzentil von 955 µg/kg und einem Median von 346 µg/kg konnte im Jahr 2001 festgestellt werden. Auch die Probe mit dem höchsten, im Untersuchungszeitraum gemessenen DON-Gehalt (1760 µg/kg) stammte aus diesem Jahr. In den Folgejahren lag der Spitzenwert jeweils bei etwa 900 µg/kg. Die relativ starke Belastung der Teigwaren wird auch dadurch deutlich, dass regelmäßig über den gesamten Untersuchungszeitraum Proben gefunden wurden, die den vorgeschlagenen Grenzwert von 500 µg/kg überschritten (11,5 % der Proben). Somit kann von einer regelmäßigen Belastung des Verbrauchers ausgegangen werden, wenn auch das Niveau der Kontaminationen im Vergleich zu 2001 in den Folgejahren deutlich niedriger lag (Abb.17).

Getreidemehle, -grieße und -schrote bieten insofern ein anderes Bild, als dass über den gesamten Untersuchungszeitraum eine relativ konstante Belastung (Median 115 µg/kg) festgestellt werden konnte. Jedoch lag das 90. Perzentil im Jahr 2003 etwa doppelt so hoch wie im Durchschnitt der einzelnen Jahre (366 µg/kg). Auch die Spitzenbelastung dieser Gruppe (1053 µg/kg) stammte von einer Weizenmehlprobe aus diesem Jahr (Abb. 18). Ebenso konnte bei einzelnen Proben aus dem Jahr 2002 und 2003 eine Überschreitung des avisierten Grenzwertes nachgewiesen werden (3.3.4.6).

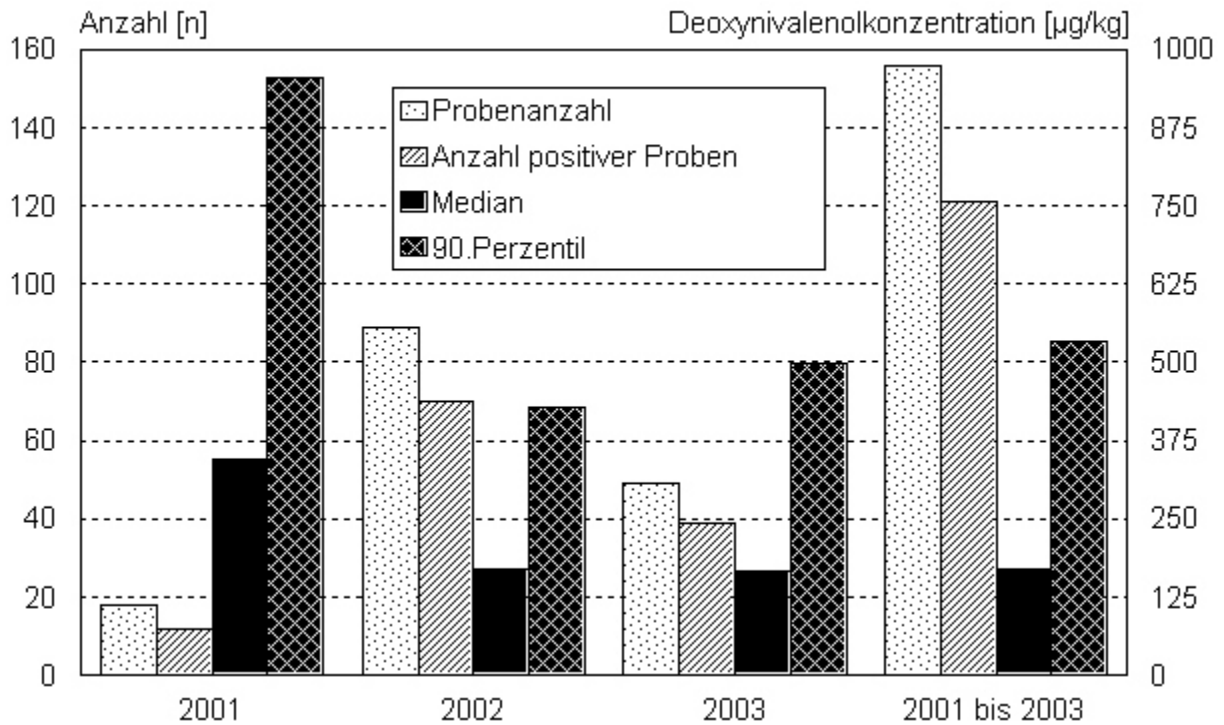


Abbildung 17: Deoxynivalenolbelastung von Teigwaren (ZEBS 220000 - 229999 + 500102 + 500113) in den einzelnen Untersuchungsjahren

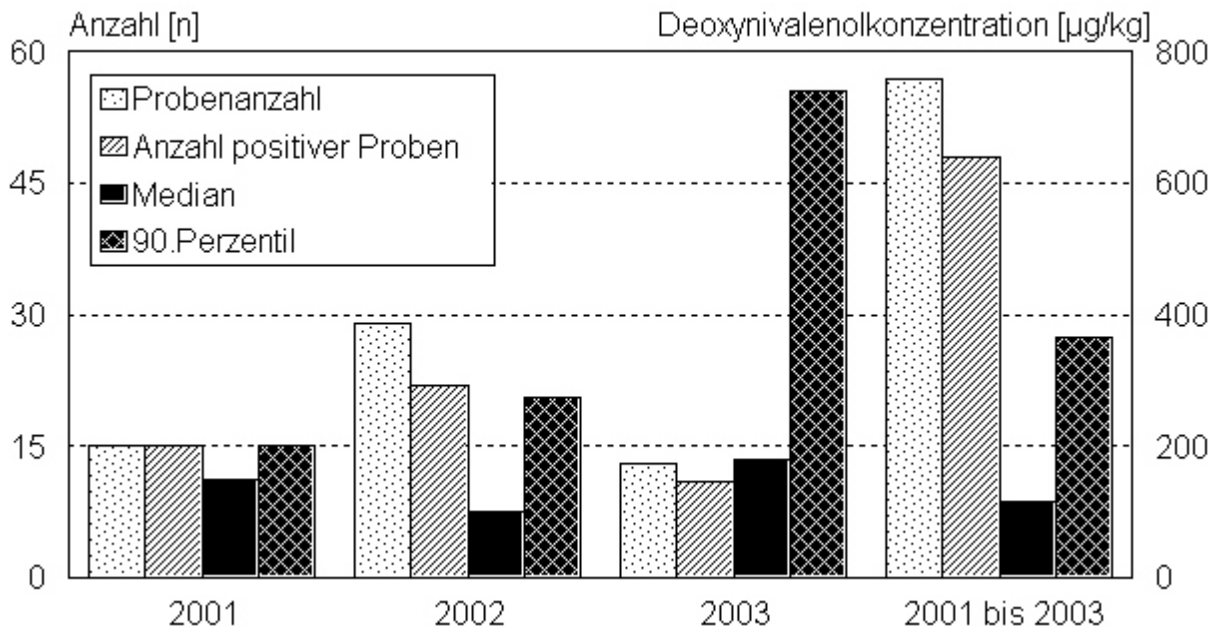


Abbildung 18: Deoxynivalenolbelastung von Getreidemehlen, -grießen und -schroten (ZEBS 160100 - 160399) in den einzelnen Untersuchungsjahren

Bei der Gruppe der Brote und Kleingebäcke ist anzumerken, dass nur Knäckebröte untersucht wurden. Dies beruht auf der Aufgabenverteilung zwischen den am Projekt beteiligten Instituten. Dabei erwies sich ein hoher Prozentsatz (81,5 %) als positiv, der Median lag bei 125 µg/kg. Der Spitzenwert von 757 µg/kg wurde bei einem Vollkornknäckebröte aus dem Jahr 2003 festgestellt.

Frühstückszerealien (z.B. Cornflakes) wurden hauptsächlich im Jahr 2002 untersucht. Das 90. Perzentil betrug 337, der Median 169,5 µg/kg. Im Vergleich zu Müsli (siehe 3.3.3.2) trugen Frühstückszerealien (Kontaminationshäufigkeit 89,3 %) stärker zur Deoxynivalenol-Belastung bei. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass in der Herstellung dieser Produkte Mais, der bekanntermaßen besonders anfällig für Fusarien-Infektionen ist, eine große Rolle spielt.

Auch Knabbererzeugnisse (Chips, Kräcker, Laugendauergebäck, etc.) wurden schwerpunktmäßig nur im Jahr 2002 untersucht. Der 90. Perzentilwert von 272 und ein Medianwert von 109 µg/kg wiesen auf eine überdurchschnittliche Kontaminationshöhe hin. Allerdings ist einschränkend anzumerken, dass nur eine relativ niedrige Anzahl an Proben (n = 16) untersucht wurde.

3.3.4.2 Produktgruppen mit mittlerer Deoxynivalenolbelastung

Produkte, die ebenfalls häufig mit Deoxynivalenol kontaminiert waren, jedoch eine geringere Belastungshöhe aufwiesen, werden durch Getreideflocken, Feine Backwaren, Müsli, sowie Brot- und Backmischungen repräsentiert, wobei von Getreideflocken im Untersuchungszeitraum nur relativ wenige Proben (n = 14) analysiert wurden. Der Medianwert lag hierbei bei 86 µg/kg.

Ein uneinheitliches Bild bot die Produktgruppe Feine Backwaren (Kekse, Biskuits, Teegebäck und andere Süßwaren mit Getreideanteil) aufgrund der inhomogenen Probenverteilung über den Untersuchungszeitraum. Ein aussagekräftiger Vergleich der Untersuchungsjahre ist daher nicht möglich. Der Median lag bei 95 µg/kg, das 90. Perzentil betrug 222 µg/kg.

Aus der Produktgruppe Müsli wurden hauptsächlich im Jahr 2002 Proben untersucht. Anhand des Medians (73 µg/kg) und des 90. Perzentils (137 µg/kg) kann keine übermäßige Belastung

des Verbrauchers abgeleitet werden. Auch der Prozentsatz positiver Proben (61,3 %) lag niedriger als bei den Frühstückszerealien.

Bei Brotvormischungen und Vormischungen für Backwaren kann aufgrund der Probenanalysen aus 2001 und 2002 (90.Perzentil 168,6 µg/kg, Median 67 µg/kg) von einer relativ niedrigen Belastung ausgegangen werden. Vormischungen für Kuchen (n = 5) waren durchwegs gering belastet. Die im 2001 gefundene Maximalbelastung lag bei 334 µg/kg.

3.3.4.3 Säuglings- und Kleinkindernahrung

Säuglings- und Kleinkindernahrung stellt eine Sondergruppe dar, da die Konsumentengruppe als besonders gefährdet gilt. Auch deshalb wurde bei der Entwicklung der Analysenmethode besonderer Wert auf eine niedrige Nachweisgrenze gelegt, alle Proben wurden ausnahmslos mit der unter 3.3.1.3.1 beschriebenen Methode gemessen. In Abb. 19 sind die Ergebnisse nach Analysenjahre getrennt aufgeführt, um eine Vergleichsmöglichkeit mit den restlichen Produktgruppen zu gewährleisten. Grundsätzlich bewegten sich die Kontaminationen der meisten Proben über den Untersuchungszeitraum auf niedrigem Niveau, der Median lag bei 22,5 µg/kg. Dass das 90. Perzentil (104 µg/kg) knapp über dem in der Zwischenzeit verabschiedeten Grenzwert von 100 µg/kg lag, ist v.a. auf die relativ starke Belastung einiger Proben, wie z.B. ein ökologisches Vollkornerzeugnis (150 µg/kg), im Untersuchungsjahr 2003 zurückzuführen. Im Hinblick auf den gesamten Untersuchungszeitraum fällt auf, dass der Anteil an positiven Proben in 2001 bei 66,7 % lag, sich in 2002 auf unter 20 % reduzierte um im Jahr 2003 wieder auf etwas mehr als 50 % zu steigen.

3.3.4.4 Biere und bierähnliche Getränke

Die Möglichkeit, Bier unverdünnt zu messen, erlaubte eine etwa um Faktor zehn niedrigere Nachweisgrenze von 5 bzw. 3 µg/l als bei anderen Produktgruppen (siehe 3.3.1.4.). Dieser sensitive Nachweis ist auch der Grund für den hohen Prozentsatz positiver Proben (98,3 %), wobei sich die Kontaminationshöhe üblicherweise in einem relativ niedrigen Bereich bewegte. Aufgrund des relativen hohen Verbrauchs (>100 l/Jahr/Kopf) ist dennoch davon auszugehen,

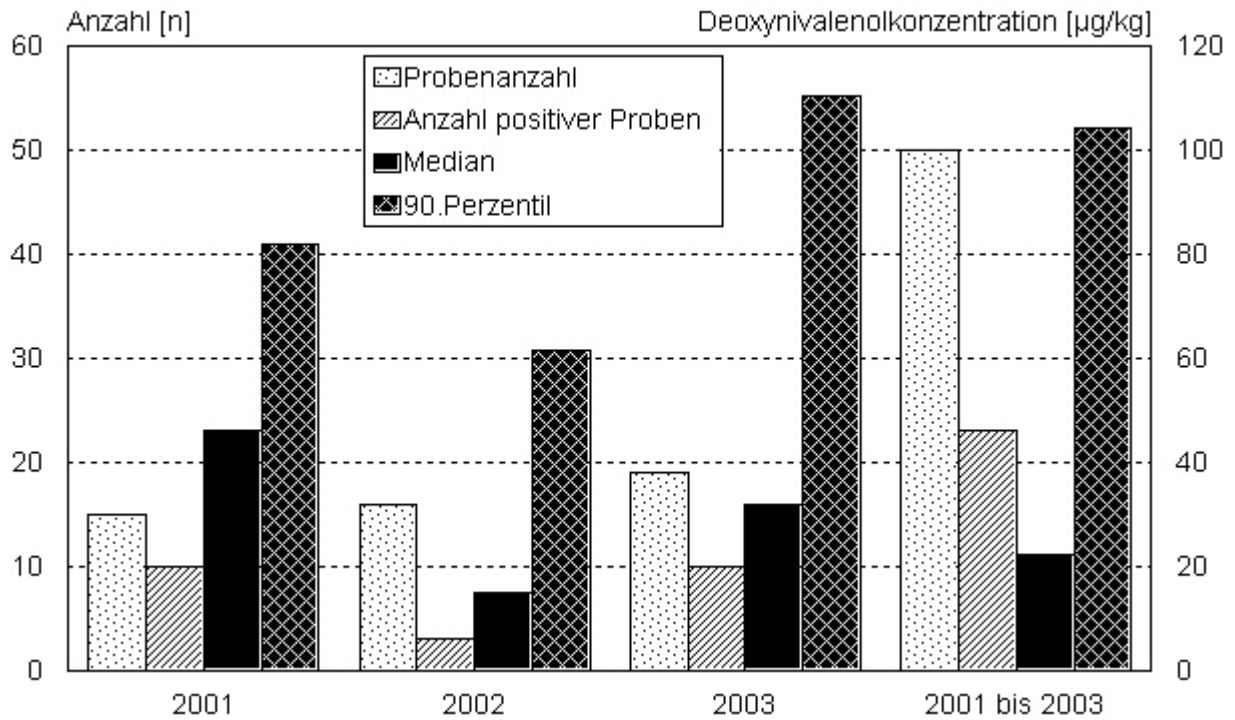


Abbildung 19: Deoxynivalenolbelastung von Säuglings- und Kleinkindernahrung in den einzelnen Untersuchungsjahren

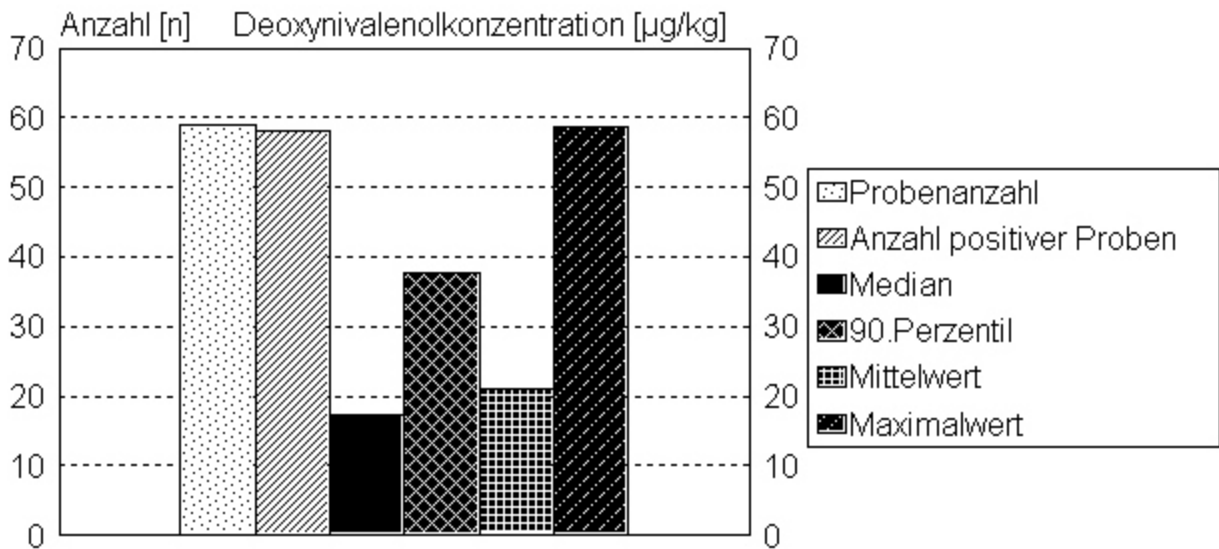


Abbildung 20: Deoxynivalenolbelastung von Bieren und bierähnlichen Getränken

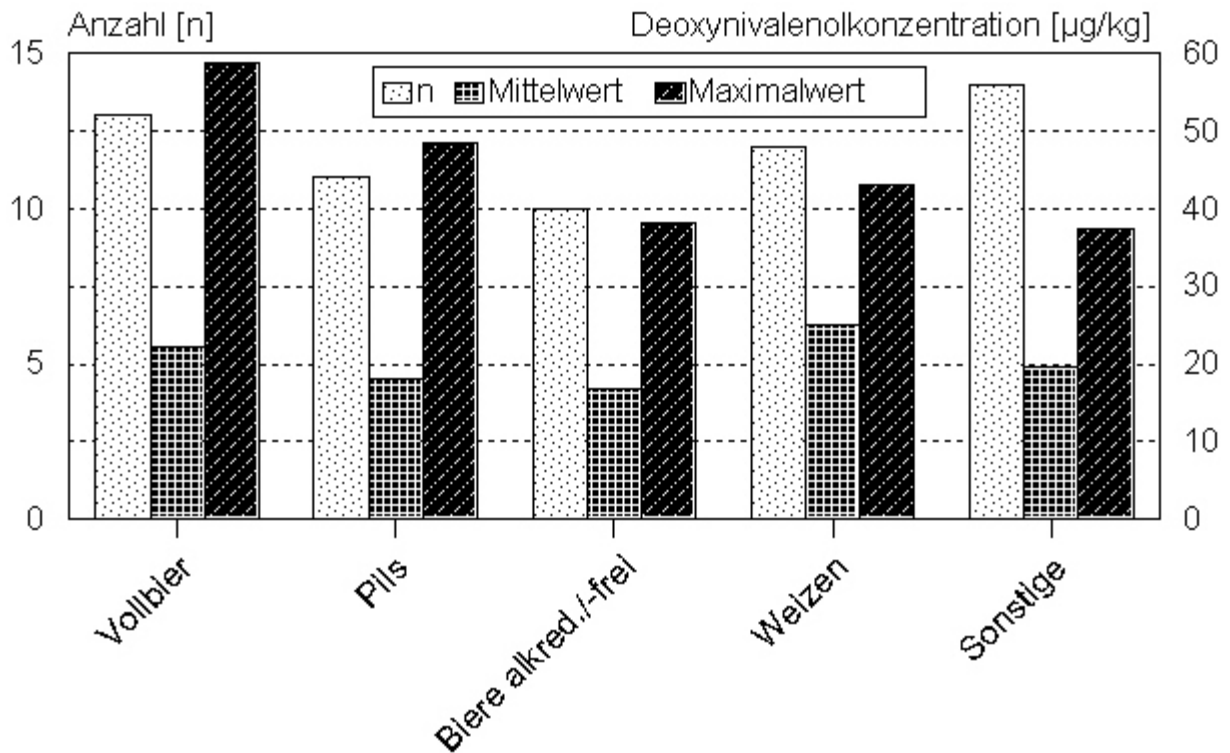


Abbildung 21: Vergleichende Darstellung der Deoxynivalenolbelastung verschiedener Biersorten

dass Bier mit einem 50. Perzentil von $17,4 \mu\text{g/l}$ und einem 90. Perzentil von $37,6 \mu\text{g/kg}$ bei großen Teilen der Bevölkerung deutlich zur DON-Belastung beiträgt. Abb. 20 gibt einen Überblick zur Belastungssituation, alle Bierproben stammten aus dem Jahr 2003. Die Zusammensetzung des Probenpools, sowie der jeweilige Mittelwert und der Maximalwert sind Abb. 21 zu entnehmen, wobei zwischen den verschiedenen Biersorten keine stark differierende Belastung zu verzeichnen war. Tendenziell ließen sich zwar bei dunklen Bieren etwas höhere DON-Gehalte nachweisen, allerdings lag die untersuchte Probenanzahl zu niedrig ($n = 6$), um gesicherte Aussagen treffen zu können.

3.3.4.5 Vergleich von ökologischen und konventionellen Produkten

Da beim Kaufverhalten der Verbraucher die ökologische Herkunft der Produkte zunehmend eine Rolle spielt, wurde bei der Auswahl der Proben versucht, diesem Trend Rechnung zu tragen. Dabei wurde nicht unterschieden ob die Produkte aus "ökologischem" oder "natürlichem" Anbau stammten, oder die Präfixe "Öko" und "Bio", oder das Ökosiegel des BMVEL trugen. Entscheidend war die deutliche Abgrenzung zu konventionellen Produkten. Der Anteil an der Gesamtprobenmenge lag bei 15,8 %, Tab. 13 gibt einen Vergleich der bei ökologischen und konventionellen Produkten erzielten Ergebnisse. Auffällig ist, dass der Prozentsatz positiver Proben bei ökologischen Produkten um mehr als 35 % niedriger lag als bei Produkten aus konventioneller Herstellung. Dementsprechend betrug der Mittelwert und der Maximalwert ökologischer Proben etwa die Hälfte der entsprechenden konventionellen Werte. Beim Median und dem 90. Perzentil wurden etwa um den Faktor 3 unterschiedliche Werte zwischen den beiden Gruppen ermittelt.

Tabelle 13: Vergleich der Deoxynivalenolbelastung ökologischer und konventioneller Produkte

Produkt	n	% positiv	Mittelwert t (µg/kg)	Median (µg/kg)	Max. (µg/kg)	90. Perzentil (µg/kg)
ökologisch	85	41,1	73,0	30	885	132,4
konventionell	454	76,7	157,7	92,5	1760	376,1

% positiv: Prozentsatz der auf DON positiv getesteten Proben

n: Anzahl der Proben

Max.: Maximalwert

3.3.4.6 Grenzwertüberschreitungen

In Deutschland wurden mit der am 04.02.2004 verkündeten Verordnung zur Änderung der Mykotoxin-Höchstmengenverordnung und der Diätverordnung Höchstmengen für DON in Lebensmitteln festgelegt: in Speisegetreide und Getreideerzeugnissen 500 µg/kg und für Brot, Kleingebäck und feine Backwaren 350 µg/kg. In Getreideerzeugnissen, die zur Herstellung von diätetischen Lebensmitteln für Säuglinge und Kleinkinder vorgesehen sind, darf der DON-Gehalt 100 µg/kg nicht überschreiten. Insgesamt wurden im Untersuchungszeitraum von 12 % der Säuglings- und Kleinkindernahrungsproben, 11,1 % der Brote- und Kleingebäcke, 37,5 % der Broterzeugnisse, 2,9 % der Feinen Backwarenproben, 14,3 % der Getreideflocken, 7,0 % der Getreidemehle, -grieße und -schrote und 6,3 % der Knabbererzeugnisse diese Grenzwerte überschritten. Den im Entwurf der o.a. Verordnung ursprünglich auch für Teigwaren avisierten Grenzwert von 500 µg/kg überschritten 11,5 % der untersuchten Nudelprodukte. Alle nicht aufgeführten Produkte wiesen keine Grenzwert-Überschreitungen auf oder sind wie beispielsweise Biere nicht Gegenstand der Verordnung.

4 DISKUSSION

In den letzten Jahren wurde auf dem Gebiet des vorbeugenden Verbraucherschutzes der Mykotoxin-Problematik verstärkte Aufmerksamkeit geschenkt, da viele Untersuchungen das häufige Vorkommen dieser Schimmelpilzmetabolite in Lebensmitteln dokumentieren und zum anderen in jüngerer Zeit von verschiedenen, internationalen Institutionen Monographien zu den toxikologischen Eigenschaften einiger Mykotoxine erarbeitet wurden. Aufgrund ihrer hohen Inzidenz rückten hierbei die Fusarientoxine (Fumonisin, Typ A- und B-Trichothecene, Zearalenon) in den Mittelpunkt des Interesses - dies gilt insbesondere für DON, das weltweit am häufigsten in Lebensmitteln nachweisbare Mykotoxin.

Bei der toxikologischen Evaluierung von DON wurden insbesondere dessen immunsuppressive Eigenschaften und die mit der chronischen Aufnahme einhergehende Gewichtsreduktion berücksichtigt. Zwischen den verschiedenen Expertengruppen (JECFA, SCF, RIVM, Nordic Working Group) herrschte Einigkeit darüber, die tolerierbare, tägliche Aufnahmemenge (tolerable daily intake, TDI) von DON auf 1 µg/kg KGW/d festzulegen. Diese Empfehlungen veranlasste das BMVEL eine Studie zu initiieren, in der statistisch aussagekräftige Daten zur Belastung des deutschen Verbrauchers mit DON (und ZEA) erhoben werden sollten. Teilaspekte dieser Studie waren Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

4.1. Analytik

Validierte Analysenverfahren sind essentielle Voraussetzung von Inzidenzstudien, da nur so die Konsistenz der erhobenen Daten und die Vergleichbarkeit mit anderen Erhebungen gewährleistet ist. Deswegen wurde im Rahmen des Verbundprojektes großer Wert auf die Validierung der verschiedenen Nachweisverfahren gelegt, insbesondere da aufgrund des höheren Probendurchsatzes auch Enzymimmuntests zur quantitativen Analyse eingesetzt wurden. Da es im Hinblick auf das zu untersuchende breite Probenspektrum nicht sinnvoll erschien, für jede Probenmatrix eine zeit- und arbeitsaufwendige Bestimmung der Wiederfindungsraten durchzuführen, wurde zur Validierung des verwendeten EIA-Verfahrens folgender

konzeptioneller Ansatz gewählt: die Richtigkeit der Analysen wurde laborintern durch Neutralisationstests und Untersuchung dotierter Proben, sowie extern durch Ringversuche innerhalb des Forschungsverbundes überprüft; die Wiederholpräzision der Methode wurde hingegen vorzugsweise anhand kontaminierter Realproben bestimmt.

Der im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierte Enzymimmuntest erwies sich mit einer 50 %-Hemmungsdosis von 8,4 ng/ml und einer Nachweisgrenze von 3,7 ng/ml als eines der sensitivsten bislang beschriebenen immunologischen Nachweisverfahren für DON. Die Testmittelpunkte anderer klassischer EIA-Verfahren zum Nachweis von DON liegen im Bereich von 18 bis 160 ng/ml (MARAGOS und McCORMICK, 2000; SCHNEIDER et al., 2000), bei in jüngerer Zeit publizierten alternativen immunchemischen Nachweisverfahren wie dem Fluoreszenz-Polarisationstest bzw. einem auf der SPR-Technik basierenden System sogar um zwei Größenordnungen (407 bzw. 720 ng/ml) schlechter (MARAGOS und PLATTNER, 2002; SCHNERR et al., 2003). Nur der von TÜDÖS et al. (2003) beschriebene SPR-Test weist mit einem 50%-Wert von 4,1 ng /ml eine höhere Sensitivität auf.

Wie bei fast allen bislang beschriebenen Antikörpern zum Nachweis von DON besitzt auch der in den eigenen Untersuchungen verwendete MAk hohe Affinität zu strukturverwandten Analoga, insbesondere 3-AcDON. Dies kann bei der Untersuchung kontaminierter Proben in einer Überschätzung des tatsächlichen DON-Gehaltes resultieren. Wie allerdings eine jüngst publizierte umfangreiche Datenerhebung der SCOOP-Arbeitsgruppe Fusarientoxine (europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/task3210.pdf) zeigte, wurde europaweit nur in ca. 8 % der Proben (n = 3721) 3-AcDON - üblicherweise in niedrigen Konzentrationen - nachgewiesen, in Mais lag die Inzidenz höher (27 %). Diese Angaben decken sich weitgehend mit den eigenen Untersuchungen, bei denen auch nur in maishaltigen Produkten 3-AcDON nachweisbar war; die Konzentrationen lagen allerdings so niedrig, dass keine Überschätzung des DON-Gehaltes zu erwarten war.

Zur Extraktion von DON aus Lebens- und Futtermitteln wird v.a. beim Einsatz physikalisch-chemischer Nachweisverfahren sehr häufig ein Acetonitril/Wasser-Gemisch (84/16) verwendet (vgl. Tab. 2; Übersicht bei KRŠKA, 2001). Der hohe Anteil an organischem Lösungsmittel in

dieser Extraktionslösung ist jedoch bei Verwendung eines Enzymimmuntests als Nachweisverfahren mit Nachteilen behaftet, da dieser Rohextrakt vor dem Testeinsatz mindestens 1:10 in Puffer verdünnt werden muss (TÜDÖS et al., 2003) - mit entsprechenden Auswirkungen auf die Nachweisempfindlichkeit des Verfahrens. Mit dem in den eigenen Untersuchungen eingesetzten Methanol/A. dest.- bzw. Methanol/PBS-Gemisch (1/9) ließen sich diese Probleme hingegen vermeiden ohne dass die Effizienz der Extraktion darunter litt. Im Laufe der Studie zeigte sich vielmehr, dass damit eine ideale, für alle Probenmatrices einsetzbare Extraktionslösung gefunden wurde. Die Wiederfindungsraten lagen durchwegs bei > 90 %, während MARAGOS und McCORMICK (2000), sowie MARAGOS und PLATTNER (2002), die PBS ohne Zusatz von Lösungsmittel zur Extraktion von dotierten Weizen- und Maisproben verwendeten, geringere Raten erzielten (71,4 - 94,3 %).

Komplexe Probenmatrices, wie Säuglings- und Kleinkindernahrung, aber auch fettreiche (schokoladenhaltige Backwaren, Frühstückszerealien, Chips und Nuss-Nougatcremes), quellfähige (z.B. Kleieprodukte) und farbintensive Produkte (z.B. Malzkaffee) verursachten unspezifische Reaktionen im EIA und erforderten einen zusätzlichen Aufreinigungsschritt. In früheren Untersuchungen (PATHRE und MIROCHA, 1978; USLEBER et al. 1991) hatte sich Ethylacetat für die Flüssig-Flüssig-Verteilungschromatographie von DON, als geeignet erwiesen. Dieses Verfahren wurde für die jeweiligen Probenmatrices adaptiert, wobei hohe Wiederfindungsraten von durchschnittlich 82,9 % ermittelt werden konnten.

Untersuchungen zur Wiederholpräzision der verschiedenen Verfahren (Direkteinsatz der Proben bei einfachen Probenmatrices bzw. Reinigung mittels Ethylacetat bei komplexen Matrices) wurden wie von TRENHOLM et al. (1985) gefordert an einer Vielzahl von natürlich kontaminierten Probenmaterialien (Weizenmehl, Teigwaren, Backwaren, Kleingebäck, Getreideprodukte, Säuglings- und Kleinkindernahrung) durchgeführt. Für alle Materialien konnte die Reproduzierbarkeit der Untersuchungen belegt werden, die Variationskoeffizienten bewegten sich in einem für EIA's üblichen Bereich von 8,9 (Teigwaren) bis 12,6 % (Säuglings- und Kleinkindernahrung), wobei zu berücksichtigen ist, dass bei letztgenannter Gruppe der Kontaminationsbereich (33 - 104 µg/kg) sehr niedrig lag. Daneben belegten diese Ergebnisse aber auch die homogene Verteilung des Toxins im Untersuchungsmaterial, da bei beiden

Probenmaterialien eine sehr ähnliche Streubreite der Ergebnisse beobachtet werden konnte.

Dass mit den entwickelten Extraktionsverfahren und dem etablierten Enzymimmuntest ein zuverlässiges und robustes Nachweissystem für die Routineanalytik zur Verfügung stand, zeigten auch die Vergleichsuntersuchungen mit der HPLC. Beide Verfahren lieferten bei der Analyse eines breiten Spektrums unterschiedlicher Lebensmittel konsistente Ergebnisse ($r^2 = 0,921$). Die Richtigkeit der Ergebnisse wurde auch durch die innerhalb des Verbundprojektes durchgeführten Ringversuche (Ergebnisse nicht dargestellt) belegt, bei denen insgesamt zehn Proben im Kontaminationsbereich von 106 - 903 $\mu\text{g}/\text{kg}$ von sechs verschiedenen Labors untersucht wurden, wobei das eingesetzte Methodenspektrum alle derzeit in der Praxis verwendeten Verfahren umfasste. Trotz der Vielzahl der eingesetzten Methoden wurde eine bemerkenswerte Übereinstimmung der Ergebnisse beobachtet.

Bei der Analyse von natürlich kontaminierten Bierproben wurden hingegen in Abhängigkeit vom verwendeten Probenaufarbeitungs- (Direkteinsatz bzw. Extraktion mit Ethylacetat) und Nachweisverfahren (EIA, HPLC) deutlich divergierende Resultate erhalten, obwohl im Rahmen der Methodvalidierung (Neutralisationstests, Untersuchung dotierter Proben) für alle Verfahren hohe Wiederfindungsraten und eine gute Reproduzierbarkeit ermittelt werden konnten. Auf der Suche nach der Ursache für diese Diskrepanz konnte durch Kombination der HPLC mit dem EIA (Immunogramm) die Existenz einer mit dem MAk DON-KLH I 1H8 kreuzreagierenden Substanz X nachgewiesen werden. Da aufgrund des Retentionsverhaltens in der HPLC und der Stabilität gegenüber zuckerspaltenden Enzymen zweifelsfrei ausgeschlossen werden kann, dass es sich bei dieser Substanz um eines der bekannten DON-Analoga (acetyliertes DON, DOM-1, DON-3-Glucosid) handelt, kann derzeit über die Struktur der Verbindung nur spekuliert werden. Die Ergebnisse des Immunogramms (Peakhöhe im Chromatogramm, relative Hemmung im EIA) lassen darauf schließen, dass der in den EIA implementierte MAk zur Substanz X eine ähnlich hohe Affinität wie zu DON besitzt. Unter Berücksichtigung des bekannten Reaktivitätsmuster des MAk (ausgeprägte Kreuzreaktionen mit 3-AcDON von $>500\%$ und minimale Reaktivität mit Nivalenol) erscheint es somit wahrscheinlich, dass die Substanz an C3/C4 des Trichothecen-Grundgerüsts ähnliche funktionelle Gruppen wie DON besitzt. Da aber andererseits der linksseitige Ring des DON-

Moleküls mit der Carbonylgruppe an C7, sowie die Hydroxylgruppe an C15 eine immundominante Struktur darstellen, bleiben als mögliche Strukturvarianten nur mehr Verbindungen übrig, die sehr hohe Ähnlichkeiten mit DON aufweisen. Als repräsentative Vertreter solcher Strukturen sind beispielsweise das Iso-DON (Abb. 1) bzw. das von VÖLKL et al. (1997) ansatzweise charakterisierte X1-DON (2.1.3) zu nennen. Gegen diese Hypothese spricht allerdings, dass die unbekannte Substanz im Gegensatz zu DON in Ethylacetat kaum löslich ist. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass unter rein analytischen Gesichtspunkten der Direkteinsatz der Bierproben in den EIA eine deutliche Überschätzung des tatsächlichen DON-Gehaltes zur Folge hat. Andererseits stellt sich im Hinblick auf den vorbeugenden Verbraucherschutz die Frage, ob das Vorkommen einer offensichtlich sehr eng mit DON verwandten Substanz X im Bier nicht bei der Ermittlung von künftigen Grenzwerten Berücksichtigung finden sollte, solange die Identifizierung und toxikologische Bewertung des Derivates nicht möglich ist.

4.2 Vorkommen

Zur Verbesserung der Datenlage über die Kontamination von Lebensmitteln mit DON wurden in der vorliegenden Arbeit im Zeitraum von Dezember 2001 bis Mai 2003 insgesamt 539 Lebensmittel mittels EIA untersucht, wobei aufgrund der Verzehrshäufigkeit Teigwaren, Mehle und Biere einen Schwerpunkt bildeten. Daneben wurde besonderes Augenmerk auf die Belastungssituation von Kleinkinder- und Säuglingsnahrung gelegt.

Grundsätzlich konnte in der vorliegenden Untersuchung eine hohe Vorkommenshäufigkeit (72 %) von DON in Lebensmitteln festgestellt werden. Auch in anderen neueren Arbeiten zur Inzidenz von DON wurden ähnlich hohe Kontaminationsraten festgestellt. So erwiesen sich bei RASMUSSEN et al. (2003) 78 % von 190 untersuchten Mehlproben als positiv, CIRILLO et al. (2003) konnten in 84 % der 202 untersuchten Lebensmittel des italienischen Marktes DON nachweisen. Ähnliche Daten wurden auch von MacDONALD et al. (2003) aus England berichtet. Bei den von einer SCOOP-Arbeitsgruppe gesammelten Daten über das Vorkommen von DON in den EU-Mitgliedsstaaten ergab sich bei Auswertung von 11022 Analysedaten eine

durchschnittliche Kontaminationsrate von 57 %, wobei hierbei zu berücksichtigen ist, dass die Nachweisgrenzen in den verschiedenen Labors stark differierten. Auch der in den eigenen Untersuchungen festgestellte Median von 80 µg/kg korreliert mit den von CIRILLO et al. (2003) vorgestellten Daten (Median 65 µg/kg). Bei RASMUSSEN et al. (2003) lagen die jahresabhängig ermittelten Mediane im Bereich von 10 - 167 µg/kg, während im SCOOP-Bericht abhängig von der untersuchten Getreideart Mediane von 37 µg/kg (Gerste) bis zu 594 µg/kg (Mais) angegeben werden.

Wie auch schon in anderen in Deutschland durchgeführten Studien beobachtet wurde (BASSEN und THIELERT, 2000; DÖLL et al., 2002; KIRCHHEIM et al., 2002; SCHOLLENBERGER et al., 2002), wiesen ökologische Produkte generell eine geringere Kontaminationshöhe und Kontaminationshäufigkeit auf als konventionell produzierte.

Mit Blick auf die untersuchten Produktgruppen erwiesen sich insbesondere zu Beginn der Untersuchungen Teigwaren als besonders hoch belastet (90. Perzentil 2001: 955 µg/kg), während bei den anderen untersuchten Probenmatrices starke Hersteller- und Chargenabhängige Variationen auftraten. Bedingt durch eine zunehmende Sensibilisierung der Teigwaren-Hersteller und einer daraus resultierenden Intensivierung der betrieblichen Analysen (WOLFF, pers. Mitteilung) konnte im Folgezeitraum eine deutliche Reduktion der DON-Belastung dieser Produkte beobachtet (Median 2001, 2002 und 2003: 346, 170, bzw. 167 µg/kg) werden.

Bei Getreidemehl, -schrot und -grieß betrug der Medianwert 115 und das 90. Perzentil 366 µg DON/kg, 7 % der Proben überschritten den inzwischen in der MykotoxinhöchstmengenVO festgelegten Grenzwert von 500 µg/kg. Bei von WOLFF (2003) angestellten Untersuchungen zur DON-Belastung von im Rahmen der besonderen Ernteermittlung gezogenen Weizenproben, überschritten 2001 15,8 % der Proben und 2002 13 % den Grenzwert. Da es sich dabei um Feldproben handelte, lassen diese Daten den Rückschluss zu, dass ca. 50 % der hochbelasteten Partien nicht in den Handel kommen, bzw. mit geringer belasteten Chargen verschnitten werden. Eine Korrelation des DON-Gehaltes mit dem Ascheanteil von Mehlen, wie von SCHOLLENBERGER et al. (2002) beobachtet, konnte in den eigenen Untersuchungen nicht festgestellt werden, ebensowenig wie eine stärkere Belastung von Vollkornprodukten. Von

RASMUSSEN et al. (2003) wurden in dänischen Weizen- und Roggenmehlproben der Jahre 1998 bis 2001 ähnliche Mediane zwischen 10 und 167 µg/kg ermittelt. Bei schwedischen Hartweizenmehlproben (n = 33) konnten hingegen in den Untersuchungsjahren 2000 und 2001 deutlich höhere Belastungen festgestellt werden (Mediane > 1200 µg DON/kg).

In Säuglings- und Kleinkindernahrung wurde im Untersuchungszeitraum anhand von 50 Proben ein Medianwert von 22,5 µg/kg und ein 90. Perzentil von 104,2 µg/kg bei einer Kontaminationshäufigkeit von 46 % ermittelt, wobei Proben des Jahres 2002 niedriger belastet schienen. CIRILLO et al. (2003) fanden ganz ähnliche Daten in italienischer Babynahrung (Max. 166 µg DON/kg, Median 35 µg DON/kg, Inzidenz 62 %). SCHOLLENBERGER et al. (1999) führten die niedrigere DON-Belastung von Babynahrung auf eine bessere Getreideauswahl, eine höhere DON-Reduktion durch den Bearbeitungsprozess und auf einen niedrigeren Anteil von Getreide im Fertigprodukt zurück. Allgemein kann jedoch davon ausgegangen werden, dass Verbesserungen im betrieblichen Qualitätsmanagement in den letzten Jahren Wirkung gezeigt haben: noch vor wenigen Jahren konnten BASSEN und THIELERT (2000) in zwei Babynahrungs-Proben DON-Gehalte finden (505 bzw. 537 µg/kg), die den jetzigen Grenzwert (100 µg/kg) um mehr als das Fünffache überschritten hätten. LOMBAERT et al. (2003) wiesen in 363 Kleinkindernahrungsmitteln aus Nordamerika und Europa in den Jahren 1997 - 1999 zum Teil auch sehr hohe Werte nach (Maximalwert 980 µg/kg, Mittelwerte von 32 - 150 µg/kg, Inzidenz 63 %).

In 58 von 59 Bierproben konnte DON nachgewiesen werden, wobei hier zu berücksichtigen ist, dass für diese Probenmatrix eine sehr niedrige Nachweisgrenze von 5 µg/l bedingt durch den Direkteinsatz der Proben realisiert werden konnte. Der Medianwert lag bei 17,4, der Mittelwert bei 21 µg/l. Interessanterweise konnten bei den verschiedenen Biersorten keine signifikanten Unterschiede in der DON-Belastung festgestellt werden, wie von NIESEN et al. (1993) berichtet, bzw. wie es auch aufgrund der von SCOOP (2003) ermittelten deutlich niedrigeren DON-Belastung von Gerste im Vergleich zum Weizen zu erwarten gewesen wäre. NIESEN et al. (1993) fanden in 190 Lager- und Weizenbierproben aus Süddeutschland deutlich höhere Mittelwerte von 148 bzw. 245 µg/l, der Prozentgehalt positiver Proben war mit 22,8 %, bzw. 47,8 % aber geringer, wobei diese Differenz auf die deutlich schlechteren Nachweisgrenzen (50

$\mu\text{g/l}$) der damals verwendeten Methode zurückzuführen sein dürfte.

4.3 Belastung des deutschen Verbrauchers

Im Hinblick auf die durchschnittlichen Verzehrsgewohnheiten und der mittleren DON-Belastung der untersuchten Lebensmittelgruppen lässt sich eine generelle oder besondere Gefährdung des deutschen Verbrauchers nicht ableiten. Bei allen Lebensmitteln traten aber immer wieder Spitzenbelastungen bei bestimmten Chargen auf, deren Verzehr eine deutliche Überschreitung des TDI zur Folge hätte. Im Vergleich zu früheren Berechnungen des RIVM, (PIETERS et al., 2001), denen eine deutlich höhere Durchschnittsbelastung der Lebensmittel zugrunde lag, ist aber derzeit nicht davon auszugehen, dass eine regelmäßige Überschreitung des TDI bei Erwachsenen wie auch bei Risikogruppen wie Kleinkindern auftritt. Nimmt man beispielsweise für Babys im vierten bis siebten Monat ein durchschnittliches Körpergewicht von etwa 9 kg und eine Portionsgröße von 150 - 200 ml Babybrei (entsprechend etwa 50 g Trockenpulver) pro Tag an, so ergäbe sich bei Berücksichtigung des 90. Perzentils aus 2003 (110,4 $\mu\text{g/kg}$) eine tägliche Belastung von etwa 0,6 $\mu\text{g DON/kg KGW}$. Das RIVM kommt jedoch zu dem Ergebnis, dass bei 80 % der einjährigen Kinder der provisorische TDI von 1 $\mu\text{g/kg KGW}$ überschritten würde.

Bei Erwachsenen würde der tägliche Verzehr von 100 g Nudeln und 50 g Brot (Trockenmasse) bei jeweiliger Berücksichtigung der Mediane über den Untersuchungszeitraum (169 $\mu\text{g/kg}$ bzw. 125 $\mu\text{g/kg}$) und einem angenommenen Körpergewicht von 65 kg in einer DON-Aufnahme von 0,35 $\mu\text{g/kg KGW/d}$ resultieren. Bei Berücksichtigung des 90. Perzentils (533,5 $\mu\text{g/kg}$ bzw. 360 $\mu\text{g/kg}$) würde der vorgeschlagene TDI von 1 $\mu\text{g/kg KGW}$ knapp überschritten, wobei es aber Hinweise zur Reduktion des DON-Gehaltes während der Zubereitung von Nudeln gibt (NOWICKI et al., 1988; BOCKHORN et al., 2001). CIRILLO et al. (2003) errechneten aufgrund ihrer Daten eine Belastung der italienischen Bevölkerung von 7,88 $\mu\text{g DON pro Tag und Kopf}$.

Diese Fallbeispiele sind aber sehr vorsichtig zu interpretieren, da die individuelle Schwankungsbreite der täglichen DON-Aufnahme sehr groß ist und in einigen Produktgruppen

eine noch zu geringe Probenanzahl untersucht wurde, um fundierte Aussagen zu treffen. Die bislang umfangreichste Studie (SCOOP, 2003) zu diesem Thema, kam zu dem Ergebnis, dass in Abhängigkeit von vielen Faktoren - wie z.B. Verzehrsgewohnheiten, geographische Herkunft etc. - in der europäischen Bevölkerung der TDI bei Erwachsenen zu 14,4 - 46,1 % und bei Kindern zu 11,3 - 95,9 % ausgeschöpft wird.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die vorliegende Arbeit als Teil des laufenden Forschungsprojektes wertvolles Datenmaterial zur DON-Belastung des deutschen Verbrauchers liefert. Die etablierten Analyseverfahren erlauben die zuverlässige Untersuchung von Lebensmitteln unterschiedlichster Zusammensetzung und haben ihre Robustheit im Routineeinsatz bewiesen. Das in Bier mittels EIA nachweisbare und bislang nicht identifizierte DON-Analog wird Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Etablierung analytischer Verfahren zum Nachweis von Deoxynivalenol (DON), sowie dem Vorkommen dieses Toxins in Lebensmitteln des deutschen Marktes.

Zur Extraktion getreidehaltiger Proben wurde ein Methanol/Wasser-Gemisch (1/9) verwendet. Der so erhaltene Rohextrakt wurde entweder direkt in den Enzymimmuntest (EIA) eingesetzt oder bei komplexen Probenmatrices wie z.B. Säuglings- und Kleinkindernahrung mittels Flüssig-Flüssig-Verteilungschromatographie gereinigt. Mit beiden Varianten konnten in dotierten Proben Wiederfindungsraten von >80 % erzielt werden. Bierproben wurden mit Phosphatpuffer neutralisiert und ohne weitere Probenaufarbeitung mittels EIA analysiert. Die Reproduzierbarkeit der Verfahren wurde vorzugsweise mit natürlich kontaminierten Proben überprüft, der durchschnittliche Variationskoeffizient lag je nach untersuchter Matrix bei 8,9 bis 12,6 %. Vergleichsuntersuchungen mittels HPLC führten zu übereinstimmenden Ergebnissen.

Im Rahmen einer umfangreichen Erhebung (n = 539) konnte in 72 % der Proben DON nachgewiesen werden, wobei sich über den Untersuchungszeitraum von zwei Jahren die Belastungshäufigkeit als relativ konstant erwies. Prinzipiell lag die mittlere DON-Belastung der untersuchten Produktgruppen deutlich unter den derzeitigen Grenzwerten. Der Mittelwert der untersuchten Proben betrug 144 µg/kg, der Median und das 90. Perzentil lagen bei 80 bzw. 343 µg/kg. Die Hauptbelastung ging von Weizenprodukten aus, wobei in Teigwaren und Weizenmehl auch die Maximalwerte ermittelt wurden (1760 µg/kg, bzw. 1053 µg/kg).

Die Kontaminationshäufigkeit der Säuglings- und Kleinkindernahrungsmittel mit DON lag zwischen 18,8 % (im Jahr 2002) und 66,7 % (im Jahr 2001). Der Median betrug zwischen 15 und 46 µg DON/kg (2001 - 2003: 22,5 µg DON/kg). Den Grenzwert von 100 µg/kg überschritten 12 % der Proben.

Bier erwies sich als gering belastet (Median 17,4 µgDON/l). Neben DON konnte eine unbekannt Substanz nachgewiesen werden, die vermutlich ein DON-Analog darstellt.

SUMMARY

Survey on the occurrence and incidence of deoxynivalenol in foodstuffs

This paper describes the establishment of analytical methods for the detection of deoxynivalenol (DON), as well as the occurrence of this toxin in food distributed on the German market.

A mixture consisting of PBS/methanol (9/1 v/v) was used as extraction solvent for cereal-based foods. The resulting raw extract was either used in the enzyme immunoassay (EIA) without further treatment or was purified by liquid-liquid partition during the analyses of complex food matrices such as baby and infant food. In spiked samples high recovery rates of > 80 % could be obtained with both variants. Beer samples were neutralized with phosphate buffer and analyzed by EIA without further treatment. Naturally contaminated samples were preferentially used for studies on the reproducibility of the established methods. Depending on the analyzed sample matrix average coefficients of variation were in the range of 8.9 to 12.6 %. Comparison studies between EIA and HPLC resulted in consistent results.

During a comprehensive survey DON could be detected in 388 out of 539 analyzed samples (72 %). In the two year period of analyses contamination frequency was quite constant. Average DON levels of the analyzed products were well below the established legal limit. The mean concentration found was 144 µg/kg, the median 80 µg/kg and the 90th percentile 343 µg/kg. Wheat products represented the major source of intake for DON. The maximum values were 1760 µg/kg (pasta) and 1053 µg/kg (wheat flour).

The contamination frequency of baby- and infant food ranged between 18.8 % (2002) and 66.7 % (2001) with an overall median of 22.5 µg/kg (range of 15 - 46 µg/kg). 12 % of the samples contained concentrations of DON exceeding the legal limit.

Beer proved to be moderately contaminated (median of 17.4 µg/l). Besides DON an unknown substance could be detected which probably represents a DON analog.

6 LITERATURVERZEICHNIS

ADAM, G., R. MITTERBAUER, A. RADITSCHNIG, B. POPPENBERGER, T. KARL, S. GORITSCHNIG, H. WEINDORFER und J. GLÖSSL (2001):

Molecular mechanisms of deoxynivalenol resistance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*
Mycotoxin Res. 17A, 19-23

BARTELS, G. und B. RODEMANN (2003):

Prevention strategies of mycotoxins in grain
Gesunde Pflanzen 55, 125-135

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

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

BAUER, J., E. USLEBER, E. MÄRTLBAUER, M. RITZMANN und W. GRÄNZER (2000):

Untersuchungen zum Carry over von Zearalenon und Deoxynivalenol beim Schwein
Mycotoxin Res. 16A, 188

BEREK, L., I. B. PETRI, Á. MESTERHÁZY, J. TÉREN und J. MOLNÁR (2001):

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

BERGSJØ, B., W. LANGSETH, I. NAFSTAD, J. HØGSET und H. J. S. 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

BERTHILLER, F., R. SCHUHMACHER, G. BUTTINGER, M. FREUDENSCHUSS, G. ADAM und R. KRŠKA (2003):

Synthesis of deoxynivalenol-glucosides and their characterization using a Qtrap LC-MS/MS.
Mycotoxin Res. 19, 47-50

BILY, A. C., L. M. REID, M. E. SAVARD, R. REDDY, B. A. BLACKWELL, C. M. CAMPBELL, A. KRANTIS, T. DURST, B. J. R. PHILOGENE, J. T. ARNASON und C. REGNAULT-ROGER (2004):

Analysis of *Fusarium graminearum* mycotoxins in different biological matrices by LC/MS
Mycopathologia 157, 117-126

BINDER, J., E. M. HORVATH, G. SCHATZMAYR, N. ELLEND, H. DANNER, R. KRŠKA und R. BRAUN (1997):

Neue Erkenntnisse über die mikrobielle Detoxifikation von DON und 3-Acetyl-DON
in: MÄRTLBAUER, E. und E. USLEBER (Hrsg.): Proceedings des 19. Mykotoxin-Workshops,
2.-4. Juni 1997, München, S. 50-54

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

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

BÖHM, J., E. RAZZAZI, J. GRAJEWSKI und I. STYRIAK (1999):

Aktuelles und Zukunftsperspektiven der Biodegradation von Mykotoxinen
in: ROSNER, H. und P. KIELSTEIN: Proceedings des 21. Mykotoxin - Workshops, 7.-9. Juni
1999, Jena, S. 188-191

BÖHM, J., J. GRAJEWSKI, H. ASPERGER, B. CECON, B. RABUS und E. RAZZAZI (2000):
Study on biodegradation of some A- und B-trichothecenes and ochratoxin A by use of probiotic
microorganisms

Mycotoxin Res. 16A, 70-74

CHAROENPORNSOOK, K., J. L. FITZPATRICK und J. E. SMITH (1998):

The effects of four mycotoxins on the mitogen stimulated proliferation of bovine peripheral blood mononuclear cells *in vitro*

Mycopathologia 143, 105-111

CZERWIECKI, L. und G. WILCZYNSKA (2003):

Determination of deoxynivalenol in cereals by HPLC-UV

Mycotoxin Res. 19, 31-34

CIRILLO, T., A. RITIENI, F. GALVANO und R. AMODIO COCCHIERI (2003):

Natural co-occurrence of deoxynivalenol and fumonisins B₁ and B₂ in Italian marketed foodstuffs

Food Addit. Contam. 20, 566-571

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (2002):

Joint FAO/WHO food standards programme, November 2002

Discussion paper on Deoxynivalenol, CX/FAC 03/'35

<http://www.mykotoxin.de/Dokumente/Codex%20DON%2012.02.pdf>

CONCOVÁ, E., A. LACIACOVÁ, G. KOVÁČ und H. SEIDEL (2003):

Fusarial toxins and their role in animal diseases

Vet. J. 165, 214-220

CREPPY, E. E. (2002):

Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe

Toxicol. Lett. 127, 19-28

CZERWIECKI, L. und G. WILCZYNSKA (2003):

Determination of deoxynivalenol in cereals by HPLC-UV

Mycotoxin Res. 19, 31-34

DÄNICKE, S. und DÖLL, S. (2003):

On the efficacy of detoxifying agents in the prevention of fusariotoxicoses - A critical evaluation of the situation

Abstracts des 25. Mykotoxin-Workshops, 19. - 21. Mai 2003, Giessen, S. 6

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

Effects of *Fusarium*-toxin contaminated wheat in ruminant nutrition

Mycotoxin Res. 18A, 24-27

DÄNICKE, S., H. VALENTA und S. DÖLL (2003):

On the toxicokinetics and the metabolism of deoxynivalenol in the pig

Abstracts des 25. Mykotoxin-Workshops, 19. - 21. Mai 2003, Giessen, S. 11

DÄNICKE, S., H. VALENTA, F. KLOBOSA, S. DÖLL, M. GANTER und G. FLACHOWSKY (2004):

Effects of graded levels of *Fusarium* toxin contaminated wheat in diets for fattening pigs on growth performance, nutrient digestibility, deoxynivalenol balance and clinical serum characteristics

Arch. Anim. Nutr. 58, 1-17

DERSJANT-LI, Y. M., M. W. A. VERSTEGEN und W. J. J. GERRITS (2003):

The impact of low concentrations of aflatoxin, deoxynivalenol or fumonisin in diets on growing pigs and poultry

Nutr. Res. Rev. 16, 223-229

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

Wirkung von Deoxynivalenol beim wachsenden Schwein in Abhängigkeit von der Darreichungsform

Mycotoxin Res. 16A, 170-173

D'MELLO, J. P. F., C. M. PLACINTA und A. M. C. McDONALD (1999):

Fusarium mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity

Anim. Feed Sci. Tech. 80, 183-205

DÖLL, S., H. VALENTA, S. DÄNICKE und G. FLACHOWSKY (2002):

Fusarium mycotoxins in conventionally and organically grown grain from Thuringia/Germany
Landbauforschung Völkenrode 52, 91-96

DÖLL, S., S. DÄNICKE, K.-H. UEBERSCHÄR, H. VALENTA, U. SCHNURRBUSCH, M. GANTER, F. KLOBASA und G. FLACHOWSKY (2003):

Effects of graded levels of *Fusarium* toxin contaminated maize in diets for female weaned piglets.

Arch. Anim. Nutr. 57, 311-334

DROCHNER, W., S. GÖTZ, M. SCHOLLENBERGER, U. LAUBER, H.-P. PIEPHO, F. KLOBASA und U. WEILER (2003):

Einfluss niedriger DON-Belastungen auf den IgA-Blutspiegel beim wachsenden Schwein

Abstracts des 25. Mykotoxin-Workshops, 19. - 21. Mai 2003, Giessen, S. 12

ENGELHARDT, G., M. RUHLAND und P. R. WALLNÖFER (1999):

Metabolism of mycotoxins in plants

Adv. Food Sci. 21, 71-78

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

Fusarium toxins in cereals - a risk assessment. Nordic Council of ministers; TemaNord 1998:
502, S. 7-27 und 45-58; Copenhagen

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

Lack of de-epoxidation of type B trichothecenes in incubates with human faeces

Food Addit. Contam. 20, 579-582

ERIKSEN, G. S., H. PETTERSON und J. E. LINDBERG (2003):

Absorption, metabolism and excretion of 3-acetylDON in pigs.

Arch. Anim. Nutr. 57, 335-345

FRIEND, D. W., H. L. TRENHOLM, B. K. THOMPSON, P. S. FISER und K. E. HARTIN (1986):

Effect of feeding diets containing deoxynivalenol (vomitoxin)-contaminated wheat or corn on the feed consumption, weight gain, organ weight and sexual development of male and female pigs

Can. J. Anim. Sci. 66, 765-775

GAREIS, M. und J. CEYNOWA (1994):

Einfluß des Fungicids Matador (Tebuconazole/Triadimenol) auf die Mykotoxinbildung durch *Fusarium culmorum*

Z. Lebensm.Unters. Forsch. 198, 244-248

GESSLER, R. (1997):

Vergleichende Untersuchungen zum Nachweis von Mykotoxinen in Gerste unter Verwendung enzymimmunologischer Verfahren

Diss. vet. med., München

HART, L. P., H. CASPER, O. SCHABENBERGER und P. NG (1998):

Comparison of gas chromatography-electron capture and enzyme-linked immunosorbent assay for deoxynivalenol in milled fractions of naturally contaminated wheat

J. Food Prot. 12, 1695-1697

HSIA, C. C., J. L. WU, X. Q. LU und Y. S. LI (1988):

Natural occurrence and clastogenic effect of nivalenol, deoxynivalenol, 3-acetyl-deoxynivalenol, 15-acetyl-deoxynivalenol, and zearalenone in corn from a high-risk area of esophageal cancer

Cancer Detect. Prev. 13, 79-86

ISLAM, Z. und J. J. PESTKA (2003):

Role of IL-1 β in endotoxin potentiation of deoxynivalenol-induced corticosterone response and leucocyte apoptosis in mice

Toxicol. Sci. 74, 93-102

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

Teratogen. Carcin. Mut. 15, 283-306

JECFA: JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES (2001): Fifty-sixth meeting

<http://www.who.int/pcs/jecfa/summaries.htm>

KAPPENSTEIN, O., H. S. KLAFFKE, H. J. SPOTT, R. TIEBACH und R. WEBER (2002):

Bestimmung von Deoxynivalenol mittels LC - MS/MS (Tandem Massenspektrometrie)

Mycotoxin Res. 18A, 52-55

KARLOWSKY, P. (1999):

Biological detoxification of fungal toxins and its use in plant breeding, feed and food production

Nat. Toxins 7, 1-23

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

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

Mycotoxin Res. 18A, 28-30

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

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

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

LANGSETH, W. und T. RUNDBERGET (1999):

The occurrence of HT-2 toxin and other trichothecenes in Norwegian cereals
Mycopathol. 147, 157-165

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. 16A, 166-169

LAUBER U., T. DILLENBURGER und W. DROCHNER (2001):

Distinct effects of equal levels of *Fusarium* toxins (Deoxynivalenol) in growing pigs. Possible
reasons
Mycotoxin Res. 17A, 53-57

LOGRIECO, A., A. BOTTALICO, G. MULÉ, A. MORETTI und G. PERRONE (2003):

Epidemiology of toxigenetic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean
crops
Eur. J. Plant Pathol. 109, 645-667

LOMBAERT, G. A., P. PELLAERS, V. ROSCOE, M. MANKOTIA, R. NEIL, und P.M.
SCOTT (2003):

Mycotoxins in infant cereal foods from the Canadian retail market
Food Addit. Contam. 20, 494-504

MacDONALD, S., T. J. PRICKETT, K. B. WILDEY und D. CHAN (2003):

Survey of ochratoxin A and deoxynivalenol in stored grains from the 1999 harvest in the UK
Food Addit. Contam. 21, 172-181.

MÄRTLBAUER, E., M. GAREIS und G. TERPLAN (1988):

Enzyme immunoassay for the macrocyclic trichothecene roridin A: Production, properties, and use of rabbit antibodies

Appl. Environ. Microbiol. 54, 225-230

MAGAN, N., R. HOPE, A. COLLEATE und E. S. BAXTER (2002):

Relationship between growth and mycotoxin production by *Fusarium* species, biocides and environment

Eur. J. Plant. Pathol. 108, 685-690

MAGG, T., A. E. MELCHINGER, D. KLEIN und M. BOHN (2002):

Relationship between European corn borer resistance and concentration of mycotoxins produced by *Fusarium* spp. in grains of transgenic *Bt* maize hybrids, their isogenetic counterparts, and commercial varieties

Plant Breeding 121, 146-154

MARAGOS, C. und S. P. McCORMICK (2000):

Monoclonal antibodies for the mycotoxins deoxynivalenol and 3-acetyl-deoxynivalenol

Food Agric. Immunol. 12, 181-192

MARAGOS, C. und R. D. PLATTNER (2002):

Rapid fluorescence polarisation immunoassay for the mycotoxin deoxynivalenol in wheat

J. Agr. Food Chem. 50, 1827-1832

MARESCA, M., R. MAHFOUD, N. GARMY und J. FANTINI (2002):

The mycotoxin deoxynivalenol affects nutrient absorption in human intestinal epithelial cells

J. Nutr. 132, 2723-2731

MATEO, J. J., A. LLORENS, B. MATEO und M. JIMÉNEZ(2001):

Critical study of and improvements in chromatographic methods for the analysis of type B trichothecenes

J. Chromatogr. A 918, 99-112

MAY, H. D., Q. WU und C. K. BLAKE (2000):

Effects of the *Fusarium* spp. mycotoxins fusaric acid and deoxynivalenol on the growth of *Ruminococcus albus* and *Methanobrevibacter ruminatum*

Can. J. Microbiol. 46, 692-699

MAYER, B., E. SCHNEIDER, E. USLEBER, R. DIETRICH, C. BÜRCK und E. MÄRTLBAUER (2000):

Entwicklung eines immunchemischen Schnelltestverfahrens zum Mykotoxinnachweis

Mycotoxin Res. 16A, 227-230

MEKY, F. A., L. J. HARDIE, S. W. EVANS, 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

MENNITI, A. M., D. PANCALDI, M. MACCAFERRI und L. CASALINI (2003):

Effect of fungicides on *Fusarium* head blight and deoxynivalenol content in durum wheat grain

Eur. J. Plant Pathol. 109, 109-115

MEYER, K., S. WENZ und J. BAUER (2002):

Vorkommen und Nachweis von Fusarinsäure im Weizen

Mycotoxin Res. 18A, 70-73

MINERVINI, F., F. FORNELLI und K. M. FLYNN (2004):

Toxicity and apoptosis induced by the mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and fumonisin B₁ in a human erythroleukemia cell line

Toxicol. in vitro 18, 21-28

MOON, Y. und J. J. PESTKA (2003):

Cyclooxygenase-2 mediates interleukin-6 upregulation by vomitoxin (deoxynivalenol) in vitro and in vivo

Toxicol. Appl. Pharm. 187, 80-88

NIESSEN, L., M. BÖHM-SCHRAML, H. VOGEL und S. DONHAUSER (1993):

Deoxynivalenol in commercial beer - screening for the toxin with an indirect competitive ELISA

Mycotoxin Res. 9, 99-109

NOWICKI, T. W., D. G. GABA, J. E. DEXTER, R. R. MATSUSO und R. M. CLEAR (1988):

Retention of the fusarium mycotoxin deoxynivalenol in wheat during processing and cooking of spaghetti and noodles

J. Cereal.Sci. 8, 189-202

PATHRE, S. V. und C. J. MIROCHA (1978):

Analysis of deoxynivalenol from cultures of *Fusarium* species

Appl. Environ. Microb. 35, 992-994

PESTKA, J. J. (2003):

Deoxynivalenol-induced IgA production and IgA nephropathy-aberrant mucosal immune response with systemic repercussions

Toxicol. Lett. 140-141, 287-295

PESTKA, J. J. und H.-R. ZHOU (2000):

Interleukin-6-deficient mice refractory to IgA dysregulation but not anorexia induction by vomitoxin (deoxynivalenol) ingestion

Food Chem. Toxicol. 38, 565-575

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

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

Absorption, metabolism and excretion of type-B trichothecenes in pigs

Abstracts des 25. Mykotoxin-Workshops, 19. - 21. Mai 2003, Giessen, S. 8

PICHLER, H., S. BAUMGARTNER, M. FREUDENSCHUSS, S. PALME, E. M. BINDER und R. KRŠKA (2001):

Development of enzyme-immunoassays based on egg yolk antibodies for the detection of mycotoxins

Mycotoxin Res. 17A, 202-205

PIETERS, M. N., D. C. M. FIOLET und A. J. BAARS (1999): Deoxynivalenol, derivation of concentration limits in wheat and wheat containing food products, National Institute of Public Health and the Environment, RIVM report 388802 018

PIETERS, M. N., J. FREIJER, A. J. BAARS und W. SLOB (2001):

Risk assessment of deoxynivalenol in food

National Institute of Public Health and the Environment, RIVM report 388802 022

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

POLLMANN, 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

POPPENBERGER, B., F. BERTHILLER, D. LUCSHYN, T. SIEBERER, R. SCHUHMACHER, R. KRŠKA, K. KUHLER, J. GLÖSSL, C. LUSCHNIG und G. ADAM (2003):

Detoxification of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*

J. Biol. Chem. 278, 47905-47914

PRELUSKY, D. B. (1996):

A study on the effect of deoxynivalenol on serotonin receptor binding in pig brain membranes

J. Environ. Sci. Health, B31, 1103-1117

PRELUSKY, D. B., D. M. VEIRA und H. L. TRENHOLM (1985):

Plasma pharmacokinetics of the mycotoxin deoxynivalenol following oral and intravenous administration to sheep

J. Environ. Sci. Health. B20, 603-624

RAMIREZ, M., S. CHULZE und N. MAGAN (2004):

Impact of environmental factors and fungicides on growth and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* isolates from Argentinean wheat.

Crop Prot. 23, 117-125

RASMUSSEN, P. H., F. GHORBANI und T. BERG (2003):

Deoxynivalenol and other *Fusarium* toxins in wheat and rye flours on the Danish market
Food Addit. Contam. 20, 396-404

RAZZAZI, E., J. BÖHM, B. KETTNER, W. HOCHSTEINER und H. KAHLBACHER (2002):

Metabolisierung von DON und DOM-1 im Urin vom Schwein
Mycotoxin Res. 18A, 84-88

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

Simultaneous determination of major B-trichothecenes and the de-epoxy-metabolite of deoxynivalenol in pig urine and maize using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry
J. Chromatogr. B 796, 21-33

RICHTER, W. I. F., M. SCHUSTER und E. RATTENBERGER (2002):

Einfluss der Fermentation von Silomais auf die Nachweisbarkeit von Deoxynivalenol (DON)
Mycotoxin Res. 18A, 16-19

RUPP, H. (2002):

Determination of deoxynivalenol in whole wheat flour and wheat bran
J. AOAC Int. 85, 1355-1359

SANO A., S. MATSUTANI, M. SUZUKI und S. TAKITANI (1987):

High-performance liquid chromatographic method for determining trichothecene mycotoxins by post-column fluorescence derivatization
J. Chromatogr. 410, 427-436

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
Fres. J. Anal. Chem. 367, 98-100

SCHNERR, H., R. F. VOGEL und L. NIESSEN (2002):

A biosensor-based immunoassay for rapid screening of deoxynivalenol contamination in wheat
Food Agric. Immunol. 14, 313-321

SCHOLLENBERGER, M., H.-M. MÜLLER und W. DROCHNER (2003):

Deoxynivalenol contents in foodstuffs of organical and conventional production
Mycotoxin Res. 19, 39-42

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

Fusarium toxins in wheat flour collected in an area in southwest Germany
Int. J. Food Microbiol., 72, 85-89

SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD OF THE EUROPEAN COMMISSION (SCF) (1999):

Opinion on *Fusarium* toxins. Part 1: Deoxynivalenol (DON), expressed on 2 December 1999
http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out44_en.pdf

SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD OF THE EUROPEAN COMMISSION (SCF) (2002):

Opinion of the Scientific Committee on Food on *Fusarium* toxins. Part 6: Group evaluation of
T-2 toxin, HT-2 toxin, nivalenol and deoxynivalenol, 27 February 2002
http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out123_en.pdf

SCOOP (2003):

Report of experts participating in Task 3.2.10: Collection of occurrence data of *Fusarium* toxins
in food and assessment of dietary intake by the population of EU Member States
<http://europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/task3210.pdf>

SEWALD, N., J. LEPSCHY VON GLEISSENTHALL, M. SCHUSTER, G. MÜLLER und R.
T. APLIN (1992):

Structure elucidation of a plant metabolite of 4-desoxynivalenol
Tetrahedron-Asymmetr. 3, 953-960

ŠTYRIAK, I., E. CONCOVÁ, V. KMEC, J. BÖHM und E. RAZZAZI (2001):

The use of yeast for microbial degradation of some selected mycotoxins

Mycotoxin Res. 17A, 24-27

SUDAKIN, D. L. (2003):

Trichothecenes in the environment: relevance to human health

Toxicol. Lett. 143, 97-107

SZKUDELSKA, K., T. SZUDELSKI und L. NOGOWSKI (2002):

Short-time deoxynivalenol treatment induces metabolic disturbances in the rat

Toxicol. Lett. 136, 25-31

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

TÜDÖS, A. J., E. R. LUCAS-VAN DEN BOS und E. C. A. STIGTER (2003):

Rapid surface plasmon resonance-based inhibition assay of deoxynivalenol

J. Agr. Food Chem. 51, 5843-5848

TRENHOLM, H. L., R. M. WARNER und D. B. PRELUSKY (1985):

Assessment of extraction procedures in the analysis of naturally contaminated grain products for deoxynivalenol (vomitoxin)

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 68, 645-649

USLEBER, E. P. (1991):

Entwicklung und Anwendung enzymimmunologischer Verfahren zum Nachweis von Deoxynivalenol und 3-Acetyldeoxynivalenol

Diss. vet. med., München

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

Direct enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of the 8-ketotrichothecene mycotoxins deoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol, and 15-acetyldeoxynivalenol in buffer solutions

J. Agr. Food Chem. 39, 2091-2095

VALENTA, H., S. DÄNICKE, G. FLACHOWSKY und T. BÖHME (2001):

Comparative study on concentrations of deoxynivalenol and zearalenone in kernels of transgenic *Bt* maize hybrids and nontransgenic maize hybrids

Mycotoxin Res. 17A, 15-18

VALENTA, H., S. DÄNICKE und S. DÖLL (2003):

Analysis of deoxynivalenol and de-epoxy-deoxynivalenol in animal tissues by liquid chromatography after clean-up with an immunoaffinity column

Mycotoxin Res. 19, 51-55

VÖLKL, A., G. WOERFL, T. HÄÜBERMANN, B. VOGLER, I. KLAIBER und P. KARLOVSKY (1997):

Biotransformation von Mykotoxinen von *Fusarium* spp.

in: MÄRTLBAUER, E. und E. USLEBER (Hrsg.): Proceedings des 19. Mykotoxin-Workshops, 2.-4. Juni 1997, München, S. 45-49

WEISS, R., M. FREUDENSCHUSS, R. KRŠKA und B. MIZAIKOFF (2003):

Improving methods of analysis for mycotoxins: molecularly imprinted polymers for deoxynivalenol and zearalenone

Food Addit. Contam. 20, 386-395

WIDESTRAND, J., T. LUNDH, H. PETTERSSON und J. E. LINDBERG (2003):

A rapid and sensitive cytotoxicity screening assay for trichothecenes in cereal samples

Food Chem. Toxicol. 41, 1307-1313

WOLFF, J. (2003):

Deoxynivalenol (DON)- und Zearalenon (ZEA)-Gehalte in Weizen, Roggen und Triticale:
Ergebnisse aus der besonderen Ernteterminnung (BEE) 2001 und 2002

Mycotoxin Res. 19, 35-38

YU, W., F.-Y. YU, D. J. UNDERSANDER und F. S. CHU (1999):

Immunoassays of selected mycotoxins in hay, silage and mixed feed

Food Agr. Immunol. 11, 307-319

ZHOU H.-R., J. R. HARKEMA, J. A. HOTCHKISS, D. YAN, R. A. ROTH und J. J. PESTKA
(2000):

Lipopolysaccharide and the trichothecene vomitoxin (deoxynivalenol) synergistically induce
apoptosis in murine lymphoid organs

Toxicol. Sci. 53 , 253-263

Herrn Prof. Dr. E. Märtlbauer danke ich herzlich für die für die Überlassung des Themas, für die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit und für die bereitwillig gewährte Arbeitsmöglichkeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. R. Dietrich für zahlreiche Ratschläge und für die allzeit geduldige, humorvolle Betreuung bei Anfertigung, sowie bei der sorgfältigen Durchsicht dieser Arbeit.

Bei Frau Dr. C. Bürk möchte ich mich herzlich für den stets gewährten Beistand im Kampf mit technischen Tücken und chaotischen Computern bedanken.

Ich danke vielmals allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts, insbesondere Frau Evi Bachmeier-Köck und Herrn Mostefa Djefal für ihre tatkräftige Unterstützung. Ein großes Dankeschön für ihre Freundschaft und Kameradschaft geht an alle (ehemaligen) Doktoranden.

Von ganzem Herzen danke ich Nina für ihren Zuspruch, ihre Geduld und ihre Aufmunterungsversuche.

Mein größter Dank aber gilt meinen Eltern, die durch ihre allseits gewährte großzügige moralische und finanzielle Unterstützung es mir erst ermöglicht haben diesen Beruf zu ergreifen.

LEBENS LAUF

Bernd Ulrich Spindelböck
Geboren am 14.09.1974 in München

- Eltern** Franziska Katharina Spindelböck, geb. Kienberger
Wolf-Dieter Spindelböck
- Schulbildung** 1980-81 Volksschule Pfaffenhofen a.d. Ilm
1981-84 Gerhardinger Volksschule, Pfaffenhofen a.d. Ilm
1984-94 Schyren-Gymnasium, Pfaffenhofen a.d. Ilm; Abitur
- Staatsdienst** März 1995 - Apr. 1996 Zivildienst beim Roten Kreuz,
Pfaffenhofen a.d. Ilm
- Studium** Okt. 1994 Studium der Tiermedizin in Wien/Österreich
Nov. 1994 - Feb. 1995 und
Mai 1996 - Sep. 2001 Studium der Tiermedizin an der Ludwig-
Maximilians-Universität München
- Staatsexamen** 14. September 2001
- Approbation** 28. Januar 2002
- Berufstätigkeit** Apr. 1998 und Aug. 2000 Hilfskraft an der II. Medizinischen Tierklinik der
Tierärztlichen Fakultät der Universität München
- Nov. 2001 bis Nov. 2003 als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für
Hygiene und Technologie der Milch der Tierärztlichen Fakultät der
Universität München
- Seit Jan. 2004 als Assistent in der tierärztlichen Gemeinschaftspraxis Dres.
Lipold und Taschke, Schnaitsee tätig.

