

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

---

**Entwicklung und Validierung von Enzymimmuntests  
zum Nachweis von T-2 Toxin und HT-2 Toxin  
sowie Vorkommen dieser Mykotoxine in  
Lebensmitteln des deutschen Marktes**

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

von  
**Katja Bernhardine Hocke**  
aus  
Göppingen

München 2008

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

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. h.c. Märtlbauer
Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. Potschka

Tag der Promotion: 18. Juli 2008

*Für meine Eltern  
und für Opa*

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>SCHRIFTTUM</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Allgemeines</b>	<b>3</b>
2.1.1	Physikalisch-chemische Eigenschaften	3
2.1.2	Biologische Eigenschaften	5
2.1.3	Bildung, Entstehung und Metabolismus	11
2.1.4	Vorkommen von T-2 Toxin und HT-2 Toxin in Lebensmitteln	16
2.1.5	Vermeidung und Detoxifikation	21
<b>2.2</b>	<b>Analytik von T-2 Toxin und HT-2 Toxin</b>	<b>22</b>
2.2.1	Extraktion und Reinigung	22
2.2.2	Nachweisverfahren	27
<b>3</b>	<b>EIGENE UNTERSUCHUNGEN</b>	<b>31</b>
<b>3.1</b>	<b>Materialien und Geräte</b>	<b>31</b>
3.1.1	Chemikalien und Biochemika	31
3.1.2	Puffer und Lösungen	31
3.1.3	Immunreagenzien	32
3.1.4	Geräte	33
3.1.5	Sonstiges	33
<b>3.2</b>	<b>Methodik und Ergebnisse</b>	<b>34</b>
3.2.1	Etablierung spezifischer Enzymimmuntests	34
3.2.1.1	Überprüfung der Immunreagenzien	34
3.2.1.2	Enzymimmuntest zum Summennachweis von T-2 Toxin und HT-2 Toxin (EIA-Variante A)	36
3.2.1.2.1	Durchführung	36
3.2.1.2.2	Sensitivität	37
3.2.1.2.3	Spezifität	37

3.2.1.3	Enzymimmuntest zum spezifischen Nachweis von T-2 Toxin (EIA-Variante B)	38
3.2.1.3.1	Durchführung	38
3.2.1.3.2	Sensitivität und Spezifität der EIA-Variante B	39
3.2.2	Entwicklung und Etablierung geeigneter Extraktionsverfahren	40
3.2.2.1	Orientierende Vorversuche	40
3.2.2.2	Etablierung eines auf Flüssig-Flüssig-Chromatographie basierenden Extraktionsverfahrens für feste Probenmatrices	42
3.2.2.2.1	Bestimmung der Wiederfindungsraten für T-2 Toxin	43
3.2.2.2.2	Bestimmung der Wiederfindungsraten für HT-2 Toxin	45
3.2.2.3	Entwicklung und Etablierung eines immunaffinitätschromato- graphischen Extraktionsverfahrens	46
3.2.2.3.1	Kopplung von Antikörpern an CNBr-aktivierte Sepharose 4B	46
3.2.2.3.2	Ermittlung der Antigenbindungskapazität	47
3.2.2.3.3	Untersuchung von Lebensmitteln	47
3.2.2.3.4	Vergleichende Untersuchungen zu den Extraktionsverfahren	48
3.2.3	Validierung der Nachweisverfahren	50
3.2.3.1	Laborinterne Validierung	50
3.2.3.2	Laborvergleichsuntersuchungen	53
3.2.4	Vorkommen von T-2 Toxin und HT-2 Toxin in Lebensmitteln des deutschen Marktes in den Jahren 2006 und 2007	55
3.2.4.1	Vorkommenshäufigkeit und Belastungssituation	56
3.2.4.2	Produktgruppen mit erhöhter T-2/HT-2 Belastung	65
3.2.4.3	Produktgruppen mit mittlerer T-2/HT-2 Belastung	67
3.2.4.4	Produktgruppen mit niedriger T-2/HT-2 Belastung	72
3.2.4.5	Säuglings- und Kleinkindernahrung	74
3.2.4.6	Biere und Säfte	76
3.2.4.7	Vergleich von ökologischen und konventionellen Produkten	78
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>79</b>

<b>4.1</b>	<b>Analytik</b>	79
<b>4.2</b>	<b>Vorkommen</b>	83
<b>4.3</b>	<b>Belastung des deutschen Verbrauchers</b>	87
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY</b>	90
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	92
<b>7</b>	<b>ANHANG</b>	108

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

AFB <sub>1</sub>	Aflatoxin B <sub>1</sub>
1-AN	1-Anthroylnitril
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
AST	Aspartat-Amino-Transferase
ATA	Alimentäre Toxische Aleukie
BLE	Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung
BMELV	Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucher- schutz
ConA	Concanavalin A
DAS	Diacetoxyscirpenol
DON	Deoxynivalenol
ECD	Elektroneneinfangdetektion ( <u>e</u> lectron <u>c</u> apture <u>d</u> etection)
EIA	Enzymimmuntest
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ESI	Elektrospray-Ionisation
FAO	Food and Agriculture Organisation of the United Nations
FFC	Flüssig-Flüssig-Chromatographie
FLD	Fluoreszenzdetektion
GC	Gaschromatographie
GPC	Gel-Permeationschromatographie
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie ( <u>h</u> igh <u>p</u> ressure <u>l</u> iquid <u>c</u> hromato- graphy)
HRP	Meerrettichperoxidase ( <u>h</u> orse <u>r</u> adish <u>p</u> eroxidase)
HS	Hemisuccinat
IAC	Immunaффinitätschromatographie
IC <sub>50</sub>	50%-Hemmungskonzentration
Ig	Immunglobulin
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
KGW	Körpergewicht
LC	Flüssigkeitschromatographie ( <u>l</u> iquid <u>c</u> hromatography)
LD <sub>50</sub>	Mittlere letale Dosis
LFGB	Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch

LOD	Nachweisgrenze ( <u>l</u> imit <u>o</u> f <u>d</u> etermination)
LOEL	<u>L</u> owest <u>O</u> bserved <u>E</u> ffect <u>L</u> evel
LOQ	Bestimmungsgrenze ( <u>l</u> imit <u>o</u> f <u>q</u> uantification)
MAk	Monoklonaler Antikörper
Max	Maximalwert
MDA	Malondialdehyd
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
NIV	Nivalenol
NOEL	<u>N</u> o- <u>O</u> bserved <u>E</u> ffect <u>L</u> evel
PBL	Periphere Blut-Lymphozyten
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PFU	Plaque forming Units
PHA	Phytohämagglutinin
SCF	Scientific Committee on Food
SCOOP	Scientific Co-operation on Questions relating to Food
SPE	Festphasenextraktion ( <u>s</u> olid <u>p</u> hase <u>e</u> xtraction)
TDI	Tolerierbare tägliche Aufnahme ( <u>t</u> olerable <u>d</u> aily <u>i</u> ntake)
TLC	Dünnschichtchromatographie ( <u>t</u> hin- <u>l</u> ayer <u>c</u> hromatography)
TMB	Tetramethylbenzidin
UV	Ultraviolett
VK	Variationskoeffizient
WFR	Wiederfindungsrate
WHO	World Health Organisation
ZEA	Zearalenon
ZEBS	Zentrale Erfassungs- und Bewertungsstelle für Umweltchemikalien des Bundesgesundheitsamtes

## 1 EINLEITUNG

Fusarien sind die wichtigsten toxinbildenden Schimmelpilze in den gemäßigten Zonen der nördlichen Hemisphäre. Als sogenannte Feldpilze infizieren sie verschiedene Getreidearten wie Mais, Weizen, Hafer und Gerste, aber auch andere pflanzliche Produkte bereits während der Vegetationsperiode auf dem Feld. Bei Einlagerung eines Lagergutes mit zu hohem Wassergehalt können sich Fusarien in seltenen Fällen jedoch auch im Lager ausbreiten. Neben enormen Ertragseinbußen in der Landwirtschaft durch verminderte Getreidequalität stellt vor allem die Mykotoxinbildung der Fusarien ein großes Problem für die Gesundheit von Mensch und Tier dar.

Eine der wichtigsten von Fusarien gebildeten Mykotoxingruppen bilden die Trichothecene (12,13-Epoxy-trichothec-9-ene), die in 4 Untergruppen eingeteilt werden. T-2 Toxin und dessen Abbauprodukt HT-2 Toxin gehören zu den Typ A Trichothecenen, die als sekundäre Stoffwechselprodukte von *Fusarium poae*, *F. equiseti*, *F. acuminatum*, *F. sporotrichioides* und auf Hafer insbesondere von *F. langsethiae* gebildet werden. Im Vergleich zu den sog. Typ B Trichothecenen, wie z. B. Deoxynivalenol (DON), besitzen sie eine ungleich höhere toxische Aktivität. Weiterhin überstehen sie aufgrund der für Trichothecene typischen ausgeprägten physikalischen und chemischen Stabilität die meisten Getreidebearbeitungsprozesse unbeschadet und gelangen somit in Futter- und Nahrungsmittel. Sowohl beim Mensch, als auch beim Tier kann dies zu Gesundheitsbeeinträchtigungen führen.

Derzeit gibt es für T-2 Toxin und HT-2 Toxin noch keine Höchstmengenregelungen. Bedingt auch durch die limitierte Verfügbarkeit von einfachen, schnellen und empfindlichen Analyseverfahren ist die Datenlage zum natürlichen Vorkommen bislang unbefriedigend. Deshalb initiierte das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) Ende 2005 ein Forschungsprojekt mit dem Ziel, die Analytik für Typ A Trichothecene (T-2 und HT-2 Toxin) zu verbessern, zu validieren und somit belastbares Datenmaterial zum Vorkommen dieser Mykotoxine in Lebensmitteln des deutschen Marktes zu generieren.

Vor diesem Hintergrund beschreibt die vorliegende Arbeit zum einen die Etablierung spezifischer Enzymimmuntests (EIAs) zum Nachweis von T-2 und HT-2 Toxin, zum anderen die Entwicklung von einfachen und schnellen Extraktionsverfahren, sowie die Validierung

der entwickelten Verfahren anhand von künstlich und natürlich kontaminierten Lebensmittelproben. Die Validierung erfolgte sowohl laborintern, als auch in Laborvergleichsuntersuchungen. Um Aussagen über die Belastungssituation machen zu können, wurden in den Jahren 2006 und 2007 insgesamt 800 Lebensmittelproben auf Getreidebasis aus dem Großraum München auf T-2 und HT-2 Toxin untersucht.

---

Die Förderung des Vorhabens “Verbesserung und Validierung der Analytik für Typ A Trichothecene (T-2 und HT-2 Toxin) sowie Vorkommen dieser Mykotoxine in Lebensmitteln des deutschen Marktes” (Projektnummer 05 HS 001) erfolgte aus Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) über die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE)

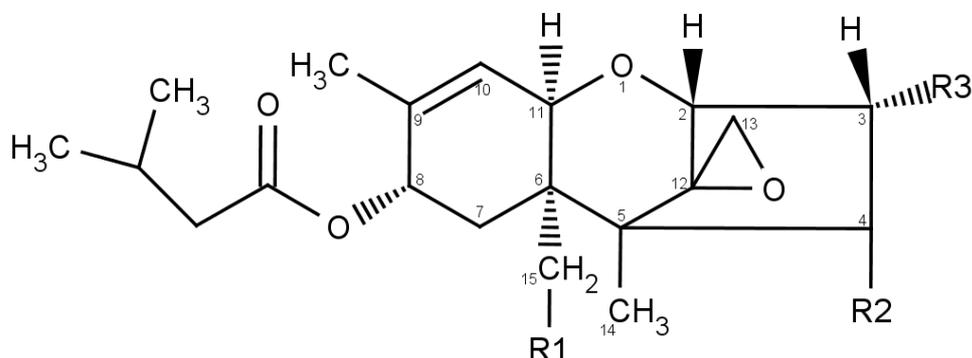
## 2            **SCHRIFTTUM**

Seit den späten Sechzigern hat sich eine Vielzahl von Publikationen mit den physikalisch-chemischen und biologischen Eigenschaften von T-2 Toxin und HT-2 Toxin, sowie deren Nachweis und dem Vorkommen in Futter- und Lebensmitteln beschäftigt. Verschiedene nationale und internationale Gremien wie das gemeinsame FAO/WHO Expertenkomitee (JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES; JECFA, 2001) oder das SCF (SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD, 2001 und 2002) veröffentlichten zum Teil umfangreiche Monographien zur toxikologischen Bewertung dieser und anderer Trichothecene. Eine umfangreiche Erhebung zum Vorkommen von T-2 und HT-2 Toxin in den europäischen Ländern wurde 2003 vom SCOOP vorgelegt.

### 2.1            **Allgemeines**

#### 2.1.1         **Physikalisch-chemische Eigenschaften**

T-2 Toxin, sowie dessen Abbauprodukt HT-2 Toxin gehören zu den sogenannten Trichothecenen. Bei dieser Gruppe von Mykotoxinen handelt es sich um sekundäre Stoffwechselprodukte verschiedener Schimmelpilzarten, v.a. von *Fusarien*-Arten. Trichothecene sind tetrazyklische Sesquiterpenoide (Abb. 1), von denen die meisten eine Doppelbindung an Position C-9,10 aufweisen (LANGSETH und RUNDBERGET, 1998). Ein insbesondere im Hinblick auf die Toxizität der Trichothecene wichtiges Strukturmerkmal dieser Verbindungen stellt die 12,13-Epoxidgruppe dar (SCF, 2002). Derzeit sind rund 170 Trichothecene bekannt, die aufgrund ihrer charakteristischen funktionellen Seitenketten in vier Untergruppen (A – D) eingeteilt werden. Typ A und Typ B Trichothecene sind weltweit sehr verbreitet, während Typ C und D natürlicherweise kaum vorkommen (KRSKA et al., 2001). Alle Typ B Trichothecene, deren wichtigster Vertreter Deoxynivalenol (DON) ist, weisen am C-8 eine Ketogruppe auf. T-2 und HT-2 Toxin, die einen Isovalerylrest am C-8 aufweisen, sind wiederum die wichtigsten Vertreter der Typ A Trichothecene (LANGSETH und RUNDBERGET, 1998).



Toxin	R1	R2	R3
T-2 Toxin	OAc	OAc	OH
HT-2 Toxin	OAc	OH	OH
Acetyl-T-2	OAc	OAc	OAc
T-2 Triol	OH	OH	OH

**Abbildung 1:** Strukturformel einiger wichtiger Typ A Trichothecene

**Tabelle 1:** Physikalisch-chemische Eigenschaften von T-2 Toxin und HT-2 Toxin

	T-2 Toxin	HT-2 Toxin
Summenformel:	C <sub>24</sub> H <sub>34</sub> O <sub>9</sub>	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>8</sub>
Molekulargewicht:	466,58	424,54
Schmelzpunkt:	151 – 152 °C	1)
Spezifische Rotation:	[α] <sub>D</sub> <sup>26</sup> = + 15	1)

1) keine Angaben, da ölige Substanz

T-2 Toxin (3 $\alpha$ -hydroxy-4 $\beta$ -15-diacetoxy-8 $\alpha$ -(3-methylbutyryloxy)-12,13-epoxytrichothec-9-en) ist eine farblose, kristalline Verbindung mit einer chemisch hohen Stabilität (BAMBURG und STRONG, 1971). Es wird während Lagerung, Erhitzung, Mahlprozessen und anderen Produktionsschritten von Lebens- und Futtermitteln nicht zerstört (ERIKSEN und ALEXANDER, 1998). HT-2 Toxin (3 $\alpha$ ,4 $\beta$ -Hydroxy-15-acetoxy-8 $\alpha$ -(3-methylbutyryloxy)-12,13-epoxytrichothec-9-en) ist ein blassgelbes Öl. Die physikalisch-chemischen Eigenschaften der beiden Toxine sind in Tab. 1 zusammengefaßt. Beide Toxine sind, wie alle Typ A Trichothecene, in organischen Lösungsmitteln wie Ethylalkohol, Etyhlacetat, Chloroform und Dimethylsulfoxid gut, in Wasser hingegen nur schwer löslich (YAGEN und BIALER, 1993). Typ A Trichothecene sind wesentlich unpolarer als Typ B Trichothecene, da sie weniger freie Hydroxylgruppen besitzen und die Ketogruppe an C-8 fehlt (KRSKA et al., 2001). Typ A Trichothecene besitzen auch im Gegensatz zu den Typ B Trichothecenen (konjugierte Ketogruppe an C-8) keine UV-absorbierenden Eigenschaften, eine UV-Detektion ist somit nicht möglich (KOTAL et al., 1999).

Laut YAGEN und BIALER (1993) sind neben der oben bereits erwähnten 12,13-Epoxidgruppe auch die C-9,10 Doppelbindung und die freie 3 $\alpha$ -Hydroxyl-Gruppe für die Toxizität von T-2 Toxin verantwortlich. So konnten BERGMANN et al. (1988) zeigen, dass Verbindungen mit einer freien 3 $\alpha$ -Hydroxyl-Gruppe (T-2, HT-2) eine zehnfach höhere Toxizität als 3 $\alpha$ -Acetyl T-2 Toxin aufwiesen.

### 2.1.2 Biologische Eigenschaften

In den Jahren 1942 – 1947 erkrankten über 10% der Bevölkerung von Orenburg, Sibirien, nach dem Verzehr von überwintertem Getreide (Hirse, Weizen und Gerste) an der sogenannten “Alimentären Toxischen Aleukie (ATA)”, die sich durch folgende Symptome auszeichnete: Erbrechen, Entzündungen der Haut, Durchfall, Leukopenie, multiple Hämorrhagien, nekrotisierende Angina, Sepsis und Depletion des Knochenmarks (FORGACS und CARLL, 1962). In Proben des überwinterten Getreides konnten *F. sporotrichioides* und *F. poae* nachgewiesen werden, aus denen OLIFSON (1972) das sogenannte “Poaeufusarin” als ursächliches Toxin der Erkrankung isolierte. MIROCHA und PATHRE (1973) untersuchten eine “Poaeufusarin”-Probe mittels GLC (gas-liquid chromatographie) und fanden heraus, dass

sie aus mindestens 7 Hauptkomponenten bestand, wobei T-2 Toxin den größten Anteil ausmachte.

Im Winter 1970 – 71 starben 20% einer Milchviehherde in Wisconsin, nachdem sie über längere Zeit Futter gefressen hatten, das 60 % verschimmeltetes Getreide enthielt. SMALLEY et al. (1971) konnten zeigen, dass das Getreide insbesondere mit *F. tricinctum* kontaminiert war. Bereits 1968 entdeckten BAMBURG et al., dass dieser Pilz in der Lage ist, Diacetoxyscirpenol und T-2 Toxin zu produzieren. Im kontaminierten Getreide aus Wisconsin konnten bis zu 2 mg T-2 Toxin pro kg trockenem Getreide nachgewiesen werden (HSU et al., 1972).

In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass T-2 Intoxikationen zu relativ unspezifischen Symptomen wie Gewichtsabnahme, Nahrungs- bzw. Futterverweigerung, Dermatitis, Erbrechen, Durchfall, Hämorrhagien und Nekrose des Magen- und Darmepithels, der Milz, des Knochenmarks, der Hoden und der Ovarien führen (SCF, 2001). T-2 ist, wie andere Typ A Trichothecene auch, bis zu zehnfach toxischer als DON. Schweine sind Trichothecenen gegenüber wesentlich empfindlicher als Wiederkäuer, während Puten relativ unempfindlich zu sein scheinen (LANGSETH und RUNDBERGET, 1998). Auch Katzen zeigten gegenüber T-2 Toxin eine sehr hohe Sensitivität (SCF, 2001) und Neugeborene und Jungtiere sind allgemein sehr viel empfindlicher, als ausgewachsene Tiere (UENO, 1984).

Auf zellulärer Ebene besteht der Haupteffekt von T-2 Toxin und anderen Trichothecenen in einer Unterbrechung der DNA- und RNA-Synthese, verursacht durch eine Hemmung der Proteinbiosynthese (RICHARD, 2007). T-2 Toxin hat eine starke Affinität zur 60 S Untereinheit des Ribosoms und hemmt die Aktivität der Peptidyl-Transferase. Infolgedessen wird die Proteinbiosynthese in der Initiationsphase gehemmt, weshalb man T-2 auch zu den sogenannten "I-Typen" der Trichothecene zählt (CUNDLIFFE und DAVIES, 1977; SCF, 2001). *In vivo* verursacht T-2 Toxin außerdem eine sehr schnelle und erhebliche Degradation von Polyribosomen. Pro Ribosom wird ein T-2-Molekül gebunden, diese Bindung ist bei 37 °C reversibel (Halbwertszeit 2,5 h). Die Bindungsaffinität zum Ribosom von T-2 Toxin ist hundertfach höher als die von Trichodermin (4 $\beta$ -Acetoxy-12,13-epoxytrichothec-9-en), einem Trichothecen, das sich unter anderem durch den fehlenden Isovalerylrest (Abb. 1) von T-2 unterscheidet (MIDDLEBROOK und LEATHERMAN, 1989).

Da T-2 die Proteinbiosynthese hemmt, beeinflusst es hauptsächlich die teilungsaktiven Zellen (RICHARD, 2007). Deshalb ist das Immunsystem eines der Hauptziele von T-2 Toxin. Dies äußert sich in verringerten Leukozytenzahlen, allergischen Reaktionen vom Typ IV, Depletion von Vorläuferzellen, reduzierter Antikörperbildung und Transplantatabstoßungen (CREPPY, 2002). Trichothecene haben zudem eine hohe Hämatoxizität. Sie führen zu Thrombozytopenie und Leukopenie, wobei die Abnahme der zirkulierenden Blutzellen meist in engem Zusammenhang mit Knochenmarksschäden steht. Die Trichothecene greifen hierbei v. a. die hämatopoetischen Vorläuferzellen an. Bei den meisten Spezies (Schwein, Maus, Kaninchen, Maus, Pferd, Mensch) induzieren die Trichothecene zudem eine Hämolyse. Bei Wiederkäuern ist dies nicht der Fall, was darauf zurückgeführt wird, dass sie sehr wenig oder gar kein Phosphatidylcholin in der Erythrozytenmembran haben. In vitro konnte gezeigt werden, dass Erythrozyten-Vorläuferzellen deutlich weniger empfindlich gegenüber T-2 Toxin sind, als Thrombozyten- und Leukozyten-Vorläuferzellen (PARENT-MASSIN, 2004).

Ein weiterer wichtiger Effekt von T-2 Toxin ist die Induktion von Apoptose (SCF, 2001). LE DRÉAN et al. (2005) konnten zeigen, dass es in humanen CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Vorläuferzellen durch T-2 Toxin dosis- und zeitabhängig zu einem proportionalen Anstieg der Caspase-3 spezifischen Aktivität kommt. CHEN et al. (2006) untersuchten die apoptotischen Effekte von T-2 auf Chondrozyten. Sie konnten ebenfalls eine zeit- und dosisabhängige Hemmung der zellulären Proliferation nachweisen. Außerdem gelang es ihnen zu zeigen, dass sich das Verhältnis von Bcl-2 (antiapoptotisches Protein) und Bax (proapoptotisches Protein) unter T-2-Einwirkung zu Gunsten von Bax ändert. Per RT-PCR konnte die Arbeitsgruppe des weiteren nachweisen, dass die Bax-Expression über transcriptionale Mechanismen hochreguliert wird, da sowohl Bax-Protein als auch Bax-mRNA erhöht waren. Die Bcl-2-Protein-Expression war ebenfalls erhöht, während die Bcl-2-mRNA jedoch unverändert blieb. Dies führten die Autoren darauf zurück, dass die Bcl-2-Protein-Expression in T-2-induzierten Chondrozyten durch post-transcriptionale Mechanismen reguliert wird. HUANG et al. (2007) zeigten an U937-Zellen (humane monozytäre Leukämie-Zellen), dass die Aktivierung von Caspase-2 essentiell für die T-2-induzierte Apoptose ist. Dies resultiert in einer Aktivierung weiterer Caspasen (u. a. 8 und 9) und damit letztendlich im Zelltod. HUANG et al. (2007) bewiesen außerdem, dass T-2 Toxin keinen der Komplexe (I – IV) der mitochondrialen Atmungskette hemmt und dass es zu keinem ATP-Anstieg in T-2-behandelten Zellen kommt. Dadurch konnte bewiesen werden,

dass der mitochondriale Stoffwechselweg bei der T-2-induzierten Apoptose keine Rolle spielt.

Eine umfangreiche und detaillierte Zusammenstellung früherer Arbeiten zur Toxizität von T-2 Toxin ist den Monographien des SCF (2001) und der JECFA (2001) zu entnehmen. Die folgenden Ausführungen konzentrieren sich deswegen auf neuere Arbeiten zu diesem Themenkomplex.

### *In vitro*

BOUAZIZ et al. (2006) untersuchten die Zytotoxizität und die daraus resultierenden Effekte von T-2 Toxin auf Vero-Zellen, wobei die Zellen 24 Stunden lang steigenden T-2-Konzentrationen ausgesetzt wurden. Danach wurde mittels Neutralrot-Test bzw. MTT-Test der Anteil der lebenden Zellen bestimmt. Mit beiden Tests konnte eine dosisabhängige Wachstumshemmung gezeigt werden. Die entsprechenden IC<sub>50</sub>-Werte lagen bei 4 nM (Neutralrot-Test) bzw. bei 60 nM (MTT). Um die Induktion der Lipidperoxidation durch T-2 bestimmen zu können, wurde der Malondialdehyd (MDA)-Gehalt nach zwölfstündiger Inkubation mit T-2 (20, 30 und 60 nM) gemessen. Die MDA-Werte stiegen von  $7,9 \pm 1,1 \mu\text{M}$  bei 20 nM T-2 Toxin auf  $23,9 \pm 0,4 \mu\text{M}$  bei 60 nM Toxin. Des Weiteren konnte DNA-Fragmentation in den Vero-Zellen bei T-2-Konzentrationen von 30, 60 und 120 nM beobachtet werden, und bis einschließlich 120 nM T-2 wurde eine dosisabhängige Zunahme der Caspase-3-Aktivität verzeichnet. Anhand der Bestimmung der zellulären Retention einer fluoreszierenden Substanz konnte außerdem ein deutlicher Abfall des mitochondrialen Transmembran-Potentials 24 h nach T-2 Exposition gezeigt werden.

VLATA et al. (2005) beschäftigten sich mit den zytopathischen Effekten von T-2 auf humane periphere Blut-Lymphozyten (PBLs). Toxische Dosen (10 ng/ml) von T-2 Toxin hemmten die Phytohämagglutinin (PHA)-induzierte T-Lymphozyten-Proliferation vollständig und führten zur Apoptose, die 8 Stunden nach der Behandlung ihren Höhepunkt erreichte. Es waren sowohl T-Helferzellen (CD4<sup>+</sup>) als auch T-Killerzellen (CD8<sup>+</sup>) betroffen. Subtoxische T-2-Dosen (0,1 ng/ml) führten hingegen zu einem deutlichen Anstieg beider Subpopulationen.

Ähnliche Effekte konnten von JARDAT et al. (2006) bei Hühner-Lymphozyten beobachtet werden, wobei in dieser Studie sowohl Concanavalin A (ConA) als auch Phytohämagglutinin-M (PHA-M) zur Stimulation eingesetzt wurden. Die Proliferation wurde komplett unterbunden, wenn 10 ng/ml T-2 zum Zeitpunkt 0 hinzugefügt wurden. Wurde dieselbe Dosis jedoch erst 24 Stunden nach Stimulation verabreicht, so wurde die Proliferation nur um 80% reduziert. Niedrige Dosen von T-2 Toxin (0,1 ng/ml oder weniger) führten bei ConA-stimulierten Lymphozyten zu einem leichten Anstieg der Proliferation. JARDAT et al. (2006) testeten außerdem, ob der Zusatz des Antioxidans Vitamin E einen Einfluss auf die mitogenstimulierte Lymphozytenproliferation in Anwesenheit von T-2 Toxin hat. Hierbei zeigte sich, dass die wasserlösliche Form von Vitamin E in hohen Konzentrationen (200 µM) dem Effekt von T-2 entgegenwirkt. Die fettlösliche Form des Vitamin E ( $\alpha$ -Tocopheryllacetat) zeigte weder in niedrigen (25 µM) noch in hohen (100 µM) Konzentrationen einen protektiven Effekt auf die Lymphozyten.

MC KEAN et al. (2006) testeten die Zytotoxizität von T-2 Toxin bzw. von T-2 und Aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) in Kombination auf HepG<sub>2</sub>- (humane Hepatoma-Zelllinie) und auf BEAS-2B-Zellen (humane Bronchialepithelzelllinie). Für die HepG<sub>2</sub>-Zellen ergab sich hierbei eine IC<sub>50</sub> von 0,98 µM, für die BEAS-2B-Zellen eine IC<sub>50</sub> von 32,1 nM. Um den Effekt einer kombinierten Zugabe von AFB<sub>1</sub> und T-2 messen zu können, wurde den Zelllinien ein Äquivalent jedes Toxins hinzugefügt, das 3/4, 1/2, 3/8, 1/4 bzw. 1/8 des jeweiligen IC<sub>50</sub>-Wertes entsprach. In HepG<sub>2</sub>-Zellen zeigten die beiden Toxine einen additiven Effekt, während bei den BEAS-2B-Zellen ein eindeutiger synergistischer Effekt der beiden Toxine beobachtet werden konnte. Die IC<sub>50</sub> für T-2 sank hierbei von 32,1 auf 3 nM.

Die Wirkung von verschiedenen Trichothecenen (T-2, DAS, NIV, DON; einzeln und in Kombination) auf die Immunglobulin(Ig)-Produktion humaner Lymphozyten wurde 1999 von THUVANDER et al. beschrieben. T-2 Toxin war der potenteste Proliferationsinhibitor PHA-stimulierter Lymphozyten, wobei die Zugabe von niedrigen Toxindosen zum Teil in einer gesteigerten Proliferationsrate resultierte. Alle eingesetzten Mykotoxine hemmten die *in vitro*-Immunglobulin-Produktion von Lectin-stimulierten Lymphozyten, unabhängig von der Art der Immunglobuline (IgG, IgA oder IgM). Auch bei der Ig-Produktion war bei niedrigen Toxinkonzentrationen ein Anstieg zu verzeichnen. Dieser Effekt war bei der IgA-Synthese am signifikantesten. Die Kombination von Nivalenol (NIV) und T-2 Toxin resultierte in einer

additiven Toxizität, während die Kombination von DON und T-2 einen antagonistischen Effekt hatte.

Auch TAJIMA et al. (2002) beschäftigten sich mit der Interaktion verschiedener Trichothecene. Sie konnten zeigen, dass NIV und T-2 die DNA-Synthese in Maus-Fibroblasten L-929-Zellen synergistisch hemmen. Außerdem wurde auch in dieser Studie bestätigt, dass die Hemmung der DNA-Synthese durch alle eingesetzten Mykotoxine (T-2, DON, NIV, ZEA, FB<sub>1</sub>) dosisabhängig erfolgt und dass die Zellen wesentlich empfindlicher auf Typ A Trichothecene (T-2) als auf Typ B Trichothecene (DON, NIV) reagieren.

### ***In vivo***

Puten, deren Futter 4 mg/kg T-2 Toxin enthielt, zeigten nach einer Woche gelbe, käsige Plaques am Schnabelrand, an der Mukosa des harten Gaumens, an den Schnabelwinkeln und an der Zunge. Bei niedrigeren T-2-Konzentrationen (0,4 mg/kg) traten die Veränderungen erst nach sieben Wochen auf. Bei mittleren Toxinkonzentrationen (1 – 4 mg/kg) konnten nach drei Wochen entsprechende Läsionen zusammen mit Gewichtsverlust und reduzierter Futteraufnahme verzeichnet werden (RICHARD, 2007).

MC KEAN et al. (2006) untersuchten die akute Toxizität sowie die Kombinationswirkung von Aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) und T-2 am Ratten- und am Fisch-Modell. Hierbei verabreichten sie jungen männlichen F-344 Ratten (90 – 110 g) über 7 d oral verschiedene Konzentrationen (1,0 – 10,0 mg/kg KGW) von T-2 Toxin. Hohe T-2-Dosen (10,0 und 4,64 mg/kg KGW) führten bereits kurz nach der Verabreichung zu akuten toxischen Symptomen wie Futtermverweigerung und Durchfall, die Mortalität betrug nach 24 h 100%. Auch bei T-2-Konzentrationen von 2,15 mg/kg KGW konnten verschiedene Vergiftungserscheinungen wie Futtermverweigerung und blutiger Stuhl beobachtet werden, während der einwöchigen Studie traten jedoch keine Todesfälle auf. Keine Vergiftungssymptome traten in der Gruppe mit der niedrigsten T-2-Dosierung (1,0 mg/kg KGW) sowie in der Kontrollgruppe auf. Um die Kombinationswirkung von T-2 und AFB<sub>1</sub> zu überprüfen, wurden den Ratten über 14 d Toxinmischungen unterschiedlicher Zusammensetzung per Sonde verabreicht. Hierbei zeigte sich, dass die Kombination von T-2 und AFB<sub>1</sub> bei den Ratten nur in einer geringfügig

höheren akuten Toxizität resultierte, der LD<sub>50</sub>-Wert stieg von 3,71 mg T-2 Toxin pro kg KGW auf 2,83 mg. Im Fisch-Modell konnte bei Mosquitofischen (*Gambusia affinis*) hingegen ein sehr starker additiver Toxizitätseffekt der beiden Mykotoxine beobachtet werden.

In einer weiteren jüngeren Studie wurde von LI et al. (2006) die negative Wirkung von T-2 Toxin auf das Immunsystem am Maus-Modell untersucht. Sie injizierten 4 Wochen alten weiblichen Balb/c Mäusen einmalig intraperitoneal 1,75 mg T-2 Toxin pro kg KGW, bevor sie ihnen 2 h später  $1 \times 10^7$  plaque forming Units (PFU) eines Reovirus (Serotyp 1) intranasal instillierten. Die Kontrollgruppe erhielt ausschließlich Reovirus. Alle Mäuse entwickelten nach der Reovirus-Instillation eine Bronchiolitis und Alveolitis, die bei den mit T-2 behandelten Tieren jedoch wesentlich ausgeprägter waren. Dementsprechend waren nach 10 d sowohl die PFU-Titer als auch die virale L2-Genexpression in den Lungen der T-2 behandelten Mäuse zehnfach höher als bei den Kontrolltieren. Analysen bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit zeigten, dass T-2 die Mobilisierung von Entzündungszellen in den Lungen der Reovirus-infizierten Mäuse zuerst mindert und anschließend erhöht. Außerdem wurde offensichtlich, dass T-2 die Reovirus-spezifische Ig-Antwort verzögert und die maximale lokale IgA-Antwort mindert, während die systemische Ig-Antwort potenziert wird. Anhand der Bestimmung der Reovirus- und der viralen L2-Gen-Konzentration in der Lunge 4 d nach der Behandlung mit unterschiedlichen T-2-Konzentrationen (0,02 – 2,0 mg/kg KGW) konnte eine Dosisabhängigkeit aufgezeigt werden. So war bei den hohen Dosierungen ein deutlicher Anstieg zu verzeichnen, während 0,02 mg T-2 Toxin/kg KGW keinen Effekt zeigten. NOEL (no-observed effect level) und LOEL (lowest observed effect level) für die T-2-induzierte, verminderte Reovirus-Clearance lagen bei 20 µg/kg KGW bzw. bei 200 µg/kg KGW.

### **2.1.3 Bildung, Entstehung und Metabolismus**

#### **T-2 und HT-2 Toxin bildende Schimmelpilze**

*Fusarien* kommen als sogenannte “Feldpilze“ - d.h. sie befallen das Getreide bereits auf dem Feld - weltweit vor, vorwiegend jedoch in Zonen mit gemäßigttem Klima (KRSKA et al., 2001). Temperaturen von 18 – 19 °C und tägliche Niederschläge von mehr als 5 mm Regen

während der Blütezeit begünstigen die Infektion besonders (BARTELS und RODEMANN, 2003). *Fusarien*-Infektionen führen zu reduzierten Getreidequalitäten und verringerten Ernteerträgen und verursachen somit große ökonomische Verluste (LANGSETH und RUNDBERGET, 1999). *F. acuminatum*, *F. poae*, *F. equiseti* und *F. sporotrichioides* sind wichtige T-2 und HT-2 Toxin-Produzenten. Lange Zeit wurde *F. sporotrichioides*, ein Pilz der bei Temperaturen zwischen -2 und 35 °C wächst und eine Wasseraktivität von mindestens 0,88 braucht, als der wichtigste T-2 und HT-2-Produzent angesehen (CREPPY, 2002). Doch 1999 beschrieben TORP und LANGSETH eine *Fusarien*-Art, die morphologisch *F. poae* ähnelt, jedoch das gleiche Toxinprofil (T-2 und HT-2) wie *F. sporotrichioides* besitzt. Da die Kolonien in der Kultur ein pulverartiges Erscheinungsbild hatten, nannten TORP und LANGSETH die neue *Fusarien*-Art vorläufig "powdery *F. poae*". TORP und NIRENBERG (2004) führten ausführliche Untersuchungen mit "powdery *F. poae*" durch und kamen zu dem Schluss, dass es sich um eine eigenständige *Fusarien*-Art handelt, der sie den Namen "*Fusarium langsethiae*" gaben. Heute wird *F. langsethiae* v. a. im Hinblick auf den Befall von Hafer als die wichtigste T-2 produzierende *Fusarien*-Art angesehen (EDWARDS, 2008).

### **Metabolismus von T-2 Toxin**

Verschiedene Bakterienarten und Protozoen sind in der Lage, T-2 Toxin zu verstoffwechseln. BEETON und BULL (1989) boten Isolaten von verschiedenen Bakterienarten, die vergesellschaftet im Erdreich oder Wasser leben, T-2 Toxin als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle an. Der Hauptabbauweg in den meisten dieser Isolate führte über eine Abspaltung der Acetylreste zu HT-2 Toxin und T-2 Triol. In wenigen Fällen wurde T-2 auch durch Abspaltung des Isovalerylrests zu Neosolaniol und dann weiter zu 4-Deacetyl-Neosolaniol abgebaut. Manche Bakterienstämme waren zudem in der Lage, T-2 Triol oder 4-Deacetyl-Neosolaniol weiter zu T-2 Tetraol abzubauen

KIESSLING et al. (1984) inkubierten verschiedene Mykotoxine, darunter auch T-2 Toxin, mit intaktem Pansensaft oder mit Fraktionen von Pansenprotozoen und Pansenbakterien von Schafen und Kälbern. Ochratoxin A, ZEA, T-2, DAS und DON wurden metabolisiert, wobei die Protozoen wesentlich aktiver waren, als die Bakterien. T-2 Toxin wurde vorzugsweise zu HT-2 deacetyliert.

Bei den meisten Tierarten wird T-2 Toxin nach der Aufnahme schnell absorbiert und, ohne dass eine Akkumulation in einem spezifischen Organ auftritt, gleichmäßig im Organismus verteilt. Die Plasmahalbwertszeit von T-2 Toxin beträgt in der Regel weniger als 20 Minuten. Eine Metabolisierung ist prinzipiell über Deacetylierung, Hydroxylierung, Glucuronidierung und Deepoxidation möglich, wobei der Hauptbiotransformationsweg die Deacetylierung am C-4 ist, was zur Entstehung von HT-2 Toxin führt (SCF, 2001). Die Reaktion wird durch eine Carboxylesterase katalysiert und findet hauptsächlich in der Leber (JOHNSEN et al., 1986), aber auch im Blutplasma (JOHNSEN et al., 1988) und im Magen- und Darmtrakt (YOSHIZAWA et al., 1980; CONRADY-LORCK et al., 1988) statt. Bei *in vitro*-Versuchen konnten YOSZHIZAWA et al. (1980) nachweisen, dass isolierte Mägen von Ratten T-2 bei pH 7,5 hauptsächlich zu HT-2 und Neosolaniol umbauen. JOHNSEN et al. (1986) zeigten, dass die Deacetylierung in den Microsomen der Leber von Ratten durch das Isoenzym pI 5,4 der Leber-Carboxylesterase katalysiert wird. Später konnten ebenfalls JOHNSEN et al. (1988) nachweisen, dass auch die Blutzellen in der Lage sind, über eine Carboxylesterase T-2 Toxin abzubauen. Alle Leukozytensubpopulationen bauen T-2 zu HT-2 ab. In Ratten-Erythrozyten entsteht als Hauptmetabolit des T-2-Abbaus hingegen Neosolaniol, während humane Erythrozyten gleiche Mengen von HT-2 und Neosolaniol produzieren.

Die Metabolisierung von T-2 Toxin wurde relativ häufig an Schweinen untersucht. ROBISON et al. (1979a) applizierten Absatzferkeln 0,1 mg [<sup>3</sup>H]T-2 Toxin/kg KGW per Tubus und bestimmten nach 18 Stunden die Verteilung des Tritium-markierten T-2 Toxins im Schweinekörper. Von der verabreichten Dosis konnten 0,7 % in der Muskulatur, 0,43% in der Leber, 0,08% in der Niere, 0,06% in der Galle, 21,6% im Urin und 25% im Faeces nachgewiesen werden. CORLEY et al. (1985) stellten bei zwei Versuchsschweinen fest, dass 63 % der T-2-Metaboliten im Urin und 77% in der Galle glucuronidiert waren. Dieselbe Arbeitsgruppe (CORLEY et al., 1986) beschäftigte sich auch mit den im Plasma und im Gewebe von Schweinen nachweisbaren Metaboliten nach intravenöser Verabreichung von [<sup>3</sup>H]T-2 Toxin. Hierbei betrug die Plasmahalbwertszeit 90 Minuten, nach 4 Stunden war der größte Anteil der Radioaktivität im Gastrointestinaltrakt nachweisbar. Insgesamt wurden 21 Metaboliten nachgewiesen, wobei 55% der Radioaktivität im Gewebe und im Gastrointestinaltrakt der Schweine auf T-2, HT-2, Deepoxy-HT-2, T-2 Triol, Deepoxy-T-2 Triol, 3'-OH T-2, 3'-OH HT-2, T-2 Tetraol und Deepoxy-T-2 Tetraol zurückgingen.

PFEIFFER et al. (1988) behandelten Ratten auf verschiedenen Applikationswegen (oral, i.v., dermal) mit jeweils 0,15 bzw. 0,60 mg/kg KGW T-2 Toxin. Nach oraler Applikation erfolgte die Exkretion der Radioaktivität sehr schnell und war nach 72 Stunden nahezu vollständig (mehr als 95%). Bei den Ratten, die 0,15 mg/kg KGW T-2 intravenös erhalten hatten, erfolgte die Exkretion ebenfalls sehr schnell und war auch nach 72 Stunden nahezu komplett. Bei den Ratten der hohen Dosierungsgruppe (0,6 mg/kg KGW) waren 72 Stunden nach der i.v.-Applikation jedoch weniger als 80% ausgeschieden, was auf eine ausgeprägte T-2-induzierte Angiopathie zurückzuführen war. Bei dermalen Applikation des T-2 Toxins wurden innerhalb von 72 Stunden weniger als 60% der Dosis ausgeschieden. Insgesamt 68,3% der Radioaktivität im Urin wurden durch T-2 (5,6%), HT-2 (8,9%), 3'-OH HT-2 (29,3%), 3'-OH T-2 (3,2%), T-2 Tetraol (21,3%) und zwei unbekannt Metaboliten M5 (7,5%) und M9 (13,8%) verursacht. Insgesamt 29,1% der Radioaktivität im Faeces waren auf die Metaboliten Deepoxy-HT-2 (3,4%), 3'-OH HT-2 (15,1%) und Deepoxy-T-2 Tetraol (10,6) zurückzuführen, daneben konnten noch drei unbekannte Metaboliten M5 (5,2%), M7 (9,7%) und M9 (46,5%) nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zu PFEIFFER et al. (1988) wählten PACE et al. (1985) den intramuskulären Injektionsweg. Nach Injektion einer LD<sub>50</sub>-Dosis (1,04 mg/kg) <sup>3</sup>H-markierten T-2 Toxins erreichte die Plasmakonzentration bei männlichen Meerschweinchen nach 30 min ihr Maximum. Die Nachweisbarkeit von radioaktiven Metaboliten in den Exkrementen verlief biphasisch mit Halbwertszeiten von 2,2 Stunden im Urin und 8,2 Stunden im Kot. Bei den Meerschweinchen dauerte die Ausscheidung länger, als bei den von PFEIFFER et al. (1988) verwendeten Ratten, nach 5 Tagen waren 75% der Radioaktivität mit Urin und Kot in einem Verhältnis von 4:1 ausgeschieden. Die Galle der Meerschweinchen enthielt die höchste Toxinkonzentration und wies 12 h nach Applikation 17% der Radioaktivität auf.

Verschiedene Arbeitsgruppen führten Versuche zum transplacentaren Übergang von T-2 Toxin und den daraus resultierenden fetalen Schäden durch. Hierbei fanden Rattenmodelle in verschiedener Anordnung Verwendung. LAFARGE-FRAYSSINET et al. (1990) untersuchten den Thymus und die Milz von Neugeborenen, nachdem den Muttertieren während der Trächtigkeit T-2 Toxin entweder über das Futter oder intraperitoneal verabreicht worden war. Der Thymus der Neugeborenen war atrophisch, was jedoch innerhalb einer Woche reversibel war. Histologische Untersuchungen des Thymus zeigten, dass am ersten Tag nach der Geburt die Rinde atrophisch und das Mark proliferativ waren, am sechsten Tag nach der Geburt war

die Situation jedoch umgekehrt. In der Milz waren sowohl B- als auch T-Zellen betroffen und ihre Antwort auf PHA war reduziert.

In einer anderen Studie (SEHATA et al., 2004) wurde Ratten am 13. Tag der Trächtigkeit eine einmalige orale Dosis von 2 mg/kg T-2 Toxin appliziert, was Läsionen im Gehirn der Feten verursachte. Die von T-2 induzierte Apoptose im fetalen Gehirn begann 1 h nach Verabreichung (p.a.) und erreichte 12 Stunden p.a. ihren Höhepunkt.

### **Carry-over von T-2 Toxin**

In verschiedenen Arbeiten wurde der Übergang (Carry-over) von T-2 Toxin in Lebensmittel tierischen Ursprungs untersucht. So verabreichten ROBISON et al. (1979b) einer trächtigen Holstein Kuh 15 Tage lang je 182 mg T-2 Toxin per Schlundsonde, was einer theoretischen T-2-Konzentration im Futter von 50 ppm entsprach. Am Tag 2, 4, 5, 8, 10 und 12 wurden Milchproben untersucht, wobei T-2-Konzentrationen im Bereich von 10 bis 160 ng/ml nachgewiesen werden konnten.

In einer weiteren Studie beschäftigten sich YOSHIZAWA et al. (1981) ebenfalls mit dem Carry-over von T-2 Toxin in Kuhmilch. Sie verabreichten einer laktierenden Jersey Kuh 3 Tage lang 180 mg/d T-2 Toxin in Form von Gelatine-Kapseln, bevor die Kuh am vierten Tag eine einmalige orale Dosis [<sup>3</sup>H]T-2 Toxin erhielt. Bezogen auf die Futtermenge entsprach dies einer T-2-Konzentration von 31 – 36 ppm. Nach 72 Stunden waren 0,2% der verabreichten Radioaktivität in der Milch nachweisbar. Die höchsten Werte (37 ppb) in der Milch wurden 16 Stunden p.a. beobachtet, die Halbwertszeit von T-2 in Milch betrug 24 Stunden. Nach 12 Stunden lag die Konzentration von unmetabolisiertem T-2 in der Milch bei 2 ppb und sank nach 36 Stunden auf unter 0,1 ppb.

Auch ESGIN et al. (1989) fütterten zwei laktierende Kühe mit T-2 Toxin. Kuh 1 erhielt 0,3 mg/kg KGW T-2 Toxin per os, Kuh 2 wurden 0,5 mg/kg KGW verabreicht, bevor nach 4, 8, 12, 24, 36, 48, 60 und 96 h Milchproben entnommen und per ELISA untersucht wurden. Beide Tiere schieden Toxin über die Milch aus, die Dauer der Toxinausscheidung war von der Dosierung abhängig. So erreichten bei Kuh 1 die Toxinkonzentrationen in der Milch

bereits nach 4 h, bei Kuh 2 jedoch erst nach 8 h maximale Werte (16,2 bzw. 52,5 ng/ml). Außerdem konnte bei Kuh 1 schon nach 24 h kein Toxin mehr nachgewiesen werden, was bei Kuh 2 erst nach 96 h der Fall war. In beiden Versuchen waren von der aufgenommenen Toxinmenge nur Spuren in der Milch nachweisbar (Kuh 1: 0,055 %, Kuh 2: 0,047 %).

#### **2.1.4 Vorkommen von T-2 Toxin und HT-2 Toxin in Lebensmitteln**

Viele Untersuchungen in den letzten Jahren zeigten, dass T-2 Toxin und HT-2 Toxin praktisch weltweit sowohl in Getreide wie Weizen, Mais, Hafer, Gerste, Reis, als auch auf Bohnen und Sojabohnen vorkommt (JECFA, 2001). Unter den verschiedenen Getreidesorten scheint Hafer am anfälligsten für T-2- und HT-2-Kontaminationen zu sein (SCCOP, 2003; LANGSETH und RUNDBERGET, 1999).

Ein Hauptteil (90 – 95 %) des in Hafer enthaltenen Toxingehaltes geht während der industriellen Verarbeitung zu Haferflocken verloren (SCUDAMORE et al., 2007). Hierbei wird während des Entspelzens die größte Toxinmenge entfernt. Dies hängt damit zusammen, dass die Mykotoxine hauptsächlich in den äußeren Schichten des Korns zu finden sind, was sich auch in der hohen Belastung des Kraftfutters, das aus den Kornhüllen hergestellt wird, widerspiegelt (SCUDAMORE et al. 2007). SCHOLLENBERGER et al. (2002) kamen bei der Untersuchung von Mehlproben zu einem ähnlichen Ergebnis. Sie konnten zeigen, dass der durchschnittliche Mykotoxingehalt in Mehl mit steigendem Aschegehalt abnimmt. Durch müllereitechnische Prozesse (Mahlen, Sieben) werden die Pilzhyphen, die sich in den äußeren Kornsichten befinden aussortiert und folglich wird die Mykotoxinbelastung gesenkt. Koch- und Backprozesse überstehen T-2 und HT-2 Toxin nahezu unbeschadet (JECFA, 2001).

Verschiedene Untersuchungen legen die Vermutung nahe, dass Produkte aus ökologischer Landwirtschaft weniger belastet sind, als Produkte aus konventioneller Landwirtschaft (GOTTSCHALK et al, 2007; EDWARDS und SCUDAMORE, 2007).

Basierend v. a. auf einer Kurzzeitstudie zur Hämatotoxizität und Immunotoxizität von T-2 Toxin bei Schweinen (RAFAI et al., 1995) führte das SCF (2001) Berechnungen zur Festlegung eines tTDI (temporary tolerable daily intake) beim Menschen durch. Es ergab sich

ein Wert von 0,06 µg/kg KGW für die Summe von T-2 und HT-2. Die Nordic Working Group hingegen errechnete aus dem vorhandenen toxikologischen Datenmaterial einen tTDI von 0,2 µg/kg KGW (SCOOP, 2003). Die geschätzte durchschnittliche tägliche Aufnahme von T-2 in Europa liegt bei 7,6 ng/kg KGW, die von HT-2 bei 8,7 ng/kg KGW (JECFA, 2001). In den Nordischen Ländern wurde die durchschnittliche tägliche Aufnahme von T-2 und HT-2 auf 0,13 µg/kg KGW geschätzt (ERIKSEN und ALEXANDER, 1998). LANGSETH und RUNDBERGET (1999) berechneten, dass eine 60 kg schwere Person, die täglich 30 g Hafer (z. B. über Frühstückszerealien) zu sich nimmt, der in Norwegen durchschnittlich mit 164 µg/kg HT-2 und T-2 belastet ist, auf eine durchschnittliche tägliche Belastung von 0,08 µg/kg KGW kommt.

In Tabelle 2 sind einige Daten zum natürlichen Vorkommen von T-2 Toxin und HT-2 Toxin in Getreide und Lebensmitteln zusammengefasst. Weitere Daten sind dem SCOOP-Bericht von 2003 zu entnehmen.

**Tabelle 2:** Ausgewählte Veröffentlichungen zum natürlichen Vorkommen von T-2 Toxin und HT-2 Toxin in Getreide, Lebensmitteln und Futtermitteln

Probenmaterial	n	% positiv T-2 / HT-2	Ursprungsland	Toxingehalte (T-2 / HT-2)		Referenz
				in µg/kg Bereich bzw. Mittelwerte		
(Futter-) Weizen	84	26 / 7	Baden-Württemberg	3 – 249 / 3 - 20		MÜLLER und SCHWADORF (1993)
18 Weizen	20	10 / k. A.	Brasilien	400 – 800 / k. A.		FURLONG et al. (1995)
(Futter-) Gerste	240	14 / 5	Baden-Württemberg	25,5 / 38,2		MÜLLER et al. (1997)
Gerste	24	50 / 20,8	Polen	20 – 2400 / 10 - 370		PERKOWSKI et al. (1997)
(Futter-) Weizen	25	24 / k. A.	Rumänien	26,0 / k. A.		CURTUI et al. (1998)
(Futter-) Mais	30	3,3 / k. A.		63,0 / k. A.		
Gerste	102	5 <sup>1)</sup> / 22 <sup>1)</sup>	Norwegen	14,0 / 24,0		LANGSETH und RUNDBERGET (1999)
Hafer	178	30 <sup>1)</sup> / 70 <sup>1)</sup>		25,0 / 83,0		
Weizen	169	0,6 <sup>1)</sup> / 1,2 <sup>1)</sup>		10,0 / 10,0		

**Fortsetzung Tab. 2:** Ausgewählte Veröffentlichungen zum natürlichen Vorkommen von T-2 Toxin und HT-2 Toxin

Probenmaterial	n	% positiv T-2 / HT-2	Ursprungsland	Toxingehalte (T-2 / HT-2)		Referenz
				in µg/kg Bereich bzw. Mittelwerte		
Weizenmehl	60	1,6 / 6,6	Baden-Württemberg	4,0 / 12,0		SCHOLLENBERGER et al. (2002)
Putenmastfutter	50	90 / 76	Slowakei	13,0 / 18,0		LABUDA et al. (2005)
	101	1 / 2	Baden-Württemberg	4,0 / 12,0		SCHOLLENBERGER et al. (2005)
Weizen	41	5 / 54	Deutschland	6,0 / 9,0		SCHOLLENBERGER et al. (2006)
Hafer	17	100 / 100		73,0 / 181,0		
Mais	41	51 / 76		16,0 / 21,0		
Mais-Nebenprodukte	13	69 / 85		29,0 / 55,0		
Mais-Pflanzen	8	75 / 88		70,0 / 233,0		
Mais-Silage	5	0 / 100		0 / 18,0		
Lupine	9	11 / 11		6,0 / 5,0		
Sojamehl	13	0 / 7,7		0 / 5,0		

**Fortsetzung Tab. 2:** Ausgewählte Veröffentlichungen zum natürlichen Vorkommen von T-2 Toxin und HT-2 Toxin

Probenmaterial	n	% positiv T-2 / HT-2	Ursprungsland	Toxingehalte (T-2 / HT-2)	Referenz
				in µg/kg Bereich bzw. Mittelwerte	
Hafer	10	100 / k. A.	Litauen	10,8 – 121,5 / k. A.	MANKIEVIČIENE et al. (2007)
Hafer	8	100 / 100	Großbritannien/Irland	246,0 / 718,0	SCUDAMORE et al. (2007)
Hafer	4	100 / 100	Skandinavien	135,0 / 466,0	
Hafer	20	45 <sup>2)</sup> / 75 <sup>2)</sup>	Großbritannien,	71,0 / 175,0	PETTERSSON (2008)
Hafer-Produkte	185	0 <sup>2)</sup> / 2 <sup>2)</sup>	Deutschland,	6,0 / 16,0	
Hafer-Nebenprodukte	20	90 <sup>2)</sup> / 100 <sup>2)</sup>	Finnland und Irland	299,0 / 464,0	

1) > 20 µg/kg

2) > 50 µg/kg

### 2.1.5 Vermeidung und Detoxifikation

Ackerbauliche Maßnahmen sind ein sehr wichtiger Ansatzpunkt bei der Vermeidung bzw. Verminderung der Mykotoxinbildung in der Getreideproduktion. So ist z. B. die gewählte Fruchtfolge von großer Bedeutung, da man weiß, dass Mais als Vorfrucht vor Weizen das Risiko einer *Fusarien*-Infektion deutlich erhöht (OBST et al., 2000; BARTELS und RODEMANN, 2003). Es sollte außerdem auf die Auswahl der richtigen Getreidesorte geachtet werden und möglichst nur Sorten mit geringer Anfälligkeit gegen *Fusarien* angebaut werden. Des Weiteren ist es wichtig, potentielle Inokulum-Quellen zu beseitigen, was durch Einsatz von wendenden Bodenbearbeitungsverfahren wie Pflügen erreicht wird (MATTHIES et al., 2000). Wird hingegen durch Einsatz eines Grubbers bzw. einer Ackerfräse die Minimalbodenbearbeitung angewandt, so können *Fusarien* an der Bodenoberfläche überdauern und über Ascosporen das Folgegetreide infizieren. Ist die konservative Bodenbearbeitung aufgrund von Erosionsgefahr nötig, so sollte der Rotteprozess von Pflanzen- und Ernterückständen auf der Bodenoberfläche durch Häckseln z.B. der Maisstoppeln und gleichmäßige Einarbeitung der Rückstände in die Erdoberfläche gefördert werden (BARTELS und RODEMANN, 2003; OLDENBURG et al., 2006). Hohe Stickstoffgaben bei der Spätdüngung und der sich hieraus ergebende Einsatz von Wachstumsreglern fördern den *Fusarien*-Befall, während optimierte bedarfsangepasste Stickstoffdüngung die Befallswahrscheinlichkeit senkt. D'MELLO et al. zeigten 1998, dass subletale Dosen von verschiedenen Fungiziden, u.a. Carbendazim, Difenoconazol und Tebuconazol mit Triadimenol, das *Fusarien*-Wachstum fördern.

Eine Möglichkeit, die negativen Auswirkungen von T-2 bzw. HT-2 zu verringern, ist die Zugabe von detoxifizierenden Substanzen zu den Futtermitteln von Tieren. Der Zusatz von Calciumhydroxid-Monoethylamin kann in Abhängigkeit vom Feuchtigkeitsgehalt des Futters und von der Verarbeitungstemperatur T-2-haltiges Futter dekontaminieren (JECFA, 2001). CARSON und SMITH (1983) konnten zeigen, dass der Zusatz von Bentonit zum Futter T-2-Toxikosen verhindern kann, indem es die intestinale Absorption des Toxins senkt und die fäkale Exkretion erhöht. Bei einem Bentonit-Gehalt von 10 % im Futter von Ratten konnte die Nahrungsverweigerung und Wachstumsdepression am effektivsten verhindert werden. In einer Studie von EDRINGTON et al. (1997) zeigte sich, dass der Einsatz von Aktivkohle keine wesentlichen Effekte auf die Toxizität von T-2 bei Broilern hat. Die Wirksamkeit der

meisten Absorbentien ist jedoch bislang nicht eindeutig bewiesen (DÄNICKE und DÖLL, 2003).

## **2.2 Analytik von T-2 Toxin und HT-2 Toxin**

Prinzipiell lassen sich die existierenden Nachweisverfahren für Trichothecene in zwei Kategorien einteilen: die "instrumentellen Methoden" wie Gaschromatographie (GC) und Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) und die "Schnelltests" wie Dünnschichtchromatographie (TLC) und Enzymimmuntests (KOCH, 2004). Die JECFA unterscheidet zwischen "Screeningtests" (ELISA und TLC) und "quantitativen Methoden" (GC und HPLC). Die physikalisch-chemischen Verfahren (GC und HPLC) ermöglichen grundsätzlich die simultane Bestimmung verschiedener Mykotoxine in Konzentrationen von wenigen ng/g, haben aber den Nachteil, dass sie sehr zeit- und kostenintensiv sind und aufwendige Aufreinigungsschritte benötigen (YOSHIZAWA et al., 2004). Enzymimmuntests sind relativ schnell durchführbar, spezifisch und kostengünstig (MÄRTLBAUER et al., 1991). Umfangreiche Übersichtsartikel zu den verschiedenen Nachweisverfahren für Typ A und Typ B Trichothecene wurden von LANSETH und RUNDBERGET (1998) und KRŠKA et al. (2001) veröffentlichten. Deshalb wird in den folgenden Ausführungen hauptsächlich auf einige grundlegende Details und auf neuere Entwicklungen der T-2 und HT-2 Toxin-Analytik eingegangen.

### **2.2.1 Extraktion und Reinigung**

Zur Extraktion von T-2 Toxin und HT-2 Toxin haben sich Methanol/Wasser- (STRATTON et al., 1993; PASCALE et al., 2003; VISCONTI et al., 2005; LATTANZIO et al., 2007) und Acetonitril/Wasser-Gemische (RADOVÁ et al., 1998; KOTAL et al., 1999; MATEO et al., 2002; YOZHIZAWA et al., 2004; BERTHILLER et al., 2005; SAGAWA et al., 2006) in verschiedenen Konzentrationen bewährt.

Für die meisten physikalisch-chemischen Nachweisverfahren ist eine weitere Reinigung der Rohextrakte nötig. Hierbei gibt es die Möglichkeit der Festphasenextraktion über

verschiedene Säulenmaterialien wie Kieselgel, Florisil, Aktivkohle, Aluminiumoxid und C<sub>18</sub>-Kartuschen bzw. die Gel-Permeationschromatographie über mit Bio-Beads S-X3 gefüllte Säulen. In der neueren Literatur wird auch häufig über den Einsatz der von der Firma Romer entwickelten MycoSep<sup>®</sup>-Säulen berichtet, die eine einfache und schnelle Aufreinigung der Rohextrakte ermöglichen sollen (RADOVÁ et al., 1998; MATEO et al., 2002; BERTHILLER et al., 2005). Eine weitere Möglichkeit zum Clean-up des Rohextraktes ist der Einsatz von kommerziell erhältlichen Immunaффinitätssäulen, bei denen T-2/HT-2-spezifische monoklonale Antikörper kovalent an die Gelmatrix immobilisiert sind (PASCALE et al., 2003; VISCONTI et al., 2005). Tabelle 3 gibt eine kurze Übersicht über die gängigen Extraktions- und Aufreinigungsverfahren.

**Tabelle 3:** Extraktions- und Aufreinigungsverfahren für T-2 Toxin und HT-2 Toxin in verschiedenen Probenmatrices

Probenmaterial (Menge)	Extraktion			Aufreinigung des Rohextraktes (Säulenmaterial/Elutionsmittel)	WFR (%)	Referenz
	Extraktionsmittel	Menge (ml)	Dauer			
Weizen (10 g)	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O (84/16)	60	60 min	MycoSep <sup>®</sup> #225	T-2: 92,9	RADOVÁ et al. (1998)
	dann CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O (84/16)	40	15 min		Florisol-SPE-Kartusche / CHCl <sub>3</sub> :MeOH (70:30) dann C <sub>18</sub> .Kieselgel-SPE- Kartusche / CH <sub>3</sub> CN:H <sub>2</sub> O (20:80)	
Weizen (5 g)	CH <sub>3</sub> CN/MeOH (1/1)	40	60 min	Bio-Beads S-X3 (GPC)	T-2: 91	KOTAL et al. (1999)
	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O (84/16)	40	120 min	Bio-Beads S-X3 (GPC)	k. A.	
Mais, Reis, Weizen (5 g)	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O (84/16)	k. A.	k. A.	Kieselgel-SPE-Kartusche / Chloroform:MeOH (90:10)  MycoSep <sup>®</sup> #225	T-2: 87,6	MATEO et al. (2002)
	Entfettung: Hexan (2 x 10 ml) dann CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (3 x 15 ml)				T-2: 84,3 HT-2: 79,6	

**Fortsetzung Tab. 3:** Extraktions- und Aufreinigungsverfahren für T-2 Toxin und HT-2 Toxin in verschiedenen Probenmatrices

Probenmaterial (Menge)	Extraktion			Aufreinigung des Rohextraktes (Säulenmaterial/Elutionsmittel)	WFR (%)	Referenz
	Extraktionsmittel	Menge (ml)	Dauer			
Weizen, Mais, Hafer, Reis und Hirse (50 g)	MeOH/H <sub>2</sub> O (80/20)	100	2 min	T-2-IAC / MeOH	T-2: 80,4 – 98,5	PASCALE et al. (2003)
Mais (10 g)	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O (84/16)	40	90 min	MycoSep <sup>®</sup> #227  MycoSep <sup>®</sup> #226	T-2: 94 HT-2: 98 T-2: 73 HT-2: 77	BERTHILLER et al. (2005)
Weizen, Mais und Gerste (50 g)	MeOH/H <sub>2</sub> O (90/10) + 1g NaCl	100	2 min	T-2-IAC / MeOH	T-2: 69,5 – 103,0; HT-2: 82,4 – 101,5	VISCONTI et al. (2005)
Reis (5 g)	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O (85/15)	10	über Nacht	k. .A.	T-2: 90 bzw. 93	SAGAWA et al. (2006)

**Fortsetzung Tab. 3:** Extraktions- und Aufreinigungsverfahren für T-2 Toxin und HT-2 Toxin in verschiedenen Probenmatrices

Probenmaterial (Menge)	Extraktion			Aufreinigung des Rohextraktes (Säulenmaterial/Elutionsmittel)	WFR (%)	Referenz
	Extraktionsmittel	Menge (ml)	Dauer			
Mais, Weizen (0,5 g)	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O/CH <sub>3</sub> COOH (79/20/1)	2	90 min	k. A.	T-2: 107 HT-2: 106	SULYOK et al. (2006)
Mais (10 g)	MeOH/ H <sub>2</sub> O (80/20) dann PBS	50 50	60 min 60 min	AOFZDT2 <sup>TM</sup> (IAC) / MeOH	T-2: 97 HT-2: 77	LATTANZIO et al. (2007)

CH <sub>3</sub> CN	= Acetonitril	k. A.	= keine Angaben
CH <sub>3</sub> COOH	= Essigsäure	MeOH	= Methanol
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	= Dichlormethan	NaCl	= Natriumchlorid
GPC	= Gel-Permeationschromatographie	PBS	= Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
IAC	= Immunaффinitätssäule	SPE	= Festphasenextraktion (solid phase extraction)

### 2.2.2 Nachweisverfahren

Sehr umfangreiche Übersichten zu den chromatographischen und immunologischen Nachweisverfahren für T-2 Toxin und HT-2 Toxin wurden von LANGSETH und RUNDBERGET (1998), KRŠKA et al. (2001) und KOCH (2004) veröffentlicht.

Die ersten Methoden, die zum Nachweis von Trichothecenen in Getreide entwickelt wurden, basierten auf der Dünnschichtchromatographie (TLC), wiesen jedoch im Hinblick auf Sensitivität und Selektivität große Nachteile auf (JIMÉNEZ et al., 2000). Lange Zeit war dann die Gaschromatographie (GC) basierend auf Elektroneneinfangdetektion (ECD) oder massenspektrometrischer Detektion (MS) das Verfahren der Wahl zum Nachweis von Trichothecenen. Da die Typ A Trichothecene im Gegensatz zu den Typ B Trichothecenen keine konjugierte Carbonylgruppe besitzen, sind sie mittels ECD weniger sensitiv zu detektieren (LANGSETH und RUNDBERGET, 1998). Deshalb ist eine Vorsäulenderivatisierung der Hydroxylgruppen notwendig (KOTAL et al., 1999), bei der Trimethylsilyl-, Trifluoracetyl-, Pentafluorpropionyl- oder Heptafluorobutyryl-Verbindungen generiert werden. Eine Acetylierung mit Essigsäureanhydrid ist ebenfalls möglich (LANGSETH und RUNDBERGET, 1998). Häufig werden Quarzglassäulen als stationäre Phasen und Stickstoff als Trägergas verwendet (RADOVÁ et al., 1998; KOTAL et al., 1999). Die GC erlaubt die simultane Bestimmung von mehreren verschiedenen Mykotoxinen im unteren ng/g-Bereich (YOSHIZAWA et al., 2004). Der große Nachteil der GC ist jedoch die Anfälligkeit für Matrixstöreffekte (PASCALE et al., 2003) und die daraus resultierende aufwendige und zeitintensive Probenaufbereitung (JIMÉNEZ et al., 2000).

In der neueren Literatur wird immer häufiger die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) in Kombination mit Ultraviolett (UV)-, Fluoreszenz (FL)- oder massenspektrometrischer (MS) Detektion eingesetzt (KOCH, 2004). Da die Typ A Trichothecene an C-8 keine konjugierte Ketogruppe haben, ist eine UV-Detektion ohne vorherige Derivatisierung nicht möglich (KRŠKA et al., 2001). MAYCOCK und UTLEY beschrieben 1985 die UV-Detektion von p-Nitrobenzoyl-Derivaten verschiedener Trichothecene, darunter auch T-2 Toxin. In den letzten Jahren wurde eine ganze Reihe von Arbeiten zur Analyse von T-2/HT-2 Toxin mittels HPLC und Fluoreszenz-Detektion publiziert (Tab. 4). Zur Derivatisierung der Toxine wurden hierbei Cumarin-3-carbonyl-chlorid (JIMÉNEZ et al., 2000; MATEO et al., 2002; DALL'ASTA et al., 2004) bzw. 1-Anthroylnitril (1-AN)

(PASCALE et al., 2003; VISCONTI et al., 2005; MARAGOS, 2006) verwendet. Als Methode der Wahl hat sich in jüngster Zeit die Flüssigchromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) (BERTHILLER et al., 2005; SULYOK et al., 2006; SAGAWA et al., 2006, DELMULLE et al., 2006; HÄUBL et al., 2007; GENTILI et al., 2007; LATTANZIO et al., 2007) erwiesen. Als Ionisationssysteme werden hierbei Elektrospray-Ionisation (ESI) (SULYOK et al., 2006; SAGAWA et al., 2006; LATTANZIO et al., 2007) oder die "Atmospheric Pressure Chemical Ionization" (APCI) (BERTHILLER et al., 2005) eingesetzt. GENTILI et al. (2007) erreichten bei Anwendung der LC-MS/MS Nachweisgrenzen von 0,8 µg/kg für T-2 und 0,6 µg/kg für HT-2 in Maismehl. Die entsprechenden Bestimmungsgrenzen lagen bei 2,5 bzw. 1,7 µg/kg. BERTHILLER et al. (2005) berichteten bei Anwendung der LC-APCI-MS/MS von Nachweisgrenzen für T-2 in Mais von 0,3 µg/kg. LATTANZIO et al. (2007) verwendeten ein LC/ESI-MS/MS-Verfahren und konnten T-2 Toxin ab 1,5 und HT-2 Toxin ab 1,9 µg/kg in Mais nachweisen.

Bisher gibt es nur wenige einfache und verlässliche Screeningmethoden für Typ A Trichothecene (KRSKA et al., 2001). ELISA's sind eine schnelle, spezifische und kostengünstige Methode für den Mykotoxinnachweis (MÄRTLBAUER et al., 1991) und erlauben zudem einen hohen Probendurchsatz. BARNA-VETRÓ et al. berichteten 1994 von einem direkt-kompetitiven ELISA zum T-2-Nachweis, der auf monoklonalen Antikörpern basiert. Die Nachweisgrenze des ELISA's liegt in Pufferlösungen bei 0,43 ng/ml, die 50%-Hemmungsdosis durchschnittlich bei 2,3 ng/ml. YOSHIZAWA et al. (2004) entwickelten einen ebenfalls auf monoklonalen Antikörpern basierenden ELISA zum Nachweis von T-2 und HT-2 Toxin. Bei diesem ELISA liegt die Nachweisgrenze für T-2 Toxin in Lebensmitteln bei 30 µg/kg. Die Kreuzreaktivität des ELISA's beträgt für T-2 Toxin und HT-2 jeweils 100 %, für Acetyl-T-2 78,1 %. Der von ESGIN et al. (1989) entwickelte ELISA zum Nachweis von T-2 Toxin basiert auf einem polyklonalem Kaninchenantiserum und erlaubt den Nachweis von T-2 in Pufferlösungen in Konzentrationen ab 0,05 ng/ml. Der Test zeigte Kreuzreaktionen von mehr als 100 % mit Acetyl-T-2, 40 % mit HT-2 und 3,5 % mit T-2 Triol. In Milch konnten mit diesem ELISA noch T-2-Konzentrationen von 0,5 µg/l nachgewiesen werden. MÄRTLBAUER et al. (1991) konnten unter Verwendung dieses Kaninchenantiserums T-2 Toxin-Konzentrationen von 2 µg/kg in Zerealien nachweisen, die Wiederfindungsraten lagen im Bereich von 89 bis 98 %.

**Tabelle 4:** HPLC-FLD-Verfahren zum Nachweis von T-2 und HT-2 Toxin in Lebensmitteln

Clean-up (Matrix)	Stationäre Phase	Mobile Phase	Derivatisierung Detektion ( $\lambda_{\text{ex}} / \lambda_{\text{em}}$ )	Nachweisgrenze	Referenz
Flüssig-Flüssig- Chromatographie (Getreide)	LiChrospher 100 C <sub>18</sub> RP-Säule (5 $\mu\text{m}$ ) + Vorsäule (5 $\mu\text{m}$ )	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O (65/35) + 0,75% CH <sub>3</sub> COOH	Cumarin-3-carbonyl-chlorid (292 nm / 425 nm)	T-2: 10 ng/g	JIMÉNEZ et al. (2000)
29 MycoSep <sup>®</sup> (Getreide)	LiChrospher 100 C <sub>18</sub> RP-Säule (5 $\mu\text{m}$ ) + Vorsäule (5 $\mu\text{m}$ )	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O (65/35) + 0,75% CH <sub>3</sub> COOH	Cumarin-3-carbonyl-chlorid (292 nm / 425 nm)	T-2: 10 ng/g	MATEO et al. (2002)
MycoSep <sup>®</sup> (Getreide)	Spherisorb ODS2 (3 $\mu\text{m}$ )	MeOH/H <sub>2</sub> O- Gradient	Cumarin-3-carbonyl-chlorid (292 nm / 425 nm)	T-2: 0,6 ng/g HT-2: 0,4 ng/g	DALL'ASTA et al. (2004)
IAC (Getreide)	C <sub>18</sub> RP Symmetry (5 $\mu\text{m}$ ) + vorgeschalteter Filter (0,5 $\mu\text{m}$ )	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O (80/20)	1-Anthroylnitril (381 nm / 470 nm)	T-2: 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$	PASCALE et al. (2003)

**Fortsetzung Tab. 4:** HPLC-FLD-Verfahren zum Nachweis von T-2 und HT-2 Toxin in Lebensmitteln

Clean-up (Matrix)	Stationäre Phase	Mobile Phase	Derivatisierung Detektion ( $\lambda_{\text{ex}} / \lambda_{\text{em}}$ )	Nachweisgrenze	Referenz
IAC (Getreide)	Phenyl-Hexyl Luna <sup>®</sup> (5 $\mu\text{m}$ ) + vorgesch. Filter (0,5 $\mu\text{m}$ )	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O- Gradient	1-Anthroylnitril (381 nm / 470 nm)	T-2: 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ HT-2: 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$	VISCONTI et al. (2005)
CAF + IAC (Flüssigei)	Phenomenex Luna <sup>®</sup> C <sub>18</sub> (3 $\mu\text{m}$ )	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O- Gradient	1-Anthroylnitril (381 nm / 470 nm)	T-2 + HT-2: 1 ng/ml LOQ = 5 ng/ml	MARAGOS (2006)

1-AN = 1-Anthroylnitril  
CAF = Charcoal-Aluminium-Florisil Säule  
CH<sub>3</sub>CN = Acetonitril  
CH<sub>3</sub>COOH = Essigsäure  
IAC = Immunaффinitätschromatographie  
LOQ = Bestimmungsgrenze  
MeOH = Methanol

### **3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN**

#### **3.1 Materialien und Geräte**

##### **3.1.1 Chemikalien und Biochemika**

Aceton (Riedel de Haën, 32201)

Acetonitril (Sigma-Aldrich, 34851)

Chloramin T Trihydrat (Merck, 8.18705.5000)

1-Anthroylcyanid (Wako, 017-12101)

Citronensäure-Monohydrat (Merck, 1.00244.5000)

CNBr-aktivierte Sepharose<sup>®</sup> 4B (Pharmacia Biotech, 71-7088-00)

4-Dimethylaminopyridin (Sigma, 115 K 3662)

Ethylacetat p.a. (Merck, 1.09623.2500)

Heptan (Fluka, 51745)

HT-2 Toxin (biopure, L-06472C)

Kalilauge 1,0 mol/l (Riedel de Haën, 35113)

Kaliumdihydrogenphosphat (Riedel de Haën, 30407)

Methanol (Fluka 65543)

Natriumcarbonat (Riedel de Haën, 31432)

Natrium-Caseinat (Sigma-Aldrich, C-8654)

Natriumchlorid (Riedel de Haën, 31434)

Natriumhydrogencarbonat (Riedel de Haën, 31437)

di-Natriumhydrogenphosphat (Riedel de Haën, 30427)

Schwefelsäure 95 – 97% (Riedel de Haën, 30743)

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

Toluol (Riedel de Haën, 32249)

Tween 20 (Sigma-Aldrich, P-1379)

T-2 Toxin (biopure, L-06472B)

Wasserstoffperoxid 30% (Merck, 1.07209.0250)

##### **3.1.2 Puffer und Lösungen**

Enzymimmuntest (EIA)

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

Casein-PBS-Lösung: 1% bzw. 3 % (w/v) Natrium-Caseinat in PBS

Citratpuffer: 0,21 mol/l mit Zusatz von 3,13 mmol/l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pH 3,95

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS): 0,013 mol/l Phosphatpuffer mit Zusatz von 0,12 mol/l Natriumchlorid, pH 7,3

Tetramethylbenzidin-Lösung (TMB): 0,021 mol/l 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in 1 ml Aceton und 9 ml Methanol

Substrat-Chromogen-Lösung: 20 Teile Citratpuffer mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zusatz und 1 Teil TMB-Lösung

Schwefelsäure: 1 mol/l

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

### Kopplung der monoklonalen Antikörper an CNBr-aktivierte Sepharose 4B

Blockierungspuffer: 0,1 mol/l Tris/HCl, pH 8,0

Kopplungspuffer: 0,1 mol/l Natriumhydrogencarbonat (pH 8,3) mit Zusatz von 0,5 mol/l NaCl

Waschpuffer 1: 0,1 mol/l Natriumacetatpuffer (pH 4,0) mit Zusatz von 0,5 mol/l NaCl

Waschpuffer 2: 0,1 mol/l Tris/HCl (pH 8,0) mit Zusatz von 0,5 mol/l NaCl

### **3.1.3 Immunreagenzien**

Kaninchen-anti-Maus-IgG-Antikörper (DakoCytomation, Z0259)

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

Schaf-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper

polyklonales Kaninchenantiserum gegen T-2 Toxin (ESGIN et al., 1989)

polyklonales Kaninchenantiserum gegen HT-2 Toxin

monoklonaler Mausantikörper (MAk; 3E2) gegen HT-2 Toxin (HACK et al., 1998)

Toxin-Enzymkonjugate: T-2-Hemisuccinat-Meerrettichperoxidase (T2-HS-HRP)

HT-2-Hemisuccinat-Meerrettichperoxidase (HT2-HS-HRP)

T-2-Carbonyldiimidazol-Meerrettichperoxidase (T2-C-HRP)

HT-2-Carbonyldiimidazol-Meerrettichperoxidase (HT2-C-HRP)

### 3.1.4 Geräte

Mikrotiterplattenlesegerät Sunrise Remote Control (Tecan)

Mikrotiterplattentaumelgerät (Heidolph)

Variable Pipetten 0,5 – 10 µl, 10 – 100 µl, 100 – 1000 µl (Eppendorf)

Variable Zwölfkanalpipette 30 – 300 µl (Eppendorf)

Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte mit der Software Ridasoft Win, Version 1.38 (r-Biopharm)

### 3.1.5 Sonstiges

Dialyseschläuche

Filterpapier: Nr. 596 ½, Ø 110 mm (Schleicher & Schuell)

Immunaффinitätschromatographiesäulen (MoBiTec)

Kühlzentrifuge (Multifuge 1 S-R, Heraeus)

Magnetrührer mit Heizeinheit (Arex)

Mehrfachmagnetrührgerät (ES 5, Janke & Kunkel)

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

Milli-Q Q-Gard 1 (Millipore)

Mixgerät mit Glasaufsätzen (Waring Blendor 8011)

pH Meter inoLab pH / Cond 720 (WTW)

Spektrophotometer UV-1602 (Shimadzu)

Ultraschallbad (RK 510 H, Bandelin)

Umlufttrockenschrank UT 12 (Heraeus, Kendro)

Vakuum-Rotationsverdampfer RVC 2-25 (Christ)

Vortex-Genie 2 (Scientific Industries)

## **3.2 Methodik und Ergebnisse**

Seit März 2006 wurden am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch der Tierärztlichen Fakultät München Lebensmittel im Rahmen des Forschungsauftrages „Verbesserung und Validierung der Analytik für Typ A Trichothecene (T-2 Toxin und HT-2 Toxin) sowie Vorkommen dieser Mykotoxine in Lebensmitteln des deutschen Marktes“ des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) auf T-2 Toxin und HT-2 Toxin untersucht. Ziele des Forschungsvorhabens waren zum einen die Etablierung und Validierung adäquater Analysensysteme für T-2 Toxin und HT-2 Toxin, zum anderen die Ermittlung der Belastung der Lebensmittel des deutschen Marktes mit diesen Toxinen. Schwerpunkte dieser Arbeit waren die Etablierung und Optimierung von Enzymimmuntests zum Nachweis der beiden relevanten Mykotoxine sowie der hierfür benötigten Extraktionsverfahren, und im Anschluss daran die Untersuchung einer repräsentativen Anzahl von Lebensmitteln.

### **3.2.1 Etablierung spezifischer Enzymimmuntests**

#### **3.2.1.1 Überprüfung der Immunreagenzien**

Im Hinblick auf die Etablierung spezifischer Enzymimmuntests zum Nachweis von T-2 und HT-2 Toxin wurden basierend auf den am Institut produzierten mono- (HACK et al., 1998) und polyklonalen Antikörpern und Toxin-Enzymkonjugaten (T2-HS-HRP, HT2-HS-HRP, T2-C-HRP und HT2-C-HRP) verschiedene EIA-Varianten überprüft. Hierbei wurden die optimalen Immunreagenzienkonzentrationen jeweils mittels Schachbretttitration bestimmt. Die bei der Optimierung der Analyseverfahren erzielten Ergebnisse sind in Tab. 5 zusammengefasst.

Prinzipiell konnte bei allen EIA-Systemen, bei denen die mittels 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI; XIAO et al., 1995) hergestellten Enzymkonjugate (T2-C-HRP, HT-2-C-HRP) Verwendung fanden, eine geringere Testsensitivität sowohl für den T-2 als auch den HT-2 Toxinnachweis im Vergleich zu den Hemisuccinat(HS)-Konjugaten (ESGIN et al., 1989; HACK et al., 1998) festgestellt werden. Das polyklonale Anti-T-2-Antiserum zeigte sogar überhaupt keine Reaktivität mit den C-HRPs. Bei Verwendung der monoklonalen Antikörper

und der HS-Konjugate konnte hingegen ein hochsensitives System zum Nachweis von T-2 Toxin realisiert werden. Die geringe Kreuzreaktivität (< 5 %) dieses EIA-Systems mit HT-2 Toxin war jedoch im Hinblick auf das Screening der Lebensmittel als besonders kritisch zu beurteilen.

Deswegen wurden weitere Anstrengungen zur Etablierung eines immunchemischen Summennachweissystems für T-2 und HT-2 unternommen. Hierbei zeigte sich, dass durch die Kombination eines polyklonalen HT-2 Antiserums und eines T-2-HS-HRP Konjugates (Herstellung analog zu ESGIN et al., 1989) ein hochsensitives EIA-System erstellt werden konnte, das den Nachweis der beiden Toxine im pg/ml-Bereich (Abb. 2) ermöglicht. Alle nachfolgenden Untersuchungen zum Summennachweis von T-2 und HT-2 Toxin wurden mit diesem EIA-System durchgeführt.

**Tabelle 5:** Kenndaten verschiedener EIA-Systeme zum Nachweis von T-2 und HT-2 Toxin

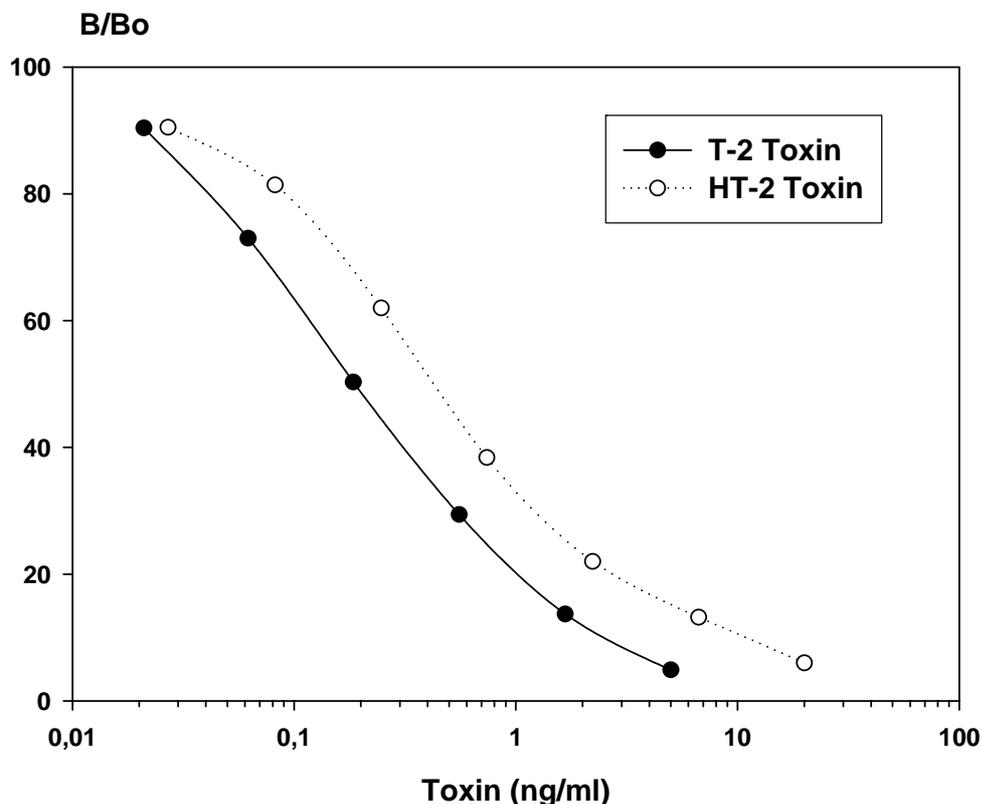
Antikörper/ Enzymkonjugat	Reaktivität	50 % Dosis (ng/ml)		Nachweisgrenze (ng/ml)	
		T-2 Toxin	HT-2 Toxin	T-2 Toxin	HT-2 Toxin
<i>polyklonales Anti-T-2 Antiserum</i>					
- T-2-HS-HRP	+	> 10	>10	n.a. <sup>1)</sup>	n.a. <sup>1)</sup>
- HT-2-HS-HRP	+	0,84	1,70	0,16	0,29
-T-2-C-HRP	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
-HT-2-C-HRP	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>polyklonales Anti-HT-2 Antiserum</i>					
- <b>T-2-HS-HRP</b>	<b>+</b>	<b>0,20</b>	<b>0,43</b>	<b>0,07</b>	<b>0,15</b>
- HT-2-HS-HRP	+	0,53	2,53	0,14	0,86
-T-2-C-HRP	+	1,60	5,00	0,40	0,90
-HT-2-C-HRP	+	7,60	21,10	2,45	7,40
<i>monoklonaler Anti-HT-2 Antikörper</i>					
- T-2-HS-HRP	+	0,15	4,30	0,08	1,20
- <b>HT-2-HS-HRP</b>	<b>+</b>	<b>0,12</b>	<b>4,50</b>	<b>0,05</b>	<b>1,20</b>
-T-2-C-HRP	+	0,25	5,30	0,10	1,30
-HT-2-C-HRP	+	0,31	9,30	0,15	3,50

<sup>1)</sup> nicht anwendbar

### 3.2.1.2 Enzymimmuntest zum Summennachweis von T-2 Toxin und HT-2 Toxin (EIA-Variante A)

#### 3.2.1.2.1 Durchführung

Zur Durchführung des Enzymimmuntests wurden Mikrotiterplatten mit affinitätschromatographisch gereinigten Schaf-anti-Kaninchen IgG beschichtet (5 µg/ml Bicarbonatpuffer; 100 µl/Kavität). Nach Absättigung mit 3 % Casein/PBS-Lösung und anschließendem Waschen wurde das polyklonale Anti-HT-2-Kaninchenserum (1:10.000 in PBS) zugegeben (100 µl/Kavität) und für 1 h inkubiert. Danach wurde gewaschen und pro Kavität 50 µl Standard- bzw. Probenlösung, sowie 50 µl Toxin-Enzym-Konjugat (T2-HS-HRP) in einer Verdünnung von 1:200.000 in 1 % Casein/PBS zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1 h wurde nochmals gewaschen und abschließend Substrat/Chromogen-Lösung hinzugefügt, die Farbentwicklung nach ca. 20 min mit 1 mol/l Schwefelsäure gestoppt und die Absorption bei 450 nm gemessen. Zur Auswertung wurden die für die jeweilige Toxinstandardkonzentration erhaltenen Extinktionswerte (B) prozentual zur Extinktion des antigenfreien Ansatzes ( $B_0$ ) gesetzt.



**Abbildung 2:** Standardkurven für T-2 und HT-2 Toxin in EIA-Variante A

**Tabelle 6:** Charakteristika der T-2-Standardkurven in EIA-Variante A (n = 30)

	50% Dosis (pg/ml)	B/B <sub>0</sub> bei 61,7 pg/ml in (%)
Mittelwert	198	73,1
Standardabweichung	25,2	2,92
Variationskoeffizient	12,7	3,99
Minimalwert	153	66,3
Maximalwert	261	79,4

### 3.2.1.2.2 Sensitivität

In Tab. 6 sind die bei der Erstellung von Standardkurven erzielten charakteristischen Kenndaten zusammengefasst. Hierfür wurden 30 an unterschiedlichen Tagen durchgeführte Tests ausgewertet. Die 50% Hemmungsdosis für T-2 Toxin lag durchschnittlich bei 198 pg/ml. Bei einer Toxinkonzentration von 61,7 pg T-2 Toxin/ml lag der erhaltene Extinktionswert durchschnittlich bei 73,1 % der Extinktion des antigenfreien Ansatzes. Die Nachweisgrenze, ausgedrückt als die dem 70%-Wert der Standardkurven entsprechende Toxinkonzentration lag für T-2 Toxin durchschnittlich bei 0,07 ng/ml, für HT-2 Toxin wurde eine Nachweisgrenze von 0,15 ng/ml ermittelt.

### 3.2.1.2.3 Spezifität

Zur Überprüfung der Spezifität des verwendeten polyklonalen Kaninchenantiserums wurde dessen Kreuzreaktion mit strukturverwandten Toxinanaloge (HT-2 Toxin, Acetyl-T-2 und T-2 Triol) ermittelt. Dazu wurden Standardkurven von jedem Toxin angefertigt und mit der T-2-Standardkurve verglichen. Nach Messung der 50%-Dosen wurde die relative Kreuzreaktion nach folgender Formel berechnet:

$$\text{relative Kreuzreaktion (\%)} = \frac{\text{50\%-Dosis T-2 Toxin in mol/l}}{\text{50\%-Dosis Testtoxin in mol/l}}$$

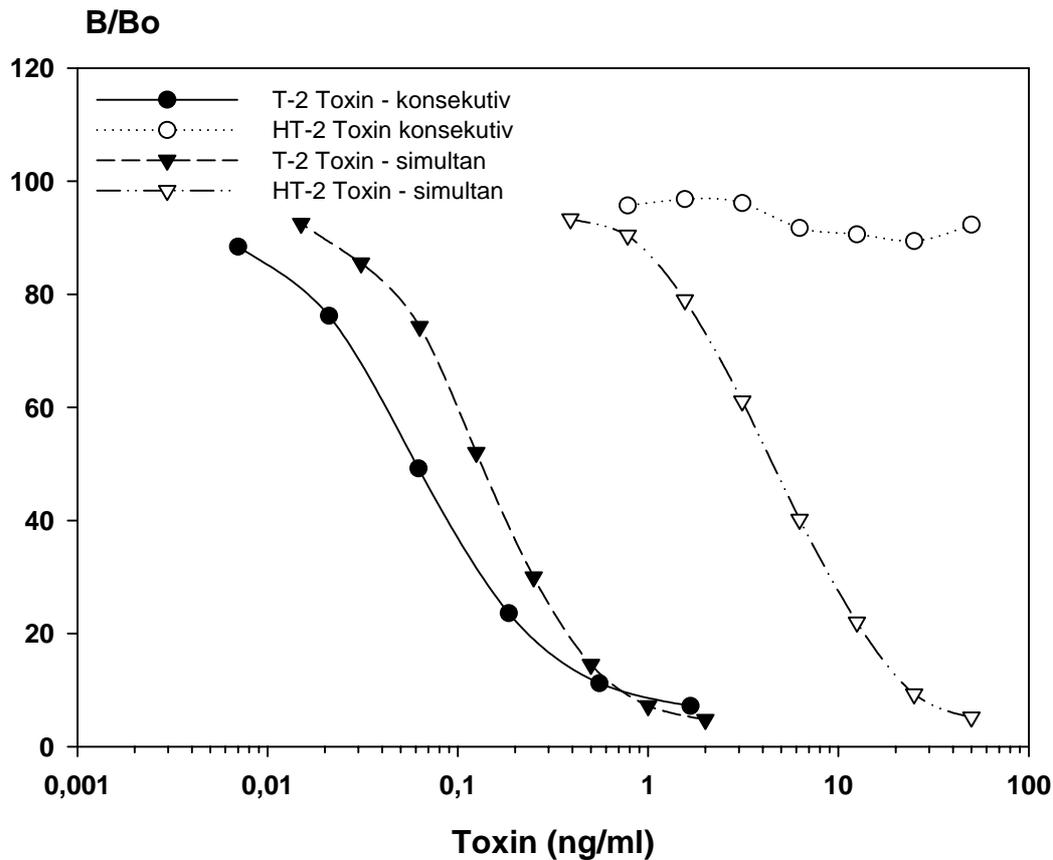
Die relative Kreuzreaktivität für HT-2 lag im Durchschnitt bei 44,5%, die für Acetyl-T-2 bei 61,5 %. Für T-2 Triol konnte eine durchschnittliche relative Kreuzreaktion von 4,92 % ermittelt werden.

### **3.2.1.3 Enzymimmuntest zum spezifischen Nachweis von T-2 Toxin (EIA-Variante B)**

Die hohe Spezifität des monoklonalen Antikörpers für T-2 Toxin (Tab. 5) war Anlass dafür, zu überprüfen, inwieweit durch Änderung des Testablaufs ein spezifischer Nachweis dieses Toxins zu realisieren ist. Hierbei wurde insbesondere die zeitlich getrennte Zugabe des freien (Standard) und des markierten Toxins (Enzymkonjugat) überprüft (konsequente Testanordnung).

#### **3.2.1.3.1 Durchführung**

Zur Durchführung des kompetitiven, direkten Enzymimmuntest mit konsekutiver Testanordnung (EIA-Variante B) wurden Mikrotiterplatten 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. Die Platten wurden dann mit einer 3 % Casein/PBS-Lösung abgesättigt, anschließend erfolgte die Zugabe des MAk 3E2 (25 ng/ml). Im nächsten Inkubationsschritt wurde in jede Kavität 100 µl Standard- oder Probenlösung [verdünnt in 10/90 (v/v) MeOH/PBS] gegeben. Die Platte wurde dann wieder gewaschen und ausgeklopft. Anschließend wurden in jede Kavität 100 µl HT-2-HS-HRP (1:75.000 in 1 % Casein/PBS) gegeben und für eine weitere halbe Stunde inkubiert. Abschließend wurde nochmals gewaschen und dann Substrat/Chromogen-Lösung hinzugefügt. Die Farbentwicklung wurde nach 10 – 20 min mit 1 mol/l Schwefelsäure gestoppt und die Absorption bei 450 nm gemessen.



**Abbildung 3:** Standardkurven für T-2 und HT-2 Toxin bei konsekutiver bzw. simultaner Testanordnung der EIA-Variante B

### 3.2.1.3.2 Sensitivität und Spezifität der EIA-Variante B

Die konsekutive Testanordnung führte dazu, dass im EIA nur mehr T-2 Toxin erkannt wurde, mit HT-2 konnte selbst bei Konzentrationen von 1000 ng/ml keine Hemmung induziert werden (Abb. 3). Gleiches gilt für Acetyl-T-2 und T-2 Triol. Des Weiteren konnte im Vergleich zur simultanen Testvariante auch eine Verbesserung der Sensitivität des EIA beobachtet werden.

Nach Auswertung von 30 an unterschiedlichen Tagen durchgeführten Tests ergab sich eine durchschnittliche 50%-Hemmungsdosis von 64,6 pg/ml. Die Nachweisgrenze (ermittelt wie

in 3.2.1.2.2) lag im Mittel bei 25 pg/ml. Die wichtigsten Charakteristika der Standardkurven sind in Tab. 7 aufgelistet.

**Tabelle 7:** Charakteristika der T-2-Standardkurven in EIA-Variante B (n = 30)

	50% Dosis (pg/ml)	B/B <sub>0</sub> bei 20,6 pg/ml in (%)
Mittelwert	64,6	77,9
Standardabweichung	9,38	4,75
Variationskoeffizient	14,5	6,1
Minimalwert	50,4	70,1
Maximalwert	87,1	88,4

### 3.2.2 Entwicklung und Etablierung geeigneter Extraktionsverfahren

#### 3.2.2.1 Orientierende Vorversuche

Im Rahmen früherer Untersuchungen war am Lehrstuhl bereits ein Extraktionsverfahren für T-2 und HT-2 Toxin entwickelt worden. Dabei wurden 2 g Probe mit 10 ml eines MeOH/A. dest-Gemisches (70/30 v/v) extrahiert und 2 ml des Rohextraktes anschließend mit 3 ml Dichlormethan ausgeschüttelt. Die so erhaltene organische Phase wurde im Anschluss daran bei ca. 39 °C eingedampft, der Rückstand in 2 ml MeOH/A. dest (50/50) gelöst und mit 1,5 ml Heptan entfettet. Um die Probe in den EIA einsetzen zu können, musste sie abschließend noch 1:5 mit PBS verdünnt werden. Dies resultierte in einem durch die Extraktion bedingten Probenverdünnungsfaktor von 25.

Für die vorliegende Arbeit wurde dieses Extraktionsverfahren im Hinblick auf zwei Aspekte modifiziert:

Zum einen wurde versucht das toxikologisch bedenkliche Dichlormethan durch weniger toxische Lösungsmittel wie z. B. Ethylacetat zu ersetzen. Hierfür wurden Rohextrakte mit unterschiedlichen Toxingehalten zweimal mit je 3 ml Ethylacetat ausgeschüttelt, die

organischen Phasen abgenommen und bei 55 °C eingedampft. Bei den Analysen der Endextrakte zeigte sich, dass durch diese Modifikation der Probenaufarbeitung keine größeren Verluste beim Clean-up auftraten (Tab. 8).

Die zweite Modifikation hatte zum Ziel, den Probenverdünnungsfaktor zu minimieren. Dazu wurden zur Rekonstitution des eingedampften Extraktes unterschiedliche Methanol-PBS-Gemische getestet. Der Einsatz von 2 ml MeOH/PBS (10/90 v/v) zur Rekonstitution der Probe ermöglichte es, den Endextrakt anschließend direkt in den EIA einzusetzen. Der Probenverdünnungsfaktor (F) konnte somit von F 25 auf F 5 reduziert werden. Tab. 8 zeigt die Analyseergebnisse, die mit den unterschiedlichen Probenaufbereitungsverfahren bei zwei natürlich kontaminierten Haferproben erhalten wurden.

**Tabelle 8:** Vergleich der unterschiedlichen Probenaufbereitungsverfahren

Probe	Toxingehalt ohne Aufreinigung des Rohextraktes <sup>1)</sup>	Rekonstitution des eingedampften Extraktes in 2 ml	Toxingehalt nach Aufreinigung mittels Dichlormethan	Toxingehalt nach Aufreinigung mittels Ethylacetat
Schwarzhafer	34,3 µg/kg	10% MeOH/PBS	15,3 µg/kg	19,7 µg/kg
		50% MeOH/PBS	19,9 µg/kg	18,8 µg/kg
Gelbhafer	118 µg/kg	10% MeOH/PBS	86,3 µg/kg	64,5 µg/kg
		50% MeOH/PBS	82,7 µg/kg	73,4 µg/kg

<sup>1)</sup> Analyse des Rohextraktes mittels EIA resultiert in einer Überschätzung des tatsächlichen Toxingehaltes

### **3.2.2.2 Etablierung eines auf Flüssig-Flüssig-Verteilungschromatographie basierendem Extraktionsverfahren für feste Probenmatrices**

Für die Untersuchungen zum Vorkommen von T-2 und HT-2 Toxin in Lebensmitteln (3.2.4) wurden die Proben anhand des Codes der Zentralen Erfassungs- und Bewertungsstelle für Umweltchemikalien des Bundesgesundheitsamtes (ZEBS-Codierung) in verschiedene Produktobergruppen eingeteilt. Die im Folgenden beschriebenen Arbeiten zur Validierung der Extraktionsverfahren konzentrierten sich im Wesentlichen auf die wichtigsten Produktobergruppen. Sowohl einfache (Getreide, Mehle, Teigwaren, etc.), als auch komplexe (Säuglings- und Kleinkindernahrung, Frühstückszerealien, feine Backwaren) Probenmatrices wurden mit Hilfe eines Mixgerätes zu einem feinen Pulver zerkleinert und bis zur weiteren Verwendung in verschließbaren Plastikbehältern bei Raumtemperatur gelagert.

Routinemäßig wurde das folgende optimierte Verfahren verwendet:

5 g homogenisierte Probe wurden mit 25 ml MeOH/A. dest (70/30 v/v) 30 min auf dem Magnetrührer extrahiert, anschließend zentrifugiert (2.000 x g, 10 °C, 15 min) und filtriert. Für das Clean-up des Rohextraktes über Flüssig-Flüssig-Verteilungschromatographie wurden 2 ml des Filtrats mit 2 ml A. dest und 3 ml Ethylacetat gemischt und nach Zentrifugation (2.000 x g bei 4 °C für 15 min) des Ansatzes die organische Phase entnommen. Dieses Procedere wurde einmal wiederholt, anschließend wurden die abgenommenen Ethylacetat-Phasen bei 55 °C eingedampft. Der Rückstand wurde schließlich in 2 ml MeOH/PBS (10/90 v/v) aufgenommen und mit 1,5 ml Heptan entfettet. Die fertig aufbereiteten Proben wurden dann in verschiedenen Verdünnungsstufen - angelegt in MeOH/PBS (10/90 v/v) - in die entsprechenden EIAs (3.2.1.1 und 3.2.1.2) eingesetzt.

Unter Berücksichtigung der Nachweisgrenzen der EIA-Varianten (3.2.1.2.2 und 3.2.1.3.2), des durch die Extraktion bedingten Probenverdünnungsfaktors und der Wiederholbarkeit des Analyseverfahrens ergaben sich somit T-2/HT-2-Nachweisgrenzen für die untersuchten Proben von 0,5 µg/kg (EIA-Variante A) bzw. 0,2 µg/kg (EIA-Variante B).

### 3.2.2.2.1 Bestimmung der Wiederfindungsraten für T-2 Toxin

Die Wiederfindungsraten für T-2 Toxin in festen Probenmatrices wurden im Bereich von 1 – 20 µg/kg anhand von dotierten Proben (Weizenmehl, Hartweizennudeln, Kleinkindernahrung) überprüft. Hierfür wurden die Proben mit den entsprechen Toxinzusätzen in Methanol versetzt und eine halbe Stunde stehen gelassen. Anschließend wurden die Proben mit dem unter 3.2.2.2 skizzierten Verfahren extrahiert und über Flüssig-Flüssig-Verteilungschromatographie aufgereinigt. Die fertig aufbereiteten und entfetteten Proben wurden in verschiedenen Verdünnungsstufen (in MeOH/PBS 10/90 v/v) in den T-2 spezifischen EIA eingesetzt.

Die Wiederfindungsraten für T-2 Toxin in allen untersuchten Proben lagen zwischen 75 und 88,6 %, die durchschnittliche Wiederfindungsrate betrug 81,7 %. Bei den Untersuchungen der dotierten Weizenmehlproben konnte eine durchschnittliche Wiederfindungsrate von 83,3 % (75 – 88,6 %) ermittelt werden. Ähnliche Größenordnungen von 80,3 bzw. 81,1 % wurden bei der Untersuchung von künstlich kontaminierten Hartweizennudeln bzw. Kleinkindernahrung erhalten (Tab. 9). Damit erfüllt das Verfahren die in der VO (EG) Nr. 401/2006 geforderten Leistungskriterien, nach denen die Wiederfindungsraten im Bereich von 60 bis 130 % liegen sollen. Auch die Wiederholbarkeit des Verfahrens ist gewährleistet, der durchschnittliche Variationskoeffizient betrug 8,58 %.

**Tabelle 9:** Wiederfindungsraten für T-2 Toxin in verschiedenen Lebensmittelmatrices

Probe	Toxinzusatz (µg/kg)	Anzahl	Mittelwert (µg/kg)	VK (%)	Ø WFR(%)
Weizenmehl (ZEBS-Code 1601xx)	1	5	0,86	12,4	86,4
	5	5	4,43	4,8	88,6
	20	7	15,0	4,0	75,0
Hartweizennudeln (ZEBS-Code 22xxxx)	5	5	4,43	8,8	83,0
	20	5	15,5	7,9	77,5
Kleinkindernahrung (ZEBS-Code 48xxxx)	2	10	1,51	15,9	76,5
	5	5	4,28	9,3	85,7
	20	7	16,2	5,5	81,1

VK = Variationskoeffizient

WFR = Wiederfindungsrate

Da bei haferflockenhaltigen Frühstückszerealien (ZEBS-Code-Bereich 161xxx) keine negativen Proben verfügbar waren, wurde für diese Warengruppe ein Aufstockungsversuch durchgeführt. Die Proben wurden wie oben beschrieben mit T-2 im Bereich von 5 – 20 µg/kg künstlich kontaminiert und entsprechend aufbereitet, bevor sie in den EIA eingesetzt wurden. Abschließend wurde die Ausgangskonzentration von den Messergebnissen subtrahiert.

Die Wiederfindungsrate wurde anhand folgender Formel ermittelt:

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

Auch für diese Probenmatrix bewährte sich das überprüfte Extraktionsverfahren, die Analyseergebnisse sind in Tab. 10 zusammengefasst. Die nach Abzug der Ausgangskontamination erhaltenen Wiederfindungsraten lagen durchschnittlich bei 97,6 %, der Variationskoeffizient betrug 3,72 %.

**Tabelle 10:** Wiederfindungsraten für T-2 Toxin in Frühstückszerealien (ZEBS-Code 161xxx).  
Die Ausgangskontamination der Probe lag bei  $1,09 \pm 0,22$  µg/kg und wurde für die Ermittlung der Wiederfindungsraten von den Messergebnissen subtrahiert.

Toxinzusatz (ng/g)	Anzahl	Mittelwert (ng/g)	VK (%)	Ø WFR(%)
5	3	5,00	4,23	100
10	3	9,64	6,05	96,4
20	3	19,3	0,88	96,5

VK = Variationskoeffizient

WFR = Wiederfindungsrate

### 3.2.2.2 Bestimmung der Wiederfindungsraten für HT-2 Toxin

Um die Wiederfindungsraten für HT-2 zu bestimmen, wurden die Proben (Hartweizennudeln, Kleinkindernahrung) artifiziert mit HT-2 Toxin (2 – 18 µg/kg) kontaminiert, eine halbe Stunde stehen gelassen und danach ebenfalls nach 3.2.2.2 extrahiert, aufgereinigt, entfettet und verdünnt. Anschließend wurden die Proben in den EIA (Variante A) eingesetzt.

Im untersuchten Kontaminationsbereich lagen die ermittelten Wiederfindungsraten zwischen 85,9 und 103,5 % (Tab. 11), die durchschnittliche Wiederfindungsrate betrug 93,2 %. Die Wiederfindungsraten für Hartweizennudeln (ZEBS-Code 22xxxx) lagen im Bereich von 85,9 bis 93,3 %, die für Kleinkindernahrung (ZEBS-Code 48xxxx) bei 88,9 bis 103,5 %. Die Variationskoeffizienten betrugen 5,88 bis 12,5 %, die Wiederholbarkeit des Verfahrens auch bei niedrigen Konzentrationsniveaus ist somit gewährleistet.

**Tabelle 11:** Wiederfindungsraten für HT-2 Toxin in verschiedenen Lebensmittelmatrices

Probe	Toxinzusatz (µg/kg)	Anzahl	Mittelwert (µg/kg)	VK (%)	Ø WFR (%)
Hartweizennudeln (ZEBS-Code 22xxxx)	2	3	1,87	5,88	93,3
	6	3	5,31	10,2	87,1
	18	3	15,5	12,5	85,9
Kleinkindernahrung (ZEBS-Code 48xxxx)	2	4	2,07	7,25	103,5
	6	3	5,92	9,12	98,7
	18	4	16,0	7,94	88,9

VK = Variationskoeffizient

WFR = Wiederfindungsrate

### **3.2.2.3 Entwicklung und Etablierung eines immunaffinitätschromatographischen Extraktionsverfahrens**

Zur Absicherung der mit dem oben skizzierten Verfahren (3.2.2.2) gewonnenen Ergebnisse wurde ein weiteres, auf Immunaffinitätschromatographie basierendes Extraktionsverfahren entwickelt und etabliert.

Die Immunaffinitätschromatographie (IAC) beruht auf der spezifischen, reversiblen Wechselwirkung zwischen dem zu isolierenden Antigen (Analyten) und dem an eine feste Trägersubstanz gebundenen spezifischen Antikörper (Immunosorbens). Während der Passage des Probenextraktes durch die Säule wird der Analyt durch das Immunosorbens (feste Phase) gebunden, unerwünschte Probenbestandteile passieren die Säule. Durch Änderung der mobilen Phase kann anschließend eine Dissoziation des Antigen-Antikörper-Komplexes induziert werden (Elution).

#### **3.2.2.3.1 Kopplung von Antikörpern an CNBr-aktivierte Sepharose 4B**

Zur Herstellung der Immunaffinitätssäulen wurde der monoklonale Antikörper HT2 I MAK 3E2 über Nacht gegen Kopplungspuffer (3.1.2) dialysiert und am nächsten Morgen die Konzentration des Antikörpers bei 280 nm im Photometer bestimmt. Pro g Gel wurden 10 mg Antikörper gekoppelt. Direkt vor der Kopplung wurden 2 g CNBr-aktivierte Sepharose 4B in ca. 100 ml HCl (1 mmol/l) suspendiert und auf eine Filternutsche überführt, an die über eine druckluftbetriebene Vakuumpumpe ein Unterdruck angelegt wurde. Das Gel wurde dann 15 Minuten lang mit HCl (1 mmol/l) und anschließend mit ca. 100 ml Kopplungspuffer gewaschen. Nach Verschluss der Nutsche und Absetzen des Gels wurde möglichst viel Überstand mit einer Pasteurpipette abgenommen und anschließend die gegen Kopplungspuffer dialysierte Antikörperlösung in doppeltem Gelvolumen (14 ml) zugegeben. Dieser Ansatz wurde für 45 Minuten auf einem Taumler inkubiert, wobei das Gel mehrmals resuspendiert wurde. Zur Kontrolle der Kopplung wurde danach ca. 1 ml Überstand mit einer Pasteurpipette entnommen und der Proteingehalt photometrisch bei 280 nm bestimmt. Bei einer Extinktion von  $< 0,1$  wurde die Kopplung beendet und das Gel zur Entfernung nicht kovalent gebundener MAK's zuerst mit 200 ml Kopplungspuffer und anschließend mit 100 ml Blockierungspuffer (3.1.2) gewaschen. Noch vorhandene aktive Gruppen des Gels wurden danach durch zweistündige Inkubation auf dem Taumler in Blockierungspuffer deaktiviert.

Im Anschluss daran wurde das Gel dreimal mit jeweils 200 ml Waschpuffer 1 und 2 (3.1.2) im Wechsel und abschließend mit ca. 100 ml PBS mit Zusatz von 0,09 %  $\text{NaN}_3$  gewaschen. Das so hergestellte Immunosorbens wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

### **3.2.2.3.2 Ermittlung der Antigenbindungskapazität**

Zur Ermittlung der Funktionalität und Antigenbindungskapazität des hergestellten Immunosorbens wurden 100  $\mu\text{l}$  Gel in eine Säule (MoBiTec) gefüllt und mit PBS äquilibriert. Anschließend wurden 20 ml einer dotierten Probe [50 ng T-2 Toxin/ml MeOH/PBS (10/90 v/v)] aufgetragen und der Probendurchlauf fraktioniert aufgefangen. Nach Spülen der Säule mit MeOH/PBS (10/90 v/v) wurde gebundenes Toxin mit Methanol eluiert. Alle Fraktionen, Spüldurchläufe und Eluat wurden mittels simultanem, direkt-kompetitivem EIA (EIA-Variante A) analysiert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 24 ml Immunosorbens in drei verschiedenen Kopplungsansätzen hergestellt. Die mittels EIA bestimmten Antigenbindungskapazitäten der Immunosorbentien lagen bei 848 ng, 837 ng bzw. 792 ng T-2 Toxin pro 100  $\mu\text{l}$  Gel, dies entspricht durchschnittlich 46,4 % der stöchiometrisch ermittelten theoretischen Kapazität. Gebundenes Toxin konnte vollständig mit 3 ml Methanol eluiert werden.

### **3.2.2.3.3 Untersuchung von Lebensmitteln**

Zur Untersuchung von Lebensmitteln wurden 5 g Probe mit 25 ml MeOH/A. dest (70/30) 30 Minuten auf dem Magnetrührer extrahiert, im Anschluss daran zentrifugiert (2 000 x g, 10 °C, 15 min) und filtriert. Ein Aliquot des Filtrats (5 ml) wurde mit 20 ml PBS gemischt und dann langsam auf eine mit 100  $\mu\text{l}$  Gel beschickte Säule aufgetragen. Anschließend wurde zur Entfernung unspezifisch gebundener Extraktbestandteile die Säule mit 5 ml MeOH/PBS (10/90) und 5 ml A. dest gewaschen. Vor der Elution der gebundenen Toxine mit 3 ml Methanol wurde überschüssige Flüssigkeit durch Durchpressen von Luft vollständig aus der Säule entfernt. Das Eluat wurde abschließend eingedampft und der Rückstand in 2 ml MeOH/PBS (10/90) aufgenommen. Die fertig aufbereitete Probe wurde in MeOH/PBS

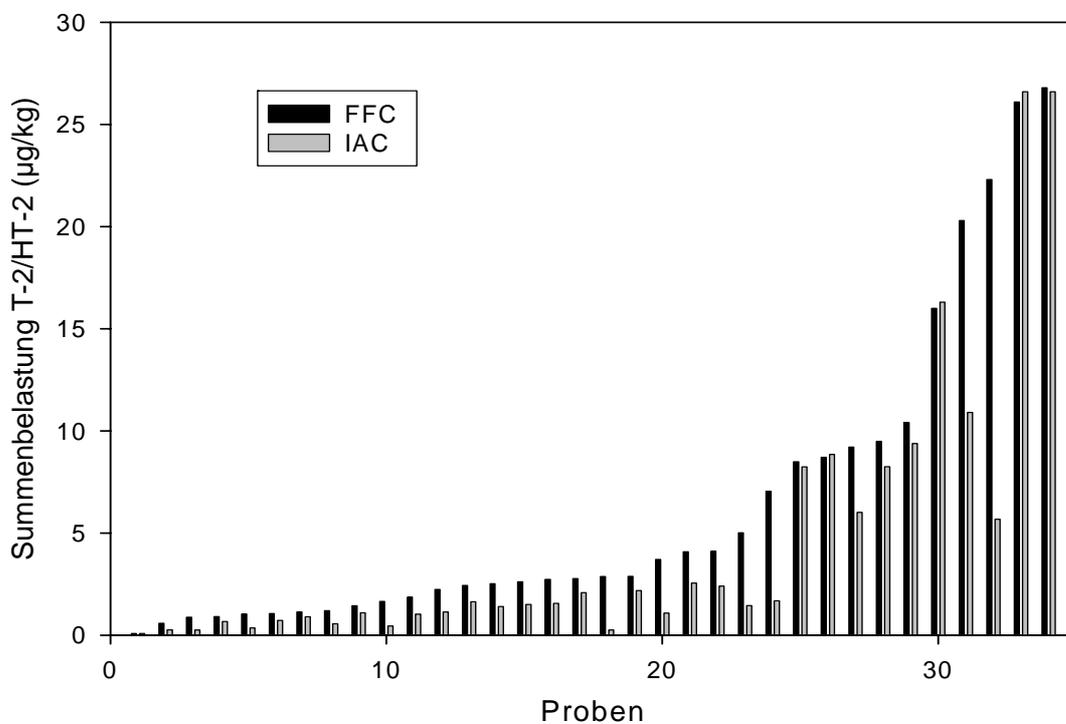
(10/90) verdünnt und die verschiedenen Verdünnungsstufen in die beiden EIA-Varianten eingesetzt.

In orientierenden Versuchen, bei denen künstlich mit T-2 bzw. HT-2 Toxin kontaminierte Rohextrakte verwendet wurden, konnte gezeigt werden, dass mit diesem Verfahren die beiden Mykotoxine zuverlässig angereichert werden konnten. Die Wiederfindungsraten lagen bei > 80 %, im Probendurchlauf der Säulen war kein Toxin nachweisbar (Ergebnisse nicht dargestellt). Detailliertere Untersuchungen (n = 2) wurden anhand von artifiziell mit HT-2 Toxin (2 – 18 µg/kg) kontaminierten Weizenmehl-, Hartweizennudel- und Kleinkindernahrungsproben durchgeführt. Die durchschnittliche Wiederfindungsrate für HT-2 lag bei den Hartweizennudeln (ZEBS-Code 22xxxx) bei 89,6 % (87,5 – 91,7 %). Für Kleinkindernahrung (ZEBS-Code 48xxxx) konnte eine durchschnittliche Wiederfindungsrate von 91,1 % (88,7 – 93 %), für Weizenmehl (ZEBS-Code 1601xx) eine durchschnittliche Wiederfindungsrate von 76,6 % (73,3 – 78,5 %) ermittelt werden.

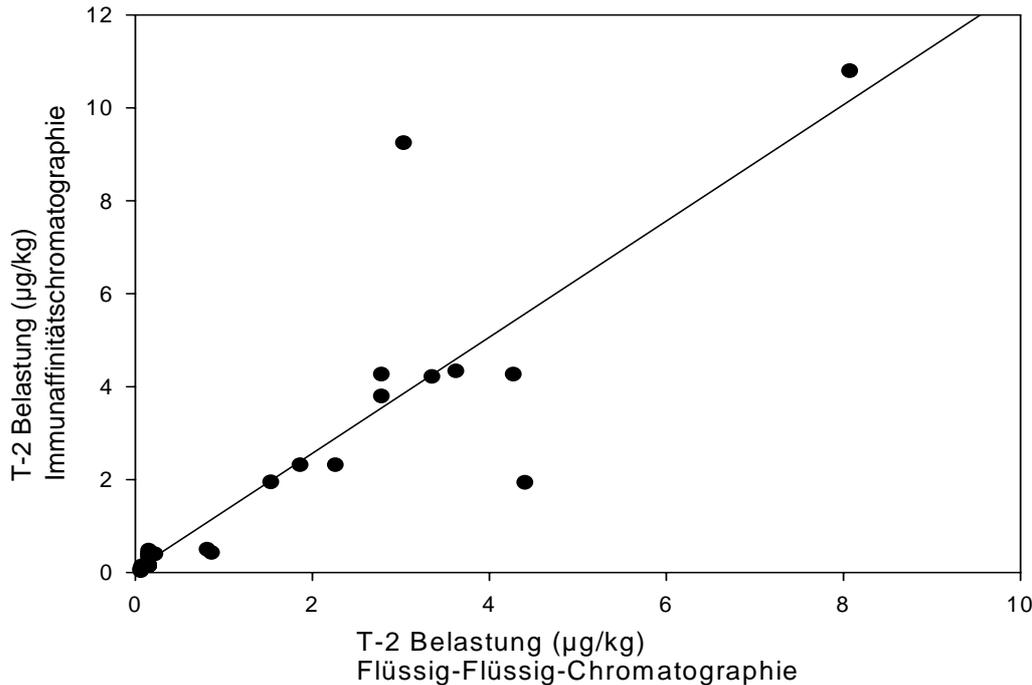
#### **3.2.2.3.4 Vergleichende Untersuchungen zu den Extraktionsverfahren**

Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen, wurden Rohextrakte von natürlich kontaminierten Proben sowohl mittels Flüssig-Flüssig-Chromatographie als auch mittels IAC gereinigt und im Anschluss daran entweder mit EIA-Variante A (3.2.1.2) (n = 34) oder EIA-Variante B (3.2.1.3) (n = 31) analysiert.

Es zeigte sich, dass die beiden Clean-up-Verfahren sehr gut miteinander vergleichbare Analysenergebnisse lieferten (Abb. 4 und 5). Bei Verwendung der EIA-Variante A lag der Korrelationskoeffizient bei 0,90, die Geradengleichung lautete  $y = 0,82 x - 0,64$ . Der Kontaminationsbereich der Proben lag zwischen < 0,5 und 26,8 µg/kg. Auch für die T-2 Belastung konnte eine sehr gute Korrelation der beiden Aufarbeitungsverfahren erzielt werden. Für die mittels EIA-Variante B erzielten Ergebnisse betrug der Korrelationskoeffizient 0,89 (Abb. 5), die nachweisbaren T-2 Toxin-Konzentrationen lagen zwischen < 0,2 und 8,07 µg/kg.



**Abbildung 4:** Vergleichende Darstellung der Untersuchungsergebnisse von Extrakten natürlich kontaminierter Proben ( $n = 34$ ), aufbereitet über Flüssig-Flüssig-Chromatographie (FFC) bzw. Immunaffinitätschromatographie (IAC). In den Endextrakten wurde die Summenbelastung (T-2/HT-2 Toxin) mittels EIA-Variante A bestimmt.



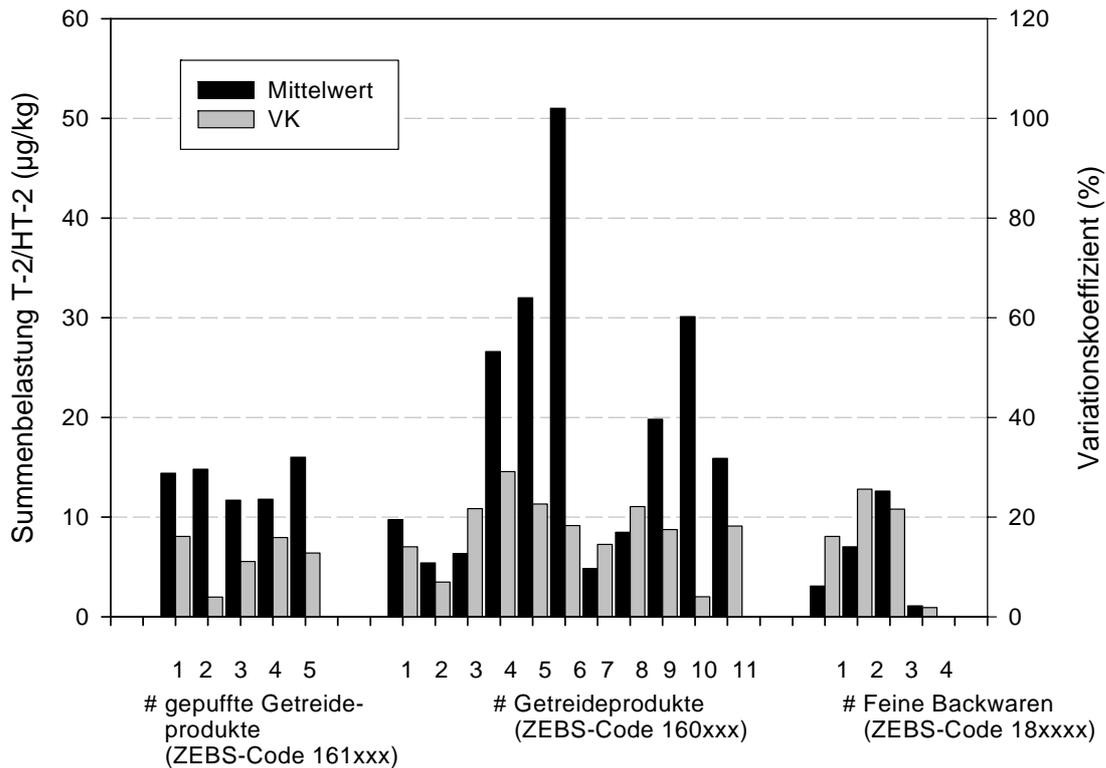
**Abbildung 5:** Korrelation zwischen den nach FFC- bzw. IAC-Aufarbeitung nachweisbaren T-2 Toxinbelastungen (EIA Variante B) von natürlich kontaminierten Proben ( $n = 31$ ). Die Geradengleichung lautet:  $y = 1,25 x + 0,06$  (Korrelationskoeffizient: 0,89;  $r^2 = 0,78$ ).

### 3.2.3 Validierung der Nachweisverfahren

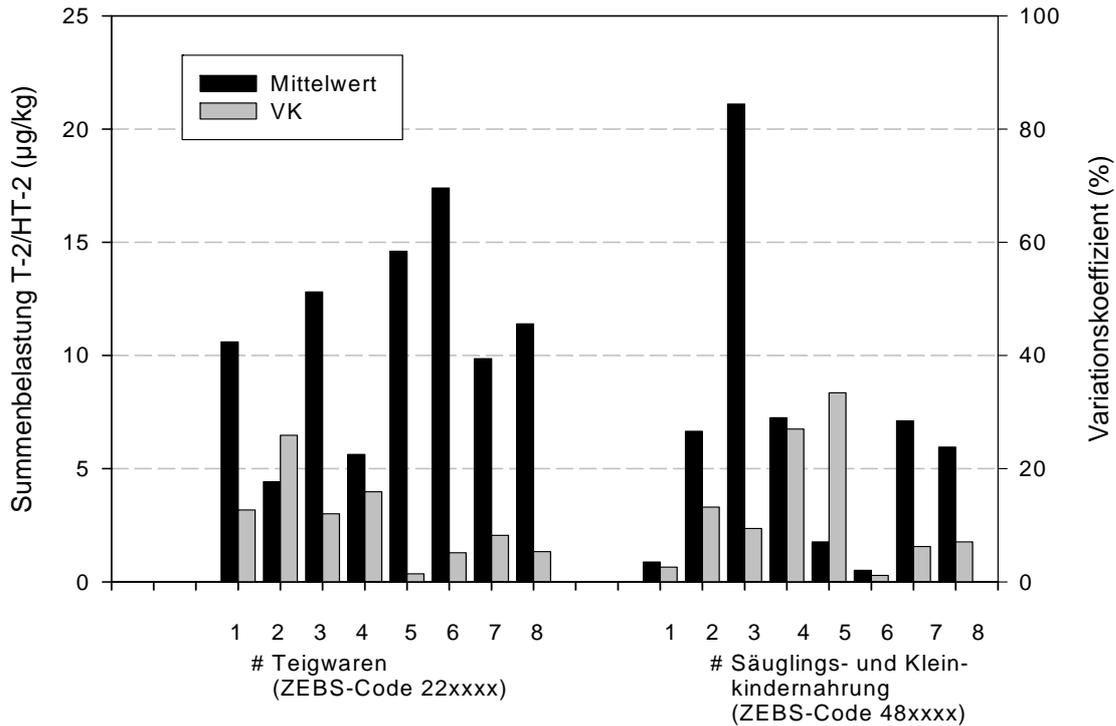
#### 3.2.3.1 Laborinterne Validierung

Um die Wiederholbarkeit des Verfahrens weiter zu untermauern, wurden einige natürlich kontaminierte Proben verschiedener Produktobergruppen (ZEBS-Codierung) mehrfach untersucht (Abb. 6 - 8). Hierfür wurden die Proben an mindestens drei verschiedenen Tagen extrahiert und analysiert. Bei der Auswahl der Proben wurde darauf geachtet, den relevanten Konzentrationsbereich abzudecken und für jede verwendete Produktobergruppe eine repräsentative Probenanzahl zu untersuchen. Die Mittelwerte der mehrfach untersuchten Proben lagen bei der EIA-Variante A zwischen 0,51 µg/kg und 51,0 µg/kg, die T-2-Mittelwerte (EIA B) zwischen 0,31 µg/kg und 8,92 µg/kg. Nach Untersuchung von insgesamt 36 Proben ergab sich für EIA-Variante A ein durchschnittlicher Variationskoeffizient von

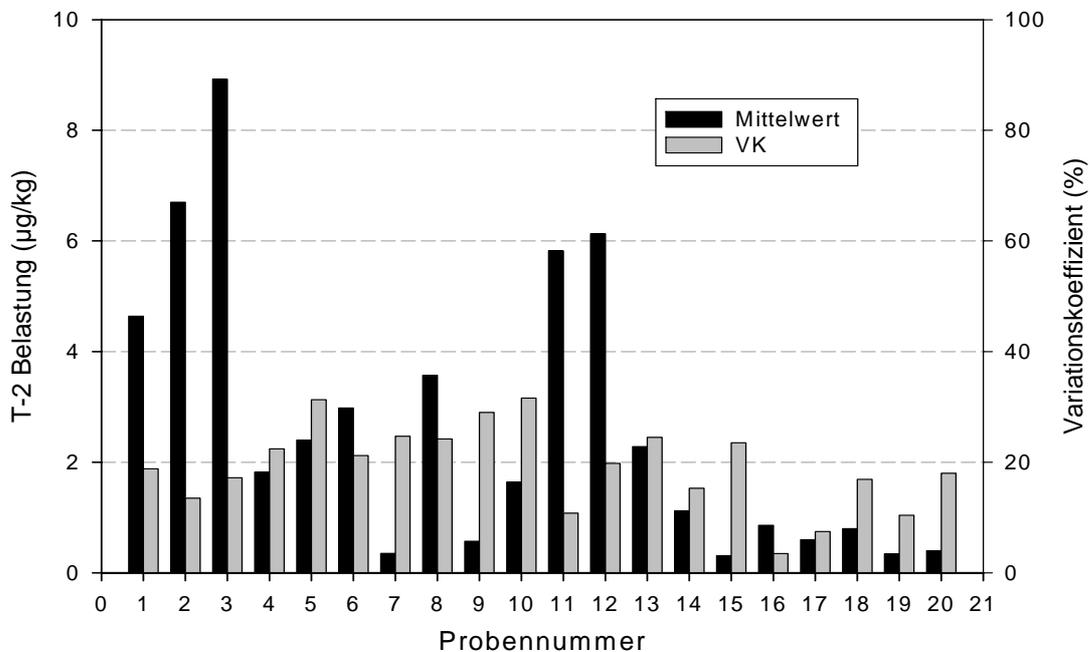
14,2 % (Bereich von 1,14 bis 33,4 %). Bei der Untersuchung von 20 Proben mittels EIA-Variante B lagen die Variationskoeffizienten zwischen 3,49 und 31,6 %, der durchschnittliche Variationskoeffizient betrug 19,8 %. Die höheren Schwankungen traten v. a. bei niedrig kontaminierten Proben auf.



**Abbildung 6 :** Analysenergebnisse, die bei der Mehrfachuntersuchung verschiedener natürlich kontaminierter Getreideprodukte, gepuffter Getreideprodukte bzw. feiner Backwaren mit EIA-Variante A erhalten wurden



**Abbildung 7 :** Analysenergebnisse, die bei der Mehrfachuntersuchung verschiedener natürlich kontaminierter Teigwaren bzw. Säuglings- und Kleinkindernahrung mit EIA-Variante A erhalten wurden

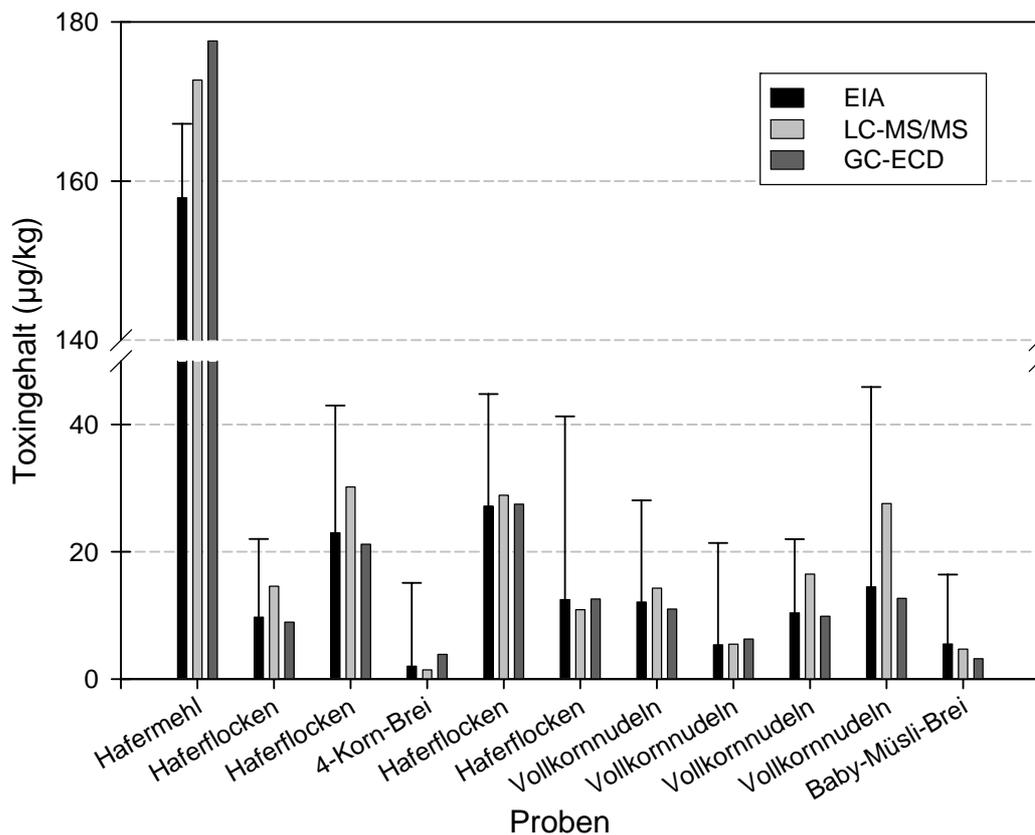


**Abbildung 8 :** Analysenergebnisse, die bei der Mehrfachuntersuchung verschiedener natürlich kontaminierter Proben im T-2 spezifischen EIA erhalten wurden

### 3.2.3.2 Laborvergleichsuntersuchungen

Innerhalb des Forschungsprojektes, an dem noch vier weitere Labors teilnahmen, wurden in regelmäßigen Abständen Laborvergleichsuntersuchungen durchgeführt, um die Vergleichbarkeit der verschiedenen Methoden und die Reproduzierbarkeit des EIA-Verfahrens in den beteiligten Labors zu überprüfen (Abb. 9).

In den fünf beteiligten Labors wurden verschiedene Analyseverfahren verwendet: Vier Labors setzten das am Lehrstuhl entwickelte EIA-Verfahren zum Summennachweis von T-2 und HT-2 Toxin ein, eines davon zusätzlich eine GC-ECD Methode; ein weiteres Labor untersuchte die Proben mittels LC-MS/MS.



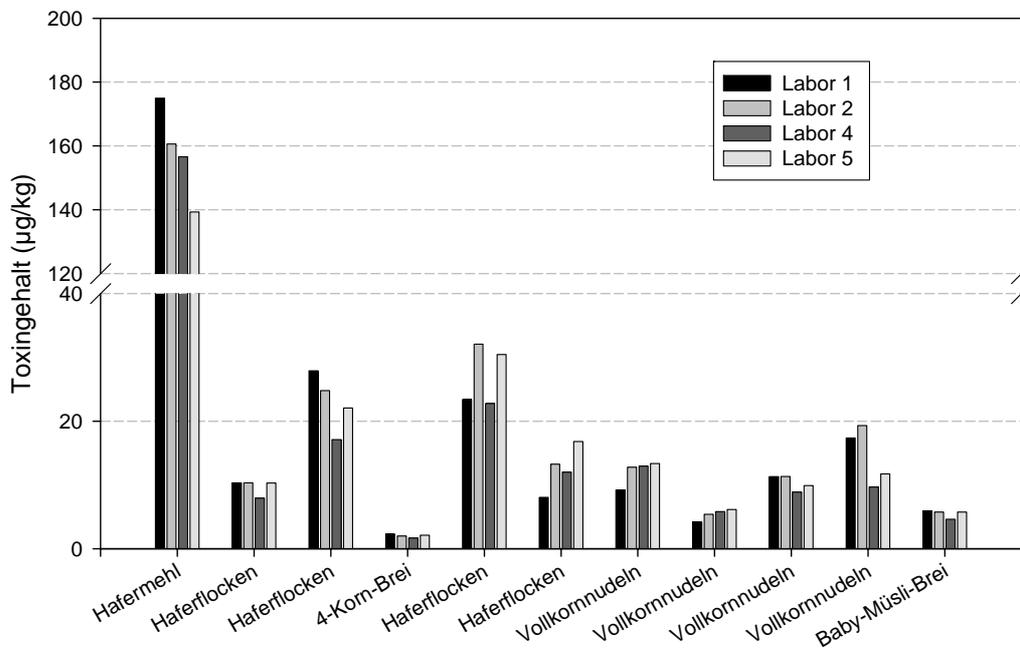
**Abbildung 9 :** Vergleichende Darstellung der mit unterschiedlichen Analyseverfahren ermittelten Toxinbelastung von 11 Lebensmittelproben

Bei der Auswahl der Proben wurde darauf geachtet, dass der gesamte relevante Konzentrationsbereich (Mittelwerte zwischen 2,02 und 158 µg/kg im Summennachweis)

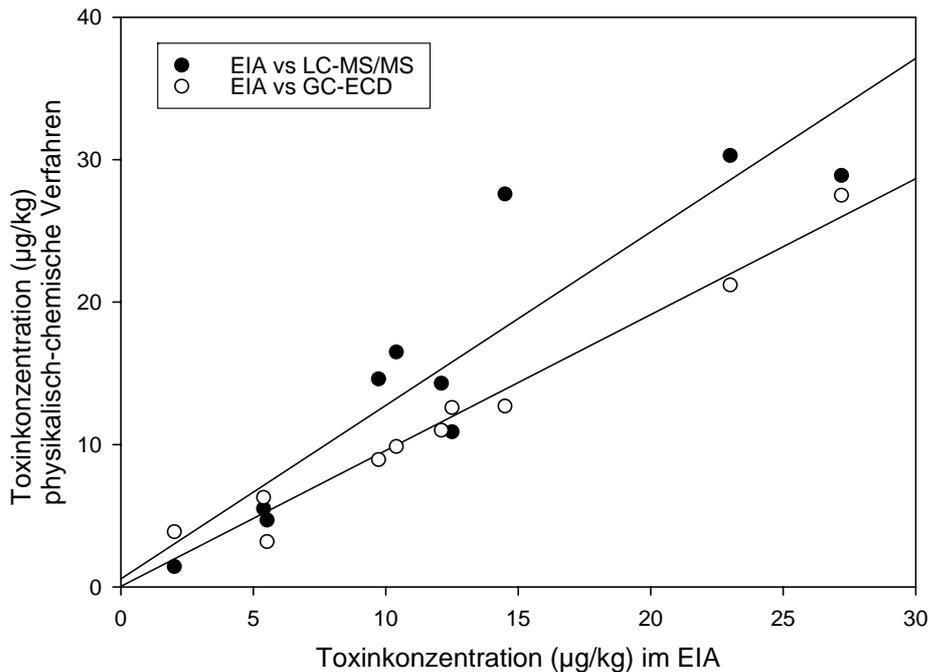
abgedeckt wurde und dass Muster aller relevanten Probenmatrices miteinbezogen wurden. Jeder Projektteilnehmer bekam die Proben ohne Angaben des Toxingehaltes zugeschickt und untersuchte sie im Doppelansatz (Blindstudie).

Es zeigte sich, dass die EIA-Ergebnisse der verschiedenen Labors, unabhängig von der Probenmatrix, sehr gering divergierten (Abb. 10). Die relativen Standardabweichungen, berechnet aus den unter Reproduzierbarkeitsbedingungen ermittelten Ergebnissen,  $RSD_R$ , lagen zwischen 9,3 und 31,4 %. Für alle elf untersuchten Proben ergab sich eine durchschnittliche  $RSD_R$  von 17 %. Die besten Ergebnisse wurden erwartungsgemäß bei einem hoch kontaminierten internen Referenzhafer erreicht ( $RSD_R$  der EIA-Ergebnisse 9,3 % bzw. 8,92 % bei Berücksichtigung aller Ergebnisse). Doch auch in den niedrigen Konzentrationsbereichen konnten sehr gute Ergebnisse erzielt werden, bei der am geringsten belasteten Probe (Mittelwert 2,02  $\mu\text{g}/\text{kg}$  im Summennachweis) lag die  $RSD_R$  bei 13,1 %.

Auch beim Vergleich des immunchemischen Verfahrens mit den physikalisch-chemischen Verfahren zeigte sich, dass die Ergebnisse sehr gut miteinander korrelierten. Der Vergleich von EIA und GC-ECD resultierte in einem Korrelationskoeffizienten von 0,99, beim Vergleich von EIA und LC-MS/MS lag der Korrelationskoeffizient bei 0,91 (Abb. 11).



**Abbildung 10:** Vergleichende Darstellung der in den verschiedenen Labors erzielten EIA-Ergebnisse bei der Untersuchung natürlich kontaminierter Lebensmittel

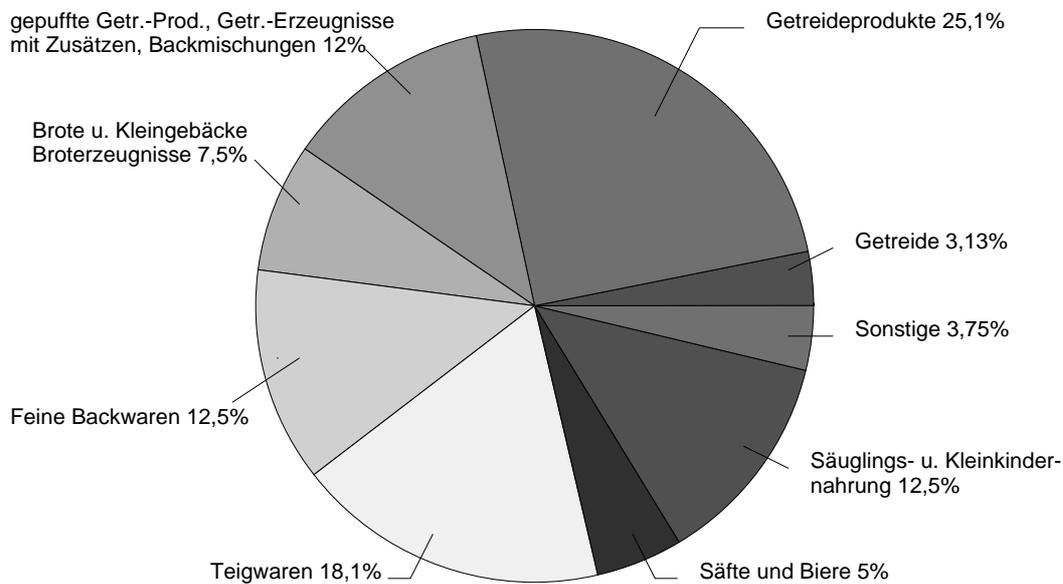


**Abbildung 11:** Korrelation der mittels EIA und LC-MS/MS bzw. GC-ECD ermittelten T-2/HT-2-Gehalte natürlich kontaminierter zerealienhaltiger Proben (n = 10). Die Geradengleichung EIA vs. LC-MS/MS lautet  $y = 1,2182 x + 0,5680$  (Korrelationskoeffizient: 0,91;  $r^2 = 0,83$ ). Die Geradengleichung für den EIA-Vergleich mit der GC-ECD lautet  $y = 0,95 x + 0,04$  (Korrelationskoeffizient: 0,99;  $r^2 = 0,97$ ).

### 3.2.4 Vorkommen von T-2 Toxin und HT-2 Toxin in Lebensmitteln des deutschen Marktes in den Jahren 2006 und 2007

Im Rahmen des oben erwähnten Forschungsauftrages „Verbesserung und Validierung der Analytik für Typ A Trichothecene (T-2 Toxin und HT-2 Toxin) sowie Vorkommen dieser Toxine in Lebensmitteln des deutschen Marktes“ wurde zur Identifizierung T-2 und HT-2-belasteter Lebensmittel ein weites Spektrum an Proben untersucht. Die Produkte wurden im Groß- und Einzelhandel (verschiedene Supermärkte, Großhandel, Reformhäuser, Bioläden, Drogeriemärkte) im Großraum München gekauft, wobei darauf geachtet wurde, das vorhandene Angebot zerealienhaltiger Lebensmittel möglichst großflächig abzudecken, um sich so einen ersten Überblick über die Belastungssituation zu verschaffen. Höher belastete Produkte bzw. Produktgruppen wurden dann gezielt nachgekauft, um eine detailliertere

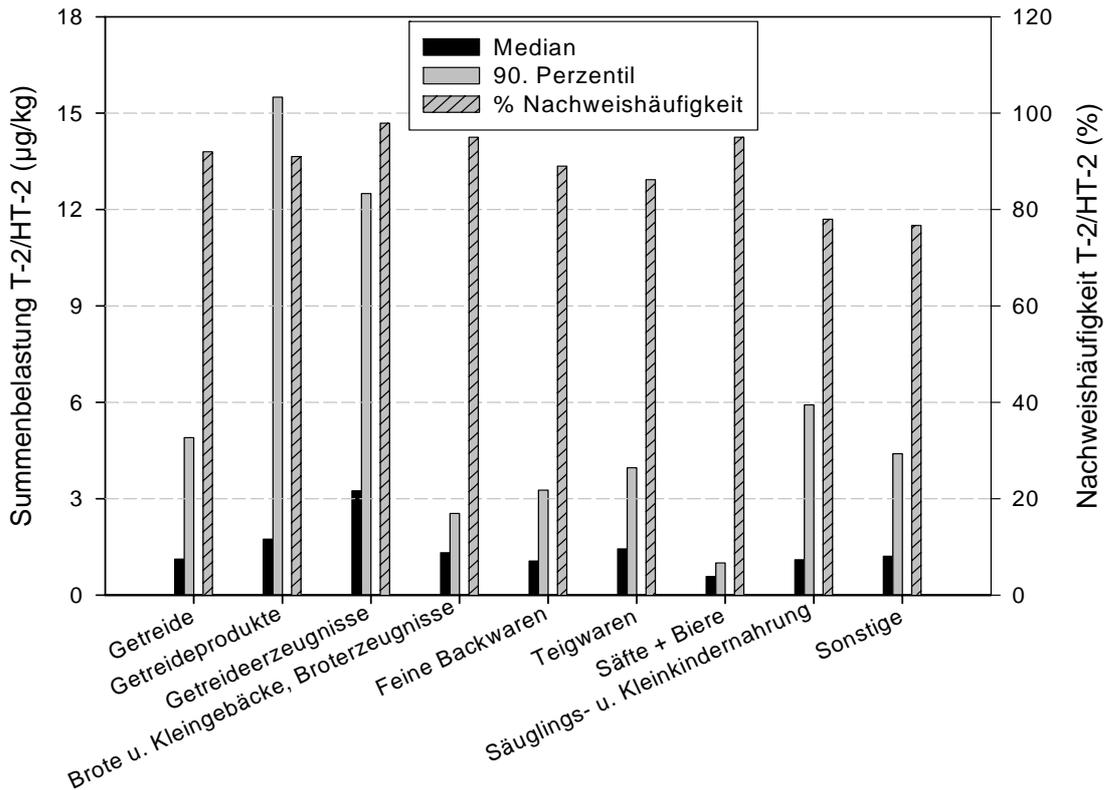
Aussage über die tatsächliche Belastungssituation machen und eventuelle chargenabhängige Veränderungen registrieren zu können. Insgesamt wurden 800 Lebensmittelproben eingekauft und auf T-2 Toxin und HT-2 Toxin untersucht. Die Proben wurden nach dem Code der Zentralen Erfassungs- und Bewertungsstelle für Umweltchemikalien des Bundesgesundheitsamtes (ZEBS-Codierung) erfasst, entsprechend sortiert und zusammengefasst. Abb. 12 gibt einen Überblick über die Verteilung der untersuchten Produktobergruppen.



**Abbildung 12:** Prozentualer Anteil der verschiedenen Produktobergruppen an der Gesamtmenge der untersuchten Proben (n = 800)

### 3.2.4.1 Vorkommenshäufigkeit und Belastungssituation

Von den 800 untersuchten Proben waren 89 % mit T-2/HT-2 Toxin (im Summennachweis) belastet. In den einzelnen Produktobergruppen lag der prozentuale Anteil der positiven Proben zwischen 76,6 % und 97,9 % (Abb. 13). Bei Getreide (91 %), Getreideprodukten (91 %), Getreideerzeugnissen (97,9 %), Broten und Kleingebäcken inklusive Broterzeugnissen (95 %) und Säften und Bieren (95 %) lag der Anteil der positiven Proben bei über 90 %.



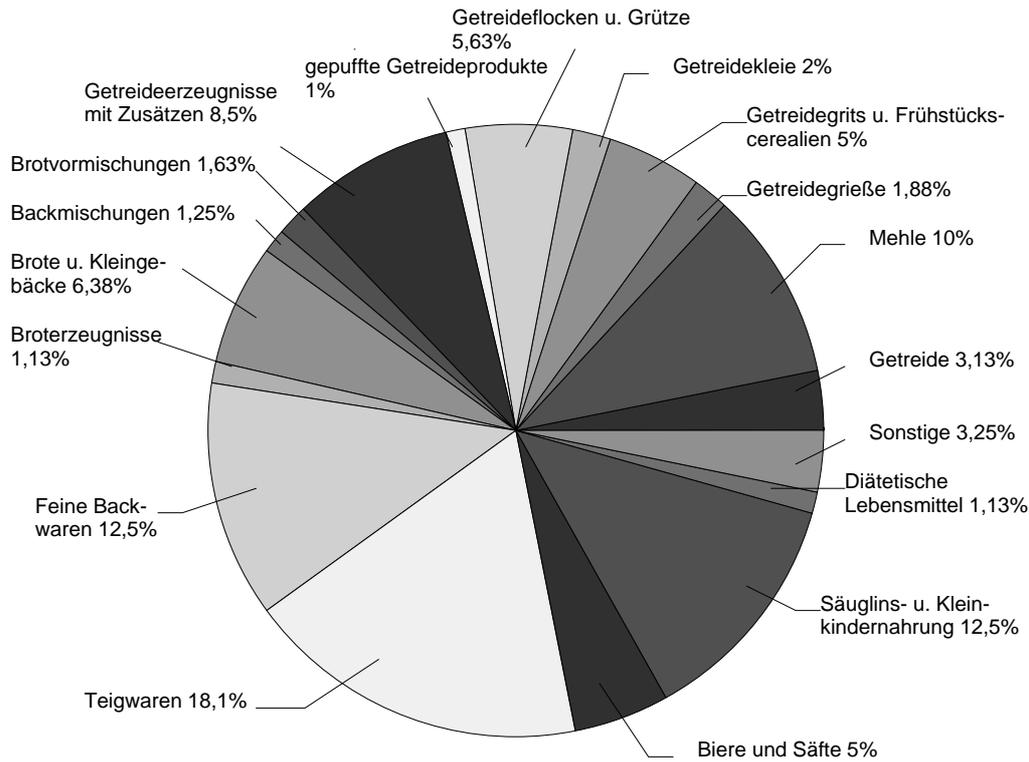
**Abbildung 13:** Überblick zur Belastung von Lebensmitteln mit T-2/HT-2 Toxin

Abb. 13 gibt anhand des Medians und des 90. Perzentils weiterhin einen Überblick zur Höhe der T-2/HT-2 Belastung der Proben im Untersuchungszeitraum. Aus statistisch-mathematischen Gründen wurde hierbei bei negativen Proben der Toxingehalt entsprechend der halben Nachweisgrenze des jeweiligen Untersuchungsverfahrens in die Berechnungen mit einbezogen. Der Median aller Proben lag bei 1,29 µg/kg (0,58 – 3,25 µg/kg), das 90. Perzentil bei 6,0 µg/kg (1,00 – 12,5 µg/kg). Die Gruppe der Getreideerzeugnisse (gepuffte Getreideprodukte, Getreideerzeugnisse mit Zusätzen und Backmischungen) war mit einem Median von 3,25 µg/kg durchschnittlich am höchsten belastet, der Maximalwert dieser Gruppe betrug 22,7 µg/kg. Den absolut höchsten Toxingehalt aller Proben wies mit 51,0 µg/kg eine Haferflocken-Probe aus der Gruppe der Getreideprodukte auf. In der Gruppe der Brote und Kleingebäcke inklusive Broterzeugnisse war eine Spitzenbelastung von 22,7 µg/kg nachweisbar, wobei der Median der Gruppe bei 1,32 µg/kg lag. Bei den Feinen Backwaren (Median 1,06 µg/kg) lag der Höchstwert bei 14,0 µg/kg. Ähnlich verhielt es sich mit den Teigwaren. Hier konnte ein Höchstwert von 12,1 µg/kg (Vollkornnudeln) und ein Median von

1,44 µg/kg nachgewiesen werden. Bei Säuglings- und Kleinkindernahrung lag der Median der T-2/HT-2 Belastung durchschnittlich bei 1,10 µg/kg, der Maximalwert von 21,7 µg/kg wurde in einer Getreidebrei Hafer-Aprikose-Probe nachgewiesen.

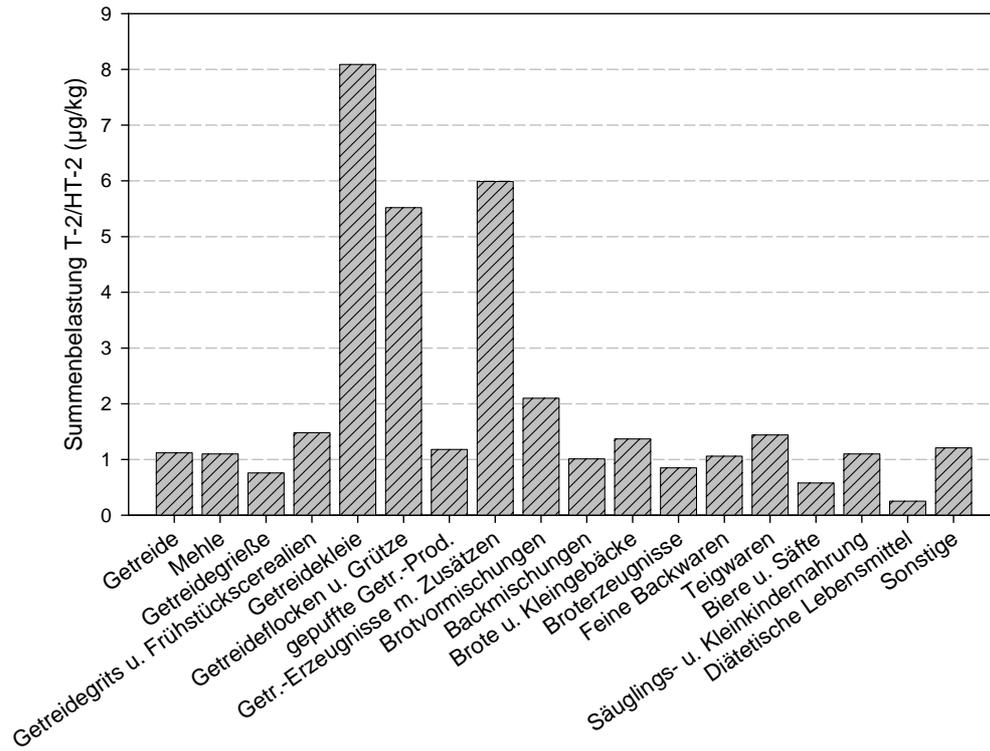
Trotz der höheren Sensitivität der T-2 spezifischen EIA-Variante B reagierten von den 716 im Summennachweis positiven Proben nur 225 in diesem Testsystem positiv. Die Proben waren mit durchschnittlich 0,46 µg/kg relativ gering mit T-2 Toxin belastet, der Median und das 90. Perzentil lagen bei 0,15 bzw. 1,12 µg/kg. Die Spitzenbelastung wies mit 8,92 µg/kg eine Haferflockenprobe auf. Generell zeigte sich, dass im Gegensatz zu anderen Produktgruppen bei Lebensmitteln auf Haferbasis deutlich höhere Belastungen sowohl für den Summenwert, als auch für T-2 Toxin detektiert werden konnten. In einer Maismehlprobe, die im Summennachweis ebenfalls sehr hoch belastet war (36,5 µg/kg), konnten 4,90 µg/kg T-2 Toxin nachgewiesen werden.

Die Unterteilung in Produktobergruppen wurde gewählt, um einen groben Überblick über die Belastungssituation zu erhalten. Die einzelnen Produktobergruppen beinhalteten jedoch viele unterschiedliche Produkte. So umfasst z. B. die Gruppe der Getreideprodukte (ZEBS-Code 160xxx) Mehle, Getreidegrieße, Getreidegrits, Frühstückszerealien, Getreidekleie, Getreideflocken und Grütze. Um eine detaillierte Aussage über die tatsächliche Belastung der unterschiedlichen Produkte machen zu können, wurde deshalb anschließend eine Einteilung in Produktuntergruppen vorgenommen (Abb. 14). Die Produktobergruppe der Teigwaren (ZEBS-Code 22xxxx) wurde nicht weiter unterteilt, da der Eigehalt der Produkte, der eine Einteilung in Produktuntergruppen ermöglicht hätte, keinen Einfluss auf die T-2/HT-2 Belastung hatte. Die Produktobergruppe der Säuglings- und Kleinkindernahrung wurde an dieser Stelle auch nicht unterteilt, da diese Produkte aufgrund der besonders gefährdeten Verbrauchergruppe im Folgenden (3.2.4.5) separat betrachtet werden. Eine gesonderte Betrachtung wird aufgrund der niedrigeren Nachweisgrenzen für flüssige Probenmatrices ebenso bei der Produktobergruppe Biere und Säfte (3.2.4.6) vorgenommen.



**Abbildung 14:** Prozentualer Anteil der verschiedenen Produktuntergruppen an der Gesamtmenge der untersuchten Proben (n = 800)

Abb. 15 dokumentiert anhand des Medians die durchschnittliche T-2/HT-2 Summenbelastung der Produktuntergruppen. Am höchsten belastet war die Gruppe der Getreidekleie (ZEBS-Code 1608xx) (n = 16) mit einem Median von 8,09 µg/kg, gefolgt von der Gruppe der Getreideflocken und Grütze (ZEBS-Code 1609xx; 5,52 µg/kg; n = 45), sowie den Getreideerzeugnissen mit Zusätzen (ZEBS-Code 1611xx; 5,99 µg/kg) (n = 68). Am niedrigsten belastet war die Gruppe der diätetischen Lebensmittel (n = 9). Da in den meisten Proben dieser Gruppe kein bzw. nur Spuren des Toxins nachweisbar waren, lag der Median bei 0,25 µg/kg, was rechnerisch der halben Nachweisgrenze des eingesetzten Analyseverfahrens entspricht. Die Ergebnisse aller untersuchten Produktgruppen sind in Tab. 12 zusammengefasst.



**Abbildung 15:** Belastung der einzelnen Produktuntergruppen mit T-2 und HT-2 dargestellt anhand des Medians. Werte basieren auf den in der EIA-Variante A (Summennachweis) erhaltenen Ergebnissen.

**Tabelle 12:** T-2/HT-2 Summenbelastung von Lebensmitteln (n = 800) in den Untersuchungsjahren 2006 und 2007

<b>Produktgruppe (ZEBS-Code)</b>	<b>n</b>	<b>Anteil an Gesamtmenge (%)</b>	<b>n positiv</b>	<b>% positiv</b>	<b>Median (µg/kg)</b>	<b>90. Perzentil (µg/kg)</b>	<b>Maximal- wert (µg/kg)</b>
Getreide (150xxx)	25	3,13	23	92,0	1,12	4,90	17,1
Mehle (1601xx)	80	10,0	71	88,8	1,10	3,00	36,5
Getreidegrieße (1602xx)	15	1,88	13	86,7	0,76	2,67	4,34
Getreidegrits u. Frühstücks-Zerealien (1606xx)	40	5,00	35	87,5	1,48	6,20	9,84
Getreidekleie (1608xx)	16	2,00	16	100	8,09	26,1	35,5
Getreideflocken u. Grütze (1609xx)	45	5,63	45	100	5,52	26,6	51,0

**Fortsetzung Tab. 12:** T-2/HT-2 Summenbelastung von Lebensmitteln (n = 800) in den Untersuchungsjahren 2006 und 2007

<b>Produktgruppe (ZEBS-Code)</b>	<b>n</b>	<b>Anteil an Gesamtmenge (%)</b>	<b>n positiv</b>	<b>% positiv</b>	<b>Median (µg/kg)</b>	<b>90. Perzentil (µg/kg)</b>	<b>Maximalwert (µg/kg)</b>
Gepuffte Getreideprodukte (1610xx)	8	1,00	6	75,0	1,18	2,03	2,04
Getreideerzeugnisse m. Zusätzen (1611xx)	68	8,50	68	100	5,99	13,4	22,7
Brotvormischungen (1612xx)	13	1,63	13	100	2,1	3,15	8,79
Backmischungen (1613xx + 1626xx)	10	1,25	10	100	1,01	1,57	1,76
Brote u. Klein- gebäck (170xxx + 171xxx)	51	6,38	49	96,1	1,37	2,63	26,7

**Fortsetzung Tab. 12:** T-2/HT-2 Summenbelastung von Lebensmitteln (n = 800) in den Untersuchungsjahren 2006 und 2007

<b>Produktgruppe (ZEBS-Code)</b>	<b>n</b>	<b>Anteil an Gesamtmenge (%)</b>	<b>n positiv</b>	<b>% positiv</b>	<b>Median (µg/kg)</b>	<b>90. Perzentil (µg/kg)</b>	<b>Maximalwert (µg/kg)</b>
Broterzeugnisse (172xxx)	9	1,13	8	88,9	0,85	1,41	1,59
Feine Backwaren (18xxxx)	100	12,5	89	89,0	1,06	3,27	14,0
Teigwaren (22xxxx)	145	18,1	125	86,2	1,44	3,95	12,1
Biere u. Frucht- Säfte (3xxxxx)	40	5,00	38	95,0	0,58	1,00	1,59
Säuglings- und Klein- kindernahrung (48xxxx)	100	12,5	78	78,0	1,10	5,92	21,7

**Fortsetzung Tab. 12:** T-2/HT-2 Summenbelastung von Lebensmitteln (n = 800) in den Untersuchungsjahren 2006 und 2007

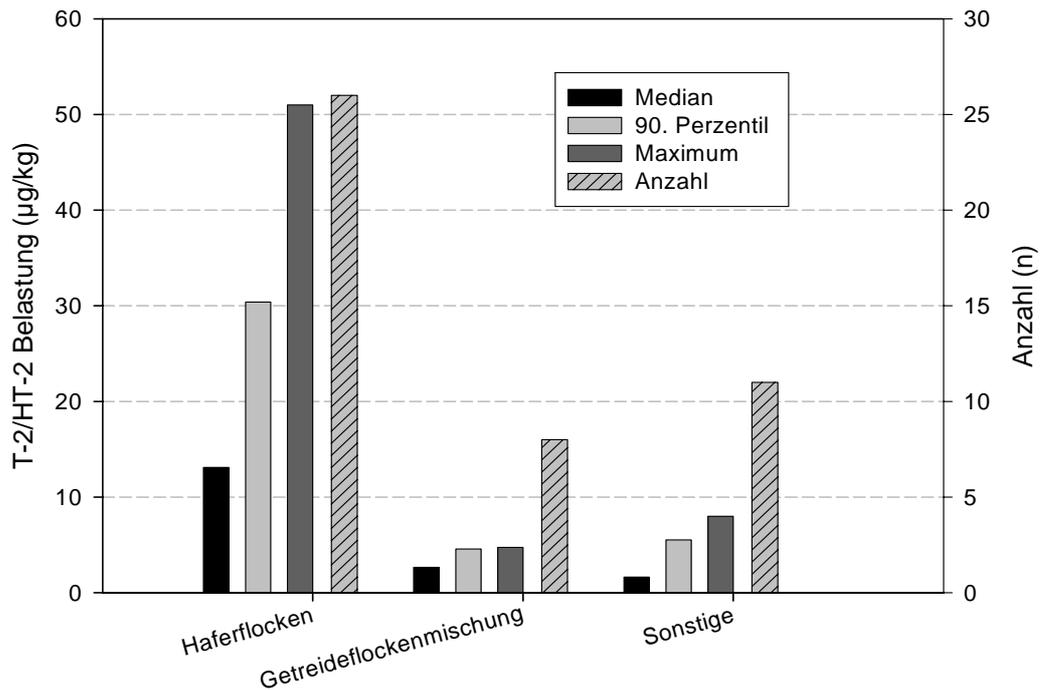
<b>Produktgruppe (ZEBS-Code)</b>	<b>n</b>	<b>Anteil an Gesamtmenge (%)</b>	<b>n positiv</b>	<b>% positiv</b>	<b>Median (µg/kg)</b>	<b>90. Perzentil (µg/kg)</b>	<b>Maximalwert (µg/kg)</b>
Diätetische Lebensmittel (49xxxx)	9	1,13	4	44,4	0,25	5,11	7,97
Sonstige (xxxxxx)	26	3,25	22	84,6	1,21	3,68	10,0
<b>Gesamt</b>	<b>800</b>	<b>100</b>	<b>713</b>	<b>89,1</b>	<b>1,36</b>	<b>7,50</b>	<b>51,0</b>

### 3.2.4.2 Produktgruppen mit erhöhter T-2/HT-2 Belastung

Hierunter wurden diejenigen Produkte eingestuft, deren Median (Summenbelastung T-2/HT-2 Toxin) über 5 µg/kg lag. Dies traf für die Produktuntergruppen Getreidekleie (ZEBS-Code 1608xx), Getreideflocken und Grütze (ZEBS-Code 1609xx) und Getreideerzeugnisse mit Zusätzen (ZEBS-Code 1611xx) zu.

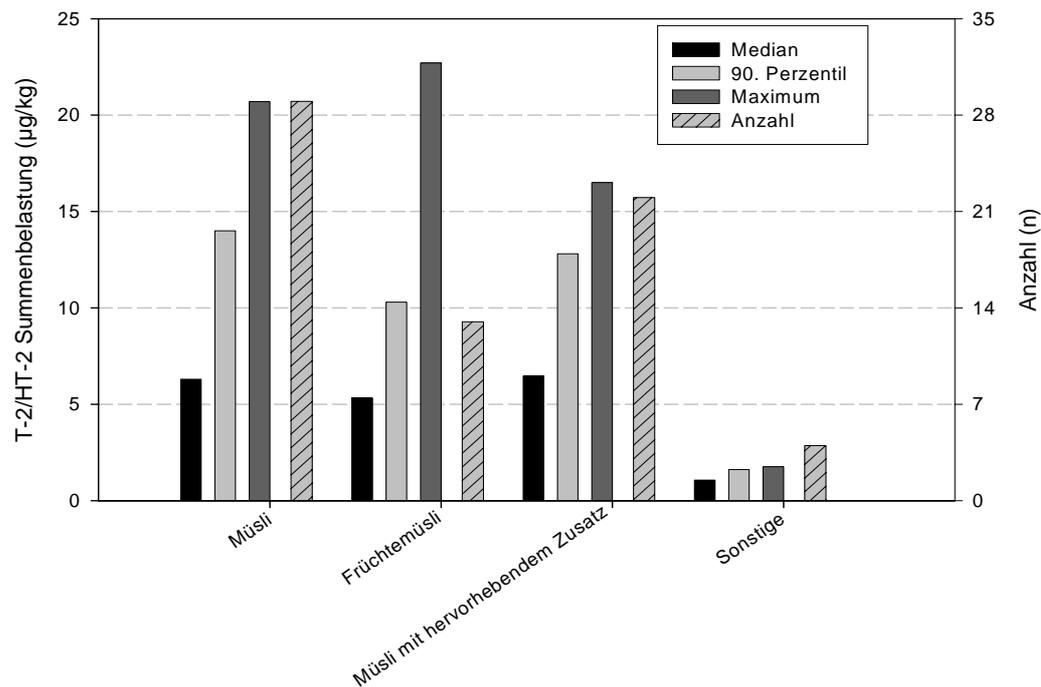
Der Median aller 16 untersuchten Getreidekleie-Proben lag bei 8,09 µg/kg, das 90. Perzentil bei 26,1 µg/kg. Der relativ hohe Medianwert wurde im Wesentlichen durch die 10 Haferkleie-Proben (Median 13,7 µg/kg, 90. Perzentil 27,0 µg/kg) verursacht. Die sechs parallel untersuchten Weizenkleie-Proben waren mit einem Medianwert von 5,97 µg/kg und einem 90. Perzentil von 17,4 µg/kg geringer belastet.

Die Gruppe "Getreideflocken und Grütze" setzte sich aus 26 Haferflocken-Proben, 8 Getreideflockenmischungen und 11 unter "Sonstige" zusammengefassten Proben zusammen. Die Gruppe „Sonstige“ beinhaltete z. B. Dinkelflocken, Roggenflocken, Hirseflocken, Hafergrütze und Gerstengrütze. Der Median der Summenbelastung aller 45 Proben betrug 5,52 µg/kg, das 90. Perzentil lag bei 26,6 µg/kg. Auffällig war, dass die Gruppe der Haferflocken mit einem Median von 15,1 µg/kg deutlich höher belastet war, als die Getreideflockenmischungen (Median 2,65 µg/kg) oder die Gruppe "Sonstige" (Median 1,63 µg/kg). Bei der Probe mit der absoluten Spitzenbelastung des gesamten Projekts (51,0 µg/kg) handelte es sich um Haferflocken. Median und 90. Perzentil der einzelnen Untergruppen sind in Abb. 16 graphisch dargestellt.



**Abbildung 16:** Belastung der Produktuntergruppe “Getreideflocken und Grütze” (ZEBS-Code 1609xx) mit T-2/HT-2 Toxin

In der Gruppe der “Getreideerzeugnisse mit Zusätzen” (ZEBS-Code 1611xx) wurden 29 Müsli-Proben, 13 Früchtemüsli-Proben, 22 Proben Müsli mit hervorhebendem Zusatz (z. B. Schoko-Müsli) und 4 Proben “Sonstige” (z. B. Puffreis mit Zucker) untersucht. Der Medianwert aller 68 Proben betrug 5,99 µg/kg, das 90. Perzentil 13,4 µg/kg. Die Toxingehalte der unterschiedlichen Müsli-Unterprodukte bewegten sich zwischen 0,87 und 22,7 µg/kg, deutliche Unterschiede zwischen den Unterprodukt-Gruppen konnten nicht gefunden werden. Abb. 17 gibt hierzu einen Überblick.



**Abbildung 17:** Belastung der Produktuntergruppe “Getreideerzeugnisse mit Zusätzen” (ZEBS-Code 1611xx) mit T-2/HT-2 Toxin

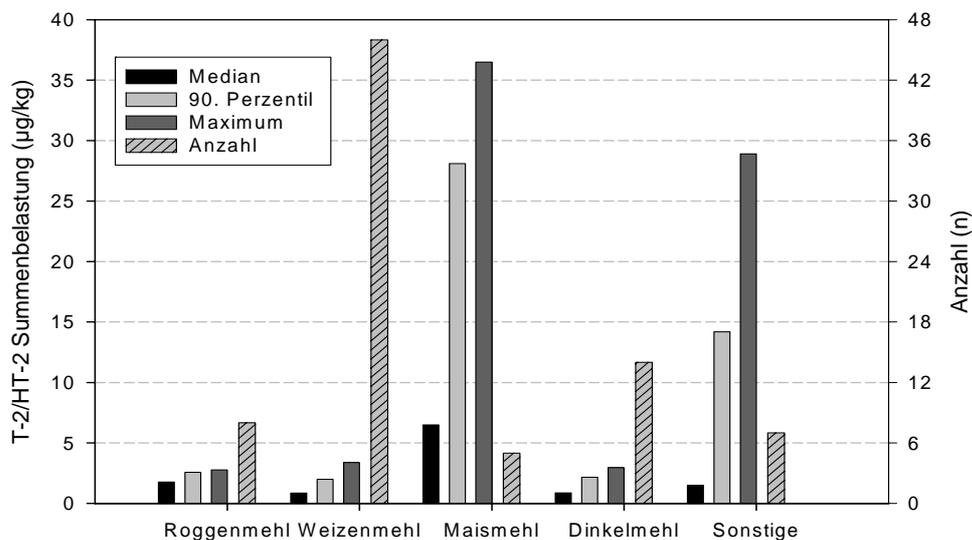
### 3.2.4.3 Produktgruppen mit mittlerer T-2/HT-2 Belastung

Als Produktgruppen mit mittlerer T-2/HT-2 Belastung wurden diejenigen Produktgruppen definiert, deren Median des T-2/HT-2 Gehaltes zwischen 1 und 5 µg/kg lag. In diese Kategorie waren die meisten der untersuchten Proben einzuordnen. Diese Gruppe umfaßte die Produktuntergruppen Getreide (ZEBS-Code 15xxxx), Mehle (ZEBS-Code 1601xx), Getreidegrits und Frühstückszerealien (ZEBS-Code 1606xx), gepuffte Getreideprodukte (ZEBS-Code 1610xx), Brotvormischungen (ZEBS-Code 1612xx), Backmischungen (ZEBS-Code 1613xx + 1626xx), Feine Backwaren (ZEBS-Code 18xxxx), Teigwaren (ZEBS-Code 22xxxx) und Brote und Kleingebäcke (ZEBS-Code 170xxx + 171xxx).

Insgesamt wurden 25 Getreide-Proben untersucht, wobei darauf geachtet wurde, dass möglichst alle gängigen Speisegetreidearten abgedeckt wurden. Der Median aller Proben lag bei 1,12 µg/kg und das 90. Perzentil bei 4,9 µg/kg. Mit einem Spitzenwert von 17,1 µg/kg

war Hafer deutlich höher belastet als die anderen Getreidesorten. Die niedrigste Belastung wies mit durchschnittlich 0,98 µg/kg Weizen auf.

Bei den 80 untersuchten Mehl-Proben handelte es sich 8 mal um Roggenmehl, 46 mal um Weizenmehl, 5 mal um Maismehl, 14 mal um Dinkelmehl und 7 mal um sonstige Proben (Hafermehl, Grünkernmehl, Buchweizenmehl; Abb. 18). Die mediane Belastung der Mehl-Proben lag bei 1,1 µg/kg, das 90. Perzentil betrug 3,0 µg/kg. Roggenmehl war durchschnittlich mit 1,77 µg/kg (0,55 – 1,77 µg/kg) belastet. Bei Weizenmehl betrug die durchschnittliche T-2/HT-2 Belastung 1,12 µg/kg (0,25 – 3,38 µg/kg), bei Dinkelmehl 1,16 µg/kg (0,25 – 2,96 µg/kg). Bei Maismehl wurde hingegen eine deutlich höhere Belastung ermittelt. Die nachweisbare T-2/HT-2-Konzentration betrug durchschnittlich 13,0 µg/kg. Bei der inhomogenen Gruppe der “sonstigen“ Mehle konnte eine durchschnittliche Belastung von 5,75 µg/kg nachgewiesen werden, die Werte reichten von 0,70 µg/kg (Grünkernmehl) bis 28,9 µg/kg (Hafermehl).

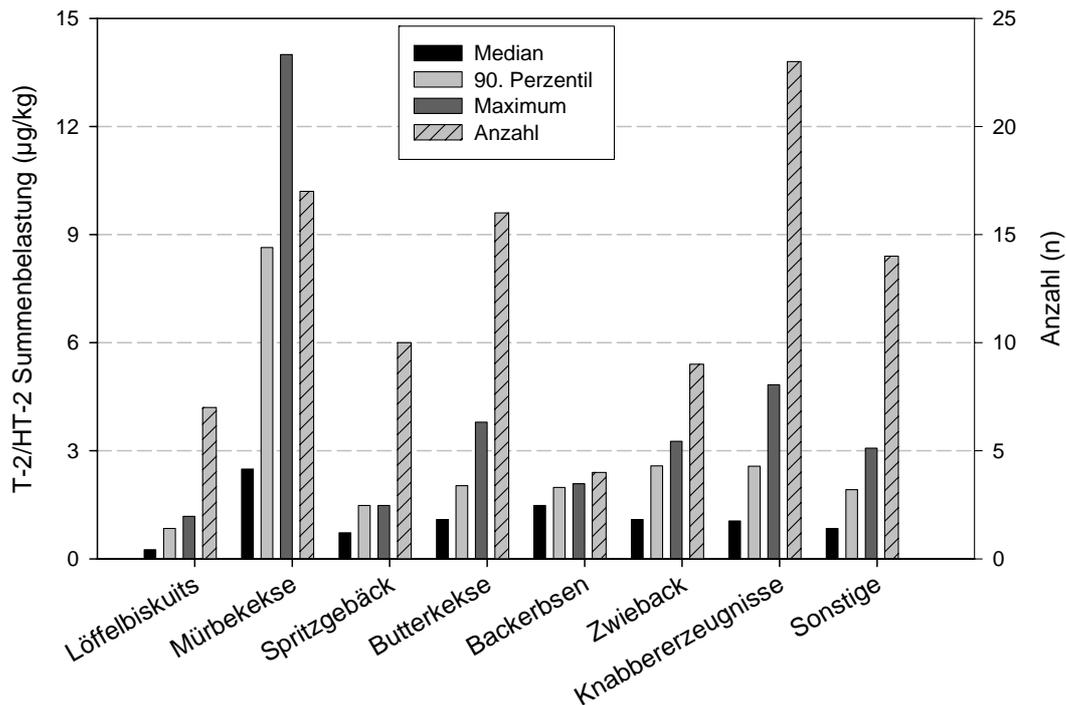


**Abbildung 18:** Belastung der Produktuntergruppe “Mehle” (ZEBS-Code 1601xx) mit T-2/HT-2 Toxin

Eine ähnliche Belastungssituation wurde in den Gruppen “gepuffte Getreideprodukte”, “Brotvormischungen” und “Backmischungen” gefunden (Tab. 12).

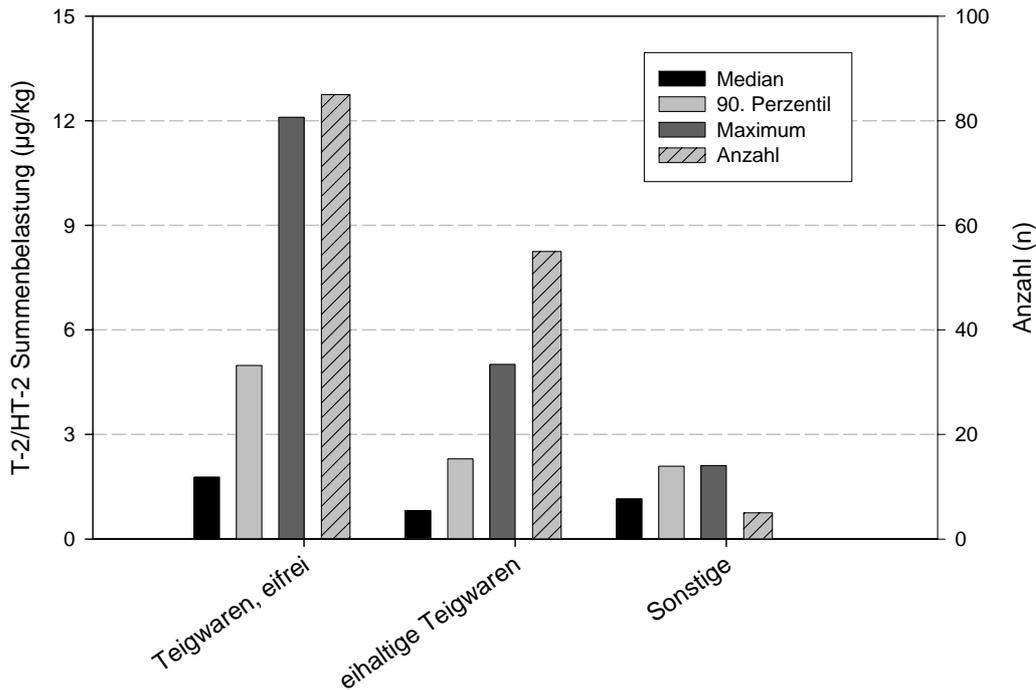
Aus der Gruppe der Getreidegrits und Frühstückszerealien wurden 40 Proben, hauptsächlich Cornflakes auf verschiedener Getreidebasis, untersucht. Median und 90. Perzentil lagen bei 1,48 bzw. 6,2 µg/kg. Hoch belastet waren in dieser Gruppe v.a. vier Produkte auf Haferbasis (5,95 – 9,84 µg/kg), eine Probe “Frühstückscerealien aus den Randschichten des vollen Korns” (9,75 µg/kg) und eine auf Mais basierende Cornflakes-Probe (6,01 µg/kg).

Aufgrund der Inhomogenität der Gruppe der Feinen Backwaren wurden von diesen Produkten vergleichsweise viele Proben untersucht. Der Median aller 100 untersuchten Proben betrug 1,06 µg/kg, das 90. Perzentil lag bei 3,27 µg/kg. Mit einem durchschnittlichen Toxingehalt von 3,77 µg/kg (0,25 – 14,0 µg/kg) war die Gruppe der Mürbekekse am höchsten belastet. Hier wiesen v. a. die Kekse auf Haferbasis (n = 7) höhere Belastungswerte (3,34 – 14,0 µg/kg) auf. Mais-Knabber-Flips aus der Produktgruppe der Knabbererzeugnisse waren mit 4,83 µg/kg ebenfalls relativ hoch belastet. Tendenziell waren in allen Produktgruppen der “Feinen Backwaren” Vollkornprodukte höher belastet, nämlich Vollkornbutterkeks mit 3,79 µg/kg, Vollkornzwieback mit 3,26 µg/kg und Dinkel-Vollkorn-Knabberstangen mit 4,75 µg/kg. Die Medianwerte sowie das 90. Perzentil der einzelnen Produktgruppen sind in Abb. 19 dargestellt.



**Abbildung 19:** Belastung der Produktuntergruppe “Feine Backwaren” (ZEBS-Code 18xxxx) mit T-2/HT-2 Toxin

Bei den 145 untersuchten Teigwaren wurde unterschieden in eifreie Teigwaren (n = 85), eihaltige Teigwaren (n = 55) und sonstige Teigwaren (n = 5). Es konnte ein 50. Perzentil der T-2/HT-2 Belastung von 1,44 µg/kg und ein 90. Perzentil von 3,95 µg/kg festgestellt werden. Die Summenbelastungswerte der eifreien Teigwaren reichten von 0,25 bis 12,1 µg/kg (Vollkornnudeln), was einer mittleren Belastung von 2,45 µg/kg entsprach. Die durchschnittliche Toxinkonzentration der eihaltigen Teigwaren betrug 1,16 µg/kg (0,25 – 5,01 µg/kg). Die Teigwaren, die unter “Sonstige“ eingeordnet wurden (z. B. Glasnudeln, Flädle) waren durchschnittlich mit 1,25 µg/kg (0,25 – 2,11 µg/kg) belastet. Abb. 20 zeigt eine graphische Darstellung der Medianwerte und des 90. Perzentils der einzelnen Produktgruppen.

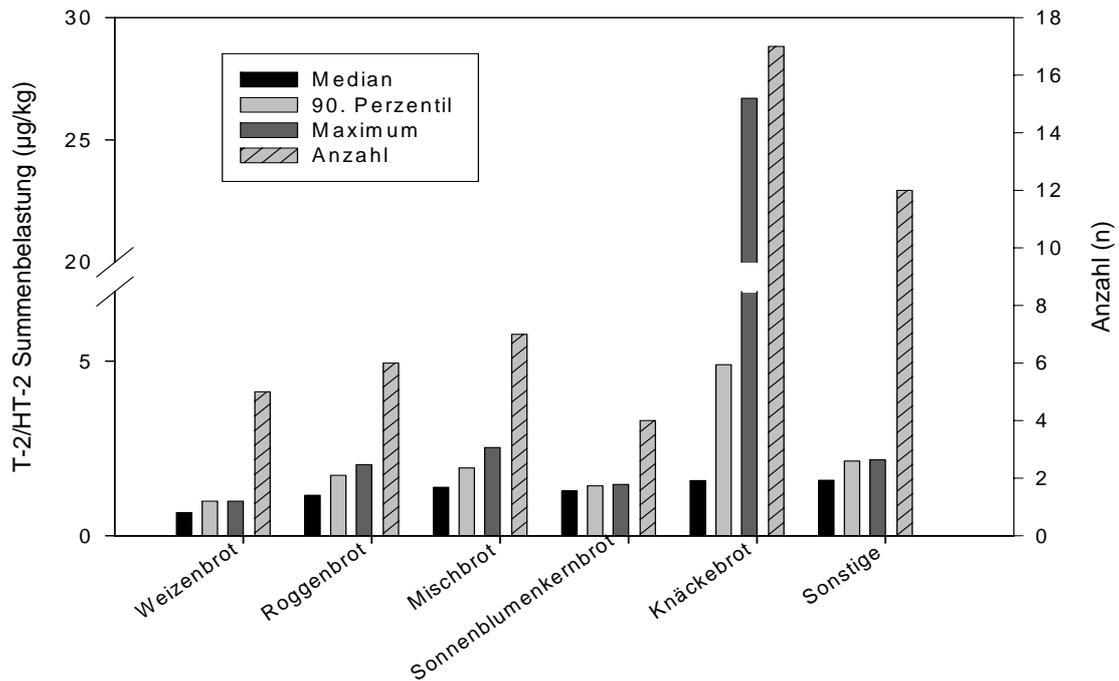


**Abbildung 20:** Belastung der Produktuntergruppe “Teigwaren” (ZEBS-Code 22xxxx) mit T-2/HT-2 Toxin

Die 51 untersuchten Brote und Kleingebäcke wurden aus Gründen der besseren Lagerfähigkeit getrocknet. Dazu wurde entsprechend dem Referenzverfahren (Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, Untersuchung von Lebensmitteln, Bestimmung des Trocknungsverlustes in Brot einschließlich Kleingebäck aus Brotteigen, L 17.00-1: 1982 und L 17.00-1 Berichtigung: 2002) ein ganzer Brotlaib bzw. 5 Brötchen einer Sorte in kleine Würfel mit einer Kantenlänge von nicht mehr als 2 cm Kantenlänge geschnitten und auf einem an den Rändern aufgefalteten Stück Aluminiumfolie verteilt. Nach Ermittlung des Feuchtgewichtes kamen die Brotwürfel für ca. 16 Stunden bei 40°C in den Trockenschrank. Anschließend wurde das Trockengewicht bestimmt, um damit unter Einbeziehung des Feuchtgewichtes den Trocknungsfaktor zu berechnen. Die getrockneten Brotwürfel wurden dann mit einem Mixgerät zu einem feinen, mehlartigem Pulver zermahlen und mittels des in 3.2.2.2 beschriebenen Verfahrens extrahiert.

Die durchschnittliche Toxinbelastung lag bei 1,37 µg/kg, das 90. Perzentil bei 2,63 µg/kg. Weizenbrot war mit durchschnittlich 0,70 µg/kg am geringsten belastet, bei den anderen

Brotsorten konnten Werte zwischen 1,26 und 1,47  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ermittelt werden. Die relativ große Gruppe der Knäckebröte ( $n = 17$ ) hingegen war mit durchschnittlich 3,42  $\mu\text{g}/\text{kg}$  am höchsten belastet. Der absolut höchste Toxingehalt (26,7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) konnte in einem ‐Vollkorn-Knäckebrötchen mit 21% Ballaststoffen‐ ermittelt werden. Abb. 21 zeigt eine vergleichende Darstellung der Medianwerte und des 90. Perzentils der Produktuntergruppen.



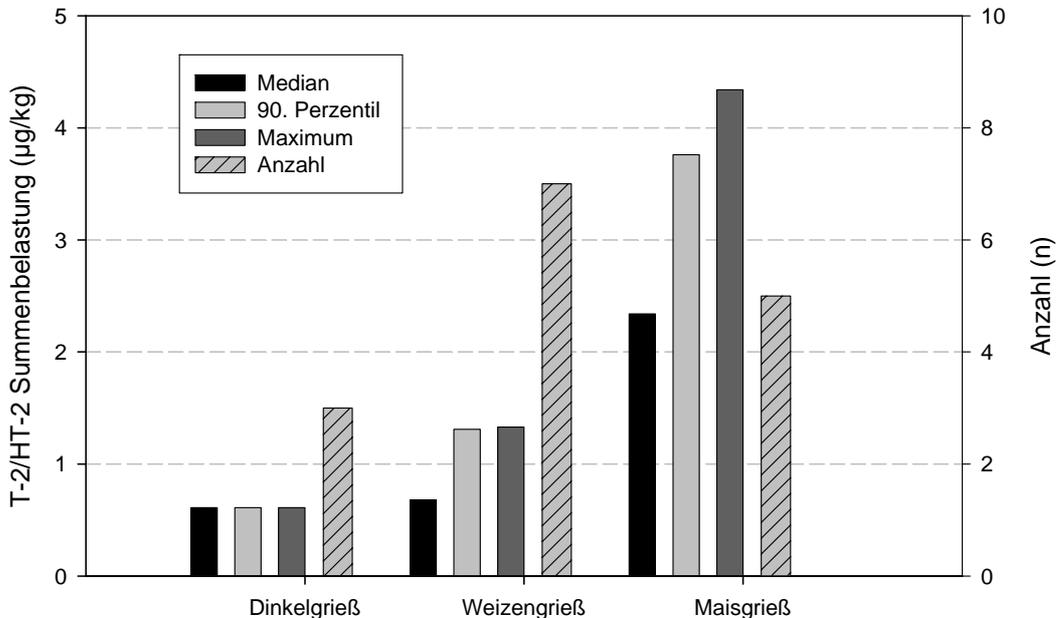
**Abbildung 21:** Belastung der Produktuntergruppe ‐Brote und Kleingebäck‐ (ZEBS-Code 170xxx + 171xxx) mit T-2/HT-2 Toxin

#### 3.2.4.4 Produktgruppen mit niedriger T-2/HT-2 Belastung

Alle Produktgruppen, die im T-2/HT-2 Summennachweis unter 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  lagen wurden zu den Produktgruppen mit niedriger T-2/HT-2 Belastung gerechnet. Dies waren die Gruppe der Getreidegrieße (ZEBS-Code 1602xx), die Gruppe der Broterzeugnisse (ZEBS-Code 172xxx), sowie die Gruppe der diätetischen Lebensmittel (ZEBS-Code 49xxxx).

Bei der 15 Proben umfassenden Gruppe der Getreidegrieße (Abb. 22) bestätigte sich die Tendenz, dass Maisprodukte grundsätzlich etwas höher belastet sind als Weizen- oder

Dinkelprodukte. So lag die durchschnittliche Belastung der 5 Maisgrieß-Proben bei 2,51  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (1,17 – 4,34  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), während Dinkelgrieß- und Weizengrieß-Proben mit durchschnittlich 0,59 bzw. 0,74  $\mu\text{g}/\text{kg}$  deutlich geringer belastet waren.



**Abbildung 22:** Belastung der Produktuntergruppe “Getreidegrieße” (ZEBS-Code 1602xx) mit T-2/HT-2 Toxin

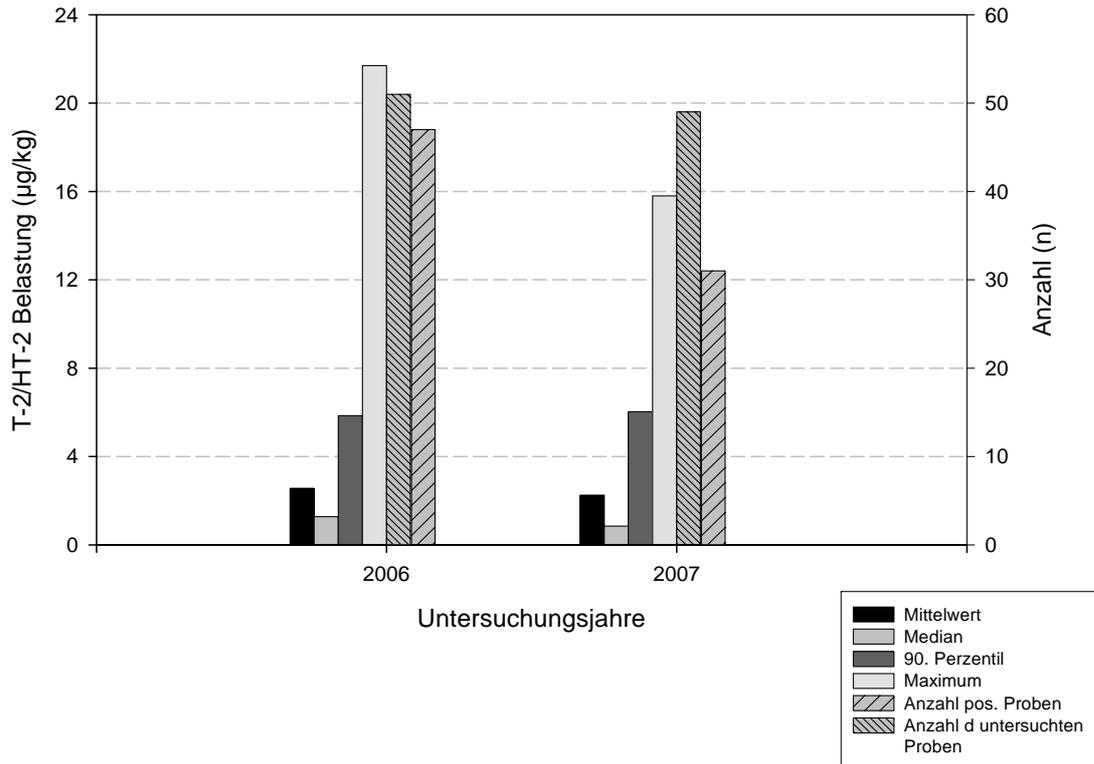
Zur Gruppe der Broterzeugnisse gehörten unter anderem Semmelbrösel, Paniermehl und Knödelbrot. Anhand der Toxingehalte der 9 untersuchten Proben, die zwischen 0,25 und 1,59  $\mu\text{g}/\text{kg}$  lagen, ergab sich für diese Gruppe eine mediane Belastung von 0,85  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , das 90. Perzentil lag bei 1,14  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Am höchsten kontaminiert war eine Vollkornsemmelbrösel-Probe (1,59  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

Mit einem Median von 0,25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  stellten diätetische Lebensmittel (n = 9) die Gruppe mit der geringsten Belastung dar. Die T-2/HT-2 Summenwerte lagen zwischen 0,25 und 7,97  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , wobei der Spitzenwert bei einem natriumarmen Waffelbrot nachgewiesen wurde. Das 90. Perzentil der untersuchten Proben lag bei 5,11  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

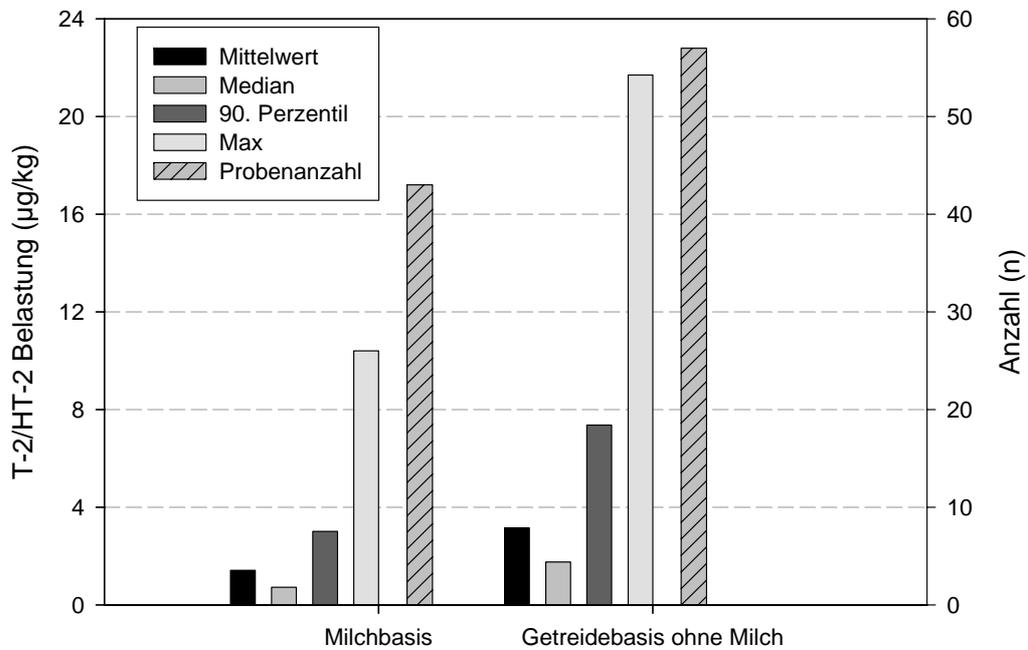
### 3.2.4.5 Säuglings- und Kleinkindernahrung

Aufgrund der besonderen Gefährdung der Konsumentengruppe stellt die Säuglings- und Kleinkindernahrung eine Sondergruppe dar. Von den insgesamt 100 Proben aus der Gruppe der Säuglings- und Kleinkindernahrung (ZEBS-Code 48xxxx) wurden 51 im Jahr 2006 und 49 im Jahr 2007 untersucht. In Abb. 23 ist der Vergleich der Untersuchungsjahre graphisch dargestellt. Im Jahr 2006 lag der Mittelwert der Toxinbelastung bei 2,56 µg/kg (0,25 – 21,7 µg/kg), der Median bei 1,28 µg/kg und das 90. Perzentil bei 5,85 µg/kg. Im Jahr 2007 waren die Proben durchschnittlich mit 2,25 µg/kg T-2/HT-2 belastet (0,25 – 15,8 µg/kg), mit einem Median von 0,85 µg/kg und einem 90. Perzentil von 6,03 µg/kg.

Eine Unterteilung der Gruppe “Säuglings- und Kleinkindernahrung” erfolgte dahingehend, ob Milch Bestandteil des Produktes ist, oder nicht: Säuglings- und Kleinkindernahrung auf Milchbasis (ZEBS-Code 4801xx) bzw. Säuglings- und Kleinkindernahrung auf Getreidebasis ohne Milch (ZEBS-Code 4802xx). Von den untersuchten Proben waren 43 % auf Milchbasis, die übrigen 57 % auf Getreidebasis. Wie erwartet zeigte sich, dass die Proben auf Getreidebasis mit einem durchschnittlichen Toxingehalt von 3,15 µg/kg (Maximum 21,7 µg/kg) im Verhältnis zu den Proben auf Milchbasis (Mittelwert 1,42 µg/kg; Maximum 10,4 µg/kg) höher belastet waren (Abb. 24).



**Abbildung 23:** Säuglings- und Kleinkindernahrung (ZEBS-Code 48xxxx): Vergleich der Untersuchungsjahre 2006 und 2007



**Abbildung 24:** Säuglings- und Kleinkindernahrung (ZEBS-Code 48xxxx): Vergleich der Toxinbelastung von Proben auf Milchbasis mit Proben auf Getreidebasis

Es waren 13 Säuglings- und Kleinkindernahrungs-Proben mit mehr als 5 µg/kg belastet. Dabei handelte es sich zehnmal um Brei auf Getreidebasis ohne Milch, einmal um Vollkorn-Milchbrei (10,4 µg/kg) und zweimal um Milchbrei mit Hafer (6,92 und 5,85 µg/kg). Unter den zehn hoch belasteten Getreidebrei-Proben waren neun Proben Getreidebrei mit Hafer (5,40 – 21,7 µg/kg) und ein Babymüsli-Brei (7,08 µg/kg). Den Spitzenwert von 21,7 µg/kg wies ein Getreidebrei mit Hafer und Aprikose auf.

### **3.2.4.6 Biere und Säfte**

Für flüssige Probenmatrices, in diesem Fall Biere und Säfte, musste das unter 3.2.2.2 dargestellte Extraktionsverfahren modifiziert werden:

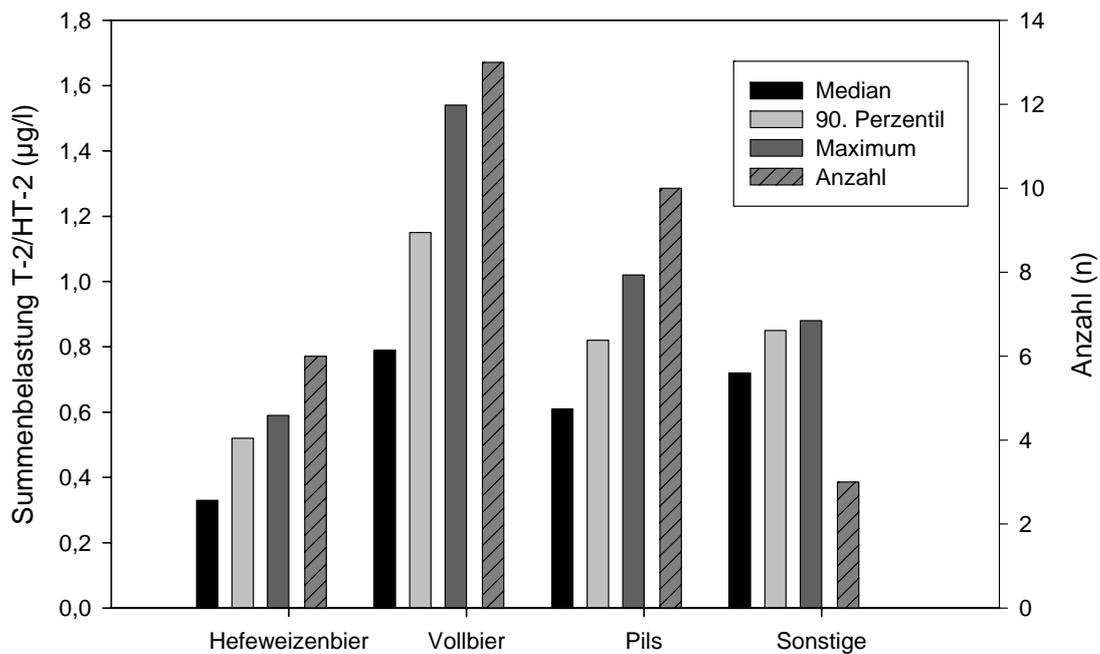
Die Proben wurden zuerst ca. 15 Minuten mittels Ultraschall entgast. Anschließend wurden 4 ml der entgasten Probe mit 3 ml Ethylacetat gemischt, zentrifugiert (2 000 x g, 4 °C, 15 min) und dann die Ethylacetatphase abgenommen. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Im Anschluss daran wurden die entnommenen organischen Phasen bei 55 °C eingedampft und der Rückstand in MeOH/PBS (10/90 v/v) aufgenommen. Abschließend wurden verschiedene Verdünnungsstufen in MeOH/PBS (10/90 v/v) angelegt und diese in den EIA eingesetzt.

Aufgrund des modifizierten Extraktionsverfahrens konnte der Probenverdünnungsfaktor auf einen Wert von 0,5 gesenkt werden. Dies resultierte in einer Nachweisgrenze von 70 pg/ml bei Verwendung der EIA-Variante A bzw. von 25 pg/ml in der T-2-spezifischen EIA-Variante B.

Die 40 untersuchten flüssigen Proben wiesen eine mediane T-2/HT-2 Summenbelastung von 0,58 µg/l auf, das 90. Perzentil lag bei 1,00 µg/l. Die Gruppe splittete sich in 32 Bier-Proben, 5 alkoholfreie Malzgetränke und 3 sonstige Proben. Die Bierproben, auf die im Folgenden noch genauer eingegangen wird, waren durchschnittlich mit 0,67 µg/l (0,21 – 1,54 µg/l) belastet. Bei den alkoholfreien Malzgetränken wurde ein mittlerer Toxingehalt von 0,15 µg/l (0,04 – 0,37 µg/l) und bei den sonstigen Proben ein Durchschnittswert von 0,73 µg/l (0,07 – 1,59 µg/l) festgestellt. Die Probe mit der absoluten Spitzenbelastung von 1,59 µg/l war hierbei ein als “Brottrunk” bezeichnetes alkoholfreies, enzymhaltiges Mischgetränk. Der hohe

Prozentsatz (95 % in EIA-Variante A) positiver Proben lässt sich auf die bereits beschriebenen niedrigeren Nachweisgrenzen zurückführen.

Es wurden 6 Hefeweizenbiere, 13 Vollbiere, 10 Pils und 3 sonstige Biere untersucht. Die Summenbelastungswerte der Hefeweizenbiere lagen zwischen 0,21 und 0,59  $\mu\text{g/l}$  (Mittelwert 0,36  $\mu\text{g/l}$ ). Pils war durchschnittlich mit 0,66  $\mu\text{g/l}$  (0,42 – 1,02  $\mu\text{g/l}$ ) belastet und bei den sonstigen Bierproben wurden Werte zwischen 0,49 und 0,88  $\mu\text{g/l}$  (Mittelwert 0,70  $\mu\text{g/l}$ ) nachgewiesen. Am höchsten belastet war die Gruppe der Vollbiere. Hier wurde eine mittlere Belastung von 0,82  $\mu\text{g/l}$  (0,41 – 1,54  $\mu\text{g/l}$ ) ermittelt. Die entsprechenden Medianwerte lagen zwischen 0,33 und 0,79  $\mu\text{g/l}$ , das 90. Perzentil zwischen 0,52 und 1,15  $\mu\text{g/l}$  (Abb. 25).



**Abbildung 25:** Vergleichende Darstellung der T-2/HT-2 Belastung verschiedener Biersorten

### 3.2.4.7 Vergleich von ökologischen und konventionellen Produkten

Da beim Konsumverhalten des Verbrauchers immer mehr Wert auf die ökologische Herkunft der Waren gelegt wird, wurde diesem Trend auch bei der Auswahl der Proben Rechnung getragen. Dabei wurde nicht berücksichtigt, ob die Waren aus „ökologischem“ oder „natürlichem“ Anbau stammten, oder ob sie die Präfixe „Öko“ oder „Bio“ trugen. Ausschlaggebend war die deutliche Abgrenzung zu konventionellen Produkten. Der Anteil der Proben aus ökologischer Herkunft an der Gesamtmenge der 800 Proben betrug 27,3 %. In Tab. 13 sind die wichtigsten Daten der Proben aus ökologischer Herkunft und der Proben aus konventioneller Herkunft gegenüber gestellt.

Von den 218 untersuchten Proben ökologischer Herkunft waren 95,4 % positiv, die durchschnittliche Belastung lag bei 3,05 µg/kg. Bei den 582 aus konventioneller Landwirtschaft stammenden Proben lag der Prozentsatz der positiven Proben bei 86,6 %, der mittlere Toxingehalt betrug 3,12 µg/kg. Es war also kein signifikanter Unterschied zwischen Waren aus ökologischer und Waren aus konventioneller Herstellung festzustellen.

**Tabelle 13:** Vergleich der T-2/HT-2 Belastung ökologischer und konventioneller Produkte

Produkt	n	% positiv	Mittelwert (µg/kg)	Median (µg/kg)	90. Perzentil (µg/kg)	Max. (µg/kg)
ökologisch	218	95,4	3,05	1,87	6,35	36,5
konventionell	582	86,6	3,12	1,12	8,16	51,0

n = Anzahl der Proben

% positiv = Prozentsatz der auf T-2/HT-2 positiv getesteten Proben

Max. = Maximalwert

## **4 DISKUSSION**

In den letzten Jahren rückte die potentielle Gesundheitsgefährdung durch Mykotoxine mehr und mehr in den Fokus des präventiven Verbraucherschutzes. Deshalb wurden innerhalb der EU eine ganze Reihe von Gutachten zum Vorkommen (Scientific Co-operation on Questions relating to Food, SCOOP) bzw. zur Toxizität von verschiedenen Mykotoxinen (wissenschaftlicher Lebensmittelausschuss, Scientific Committee on Food, SCF) in Auftrag gegeben. Im Zentrum des Interesses standen hierbei aufgrund ihrer hohen Inzidenz die Fusarientoxine (Fumonisine, Typ A und B Trichothecene, Zearalenon).

Grenzwerte wurden bereits für Fumonisine, ZEA und DON (Typ B Trichothecen) festgelegt, während es für T-2 und HT-2 Toxin bislang aufgrund bestehender Defizite im Hinblick auf die Verfügbarkeit validierter Analysensysteme und auf belastbare Expositionsdaten keine Höchstmengenregelung innerhalb der EU gibt. Die vom SCF für die Summe der beiden Toxine kalkulierte tägliche Aufnahmemenge (tolerable daily intake, TDI) liegt bei 0,06 µg/kg KGW und ist somit ungleich niedriger als die für DON (1 µg/kg KGW). Der sich hieraus ergebende Bedarf an sensitiven Analysensystemen und das bereits erwähnte Defizit an Daten zum Vorkommen von T-2 und HT-2 Toxin veranlasste das BMELV Ende 2005 einen Forschungsauftrag mit dem Titel "Verbesserung und Validierung der Analytik für Typ A Trichothecene (T-2 Toxin und HT-2 Toxin) sowie Vorkommen dieser Mykotoxine in Lebensmitteln des deutschen Marktes" zu vergeben. Im Rahmen dieses Forschungsauftrages wurden in der vorliegenden Arbeit Enzymimmuntests zum Nachweis der beiden relevanten Mykotoxine etabliert und optimiert und anschließend eine repräsentative Anzahl von Proben (n = 800) untersucht.

### **4.1 Analytik**

Um die tägliche Aufnahme von T-2 und HT-2 Toxin durch den deutschen Verbraucher realistisch einschätzen zu können, werden neben validen Analysenergebnissen v. a. auch sensitive Nachweisverfahren benötigt, da es ansonsten zu einer potentiellen Überschätzung der tatsächlichen Aufnahme kommen kann. Dies ist dadurch bedingt, dass aus statistischen Gründen bei den Berechnungen der täglichen Aufnahme analytisch negative Proben mit Werten entsprechend der halben Nachweisgrenze im Datensatz berücksichtigt werden. Vor

diesem Hintergrund war es ein wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit, ein immunchemisches Nachweisverfahren zu entwickeln, das den Nachweis von T-2 und HT-2 im pg/ml-Bereich erlaubt. Mit der auf einem polyklonalem Kaninchenantiserum basierenden EIA-Variante A gelang es, Nachweisgrenzen für den Summennachweis von T-2 und HT-2 in Pufferlösungen von 50 pg/ml zu realisieren. Die durchschnittliche 50%-Hemmungsdosis lag hierbei bei 198 pg/ml. Der Einsatz von monoklonalen Antikörpern (MAk) und eine konsekutive Testanordnung ermöglichten die Entwicklung eines für T-2 Toxin spezifischen EIAs (EIA-Variante B). Die Nachweisgrenze für T-2 in Pufferlösungen lag in EIA-Variante B bei 25 pg/ml, die 50%-Hemmungsdosis betrug durchschnittlich 64,6 pg/ml. Damit stellt das entwickelte Analyseverfahren einen wesentlichen Fortschritt zu dem 1994 von BARNAVETRÓ et al. publizierten EIA dar, dessen Nachweisgrenze für T-2 Toxin bei 430 pg/ml liegt. Auch die Sensitivität des von ESGIN et al. (1989) entwickelten EIAs zum Nachweis von T-2 Toxin (Nachweisgrenze 0,05 ng/ml) konnte übertroffen werden.

Zur Extraktion von T-2 und HT-2 Toxin aus verschiedenen Lebens- und Futtermittelmatrices werden häufig Acetonitril/Wasser oder Methanol/Wasser-Gemische in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. YOSHIKAWA et al. (2004) extrahierten 5 g gemahlene Weizen mit 40 ml Acetonitril/Wasser (85/15, v/v) und acetylierten den so gewonnenen Rohextrakt anschließend, bevor sie ihn zum Nachweis von T-2 und HT-2 Toxin in den auf MAks gegen Acetyl-T-2 basierenden ELISA einsetzten. Sie erreichten Wiederfindungsraten zwischen 99,8 und 112%, die Nachweisgrenze für T-2 in Lebensmittelproben betrug 30 µg/kg. In den eigenen Untersuchungen wurde ein Methanol/Wasser-Gemisch (70/30, v/v) zur Extraktion von T-2 und HT-2 aus Lebensmitteln eingesetzt, der sich eine Aufreinigung des Rohextraktes über Flüssig-Flüssig-Chromatographie mit Ethylacetat anschloss. Unter Berücksichtigung der Nachweisgrenzen der EIA-Varianten und des durch die Extraktion bedingten Probenverdünnungsfaktors ergab sich somit eine Nachweisgrenze von 0,5 µg/kg für T-2 und HT-2 (EIA-Variante A) bzw. von 0,2 µg/kg für T-2 (EIA-Variante B). Das entwickelte Nachweisverfahren für T-2 und HT-2 Toxin ist damit um den Faktor 60 sensitiver als das von YOSHIKAWA et al. (2004) vorgestellte Verfahren zum simultanen Nachweis von T-2 und HT-2 Toxin.

Für Inzidenzstudien sind validierte Analyseverfahren eine Grundvoraussetzung, da nur sie eine Konsistenz der erhobenen Daten und eine Vergleichbarkeit mit anderen Erhebungen gewährleisten. Deshalb wurden die im Rahmen des Verbundprojektes entwickelten und

etablierten Analysenverfahren sowohl laborintern, als auch in Ringversuchen mehrfach validiert. Laborintern wurden sowohl Wiederfindungsraten anhand von artifiziell kontaminierten Lebensmittelproben als auch die Wiederholpräzision anhand von Mehrfachuntersuchungen natürlich kontaminierter Proben bestimmt.

Die Wiederfindungsraten wurden in verschiedenen Lebensmittelmatrices (Weizenmehl, Hartweizennudeln, Kleinkindernahrung) bei unterschiedlichen Kontaminationsniveaus (1 – 20 µg/kg für T-2 bzw. 2 – 18 µg/kg für HT-2) bestimmt. Die erhaltenen Ergebnisse bestätigten die Wiederholbarkeit des Verfahrens, die durchschnittlichen Wiederfindungsraten betragen 81,7 % (T-2) bzw. 93,2 % (HT-2) und sind somit sehr gut mit den in der Literatur gemachten Angaben zur Extrahierbarkeit der beiden Typ A Trichothecene aus zerealienhaltigen Probenmatrices vergleichbar (RADOVÁ et al., 1998; KOTAL et al., 1999; MATEO et al., 2002; PASCALE et al., 2003; BERTHILLER et al., 2005; VISCONTI et al., 2005, SAGAWA et al., 2006; SULYOK et al., 2006, LATTANZIO et al., 2007). Die in der VO (EG) Nr. 401/2006 geforderten Leistungskriterien für die Bestimmung von T-2 und HT-2 Toxin (Wiederfindungsraten von 60 bis 130 %) wurden sogar in wesentlich niedrigeren Kontaminationsbereichen als in der Verordnung gefordert (50 – 250 µg/kg) erfüllt.

Die Wiederholbarkeit des Verfahrens konnte anhand von Mehrfachuntersuchungen natürlich kontaminierter Proben verschiedener Produktobergruppen untermauert werden. Die Proben deckten den relevanten Konzentrationsbereich (0,51 – 51,0 µg/kg in EIA-Variante A) ab. Die ermittelten durchschnittlichen Variationskoeffizienten lagen mit 14,2 % für die EIA-Variante A und 19,8 % für die EIA-Variante B durchaus in den für Enzymimmuntests üblichen Bereichen (SPINDELBÖCK, 2004).

Bei den als Ringversuch angelegten Laborvergleichsuntersuchungen wurde zum einen die Reproduzierbarkeit des EIA-Verfahrens in den verschiedenen Labors überprüft, zum anderen wurde das immunchemische Verfahren mit den physikalisch-chemischen Verfahren verglichen. Unabhängig von der Probenmatrix divergierten die EIA-Ergebnisse der verschiedenen Labors nur in sehr geringem Umfang. Selbst bei sehr niedrigen Kontaminationsbereichen (2,02 µg/kg) konnte in den Vergleichsuntersuchungen eine geringe relative Standardabweichung ( $RSD_R$ ) von 13,1 % erzielt werden. Beim Vergleich des EIAs mit den physikalisch-chemischen Verfahren (GC-ECD und LC-MS/MS) zeigte sich, dass die

Ergebnisse sehr gut miteinander korrelierten. Die Korrelationskoeffizienten lagen bei 0,99 (GC-ECD) bzw. bei 0,91 (LC-MS/MS).

Auch im Hinblick auf die absolut nachgewiesenen Toxinkonzentrationen konnte eine ausgezeichnete Übereinstimmung der Ergebnisse des Summennachweises zwischen den physikalisch-chemischen Verfahren und dem EIA nachgewiesen werden. Dies war aufgrund der Kreuzreaktivität von 44,5 % für HT-2 Toxin in der EIA-Variante A nicht zu erwarten. Eine mögliche Erklärung für das Phänomen, dass im EIA trotzdem sehr ähnliche Toxingehalte nachgewiesen wurden wie bei den chromatographischen Verfahren, ist die Existenz weiterer, bisher unbekannter T-2-Analoga, die mit dem polyklonalen Kaninchenantiserum kreuzreagieren. Bisher nicht veröffentlichte Ergebnisse einer Arbeitsgruppe aus Gießen unter der Leitung von Prof. USLEBER untermauern diese These. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass unter analytischen Gesichtspunkten das entwickelte EIA-Verfahren v. a. im Hinblick auf Kosten- und Zeitersparnis eine sehr gute Alternative zu den physikalisch-chemischen Verfahren darstellt.

Neben dem Clean-up über Flüssig-Flüssig-Verteilungschromatographie wurde ein immunaffinitätschromatographisches Verfahren etabliert. Die Immunaффinitätschromatographie ist seit Jahren auf dem Gebiet der Mykotoxin-Analytik weit verbreitet, für den Nachweis von T-2 und HT-2 Toxin wurden jedoch bislang nur sehr wenige Arbeiten veröffentlicht (KRSKA et al., 2001). Die durchschnittliche Antigenbindungskapazität der selbsthergestellten Immunosorbentien lag bei 826 ng T-2 Toxin pro 100 µl Gel. Mit den von PASCALE et al (2003) verwendeten kommerziell erhältlichen IAC-Säulen der Firma Vicam (T-2 TAG) konnten 1,6 µg T-2 je Säule gebunden werden. Die von VISCONTI et al. (2005) verwendeten IAC-Säulen (T-2 test<sup>TM</sup> HPLC, Vicam) zeigten eine Bindungskapazität von 1,4 µg T-2/HT-2 je Säule. Bei Berücksichtigung des geringeren Gelvolumens (100 µl) der selbst hergestellten IAC-Säulen dürften die verschiedenen Immunosorbentien sehr ähnliche Bindungskapazitäten aufweisen. Auch im Hinblick auf die Wiederfindungsraten konnte das "Eigenfabrikat" mit den kommerziell erhältlichen Säulen konkurrieren. Für HT-2 Toxin wurden trotz der geringeren Affinität des verwendeten MAk für dieses Toxin (3.2.1.3) Wiederfindungsraten von 85,8 % erzielt, PASCALE et al. (2003) und VISCONTI et al. (2005) berichteten für T-2 Toxin von Wiederfindungsraten im Bereich von 93 bzw. 90 %.

Im Laufe der vorliegenden Arbeit wurden auch Versuche unternommen, neben den bereits erwähnten immunchemischen Nachweisverfahren ein physikalisch-chemisches Verfahren zum Nachweis von T-2 und HT-2 Toxin zu etablieren (Ergebnisse nicht dargestellt). Hierfür wurden sowohl die von VISCONTI et al. (2005), als auch die von MARAGOS (2006) beschriebenen HPLC-Verfahren mit Fluoreszenz-Detektion überprüft. Mit beiden Methoden war es nicht möglich, saubere Chromatogramme zu erhalten, da mit dem verwendeten Derivatisierungsreagenz 1-Anthroylnitril eine Vielzahl von fluoreszierenden Verbindungen generiert wurden, deren Retentionszeiten sich z. T. mit denen von T-2 Toxin und HT-2 Toxin überlagerten. Daher konnten keine Eichgeraden für die Toxine erstellt werden. Die störenden Extra-Peaks traten auch bei toxinfreien Kontrollansätzen [Derivatisierungsreagenz und Lösungsmittel (Toluol) ohne Zusatz von Toxinstandard] auf. Weitere detailliertere Untersuchungen innerhalb des Forschungsverbundes zeigten, dass nur bestimmte Chargen des bei der Derivatisierung eingesetzten Lösungsmittels (Toluol) die für diesen Zweck erforderliche Reinheit aufweisen (LAUBER, pers. Mitteilung).

Neben dem vergleichsweise aufwendigen HPLC-MS-Verfahren, für das teure Geräte und geschultes Personal benötigt werden, stehen mit den entwickelten EIA-Verfahren einfache, schnelle und zuverlässige Analysensysteme zum Nachweis von T-2 und HT-2 Toxin zur Verfügung, die sich sehr gut zum Einsatz z. B. in Müllereien zur Qualitätssicherung eignen.

## **4.2 Vorkommen**

Zur Identifizierung der mit T-2 und HT-2 belasteten Lebensmittel des deutschen Marktes wurde in den Jahren 2006 und 2007 eine breitgefächerte Auswahl zerealienhaltiger Lebensmittel untersucht. Es wurde darauf geachtet, möglichst die gesamte Bandbreite der üblicherweise verzehrten Lebensmittel, sowie eine breite Auswahl an verschiedenen Geschäften (verschiedene Supermärkte, Großhandel, Reformhäuser, Bioläden, Drogeriemärkte), in denen die Proben eingekauft wurden, abzudecken. Ein besonderes Augenmerk wurde auf die Gruppe der Säuglings- und Kleinkindernahrung gelegt, da die entsprechende Konsumentengruppe besonders empfindlich gegenüber Mykotoxinen ist.

Von den insgesamt 800 untersuchten Proben waren 89 % mit T-2/HT-2 Toxin (im Summenachweis) belastet. Auch andere Arbeitsgruppen (PERKOWSKI et al., 1997; LANGSETH

und RUNDBERGET, 1999; SCHOLLENBERGER et al. 2006; MANKIEVIČIENE et al., 2007; SCUDAMORE et al., 2007) fanden eine sehr hohe Vorkommenshäufigkeit von T-2 und HT-2, jedoch lassen sich diese Arbeiten nicht direkt mit den eigenen Untersuchungen vergleichen, da sich diese Arbeiten z. T. nur auf bestimmte Getreide- bzw. Produktgruppen konzentrierten. Bei der Auswertung der von einer SCOOP-Arbeitsgruppe (2003) gesammelten Daten zur Vorkommenshäufigkeit von T-2 und HT-2 Toxin in den EU-Mitgliedsstaaten ergab sich hingegen bei insgesamt 3490 Proben nur eine Vorkommenshäufigkeit für T-2 Toxin von 20 %. Von 3032 auf HT-2 Toxin untersuchten Proben waren 14 % positiv. Dieser im Vergleich zu den eigenen Untersuchungen deutlich geringere Prozentsatz an positiven Proben lässt sich damit erklären, dass für die SCOOP-Erhebung Daten von vielen verschiedenen Labors mit zum Teil sehr hohen Nachweisgrenzen (> 50 ppb) zur Verfügung gestellt wurden.

Über alle Produktgruppen hinweg zeigte sich, dass haferhaltige Lebensmittel deutlich höher mit T-2 Toxin und HT-2 Toxin belastet sind als auf anderen Getreidesorten basierende Produkte. Dementsprechend enthielten die drei Produktgruppen mit der höchsten T-2/HT-2 Belastung, "Getreidekleie", "Getreideflocken und Grütze" und "Getreideerzeugnisse mit Zusätzen", hauptsächlich Produkte auf Haferbasis. Bei den Getreideflocken handelte es sich bei der Mehrzahl der Proben (26 von insgesamt 45 Proben) um Haferflocken, die durchschnittlich mit 17,1 µg/kg belastet waren, wohingegen der Median der gesamten Gruppe bei 5,52 µg/kg lag. Eine Haferflockenprobe wies mit 51,0 µg/kg auch den absoluten Höchstwert der gesamten Untersuchung auf. Die Gruppe "Getreideerzeugnisse mit Zusätzen" wurde hauptsächlich durch verschiedene Müslis mit Hauptbestandteil Haferflocken repräsentiert. So ist es auch nicht verwunderlich, dass diese Gruppe mit einem Median von 5,99 µg/kg die am zweithöchsten belastete Gruppe der Studie war. Auch bei der "Getreidekleie", die grundsätzlich eine vergleichsweise hohe Belastung aufwies, war Haferkleie deutlich stärker kontaminiert (Mittelwert 15,4 µg/kg) als beispielsweise Weizenkleie (Mittelwert 8,67 µg/kg). Bei der Untersuchung von Speisegetreide bestätigte sich, dass Hafer (Spitzenwert 17,1 µg/kg) ungleich höher belastet ist als Weizen (Mittelwert 0,98 µg/kg). Diese Tendenz setzte sich auch bei den Mehlsproben fort. Der Maximalwert bei Hafermehlsproben betrug 28,9 µg/kg, bei den Weizenmehlsproben hingegen nur 3,38 µg/kg. Auch in den Gruppen "Feine Backwaren" und "Getreidegrits und Frühstückszerealien" gingen die Spitzenbelastungen auf Haferprodukte zurück. So waren die Kekse auf Haferbasis mit 3,34 bis 14,0 µg/kg belastet und in den Frühstückszerealien auf Haferbasis konnten 5,59

bis 9,84 µg/kg T-2/HT-2 nachgewiesen werden. Sehr deutlich wurde die hohe Kontamination von Hafer auch in der Gruppe der “Säuglings- und Kleinkindernahrung”. Hier enthielten 13 Proben über 5 µg/kg T-2/HT-2, wovon 11 auf Haferbasis (5,40 – 21,7 µg/kg) waren. Auch andere Arbeitsgruppen (LANGSETH und RUNDBERGET, 1999; SCOOP, 2003; SCHOLLENBERGER et al., 2006; MANKIEVIČIENE et al., 2007; SCUDAMORE et al., 2007; PETTERSSON, 2008; EDWARDS, 2008) kamen zu dem Ergebnis, dass Hafer die Getreidesorte mit der höchsten T-2/HT-2 Belastung ist.

Es ist bekannt, dass sich Mykotoxine hauptsächlich in den äußeren Schichten des Korns (SCHOLLENBERGER et al., 2002; SCUDAMORE et al., 2007) nachweisen lassen. Dies spiegelte sich auch deutlich in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wider. So war die Gruppe “Getreidekleie” mit einer medianen Belastung von 8,09 µg/kg die Gruppe mit den höchsten Toxingehalten. Außerdem waren über alle Produktgruppen hinweg die Vollkornprodukte meist höher belastet, da hierbei auch die höher belasteten Randschichten des Korns verarbeitet werden. So wies ein Vollkornknäckebrötchen mit 21% Ballaststoffen 26,7 µg/kg T-2/HT-2 auf, eine Probe Vollkornnudeln war mit 12,1 µg/kg und eine Backmischung für Mehrkornbrot mit 8,79 µg/kg belastet. Auch in der Gruppe der “Feinen Backwaren” waren Vollkornprodukte tendenziell höher kontaminiert.

Analog zu den Ergebnissen der SCOOP-Erhebung (2003) zeigte sich auch in dieser Studie, dass Mais relativ häufig und relativ hoch mit T-2 und HT-2 Toxin belastet ist. Besonders Maismehl wies mit durchschnittlich 13,0 µg/kg (1,27 – 36,5 µg/kg) eine hohe Toxinbelastung auf. Allerdings wurde nur eine sehr geringe Probenzahl (n = 5) untersucht, so dass es weiterer Maismehl-Untersuchungen bedarf, um diese Tendenz zu bestätigen. Höhere Kontaminationen wurden aber auch bei anderen auf Mais basierenden Produkten gefunden. So konnten in einer Cornflakes-Probe aus Mais 6,01 µg/kg und in Mais-Knabber-Flips 4,83 µg/kg T-2/HT-2 nachgewiesen werden. Des Weiteren war Maisgrieß mit durchschnittlich 2,51 µg/kg deutlich höher belastet als andere Getreidegrieße, die mediane Belastung der gesamten Gruppe “Getreidegrieße” lag bei 0,76 µg/kg. Die relativ hohe Belastung von Mais ist darauf zurückzuführen, dass diese Getreideart sehr häufig von *Fusarien* befallen wird; auch für andere Fusarientoxine wie DON und Fumonisin wurde in früheren Untersuchungen eine starke Belastung festgestellt (ZIMMER et al., 2004; CURTUI et al., 2005).

Bei der Gruppe "Säuglings- und Kleinkindernahrung" wurde zwischen Produkten auf Getreidebasis und Produkten auf Milchbasis unterschieden. Die Proben auf Getreidebasis waren mit durchschnittlich 3,15 µg/kg (Maximum 27,1 µg/kg) höher belastet, als die Proben auf Milchbasis (Mittelwert 1,42 µg/kg; Maximum 10,4 µg/kg). Bei 13 % der Proben konnten T-2/HT-2-Konzentrationen von mehr als 5 µg/kg gefunden werden, die Spitzenbelastung eines haferhaltigen Getreidebreis lag bei 21,7 µg/kg. Vergleichbare Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen liegen nicht vor.

Im Gegensatz zu früheren Erhebungen zur Vorkommenshäufigkeit von DON bzw. Fumonisin (ZIMMER, 2003; SPINDELBÖCK, 2004) konnte im Rahmen der T-2/HT-2 Toxinanalysen beim Vergleich der Untersuchungsjahre kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. So wurden im Jahr 2006 in 92,6 % der Proben T-2/HT-2 nachgewiesen, im Jahr 2007 lag die Vorkommenshäufigkeit bei 86,4 %. Die Median-Belastung der 2006er Proben lag mit 1,65 µg/kg etwas über der Belastung der Proben aus 2007 (1,11 µg/kg).

Im Laufe der Studie zeigte sich, wie auch in anderen Arbeiten (LANGSETH und RUNDBERGET, 1999; SCHOLLENBERGER et al., 2006), dass HT-2 Toxin wesentlich häufiger vorkommt als T-2 Toxin. Von den 800 untersuchten Proben waren 716 im EIA zum Summennachweis von T-2 und HT-2 Toxin positiv, wovon jedoch nur 225 im T-2-spezifischen EIA positiv reagierten. Dies bedeutet, dass nur rund ein Drittel der Toxinbelastung auf T-2 Toxin zurückzuführen ist, die restlichen zwei Drittel werden durch HT-2 Toxin und eventuell durch andere kreuzreagierenden T-2-Abkömmlinge verursacht. Auch SCUDAMORE et al. (2007), die bei 12 untersuchten Haferproben das HT-2/T-2-Verhältnis berechneten, kamen zu einem ähnlichen Ergebnis. Das durchschnittliche Verhältnis von HT-2 zu T-2 Toxin lag bei 3,5:1.

In einigen Studien (EDWARDS & SCUDAMORE, 2007; GOTTSCHALK et al., 2007) wurde – wie auch schon früher bei anderen Trichothecenen (SPINDELBÖCK, 2004) – beobachtet, dass Produkte aus ökologischer Landwirtschaft weniger mit T-2 Toxin und HT-2 Toxin belastet sind als Produkte aus konventioneller Landwirtschaft. Diese Tendenz konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Die Inzidenz lag mit 95,4 % (ökologischer Anbau) bzw. 86,6 % (konventionelle Landwirtschaft) in einem ähnlichen Größenbereich, die Mittelwerte waren fast identisch (3,05 µg/kg bei ökologischem Ursprung, 3,12 µg/kg bei konventionellem Ursprung). Jedoch war in der Gruppe der Lebensmittel aus konventioneller

Landwirtschaft der Prozentsatz an hoch kontaminierten Proben höher: 7,57 % der untersuchten Lebensmittelproben dieser Kategorie wiesen Toxingehalte von über 10 µg/kg auf, 3,27 % waren sogar mit mehr als 20 µg/kg belastet. Die entsprechenden Werte für die Ökoprodukte lagen bei 4,13 % (> 10 µg/kg) bzw. bei 0,46 % (> 20 µg/kg). Dies spiegelt sich auch in den jeweiligen Werten des 90. Perzentils wider: 6,35 µg/kg bei Ökoprodukten, 8,16 µg/kg bei konventionellen Produkten.

### **4.3 Belastung des deutschen Verbrauchers**

Anhand der ermittelten Toxingehalte der untersuchten Lebensmittel ist eine Einschätzung der Relevanz des Beitrags einzelner Lebensmittel an der Gesamtaufnahmemenge von T-2/HT-2 Toxin möglich. Da jeder Verbraucher eine Mischung verschiedener Lebensmittel zu sich nimmt und der TDI durch eine einzelne Lebensmittelgruppe nicht bereits erheblich ausgeschöpft sein sollte, ist es für die Bewertung interessant, diejenige Verzehrsmenge zu ermitteln, die erforderlich ist, um 10 % des TDI-Wertes (0,06 µg/kg KGW/Tag) auszuschöpfen. Für einen Erwachsenen mit einem Durchschnittsgewicht von 68,5 kg Körpergewicht ergibt sich entsprechend den Vorgaben der SCF (2001) eine maximal zulässige tägliche Aufnahmemenge von 4,11 µg, d. h. der 10 %-Wert liegt somit bei 0,411 µg. Bereits mit dem Verzehr von 27 g Haferflocken (mediane Belastung 15,1 µg/kg) bzw. von 30 g Haferkleie (mediane Belastung 13,7 µg/kg) würden 10 % des TDI's ausgeschöpft. Bei Weizenkleie (mediane Belastung 5,97 µg/kg) und "Getreideerzeugnissen mit Zusätzen" (mediane Belastung 5,99 µg/kg), reichen ebenfalls schon relativ geringe Mengen (69 g), um 10 % des TDI-Wertes zu erreichen. Dagegen werden bei "Brot und Kleingebäcken", bei "Feinen Backwaren" und bei "Teigwaren" erst mit relativ großen Verzehrsmengen von 300 g, 388 g und 285 g 10 % des TDI-Wertes ausgeschöpft. Diese Lebensmittel stellen also im Gegensatz zu den mit DON gemachten Erfahrungen (CURTUI et al., 2005) trotz der hohen Kontaminationsfrequenz für Erwachsene keine offensichtliche relevante Quelle für die T-2 bzw. HT-2 Toxin-Aufnahme dar.

Ein anderer Ansatz für die Bewertung der Lebensmittelbelastung konzentriert sich darauf, ob durch die Toxinmenge, die der Verbraucher mit der üblichen Verzehrsmenge eines Lebensmittels zu sich nimmt, eine Ausschöpfung des TDI's erreicht wird. So ist Hafer zwar deutlich höher belastet als Weizen, trägt aber durch seine niedrige Verzehrsmenge von

durchschnittlich 2 kg/Person/Jahr (MLR Baden-Württemberg, 2003) kaum zur Gesamtbelastung des Verbrauchers bei. Die Deutschen verzehren jedoch pro Person jährlich durchschnittlich 53 kg Weichweizen und 4 kg Hartweizen. Daraus errechnet sich ein durchschnittlicher Tageskonsum von 156 g Weizen, was unter Berücksichtigung der medianen Toxinbelastung von Weizen (0,98 µg/kg) einer täglichen T-2/HT-2-Aufnahme von 0,15 µg entspricht. Dies liegt weit unter dem TDI eines Erwachsenen (68,5 kg KGW; 4,11 µg T-2/HT-2 Toxin/d). Auch für die jeweilige Produktgruppe ergibt sich ein ähnliches Bild. So isst jeder erwachsene Deutsche im Durchschnitt ca. 220 g Brot am Tag. Bei Berücksichtigung der medianen T-2/HT-2-Belastung (1,37 µg/kg) errechnet sich daraus eine tägliche Toxinaufnahme von 0,30 µg über Brot und Broterzeugnisse. Eine durchschnittliche Portion Nudeln von 100 g bedeutet für den Verbraucher eine Toxinaufnahme von 0,14 µg, ein Erwachsener, der täglich eine Portion Müsli (ca. 70 g) zum Frühstück konsumiert, schöpft damit 1/10 seines TDI-Wertes (0,41 µg) aus. Der Konsum dieser Lebensmittel führt also bei Erwachsenen zu keiner nennenswerten Toxinbelastung.

Etwas kritischer ist die Situation bei Kindern und v. a. bei Säuglingen und Kleinkindern zu bewerten, da aufgrund des geringeren Körpergewichtes und der höheren relativen Verzehrsmenge pro kg KGW der TDI schon bei geringerer Belastung der Lebensmittel ausgeschöpft wird. Geht man davon aus, dass ein achtjähriges Kind durchschnittlich 27 kg wiegt, so resultiert daraus ein TDI von 1,62 µg. Bereits mit dem Verzehr von 50 g Müsli, 3 Scheiben Brot, 100 g Nudeln und 80 g feinen Backwaren werden bei Berücksichtigung der Medianbelastungen knapp die Hälfte (0,73 µg) des TDI-Wertes ausgeschöpft. Legt man jedoch das 90. Perzentil der Toxinbelastung zugrunde, wird bei dem oben aufgeführten Verzehr von Müsli, Brot, Nudeln und feinen Backwaren der TDI bereits überschritten (1,71 µg).

Auch für Kleinkinder zwischen vier und sieben Monaten (durchschnittliches Körpergewicht von 8 kg) besteht bereits beim Verzehr von zwei Babybrei-Mahlzeiten von jeweils 150 – 200 ml (entspricht ca. 50 g Trockenpulver) pro Tag ein erhöhtes Risiko. Bei Berücksichtigung des 90. Perzentils von Getreidebrei errechnet sich eine tägliche T-2/HT-2-Aufnahme von 0,08 µg/kg KGW, was eine Überschreitung des TDI-Wertes (0,06 µg/kg KGW) bedeutet. Spitzenbelastungen, wie sie in einer Getreidebrei-Probe mit Hafer und Aprikose gefunden wurden (21,7 µg/kg), würden zu einer 4,5-fache Überschreitung des TDI-Wertes führen.

Abschließend lässt sich feststellen, dass robuste Analyseverfahren etabliert wurden, die die zuverlässige Untersuchung von Lebensmitteln unterschiedlichster Zusammensetzung erlauben und somit für den Routineeinsatz geeignet sind. Die vorliegende Arbeit generierte als Teil des laufenden Forschungsprojektes wertvolles Datenmaterial zur T-2/HT-2 Belastungssituation und ermöglicht zusammen mit den von den Projektpartnern bereitgestellten Datensätzen in Zukunft eine fundierte Beurteilung der Belastung des deutschen Verbrauchers mit T-2 Toxin und HT-2 Toxin.

## 5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung, Etablierung und Validierung enzymimmunologischer Verfahren zum Nachweis von T-2 Toxin und HT-2 Toxin, sowie dem Vorkommen dieser Toxine in Lebensmitteln des deutschen Marktes.

Es wurde sowohl ein Enzymimmuntest (EIA) zum Summennachweis von T-2 und HT-2 Toxin (EIA-Variante A), als auch ein T-2 spezifischer EIA (EIA-Variante B) entwickelt. Die entsprechenden Nachweisgrenzen lagen bei 70 pg/ml (EIA-Variante A) bzw. 25 pg/ml (EIA-Variante B).

Die getreidehaltigen Proben wurden mittels eines Methanol/Wasser-Gemisches (70/30 v/v) extrahiert und anschließend entweder über Flüssig-Flüssig-Verteilungschromatographie mit Ethylacetat oder über Immunaффinitätschromatographie aufgereinigt. Mit beiden Clean-up-Varianten lagen die in dotierten Lebensmittelproben ermittelten Wiederfindungsraten sowohl für T-2, als auch für HT-2 bei über 80 %. Die Nachweisgrenzen in Lebensmitteln lagen bei 0,5 µg/kg (EIA-Variante A) bzw. bei 0,2 µg/kg (EIA-Variante B). Die Validierung der Verfahren erfolgte sowohl laborintern, als auch in Laborvergleichsuntersuchungen. Laborintern wurde die Reproduzierbarkeit anhand von Mehrfachuntersuchungen natürlich kontaminierter Proben überprüft und nachgewiesen. In den Laborvergleichsuntersuchung wurde einerseits die Reproduzierbarkeit der EIA-Verfahren in verschiedenen Labors belegt, zum anderen eine gute Korrelation der EIA-Ergebnisse mit den Ergebnissen der GC und HPLC nachgewiesen ( $r^2 > 0,91$ ).

Im Rahmen eines vom BMELV geförderten Forschungsprojektes wurden in den Jahren 2006 und 2007 insgesamt 800 Lebensmittelproben auf T-2 und HT-2 Toxin untersucht, davon erwiesen sich 89 % als positiv, HT-2 war hierbei das quantitativ dominierende Toxin. Der Mittelwert der Summenbelastung aller untersuchter Proben betrug 3,10 µg/kg, die 50. und 90. Perzentile lagen bei 1,36 und 7,50 µg/kg. Höhere T-2/HT-2-Konzentrationen wurden v. a. in Haferprodukten nachgewiesen, der Maximalwert betrug 51,0 µg/kg.

Bei Erwachsenen wird die tolerierbare tägliche Aufnahmemenge (TDI) von T-2 und HT-2 in der Regel nur zu etwa 10 % ausgeschöpft, während es bei Kindern und v. a. bei Kleinkindern relativ leicht zu einer Ausschöpfung oder sogar Überschreitung des TDIs kommt.

## SUMMARY

### **Development and validation of enzyme immunoassays for detection of T-2 toxin and HT-2 toxin, as well as the occurrence of these mycotoxins in food distributed on the German market**

This paper describes the development, establishment and validation of enzyme immunoassays for detection of T-2 toxin and HT-2 toxin, as well as the occurrence of these mycotoxins in food distributed on the German market.

An enzyme immunoassay (EIA) for simultaneous detection of T-2 and HT-2 (EIA version A) and an EIA for specific detection of T-2 (EIA version B) were developed. The detection limits were 70 pg/ml (EIA version A) and 25 pg/ml (EIA version B).

Cereal-based samples were extracted with a mixture of methanol/water (70/30 v/v) before purification by either liquid-liquid-partition or by immunoaffinity clean-up. After examination of food samples spiked with T-2 or HT-2 toxin, recovery rates > 80 % were obtained with detection limits of 0,5 µg/kg (EIA version A) and 0,2 µg/kg (EIA version B). Method validation was performed in-house and in interlaboratory studies. In-house the reproducibility was verified by repetition analysis of naturally contaminated samples. In interlaboratory studies reproducibility of the EIAs was shown and good correlation between EIA results and results obtained by GC and HPLC was achieved ( $r^2 > 0,91$ ).

In 2006 and 2007 a total of 800 food products were analyzed in a survey supported by the Federal Ministry of Nutrition, Agriculture and Consumer Protection (BMELV), revealing positive results for 89 % of the examined samples and HT-2 being the quantitatively dominating toxin. The average T-2/HT-2 contamination level of all analyzed samples was 3,10 µg/kg, the 50<sup>th</sup> and 90<sup>th</sup> percentiles were 1,36 and 7,50 µg/kg, respectively. Higher toxin levels were found in oat-based products with a maximum value of 51,0 µg/kg.

Adults normally reach only 10 % of the tolerable daily intake (TDI) of T-2 and HT-2, whereas the TDI is easily exhausted or even exceeded for children and especially for infants.

**6 LITERATURVERZEICHNIS**

BAMBURG, J. R. und F. M. STRONG (1971):

12,13-epoxytrichothecenes

In: S. KADIS, A. CIEGLER und A. J. AJL (Hrsg.)

Microbial Toxins Vol. 7

Academic Press, New York, pp. 207 – 292

BAMBURG, J. R., N. W. RIGGS und F. M. STRONG (1968):

The structures of toxins from two strains of *Fusarium tricinctum*

Tetrahedron 24, 3329 – 3336

BARNA-VETRÓ, I., A. GYÖNGYÖSI und L. SOLTI (1994):

Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay of *Fusarium* T-2 and Zearalenone toxins in cereals

Appl. Environ. Microbiol. 60, 729 – 731

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

Strategien zur Vermeidung von Mykotoxinen im Getreide

Gesunde Pflanzen 55, 125 - 135

BEETON, S. und A. T. BULL (1989):

Biotransformation and detoxification of T-2 toxin by soil and freshwater bacteria

Appl. Environ. Microbiol. 55, 190 – 197

BERGMANN, F., D. SOFFER und B. YAGEN (1988):

Cerebral toxicity of the trichothecene toxin T-2, of the products of its hydrolysis and of some related toxins

Toxicon 26, 923 - 930

BERTHILLER, F., R. SCHUHMACHER, G. BUTTINGER und R. KRŠKA (2005):

Rapid simultaneous determination of major type A- and B-trichothecenes as well as zearalenone in maize by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

J. Chromatogr. A 1062, 209 – 216

BOUAZIZ, C., S. ABID-ESSEFI, A. BOUSLIMI, E. EL GOLLI und H. BACHA (2006):

Cytotoxicity and related effects of T-2 toxin in cultured Vero cells

Toxicon 48, 343 – 352

CARSON, M. S. und T. K. SMITH (1983):

Role of Bentonite in prevention of T-2 toxicosis in rats

J. Anim. Sci. 57, 1498 – 1506

CHEN, J., Y. CHU, J. CAO, Z. YANG, X. GUO und Z. WANG (2006):

T-2 toxin induces apoptosis, and selenium partly blocks, T-2 toxin induced apoptosis in chondrocytes through modulation of the Bax/Bcl-2 ratio

Food Chem. Toxicol. 44, 567 – 573

CONRADY-LORCK, S., M. GAREIS, X.-C. FENG, W. AMSELGRUBER, W. FORTH und B. FICHTL (1988):

Metabolism of T-2 toxin in vascularly autoperfused jejunal loops of rats

Toxicol. Appl. Pharm. 94, 23 – 33

CORLEY, R. A., S. P. SWANSON und W. B. BUCK (1985):

Glucuronide conjugates of T-2 toxin and metabolites in swine bile and urine

J. Agric. Chem. 33, 1085 – 1089

CORLEY, R. A., S. P. SWANSON, G. J. GULLO, L. JOHNSON, V. R. BEASLEY und W. B. BUCK (1986):

Disposition of T-2 toxin, a trichothecene mycotoxin, in intravascularly dosed swine

J. Agric. Food Chem. 34, 868 – 875

CREPPY, E. E. (2002):

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

Toxicol. Lett. 127, 19 – 28

CUNDLIFFE, E. und J. E. DAVIES (1977):

Inhibition of initiation, elongation and termination of eukaryotic protein synthesis by trichothecene fungal toxins

Antimicrob. Agents Chemother. 11, 491 – 499

CURTUI, V., E. USLEBER, R. DIETRICH, J. LEPSCHY und E. MÄRTLBAUER (1998):

A survey on the occurrence of mycotoxins in wheat and maize from western Romania

Mycopathol. 143, 97 – 103

CURTUI, V., A. BROCKMEYER, R. DIETRICH, O. KAPPENSTEIN, H. KLAFFKE, J. LEPSCHY, E. MÄRTLBAUER, E. SCHNEIDER, C. SEIDLER, G. THIELERT, E. USLEBER, R. WEBER und J. WOLFF (2005):

Deoxynivalenol in Lebensmitteln

Mycotox. Res. 21, 83 – 88

DÄNICKE, S. und S. DÖLL (2003):

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

Kurzfassungen/Abstracts des 25. Mycotoxin-Workshops, 19. – 21. Mai, Giessen

DALL'ASTA, C., G. GALAVERNA, A. BIANCARDI, M. GASPARINI, S. SFORZA, A. DOSSENA und R. MARCHELLI (2004):

Simultaneous liquid chromatography-fluorescence analysis of type A and type B trichothecenes as fluorescent derivatives via reaction with coumarin-3-carbonyl chloride

J. Chromatogr. A 1047, 241 – 247

DELMULLE, B., S. DE SAEGER, A. ADAMS, N. DE KIMPE und C. VAN PETEGHEM (2006):

Development of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of 16 mycotoxins on cellulose filters and in fungal cultures

Rapid Commun. Mass Spectrom. 20, 771 – 776

D'MELLO, J. P. F., A. M. C. MACDONALD, D. POSTEL, W. T. P. DIJKSMA, A. DIJARDIN und C. M. PLACINTA (1998):

Pesticide use and mycotoxin production in *Fusarium* and *Aspergillus* phytopathogens  
Europ. J. Plant Pathol. 104, 741 – 751

EDRINGTON, T. S., L. F. KUBENA, R. B. HARVEY und G. E. ROTTINGHAUS (1997):

Influence of a superactivated charcoal on the toxic effects of aflatoxin or T-2 toxin in growing broilers

Poultry Sci. 76, 1205 – 1211

EDWARDS, S. (2008):

Impact of agronomy on *Fusarium* mycotoxin content of wheat and oats  
5<sup>th</sup> *Fusarium* toxin forum, January 10 – 11<sup>th</sup> 2008, Brussels

EDWARDS, S. und K. SCUDAMORE (2007):

*Fusarium* mycotoxins in UK oats – Impact of agronomy and processing  
Kurzfassungen/Abstracts des 29. Mycotoxin-Workshops, 14. – 16. Mai, Fellbach

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

*Fusarium* toxins in cereals – a risk assessment.

Nordic Council of Ministers; Tema Nord 1998: 502, pp. 7 - 44; Copenhagen

ESGIN, S., E. MÄRTLBAUER und G. TERPLAN (1989):

Entwicklung und Anwendung eines enzymimmunologischen Verfahrens zum Nachweis von T-2 Toxin in Milch

Arch. Lebensmittelhyg. 40, 97 – 120

FORGACS, J. und W. CARLL (1962):

Mycotoxicoses

Adv. Vet. Sci. 7, 273 - 293

- FURLONG, E. B., L. M. V. SOARES, C. C. LASCA und E. Y. KOHARA (1995):  
Mycotoxins and fungi in wheat harvested during 1990 in test plots in the state of Sao Paulo, Brazil  
*Mycopathol.* 131, 185 – 190
- GENTILI, A., F. CARETTI, G. D'ASCENZO, L. MAINERO ROCCA, S. MARCHESE, S. MATERAZZI und D. PERRET (2007):  
Simultaneous determination of trichothecenes A, B, and D in maize food products by LC-MS-MS  
*Chromatographia* 66, 669 - 676
- GOTTSCHALK, C., J. BARTHEL, G. ENGELHARDT, J. BAUER und K. MEYER (2007):  
Occurrence of Type A trichothecenes in conventionally and organically produced oats and oat products  
*Mol. Nutr. Food Res.* 51, 1547 – 1553
- HACK, R., E. MÄRTLBAUER und G. TERPLAN (1989):  
A monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for the detection of T-2 at picogram levels  
*Lett. Appl. Microbiol.* 9, 133 – 135
- HÄUBL, G., F. BERTHILLER, C. HAMETNER, J. RECHTHALER, G. JAUNECKER, M. FREUDENSCHUSS, R. KRŠKA und R. SCHUHMACHER (2007):  
Characterization of (<sup>13</sup>C<sub>24</sub>) T-2 toxin and its use as an internal standard for the quantification of T-2 toxin in cereals with HPLC-MS/MS  
*Anal. Bioanal. Chem.* 389, 931 – 940
- HSU, I.-C., E. B. SMALLEY, F. M. STRONG und W. E. RIBELIN (1972):  
Identification of T-2 toxin in moldy corn associated with a lethal toxicosis in dairy cattle  
*Appl. Microbiol.* 24, 684 – 690

HUANG, P., K. AKAGAWA, Y. YOKOYAMA, K. NOHARA, K. KANOB und K. MORIMOTO (2007):

T-2 toxin initially activates caspase-2 and induces apoptosis in U937 cells  
Toxicol. Lett. 170, 1 – 10

JARADAT, Z. W., B. VILÀ und R. R. MARQUARDT (2006):

Adverse effects of T-2 toxin on chicken lymphocytes blastogenesis and its protection with Vitamin E  
Toxicol. 225, 90 – 96

JECFA: JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES (2001):

Fifty-sixth meeting  
WHO Food Additives Series No 47

JIMÉNEZ, M., J. J. MATEO und R. MATEO (2000):

Determination of type A trichothecenes by high-performance liquid chromatography with coumarin-3-carbonyl chloride derivatisation and fluorescence detection  
J. Chromatogr. A. 870, 473 – 481

JOHNSEN, H., E. ODDEN, O. LIE, B. A. JOHNSEN und F. FONNUM (1986):

Metabolism of T-2 toxin by rat liver carboxylesterase  
Biochem. Pharmacol. 35, 1469 – 1473

JOHNSEN, H., E. ODDEN, B. A. JOHNSEN und F. FONNUM (1988):

Metabolism of T-2 toxin by blood cell carboxylesterase  
Biochem. Pharmacol. 37, 3193 – 3197

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

Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria  
Appl. and Environ. Microbiol. 47, 1070 – 1073

KOCH, P. (2004):

State of the art of trichothecenes analysis

Toxicol. Lett. 153, 109 – 112

KOTAL, F., K. HOLADOVÁ, J. HAJŠLOVÁ, J. POUSTAKA und Z. RADOVÁ (1999):

Determination of trichothecenes in cereals

J. Chromatogr. A 830, 219 – 225

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

Fres. J. Anal. Chem. 371, 285 – 299

LABUDA, R., A. PARICH, F. BERTHILLER und D. TANČINOVÁ (2005):

Incidence of trichothecenes and zearalenone in poultry feed mixtures from Slovakia

Int. J. Food Microbiol. 105, 19 – 25

LAFARGE-FRAYSSINET, C., K. CHAKOR, P. LAFONT und C. FRAYSSINET (1990):

Transplacental transfer of T-2 toxin: pathological effect

J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. 10, 64 – 68

LANGSETH, W. und T. RUNDBERGET (1998):

Instrumental methods for determination of nonmacrocylic trichothecenes in cereals, foodstuff and cultures

J. Chromatogr. A 815, 103 – 121

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

The occurrence of HT-2 toxin and other trichothecenes in Norwegian cereals

Mycopathol. 147, 157 – 165

LATTANZIO, V. M. T., M. SOLFRIZZIO, S. POWERS und A. VISCONTI (2007):

Simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A and *Fusarium* toxins in maize by liquid chromatography/tandem mass spectrometry after multitoxin immunoaffinity cleanup

Rap. Commun. Mass Spectrom. 21, 3253 – 3261

LE DRÉAN, G., M. AUFFRET, P. BATINA, F. ARNOLD, Y. SIBIRIL, D. ARZUR und D. PARENT-MASSIN (2005):

Myelotoxicity of trichothecenes and apoptosis: An in vitro study on human cord blood CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitors

Toxicol. in Vitro 19, 1015 – 1024

LI, M., J. R. HARKEMA, Z. ISLAM, C. F. CUFF und J. J. PESTKA (2006):

T-2 toxin impairs murine immune response to respiratory reovirus and exacerbates viral bronchiolitis

Toxicol. Appl. Pharmacol. 217, 76 – 85

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

Erfahrungen bei der Anwendung von Immunoassays zum Nachweis von Mykotoxinen in Lebensmitteln

Arch. Lebensmittelhyg. 42, 1 - 24

MANKIEVIČIENE, A., B. BUTKUTE, Z. DABKEVIČIUS und S. SUPRONIENE (2007):

*Fusarium* mycotoxins in Lithuanian cereals from the 2004 – 2005 harvests

Ann. Agric. Environ. Med. 14, 103 – 107

MARAGOS, C. M. (2006):

Measurement of T-2 and HT-2 toxins in eggs by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection

J. Food Protect. 69, 2773 – 2776

MATEO, J. J., R. MATEO, M. J. HINOJO, A. LLORENS und M. JIMÉNEZ (2002):

Liquid chromatographic determination of toxigenic secondary metabolites produced by *Fusarium* strains

J. Chromatogr. A 955, 245 – 256

MATTHIES, A., A. FLATTER, M. SEMAR, H. BLEIHOLDER und K. OPPITZ (2000):

*Fusarium* in wheat: importance and toxin production in the field – possibilities and limits of fungicide treatments

Proceedings des 22. Mycotoxin-Workshops, 5. – 7. Juni, Bonn

MAYCOCK, R. und D. UTLEY (1985):

Analysis of some trichothecene mycotoxins by liquid chromatography

J. Chromatogr. 347, 429 – 433

McKEAN, C., L. TANG, M. BILLAM, M. TANG, C. W. THEODORAKIS, R. J. KENDALL und J.-S. WANG (2006):

Comparative acute and combinative toxicity of aflatoxin B1 and T-2 toxin in animals and immortalized human cell lines

J. Appl. Toxicol. 26, 139 – 147

MIDDLEBROOK, J. L. und D. L. LEATHERMAN ( 1989):

Binding of T-2 Toxin to Eukaryotic Cell Ribosomes

Biochem. Pharmacol. 38, 3103 – 3110

MINISTERIUM FÜR ERNÄHRUNG UND LÄNDLICHEN RAUM BADEN-WÜRTTEMBERG (2003):

Getreide – Information für Verbraucher

[http://www.mlr.baden-wuerttemberg.de/mlr/allgemein/Bro\\_Getreide\\_PDF.pdf](http://www.mlr.baden-wuerttemberg.de/mlr/allgemein/Bro_Getreide_PDF.pdf)

(Stand 18.03.2008)

MIROCHA, C. J. und S. PATHRE (1973):

Identification of the Toxic Principle in a Sample of Poaeufusarin

Appl. Microbiol. 26, 719 – 724

MÜLLER, H.-M. und K. SCHWADORF (1993):

A survey of the natural occurrence of *Fusarium* toxins in wheat grown in a southwestern area of Germany

Mycopathol. 121, 115 – 121

MÜLLER, H.-M., J. REIMANN, U. SCHUMACHER und K. SCHWADORF (1997):

Natural occurrence of *Fusarium* toxins in barley harvested during five years in an area of southwest Germany

Mycopathol. 137, 185 – 192

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

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

Proceedings des 22. Mycotoxin-Workshops, 5. – 7. Juni, Bonn

OLDENBURG, E., J. BRUNOTTE und J. WEINERT (2006):

Strategien zur Reduzierung des Fusarientoxinrisikos im Getreide durch variierte Bodenbearbeitungsverfahren und Sortenwahl

Proceedings of the 28th Mycotoxin-Workshop, 29 – 31<sup>th</sup> May, Bydgoszcz, Polen

OLIFSON, L. E. (1972):

To the question of toxic steroids by microscopic fungi, *Fusarium Sporotrichiella* Bilai

Proceedings of the symposium on mycotoxins, p. 17, Academy of Sciences of Ukrainian S. S.

R. Kiev, Oct. 3 – 9

Zitiert nach:

MIROCHA, C. J. und S. PATHRE (1973):

Identification of the Toxic Principle in a Sample of Poaefusarin

Appl. Microbiol. 26, 719 – 724

PACE, J. G., M. R. WATTS, E. P. BURROWS, R. E. DINTERMAN, C. MATSON, E.C. HAUER und R. W. WANNEMACHER JR. (1985):

Fate and distribution of <sup>3</sup>H-labeled T-2 mycotoxin in guinea pigs

Toxicol. Appl. Pharmacol. 80, 377 – 385

PARENT-MASSIN, D. (2004):

Haematotoxicity of trichothecenes

Toxicol. Lett. 153, 75 – 81

PASCALE, M., M. HAIDUKOWSKI und A. VISCONTI (2003):

Determination of T-2 toxin in cereal grains by liquid chromatography with fluorescence detection after immunoaffinity column clean-up and derivatization with 1-anthrolylnitrile

J. Chromatogr. A 989, 257 – 264

PERKOWSKI, J., H. JELEŃ, I. KIECANA und P. GOLIŃSKI (1997):

Natural contamination of spring barley with group A trichothecene mycotoxins in south-eastern Poland

Food Addit. Contam. 14, 321 – 325

PETTERSSON, H. (2008):

T-2 and HT-2 toxins in oats and oat products

5<sup>th</sup> Fusarium toxin forum, January 10 – 11<sup>th</sup> 2008, Brussels

PFEIFFER, R. L., S. P. SWANSON und W. B. BUCK (1988):

Metabolism of T-2 toxin in rRats: Effects of dose, route and time

J. Agric. Food Chem. 36, 1227 – 1232

RADOVÁ, Z., K. HOLADOVÁ und J. HAJŠLOVÁ (1998):

Comparison of two clean-up principles for determination of trichothecenes in grain extract

J. Chromatogr. A 829, 259 – 267

RAFAL, P. S. TUBOLY, A. BATTA, P. TILLY, A. VANYI, Z. PAPP, L. JAKAB und E. TURY (1995):

Effect of various levels of T-2 toxin in the immune system of growing pigs

Vet. Rec. 136, 511 – 514

RICHARD, J. L. (2007):

Some major mycotoxins and their mycotoxicosis – An overview

Int. J. Food Microbiol. 119, 3 – 100

ROBISON, T. S., C. J. MIROCHA, H. J. KURTZ, J. C. BEHREND, G. A. WEAVER und M. S. CHI (1979a):

Distribution of Tritium-labeled T-2 toxin in swine

J. Agric. Food Chem. 27, 1411 - 1413

ROBISON, T. S., C. J. MIROCHA, H. J. KURTZ, J. C. BEHRENS, M. S. CHI, G. A. WEAVER und S. D. NYSTROM (1979b):

Transmission of T-2 toxin into bovine and porcine milk

J. Dairy Sci. 62, 637 – 641

SAGAWA, Y., T. TAKINO und S. KUROGOCHI (2006):

A simple method with liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the determination of the six trichothecene mycotoxins in rice medium

Biosci. Biotechnol. Biochem. 70, 230 – 236

SCHOLLENBERGER, M., H. TERRY-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

SCHOLLENBERGER, M., W. DROCHNER, M. RÜFLE, S. SUCHY, H. TERRY-JARA und H.-M. MÜLLER (2005):

Trichothecene toxins in different groups of conventional and organic bread of the German market

J. Food Compos. Anal. 18, 69 – 78

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

Natural occurrence of 16 *Fusarium* toxins in grains and feedstuff of plant origin from Germany

Mycopathol. 161, 43 – 52

SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD OF THE EUROPEAN COMMISSION (SCF) (2001):

Opinion of the Scientific Committee on Food on *Fusarium* toxins

Part 5: T-2 Toxin and HT-2 Toxin, 30. May 2001

[http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out88\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out88_en.pdf) (Stand 19.03.2008)

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://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out123\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out123_en.pdf) (Stand 19.03.2008)

SCOOP (2003):

Reports 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://ec.europa.eu/food/fs/scoop/task3210.pdf> (Stand 19.03.2008)

SCUDAMORE, K. A., H. BAILLIE, S. PATEL und S. G. EDWARDS (2007):

Occurrence and fate of *Fusarium* mycotoxins during commercial processing of oats in the UK  
Food Addit. Contam. 24, 1374 – 1385

SEHATA, S., N. KIYOSAWA, T. MAKINO, F. ATSUMI, K. ITO, T. YAMOTO, M.  
TERANISHI, Y. BABA, K. UETSUKA, H. NAKAYAMA und K. DOI (2004):

Morphological and microarray analysis of T-2 toxin-induced rat fetal brain lesion

Food Chem. Toxicol. 42, 1727 – 1736

SMALLEY, E. B., W. F. O. MARASAS, F. M. STRONG, J. R. BAMBURG, R. E.  
NICHOLS und N. R. KOSURI (1971):

Mycotoxicoses associated with moldy corn

Proceedings of the first U.S.-Japan conference on toxic micro-organism, pp. 163 – 173

Zitiert nach:

MIROCHA, C. J., und S. PATHRE (1973).

Identification of the toxic principle in a sample of Poaeufusarin

Appl. Microbiol. 26, 719 – 724

SPINDELBÖCK, B. U. (2004):

Untersuchung zum Vorkommen und zur Häufigkeit von Deoxynivalenol in Lebensmitteln

Diss. vet. med., München

STRATTON, G. W., A. R. ROBINSON, H. C. SMITH, L. KITILSEN und M. BARBOUR (1993):

Levels of five mycotoxins in grains harvested in Atlantic Canada as measured by high performance liquid chromatography

Arch. Environ. Contam. Toxicol. 24, 399 – 409

SULYOK, M., F. BERTHILLER, B. KRŠKA und R. SCHUHMACHER (2006):

Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize

Rap. Commun. Mass Spectrom. 20, 2649 – 2659

TAJIMA, O., E. D. SCHOEN, V. J. FERON und J. P. GROTEN (2002):

Statistically designed experiments in a tiered approach to screen mixtures of *Fusarium* mycotoxins for possible interactions

Food Chem. Toxicol. 40, 685 – 695

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

TORP, M. und W. LANGSETH (1999):

Production of T-2 toxin by a *Fusarium* resembling *Fusarium poae*

Mycopathol. 147, 89 – 96

TORP, M. und H. I. NIRENBERG (2004):

*Fusarium langsethiae* sp. nov. on cereals in Europe

Int. J. Food Microbiol. 95, 247 – 256

UENO, Y. (1984):

Toxicological features of T-2 toxin and related trichothecenes

Fund. Appl. Toxicol. 4, 124 – 132

VISCONTI, A., V. M. T. LATTANZIO, M. PASCALE und M. HAIDUKOWSKI (2005):  
Analysis of T-2 und HT-2 toxins in cereal grains by immunoaffinity clean-up and liquid chromatography with fluorescence detection

J. Chromatogr. A 1075, 151 – 158

VLATA, Z., F. PORICHIS, G. TZANAKAKIS, A. TSATSAKIS und E. KRAMBOVITIS (2005):

In vitro cytopathic effects of mycotoxin T-2 on human peripheral blood T lymphocytes

Toxicol. Lett. 160, 60 – 68

XIAO, H., J. R. CLARKE, R. R. MARQUARDT und A. A. FROHLICH (1995):

Improved methods for conjugating selected mycotoxins to carrier proteins and dextran for immunoassays

J. Agric. Food Chem. 43, 2092 – 2097

YAGEN, B., und M. BIALER (1993):

Metabolism and pharmacokinetics of T-2 toxin and related trichothecenes

Drug Metabol. Rev. 25, 281 – 323

YOSHIZAWA, T., S. P. SWANSON und C. J. MIROCHA (1980):

In vitro metabolism of T-2 Toxin in rats

Appl. Environ. Microbiol. 40, 901 – 906

YOSHIZAWA, T., C. J. MIROCHA, J. C. BEHRENS und S. P. SWANSON (1981):

Metabolic fate of T-2 toxin in a lactating cow

Food Cosmet. Toxicol. 19, 31 – 39

YOSHIZAWA, T., H. KOHNO, K. IKEDA, T. SHINODA, H. YOKOHAMA, K. MORITA, O. KUSADA und Y. KOBAYASHI (2004):

A practical method for measuring deoxynivalenol, nivalenol, and T-2 + HT-2 toxin in foods by enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies

Biosci. Biotechnol. Biochem. 68, 2076 – 2085

ZIMMER, I.-A. (2003):

Entwicklung und Anwendung eines enzymimmunologischen Verfahrens zum Nachweis von hydrolysiertem Fumonisin B1

Diss. vet. med., München

ZIMMER, I., R. DIETRICH, E. MÄRTLBAUER, E. USLEBER, H. KLAFFKE, R. TIEBACH, R. WEBER, P. MAJERUS und H. OTTENEDER (2004):

Fumonisinaufnahme des deutschen Verbrauchers

Berichte über Landwirtschaft 82, 446 - 470

## 7 ANHANG

### Abbildungsverzeichnis

Abb.1:	Strukturformel einiger wichtiger Typ A Trichothecene	4
Abb.2:	Standardkurven für T-2 und HT-2 Toxin in EIA-Variante A	36
Abb.3:	Standardkurven für T-2 und HT-2 Toxin bei konsekutiver bzw. simultaner Testanordnung der EIA-Variante B	39
Abb. 4:	Vergleichende Darstellung der Untersuchungsergebnisse von Extrakten Natürlich kontaminierter Proben (n = 34), aufbereitet über Flüssig-Flüssig-Chromatographie (FFC) bzw. Immunaффinitätschromatographie (IAC)	49
Abb. 5:	Korrelation zwischen den nach FFC- bzw. IAC-Aufarbeitung nachweisbaren T-2 Toxinbelastungen (EIA-Variante B) von natürlich kontaminierten Proben (n = 31)	50
Abb. 6:	Analysenergebnisse, die bei der Mehrfachuntersuchung verschiedener natürlich kontaminierter Getreideprodukte, gepuffter Getreideprodukte bzw. feiner Backwaren mit EIA-Variante A erhalten wurden	51
Abb. 7:	Analysenergebnisse, die bei der Mehrfachuntersuchung verschiedener natürlich kontaminierter Teigwaren bzw. Säuglings- und Kleinkinder-nahrung mit EIA-Variante A erhalten wurden	52
Abb. 8:	Analysenergebnisse, die bei der Mehrfachuntersuchung verschiedener natürlich kontaminierter Proben im T-2 spezifischen EIA erhalten wurden	52
Abb. 9:	Vergleichende Darstellung der mit unterschiedlichen Analyseverfahren Ermittelten Toxinbelastung von 11 Lebensmittelproben	53
Abb. 10:	Vergleichende Darstellung der in den verschiedenen Labors erzielten EIA-Ergebnisse bei der Untersuchung natürlich kontaminierter Lebensmittel	54
Abb. 11:	Korrelation der mittels EIA und LC-MS/MS bzw. GC-ECD ermittelten T-2/HT-2-Gehalte natürlich kontaminierter Zerealien-haltiger Proben (n = 10)	55
Abb. 12:	Prozentualer Anteil der verschiedenen Produktobergruppen an der Gesamtmenge der untersuchten Proben (n = 800)	56
Abb. 13:	Überblick zur Belastung von Lebensmitteln mit T-2/HT-2 Toxin	57
Abb. 14:	Prozentualer Anteil der verschiedenen Produktuntergruppen an der Gesamtmenge der untersuchten Proben (n = 800)	59
Abb. 15:	Mediane Belastung der einzelnen Produktuntergruppen mit T-2 und HT-2.	60

Werte basieren auf den in EIA-Variante A erhaltenen Ergebnissen.

Abb. 16: Belastung der Produktuntergruppe "Getreideflocken und Grütze" (ZEBS-Code 1609xx) mit T-2/HT-2 Toxin	66
Abb. 17: Belastung der Produktuntergruppe "Getreideerzeugnisse mit Zusätzen" (ZEBS-Code 1611xx) mit T-2/HT-2 Toxin	67
Abb. 18: Belastung der Produktuntergruppe "Mehle" (ZEBS-Code 1601xx) mit T-2/HT-2 Toxin	68
Abb. 19: Belastung der Produktuntergruppe "Feine Backwaren" (ZEBS-Code 18xxxx) mit T-2/HT-2 Toxin	70
Abb. 20: Belastung der Produktuntergruppe "Teigwaren" (ZEBS-Code 22xxxx) mit T-2/HT-2 Toxin	71
Abb. 21: Belastung der Produktuntergruppe "Brote und Kleingebäcke" (ZEBS-Code 170xxx + 171xxx) mit T-2/HT-2 Toxin	72
Abb. 22: Belastung der Produktuntergruppe "Getreidegrieße" (ZEBS-Code 18xxxx) mit T-2/HT-2 Toxin	73
Abb. 23: Säuglings- und Kleinkindernahrung (ZEBS-Code 48xxxx): Vergleich der Untersuchungsjahre 2006 und 2007	75
Abb. 24: Säuglings- und Kleinkindernahrung (ZEBS-Code 48xxxx): Vergleich der Toxinbelastung von Proben auf Milchbasis mit Proben auf Getreidebasis	75
Abb. 25: Vergleichende Darstellung der T-2/HT-2 Belastung verschiedener Biersorten	77

**Tabellenverzeichnis**

Tab. 1:	Physikalisch-chemische Eigenschaften von T-2 Toxin und HT-2 Toxin	4
Tab. 2:	Ausgewählte Veröffentlichungen zum natürlichen Vorkommen von T-2 Toxin und HT-2 Toxin in Getreide, Lebens- und Futtermitteln	18
Tab. 3:	Extraktions- und Aufreinigungsverfahren für T-2 und HT-2 Toxin in verschiedenen Probenmatrices	24
Tab. 4:	HPLC-FLD-Verfahren zum Nachweis von T-2 und HT-2 Toxin in Lebensmitteln	29
Tab. 5:	Kenndaten verschiedener EIA-Systeme zum Nachweis von T-2 und HT-2 Toxin	35
Tab. 6:	Charakteristika der T-2-Standardkurven in EIA-Variante A (n = 30)	37
Tab. 7:	Charakteristika der T-2-Standardkurven in EIA-Variante B (n = 30)	40
Tab. 8:	Vergleich der unterschiedlichen Probenaufbereitungsverfahren	41
Tab. 9:	Wiederfindungsraten für T-2 Toxin in verschiedenen Lebensmittelmatrices	43
Tab. 10:	Wiederfindungsraten für T-2 Toxin in Frühstückszerealien (ZEBS-Code 161xxx)	44
Tab. 11:	Wiederfindungsraten für HT-2 Toxin in verschiedenen Lebensmittelmatrices	45
Tab. 12:	T-2/HT-2 Summenbelastung von Lebensmitteln (n = 800) in den Untersuchungsjahren 2006 und 2007	61
Tab. 13:	Vergleich der T-2/HT-2 Belastung ökologischer und konventioneller Produkte	78

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

Mein spezieller Dank gilt Herrn Dr. R. Dietrich für die engagierte Betreuung und die große Sorgfalt bei der Durchsicht der Arbeit, die vielen Anregungen, Ermutigungen und v. a. für die allzeit freundliche, humorvolle und geduldige Hilfe.

Ich danke allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für das sehr angenehme Arbeitsklima und die stets gewährte Hilfe. Besonders möchte ich Frau C. Ehlich und Frau. D. Herrmann für ihre Hilfe bei der Untersuchung der Proben und Frau C. Nielsen und Frau E. Wehrle für ihre Hilfe bei der Anfertigung der Arbeit danken.

Besonders herzlich bedanke ich mich bei Frau B. Minich dafür, dass sie mir allzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Diana, Steffi und Esther danke ich für die vielen schönen und lustigen Stunden innerhalb und v. a. auch außerhalb des Instituts.

Ich danke den Projektpartnern aus Gießen, Detmold, Trier und Stuttgart für die gute Zusammenarbeit.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Schwestern dafür, dass sie immer für mich da waren und mir mit ihrem Zuspruch und ihren Aufmunterungsversuchen allzeit zur Seite standen.

Mein größter Dank aber gilt meinen Eltern, die es mir durch ihre allzeit gewährte großzügige moralische und finanzielle Unterstützung erst ermöglicht haben, diesen Beruf zu ergreifen. Ohne Euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen!

## **Lebenslauf**

Katja Bernhardine Hocke

geboren am 24.11.1978 in Göppingen

<b>Eltern</b>	Bernhardine Hocke, geb. Göttle Michael Hocke
<b>Schulbildung</b>	1985 – 1989 J.-G.-Fischer Grundschule Süßen 1989 – 1998 Erich-Kästner-Gymnasium Eislingen
<b>Berufsausbildung</b>	1998 – 2000 Ausbildung zur Tierarzhelferin in der Tierarztpraxis G. Grün, Rechberghausen
<b>Studium</b>	2000 – 2006 Studium der Tiermedizin an der Ludwig- Maximilians-Universität München
<b>Staatsexamen</b>	02. Februar 2006
<b>Approbation</b>	10. April 2006
<b>Berufliche Tätigkeit</b>	Seit März 2006 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Hygiene und Technologie der Milch der Tierärztlichen Fakultät der Universität München