

Aus dem Wissenschaftszentrum Weihenstephan  
für Ernährung, Landnutzung und Umwelt  
der Technischen Universität München  
Lehrstuhl für Tierhygiene Univ.- Prof. Dr. Dr. h.c. Johann Bauer  
Vorgelegt über das Institut für  
Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs  
Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch  
Univ.- Prof. Dr. Erwin Märtlbauer  
Tierärztliche Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

## Vorkommen und Nachweis von Citrinin in Nahrungsmitteln pflanzlicher Herkunft

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

von Claudia Barbara Schneider  
aus München

München 2007

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer  
Referent: Prof. Dr. Märtlbauer  
Korreferent: Jun. Prof. Dr. Deeg

Tag der Promotion: 9. Februar 2007

*Meinem Mann und meinen beiden Töchtern*

## Inhaltsverzeichnis

<b>A</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>B</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>3</b>
1	Physikalische und chemische Eigenschaften von Citrinin .....	3
2	Citrinin-bildende Pilze .....	5
3	Vorkommen von Citrinin .....	7
4	Toxikokinetik .....	9
5	Biologische Eigenschaften von Citrinin .....	10
5.1	Wirkung auf Mikroorganismen .....	10
5.2	Wirkung auf Makroorganismen und Zellsysteme .....	10
5.2.1	Zytotoxizität .....	11
5.2.2	Nephrotoxizität .....	12
5.2.3	Genotoxizität .....	15
5.2.4	Kanzerogenität .....	16
5.2.5	Embryotoxische und teratogene Effekte .....	17
5.2.6	Kombinationseffekte mit anderen Mykotoxinen .....	17
5.3	Pharmakologische Eigenschaften .....	18
6	Verfahren zum Nachweis von Citrinin .....	19
<b>C</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>20</b>
1	Material .....	20
1.1	Probenmaterial .....	20
1.2	Gebrauchsmaterial .....	21
1.3	Verbrauchsmaterial .....	21
1.4	Chemikalien .....	22
2	Methoden .....	22
2.1	Methodenentwicklung zur Bestimmung von Citrinin in Zerealien .....	23
2.1.1	Vorversuche zur Extraktion .....	23
2.1.2	Vorversuche zur Aufreinigung .....	24
2.1.2.1	Flüssig-Flüssig-Trennung .....	24
2.1.2.2	Aufreinigung mittels Festphasenextraktion .....	30
2.1.2.3	Aufreinigung mittels Immunoaffinitätschromatographie .....	33
2.2	Methodenentwicklung zur Bestimmung von Citrinin in Frucht- und Gemüsesäften .....	34

---

2.3	Orientierende Untersuchungen zur Stabilität von Citrinin in Fruchtsäften	38
2.4	Bestimmung von Citrinin in asiatischen Lebensmitteln	38
2.5	Validierung der Methoden	39
2.6	Massenspektrometrische Bestimmung von Citrinin	41
2.6.1	LC-MS-Analyse der Zerealien	41
2.6.2	LC-MS/MS-Analyse der Obst- und Gemüsesäfte sowie der asiatischen Lebensmittel	42
2.7	Untersuchung der Handelsproben	43
<b>D</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>45</b>
1	Nachweis und Bestimmung von Citrinin mittels ESI-MS bzw. –MS/MS	45
2	Vorversuche zur Bestimmung von Citrinin in organischen Matrices	48
2.1	Zerealien	48
2.1.1	Extraktion	48
2.1.2	Aufreinigung	49
2.1.2.1	Flüssig-Flüssig-Trennung	49
2.1.2.2	Aufreinigung mittels Festphasenextraktion	52
2.1.2.3	Aufreinigung mittels Immunoaffinitätssäulen	54
2.2	Frucht- und Gemüsesäfte	55
2.2.1	Ergebnisse der Vorversuche	55
2.2.2	Orientierende Untersuchungen zur Stabilität von Citrinin in Apfelsaft	57
2.3	Methodenvalidierung	58
3	Vorkommen von Citrinin in Nahrungsmitteln	61
3.1	Zerealien	61
3.2	Frucht- und Gemüsesäfte	62
3.3	Asiatische Lebensmittel	62
<b>E</b>	<b>Diskussion</b>	<b>63</b>
<b>F</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>68</b>
<b>G</b>	<b>Summary</b>	<b>69</b>
<b>H</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>70</b>

---

## Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: Strukturformel von Citrinin, A) p-Chinon-Form und B) o-Chinon-Form..	3
Abbildung 2: LC-MS-Chromatogramme (m/z 251) einer Standardlösung (5 ng/ml, oben) und einer Citrinin-haltigen Maismehlprobe (4,4 µg/kg, unten) ...	46
Abbildung 3: Massenspektrum von Citrinin (ESI+, Cone Voltage 30 V).....	46
Abbildung 4: LC-MS/MS-Chromatogramme (m/z 249/175) einer Standardlösung (1 ng/ml, oben) und einer mit Citrinin artifiziiell kontaminierten Apfelsaftprobe (c: 0,1 ng/ml, unten).....	47
Abbildung 5: Abbauverhalten von Citrinin in Apfelsaft bei Raumtemperatur .....	58

## Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1:	Physikalische und chemische Eigenschaften von Citrinin (Cole & Cox, 1981) .....	4
Tabelle 2:	Citrinin bildende Pilze (Cole und Cox, 1981; Betina, 1989, Roth et al., 1990; Frank, 1992; Blanc et al., 1995b, Wang et al., 2005).....	6
Tabelle 3:	LD <sub>50</sub> -Werte von Citrinin bei Labortieren (Hanika & Carlton, 1994, Smith & Henderson, 1991) .....	11
Tabelle 4:	Versuchsanordnung zur Überprüfung der Eignung verschiedener Lösungsmittel zur Extraktion von Citrinin bei Zerealien .....	23
Tabelle 5:	Extraktion von Citrinin aus Weizen mit Ethylacetat und anschließende Flüssig/Flüssig-Aufreinigung des Extrakts.....	24
Tabelle 6:	Auswahl an Lösungsmitteln, Säuren und Laugen zur Flüssig-Flüssig-Trennung .....	25
Tabelle 7:	Vorversuche zur Extraktion von Citrinin aus verschiedenen Säuren... ..	25
Tabelle 8:	Varianten zur Flüssig-Flüssig-Aufreinigung von Zerealienextrakten ... ..	26
Tabelle 9:	Flüssig-Flüssig-Aufreinigung mit Hexan (Variante M) .....	28
Tabelle 10:	Übersicht über die Flüssig-Flüssig-Trennung mit Hexan, Ethylacetat und TBME .....	29
Tabelle 11:	Lösungsmittelmischungen zur Überprüfung des Retentionsverhaltens von Citrinin auf RP-Festphasenkartuschen (strata-X) .....	30
Tabelle 12:	Unterschiedliche Methoden der Extraktzubereitung vor der Festphasenextraktion .....	31
Tabelle 13:	Methode zum Nachweis von Citrinin in Zerealien (Variante a).....	32
Tabelle 14:	Methode zum Nachweis von Citrinin in Zerealien (Variante b).....	33
Tabelle 15:	Vorversuch zur Bestimmung von Citrinin in Säften durch Zentrifugation und Aufreinigung mit polymerbasierten Festphasenkartuschen .....	34
Tabelle 16:	Methodenbeschreibung der Vorversuche zur Extraktion von Citrinin aus Säften .....	35
Tabelle 17:	Varianten zur Optimierung der Methode <i>Extraktion mit Ethylacetat</i> bei Frucht- und Gemüsesäften I.....	36
Tabelle 18:	Varianten zur Optimierung der Methode <i>Extraktion mit Ethylacetat</i> bei Frucht- und Gemüsesäften II.....	37
Tabelle 19:	Probennahmeschema zum Abbauverhalten von Citrinin in Apfelsaft (Extraktion nach artifizieller Kontamination) .....	38
Tabelle 20:	Arbeitsanweisung zum Citrininnachweis in asiatischen fermentierten Lebensmitteln .....	39
Tabelle 21:	Konzentrationsstufen der Methodvalidierung zur Analyse von Citrinin in Frucht- und Gemüsesäften .....	40
Tabelle 22:	LC-MS-Parameter zur Analyse von Citrinin in Zerealien .....	41
Tabelle 23:	LC-MS/MS-Parameter zur Analyse von Citrinin in Fruchtsäften und asiatischen Lebensmitteln .....	42
Tabelle 24:	Methodenbeschreibung zur Analyse von Citrinin in Zerealien .....	43

---

Tabelle 25:	Methodenbeschreibung zur Analyse von Citrinin in Frucht- und Gemüsesäften .....	44
Tabelle 26:	Richtigkeit der Analysen nach Extraktion von Citrinin aus Zerealien mit verschiedenen Extraktionsmethoden.....	48
Tabelle 27:	Richtigkeit der Analysen nach Extraktion von Citrinin mit verschiedenen Extraktionsmitteln bei Zerealien (c=50 µg/kg) .....	49
Tabelle 28:	Mittlere Wiederfindungsraten von Citrinin nach Extraktion aus Säuren mit Dichlormethan oder Ethylacetat.....	50
Tabelle 29:	Wiederfindungsraten von Citrinin in den einzelnen Phasen bei verschiedenen Varianten der Flüssig/Flüssig-Aufreinigung von Weizenextrakten.....	51
Tabelle 30:	Mittlere Wiederfindungsraten von Citrinin (c=50 µg/kg) in Weizen nach der Aufreinigung mit verschiedenen Verfahren .....	52
Tabelle 31:	Einfluss der Lösungsmittelzusammensetzung auf die Elution von Citrinin in der Festphasenextraktion (strata-X) .....	52
Tabelle 32:	Einfluss unterschiedlicher Methoden der Extraktbehandlung vor der Aufreinigung mit polymerbasierten Festphasenkartuschen auf die Wiederfindung von Citrinin in Zerealien (c=50 µg/kg).....	53
Tabelle 33:	Einfluss der verschiedenen Methodenschritte auf die Wiederfindungsraten der Analyse von Citrinin in Zerealien (c=50 µg/kg).....	54
Tabelle 34:	Präzision der Analysen von Citrinin in Frucht- und Gemüsesäften (c=0,02; 0,1; 0,5 ng/ml) nach Zentrifugation und Festphasenextraktion.. ..	55
Tabelle 35:	Präzision der Analysen von Citrinin in Frucht- und Gemüsesäften (c=0,5 ng/ml) nach der Extraktion mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln .....	56
Tabelle 36:	Präzision der Analysen von Citrinin in Orangensaft (c=5 ng/ml) nach verschiedenen Bedingungen für die Zentrifugation und die Ansäuerung .....	56
Tabelle 37:	Präzision und Richtigkeit der Analysenmethode <i>Extraktion mit Ethylacetat</i> zum Nachweis von Citrinin in Frucht- und Gemüsesäften (c=5 ng/ml, Variante a) .....	57
Tabelle 38:	Präzision und Richtigkeit der Analysenmethode <i>Extraktion mit Ethylacetat</i> zum Nachweis von Citrinin in Frucht- und Gemüsesäften (c=0,5 ng/ml, Variante c) .....	57
Tabelle 39:	Richtigkeit und Präzision der Analysenmethode zum Citrininnachweis in Zerealien .....	59
Tabelle 40:	Richtigkeit und Präzision der Analysenmethode zum Citrininnachweis in Frucht- und Gemüsesäften ( <i>Extraktion mit Ethylacetat</i> Variante b).....	60
Tabelle 41:	Richtigkeit und Präzision der Analysenmethode zum Citrininnachweis in asiatischen Lebensmitteln .....	60
Tabelle 42:	Citrinin-Gehalte in Zerealien.....	61

## Abkürzungsverzeichnis

$a_w$ -Wert	Wasseraktivität
BEN	Balcan Endemic Nephropathy
BHK21-Zellen	Babyhamster kidney cells
CHO-K1-Zellen	Chinese hamster ovary cells
DNA	Desoxyribonucleid acid (DNS: Desoxaribonukleinsäure)
EIA	Enzymimmunoassay (Enzymimmuntest)
$g$	Erdbeschleunigung ( $1g = 9,81 \text{ m/s}^2$ )
g	Gramm
HCl	Salzsäure
Hela-Zellen	Human cervix carcinoma cells
HEK293-Zellen	Human embryonic kidney cells
HL-60-Zellen	Human promyelocytic leukemia cells
HPLC	High performance liquid chromatography
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HTC-Zellen	Hepatoma tissue cells
IAC	Immunoaffinitätschromatographie
IARC	International Agency for Research on Cancer
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
LC-MS	Liquid chromatography-Mass spectrometry
LC-MS/MS	Liquid chromatography-Tandem mass spectrometry
LD	Letaldosis
LLC-PK1	Porcine renal cell line
MDBK-Zellen	Madin Darby bovine kidney cells
MeOH	Methanol
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MPN	Mycotoxic Porcine Nephropathy
m-RNS	“messenger“ Ribonukleinsäure
m/z	Masse/Ladung
n	Anzahl
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
$N_2$	Stickstoff
nM	Nanomolar
ng	Nanogramm
n.n.	nicht nachweisbar
PBS	Phosphat-Buffered-Saline
p.o.	per os

---

ppb	parts per billion
ppm	parts per million
RNS	Ribonucleinsäure
r-RNS	ribosomale Ribonucleinsäure
RP	Reversed-Phase
RNS	Ribonucleinsäure
s.c.	subkutan
SCE-Assay	Schwesterchromatidaustauschassay
TBME	<i>tertiär</i> -Butyl-Methyl-Ether
TLC	Thin layer chromatography
UDS-Assay	unscheduled DNA-Synthesis- (DNA-Reparatursynthese-) Assay
V79-Zellen	Lungenfibroblasten männlicher chinesischer Hamster
WHO	World Health Organisation
µg	Mikrogramm
µM	Mikromolar

## A Einleitung

Citrinin wurde bereits 1931 von Hetherington & Raistrick bei ihrer Suche nach natürlichen Substanzen mit antibiotischer Wirkung aus Kulturen des Schimmelpilzes *Penicillium citrinum* isoliert und charakterisiert. Zunächst wurde dieser Sekundärmetabolit aufgrund seiner antibakteriellen Eigenschaften als Antibiotikum „neuen Typs“ bezeichnet, inzwischen zählt Citrinin aber zu den Mykotoxinen. Hierbei ist insbesondere das nephrotoxische Potenzial von Bedeutung (Betina, 1989). Die von den auf Lebensmitteln vorkommenden Schimmelpilzen der Gattungen *Aspergillus*, *Penicillium* und *Monascus* (Betina, 1989, Blanc et al., 1995b) gebildete Substanz kann in den proximalen Nierentubuli durch Beeinträchtigung mitochondrialer Funktionen und makromolekularer Synthesen zu Nierenschäden führen (Hanika & Carlton, 1994). So wird Citrinin neben Ochratoxin A als eine der Ursachen für das Auftreten der Balkan Endemic Nephropathy (BEN) beim Menschen angesehen (Vrabcheva et al., 2000, Pfohl-Leszkowicz et al., 2002).

Neben seiner Nephrotoxizität, die in einer Vielzahl von Studien bei allen bislang untersuchten Tierarten nachgewiesen werden konnte (Übersicht bei Hanika & Carlton, 1994), weist Citrinin auch genotoxische (Martin et al., 1986, Föllmann et al., 1999), embryotoxische und teratogene Eigenschaften auf (Reddy et al., 1982, Ciegler et al., 1977). Die LD<sub>50</sub>-Werte liegen je nach Tierart und Applikationsform zwischen 17 und 220 mg/kg KGW (Hanika & Carlton, 1994).

Obwohl Citrinin-produzierende Schimmelpilze, insbesondere toxinogene *Penicillium* spp., häufig anzutreffen sind, sind Literaturangaben zum natürlichen Vorkommen dieser Substanz in der Nahrungskette relativ selten. Ein Hauptgrund für die relativ geringe wissenschaftliche Bearbeitung des Citrinin ist in der schwierigen Nachweisbarkeit zu sehen. Als problematisch erwies sich hierbei insbesondere die Instabilität des Toxins bei der Probenaufbereitung, die dadurch verursachte geringe Präzision der Ergebnisse, sowie ein ausgeprägtes „Tailing“ bei der chromatographischen Auftrennung mit herkömmlichen RP-HPLC-Kieselgelsäulen (Wilson, 1994, Reinhard & Zimmerli, 1999a, Dick et al., 1988). Hinzu kommt eine gewisse Instabilität des Toxins im Lebensmittel. Kitabatake et al. (1991) stellten in mehreren Versuchsreihen fest, dass die Zersetzung von Citrinin zu einem von der

Erhitzungstemperatur, zum anderen vom Wassergehalt des Substrates abhängig ist.

Ungeachtet dieser analytischen Schwierigkeiten wurde aber bereits wiederholt von Citrinin in Zerealien berichtet (Molinié, et al., 2005, Vrabcheva et al. 2000). Martins et al. (2002) entdeckten Citrinin neben Patulin in portugiesischen Äpfeln mit fauligen Stellen. Zudem wurde, vermutlich bedingt durch die Verwendung von mit *Monascus ruber* fermentiertem Rotschimmelreis, in vegetarischen Wurstprodukten Citrinin nachgewiesen (Dietrich et al., 1999).

Die Nephrotoxizität von Citrinin macht es erforderlich, weitere Daten zum Vorkommen dieses Mykotoxins in der Nahrungskette zu erheben. Aus diesem Grund wurden verschiedene Lebensmittel pflanzlichen Ursprungs (Zerealien, Frucht- und Gemüsesäfte und asiatische Nahrungsmittel) auf das Vorkommen von Citrinin untersucht. Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde unter Einbeziehung der aktuellen Literatur zur toxikologischen Bewertung das daraus resultierende Gesundheitsrisiko für den Menschen eingeschätzt, um gegebenenfalls Präventivmaßnahmen im Sinne eines vorbeugenden Verbraucherschutzes einleiten zu können.

Derzeit werden zum Nachweis von Citrinin in Lebens- und Futtermitteln neben chromatographischen auch immunochemische Verfahren eingesetzt (Reinhard & Zimmerli, 1999a). Für dieses Forschungsvorhaben wurde aufgrund der hohen Anforderung an die Selektivität und Sensitivität des Nachweisverfahrens die HPLC-MS (Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie-Massenspektrometrie), sowie die HPLC-MS/MS (- Tandem Massenspektrometrie) zur Analyse der Proben ausgewählt.

## B Literatur

### 1 Physikalische und chemische Eigenschaften von Citrinin

Citrinin ist eine feste, kristalline, geruchlose Substanz. In Ethanol gelöstes Citrinin fluoresziert gelb ( $\lambda = 360 \text{ nm}$ ) und kristallisiert in Form zitronengelber Nadeln aus. Das hydrophobe Mykotoxin ist gut löslich in Aceton, Benzol, Chloroform, heißem Ethanol, Ethylacetat und in verdünnten Laugen, weniger löslich in Diethylether und Ethanol und praktisch unlöslich in Wasser (Betina, 1989, Frank, 1992).

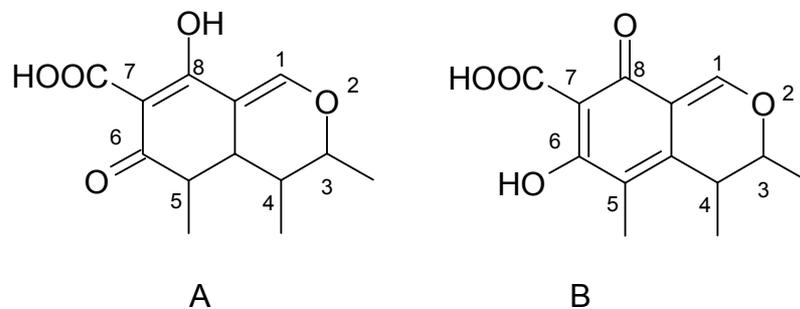


Abbildung 1: Strukturformel von Citrinin, A) p-Chinon-Form und B) o-Chinon-Form

In Gegenwart von Metallionen neigt Citrinin aufgrund seiner Struktur zur Chelatkomplexbildung (Vazquez et al., 1996). Zudem treten zwei tautomere Formen, die p-Chinon und die o-Chinon-Form (Abbildung 1), auf, welche in wässriger Lösung bei Raumtemperatur über eine Keto-Enol-Tautomerie im Gleichgewicht stehen (Sankawa et al., 1983). In Methanol und in Methanol/Methylenchlorid Lösungen reagiert Citrinin im Sinne einer „Michael-Addition“, indem das Methanol an das C<sub>1</sub>-Atom der o-Chinonform gebunden wird. Diese Additions-Reaktion ist reversibel und das Gleichgewicht Additions-Produkt/freies Citrinin verschiebt sich bei steigenden Temperaturen sowie einer Erhöhung des Methylenchlorid-Anteils der Methanol/Methylenchlorid-Mischung zu Gunsten des freien Citrinins (Poupko et al, 1997).

Die wesentlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften von Citrinin sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Physikalische und chemische Eigenschaften von Citrinin (Cole &amp; Cox, 1981)

Eigenschaft	Citrinin
Summenformel	$C_{13}H_{14}O_5$
Chemisch-wissenschaftlicher Name	(3R,4S)-4,4-dihydroxy-3,4,5-trimethyl-6-oxo3H-benzopyran-7-Carboxylsäure
Molekulargewicht [g/mol]	250,1
Schmelzpunkt	175°C
UV <sub>max.</sub> in Ethanol (nm)	222, 253, 319
Molarer Absorptionskoeffizient bei 319 nm	4700
Erscheinungsform	Gelb, fest, kristallin und geruchlos

Citrinin ist verglichen mit anderen Mykotoxinen relativ hitzeempfindlich. Sein Abbau setzt bereits bei Temperaturen von 60-70 °C ein. Eine deutliche Abnahme seiner antibiotischen Wirksamkeit konnte schon nach einer 15-minütigen Erhitzung auf 100°C bei pH 2-9,5 beobachtet werden (Scott, 1984).

In einer Reihe von Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass Citrinin in wässrigen Lösungen instabil und thermolabil ist. So wurde gezeigt, dass der Citrinin-Gehalt in mit *Monascus* fermentierten kommerziellen roten Reisproben nach 20-minütigem Kochen in Wasser um 50 % reduziert wird (Shu et al., 2002). Kitabatake et al. (1991) untersuchten den Abbau und die Detoxifikation von Citrinin unter verschiedenen Bedingungen bezüglich Erhitzungstemperatur und Feuchtigkeit. Sie stellten fest, dass der Abbau bei trockener Erhitzung bei 160°C einsetzt; ab 175°C war Citrinin vollständig zersetzt und wies auch keine Zytotoxizität mehr gegenüber HeLa-Zellen auf. Unter halbfeuchten Bedingungen wurde das Mykotoxin bereits ab Temperaturen von 140°C abgebaut. Hierbei entstanden allerdings Derivate, die eine ähnliche oder sogar höhere Zytotoxizität als Citrinin aufwiesen. Nicht-Toxische Komponenten entstanden bei der feuchten Erhitzung erst ab 160°C. Zudem ist bekannt, dass bei einer Erhitzung über 100°C aus zwei Citrinin-Molekülen das um den Faktor 10 stärker toxische Citrinin H1 entstehen kann (Trivedi, 1993). Des Weiteren konnte nach Erhitzung von Citrinin auf 140°C in Anwesenheit von Wasser

Citrinin H<sub>2</sub> isoliert werden, welches eine deutlich schwächere Toxizität als Citrinin aufweist (Hirota, 2002).

Auch bei der Lagerung von Feldfrüchten kann Citrinin abgebaut werden. Der entscheidende Parameter hierfür ist der Wassergehalt. Die Reduktion des Citriningehalts erfolgt dabei umso schneller, je höher der Wassergehalt der Produkte ist. Es konnte gezeigt werden, dass die Halbwertszeiten von Citrinin in Gerste, Mais und Weizen bei einem  $a_w$ -Wert von 0,7 und einer Temperatur von 25°C 7,8; 15,5 bzw. 11,9 Tage betragen, bei einem  $a_w$ -Wert von 0,9 waren es nur noch 1,8; 10,4 bzw. 3,0 Tage (Harwig et al. 1977).

## 2 Citrinin-bildende Pilze

Citrinin wurde 1931 von Hetherington & Raistrick auf der Suche nach antibakteriell wirkenden Substanzen aus Kulturen von *Penicillium citrinum* isoliert. Nach heutigem Kenntnisstand wird Citrinin von einer Vielzahl von Pilzen der Gattungen *Penicillium*, *Aspergillus* und *Monascus* gebildet. Die derzeit bekannten sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Citrinin-bildende Pilzspezies zählen zu den Lagerpilzen. Sie wachsen und produzieren Citrinin nur unter bestimmten Lagerbedingungen, hierbei sind die Grenzen für das Pilzwachstum wesentlich weiter als für die Citrininproduktion; vor allem das Substrat, die Wasseraktivität und die Temperatur sind entscheidend (Frank, 1992). Da potentiell Citrinin-produzierende *Penicillium*-Arten vorwiegend tiefere Temperaturen (Temp.<sub>Opt.</sub>: 21-30°C;  $a_w$ : 0.80-0.85; Frank, 1992) bevorzugen, kommt dieses Mykotoxin natürlicherweise vor allem in Ländern mit gemäßigttem Klima vor. Diese Pilzspezies sind zudem oftmals auch zur Bildung von Ochratoxin A fähig, weshalb beide Mykotoxine häufig gemeinsam vorzufinden sind (Krogh et al, 1973). Allerdings können die günstigsten Bedingungen zur Bildung der beiden Toxine unterschiedlich sein. So wurde festgestellt, dass *Penicillium viridicatum* (*verrucosum*) bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 85 % gut wuchs und Ochratoxin A und Penicillinsäure produzierte, Citrinin aber erst bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90 % zusätzlich gebildet wurde (Frank, 1992).

Tabelle 2: Citrinin-bildende Pilze (Cole und Cox, 1981; Betina, 1989, Roth et al., 1990; Frank, 1992; Blanc et al., 1995b, Wang et al., 2005)

Genus	Spezies
<b>Aspergillus</b>	A. candidus A. flavipes A. niveus A. terreus
<b>Penicilium</b>	P. canescens P. citroviridae P. citrinum P. claviforme P. expansum P. fellutanum P. implicatum P. janthinellum P. jenseni P. lividum P. palitans P. purpurescens P. roqueforti P. spinolosum P. velutinum P. verrucosum
<b>Monascus</b>	M. floridanus M. lunisporas M. pallens M. pilosus M. purpureus M. ruber M. sangiuneus

### 3 Vorkommen von Citrinin

Wie bereits dargestellt sind verschiedene häufig vorkommende Schimmelpilze in der Lage, neben anderen Mykotoxinen das nephrotoxisch wirksame Citrinin zu bilden. Trotzdem sind Literaturangaben zum natürlichen Vorkommen dieser Substanz relativ selten. Dies könnte einerseits an der Instabilität des Toxins bei der Probenaufbereitung (Wilson, 1994) sowie im Lebensmittel selbst liegen (Reinhard & Zimmerli, 1999b), andererseits kann ein bei flüssigkeitschromatographischer Auftrennung auftretendes „Tailing“ (Dick et al., 1988) die exakte Bestimmung von Citrinin in organischer Matrix behindern.

#### a) Lebensmittel pflanzlichen Ursprungs

Citrinin kann einen Kontaminanten in diversen Getreiden und Getreideprodukten darstellen. Dick et al. (1988) konnten Citrinin in 14 von 38 Zerealienproben mit einem Höchstwert von 1 µg/kg nachweisen. Von Vrabcheva et al. (2000) wurden sowohl Ochratoxin A (bis 40 µg/kg) als auch Citrinin (bis 420 µg/kg) in Getreideproben detektiert. Mit Ausnahme von einer Getreideprobe waren hier alle Citrinin-positiven Proben auch Ochratoxin A belastet, die Citrinin-Konzentrationen lagen allerdings 2-200fach über denen von Ochratoxin A. In mit *Penicillium verrucosum* inokuliertem Futterhafer konnte in sehr hoch mit Ochratoxin A belasteten Proben ebenfalls Citrinin (bis 2,0 mg/kg) nachgewiesen werden (Richter et al. 1998). Weiterhin bestimmte Meister (2003) in diversen Ochratoxin A-positiven Getreiden und Getreideprodukten Citrinin in Konzentrationen von 0,5-7,7 µg/kg. In Frankreich konnte neuesten Untersuchungen zufolge Citrinin in Frühstücksmüsli nachgewiesen werden (Molinié, et al., 2005). Die 54 Proben enthielten Mais, Kleie, Früchte, Getreide (Weizen und/oder Reis), Schokolade, Reis und Hafer als Hauptzutaten, allein oder gemischt. Hierbei wurde in 18 % der Müsliprobe Citrinin in einem Bereich von 1,5-42 µg/kg bestimmt. Citrinin trat dabei ebenfalls immer gemeinsam mit Ochratoxin A auf. Nishijama (1984) entdeckte in einer Maismehlprobe 27 µg/kg Citrinin. Auch in mit *Monascus ruber* infizierten Silagen (n=233) war Citrinin mit Konzentrationen zwischen 2,4 und 64,3 µg/kg nachweisbar (Schneweis et al., 2001). In Säften (55 Handelsproben) konnte das Mykotoxin dagegen nur in Spuren von höchstens 0,2 ng/ml nachgewiesen werden (Dietrich et. al., 2001). Bei Untersuchungen auf das Vorkommen von Citrinin in Rotwein konnten von Meyer et al. (2001) allerdings keine derartige Belastung detektiert werden. Der fehlende Nachweis von Citrinin in Bier

wurde auf eine Zerstörung während des Brauprozesses zurückgeführt (Odhav & Naicker, 2002).

Martins et al. (2002) entdeckten Citrinin neben Patulin in Portugiesischen Äpfeln mit fauligen Stellen in Konzentration von 0,32-0,92 mg/kg. Von 351 Äpfeln konnte Citrinin in 14 Proben (3,9 %) alleine und in 69 Proben (19,6 %) gemeinsam mit Patulin nachgewiesen werden.

Das von verschiedenen *Monascus*-Stämmen gebildete Monascidin A ist mit dem nephrotoxischen Citrinin identisch (Blanc et al., 1995a). Da mit *Monascus spp.* fermentierter Reis (Angkak) als natürlicher Farbstoff (Vollbrecht, 1998) bei der Herstellung asiatischer Nahrungsmittel wie Miso-Pasten, roter Tofu und Hoi-Sin Sauce, aber auch bei der Herstellung „vegetarischer Würstchen“ verwendet wird, kann dies als Ursache des Nachweises von Citrinin in diesen Lebensmitteln angesehen werden (Dietrich et al., 1999). Hierbei wurden in acht von zwölf vegetarischen Wurstprodukten und zwei von elf asiatischen Spezialitäten Konzentrationen von 22-105 µg/kg bestimmt. Bei der Untersuchung von zwölf aus China importierten, mit *Monascus* fermentierten Rotschimmelreisproben konnte Citrinin in sämtlichen Proben mit Gehalten von 0,2 bis 17,1 mg/kg nachgewiesen werden (Sabater-Vilar, 1999). In einer Probe von rot-fermentiertem Reis aus China konnte eine Konzentration von 2903 µg/kg detektiert werden (Meister, 2003). Auch in Kakaobohnen konnte Meister (2003) einen Citriningehalt von 2,4 µg/kg feststellen.

#### *b) Lebensmittel tierischer Herkunft*

Eine Kontamination tierischer Lebensmittel mit Mykotoxinen ist auf verschiedenen Wegen möglich. Zum einen kann das fertige Lebensmittel verschimmeln und somit mit Mykotoxinen kontaminiert werden. Zum anderen können Mykotoxine bei Nutztieren nach Aufnahme toxinhaltiger Futtermittel in unveränderter oder in metabolisierter Form in Organen abgelagert oder ausgeschieden werden. Auf diese Weise können Lebensmittel tierischer Herkunft (Fleisch, Milch und Eier) Mykotoxine enthalten, ohne dass eine derartige Kontamination äußerlich erkennbar ist (Engelhardt, 2001).

*Penicillium viridicatum*-Stämme, die von geräuchertem Schinken isoliert werden konnten, bildeten bei Temperaturen zwischen 25 und 30°C auf diesem auch Citrinin

(Wu et al. 1974). Von Jarvis (1983) wurden 19 Schimmelkäsesorten auf Citrinin untersucht. Hierbei enthielten 15 neben Ochratoxin A auch Citrinin in Konzentrationen bis zu 50 µg/kg. Die Konzentrationen im Käseinneren waren dabei höher als auf der Oberfläche. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass Citrinin von Stämmen der Gattung *Penicillium citrininum* und *Penicillium expansum* bei 20°C in Käse gebildet wird und in dieser Matrix auch stabil ist (Bailly et al., 2002).

#### 4 Toxikokinetik

Die Absorption, Verteilung und Metabolisierung von Citrinin wurde in diversen Studien untersucht. Unabhängig von der Art der Verabreichung wird Citrinin relativ schnell ins Blut absorbiert, metabolisiert und vornehmlich renal ausgeschieden (Dunn & Friedmann, 1994).

Von Phillips et al. (1979) wurde die Verteilung und Ausscheidung von radioaktiv markiertem [<sup>14</sup>C]Citrinin an männlichen Ratten untersucht. 30 min nach der Applikation (3 mg/kg KGW, i.v.) konnten 14,7 % der Gesamtradioaktivität in der Leber und 6 % in den Nieren nachgewiesen werden, nach 6 h sank der Gehalt in der Leber auf 7,5 % und in den Nieren auf 4,7 %. Die Dosis im Plasma sank von 9,2 % (30 min) auf 4,7 % (6 h). 73,9 % wurden innerhalb von 24 h über den Urin und 4,0 % über den Faeces ausgeschieden. Nach 72 h waren lediglich 1,2 % des verabreichten [<sup>14</sup>C]Citrinin in der Leber, den Nieren und dem Plasma nachweisbar. Ähnliche Ergebnisse wurden von Reddy et al. (1982a) berichtet. Demnach wurden nach 24 h 74 % der verabreichten Dosis (35 mg/kg, s.c.) von trächtigen Ratten über den Urin eliminiert. Nach 48 bzw. 72 h waren nur noch 1,7 bzw. 1,4 % der verabreichten Dosis im Urin messbar. 9,5 % des Citrinins wurden innerhalb von 24 h mit dem Faeces ausgeschieden. Dieser Werte sank innerhalb von 48 bzw. 72 h auf 4,1 bzw. 7,3 %. Die Elimination von Citrinin aus dem Plasma erfolgte in zwei Phasen, wobei die biologische Halbwertszeit in der ersten Phase 1,95 h und in der zweiten Phase 39,7 h betrug. In von Phillips et al. (1979) gemachten Untersuchungen an männlichen Ratten waren es entsprechend 2,6 und 14,9 h. Citrinin konnte hier auch noch 24 h nach Applikation (i.v., i.m., oder s.c.) im Blut nachgewiesen werden. Nach oraler Verabreichung wurden maximale Gehalte nach 3 h im Serum wiedergefunden, wovon 20 % an Serumalbumin gebunden waren (Frank, 1992).

Reddy et al. (1982a) konnten nach subkutaner Applikation von [<sup>14</sup>C]-markiertem Citrinin (35 mg/kg KGW) im Plasma, im Urin, der Galle und der Uterusflüssigkeit von trächtigen Ratten Metaboliten mit einer höheren Polarität als die Muttersubstanz mittels HPLC nachweisen, diese wurden allerdings nicht genauer identifiziert. Als Hauptmetabolit konnten Dunn et al. (1983) im Urin behandelter Tiere (30 mg/kg KGW per os) mittels Massen- und UV-Spektrometrie sowie Dünnschichtchromatographie das blau fluoreszierende Dihydrocitrinon nachweisen, welches das gleiche UV-Spektrum wie Citrinin zeigt. Hierbei wurde 15,4 % der eingesetzten Menge an [<sup>14</sup>C]-markiertem Citrinin als Dihydrocitrinon und 42,6 % als Citrinin mit dem Urin ausgeschieden, während im Blutplasma nur Citrinin nachweisbar war.

## **5 Biologische Eigenschaften von Citrinin**

### **5.1 Wirkung auf Mikroorganismen**

Citrinin hemmt in Konzentrationen von 50-100 µg/ml in erster Linie grampositive Keime wie *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus lactis* und *Staphylococcus aureus* (Betina, 1989, Blanc et al., 1995b, Haraguchi et al., 1987a). Zudem besitzt es antimycetische Eigenschaften. Es inhibiert bei pH 3 das Wachstum von *Rhizopus chinensis*, *Mucor mucedo* und *Sacharomyces cerevisiae* (Haraguchi et al., 1987a). Darüber hinaus weist Citrinin hemmende Effekte gegenüber einigen Protozoen, wie *Trypanosoma gambiense*, *Trichomonas vaginalis*, *Trichomonas foetus* und *Entamoeba histolytica*, auf (Betina, 1989). Allerdings lässt sich aufgrund seines beträchtlichen toxischen Potentials die antibiotische Wirkung von Citrinin therapeutisch nicht nutzen.

### **5.2 Wirkung auf Makroorganismen und Zellsysteme**

Citrinin ist vor allem nephrotoxisch, weist aber auch genotoxische, embryotoxische und teratogene Eigenschaften auf. Zudem wurde es von der IARC (1986) als Substanz mit unklarer karzinogener Wirkung eingestuft. Die akute Toxizität von Citrinin ist als mäßig bis gering einzustufen. Die LD<sub>50</sub>-Werte variieren je nach Tierart und Applikationsform (Tabelle 3).

Tabelle 3: LD<sub>50</sub>-Werte von Citrinin bei Labortieren (Hanika & Carlton, 1994, Smith & Henderson, 1991)

Tierart	LD <sub>50</sub> (mg/kg)	Applikationsform
Ratte	67	i.p.
Kaninchen	19	i.v.
Meerschweinchen	37	s.c.
Maus	35	s.c.
Broiler	95	p.o.

### 5.2.1 Zytotoxizität

In der Zelle akkumuliert Citrinin in den Mitochondrien und interferiert dort mit dem Elektronentransportsystem der Atmungskette (Aleo et al., 1991). Es beeinflusst durch die Hemmung von Enzymen (NADH-Dehydrogenase-Komplex und Succinat-Dehydrogenase-Komplex) die oxidative Phosphorylierung und kann dadurch die Übertragung von Elektronen auf O<sub>2</sub> (Haraguchi et al., 1987b) blockieren; die Inhibierung der DNS-Synthese führt schließlich zu einer rückläufigen RNS- und Protein-Synthese. Zudem konnte an isolierten Zellkernen festgestellt werden, dass 100 µg/ml Citrinin die Aktivität der RNS-Polymerase I um 60 % reduziert, während sie die Aktivität der RNS-Polymerase II nur um 24 % vermindert. Somit wird vor allem die r-RNS-Synthese beeinflusst, wohingegen die Auswirkungen auf die m-RNS-Synthese weniger stark sind (Betina, 1989).

Von Chagas et al. (1994) wurden Untersuchungen bezüglich der Zytotoxizität von Citrinin an BHK-21-Zellen (Nierenzellen von Hamstern) durchgeführt. Die morphologischen Veränderungen stellten sich dabei wie folgt dar: Die bei lichtmikroskopischer Betrachtung normalerweise flach und länglich erscheinenden Zellen waren rund und geschwollen. Nach 10-stündiger Inkubation mit Konzentrationen ab 0,1 mM Citrinin zeigten elektronenmikroskopische Aufnahmen schwerwiegende Veränderungen an den Mitochondrien (Verdickung, Verformung der Christae); schließlich führten Konzentrationen von 0,5 und 1,0 mM zum Zelltod. Weiterhin wurden von Chagas et al. (1995a, 1995b) Untersuchungen bezüglich des Effekts von Citrinin auf den Ca<sup>2+</sup>-Transport in isolierten Nierenrinden- und Lebermitochondrien sowie in BHK-21-Zellen durchgeführt. Hierbei hemmte Citrinin bei einer Konzentration von 1 nM die intramitochondrialen Enzyme 2-Oxoglutarat-

Dehydrogenase und Pyruvat-Dehydrogenase signifikant. Da beide Enzyme den  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport aktivieren, war dessen Aufnahmegeschwindigkeit und -menge sowohl in Leber- als auch in Nierenmitochondrien stark reduziert. Auch in intakten Zellen war die  $\text{Ca}^{2+}$ -Menge in der mitochondrialen Matrix deutlich vermindert, während die extramitochondrialen Kompartimente weniger betroffen waren. Zudem konnte eine Reduzierung des  $\text{O}_2$ -Gehalts in BHK-21-Zellen um 45 % unter dem Einfluss von Citrinin festgestellt werden. Weiterhin beeinträchtigte das Mykotoxin nicht nur die Atmungskette, sondern zeichnete sich auch durch eine signifikante Hemmung der Glykolyse aus. Die Glukoseausnutzung in BHK-21-Zellen war um 86 % vermindert; dabei bildeten die behandelten Zellen eine kleine Menge Pyruvat, aber kein Lactat.

Auch konnte eine Beeinträchtigung der Glutathion-Reduktase, welche für die Beseitigung von freien Radikalen von Bedeutung ist, ebenso nachgewiesen werden wie die vermindert ablaufende Reduktion von  $\text{Fe}^{3+}$  zu  $\text{Fe}^{2+}$  in der Atmungskette (Ribeiro et al. 1997).

In einer neueren Studie wurde berichtet, dass durch Citrinin in HL-60 Zellen die Apoptose über den intrinsischen Weg ausgelöst wurde. Da Antioxidantien diesen Vorgang nicht verhindern konnten, schien oxidativer Stress hierbei keine Rolle zu spielen (Yu et al., 2006).

Andererseits kann Citrinin aber auch einen schützenden Effekt auf biologische Membranen ausüben, indem es die Eisen-induzierte Fettperoxidation durch Bildung eines Citrinin- $\text{Fe}^{3+}$ -Komplexes hemmt (Da Lozzo et al., 2002).

### **5.2.2 Nephrotoxizität**

Die Nephrotoxizität von Citrinin wurde von Krogh et al. (1970) erstmals beschrieben. Die Effekte sind charakterisiert durch eine Nierenvergrößerung, eine zunehmende Degeneration der proximalen Tubuli mit anschließender interstitieller Fibrose und einer fortschreitenden renalen Dysfunktion (Krogh et al., 1970; Betina, 1989; Hanika & Carlton, 1983). Nach einer einmaligen intraperitonealen Applikation von 50 mg Citrinin/kg KGW an Ratten konnte nach 24 h vornehmlich eine zytoplasmatische Vakuolisierung der Epithelzellen der proximalen gewundenen Tubuli beobachtet werden, diese stellten sich nach 48 h als nekrotische Bereiche dar. Nach 72 h konnte eine einsetzende Regeneration der geschädigten Bereiche beobachtet werden und

nach 96 h erschienen einige Nieren morphologisch völlig normal (Lockard et al. 1980). Zu ähnlichen Ergebnissen führten auch die von Jordan et al. (1978) an Ratten durchgeführten Untersuchungen.

Eine einmalige Verabreichung von 125-150 mg/kg KGW p.o. an Kaninchen führte innerhalb von 8 h zu starker Diarrhoe und zu den pathohistologischen Veränderungen einer Degeneration und Nekrose der proximalen gewundenen Tubuli (Hanika & Carlton, 1983).

Bei Mäusen konnte nach einer einmaligen intraperitonealen Applikation von 35 mg/kg KGW innerhalb von 24 - 48 Stunden eine deutliche Reduktion der Nierenmasse sowie eine reduzierte RNA-, Protein- und DNA-,Synthese in Nieren und Leber beobachtet werden (Phillips & Hayes, 1978).

Beim Schwein äußerten sich tägliche Citriningaben (20-40 mg/kg KGW) durch Läsionen und Abschilferungen von Epithelzellen des proximalen Nierentubulus, Anschwellung der Tubuli, Verdickung der Basalmembran und einer gesteigerten Zellproliferation im Interstitium (Krogh et al., 1970). Weiterhin kam es zum Anstieg von Kreatinin und Harnstoff im Blut sowie einer Azotämie, Glukosurie und Proteinurie. Im Urin waren als Folge einer Citriningabe von 20-40 mg/kg KGW zahlreiche vergrößerte Tubulus-Epithelzellen mit stark vergrößerten Zellkernen nachweisbar (Friis et al., 1969).

Bei narkotisierten Hunden führte eine intravenöse Applikation von 80 µg/kg KGW zu einem drastischen Anstieg des Hämatokrit-Wertes und zu elektronenmikroskopisch sichtbaren Schäden im proximalen und distalen Tubulussegment (Krejci et al., 1996). Zu den klinischen Symptomen zählten, nach mehrmaliger täglicher intraperitonealer Verabreichung von 20 oder 40 mg Citrinin/kg KGW (Tod innerhalb von 5 Tagen), Erbrechen, Defäkation, Harnlassen, Tenesmus, Schleim im Urin, Tränenfluss, Polydipsie, Polyurie, und Dehydration. Biochemisch äußerte sich die Nierenschädigung durch den Anstieg von Harnstoff im Blut, Glukosurie, Proteinurie, verringertes spezifisches Gewicht des Harns, erhöhte Aktivität der Oxalazetat-Transaminase und Isozitat-Dehydrogenase, sowie einem Vorkommen von renalen tubularen, nekrotischen Epithelzellen im Harnsediment. Die renalen Läsionen bestanden aus Degeneration und Nekrose des Tubularepithels. Die Nieren erschienen geschwollen, gräulich und wiesen starke Läsionen auf (Carlton et al., 1974; Smith & Henderson, 1991).

Nach einer täglichen oralen Citrinin-Gabe (50-250 mg/kg) über 3 Wochen konnte bei Legehennen nach 3 Tagen eine starke Diarrhoe und vor allem eine vermehrte Speichelproduktion beim Fressen beobachtet werden. Ein negativer Einfluss auf das Körpergewicht, den Futterverbrauch und die Eier-Produktion trat hingegen nicht auf (Ames et al., 1976). Infolge einer täglichen Verabreichung von 500 mg/kg KGW über 3 Wochen kam es bei Broilern zu einem drastischen Anstieg des Wasserverbrauchs und zu starker Diarrhoe (Smith & Henderson, 1991). Einmalige orale Citrinin-Gaben führten bei Puten- (50-80 mg/kg KGW) und Entenküken (30-50 mg/kg KGW) zu einer Degeneration und Nekrose der Tubuliepithelien. Diese Nierenveränderungen waren bei den Puten in verstärktem Maße zu beobachten. Zudem kam es bei beiden Spezies zu einer Lymphzellnekrose und -dezimierung in Thymus und kloakaler Bursa. Bei Puten konnten auch Veränderungen an der Leber inklusive Leberzellnekrose und Gallengangshyperplasie festgestellt werden (Mehdi et al. 1983).

Citrinin wurde aufgrund seiner Nephrotoxizität als eine der Ursachen für das Auftreten der Mycotoxic Porcine Nephropathy (MPN) verdächtigt. Diese beim Schwein vorkommende endemische Nephropathie ist gekennzeichnet durch eine Vergrößerung der Nieren, Degeneration der proximalen Tubuli, eine interstitielle Fibrose und Zystenbildung. Sie tritt gehäuft in Skandinavien auf und wurde auf das Verfüttern von mit *P. viridicatum* (jetzt: *P. verrucosum*) kontaminiertem Getreide zurückgeführt. Obwohl durch das Verfüttern von Citrinin das Krankheitsbild reproduziert werden konnte (Friis et al., 1969), wurde von Krogh et al. (1973) in epidemiologischen Studien zum Vorkommen der nephrotoxischen Mykotoxine Citrinin und Ochratoxin A gezeigt, dass Citrinin nur in 9 % der untersuchten Getreideproben mit Gehalten von 160-2000 ppb und nur zusammen mit Ochratoxin A nachweisbar war.

Die beim Menschen auftretende Balcan Endemic Nephropathy (BEN) weist eine gewisse Ähnlichkeit mit der MPN auf. Sie wurde 1964 von der WHO als eine chronisch verlaufende, nicht-entzündliche, bilaterale Nephropathie charakterisiert. Zudem konnte in endemischen Gebieten eine Häufung von Tumoren der harnableitenden Wege beobachtet werden (Pfohl-Leszkowicz et al., 2002). Von dieser Krankheit ist vor allem die ländliche Bevölkerung bestimmter Gebiete Bulgariens, Rumäniens und Teilen des früheren Jugoslawiens betroffen (Krogh, 1992; Čeovič et al., 1992; Stoev, 1998). Aufgrund der Ähnlichkeit mit der Mycotoxic

Porcine Nephropathy (MPN) wird das nephrotoxische Ochratoxin A als Ursache verdächtigt. Von Vrabcheva et al. (2000) konnte gezeigt werden, dass in den endemischen Gebieten sowohl Ochratoxin A als auch Citrinin in zum Teil hohen Konzentrationen vorkommen; mit Ausnahme von einer Getreideprobe waren alle Citrinin-positiven Proben auch Ochratoxin A-positiv, wobei die gemessenen Citrinin-Konzentrationen 2-200 mal höher waren als die für Ochratoxin A. Die höchsten gefunden Konzentrationen betragen für Ochratoxin A 30-40 ng/g und für Citrinin 420 ng/g. Allerdings werden weitere Auslöser wie diverse Chemikalien und Schwermetalle mit diesem Krankheitsbild in Verbindung gebracht, so dass vermutlich davon ausgegangen werden kann, dass die Entstehung der BEN ein multifaktorielles Geschehen darstellt (Pfohl-Leszkowicz et al., 2002).

### 5.2.3 Genotoxizität

Bezüglich der Mutagenität und Genotoxizität von Citrinin gibt es kontroverse Berichte. In diversen Untersuchungen wurde festgestellt, dass Citrinin für Bakterien genotoxisch ist. So wurden von Citrinin in intakten *Escherichia coli*-Zellen Chromosomenbrüche induziert (Martin et al., 1986), jedoch konnte die Mutationsfrequenz im Ames-Test mit *Salmonella typhimurium* nicht durch Citrinin beeinflusst werden (Wehner et al., 1978, Wuergler et al., 1991, Sabater-Vilar et al., 1999).

Von Föllmann et al. (1998, 1999) wurden verschiedene Untersuchungen zur mutagenen und genotoxischen Wirkung von Citrinin auf eukaryotische Zellen durchgeführt. So konnte *in vitro* im HPRT-Assay mit V79-Zellen keine direkte mutagene Wirkung von Citrinin nachgewiesen werden, während im UDS- und SCE-Assay durch Citrinin konzentrationsabhängig genotoxische Effekte in kultivierten Schweineharnblasen-Epithelzellen aufgezeigt wurden. Auch induzierte Citrinin nach metabolischer Aktivierung in Hepatozyten (Ratte) im Salmonellen-Hepatozyten-Test mutagene Effekte (Sabater-Vilar et al., 1999). Dagegen konnte eine Beeinflussung des Schwesterchromatidaustausches in V79-Zellen (Thust & Kneist, 1979) ebenso wenig beobachtet werden wie genotoxische Eigenschaften von Citrinin in CHO-K1- (bis 15  $\mu$ M Citrinin) und HEK293-Zellen (bis 60  $\mu$ M Citrinin) sowie humanen Lymphozyten (bis 15  $\mu$ M Citrinin) (Liu et al., 2003). In letzterer Studie wurde lediglich eine Stimulation des Hitzeschockproteins HSP70, welches ein Hinweis auf einen durch Citrinin verursachten Zellstress sein könnte und möglicherweise mit einem

durch Citrinin induzierten Apoptose-Prozess in Verbindung steht, aufgezeigt.

Im Mikronukleus-Test verursachte Citrinin (30 und 40  $\mu\text{M}$ ) aneugene Effekte in V79-Zellen durch Hemmung der Mikrotubulus-Polymerisation und Induzierung von CREST-positiven Mikronuklei; klastogene Effekte konnten hingegen nicht nachgewiesen werden (Pfeiffer et al. 1998). Andererseits wurden in Knochenmarkszellen von Mäusen, denen peroral Citrinin (5-20 ppm) verabreicht wurde, klastogene Effekte wie Chromosomenbrüche beobachtet (Jeswal, 1996).

#### **5.2.4 Kanzerogenität**

Über die karzinogene Wirkung von Citrinin wurden bislang nur vereinzelt Untersuchungen durchgeführt. Von der IARC (1986) wurde Citrinin aufgrund der unzureichenden Beweise für seine Karzinogenität gegenüber Tieren und dem Fehlen von Untersuchungen beim Menschen in Gruppe 3 eingeteilt. Dies bedeutet, dass es bezüglich seiner Kanzerogenität gegenüber dem Menschen nicht klassifiziert werden kann.

In einer Studie wurde männlichen DDD Mäusen ( $n=20$ ) über 70 Wochen mit Citrinin (0, 100, 200 mg/kg) kontaminiertes Futter verabreicht. Bei den überlebenden Tieren konnten in dieser Zeit keine Tumoren induziert werden (Kanisawa, 1984). Allerdings trat ein synergistischer Effekt auf, wenn Citrinin gemeinsam mit Ochratoxin A verabreicht wurde, die Inzidenz von Nierentumoren stieg dadurch deutlich an. Bei Ratten (200 bzw. 500 mg Citrinin/kg KGW p.o. über 48 Wochen) konnte ebenfalls keine Bildung von Nierentumoren festgestellt werden. Wenn Citrinin jedoch gemeinsam mit anderen Nieren-Karzinogenen (*N*-nitrosodimethylamin oder *N*-(3,5-dichlorphenyl)succinimid) verabreicht wurde, konnten auch hier synergistische Effekte und ein vermehrtes Auftreten von Nierentumoren beobachtet werden (Shinohara et al., 1976). Nach Langzeitfütterungsversuchen, bei denen männlichen F344 Ratten ein äußerst hoch mit Citrinin kontaminiertes Futter (1 g/kg Futter) 80 Wochen lang verfüttert wurde, konnten allerdings bei 35 von 48 Tieren (72,9 %) pathohistologisch Nierentumoren (Adenome) festgestellt werden (Arai & Hibono, 1983).

### 5.2.5 Embryotoxische und teratogene Effekte

Untersuchungen zu den teratogenen Eigenschaften von Citrinin wurden mit Ratten, Mäusen und Hühnerembryonen durchgeführt. Reddy et al. (1982b) verabreichten Ratten zwischen dem 3. und dem 15. Gestationstag eine einmalige Citrinindosis von 35 mg/kg KGW (s.c.). Obwohl die Implantationszahl infolge dessen nicht verringert wurde, konnte eine erhöhte Resorptionsrate und eine Wachstumsdepression der Feten beobachtet werden. Neben diesen fötotoxischen Effekten wurden teratogene Effekte wie Gaumenspalten, vergrößerte Nieren und Hydrozephalie aufgezeigt. Bei einer gleichzeitigen Gabe von OTA konnten zudem signifikante Skelettmissbildungen der Feten beobachtet werden. Allerdings starben bis zu 50 % der Muttertiere, so dass die Aussagekraft dieser Studie limitiert wurde. Bei ähnlichen Versuchen an Mäusen, denen i.p. bis zu 40 mg/kg/KGW Citrinin verabreicht wurde, beschrieben Hood et al. (1976) ebenfalls eine Wachstumsdepression der Feten. Bei Hühnerembryonen konnte von Ciegler et al. (1977) eine dosisabhängige Inzidenz von Skelettdeformationen, Exenzephalie, Exophthalmus und Krummschnäbeln festgestellt werden.

### 5.2.6 Kombinationseffekte mit anderen Mykotoxinen

Die Mykotoxine Ochratoxin A und Citrinin werden von einer Reihe von *Penicillium*- und *Aspergillus*- Arten teilweise simultan gebildet, somit ist in Abhängigkeit von den Umwelt- und Substratbedingungen ein gleichzeitiges Vorkommen dieser Mykotoxine in Nahrungsmitteln gut möglich.

In diversen Studien wurden Untersuchungen bezüglich der additiven bzw. synergistischen toxikologischen Effekte durchgeführt. So wurden von Creppy et al. (1980) synergistische Effekte bezüglich der hemmenden Wirkung von Citrinin und Ochratoxin A auf die RNA-, die Protein-, und die DNA-Synthese beschrieben. Teratogene synergistische Effekte wurden von Mayura et al. (1984) bei trächtigen Ratten nach einer einmaligen Applikation beider Toxine (Citrinin: 30 mg/kg KGW, OTA: 1,0 mg/kg KGW s.c., zwischen dem 4. und 5. Gestationstag) beobachtet. Es traten signifikant häufiger Skelett- und Gewebemißbildungen als nach der Verabreichung eines einzelnen Toxins auf, wobei zudem 20-40 % der Muttertiere starben. Auch traten nach Applikation von 4 µg Citrinin/Ei und 0,03-0,05 µg

Ochratoxin A/Ei bei Hühnerembryonen additive embryotoxische Effekte in Form von Wachstumsverzögerung und diversen Missbildungen auf (Vesela et al., 1983). Die Verabreichung von 300 mg Citrinin/kg Futter und 3 mg Ochratoxin A/kg Futter hatte bei Untersuchungen an Legehennen nur geringe additive Wirkung (Brown et al., 1986) und bei Broilern waren bei subkutaner Verabreichung der gleichen Toxindosen weder synergistische noch additive Effekte zu beobachten (Manning et al., 1985). Desweiteren wurde eine synergistische karzinogene Wirkung beschrieben. Die Inzidenz von Nierentumoren stieg nach gemeinsamer oraler Verabreichung von Citrinin (200 mg/kg KGW) und Ochratoxin A (25 mg/kg KGW) deutlich an (Kanisawa, 1984). Braunberg et al. (1994) konnten bei *in vitro* Untersuchungen von Nierenrindenzellen von Miniaturschweinen (Hormel-Hanford) synergistische Eigenschaften auf den Transport von para-Aminohippurat-Ionen und die Protein-Synthese nachweisen. Von Heussner et al. (2006) wurden synergistische zytotoxische Effekte von Citrinin und Ochratoxin A und möglicherweise anderen Mykotoxinen anhand von *in vitro* Untersuchungen an LLC-PK1 Zellen und dem MTT Reduktions-Test bestätigt.

### **5.3 Pharmakologische Eigenschaften**

Eine parenterale Citrininapplikation verursacht Effekte, die einer parasymphatischen Stimulation ähneln. Nach einer intravenösen Citrininapplikation hatten Ratten klinische Zeichen einer Miosis, von Speichelfluss, einer gesteigerten bronchialen Sekretion und von Tränenfluss (Ambrose & DeEds, 1946). Diese Effekte konnten teilweise durch Atropin-Applikation reduziert werden. Bei Ratten konnten durch toxische Dosen Vasodilatation, Bronchokonstriktion und faszikuläre Zuckungen verursacht werden (Marquardt & Schäfer, 1997). Zudem setzt Citrinin die Konzentration des Neurotransmitters Dopamin im Gehirn von Mäusen herab und steigert die von Epinephrin, Norepinephrin und 5-Hydroxytryptamin (Betina, 1989). Von Endo und Kuroda (1976) konnte gezeigt werden, dass Citrinin die Cholesterol- und die Triglycerid-Biosynthese in Rattenlebern hemmt. In einer neueren Studie konnten für Citrinin außerdem antioxidative Eigenschaften, nach Bildung eines Michael-Additions-Produktes, nachgewiesen werden (Heider et al., 2006).

## 6 Verfahren zum Nachweis von Citrinin

Im Vergleich zu anderen Mykotoxinen gibt es nur wenige Daten zum Vorkommen von Citrinin in Lebensmitteln. Dies ist teilweise in dessen analytischen Besonderheiten begründet, wobei sich vor allem die Instabilität des Toxins bei der Probenaufbereitung und dadurch verursachte stark schwankende Wiederfindungsraten (Wilson, 1994) sowie ein ausgeprägtes „Tailing“ beim chromatographischen Nachweis als problematisch erweisen können (Dick, 1988).

Zum Citrininnachweis wurden bisher vor allem Dünnschichtchromatographie (TLC) (Blanc et al., 1995a, b, Martins et al., 2002, Gimeno, 1984), Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit UV- (Phillips et al., 1980) oder Fluoreszenzdetektion (Lepom, 1986, Reinhard & Zimmerli, 1999b, Schneewis et al., 2001) sowie Gaschromatographie (GC) (Shu & Lin, 2002). und Enzymimmuntests (EIA) (Abramson et al., 1996, 1999, Dietrich et al., 1998, 1999, Vrabcheva et al., 2000, Schmid, 2002) eingesetzt.

## **C Material und Methoden**

### **1 Material**

#### **1.1 Probenmaterial**

In dieser Arbeit wurden hauptsächlich Getreide und Getreideprodukte sowie Frucht- und Gemüsesäfte untersucht. Zusätzlich wurden einzelne asiatische Lebensmittel analysiert. Die Proben wurden aus dem Lebensmitteleinzelhandel bezogen.

##### *Zerealien*

Insgesamt 380 Proben wurden auf das Vorkommen von Citrinin analysiert. Hiervon waren 279 Getreide/Getreideprodukte und 69 Mais/Maisprodukte. Zur Ergänzung wurden 19 Buchweizen/Buchweizenprodukte und 13 Reisproben untersucht.

##### *Frucht- und Gemüsesäfte*

Von den 98 analysierten Säften waren 34 Apfel-, 27 Orangen-, 7 Trauben-, 8 Ananas-, 4 Birnen-, 7 Bananen-, 3 Pfirsich-, 4 Multivitamin-, 3 Tomatensäfte sowie 1 Mandarinenensaft.

##### *Asiatische Lebensmittel*

Es wurden 2 Proben Sake-Wein und 2 Hoi-Sin Saucen, sowie eine asiatische Gewürzpaste auf das Vorkommen von Citrinin untersucht.

Zur Entwicklung und Validierung der Nachweismethoden wurde mykologisch unbedenkliches Probenmaterial verwendet. Die artifizielle Kontamination des Probenmaterials erfolgte mit Citrinin-Standardlösungen.

## 1.2 Gebrauchsmaterial

### *Probenvorbereitung*

- Analysenwaage, SATORIUS PT 1200, PRECISA XB 620 C
- Getreidemühle/Labormühle, RETSCH ZM1000

### *Extraktion*

- Mikrowellen-Aufschluss-Gerät, MARSX Version 045062, CEM Corporation
- Laborschüttler, VORTEX Genie 2 SCIENTIFIC INDUSTRIES G-560 E, BENDER&HOBEIN
- Horizontalschüttler, JANKE&KUNKEL, KS 250
- Zentrifuge, HERAEUS Sepatech, Megafuge 1,0 R
- Zentrifuge, HERAEUS Biofuge 28 RS
- Vakuumzentrifuge, CHRIST RVC 2-25
- Membran-Vakuumpumpe, VACUUBRAND MZ 2 C
- Kühlfalle, CHRIST CT 04-50
- pH-Meter, WTW pH 535

### *Aufreinigung und Nachbereitung*

- Vakuumextraktionsanlage, J.T. BAKER
- Luer Absperrhähne, MERCK Nr. 19836
- Stickstoffevaporator, BARKEY Vapotherm mobil FN 4578
- Ultraschallbad, BANDELIN Sonorex RK255

### *Analyse*

- HPLC, WATERS 2690 mit Autosampler
- Säule, WATERS Xterra, C<sub>18</sub>, 2,1x150mm, 3,5µm (Nr. 186000408)
- Vorsäule, Phenomenex Security Guard AJO-4, C<sub>18</sub>, 4,0 x 2,0 mm
- Massenspektrometer, FISIONS INSTRUMENTS VG Platform II
- HPLC, Perkin-Elmer Series 200 mit Autosampler
- Massenspektrometer, API 3200 Applied Biosystems
- Säule, Phenomenex, Gemini 5µ C18, 2x150 mm +2x50 mm

## 1.3 Verbrauchsmaterial

- PP-Zentrifugenröhrchen, 15 ml, 50 ml steril, GREINER (188.271)
- Glas-Zentrifugenröhrchen, Brand 114115
- Eppendorf-Zentrifugenröhrchen
- Festphasenkartuschen STRATA-X, 30mg / 1ml, PHENOMENEX (Nr. P208092203)
- Crimp-Top Vial, Crimp-Cap mit Septum, BGB Analytik (110411, 110312021)

- Immunoaffinitätssäulen<sup>1</sup>, monoklonale Citrinin-Antikörper (Immunisierung von Mäusen mit CT-KLH)

#### 1.4 Chemikalien

- Methanol, HPLC-grade, BAKER
- Acetonitril, HPLC-grade, BAKER
- Hexan p.a., MERCK
- Ethylacetat, HPLC-grade, BAKER
- Toluol p.a., MERCK
- Chloroform reinst, MERCK
- Dichlormethan p.a., MERCK
- *tertiär*-Butyl-Methyl-Ether, MERCK
- Salzsäure 1M, MERCK
- Ameisensäure 98 - 100 %, MERCK
- Essigsäure 98 - 100 %, MERCK
- Ortho-Phosphorsäure, MERCK
- Natronlauge 1 M, MERCK
- Reinstwasser, Milli-Q<sup>UF Plus</sup>; MILLIPORE
- PBS, BIOCHROM
- Citrinin (*P. citrininum*): C 1017 (SIGMA)

## 2 Methoden

Zur Entwicklung und Optimierung der Methoden zum Nachweis von Citrinin aus Zerealien, Frucht- und Gemüsesäften sowie asiatischen Lebensmitteln wurden verschiedene Vorversuche durchgeführt, die nachfolgend beschrieben werden. Die Bewertung der einzelnen Methoden in den Vorversuchen erfolgte nach den Kriterien Richtigkeit und Präzision der Ergebnisse sowie dem Auftreten von störenden Interferenzen in den LC-MS bzw. LC-MS/MS-Chromatogrammen. Für die Methodenentwicklung wurde artifizell kontaminiertes Probenmaterial verwendet.

---

<sup>1</sup> Für die Überlassung der Immunoaffinitätssäulen danke ich Prof. Dr. Erwin Märtlbauer und Dr. Richard Dietrich vom Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Ludwig-Maximilians-Universität München

## 2.1 Methodenentwicklung zur Bestimmung von Citrinin in Zerealien

Die Methoden wurden zunächst anhand von artifiziell kontaminierten Weizenproben überprüft und anschließend auch an den anderen Matrices getestet.

### 2.1.1. Vorversuche zur Extraktion

Zur Auswahl eines geeigneten Extraktionsmittels wurden verschiedene Lösungsmittel bzw. -mischungen überprüft. Die Versuchsanordnung ist in Tabelle 4 dargestellt. Zusätzlich wurde nach dem gleichen Schema eine Mikrowellen-unterstützte Extraktion (2 min Aufheizen bis auf 60°C, 5 min Temperatur halten und 5 min Abkühlen) mit Methanol und Methanol/Reinstwasser (7/3) überprüft.

Tabelle 4: Versuchsanordnung zur Überprüfung der Eignung verschiedener Lösungsmittel zur Extraktion von Citrinin bei Zerealien

Methodenschritte	Beschreibung der Methode
Probenvorbereitung	100 g Probe mit der Getreidemühle fein zermahlen, 2 g in PP- Zentrifugenröhrchen einwiegen
Extraktion	Jeweils 8 ml <ul style="list-style-type: none"> <li>• Methanol</li> <li>• Methanol/ Reinstwasser (7/3)</li> <li>• Methanol/Reinstwasser/Essigsäure 98 % (7/3/1)</li> <li>• Acetonitril/ Reinstwasser/Essigsäure 98 % (21/4/1)</li> <li>• Toluol/Ethylacetat/Ameisensäure 100 % (7/3/1)</li> <li>• Chloroform/Methanol (2/8)</li> </ul> zugeben, kräftig schütteln (Vortex, 30 sec) 15 min auf dem Horizontalschüttler extrahieren
Nachbereitung	Zentrifugieren bei 2772 x g, 15 min  2 ml vom Extrakt abnehmen, in Zentrifugengläser überführen, in der Vakuumzentrifuge bei 60°C auf 0,5 ml einengen, in HPLC-Fläschchen überführen, unter einem sanften N <sub>2</sub> -Strom bei 40°C vollständig niedertrocknen, in 200 µl Fließmittel (Acetonitril/Reinstwasser 1/1) lösen
LC-MS-Analyse	Siehe Kapitel 2.6.1

Des Weiteren wurde eine Extraktions-/Aufreinigungsmethode, die zur Vorbereitung der Proben vor einer Aufreinigung mit Immunoaffinitätssäulen entwickelt wurde (Schmid, 2002), in leicht modifizierter Form getestet. Die veränderte Versuchsanordnung ist in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Extraktion von Citrinin aus Weizen mit Ethylacetat und anschließende Flüssig/Flüssig-Aufreinigung des Extrakts

Methodenschritte	Beschreibung der Methode
Probenvorbereitung	100 g Probe mit der Getreidemühle fein zermahlen, 2 g in PP- Zentrifugenröhrchen einwiegen
Extraktion	+ 5 ml HCl kräftig schütteln (Vortex, 30 sec) + 10 ml Ethylacetat 15 min auf dem Horizontalschüttler extrahieren
Nachbereitung	Zentrifugieren bei 1500 x g, 15 min, 4°C 5 ml von der Ethylacetatphase (obere Phase) abnehmen, in Zentrifugengläser überführen
Aufreinigung	Ausschütten mit 5 ml Natriumhydrogencarbonat (0,13 mol/l) Vortex (30 sec) Zentrifugieren bei 1500 x g, 15 min, 4°C 200 µl abnehmen, in HPLC-Fläschchen überführen
LC-MS-Analyse	Siehe Kapitel 2.6.1

## 2.1.2 Vorversuche zur Aufreinigung

Um die Sensitivität und Selektivität des Verfahrens zu erhöhen, wurden neben der direkten Verwendung des Extraktes verschiedenen Verfahren zur Extraktreinigung getestet. Die Probe wurde zunächst wie bereits in Tabelle 4 beschrieben vorbereitet und extrahiert.

### 2.1.2.1 Flüssig-Flüssig-Trennung

Da Citrinin pH-abhängig sowohl in wässrigen als auch in organischen Lösungsmitteln gut löslich ist, wurden zuerst Vorversuche bezüglich der Möglichkeit einer Flüssig-Flüssig-Trennung durchgeführt. Hierfür wurden zahlreiche Kombinationen aus organischen Lösungsmitteln, Säuren und Laugen getestet (vergl. Tabelle 6).

Tabelle 6: Auswahl an Lösungsmitteln, Säuren und Laugen zur Flüssig-Flüssig-Trennung

Organische Lösungsmittel	Laugen	Säuren
Hexan	0,13 M NaHCO <sub>3</sub>	1 M HCl
Dichlormethan	0,1 M NaOH	0,1 % o-Phosphorsäure
Ethylacetat	0,01 M NaOH	1 % Essigsäure
TBME	0,001 M NaOH	0,1 % Essigsäure

Zunächst wurden Vorversuche zur Extraktion von Citrinin aus matrixfreien Standard-Lösungen durchgeführt (Tabelle 7).

Tabelle 7: Vorversuche zur Extraktion von Citrinin aus verschiedenen Säuren

Methodenschritte	Vorversuch Ethylacetat	Vorversuch CH <sub>2</sub> CL <sub>2</sub>
Probenvorbereitung	50 µl Citrinin-Standard (10 µg/ml) in Zentrifugengläser geben, evaporieren	50 µl Citrinin-Standard (10 µg/ml) in Eppendorf Zentrifugenröhrchen geben, evaporieren
Lösen in	a) 1 ml 0,1 % o-Phosphorsäure b) 1 ml 1 % Essigsäure c) 1ml 0,1 % Essigsäure d) 1 ml 1 M HCl	
Extraktion	+ 1 ml Ethylacetat	+ 200 µl Dichlormethan
	kräftig schütteln (Vortex, 30 sec)	
Zentrifugation	389 x g, 3min	
Nachbereitung	500 µl von der Ethylacetat-Phase abnehmen	100 µl von der Dichlormethan-Phase abnehmen
	in HPLC-Fläschchen überführen, unter einem sanften N <sub>2</sub> -Strom bei 40°C vollständig niedertrocknen, in 200 µl Fließmittel (Acetonitril/Reinstwasser 1/1) lösen	
LC-MS-Analyse	Siehe Kapitel 2.6.1	

Daraufhin wurden diverse Varianten der Flüssig-Flüssig-Aufreinigung (Tabelle 8) ausprobiert.

Tabelle 8: Varianten zur Flüssig-Flüssig-Aufreinigung von Zerealienextrakten

Methodenschritte	Flüssig-Flüssig-Aufreinigung					
	Variante A	Variante B	Variante C	Variante D	Variante E	Variante F
Probenvorbereitung	100 g Probe mit der Getreidemühle fein zermahlen, 2 g in PP- Zentrifugenröhrchen einwiegen					
Extraktion	8 ml Methanol zugeben, kräftig schütteln (Vortex, 30 sec) 15 min auf dem Horizontalschüttler extrahieren Zentrifugieren bei 2772 x g, 15 min					
Aufreinigung	2 ml des Extrakts in ein Zentrifugenglas überführen und 30 min bei 60°C in einer Vakuumzentrifuge auf 110 µl einengen.					
	Lösen in 1 ml 0,13 M NaHCO <sub>3</sub> + 2 ml TBME      + 2 ml Ea      + 2 ml TBME      + 2 ml Ea				Lösen in 1 ml 0,01 M NaOH + 2 ml TBME      + 2 ml Ea	
	Vortex, 30 sec ; Zentrifugieren (1171 x g, 6 min) TBME/Ethylacetat-Phase abnehmen und verwerfen					
	+ 1 ml 1 % Essigsäure		+ 1 ml 1 M HCl		+ 1 ml 1 % Essigsäure	
Rückextraktion:	+ 2 ml Ethylacetat zugeben Vortex, 30 sec; Zentrifugieren (1171 x g, 6 min)					
Nachbereitung	1 ml von der Ethylacetatphase abnehmen, in HPLC-Fläschchen überführen, unter einem sanften N <sub>2</sub> -Strom bei 40°C vollständig niedertrocknen und in 150 µl HPLC-Fließmittel (Acetonitril/Reinstwasser 1/1) lösen					
LC-MS-Analyse	Siehe Kapitel 2.6.1					

Fortsetzung Tabelle 8: Varianten zur Flüssig-Flüssig-Aufreinigung von Zerealienextrakten

Methodenschritte	Flüssig-Flüssig-Aufreinigung					
	Variante G	Variante H	Variante I	Variante J	Variante K	Variante L
Probenvorbereitung	100 g Probe mit der Getreidemühle fein zermahlen, 2 g in PP- Zentrifugenröhrchen einwiegen					
Extraktion	8 ml Methanol zugeben, kräftig schütteln (Vortex, 30 sec) 15 min auf dem Horizontalschüttler extrahieren Zentrifugieren bei 2772 x g, 15 min					
Aufreinigung	2 ml des Extrakts in ein Zentrifugenglas überführen und 30 min bei 60°C in einer Vakuumzentrifuge auf 110 µl einengen.					
	Lösen in 1 ml 0,01 M NaOH + 2 ml TBME + 2 ml Ea		Lösen in 1 ml 0,001 M NaOH + 2 ml TBME + 2 ml Ea + 2 ml TBME + 2 ml Ea			
	Vortex, 30 sec ; Zentrifugieren (1171 x g, 6 min) TBME/Ethylacetat-Phase abnehmen und verwerfen					
	+ 1 ml 1 M HCl		+ 1 ml 1 % Essigsäure		+ 1 ml 1 M HCl	
Rückextraktion	+ 2 ml Ethylacetat zugeben Vortex, 30 sec; Zentrifugieren (1171 x g, 6 min)					
Nachbereitung	1 ml von der Ethylacetatphase abnehmen, in HPLC-Fläschchen überführen, unter einem sanften N <sub>2</sub> -Strom bei 40°C vollständig niedertrocknen und in 150 µl HPLC-Fließmittel (Acetonitril/Reinstwasser 1/1) lösen					
LC-MS-Analyse	Siehe Kapitel 2.6.1					

Um die Effizienz der einzelnen Schritte zu überprüfen, wurde von jedem Ansatz jeweils,

- 1 ml von der TBME/Ethylacetat-Phase (Aufreinigungsschritt) abgenommen und in HPLC-Fläschchen überführt, unter einem N<sub>2</sub>-Strom bei 40°C vollständig niedertrocknet, in 150 µl HPLC-Fließmittel (Acetonitril/Reinstwasser 1/1) gelöst und mit der LC-MS analysiert (Kapitel 2.6.1)
- 200 µl von der wässrigen Phase (Säure) in HPLC-Fläschchen überführt und mit der LC-MS analysiert (Kapitel 2.6.1)
- 1 ml von der Ethylacetat-Phase (Rückextraktion) abgenommen und in HPLC-Fläschchen überführt, unter einem sanften N<sub>2</sub>-Strom bei 40°C vollständig niedertrocknet, in 150 µl HPLC-Fließmittel (Acetonitril/Reinstwasser 1/1) gelöst und mit der LC-MS analysiert (Kapitel 2.6.1)

Ergänzend wurde eine Flüssig-Flüssig-Aufreinigung mit Hexan in das Gesamtverfahren integriert (Tabelle 9).

Tabelle 9: Flüssig-Flüssig-Aufreinigung mit Hexan (Variante M)

Methodenschritte	Beschreibung der Methode
Probenvorbereitung	100 g Getreide mit der Getreidemühle fein zermahlen, 2 g in PP-Zentrifugenröhrchen einwiegen
Extraktion	8 ml Methanol zugeben, kräftig schütteln (Vortex, 30 sec) 15 min auf dem Horizontalschüttler extrahieren
Aufreinigung	Zentrifugieren bei 2772 x g, 15 min Extrakt (900 µl) + 100 µl Reinstwasser 2 x 2 ml Hexan zugeben (Vortex, 30 sec), Zentrifugieren (1171 x g, 6 min) Hexanphase verwerfen
Nachbereitung	Extrakt 30 min bei 60°C in einer Vakuumzentrifuge auf 110 µl einengen, in HPLC-Fläschchen überführen, unter einem sanften N <sub>2</sub> -Strom vollständig niedertrocknen und in 150 µl HPLC-Fließmittel (Acetonitril/Reinstwasser 1/1) lösen.
LC-MS-Analyse	Siehe Kapitel 2.6.1

Anhand der mittleren Wiederfindungsraten und Standardabweichungen der Vorversuche haben sich drei Kombinationen als vorteilhaft erwiesen, dabei handelte es sich um die Variante mit Hexan, eine Variante mit Ethylacetat (0,01 M NaOH, 1 M HCl) und eine Variante mit TBME (0,13 M NaHCO<sub>3</sub>, 1 M HCl) als lipophile Phase. Diese Varianten sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Tabelle 10: Übersicht über die Flüssig-Flüssig-Trennung mit Hexan, Ethylacetat und TBME

Methodenschritte	Variante Hexan	Variante Ethylacetat	Variante TBME
Probenvorbereitung	100 g Getreide mit der Getreidemühle fein zermahlen, 2 g in 50 ml PP-Zentrifugenröhrchen einwiegen		
Extraktion	8 ml Methanol zugeben, kräftig schütteln (Vortex, 30 sec), 15 min auf dem Horizontalschüttler extrahieren Zentrifugieren bei 2772 x g, 15 min		
Aufreinigung	-entfällt-	2 ml des Extrakts in ein Zentrifugenglas überführen und 30 min bei 60°C in einer Vakuumzentrifuge auf ca. 100 µl einengen	
	Extrakt (900 µl) mit 100 µl Reinstwasser versetzen, 2 x 2 ml Hexan zugeben, kräftig schütteln (Vortex, 30 sec), zentrifugieren (1171 x g, 6 min), Hexanphase abnehmen und verwerfen	Extrakt mit 1 ml 0,01 M NaOH versetzen, + 2 ml Ethylacetat, kräftig schütteln (Vortex, 30 sec), zentrifugieren (1171 x g, 6 min), obere Phase (Ethylacetatphase) abnehmen und verwerfen	Extrakt mit 1 ml 0,13 M NaHCO <sub>3</sub> versetzen, + 2 ml TBME kräftig schütteln (Vortex, 30 sec), zentrifugieren (1171 x g, 6 min), obere Phase (TBME-Phase) abnehmen und verwerfen
	Extrakt 30 min bei 60°C in einer Vakuumzentrifuge auf 100 µl einengen, in HPLC-Fläschchen überführen, mit 200 µl MeOH nachspülen, mit dem Extrakt vereinen	+ 1 ml 1 M HCl, + 2 ml Ethylacetat kräftig schütteln (Vortex, 30 sec), zentrifugieren (1171 x g, 6 min), 1 ml von der Ethylacetatphase abnehmen, in HPLC-Fläschchen überführen	
Nachbereitung	unter einem sanften N <sub>2</sub> -Strom bei 40°C vollständig niedertrocknen, in 150 µl HPLC-Fließmittel (Acetonitril/Reinstwasser 1/1) lösen		
LC-MS-Analyse	Siehe Kapitel 2.6.1		

### 2.1.2.2 Aufreinigung mittels Festphasenextraktion

#### *Optimierung der Zusammensetzung von Auftrags- und Waschlösung*

Zunächst wurden verschiedene Methanol/Wassergemische (Tabelle 11) als Auftrags- und Waschlösung für die polymerbasierten RP-Festphasenkartuschen (strata-X) getestet. Diese Testreihen wurden mit matrixfreien Standardlösungen jeweils im Doppelansatz durchgeführt. Dabei wurde 1 ml Probenlösung (Methanol/Wassergemisch, in welchem 20 ng/ml Citrinin enthalten waren) aufgetragen und die Säulen anschließend mit Lösungsmitteln gleicher Zusammensetzung gespült. Diese 2 ml (Auftrags- und Waschlösung) wurden gemeinsam aufgefangen; ein Aliquot von 100 µl wurde abgenommen, in HPLC-Fläschchen überführt, unter einem sanften N<sub>2</sub>-Strom vollständig niedertrocknet, in 200 µl HPLC-Fließmittel (Acetonitril/Reinstwasser 1/1) gelöst und mittels LC-MS analysiert.

Tabelle 11: Lösungsmittelmischungen zur Überprüfung des Retentionsverhaltens von Citrinin auf RP-Festphasenkartuschen (strata-X)

Auftragslösung/Waschlösung
MeOH/Reinstwasser (5/95)
MeOH/Reinstwasser (20/80)
MeOH/Reinstwasser (40/60)
MeOH/Reinstwasser (80/20)
MeOH/Reinstwasser (100/0)

#### *Extraktaufbereitung vor der Festphasenextraktion*

Es wurden drei verschiedene Varianten der weiteren Aufbereitung des Rohextrakts für die Festphasenextraktion untersucht (Tabelle 12).

Tabelle 12: Unterschiedliche Methoden der Extraktaufbereitung vor der Festphasenextraktion

Vorversuch a	Vorversuch b	Vorversuch c
300 µl Rohextrakt + 700 µl Reinstwasser	2 ml Rohextrakt einengen auf 200 µl (Vakuumzentrifuge) + 800 µl Reinstwasser	
	-entfällt-	+ 2 ml Hexan Schütteln, Zentrifugieren Hexanphase verwerfen
1 ml polymerbasierte RP-Festphasenkartuschen: Konditionieren: 1 ml MeOH, 1 ml Reinstwasser Probenauftrag: 1 ml Extrakt Waschen: 1 ml MeOH/Reinstwasser (2/8), Eluieren: 1 ml MeOH/Reinstwasser (8/2)		
LC-MS-Analyse (siehe Kapitel 2.6.1)		

*Festphasenextraktion mittels polymerbasierter RP-Festphasenkartuschen*

Anhand der ersten Ergebnisse der Vorversuche wurde folgende Methode (Tabelle 13) zum Nachweis von Citrinin in Zerealien entwickelt. Darauf aufbauend wurden weitere Optimierungsversuche unternommen.

Tabelle 13: Methode zum Nachweis von Citrinin in Zerealien (Variante a)

Methodenschritte	Beschreibung der Methode
Probenvorbereitung	100 g Probe mit der Getreidemühle fein zermahlen, 1 g in PP Zentrifugenröhrchen einwiegen
Extraktion	8 ml Methanol zugeben, kräftig schütteln (Vortex, 30 sec), 15 min auf dem Horizontalschüttler extrahieren, zentrifugieren (6238 x g, 5 min) 2 ml vom Überstand abnehmen, in der Vakuumzentrifuge auf 200 µl einengen, in Zentrifugengläser überführen, mit deionisiertem Wasser (800 µl) auf 1 ml auffüllen
Aufreinigung	Flüssig- Flüssig- Extraktion: 2 x mit je 2 ml Hexan 30 sec vortexen, zentrifugieren (6238 x g, 5 min, 20°C), jeweils obere Phase abnehmen und verwerfen, Hexan-Rest in Vakuumzentrifuge evaporieren  Festphasenextraktion: Konditionieren: 1 ml 100 % MeOH, 1 ml Reinstwasser Probenauftrag: 1 ml Extrakt Waschen: 1 ml MeOH/Reinstwasser (2/8) Eluieren: 1 ml MeOH
Nachbereitung	Das Eluat in der Vakuumzentrifuge bei 60°C auf 0,5 ml einengen, in HPLC-Fläschchen überführen, unter einem sanften N <sub>2</sub> -Strom bei 40°C vollständig niedertrocknen, in 200 µl Fließmittel (Acetonitril/Reinstwasser 1/1) lösen
LC-MS-Analyse	Siehe Kapitel 2.6.1

Zur Überprüfung der einzelnen Verfahrensschritte von Variante a wurden von den Matrices Haferflocken, Weizen und Mais zusätzlich auch der Rohextrakt, der Extrakt nach der Flüssig-Flüssig-Trennung mit Hexan und der vollständig niedertrocknete Rückstand, welcher einem zusätzlichen Hitzestress ausgesetzt wurde, indem er weitere 10 min in der Vakuumzentrifuge verblieb (60°C, 1 mbar), mittels LC-MS analysiert. Eine weitere überprüfte Variante (b), die auf eine Flüssig-Flüssig-Trennung verzichtet, ist in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Methode zum Nachweis von Citrinin in Zerealien (Variante b)

Methodenschritte	Beschreibung der Methode
Probenvorbereitung	100 g Probe mit der Getreidemühle fein zermahlen, 1 g in PP Zentrifugenröhrchen einwiegen
Extraktion	6 ml Methanol zugeben, kräftig schütteln (Vortex, 30 sec), 15 min auf dem Horizontalschüttler extrahieren, zentrifugieren (6238 x g, 5 min), 300 µl vom Überstand abnehmen, in Zentrifugengläser überführen, mit deionisiertem Wasser (700 µl) auf 1 ml auffüllen
Aufreinigung	Festphasenextraktion: Konditionieren: 1 ml 100 % MeOH, 1 ml Reinstwasser Probenauftrag: 1 ml Extrakt Waschen: 1 ml MeOH/ Reinstwasser (2/8) Eluieren: 1 ml MeOH/ Reinstwasser (8/2)
Nachbereitung	Das Eluat in der Vakuumzentrifuge bei 60°C auf 0,5 ml einengen, in HPLC-Fläschchen überführen, mit 200 µl MeOH nachspülen, unter einem sanften N <sub>2</sub> -Strom bei 40°C vollständig niedertrocknen, in 150 µl Fließmittel (Acetonitril/ Reinstwasser 4/6) lösen
LC-MS-Analyse	Siehe Kapitel 2.6.1

### 2.1.2.3 Aufreinigung mittels Immunoaffinitätschromatographie

Um das Ziel einer Nachweisgrenze von 1 µg/kg auch für sehr komplexe Matrices zu erreichen wurden Versuche mit einem IAC-cleanup durchgeführt. Hierbei wurde mykologisch unbedenklicher Weizen verwendet, welcher artifiziell mit einem Citrinin-Standard (25 µg/kg) kontaminiert wurde.

Von dem methanolischen Extrakt (vergl. Tabelle 4) wurde 1 ml abgenommen und mit PBS auf einen Methanolgehalt von 10 % (v/v) eingestellt. Anschließend wurden auf die mit 5 ml PBS vorgespülten IAC-Säulen 10 ml des verdünnten Rohextraktes bei einer Flussrate von max. 2-3 ml mittels Einzelspritzen aufgetragen. Es folgte ein zweiphasiger Waschschrift (5 ml 10 % Methanol/PBS und 5 ml deionisiertes Wasser). Daraufhin wurden 5 ml Luft durch die Säulen gepresst, um vorhandene Restflüssigkeit vollständig zu entfernen. Die Elution des gebundenen Citrinins erfolgte mit 2 ml Methanol. Davon wurde 1 ml abgenommen, in HPLC-Fläschchen überführt, unter einem N<sub>2</sub>-Strom bei 40°C vollständig niedertrocknet und in 150 µl

HPLC-Fließmittel (Acetonitril/Reinstwasser 1/1) gelöst. Die Proben wurden mittels LC-MS analysiert (siehe 2.6.1).

## 2.2 Methodenentwicklung zur Bestimmung von Citrinin in Frucht- und Gemüsesäften

Zur Entwicklung und Optimierung der Nachweismethode von Citrinin in Säften wurden verschiedene Vorversuche durchgeführt, die nachfolgend beschrieben werden. Die Bewertung der einzelnen Methoden in den Vorversuchen erfolgte nach den Kriterien Richtigkeit, Präzision und dem Auftreten von störenden Interferenzen in der LC-MS/MS-Analyse. Für diese Vorversuche wurden citrininfreie Saftproben artifiziell kontaminiert ( $c=0,5$  ng/ml). Zunächst wurden die Proben in Anlehnung an die Methode zur Bestimmung von Citrinin in Zerealien mit MeOH versetzt, anschließend zentrifugiert und nach Einstellung eines MeOH Anteils von 30 % auf polymerbasierte RP-Festphasenkartuschen aufgetragen (Tabelle 15).

Tabelle 15: Vorversuch zur Bestimmung von Citrinin in Säften durch Zentrifugation und Aufreinigung mit polymerbasierten Festphasenkartuschen

Methodenschritte	Beschreibung der Grundmethode
Probenvorbereitung	400 µl Saft + 400 µl MeOH Vortex (30 sec) 10 min bei Raumtemperatur stehen lassen
Zentrifugation	6596 x g, 5 min
	600 µl abnehmen + 400 µl Reinstwasser
Aufreinigung	Festphasenextraktion: Konditionieren: 1 ml 100 % MeOH, 1 ml Reinstwasser Probenauftrag: 1 ml Probe Waschen: 1 ml MeOH/ Reinstwasser (2/8) Eluieren: 1 ml MeOH/ Reinstwasser (8/2)
Nachbereitung	Das Eluat in der Vakuumzentrifuge bei 60°C auf 0,5 ml einengen, in HPLC-Fläschchen überführen, unter Stickstoff bei 40°C vollständig niedertrocknen, in 100 µl Fließmittel MeOH/Reinstwasser (4/6) lösen
LC-MS-Analyse	Siehe Kapitel 2.6.2

Des Weiteren wurde die Eignung der Extraktionsmittel Ethylacetat und Dichlormethan zur Extraktion von Citrinin aus Säften überprüft. Die Versuchsanordnung ist Tabelle 16 zu entnehmen.

Tabelle 16: Methodenbeschreibung der Vorversuche zur Extraktion von Citrinin aus Säften

Methodenschritte	Vorversuch Ethylacetat	Vorversuch Dichlormethan
Extraktion	0, 5 ml Saft/1 N HCl (1/1) + 2 ml Ethylacetat kräftig schütteln (Vortex 30 s)	0, 5 ml Saft/1 N HCl (1/1) + 0,5 ml Dichlormethan kräftig schütteln (Vortex 30 s)
Zentrifugation	693 x g/5 min	
Nachbereitung	1 ml von der oberen Phase abnehmen	250 µl von der unteren Phase abnehmen
	In Reagenzgläser überführen, in der Vakuumzentrifuge einengen (40°C, 10 min)	-entfällt-
	In HPLC-Fläschchen überführen, unter einem sanften N <sub>2</sub> - Strom bis zur vollständigen Trockene evaporieren; in 100 µl MeOH/Reinstwasser (4/6) lösen	
LC-MS/MS-Analyse	Siehe Kapitel 2.6.2	

In weiteren Vorversuchen wurde untersucht, inwiefern sich eine Änderung der Zentrifugationsparameter und eine Variation der Molarität der Salzsäure auf die Ergebnisse auswirken. Die Varianten dieser Optimierungsversuche sind in Tabelle 17 zusammengefasst.

Tabelle 17: Varianten zur Optimierung der Methode *Extraktion mit Ethylacetat* bei Frucht- und Gemüsesäften I

Methodenschritte	Variante 1	Variante 2	Variante 3	Variante 4
Probenvorbereitung	0,5 ml Saft in Zentrifugengläser überführen			
1. Extraktion	+ 0,5 ml 1 M HCl kräftig schütteln (Vortex 30 sec)	+ 0,5 ml 1 M HCl kräftig schütteln (Vortex 30 sec)	+ 0,5 ml 2 M HCl kräftig schütteln (Vortex 30 sec)	+ 0,5 ml 2 M HCl kräftig schütteln (Vortex 30 sec)
	+ 5 ml Ethylacetat, Vortex (30 sec)			
Zentrifugation	2772 x g/5 min	1559 x g/5 min	2772 x g/5 min	1559 x g/5 min
	Überstand abnehmen, in Reagenzgläser überführen, bei 40°C 25 min in der Vakuumzentrifuge einengen			
2. Extraktion	+ 5 ml Ethylacetat (auf Rückstand), Vortex (30 sec)			
Zentrifugation	2772 x g/5 min	1559 x g/5 min	2772 x g/5 min	1559 x g/5 min
Nachbereitung	Überstand abnehmen, zum 1. Überstand dazugeben, beide Überstände bei 40°C in der Vakuumzentrifuge auf 200 µl einengen (25 min), in HPLC-Fläschchen überführen, unter einem sanften N <sub>2</sub> -Strom bis zur vollständigen Trockene evaporieren, in 250 µl MeOH/Reinstwasser (4/6) lösen			
LC-MS/MS-Analyse	Siehe Kapitel 2.6.2			

Zur Optimierung des Analyseverfahrens wurde die Methode *Extraktion mit Ethylacetat* in 3 weiteren Varianten (Tabelle 18) getestet. Bei Variante a wurde mit einem 10-fachen Ethylacetatüberschuss (0,5 ml Saft/2 M HCl-Gemisch (1/1) und 5 ml Ethylacetat) und bei Variante b mit einem 5-fachen Ethylacetatüberschuss (1 ml Saft/1 M HCl-Gemisch (1/1) und 5 ml Ethylacetat) extrahiert. Bei Variante c wurde ebenfalls mit einem 5-fachen Überschuss an organischem Lösungsmittel extrahiert, allerdings wurde die Saftprobe hierbei mit 0,1 M Salzsäure angesäuert.

Tabelle 18: Varianten zur Optimierung der Methode *Extraktion mit Ethylacetat* bei Frucht- und Gemüsesäften II

Methodenschritte	Variante a	Variante b	Variante c
Probenvorbereitung	0,25 ml Saft in Zentrifugengläser überführen + 0,25 ml 2 M HCl kräftig schütteln (Vortex 30 sec)	0,5 ml Saft in Zentrifugengläser überführen + 0,5 ml 1 M HCl kräftig schütteln (Vortex 30 sec)	0,5 ml Saft in Zentrifugengläser überführen + 0,5 ml 0,1 M HCl kräftig schütteln (Vortex 30 sec)
1. Extraktion	+ 5 ml Ethylacetat kräftig schütteln (Vortex 30 sec)		
Zentrifugation	2772 x g/5 min		
	Überstand abnehmen, in Reagenzgläser überführen, in der Vakuumzentrifuge bei 40°C 25 min einengen		
2. Extraktion	+ 5 ml Ethylacetat (auf Rückstand), kräftig schütteln (Vortex 30 sec)		
Zentrifugation	2772 x g/5 min		
Nachbereitung	Überstand abnehmen, mit dem 1. Extrakt vereinigen, zusammen in der Vakuumzentrifuge bei 40°C 35 min auf 200 µl einengen (35 min), in HPLC-Fläschchen überführen, unter einem sanften N <sub>2</sub> -Strom bis zur vollständigen Trockene einengen, in 250 µl MeOH/Reinstwasser (1/1) lösen		
LC-MS/MS-Analyse	Siehe Kapitel 2.6.2		

### 2.3 Orientierende Untersuchungen zur Stabilität von Citrinin in Fruchtsäften

Die Stabilität von Citrinin in Apfelsaft wurde in einem Versuchsansatz orientierend überprüft. Hierbei wurde die Toxinkonzentration im Saft auf 0,5 ng/ml eingestellt. Das gewählte Schema zur Probenentnahme ist in Tabelle 19 angegeben. Die Probenaufbereitung erfolgte gemäß der Methode *Extraktion mit Ethylacetat* (Variante b, Tabelle 18).

Tabelle 19: Probennahmeschema zum Abbauverhalten von Citrinin in Apfelsaft (Extraktion nach artifizieller Kontamination)

Ansatz Nr.	Probenahme (h)
1	0
2	2
3	24
4	72
5	168

### 2.4 Bestimmung von Citrinin in asiatischen Lebensmitteln

Basierend auf den Methoden für Getreide sowie Frucht- und Gemüsesäfte wurden die adaptierten Versuchsanordnungen zur Bestimmung von Citrinin in asiatischen Lebensmitteln überprüft. Die Sake-Weinproben wurden ohne Vorbereitung direkt mittels LC-MS/MS analysiert (siehe Kapitel 2.6.2). Die komplexere Matrix der Saucen und Würzpasten wurde mit folgender Methode (Tabelle 20) aufbereitet und analysiert.

Tabelle 20: Arbeitsanweisung zum Citrininnachweis in asiatischen fermentierten Lebensmitteln

Methodenschritte	Arbeitsanweisung
Probenvorbereitung	1 g Probe + 5 ml 1 M HCL kräftig schütteln (Vortex 30 sec)
Extraktion	+ 5 ml Ethylacetat kräftig schütteln (Vortex 30 sec) 15 min schütteln auf dem Horizontalschüttler
Zentrifugation	1559 x g, 10 min
Nachbereitung	2 ml vom Überstand in Zentrifugengläser überführen, in der Vakuumzentrifuge auf 200 µl einengen, in HPLC-Fläschchen überführen, unter einem sanften N <sub>2</sub> -Strom bis zur vollständigen Trockene evaporieren, in 200 µl Acetonitril/Reinstwasser (4/6) lösen
LC-MS-Analyse	Siehe Kapitel 2.6.2

## 2.5 Validierung der Methoden

Zur Ermittlung der Bestimmbarkeitsgrenzen und Wiederfindungsraten wurden Nullproben der jeweiligen Matrices mit Citrininstandard in unterschiedlichen Konzentrationsstufen artifiziell kontaminiert. Die Proben wurden gemäß den ausgewählten Methoden (vergl. Kapitel 2.7) aufbereitet und mittels LC-MS bzw. LC-MS/MS analysiert (vergl. Kapitel 2.6). Als Kontrolle dienten die nicht kontaminierten Nullproben.

### *Zerealien*

Es wurden Getreideproben (Weizen, Hafer, Dinkel, Roggen, Gerste und Hirse), sowie Buchweizen-, Mais-, Cornflakes-, und Reisproben mit einer Citrinin-Standardlösung in 2 Konzentrationsstufen (1 µg/kg und 10 µg/kg) versetzt und in einem Fünffachansatz (n=5) analysiert.

### *Frucht- und Gemüsesäfte*

Für die Untersuchung von Frucht- und Gemüsesäften wurden ebenfalls Nullproben artifiziell kontaminiert und im fünffachen Ansatz analysiert. Die eingestellten Konzentrationen sind in Tabelle 21 zusammengefasst. Die Analyse erfolgte mittels

LC-MS/MS. Als Kontrolle wurden die Nullproben mit dem gleichen Verfahren untersucht.

Tabelle 21: Konzentrationsstufen der Methodvalidierung zur Analyse von Citrinin in Frucht- und Gemüsesäften

Probenart	Konzentrationsstufen [ng/ml]
Apfelsaft*	0,02; 0,1; 0,5
Orangensaft*	0,02; 0,1; 0,5
Traubensaft*	0,02; 0,1; 0,5
Birnensaft*	0,02; 0,1; 0,5
Tomatensaft*	0,02; 0,1; 0,5
Bananensaft*	0,02; 0,1; 0,5

\* Jede Konzentrationsstufe wurde im Fünffachansatz (n=5) untersucht

#### *Asiatische Lebensmittel*

Zur Überprüfung der Richtigkeit und Präzision der Analysemethode zum Citrininnachweis in asiatischen Lebensmitteln wurde eine Hoi-Sin Sauce mit Citrinin (10 µg/kg) artifiziert kontaminiert, anhand der in Tabelle 20 beschriebenen Methode in einem Dreifachansatz aufbereitet und mittels LC-MS/MS analysiert. Zudem wurde eine Reisweinprobe mit Citrininstandardlösung (0,1 ng/ml) versetzt und in einem Fünffachansatz mittels LC-MS/MS analysiert.

## 2.6 Massenspektrometrische Bestimmung von Citrinin

Die Analyse der Probenextrakte erfolgte mittels LC-MS bzw. LC-MS/MS unter den nachfolgend beschriebenen Bedingungen.

### 2.6.1 LC-MS-Analyse der Zerealien

Die Analyse der Zerealienextrakte wurde mittels LC-MS durchgeführt. Hierbei wurden folgende Bedingungen gewählt:

Tabelle 22: LC-MS-Parameter zur Analyse von Citrinin in Zerealien

Injektionsvolumen	50 $\mu$ l
Mobile Phase A	Reinstwasser
Mobile Phase B	Acetonitril
Mobile Phase C	Reinstwasser/Ameisensäure 95/5
Ionisation	Elektrospray positiv (ESI <sup>+</sup> )
Säulentemperatur	30°C
Aufgezeichnete Ionenmassen	m/z 251, 233
Cone Voltage	30 V (251), 60 V (233)
Identifizierung	Retentionszeit und relative Signalintensität der aufgezeichneten Ionenmassen
Quantifizierung	Signalintensität des Quasimolekülions (m/z 251) oder des Fragments (m/z 233) der Probe verglichen mit der eines externen Citrinin-Standards

#### Gradientenprogramm

Zeit [min]	Anteil A [% der mobilen Phase]	Anteil B [% der mobilen Phase]	Anteil C [% der mobilen Phase]	Flussrate [ml/min]
0	50	40	10	0,3
5 <sup>1</sup>	30	60	10	0,3
8	30	60	10	0,3
10	0	90	10	0,5
14	50	40	10	0,5

<sup>1</sup>linearer Anstieg

## 2.6.2 LC-MS/MS-Analyse der Obst- und Gemüsesäfte sowie der asiatischen Lebensmittel

Die Analyse der Säfte und asiatischen Lebensmittel erfolgte mittels LC-MS/MS. Hierbei wurden folgende Bedingungen gewählt:

Tabelle 23: LC-MS/MS-Parameter zur Analyse von Citrinin in Fruchtsäften und asiatischen Lebensmitteln

Injektionsvolumen	10 µl
Mobile Phase A	Reinstwasser/5 mM Ammoniumformiat
Mobile Phase B	Methanol/5 mM Ammoniumformiat
Ionisation	Elektrospray negativ (ESI <sup>-</sup> )
Säulentemperatur	30°C
Aufgezeichnete Übergänge	m/z 249/205, 249/175
Identifizierung	Retentionszeit und relative Signalintensität der aufgezeichneten Ionenmassenübergänge
Quantifizierung	Signalintensität des Fragments m/z 249/175 verglichen mit der eines externen Citrinin-Standards

### HPLC-Gradientenprogramm

Zeit [min]	Anteil A [% der mobilen Phase]	Anteil B [% der mobilen Phase]	Flussrate [ml/min]
4 (Equilibrierung)	60	40	0,4
0	60	40	0,4
8 <sup>1</sup>	0	100	0,4
12	0	100	0,4

<sup>1</sup>linearer Anstieg

## 2.7 Untersuchung der Handelsproben

Für den Hauptversuch, die Untersuchung der Handelsproben (Zerealien und Fruchtsäfte) auf ihren Citrinin-Gehalt, wurden die in den Tabellen 24 und 25 beschriebenen Methoden ausgewählt.

Tabelle 24: Methodenbeschreibung zur Analyse von Citrinin in Zerealien

Methodenschritte	Beschreibung der Methode
Probenvorbereitung	100 g Probe mit der Getreidemühle fein zermahlen, 1 g in PP Zentrifugenröhrchen einwiegen
Extraktion	6 ml Methanol zugeben, kräftig schütteln (Vortex, 30 sec), 15 min auf dem Horizontalschüttler extrahieren, zentrifugieren (6238 x g, 5 min), 300 µl vom Überstand abnehmen, in Zentrifugengläser überführen, mit deionisiertem Wasser (700 µl) auf 1 ml auffüllen
Aufreinigung	Festphasenextraktion: Konditionieren: 1 ml 100 % MeOH, 1 ml Reinstwasser Probenauftrag: 1 ml Extrakt Waschen: 1 ml MeOH/ Reinstwasser (2/8) Eluieren: 1 ml MeOH/ Reinstwasser (8/2)
Nachbereitung	Das Eluat in der Vakuumzentrifuge bei 60°C auf 0,5 ml einengen, in HPLC-Fläschchen überführen, mit 200 µl MeOH nachspülen, unter einem sanften N <sub>2</sub> -Strom bei 40°C vollständig niedertrocknen, in 150 µl Fließmittel (Acetonitril/ Reinstwasser 4/6) lösen
LC-MS-Analyse	Siehe Kapitel 2.6.1

Tabelle 25: Methodenbeschreibung zur Analyse von Citrinin in Frucht- und Gemüsesäften

Methodenschritte	Beschreibung der Methode
Probenvorbereitung	0,5 ml Saft in Zentrifugengläser überführen, + 0,5 ml 1 M HCl kräftig schütteln (Vortex 30 sec)
1. Extraktion	+ 5 ml Ethylacetat kräftig schütteln (Vortex 30 sec)
Zentrifugation	2772 x <i>g</i> /5 min  Überstand abnehmen, in Reagenzgläser überführen, in der Vakuumentrifuge bei 40°C 25 min einengen
2. Extraktion	+ 5 ml Ethylacetat (auf Rückstand), kräftig schütteln (Vortex 30 sec)
Zentrifugation	2772 x <i>g</i> /5 min
Nachbereitung	Überstand abnehmen, mit dem 1. Extrakt vereinigen, zusammen in der Vakuumentrifuge bei 40°C 35 min auf 200 µl einengen (35 min), in HPLC-Fläschchen überführen, unter einem sanften N <sub>2</sub> -Strom bis zur vollständigen Trockene einengen, in 250 µl MeOH/Reinstwasser (1/1) lösen
LC-MS/MS-Analyse	Siehe Kapitel 2.6.2

## D Ergebnisse

Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse der Vorversuche zum Nachweis von Citrinin in Zerealien, Frucht- und Gemüsesäften und asiatischen Lebensmitteln dargestellt. Des Weiteren werden die Ergebnisse der Methodvalidierung sowie der Untersuchungen zum Vorkommen des Mykotoxins zusammengefasst und besprochen.

### 1 Nachweis und Bestimmung von Citrinin mittels ESI-MS bzw. –MS/MS

*Single Quadrupole (FISONS INSTRUMENTS VG, Platform II)*

Die Auswertung der LC-MS-Chromatogramme (Abbildung 2) ergab, dass Citrinin mittels LC-MS (ESI+) in Zerealienproben sensitiv nachgewiesen werden kann. Die Identifizierung erfolgte anhand der Retentionszeit (Gradientenprogramm: 6,5 min) und der dominanten Ionenmassen  $m/z$  251  $[M+H^+]$  und  $m/z$  233  $[M+H-H_2O]$ . Weitere Fragmente wurden unter den angewandten Bedingungen (Cone Voltage 30 - 100 V) nur in sehr geringem Umfang gebildet (Abbildung 3) und daher nicht zur qualitativen und quantitativen Auswertung herangezogen.

Die Quantifizierung erfolgte durch den Vergleich der Signalintensität der Ionenmasse  $m/z$  251 bzw.  $m/z$  233 der Probe mit der eines externen Standards.

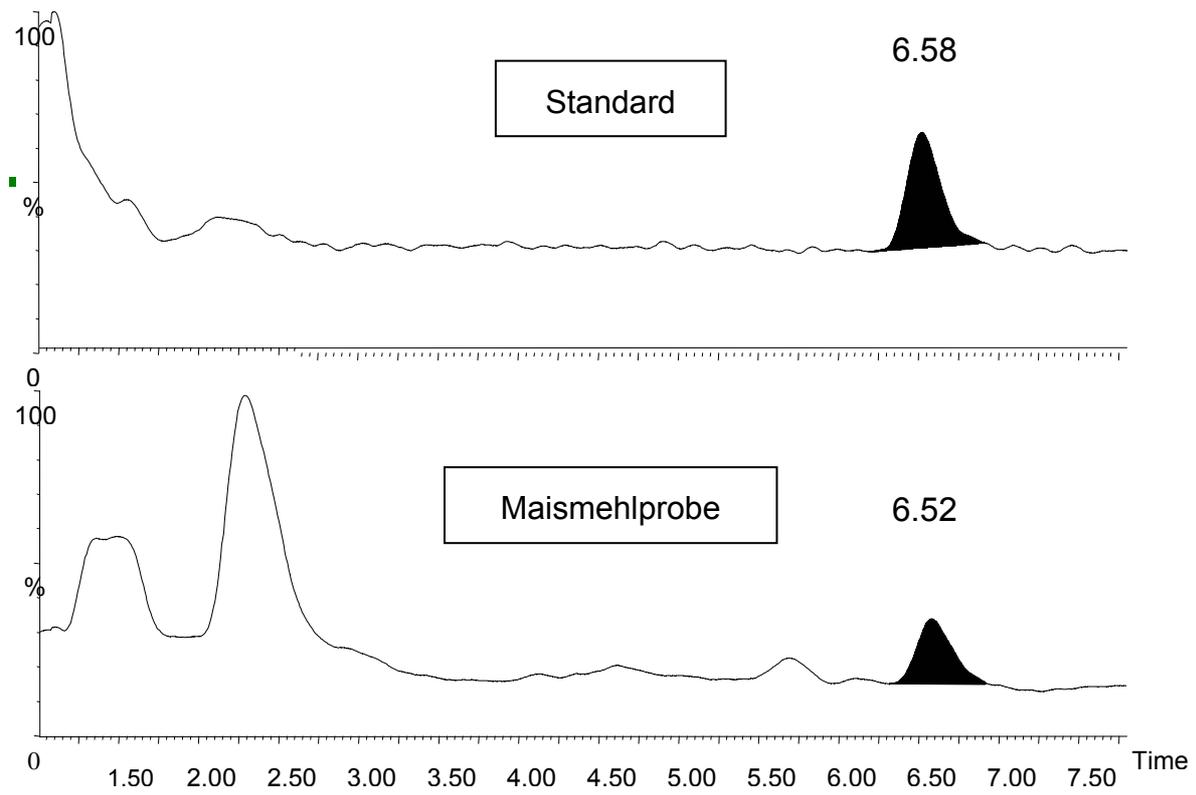


Abbildung 2: LC-MS-Chromatogramme (m/z 251) einer Standardlösung (5 ng/ml, oben) und einer Citrinin-haltigen Maismehlprobe (4,4 µg/kg, unten)

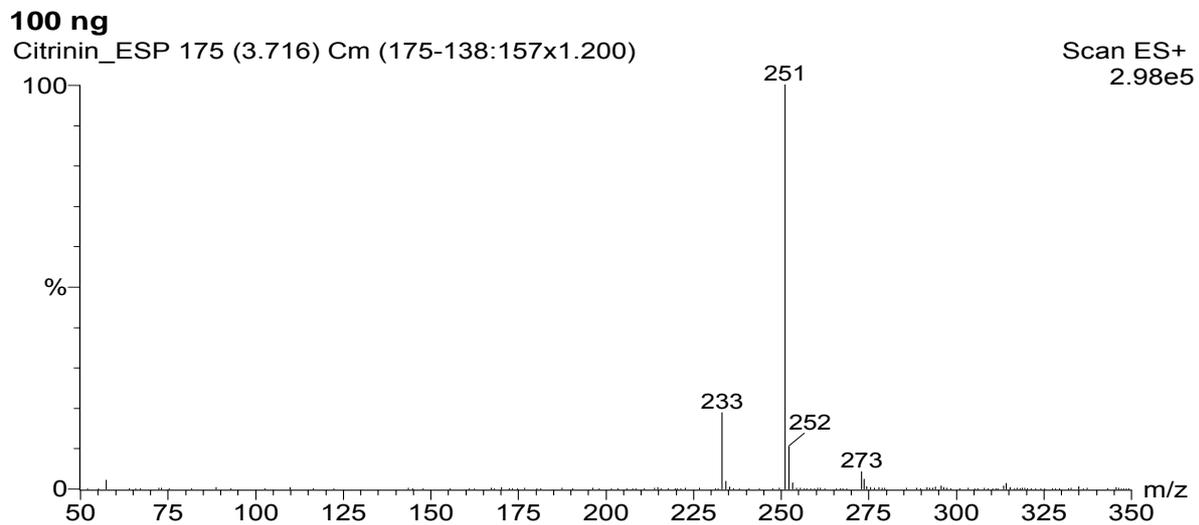


Abbildung 3: Massenspektrum von Citrinin (ESI+, Cone Voltage 30 V)

*Triple Quadrupole (API 3200, Applied Biosystems)*

Die Auswertung der LC-MS/MS-Chromatogramme (Abbildung 4) ergab, dass Citrinin mittels LC-MS/MS (ESI<sup>-</sup>) sehr sensitiv in Fruchtsäften nachgewiesen werden kann. Die Identifizierung erfolgte anhand der Retentionszeit (Gradientenprogramm: 4,6 min) und der relativen Signalintensität der aufgezeichneten Ionenmassenübergänge ( $m/z$  249/205, 249/175). Die Quantifizierung erfolgte durch den Vergleich der Signalintensität des Fragments  $m/z$  249/175 mit der eines externen Citrininstandards.

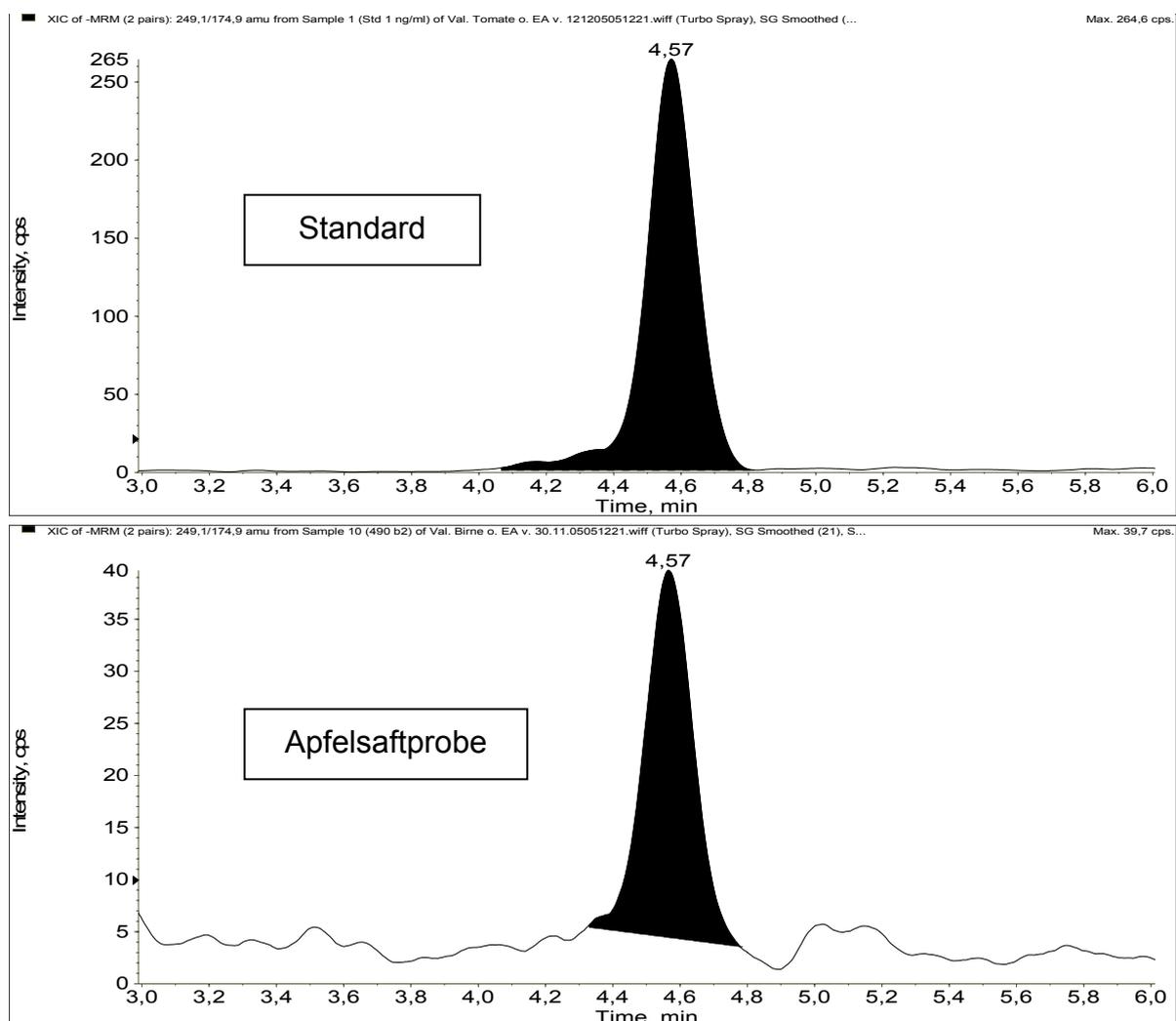


Abbildung 4: LC-MS/MS-Chromatogramme ( $m/z$  249/175) einer Standardlösung (1 ng/ml, oben) und einer mit Citrinin artifiziiell kontaminierten Apfelsaftprobe (c: 0,1 ng/ml, unten)

## 2 Vorversuche zur Bestimmung von Citrinin in organischen Matrices

### 2.1 Zerealien

Zunächst werden die Resultate der Extraktionsversuche und der Versuche zur Probenaufreinigung dargestellt.

#### 2.1.1 Extraktion

Die Ergebnisse der orientierend durchgeführten Untersuchungen zum Vergleich der Mikrowellen-unterstützten Extraktion (Microwave-Accelerated-Solvent-Extraction, MASE) gegenüber der konventionellen Extraktion auf dem Horizontalschüttler sind in Tabelle 26 zusammengefasst. Die Wiederfindungsraten zeigten dabei eine vergleichbare Richtigkeit der Ergebnisse. Da aber die Mikrowellen-unterstützte Extraktion einerseits teilweise eine geringere Präzision der Resultate (Standardabweichung der Wiederfindungsraten) erkennen lies, andererseits der Arbeitsaufwand für diese Methode höher ist, wurde in den weiteren Versuchen auf diese Technik verzichtet.

Tabelle 26: Richtigkeit der Analysen nach Extraktion von Citrinin aus Zerealien mit verschiedenen Extraktionsmethoden

Extraktionsmittel	Extraktionsmethode	Wiederfindungsrate [Mittelwert $\pm$ s (%); n=3]
MeOH	Mikrowelle	69,1 $\pm$ 9,6
MeOH	Horizontalschüttler	70,4 $\pm$ 1,4
MeOH/Reinstwasser (7/3)	Mikrowelle	30,9 $\pm$ 3,7
MeOH/Reinstwasser (7/3)	Horizontalschüttler	30,4 $\pm$ 3,7

\* Mittelwerte von jeweils 3 Wiederholungen

In weiteren Vorversuchen wurden verschiedene Lösungsmittel auf ihre Eignung zur Extraktion von Citrinin aus Zerealien getestet. Hierbei zeigten sich erhebliche Unterschiede in der Richtigkeit und Präzision der Resultate (Tabelle 27).

Tabelle 27: Richtigkeit der Analysen nach Extraktion von Citrinin mit verschiedenen Extraktionsmitteln bei Zerealien (c=50 µg/kg)

Extraktionsmittel	Wiederfindungsrate [Mittelwert ± s (%); n=3]
Methanol	84,1 ± 2,8
Methanol/Reinstwasser (7/3)	30,9 ± 3,7
Methanol/Reinstwasser/Essigsäure 98 % (7/3/1)	20,1 ± 6,5
Acetonitril/Reinstwasser/Essigsäure 98 % (21/4/1)	18,1 ± 4,0
Toluol/Ethylacetat/Ameisensäure 100 % (7/3/1)	45,5 ± 21,0
Chloroform/Methanol (2/8)	43,2 ± 20,4
HCl/Ethylacetat (1/2) + (NaHCO <sub>3</sub> )	52,0 ± 33,6

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde Methanol als Extraktionsmittel ausgewählt.

## 2.1.2 Aufreinigung

Zur Aufreinigung der Probenextrakte standen verschiedene Methoden zur Auswahl. In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Vorversuche zur Aufreinigung beschrieben.

### 2.1.2.1 Flüssig-Flüssig-Trennung

Die Ergebnisse der Vorversuche zur Extraktion von Citrinin aus diversen Säuren mit Ethylacetat bzw. Dichlormethan sind in Tabelle 28 dargestellt. Aus den erzielten Wiederfindungsraten ist ersichtlich, dass sich Ethylacetat in diesem Fall besser eignet als der chlorierte Kohlenwasserstoff.

Tabelle 28: Mittlere Wiederfindungsraten von Citrinin nach Extraktion aus Säuren mit Dichlormethan oder Ethylacetat

Methodenschritte	Wiederfindungsrate [Mittelwert aus 2 Einzelwerten]
Gelöst in: 1 ml 0,1 % o-Phosphorsäure Ausgefällt mit: 200 µl Dichlormethan	29,9
Gelöst in: 1 ml 1 % Essigsäure Ausgefällt mit: 200 µl Dichlormethan	35,5
Gelöst in: 1 ml 0,1 % Essigsäure Ausgefällt mit: 200 µl Dichlormethan	34,2
Gelöst in: 1 ml 1 M HCl Ausgefällt mit: 200 µl Dichlormethan	38,1
Gelöst in: 1 ml 0,1 % o-Phosphorsäure Ausgefällt mit: 1 ml Ethylacetat	96,2
Gelöst in: 1 ml 1 % Essigsäure Ausgefällt mit: 1 ml Ethylacetat	102,8
Gelöst in: 1 ml 0,1 % Essigsäure Ausgefällt mit: 1 ml Ethylacetat	100,7
Gelöst in: 1 ml 1 M HCl Ausgefällt mit: 1 ml Ethylacetat	142,0

Die Ergebnisse der Vorversuche zur Flüssig-Flüssig-Trennung zeigten hohe Verluste des Mykotoxins bei den meisten Varianten (Tabelle 29).

Tabelle 29: Wiederfindungsraten von Citrinin in den einzelnen Phasen bei verschiedenen Varianten der Flüssig/Flüssig-Aufreinigung von Weizenextrakten

Variante	Wiederfindungsrate [%Mittelwert aus 2 Einzelwerten]		
	Aufreinigung (TBME/Ea)	Wässrige Phase	Ethylacetatphase (Rückextraktion)
Variante A (0,13 M NaHCO <sub>3</sub> /TBME/1 %Essigsäure)	3,9	41,8	n.n.
Variante B (0,13 M NaHCO <sub>3</sub> /Ea/1 %Essigsäure)	27,9	22,0	n.n.
Variante C (0,13 M NaHCO <sub>3</sub> /TBME/1 M HCl)	4,2	n.n.	26,2
Variante D (0,13 M NaHCO <sub>3</sub> /Ea/1 M HCl)	30,3	n.n.	13,5
Variante E (0,01 M NaOH/TBME/1 %Essigsäure)	n.n.	n.n.	15,1
Variante F (0,01 M NaOH/Ea/1 %Essigsäure)	11,7	13,2	17,8
Variante G (0,01 M NaOH/TBME/1 M HCl)	n.n.	n.n.	35,8
Variante H (0,01 M NaOH/Ea/1 M HCl)	13,8	n.n.	20,5
Variante I (0,001 M NaOH/TBME/1 %Essigsäure)	n.n.	n.n.	35,2
Variante J (0,001 M NaOH/Ea/1 %Essigsäure)	n.n.	n.n.	26,2
Variante K (0,001 M NaOH/TBME/1 M HCl)	n.n.	n.n.	30,4
Variante L (0,001 M NaOH/Ea/1 M HCl)	5,7	n.n.	18,1

Mit der Aufreinigung mit Hexan (Variante M) wurde dagegen eine mittlere Wiederfindungsrate von 79,2 % erreicht.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde die Validität von drei Methoden zur Extraktion und Aufreinigung von Citrinin in Weizen überprüft (Tabelle 10). Diese zeigten dabei eine zufrieden stellende Richtigkeit und Präzision der Ergebnisse

(Tabelle 30). Dabei traten insbesondere bei der Flüssig-Flüssig-Trennung mit Hexan keine zusätzlichen Verluste des Analyten nach der Extraktion auf. Allerdings war hier auch der Aufreinigungseffekt gegenüber den anderen Verfahren am geringsten. Die Aufreinigung mit Ethylacetat lieferte einen optisch reineren Extrakt.

Tabelle 30: Mittlere Wiederfindungsraten von Citrinin ( $c=50 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) in Weizen nach der Aufreinigung mit verschiedenen Verfahren

Aufreinigungsmethode	Wiederfindungsrate [Mittelwert $\pm$ s (%); n=3]
Hexan	85,9 $\pm$ 2,6
Ethylacetat (0,01 M NaOH/1 M HCl)	62,4 $\pm$ 2,2
TBME (0,13 M NaHCO <sub>3</sub> /1 M HCl)	57,6 $\pm$ 5,4

### 2.1.2.2 Aufreinigung mittels Festphasenextraktion

Zur Extraktaufreinigung über polymerbasierte Festphasenkartuschen wurden verschiedene Vorversuche durchgeführt, deren Ergebnisse in diesem Kapitel dargestellt sind.

#### *Lösungsmittelmischungen*

Die Wiederfindungsraten in Abhängigkeit von der Lösungsmittelzusammensetzung zum Auftrag und zur Elution sind in Tabelle 31 dargestellt. Anhand dieser Resultate wurde eine Zusammensetzung der Auftrags- und Waschlösung von 20/80 (MeOH/Reinstwasser) und ein Methanolanteil von > 80 % in der Elutionslösung für die weiteren Versuche gewählt.

Tabelle 31: Einfluss der Lösungsmittelzusammensetzung auf die Elution von Citrinin in der Festphasenextraktion (strata-X)

Methanol/Reinstwasser	Wiederfindungsrate [Mittelwert $\pm$ s (%); n=3]
5/95	0
20/80	0
40/60	49.9 $\pm$ 4.7
60/40	76.5 $\pm$ 14.1
80/20	88.0 $\pm$ 7.2
100/0	75.0 $\pm$ 3.2

### Extraktzubereitung

Es wurden drei verschiedene Methoden der Extraktzubereitung überprüft. Wie aus Tabelle 32 hervorgeht, konnte mit der Methode Vorversuch c eine mittlere Wiederfindungsrate von 67,7 % erreicht werden. Hierbei wurden vom Rohextrakt 2 ml abgenommen, diese auf ca. 200 µl eingeeengt, mit deionisiertem Wasser auf 1 ml aufgefüllt und eine Flüssig-Flüssig-Trennung mit Hexan durchgeführt.

Tabelle 32: Einfluss unterschiedlicher Methoden der Extraktbehandlung vor der Aufreinigung mit polymerbasierten Festphasenkartuschen auf die Wiederfindung von Citrinin in Zerealien (c=50 µg/kg)

Vorversuch*	Wiederfindungsrate [Mittelwert ± s (%); n=3]
Vorversuch a	36,2 ± 2,7
Vorversuch b	58,1 ± 3,7
Vorversuch c	67,7 ± 15,8

\*Details siehe Tabelle 12

Aufgrund der durchschnittlichen Wiederfindungsraten dieser beiden Vorversuche wurde für die Aufreinigung der Probenextrakte über polymerbasierte Festphasenkartuschen die in Tabelle 13 beschriebene Versuchsanordnung ausgewählt.

Eine Lösungsmittelzusammensetzung und -menge von 1 ml 80/20 MeOH/Reinstwasser erwies sich als ausreichend um Citrinin von den polymerbasierten Festphasenkartuschen zu eluieren. Höhere MeOH-Anteile führten zu keiner Erhöhung der Wiederfindungsraten. Andererseits könnten aber durch eine Begrenzung des MeOH-Anteils Matrixeffekte bei der LC-MS-Analyse reduziert werden.

### Optimierungsversuche zur Aufreinigung über polymerbasierte Festphasenkartuschen

Bei Anwendung der aus den Vorversuchen, die mit Weizenextrakten bzw. Standardlösungen durchgeführt wurden, resultierenden Methode auf andere zu analysierende Matrices zeigte sich, dass hierbei die Richtigkeit der Ergebnisse teilweise (insbesondere bei Mais) erheblich niedriger war. Aus diesem Grund wurden zur weiteren Optimierung der Methode diverse weitere Vorversuche durchgeführt. Hierbei wurde überprüft, inwieweit diese Verluste aus bestimmten

Verfahrensschritten (Flüssig-Flüssig-Trennung mit Hexan, Einengung des Eluats in der Vakuumzentrifuge) resultierten. Die Ergebnisse aus diesen Versuchen sind in Tabelle 33 dargestellt. Offensichtlich ging ein Anteil des Citrinins matrixabhängig bei der Flüssig-Flüssig-Trennung mit Hexan verloren. Besonders deutlich sind diese Verluste bei Mais zu sehen. Die Einengung des Eluats mit der Vakuumzentrifuge führte dagegen erst dann zu einer Reduzierung der Wiederfindungsraten, wenn der vollständig getrocknete Rückstand noch längere Zeit (10 min) den Evaporationsbedingungen (60°C, 1 mbar, „Hitzestress“) ausgesetzt wurde.

Tabelle 33: Einfluss der verschiedenen Methodenschritte auf die Wiederfindungsraten der Analyse von Citrinin in Zerealien (c=50 µg/kg)

Wiederfindungsrate [Mittelwert ± s (%); n=3]					
Probe (10 µg/kg)	Extrakt direkt	Extrakt nach Entfetten	Eluat direkt	Eluat nach Evaporation	Eluat nach Hitzestress
Haferflocken	90,7 ± 8,2	80,7 ± 6,2	66,7 ± 5,3	65,3 ± 6,8	51,3 ± 4,1
Weizen	93,3 ± 1,9	68,0 ± 2,4	66,7 ± 5,3	74,7 ± 12,5	56,7 ± 6,6
Mais	78,7 ± 1,9	40,0 ± 1,6	33,3 ± 6,6	38,0 ± 13,1	39,3 ± 8,2

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die in Tabelle 13 beschriebene Methode dahingehend modifiziert (Tabelle 14), dass auf eine Flüssig-Flüssig-Trennung verzichtet wurde.

### 2.1.2.3 Aufreinigung mittels Immunoaffinitätssäulen

Die Aufreinigung mit Immunoaffinitätssäulen zeigte nur geringe Toxinverluste bei der Bestimmung von Citrinin in Weizen. Es konnten Wiederfindungsraten von durchschnittlich 98,4 % erreicht werden. Die Methode erwies sich also als sehr gut geeignet für Bestätigungsanalysen. Auch könnte dieses Verfahren als alternative oder zusätzliche Aufreinigung bei komplexen Matrices eingesetzt werden.

## 2.2 Frucht- und Gemüsesäfte

### 2.2.1 Ergebnisse der Vorversuche

Zur Entwicklung einer geeigneten Methode zum Nachweis von Citrinin in Frucht- und Gemüsesäften wurden verschiedene Vorversuche durchgeführt.

Die Citrininbestimmung in Säften nach Aufreinigung mittels Zentrifugation und Festphasenextraktion wurde an unterschiedlichen Säften in 3 Dotierungsstufen (0,02; 0,1; 0,5 ng/ml) überprüft. Die Resultate sind in Tabelle 34 zusammengefasst.

Tabelle 34: Präzision der Analysen von Citrinin in Frucht- und Gemüsesäften (c=0,02; 0,1; 0,5 ng/ml) nach Zentrifugation und Festphasenextraktion

Probenart	Konzentrationsstufen von Citrinin [ng/ml]	Wiederfindungsrate [Mittelwert $\pm$ s (%); n=5]	Durchschnittliche Wiederfindungsrate [Mittelwert $\pm$ s (%)]
Apfelsaft	0,02	n.n.	n.n.
	0,1	n.n.	
	0,5	n.n.	
Orangensaft	0,02	n.n.	27,3 $\pm$ 1,3
	0,1	26,4 $\pm$ 1,6	
	0,5	28,3 $\pm$ 2,6	
Traubensaft	0,02	n.n.	6,5 $\pm$ 5,4
	0,1	n.n.	
	0,5	6,5 $\pm$ 5,4	
Birnensaft	0,02	54,2 $\pm$ 10,1	56,9 $\pm$ 3,7
	0,1	61,1 $\pm$ 7,9	
	0,5	55,4 $\pm$ 6,2	
Tomatensaft	0,02	n.n.	33,9 $\pm$ 5,9
	0,1	38,1 $\pm$ 2,4	
	0,5	29,7 $\pm$ 1,8	
Ananassaft	0,02	n.n.	33,4 $\pm$ 0,5
	0,1	33,0 $\pm$ 1,7	
	0,5	33,7 $\pm$ 2,9	

Die Ergebnisse des Versuchsansatzes zur Ermittlung eines geeigneten organischen Extraktionsmittels sind in Tabelle 35 zusammengefasst. Die mittlere Wiederfindungsrate der Ergebnisse aller untersuchten Säfte lag nach der Extraktion mit Ethylacetat bei 48,1 %  $\pm$  15,9 % und nach der Extraktion mit Dichlormethan bei 39,1 %  $\pm$  7,2 %.

Tabelle 35: Präzision der Analysen von Citrinin in Frucht- und Gemüsesäften ( $c=0,5$  ng/ml) nach der Extraktion mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln

Probenart	Extraktion mit Ethylacetat Wiederfindungsrate [%]	Extraktion mit Dichlormethan Wiederfindungsrate [%]
Mandarinsaft	28,4	29,4
Tomatensaft	37,5	31,2
Birnensaft	68,6	47,2
Bananensaft	39,7	40,4
Ananassaft	48,0	40,8
Apfel-Birne	70,7	48,1
Orangensaft	43,7	36,9
Mittelwert $\pm$ s	48,1 $\pm$ 15,9	39,1 $\pm$ 7,2

Aufgrund der niedrigen Wiederfindungsraten bei bestimmten Matrices (u.a. Orangensaft) wurde untersucht, inwieweit durch Variation der Versuchsbedingungen eine höhere Richtigkeit der Analysenmethode erreicht werden konnte. Hierzu wurden sowohl die Bedingungen der Zentrifugation als auch die Molarität der Salzsäure variiert (Tabelle 17). Die mittleren Wiederfindungsraten konnten hierdurch allerdings nicht signifikant gesteigert werden (vergl. Tabelle 36).

Tabelle 36: Präzision der Analysen von Citrinin in Orangensaft ( $c=5$  ng/ml) nach verschiedenen Bedingungen für die Zentrifugation und die Ansäuerung

Variante	Wiederfindungsrate (Mittelwert $\pm$ s [%]; n=3)
Variante 1 (2772 x g; 1 M HCl)	39,5 $\pm$ 7,2
Variante 2 (1559 x g; 1 M HCl)	40,7 $\pm$ 10,6
Variante 3 (2772 x g; 2 M HCl)	39,0 $\pm$ 1,1
Variante 4 (1559 x g; 2 M HCl)	37,2 $\pm$ 1,1

Die Ergebnisse der Vorversuche der Analysenmethoden zum Citrininnachweis in Säften durch *Extraktion mit Ethylacetat* (Variante a und c) sind in den Tabellen 37 und 38 zusammengefasst. Die Wiederfindungsraten variierten zwischen 12,2 % und 72,5 %. Die Ergebnisse der Variante b sind in Kapitel 2.3 (Tabelle 40) aufgeführt.

Tabelle 37: Präzision und Richtigkeit der Analysenmethode *Extraktion mit Ethylacetat* zum Nachweis von Citrinin in Frucht- und Gemüsesäften (c=5 ng/ml, Variante a)

Probenart	Wiederfindungsrate (Mittelwert $\pm$ s [%]; n=5]
Orangensaft	12,2 $\pm$ 6,0
Traubensaft	31,8 $\pm$ 5,3
Birnensaft	72,5 $\pm$ 6,9
Tomatensaft	28,2 $\pm$ 12,9
Ananassaft	41,0 $\pm$ 5,7

Tabelle 38: Präzision und Richtigkeit der Analysenmethode *Extraktion mit Ethylacetat* zum Nachweis von Citrinin in Frucht- und Gemüsesäften (c=0,5 ng/ml, Variante c)

Probenart	Wiederfindungsrate [Mittelwert $\pm$ s (%); n=3]
Orangensaft	19,1 $\pm$ 3,7
Tomatensaft	45,5 $\pm$ 7,6

### 2.2.2 Orientierende Untersuchungen zur Stabilität von Citrinin in Apfelsaft

In den bei Raumtemperatur gelagerten Apfelsaftproben wurde das zugesetzte Citrinin, wie aus Abbildung 5 ersichtlich, stetig abgebaut. Nach 7 Tagen waren nur noch 5,5 % von ursprünglichen 36,6 % nachweisbar. Citrinin erwies sich also in Apfelsaft als relativ instabil.

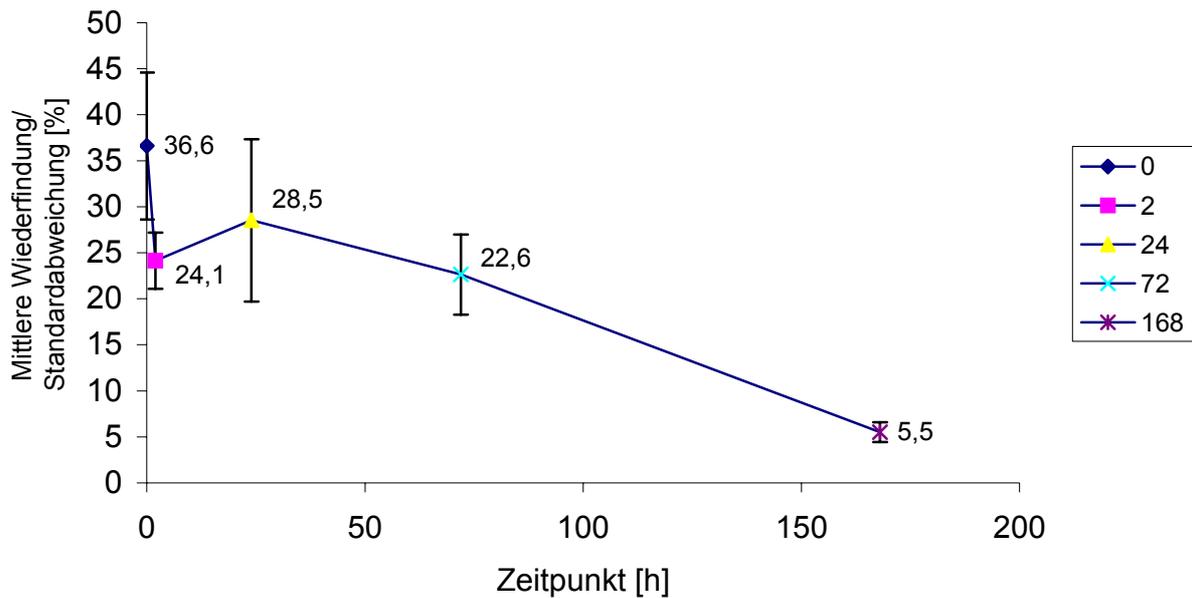


Abbildung 5: Abbauverhalten von Citrinin in Apfelsaft bei Raumtemperatur (20°C)

### 2.3 Methodvalidierung

Für die entwickelten Methoden wurden folgende Bestimmbarkeitsgrenzen sowie Kennzahlen zur Präzision und Richtigkeit der Analyse von Citrinin in verschiedenen Probenmatrizes ermittelt.

#### Zerealien

Die durchschnittlichen Wiederfindungsraten von artifiziell kontaminierten Zerealien, welche gemäß der Methode zum Nachweis von Citrinin in Zerealien (Tabelle 24) in einem Fünffachansatz aufbereitet und mittels LC-MS analysiert wurden, sind in Tabelle 39 zusammengefasst. Anhand der Wiederfindungsraten ist ersichtlich, dass diese Methode sehr unterschiedlich gut für den Citrininnachweis geeignet ist. Die mittleren Wiederfindungsraten der niedrigsten Konzentrationsstufe (1 µg/kg) lagen je nach Matrix zwischen 106,8 % und 18,1 %. Die Bestimmbarkeitsgrenze, definiert als die geringste Analytenkonzentration, die mit bestimmter Richtigkeit und Präzision validiert wurde, lag in den meisten Fällen bei 1 µg/kg. Lediglich bei den Matrizes Mais und Hirse beeinträchtigten in wenigen Fällen auftretende Interferenzen die Auswertung der Chromatogramme. Bei der Matrix Hirse war aufgrund dessen eine genaue Bestimmung der niedrigen Konzentration nicht möglich, so dass die

Bestimmbarkeitsgrenze hier bei 10 µg/kg lag.

Tabelle 39: Richtigkeit und Präzision der Analysenmethode zum Citrininnachweis in Zerealien

Probenart	Konzentration 1 µg/kg WfR (Mittelwert ± s [%]; n=5)	Konzentration 10 µg/kg WfR (Mittelwert ± s [%]; n=5)
Weizen	75,6 ± 15,5	42,4 ± 6,4
Mais	64,8 ± 2,4	49,2 ± 9,9
Cornflakes	69,6 ± 6,1	81,6 ± 12,4
Dinkel	52,8 ± 4,5	73,2 ± 2,4
Roggen	106,8 ± 25,6	77,6 ± 1,3
Grünkern	50,4 ± 5,4	13,0 ± 5,4
Gerste	49,2 ± 10,3	64,8 ± 5,9
Hirse	18,1 ± 1,2	28,6 ± 3,2
Buchweizen	64,8 ± 5,9	55,5 ± 7,1
Hafer	73,2 ± 2,4	70,8 ± 5,0
Reis	93,6 ± 4,8	47,4 ± 3,1

#### *Frucht- und Gemüsesäfte*

Die durchschnittlichen Wiederfindungsraten von artifiziell kontaminierten Saftproben, welche gemäß der in Tabelle 25 beschriebenen Methode in einem Fünffachansatz aufbereitet wurden und mittels LC-MS/MS analysiert wurden sind in Tabelle 40 angegeben. Die Bestimmbarkeitsgrenze für den Citrininnachweis war in allen Fällen 0,02 ng/ml.

Tabelle 40: Richtigkeit und Präzision der Analysenmethode zum Citrininnachweis in Frucht- und Gemüsesäften (*Extraktion mit Ethylacetat* Variante b)

Probenart	Konzentrationsstufen von Citrinin [ng/ml]	Wiederfindungsrate (Mittelwert $\pm$ s [%]; n=5)	Durchschnittliche Wiederfindungsrate (Mittelwert $\pm$ s [%])
Apfelsaft	0,02	68,1 $\pm$ 27,9	68,0 $\pm$ 2,7
	0,1	65,2 $\pm$ 14,6	
	0,5	70,6 $\pm$ 5,6	
Orangensaft	0,02	18,0 $\pm$ 11,3	19,6 $\pm$ 1,5
	0,1	19,8 $\pm$ 4,2	
	0,5	20,9 $\pm$ 1,6	
Traubensaft	0,02	25,1 $\pm$ 6,3	28,1 $\pm$ 2,8
	0,1	30,6 $\pm$ 0,9	
	0,5	28,6 $\pm$ 1,3	
Birnensaft	0,02	62,8 $\pm$ 16,8	57,5 $\pm$ 6,9
	0,1	49,7 $\pm$ 7,0	
	0,5	60,0 $\pm$ 2,2	
Tomatensaft	0,02	30,5 $\pm$ 6,5	36,1 $\pm$ 4,8
	0,1	38,5 $\pm$ 2,6	
	0,5	39,2 $\pm$ 2,4	
Bananensaft	0,02	69,6 $\pm$ 3,7	70,0 $\pm$ 2,7
	0,1	67,6 $\pm$ 5,0	
	0,5	72,9 $\pm$ 2,3	

*Asiatische Lebensmittel*

Die Richtigkeit und Präzision der Analysenmethode zum Citrininnachweis in asiatischen Lebensmitteln ist in Tabelle 41 dargestellt. Die Bestimmbarkeitsgrenze für Saucen und Gewürzpulver lag bei 10  $\mu$ g/kg, für Reiswein bei 0,1 ng/ml.

Tabelle 41: Richtigkeit und Präzision der Analysenmethode zum Citrininnachweis in asiatischen Lebensmitteln

Probenart	Konzentrationsstufe von Citrinin [ $\mu$ g/kg bzw. l]	Wiederfindungsrate (Mittelwert $\pm$ s [%]; n=5)
Hoi-Sin Sauce	10	25,3 $\pm$ 1,6
Reiswein	0,1	36,2 $\pm$ 9,3

### 3 Vorkommen von Citrinin in Nahrungsmitteln

#### 3.1 Zerealien

Bei der Analyse der 380 Proben aus dem Bereich Zerealien konnten in 5 Proben (1,3 %) Spuren unterhalb der Bestimmbarkeitsgrenze von 1 µg/kg nachgewiesen werden. Bei 7 (1,8 %) der untersuchten Proben lag der Citriningehalt oberhalb der Bestimmbarkeitsgrenze von 1 µg/kg, der höchste Gehalt wurde in einer Roggenmehlprobe mit 10,9 µg/kg gemessen (Tabelle 42).

Tabelle 42: Citrinin-Gehalte in Zerealien

Probenart	Form	Probenanzahl	Positive Proben		Citrinin [µg/kg]	
			n	[%]	$\bar{x}$	Bereich
Weizen	Körner	15	—	—	—	n.n.
	Grieß	11	—	—	—	n.n.
	Flocken	5	—	—	—	n.n.
	Mehl	27	—	—	—	n.n.
	Kleie	13	—	—	—	n.n.
	Keime	1	—	—	—	n.n.
	Pops	1	—	—	—	n.n.
Hafer	Körner	12	—	—	—	n.n.
	Flocken	21	—	—	—	n.n.
	Kleie	5	—	—	—	n.n.
	Grütze	1	—	—	—	n.n.
Roggen	Körner	14	—	—	—	n.n.
Roggen	Schrot	1	—	—	—	n.n.
	Flocken	4	—	—	—	n.n.
	Mehl	19	4	21,0	5,6	1,2-10,9
Hirse	Körner	17	—	—	—	n.n.
	Flocken	4	—	—	—	n.n.
	Mehl	3	—	—	—	n.n.
Dinkel	Körner	16	—	—	—	n.n.
	Schrot	1	—	—	—	n.n.
	Gequetscht	2	—	—	—	n.n.
	Grütze	1	1	100	0,1	0,1
	Dinkelino	1	—	—	—	n.n.
	Flocken	6	—	—	—	n.n.
	Mehl	17	—	—	—	n.n.
	Kleie	1	—	—	—	n.n.
	Flakes	1	—	—	—	n.n.
	Grieß	2	1	50	0,6	0,6

Fortsetzung Tabelle 42: Citrinin-Gehalte in Zerealien

Probenart	Form	Probenanzahl	Positive Proben		Citrinin [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	
			n	[%]	$\bar{x}$	Bereich
Gerste	Körner	9	1	11	1,4	1,4
	Graupen	7	—	—	—	n.n.
	Flocken	3	—	—	—	n.n.
	Grütze	2	—	—	—	n.n.
Grünkern	Mehl	1	—	—	—	n.n.
	Körner	17	—	—	—	n.n.
	Schrot	1	—	—	—	n.n.
Mais	Mehl	1	—	—	—	n.n.
	Körner	8	—	—	—	n.n.
	Grieß	22	1	4,5	0,5	0,5
	Mehl	22	4	18	1,7	0,7-4,4
Kamut	Cornflakes	17	—	—	—	n.n.
	Körner	4	—	—	—	n.n.
	Grieß	2	—	—	—	n.n.
	Mehl	2	—	—	—	n.n.
Einkorn	Flocken	1	—	—	—	n.n.
	Körner	2	—	—	—	n.n.
	Flocken	1	—	—	—	n.n.
Emmer	Körner	1	—	—	—	n.n.
5-Korn	Flocken	1	—	—	—	n.n.
6-Korn	Flocken	1	—	—	—	n.n.
Kritharaki		1	—	—	—	n.n.
Reis		13	—	—	—	n.n.
Buchweizen	Körner	11	—	—	—	n.n.
	Grütze	1	—	—	—	n.n.
	Flocken	2	—	—	—	n.n.
	Mehl	4	—	—	—	n.n.
	Flakes	1	—	—	—	n.n.

### 3.2 Frucht- und Gemüsesäfte

Die Untersuchung der Frucht- und Gemüsesäfte wurde gemäß der in Tabelle 25 beschriebenen Methode durchgeführt. Trotz der sehr niedrigen Bestimmbarkeitsgrenze von 0,02 ng/ml konnte in keiner der untersuchten Proben Citrinin detektiert werden.

### 3.3 Asiatische Lebensmittel

In keinem der untersuchten asiatischen Lebensmittel war Citrinin nachzuweisen.

## E Diskussion

Citrinin ist ein nephrotoxisches Mykotoxin. Es kann von verschiedenen Schimmelpilz-Spezies der weitverbreiteten Gattungen *Penicillium*, *Aspergillus* und *Monascus* gebildet werden. Obwohl schon seit langem bekannt (Hetherington & Raistrick, 1931), liegen allerdings bisher noch relativ wenige Daten über das natürliche Vorkommen von Citrinin vor. Hierzu könnte seine Instabilität im Lebensmittel, aber auch Schwierigkeiten beim analytischen Nachweis beigetragen haben. Ziel dieser Arbeit war es daher zunächst, Methoden zum Nachweis von Citrinin in pflanzlichen Lebensmitteln, insbesondere in Getreide- und Getreideprodukten, Obst- und Gemüsesäften sowie asiatischen Lebensmitteln, zu entwickeln. Die Besprechung der Auswahl und Optimierung dieser Methoden soll daher hier vorangestellt und im Folgenden die Ergebnisse zum Vorkommen von Citrinin in Lebensmitteln sowie deren mögliche Folgen für die Gesundheit der Konsumenten diskutiert werden.

Für den Citrininnachweis in Zerealien wurde zuerst ein geeignetes Lösungsmittel zur Extraktion ermittelt. Aus einer Vielzahl von Extraktionslösungen erwies sich hier reines Methanol als am besten geeignet, da hiermit die höchsten Wiederfindungsraten bei gleichzeitig geringen Matrixeffekten erzielt wurden. Zur Aufreinigung wurde eine Umkehrphasen-Festphasenextraktion auf polymerbasiertem Säulenmaterial gewählt; eine Flüssig-Flüssig-Trennung mit Hexan vor der Festphasenextraktion führte bei einigen Matrices zu stark reduzierten Wiederfindungsraten, es wurde daher auf diesen Aufreinigungsschritt verzichtet.

Demgegenüber erwies sich eine Aufreinigung über Immunoaffinitätssäulen als sehr gut geeignet gegebenenfalls eine höhere Richtigkeit der Ergebnisse sowie niedrigere Bestimmbarkeitsgrenzen von Citrinin insbesondere bei sehr komplexen organischen Matrices zu erreichen. Das bei der flüssigkeitschromatischen Auftrennung von Citrinin-haltigen Extrakten auf RP-C<sub>18</sub>-Säulen häufig auftretende „Tailing“ (Dick et al., 1988, Wilson, 1994), war bei den angewandten HPLC-Bedingungen nur im geringen Umfang zu beobachten. Hierzu könnte die geringe Silanolaktivität sowie ein niedriger Metallgehalt des verwendeten Säulenmaterials beigetragen haben.

Bei der Analyse von Citrinin in Zerealien konnten aufgrund der gewählten Extraktions- und Aufreinigungsverfahren sowie den Parametern der LC-MS-Methode

nur selten die Bestimmung störende interferierende Substanzen beobachtet werden. Aus diesem Grund wurde in den meisten Matrices eine Bestimmbarkeitsgrenze von 1 µg/kg erreicht. Lediglich bei den Matrices Mais und Hirse beeinträchtigten in wenigen Fällen auftretende Interferenzen die Auswertung der Chromatogramme.

Zur Analyse der Frucht- und Gemüsesäfte wurde Ethylacetat aufgrund der gegenüber Dichlormethan höheren Wiederfindungsraten zur Extraktion aus einer stark angesäuerten wässrigen Phase ausgewählt. Die Extraktion wurde zur Steigerung der Präzision und Richtigkeit der Analysen zweimal mit einem Fünffachen Ethylacetatüberschuss durchgeführt. Ein signifikanter Anstieg der Wiederfindungsraten gegenüber einer einfachen Extraktion konnte hiermit allerdings ebenso wenig erzielt werden wie durch die Erhöhung der Extraktionsmittelmenge auf einen 10-fachen Überschuss. Auch eine Variation der Zentrifugationsbedingungen konnte keine signifikanten Unterschiede in den Ergebnissen bewirken. Teilweise (z.B. beim Orangensaft) sanken die Wiederfindungsraten bei der Validierung der Nachweismethode gegenüber den Vorversuchen sogar ab. Dies könnte möglicherweise auf die nachgewiesene Instabilität von Citrinin im Lebensmittel sowie an eine Bindung an im Saft vorhandene Schwebstoffe zurückzuführen sein. So waren insgesamt in „klaren“ Säften (Apfel-, Birnen-) höhere Wiederfindungsraten zu erzielen als in „trüben“ (Tomaten-, Orangensaft). Insgesamt jedoch erwies sich die entwickelte Methode zur selektiven und sensitiven Bestimmung von Citrinin in Säften als geeignet. Die Bestimmbarkeitsgrenze von 0,02 ng/ml kann im Hinblick auf die geringe akute Toxizität von Citrinin (Betina, 1989) als ausreichend angesehen werden.

Für die komplexe Gruppe der asiatischen Lebensmittel wurden matrixabhängig die Methoden für Zerealien, Frucht- und Gemüsesäfte adaptiert. Die Überprüfung der Richtigkeit und Präzision der Analysemethode anhand von Saucen und Würzpasten lieferte zufrieden stellende Ergebnisse. Dasselbe gilt für die Analyse der Sake-Weinproben, welche ohne weitere Aufbereitung mittels LC-MS/MS analysiert wurden. Ein für die einzelnen Probenarten optimiertes Analyseverfahren hätte hier vermutlich zu einer weiteren Verbesserung der Methodenkenzahlen geführt; aber auch in diesem Fall kann die Bestimmbarkeit von Citrinin vor dem Hintergrund des toxischen Potenzials dieser Verbindung als hinreichend sensitiv angesehen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden Zerealien aus dem Einzelhandel auf ihre Belastung mit Citrinin untersucht, um die daraus möglicherweise resultierende Gefährdung der Verbrauchergesundheit beurteilen zu können. In diesen Proben konnte Citrinin lediglich in 7 Proben mit Gehalten über 1 µg/kg bestimmt werden, wobei der höchste Gehalt in einer Roggenmehlprobe 10,9 µg/kg betrug; in weiteren 5 Proben wurden Spuren von unter 1 µg/kg nachgewiesen. In den übrigen Proben (97 %) konnte kein Citrinin detektiert werden. Zudem wurden 100 Frucht- und Gemüsesäfte sowie 5 asiatische Lebensmittel analysiert. Auch hier war das Mykotoxin nicht nachweisbar. Insgesamt konnte also trotz einer sensitiven Analytik lediglich in 2,5 % der 485 untersuchten Proben Citrinin bestimmt werden.

Ungeachtet der geringen Frequenz der Nachweisbarkeit müssen diese Daten jedoch vor dem Hintergrund des toxischen Potenzials dieses Mykotoxins betrachtet werden. Die akute Toxizität von Citrinin ist relativ niedrig; die LD<sub>50</sub>-Werte variieren je nach Tierart und Applikationsform. Sie liegen bei Ratten nach intraperitonealer und bei Mäusen nach subkutaner Verabreichung bei 67 bzw. 35 mg/kg KGW, bei Meerschweinchen nach subkutaner Applikation bei 37 mg/kg und bei Kaninchen nach intravenöser Verabreichung bei 19 mg/kg (Hanika und Carlton, 1994). Auch subletale Dosierungen führten in Tierversuchen erst bei höherer Toxingabe zu akuten Krankheitserscheinungen, so traten bei Untersuchungen an jungen Hunden der Beaglerasse klinisch bzw. pathologisch-histologisch diagnostizierbare Symptome einer Nierenerkrankung erst ab Konzentrationen von 20 oder 40 mg Citrinin/kg KGW (i.p.) auf. Tiere, denen täglich 6 Wochen lang per os bis zu 5 mg Citrinin/kg KGW verabreicht wurde, blieben dagegen klinisch unauffällig und entwickelten auch keine Nierenläsionen (Carlton et al., 1974). Bei Kaninchen bedingte eine perorale Citriningabe von 120 mg bzw. 67 mg Citrinin/kg KGW Nierenversagen und pathohistologische Veränderungen der proximalen Tubuli (Hanika et al., 1984 und 1985). Teratogene und embryotoxische Effekte konnten bei Ratten nach einer einmaligen Citrinindosis von 35 mg/kg KGW (s.c.) zwischen dem 3. und dem 15. Gestationstag beobachtet werden (Reddy et al. 1982). Derartige Effekte sind durch die in den Proben detektierten Citriningehalte in der Humanernährung nicht zu erwarten, denn selbst bei Aufnahme einer Portion von 200 g der in diesem Versuch höchstbelasteten Probe läge die Dosierung um einen Faktor von 10<sup>5</sup> (Erwachsener, 70 kg KGW, Toxingehalt um analytische Wiederfindungsrate korrigiert) unter der im oben beschriebenen Tierversuch (Carlton et al., 1974) symptomlosen Toxingabe.

Zweifellos ist diese Modellrechnung nicht mit einer fundierten Risikobewertung gleichzusetzen, da jedoch einerseits für diese Kalkulation die höchste im Lebensmittel gemessene Konzentration herangezogen wurde, andererseits der errechnete Faktor den bei nicht kanzerogenen Mykotoxinen üblichen Sicherheitsfaktor zur Festlegung des „tolerable daily intake“ (TDI) von 100 um das 1000fache übertrifft, ist aufgrund dieser Daten nicht von einer Gefährdung der Verbrauchergesundheit durch den Verzehr Citrinin-belasteter Lebensmittel auszugehen.

Für die in dieser Untersuchung, auch im Vergleich zu den bisher vorliegenden Daten zur Citrininbelastung von Lebensmitteln, sehr niedrigen messbaren Toxinkonzentrationen gibt es diverse Erklärungsmöglichkeiten. Zum einen wurde möglicherweise in den untersuchten Lebensmitteln bzw. den zugrunde liegenden Rohstoffen a priori kaum Citrinin gebildet. Da die zu den Lagerpilzen zählenden Gattungen *Penicillium* und *Aspergillus* sich nur unter suboptimalen Lagerbedingungen (Luftfeuchtigkeit von mind. 70 %, aw: 0,75-0,85 und Temperaturoptimum: 20-30°C; Frank, 1992) entwickeln, könnte so aufgrund von allgemein guten Lagerbedingungen des Verzehrsgetreides nur in wenigen Fällen Citrinin produziert worden sein. Außerdem kann es auch bei der Lagerung von Feldfrüchten zum Abbau von Citrinin kommen. Der entscheidende Parameter hierfür ist der Wassergehalt. Es ist bekannt, dass der Abbau von Citrinin umso schneller erfolgt, je höher der Wassergehalt der Produkte ist (Harwig et al. 1977). Da Citrinin zudem relativ hitzeempfindlich ist und dessen Abbau bereits bei Temperaturen von 60-70 °C einsetzt (Scott, 1984) kann weiterhin eine in der Lebensmittelverarbeitung angewandte Hitzeeinwirkung, wie zum Beispiel beim Pasteurisieren von Säften oder der Herstellung von Cornflakes, ursächlich für die niedrigen Citriningehalte gewesen sein. Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass in den jeweiligen Matrices enthaltene Enzyme zum Citrininabbau beigetragen haben. Desweiteren gilt Citrinin als relativ instabil in wässrigen Lebensmitteln. Diese Hypothese wurde bereits 1977 von Harwig et al. aufgestellt und konnte durch den hier durchgeführten Stabilitätsversuch von Citrinin in Apfelsaft (Abbildung 4) bestätigt werden. Der nachweisbare Citriningehalt sank dabei innerhalb von 7 Tagen von anfangs 36,6 % auf 5 % der dotierten Toxinmenge. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass dieser Rückgang der nachweisbaren Menge nicht auf einen Abbau, sondern auf eine Bindung des Toxins an Probenmatrixbestandteile zurückzuführen ist. Auch eine

Umwandlung von Citrinin in eine ebenfalls toxische Verbindung wäre denkbar.

Da Citrinin von verschiedenen *Monascus*-Stämmen gebildet werden kann (Blanc et al., 1995a) und mit *Monascus* spp. fermentierter Reis (Angkak) als natürlicher Farbstoff bei der Herstellung asiatischer Nahrungsmittel wie Miso-Pasten, roter Tofu und Hoi-Sin Sauce verwendet wird (Vollbrecht, 1989), wurden auch diese Lebensmittel stichprobenartig auf ihren Citriningehalt untersucht. Da aber von der sehr begrenzten Anzahl an untersuchten Proben (n=5) weder bekannt war, ob diese überhaupt diesen Zusatzstoff enthielten und außerdem davon ausgegangen werden kann, dass viele der zu diesem Zweck eingesetzten *Monascus*-Stämme, in Abhängigkeit von ihrer genetischen Abstammung und den Bedingungen bei der Kultivierung, Citrinin gar nicht oder nur in geringem Umfang bilden (Blanc et al., 1995b, Sabater-Vilar et al., 1999, Wang et al., 2005) kann aus dem negativen Toxinnachweis in diesem Fall nicht auf die allgemeine Citrininbelastung derartiger Nahrungsmittel geschlossen werden.

Allgemein lässt sich aber aufgrund der bisherigen Ergebnisse eine Beeinträchtigung des Gesundheitszustandes des Menschen durch den Verzehr der in dieser Studie untersuchten Lebensmittel weitestgehend ausschließen. Zudem ist davon auszugehen, dass vorhandenes Citrinin unter den üblichen Koch- und Backbedingungen abgebaut wird.

Zwar ist nur unzureichend geklärt, inwieweit das Zusammenwirken verschiedener Mykotoxine und anderer toxischer Komponenten im Lebensmittel zu einer Verstärkung der Effekte führen kann; so wurden additive bzw. synergistische toxikologische Wirkungen bisher lediglich für Citrinin und Ochratoxin A in sehr hohen Dosierungen beschrieben (CREPPY ET AL., 1980; VESELA ET AL., 1983, MAYURA ET AL., 1984; KANISAWA, 1984, HEUSSNER ET AL., 2005). Zudem liegen keine Daten bezüglich der Auswirkungen einer Langzeitexposition von Mensch und Tier gegenüber geringen Citrinindosen vor. Angesichts der im Vergleich zu einer wirksamen Einzeldosis äußerst geringen in Lebensmitteln auftretenden Mengen lässt sich aber auch unter Berücksichtigung dieser Aspekte ein Gefährdungspotential durch Citrinin nicht erkennen.

## F Zusammenfassung

Über das Vorkommen der nephrotoxischen Substanz Citrinin liegen bisher im Vergleich zu anderen *Aspergillus*- und *Penicillium*toxinen relativ wenige Daten vor. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Studie pflanzliche Lebensmittel, insbesondere Getreide- und Getreideprodukte, Obst- und Gemüsesäfte, sowie in geringem Umfang asiatische Lebensmittel aus dem Einzelhandel auf ihre Belastung mit Citrinin untersucht, um die daraus möglicherweise resultierende Gefährdung der Verbrauchergesundheit beurteilen zu können. Hierzu waren zunächst geeignete Analysemethoden zu entwickeln.

Bei der Analyse von Citrinin in Zerealien konnte aufgrund der gewählten Extraktions- und Aufreinigungsverfahren sowie dem Einsatz der LC-MS eine Bestimmbarkeitsgrenze von 1 µg/kg erreicht werden. Insbesondere das zum Nachweis von Citrinin in Obst- und Gemüsesäften angewandte LC-MS/MS-Verfahren erwies sich zur selektiven und sensitiven Bestimmung dieses Mykotoxins als gut geeignet; hier lag die Grenze der Bestimmbarkeit bei 0,02 µg/l. In Zerealien war Citrinin lediglich in 12 von 380 Proben (3,2 %) mit Gehalten zwischen 0,1 und 10,9 µg/kg nachweisbar; in 100 untersuchten Frucht- und Gemüsesäften sowie in 5 analysierten asiatischen Lebensmitteln konnte das Mykotoxin nicht detektiert werden. Für diese sehr niedrigen messbaren Toxinkonzentrationen könnte das temperaturabhängige Abbauverhalten von Citrinin in Zerealien einerseits sowie die Instabilität in wässrigen Lebensmitteln andererseits verantwortlich sein.

Allgemein lässt sich aufgrund der Ergebnisse eine Beeinträchtigung des Gesundheitszustandes des Menschen durch den Verzehr der in dieser Studie untersuchten Lebensmittel weitestgehend ausschließen.

## G Summary

### Occurrence and detection of citrinin in foodstuffs of vegetable origin

While *Aspergillus*- and *Penicillium*toxins are relatively well documented, few facts are available on the existence of the nephrotoxic substance citrinin. For that reason, this study examined the level of citrinin-contamination found in food of vegetable origin sold through retail trade. Focusing on cereals and cereal-products, fruit- and vegetable juices, as well as a small amount of Asiatic food, the objective of the analysis was to determine in what respect a possible contamination might represent a potential danger to consumers health. In order to achieve this, a suitable method of analysis had to be developed first.

Because of both the chosen extraction- and purification-procedure and the use of the LC-MS, it was possible to attain a limit of quantification of 1 µg/kg during the analysis of the citrinin content in the cereal samples. The LC-MS/MS-procedure proved to be especially suitable for the selective and precise quantification of this mycotoxin in fruit- and vegetable juices, enabling a 0,02 µg/l limit of quantification.

With contents ranging between 0,1 and 10,9 µg/kg, citrinin could only be detected in 12 out of 380 cereal-samples (3,2 %). The mycotoxin could not be determined in the 100 analyzed fruit- and vegetable juices or in the five analyzed samples of Asiatic origin. The cause of these very low concentrations of measured toxin could be both the temperature induced decomposition of citrinin in cereals and the instability of citrinin in liquid foods.

In general, the findings in this study indicate that the consumption of the analyzed food stuff will not cause any significant impairment on the human state of health.

## H Literaturverzeichnis

- ABRAMSON, D., USLEBER, E., MÄRTLBAUER, E., 1996  
Determination of citrinin in barley by indirect and direct enzyme immunoassay  
Journal of AOAC International, 79(6), 1325-1329
- ABRAMSON, D., USLEBER, E., MÄRTLBAUER, E., 1999  
Rapid determination of citrinin in corn by fluorescence liquid chromatography and enzyme immunoassay  
Journal of AOAC International, 82(6), 1353-1356
- ALEO, A., WYATT, R.D., SCHNELLMANN, R.G., 1991  
The role of altered mitochondrial function in Citrinin-induced toxicity to rat renal proximal tubule suspensions  
Toxicology and Applied Pharmacology 109, 455-463
- AMBROSE, A.M. and DEEDS, F.J., 1946  
Some toxicological and pharmacological properties of citrinin  
J. Pharmacol. Exp. Ther., 88, 173-186
- AMES, D.D., WYATT, R.D., MARKS, H.L., WASHBURN, K.W., 1976  
Effect of citrinin, a mycotoxin produced by *penicillium citrininum*, on laying hens and young broiler chicks  
Poultry Science 55, 1294-1301
- ARAI, M., HIBINO, T., 1983  
Tumorigenicity of citrinin in male F344 rats  
Cancer Letters 17, 281-287
- BAILLY, J.D., QUERIN, A., LE BARS-BAILLY, S., BENARD, G., GUERRE, P., 2002  
Citrinin production and stability in cheese  
Journal of Food Protection. 65(8), 1317-1321
- BETINA, V., 1989  
Mycotoxins: Chemical, Biological and Environmental Aspects  
Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo
- BRAUNBERG, R.C., BARTON, C.N., GANTT, O.O., FRIEDMANN, L., 1994  
Interaction of citrinin and ochratoxin A  
Natural Toxins 2, 124-131

- BROWN, T.P., MANNING, R.O., FLETCHER, O.J., WYATT, R.D., 1986  
The individual and combined effects of citrinin and ochratoxin A on renal ultrastructure in layer chicks  
*Avian Diseases*. 30, 191-198
- BLANC, P.J., LAUSSAC, J.P., LE BARS, J., LE BARS, P., LORET, M.O., PAREILLEUX, A., PROMÉ, D., PROMÉ, J.C., SANTERRE, A.L., GOMA, G., 1995a  
Characterization of monascidin A from *Monascus* as citrinin  
*International Journal of Food Microbiology* 27, 201-213
- BLANC, P.J., LORET, M.O., GOMA, G., 1995b  
Production of citrinin by various species of *Monascus*  
*Biotechnology Letters* 17 (3), 291-294
- CARLTON, W.W., SANSING, G., SZCZECZ, G.M., TUIE, J., 1974  
Citrinin mycotoxicosis in beagle dogs  
*Food and Cosmetics Toxicology*. 12, 479-490
- ČEOVIČ, S., HRABAR, A., SARIC, M., 1992  
Epidemiology of balcan endemic nephropathy  
*Food and Chemical Toxicology* 30, 183-188
- CHAGAS, G.M., KLÜPPEL, M.L., CAMPELLO, A.P., BUCHI, B.M., OLIVEIRA, M.B., 1994:  
Alterations induced by citrinin in cultured kidney cells,  
*Cell Structure and Function* 19, 103-108
- CHAGAS, G.M., CAMPELLO, A.P., KLÜPPEL, M.L., OLIVEIRA, M.B., 1995a:  
Citrinin affects the oxidative metabolism of BHK-21 cells,  
*Cell Biochemistry and Function* 13, 267-271
- CHAGAS, G.M., OLIVEIRA, M.B., CAMPELLO, A.P., KLÜPPEL, M.L., 1995b:  
Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria: IV. Effekt on Ca<sup>2+</sup> Transport  
*Cell Biochemistry and Function* 13, 53-59
- CIEGLER, A., VESONDER, R.F., JACKSON, L.K., 1977  
Production and biological activity of patulin and citrinin from *Penicillium expansum*  
*Applied and Environmental Microbiology* 33, 1004-1006
- COLE, R.J., COX, R.H., 1981  
Handbook of toxic fungal metabolites,  
Academic Press, New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco

- CREPPY, E.E., LORKOWSKI, G., BECK, G., ROESCHENTHALER, G., DIRHEIMER, R., 1980  
Combined action of citrinin and ochratoxin A on hepatoma tissue culture cells  
Toxicology Letters 5, 375-380
- DA LOZZO, E.J., MANGRICH, A.S., ROCHA, M.E., MARTINELLI DE OLIVEIRA, M.B.,  
CARNIERI, E.G.S., 2002  
Effects of citrinin on iron-redox cycle  
Cell Biochemistry and Funktion, 20, 19-29
- DICK, R., BAUMANN, U., ZIMMERLI, B., 1988  
Zum Vorkommen von Citrinin in Cerealien  
Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene, 79, 159-  
164
- DIETRICH, R., USLEBER, E., ABRAMSON, D., MÄRTLBAUER, 1998:  
Herstellung monoklonaler Antikörper gegen Citrinin.  
Proceedings des 20. Mycotoxin-Workshops vom 08.-10.06.1998 in Detmold, p. 208-  
212  
Bundesanstalt für Getreide-, Kartoffel-, und Fettforschung, Detmold (1998)
- DIETRICH, R., USLEBER, E., MÄRTLBAUER, E., GAREIS, M., 1999  
Nachweis des nephrotoxischen Mykotoxins Citrinin in Lebensmitteln und mit  
*Monascus spp.* hergestellten Lebensmittelfarbstoffen  
Archiv für Lebensmittelhygiene 50, 17-24
- DIETRICH, R., SCHMID, A., MÄRTLBAUER, E., 2001  
Citrinin in Fruit Juices  
Proc. 23. Mycotoxin-Workshop, Wien, 28.-30.05. 2001. Gesellschaft für  
Mycotoxinforschung e. V., (2001) Teil 2, 156-159
- DUNN, B.B., STACK, M.E., PARK, D.L., JOSHI, A., FRIEDMANN, L., KING, R.L., 1983  
Isolation and identification of dihydrocitrinone, a urinary metabolite of Citrinin in rats  
Journal of Toxicology and Environmental Health, 12, 283-289
- DUNN, B.B., FRIESMANN, L., 1994  
Distribution and metabolism of citrinin: a review p 27-40  
In: LLEWELLYN, G.C., DASHEK, W.V. und O`REAR (Hrsg.): Biodeterioration research 4.  
Mycotoxins, wood decay, plant stress, biocorrosion and general biodeterioration, p.  
27-40  
Plenum Press, New York
- ENDO, A., AND KURODA, M., 1976  
Citrinin an inhibitor of cholesterol synthesis  
Journal of Antibiotics, 29 (8), 841-843

ENGELHARDT, G., 2001

Mykotoxine - Giftige Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen  
Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit  
<http://www.vis-ernaehrung.bayern.de>

FÖLLMANN, W., DÖRRENHAUS, A., BOLT, H. M., 1998

Induktion von Mutationen im HPRT-Gen, DNA-Reparatursynthese und Schwesterchromatidasutauschen durch Ochratoxin A und Citrinin *in vitro*  
Proc. 20. Mycotoxin-Workshop, 08.-10.06. 1998, Bundesanstalt für Getreide-, Kartoffel-, und Fettforschung Detmold (1998) 81-86

FÖLLMANN, W., DÖRRENHAUS, A., KULLIK, B., KOCH, M., BOLT, H. M., 1999

Vergleichende Untersuchungen zur Zytotoxizität und Genotoxizität der Mykotoxine Ochratoxin A und Citrinin *in vitro*  
Proc. 22. Mycotoxin-Workshop, Jena, 07.-09. 1999, Bundesinstitut für Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV), (1999) 156-160

FRANK, H., K., 1992

Citrinin  
Zeitschrift für Ernährungswissenschaften 31, 164-177

FRIIS, P., HASSELAGER, P., KROGH, P., 1969

Isolation of citrinin and oxalic acid from *Penicillium viridicatum* and their nephrotoxicity in rats and pigs  
Acta Pathologica and Microbiologica Scandinavica 77, 559-560

GIMENO, A., 1984

Determination of citrinin in corn and barley on thin layer chromatographic plates impregnated with glycolic acid  
Journal of the Association of Official Analytical Chemists 67, 194-196

HANIKA, C., CARLTON, W. W., TUIE, J., 1983

Citrinin mycotoxicosis in the rabbit  
Food and Chemical Toxicology, 21(4), 487-493

HANIKA, C., CARLTON, W. W., BOON, W. W., TUIE, J., 1984

Citrinin mycotoxicosis in the rabbit: clinicopathological alterations  
Food and Chemical Toxicology 22, 999-1008

HANIKA, C., CARLTON, W. W., HINSMAN, E.J., W. W., TUIE, J., 1985

Citrinin mycotoxicosis in the rabbit: ultrastructural alterations  
Veterinary Pathology 23, 245-253

- HANIKA, C., CARLTON, W. W., 1994  
Toxicology and pathology of citrinin  
In: LLEWELLYN, G. C., DASHEK, W. V., O`REAR, C. E. (Hrsg.): Biodeterioration research  
4. Mycotoxins, wood decay, plant stress, biocorrosion and general biodeterioration,  
p. 41-63  
Plenum Press, New York
- HARAGUCHI. H., K., HASHIMOTO, K., SHIBATA, M., TANIGUCHI, OI, S. 1987a  
Mechanism of antifungal action of citrinin  
Agricultural and Biological Chemistry 51 (5), 1373-1378
- HARAGUCHI. H., K., HASHIMOTO, K., SHIBATA, M., TANIGUCHI, OI, S.1987b  
Inhibitory effects of citrinin in mitochondrial function  
Agricultural and Biological Chemistry 51 (5), 1453-1454
- HARWIG, J., BLANCHFELD, B.J., JARVIS, G., 1977  
Effect of water activity on disappearance of patulin and citrinin from grains  
Journal of Food Science 42, 1225-1228
- HEIDER, E.M., HARPER, J.K., GRANT, D.M., HOFFMAN, A., DUGAN, F., TOMER, D.P.,  
O`NEILL, K.,L., 2006  
Exploring unusual antioxidant activity in a benzoic acid derivate: a proposed  
mechanism for Citrinin  
Tetrahedron 62, 1199-1208
- HETHERINGTON, A. C. UND RAISTRICK , 1931  
Studies in the biochemistry of microorganisms. PART XIV. On the production and  
chemical constitution of a new yellow coloring matter, citrinin, produced from glucose  
by *Penicillium citrinum* Thom.  
Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological  
Sciences, 220, 269-295
- HEUSSNER, A.H., DIETRICH, D.R., O`BRIEN, E., 2006  
In vitro investigation of individual and combined cytotoxic effects of ochratoxin A and  
other selected mycotoxins on renal cells  
Toxicology in Vitro, 20, 332-341
- HIROTA, M., MENTA, A. B., YONEYAMA, K., KITABATAKE, N., 2002  
A major decomposition product, citrinin H2, from citrinin on heating with moisture  
Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 66 (1), 206-210
- HOOD, R.D., HAYES, A.W., SCAMMELL, J.G., 1976  
Effects of the prenatal administration of citrinin and viriditoxin to mice  
Food and Cosmetics Toxicology 14, 175-178

IARC (International Agency for Research on Cancer), 1986

IARC Monographs of the evaluation of the carcinogenic risk of chemical to human:  
some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic  
aromatic amines and mycotoxins  
Lyon, France, 40, 67

JARVIS, B., 1983

Mould and mycotoxins in mouldy cheeses  
Microbiologie-Aliments-Nutrition 1, 187-191

JESWAL, P., 1996

Citrinin-induced chromosomal abnormalities in the bone marrow cells of *Mus  
musculus*  
Cytibios 86, 29-33

JORDAN, W.H., CARLTON, W.W., SANSING, G.A., 1978

Citrinin mycotoxicosis in the rat: I. Toxicology and pathology  
Food and Cosmetics Toxicology, 16, 431-439

KANISAWA, M., 1984

Synergistic effect of citrinin in hepatorenal carcinogenesis of ochratoxin A in mice  
Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Niederlande, p. 245-254

KITABATAKE, N., TRIVEDI, A. B., DOI, E., 1991

Thermal decomposition and detoxification of citrinin under various moisture conditions  
Journal of Agriculture and Food Chemistry, 39, 2240

KREJCI, M.E., BRETZ, N.S., KOECHEL, D.A., 1996

Citrinin produces acute adverse changes in renal function and ultrastructure in  
phenobarbital-anesthetized dogs without concomitant reduction in [potassium]<sub>plasma</sub>  
Toxicology 106, 167-177

KROGH, P., HASSELAGER, E., FRIIS, P., 1970

Studies on fungal nephrotoxicity. 2. Isolation of two nephrotoxic compounds from  
*penicillium viridicatum* westling: Citrinin and oxalic acid  
Acta Pathologica and Microbiologica Scandinavica Section B 78, 401-413

KROGH, P., HALD, B, PEDERSEN, U.J., 1973

Occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals associated with mycotoxic porcine  
nephropathy  
Acta Pathologica and Microbiologica Scandinavica Section B 81, 689-695

KROGH, P., 1992

Role of ochratoxin in disease causation  
Food and Chemical Toxicology 30, 213-224

LEPOM, P., 1986

Simultaneous determination of the mycotoxins citrinin and ochratoxin A in wheat and barley by high-performance liquid chromatography  
Journal of Chromatography 355, 335-339

LIU, B.-H., YU, F.-Y., WU, T.-S., LI, S.-Y., SU, M.-C., WANG, M.-C., SHIH, S.-M., 2003

Evaluation of genotoxic and oxidative DNA damage in mammalian cells exposed to mycotoxins, patulin and Citrinin  
Toxicology and Applied Pharmacology 191, 255-263

LOCKARD, V.G., PHILLIPS, R.D., HAYES, A.W., BERNDT, W.O., O'NEAL, R.M., 1980

Citrinin nephrotoxicity in rats: A light and electron microscopic study  
Experimental and Molecular Pathology 32, 226-240

MANNING, R.O., BROWN, T.P., WYATT, R.D., FLETCHER, O.J., 1985

The individual and combined effects of citrinin and ochratoxin A in broiler chicks  
Avian Diseases 29, 985-997

MARQUARDT, H., SCHÄFER, S.G., 1997

Lehrbuch der Toxikologie  
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin

MARTIN, W., LORKOWSKI, G., CREPPY, E.E., DIRHEIMER, G., ROESCHENTHALER, R., 1986

Action of citrinin on bacterial chromosomal and plasmid DNA *in vivo* and *in vitro*  
Applied and Environmental Microbiology 52, 1273-1279

MARTINS, M. L., GIMENO, A., MARTINS, H. M., BERNARDO, F., 2002

Co-occurrence of patulin and citrinin in Portuguese apples with rotten spots  
Food Additives and Contaminants, 2002, Vol. 19, No. 6, 568-574

MAYURA, K., PARKER, R., BERNDT, O.W., PHILLIPS, T.D., 1984

Effect of simultaneous prenatal exposure to ochratoxin A and Citrinin in the rat  
Journal of Toxicology and Environmental Health 13, 553-561

MEHDI, N.A.Q., CARLTON, W.W., TUIE, J., 1983

Acute toxicity of citrinin in turkeys and ducklings  
Avian pathology 12,231-233

MEISTER, U., 2003

Detection of citrinin in ochratoxin A-containing products by a new HPLC method  
Mycotoxin Research, Gießen, 19.-21.05.2003, Vol. 19, 27-30

MEYER, K., MÜLLER, T., DIETRICH, R., MÄRTLBAUER, E., BAUER, J., 2001

Nachweis und Vorkommen von Mycophenolsäure und Citrinin in Rotwein  
Proc. 23. Mycotoxin-Workshop, Wien, 28.-30.05. 2001. Gesellschaft für  
Mycotoxinforschung e. V., (2001) Teil 2, 160-164

MOLINIÉ, A., FAUCET, V., CASTEGNARO, M., PFOHL-LESZKOWICZ, A., 2005

Analysis of some breakfast cereals on the French market for their contents of  
ochratoxin A, citrinin and fumonisin B<sub>1</sub> development of a method for simultaneous  
extraction of ochratoxin A and citrinin  
Food Chemistry, 92,391-400

NISHIJIMA, M. 1984

Survey of mycotoxins in commercial foods  
In: KURATA, H. und UENO, Y. (Hrsg.): Toxigenic fungi-their toxins and health hazard  
p.172-181  
Elsevier Science Publishers, B.V., Amsterdam, Niederlande

ODHAV, B. & NAICKER, V., 2002

Mycotoxins in South African traditionally brewed beers  
Food Additives and Contaminants, 19(1), 55-61

PFEIFFER, E.K., GROSS, K., METZLER, M., 1998

Aneuploidogenic and clastogenic potential of the mycotoxins citrinin and patulin  
Carcinogenesis 19 (7), 1313-1318

PFOHL-LESZKOWICZ, A., PETKOVA-BOCHAROVA, T., CHERNOZEMSKY, I.N., CASTEGNARO, M., 2002

Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumours: a review on  
aetiological causes and the potential role of mycotoxins  
Food Additives and Contaminants, 2002, 19 (3), 282-302

PHILLIPS, R.D., & HAYES, A.W., 1978

Effect of the mycotoxin citrinin on composition of mouse liver and kidney  
Toxicol, 16, 351-359

PHILLIPS, R.D., BERNDT, W.O., HAYES; A.W., 1979

Distribution and Excretion of [<sup>14</sup>C]Citrinin in rats  
Toxicology, 12, 285-298

- PHILLIPS, R.D., HAYES, A.W., BERNDT, W.O., 1980  
High performance liquid chromatographic analysis of the mycotoxin Citrinin and its application to biological fluids  
Journal of chromatography, 190, 419-427
- POUPKO, R., LUZ, Z., DESTRO, R., 1997  
Carbon-13 NMR of citrinin in the solid state and in solutions  
Journal of Physical Chemistry A, 101, 5097-5102
- REDDY, R.V., HAYES, A.W., BERNDT, W.O., 1982a  
Disposition and metabolism of [<sup>14</sup>C] citrinin in pregnant rats  
Toxicology, 25, 161-174
- REDDY, R.V., MAYURA, K., HAYES, A.W., BERNDT, W.O., 1982b  
Embryocidal teratogenic and fetotoxic effects of citrinin in rats  
Toxicology, 25, 151-160
- REINHARD, H., ZIMMERLI, B., 1999a  
Chromatographisches Verhalten von Citrinin  
Proceedings 21. Mycotoxin-Workshop, Jena, 07.-09.6.1999, Bundesinstitut für Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV), (1999) 168-172
- REINHARD, H., ZIMMERLI, B., 1999b  
Reversed-phase liquid chromatography behavior of the mycotoxins citrinin und ochratoxin A  
Journal of chromatography A, 862 (1991), 147-159
- RIBEIRO, S.M.R., CHAGAS, G.M., CAMPELLO, A.P., KLUPPEL, M.L., 1997  
Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. V. Effect on the homeostasis of the reactive oxygen species  
Cell Biochemistry and Function 15 (3), 203-209
- RICHTER, W., SCHUSTER, M., SCHOLZ, W., BARANOWSKI, A., 1998  
Ochratoxin A (OTA)- und Citrinin (CT)-Bildung in mit *Penicillium verrucosum* inokuliertem Futterhafer  
Proc. 20. Mycotoxin-Workshop, 08.-10.06. 1998, Bundesanstalt für Getreide-, Kartoffel-, und Fettforschung Detmold (1998) 100-104
- ROTH, L., H., FRANK, K., KORMANN, 1990  
Giftpilze, Pilzgifte  
Ecomed verlagsgesellschaft mbH

- SABATER-VILAR, M., MAAS, R.F.M., FINK-GREMMELS, J., 1999  
Mutagenicity of commercial *Monascus* fermentation products and the role of citrinin contamination  
Mutation Research 444, 7-16
- SANKAWA, U., EBIZUKA, Y., NOGUCHI, H., ISIKAWA, Y., KITAGAWA, S., YAMAMOTO, Y., KOBAYASHI, T., IITAK, Y., 1983  
Biosynthesis of citrinin in *Aspergillus terreus*  
Tetrahedron, 39(21), 3583-3591
- SCHMID, A., 2002  
Zum Nachweis von Citrinin in Lebensmitteln  
Diss. Med. Vet., Ludwig-Maximilians-Universität, München
- SCHNEWEIS, I., MEYER, K., HÖRMANSDORFER, S., BAUER, J., 2001  
Metabolites of *Monascus ruber* in Silages  
Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 85, 38-44
- SCOTT, P.M., 1984  
Effects of food processing on mycotoxins  
Journal of Food Protection 47, 489-499
- SHINOHARA, D.K., ARAI, M., HIRAO, K., SUGIHARA, S., NAKANISHI, K., TSONODA, H., ITO, N., 1976  
Combination effect of citrinin and other chemicals on rat kidney tumorigenesis  
Gann. 67, 147-155
- SHU, P.-Y., LIN, C.-H., 2002  
Simple and sensitive determination of citrinin in *Monascus* by GC- selected ion monitoring mass spectrometry  
Analytical Sciences 18(3), 283-287
- SMITH, J.E., HENDERSON, R.S., 1991  
Mycotoxins and animal foods  
CRC Press, London
- STOEV, S.D., 1998  
The role of ochratoxin A as a possible cause of balcan endemic nephropathy and its risk evaluation  
Veterinary and Human Toxicology 40, 352-360

- THUST, R., KNEIST, S., 1979  
Activity of Citrinin metabolizes by rat and human mikrosome fractions in clastogenicity and SCE assays on Chinese hamster V79-Ecells  
Mutation Research, 67, 321-330
- TRIVEDI, A.B., HIROTA, M., DOI, E., KITABATAKE, N., 1993  
Formation of a new toxic compound, citrinin H1, from citrinin on mild heating in water  
Journal of the Chemical Society-Perkin Transaction I, 2167-2171
- VAZQUEZ, B.P., FENTE, C., FRANCO, C., CEPEDA, A., PROGNON, P., MAHUZIER, G., 1996  
Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of ochratoxin A and citrinin in cheese by time-resolved luminescence using terbium  
Journal of Chromatography A 727, 185-193
- VESELA, D., VESELY, D., JELINEK, R., 1983  
Toxic effects of ochratoxin A and citrinin, alone and in combination, on chicken embryos  
Applied and Environmental Microbiology 45, 91-93
- VOLLBRECHT, D. 1998  
Hochwertige Nahrungsmittel: Rot Fermentierter Reis (Ang-Khak)  
BIOforum 4/98 195-200
- VRABCHEVA, T. USLEBER, E., DIETRICH, R., MÄRTLBAUER, E., 2000  
Co-occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals from Bulgarian villages with a history of Balcan Endemic Nephropathy  
Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2000, 48, 2483-2488
- WANG, Y.-Z., JU, X.-L., ZHOU, Y.-G, 2005  
The variability of citrinin production in *Monascus* type cultures  
Fodd Microbiology 22, 145-148
- WEHNER, F.C., THIEL, P.G., RENSBURG, S.J.V., DEMASIUS, J.P.C., 1978  
Mutagenicity to *Salmonella typhimurium* of some *Aspergillus* and *Penicillium* mycotoxins  
Mutation Research 58, 193-203
- WILSON, D.M., 1994  
Citrinin: analysis and occurrence  
In: LLEWELLYN, G. C., DASHEK, W. V., O`REAR, C. E. (Hrsg.): Biodeterioration research 4. Mycotoxins, wood decay, plant stress, biocorrosion and general biodeterioration, p. 65-73  
Plenum Press, New York

WORLD HEALTH ORGANISATION, 1965

Memoranda: The endemic nephropathy of South Eastern Europe (Geneva: WHO),  
431-448

WÜRGLER, F.E., FRIEDERICH, U., SCHLATTER, J., 1991

Lack of mutagenicity of ochratoxin A and B, citrinin, patulin and cneistine in  
*Salmonella typhimurium* TA102  
Mutation Research 261, 209-216

WU, M.T., AYRES, J.C., KOEHLER, P.E., 1974

Production of citrinin by *Penicillium viridicatum* on Country-Cured Ham  
Applied Microbiology, 27(2), 427-428

YU, F.-Y., LIAO, Y.-C., CHANG, C.-H., LIU, B.-H., 2006

Citrinin induces apoptosis in HL-60 cells via activation of the mitochondrial pathway  
Toxicology Letters 161, 143-151

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Johann Bauer vom Lehrstuhl für Tierhygiene der Technischen Universität München möchte ich für die Überlassung des Themas, die freundliche Unterstützung bei der Durchführung sowie für die Einstellung als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl sehr herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. Erwin Märtlbauer vom Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch der Ludwig-Maximilians-Universität München möchte ich insbesondere für die Übernahme dieser Arbeit danken.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Karsten Meyer für seine Betreuung bei der praktischen und schriftlichen Ausarbeitung des Themas und seine zahlreichen und konstruktiven Anregungen und Ratschläge sowie seine mir stets gewährte Unterstützung bedanken.

Herrn Dr. Richard Dietrich vom Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Ludwig-Maximilians-Universität München, danke ich für die sorgfältige Durchsicht der Arbeit.

Den Mitarbeitern des Lehrstuhls für Tierhygiene der Technischen Universität München danke ich für die freundliche Aufnahme, die Einarbeitung, stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung. Insbesondere danke ich Frau Monika Held, Herrn René Mamet, Frau Andrea Schott und Frau Dr. Katrin Harms für die gute Zusammenarbeit im Labor.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meinem Mann Michael, meinen beiden Töchtern, Anna Carina und Marie Aimée sowie meinen Eltern und Schwiegereltern für ihr Verständnis und ihre moralische Unterstützung.

# Lebenslauf

Claudia Barbara Schneider, geb. Wagner  
Geboren in München am 19.12.1976, verheiratet, 2 Kinder

## Ausbildung

---

### *Schule*

1983-1987	Camerloher-Grundschule in München
1987-1992	Ludwigsgymnasium in München
1992-1996	Luisengymnasium in München
Juni 1996	Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

### *Studium*

1996-1997	Studium der Rechtswissenschaften an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
1997-2003	Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
23.09.2003	Approbation als Tierärztin
Seit 12/03	Promotionsstudium am Lehrstuhl für Tierhygiene der Technischen Universität München, Weihenstephan

## Arbeitsstellen

---

07-11/02	Klifovet AG, Assistentin im Bereich Monitoring von klinischen Feldstudien
12/03-11/05	Wissenschaftliche Angestellte am Lehrstuhl für Tierhygiene der Technischen Universität München, Weihenstephan

---