

Methode zur Bestimmung von Mutterkornalkaloiden in Lebensmitteln

Christian Klug^{1*}, Werner Baltes¹, Wolfhard Krönert² und Rudolf Weber²

¹ Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität Berlin, Müller-Breslau-Strasse 10, D-1000 Berlin 12

² Max von Pettenkofer-Institut des Bundesgesundheitsamtes, Unter den Eichen 82-84, D-1000 Berlin 45

Method for the determination of ergot alkaloids in food

Summary. A suitable method has been developed for the routine analysis of the ergot alkaloids ergometrine, ergometrinine, ergosine, ergosinine, ergotamine, ergotaminine, ergocornine, ergocorninine, α -ergocryptine, α -ergocryptinine, β -ergocryptine, β -ergocryptinine, ergocristine and ergocristinine in cereal products. The method consists of food extraction, cleaning of the crude extract by a modified form of the Extrelut method, and identification and quantitative determination of the alkaloids by high pressure liquid chromatography (HPLC). The results are confirmed by thin layer chromatography (TLC) and gaschromatography/mass spectrometry (GC/MS). Market investigations have shown contaminations in ecological as well as in conventional products, with rye products mainly being contaminated. Within the EEC, a maximum value of 0.05% ergot respectively a total alkaloid content of 1 mg/kg in cereals used for food production is prescribed. This value was not exceeded in any of the investigated samples.

Zusammenfassung. Es wurde eine für die Routineanalytik geeignete Methode zur Bestimmung der Mutterkornalkaloide Ergometrin, Ergometrinin, Ergosin, Ergosinin, Ergotamin, Ergotaminin, Ergocornin, Ergocorninin, α -Ergokryptin, α -Ergokryptinin, β -Ergokryptin, β -Ergokryptinin, Ergocristin und Ergocristinin in Getreideprodukten entwickelt. Die Methode besteht aus der Extraktion des Lebensmittels, der Reinigung des Rohextraktes mit einer modifizierten Form des Extrelut-Verfahrens und der Identifizierung und quantitativen Bestimmung der Alkaloide mittels HPLC. Zur Absicherung der qualitativen Ergebnisse wurden DC und GC/MS hinzugezogen. Marktunter-

suchungen zeigten Kontaminationen sowohl bei alternativen als auch bei herkömmlichen Produkten, wobei der Befall bei Roggenerzeugnissen überwiegt. Die gemessenen Werte lassen indes erkennen, daß in keinem Falle die in der Europäischen Gemeinschaft geltende Interventionsgrenze von 0,05% Mutterkorn entsprechend 1 mg/kg Gesamtalkaloide erreicht wurde.

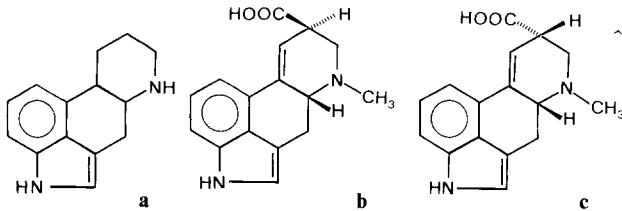
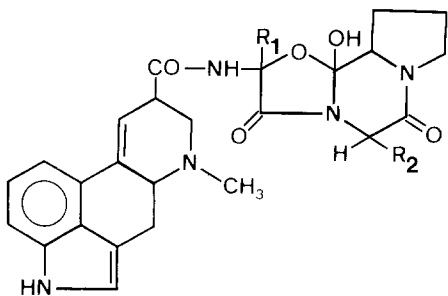
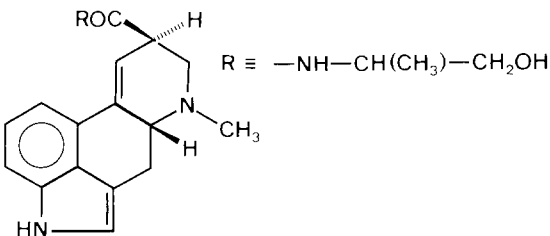
Einleitung

An dieser Stelle berichteten wir [1] in einer Kurzmittteilung über eine Methode zur Bestimmung von Mutterkornalkaloiden in Cerealien. Der Verzehr von mit Mutterkorn kontaminiertem Getreide führte in der Vergangenheit häufig zu epidemieartig auftretenden Massenvergiftungen, bei denen im Mittelalter sogar Zehntausende von Menschen ums Leben kamen. Die letzte Massenvergiftung in Europa ereignete sich 1951 in Frankreich. Danach schien das Mutterkorn lange Zeit keine Gefahr mehr für die Gesundheit des Menschen darzustellen. Dazu trugen eine Verbesserung der Getreidereinigung sowie die Anwendung geeigneter Bekämpfungsmaßnahmen bei [2, 3]. In den letzten Jahren wurde wiederholt von einer Zunahme des Mutterkornbefalls berichtet [4-6]. Gerade in jüngster Zeit gewinnt eine ständig wachsende Bevölkerungsgruppe an Bedeutung, die sich mit Produkten aus biologisch-dynamischem Anbau ernährt. Unter diesen Produkten erfreuen sich Müslis, Vollkornmehle und Schrote und aus letzteren hergestellte Backwaren besonderer Beliebtheit [7-9]. Getreide aus biologisch-dynamischem Anbau ist entweder direkt beim Landwirt oder in sogenannten Alternativ- bzw. Bioläden erhältlich. Landwirte, die biologisch-dynamisch angebautes Getreide produzieren, haben oft keine Möglichkeit, dieses zum Reinigen in eine Mühle zu bringen. Der oft praktizierte alleinige Einsatz einer Saatgutreinigungsmaschine reicht zur Entfernung von Mutterkorn nicht aus. Auch wird teilweise aus Nachlässigkeit oder aus ideologischen Gründen von der üblichen Mühlentechnik

* Seit November 1985 c/o Hoechst Aktiengesellschaft, Abteilung Lebensmitteltechnik, Postfach 8003 20, D-6230 Frankfurt/M. 80, Bundesrepublik Deutschland
Offprint requests to: Ch. Klug

Tabelle 1. Zusammensetzung des Tripeptidteils der Peptidalkaloide

	Alkaloid	R ₁	Hydroxy-AS	R ₂	AS
Ergotamin-Gruppe	Ergotamin	CH ₃ -	α-Hydroxyalanin	C ₆ H ₅ -CH ₂ -	Phenylalanin
	Ergosin	CH ₃ -		(CH ₃) ₂ CH-CH ₂ -	Leucin
Ergotoxin-Gruppe	Ergocornin	(CH ₃) ₂ CH-	α-Hydroxyvalin	(CH ₃) ₂ CH-	Valin
	α-Ergokryptin	(CH ₃) ₂ CH-		(CH ₃) ₂ CH-CH ₂ -	Leucin
	β-Ergokryptin	(CH ₃) ₂ CH-		CH ₃ CH ₂ -(CH ₃)CH-	Isoleucin
	Ergocristin	(CH ₃) ₂ CH-		C ₆ H ₅ -CH ₂ -	Phenylalanin

**Abb. 1a-c.** Strukturen von Ergolin (a), D-Lysergsäure (b) und D-Isolysergsäure (c)**Abb. 2.** Struktur von Mutterkornalkaloiden des Tripeptid-Typs**Abb. 3.** Struktur von Ergometrin

abgewichen bzw. diese vollständig unterlassen. Eine Getreidereinigung ist dann nur bedingt bzw. nicht gewährleistet. Es ist daher nicht weiter erstaunlich, daß es nach dem Verzehr von Getreideprodukten aus biologisch-dynamischem Anbau vereinzelt zu Mutterkornvergiftungen kam, die einen stationären Krankenhausaufenthalt erforderlich machten [10].

Das Grundgerüst der Mutterkornalkaloide ist das Ergolin (Abb. 1a), ein partiell hydriertes Indolochinolin. Mutterkornalkaloide sind Amide und Peptide der D-Lysergsäure (6-Methyl-8-carboxyl-9,10-ergolin) (Abb. 1b) und ihres Diastereomeren, der D-Isolysergsäure (Abb. 1c). Zu ihrer Unterscheidung enden die

Verbindungen der D-Lysergsäure auf „in“ (z. B. Ergotamin), die der D-Isolysergsäure auf „inin“ (z. B. Ergotaminin). Clavin-Alkaloide kommen im Mutterkornpilz *Claviceps purpurea* nur in geringen Mengen vor und werden hier nicht berücksichtigt.

Bei den Peptidalkaloiden ist der mit der Säure verknüpfte Rest ein cyclisches Tripeptid (Abb. 2). Die Alkaloide dieses Typs unterscheiden sich im Aufbau des Tripeptids, das neben einer Amino- und einer Hydroxyaminsäure stets Prolin enthält.

Die Tabelle 1 zeigt die unterschiedliche Zusammensetzung des Tripeptid-Teils der Peptidalkaloide.

Beim Ergometrin (= Ergobasin), dem in Mutterkorn enthaltenen Vertreter der Säureamide, ist die D-Lysergsäure amidartig mit 2-Amino-propanol-(1) verknüpft (Abb. 3).

Nachfolgend sollen die Bedingungen für die Bestimmung von Mutterkornalkaloiden beschrieben werden, mit deren Hilfe wir eine größere Anzahl von Getreideprodukten untersucht haben.

Experimentelle Angaben

1 Vorbereitung der Probe

Alle über den Feinheitsgrad von Mehlen hinausgehenden Proben mahlen. Schrote, Grieße, Grützen, Flocken, feine Backwaren, Knäckebrot, Teigwaren und Müslis, falls erforderlich, im Mörser vorzerkleinern und anschließend mahlen. – Außer Knäckebrot jedes Brot vor dem Mahlen trocknen, am besten gefriertrocknen. Bei Trocknung im Trockenschrank $T_{\max} = 35^{\circ}\text{C}$. Stark fetthaltige Lebensmittel (z. B. feine Backwaren, ölsamenhaltige Brote) nach Trocknung 45 min in Soxhlet-Apparatur (Extraktionsinhalt 250 ml, Kolbeninhalt 500 ml, Kühler NS 45/40) mit Petrolether (40–60 °C) entfetten. Vollständige Entfettung ist nicht notwendig.

2 Extraktion der Mutterkornalkaloide aus der Probe

50,0 g der nach Nr. 1 vorbereiteten Probe 30 min lang in gut verschlossenem Schlierlenmeyerkolben (300 ml) mit 200 ml Dichlormethan/Essigsäureethylester/Methanol/konz. Ammoniak ($D=0,89$) (50 + 25 + 5 + 1; v/v/v/v) durch Schütteln extrahieren. Nach Unterdruckfiltration durch Glasfaserfilter (Sartorius, Type S 13400) Probenrückstand und Filterkuchen ein zweites Mal mit 200 ml Extraktionsgemisch 30 min lang extrahieren. Vereinigte klare Filtrate am Rotationsverdampfer einengen ($T_{\max} = 35^{\circ}\text{C}$). Konzentrierten Rohextrakt quantitativ in 25-ml-Spitzkolben überführen und fast bis zur Trockne einengen. Restlos durch Abblasen mit Stickstoff von Lösungsmitteln und insbesondere vom Ammoniak befreite, eingeeengte Extrakte können einige Tage im Tiefkühlschrank aufbewahrt werden.

3 Reinigung des Rohextraktes

Nach Nr. 2 erhaltenen Rohextrakt in 2 ml Toluol/Methanol (49+1; v/v) aufnehmen (Ultraschallbad), dann mit 18 ml n-Hexan versetzen. Die gut durchmischte, manchmal trübe Lösung in Portionen von 1–2 ml (Pasteur-Pipette) auf Extrelut 20-Säule geben, die 15 min zuvor mit 20 ml 2%iger wäßriger Weinsäurelösung belegt wurde; bei jeder Zugabe warten, bis Lösung im Säulenbett versickert ist. 15minütige Wartezeit nach Säulenbelegung unbedingt einhalten! Spitzkolben zweimal spülen. Dazu Kolbenwand im Ultraschallbad (!) mit jeweils 1 ml Toluol/Methanol (49+1; v/v) gründlich nachwaschen. Nach Zugabe von 9 ml n-Hexan Lösung gut durchmischen und wie oben auf Säule geben.

Säule mit 75 ml Diisopropylether/n-Hexan (1+1; v/v) eluieren. Eluat verwerfen. Restliches Elutionsgemisch mit Wasserstrahlpumpe ca. 5 min lang absaugen. Über die Säule gasförmiges Ammoniak aus konz. Ammoniaklösung (D=0,89)/Wasser (1+1; v/v) mit Hilfe eines nicht zu starken Stickstoffstromes (Neutralisationswärme!) über die Säule leiten, bis Ammoniak am Säulenende nachweisbar (pH-Papier). Elution der Mutterkornalkaloide mit 75 ml Dichlormethan in 100-ml-Schliffkolben (zum Lichtschutz mit Alufolie umhüllen). Restliches Dichlormethan mit Pumpball von Säule in Kolben drücken, in dem sich Eluat befindet. Meist milchig trübes Eluat am Rotationsverdampfer ($T_{\max}=35\text{ °C}$) bis auf ca. 1 ml einengen. Restliches Lösungsmittel mit Stickstoff abblasen.

Trüben Rückstand in 8 ml Acetonitril/bidest. Wasser (47+53; v/v) aufnehmen, dabei im Ultraschallbad (!) sämtliche an Kolbenwand haftenden Bestandteile von dieser ablösen. So erhaltene Lösung in 20-ml-Meßkolben überführen. Kolben noch zweimal mit je 6 ml oben genannten Gemisches im Ultraschallbad spülen; Spülflüssigkeit ebenfalls in Meßkolben geben. Anschließend mit oben genanntem Gemisch bis zur Marke auffüllen und gut schütteln. Analysenlösung mit Dreiringspritze mit Luer-Anschluß durch Membranfilter aus regenerierter Cellulose, Porengröße 0,45 µm (Sartorius, Type N 11606) klar filtrieren.

4 Identifizierung der Mutterkornalkaloide

4.1 Hochleistungsflüssigchromatographie

HPLC-Bedingungen. Säule: Länge 250 mm, Innendurchmesser 4,6 mm, gepackt mit Shandon Hypersil ODS, Teilchengröße 3 µm (Knauer, Berlin). – Vorsäule: Länge 30 mm, Innendurchmesser 4,6 mm, gepackt mit Shandon Hypersil ODS, Teilchengröße 5 µm (Knauer, Berlin). Mobile Phase: Acetonitril/bidest. Wasser (47+53; v/v) + 0,1 g Ammoniumcarbonat/l, Fließrate 1,1 ml/min, Einspritzvolumen 20 µl, Detektion fluoreszenzspektralphotometrisch, Anregungswellenlänge: 327 nm, Emissionswellenlänge: 398 nm.

4.2 Bestätigung durch Dünnschichtchromatographie

15,0 ml des in Nr. 3 erhaltenen Filtrats in 25-ml-Spitzkolben zur weitgehenden Entfernung von Acetonitril am Rotationsverdampfer ($T_{\max}=35\text{ °C}$) auf ca. 8–10 ml einengen. Trübe Lösung quantitativ in Fortuna-Mixor-Extraktionsgefäß (Volumen 20 ml) überführen. Spitzkolben dreimal mit insgesamt 10 ml Chloroform/Methanol (9+1; v/v) spülen (Ultraschallbad). Spüllösung jeweils in Extraktionsgefäß geben. Nach Extraktion organische Phase über wasserfreies Natriumsulfat filtrieren. Extraktion der wässrigen Phase zweimal mit oben genanntem Gemisch wiederholen. Getrocknete vereinigte organische Phasen bis fast zur Trockne einengen.

Extrakt quantitativ in kleines Probengefäß (Volumen 1 ml) überführen (Lösungsmittel zwischendurch mit Stickstoff abblasen), Rückstand vollständig trocken blasen und in 300 µl oben genannten Gemisches aufnehmen (100 µl \pm 12,5 g Probe).

DC-Bedingungen. Sorbens: Kieselgel 60, ohne Fluoreszenzindikator, Schichtdicke 0,5 mm (Merck), Laufmittel Dichlormethan/Methanol (9+1; v/v), Laufstrecke 15 cm, Laufzeit ca. 45 min, Me-

thode aufsteigend, Kammersättigung, Auftragsart strichförmig (Strichlänge 1,5 cm), Auftragsmenge 250–500 µg je Alkaloid, 100–200 µl Probelösung, Sprühreagens a) 0,5 g p-Dimethylaminobenzaldehyd gelöst in 100 ml Cyclohexan, b) konz HCl (D=1,19)/Wasser (1+1; v/v). Platte nach Entwickeln vorsichtig mit Föhn trocknen, dann mit a) und anschließend mit b) besprühen. Mutterkornalkaloide erscheinen als blauviolette Flecke auf weißem Untergrund.

4.3 Bestätigung durch Gaschromatographie/Massenspektrometrie

Zur Identifizierung der Mutterkornalkaloide wird die in Kap. 4.2 aufgearbeitete Probelösung eingesetzt.

GC/MS-Bedingungen. Trennsäule DB 1 Fused silica-Capillarsäule, Länge 15 m, Innendurchmesser 0,32 mm, Filmdicke 0,25 µm, Injektortemperatur 250 °C, Injektion splitlos, Einspritzvolumen 0,5–1,0 µl, Temperaturprogramm: 3 min auf 180 °C halten, dann mit 20 °C/min auf 300 °C aufheizen, 10 min bei 300 °C halten. Trägergas Helium, 2,5 ml/min, Reaktandgas Methan, Ionisierungsenergie 70 eV, Emissionsstrom 300 mA, Ionenquelle 150 °C, cyclischer Scan 100–600 m/z in 1,1 s, Ionisierungsart NCI.

Ergebnisse und Diskussion

Mit der beschriebenen Analysenmethode gelingt der eindeutige Nachweis und die quantitative Bestimmung von Mutterkornalkaloiden in Lebensmitteln.

Die Extraktion mit dem bereits von anderen Autoren [11, 12] verwendeten Extraktionsgemisch wurde erfolgreich bei Getreideprodukten verschiedener Ausmahlungsgrade bzw. Verarbeitungsformen wie Mehlen, Schrotten, Grießen, Grützen und Flocken von Roggen, Weizen, Gerste, Hafer und Mais, Weizenkeimen, Weizenkleien, Broten (Roggen-, Roggenvollkorn-, Misch-, Weiß-, Mehrkorn-, Leinsamen-, Sesam-, Knäcke- und Kleibrotten), Zwieback, feinen Backwaren (Lebkuchen, Keksen, Biscuits), Kindernährmitteln auf Getreidebasis, Teigwaren und Müslis durchgeführt. Dabei hat sich vor allem die von uns entwickelte Reinigung mit Extrelut® nach Weinsäurebehandlung gut bewährt. So konnten störende Begleitsubstanzen fast vollständig beseitigt werden. Bei überwiegend Haferflocken enthaltenden Proben wie z. B. Müslis, setzten nach der Extraktion in der Lösung enthaltene Trübstoffe die Filterporen zu. Ein Absetzen der Trübstoffe konnte vor der Filtration durch Zentrifugation bei 10 000 U/min erreicht werden.

Es wurden gut reproduzierbare Analyseergebnisse mit hohen Wiederfindungsraten erzielt. Zur Ermittlung der in Tabelle 2 angegebenen Mittelwerte wurden je 5 Bestimmungen durchgeführt. Dazu wurden jeweils 0,5 mg/kg Alkaloid zu einem unkontaminierten Roggenmehl gegeben und aufgearbeitet. Die quantitative Bestimmung der Alkaloide erfolgte mittels HPLC und fluoreszenzspektralphotometrischem Nachweis. Von dem HPLC-System wurden die Mutterkornalkaloide in der Reihenfolge der Abb. 4 getrennt.

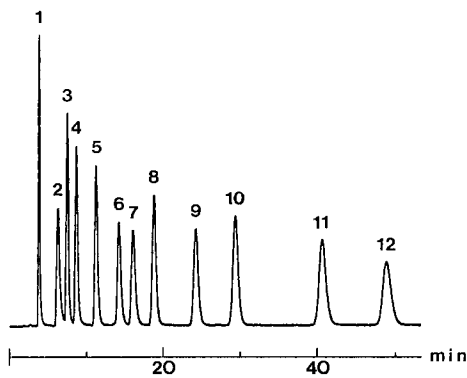


Abb. 4. HPLC-Chromatogramm eines Mutterkornalkaloid-Standardgemisches

Tabelle 2. Reihenfolge der Alkaloide bei der HPLC-Trennung

Nr.	Alkaloid	Retentionszeit min/s	Nachweisgrenze ng	Wiederfindung %
1	Ergometrin	3'25"	0,03	97±2
2	Ergometrinin	5'25"	0,05	90±5
3	Ergosin	7'05"	0,10	84±6
4	Ergotamin	8'10"	0,10	88±6
5	Ergocornin	10'50"	0,10	68±5
6	α-Ergokryptin	13'45"	0,10	66±4
6a	β-Ergokryptin	14'30"	0,10	66±4
7	Ergocristin	15'30"	0,15	64±4
8	Ergosinin	18'45"	0,15	68±5
9	Ergotaminin	24'30"	0,15	66±4
10	Ergocorninin	29'45"	0,15	73±4
11	α-Ergokryptinin	41'30"	0,20	71±5
11a	β-Ergokryptinin	42'05"	0,20	72±7
12	Ergocristinin	49'45"	0,20	73±8

Die Zuordnung der Peaks erfolgt mit Hilfe der Nummerierung der Alkaloide in Tabelle 2. Die eingespritzten Mengen betragen bei den Verbindungen 1 und 2 je 5 ng, bei den Alkaloiden 3–12 je 10 ng. Die Alkaloide 6a und 11a waren in der Alkaloidmischung nicht enthalten. Während 6 und 6a mit diesem System noch gut voneinander getrennt werden konnten, gelang bei 11 und 11a nur eine Antrennung.

Zum Nachweis der Alkaloide wurde angesichts ihrer starken Fluoreszenz im UV-Bereich ein Fluoreszenzspektralphotometer eingesetzt. Mit diesem Analysensystem gelang der Nachweis der Mutterkornalkaloide noch im Pikogramm-Bereich. Die quantitative Bestimmung der Alkaloide erfolgte über eine Eichgerade. Bei fluorimetrischen Messungen wird die Linearität der Meßwertanzeigen neben anderen Faktoren auch durch das Fluorimeter selbst begrenzt, da sowohl Empfänger als auch Verstärker nur einen limitierten Linearitätsbereich haben. Für das hier verwendete Meßsystem lag dieser Bereich für die Alkaloide 1 und 2 zwischen 0 und 50 ng; alle anderen hier untersuchten Alkaloide zeigten ein lineares Signal/Alkaloidmengen-Verhältnis im Bereich von 0–100 ng. Zur Aufstellung der Eichgeraden wurden unterschiedliche Alkaloidmengen chromatographiert und die aus dem

Chromatogramm resultierenden Peak-Flächen gegen die jeweilige Konzentration aufgetragen. Werden die in Kap. 1–4.1 gegebenen Versuchsbeschreibungen genau eingehalten, so kann der Gehalt der jeweiligen Alkaloide im Lebensmittel bei einer Einspritzmenge von 20 µl wie folgt berechnet werden:

$$X \mu\text{g/kg-Alkaloid} = Y \text{ ng Alkaloid} \times 20$$

Y = aus der Eichgeraden abgelesene Alkaloidmenge.

Grundsätzlich muß gesagt werden, daß eine Berechnung des Gehaltes an Mutterkorn eines Lebensmittels mit Hilfe des in Nr. 4.1 bestimmten Alkaloidgehaltes nicht möglich ist, da der Alkaloidgehalt des Mutterkorns großen Schwankungen unterliegt. Grobe Abschätzungen sind jedoch möglich.

Die maximalen Alkaloidgehalte von Mutterkorn bestimmter Provenienz sind bekannt; so enthält zentraleuropäisches Mutterkorn maximal 0,2%, kanadisches bis zu 0,5% Alkaloide. So muß bei einem für den EG-Bereich gesetzlich festgelegten Höchstwert von 0,05% Mutterkorn im Getreide [13] 1 mg/kg Gesamtalkaloid als maximal zulässig angesehen werden. Dabei wurde ein Alkaloidgehalt des Mutterkorns von 0,2% zugrunde gelegt, da davon ausgegangen wurde, daß zur Herstellung gerade der alternativen Lebensmittel das Getreide aus dem zentraleuropäischen Raum stammt.

Eine Abschätzung des Mutterkorngehaltes von zur Brot- bzw. Backwarenherstellung verwendeten Getreides ist allerdings wegen der Alkaloidverluste beim Backen nicht möglich.

Auswertungsschwierigkeiten wurden nach bisher gewonnenen Erfahrungen nur bei der Bestimmung geringer Mengen Ergometrin festgestellt. Das Vortäuschen nicht vorhandener Alkaloide durch Lebensmittelkomponenten wurde nur beim Ergocornin (Weizenkeime) und Ergometrinin (Roggenvollkorn- bzw. Roggenmischbrot) beobachtet. Beide Alkaloide sind im Mutterkorn mengenmäßig nur untergeordnet vorhanden und haben daher keinen maßgeblichen Anteil am Gesamtalkaloidgehalt.

Abbildung 5 zeigt eine Gegenüberstellung der Chromatogramme eines mutterkornfreien Roggenvollkornmehles (B), dem die gesetzlich erlaubte Höchstmenge von 0,05% Mutterkorn zugesetzt wurde (A). Die vorgestellte Methode gewährleistet sehr gut reproduzierbare qualitative und quantitative Ergebnisse. Sie wurde daher für marktorientierte Untersuchungen eingesetzt, deren Ergebnisse durch Dünnschichtchromatographie und Gaschromatographie/Massenspektrometrie abgesichert wurden.

Mit dem in Nr. 4.2 beschriebenen DC-System war die vollständige Auftrennung aller Alkaloide zwar

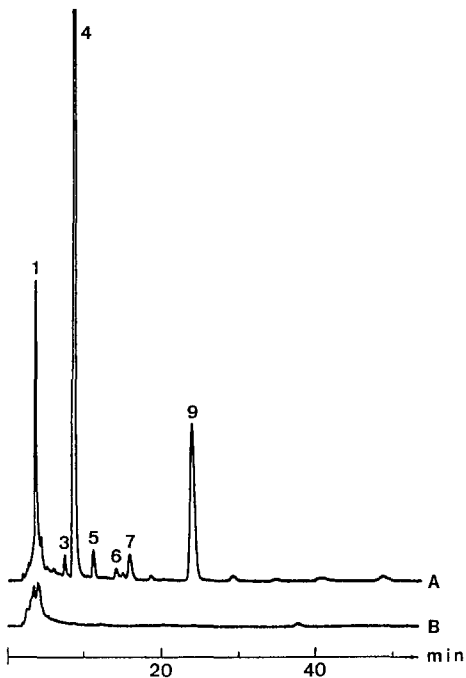


Abb. 5. Gegenüberstellung der Chromatogramme eines alkaloidfreien (A) und eines mit 0,05% Mutterkorn kontaminierten Mehles (B)

Tabelle 3. R_f -Werte der Mutterkornalkaloide

	R_f -Wert $\times 100$		R_f -Wert $\times 100$
Ergometrin	15,3	Ergocristin	43,2
Ergometrinin	22,7	Ergosinin	44,3
Ergosin	36,7	Ergotaminin	46,0
Ergotamin	36,7	Ergocorninin	48,3
Ergocornin	42,7	α -Ergokryptinin	50,0
α -Ergokryptin	43,0	β -Ergokryptinin	50,3
β -Ergokryptin	43,0	Ergocristinin	63,3

nicht möglich, eine gruppenweise Trennung erwies sich im Rahmen dieser Methode zur Absicherung qualitativer Ergebnisse jedoch als vollkommen ausreichend.

Von den zahlreichen in der Literatur erwähnten, für Alkaloide spezifischen Sprühreagentien reagierte nur p-Dimethylaminobenzaldehyd in einer von den übrigen Matrixkomponenten unterschiedlichen Art und Weise mit den Mutterkornalkaloiden. Bei Besprühen der DC-Platte nach dem Entwickeln färbten sich die Alkaloid-Banden innerhalb von ca. 45 s deutlich blau-violett auf weißem Untergrund. Andere Lebensmittelinhaltsstoffe traten erst nach einigen Minuten als zum Teil andersfarbige Flecke in Erscheinung. Die Alkaloide bzw. die nicht aufgetrennten Alkaloidgruppen konnten daher unmittelbar nach dem Besprühen mit Hilfe eines mitlaufenden Alkaloidgemisches über ihre R_f -Werte identifiziert werden.

Tabelle 4. Charakteristische Massen der Mutterkornalkaloide bei Aufnahme der Spektren mit NCI

	m/z
Ergometrin	323/324
Ergosin	280/281
Ergotamin	314/315
Ergocornin	294/295
α -Ergokryptin	308/309
β -Ergokryptin	308/309
Ergocristin	342/343

Die Nachweisgrenze der einzelnen Alkaloide im Getreide bzw. in Getreideprodukten betrug zwischen 25 und 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Als zweites Absicherungsverfahren wurde die GC/NCIMS angewandt.

Bei Mutterkornalkaloiden des Peptidtyps wird die Amidbindung des Alkaloidmoleküls bei Injektortemperaturen von ca. 250 °C zwischen dem Lysergsäure- und dem Peptidteil quantitativ gespalten. Durch das unterschiedliche Retentionsverhalten des für jedes Alkaloid charakteristischen Peptidbruchstückes in der stationären Phase der Trennsäule wird ihre gaschromatographische Trennung und massenspektrometrische Identifizierung ermöglicht. Es wurden die folgenden charakteristischen m/z-Werte für die Peptidanteile der Mutterkornalkaloide gemessen (siehe Tabelle 4).

Für die massenspektrometrische Detektion von Ergometrin erwies sich die hier angewandte Methode allerdings als zu unempfindlich. Da Ergometrin immer gemeinsam mit anderen Mutterkornalkaloiden im Mutterkorn enthalten ist, ist sein Nachweis zur Ermittlung einer Mutterkornkontamination daher nicht zwingend erforderlich. Die Identifizierung der Alkaloide mittels GC/MS konnte somit durch Anwendung des Selected Ion Monitoring (SIM) erfolgen. Dies ist in Abb. 6 dargestellt.

Mit dem SIM-Verfahren wurden jeweils auch Extrakte alkaloidfreier Lebensmittel untersucht. Bei der Auswahl dieser Proben wurde darauf geachtet, daß neben den einzelnen Getreidearten jeweils eine alkaloidfreie Probe als Vertreter einer der hier untersuchten Produktgruppen analysiert wurde. Bei keiner dieser Proben wurde dabei die Anwesenheit von Mutterkornalkaloiden vorgetäuscht, die selber halbquantitativ bis in den Pikogramm-Bereich nachzuweisen waren.

Einzelheiten zum experimentellen Teil, eine ausführliche Diskussion der Methode sowie die Darstellung von Chromatogrammen und Massenspektren können [14] entnommen werden.

Zur Verschaffung eines Überblicks über die Belastung von Getreideprodukten des deutschen Marktes mit Mutterkornalkaloiden und gleichzeitiger praxis-

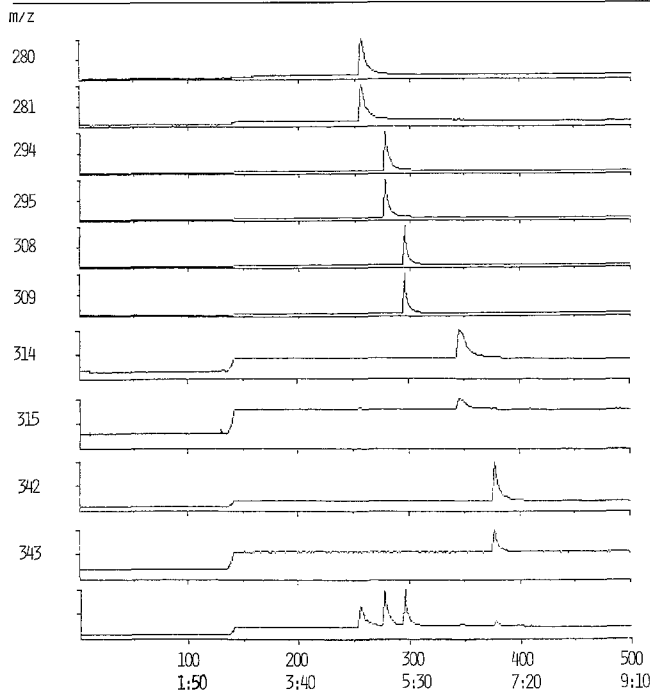


Abb. 6. Elutionsfolge der Alkaloid-Peptidteile und deren Identifizierung durch jeweils zwei charakteristische Massen.

Tabelle 5. Zusammenstellung der Ergebnisse einer Untersuchung von Getreideprodukten des alternativen und des konventionellen Marktes

	Anzahl der Proben	Davon kontaminiert	Gesamtalkaloide $\mu\text{g}/\text{kg}$
<i>Konventioneller Markt</i>			
Roggenerzeugnisse	12	7	14–187
Weizenerzeugnisse	4	–	–
Weizenkleien	4	1	25
Weizenkeime	3	1	185
Brote	7	–	–
Kindernährmittel	2	–	–
Feine Backwaren	2	–	–
Teigwaren	2	–	–
Müslis	1	1	78
Gesamt	37	10	
<i>Alternativer Markt</i>			
Roggenerzeugnisse	24	9	12–109
Weizenerzeugnisse	9	1	17
Weizenspelzen	1	–	–
Weizenkleien	1	–	–
Weizenkeime	2	2	58–199
Maisерzeugnisse	7	–	–
Gerstenerzeugnisse	4	–	–
Hafererzeugnisse	3	–	–
Feine Backwaren	11	1	18
Brote	7	6	27–156
Teigwaren	5	–	–
Kindernährmittel	2	–	–
Müslis	5	–	–
Gesamt	81	19	

gerechter Überprüfung der entwickelten Analysemethoden wurde eine Untersuchung von insgesamt 118 Proben des alternativen und konventionellen Marktes durchgeführt. Dabei hat sich das Bestimmungsverfahren ohne Einschränkungen bewährt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Der Vergleich der beiden Marktanalysen zeigt, daß in beiden Markt Bereichen mutterkornhaltige Produkte in den Verkehr gebracht wurden. Allerdings lagen bei allen Proben die Werte deutlich unter der gesetzlich festgelegten Höchstgrenze von 0,05% Mutterkorn ($\cong 1 \text{ mg}/\text{kg}$ Gesamtalkaloide bei einem maximalen Alkaloidgehalt zentraleuropäischen Mutterkorns von 0,2%). Aus dem Ergebnis dieser Untersuchung ist ersichtlich, daß Mutterkorn hauptsächlich in Roggenprodukten vorhanden ist. Dieses Ergebnis bestätigt Literaturangaben, nach denen bevorzugt Roggen während der Blütezeit mit den Sporen des Mutterkornpilzes *Claviceps purpurea* infiziert wird.

Eine vom Schweizer Bundesamt für das Gesundheitswesen [15] nach dieser Methode durchgeführte Untersuchung deckt sich weitgehend mit unseren Ergebnissen. Insgesamt sind die Untersuchungsbefunde aus der Schweiz und der Bundesrepublik Deutschland nicht beunruhigend, jedoch deuten die in den letzten Jahren vereinzelt aufgetretenen Vergiftungsfälle darauf hin, daß unzureichend gereinigte Roggenchargen mit wesentlich höheren Gehalten als 0,05% Mutterkorn gelegentlich vermarktet werden. Eine regelmäßige Kontrolle des Marktes scheint daher sinnvoll.

Dank. Dem Bundesminister für Jugend, Familie, Frauen und Gesundheit danken wir für die finanzielle Unterstützung, Frau Gisela Mathis für die Aufarbeitung der Proben und Herrn Werner Blass für die GC/MS-Absicherung.

Literatur

- Klug C, Baltes W, Krönert W, Weber R (1984) Z Lebensm Unters Forsch 179:245
- Mühle E, Breuel K (1977) Das Mutterkorn. Die Neue Brehm-Bücherei. A. Ziemsen Verlag, Wittenberg Lutherstadt
- Wegler R (1977) Chemie der Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel, Bd 4. Springer, Berlin Heidelberg New York
- Seibel W (1983) BLL Schriftreihe. Behr's Verlag, Hamburg 102:273
- Deutsche Gesellschaft für Ernährung (1983) Dtsch Lebens Rundsch 79:276
- Heinze K (1983) Leitfaden der Schädlingsbekämpfung, Bd III. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart
- Seibel W, Ludewig HG (1983) Brot Backwaren 1/2:13
- Huber H (1983) Muehle + Mischfuttertechn 16:215
- Steller W (1984) Getreide Mehl Brot 4:123
- Pfänder HJ, Seiler KU, Ziegler A (1985) Dtsch Ärztebl 27:2013
- Scott PM, Lawrence GA (1980) J Agric Food Chem 28:1258
- Scott PM, Lawrence GA (1982) J Agric Food Chem 30:445
- Verordnung (EWG) Nr. 1569/77 der Kommission vom 11. Juli 1977 über das Verfahren und die Bedingungen für die Übernahme von Getreide durch die Interventionsstellen, Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft Nr. L 174/15
- Klug C (1986) Bestimmung von Mutterkornalkaloiden in Lebensmitteln. MvP-Hefte 2/1986, Max von Pettenkofer-Institut des Bundesgesundheitsamtes, Berlin
- Baumann U, Hunziker HR, Zimmerli B (1985) Mitt Gebiete Lebensm Hyg 76:609

Eingegangen am 21. Juli 1987