

Bestimmung von Deoxynivalenol in Brot und Bier

**V. Curtui¹, C. Seidler¹, R. Dietrich², E. Märtlbauer²,
E. Schneider¹, E. Usleber¹**

1, Professur für Milchwissenschaften, Justus-Liebig-Universität,
Ludwigstr. 21, D-35390 Giessen

2, Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch,
Ludwig-Maximilians-Universität, Veterinärstr. 13, D-80539
München

Abstract

Determination of Deoxynivalenol in Bread and Beer

Analytical procedures for the determination of deoxynivalenol (DON) in bread and beer, using enzyme immunoassay (EIA) and HPLC methods, were developed. For determination of DON by EIA, aqueous raw extracts of bread or degassed beer were extracted by liquid-liquid partitioning with ethyl acetate, the organic solvent evaporated, and the residue redissolved in phosphate buffered saline (PBS) for analysis. For determination by HPLC (UV detection at 218 nm), DON in bread extracts or beer was purified on immunoaffinity chromatographic columns. In bread, detection limits for DON of 15 µg/kg (EIA) and 7 µg/kg (HPLC) were achieved, with mean recoveries of 81%. In beer, the detection limit for DON was 2 µg/l both in EIA and HPLC, with recoveries of 91-93%. Both methods showed good agreement of the results for naturally contaminated sample materials, with $r^2=0.993$ for bread and $r^2=0.823$ for beer, respectively.

Keywords: mycotoxin, deoxynivalenol, bread, beer

Einleitung

Den von Schimmelpilzen der Gattung *Fusarium* gebildeten Mykotoxinen kommt im Hinblick auf Vorkommenshäufigkeit und Kontaminationshöhe in Getreide derzeit in Mitteleuropa besondere Bedeutung zu. Nach gegenwärtigem Wissensstand spielt dabei im Lebensmittelbereich (1; 2) das Mykotoxin Deoxynivalenol (DON) eine herausragende Rolle. Durch die Festlegung von – vorläufigen – tolerierbaren Tageshöchstaufnahmen (temporary Tolerable Daily Intake, tTDI) für eine Reihe von Fusarientoxinen (DON: 1 µg/kg Körpergewicht und Tag) durch den wissenschaftlichen Ausschuss für Lebensmittel der Europäischen Union, sind kürzlich *de facto* die Grundlagen für künftige Höchstmengen dieser Toxine in Lebensmitteln gelegt worden, welche derzeit innerhalb der EU diskutiert werden. Für verzehrsfertige Lebensmittel dürften diese im Bereich von 100-500 µg/kg liegen (4). Für Bier gibt es noch keinen Vorschlag zu Höchstmengenregelungen.

Brot und Bier stellen aufgrund der durchschnittlichen Verzehrsmengen einen erheblichen Anteil am Gesamtverzehr von Getreide dar und sind somit im Hinblick auf die Aufnahme von Fusarientoxinen von besonderem Interesse. Bereits in früheren Arbeiten wurden Brot und Bier auf ihren DON-Gehalt untersucht (3, 5) und mit erheblicher Inzidenz nachgewiesen. In diesem Beitrag wird die Entwicklung einer enzymimmunochemischen Routinemethode zur Bestimmung von DON in diesen Matrices beschrieben. Zur Validierung wurden Brot- bzw. Bierproben mittels Enzymimmuntest (EIA) bzw. HPLC/UV auf DON vergleichend untersucht. Die Arbeiten erfolgten im Rahmen eines vom Bundesministerium für Verbraucherschutz und Landwirtschaft geförderten Verbundforschungsprojekts, in dem zum einen zuverlässige und praktikable Methoden für DON und Zearalenon in Lebensmitteln erarbeitet werden sollen, zum anderen die Belastung von Lebensmitteln mit diesen Toxinen repräsentativ ermittelt werden soll.

Methodik

EIA

Extraktion von Brot: Brot wurde vor der Untersuchung in Würfel (ca. 2 x 2 cm) geschnitten, das Feuchtgewicht ermittelt und dann für 24 h im Trockenschrank getrocknet. Nach Ermittlung des Trockengewichts wurden die Brotstücke in einer Getreidemühle fein vermahlen. Zur Untersuchung auf DON wurden jeweils 5 g der gemahlene Probe mit 50 ml Methanol/PBS (10:90; v/v) 30 min auf dem Magnetrührer extrahiert, zentrifugiert (15 min, 1500 x g) und über einen Papierfaltenfilter filtriert. Von diesem Filtrat wurden 2 ml mit 4 ml Ethylacetat in einem Reagenzglas ausgeschüttelt (Vortex), zentrifugiert (15 min, 1500 x g) und die obere Phase in einen Rundkolben überführt. Die untere Phase wurde erneut mit 4 ml Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer (Wasserbad 50 °C) abgedampft. Der Rückstand wurde in 1 ml PBS (pH 7,2) versetzt und für 30 s im Ultraschallbad gelöst. Dieser Extrakt wurde unverdünnt im EIA eingesetzt, weitere Verdünnungsstufen erfolgten in PBS.

Extraktion von Bier: Zur Extraktion von Bier wurde dieses zunächst im Ultraschallbad entgast. Zwei ml der entgasten Bierprobe wurden mit 4 ml Ethylacetat vermischt (Vortex), zentrifugiert (15 min, 1500 x g) und die obere Phase in einen Rundkolben überführt. Die wässrige Phase wurde erneut mit 4 ml Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und weiter wie für Brot beschrieben behandelt.

Bei dem zur DON-Bestimmung eingesetzten Enzymimmuntest handelte es sich um eine hausinterne Methode unter Verwendung monoklonaler Antikörper gegen DON und eines DON-Meerrettichperoxidase-Konjugats. Die mittlere rechnerische Nachweisgrenze für DON-Standardlösungen lag bei 3 ng/ml, der 50%-Inhibitionswert der Standardkurve bei 7 ng/ml. Unter Berücksichtigung der Probenverdünnungsfaktoren und der Wiederfindungsraten ergaben sich hieraus aufgerundete Nachweisgrenzen im Probenmaterial von 15 µg/kg (Brot) bzw. 2 µg/l (Bier).

HPLC

Extraktion von Brot: Die Vorbereitung von Brotproben erfolgte wie für den Enzymimmuntest beschrieben. Zur Extraktion wurden 20 g fein gemahlene Probe mit 100 ml Wasser (Membrapure) und 4 g PEG 8000 versetzt und 30 min auf dem Magnetrührer extrahiert, zentrifugiert (11000 x g) und anschließend über einen Papierfaltenfilter filtriert. Von diesem Filtrat wurden 5 ml nach Herstellerangaben über eine Immunaффinitätssäule (R-Biopharm, Darmstadt) aufgereinigt und das Toxin mit 1 ml Methanol eluiert. Das Lösungsmittel wurde unter Stickstoff im Wasserbad bei 40 °C vorsichtig abgedampft. Der Rückstand wurde in 200 µl mobile Phase aufgenommen.

Extraktion von Bier: Für die Probenaufbereitung wurden 5 ml einer im Ultraschallbad entgasten Bierprobe durch Zugabe von wässriger Natriumcarbonatlösung auf einen pH-Wert von 6,8-7,2 eingestellt. Die Probe wurde bei 11000 x g 15 min zentrifugiert und 5 ml über eine Immunaффinitätssäule wie für Brot beschrieben aufgereinigt.

Die Messung erfolgte an einem Dionex HPLC System unter Einhaltung folgender Parameter: Stationäre Phase: RP 18 125 x 4 (5 µm) (Merck); mobile Phase: Acetonitril/Wasser (5:95; v/v); Säulentemperatur 40 °C; Fließgeschwindigkeit 1,5 ml/min; Injektionsvolumen 50 µl; Detektion UV/DAD, Quantifizierung bei 218 nm. Die Retentionszeit für DON lag bei ~5,7 min. Unter den angegebenen Bedingungen lag die Nachweisgrenze für DON-Standardtoxin bei 1 ng absolut (injiziert), die Nachweisgrenze lag unter Berücksichtigung der Probenextraktionsfaktoren für Brotproben bei 7 µg/kg und für Bier bei 2 µg/l.

Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse der Überprüfung der eingesetzten Methoden unter Verwendung künstlich mit DON kontaminierter Probenmaterialien sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Die EIA-Methodik erbrachte hinsichtlich der Reproduzierbarkeit im Konzentrationsbereich 50-200 µg/kg (Brot) bzw. 10-20 µg/l (Bier) zufrieden-

stellende Ergebnisse, was einen quantitativen Toxinnachweis im relevanten Konzentrationsbereich ermöglichte. In der HPLC lagen die Wiederfindungsraten für Brot bei 81% und für Bierproben bei 93% mit Variationskoeffizienten von 5-6%.

| Verfahren | Probentyp | Zusatz (□g/kg) | Mittlere Wiederfindungsrate (%) | VK (%) | n |
|-----------|-----------|-------------------|------------------------------------|-----------|----|
| EIA | Brot | 50 - 200 | 81 | 14 | 13 |
| | Bier | 10 - 20 | 91 | 15 | 14 |
| HPLC | Brot | 100 - 500 | 81 | 6 | 10 |
| | Bier | 20 - 100 | 93 | 5 | 8 |

Tabelle 1: Wiederfindungsraten für DON in künstlich kontaminierten Brot- und Bierproben

Sowohl die EIA- als auch die HPLC-Methode wiesen somit hinreichende Empfindlichkeit für die Untersuchung von Brot und Bier in Bezug auf mögliche künftige Höchstmengenniveaus auf. Diese dürften für Brot bei 350 µg/kg liegen. Für Bier wird bei einer angenommenen täglichen Verzehrmenge von 0,5 l der TDI bereits bei einer DON-Konzentration von 150 µg/l erreicht, so dass künftige Höchstmengenregelungen für dieses Lebensmittel unterhalb dieses Konzentrationsniveaus liegen müssten.

Zur weiteren Methodenvalidierung wurden natürlich kontaminierte Brote (n = 17) und Biere (n = 14) parallel mittels HPLC und EIA untersucht. Es zeigte sich, dass beide Methoden vergleichbare Ergebnisse liefern. Die Korrelationskoeffizienten lagen für Brot (Konzentrationsbereich: 20-300 µg/kg) bei $r^2 = 0,993$. Für Bier (Konzentrationsbereich: 5-30 µg/l) lag die Übereinstimmung bei $r^2 = 0,823$. Systematische Abweichungen der Messergebnisse des EIA von denjenigen der HPLC wurden nicht festgestellt.

Eine direkte Untersuchung von wässrigen Rohextrakten im EIA ohne weitere Reinigung führte dagegen in natürlich kontaminierten Proben im Vergleich zur HPLC zu einer deutlichen Überschätzung des Toxingehalts (Ergebnisse nicht dargestellt). Die Ursachen hierfür konnten noch nicht geklärt werden, dürften aber zumindest teilweise in der Anwesenheit von immunoreaktiven DON-Metaboliten in diesen Probenmaterialien begründet sein. Für die Untersuchung von Brot und Bier erwies es sich daher als notwendig, die wässrigen Rohextrakte wie hier beschrieben durch Flüssig-Flüssig-Verteilungschromatographie mit Ethylacetat zu extrahieren. Zur Erhöhung der Extraktionseffizienz wurde dieser Schritt wiederholt. Gleichzeitig konnte so im EIA eine deutliche Verbesserung der Nachweisgrenzen im Probenmaterial erreicht werden. Aufgrund der Ergebnisse eignet sich der EIA für eine quantitative Routineuntersuchung auf DON mit hohem Probendurchsatz.

Danksagung

Wir danken dem Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft für die finanzielle Förderung des Projektes (BLE 00 HS 055).

Literatur

- 1 Usleber E, Märtlbauer E (1998) A limited survey of cereal foods from the German market for Fusarium toxins (deoxynivalenol, zearalenone, fumonisins). Arch. Lebensmittelhyg. 49: 42-45
- 2 Usleber E, Lepschy J, Märtlbauer E (2000) Deoxynivalenol in Mehlproben des Jahres 1999 aus dem Einzelhandel. Mycotoxin Res. 16A: 30-33
- 3 Schmidt S, Thielert G (2001) Fusarientoxine (DON und ZEA) in Mehl und Brot. Mycotoxin Res. 17A: 49-52
- 4 Rosner H. (2002) Gesetzliche Regelungen für Mykotoxine in Lebensmitteln. Mycotoxin Res. 18 A: 1-5
- 5 Taschan H, Puchtinger G, Waller U, Puchtinger T (2000) Deoxynivalenol in grain and grain products. Mycotoxin Res. 16A: 26-29

Presented at the 25th Mykotoxin Workshop in Giessen, Germany, May 19-21, 2003