

P12 - MANUELLES VS. AUTOMATISCHES SAMPLING AM BEISPIEL VON MIT OCHRATOXIN A KONTAMINIERTER GERSTE

Reiter, E.V.^{a,b}, Andersson, G.^c, Häggblom P.^c, Zentek J.^{a,b}, Razzazi-Fazeli, E.^a

^aInstitut für Tierernährung, Veterinärmedizinische Universität Wien, Wien, Austria.

^bInstitut für Tierernährung, Freie Universität Berlin, Berlin, Deutschland

^cNational Veterinary Institute, Uppsala, Schweden

Schlüsselwörter

Ochratoxin A, Getreide, Probenahme, Probenvorbereitung

Einleitung

Ochratoxin A (OTA) wird von Pilzen der Gattung *Penicillium verrucosum* und *Aspergillus ochraceus* gebildet und ist hauptsächlich in Getreide und Getreideprodukten sowie Kaffee, Bier, Wein und Traubensaft zu finden. Die überwiegend am Balkan auftretenden Nephropathien werden mit der toxischen Wirkung von OTA in Verbindung gebracht. Des Weiteren hat OTA mutagene, kanzerogene, teratogene sowie immunsuppressive Wirkungen. Im Zusammenhang mit dem Nachweis von Mykotoxinen in Lebensmittel wird auch immer wieder die Eignung der angewandten Probenahmeverfahren aufgrund der heterogenen Verteilung diskutiert. Die Probenahmeverfahren für Mykotoxine in Lebensmitteln (die Beprobung von Großpartien sowie die Beprobung im Einzelhandel) sind im Rahmen der EU-Verordnung 401/2006 geregelt [2]. Im Allgemeinen werden Lebensmittel in Großpartien manuell beprobt. Im Rahmen eines EU-Projektes (www.biotracer.org) wurden manuelle und automatische Probenahme verglichen.

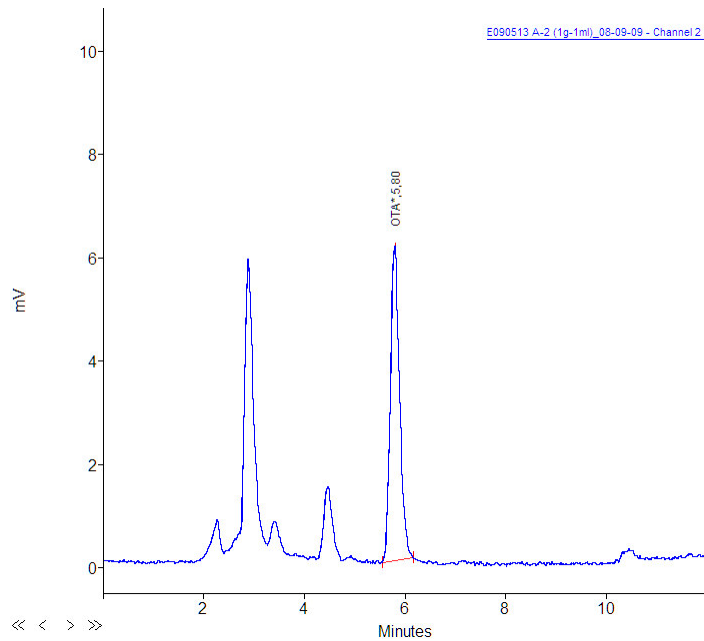
Bei Mykotoxinen wird zwischen Feld und Lagerpilzen unterschieden, während Feldpilze, das wachsende Getreide am Feld befallen können, kommen Lagerpilze vor allem in unsachgemäß gelagerten Lebens- und Futtermitteln vor. Diese Lagerpilze treten in so genannten „hot-spots“ auf. Während der Großteil der Charge kaum bis gar

nicht mit Mykotoxinen kontaminiert ist, findet man an einigen wenigen Stellen große Mengen des entsprechenden Mykotoxins. Gerade dies erschwert die Entnahme einer repräsentativen Probe sowie Probenvorbereitung. Die Probenahme von mykotoxin-kontaminiertem Lebensmitteln ist von Seiten der EU geregelt [3,4]. Normalerweise erfolgt die Probennahme manuell. Jedoch zeichnet sich eine automatische Probenahme durch die Möglichkeit aus, dass eine größere Anzahl an Einzelproben und somit eine repräsentativere Sammelprobe gezogen werden kann.

Material & Methoden

Um sicherzustellen, dass die zu untersuchende Gerste auch tatsächlich OTA enthält wurde sie mit *Penicillium verrucosum* inokuliert und über mehrere Wochen die Bildung des OTA kontrolliert. Nach erfolgreicher Inokulation erfolgte die manuelle Probenahme mit Probennahmelanzen. Die automatische Probenahme hingegen erfolgte mit einem kommerziell erhältlichen Sampler (Tagumatic), der während der Umladung der Charge eingesetzt wird und somit Einzelproben in definierten Abständen entnimmt. Es wurden jeweils 8 Sammelproben (in duplikate) zu je 4.5 kg gezogen. Die Sammelproben wurden daraufhin mit einer RAS[®] (Romer Analytical Sampling) Mühle zu jeweils 4 Laborproben (à 500g) gesplittet, wobei von jeder Sammelprobe nur 2 Laborproben analysiert wurden. Die Laborproben wurden anschließend mittels „fractional shovelling“ reduziert um den Fehler der Probenvorbereitung möglichst gering zu halten. Die Analyse der Proben erfolgte in Doppelbestimmung. Die rund 25g wurden mit je 4 ml Extraktionslösung (ACN/H₂O, 60/40, v/v) pro g Probe extrahiert. Danach wurde ein Aliquot (4 ml) entnommen und mit PBST verdünnt und auf die Immunaффinitätssäulchen (OtaCLEAN[™], LC Tech) aufgebracht. Nach einem Waschschriff mit H₂O erfolgte die Elution mit MeOH. Nach Entfernen des Elutionsmittels wurde der Rückstand in mobiler Phase wieder aufgenommen und mittels HPLC-FLD bestimmt. Die Auswertung der Signale und deren Quantifizierung erfolgte mittels Stratos[®] Version 4.5.

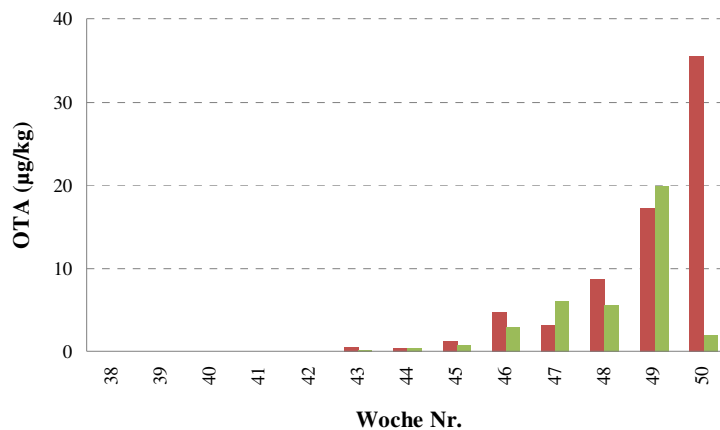
Abbildung 1: Chromatogramm einer mit OTA kontaminierten Gerste (conc. 3.8 µg/kg)



Ergebnisse und Diskussion

Nach Inokulation mit *P. verrucosum* konnte nach ca. 5 Wochen Ochratoxin A Bildung festgestellt werden und nach 12 Wochen konnten OTA-Konzentrationen weit über dem EU-Grenzwert festgestellt werden (Abbildung 2) [2].

Abbildung 2: Bildung von OTA in Gerste nach Inokulation mit *Penicillium verrucosum*



Während bei der manuellen Probenahme eine starke Variation der Einzelproben festgestellt werden konnte (1.86 bis 90.23 µg/kg), variierten die OTA-Konzentrationen bei der automatischen Probenahme nur von 11,12 – 24,84 µg/kg. Eine Übersicht über die gemessenen OTA Konzentrationen ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: OTA Konzentrationen der gezogenen Proben bei manueller und automatischer Probenahme (µg/kg)

<i>Manuelles Sampling</i>											
	<i>A1A</i>	<i>A1B</i>	<i>A2A</i>	<i>A2B</i>	<i>B1A</i>	<i>B1B</i>	<i>B2A</i>	<i>B2B</i>	<i>xM sample</i>	<i>SD</i>	
M1	35,50	31,95	41,75	28,90	30,72	30,41	37,79	39,09	34,51		
M2	2,02	2,21	3,82	3,56	1,86	2,13	2,79	2,84	2,65		
M3	11,77	7,69	12,31	11,62	8,87	9,72	13,58	15,66	11,40		
M4	14,64	19,02	16,81	16,93	18,91	15,40	15,68	15,87	16,66		
M5	35,06	35,51	27,31	23,68	18,29	19,03	22,39	18,32	24,95		
M6	90,23	78,50	86,56	67,05	77,51	79,87	73,83	62,15	76,96		
M7	9,89	10,24	17,40	19,44	13,93	12,45	22,59	14,23	15,02		
M8	23,55	28,55	17,98	15,08	20,89	18,21	19,17	20,13	20,45		
Charge									25,33	22,88	
<i>Automatisches Sampling</i>											
	<i>A1A</i>	<i>A1B</i>	<i>A2A</i>	<i>A2B</i>						<i>xM sample</i>	<i>SD</i>
A1	21,57	17,53	12,36	18,34						17,45	
A2	14,74	23,89	15,85	24,84						19,83	
A3	14,07	15,70	18,66	14,39						15,70	
A4	20,08	18,10	12,37	14,64						16,30	
A5	11,12	12,79	14,13	17,67						13,93	
A6	21,87	21,26	13,51	18,30						18,74	
A7	17,70	20,14	22,46	21,58						20,47	
A8	18,15	18,25	18,17	18,44						18,25	
Charge									17,58	2,20	

Hiermit konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass durch die Verwendung automatischer Probenahme, die Unsicherheit der Probennahme deutlich reduziert werden kann. Allerdings mußte hier auch festgestellt werden, dass

Probenvorbereitungsmethoden einen großen Beitrag zur Messunsicherheit leisten können. Die oft durchgeführte Entnahme der Analytischen Probe mit dem Löffel erhöht den Probenahmefehler. Daher ist auch hier die Verwendung von validierten Methoden zu empfehlen, zumal von Seiten der EU bei der Angabe der Analyseergebnisse auch die Angabe der Messunsicherheit sowie der Recovery gefordert wird [1,2].

Literatur

- [1] European Commission, COMMISSION DIRECTIVE 2005/5/EC of 26 January 2005 amending Directive 2002/26/EC as regards sampling methods and methods of analysis for the official control of the levels of ochratoxin A in certain foodstuffs, Official Journal of the European Union L27 (2005) 38-40.
- [2] European Commission, COMMISSION REGULATION (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs, Official Journal of the European Union L70 (2006) 12-34.
- [3] M. Miraglia, B. De Santis, V. Minardi, F. Debegnach, C. Brera, The role of sampling in mycotoxin contamination: An holistic view, Food Additives and Contaminants 22 (2005) 31-36.
- [4] T.B. Whitaker, Sampling foods for mycotoxins, Food Additives and Contaminants 23 (2006) 50-61.