

Lebensmittelchemie 1999

Aus den vielfältigen Themenkomplexen der Kontaminanten und Rückstände konzentriert sich der Überblick auf Mykotoxine und Pflanzenschutzmittel. Mykotoxine als klassische Lebensmittelkontaminanten wurden in den vergangenen Jahren in einer wachsenden Anzahl verschiedenster Lebensmittel nachgewiesen. Rückstände von Pflanzenschutzmitteln bleiben ein konstant aktuelles Thema; deren Analytik bleibt insbesondere durch die Einführung neuer Methoden spannend.

Kontaminanten und Rückstände

Mykotoxine

Mykotoxine sind natürliche sekundäre Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen, die aufgrund ihrer toxischen Wirkungen zu den klassischen Lebensmittelkontaminanten zählen. Zu den gegenwärtig etwa 400 bekannten Verbindungen gehören als Hauptvertreter die Aflatoxine, Ochratoxin A, die Trichothecene (z. B. Desoxygenivalenol), die Fumonisine, Zearalenon sowie Patulin und Citrinin (Abbildung 1). Aufgrund seiner nephrotoxischen und karzinogenen Wirkung ist derzeit in Europa Ochratoxin A (OTA) von besonderem Interesse. Eine Studie zur Belastung des Verbrauchers und der Lebensmittel mit OTA wurde im letzten Jahr veröffentlicht,¹⁾ und basierend auf diesen Daten ist in der EU mit der Festlegung von OTA-Höchstmengen zu rechnen.²⁾ Daneben spielen Fusarientoxine wie die Trichothecene und Zearalenon, die aufgrund von Witterungseinflüssen immer wieder zu einer starken Belastung im Getreide beitragen, eine wichtige Rolle.³⁾

Besondere Aufmerksamkeit findet weiterhin die Analytik von Mykotoxinen. Dabei verstärkt sich der Trend zur Anwendung von HPLC-MS-Kopplungen zur Identifizierung und Quantifizierung in Lebensmitteln und anderen Proben. So wurden verschiedene HPLC-MS-Methoden für die Bestimmung von Fumonisin,⁴⁾ OTA⁵⁾ sowie Zearalenon⁶⁾ beschrieben, wobei sowohl die Elektrospray-Ionisierung als auch die chemische Ionisation bei Atmosphärendruck zum Einsatz kamen. Für eine exakte Quantifizierung von Mykotoxinen werden bei der HPLC-MS und auch bei GC-MS-Methoden verstärkt die Isotopenverdünnungsanalyse mit isotoopenmarkierten Standards angewandt.^{4,7)}

Ein weiterer Trend auf dem Gebiet der Mykotoxinanalytik ist der Einsatz von Immunoaffinitätssäulen, die anstelle der klassischen Clean-up-Methoden Verwendung finden. Immunoaffinitätssäulen nutzen die analytenspezifische Wechselwirkung zwischen den auf dem Säulenmaterial immobilisierten Antikörpern und dem Analyten. Die Aufarbeitung mit Immunoaffinitätssäulen zeichnet sich aufgrund der spezifischen Antikörper durch eine hohe Selektivität aus, die insbesondere bei komplexen Matrices zu sehr sauberen Extrakten führt. Immunoaffinitätssäulen wurden bereits vielfach für die Analytik von verschiedenen Mykotoxinen eingesetzt.⁸⁾ Um die Qualitätssicherung in der Mykotoxinanalytik zu gewährleisten, führen Labore in verstärktem Maße auch Vergleichstests und Ringversuche durch.³⁾

Ein weiterer wichtiger Aspekt auf dem Gebiet der Mykotoxinforschung sind Untersuchungen zur Toxikologie und zum Wirkungsmechanismus. Neue Forschungsergebnisse belegen, daß Fumonisin FB₁ – in Abhängigkeit von Art und Geschlecht der Versuchstiere – eindeutig ein kanzerogenes Potential aufweist.⁹⁾ Fumonisine gelten als Inhibitoren der Ceramidsynthese,¹⁰⁾ und obwohl kürzlich erstmals der Nachweis einer Metabolisierung von hydrolysiertem Fumonisin HFB₁ durch die Ceramidsynthese gelang, ist der genaue Wirkungsmechanismus unbekannt.¹¹⁾

Die Genotoxizität von Ochratoxin A wird weiterhin kontrovers diskutiert. Ein genotoxisches Potential von OTA ist bisher in verschiedenen In-vitro-Testsystemen sowie durch die Bildung von DNA-Addukten nachgewiesen worden.¹²⁾ Kürzlich wurde zum ersten Mal auch die mutagene Wirkung in bakteriellen Testsystemen nach Aktivierung mit Nieren-Mikrosomen gezeigt.¹³⁾ Im Gegensatz dazu gibt es auch Studien, die – basierend auf Untersuchungen mit Cytochrom P450 und Glutathion-S-Transferase – zu dem Ergebnis kommen, daß die DNA-Adduktbildung von OTA-Metaboliten eher unwahrscheinlich erscheint.¹⁴⁾ Weiterhin von Interesse sind die pathophysiologischen Aspekte der Nephrotoxizität von Ochratoxin A.¹⁵⁾

Zum molekularen Mechanismus der Toxizität von Patulin wurden erstmals Reaktionsprodukte von Patulin mit einem monofunktionellen Modell-Thiol beschrieben, die auf die exakten Reaktionswege in der Zelle schließen lassen.¹⁶⁾ Ein weiteres aktuelles Thema ist die östrogene Wirksamkeit von Mykotoxinen, wobei hier insbesondere die Zearalenone zu nennen sind.¹⁷⁾

Pflanzenschutzmittel

Die bewährten Multimethoden wie die Methoden S8 oder S19¹⁸⁾ der Deutschen Forschungsgemeinschaft, die einen Großteil an Wirkstoffen einschließlich einer Vielzahl von Metaboliten oder Abbauprodukten erfassen, bestimmen den Routinebetrieb in rückstandsanalytischen Laboratorien.¹⁹⁾ Zahlreiche Wirkstoffe oder Wirkstoffgruppen (beispielsweise Dithiocarbamate, Phenylharnstoffherbizide oder die Carbendazimgruppe (Abbildung 2) erfordern allerdings „exotische“ Methoden wie Aufschluß- oder spezielle Derivatisierungsverfahren sowie eine spezielle Ausstattung, so daß aufwendige Sonderreaktionen notwendig sind, die nicht zum Standarduntersuchungsprogramm gehören. Zusätzlich muß man neu zugelassenen Wirkstoffen ständig Aufmerksamkeit widmen.²⁰⁾

Vereinfachung, Automatisierung, Kostenreduktion und Schnelligkeit sind daher die Triebfedern in der Methodenentwicklung auf dem Gebiet der Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln.

Zu den diesbezüglichen Erfolgen gehört im Einzelfall die Vereinfachung und erhebliche Reduktion des manuellen Aufwandes bei der Bestimmung von Vinclozolin-Rückständen (einschließlich der geforderten Metaboliten) unter Einsatz einer Bleidner-Apparatur zur simultanen Wasserdampfdestillation / Extraktion (steam distillation extraction, SDE).²¹⁾ In erweiterter Nutzung bietet dieses Verfahren ein elegantes System zum schnellen Screenen von Wirkstoffen, die bei alkalischer Hydrolyse Anilinderivate freisetzen.²²⁾

Zur Bestimmung von Dithiocarbamat- und Thiuramdisulfid-Rückständen ist die wiederbelebte Xanthoge-natmethode²³⁾ inzwischen in eine Normmethode²⁴⁾ eingeflossen, die Rückstände, ausgedrückt als Summenparameter $\text{mg}\cdot\text{CS}_2\cdot\text{kg}^{-1}$, empfindlich bestimmt. Eine differenzierte rückstandsanalytische Bestimmung der toxikologisch unterschiedlich

bewerteten Dithiocarbamate aus Oberflächenextrakten gelingt mittels Ionenpaarchromatographie und elektrochemischer Detektion.²⁵⁾

Automatisierbare Extraktion

Methoden der Gaschromatographie gekoppelt mit massenspektrometrischer Detektion erfahren grundsätzlich der Robustheit und des qualitativen Informationsgehaltes sowie auch der Vertrautheit wegen große Akzeptanz. Sie liefern am Ende des Analysenganges in hohem Automatisierungsgrad das Analysenergebnis. Die personal- und zeitintensiven Arbeitsschritte vor der GC-Bestimmung, wie die Probenextraktion bei gleichzeitiger Reduktion von Reinigungsprozeduren, bedeuten dagegen reizvolle Herausforderungen an den Rückstandsanalytiker.

Die Extraktion mit überkritischem CO_2 (supercritical fluid extraction, SFE)²⁶⁾ verspricht eine selektive Extraktion und matrixarme Extrakte (Abbildung 3), die im allgemeinen ohne weitere Aufarbeitung zur Gaschromatographie eingesetzt werden können.²⁷⁻³⁰⁾ Besonders eindrucksvoll sind die Einsparungen bei Chemikalien und Arbeitszeit (Tabelle). Gerade für „Problemwirkstoffe“ wie 2,4-D oder Garbendazim,²⁸⁾ die bislang aufwendige Analysenverfahren erforderten, hat die SFE zu Fortschritten geführt. An ihre Grenzen stößt die SFE allerdings bei stark polaren Analyten, die hohe Anteile an Modifiern (Methanol, Aceton) verlangen; damit ist die SFE eher eine temperatur- und druckgesteuerte Lösungsmittel-extraktion. Und das ist das Konzept der noch relativ jungen beschleunigten Lösungsmittel-extraktion (accelerated solvent extraction, ASE),³¹⁾ in der Literatur auch als PLE (pressurized liquid extraction) bezeichnet.

Gegenüber der SFE liegt der Vorteil der ASE in der freien Lösungsmittelwahl, der möglichen sequentiellen Extraktion unter Druck- und Temperaturkontrolle sowie – gegenüber klassischen Extraktionsverfahren – im geringen Lösungsmittelverbrauch. Auch sind inzwischen Geräte auf dem Markt, die die Bereiche zwischen SFE und ASE lückenlos abdecken. Wie keine andere Neuerung zuvor hat die ASE in kurzer Zeit Einlaß in diverse amerikanische EPA (Environmental Protection Agency)-Methoden der Bestimmung von Pestiziden in Böden oder Sedimenten gefunden.³²⁾ Die Anwendung auf pflanzliche Proben steht noch am Anfang, jedoch besteht auch hier begründete Hoffnung auf eine routinetaugliche, schnelle und automatische Probenextraktion.^{33,34)} Für fett- und wasserarme Proben (Getreide, Tee, Gewürze) wurde die ASE bereits als Extraktionsvariante in eine modulare Multimethode aufgenommen, welche jüngst als neu aufgelegte § 35-Methode veröffentlicht wurde.³⁵⁾

Dem Bestreben, auf organische Lösungsmittel weitgehend zu verzichten und gleichzeitig einen hohen

Automatisierungsgrad zu erreichen, kommt das Konzept der Festphasenmikroextraktion (solid phase micro extraction, SPME) entgegen. Die Analyten sorbieren an eine Mikrofaser (in diversen Oberflächenmodifikationen erhältlich) und desorbieren aus dieser thermisch nach Einführung in den GC-Injektor. Für diese Extraktionstechnik, die im Bereich der Wasseranalytik in den vergangenen Jahren zu diversen Applikationen geführt hat,³⁶⁾ wurden jüngst auch Anwendungen in der Analytik von Pestizidrückständen in pflanzlichen Proben³⁷⁾ oder in Wein³⁸⁾ vorgestellt. Die noch ausstehende automatische Kopplung der SPME mit der HPLC³⁹⁾ vermag eventuell weitere fruchtbare Entwicklungen anzustoßen.

Immunochemische Analytik

Der Einsatz selektiver Antikörper erlaubt eine apparativ einfache, schnelle und empfindliche Bestimmung von Pestizidrückständen.^{40,41)} Die Verwendung spezifischer Antikörperfragmente zeigt Fortschritte bezüglich Empfindlichkeit und Stabilität gegenüber organischen Lösungsmitteln.⁴²⁾ Den vielfach kritisierten Nachteil der Einzelstoffanalytik von ELISAs (enzyme linked immunosorbent assay) macht der Trend wett, „Multimethoden“ im Sinne der Substanzklassenerkennung zu präsentieren (etwa für Organophosphate⁴³⁾), die als Screeningverfahren attraktiv sind. In die Richtung „Multianalytfähigkeit“ geht ebenso die Entwicklung von Immunosensorarrays.⁴⁴⁾

Besonders nützlich haben sich Immunoassays zum Nachweis gebundener (nicht-extrahierbarer) Rückstände in Fruchtschalen (Abbildung 4) erwiesen.^{45,46)}

Die Förderung des noch sehr lückenhaften Verständnisses um die Antigen (Hapten)/Antikörper-Reaktion⁴⁷⁾ wird zweifelsohne Immunoassays in ihrer Selektivität und Sensitivität in allen Bereichen der Rückstandsanalytik künftig weiteren Vorschub leisten.

LC/MS

Flüssigchromatographische• Trenn-verfahren (HPLC) gehören in der Trinkwasseranalytik seit Jahren zum Standard, werden allerdings im Bereich der Rückstandsanalytik von Pestiziden in Lebensmitteln eher selten eingesetzt. Dies wird sich wohl ändern, nachdem LC-gekoppelte MS-Detektoren inzwischen robuste und empfindliche Geräte und nun auch zu einem erschwinglichen Preis zu haben sind. Die Anwendungen konzentrieren sich derzeit noch auf die Wasseranalytik (der einfacheren Matrix wegen).^{48,49)} Doch zeigen sich insbesondere bei thermolabilen Wirkstoffen (z. B. insektizide Carbamate, Organozinn-Pestizide) die Vorteile der LC/MS-Technik auch in der Rückstandsanalytik pflanzlicher Proben.^{50,51)}

Die Hinwendung zur LC/MS und damit der apparative Ausbau rückstandsanalytischer Laboratorien gewinnt außerdem insofern Bedeutung, als die chemische Industrie im Rahmen von Zulassungsverfahren neuer Pflanzenschutzmittel verstärkt LC/MS-Methoden propagiert.

*Hans-Ulrich Humpf, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Universität Würzburg,
E-Mail: humpf@pvlc.uni-wuerzburg.de,
Wolfgang Schwack, Institut für Lebensmittelchemie, Universität Hohenheim, Stuttgart,
E-Mail: wschwack@uni-hohenheim.de*

- 1) J. Wolff et al., Proceedings zum 21. Mykotoxin-Workshop Jena, 1999, 139.
- 2) R. Weber, Proceedings zum 21. Mykotoxin-Workshop Jena, 1999, 129.
- 3) R. Krska, Nachr. Chem. Tech. Lab. 1999, 47, 553.
- 4) M. Hartl, H.-U. Humpf, J. Agric. Food Chem. 1999, im Druck; M. Hartl et al., Eur. Food Res. Technol. 1999, 209, 348.
- 5) M. Becker et al., J. Chrom. 1998, 818, 260.
- 6) E. Rosenberg et al., J. Chrom. 1998, 819, 277; P. Zollner, J. Jodlbauer, W. Lindner, ibid. 1999, 858, 167.
- 7) M. Rychlik, P. Schieberle, J. Agric. Food Chem. 1999, 47, 3749.
- 8) Chromatography of Mycotoxins (Hrsg.: P. M. Scott), J. Chrom. 815, Elsevier, Amsterdam, 1998.
- 9) NTP-Studie (TR 496), NIH Publication No. 99-3955, 1999.
- 10) A. H. Merrill, D. C. Liotta, R. T. Riley, Trends Cell Biol. 1996, 6, 218.
- 11) H.-U. Humpf et al., J. Biol. Chem. 1998, 273, 19060.
- 12) G. Dirheimer, Rev. Med. Vet. 1998, 149, 605.
- 13) S. Obrecht-Pflumio et al., Mut. Res. 1999, 446, 95.
- 14) H. Zepnick et al., Proceedings zum 21. Mykotoxin-Workshop Jena 1999, 129.
- 15) G. Schwerdt et al., Toxicology 1999, 135, 1.
- 16) R. Fliege, M. Metzler, Rev. Med. Vet. 1998, 149, 562.
- 17) W. T. Shier, Rev. Med. Vet. 1998, 149, 599.
- 18) Deutsche Forschungsgemeinschaft, Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln, Mitteilung VI der Senatskommission für Pflanzenschutz-, Pflanzenbehandlungs- und Vorratsschutzmittel, Methodensammlung der Arbeitsgruppe Analytik, 11. Lieferung, VCH, Weinheim, 1991.
- 19) W. G. Fong et al., Pesticide Residues in Foods: Methods, Techniques and Regulations, John Wiley & Sons, New York, 1999.
- 20) R. Hänel et al., Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. 1998, 50, 5.
- 21) C. Hemmerling et al., Dtsch. Lebensm. Rundsch. 1998, 94, 221.
- 22) C. Hemmerling, Lebensmittelchemie 1999, 53, 102.
- 23) S. Nyanzi, W. Schwack, J. AOAC Internat. 1995, 78, 458.
- 24) DIN EN 12396-3, Beuth, Berlin, 1998.
- 25) H. van Lishaut, W. Schwack, J. AOAC Internat., im Druck.
- 26) D. R. Gere et al. in: Instrumental Methods in Food Analysis (Hrsg.: J. R. J. Paré, J. M. R. Bélanger), Elsevier, 1997, 421.
- 27) S. J. Lehotay, J. Chromatogr. A 1997, 785, 289.
- 28) M. Anastassiades, W. Schwack, J. Chromatogr. A 1998, 825, 45.
- 29) K. Yoshii et al., J. AOAC Internat. 1999, 82, 1239.

- 30) N. Motohashi, J. Biochem. Biophys. Meths., *im Druck*.
- 31) F. Höfler et al., Labor Praxis 1995, 19, 62.
- 32) J. Gan et al., Environ. Sci. Technol. 1999, 33, 3249.
- 33) F. Schröter et al., CLB Chem. Labor Biotech. 1999, 50, 4.
- 34) M. Okihashi et al., Analyst 1998, 123, 711.
- 35) Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG, Methode L 00.00-34, 37, (Hrsg.: Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin), Beuth, Berlin, Wien, Zürich, 1999.
- 36) Applications of Solid Phase Microextraction (Hrsg.: J. Pawliszyn), Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1999.
- 37) S. J. Crook, in 36), 188.
- 38) K. Friedrichs, GIT Spezial, Separation 1999, 19, 69.
- 39) D. A. Volmer, J. P. M. Hui, Arch. Environ. Contam. Toxicol. 1998, 35, 1.
- 40) Immunoanalysis of Agrochemicals (Hrsg.: J. O. Nelson), ACS Symp. Ser. 586, 1995.
- 41) www.immuochem.org
- 42) S. Grant et al., J. Agric. Food Chem. 1999, 47, 340.
- 43) C. M. Ward et al., J. Immunochem. Meths. 1999, 224, 197.
- 44) A. J. Schütz et al., Fres. J. Anal. Chem. 1999, 363, 731.
- 45) J. Wettach, W. Schwack, Lebensmittelchemie 1999, 53, 122.
- 46) C. Jahn, H. Zorn, A. Petersen, W. Schwack, Pestic. Sci. 1999, 55, 1167.
- 47) M. H. Goodrow, B. D. Hammock, Anal. Chim. Acta, 1998, 376, 83.
- 48) M. Rodriguez, D. B. Orescan, Anal. Chem. 1998, 70, 2710.
- 49) J. Hu et al., Water Res. 1999, 33, 417.
- 50) R. K. Juhler, J. AOAC Internat. 1999, 82, 331.
- 51) M. Anastassiades, W. Schwack, Lebensmittelchemie, 1999, 53, 113.
- 52) M. Anastassiades, Diss. Univ. Hohenheim, 2000 (in Vorbereitung).
- 53) C. Jahn, Diss. Univ. Hohenheim, 2000.

Abb. 1. **Strukturformeln verschiedener Mykotoxine.**

Abb. 2. **Beispiele von Wirkstoffklassen, die (mit Rücksicht auf die Höchstmengenverordnung) mit den Multimethoden¹⁸⁾ nicht bestimmt werden können.**

Abb. 3. **Chromatogramme (GC/MSD) eines SFE-Extraktes (ohne weitere Aufreinigung) und eines DFG S8-Extraktes aus Birnen.⁵²⁾**

Abb. 4. **Visualisierung nicht-extrahierbarer, in Tomatencuticula gebundener Chlorthalonil-Rückstände mittels Chlorthalonil-spezifischer Antikörper im Dot-Blot-Verfahren (nach tropfenförmiger Applikation und UV-Bestrahlung).⁵³⁾**

Tabelle 1. **Gegenüberstellung der DFG-S8 (modifiziert) und der SFE-Methode.⁵²⁾**