universität wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Analyse von Citrinin in Cerealien mittels HPLC-CEAD
nach Probenaufarbeitung mit ASE

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Verfasserin:	Magdalena Wiplinger
Matrikel-Nummer:	0004513
Studienrichtung (lt. Studienblatt):	Chemie
Betreuer:	Univ. Prof. Dr. Gerhard Sontag

Wien, im August 2008

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Juli 2007 bis August 2008 am Institut für Analytische Chemie und Lebensmittelchemie der Universität Wien.

Bedanken möchte ich mich bei

Univ. Prof. Dr. Gerhard Sontag für die fachkundige und hilfsbereite Betreuung meiner Arbeit,

Mag. Heidi Schwartz für ihre Einführung am HPLC-System und ihre guten Ratschläge,

der gesamten Arbeitsgruppe für das angenehme Arbeitsklima und die Mittags- und Kaffeepausen, die stets für frischen Mut sorgten,

meinen Eltern, Waltraud und Andreas Wiplinger, für die Unterstützung meines Studiums und ihren Glauben an mich,

Michael Fuchs, der mir in allen Lagen zur Seite steht und mir den Rücken stärkt,

Marlene Martin, Martina Humer und Alexandra Lefort, drei ganz besonderen Freundinnen, die es stets schafften, mich zum Lachen zu bringen,

und zu guter Letzt bei all meinen Freunden, die immer für neuen Mut und Motivation sorgten.

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT 5

2 CITRININ 7

2.1 Eigenschaften 7

2.2 Vorkommen 8

2.3 Toxizität 10

2.3.1 Toxikokinetik 10
2.3.2 Zytotoxizität 11
2.3.3 Mykotoxikosen und Nierentoxizität 13
2.3.4 Teratogenität und Reproduktionstoxizität 15
2.3.5 Genotoxizität 16

2.4 Stabilität 17

2.5 Nachweismethoden für CIT 19

3 THEORETISCHE GRUNDLAGEN 20

3.1 Voltammetrie 20

3.1.1 Grundlagen 20
3.1.1.1 Diffusionsgrenzstrom 21
3.1.1.2 Kapazitätsstrom 23
3.1.1.3 Strom-Spannungskurven 24
3.1.2 Messanordnung 25
3.1.3 Differential-Puls-Voltammetrie 27

3.2 Accelerated Solvent Extraction (ASE) 29

3.2.1 Grundlagen 29
3.2.2 Probenvorbereitung 29
3.2.3 Extraktionsparameter 30
3.2.3.1 Lösungsmittel 30
3.2.3.2 Temperatur 30
3.2.3.3 Druck 31
3.2.3.4 Zyklen 31
3.2.3.5 Dauer 31
3.2.4 Aufbau einer ASE-Apparatur 32

3.3 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) 33

3.3.1 Grundlagen 33
3.3.2 “Reversed Phase”-Chromatographie 37
3.3.3 Aufbau einer HPLC-Apparatur 38

3.4 Coulometrischer Elektroden-Array-Detektor (CEAD) 39

3.4.1 Grundlagen 39
3.4.2 Elektroden 39
3.4.3 Strom-Spannungskurven 41

3.4.4 Quantitative Information ... 42

4 MATERIAL UND METHODEN ... 43

4.1 Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien ... 43

4.2 Verwendetes Probenmaterial ... 44

4.3 Herstellen der Lösungen ... 44

4.3.1 Lösungen für die Voltammetrie ... 44
4.3.2 Lösungen für die ASE und Extraktaufarbeitung ... 45
4.3.3 Lösungen für die HPLC ... 46
4.3.3.1 Methode 1: Isokratische Elution ... 46
4.3.3.2 Methode 2: Gradientenelution ... 47

4.4 Verwendete Geräte ... 48

4.4.1 Allgemeine Laborausrüstung ... 48
4.4.2 Voltammetrie ... 48
4.4.3 ASE ... 48
4.4.4 HPLC-CEAD ... 48

4.5 Voltammetrische Voruntersuchungen ... 49

4.5.1 Aufnahme der Grundstromkurve und Konditionieren der Elektrode ... 49
4.5.2 Untersuchung des Redox-Verhaltens von CIT ... 51
4.5.2.1 Reduktion von CIT ... 51
4.5.2.2 Oxidation von CIT ... 51
4.5.3 Untersuchung der pH-Abhängigkeit des Signals ... 52
4.5.4 Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit des Signals ... 52

4.6 Entwicklung einer Extraktionsmethode mittels ASE ... 53

4.6.1 Ermittlung des idealen Extraktionsmittels sowie der optimalen Extraktionstemperatur ... 53
4.6.1.1 Probenvorbereitung ... 53
4.6.1.2 Untersuchung der Extraktionseffizienz verschiedener Lösungsmittel bei unterschiedlichen Extraktionstemperaturen ... 54
4.6.1.3 Aufarbeitung der Extrakte ... 54
4.6.2 Auswirkungen von Aluminiumoxid auf die Extraktion ... 55
4.6.3 Optimierung der Zyklenzahl ... 55
4.6.4 Adaption der Probenmenge und des Probenvolumens ... 56
4.6.5 Ermittlung der Wiederfindung ... 56

4.7 Entwicklung einer HPLC-CEAD-Methode zur Trennung und Detektion von Citrinin ... 57

4.7.1 Methode 1 : Isokratische Elution ... 57
4.7.1.1 Ermittlung eines geeigneten Elutionsmittels ... 57
4.7.1.2 Aufnahme einer Strom-Spannungskurve von Citrinin ... 58
4.7.1.3 Suche nach einem internen Standard ... 58
4.7.1.4 Eichgerade, Nachweisgrenze ... 59
4.7.1.5 Bestimmung der Reproduzierbarkeit ... 59
4.7.1.6 Analyse von Bio-Roggen-Proben ... 60
4.7.2 Analysenprobleme und deren Behebung ... 61
4.7.2.1 Regenerieren der Chromatographie-Säule ... 61
4.7.2.2 Ändern der mobilen Phase 1 ... 62

4.7.2.3 Einbau eines Säulenofens ... 62
4.7.2.4 Ändern der mobilen Phase 2 ... 62
4.7.2.5 Analysen mit Methode 1 (isokratische Elution) nach Erneuerung der HPLC-Säule ... 63
4.7.2.6 Entwicklung einer Gradientenelutionsmethode ... 63
4.7.2.7 Suche nach einem internen Standard ... 64
4.7.2.8 Optimierung des Gradientenprogramms ... 65
4.7.2.9 Analyse verschiedener Probenmatrices ... 65
4.7.2.10 Waschen der Säule und anschließende Änderung des Gradienten ... 65
4.7.3 Methode 2: Gradientenelution ... 67
4.7.3.1 Gradientenprogramm ... 67
4.7.3.2 Kalibriergerade und Nachweisgrenze ... 68
4.7.3.3 Ermittlung der Reproduzierbarkeit ... 68
4.7.3.4 Probenanalyse ... 68

5 ERGEBNISSE ... 69

5.1 Elektrochemisches Verhalten von Citrinin ... 69

5.1.1 Reduktion von Citrinin ... 69
5.1.2 Oxidation von Citrinin ... 70
5.1.3 pH-Abhängigkeit der Oxidation von Citrinin ... 71
5.1.4 Konzentrationsabhängigkeit der Oxidation von Citrinin ... 72

5.2 Entwicklung einer ASE-Extraktionsmethode ... 73

5.2.1 Optimierung des Lösungsmittels und der Extraktionstemperatur ... 73
5.2.1.1 Extraktion mit Methanol ... 73
5.2.1.2 Extraktion mit Ethanol ... 75
5.2.1.3 Extraktion mit Essigsäureethylester ... 75
5.2.1.4 Abhängigkeit der Wiederfindung von Lösungsmittel und Temperatur ... 76
5.2.2 Auswirkungen von Aluminiumoxid in der ASE-Zelle ... 77
5.2.3 Optimierung der Zyklenzahl ... 78
5.2.4 Optimierung der Probenmenge und des Probenvolumens ... 79
5.2.5 Zusammenfassung der optimierten Parameter für die Extraktion von Citrinin mittels ASE ... 80

5.3 Entwicklung einer HPLC-Trennmethode gekoppelt mit coulometrischer Elektroden-Array-Detektion ... 81

5.3.1 Methode 1: Isokratische Elution ... 81
5.3.1.1 Auswahl eines geeigneten Elutionsmittels ... 81
5.3.1.2 Strom-Spannungskurve von Citrinin im Fließsystem ... 83
5.3.1.3 Interner Standard ... 84
5.3.1.4 Eichgerade und Nachweisgrenze ... 85
5.3.1.5 Ermittlung der Reproduzierbarkeit ... 86
5.3.1.6 Zusammenfassung der experimentellen Daten und der Ergebnisse der Methode 1 (isokratische Trennung) ... 87
5.3.1.7 Messung von Bio-Roggen-Proben ... 88
5.3.2 Behandlung der aufgetretenen Analysenprobleme ... 89
5.3.2.1 Änderung des Laufmittels 1 ... 89
5.3.2.2 Einfluss der Säulentemperatur ... 89
5.3.2.3 Änderung des Laufmittels 2 ... 89

5.3.2.4 Versuche mit Methode 1 nach Einbau einer neuen Trennsäule 90
5.3.2.5 Entwicklung eines Gradientenprogramms 91
5.3.2.6 Suche nach einem internen Standard 92
5.3.2.7 Optimierung des Gradienten 92
5.3.2.8 Analyse verschiedener Probenmatrices 93
5.3.3 Methode 2: Gradientenelution 94
5.3.3.1 Strom-Spannungskurve von Citrinin 94
5.3.3.2 Kalibriergerade und Nachweisgrenze in Standardlösungen 95
5.3.3.3 Bestimmung der Reproduzierbarkeit 96
5.3.3.4 Probenanalyse 96
5.3.3.5 Ermittlung der Wiederfindung für verschiedene Probenmatrices 97
5.3.3.6 Bestimmung der Nachweisgrenzen für diverse Probenmatrices 98
5.3.3.7 Darstellung einiger Chromatogramme 99
5.3.3.8 Zusammenfassung der experimentellen Daten und der Ergebnisse der Methode 2 (Gradientenelution) 103

6 DISKUSSION 104

7 ANHANG 107

7.1 Zusammenfassung 107
7.2 Abstract 108
7.3 Lebenslauf 109
7.4 Abkürzungsverzeichnis 111
7.5 Abbildungsverzeichnis 113
7.6 Tabellenverzeichnis 115
7.7 Literaturverzeichnis 116

1 EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT

Citrinin (CIT) gehört zur Gruppe der Mykotoxine und wurde 1931 von *Penicillium citrinum* als sekundärer, toxischer Metabolit isoliert. Es ist insbesondere als Nierengift bekannt, führt aber auch zu Verengung der Bronchien, Erweiterung der Blutgefäße und erhöhter Muskelkontraktion [1]. Das Mykotoxin scheint neben Ochratoxin A mit ein Verursacher der beim Menschen auftretenden Balkan Endemic Nephropathy (BEN) zu sein [2, 3]. In Nagern wirkt es embryotoxisch [4], in Ratten in höheren Dosen zudem teratogen [1]. Citrinin wurde von der International Agency for Research on Cancer (IARC) als Karzinogen der Gruppe 3 eingestuft.

Obwohl die Toxizität von Citrinin in Tierversuchen deutlich gezeigt wurde, ist von den Belastungen und Auswirkungen des Mykotoxins auf den Menschen nur sehr wenig bekannt. Für Citrinin in Lebens- und Futtermitteln gibt es bis dato keine von der Europäischen Union gesetzlich festgelegten Richt- oder Grenzwerte [1].

Citrinin wird von einigen Schimmelpilzarten wie *Penicillium*, *Aspergillus* und *Monascus* gebildet. Im Gegensatz zu anderen Mykotoxinen wird von Kontaminationen mit Citrinin in der Literatur aber deutlich seltener berichtet. Dies liegt einerseits an der Instabilität des Schimmelpilzgiftes und damit verbundenen niedrigen und schwankenden Wiederfindungen, andererseits auch an den Schwierigkeiten, die bei der Analyse von Citrinin auftreten [1, 5, 6].

Nachgewiesen werden konnte das Mykotoxin bisher in rot fermentiertem Reis, verschiedenen Getreidesorten wie Weizen, Roggen und Dinkel und daraus hergestellten Frühstückscerealien, Kakaobohnenschalen, Äpfeln und in Silagen [5, 7-10].

Zum Nachweis von Citrinin kamen bisher hauptsächlich dünnschichtchromatographische Methoden [8, 11], Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) mit Fluoreszenzdetektion [5, 12, 13] und Enzymimmunoassays [14, 15] zum Einsatz.

Um Verluste bei der Probenaufarbeitung durch die Instabilität des Mykotoxins weitestgehend zu vermeiden, sollte eine Methode entwickelt werden, mit der Citrinin möglichst rasch und unter milden Bedingungen extrahiert werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde dafür die beschleunigte Lösungsmittelextraktion (ASE) als Extraktionsmethode der Wahl herangezogen. Diese ist eine Probenaufarbeitungstechnik, bei der mittels erhöhter Temperatur, erhöhtem Druck und einem geeigneten Lösungsmittel Analyten aus diversen Matrices gelöst werden. Im Zuge der Diplomarbeit wurde eine

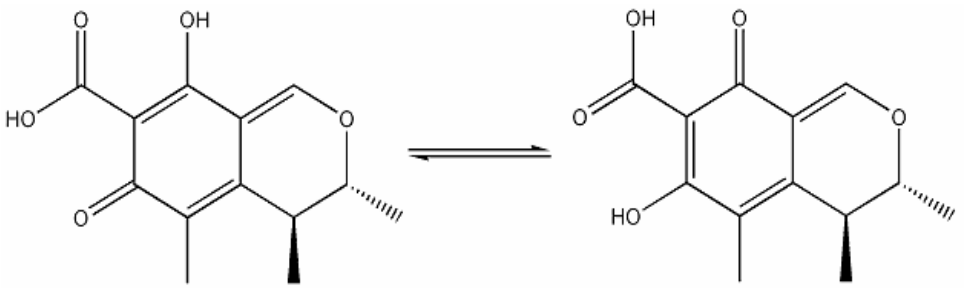
Extraktionsmethode für Citrinin aus verschiedenen Cerealienmatrices entwickelt und die Extraktionsparameter [Lösungsmittel, Temperatur, Extraktionszyklen (Dauer und Anzahl), eingesetzte Probenmenge] optimiert. Die Verbindungen im Extrakt sollten im Anschluss daran mit HPLC getrennt werden. Aufgrund der Struktur des Citrinins war anzunehmen, dass es elektrochemisch aktiv ist und sich somit für eine Detektion mit einem coulometrischen Elektroden-Array-Detektor (CEAD) eignet. Mit diesem Detektor können elektroaktive Substanzen bei hoher Empfindlichkeit und hoher Selektivität mittels in Serie geschalteter Durchflusselektroden detektiert und qualitative sowie quantitative Informationen über einen Analyten durch Messen des Stroms oder der elektrischen Ladung, der/die an der Arbeitselektrode fließt bzw. umgesetzt wird, erhalten werden. Da bisher in Publikationen weder über das elektrochemische Verhalten von Citrinin noch über eine chromatographische Trennmethode gekoppelt mit CEAD berichtet wurde, sollte in der vorliegenden Arbeit nach Untersuchung der Reduktions- bzw. Oxidationseigenschaften des Mykotoxins dieses erstmals nach der Trennung mittels HPLC mit einem coulometrischen Elektroden-Array-Detektor detektiert werden und anschließend die HPLC-CEAD-Methode validiert werden.

Die entwickelten Methoden zur Extraktion, Trennung und Detektion von Citrinin wurden in der vorliegenden Arbeit mittels Analyse von im österreichischen Handel erhältlichen Cerealienproben [Roggen (ganzes Korn), Weizen-Vollmehl, Dinkel-Vollmehl und Maismehl] überprüft und die Nachweisgrenzen von Citrinin für die jeweiligen Probenmatrices ermittelt.

2 CITRININ

2.1 Eigenschaften

Das Mykotoxin Citrinin (Abb. 1) [(3R,4S)4,6-Dihydro-8-hydroxy-3,4,5-trimethyl-6-oxo-3H-2-benzopyran-7-carboxylsäure] ist ein toxischer, sekundärer Metabolit, der erstmals 1931 von *Penicillium citrinum* als Reinsubstanz isoliert wurde [1].



p-Chinon o-Chinon

Abbildung 1: Strukturformeln von Citrinin ($C_{13}H_{14}O_5$)

Citrinin (CIT) hat eine molare Masse von 250.25 g/mol und kristallisiert zu zitronengelben Nadeln, die einen Schmelzpunkt von 175°C aufweisen [1, 16]. Es sind zwei tautomere Formen des Mykotoxins bekannt, eine p-Chinon- und eine o-Chinon-Form, die im festen Zustand im Gleichgewicht vorliegen. In Methanol und in Methanol/Methylenchlorid-Mischungen unterzieht sich CIT einer nucleophilen Michael-Additionsreaktion. Diese Reaktion ist reversibel und das Gleichgewicht verschiebt sich zur normalen, nicht addierten, Citrinin-Form bei Erhöhung der Temperatur und bei Erhöhung des Methylenchlorid-Anteils in Methanol/Methylenchlorid-Mischungen [17].

Citrinin ist schwer- bis unlöslich in Wasser, aber löslich in Methanol, Acetonitril, Ethanol, Dioxan und den meisten anderen organischen Lösungsmitteln sowie in verdünnten Natriumhydroxid-, Natriumcarbonat- und Natriumacetatlösungen [1, 16]. Es kann bei Anwesenheit von Metallionen Chelat-Komplexe ausbilden. Des Weiteren wird CIT in sauren und basischen Lösungen als auch in Gegenwart von fluoreszierendem Licht sowohl im festen Zustand als auch in Lösung abgebaut [1].

Das Mykotoxin wirkt antibiotisch [1, 16], es weist in Form seiner hydratisierten Michael-Additionsprodukte aber auch antioxidative Eigenschaften auf [18]. Auf Grund seiner Toxizität können jedoch beide Eigenschaften nicht ausgenützt werden.

2.2 Vorkommen

Citrinin wird in feuchtgemäßigten Zonen nach der Ernte bei der Lagerung von Lebensmitteln von den Schimmelpilzarten *Penicillium, Aspergillus* und *Monascus* gebildet [1, 19, 20]. In Tab. 1 ist eine Auflistung einiger CIT-bildender Pilze dargestellt. Das Wachstum von *Penicillium citrinum* und die Bildung von Citrinin sind abhängig von der Wasseraktivität (a_w-Wert) im jeweiligen Substrat [7].

Tabelle 1: Citrinin-bildende Schimmelpilze [1, 19, 20]

Gattung	Art
Penicillium	P. citrinum
	P. verrucosum
	P. camemberti
Aspergillus	A. terreus
	A. carneus
	A. oryzae
	A. niveus
Monascus	M. ruber
	M. purpureus

Viele der CIT-bildenden Arten produzieren auch Ochratoxin A, weshalb die beiden Mykotoxine häufig gemeinsam auftreten, wobei CIT wesentlich seltener nachgewiesen wird, was auf Verluste bei der Probenaufarbeitung und/oder auf Schwierigkeiten bei der Analyse zurückzuführen ist [1, 5].

Citrinin wurde in Reis, Weizen, Gerste, Hafer, Roggen, Dinkel, Mais, Kakaobohnenschalen, Erdnüssen und Früchten, aber auch in Silagen gefunden. Das

Schimmelpilzgift konnte hingegen in gebrautem Bier nicht nachgewiesen werden, da es beim Maischen zerstört wird [21]. In Tab. 2 ist eine Übersicht über gefundene Citrinin-Gehalte in verschiedenen Rohstoffen sowie Lebens- und Futtermitteln illustriert.

Tabelle 2: Citrinin-Gehalte kontaminierter Rohstoffe, Lebens- und Futtermittel

Rohstoff, Lebens- oder Futtermittel	Citrinin-Gehalte	Referenz
Weizen	65 µg/kg (a_w 0.810)	[7]
	460 µg/kg (a_w 0.825)	
	22 mg/kg (a_w 0.885)	
Weizen-Vollmehl	0.5 µg/kg	[5]
Weizenkleie	1.9-2.4 µg/kg	
Roggen-Vollmehl	1.1 µg/kg	
Kakaobohnenschalen	2.4 µg/kg	
Rosinen	0.5 µg/kg	
Rot-fermentierter Reis (China)	2.9 mg/kg	
Frühstückscerealien (Frankreich)	5-42 µg/kg	[13]
Schwarze Oliven (marokkanischer Herkunft)	0.345-0.52 µg/kg	[12]
Monascus roter Reis	4.2-25.1 mg/kg	[10]
Lebensmittelfarbstoffe aus Monascus-Arten	0.2-17.1 µg/kg	[22]
Äpfel	0.32-0.92 mg/kg	[8]
Weizenkeime	36.0 µg/kg	[15]
Sonnenblumenmehl	69.2 µg/kg	
Silagen	2.4-64.2 µg/kg	[9]
	26.9±2.5 µg/kg (obere Schicht)	[23]
	36.6±2.3 µg/kg (unterste Schicht)	

2.3 Toxizität

Citrinin ist im Tierversuch vorwiegend nierentoxisch, es zeigt aber auch gentoxische, embryotoxische und teratogene Wirkung. Für die Kanzerogenität liegen bisher nur unzureichende Beweise im Tierversuch vor. Das Mykotoxin wird daher von der IARC als Karzinogen der Klasse 3 eingestuft, kann aber hinlänglich seiner Kanzerogenität gegenüber dem Menschen nicht klassifiziert werden [4].

Citrinin ist nicht akut toxisch. Einige LD_{50}-Werte sind in Tab. 3 aufgelistet.

Tabelle 3: LD_{50}-Werte für CIT aus [1, 24, 25]

LD_{50}-Wert [mg/kg]	Versuchstier	Applikation
~ 50	Ratte	oral
64	Ratte	i.p.
35-58	Maus	i.p.
19	Kaninchen	i.p.
50 (72 h)	Kaninchen	i.p.
134 (72 h)	Kaninchen	oral

2.3.1 Toxikokinetik

Die Toxikokinetik von CIT wurde in männlichen Ratten anhand der Verteilung und Ausscheidung von [^{14}C]-markiertem Citrinin untersucht [26]. Dreißig Minuten nach Verabreichung wurden 14.7% der gesamten Radioaktivität in der Leber und 5.6% in den Nieren wiedergefunden. Die Werte sanken nach insgesamt 6 h auf 7.5% in der Leber und 4.7% in den Nieren. Die Plasmakonzentration des [^{14}C]-markierten CIT verringerte sich von 9.2% nach 0.5 h auf 4.7% nach 6 h. Zirka 80% der verabreichten ^{14}C-Aktivität war nach 24 h über Faeces und Urin ausgeschieden.

In [27] wird beschrieben, dass Citrinin in der Ratte über das renale Sekretionssystem der proximalen Tubuli für organische Anionen transportiert wird.

2.3.2 Zytotoxizität

Citrinin wirkt zytotoxisch und wird in der Zelle in den Mitochondrien akkumuliert und interagiert mit dem Elektronentransportsystem der Atmungskette. So wurde in [28] berichtet, dass CIT in *Saccharomyces cerevisiae* die Zellatmung total inhibiert, es konnten aber keine Auswirkungen auf die Zellpermeabilität festgestellt werden. In Mitochondrienpräparaten wurde eine deutliche Hemmung der Succinatoxidase sowie der NADH-Oxidase durch CIT erhalten. Etwa die Hälfte des aufgenommenen Citrinins wurde in den Mitochondrien gefunden.

Auch in [29] wurden bei der Untersuchung von renalen proximalen Tubuli und isolierten renalen kortikalen Mitochondrien in Ratten multiple Effekte von CIT auf die Mitochondrienfunktion gefunden. Eine einstündige Exposition renaler proximaler Tubuli mit 250 µM CIT erniedrigte die Komplex 3-Atmung um 34%. Des Weiteren reduzierte CIT die Succinat-unterstützte Atmung, zeigte aber keine Auswirkungen auf die Cytochrom c-Cytochrom-Oxidase.

Das Mykotoxin stört in BHK-21-Zellen sowohl die Mitochondrienfunktion als auch den anaeroben Glycolyse-Stoffwechselweg. So wurde in [30] bei der Untersuchung mit BHK-21-Zellen (Nierenzellen von Hamstern) eine Hemmung der Sauerstoffaufnahme von 45% sowie eine Hemmung der Glucoseverwertung von 86% gefunden. Außerdem konnten BHK-21-Zellen Lactat nicht generieren, wenn der oxidative Metabolismus durch Citrinin beeinträchtigt wurde.

In [31] wurde herausgefunden, dass CIT die antioxidative enzymatische Abwehr von Zellen durch Hemmung der GSSG-Reduktase und Transhydrogenase einschränkt. Das Mykotoxin erhöhte die Generierung von ROS (reactive oxygen species), wodurch die Bildung von Superoxid-Anionen in der Atmungskette stimuliert wurde. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde vorgeschlagen, dass oxidativer Stress in Zusammenhang mit der Zytotoxizität von CIT steht. Dieser Verdacht wurde in [32] bestätigt. Es wurden die CIT-induzierten mRNA-Expressionsprofile in Hefe mittels ORF DNA-Mikroarray und Oligo DNA-Mikroarray untersucht. Die Mikroarray-Studien zeigten, dass die Behandlung der Hefezellen mit dem Schimmelpilzgift oxidativen Stress hervorruft, dieser oxidative Stress aber zu keinen DNA-Schäden führt. Zur Entgiftung verwendeten die Hefezellen Glutathion-Modifikationen und pumpten das Mykotoxin mithilfe von Transportern aus der Zelle.

Das Mykotoxin kann aber auch zum Zelltod führen. So wurde in [29] beschrieben, dass die Überlebensrate renaler proximaler Tubuli in Ratten konzentrations- und zeitabhängig nach Citrinin-Exposition sank, und der Zelltod nach 1, 2 bzw. 4 h nach Exposition mit 500, 125-250 und 63 µM CIT begann.

Bei Versuchen mit HL-60-Zellen (humane promyelozytische Leukämiezellen) traten 24 h nach der Exposition mit CIT morphologische Beweise für die Apoptose in Form von Kernfragmentierung auf. Die durch das Mykotoxin ausgelöste Apoptose wurde begleitet von einer Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Cytoplasma und anschließender Aktivierung mehrerer Caspasen. Es wurde aber vermutet, dass oxidativer Stress keine Auswirkung auf den Zelltod hat [33].

Des Weiteren wurde in [34] beschrieben, dass CIT in Experimenten mit embryonalen Maus-Stammzellen Apoptose durch Generierung von ROS und Induzierung des Mitochondrien-abhängigen apoptotischen Prozesses auslöst. Außerdem wird der Überlebens-Signalweg durch Inaktivierung des Hitzeschockprotein 90/Multichaperon-Komplexes inhibiert. Das Mykotoxin verursacht zudem Schäden in den frühen Entwicklungsstadien von embryonalen Maus-Stammzellen und Blastozysten *in vitro* und führt *in vivo* ebenfalls zu Schäden in den frühen embryonalen Entwicklungsstadien und im Fall der Blastozysten sogar zur Apoptose.

2.3.3 Mykotoxikosen und Nierentoxizität

Durch Citrinin verursachte Mykotoxikosen wurden an Ratten, Mäusen, Kaninchen, Hunden und Schweinen untersucht. In diesen Studien zeigte sich insbesondere die Nierentoxizität von CIT.

Bei Ratten trat nach einer einmaligen intraperitonealen Applikation von 50 mg CIT/kg KGW nach 3 h eine Nierenschädigung in Form einer vakuolären Degeneration des renalen tubulären Epithels, nach 36 h extensive Nekrose auf. Nach 72 h konnte aber eine einsetzende Regeneration des tubulären Epithels beobachtet werden. Die Nieren der Ratten, denen CIT verabreicht wurde, waren blass und geschwollen, wobei sich zeigte, dass die blassen Stellen nekrotische renale Tubuli darstellten [24]. Ebenso führte die einmalige Verabreichung von 50 mg CIT/kg KGW (i.p.) zu einer Erhöhung der Konzentration von Glucose und Blut im Harn. Die Natrium- und Chlorid-Konzentration im Harn war 1.5 bis 2 Mal höher als bei den Vergleichstieren. Die Kalium-Konzentration war nur sehr leicht erhöht. Nach 36 h war der Pegel der Lactat-Dehydrogenase 15-20 Mal höher als in unbehandelten Ratten. Im Serum hingegen waren die Natrium- und Chlorid-Konzentrationen niedriger als in Vergleichstieren, die Kalium-Konzentration war erhöht. Des Weiteren waren im Serum die Werte für die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase und die Lactat-Dehydrogenase leicht erhöht [35].

In [36] wird beschrieben, dass Chromat die nierenschädigende Aktivität von CIT in Ratten steigert.

Veränderungen in haematologischen Parametern und histologische Veränderungen in der Leber, den Nieren und im Herz wurden bei Mäusen beobachtet, denen 60 Tage lang 0.065 mg CIT/100 g Futter oral verabreicht wurde. Die dem Mykotoxin ausgesetzten Mäuse zeigten eine geringere Gewichtszunahme, niedrigere Haematokrit-Werte, erhöhte Werte an Serum-Alanin-Aminotransferase und deutliche Zeichen für Nieren- und Lebertoxizität. In der Leber wurden infiltrierte polymorphonukleare Zellen, begleitet von leberzellulärerer Nekrose und Lipideinschlüssen in den umliegenden Mitochondrien beobachtet. Es wurde die Vermutung aufgestellt, dass Citrinin toxische Hepatitis oder intravasculäre Haemolyse verursachen kann [37].

In Kaninchen führte eine einmalige orale CIT-Dosis von 125-150 mg/kg KGW nach 8 h zu schwerer Diarrhoe. Pathologisch beobachtete Veränderungen betrafen im

Allgemeinen die Nieren und äußerten sich in der Degeneration und Nekrose der proximalen gewundenen Tubuli und der glatten Segmente [25]. Weiters wurden in einer Studie [38], in der 15 mg CIT/kg Futter für 60 Tage an Neuseeländische weiße Kaninchen verabreicht wurde, die Läsionen in den proximalen gewundenen Tubuli untersucht. Auch hier wurde von signifikanten Veränderungen in den Mitochondrien wie Kernverlust, Kernfragmentierung oder cytoplasmatischer Vakuolierung berichtet. Die distal gewundenen Tubuli wurden durch die Behandlung mit CIT nicht beeinflusst.

Bei narkotisierten Hunden ergab eine intravenöse Applikation von 80 µM CIT/kg KGW einen deutlichen Anstieg des Haematokrit-Wertes und im Harn erhöhte Protein- und Glucosewerte. Diese Dosis führte zu Läsionen des proximalen tubulären Segments, betraf aber auch die distal gewundenen Tubuli [39].

In Schweinen wurde der *in vitro*-Effekt von CIT auf die mitogen induzierte Lymphozyten-Proliferation untersucht [40, 41]. Bei einer intragastritischen Verabreichung von 0.02 mg CIT/kg KGW konnten nach 57 Tagen keine haematologischen und histopathologischen Abweichungen gefunden werden. Inhibitorische Effekte des Mykotoxins auf die Lymphozyten-Proliferation treten offenbar erst bei höheren Konzentrationen auf. Es konnte aber gezeigt werden, dass CIT synergistisch mit OTA wirkt und die Concanavalin A-induzierte Lymphozyten-Proliferation unterdrückt.

Citrinin wird aufgrund seiner nierenschädigenden Wirkung verdächtigt, mit der beim Menschen auftretenden „Balkan Endemic Nephropathy“ (BEN) in Zusammenhang zu stehen. Die „Balkan Endemic Nephropathy“ ist eine nicht entzündliche Erkrankung der Nieren, die langsam, aber chronisch bis zum Nierenversagen verläuft und vor allem die ländliche Bevölkerung in bestimmten Teilen Bulgariens, Rumäniens und im ehemaligen Jugoslawien betrifft [2, 3]. Das Mykotoxin, das am häufigsten verdächtigt wurde, für BEN verantwortlich zu sein, ist Ochratoxin A [2, 3, 42]. In [3] wurde berichtet, dass Cerealienproben endemischer Gebiete in Bulgarien sowohl OTA als auch CIT in erhöhten Konzentrationen aufweisen. Alle Proben, bis auf eine, in denen CIT detektiert wurde, stammten aus endemischen Gebieten. Außerdem waren mit einer Ausnahme alle CIT-positiven Proben auch OTA-positiv, wobei die CIT-Konzentrationen um 2-200 Mal höher waren als die OTA-Konzentrationen.

In [2] wurde gezeigt, dass die Lebensmittel in Familien mit BEN im Gegensatz zu Familien, in denen BEN nicht auftrat, mit CIT kontaminiert waren. Außerdem wird in dieser Studie vermutet, dass Kontaminationen mit CIT und OTA nicht nur zu BEN führen, sondern auch Harnwegtumore verursachen und diese beiden Erkrankungen in Zusammenhang stehen.

Die „Balkan Endemic Nephropathy“ weist starke Ähnlichkeit mit der „Mycotoxine Porcine Nephropathy“ (MPN) auf. Die MPN ist eine Erkrankung von Schweinen, die zu einer Vergrößerung der Nieren, einer Veränderung der Farbe der Nieren, zu Vesikeln an der renalen Oberfläche, Zysten und extensiver interstitialer Fibrose führt. Die Entstehung von MPN wird auf Kontaminationen des Futters mit *Penicillium verrucosum* zurückgeführt [43, 44] und könnte daher mit erhöhten Konzentrationen an OTA und CIT in Futtermitteln in Verbindung stehen. In Getreideproben konnten in 8% der Proben OTA-Gehalte von bis zu 1.2 µg/g und in 0.5% der Proben bis zu 6 µg/g CIT detektiert werden. In [43] wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen typischen von MPN verursachten Läsionen und der Anwesenheit von OTA im Gewebe besteht. In erkrankten Schweinen konnten in den Nieren OTA-Konzentrationen von bis zu 23 ng/g und im Blut 3-270 ng/mL gefunden werden.

2.3.4 Teratogenität und Reproduktionstoxizität

Bei *in vitro*-Untersuchungen von embryonalen Stammzellen (Maus) wurden durch CIT verursachte Schäden in den frühen Entwicklungsstadien und den Blastozysten, *in vivo* ebenso Schäden in den frühen embryonalen Entwicklungsschritten, aber bezüglich der Blastozysten Apoptose festgestellt [34].

Trächtigen Ratten wurde CIT in einer Konzentration von 10 mg/kg Futter in den Tagen 6-20 der Trächtigkeit oral verabreicht. Citrinin zeigte teratogene Effekte bei den sich entwickelnden Föten. Das Gewicht der Föten war deutlich reduziert, außerdem konnten Abnormalitäten des Skeletts beobachtet werden [45].

Die reproduktionstoxische Wirkung von CIT wurde *in vitro* an dispergierten interstitiellen Zellen von Hoden erwachsener Wüstenrennmäuse untersucht. Das Mykotoxin beeinflusste die Testosteronsekretion nur leicht, bei einer CIT-Konzentration von 1.74 nM trat eine Inhibierung der Testosteronsekretion von 23.3% auf [46].

2.3.5 Genotoxizität

Über die gentoxische Wirkung von CIT sind kontroverse Berichte veröffentlicht worden.

Bei der Untersuchung von *Escherichia coli* traten *in vivo* bei einer CIT-Konzentration von 100 µg/mL Einzelstrangbrüche in der chromosomalen DNA auf. *In vitro* wurde die replikative DNA-Synthese bei einer CIT-Konzentration von 200 µg/mL inhibiert, die Synthese stabiler RNA bei 300 µg/mL reduziert und die Proteinsynthese war bis zu einer Konzentration von 450 µg CIT/mL nicht betroffen. Die DNA-angreifende Aktivität wurde durch NADPH, Katalase, Superoxiddismutase und höhere Konzentrationen von Hydroxyl-Radikal-Fängern verhindert, was auf die Beteiligung von freien Radikalen auf die Aktionsmechanismen von CIT auf die DNA hinweist [47].

In V79-Zellen (Lungenfibroblastenzellen chinesischer Hamster) zeigte Citrinin aneuploidogene Effekte. Die Mikrotubuli-Polymerisation wurde gehemmt, woraufhin die Zellen in der Metaphase arretierten. In Mikrokern-Tests mit V79-Zellen führte CIT in Konzentrationen von 30 und 40 µM zu CREST-positiven Mikrokernen (Kerne mit ganzen Chromosomen/Chromatiden), was die Aneugenität von CIT impliziert. CREST-negative Mikrokerne (Kerne mit Chromosomenfragmenten) konnten nach einer Behandlung mit CIT nicht gefunden werden, CIT zeigt also keine klastogenen Effekte [48].

Citrinin zeigte keine Mutagenität im Salmonellen-Mikrosomen-Assay, weder mit noch ohne S9-Mix. Nach metabolischer Aktivierung verursachte das Mykotoxin hingegen im Salmonellen-Hepatozyten-Test eine dosisabhängige positive mutagene Antwort. Dies deutet darauf hin, dass CIT eine komplexe zelluläre Biotransformation benötigt, um Mutagenität zu entwickeln [22].

Nach oraler Verabreichung von 5-20 ppm CIT über 8 Wochen an frisch entwöhnte Mäuse wurden klastogene Effekte wie Chromosomenbrüche in Knochenmarkszellen nachgewiesen [49].

2.4 Stabilität

Das Mykotoxin zerfällt unter wasserfreien Bedingungen bei 175°C, wobei die Zerfallsprodukte nicht zytotoxisch auf HeLa-Zellen (Zelllinie aus Epithelzellen eines Zervixkarzinoms) wirken. Unter halbfeuchten Bedingungen führen Temperaturen über 140°C zur Zerstörung und Entgiftung von CIT [50]. Die Erhitzung auf 130°C unter wässrigen Bedingungen führt zu einer Erniedrigung der Toxizität von CIT auf HeLa-Zellen. Bei der Erhitzung des Schimmelpilzgiftes in Anwesenheit von Wasser auf eine Temp. von 140°C entstehen mehrere Zerfallsprodukte, unter anderem Citrinin H1 (siehe Abb. 2), welches aus zwei Molekülen Citrinin gebildet wird und 10 mal stärker toxisch als dieses ist. Dieses wird auch gebildet, wenn CIT bei 100°C 30 min lang in wässriger Lösung erhitzt wird [51, 52].

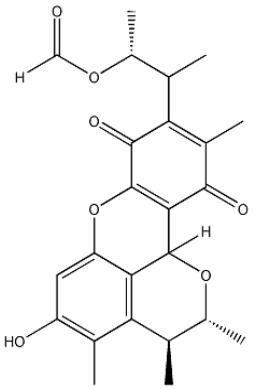


Abbildung 2: Citrinin H1

Weitere Untersuchungen der Zerfallsprodukte nach Erhitzung von CIT in Wasser auf 140°C führte zur Isolierung von Citrinin H2 (siehe Abb. 3), das weniger zytotoxisch als CIT ist [53].

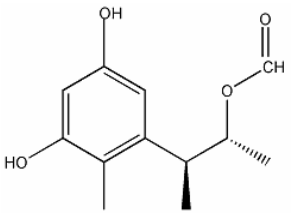


Abbildung 3: Citrinin H2

Die bei der Erhitzung auf über 160°C unter wässrigen Bedingungen entstandenen Komponenten sind nicht toxisch [50]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass durch Kochen in Wasser bei ca. 100°C die Konzentration von CIT in *Monascus* deutlich reduziert wird. Bereits nach 20 min Kochen konnte die CIT-Konzentration um 50% vermindert werden [10].

Citrinin ist aber nicht nur thermolabil unter wässrigen Bedingungen, sondern es wird auch in sauren und basischen wässrigen Lösungen abgebaut [54]. In den in [54] durchgeführten Versuchen wurde CIT in wässrigem Methanol gelöst, entweder so belassen oder mit Trifluoressigsäure oder Triethylamin versetzt und 15 Tage lang auf 50°C erhitzt. Es wurden hauptsächlich Phenol A, Phenol A-Säure, Decarboxycitrinin, Dicitrinin A, Dicitrinin B, Dicitrinin C und Dicitrinin D gefunden, deren Strukturformeln in Abb. 4 illustriert sind.

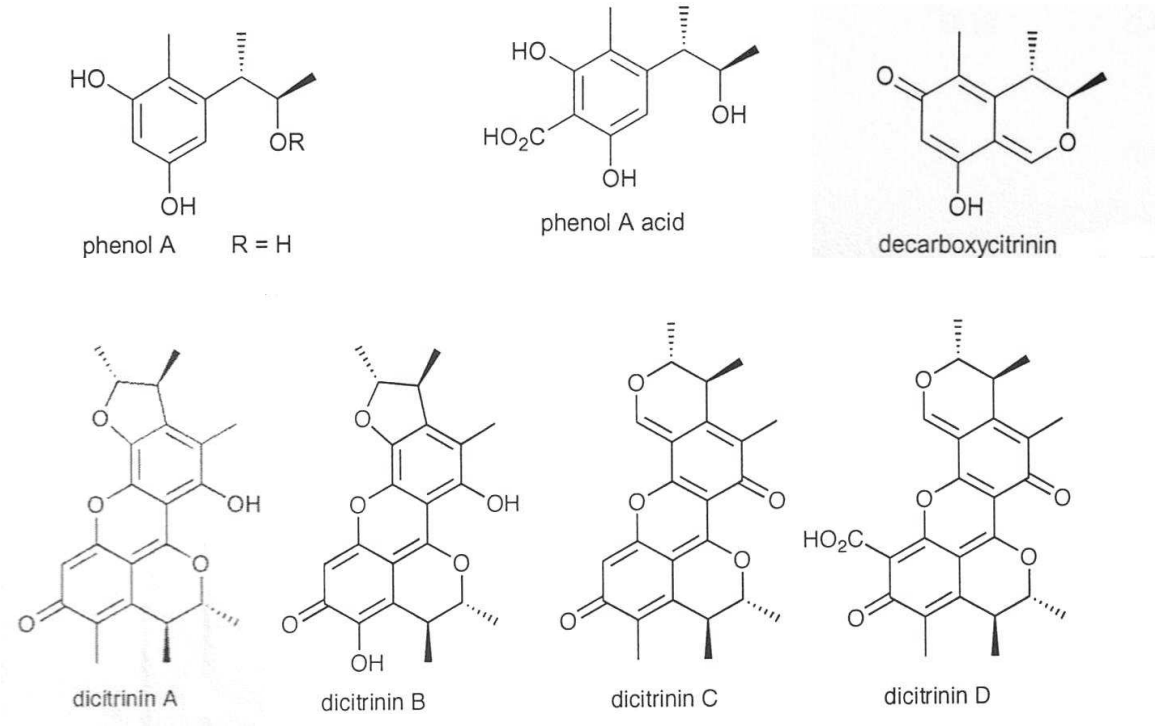


Abbildung 4: Phenol A, Phenol A-Säure, Decarboxycitrinin, Dicitrinin A-D (aus [54])

All diese Daten zeigen, dass Citrinin eine sehr heikle und empfindliche Substanz ist, die sensible analytische Handhabung erfordert.

2.5 Nachweismethoden für CIT

Bisher wurde Citrinin weniger Beachtung als anderen Mykotoxinen geschenkt, was mit den Schwierigkeiten bei der analytischen Bestimmung von Citrinin zusammenhängt. In einigen Publikationen wurde über die Instabilität des Mykotoxins, niedrige und schwankende Wiederfindung, in Zusammenhang mit HPLC auch über Tailing der Peaks, fluktuierende Retentionszeiten und interferierende Peaks berichtet [1, 5, 6].

Das Mykotoxin wurde mit polaren, meist auch angesäuerten Lösungsmitteln wie Acetonitril, Chloroform oder Methanol mit einigen Extraktionszyklen und aufwändigen Aufreinigungsschritten, verbunden mit hohem Zeit- und Kostenaufwand, aufgearbeitet und anschließend mittels Dünnschichtchromatographie [8, 11, 21, 55, 56], HPLC mit UV- [57, 58] oder Fluoreszenzdetektion [5, 9, 12, 13, 58-61], HPLC mit zeitaufgelöster Luminiszenz-Detektion [62] , HPLC-MS [23], GC-MS [10] und Enzymimmunoassays [3, 14, 15, 22] bestimmt.

3 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

3.1 Voltammetrie

(zusammengefasst aus [63, 64])

3.1.1 Grundlagen

Bei voltammetrischen Methoden wird der Strom, der in einer elektrochemischen Zelle aufgrund von Oxidations- oder Reduktionsreaktionen des Analyten bei variabler Spannung fließt, gemessen. Mit Hilfe der aufgenommenen Strom-Spannungs-Kurven können sowohl qualitative als auch quantitative Informationen über eine Probe erhalten werden.

Für voltammetrische Verfahren werden zumindest eine polarisierbare und eine unpolarisierbare Elektrode benötigt. Polarisierbare Elektroden zeichnen sich dadurch aus, dass man ihnen in einem bestimmten Bereich Potentiale aufzwingen kann, ohne dass nennenswerter Strom (Kapazitätsstrom) fließt. Bei unpolarisierbaren Elektroden hingegen bleibt das Elektrodenpotential in einem Strom durchflossenen System konstant. Unpolarisierbare Elektroden werden daher als Bezugselektroden verwendet.

Das Messsignal wird durch Ladungsdurchtritt an der Elektrodenoberfläche erhalten. Der fließende Strom wird als Faradayscher Strom bezeichnet.

3.1.1.1 Diffusionsgrenzstrom

Der Analyt kann aus der Messlösung durch Migration (Wanderung im elektrischen Feld), Diffusion oder Konvektion zur Elektrodenoberfläche transportiert werden.

Um die Migration zu unterdrücken, wird der Messlösung ein Leitsalz im Überschuss zugesetzt. Dieses Leitsalz ist ein elektrochemisch inaktiver Elektrolyt, der den Ladungstransport in der Lösung übernimmt, wodurch die Migration der Analytionen vernachlässigbar wird.

Wird die Analysenlösung nicht gerührt, so kann auch die Konvektion, also der Stofftransport aufgrund mechanischer Durchmischung, als Transportprozess ausgeschlossen werden.

Es bleibt also die Diffusion für den Transport des Analyten zur Elektrodenoberfläche. Der fließende Strom, der durch die elektrochemische Reaktion des Analyten entsteht, ist darauf zurückzuführen, dass die elektroaktive Spezies in einem Konzentrationsgradient wandert. Legt man an die Arbeitselektrode eine Spannung an, dann gilt für den Teilchenfluss des Analyten aus der Lösung zur Elektrodenoberfläche das 1. Fick´sche Gesetz:

$$J = -D \cdot \left(\frac{\partial c}{\partial x} \right)_{x=0} \qquad (3.1)$$

J ……. Teilchenfluss

D ..…….. Diffusionskoeffizient des Analyten

$\frac{\partial c}{\partial x}$ …… Konzentrationsgradient

Es stellt sich folgender Stromfluss ein:

$$I = z \cdot F \cdot A \cdot D \cdot \left(\frac{\partial c}{\partial x} \right)_{x=0} \qquad (3.2)$$

I …… Stromfluss

z ……..... Anzahl der ausgetauschten Elektronen

F ……... Faraday-Konstante (96485.3 $C \cdot mol^{-1}$)

A …….. Elektrodenfläche

An der Oberfläche einer stationären Elektrode bildet sich eine Diffusionsschicht aus, deren Dicke mit der Zeit zunimmt und der Konzentrationsgradient des Analyten an der Elekrodenoberfläche (x = 0) abnimmt. Für diese Bedingungen gilt das 2. Fick´sche Gesetz:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \cdot \left(\frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \right) \qquad (3.3)$$

Die Dicke der Diffusionsschicht und der Diffusionsgrenzstrom lassen sich aus den beiden Fick´schen Gesetzen berechnen und führen zu der von Cotrell abgeleiteten Gleichung:

$$I_{gr} = z \cdot F \cdot A \cdot D \cdot \frac{c^L}{\sqrt{\pi D t}} \qquad (3.4)$$

c^L ……. Konzentration des Analytions in Lösung

3.1.1.2 Kapazitätsstrom

Dieser Strom steht nicht in Zusammenhang mit der elektrochemischen Umsetzung des Analyten, sondern ist auf den Aufbau einer Grenzfläche zwischen Elektrode und Lösung zurückzuführen. Die Grenzfläche stellt eine elektrochemische Doppelschicht dar, bestehend aus der sogenannten inneren und äußeren Helmholzschicht, und verhält sich wie ein Plattenkondensator. Für die Ladung des Kondensators gilt:

$$Q = C_D \cdot A \cdot \left(E - E_0\right) \qquad (3.5)$$

Q …… Ladung des Kondensators

C_D …….. Doppelschichtkapazität

A …… Elektrodenfläche

E ……. Potential der Elektrode

E_0 …… Potential, wenn die Elektrode keine Ladung trägt

Ändert sich die Ladung im Laufe der Zeit, weil sich z.B. die Oberfläche und/oder das Potential verändern, dann fließt ein kapazitiver Strom I_c:

$$I_c = \frac{dQ}{dt} = C_D \cdot \left(E - E_0\right) \cdot \frac{dA}{dt} + C_D \cdot A \cdot \frac{dE}{dt} \qquad (3.6)$$

Der kapazitive Strom stört die Empfindlichkeit voltammetrischer Methoden wesentlich, weshalb dieser möglichst klein gehalten werden soll.

3.1.1.3 Strom-Spannungskurven

Bei voltammetrischen Methoden wird eine variable Spannung angelegt und der Stromfluss als Funktion der Spannung aufgezeichnet. Liegt an der Elektrode ein thermodynamisches Gleichgewicht vor, so kann man die Konzentrationen der oxidierten und reduzierten Spezies an der Elektrodenoberfläche in die Nernst-Gleichung einsetzen und erhält den Zusammenhang zwischen Strom und Spannung:

$$E = E^0 + \frac{RT}{zF} \cdot \ln \frac{D_{red}}{D_{ox}} + \frac{RT}{zF} \cdot \ln \frac{\gamma_{ox}}{\gamma_{red}} + \frac{RT}{zF} \cdot \ln \frac{I_{gr,K} - I}{-I_{gr,A} + I} \qquad (3.7)$$

E …… Elektrodenpotential
E^0 …….. Standardelektrodenpotential
R …… universelle Gaskonstante (8.31451 $J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$)
T …… Temperatur
D_{red} …… Diffusionskoeffizient der reduzierten Form
D_{ox} ……. Diffusionskoeffizient der oxidierten Form
γ_{ox} …….. Aktivitätskoeffizient der oxidierten Form
γ_{red} …….. Aktivitätskoeffizient der reduzierten Form
$I_{gr,K}$ ……. kathodischer Grenzstrom
$I_{gr,A}$ ……. anodischer Grenzstrom
I ……. gemessener Strom

Für das Potential im anodischen Elektrodenbereich gilt daher:

$$E = E^0 + \frac{RT}{zF} \cdot \ln \frac{D_{red}}{D_{ox}} + \frac{RT}{zF} \cdot \ln \frac{\gamma_{ox}}{\gamma_{red}} - \frac{RT}{zF} \cdot \ln \frac{I_{gr,A} - I}{I} \qquad (3.8)$$

Für das Halbstufenpotential $E_{1/2}$, jenem Potential, bei dem der Strom I die Hälfte des Grenzstroms I_{gr} beträgt, gilt:

$$E_{1/2} = E^0 + \frac{RT}{zF} \cdot \ln \frac{D_{red}}{D_{ox}} + \frac{RT}{zF} \cdot \ln \frac{\gamma_{ox}}{\gamma_{red}} \qquad (3.9)$$

Das Halbstufenpotential ist abhängig von der Art, nicht aber von der Konzentration des Analyten, wodurch das Halbstufenpotential qualitative Informationen über einen Analyten liefert.

3.1.2 Messanordnung

Für voltammetrische Verfahren gibt es zwei mögliche Messtechniken, einerseits die Zwei-Elektroden-Technik, andererseits die Drei-Elektroden-Technik.

Bei der Zwei-Elektroden-Technik wird zwischen einer Bezugs- und einer Arbeitselektrode eine Spannung angelegt und graduell verändert, das Elektrodenpotential wird gemessen. Durch das Anlegen der Spannung entsteht allerdings ein Spannungsabfall in der Messlösung, was zu einer Verschiebung der Elektrodenpotentiale führt. Um diesen Spannungsabfall zu verhindern, wird die Drei-Elektroden-Technik angewendet.

Bei der Drei-Elektroden-Technik werden zwischen der Arbeits- und der Referenzelektrode im stromlosen Zustand die Potentiale eingestellt, während der zwischen Arbeits- und Gegenelektrode fließende Strom registriert wird. Der schematische Aufbau einer Apparatur für die Drei-Elektroden-Technik ist in Abb. 5 dargestellt.

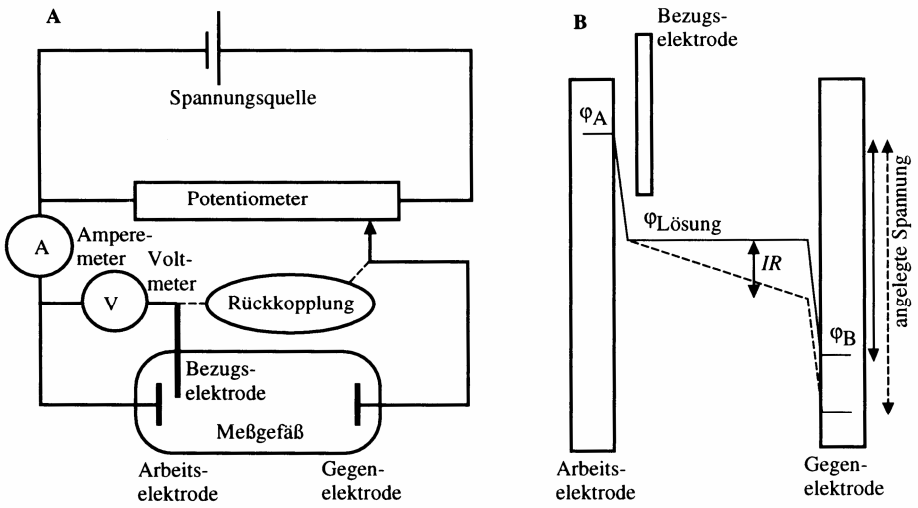


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Messanordnung für die Drei-Elektroden-Technik (A) sowie der Potentialveränderungen an der Phasengrenze (B) im stromlosen Zustand (durchgezogene Linie) und bei Stromfluss (strichlierte Linie) [63]

In der vorliegenden Arbeit wurde die Drei-Elektroden-Technik verwendet. Als Arbeitselektrode diente eine glasartige Kohlenstoffelektrode, als Referenzelektrode eine Silber/Silberchlorid/Kaliumchlorid(gesättigt)-Elektrode und als Gegenelektrode ein Platindraht.

Die glasartige Kohlenstoffelektrode besteht aus Glaskohlenstoff, welcher durch Pyrolyse von Phenol-Formaldehyd-Harzen oder anderen Polymeren, die kohlenstoffhältig sind, in inerter Atmosphäre zwischen 300°C und 2000°C gewonnen wird. Das erhaltene Material ist hart, polierfähig und besteht aus verschlungenen Kohlenstoffschichten. Glasartige Kohlenstoffelektroden werden oft durch Anlegen von abwechselnd kathodischen und anodischen Potentialen konditioniert.

3.1.3 Differential-Puls-Voltammetrie

In dieser Arbeit wurde für die voltammetrischen Untersuchungen an der glasartigen Kohlenstoffelektrode die Differential-Puls-Voltammetrie eingesetzt.

Bei diesem Verfahren wird eine stufenförmig ansteigende Spannung an die Arbeitselektrode angelegt. Am Ende jeder Stufe ist ein Spannungspuls mit der konstanten Amplitude ΔE überlagert. Die überlagerten Spannungspulse dauern ca. 50 ms, die Pulsamplitude wird in einem Bereich zwischen 20 und 100 mV gewählt. Der Strom wird sowohl kurz vor Anlegen des Pulses als auch am Ende des Pulses gemessen. Die Differenz dieser beiden Strommessungen wird als Funktion der entsprechenden Grundspannung dargestellt. Das Voltammogramm hat ein peak-förmiges Aussehen (siehe Abb. 6). Durch die Differenzbildung wird der kapazitive Strom stark verringert, was ein großer Vorteil der Differential-Puls-Voltammetrie ist.

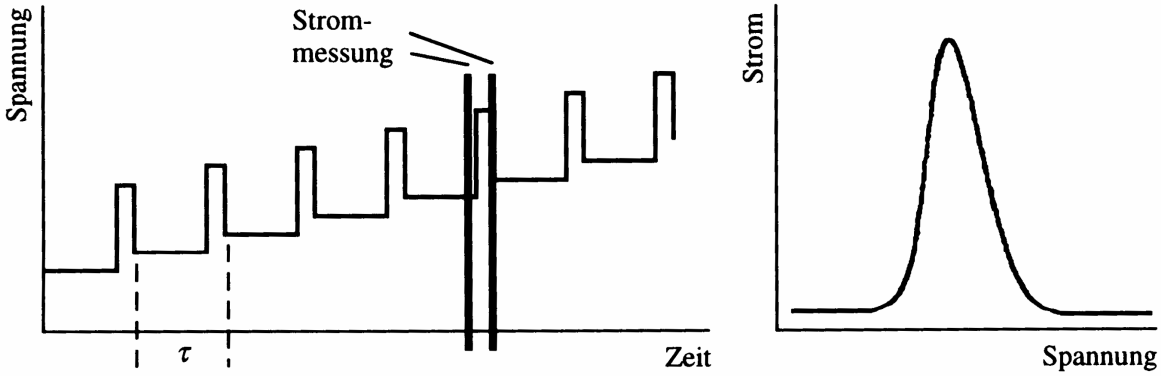


Abbildung 6: Stufenförmiger Verlauf der Spannung und Strom-Spannungskurve in der Differential-Puls-Voltammetrie [63]

Der Peakstrom I_P ist abhängig von der Analytkonzentration c und für ihn gilt:

$$I_P = z \cdot F \cdot A \cdot c \cdot \frac{D^{1/2}}{\sqrt{\pi t_w}} \cdot \left(\frac{1-\sigma}{1+\sigma} \right) \qquad (3.10)$$

mit $\sigma = \exp\left(\frac{zF}{RT} \frac{\Delta E}{2} \right)$

t_w …….. Zeit zw. Anlegen des Spannungspulses und Strommessung

Das Peakpotential E_P und das Halbstufenpotential $E_{1/2}$ enthalten beide qualitative Informationen über den Analyten. Die beiden Potentiale stehen für den anodischen Elektrodenbereich über folgende Formel in Zusammenhang:

$$E_P = E_{1/2} + \frac{\Delta E}{2} \qquad (3.11)$$

Mittels Differential-Puls-Voltammetrie können Nachweisgrenzen im Bereich von 10^{-7} bis 10^{-8} M erreicht werden. Sie gilt als eines der leistungsstärksten voltammetrischen Verfahren.

3.2 Accelerated Solvent Extraction (ASE)

(zusammengefasst aus [65-67])

3.2.1 Grundlagen

Die beschleunigte Lösungsmittelextraktion ist eine Probenaufarbeitungstechnik, bei der mittels erhöhter Temperatur, erhöhtem Druck und einem geeigneten Lösungsmittel Analyten aus diversen Matrices gelöst werden. Die Vorteile dieser Technik liegen im geringen Lösungsmittelverbrauch, der kurzen Dauer der Extraktion sowie der Automatisierbarkeit, wodurch ein hoher Probendurchsatz erreicht werden kann. Ebenso ist die Gefahr von Carryover-Kontaminationen aufgrund der geringen Totvolumina des ASE-Systems äußerst gering. Somit führen auch Extraktionen verschiedener Proben mit unterschiedlichen Analytkonzentrationen, die aufeinanderfolgend durchgeführt werden, zu zuverlässigen Analysenergebnissen.

3.2.2 Probenvorbereitung

Proben mit hohen Wassergehalten muss vor der Extraktion mittels ASE das Wasser soweit als möglich durch Luft-, Gefrier-, Ofen- oder Mikrowellentrocknung entzogen werden. Sind solche Trocknungsmöglichkeiten nicht gegeben oder sind flüchtige Substanzen, die analysiert werden sollen, in der Probe vorhanden, so kann die feuchte Probe auch durch Mischen mit präparativer Diatomeenerde für die ASE, Ottawa Sand oder Sand mit einer Siebgröße von 20-40 mesh behandelt werden.

Weiters sollen die zu untersuchenden Proben eine Partikelgröße von maximal 1-2 mm aufweisen, um eine möglichst große Oberfläche für die bessere Durchdringung mit dem Lösungsmittel zu erreichen. Je größer die Probenoberfläche ist, desto höher ist die Extraktionseffizienz.

Die meisten Proben werden vor der Überführung in die ASE-Zelle mit präparativer Diatomeenerde für die ASE, Ottawa Sand oder Sand mit einer Siebgröße von 20-40 mesh durchmischt, um ein Verklumpen der Probe in der Zelle zu verhindern und um die Angriffsfläche für das Lösungsmittel zu erhöhen.

Die ASE-Zelle soll mindestens doppelt so groß sein wie das Gewicht der Probe, also für 5 g Probe sollte eine Zelle mit mind. 10 mL Volumen verwendet werden.

Auf den Boden der Zelle werden ein bis drei passende Cellulose-Filter platziert, um die Fritte im Zellenverschluss nicht zu verstopfen und um zu verhindern, dass Probenpartikel aus der Zelle geschwemmt werden und so Ventile zerstören.

Außerdem ist es möglich, bereits während der Extraktion in der ASE-Zelle eine Probenaufreinigung durchzuführen. Sollen bei der Extraktion z.B. Lipide aus der Probe entfernt werden, wird direkt auf den Filter und vor Zugabe der Probe eine Schicht saures, aktiviertes Aluminiumoxid aufgebracht.

3.2.3 Extraktionsparameter

3.2.3.1 Lösungsmittel

Die Polarität des Lösungsmittels sollte der Polarität des/der Zielanalyten ähnlich sein. Durch Mischen mehrerer Lösungsmittel mit unterschiedlichen Polaritäten kann ein großes Spektrum an Analyten gleichzeitig extrahiert werden.

Für die ASE können beinahe alle flüssigen Lösungsmittel verwendet werden. Nur starke Säuren wie Salz-, Salpeter- oder Schwefelsäure sowie stark ätzende Laugen wie Natron- und Kalilauge sollten nicht für die Extraktion eingesetzt werden, da starke Säuren den Stahl im System angreifen und starke Basen die Pumpenkomponenten der ASE zerstören.

3.2.3.2 Temperatur

Die Temperatur ist der wichtigste Faktor in der Extraktion mittels ASE: Temperaturänderungen zeigen meist die größte Auswirkung auf die Extraktionseffizienz. Wird die Temperatur erhöht, so reduziert sich die Viskosität des Lösungsmittels, wodurch das Lösungsmittel die Matrix leichter durchdringen und die Analyten besser lösen kann, was zu höheren Ausbeuten führt.

3.2.3.3 Druck

Die Extraktion bei erhöhtem Druck dient dazu, die Lösungsmittel während der Extraktion flüssig zu halten, wenn sie über ihrem atmosphärischen Siedepunkt eingesetzt werden, und um Flüssigkeiten schnell durch das System zu transportieren. Die meisten ASE-Extraktionen werden bei einem Druck zwischen 1000 und 2000 psi durchgeführt. Druckänderungen haben, im Vergleich zu Temperaturänderungen, nur einen geringen Einfluss auf die Extraktionseffizienz.

3.2.3.4 Zyklen

Durch statische Zyklen wird während einer ASE-Extraktion frisches Lösungsmittel in die Zelle eingeleitet, wodurch es erleichtert wird, ein Extraktionsgleichgewicht zu erreichen und beizubehalten. Durch Einstellen des Spülvolumens wird nach jedem Zyklus die entsprechende Menge Lösungsmittel in das Sammelgefäß geleitet und frisches Lösungsmittel in die Zelle nachgefüllt. Nach dem letzten Spülzyklus wird mit Stickstoff nachgespült. Statische Zyklen haben sich besonders bei hohen Analytkonzentrationen bzw. bei Matrices, die für das Lösungsmittel schwer zu durchdringen sind, bewährt. Besonders bei niedrigen Extraktionstemperaturen unter 75°C sind mehrere statische Zyklen empfehlenswert, um den Mangel an frischem Lösungsmittel, das normalerweise bei höheren Temperaturen zur Druckregulierung beim Erhitzungsschritt eingeleitet wird, auszugleichen.

3.2.3.5 Dauer

Manche Probenmatrices halten die zu untersuchenden Analyten in Poren oder anderen Strukturen zurück. Durch Erhöhung der statischen Zeit in einem Zyklus bei höheren Temperaturen kann die Diffusion der Analyte in das Solvens gefördert werden.

3.2.4 Aufbau einer ASE-Apparatur

In der vorliegenden Arbeit wurde eine ASE 100 von Dionex verwendet, welche in Abb. 7 illustriert ist.

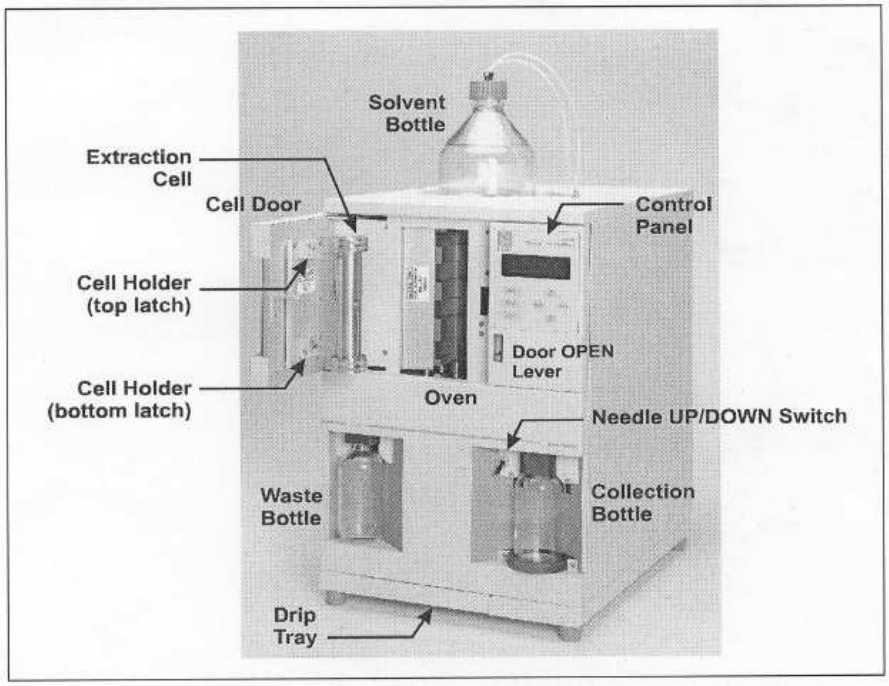


Abbildung 7: ASE 100-Apparatur von Dionex [68]

Aus der Lösungsmittelflasche wird Lösungsmittel in die Extraktionszelle eingebracht. In der Extraktionszelle findet die Extraktion bei konstanter Temperatur und erhöhtem Duck (in dieser Arbeit wurde bei einem Druck von 1500 psi gearbeitet) in mehreren aufeinanderfolgenden Zyklen statt. Nach jedem Zyklus wird ein definiertes Volumen in die Sammelflasche abgegeben, frisches Lösungsmittel aus der Lösungsmittelflasche in die Zelle transportiert und ein weiterer Extraktionszyklus gestartet. Am Ende der Extraktion wird mit Stickstoff gespült, um eventuelle Lösungsmittelrückstände aus den Leitungen des ASE-Systems zu entfernen. Die gesammelten Fraktionen der Extraktionszyklen können dann aus der Apparatur entnommen werden und, falls notwendig, weiterbehandelt werden.

3.3 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

(zusammengefasst aus [64, 69])

3.3.1 Grundlagen

Chromatographische Trennungen beruhen auf der Verteilung von Stoffen zwischen einer flüssigen oder gasförmigen mobilen Phase und einer festen oder flüssigen stationären Phase. Da in der vorliegenden Arbeit eine flüssige mobile Phase und eine feste stationäre Phase zum Einsatz kamen, also Hochleistungsflüssigchromatographie betrieben wurde, soll lediglich auf diese näher eingegangen werden.

Ein in mobiler Phase gelöstes Substanzgemisch wird auf eine Trennsäule aufgebracht und je nach Wechselwirkungsgrad mit der stationären Phase unterschiedlich schnell bei konstanter Flussgeschwindigkeit der mobilen Phase zum Ende der Säule und dem daran angeschlossenen Detektor transportiert. Die Verteilung eines Analyten zwischen der stationären und mobilen Phase wird durch den Verteilungskoeffizienten beschrieben:

$$K = \frac{c_S}{c_M} \qquad (3.12)$$

K ……. Verteilungskoeffizient

c_S ……. Konzentration des Analyten in der stationären Phase

c_M …… Konzentration des Analyten in der mobilen Phase

Moleküle, die nicht auf der Trennsäule retardiert werden (wie z.B. Moleküle der mobilen Phase), werden zur Zeit t_M (auch Totzeit genannt) detektiert. Substanzen, die mit der stationären Phase wechselwirken, werden je nach Stärke dieser Interaktion unterschiedlich lange retardiert und zu den entsprechenden Retentionszeiten t_R detektiert. Die Wanderungsgeschwindigkeit eines Analyten sowie die Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle der mobilen Phase sind in den folgenden Gleichungen dargestellt:

$$v = \frac{L}{t_R} \tag{3.13}$$

$$u = \frac{L}{t_M} \tag{3.14}$$

v ……. Wanderungsgeschwindigkeit des Analyten

u ……. Wanderungsgeschwindigkeit der mobilen Phase

t_R …… Retentionszeit des Analyten

t_M …… Totzeit

L ……. Länge der Säulenpackung

Das Verhältnis zwischen dem Verteilungskoeffizient und den Wanderungsgeschwindigkeiten wird wie folgt beschrieben:

$$v = u \cdot \frac{1}{1 + \mathrm{K} \cdot \frac{V_S}{V_M}} \tag{3.15}$$

V_S ……. Volumen der stationären Phase

V_M …… Volumen der mobilen Phase

Aus dieser Gleichung ist der Kapazitätsfaktor k´ ableitbar, welcher eine substanzspezifische Größe darstellt und zur qualitativen Analyse herangezogen werden kann. Der Kapazitätsfaktor ist direkt aus dem Chromatogramm ermittelbar.

$$k' = \mathrm{K} \cdot \frac{V_S}{V_M} = \frac{t_R - t_M}{t_M} \tag{3.16}$$

Eine weitere Kenngröße in der Chromatographie ist der Trenn- bzw. Selektivitätsfaktor α für zwei Substanzen A und B:

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M} \tag{3.17}$$

Zur Quantifizierung von Substanzen mittels HPLC können sowohl die Peakhöhe als auch die Peakfläche herangezogen werden. Bevorzugt wird jedoch die Auswertung über die Peakfläche, da diese mit der Zeit konstant bleibt, während sich die Peakhöhe durch Peakdispersion mit der Zeit verringert. Die Peakbreite wird stark von der Trennleistung, also der Säuleneffizienz, beeinflusst.

Die Effizienz einer Chromatographiesäule kann mit Hilfe zweier Parameter beschrieben werden, der Trennstufenhöhe und der Trennstufenzahl. Beide hängen über folgende Gleichung mit der Länge der Säule zusammen:

$$N = \frac{L}{H} \tag{3.18}$$

N ……. Trennstufenzahl

H ……. Trennstufenhöhe

Die Trennstufenhöhe ist definiert als das Verhältnis der Varianz eines Peaks und seiner Wanderungsstrecke:

$$H = \frac{\sigma_t^2 \cdot L}{t_R^2} \tag{3.19}$$

σ_t^2 ……. Varianz der Retentionszeit

Die Trennstufenzahl kann experimentell über die Retentionszeit und die Basisbreite des Peaks direkt aus einem Chromatogramm ermittelt werden:

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{\omega} \right)^2 \qquad (3.20)$$

ω ……. Basisbreite des Peaks

Besonders die Trennstufenhöhe hat Einfluss auf die Peakbreite. Um eine möglichst gute Trennleistung zu erreichen, wird daher versucht, diesen Parameter möglichst klein zu halten. Die Trennstufenhöhe wird von vier verschiedenen Faktoren beeinflusst:

$$H = H_{diff} + H_{conv} + H_{ex,S} + H_{ex,M} \qquad (3.21)$$

H_{diff} beschreibt die longitudinale Dispersion, H_{conv} die EDDY-Diffusion, die den Anteil der radialen Dispersion der Analytmoleküle (abhängig vom Partikeldurchmesser der stationären Phase) darstellt, und $H_{ex,S}$ sowie $H_{ex,M}$ den Massenübergang in der stationären und mobilen Phase.

Ein weiterer wichtiger Faktor in der Chromatographie ist die Auflösung, die ein Maß für die Peaktrennung ist. Für den Fall, dass die Kapazitätsfaktoren der beiden Substanzen A und B, deren Auflösung bestimmt werden soll, sehr ähnlich sind, gilt folgende Gleichung:

$$R_{AB} = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \cdot \frac{k'}{1 + k'} \qquad (3.22)$$

R_{AB} ……. Auflösung der Substanzen A und B

α ……. Selektivitätsfaktor

k´ …… Kapazitätsfaktor

Aufgrund der in Gleichung 3.22 dargestellten Zusammenhänge kann die chromatographische Trennung eines Substanzgemisches optimiert werden. Der Selektivitätsfaktor sowie der Kapazitätsfaktor können durch eine Änderung der Zusammensetzung der mobilen Phase sowie der stationären Phase beeinflusst werden, wobei der Selektivitätsfaktor den größten Einfluss auf die Trennleistung hat. Die Trennstufenzahl kann durch eine Änderung der Säulenlänge variiert werden.

3.3.2 "Reversed Phase"-Chromatographie

Bei der Umkehrphasenchromatographie werden im Gegensatz zur Normalphasenchromatographie apolare stationäre Phasen und polare mobile Phasen eingesetzt. Als Trägermaterialien dienen Kieselgel oder Aluminiumoxid, an deren Oberfläche Alkylchlorsilane gebunden wurden. Zumeist werden n-Octadecyl sowie n-Octyl als Alkylreste eingesetzt. Je länger der für das Säulenmaterial verwendete Alkylrest ist, desto länger werden Substanzen auf der Säule zurückgehalten und umso besser fällt die Trennleistung aus. Weiters hängt die Retentionszeit einer Substanz mit der Zusammensetzung der mobilen Phase zusammen. Als Elutionsmittel werden Wasser und mit Wasser mischbare Lösungsmittel, die unterschiedliche Polaritäten besitzen, wie z.B. Acetonitril, Methanol, Ethanol oder Tetrahydrofuran, verwendet. Reines Wasser ist wegen der apolaren stationären Phase für die Elution nicht geeignet, da sich für apolare Verbindungen die Retentionszeiten stark verlängern würden. Zu beachten ist auch, dass für die mobile Phase ein pH-Wert von ca. 7.5 nicht überschritten wird, da bei höheren pH-Werten die Siloxane hydrolisiert werden können, was die Zerstörung der Säulenpackung mit sich führt.

Ein bedeutender Vorteil der Umkehrpasenchromatographie liegt in der schnellen Gleichgewichtseinstellung zwischen der stationären und mobilen Phase, weshalb die Dauer für eine Systemäqulibrierung relativ kurz ist.

3.3.3 Aufbau einer HPLC-Apparatur

Der schematische Aufbau einer HPLC-Apparatur ist in Abb. 8 illustriert.

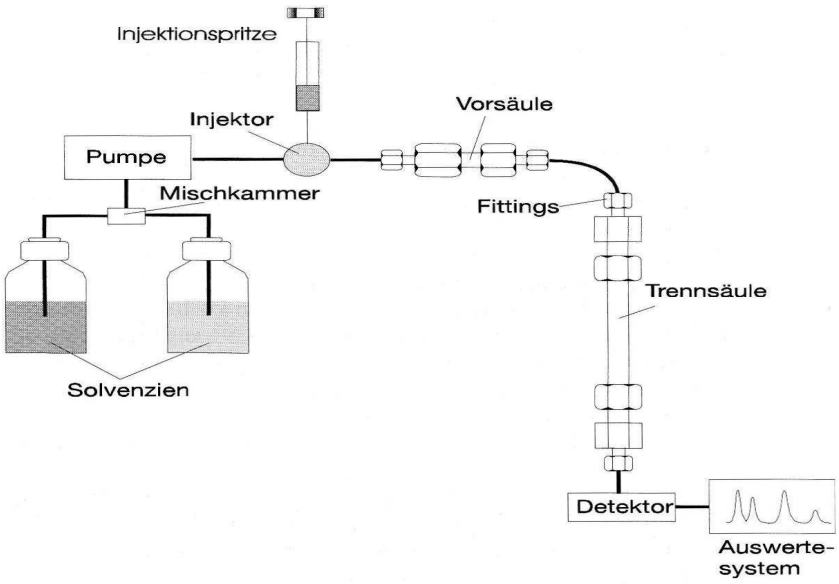


Abbildung 8: Aufbau einer HPLC-Apparatur [64]

Die mobilen Phasen werden in der Mischkammer in einem definierten Verhältnis vermischt und mit Hilfe einer Pumpe mit einer bestimmten Flussrate in das System transportiert. Mittels Injektor werden die Probelösungen in das System eingebracht, entweder händisch durch Verwenden einer Injektionsspritze oder automatisch durch Verwenden eines Autosamplers. Das Substanzgemisch gelangt über eine Vorsäule, die zum Schutz der Trennsäule vor Verunreinigungen aus der Probe oder der mobilen Phase dient, zur chromatographischen Trennsäule. Am Ende der Säule gelangen die getrennten Verbindungen in einen Detektor, welcher mit einem Auswertesystem verbunden ist. Das Auswertesystem speichert sämtliche Daten, die mit Hilfe einer speziellen Software bearbeitet werden können. Im Anschluss an den Detektor wird die mobile Phase in einem Sammelgefäß aufgefangen.

3.4 Coulometrischer Elektroden-Array-Detektor (CEAD)

(zusammengefasst aus [63, 70])

3.4.1 Grundlagen

Mit coulometrischen Elektroden-Array-Detektoren können elektroaktive Substanzen bei hoher Empfindlichkeit und hoher Selektivität mittels in Serie geschalteter Durchflusselektroden (zw. 4 und 16 Elektroden) detektiert und qualitative sowie quantitative Informationen über einen Analyten durch Messen des Stroms oder der elektrischen Ladung, die an der Arbeitselektrode umgesetzt wird, erhalten werden.

Erfolgt so wie in der vorliegenden Arbeit eine Kopplung mit HPLC, muss der mobilen Phase ein Leitelektrolyt (z.B. Phosphat-, Citrat- oder Acetatsalze) zugesetzt werden, der den Ladungstransport übernimmt.

3.4.2 Elektroden

Die Durchflusselektroden des CEAD werden in Serie geschaltet. Meistens sind in einem Zellblock vier dieser Durchflusselektroden angeordnet und es können bis zu vier dieser Zellblöcke gleichzeitig verwendet werden. In Abb. 9 ist die Anordnung der Elektroden in einem CEAD-Zellblock dargestellt.

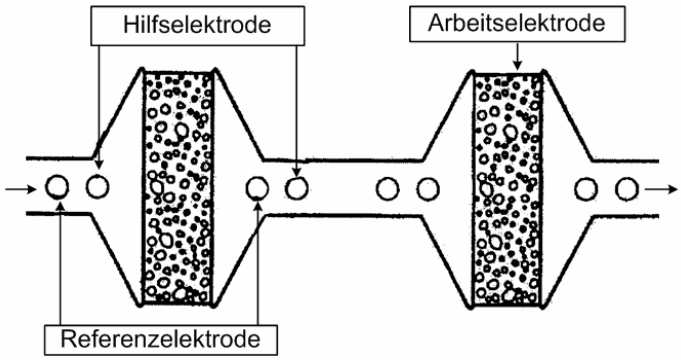


Abbildung 9: Darstellung zweier Kanäle eines CEAD-Zellblocks (modifiziert aus [70])

Wie aus Abb. 9 hervorgeht, werden in einem CEAD-System drei Elektroden verwendet: die Arbeitselektrode, die Referenzelektrode und die Hilfselektrode. Zwischen Arbeits- und Referenzelektrode wird eine konstante Spannung angelegt. Der durch elektrochemische Reaktionen an der Oberfläche der Arbeitselektrode fließende Strom wird durch Stromfluss in die Gegenrichtung an der Hilfselektrode ausgeglichen. Wird der Stromfluss als Funktion der Zeit aufgezeichnet, so ergeben sich Peaks, welche dann qualitative und quantitative Aussagen über einen Analyten ermöglichen. Der gemessene Strom rührt aber nicht nur von elektrochemischen Reaktionen der Analyte her, sondern auch von unerwünschten Redox-Reaktionen der mobilen Phase (Faradaysches Rauschen) sowie vom Material der Arbeitselektrode (Nicht Faradaysches Rauschen). Durch Verwendung geeigneter, hochreiner Chemikalien für die Herstellung der mobilen Phase und sorgfältige Wahl der Arbeitselektrode kann das Rauschen reduziert werden.

In dieser Arbeit wurde als Arbeitselektrode poröser Graphit verwendet, als Referenzelektrode eine Wasserstoff/Palladium-Elektrode und als Hilfselektrode Platin. Wasserstoff/Palladium-Elektroden werden bevorzugt in allen Durchflusszellen für CEAD verwendet, da sie sehr klein und stabil sind, nahe an der Arbeits- und Hilfselektrode platziert, nicht leicht vergiftet und auch bei hohen Drücken (bis zu 600 psi) eingesetzt werden können.

3.4.3 Strom-Spannungskurven

Werden an die Elektroden des CEAD Potentiale in bestimmten, selbst gewählten Inkrementen angelegt und der gemessene Strom gegen das entsprechende Potential aufgetragen, so erhält man Strom-Spannungskurven (Abb. 10), die substanzspezifisch sind und somit qualitative Informationen liefern.

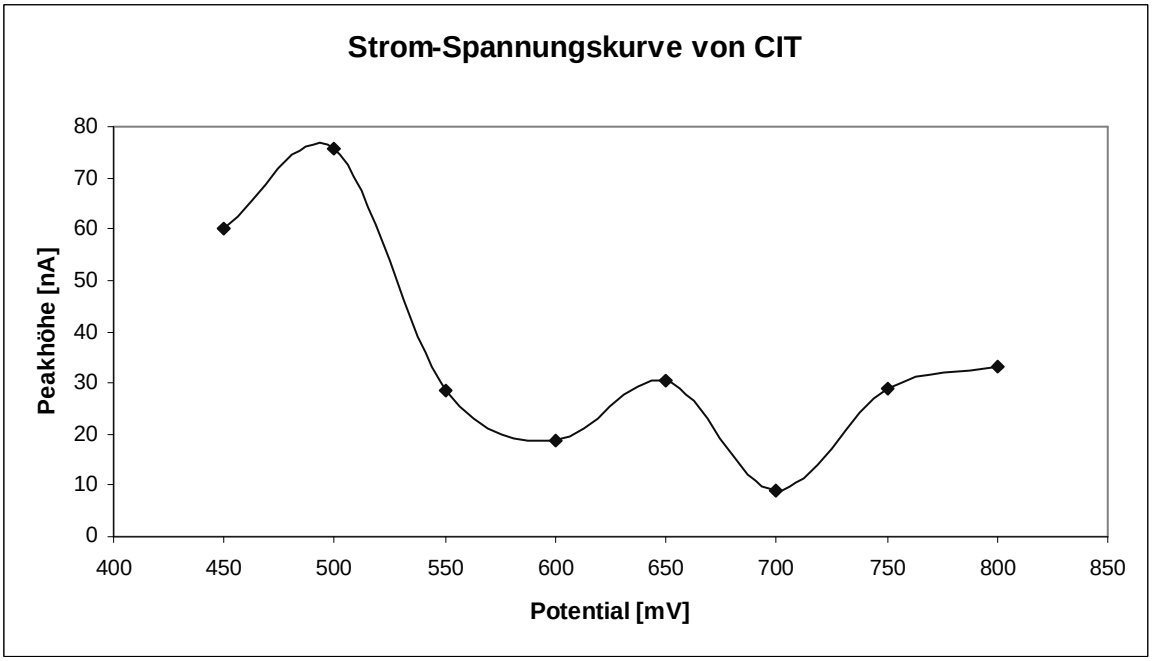


Abbildung 10: Strom-Spannungskurve von Citrinin in 0.05 M *ortho*-Phosphorsäure in 30% wässrigem ACN, ermittelt durch CEAD mit 8 Elektroden

3.4.4 Quantitative Information

Der Vorteil coulometrischer Detektoren liegt darin, dass die elektrochemische Umsetzung des Analyten beinahe zu 100% erfolgt. Da laut Faradayschem Gesetz der gemessene Strom proportional zur Stoffmenge des Reaktanten ist, kann aus dem erhaltenen Signal die Analytkonzentration ermittelt werden:

$$I = z \cdot F \cdot c \cdot V \qquad (3.23)$$

I …….. gemessener Strom (Stromsignal)
z ……. Anzahl der ausgetauschten Elektronen
F ……. Faraday-Konstante (96485.3 $C \cdot mol^{-1}$)
c ……. Analytkonzentration
V …..... Fließgeschwindigkeit

Quantifiziert werden kann mittels Eichgerade sowohl über die Peakhöhe als auch über die Peakfläche. Geht man davon aus, dass die Umsetzung eines Stoffes vollständig abläuft, so kann über die Peakfläche quantifiziert werden, da die Menge der geflossenen Ladung proportional zur Stoffmenge der Substanz ist:

$$Q = z \cdot F \int_{t_1}^{t_2} I dt = z \cdot F \cdot n = z \cdot F \cdot \frac{m}{M} \qquad (3.24)$$

Q …….. geflossene Ladung
n ……..... Stoffmenge
m …….... Masse
M …….. Molmasse

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Acetonitril, HPLC – Gradient Grade, VWR

Aluminiumoxid für die Chromatographie, sauer, 0.05-0.15 mm, pH 4.5±0.5, Fluka

ASE Prep DE, Diatomaceous Earth, Dionex

Bidestilliertes Wasser

Bisphenol A, 99%, Sigma

Borsäure, zur Analyse, Merck

Bulk Isolute Sorbent, Isolute HM – N, International Sorbent Technology Ltd

Chloroform für die Flüssigkeitschromatographie, LiChrosolv, Merck

Citrinin from Penicillium citrinum, ≥98% (TLC), Fluka

Essigsäure, Rotipuran 100% p.a., Carl Roth GmbH + Co. KG

Essigsäureethylester, puriss. p.a. ≥99.5% (GC), Fluka

Ethanol 96%, reinst, Merck

Genistein (4´, 5, 7-Trihydroxyisoflavon), Minimum 98%, Sigma

Kaliumchlorid, p.a., Merck

Lithiumchlorid, zur Analyse, Merck

Methanol, Chromanorm for HPLC – Gradient Grade, VWR

Methanol, LiChrosolv, Gradient Grade für LC, Merck

Natriumhydroxid-Plätzchen zur Analyse, Merck

ortho-Phosphorsäure 85%, p.a., Merck

Stickstoff, verdichtet, Standardqualität (technisch), Air Liquide Austria GmbH

Sartolon Polyamid-Filter, 0.45 µm Porengröße, 47 mm Durchmesser, Sartorius Stedim Biotech GmbH

Nylon 66 Membranes, 0.45 µm Porengröße, 47 mm Durchmesser, Supelco

4.2 Verwendetes Probenmaterial

Natur&Reform Bio-Roggen aus kontrolliert biologischem Anbau
Spar Natur pur Bio-Weizen-Vollmehl
Spar Natur pur Bio-Dinkel-Vollmehl
Güllüler Maismehl

4.3 Herstellen der Lösungen

4.3.1 Lösungen für die Voltammetrie

Britton-Robinson-Puffer:	250 µL Essigsäure 250 µL *ortho*-Phosphorsäure 0.25 g Borsäure 75 mL Methanol ad 100 mL mit bidestilliertem Wasser
CIT-Standardlösung:	2.2 mg Citrinin wurden in 25 mL Methanol 15 min im Ultraschallbad gelöst, aliquotiert und bei -18°C gelagert (c = 88 mg CIT/L)
CIT-Messlösung:	je nach gewünschter CIT-Konzentration der Lösung entsprechendes Volumen an CIT-Standardlösung, mit Britton-Robinson-Puffer ad 10 mL
3 M NaOH:	12 g NaOH in ca. 50 mL bidest. H_2O lösen, nach dem Abkühlen auf RT mit bidest H_2O ad 100 mL auffüllen

4.3.2 Lösungen für die ASE und Extraktaufarbeitung

CIT-Standardlösung:	1 mg Citrinin wurde in 25 mL Methanol 15 min im Ultraschallbad gelöst, aliquotiert und bei -18°C gelagert (c = 40 mg CIT/L)
CIT-Vergleichsstandard:	entsprechendes Volumen an CIT-Standardlösung, mit dem jeweiligen Extraktionsmittel ad 1 mL
Extraktionsmittel:	100% Methanol Methanol/Wasser (80/20, v/v) Ethanol/Wasser (80/20, v/v) 100% Essigsäureethylester

Lösungsmittel zur Aufnahme nach Eindampfen am Rotavapor:

Methanol/Wasser(50/50, v/v)

ACN/Wasser (30/70, v/v)

4.3.3 Lösungen für die HPLC

4.3.3.1 Methode 1: Isokratische Elution

CIT-Urstandardlösung:	1 mg Citrinin wurde in 25 mL Methanol 15 min im Ultraschallbad gelöst, aliquotiert und bei -18°C gelagert (c = 40 mg CIT/L)
CIT-Standardlösung:	entsprechendes Volumen an CIT-Urstandardlösung mit dem jeweiligen Laufmittelgemisch ad 1 mL
BPA-Standardlösung:	10 mg Bisphenol A wurden in 25 mL Methanol gelöst, aliquotiert und bei -18°C gelagert (c = 400 mg/L)
GEN-Standardlösung:	1.939 mg Genistein wurden in 10 mL Methanol gelöst, aliquotiert und bei -18°C gelagert (c = 193,9 mg/L)
CIT-GEN-Standardlösung:	CIT-Urstandardlösung und GEN-Standardlösung in den entsprechenden Volumina und mit mobiler Phase ad 1 mL
3 M NaOH:	12 g NaOH in ca. 50 mL bidest. H_2O lösen, nach dem Abkühlen auf RT mit bidest H_2O ad 100 mL auffüllen
Laufmittelgemische:	3.368 mL *ortho*-Phosphorsäure (0.05 M in 1 L) wurden in einem 1 L-Messkolben mit dem entsprechenden Volumen Methanol vermischt, mit bidest. H_2O bis knapp unter der Markierung aufgefüllt, mit 3 M NaOH ein pH-Wert von 3.0 eingestellt und mit bidest. H_2O auf 1 L aufgefüllt. Das Laufmittel wurde durch Filter mit einer Porengröße von 0.45 µm filtriert und mindestens 20 min im Ultraschallbad entgast.

4.3.3.2 Methode 2: Gradientenelution

Mobile Phase A: 3.368 mL *ortho*-Phosphorsäure (0.05 M in 1 L) wurden in einem 1 L-Messkolben mit 300 mL ACN versetzt, mit bidest. H_2O bis knapp unter der Markierung aufgefüllt, mit 3 M NaOH ein pH-Wert von 3.3 eingestellt und mit bidest. H_2O auf 1 L aufgefüllt. Das Laufmittel wurde durch Filter mit einer Porengröße von 0.45 µm filtriert und mindestens 20 min im Ultraschallbad entgast.

Mobile Phase B: 3.368 mL *ortho*-Phosphorsäure (0.05 M in 1 L) wurden in einem 1 L-Messkolben mit 200 mL ACN versetzt, mit bidest. H_2O bis knapp unter der Markierung aufgefüllt, mit 3 M NaOH ein pH-Wert von 3.3 eingestellt und mit bidest. H_2O auf 1 L aufgefüllt. Das Laufmittel wurde durch Filter mit einer Porengröße von 0.45 µm filtriert und mindestens 20 min im Ultraschallbad entgast.

Mobile Phase C: 3.368 mL *ortho*-Phosphorsäure (0.05 M in 1 L) wurden in einem 1 L-Messkolben mit 500 mL ACN versetzt, mit bidest. H_2O bis knapp unter der Markierung aufgefüllt, mit 3 M NaOH ein pH-Wert von 3.3 eingestellt und mit bidest. H_2O auf 1 L aufgefüllt. Das Laufmittel wurde durch Filter mit einer Porengröße von 0.45 µm filtriert und mindestens 20 min im Ultraschallbad entgast.

CIT-Urstandardlösung, CIT-Standardlösung und 3 M NaOH siehe 4.3.3.1

4.4 Verwendete Geräte

4.4.1 Allgemeine Laborausrüstung

Centrifuge 5413, Eppendorf
pH-Meter, 691, Metrohm
Rotavapor R-114, Büchi
Sonorex Super RK103H, Bandelin
Waterbath B-480, Büchi
Mettler AT400, Mettler

4.4.2 Voltammetrie

Polarographic Analyser, Model 384, EG&G Princeton Applied Research
Elektrodenstand, Model 303, EG&G Princeton Applied Research
    Arbeitselektrode: aus glasartigem Kohlenstoff
    Referenzelektrode: Silber/Silberchlorid/Kaliumchlorid (gesättigt)
    Gegenelektrode: Platin
Digital Plotter, RE 0082, EG&G Princeton Applied Research

4.4.3 ASE

ASE 100, Accelerated Solvent Extractor, Dionex

4.4.4 HPLC-CEAD

L-6200 Intelligent Pump, Merck Hitachi
AS-2000A Autosampler, Merck Hitachi
ACE 3 C18, 150 x 3.0 mm, 3 µm, ACE HPLC Columns
Säulenofen, Merck Hitachi
CoulArray-Detektor, Modell 5600 mit Auswertesoftware CoulArrayWin, esa
    Arbeitselektrode: poröser Graphit
    Referenzelektrode: Wasserstoff/Palladium
    Hilfselektrode: Platin

4.5 Voltammetrische Voruntersuchungen

Um CIT später nach Trennung auf einer HPLC-Säule mittels CEAD optimal detektieren zu können, musste das elektrochemische Verhalten der Substanz untersucht werden. Dazu wurden sowohl das Reduktions- als auch das Oxidationsverhalten des Mykotoxins als auch die pH- und Konzentrationsabhängigkeit des Signals an einer glasartigen Kohlenstoffelektrode überprüft.

4.5.1 Aufnahme der Grundstromkurve und Konditionieren der Elektrode

Um reproduzierbar messen zu können, war es zu Beginn jeder Messserie notwendig, die glasartige Kohlenstoffelektrode zu konditionieren. Im Fall der kathodischen Untersuchung (Reduktion) des Citrinins wurde die Elektrode zuerst anodisch im Bereich von 0 bis + 1.3 V und dann kathodisch im Bereich von 0 bis -1.2 V polarisiert. Für die anodische Untersuchung (Oxidation) des Citrinins wurde in der umgekehrten Reihenfolge vorgegangen. Hierbei wurde das Elektrodensystem im Grundelektrolyten (Britton-Robinson-Puffer, enthält 75% Methanol und 25% bidestilliertes Wasser, pH 2.3) eingetaucht und die Grundstromkurve zuerst im kathodischen Bereich (0 bis -1.2 V) und anschließend im anodischen Bereich (0 bis +1.3 V) aufgenommen. Die Messparameter für die Aufnahme der Grundstromkurven werden in Tab. 4 aufgezeigt.

Tabelle 4: Experimentelle Bedingungen für die Aufnahme der Grundstromkurven im kathodischen und anodischen Potentialbereich

Method	DPP - Blank
Purge Time	240 sec
Initial Potential	0 V
End Potential	- 1.2 V
Deposition Time	0 sec
Equilibration Time	0 sec
Pulse Height	0.05 V
Scan Rate	2 mV/sec
Tangent Fit	Yes

Method	DPP - Blank
Purge Time	240 sec
Initial Potential	0 V
End Potential	+ 1.3 V
Deposition Time	0 sec
Equilibration Time	0 sec
Pulse Height	0.05 V
Scan Rate	2 mV/sec
Tangent Fit	Yes

Zwischen den einzelnen Messungen mit CIT-Messlösungen wurde eine Konditionierung der Elektrode mit dem Grundelektrolyt durchgeführt. Dazu wurde bei der Untersuchung des Oxidationsverhaltens die Elektrode im DCS-Modus wieder zuerst im kathodischen und darauffolgend im anodischen Bereich konditioniert. Für die Untersuchung des Reduktionsverhaltens des Citrinins wurde genau umgekehrt vorgegangen, also die Elektrode zuerst anodisch und anschließend kathodisch konditioniert. Die Geräteeinstellungen sind in Tab. 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: DCS-Konditionierungsmethode

Method	DCS - Blank
Purge Time	0 sec
Initial Potential	- 1.2 V
End Potential	- 1.2 V
Deposition Time	120 sec
Equilibration Time	0 sec

Method	DCS - Blank
Purge Time	0 sec
Initial Potential	+ 1.3 V
End Potential	+ 1.3 V
Deposition Time	120 sec
Equilibration Time	0 sec

4.5.2 Untersuchung des Redox-Verhaltens von CIT

Nach Konditionierung der glasartigen Kohlenstoffelektrode im kathodischen bzw. anodischen Bereich wurden die Reduktion bzw. die Oxidation von Citrinin untersucht.

4.5.2.1 Reduktion von CIT

Eine CIT-Messlösung (siehe 4.3.1) mit c (CIT) = 44 mg/L (pH 2.4) wurde an der glasartigen Kohlenstoffelektrode mit der Methode der Differential-Puls-Polarographie im kathodischen Bereich (0 bis -1.2 V) mit den in Tab. 6 dargestellten Parametern vermessen.

Tabelle 6: Messmethode für die Reduktion von CIT

Method	DPP - Sample
Purge Time	240 sec
Initial Potential	0 V
End Potential	- 1.2 V
Deposition Time	0 sec
Equilibration Time	0 sec
Pulse Height	0.05 V
Scan Rate	2 mV/sec
Tangent Fit	Yes

4.5.2.2 Oxidation von CIT

Um das Oxidationsverhalten zu untersuchen, wurde eine CIT-Messlösung (c = 44 mg/L, pH 2.4) im anodischen Bereich (0 bis +1.3 V) der glasartigen Kohlenstoffelektrode gescannt. Die Methodenparameter sind in Tab. 7 illustriert.

Tabelle 7: Messmethode für die Oxidation von CIT

Method	DPP - Sample
Purge Time	240 sec
Initial Potential	0 V
End Potential	+ 1.3 V
Deposition Time	0 sec
Equilibration Time	0 sec
Pulse Height	0.05 V
Scan Rate	2 mV/sec
Tangent Fit	Yes

4.5.3 Untersuchung der pH-Abhängigkeit des Signals

Es wurde eine CIT-Messlösung (siehe 4.3.1) mit einer Konzentration von 8.8 mg CIT/L in Britton-Robinson-Puffer hergestellt und der pH-Wert der Lösung gemessen (pH = 2.4). Nach jeder Messung, die mit der in Tab. 7 dargestellten Methode durchgeführt wurde, wurde der pH-Wert der Lösung um ca. 0.5 Einheiten mit 3 M NaOH erhöht und die Lösung nach Konditionierung mit der DCS-Konditionierungsmethode erneut vermessen.

4.5.4 Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit des Signals

Für die Aufstellung einer Kalibriergeraden wurden fünf CIT-Messlösungen mit den Konzentrationen 0.625, 1.25, 2.5, 5 und 10 mg/L in Britton-Robinson-Puffer hergestellt und der pH-Wert der Lösungen auf 3.5 mit 3 M NaOH eingestellt. Diese Lösungen wurden mit den in Tab. 7 genannten Geräteeinstellungen im anodischen Bereich vermessen.

4.6 Entwicklung einer Extraktionsmethode mittels ASE

Damit CIT aus verschiedenen Cerealienmatrices möglichst schnell und ohne hohen Arbeits- und Kostenaufwand gelöst werden kann, sollte eine Extraktion mittels ASE entwickelt werden.

Alle HPLC-Analysen, die im Zuge der Methodenentwicklung der ASE-Extraktion notwendig waren, wurden mit der in Kapitel 5.3.1.6 dargestellten HPLC-CEAD-Methode ausgeführt.

4.6.1 Ermittlung des idealen Extraktionsmittels sowie der optimalen Extraktionstemperatur

Um CIT aus Cerealienmatrices zu extrahieren, wurden verschiedene Lösungsmittel bei verschiedenen Temperaturen getestet und so die idealen Extraktionsparameter ermittelt. Sämtliche Optimierungsversuche wurden mit einer gemahlenen Bio-Roggen-Matrix durchgeführt.

4.6.1.1 Probenvorbereitung

Es wurden 50 g Bio-Roggen gemahlen und 1 g Aliquote vorbereitet. Dann wurde je 1 g Bio-Roggen mit 3 g Diatomeenerde homogenisiert und in einer 10 mL ASE-Zelle auf eine Lage von 0.5 g aktiviertem Aluminiumoxid (Aktivierung: 15 h bei 350°C) aufgebracht. Die Zelle wurde verschlossen und in das ASE-System eingebracht.

Alle Optimierungsversuche wurden jeweils in Doppelansätzen mit ungespikten und mit CIT gespikten Proben durchgeführt. Dazu wurde 1 g der gemahlenen Bio-Roggen-Probe mit 125 µL CIT-Standardlösung (c = 40 mg CIT/L) versetzt, mit 3 g Diatomeenerde homogenisiert und anschließend in die ASE-Zelle überführt.

4.6.1.2 Untersuchung der Extraktionseffizienz verschiedener Lösungsmittel bei unterschiedlichen Extraktionstemperaturen

Die Extraktionen wurden mit 100% Methanol sowie Methanol/Wasser (80/20, v/v) bei den Temperaturen 40°C, 60°C und 80°C durchgeführt. Es wurden die in Tab. 8 dargestellten Extraktionsparameter verwendet.

Tabelle 8: ASE-Parameter

Temperatur	40°C, 60°C oder 80°C
Zyklusdauer	5 min
Zyklenzahl	4
Spülvolumen	70%

Da sich eine Extraktionstemperatur von 80°C als zu hoch erwies, wurden die Extraktionen mit Ethanol/Wasser (80/20, v/v) sowie mit 100% Essigsäureethylester nur noch bei Extraktionstemperaturen von 40°C und 60°C ausgeführt, die weiteren ASE-Parameter wurden beibehalten.

4.6.1.3 Aufarbeitung der Extrakte

Die gewonnenen Extrakte wurden unter Nachspülen mit dem jeweiligen Extraktionsmittel in 100 mL Spitzkolben transferiert und am Rotavapor bei einer Wasserbadtemperatur von 40°C zur Gänze abgedampft. Die Rückstände wurden mit ca. 3 mL Methanol/Wasser (50/50, v/v) 10 min im Ultraschallbad gelöst, unter Nachspülen mit Methanol/Wasser (50/50, v/v) in einen 5 mL-Messkolben überführt und auf 5 mL aufgefüllt. Ein Milliliter eines solchen Extraktes wurde 10 min bei 10000 rpm zentrifugiert und der Überstand zur Analyse mittels HPLC-CEAD in ein HPLC-Vial transferiert.

4.6.2 Auswirkungen von Aluminiumoxid auf die Extraktion

Um eine Beeinflussung der Wiederfindung durch das verwendete Aluminiumoxid auszuschließen, wurde auf dessen Zusatz in der Zelle verzichtet. Dabei wurde ein Filter in die Zelle eingebracht und direkt auf diesen das Proben-Diatomeenerde-Homogenisat aufgebracht. Die Versuche wurden wieder in Doppelbestimmungen jeweils mit CIT versetzt (Spikelevel 5 µg CIT/g Probe) und ungespikt durchgeführt. Als Lösungsmittel diente Methanol/Wasser (80/20, v/v) bei Extraktionstemperaturen von 40°C und 60°C. Die weiteren ASE-Parameter wurden wie in Tab. 8 beschrieben gewählt. Die Aufarbeitung der Extrakte erfolgte wie in 4.6.1.3 beschrieben.

4.6.3 Optimierung der Zyklenzahl

Bei allen bisher durchgeführten Versuchen wurden 4 Zyklen zu je 5 min zur Extraktion von CIT angewendet. Um die Extraktion zu beschleunigen, wurde die Extraktionseffizienz mit Methanol/Wasser (80/20, v/v) bei 40°C und 3 Zyklen zu je 5 min überprüft. Auch dieser Optimierungsversuch wurde im Doppelansatz mit gespikten Bio-Roggen-Proben (Spikelevel 5 µg CIT/g Probe) durchgeführt. Die Aufarbeitung der gewonnenen ASE-Extrakte erfolgte wie oben beschrieben.

4.6.4 Adaption der Probenmenge und des Probenvolumens

In den oben genannten Experimenten wurde eine Probenmenge von 1 g gemahlenem Bio-Roggen verwendet und nach der Extraktion mittels ASE auf ein Probenvolumen von 5 mL gebracht. Es wurden auch Versuche mit 2 g Probe, homogenisiert mit 2 g Diatomeenerde, durchgeführt. Auch hier wurde zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse ein Spikelevel von 5 µg CIT/g Probe gewählt. Nach der Extraktion in 3 Zyklen zu je 5 min mit Methanol/Wasser (80/20, v/v) bei 40°C wurde der Extrakt am Rotavapor bei einer Wasserbadtemperatur von 40°C zur Gänze eingedampft, in ca. 900 µL Methanol/Wasser (50/50, v/v) 10 min im Ultraschallbad gelöst, in einen 1 mL-Messkolben transferiert und auf 1 mL aufgefüllt. Anschließend wurde der Extrakt 10 min bei 10000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein HPLC-Vial überführt.

4.6.5 Ermittlung der Wiederfindung

Um die Ausbeute an zugesetztem Citrinin zu bestimmen, wurde eine CIT-Standardlösung mit einer Konzentration in der Höhe des Spikelevels (umgerechnet 1 mg/L) in Methanol/Wasser (50/50, v/v) hergestellt und in allen HPLC-Läufen mitinjiziert. Die Wiederfindung des zu Proben zugesetzten CITs wurde dann als Prozentsatz der gemessenen Peakhöhe bzw. Peakfläche des CIT-Peaks in der Probe im Vergleich zur gemessenen Peakhöhe bzw. Peakfläche des CIT-Standardpeaks berechnet.

$$Wiederfindung[\%] = \frac{Peakhöhe\,(\mathrm{Pr}obe)}{Peakhöhe\,(S\tan dard)} \cdot 100 \quad \text{bzw.} \quad \frac{Peakfläche\,(\mathrm{Pr}obe)}{Peakfläche\,(S\tan dard)} \cdot 100$$

4.7 Entwicklung einer HPLC-CEAD-Methode zur Trennung und Detektion von Citrinin

Citrinin ist, wie in den voltammetrischen Voruntersuchungen gezeigt werden konnte, elektrochemisch aktiv und daher zur Detektion mittels coulmetrischem Elektroden-Array-Detektor geeignet. Da eine solche Methode bisher in der Literatur nicht beschrieben wurde, sollte eine Methode entwickelt werden, die nach der Trennung mittels HPLC Citrinin elektrochemisch detektiert und quantitativ anzeigt.

Für sämtliche HPLC-CEAD-Analysen wurden die in Kapitel 4.4.4 aufgelisteten Geräte verwendet.

4.7.1 Methode 1 : Isokratische Elution

4.7.1.1 Ermittlung eines geeigneten Elutionsmittels

Zur chromatographischen Trennung von CIT auf einer ACE 3 C18-Säule musste zuerst ein geeignetes Elutionsmittel gefunden werden. Dazu wurden verschiedene Laufmittelgemische mit *ortho*-Phosphorsäure als Leitsalz (siehe Tab. 9) hergestellt. Es wurden jeweils 20 µL der CIT-Standardlösung (c = 4 mg/L) in das HPLC-System injiziert, im jeweiligen Laufmittelgemisch eluiert und bei Potentialen von + 100, +200, +300, +400, +500, +600, +700 und +800 mV mittels CEAD detektiert. Die Laufzeit wurde bei einer Flussrate von 0.3 mL/min auf 30 min beschränkt.

Tabelle 9: Zusammensetzung verschiedener Laufmittelgemische zur Ermittlung eines geeigneten Elutionsmittels

Laufmittelgemisch 1	0.05 M *ortho*-Phosphorsäure in 80% wässrigem Methanol, pH 3.0
Laufmittelgemisch 2	0.05 M *ortho*-Phosphorsäure in 60% wässrigem Methanol, pH 3.0
Laufmittelgemisch 3	0.05 M *ortho*-Phosphorsäure in 40% wässrigem Methanol, pH 3.0
Laufmittelgemisch 4	0.05 M *ortho*-Phosphorsäure in 50% wässrigem Methanol, pH 3.0

Die Eignung der unterschiedlichen Elutionsmittel wurde auch an einer mit CIT versetzten Bio-Roggenprobe getestet. Dazu wurden 20 µl eines mit 1 mg CIT/g gespikten Roggenextraktes in das HPLC-System injiziert und die Substanzen bei den oben genannten Bedingungen chromatographisch getrennt und detektiert.

4.7.1.2 Aufnahme einer Strom-Spannungskurve von Citrinin

Zur Erstellung einer Strom-Spannungskurve wurden 20 µL einer CIT-Standardlösung mit einer Konzentration von 1 mg/L in mobiler Phase in das HPLC-System injiziert und bei Potentialen von +450, +500, +550, +600, +650, +700, +750 und +800 mV detektiert. Anschließend wurden die Potentiale gegen die gemessenen Stromflüsse aufgetragen und durch Verbinden der Punkte eine Strom-Spannungskurve gezeichnet.

4.7.1.3 Suche nach einem internen Standard

Es wurden zwei verschiedene Substanzen auf ihre Eignung als interner Standard untersucht: Bisphenol A und Genistein. Dazu wurden je eine 1 mg/L BPA-Lösung sowie eine 1 mg/L GEN-Lösung durch Verdünnen der BPA- bzw. GEN-Standardlösung mit mobiler Phase hergestellt und mittels HPLC-CEAD bei den Potentialen +450, +500, +550, +600, +650, +700, +750 und +800 mV analysiert. Anschließend wurde eine CIT-GEN-Standardlösung mit Konzentrationen von jeweils 1 mg/L in mobiler Phase hergestellt, ebenso wurde ein Roggenextrakt mit CIT und GEN in Konzentrationen von je 1 mg/L versetzt und analysiert.

4.7.1.4 Eichgerade, Nachweisgrenze

Zuerst wurden vier CIT-Standardlösungen im Konzentrationsbereich zwischen 0.1 und 25 µg/L hergestellt, 100 µL in die HPLC-CEAD-Apparatur injiziert, mit der mobilen Phase 4 bei einer Fließgeschwindigkeit von 0.3 mL/min eluiert und bei Potentialen von +450, +500, +550, +600, +650, +700, +750 und +800 mV detektiert. Zur Bestimmung der Nachweisgrenze wurden die Signale des Citrinins im optimalen Detektionskanal bei +600 mV ausgewertet. Die Nachweisgrenze des Citrinins wurde aus dem Rauschen in einem Chromatogramm ermittelt, der Wert des dreifachen Rauschens in die Kalibrierfunktion eingesetzt und die entsprechende CIT-Konzentration berechnet.

Die Nachweisgrenze in Bio-Roggen wurde durch Bestimmung des 3-fachen Rauschens der Basislinie im Bereich des CIT-Peaks (zwischen 14 und 19 min) in einem Chromatogramm einer ungespikten Bio-Roggenprobe und anschließende Umrechnung des Wertes des dreifachen Rauschens auf die Konzentration an CIT mit Hilfe der Eichgeraden ermittelt.

4.7.1.5 Bestimmung der Reproduzierbarkeit

Die Intraday- sowie die Interday-Reproduzierbarkeit wurde für den optimalen Detektionskanal bei +600 mV ermittelt.

Für die Bestimmung der Intraday-Reproduzierbarkeit wurde eine CIT-Standardlösung mit c = 100 µg/L in mobiler Phase hergestellt, fünf Mal hintereinander je 20 µL injiziert und das Citrininsignal bei +600 mV ermittelt. Anschließend wurden der Mittelwert, die Standardabweichung sowie die relative Standardabweichung des Signals berechnet.

Die Interday-Reproduzierbarkeit wurde durch Messung einer 100 µg/L CIT-Standardlösung (Injektionsvolumen 20 µL) an fünf unabhängigen Tagen und Berechnung des Mittelwerts, der Standardabweichung sowie der relativen Standardabweichung für das Citrininsignal bei einem Potential von +600 mV ermittelt.

4.7.1.6 Analyse von Bio-Roggen-Proben

Es wurden Dreifachansätze von jeweils 2 g gemahlenem Bio-Roggen mit Citrinin versetzt (0.5 µg CIT/g Probe) und unter Einstellung der optimalen ASE-Parameter (siehe Tab. 12) extrahiert. Die Extrakte wurden am Rotavapor zur Gänze eingedampft, in ca. 900 µL Methanol/Wasser (50/50, v/v) 10 min im Ultraschallbad gelöst, mit 10 µL der Genisteinstandardlösung (das entspricht 2 mg/L GEN) als internem Standard versetzt und mit Methanol/Wasser (50/50, v/v) auf 1 mL aufgefüllt. Diese Lösung wurde 10 min bei 10000 rpm zentrifugiert, der Überstand in ein HPLC-Vial überführt und mittels HPLC-CEAD vermessen. Folgende Einstellungen wurden für die HPLC-CEAD gewählt: 0.3 mL/min Flussrate, 100 µL Injektionsvolumen, 2 Injektionen pro Vial, Potentiale zwischen +450 und +800 mV in 50 mV-Inkrementen und eine Laufzeit von 25 min.

4.7.2 Analysenprobleme und deren Behebung

Im Zuge der weiteren Untersuchungen, die für die vorliegende Arbeit durchgeführt wurden, traten einige Probleme auf, die letzten Endes zur Entwicklung einer Gradientenelutionsmethode zur Trennung und Detektion von CIT mittels HPLC-CEAD führten. Die aufgetretenen Probleme und die angewendeten Lösungsansätze werden im folgenden Kapitel sowie in Kapitel 5.3.2 beschrieben.

4.7.2.1 Regenerieren der Chromatographie-Säule

Da die Säule nach mehreren Injektionen der Extrakte an Trennleistung verloren hatte und die Peaks von CIT und GEN weder in gespikten Proben noch in Standardlösungen auch nach Erneuerung der Vorsäule getrennt waren, wurde die Säule mittels einer nach [71] modifizierten Prozedur zur Regeneration von Octadecyl-, Octyl-, Phenyl- und Nitrilsäulen behandelt. Bei einer Flussrate von 0.5 – 2 mL/min unter Einhaltung eines Maximaldruckes von 140 bar wurden folgende Lösungsmittel für je mind. 2 h durch die Säule, nicht aber durch die CEAD-Zellen, geleitet:

1. bidest. H_2O, während dessen wurden 6 Mal je 100 µL DMSO injiziert
2. Methanol
3. Chloroform
4. Methanol

Anschließend wurde das HPLC-System mit der regenerierten Säule und den CEAD-Zellen über Nacht mit mobiler Phase äquilibriert.

4.7.2.2 Ändern der mobilen Phase 1

Nach der Regeneration und Äquilibrierung der Säule wurde mit den bisher angegebenen Parametern ein CIT-GEN-Standard (Konz. der beiden Substanzen jeweils 1 mg/L) injiziert. Da hier allerdings erneut keine Trennung der beiden Substanzen voneinander auftrat, wurde der Versuch noch einmal mit veränderter Laufmittelzusammensetzung durchgeführt. Als Laufmittel diente 0.05 M *ortho*-Phosphorsäure in 45% wässrigem Methanol, pH 3.0 und die Laufzeit wurde auf 40 min verlängert. Alle weiteren HPLC-Parameter wurden beibehalten. Da der Standardversuch eine Peaktrennung zeigte, wurden auch mit 0.25 µg CIT/g gespikte Bio-Roggen-Proben extrahiert und analysiert.

4.7.2.3 Einbau eines Säulenofens

Aufgrund der immer wiederkehrenden Peaküberlappung von Citrinin und Genistein wurde der Einfluss der Temperatur auf die Trennung in Erwägung gezogen und ein Säulenofen eingebaut. Die Temperatur wurde bei 20°C konstant gehalten und eine CIT-GEN-Standardlösung injiziert (mobile Phase: 0.05 M *ortho*-Phosphorsäure in 45% wässrigem Methanol, pH 3.0). Es zeigte sich, dass die eingestellte Laufzeit von 40 min zu kurz war, woraufhin die Laufzeit auf 50 min verlängert wurde. Anschließend wurden Standard- und mit 0.5 µg CIT/g gespikte Probelösungen vermessen.

4.7.2.4 Ändern der mobilen Phase 2

Da es durch die Einstellung der Säulentemperatur auf 20°C zu einer Laufzeitverlängerung auf 50 min gekommen war, sollte die Laufzeit durch Verwendung einer mobilen Phase mit ACN als organische Komponente verkürzt werden. Es wurde ein Laufmittelgemisch mit 0.05 M *ortho*-Phosphorsäure in 25% wässrigem ACN, pH 3.0 hergestellt und eine CIT-GEN-Standardlösung als auch mit 0.5 µg CIT/g gespikte Bio-Roggenproben bei einer Flussrate von 0.4 mL/min, einer Laufzeit von 35 min und Potentialen von +450 bis +800 mV in 50 mV-Inkrementen analysiert.

4.7.2.5 Analysen mit Methode 1 (isokratische Elution) nach Erneuerung der HPLC-Säule

Nachdem alle bisherigen Lösungsversuche erfolglos blieben, wurde eine neue ACE 3 C18-Säule in das HPLC-System eingebaut. Die folgenden chromatographischen Trennungen wurden mit 0.05 M *ortho*-Phosphorsäure in 50% wässrigem Methanol, pH 3.0 als Elutionsmittel durchgeführt. Es wurden CIT-GEN-Standardlösungen und mit 0.5 µg CIT/g gespikte Bio-Roggen-Extrakte analysiert. Mit der neuen Säule musste die Flussgeschwindigkeit von 0.3 ml/min auf 0.25 mL/min reduziert werden, was zu einer Verlängerung der Laufzeit auf 45 min führte. Die Säulentemperatur wurde mit 20°C, das Injektionsvolumen mit 100 µL und die Detektorpotentiale mit +450 bis +800 mV in 50 mV-Inkrementen gewählt.

4.7.2.6 Entwicklung einer Gradientenelutionsmethode

Da Methode 1 (isokratische Elution) auch mit der neuen Chromatographiesäule nicht wieder zur Analyse von CIT mittels HPLC-CEAD geeignet war, sollte eine Trennmethode entwickelt werden, die einen Gradienten zur Elution von Citrinin verwendet.

Es wurden zwei neue Laufmittelgemische hergestellt (siehe Tab. 10) und folgender Gradient programmiert:

0 min	100% A	0% B
7 min	100% A	0% B
17 min	0% A	100% B
20 min	100% A	0% B
25 min	100% A	0% B

Tabelle 10: Elutionsmittel zur Entwicklung einer Gradientenmethode

Laufmittelgemisch A	0.05 M *ortho*-Phosphorsäure in 30% wässrigem ACN, pH 3.3
Laufmittelgemisch B	0.05 M *ortho*-Phosphorsäure in 20% wässrigem ACN, pH 3.3

Es wurde eine Standardlösung mit 1 mg/L Citrinin und 2 mg/L Genistein in ACN/Wasser (30/70, v/v) injiziert und das Gradientenprogramm bei einer Flussrate von 0.4 mL/min und einer Säulentemperatur von 20°C durchlaufen. Da die Peaks der beiden Substanzen nicht vollständig getrennt waren, wurde der Gradient verändert:

0 min	100% A	0% B
5 min	100% A	0% B
17 min	0% A	100% B
20 min	100% A	0% B
25 min	100% A	0% B

Die Standardlösung wurde ein weiteres Mal injiziert. Da nun die beiden Substanzpeaks nicht mehr überlappten, wurde eine mit 0.5 µg CIT/g versetzte Bio-Roggen-Probe aufgearbeitet [die Aufnahme des ASE-Extraktes nach dem Eindampfen am Rotavapor erfolgte mit ACN/Wasser (30/70, v/v) anstelle von Methanol/Wasser (50/50, v/v)] und injiziert. Damit sollte geprüft werden, ob mit dem Gradientenprogramm Citrinin und Genistein von der Probenmatrix abgetrennt und detektiert werden können.

4.7.2.7 Suche nach einem internen Standard

Auf Grund der immer wieder auftretenden Überlappung von Citrinin und Genistein im Chromatogramm sollte ein anderer interner Standard gesucht werden. Dazu wurden Standards von 1 mg/L CIT und 1 mg/L Hydroxymatairesinol, 1 mg/L CIT und 2 mg/L Secoisolariciresinol, 1 mg/L CIT und 2.6 mg/L Lariciresinol, 1 mg/L CIT und 2 mg/L Pinoresinol sowie 1 mg/L CIT und 1 mg/L Daidzein in ACN/Wasser (30/70, v/v) hergestellt und mit dem in Kapitel 5.3.2.5 beschriebenen Gradientenprogramm mittels HPLC-CEAD getrennt und detektiert.

4.7.2.8 Optimierung des Gradientenprogramms

Es wurde eine mit 0.5 µg CIT/g gespikte Bio-Roggen-Probe extrahiert, aufgearbeitet und ein Aliquot des Extraktes injiziert. Zur Optimierung des Gradienten wurden die Laufmittelgemische solange in der Laufdauer variiert bis CIT optimal detektiert werden konnte.

4.7.2.9 Analyse verschiedener Probenmatrices

Da außer gemahlenem Roggen auch Bio-Weizen-Vollmehl, Bio-Dinkel-Vollmehl und Maismehl auf CIT untersucht werden sollten, wurden diese wie in 5.2.5 beschrieben extrahiert und nach dem Eindampfen am Rotavapor in ACN/Wasser (30/70, v/v) aufgenommen. Es wurden von allen vier Proben (Roggen, Weizen, Dinkel, Mais) je zwei ungespikte Extrakte hergestellt und zur Überprüfung, ob CIT bei Anwendung dieses Gradientenprogramms mit Matrixkomponenten koeluiert, zu jeweils einem Extrakt nach der Aufarbeitung CIT zugesetzt und mittels HPLC-CEAD analysiert.

4.7.2.10 Waschen der Säule und anschließende Änderung des Gradienten

Nachdem bei der Analyse der oben genannten Probenmatrices ein so starkes Peak-Tailing auftrat, dass am Ende der Messserie CIT nach 30 min nicht komplett eluiert war und auch die Erneuerung der Vorsäule zu keiner Verbesserung des Tailings führte, wurden die Detektorzellen vom HPLC-System abgetrennt und die Chromatographiesäule zuerst 20 min mit ACN/Wasser (80/20, v/v) und anschließend 20 min mit ACN/Wasser (50/50, v/v) gewaschen. Danach wurden die Detektorzellen wieder an das HPLC-System gekoppelt und ohne Anlegen von Potentialen an die Zellen weitere 30 min mit ACN/Wasser (50/50, v/v) gewaschen. Im Folgenden wurde das HPLC-CEAD-System über Nacht mit 0.05 M *ortho*-Phosphorsäure in 30% wässrigem ACN, pH 3.3 äquilibriert.

Anschließend wurden mehrere Gradienten zur Trennung von CIT aus der Matrix einer Bio-Roggen-Probe getestet, unter anderem auch der in 4.7.2.6 beschriebene Gradient:

0 min	100% A	0% B
5 min	100% A	0% B
17 min	0% A	100% B
20 min	100% A	0% B
25 min	100% A	0% B

Dieser Gradient zeichnete sich als der am besten Geeignete ab. Da die Vermutung nahe lag, dass der Grund für all die vorangegangenen Analysenprobleme die kontinuierliche Belegung der Säule mit Matrixkomponenten war, wurde dem Gradienten ein Waschschritt mit 0.05 M *ortho*-Phosphorsäure in 50% wässrigem ACN, pH 3.3 angeschlossen. Diese Methode soll nun weiter als Methode 2 in einem eigenen Kapitel dargestellt werden.

4.7.3 Methode 2: Gradientenelution

4.7.3.1 Gradientenprogramm

Folgender Gradient mit den in Tab. 11 aufgeführten mobilen Phasen und folgende HPLC-CEAD-Parameter wurden für die Methode 2 angewendet:

0 min	100% A	0% B	0% C
5 min	100% A	0% B	0% C
17 min	0% A	100% B	0% C
20 min	100% A	0% B	0% C
22 min	0% A	0% B	100% C
32 min	0% A	0% B	100% C
34 min	100% A	0% B	0% C
50 min	100% A	0% B	0% C

Flussrate: 0.4 mL/min

Säulentemperatur: 20°C

Injektionsvolumen: 100 µL

Potentiale: +450, +500, +550, +600, +650, +700, +750, +800 mV

Tabelle 11: Zusammensetzung der für Methode 2 verwendeten mobilen Phasen

Laufmittelgemisch A	0.05 M *ortho*-Phosphorsäure in 30% wässrigem ACN, pH 3.3
Laufmittelgemisch B	0.05 M *ortho*-Phosphorsäure in 20% wässrigem ACN, pH 3.3
Laufmittelgemisch C	0.05 M *ortho*-Phosphorsäure in 50% wässrigem ACN, pH 3.3

4.7.3.2 Kalibriergerade und Nachweisgrenze

Zur rechnerischen und experimentellen Ermittlung der Nachweisgrenze wurde eine Kalibrierfunktion mit CIT-Konzentrationen im Bereich zwischen 0.5 und 50 µg/L in ACN/Wasser (30/70, v/v) hergestellt und in die HPLC injiziert.

4.7.3.3 Ermittlung der Reproduzierbarkeit

Es wurden sowohl die Intraday- als auch die Interday-Reproduzierbarkeit zur weiteren Charakterisierung der Methode 2 bestimmt.

Zur Ermittlung der Intraday-Reproduzierbarkeit wurde eine 100 µg/L CIT-Standardlösung in ACN/Wasser (30/70, v/v) hergestellt und 5 Mal je 100 µL injiziert und vermessen.

Die Bestimmung der Interday-Reproduzierbarkeit erfolgte an fünf aufeinanderfolgenden Tagen mit einer 100 µg/L CIT-Standardlösung in ACN/Wasser (30/70, v/v).

4.7.3.4 Probenanalyse

Zur Bestimmung der Nachweisgrenzen sowie der Wiederfindung in Proben wurden jeweils in Doppelansätzen je 2 g der Cerealien (gemahlener Bio-Roggen, Bio-Weizen-Vollmehl, Bio-Dinkel-Vollmehl und Maismehl) sowohl ungespikt als auch mit 0.1 µg CIT/g Probe gespikt mittels ASE extrahiert. Die Extrakte wurden am Rotavapor bei einer Wasserbadtemperatur von 40°C zur Gänze eingedampft, in ca. 900 µL ACN/Wasser (30/70, v/v) 10 min im Ultraschallbad gelöst, mit ACN/Wasser (30/70, v/v) auf 1 ml aufgefüllt, 10 min bei 10000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein Vial zur weiteren Analyse mittels HPLC-CEAD transferiert.

5 ERGEBNISSE

5.1 Elektrochemisches Verhalten von Citrinin

Mit der Aufnahme der Voltammogramme im kathodischen und im anodischen Messbereich sollte geklärt werden, bei welchen Potentialen Citrinin am besten im coulometrischen Elektroden-Array-Detektor detektiert werden kann.

5.1.1 Reduktion von Citrinin

Wie aus Abb. 11 hervorgeht, ist CIT in Britton-Robinson-Puffer im Potentialbereich zwischen 0 und -1.2 V an einer glasartigen Kohlenstoffelektrode nicht reduzierbar.

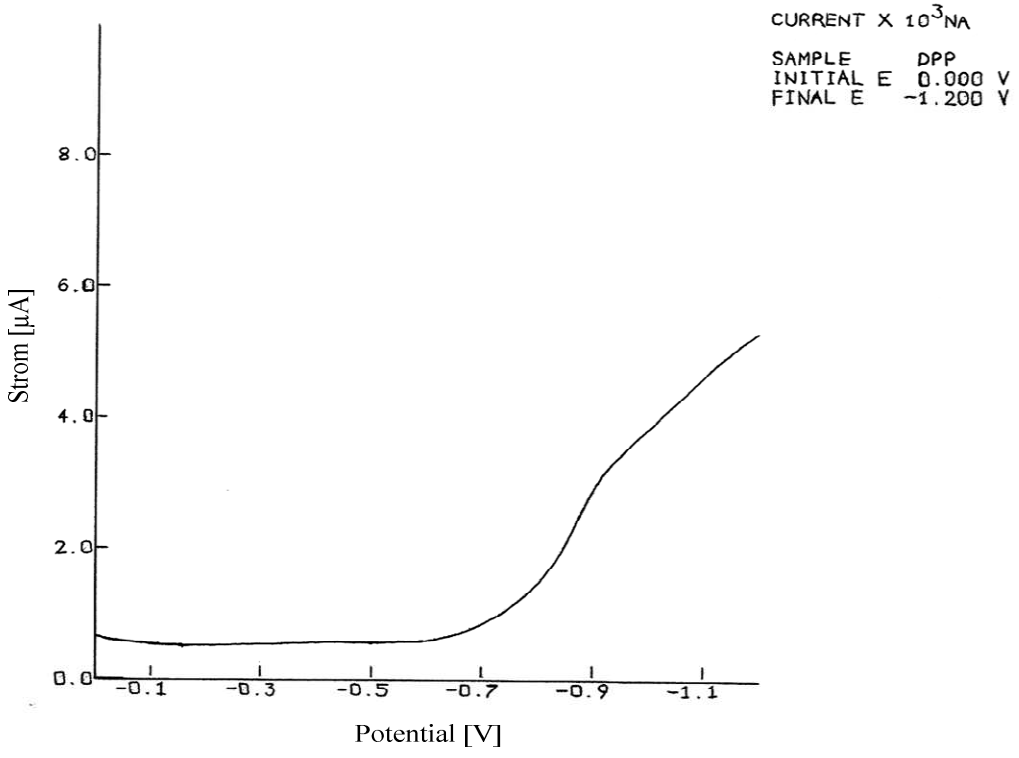


Abbildung 11: DP-Voltammogramm der Reduktion einer CIT-Messlösung mit c (CIT) = 44 mg/L bei pH 2.4

5.1.2 Oxidation von Citrinin

Citrinin ist an einer glasartigen Kohlenstoffelektrode oxidierbar. Das Mykotoxin lässt sich in einer Lösung mit Britton-Robinson-Puffer bei Potentialen zwischen +0.7 und +0.9 V (siehe Abb. 12) oxidieren.

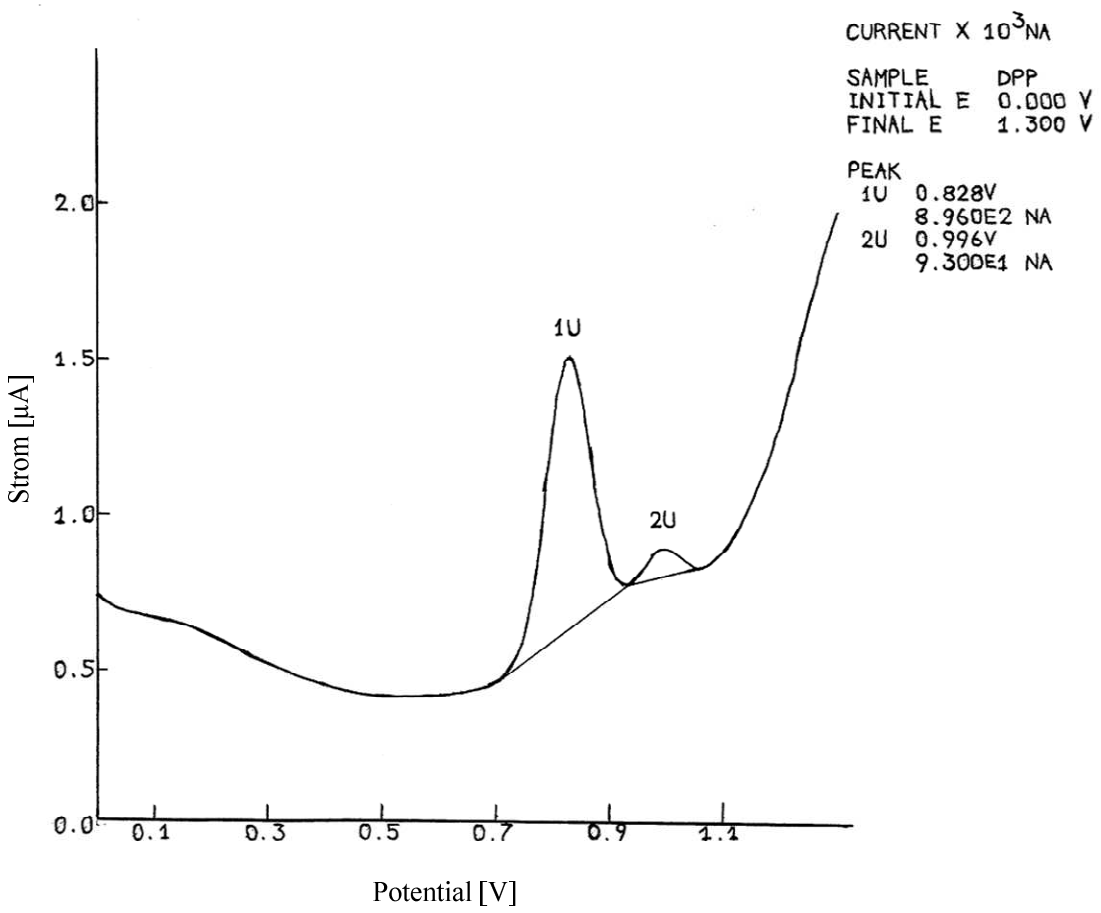


Abbildung 12: DP-Voltammogramm einer CIT-Standardlösung (44 mg/L) in Britton-Robinson-Puffer (pH 2.4)

Aufgrund dieses Ergebnisses wurde der Einfluss des pH-Wertes auf das Oxidationssignal des Citrinins untersucht.

5.1.3 pH-Abhängigkeit der Oxidation von Citrinin

Um den optimalen pH-Bereich für die Detektion von CIT zu ermitteln, wurde die Signalhöhe (Peakhöhe) in Abhängigkeit des pH-Wertes gemessen. Auch für diese Messungen erwies sich eine Konditionierung zu Beginn und eine zwischen den Messungen als notwendig, um starke Schwankungen der Signale zu vermeiden. Die Ergebnisse sind in Abb. 13 dargestellt.

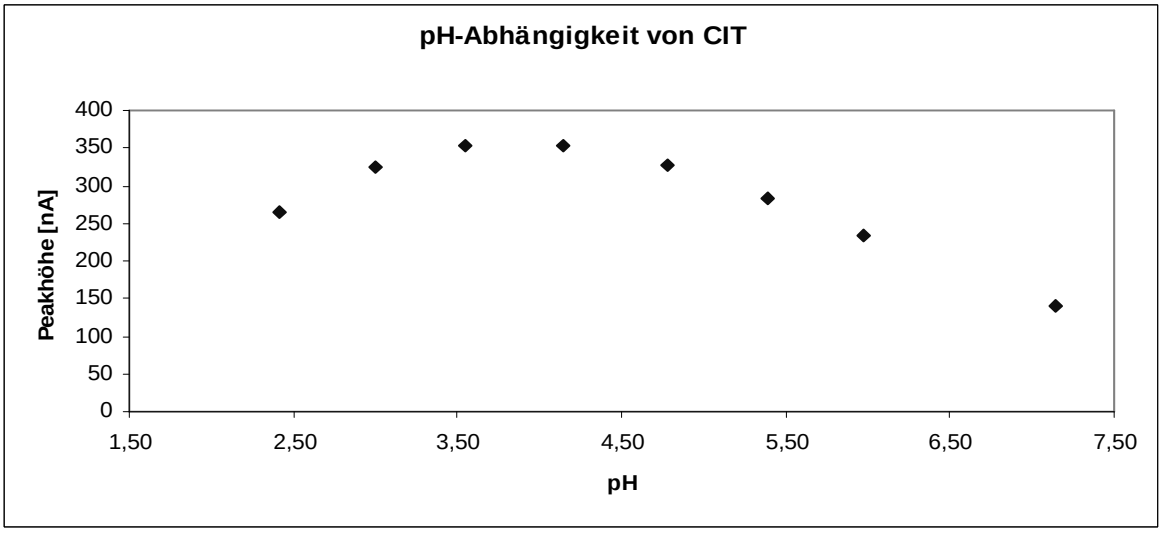


Abbildung 13: pH-Abhängigkeit von CIT in Britton-Robinson-Puffer bei Oxidation an einer glasartigen Kohlenstoffelektrode

Wie aus Abb. 13 hervorgeht, liegt das pH-Optimum für die Detektion von CIT zwischen pH 3 und 4.

5.1.4 Konzentrationsabhängigkeit der Oxidation von Citrinin

Ein konzentrationsabhängiges Signal von CIT wurde erst dann erhalten, nachdem die glasartige Kohlenstoffelektrode zu Beginn sowie zwischen den einzelnen Messungen konditioniert wurde (siehe Kapitel 4.5.1). Dann ergab sich ein linearer Zusammenhang zwischen der Peakhöhe und der Konzentration, der in Abb. 14 dargestellt ist. Als experimentelle Nachweisgrenze wurden 1.25 mg/L CIT gefunden, für die Standardlösung der Konzentration 0.625 mg/L CIT wurde kein Signal mehr erhalten.

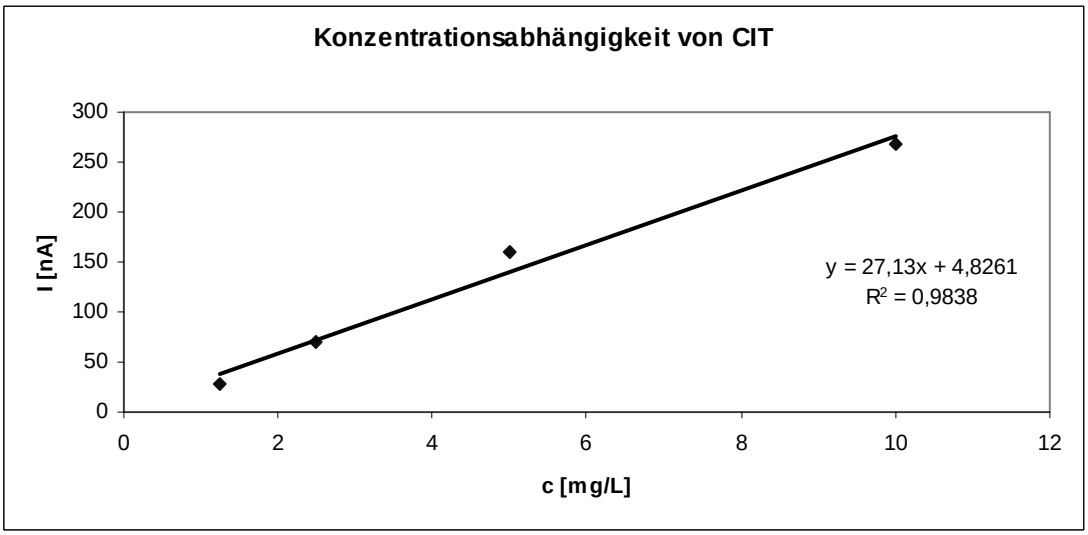


Abbildung 14: Eichfunktion von CIT in Britton-Robinson-Puffer bei pH 3.5

5.2 Entwicklung einer ASE-Extraktionsmethode

Ziel bei der Entwicklung der Methode war, eine möglichst hohe Effizienz bei der Extraktion zu erreichen. Die Art des Lösungsmittels und die Temperatur, bei der extrahiert wurde, spielten dabei eine wesentliche Rolle.

5.2.1 Optimierung des Lösungsmittels und der Extraktionstemperatur

5.2.1.1 Extraktion mit Methanol

Die Extraktion von gespiktem CIT aus einer Roggenmatrix wurde mit 100% Methanol bei den Temperaturen 40°C, 60°C und 80°C durchgeführt. Es wurden 4 statische Zyklen zu je 5 min und ein Spülvolumen von 70% eingestellt. Die Wiederfindung betrug bei Auswertung über die Peakhöhe bei 40°C 24.7±6.0%, bei 60°C 18.5±6.3% und bei 80°C 14.1±7.5%. Bei der Auswertung über die Peakfläche ergaben sich nur geringfügig unterschiedliche Werte (24.3±2.1% bei 40°C, 17.4±4.2% bei 60°C und 13.2±2.8% bei 80°C). Die Ergebnisse sind in Abb. 15 dargestellt.

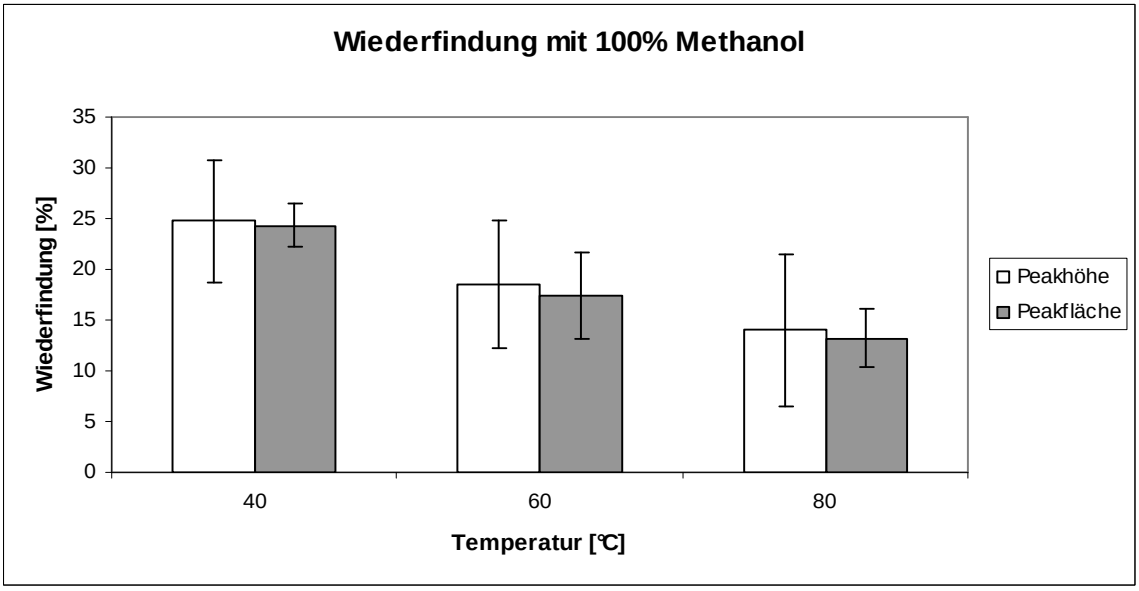


Abbildung 15: Wiederfindung gespikter Roggenproben bei Extraktion mit 100% Methanol in Abhängigkeit von der Temperatur

Aufgrund der sehr geringen Ausbeuten wurde die Extraktion mit Methanol/Wasser (80/20, v/v) wiederholt. Die Zyklenzahl, die Dauer der Zyklen sowie das Spülvolumen wurden konstant gehalten. Die Ergebnisse der Extraktionen werden in Abb. 16 illustriert. Es konnten i.B. auf die Peakhöhe 34.3±2.5% (40°C), 27.4±7.4% (60°C) sowie 15.7±10.3% (80°C) und i.B. auf die Peakfläche 29.3±4.1% (40°C), 22.2±5.4% (60°C) sowie 12.4±8.0% (80°C) wiedergefunden werden.

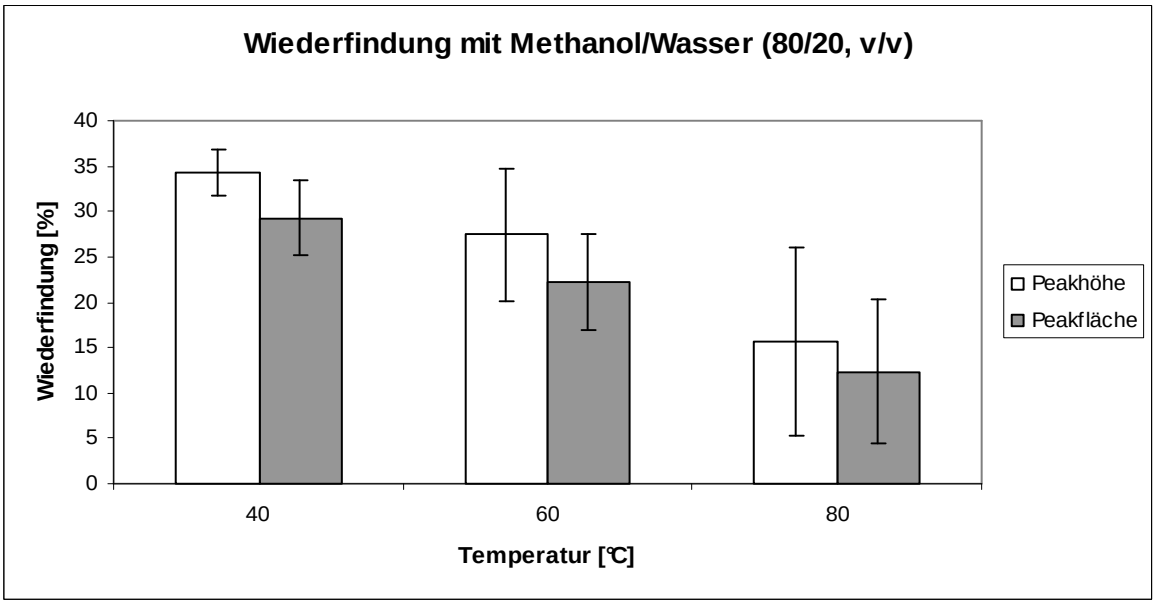


Abbildung 16: Wiederfindung gespikter Roggenproben bei Extraktion mit Methanol/Wasser (80/20, v/v) in Abhängigkeit von der Temperatur

Die Extraktionsversuche mit Methanol/Wasser (80/20, v/v) zeigten bessere Ausbeuten als die Versuche mit 100% Methanol. Bei Erhöhung der Temperatur zeichnete sich eine deutliche Abnahme der Wiederfindung ab, weshalb weitere Extraktionen nur noch bei Temperaturen von 40°C bzw. 60°C durchgeführt wurden.

5.2.1.2 Extraktion mit Ethanol

Da auch mit Methanol/Wasser (80/20, v/v) keine zufriedenstellende Ausbeute erreicht werden konnte, wurde die ASE-Extraktion mit Ethanol/Wasser (80/20, v/v) wiederholt. Die Zyklenanzahl, die Dauer der Zyklen sowie das Spülvolumen wurden, wie in Punkt 5.2.1.1 beschrieben, beibehalten. Die Extraktionsergebnisse sind in Abb. 17 dargestellt. Die Wiederfindung betrug i.B. auf die Peakhöhe 35.0±13.8% (40°C) sowie 33.0±13.3% (60°C) und i.B. auf die Peakfläche 31.9±14.9% (40°C) und 29.9±9.1% (60°C). Durch Verwendung von Ethanol an Stelle von Methanol konnte die Ausbeute nicht erhöht werden, außerdem wurden stärkere Schwankungen in der Wiederfindung beobachtet.

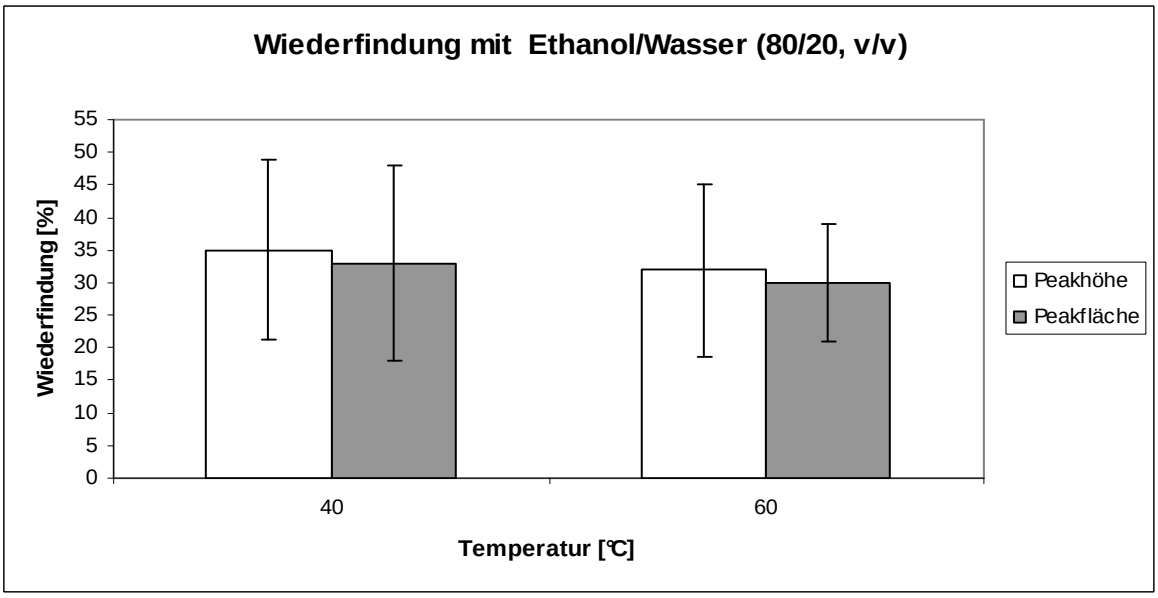


Abbildung 17: Wiederfindung gespikter Roggenproben bei Extraktion mit Ethanol/Wasser (80/20, v/v) in Abhängigkeit von der Temperatur

5.2.1.3 Extraktion mit Essigsäureethylester

Auf Grund der niedrigen Wiederfindungen mit den bisher verwendeten Lösungsmitteln wurde die Extraktion mit den oben genannten Parametern (siehe 5.2.1.1) mit 100% Essigsäureethylester als Lösungsmittel wiederholt. Es stellte sich aber heraus, dass CIT mit diesem Lösungsmittel nicht extrahiert werden kann.

5.2.1.4 Abhängigkeit der Wiederfindung von Lösungsmittel und Temperatur

Wie bereits oben gezeigt, hing die Wiederfindung deutlich vom verwendeten Lösungsmittel und von der Extraktionstemperatur ab. Diese Zusammenhänge werden in Abb. 18 zusammengefasst.

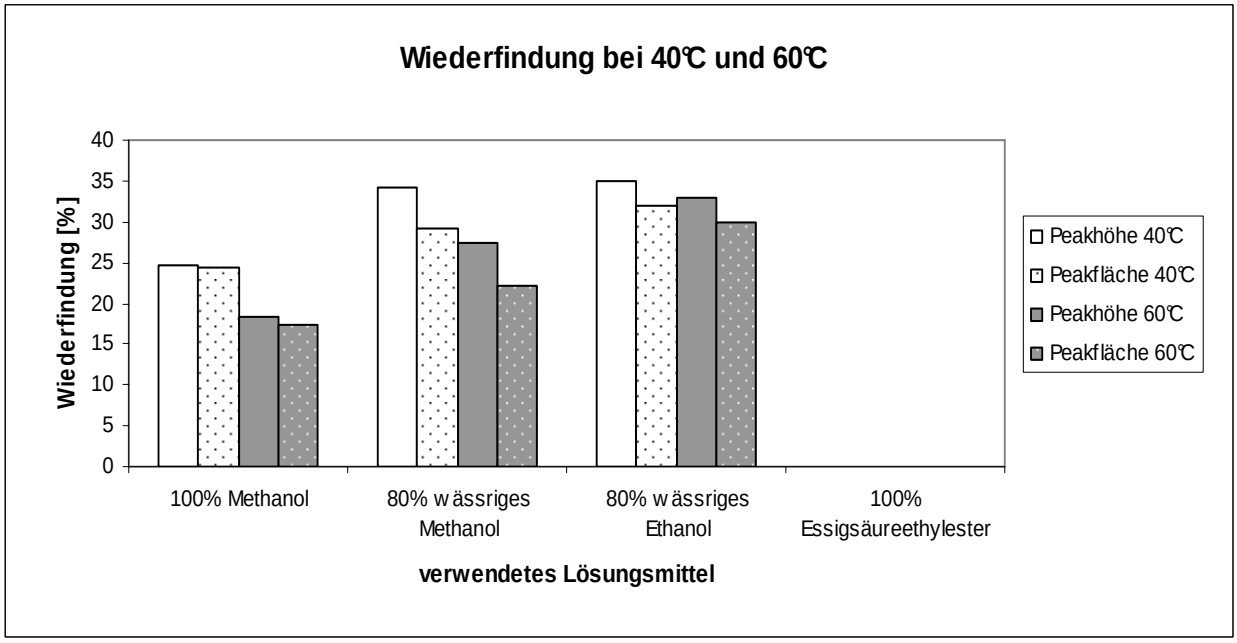


Abbildung 18: Wiederfindung gespikter Roggenproben im Vergleich bei 40°C und 60°C in Abhängigkeit vom verwendeten Lösungsmittel

Aus dieser Abbildung geht hervor, dass bei einer Extraktionstemperatur von 40°C bessere Ausbeuten erhalten werden als bei einer Extraktion bei 60°C und Methanol/Wasser (80/20, v/v) bei dieser Temperatur eine gleichwertige Effizienz wie Ethanol/Wasser (80/20, v/v) zeigt. Bei der Extraktion mit Ethanol/Wasser (80/20, v/v) ergaben sich jedoch deutlich größere Schwankungen bei der Wiederfindung. Es wurden daher eine Temperatur von 40°C und Methanol/Wasser (80/20, v/v) als Lösungsmittel für die Extraktion von CIT mittels ASE gewählt.

5.2.2 Auswirkungen von Aluminiumoxid in der ASE-Zelle

In der ASE besteht die Möglichkeit, sich vorangehende Probenentfettungsschritte durch Zugabe von saurem, aktiviertem Aluminiumoxid direkt in die Zelle zu ersparen. Diese Entfettung wurde in den beschrieben Extraktionsversuchen durchgeführt. Da jedoch nur sehr geringe Ausbeuten erzielt werden konnten, wurde vermutet, dass CIT möglicherweise durch das beigefügte Aluminiumoxid in der Zelle zurückgehalten wird. Diese Vermutung wurde bestätigt, als die Extraktionen mit Methanol/Wasser (80/20, v/v) bei 40°C und 60°C ohne Aluminiumdioxid und mit den gleichen ASE-Parametern wie in Kapitel 5.2.1.1 beschrieben durchgeführt wurden. Die Wiederfindung konnte i.B. auf die Peakhöhe bei einer Extraktion bei 40°C von 34.3±2.5% mit Aluminiumoxid auf 75.5±7.9% ohne Aluminiumoxid und bei 60 °C von 27.4±7.4% mit Aluminiumoxid auf 69.8±5.2% ohne Aluminiumoxid gesteigert werden. Hinsichtlich der Peakfläche wurde eine Erhöhung von 29.3±4.1% mit Aluminiumoxid auf 73.7±9.8% ohne Aluminiumoxid bei einer Extraktion bei 40°C und von 22.2±5.4% mit Aluminiumoxid auf 68.3±3.3% ohne Aluminiumoxid bei 60°C erreicht. Die Ergebnisse sind in Abb. 19 dargestellt.

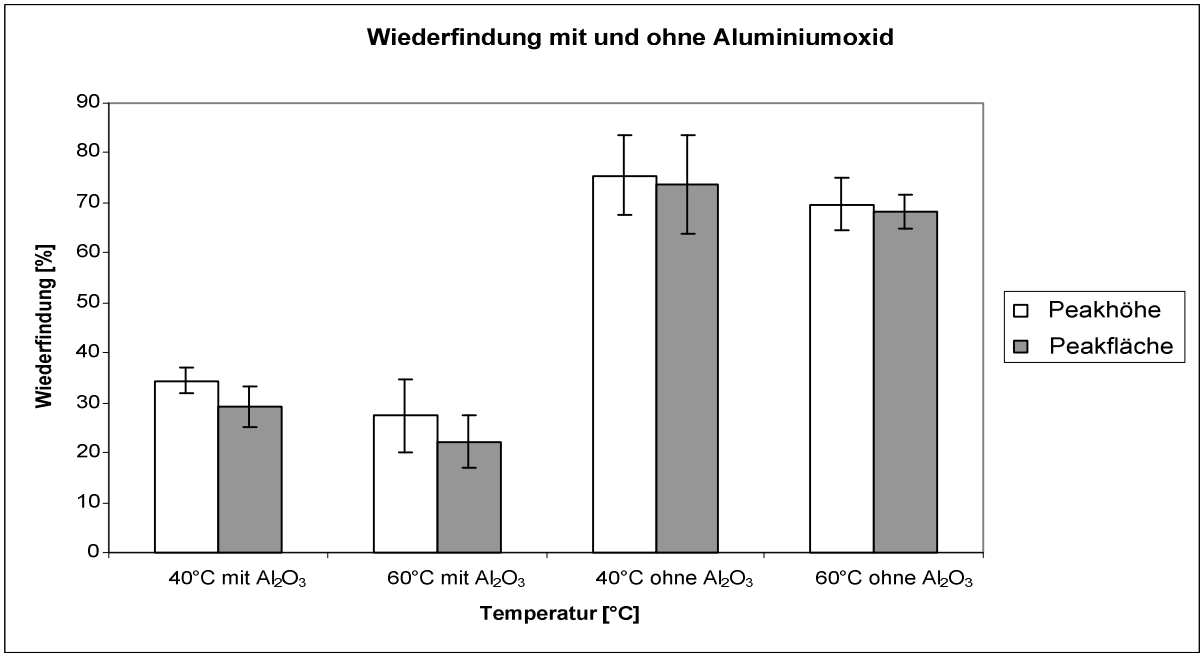


Abbildung 19: Wiederfindung gespikter Roggenproben bei 40°C und 60°C in An- und Abwesenheit von Aluminiumoxid

Auf Grund dieser Ergebnisse wurde bei den weiteren Extraktionen auf den Zusatz von Aluminiumoxid verzichtet, da auch anzunehmen war, dass sich die geringen Fettgehalte der Proben (< 10%) nicht negativ auf die HPLC-CEAD auswirken würden.

5.2.3 Optimierung der Zyklenzahl

Um in möglichst kurzer Zeit möglichst viel Analyt aus der Matrix zu lösen, wurde die ASE-Zyklenzahl mit CIT gespikten Roggenproben optimiert. Die Zyklusdauer belief sich auf 5 min, die Zyklenzahl auf 3 bzw. 4. Mit drei Zyklen konnte bei einem Zeitgewinn von 5 min eine gleich hohe Ausbeute wie mit vier Zyklen erreicht werden. Alle weiteren Versuche wurden daher mit 3 Extraktionszyklen fortgesetzt. Die Ergebnisse sind in Abb. 20 illustriert.

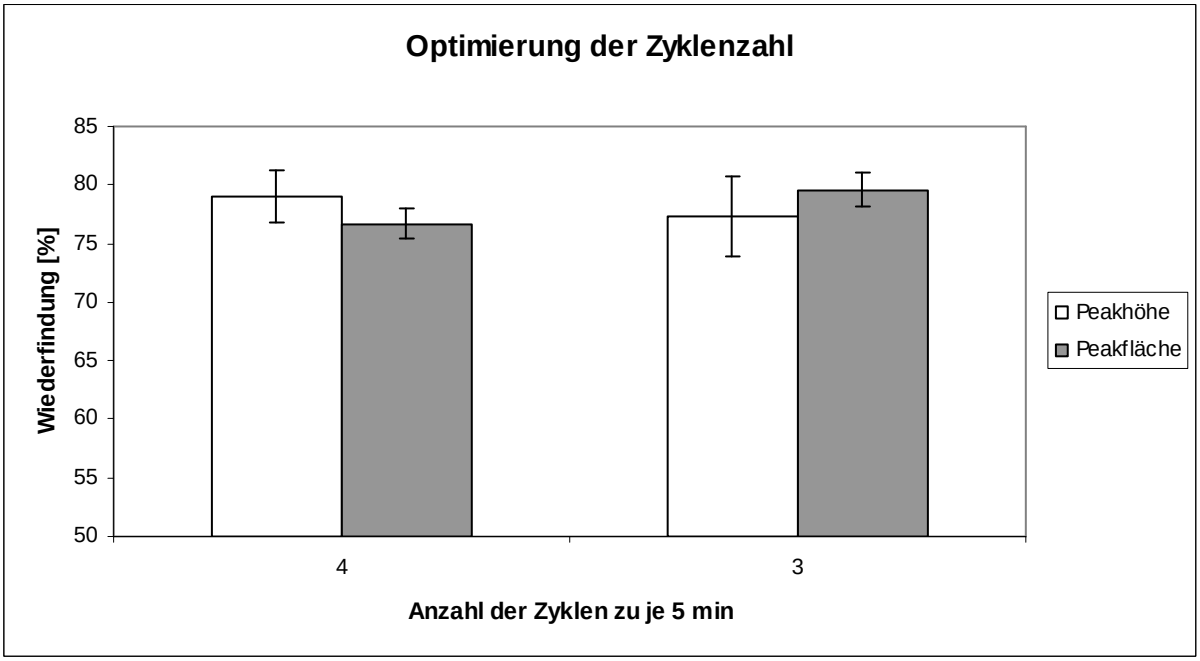


Abbildung 20: Optimierung der Anzahl der Zyklen während einer Extraktion mittels ASE

5.2.4 Optimierung der Probenmenge und des Probenvolumens

Um später möglichst geringe Analytkonzentrationen in den diversen Probenmatrices nachweisen zu können, wurde zur möglichen Aufkonzentrierung des CIT-Gehalts die eingesetzte Probenmenge auf 2 g erhöht und der Extrakt vor der Injektion in die HPLC mit mobiler Phase nur auf ein Endvolumen von 1 mL verdünnt. Bei einer Probemenge von 2 g wurde im Chromatogramm eine starke Peakverbreiterung des Citrinins festgestellt, weshalb die Peakfläche eine höhere Aussagekraft als die Peakhöhe hat. Die Ausbeute konnte in Bezug auf die Peakfläche auf 90.5±0.8% (N=2) gesteigert werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 21 dargestellt.

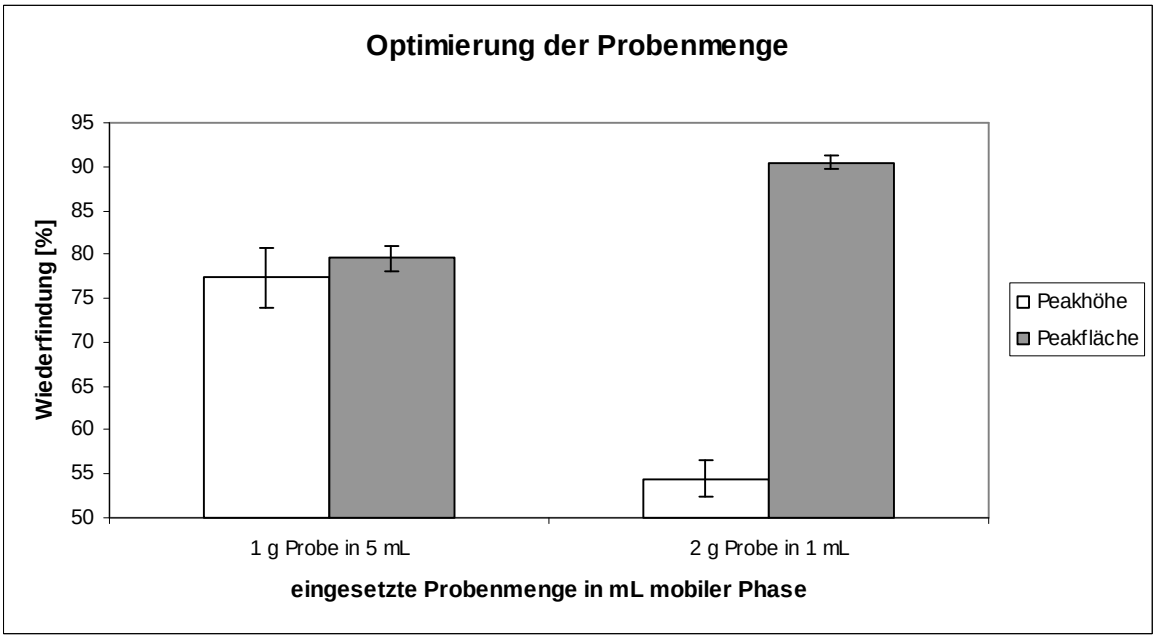


Abbildung 21: Optimierung der eingesetzten Probemenge und des Endvolumens

5.2.5 Zusammenfassung der optimierten Parameter für die Extraktion von Citrinin mittels ASE

In Tab. 12 werden die optimalen Parameter für die Extraktion von CIT aus einer Probenmatrix und die anschließende Extraktaufarbeitung dargestellt. Diese Parameter wurden für alle folgenden Extraktionen verwendet.

Tabelle 12: Optimierte ASE-Parameter

Lösungsmittel	80% wässriges Methanol
Temperatur	40°C
Zyklusdauer	5 min
Zyklenzahl	3
Spülvolumen	70%
eingesetzte Probenmenge	2 g
Endvolumen	1 mL

In Abb. 22 wird ein Schema für die Probenaufarbeitung, angefangen bei der Extraktion mittels ASE bis zum für die Analyse bereiten Extrakt, gezeigt.

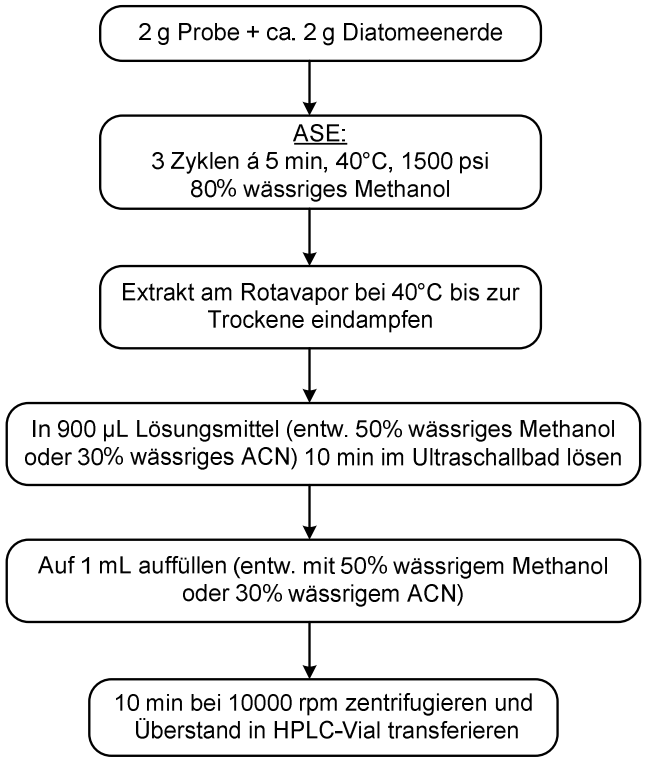


Abbildung 22: Schematische Darstellung der Probenaufarbeitung

5.3 Entwicklung einer HPLC-Trennmethode gekoppelt mit coulometrischer Elektroden-Array-Detektion

5.3.1 Methode 1: Isokratische Elution

5.3.1.1 Auswahl eines geeigneten Elutionsmittels

Es wurden vier verschiedene mobile Phasen (siehe Tab. 9) auf ihre Eignung als Elutionsmittel für die Trennung von CIT geprüft.

Das erste Laufmittelgemisch erwies sich als ungeeignet, da CIT bereits nach 3.7 min eluierte und somit in Probenmatrices mit Matrixkomponenten koeluieren würde.

Bei Laufmittelgemisch 2 zeigte sich der Peak der CIT-Standardlösung nur wenig später bei 4.3 min. Somit kann auch diese mobile Phase nicht zur chromatographischen Trennung des CITs von anderen Substanzen verwendet werden.

Das dritte Laufmittelgemisch lieferte einen sehr breiten CIT-Peak bei 28.7 min. Auf Grund dessen wurde ein viertes Laufmittelgemisch getestet. Hier eluierte CIT bei 16.2 min (siehe Abb. 23).

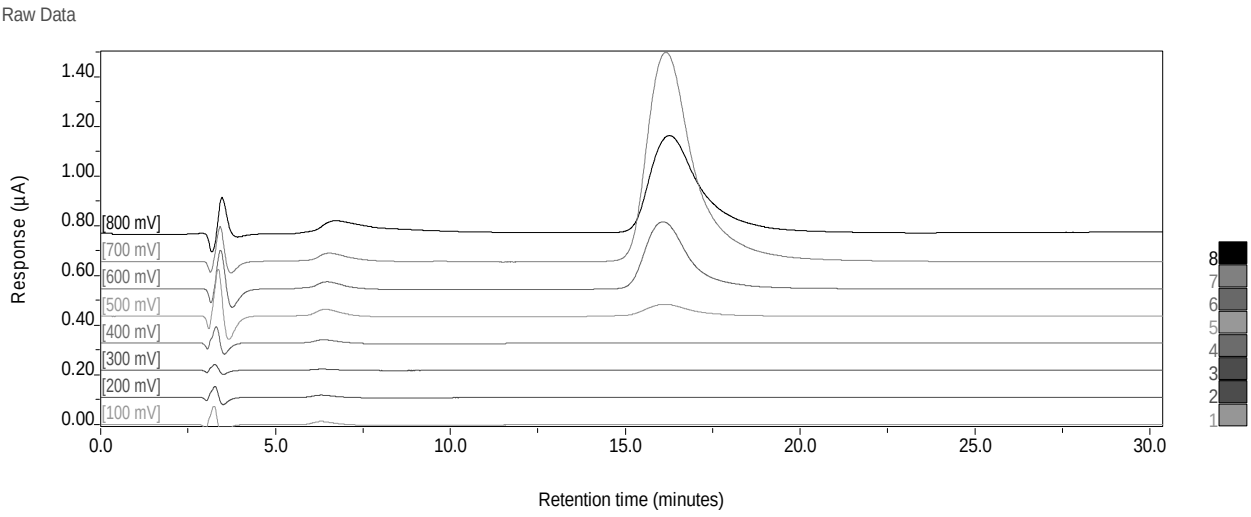


Abbildung 23: CEAD-Chromatogramme einer CIT-Standardlösung mit 0.05 M *ortho*-Phosphorsäure in 50% wässrigem Methanol, pH 3.0 als Elutionsmittel

Auf Grund dieses Ergebnisses wurde eine mit 5 µg CIT/g gespikte Bio-Roggenprobe mittels HPLC-CEAD analysiert. Wie aus Abb. 24 hervorgeht, eluiert CIT in der Probe abgetrennt von der Matrix bei 16.0 min.

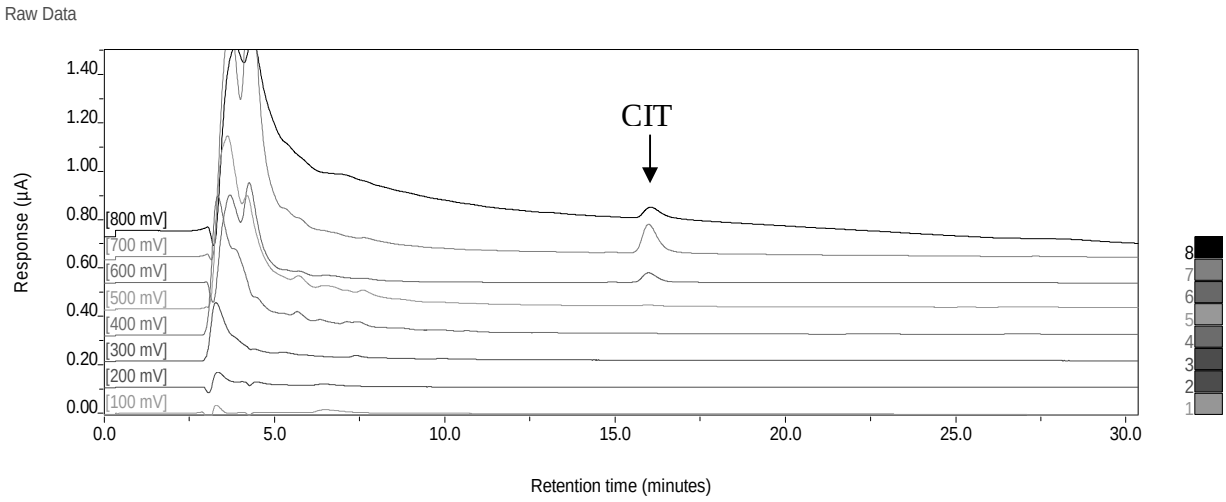


Abbildung 24: CEAD-Chromatogramme einer mit CIT gespikten Bio-Roggenprobe mit 0.05 M *ortho*-Phosphorsäure in 50% wässrigem Methanol, pH 3.0 als Elutionsmittel

Als ideale mobile Phase ergab sich also 0.05 M *ortho*-Phosphorsäure in 50% wässrigem Methanol, pH 3.0. Diese wurde für alle folgenden HPLC-CEAD-Analysen verwendet.

In den beiden Abb. 23 und 24 ist des Weiteren zu sehen, dass CIT unterhalb von Potentialen von +400 mV nicht oxidiert wird. Daher wurden für alle weiteren Analysen Zellpotentiale von +450, +500, +550, +600, +650, +700, +750 und +800 mV zur Detektion von CIT angelegt.

5.3.1.2 Strom-Spannungskurve von Citrinin im Fließsystem

Zur qualitativen Analyse einer Substanz kann neben der Retentionszeit bei Detektion mittels CEAD auch die Strom-Spannungskurve des Stoffes herangezogen werden (Abb. 25). Um einen vermeintlichen von CIT stammenden Peak in einer Probenmatrix tatsächlich als diesen zu identifizieren, wird die Strom-Spannungskurve des Citrinins in der Probe mit der in einer Standardlösung verglichen. Nur wenn die Strom-Spannungskurven übereinstimmen, liegt Citrinin vor.

Ebenso geht aus Abb. 25 hervor, dass CIT optimal bei +600 mV angezeigt wird. Dieser Kanal wird daher zur Auswertung der Chromatogramme, zur Berechnung der Wiederfindung und zur Erstellung der Kalibriergeraden herangezogen.

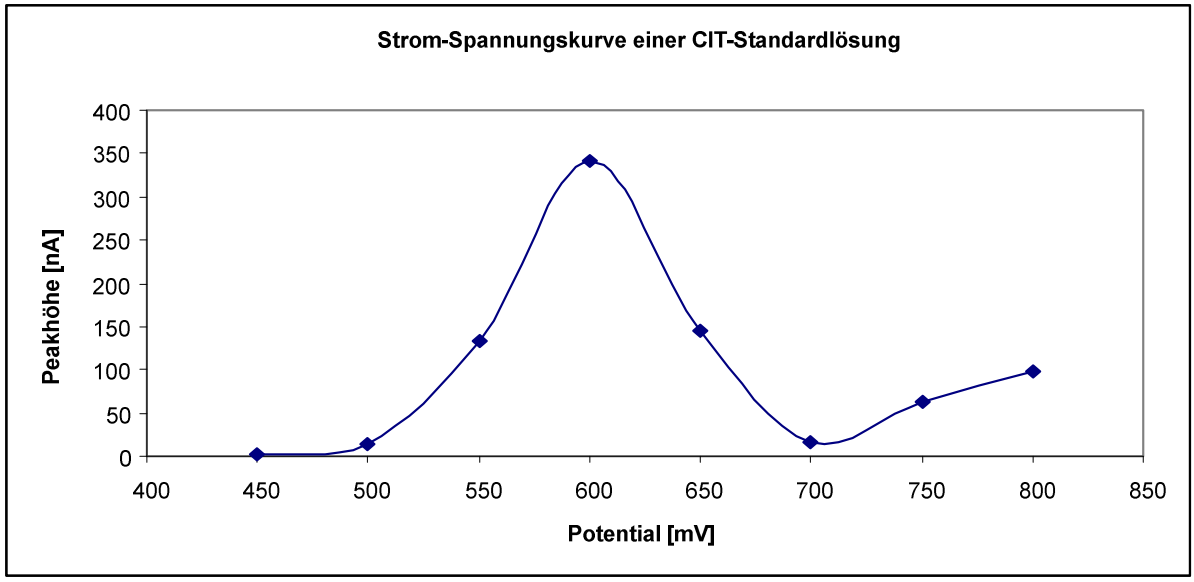


Abbildung 25: Strom-Spannungskurve einer CIT-Standardlösung (1 mg/L) bei isokratischer Trennung mit 0.05 M *ortho*-Phosphorsäure in 50% wässrigem Methanol, pH 3.0

5.3.1.3 Interner Standard

Zwei Substanzen wurden auf die Möglichkeit, sie als internen Standard zur qualitativen sowie quantitativen Analyse von CIT zu verwenden, untersucht: Bisphenol A und Genistein.

Bei der injizierten Bisphenol A-Lösung zeigte sich auch nach 45 min Laufzeit kein Peak, daher ist BPA nicht als interner Standard geeignet.

Genistein lieferte hingegen einen Peak bei 22.0 min. Zur Überprüfung, dass die beiden CIT- und GEN-Peaks im Chromatogramm nicht überlappen, wurde eine Standardlösung mit CIT und GEN (jeweils 1 mg/L) in mobiler Phase hergestellt sowie ein Roggenextrakt mit CIT und GEN (jeweils 1 mg/L) versetzt. In den Chromatogrammen waren keine Interferenzen zu erkennen, CIT hatte eine Retentionszeit von 17.0 min, GEN 22.0 min.

Des Weiteren musste ermittelt werden, ob GEN in Roggen enthalten ist. Laut [72] konnte in Roggen Genistein nicht identifiziert werden. Genistein ist demnach als interner Standard geeignet und wurde vor der Analyse mittels HPLC-CEAD in einer Konzentration von 2 mg/L in das HPLC-Vial zugegeben.

Es zeigte sich auch, dass eine Laufzeit von 25 min ausreichend ist. Daher wurde für alle weiteren Versuche die Laufzeit von 30 min auf 25 min verkürzt.

5.3.1.4 Eichgerade und Nachweisgrenze

Citrinin-Standardlösungen in Konzentrationen zwischen 0.1 und 25 µg/L wurden mittels HPLC-CEAD vermessen und die Peakhöhen gegen die Konzentrationen der CIT-Standardlösungen zur Erstellung einer Eichgeraden (siehe Abb. 26) aufgetragen.

In einer CIT-Standardlösung (1 µg/L) wurde ein Rauschen von 0.196 nA ermittelt. Die Peakhöhe des CIT-Peaks im Chromatogramm betrug 0.882 nA. Diese lag also über dem dreifachen Wert des Rauschens (0.588 nA). Daher wurde 1 µg CIT/L als experimentell ermittelte Nachweisgrenze angesehen.

Die Nachweisgrenze wurde auch rechnerisch durch Einsetzen des dreifachen Wertes des Rauschens (0.588 nA) in die Gleichung der Kalibriergeraden (Abb. 26) ermittelt. Hier ergab sich eine Nachweisgrenze von 0.4 µg/L. Die rechnerisch ermittelte Nachweisgrenze lag also deutlich unter der experimentell ermittelten.

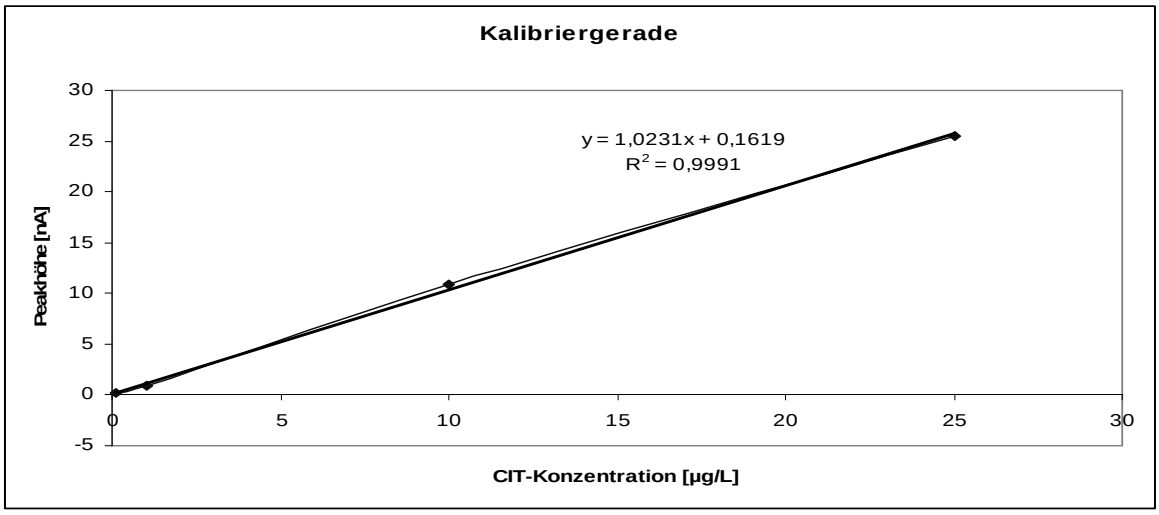


Abbildung 26: Kalibriergerade von CIT-Standardlösungen (c = 0.1 bis 25 µg/L)

Die Bestimmung der Nachweisgrenze in einer Roggenmatrix erfolgte nur rechnerisch. Das einfache Rauschen betrug 8.58 nA, das 3-fache demnach 25.74 nA. Durch Einsetzen des Wertes des 3-fachen Rauschens in die Geradengleichung aus Abb. 26 ergab sich eine Nachweisgrenze von 25 µg/kg in gemahlenem Bio-Roggen.

5.3.1.5 Ermittlung der Reproduzierbarkeit

Zur Berechnung der Reproduzierbarkeit wurden der Mittelwert der gemessenen Peakhöhen und Peakflächen, die Standardabweichung sowie die relative Standardabweichung mit den untenstehenden Formeln aus [69] herangezogen.

Mittelwert:
$$\bar{x} = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} x_i \qquad (5.1)$$

Stabw.:
$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}\left(x_i - \bar{x}\right)^2}{n-1}} \qquad (5.2)$$

rel. Stabw.:
$$RSD\,[\%] = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \qquad (5.3)$$

Für die Intraday-Reproduzierbarkeit wurde für die Peakhöhen ein Mittelwert von 233.6 nA, eine Standardabweichung von 6.1 nA und eine relative Standardabweichung von 2.6% und für die Peakflächen ein Mittelwert von 9.8 µC, eine Standardabweichung von 0.2 µC und eine relative Standardabweichung von 2.0% ermittelt.

Für die Interday-Reproduzierbarkeit wurde für die Peakhöhen ein Mittelwert von 250.2 nA, eine Standardabweichung von 6.6 nA und eine relative Standardabweichung von 2.6% und für die Peakflächen ein Mittelwert von 9.8 µC, eine Standardabweichung von 1.9 µC und eine relative Standardabweichung von 19.4% berechnet.

Anhand dieser Ergebnisse ist zu erkennen, dass die Reproduzierbarkeit für die Peakhöhen besser ist als für die Peakflächen, insbesondere was die Reproduzierbarkeit an unterschiedlichen Tagen betrifft.

5.3.1.6 Zusammenfassung der experimentellen Daten und der Ergebnisse der Methode 1 (isokratische Trennung)

Zur besseren Übersicht werden hier noch einmal die Methodenparameter sowie die Ergebnisse zusammengefasst:

Mobile Phase: 0.05 M *ortho*-Phosphorsäure in 50% wässrigem Methanol, pH 3.0

Flussrate: 0.3 mL/min

Laufzeit: 25 min

Injektionsvolumen: 20 oder 100 µL

Detektorpotentiale: +450, +500, +550, +600, +650, +700, +750, +800 mV

Optimales Detektionspotential: +600 mV

Nachweisgrenzen:	Standardlösung:	Experimentell:	1 µg/L
		Rechnerisch:	0.4 µg/L
	Roggen:	Rechnerisch:	25 µg/kg

Reproduzierbarkeit gemessen mit einer CIT-Standardlösung (100 µg/L):

Intraday:	Peakhöhe: 2.6%	Interday:	Peakhöhe: 2.6%
	Peakfläche: 2.0%		Peakfläche: 19.4%

5.3.1.7 Messung von Bio-Roggen-Proben

In keiner der ungespikten Bio-Roggen-Proben konnte CIT nachgewiesen werden (siehe Abb. 27).

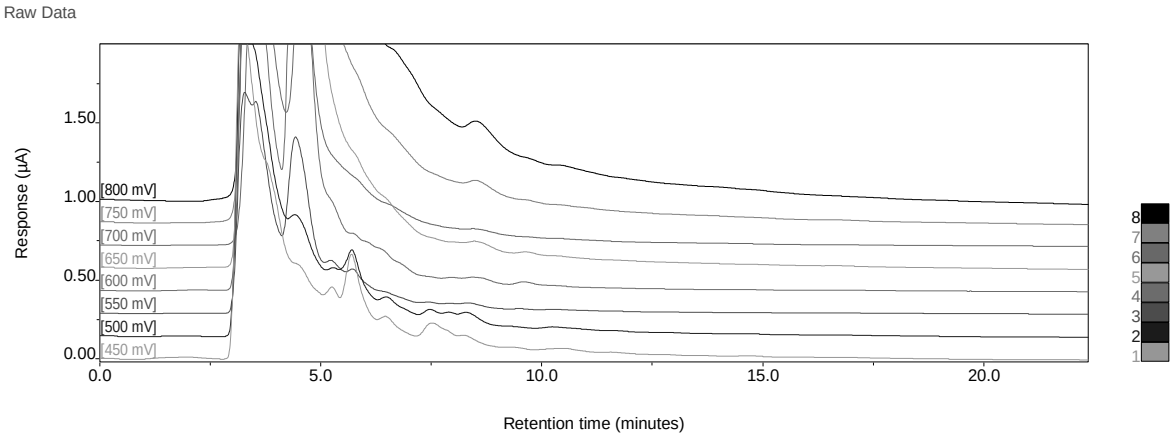


Abbildung 27: CEAD-Chromatogramme einer ungespikten Bio-Roggen-Probe (analysiert mittels Methode 1)

Bei der Analyse der gespikten Proben wurden CIT und GEN nicht mehr getrennt (siehe Abb. 28). Um festzustellen, ob Verunreinigungen die Trennleistung der Säule beeinträchtigten, wurde eine CIT-GEN-Standardlösung injiziert. Da auch hier die beiden Substanzpeaks nicht getrennt waren, wurde die Vorsäule getauscht und die Standardlösung ein weiteres Mal injiziert. Da auch diese Maßnahme keine Trennung der Substanzpeaks mit sich brachte, wurde die HPLC-Säule regeneriert (siehe 4.7.2.1).

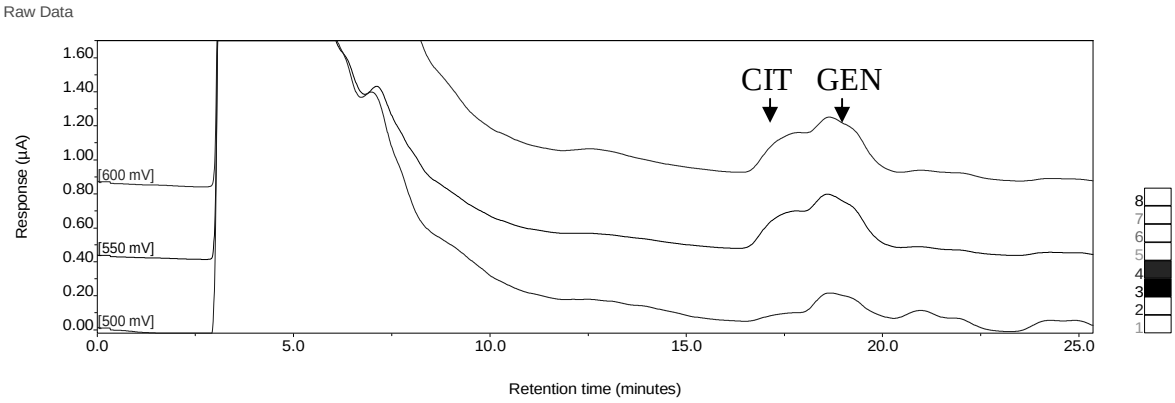


Abbildung 28: CEAD-Chromatogramme nicht getrennter Substanzpeaks von CIT und GEN in einer Bio-Roggen-Probe

5.3.2 Behandlung der aufgetretenen Analysenprobleme

Im Rahmen der für diese Arbeit durchgeführten Experimente traten einige Probleme bei den Analysen auf. Die Ergebnisse der Versuche zur Problembehebung werden in diesem Kapitel erörtert.

5.3.2.1 Änderung des Laufmittels 1

Nachdem die Regeneration der Säule nicht den erhofften Erfolg brachte, wurde die Laufmittelzusammensetzung auf 0.05 M *ortho*-Phosphorsäure in 45% wässrigem Methanol, pH 3.0 geändert. Der Standardversuch mit einem CIT-GEN-Standard zeigte eine Trennung der Peaks. Nach mehrmaliger Injektion von Probenextrakten kam es jedoch erneut zu einer Überlappung des CIT- mit dem GEN-Peak. Der darauffolgende Austausch der Vorsäule führte nur kurz zu einer erneuten Trennung, nach wenigen Probeninjektionen trat allerdings wieder das Problem der Überlappung auf.

5.3.2.2 Einfluss der Säulentemperatur

Durch Einbau eines Säulenofens wurde die Säulentemperatur bei 20°C konstant gehalten. Dadurch konnte eine Trennung der beiden Substanzpeaks erreicht werden, allerdings musste die Laufzeit auf 50 min erhöht werden, was einer Verdopplung der Analysenzeit im Vergleich zur ursprünglichen Methode 1 entsprach. Um diese zu verkürzen, wurde ein anderes Laufmittelgemisch untersucht.

5.3.2.3 Änderung des Laufmittels 2

Mit 0.05 M *ortho*-Phosphorsäure in 25% wässrigem ACN, pH 3.0 als mobiler Phase konnten CIT und GEN in einem Standardgemisch wieder getrennt werden. Im Probenextrakt überlappte CIT mit Matrixverbindungen. In den CEAD-Chromatogrammen (Abb. 29) ist bei Vergleich des Chromatogrammes des Kanals +450 mV mit dem des Kanals +500 mV deutlich zu erkennen, dass mehrere Substanzen mit CIT koeluieren.

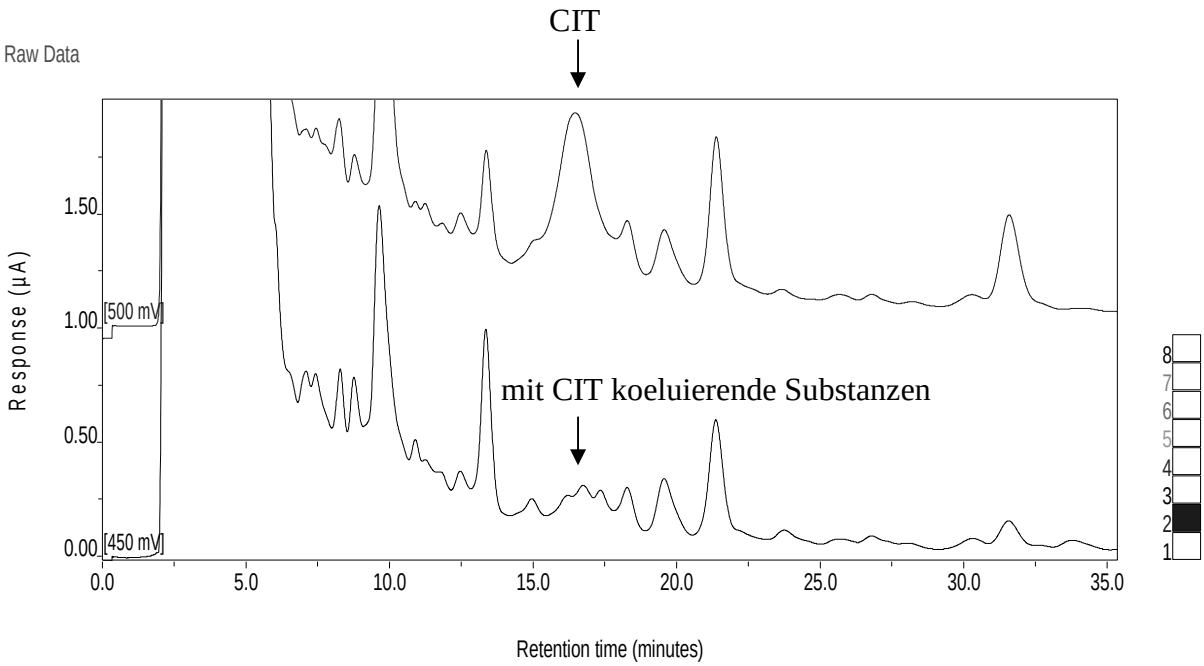


Abbildung 29: CEAD-Chromatogramme einer mit CIT gespikten Bio-Roggenprobe (Elutionsmittel: 0.05 M *ortho*-Phosphorsäure in 25% wässrigem ACN, pH 3.0)

Nachdem es noch immer nicht gelungen war, die Analysenprobleme zu beheben, wurde eine neue ACE 3 C18-Säule eingebaut und mit dieser weitergearbeitet.

5.3.2.4 Versuche mit Methode 1 nach Einbau einer neuen Trennsäule

Eine neue Trennsäule sollte die Analyse mit der ursprünglich entwickelten Methode 1 wieder zulassen. Da aber die Flussrate auf 0.25 mL/min reduziert werden musste, waren die CIT- und GEN-Substanzpeaks sehr breit und eluierten knapp nacheinander, was wiederum die Gefahr erhöhte, dass die beiden Substanzpeaks früher oder später erneut überlappen könnten. Um dies zu vermeiden, wurde die Entwicklung einer Gradientenelutionsmethode in Angriff genommen.

5.3.2.5 Entwicklung eines Gradientenprogramms

Mit folgendem Gradienten konnte bei einer Flussrate von 0.4 mL/min und einer Säulentemperatur von 20°C eine Trennung von CIT und GEN in einer Standardlösung erreicht werden (siehe Abb. 30):

0 min	100% A	0% B
5 min	100% A	0% B
17 min	0% A	100% B
20 min	100% A	0% B
25 min	100% A	0% B

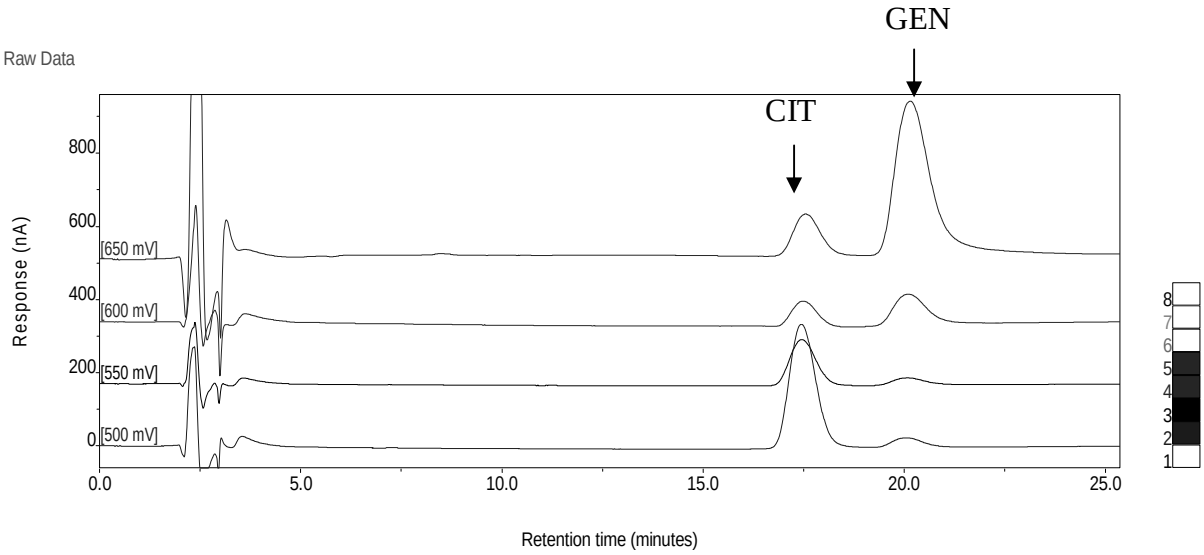


Abbildung 30: CEAD-Chromatogramme einer CIT-GEN-Standardlösung (Elution mittels Gradientenprogramm)

Beim darauffolgenden Probenversuch mit einer Bio-Roggen-Probe waren CIT und GEN erneut nicht getrennt und überlappten. Daher sollte ein anderer interner Standard gesucht werden.

5.3.2.6 Suche nach einem internen Standard

Es wurden Standardlösungen von Citrinin und Hydroxymatairesinol, Citrinin und Secoisolariciresinol, Citrinin und Lariciresinol, Citrinin und Pinoresinol sowie Citrinin und Daidzein im Hinblick auf einen neuen internen Standard untersucht. Alle getesteten Substanzen zeigten eine Retentionszeit zwischen 5 und 15 min und würden somit in den Proben mit der Matrix eluieren. Es wurde daher für künftige Bestimmungen kein interner Standard verwendet.

5.3.2.7 Optimierung des Gradienten

Nachdem kein geeigneter interner Standard ermittelt werden konnte, wurde das Gradientenprogramm zur Trennung und Detektion von CIT optimiert. Folgender Gradient wurde als optimal für die Trennung des Citrinins von Matrixsubstanzen ermittelt:

0 min	100%A	0%B
3 min	100%A	0%B
16 min	0%A	100%B
19 min	100%A	0%B
30 min	100%A	100%B

Die weiteren HPLC-Bedingungen wurden wie bisher beibehalten:

Flussrate: 0.4 mL/min

Säulenofen: 20°C

Injektionsvolumen: 100 µL

Potentiale: +450, +500, +550, +600, +650, +700, +750, +800 mV

5.3.2.8 Analyse verschiedener Probenmatrices

Vier verschiedene Probenmatrices (gemahlener Bio-Roggen, Bio-Dinkel-Vollmehl, Bio-Weizen-Vollmehl und Maismehl) wurden mit der in 5.3.2.7 beschriebenen Methode analysiert. Im Laufe der Analysen zeigte sich ein so starkes Tailing des CIT-Peaks, dass am Ende der Messserie CIT nach 30 min noch immer nicht vollständig aus der Säule eluiert war.

Aus diesem Grund wurde die Säule gewaschen und ein Gradient gesucht, der zur Trennung von CIT aus einer Bio-Roggen-Probe besser geeignet war. Dieser Gradient (siehe Kapitel 5.3.2.5) wurde, um weitere Verunreinigungen der Säule durch Matrixkomponenten zu verhindern, mit einem Waschschritt ergänzt. Diese Gradientenelutionsmethode soll nun im folgenden Kapitel vorgestellt werden.

5.3.3 Methode 2: Gradientenelution

Die unten dargestellten Ergebnisse wurden durch Anwenden des in 4.7.3.1 aufgezeichneten Gradientenprogramms erzielt. Zu klären war, inwiefern die veränderten Elutionsbedingungen die elektrochemische Detektion des Citrinins, die Kalibriergerade, die Nachweisgrenze in Standardlösungen und in Proben, die Reproduzierbarkeit sowie die Wiederfindungen beeinflussen.

5.3.3.1 Strom-Spannungskurve von Citrinin

Die Strom-Spannungskurve von CIT zeigte im Gegensatz zur isokratischen Elution zwei Maxima – eines bei +500 mV und ein weiteres bei +650 mV (siehe Abb. 31). Offensichtlich lief unter den vorliegenden Elutionsbedingungen ein zweistufiger elektrochemischer Prozess ab. Für die quantitative Auswertung war der Kanal bei +500 mV jenem von +650 mV auf Grund der höheren Empfindlichkeit und des geringeren Rauschens, welche im Kanal +500 mV erreicht wurden, vorzuziehen.

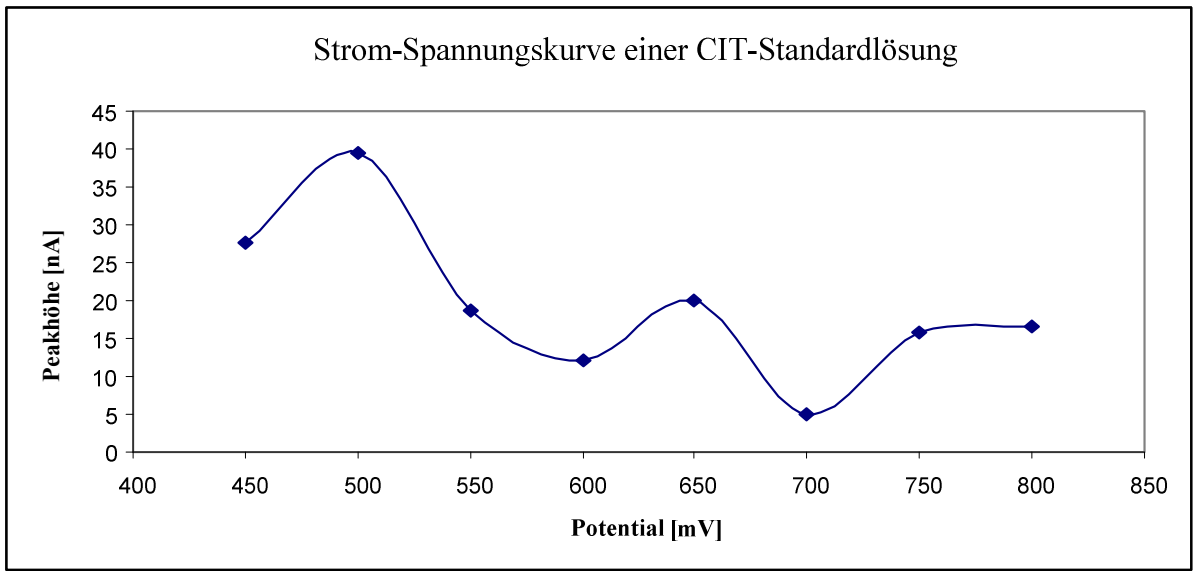


Abbildung 31: Strom-Spannungskurve einer CIT-Standardlösung [50 µg/L in ACN/Wasser (30/70, v/v)] aufgenommen unter den HPLC-CEAD-Bedingungen der Methode 2

5.3.3.2 Kalibriergerade und Nachweisgrenze in Standardlösungen

Unter den neuen Elutionsbedingungen wurde eine Kalibriergerade im Konzentrationsbereich zwischen 0.5 und 50 µg/L erstellt (siehe Abb. 32).

Das Rauschen im Chromatogramm einer CIT-Standardlösung mit c = 1 µg/L betrug 0.15 nA. Ein Peak muss also eine Peakhöhe von mindestens 0.45 nA haben, um als Substanzpeak erkannt zu werden. Die Peakhöhe des CITs betrug in dieser Standardlösung 0.608 nA und wurde als experimentell ermittelte Nachweisgrenze angesehen.

Die Nachweisgrenze wurde auch rechnerisch dadurch ermittelt, dass der dreifache Wert des Rauschens (0.45 nA) in die Kalibriergerade eingesetzt wurde. Hierbei ergab sich eine Nachweisgrenze von 1.5 µg/L, die nur geringfügig über der experimentell ermittelten Nachweisgrenze (1 µg/L) liegt.

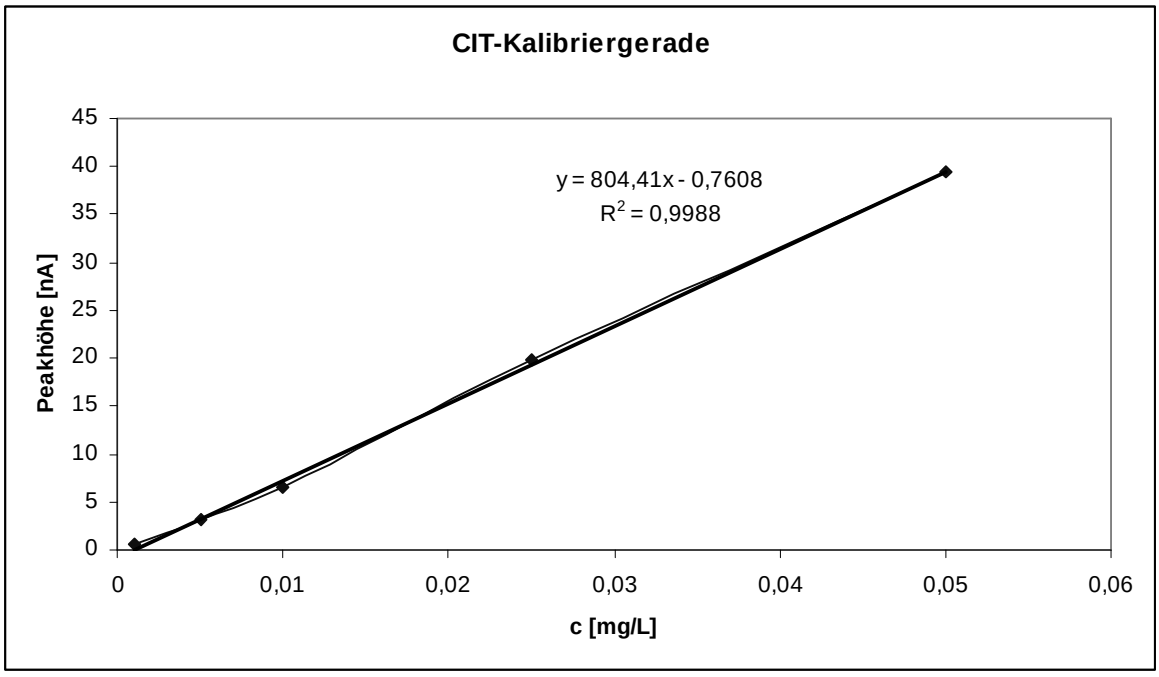


Abbildung 32: Darstellung einer Kalibriergeraden für CIT-Standards, ermittelt durch Verwendung der Methode 2

5.3.3.3 Bestimmung der Reproduzierbarkeit

Die Berechnung der Reproduzierbarkeit erfolgt mit den in 5.3.1.5 angegebenen Formeln.

Für die Intraday-Reproduzierbarkeit wurde für die Peakhöhen ein Mittelwert von 77.7 nA, eine Standardabweichung von 2.2 nA und eine relative Standardabweichung von 2.8% und für die Peakflächen ein Mittelwert von 2.94 µC, eine Standardabweichung von 0.1 µC und eine relative Standardabweichung von 2.9% berechnet.

Für die Interday-Reproduzierbarkeit wurde für die Peakhöhen ein Mittelwert von 77.5 nA, eine Standardabweichung von 2.2 nA und eine relative Standardabweichung von 2.9% und für die Peakflächen ein Mittelwert von 3.1 µC, eine Standardabweichung von 0.2 µC und eine relative Standardabweichung von 7.1% ermittelt.

Auch hier zeigte sich wie schon bei Methode 1 eine höhere relative Standardabweichung für die Auswertung über die Peakflächen an fünf aufeinanderfolgenden Tagen, wo hingegen die relativen Standardabweichungen der Peakhöhen sowohl für die Interday- als auch die Intraday-Reproduzierbarkeit sehr gut übereinstimmten.

5.3.3.4 Probenanalyse

In keiner der untersuchten Proben konnte CIT nachgewiesen werden. Daher war es erforderlich, in Proben aus vier verschiedenen Matrices, denen CIT zugesetzt wurde, die Wiederfindung und die Nachweisgrenzen zu ermitteln.

5.3.3.5 Ermittlung der Wiederfindung für verschiedene Probenmatrices

Für die vier verschiedenen Probenmatrices wurde durch Vergleichen der Peakhöhen mit einer CIT-Standardlösung, die die Konzentration aufwies, die dem Zusatz von CIT in den gespikten Proben entsprach, die Wiederfindung bestimmt. Ein Zusatz von 0.1 µg CIT/g Probe bedeutete eine CIT-Konzentration von 200 µg/L im Extrakt bzw. der zur Berechnung der Wiederfindung herangezogenen Standardlösung. Die Werte für die Wiederfindung werden in Tab. 13 illustriert.

Tabelle 13: Wiederfindung nach Analyse mittels Methode 2

Matrix	Wiederfindung
Gemahlener Bio-Roggen	55±8%
Bio-Weizen-Vollmehl	65±11%
Bio-Dinkel-Vollmehl	44±20%

Die Wiederfindung war relativ gering, was einerseits daran lag, dass für diese Versuche niedrigere CIT-Zusätze als in den bisher durchgeführten Versuchen gewählt wurden und andererseits, dass Citrinin nicht vollständig von den Probenmatrices abgetrennt werden konnte (siehe Abb. 36 bis 41 in Kapitel 5.3.3.7).

In Maismehl eluierte Citrinin so stark mit Matrixkomponenten, dass für diese Probe keine Wiederfindung berechnet werden konnte (siehe Abb. 34 und 35 in Kapitel 5.3.3.7).

5.3.3.6 Bestimmung der Nachweisgrenzen für diverse Probenmatrices

Die Nachweisgrenzen für Citrinin in gemahlenem Bio-Roggen, Bio-Weizen-Vollmehl und Bio-Dinkel-Vollmehl wurden rechnerisch ermittelt. Dazu wurde in den Chromatogrammen der ungespikten Proben das Rauschen der Basislinie in dem Bereich ermittelt, in dem CIT eluiert. Durch Berechnen des 3-fachen Rauschens und Einsetzen in die Kalibriergerade, die am selben Tag erstellt wurde (siehe Abb. 33), wurden die Nachweisgrenzen bestimmt.

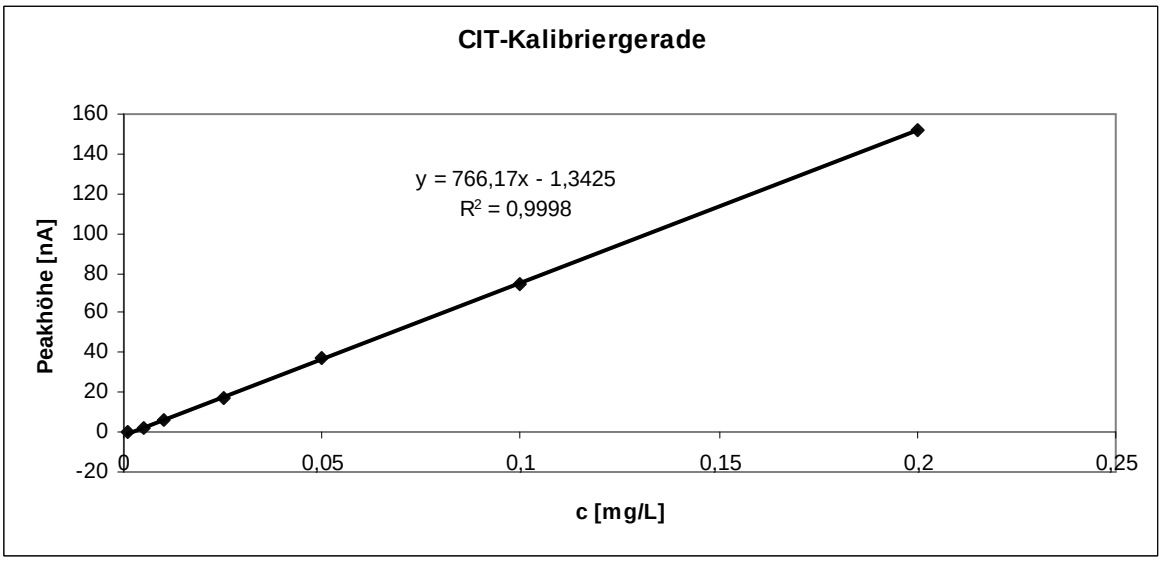


Abbildung 33: Kalibriergerade für die Berechnung der Nachweisgrenzen in den unterschiedlichen Probenmatrices

Bei gemahlenem Bio-Roggen betrug das Dreifache des Rauschens 42 nA, was umgerechnet eine Nachweisgrenze von 28.5 µg/kg bedeutet.

Für Bio-Weizen-Vollmehl wurde ein dreifaches Rauschsignal von 24 nA ermittelt, was zu einer Nachweisgrenze von 16.5 µg/kg führt.

Bei Bio-Dinkel-Vollmehl konnte ein dreifaches Rauschsignal von 27 nA festgestellt werden, was umgerechnet eine Nachweisgrenze von 18.5 µg/kg ergibt.

Für Maismehl konnte aufgrund von koeluierenden Matrixkomponenten keine Nachweisgrenze ermittelt werden.

5.3.3.7 Darstellung einiger Chromatogramme

Im Folgenden werden einige CEAD-Chromatogramme, die durch Anwendung der Methode 2 entstanden, illustriert.

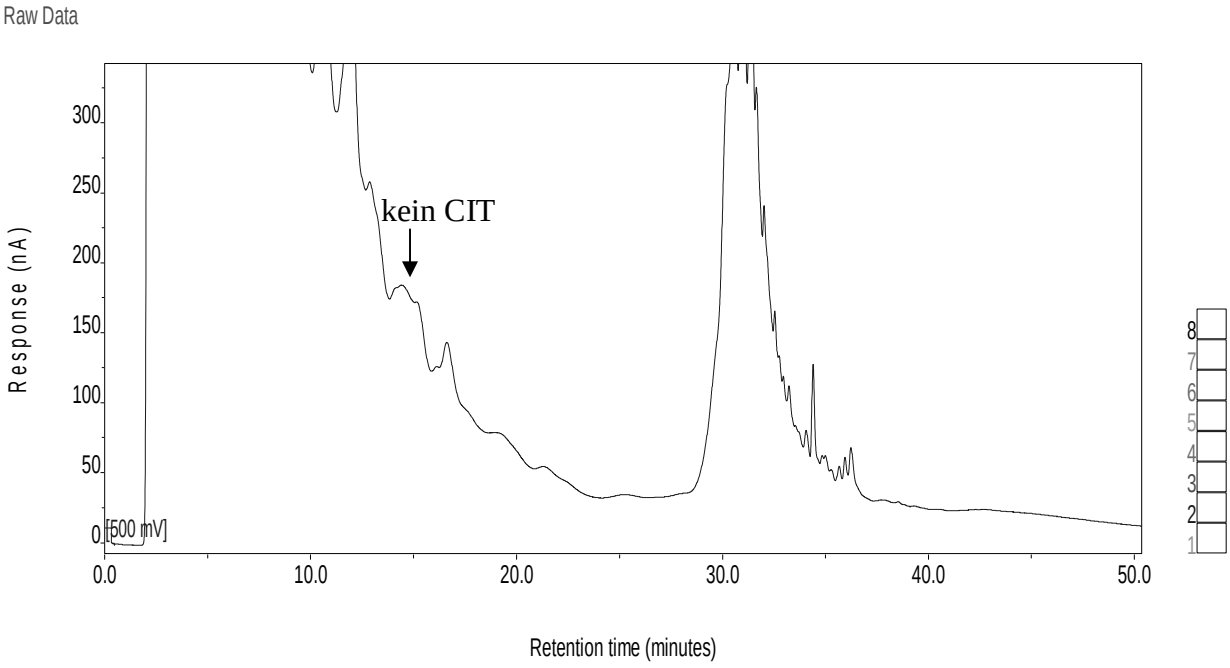


Abbildung 34: CEAD-Chromatogramm einer ungespikten Maismehlprobe

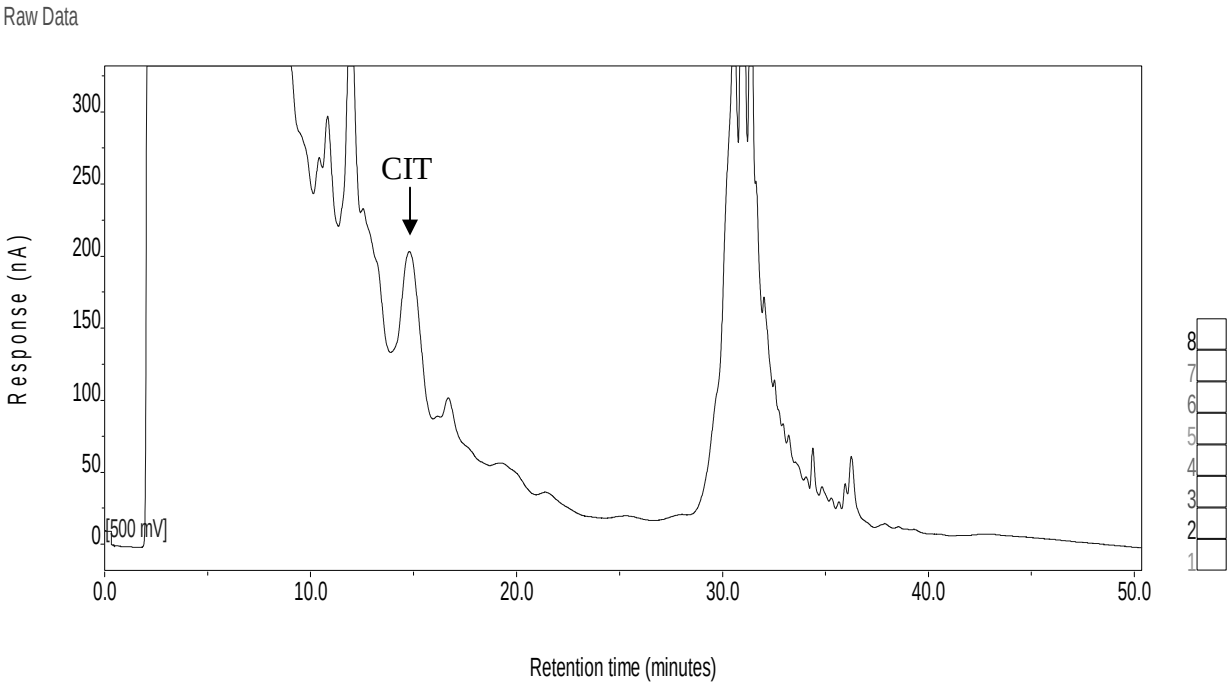


Abbildung 35: CEAD-Chromatogramm einer mit 0.1 µg CIT/g gespikten Maismehlprobe

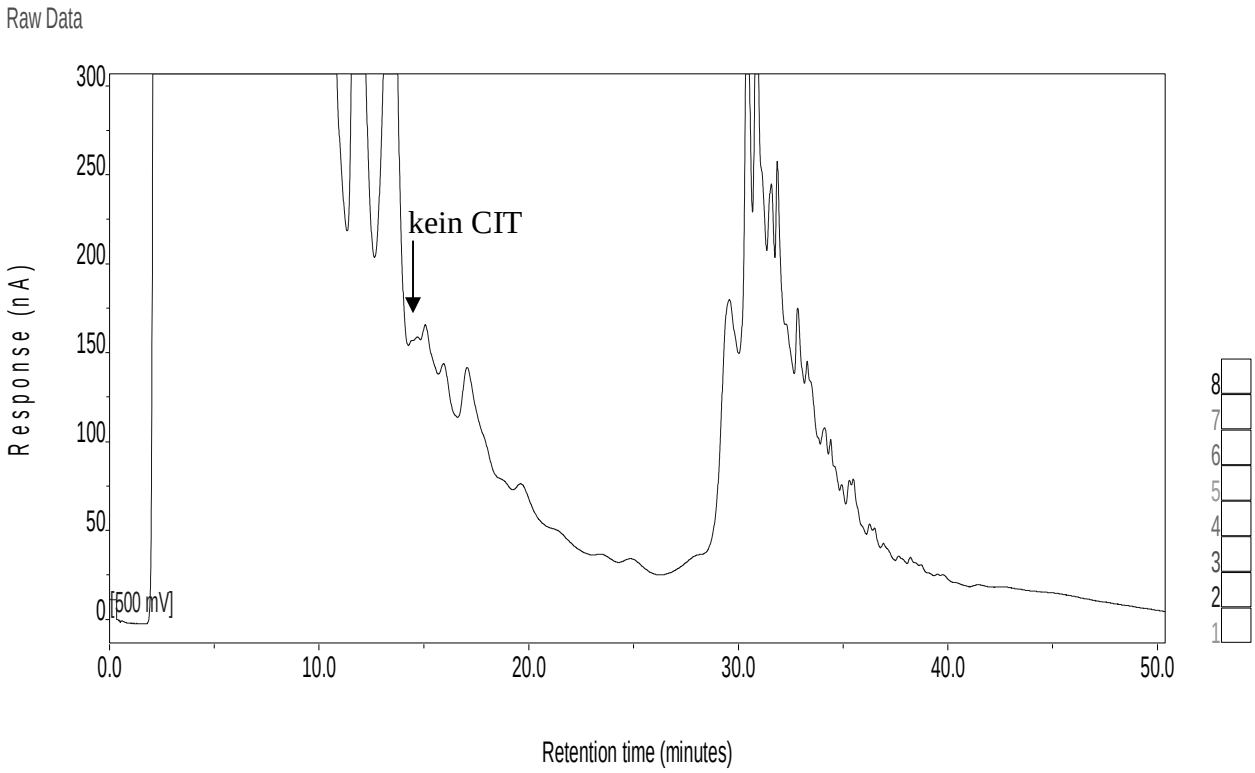


Abbildung 36: CEAD-Chromatogramm einer ungespikten Roggenprobe

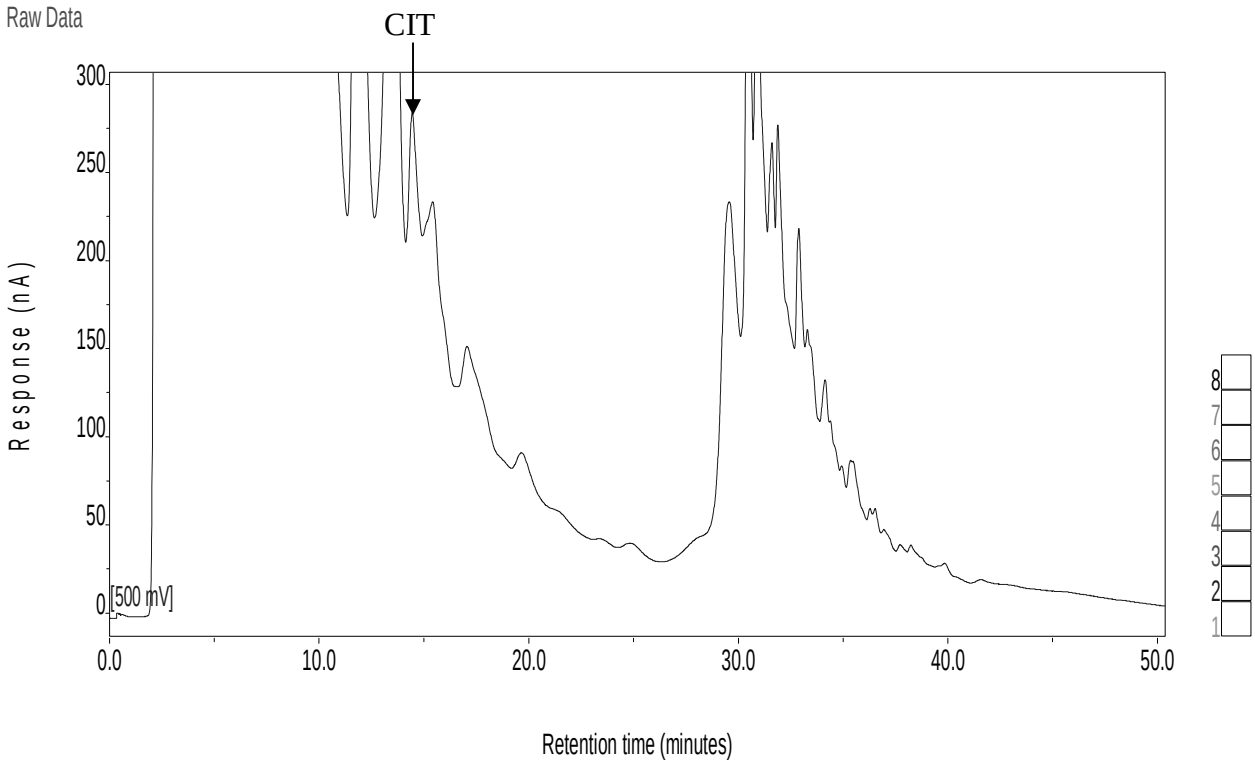


Abbildung 37: CEAD-Chromatogramm einer mit 0.1 µg CIT/g gespikten Roggenprobe

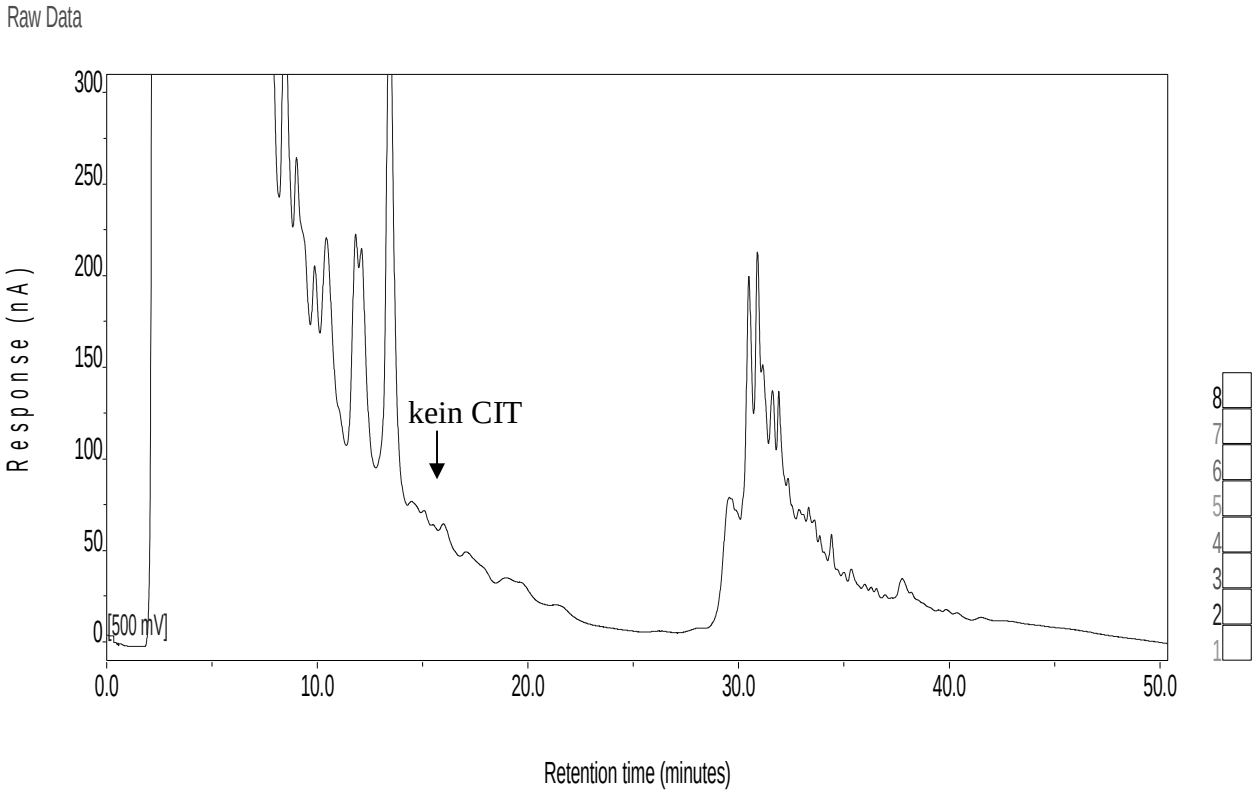


Abbildung 38: CEAD-Chromatogramm einer ungespikten Weizenprobe

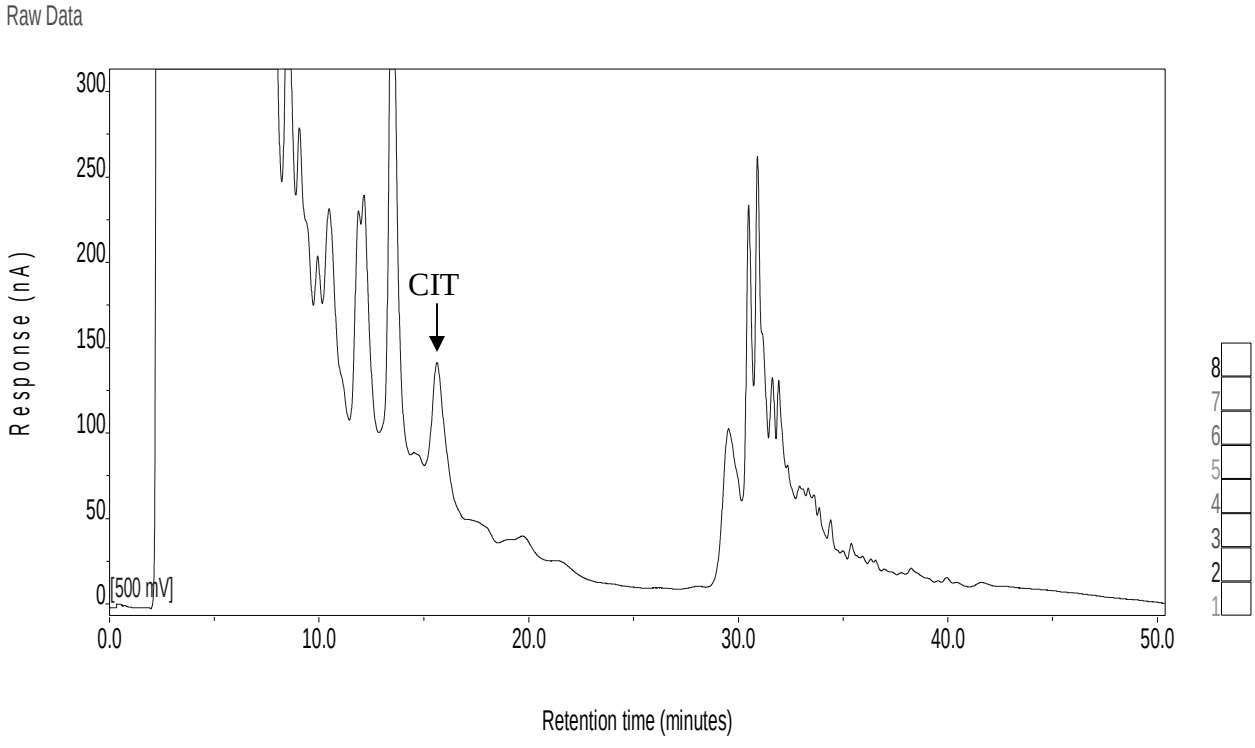


Abbildung 39: CEAD-Chromatogramm einer mit 0.1 µg CIT/g gespikten Weizenprobe

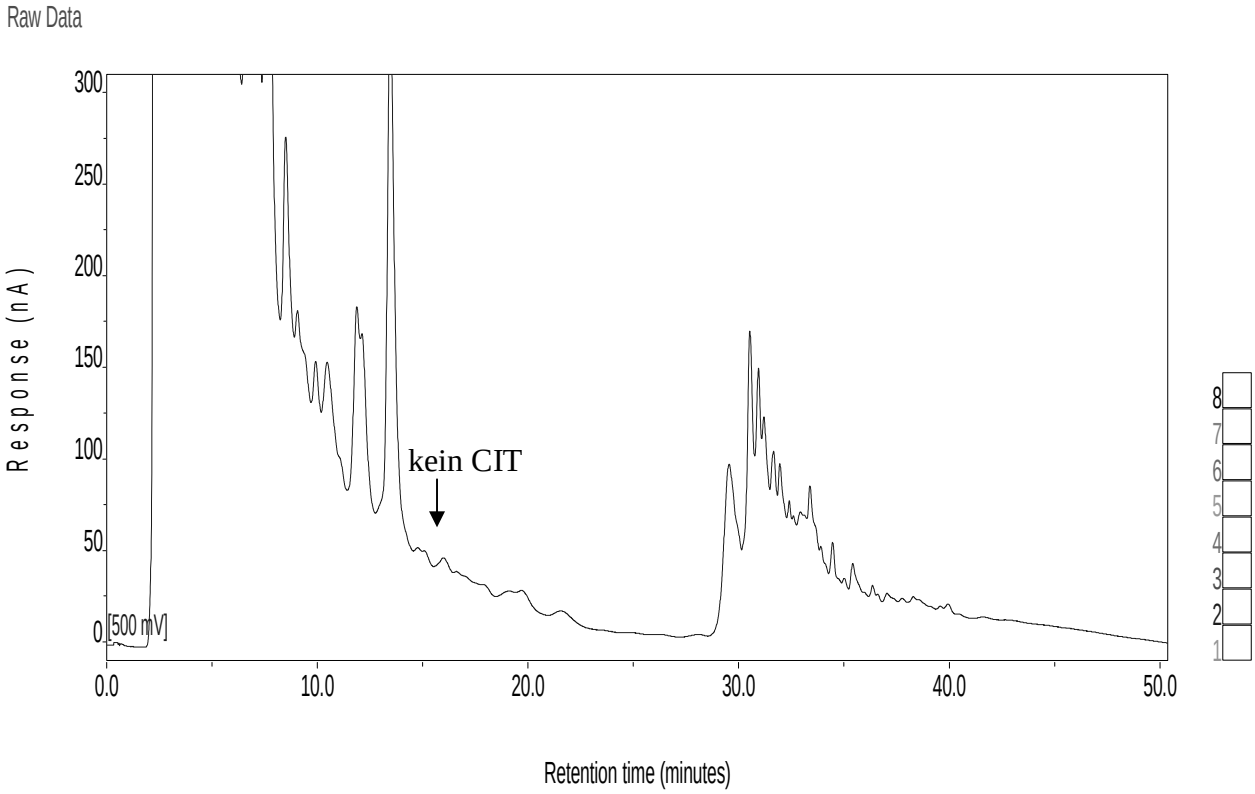


Abbildung 40: CEAD-Chromatogramm einer ungespikten Dinkelprobe

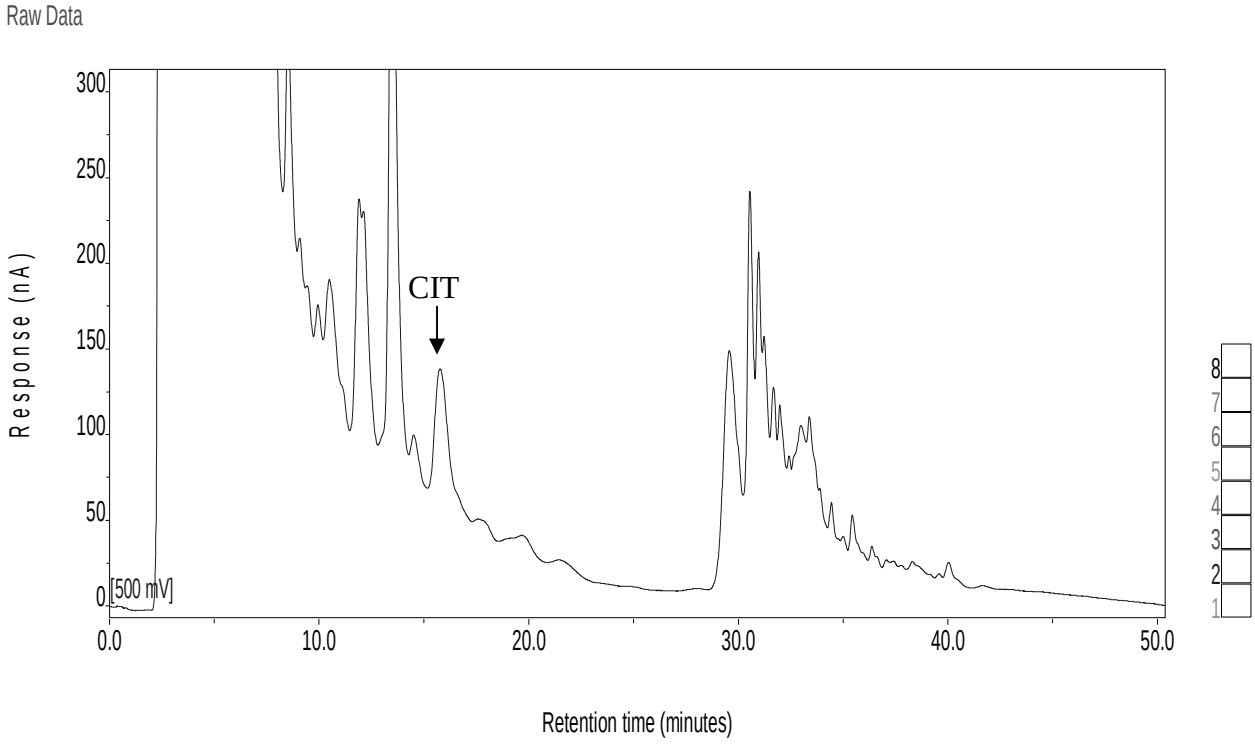


Abbildung 41: CEAD-Chromatogramm einer mit 0.1 µg CIT/g gespikten Dinkelprobe

5.3.3.8 Zusammenfassung der experimentellen Daten und der Ergebnisse der Methode 2 (Gradientenelution)

Zum besseren Überblick werden hier noch einmal die Methodenparameter sowie die Ergebnisse zusammengefasst.

Mobile Phase A: 0.05 M *ortho*-Phosphorsäure in 30% wässrigem ACN, pH 3.3
Mobile Phase B: 0.05 M *ortho*-Phosphorsäure in 20% wässrigem ACN, pH 3.3
Mobile Phase C: 0.05 M *ortho*-Phosphorsäure in 50% wässrigem ACN, pH 3.3

Gradientenprogramm:	0 min	100% A	0% B	0% C
	5 min	100% A	0% B	0% C
	17 min	0% A	100% B	0% C
	20 min	100% A	0% B	0% C
	22 min	0% A	0% B	100% C
	32 min	0% A	0% B	100% C
	34 min	100% A	0% B	0% C
	50 min	100% A	0% B	0% C

Flussrate: 0.4 mL/min
Injektionsvolumen: 100 µL

Detektorpotentiale: +450, +500, +550, +600, +650, +700, +750, +800 mV
Optimales Detektionspotential: +500 mV

Nachweisgrenzen:	Standardlösung:	Experimentell: 1 µg/L
		Rechnerisch: 1.5 µg/L
	Weizen:	Rechnerisch: 16.5 µg/kg
	Dinkel:	Rechnerisch: 18.5 µg/kg
	Roggen:	Rechnerisch: 28.5 µg/kg

Reproduzierbarkeit gemessen mit einer CIT-Standardlösung (100 µg/L):

Intraday:	Peakhöhe: 2.8%	Interday:	Peakhöhe: 2.9%
	Peakfläche: 2.9%		Peakfläche: 7.1%

6 DISKUSSION

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine ASE-Methode zur Extraktion von Citrinin aus Cerealienmatrices erstellt. Diese erlaubt die schnelle Extraktion von Citrinin unter milden Bedingungen und mit niedrigem Probenmaterial- und Lösungsmittelverbrauch. In bisher publizierten Arbeiten wurde Citrinin mit erheblichem Zeitaufwand und hohem Proben- und Lösungsmittelverbrauch aus Lebensmitteln extrahiert. So wurden bisher 20–100 g Probenmaterial und Volumina von 100–200 mL organischem, zum Teil angesäuertem Lösungsmittel benötigt. Auch der Zeitaufwand war mit bis zu 45 min erheblich. Die anschließende Probenaufreinigung erfolgte entweder über eine Flüssig/Flüssig-Extraktion unter hohem Lösungsmittelverbrauch und großem Zeitaufwand [12, 13, 60] oder über eine Festphasenextraktion, z.B. mit Polyamidsäulchen [5]. Die im Zuge dieser Arbeit entwickelte ASE-Methode verbrauchte pro Extraktion nur 2 g Probe und ca. 22 mL Lösungsmittel und dauerte 23 min. Extrahiert wurde bei erhöhtem Druck (1500 psi) und einer Temperatur von 40°C. Bei Extraktionsversuchen mit höheren Temperaturen (60°C und 80°C) zeigten sich deutlich niedrigere Wiederfindungen, was auf die Instabilität des Mykotoxins bei höheren Temperaturen hinweist. Ein weiterer Vorteil dieser Extraktionsmethode ist die Automatisierbarkeit, wodurch ein hoher Probendurchsatz erreicht werden kann. Die anschließende Aufarbeitung der ASE-Extrakte belief sich lediglich auf die Einengung der Extrakte bis zur Trockene am Rotationsverdampfer, der Solubilisierung in Lösungsmittel und Zentrifugation.

Nach voltammetrischen Voruntersuchungen zeigte sich, dass Citrinin in Britton-Robinson-Puffer an einer glasartigen Kohlenstoffelektrode oxidierbar ist und nach Konditionierung der Elektroden ein konzentrationsabhängiges Signal liefert. Das pH-Optimum zur Detektion von CIT in Britton-Robinson-Puffer liegt zwischen 3 und 4. Die Voraussetzungen zur Entwicklung einer HPLC-CEAD-Methode waren somit gegeben.

Bisher wurde in der Literatur mehrmals darüber berichtet, dass insbesondere bei der chromatographischen Analyse von Citrinin häufig Probleme, wie z.B Tailing der Peaks, fluktuiernde Retentionszeiten und interferierende Peaks, auftraten [1, 5, 6]. Die Schwierigkeiten bei der Analyse von Citrinin können an dieser Stelle bestätigt werden, im Zuge der durchgeführten Untersuchungen mussten unter anderem Probleme mit auftretendem Peak-Tailing und Überlagerungen von Peaks bearbeitet werden. Letzten Endes konnte aber eine neue Methode zur Trennung und Detektion von Citrinin mittels HPLC-CEAD nach Extraktion mittels ASE erarbeitet werden.

Zunächst wurde eine isokratische Trennmethode mittels Umkehrphasenchromatographie mit einer C18-Säule und anschließender Detektion bei Potentialen zwischen +450 und +800 mV ausgearbeitet. Es stellten sich jedoch im Laufe der Zeit einige Analysenprobleme ein, unter anderem die Überlappung des Citrinin-Signals mit dem des Genisteins, das als interner Standard verwendet werden sollte. Nach Einbau eines Säulenofens und Konstanthaltung der Säulentemperatur bei 20°C konnte wieder eine Trennung der beiden Substanzen erreicht werden. Mit Fortlaufen der Analysen wurde jedoch erneut eine Überlappung des Citrinin- und Genistein-Signals beobachtet. Da auch eine Regeneration der Säule keine Abhilfe schaffen konnte, wurde mit einer neuen RP-18-Säule weitergearbeitet. Mit dieser neuen Säule konnte jedoch nicht mehr die ursprüngliche Flussrate der isokratischen Methode erreicht werden, wodurch die Gefahr bestand, dass Citrinin und Genistein früher oder später wieder überlappen würden. Daher wurde eine Gradientenelutionsmethode entwickelt. Da aber auch hier das Problem der Überlappung von Citrinin und Genistein im Chromatogramm auftrat, wurde Genistein als interner Standard ausgeschlossen. Es konnte auch sonst keine Substanz gefunden werden, die als interner Standard geeignet gewesen wäre, daher wurde auf die Verwendung eines internen Standards verzichtet. Der bisher verwendete Gradient wurde zur Trennung von CIT aus der Matrix optimiert (siehe Kapitel 5.3.2.5 und 5.3.2.7). Im Laufe der weiteren Analysen trat in Probenversuchen mit fortschreitender Probenzahl starkes Tailing des Citrinin-Peaks auf, das darauf zurückzuführen war, dass die Chromatographiesäule durch Matrixkomponenten kontinuierlich verunreinigt wurde. Die Säule wurde daher durch einen Waschschritt im Gradientenprogramm gereinigt. Wie sich in den Chromatogrammen zeigte, war dieser Waschschritt unbedingt notwendig, da dadurch noch sehr viele Matrixbestandteile von der Säule eluiert werden konnten. Durch Integration dieses Waschschrittes wurden weitere Analysenprobleme bis zur Fertigstellung dieser Arbeit verhindert.

Mit dieser neuen HPLC-CEAD-Methode wurde Citrinin nach Trennung mittels Gradienten bei Potentialen zwischen +450 und +800 mV mit einem Signalmaximum bei +500 mV detektiert. In Standardlösungen konnte eine Nachweisgrenze von 1 µg/L erreicht werden. Die Reproduzierbarkeiten beliefen sich im Standardversuch auf 2.8% (Peakhöhe) bzw. 2.9% (Peakfläche) für die Intraday-Reproduzierbarkeit und auf 2.9% (Peakhöhe) bzw. 7.1% (Peakfläche) für die Interday-Reproduzierbarkeit.

In den Proben wurden Nachweisgrenzen von 16.5 µg/kg (Weizen), 18.5 µg/kg (Dinkel) und 28.5 µg/kg (Roggen) ermittelt. Als Wiederfindung konnte für gemahlenen Bio-Roggen 55±8%, für Bio-Weizen-Vollmehl 65±11% und für Bio-Dinkel-Vollmehl

44±20% gefunden werden. Diese Wiederfindungen waren relativ gering, was damit verbunden war, dass niedrige Spikelevel von 0.1 µg CIT/g Probe gewählt wurden, Citrinin nicht vollständig von der jeweiligen Probenmatrix abgetrennt werden konnte und keine Basislinientrennung im Chromatogramm vorlag. Dies war ebenso der Grund für die doch relativ hohen Nachweisgrenzen. In Maismehl konnten weder die Wiederfindung noch die Nachweisgrenze ermittelt werden, da Citrinin zu stark mit Matrixkomponenten koeluierte.

In keiner der untersuchten Proben konnte eine Kontamination mit CIT nachgewiesen werden.

Mit den bisher veröffentlichten HPLC-Methoden zur Trennung von Citrinin und anschließender Detektion mit UV- bzw. Fluoreszenzdetektoren oder HPLC gekoppelt mit zeitaufgelöster Luminiszenzdetektion konnten niedrigere Nachweisgrenzen und höhere Wiederfindungen als mit der in der vorliegenden Arbeit entwickelten HPLC-CEAD-Methode erreicht werden. Mittels Fluoreszenzdetektion wurden Nachweisgrenzen von 0.11 ng/g in Reis bei einer Wiederfindung von 103±5.4% [60], 1-2 µg/kg (Wiederfindung: 74-90%) [5] bzw. 0.5 µg/kg (Wiederfindung: 80.3±5%) [13] in Cerealien sowie 0.2 µg/kg (Wiederfindung: 69 bis 83.5%) in entkernten Oliven [12] ermittelt. Beim Nachweis von Citrinin in biologischen Flüssigkeiten (Blutplasma, Harn, Gallenflüssigkeit) mittels HPLC-UV wurde eine Nachweisgrenze von 2-5 ng (absolut) gefunden [57]. Bei HPLC gekoppelt mit zeitaufgelöster Luminiszenzdetektion wurde für Käseextrakte eine Nachweisgrenze von $2x10^{-6}$ M Citrinin angegeben [62].

Um die Abtrennung von Citrinin von Matrixkomponenten in Cerealienmatrices zu verbessern und damit auch für die HPLC-CEAD-Methode niedrigere Nachweisgrenzen zu erreichen, müsste noch eine Probenaufreinigung durchgeführt werden. Zur Probenaufreinigung wäre z.B. eine an die Extraktion mittels ASE angeschlossene Immunoaffinitätschromatographie denkbar. Eine Probenaufreinigung könnte dann den integrierten Waschschritt ablösen und die HPLC-Laufzeit verkürzen. Leider konnte aus Zeitgründen die Entwicklung einer Probenaufreinigungsmethode nicht mehr durchgeführt werden.

7 ANHANG

7.1 Zusammenfassung

Ziel dieser Diplomarbeit war die Entwicklung einer neuen Methode zur Trennung und Detektion von Citrinin mit Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) gekoppelt mit einem coulometrischen Elektroden-Array-Detektor (CEAD) nach Probenaufarbeitung mit beschleunigter Lösungsmittelextraktion (ASE).

Citrinin ist ein Mykotoxin, das von verschiedenen Schimmelpilzen wie *Penicillium*, *Aspergillus* und *Monascus* gebildet wird. Es wirkt nierenschädigend und steht im Verdacht, beim Menschen Krebs zu verursachen. Kontaminationen mit Citrinin sind in landwirtschaftlichen Rohstoffen, Lebens- und Futtermitteln zu finden.

Eine Extraktionsmethode für Citrinin aus Cerealien, basierend auf beschleunigter Lösungsmittelextraktion, wurde entwickelt. Als optimale Parameter wurden drei Zyklen (zu je 5 min) bei 40°C, einem Druck von 1500 psi und Methanol/Wasser (80/20, v/v) als Solvens ermittelt. Anschließend wurde Citrinin mittels Umkehrphasenchromatographie von anderen Substanzen getrennt, indem ein Gradient verwendet wurde, der mit 0.05 M *ortho*-Phosphorsäure in 30% wässrigem Acetonitril (pH 3.3 eingestellt mit 3 M Natriumhydroxidlösung) startete und dann auf 0.05 M *ortho*-Phosphorsäure in 20% wässrigem Acetonitril (pH 3.3) reduziert wurde, gefolgt von einem Säulenwaschschritt mit 0.05 M *ortho*-Phosphorsäure in 50% wässrigem Acetonitril (pH 3.3) und Detektion mittels CEAD bei Potentialen zwischen +450 und +800 mV. Die Intraday- und Interday-Reproduzierbarkeit (Peakhöhen) in einer Standardlösung (100 µg/L) betrug 2.8 und 2.9%.

Die Nachweisgrenze (S/N=3) für Citrinin in Standardlösungen war 1 µg/L, die Nachweisgrenzen in Roggen, Weizen und Dinkel wurden mit 28.5, 16.5 und 18.5 µg/kg ermittelt. Die Wiederfindungen in gespikten Proben variierten von 55±8% (Roggen) bis zu 65±11% (Weizen) und 44±20% (Dinkel). In keiner der untersuchten Proben konnte Citrinin nachgewiesen werden.

7.2 Abstract

Aim of this Master Thesis was the development of a new method for the separation and detection of citrinin with high performance liquid chromatography (HPLC) coupled with a coulometric electrode array detector (CEAD) after sample preparation with accelerated solvent extraction (ASE).

Citrinin is a mycotoxin, produced by several moulds like *Penicillium, Aspergillus* and *Monascus.* It acts as a nephrotoxic substance and is suspected to be carcinogenic for humans. Contaminations with citrinin are found in agricultural commodities, foods and feeds.

An extraction method for Citrinin from cereals based on ASE was developed. The optimal parameters were found to be three cycles (each five minutes) at 40°C, a pressure of 1500 psi and methanol/water (80/20, v/v) as solvent. Then citrinin was separated from other substances by reversed phase chromatography using a gradient starting with 0.05 M *ortho*-phosphoric acid in with 30% aqueous acetonitrile (adjusted to pH 3.3 with 3 M aqueous sodium hydroxide) going down to 0.05 M *ortho*-phosphoric acid in 20% aqueous acetonitrile (pH 3.3) followed by a column-washing step with 0.05 M *ortho*-phosphoric acid in 50% aqueous acetonitrile (pH 3.3) and detection in a coulometric electrode array detector (CEAD) at potentials between +450 and +800 mV. The intra-day and inter-day reproducibility (peak heights) in a standard solution (100 µg/L) were 2.8% and 2.9%, respectively.

The LOD (S/N=3) for citrinin in standard solutions was 1 µg/L, the LODs in rye, wheat and spelt were 28.5, 16.5 and 18.5 µg/kg, respectively. The recovery in spiked samples varied from 55±8% (rye) to 65±11% (wheat) and 44±20% (spelt). In the investigated samples citrinin could not be detected.

7.3 Lebenslauf

Name:	Magdalena Wiplinger
Geburtsdatum:	17.11.1981
Familienstand:	verlobt mit Michael A. Fuchs
Ausbildung:	
seit 10/2000	Universität Wien, Fakultät für Chemie Studium der Chemie mit den Schwerpunkten auf Biochemie und Lebensmittelchemie
09/1992 – 06/2000	Bundesgymnasium, Rohrbach**,** Oberösterreich Matura: 06/2000
09/1988 – 07/1992	Volksschule, Haslach an der Mühl, Oberösterreich
Weiterbildung:	
05/2008	Lebensmittelchemikertage 2008, Eisenstadt *im Rahmen dieser: Posterpräsentation "Detection of Citrinin in Cereals by HPLC-CEAD"*
05/2008	Projektmanagement (Seminar des Bildungsforums, Gesellschaft für Aus- und Weiterbildung)
04/2008	1st Symposium of the Vienna Research Platform of Nutrition and Food Sciences (VRPNFS) *im Rahmen dieser: Posterpräsentation "Detection of Citrinin in Cereals by HPLC-CEAD"*
04/2008	Fokus Analytik-MS "More Sensitivity" (Agilent Technologies)

Arbeitserfahrung:

03/2008 – 07/2008	Universität Wien, Fakultät für Chemie, Institut für Analytische Chemie und Lebensmittelchemie *Tutorin, Lehrveranstaltung „Lebensmittelanalytisches Praktikum“*
10/2007 – 02/2008	Universität Wien, Fakultät für Chemie, Institut für Organische Chemie *Tutorin, Lehrveranstaltung „Chemische Übungen für Ernährungswissenschafter“*
03/2005 – 07/2005 und 09/2005 – 07/2006	Octapharma Pharmazeutika Produktionsges.m.b.H *Analytikerin, Abteilung Forschung und Entwicklung*

Praktikumserfahrung:

08/2006 – 09/2006	Octapharma Pharmazeutika Produktionsges.m.b.H, Wien *Ferialpraktikantin, Abteilung Forschung und Entwicklung*
08/2005	Octapharma Pharmazeutika Produktionsges.m.b.H, Wien *Ferialpraktikantin, Abteilung Forschung und Entwicklung*
02/2005	Umweltbundesamt GmbH, Wien *Ferialpraktikantin, Abteilung Chemikalien*
07/2004 – 08/2004	Donauchem HandelsGmbH, Wien-Liesing *Ferialarbeiterin, Labor*
07/2003 – 08/2003	DSM Fine Chemicals Austria, Linz *Ferialpraktikantin, Abteilung CPC*

7.4 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
ASE	Accelerated Solvent Extraction
a_w	Wasseraktivität
BEN	Balkan Endemic Nephropathy
bidest. H_2O	bidestilliertes Wasser
BPA	Bisphenol A
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
CEAD	coulometrischer Elektroden-Array-Detektor
CIT	Citrinin
DCS	Direct Current Stripping
DNA	Deoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DP	Differential-Puls
DPP	Differential-Puls-Polarographie
entw.	entweder
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
GEN	Genistein
GSSG	Glutathiondisulfid (oxidierte Form des Glutathions)
h	Stunde(n)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IARC	International Agency for Research on Cancer
i.B.	in Bezug
i.p.	intraperitoneal
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
L	Liter
LD	letale Dosis
LOD	limit of detection
M	molar (g/mol)

mg	Milligramm
min	Minute(n)
mind.	mindestens
mL	Milliliter
mRNA	messanger Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie
mV	Millivolt
MPN	Mycotoxine Porcine Nephropathy
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)
OTA	Ochratoxin A
ppm	parts per million (1 ppm = 1 µg/g)
psi	pound per square inch (Pfund pro Quadratzoll, 1 psi = 6.894757 kPa)
(rel.) Stabw.	(relative) Standardabweichung
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
S/N	signal/noise-ratio
S/R	Signal/Rausch-Verhältnis
Tab.	Tabelle
Temp.	Temperatur
v/v	volume/volume
z.B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µM	Mikromolar

7.5 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformeln von Citrinin ($C_{13}H_{14}O_5$) 7
Abbildung 2: Citrinin H1 17
Abbildung 3: Citrinin H2 17
Abbildung 4: Phenol A, Phenol A-Säure, Decarboxycitrinin, Dicitrinin A-D (aus [54]) 18
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Messanordnung für die Drei-Elektroden-Technik (A) sowie der Potentialveränderungen an der Phasengrenze (B) im stromlosen Zustand (durchgezogene Linie) und bei Stromfluss (strichlierte Linie) [63] 26
Abbildung 6: Stufenförmiger Verlauf der Spannung und Strom-Spannungskurve in der Differential-Puls-Voltammetrie [63] 27
Abbildung 7: ASE 100-Apparatur von Dionex [68] 32
Abbildung 8: Aufbau einer HPLC-Apparatur [64] 38
Abbildung 9: Darstellung zweier Kanäle eines CEAD-Zellblocks (modifiziert aus [70]) 39
Abbildung 10: Strom-Spannungskurve von Citrinin in 0.05 M *ortho*-Phosphorsäure in 30% wässrigem ACN, ermittelt durch CEAD mit 8 Elektroden 41
Abbildung 11: DP-Voltammogramm der Reduktion einer CIT-Messlösung mit c (CIT) = 44 mg/L bei pH 2.4 69
Abbildung 12: DP-Voltammogramm einer CIT-Standardlösung (44 mg/L) in Britton-Robinson-Puffer (pH 2.4) 70
Abbildung 13: pH-Abhängigkeit von CIT in Britton-Robinson-Puffer bei Oxidation an einer glasartigen Kohlenstoffelektrode 71
Abbildung 14: Eichfunktion von CIT in Britton-Robinson-Puffer bei pH 3.5 72
Abbildung 15: Wiederfindung gespikter Roggenproben bei Extraktion mit 100% Methanol in Abhängigkeit von der Temperatur 73
Abbildung 16: Wiederfindung gespikter Roggenproben bei Extraktion mit Methanol/Wasser (80/20, v/v) in Abhängigkeit von der Temperatur 74
Abbildung 17: Wiederfindung gespikter Roggenproben bei Extraktion mit Ethanol/Wasser (80/20, v/v) in Abhängigkeit von der Temperatur 75
Abbildung 18: Wiederfindung gespikter Roggenproben im Vergleich bei 40°C und 60°C in Abhängigkeit vom verwendeten Lösungsmittel 76
Abbildung 19: Wiederfindung gespikter Roggenproben bei 40°C und 60°C in An- und Abwesenheit von Aluminiumoxid 77
Abbildung 20: Optimierung der Anzahl der Zyklen während einer Extraktion mittels ASE .. 78

Abbildung 21: Optimierung der eingesetzten Probemenge und des Endvolumens 79
Abbildung 22: Schematische Darstellung der Probenaufarbeitung..... 80
Abbildung 23: CEAD-Chromatogramme einer CIT-Standardlösung mit 0.05 M *ortho*-Phosphorsäure in 50% wässrigem Methanol, pH 3.0 als Elutionsmittel..... 81
Abbildung 24: CEAD-Chromatogramme einer mit CIT gespikten Bio-Roggenprobe mit 0.05 M *ortho*-Phosphorsäure in 50% wässrigem Methanol, pH 3.0 als Elutionsmittel 82
Abbildung 25: Strom-Spannungskurve einer CIT-Standardlösung (1 mg/L) bei isokratischer Trennung mit 0.05 M *ortho*-Phosphorsäure in 50% wässrigem Methanol, pH 3.0 83
Abbildung 26: Kalibriergerade von CIT-Standardlösungen (c = 0.1 bis 25 µg/L) 85
Abbildung 27: CEAD-Chromatogramme einer ungespikten Bio-Roggen-Probe (analysiert mittels Methode 1)..... 88
Abbildung 28: CEAD-Chromatogramme nicht getrennter Substanzpeaks von CIT und GEN in einer Bio-Roggen-Probe..... 88
Abbildung 29: CEAD-Chromatogramme einer mit CIT gespikten Bio-Roggenprobe (Elutionsmittel: 0.05 M *ortho*-Phosphorsäure in 25% wässrigem ACN, pH 3.0)..... 90
Abbildung 30: CEAD-Chromatogramme einer CIT-GEN-Standardlösung (Elution mittels Gradientenprogramm) 91
Abbildung 31: Strom-Spannungskurve einer CIT-Standardlösung [50 µg/L in ACN/Wasser (30/70, v/v)] aufgenommen unter den HPLC-CEAD-Bedingungen der Methode 2..... 94
Abbildung 32: Darstellung einer Kalibriergeraden für CIT-Standards, ermittelt durch Verwendung der Methode 2 95
Abbildung 33: Kalibriergerade für die Berechnung der Nachweisgrenzen in den unterschiedlichen Probenmatrices 98
Abbildung 34: CEAD-Chromatogramm einer ungespikten Maismehlprobe 99
Abbildung 35: CEAD-Chromatogramm einer mit 0.1 µg CIT/g gespikten Maismehlprobe... 99
Abbildung 36: CEAD-Chromatogramm einer ungespikten Roggenprobe..... 100
Abbildung 37: CEAD-Chromatogramm einer mit 0.1 µg CIT/g gespikten Roggenprobe 100
Abbildung 38: CEAD-Chromatogramm einer ungespikten Weizenprobe..... 101
Abbildung 39: CEAD-Chromatogramm einer mit 0.1 µg CIT/g gespikten Weizenprobe..... 101
Abbildung 40: CEAD-Chromatogramm einer ungespikten Dinkelprobe 102
Abbildung 41: CEAD-Chromatogramm einer mit 0.1 µg CIT/g gespikten Dinkelprobe..... 102

7.6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Citrinin-bildende Schimmelpilze [1, 19, 20] 8
Tabelle 2: Citrinin-Gehalte kontaminierter Rohstoffe, Lebens- und Futtermittel 9
Tabelle 3: LD_{50}-Werte für CIT aus [1, 24, 25] 10
Tabelle 4: Experimentelle Bedingungen für die Aufnahme der Grundstromkurven im kathodischen und anodischen Potentialbereich 49
Tabelle 5: DCS-Konditionierungsmethode 50
Tabelle 6: Messmethode für die Reduktion von CIT 51
Tabelle 7: Messmethode für die Oxidation von CIT 51
Tabelle 8: ASE-Parameter 54
Tabelle 9: Zusammensetzung verschiedener Laufmittelgemische zur Ermittlung eines geeigneten Elutionsmittels 57
Tabelle 10: Elutionsmittel zur Entwicklung einer Gradientenmethode 63
Tabelle 11: Zusammensetzung der für Methode 2 verwendeten mobilen Phasen 67
Tabelle 12: Optimierte ASE-Parameter 80
Tabelle 13: Wiederfindung nach Analyse mittels Methode 2 97

7.7 Literaturverzeichnis

[1] European Mycotoxin Awareness Network. (2008) *Citrinin. Basic Fact Sheet 9*. http://services.leatherheadfood.com/mycotoxins/item.asp?number=9&fsid=14&mytype=Basic. Online Ressource, abgerufen am 05.06.2008.

[2] Pfohl-Leszkowicz, A., Tozlovanu, M., Manderville, R., Peraica, M., Castegnaro, M., Stefanovic, V. (2007) *New molecular and field evidences for the implication of mycotoxins but not aristolochic acid in human nephropathy and urinary tract tumor*. Mol. Nutr. Food. Res. **51,** 1131-1146.

[3] Vrabcheva, T., Usleber, E., Dietrich, R., Märtlbauer, E. (2000) *Co-occurance of Ochratoxin A and Citrinin in Cereals from Bulgarian Villages with a History of Balkan Endemic Nephropathy*. J. Agric. Food Chem. **48,** (6), 2483-2488.

[4] IARC. (1986) *IARC Monographs of the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans: Some Naturally Occurring and Synthetic Food Components, Furocoumarines and Ultraviolet Radiation*. IARC Monographs **40,** 67.

[5] Meister, U. (2004) *New method of citrinin determination by HPLC after polyamide column clean-up*. Eur. Food. Res. Technol. **218,** 394-399.

[6] Xu B-J., Jia X.-Q., Gu L-J., Sung C-K. (2006) *Review on the qualtitative and quantitative analysis of the mycotoxin citrinin*. Food Control **17,** 271-285.

[7] Comerio, R., Pinto, V.E.F., Vaamonde, G. (1998) *Influence of water activity on Penicillium citrinum growth and kinetics of citrinin accumulation in wheat*. Int. J. Food Microbiol. **42,** (3), 219-223.

[8] Martins, M. L., Gimeno, A., Martins, H.M., Bernardo, F. (2002) *Co-occurance of patulin and citrinin in Portugese apples with rotten spots*. Food Addit. Contamin. **19,** (6), 568-574.

[9] Schneweis, I., Meyer, K., Hörmansdorfer, S., Bauer, J. (2001) *Metabolites of Monascus ruber in silages*. J. Anim. Phys. Anim. Nutr. **85,** (1-2), 38-44.

[10] Shu, P. Y., Lin, C.H. (2002) *Simple and Sensitive Determination of Citrinin in Monascus by GC-Selected Ion Monitoring Mass Spectrometry*. Anal. Sci. **18,** (3), 283-287.

[11] Gimeno, A., Martins, M.L. (1983) *Rapid thin layer chromatographic determination of patulin, citrinin and aflatoxin in apples and pears, and their juices and jams*. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **66,** (1), 85-91.

[12] El Adlouni, C., Tozlovanu, M., Naman, F., Faid, M., Pfohl-Leszkowicz, A. (2006) *Preliminary data on the presence of mycotoxins (ochratoxin A, citrinin and aflatoxin B1) in black table olives "Greek style" of Moroccan origin*. Mol. Nutr. Food. Res. **50,** 507-512.

[13] Molinie, 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_1: development of a method for simultaneous extraction of ochratoxin A and citrinin*. Food Chem. **92,** 391-400.

[14] Abramson, D., Usleber, E., Märtlbauer, E. (1995) *An Indirect Enzyme Immunoassay for the Mycotoxin Citrinin*. Appl. Environ. Microbiol. **61,** (5), 2007-2009.

[15] Kononenko, G. P., Burkin, A.A. (2007) *Immunoenzyme Method for the Detection of Citrinin*. J. Anal. Chem. **62,** (7), 691-696.

[16] Wikipedia. (2008) *Citrinin*. http://de.wikipedia.org/wiki/Citrinin. Online Ressource, abgerufen am 31.07.2008.

[17] Poupko, R., Luz, Z., Destro, R. (1997) *Carbon-13 NMR of Citrinin in the Solid State and in Solutions*. J. Phys. Chem. A **101,** (28), 5097-5102.

[18] Heider, E. M., Harper, J.K., Grant, D.M., Hoffman, A., Dugan, F., Tomer, D.P., O´Neill, K. (2006) *Exploring unusual antioxidant activitiy in a bentoic acid derivate: a proposed mechanism for citrinin*. Tetrahedron **62,** 1199-1208.

[19] Bischoff, M. *Mykotoxine im Getreide unter Berücksichtigung der Ernte 1998*. Lufa der Landwirtschaftskammer Weser-Ems. http://www.lufa-nord-west.de/lufa2/downloads/pdf/mykotoxine_bischoff.pdf. Online Ressource, abgerufen am 10.06.2008.

[20] Bennett, J. W., Klich, M. (2003) *Mycotoxins*. Clin. Microbiol. Rev. **16,** 497-516.

[21] Odhav, B., Naicker, V. (2002) *Mycotoxins in South African traditionally brewed beers*. Food Addit. Contamin. **19,** (1), 55-61.

[22] Sabater-Vilar, M., Maas, R.F.M., Fink-Gremmels, J. (1999) *Mutagenicity of commercial Monascus fermentation products and the role of citrinin contamination*. Mutat. Res. **444,** 7-16.

[23] Richard, E., Heutte, N., Sage, L., Pottier, D., Bouchart, V., Lebailly, P., Garon, D. (2007) *Toxigenic fungi and mycotoxins in mature corn silage*. Food Chem. Toxicol. **45,** 2420-2425.

[24] Jordan, W. H., Carlton, W.W., Sansing, G.A. (1978) *Citrinin Mycotoxicosis in the Rat. I. Toxicology and Pathology*. Toxicol. **16,** 431-439.

[25] Hanika, C., Carlton, W.W., Tuite, J. (1983) *Citrinin mycotoxicosis in the rabbit*. Food Chem. Toxicol. **21,** (4), 487-493.

[26] Philips, R. D., Berndt, W.O., Hayes, A.W. (1979) *Distribution and excretion of [14C]citrinin in rats*. Toxicol. **12,** (3), 285-298.

[27] Berndt, W. O. (1983) *Transport of Citrinin by Rat Renal Cortex*. Arch. Toxicol. **54,** 35-40.

[28] Haraguchi, H., Hashimoto, K., Shibata, K., Taniguchi, M., Oi, S. (1987) *Mechanism of Antifungal Action of Citrinin*. Agric. Biol. Chem. **51,** (5), 1373-1378.

[29] Aleo, M. D., Wyatt, R.D., Schnellmann, R.G. (1991) *The role of altered mitochondrial function in citrinin-induced toxicity to rat renal proximal tiúbule suspensions*. Toxicol. Appl. Pharmacol. **109,** (3), 455-463.

[30] Chagas, G. M., Campello, A.P., Kluppel, L.W., Oliveira, B.M. (1995) *Citrinin affects the oxidative metabolism of BHK-21 cells*. Cell Biochem. Funct. **13,** (4), 267-271.

[31] Ribeiro, S. M., Chagas, G.M., Campello, A.P., Klüpel, M.L. (1997) *Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. V. Effect on the homeostasis of the reactive oxygen species*. Cell Biochem. Funct. **15,** (3), 203-209.

[32] Iwahashi, H., Kitagawa, E., Suzuki, Y., Ueda, Y., Ishizawa, Y., Nobumasa, H., Kuboki, Y., Hosoda, H., Iwahashi, Y. (2007) *Evaluation of toxicity of the mycotoxin citrinin using yeast ORF DNA microarray and Oligo DNA microarray*. BMC Genomics **8,** (95).

[33] 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*. Toxicol. Lett. **161,** (2), 143-151.

[34] Chang, W. H. (2007) *Citrinin induces apoptosis via a mitochondrial-dependent pathway and inhibition of survival signals in embryonic stem cells, and causes developmental injury in blastocysts*. Biochem. J. **404,** 317-326.

[35] Jordan, W. H., Carlton, W.W., Sansing, G.A. (1978) *Citrinin Mycotoxicosis in the Rat. II. Clinicopathological Observations*. Toxicol. **16,** 441-447.

[36] Haberman, P. J., Baggett, J. McC., Berndt, W.O. (1987) *The effect of chromate on citrinin-induced renal dysfunktion in the rat*. Toxicol. Lett. **38,** 83-90.

[37] Lura, M. C., Fuentes, M., Cabagna, M., Gonzalez, A.M., Nepote, A., Giugni, M.C., Rico, M., Latorre, M.G. (2004) *Structural and ultrastructural alterations in BALB/c mice: Effects of Penicillium citrinum metabolites*. Mycopathologia **158,** 233-238.

[38] Kumar, M., Dwivedi, P., Sharma, A.K., Singh, N.D., Patil, R.D. (2007) *Ochratoxin and citrinin nephrotoxicity in New Zealand White rabbits: an ultrastructural assessment*. Mycopathologia **163,** 21-30.

[39] Krejci, M. E., Bretz, N.S., Koechel, D.A. (1996) *Citrinin produces acute adverse changes in renal function and ultrastructure in pentobarbital-anesthetized dogs without concomitant reductions in potassium plasma*. Toxikol. **106,** (1-3), 167-177.

[40] Bernhoft, A., Keblys, M., Morrison, E., Larsen, H.J.S., Flaoyen, A. (2004) *Combined effects of selected Penicillium mycotoxins on in vitro proliferation of porcine lymphozytes*. Mycopathologia **158,** 441-450.

[41] Keblys, M., Bernhoft, A., Höfer, C.C., Morrison, E., Larsen, H.J.S., Flaoyen, A. (2004) *The effects of the Penicillium mycotoxins citrinin, cyclopiazonic acid, ochratoxin a, patulin, penicillic acid, and roquefortine C on in vitro proliferation of porcine lymphocytes*. Mycopathologia **158,** 317-324.

[42] Krogh, P., Hald, B., Plestina, R., Ceovic, S. (1977) *Balkan (endemic) nephropathy and foodborn ochratoxin A: preliminary results of a survey of foodstuffs*. Acta. Pathol. Microbiol. Scand. [B] **85,** (3), 238-240.

[43] Golinski, P., Hult, K., Grabarkiewicz-Szczesna, J., Chelkowski, J., Kneblewski, P., Szebiotko, K. (1984) *Mycotoxine Porcine Nephropathy and Spontaneous Occurance of Ochratoxine A Residues in Kidneys and Blood of Polish Swine*. Appl. Environ. Microbiol. **47,** (6), 1210-1212.

[44] Stoev, S. D., Hald, B., Mantle, P.G. (1998) *Porcine nephropathy in Bulgaria: a progressive syndrome of complex or uncertain (mycotoxin) aetiology*. Vet. Rec. **142,** (8), 190-194.

[45] Singh, N. D., Sharma, A.K., Dwivedi, P., Patil, R.D., Kumar, M. (2007) *Citrinin and endosulfan induced teratogenic effects in Wistar rats*. J. Appl. Toxicol. **27,** (2), 143-151.

[46] Fenske, M., Fink-Gremmels, J. (1990) *Effects of fungal metabolites on testosteron secretion in vitro*. Arch. Toxicol. **64,** 72-75.

[47] Martin, W., Lorkowski, G., Creppy, E.E., Dirheimer, G., Röschenthaler, R. (1986) *Action of Citrinin on Bacterial and Plasmid DNA in Vivo and in Vitro*. Appl. Environ. Microbiol. **52,** (6), 1273-1279.

[48] Pfeiffer, E., Groß, K., Metzler, M. (1998) *Aneuploidogenic and clastogenic potential of the mycotoxins citrinin and patulin*. Carcinogenesis **19,** (7), 1313-1318.

[49] Jeswal, P. (1996) *Citrinin-induced chromosomal abnormalitis in the bone marrow cells of Mus musculus*. Cytobios. **86,** (344), 29-33.

[50] Kitabatake, N., Trivedi, A.B., Doi, E. (1991) *Thermal Decomposition and Detoxifikation of Citrinin under Various Moisture Conditions*. J. Agric. Food. Chem. **39,** 2240-2244.

[51] 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*. J. Chem. Soc., Perkin Trans. I2167-2171.

[52] Trivedi, A. B., Doi, E., Kitabatake, N. (1993) *Toxic Compounds Formed on Prolonged Heating of Citrinin under Watery Conditions*. J. Food Sci. **58,** (1), 229-232.

[53] Hirota, M., Menta, A.B., Yoneyama, K., Kitabatake, N. (2002) *A Major Decomposition Product, Citrinin H2, from Citrinin on Heating with Moisture*. Biosci. Biotechnol. Biochem. **66,** (1), 206-210.

[54] Clark, B. R., Capon, R.J., Lacey, E., Tennant, S., Gill, J.H. (2006) *Citrinin revisited: from monomers to dimers and beyond*. Org. Biomol. Chem. **4,** 1520-1528.

[55] Gimeno, A. (1984) *Determination of citrinin in corn and barley on thin layer chromatographic plates impregnated with glycolic acid*. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **67,** (1), 194-196.

[56] Lee, K. Y., Poole, C.F., Zlatkis, A. (1980) *Simultaneous Multi-Mycotoxin Determination by High Performance Thin-Layer Chromatography*. Anal. Chem. **52,** 837-842.

[57] Philips, R. D., Hayes, A.W., Berndt, W.O. (1980) *High-performance liquid chromatographic analysis of the mycotoxin citrinin and its application to biological fluids*. J. Chromatogr. **190,** (2), 419-427.

[58] Reinhard, H., Zimmerli, B. (1999) *Reversed-phase liquid chromatographic behavior of the mycotoxins citrinin and ochratoxin A*. J. Chromatogr. A **862,** 147-159.

[59] Franco, C. M., Fente, C.A., Vazquez, B., Cepeda, A., Lalloui, L., Prognon, P., Mahuzier, G. (1996) *Simple and sensitive high-performance liquid chromatography-fluorescence method for the determination of citrinin: Application to the analysis of fungal cultures and cheese extracts*. J. Chromatogr. A **723,** 69-75.

[60] Nguyen, M. T., Tozlovanu, M., Tran, T.L., Pfohl-Leszkowicz, A. (2007) *Occurance of aflatoxin B1, citrinin and ochratoxin A in rice in five provinces of the central region of Vietnam*. Food Chem. **105,** 42-47.

[61] Vail, R. B., Homann, M.J. (1990) *Rapid and sensitive detection of citrinin production during fungal fermentation using high-performance liquid chromatography*. J. Chromatogr. **535,** (1-2), 317-323.

[62] Vazquez, B. I., Fente, C., Franco, C., Cepada, 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*. J. Chromatogr. A **727,** 185-193.

[63] Buchberger, W. (1998) *Elektrochemische Analyseverfahren: Grundlagen, Instrumentation, Anwendungen*. Spektrum Akademischer Verlag, 65-104, 199-204, 209-239.

[64] Otto, M. (2000) *Analytische Chemie*. Wiley-VCH, 2, 381-396, 413-430, 452-474.

[65] Dionex. *Methods Optimization in Accelerated Solvent Extraction (ASE)*. **Technical Note 208**.

[66] Dionex. *Accelerated Solvent Extraction (ASE) Sample Preparation Techniques for Food and Animal Feed Samples*. **Technical Note 209**.

[67] Dionex. *Investigation of Carryover or Cross-contamination in the Dionex ASE 200*. **Technical Note 207**.

[68] Dionex. (2002) *ASE 100 Accelerated Solvent Extractor Operator´s Manual*.

[69] Skoog, D. A., Leary, J.J. (1996) *Instrumentelle Analytik - Grundlagen, Geräte Anwendungen*. Springer-Verlag, 623-647, 675-702, 762-763.

[70] Acworth, I. N., Naoi, M., Parvez, H., Parvez, S. (1997) *Coulometric electrode array detectors for HPLC*. Progress in HPLC-HPCE, VSP BV, 6, 3-74.

[71] Meyer, V. (1979) *Praxis der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie*. Diesterweg, Salle, Sauerländer, 91.

[72] Mazur, W., Adlercreutz, H. (2000) *Overview of Naturally Occuring Endocrine-Active Substances in the Human Diet in Relation to Human Health*. Nutrition **16,** 654-687.