



universität
wien

Diplomarbeit

Titel der Diplomarbeit

Aflatoxine in Reis: Eine Erhebung am österreichischen Markt

angestrebter akademischer Grad

Magister der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat)

Verfasser:	Florian Vouk
Matrikel-Nummer:	0309029
Studienrichtung lt. Studienblatt:	Ernährungswissenschaften
Betreuer:	Ao.Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr. nat techn. Ebrahim Razzazi-Fazeli

Wien, am 15.01.2008

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung und Fragestellung	7
2.	Reis	9
2.1.	Herkunft und Geschichte	9
2.2.	Morphologie der Reispflanze	12
2.2.1.	Aufbau der Reispflanze	12
2.2.2.	Aufbau des Reiskorns	13
2.3.	Reisanbauformen	14
2.3.1.	Bewässerungsreis	14
2.3.2.	Regenabhängiger Niederungsreis	14
2.3.3.	Regenabhängiger Bergreis	15
2.3.4.	Tiefwasserreisanbau	15
2.4.	Verarbeitung von Reis	15
2.5.	Charakteristika von Basmatireis und Jasminreis	16
2.6.	Die größten Reisproduzenten weltweit	16
2.7.	Die größten Reisexporteure weltweit	17
2.8.	Ernährungsphysiologie	17
2.8.1.	Kohlenhydrate	18
2.8.2.	Protein	18
2.8.3.	Vitamine	19
2.8.4.	Mineralstoffe	19
2.8.5.	Fett	20
2.8.6.	Antinutritive Inhaltsstoffe	21
2.9.	Bedeutung von Reis in der menschlichen Ernährung	21
2.10.	Vorkommen von Aflatoxinen in Reis	22
2.11.	Einfluss der Lagerung auf den Aflatoxingehalt	23
2.12.	Faktoren, die die Aflatoxinbildung beeinflussen	24
2.12.1.	Wasseraktivität	24
2.12.2.	Temperatur	24
2.12.3.	Substratquelle	25
2.12.4.	pH-Wert	25
3.	Mykotoxine	26
3.1.	Möglichkeiten der Nahrungsmittelkontamination	26
3.1.1.	Primärkontamination	26
3.1.2.	Sekundärkontamination	27
3.1.3.	Carry-over	27
3.2.	Einteilung Mykotoxin bildender Schimmelpilze	27
3.2.1.	Feldpilze	27
3.2.1.1.	Trichothecene	27
3.2.1.2.	Fumonisine	28
3.2.1.3.	Zearalenon	28
3.2.1.4.	Moniliformin	29
3.2.2.	Lagerpilze	29
3.2.2.1.	Ochratoxin A	29
3.2.2.2.	Citrinin	30
3.2.2.3.	Patulin	30
3.2.2.4.	Sterigmatocystin	31

3.3.	Aflatoxine.....	31
3.3.1.	Allgemeines.....	31
3.3.2.	Aufnahme und Biotransformation	34
3.3.3.	Ausscheidung.....	36
3.3.4.	Wirkungsmechanismus	37
3.3.5.	Toxizität.....	37
3.3.5.1.	Akute Toxizität	38
3.3.5.2.	Chronische Toxizität	38
3.3.6.	Gesetzliche Regelungen	40
4.	Methoden für den Nachweis von Aflatoxinen.....	43
4.1.	HPLC.....	43
4.1.1.	Aufbau	43
4.1.2.	Entgasung der mobilen Phase	44
4.1.3.	Elutionsmethoden der HPLC	44
4.1.3.1.	HPLC mit isokratischer Elution	44
4.1.3.2.	HPLC mit Gradientenelution	44
4.1.4.	Parameter der HPLC.....	45
4.1.4.1.	Der Verteilungskoeffizient	45
4.1.4.2.	Retentionsfaktor und Lineargeschwindigkeit.....	45
4.1.4.3.	Trennfaktor α	46
4.1.5.	Peakverbreiternde Prozesse	46
4.1.5.1.	Van-Deemter-Gleichung	46
4.1.5.2.	Extra-Column-Effects	47
4.2.	HPLC-Detektoren	47
4.2.1.	UV/vis-Detektoren	48
4.2.2.	Fluoreszenzdetektoren.....	49
4.3.	Derivatisierungsmethoden für Aflatoxine	50
4.3.1.	Möglichkeiten der Vorsäulenderivatisierung	50
4.3.1.1.	Derivatisierung mit Trifluoressigsäure.....	50
4.3.2.	Möglichkeiten der Nachsäulenderivatisierung	51
4.3.2.1.	Derivatisierung mit Pyridiniumbromid-Perbromid.....	51
4.3.2.2.	Prinzip der Derivatisierung mit Iod	51
4.3.2.3.	Derivatisierung mit Cyclodextrin	51
4.3.2.4.	Derivatisierung mittels elektrochemischer Zelle.....	52
5.	Methoden der Probenvorbereitung	54
5.1.	Flüssig-Flüssig-Extraktion	54
5.2.	Festphasen-Extraktion.....	54
5.3.	Immunaффinitätschromatographie (IAC)	54
6.	Material und Methoden	57
6.1.	Reagenzien und Referenzproben.....	57
6.2.	Sonstige Gegenstände	57
6.3.	Geräte	58
6.3.1.	HPLC-Apparatur.....	58
6.4.	Sonstige Geräte.....	58
6.5.	Methoden	59
6.5.1.	Reisproben	59
6.5.2.	Herkunftsländer der Reisproben.....	60
6.5.3.	Probennahme.....	60

6.5.4.	Extraktion	60
6.5.5.	Clean-up	61
6.5.6.	Quantifizierung mittels HPLC	61
6.5.7.	Berechnung der Probenkonzentration	62
6.5.8.	Herstellung von Aflatoxinstandard-Stocklösungen	62
6.5.9.	Herstellung von Aflatoxin-Mixstandard-Lösungen	64
6.5.10.	Herstellung der Standardlösungen (Supelco)	66
6.5.11.	Bestimmung der Wiederfindung	67
7.	Ergebnisse und Diskussion	68
7.1.	Entwicklung und Etablierung des Probenaufarbeitungsverfahrens basierend auf der IAC	68
7.1.1.	Probenaufarbeitung	68
7.1.2.	Erstmalige Bestimmung der Wiederfindung	69
7.1.3.	Wiederholung der Bestimmung der Wiederfindungsrate	70
7.1.4.	Elution der Proben mit verdoppeltem Methanolvolumen	71
7.1.5.	Vergleich der Wiederfindungsraten zweier verschiedener Hersteller	72
7.1.6.	Versuche mit alternativen Lösungsmitteln	73
7.1.7.	Änderung der Probenvorbereitung mit der IAC	74
7.1.8.	Bestätigung der erzielten Messwerte	76
7.2.	Kalibration mittels Standardgerade	78
7.3.	Bestimmung der Nachweis- und Quantifizierungsgrenze	80
7.4.	Analyse der Reis- und Reiswaffelp Proben	84
7.4.1.	Positive Reisproben unter der Quantifizierungsgrenze	86
7.4.2.	Positive Reisproben über der Quantifizierungsgrenze	91
7.4.3.	Reisproben mit Aflatoxinkonzentrationen über den gesetzlich erlaubten Höchstwerten	94
7.4.4.	Reiswaffeln	97
7.5.	Validierung der Methode	98
7.5.1.	Bestimmung der Wiederfindung in Reisextrakt und Reproduzierbarkeit an verschiedenen Tagen	98
7.5.2.	Bestimmung der Wiederfindung mit Erdnussbutter	101
7.5.3.	Validierung der Methode mittels zertifiziertem Referenzmaterials 102	
7.5.4.	Messung einer Positivkontrolle an verschiedenen Tagen	103
7.5.5.	Bestimmung der Wiederfindung in Reis fester Form	105
7.5.6.	Versuche mit alternativem Extraktionsmittel	106
8.	Schlussbetrachtung	108
9.	Zusammenfassung	109
10.	Summary	110
11.	Literaturverzeichnis	111
12.	Abbildungsverzeichnis	118
13.	Tabellenverzeichnis	121
14.	Abkürzungen	124
15.	Lebenslauf	125

1. Einleitung und Fragestellung

Reis dient mehr als der Hälfte der Erdbevölkerung als Hauptnahrungsmittel, in einigen Ländern Asiens besteht die Nahrung zu 80% aus Reis. Etwa 150 kg werden pro Kopf und Jahr in Asien verzehrt [MACLEAN, 2002]. Auch in Österreich hat Reis einen wichtigen Stellenwert in der Ernährung, wenngleich mit einem pro Kopf Verbrauch von 3.8 kg im Jahr 2000/01 einen weitaus geringeren als in asiatischen Ländern [ELMADFA et al., 2003]. In der österreichischen Küche wird Reis häufig als Beilage zu Fleischgerichten, aber auch als Hauptgericht, wie z.B. in Aufläufen oder als Risotto verwendet.

Bei Getreide, also auch bei Reis, kann es jedoch zu einer Belastung mit Mykotoxinen kommen. Weltweit sind nach Schätzungen der FAO (Food and Agriculture Organization der Vereinten Nationen) etwa 25 % aller Lebensmittel mit messbaren Mengen an Mykotoxinen kontaminiert. Mykotoxine sind sekundäre Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen und haben eine immense Vielfalt von chemischen Strukturen. Auch in Bezug auf ihre Wirkung auf den Organismus sind sie äußerst variabel.

Zu den Mykotoxinen gehören unter anderem auch die von *Aspergillus spp.* produzierten Aflatoxine. Ihre häufigsten Vertreter sind die Aflatoxine B₁, B₂, G₁, G₂ und die nach ihrem Auftreten in Milch benannten „Milchtoxine“ M₁ und M₂, die durch eine Hydroxylierung von Aflatoxin B₁ und B₂ durch den Organismus der Kuh und anderer laktierender Tiere, einschließlich dem Menschen, entstehen. Bislang konnten mehr als 20 strukturell eng verwandte Aflatoxine identifiziert werden. Der Hauptvertreter und gleichzeitig auch das Gefährlichste unter ihnen ist das Aflatoxin B₁. Es gilt als eines der stärksten chemischen Kanzerogene und wirkt vor allem lebertoxisch [MÜCKE und LEMMEN, 2004].

Die beiden Hauptproduzenten der Aflatoxine sind *Aspergillus flavus* und *Aspergillus parasiticus*. Während in Europa kaum Toxin bildende Schimmelpilzisolat auftreten, findet man sie in tropischen und subtropischen Gebieten häufig. Es wird angenommen, dass höhere Temperaturen in Verbindung mit pflanzlichem Stress, sowie lange und suboptimale Lagerhaltung für einen Schimmelpilzbefall hauptverantwortlich sind. Neben fettreichen pflanzlichen Produkten wie Erdnüs-

sen, Mandeln und Pistazien, sind auch bestimmte Getreidearten wie Mais und Reis häufig von Aflatoxin-bildenden Schimmelpilzen betroffen [MÜCKE und LEMMEN, 2004].

Ziel dieser Diplomarbeit ist es, zu untersuchen, ob und in welchem Grad am österreichischen Markt erhältlicher Reis mit Aflatoxinen belastet ist.

2. Reis

2.1. Herkunft und Geschichte

Reis gehört zu den am längsten kultivierten Pflanzen der Erde. Die ältesten Funde der Kulturform *Oryza sativa* aus der so genannten „Spirit Cave“ in Nord-Thailand werden auf ca. 7000 bis 10000 vor Christus datiert. Archäologischen Untersuchungen zufolge, wurde am Yangtze- und am Huai-Fluss in China vermutlich seit 8000 vor Christus Reisanbau betrieben [MACLEAN, 2002].

Ein früher Vorfahre unserer heutigen Kultursorten *Oryza sativa* und *Oryza glaberrima*, eine zur Familie der Gräser gehörende Pflanze, war auf dem riesigen Südkontinent Gondwana verbreitet. Vor ca. 130 Millionen Jahren begann Gondwana, das aus dem heutigen Südamerika, Afrika, Australien, Indien und Südostasien, sowie der Antarktis bestand, zu zerbrechen. Das Auseinanderdriften der Kontinentalplatten dauerte viele Millionen Jahre. Zuerst löste sich Südamerika vom späteren Afrika. Danach folgten Australien und die Antarktis und erst vor etwa 45 Millionen Jahren prallte die Platte mit Indien und Südostasien mit dem asiatischen Kontinent zusammen.

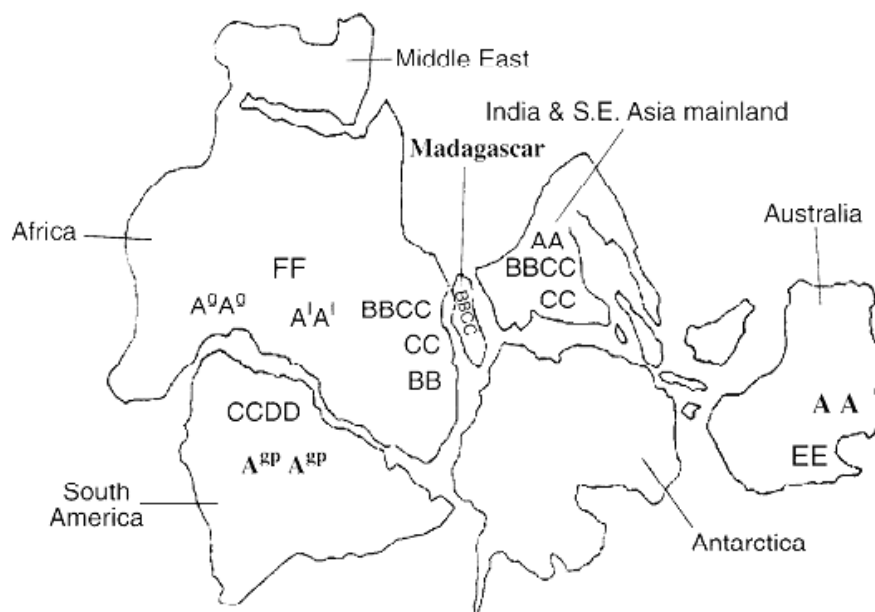


Abbildung 1: Gondwana mit verschiedenen Genomtypen von wildem Reis (mod. nach [CHANG, 2003])

Bedingt durch diese Trennung, entwickelten sich aus der Reisorform im Lauf der Jahrmlionen, mit Ausnahme der Antarktis, auf allen Teilen des einstigen Gondwana verschiedenste Reiserarten [CHANG, 2003].

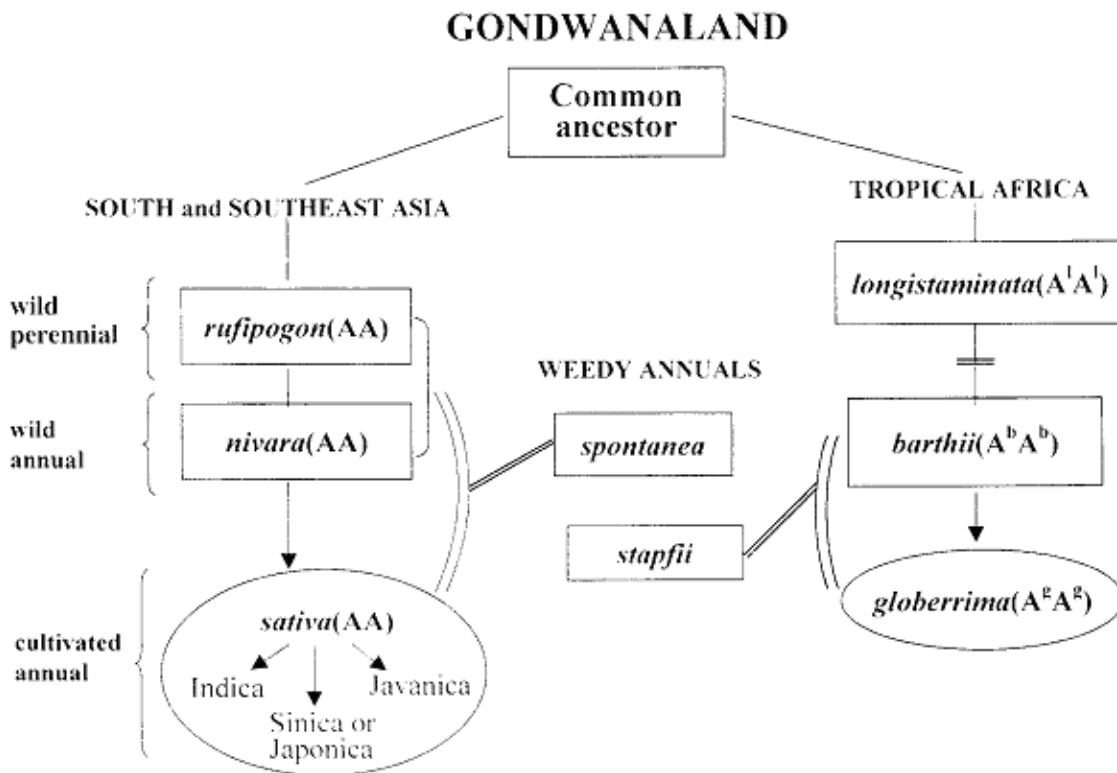


Abbildung 2: Entwicklung der zwei Kulturformen *O. sativa* und *O. glaberrima* (mod. nach [CHANG, 2003])

Die Gattung *Oryza* besteht heute aus insgesamt 23 Arten. Bedeutung als Kulturpflanze haben jedoch nur zwei: *O. sativa*, auch bekannt als asiatischer Reis, der noch in drei Unterarten (*indica*, *japonica*, *javanica*) eingeteilt wird und *O. glaberrima*, bekannt als afrikanischer Reis, der vor allem in Westafrika verbreitet ist [INTERNATIONAL RICE COMMISSION, 2005].

Spezies (Synonym)	2n für x=12	Genomgruppe	Verbreitung
<i>O. alta</i> Swallen	48	CCDD	Zentral- und Südamerika
<i>O. australiensis</i> Domin	24	EE	Australien
<i>O. barthii</i> A. Chev. (<i>O. breviligulata</i>)	24	A ^b A ^b	Westafrika
<i>O. brachyantha</i> A. Chev. et Roehr	24	FF	West- und Zentralafrika
<i>O. eichingeri</i> A. Peter	24, 48	CC, BBCC	Ost- und Zentralafrika
<i>O. glaberrima</i> Steud.	24	A ^g A ^g	Westafrika
<i>O. glumaepatula</i> teud. (<i>O. perennis</i> subsp. <i>cubensis</i>)	24	A ^{gp} A ^{gp}	Südamerika, Westindien
<i>O. grandiglumis</i> (Doell.) Prod.	48	CCDD	Südamerika
<i>O. granulata</i> Nees et Arn. ex. Hook f.	24	-	Süd- und Südostasien
<i>O. latifolia</i> Desv.	48	CCDD	Zentral- und Südamerika
<i>O. longiglumis</i> Jansen	48	-	Papua Neuguinea
<i>O. longistaminata</i> A. Chev. et Roehr (<i>O. barthii</i>)	24	A ¹ A ¹	Afrika
<i>O. meridionalis</i> Ng	24	AA	Australien
<i>O. meyeriana</i> (Zoll. et Morrill ex. Steud.) Baill.	24	-	Südostasien, südliches China
<i>O. minuta</i> J. S. Presl. ex. C. B. Presl.	48	BBCC	Südostasien
<i>O. nivara</i> Sharma et Shastry (<i>O. fatua</i> , <i>O. sativa</i> f. <i>spontanea</i>)	24	AA	Süd- und Südostasien, südliches China
<i>O. officinalis</i> Wall. ex. Watt	24	CC	Süd- und Südostasien, südliches China, Papua Neuguinea
<i>O. punctata</i> Kotschy ex.	24, 48	BBCC, BB (?)	Afrika
<i>O. ridleyi</i> Hook f.	48	-	Südostasien
<i>O. rufipogon</i> Griff. (<i>O. perennis</i> , <i>O. fatua</i> , <i>O. perennis</i> subsp. <i>balunga</i>)	24	AA	Süd- und Südostasien, südliches China
<i>O. sativa</i> L.	24	AA	Asien
<i>O. schlechteri</i> Pilger	48	-	Papua Neuguinea

Tabelle 1: Reisspezies, Chromosomenzahl, Genomabkürzung und geographische Verbreitung (mod. nach [CHANG, 2003])

2.2. Morphologie der Reispflanze

Domestizierter Reis (*O. sativa*, *O. glaberrima*) gehört zur Pflanzengattung *Oryza* aus der Familie der Süßgräser (Poaceae) und ist eine Sumpfpflanze. Wilder Reis ist hingegen eine Wasserpflanze und gehört botanisch gesehen nicht zur Gattung Reis.

2.2.1. Aufbau der Reispflanze

Die Reispflanze wird 50 bis 150 cm hoch. Sie bildet einen Haupthalm und mehrere Nebenhalm. Die Halme sind hohl und werden von ca. 20 Knoten unterbrochen, an denen sich 1 bis 2 cm breite und bis 60 cm lange Blätter bilden. Der rispenförmige Blütenstand trägt 30 bis 200 einblütige Ährchen, aus denen in weiterer Folge die Reiskörner gebildet werden. Die Zeit von Aussaat bis Ernte variiert zwischen 80 bis 200 Tagen [MOLDENHAUER und GIBBONS, 2003].

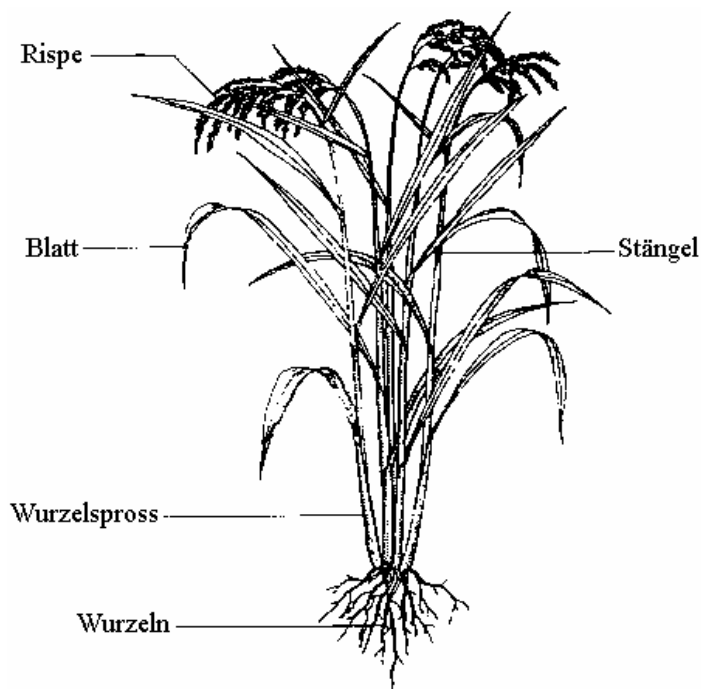


Abbildung 3: Schematischer Aufbau einer Reispflanze
[mod. nach <http://ipmworld.umn.edu/chapters/heinrich/eah001.gif>]

2.2.2. Aufbau des Reiskorns

Das Reiskorn setzt sich zusammen aus der Hülle, bestehend aus Granne, Deckspelze (Lemma) und Vorspelze (Palea) und der Karyopse, der reifenden Frucht. Die Karyopse, auch Brauner Reis oder Vollreis genannt, ist der essbare Teil des Reiskorns und besteht aus dem so genannten Silberhäutchen mit Frucht- (Perikarp), Samenschale (Tegmen) und proteinhaltiger Aleuronschicht, sowie dem vorwiegend Stärke enthaltendem Endosperm und dem Embryo [MACLEAN, 2002].

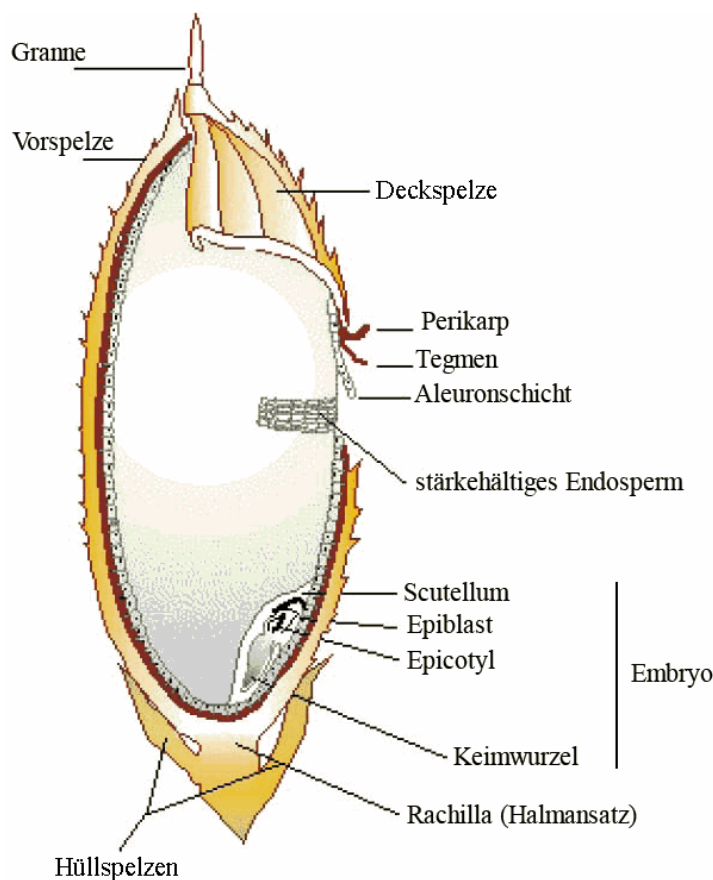


Abbildung 4: Aufbau des Reiskorns
 (mod. nach [<http://www.ikisan.com/Images/ri.%20gm.%20Rice1.gif>])

2.3. Reisanbauformen

Reis wird in mehr als hundert Ländern von 53° Nord bis 40° Süd in Seehöhen von bis zu 3000 m angebaut. Die Reispflanze kann sich ihrem ökologischen Umfeld sehr gut anpassen und wächst selbst auf eher untypischen Standorten. Sie gedeiht sowohl in künstlich bewässerten Reisfeldern, als auch auf höher gelegenen trockenen Standorten und passt sich dabei unter anderem der Regenmenge, der Wassertiefe oder der Höhe des Anbaustandorts an [LAMPE, 1997; CHILDS, 2004].

2.3.1. Bewässerungsreis

Mit 50% der gesamten Reisanbaufläche und mehr als 75% der jährlichen Weltproduktion, ist Bewässerungsreis die am meisten verbreitete Anbauform. Er liefert mit durchschnittlichen Erträgen zwischen 3 und 9 t/ha die höchsten Erträge. Für die von Dämmen umgebenen Reisfelder werden nur beste Böden mit hoher Wasserhaltekapazität verwendet [LAMPE, 1997]. Generell ist diese Form des Reisanbaus mit höherem Arbeitsaufwand verbunden, als nicht bewässerte [CHILDS, 2004].

2.3.2. Regenabhängiger Niederungsreis

Etwa 30% der Reisanbauflächen bestehen aus Niederungsreis, der ebenfalls in eingedämmten Feldern in der schlammigen Erde gepflanzt oder gesät wird. Das Feld wird jedoch nicht künstlich, sondern, zumindest für Teile der Vegetationsperiode, natürlich durch Regenwasser, mit bis zu 50 cm Wasser geflutet [Lampe, 1997]. Diese Anbauform ist jedoch stark von Regen abhängig, längere Dürreperioden wirken sich oft verheerend auf den Ertrag aus. Die durchschnittlichen Erträge liegen bei ca. 1,3 t/ha [CHILDS, 2004].

2.3.3. Regenabhängiger Bergreis

Bergreis wird vor allem in Afrika und Südamerika angebaut. Er wächst auch auf nährstoffarmen Böden und kommt ohne künstliche Bewässerung aus, liefert jedoch nur äußerst geringe Erträge von durchschnittlich 1 t/ha. Nur etwa 12% der gesamten Reiserntefläche und nur 4% der Welternte entfallen auf Bergreis [CHILDS, 2004].

2.3.4. Tiefwasserreisanbau

Zu dieser Anbaumethode zählen der Tiefwasserreis und der schwimmende Reis, die zusammen etwa 9% der gesamten Reisanbaufläche und ca. 4% der Weltproduktion ausmachen. Tiefwasserreis übersteht Überflutungen in der Regenzeit indem er bis zu zehn Tage komplett unter Wasser bleiben kann. Schwimmender Reis passt sich an Überflutungen an, indem er pro Tag bis zu 10 cm wächst und so über Wasser bleibt [Lampe, 1997]. Tiefwasserreisanbau wird zu 90% in Asien betrieben, die Ernteausbeute fällt mit ca. 1,5 t/ha gering aus [CHILDS, 2004].

2.4. Verarbeitung von Reis

Der nach der Ernte anfallende, noch von Spelzen umgebene Reis wird als Rohreis bzw. Paddy bezeichnet. Werden die Körner entspelzt, so spricht man von Vollreis, Cargo-Reis oder Brown Rice. Dieser enthält noch Silberhäutchen und Keimling. Nach Wegschleifen von Silberhäutchen und Keimling spricht man von Weissreis bzw. poliertem Reis.

Parboiled Reis erreicht annähernd den Nährstoffgehalt von Vollreis. Nach Einweichen in heißem Wasser werden die wasserlöslichen Nährstoffe von Rohreis durch Dampfdruckbehandlung ins Innere des Reiskorns gepresst und gehen bei anschließenden Verarbeitungsprozessen nicht verloren [<http://de.wikipedia.org/wiki/Reis>].

2.5. Charakteristika von Basmatireis und Jasminreis

Basmatireis wird traditionell in Regionen Indiens und Pakistans angebaut, die an den Ausläufern des Himalayagebirges liegen und der Name Basmati wird auch mit dem geografischen Ursprung assoziiert [BLIGH, 2000].

Basmatireis guter Qualität zeichnet sich durch lange, feine Körner, ein exquisites Aroma und süßen Geschmack aus. Nach dem Kochen weist Basmatireis eine trockene und weiche Textur auf, die Körner sind in der Länge 1,5 bis 2-fach verlängert, in der Breite jedoch kaum. Er ist durch einen niedrigen Amylosegehalt und eine mittlere bis niedrige Gelatinisierungstemperatur charakterisiert [SIDDIQ et al., 1997].

Thailändischer Hom Mali Reis ist auch unter den Synonymen Jasminreis oder thailändischer Duftreis bekannt. Dabei handelt es sich um Vollreis oder Weissreis, von nicht klebrigen thailändischen Duftreissorten, die bestimmte Qualitätseigenschaften aufweisen müssen. So müssen die Reiskörner mindestens 7 mm lang sein, mit einem Länge zu Breite-Verhältnis von zumindest 3,2. Der Amylosegehalt muss zwischen 13 und 18% liegen, bei einem Wassergehalt von 14%. Weiters darf Hom Mali nur bis zu 8% anderen Reis enthalten [CHEAUPUN et al., 2005].

2.6. Die größten Reisproduzenten weltweit

Die jährliche Reisproduktion lag 2006 bei über 631 Millionen Tonnen weltweit. Die zehn weltweit größten Reisproduzenten sind in absteigender Reihenfolge China (182,0 Mio. t), Indien (136,5 Mio. t), Indonesien (54,4 Mio. t), Bangladesh (43,7 Mio. t), Vietnam (35,8 Mio. t), Thailand (29,3 Mio. t), Myanmar (25,2 Mio. t), Philippinen (15,3 Mio. t), Brasilien (11,5 Mio. t) und Japan (10,7 Mio. t) [FAO-STAT, 2006]. Diese zehn Länder produzieren zusammen über 86% der jährlichen Reisproduktion. Fast 90% der Reisproduktion stammt aus Asien und wird auch dort verzehrt.

2.7. Die größten Reisexporteure weltweit

Mit 29,6 Mio. t 2007 werden nur etwa 10% der weltweiten Reisernte exportiert. 2007 erreichte der weltweit größte Reisexporteur Thailand mit 9,0 Mio. t geschältem Reis ein neues Rekordhoch. Vietnam exportierte 4,7 Mio. t, Indien 4,1 Mio. t, die USA 3,3 Mio. t. Pakistan gehört mit insgesamt nur etwa 8 Mio. t Gesamtproduktion nicht zu den großen Reisproduzenten, zählt aber mit 3,2 Mio. t zu den größten Reisexporteuren. Weitere Exporteurländer sind China mit 1,5 Mio. t und Ägypten mit 1,1 Mio. t [CALPE, 2007; USDA, 2007].

2.8. Ernährungsphysiologie

Bei der Bewertung der Nährstoffgehalte muss unterschieden werden, ob es sich um Vollreis, polierten Reis, oder Parboiled Reis handelt. Da sich ein Großteil der Vitamine, Spurenelemente und Mineralstoffe im Silberhäutchen des Reiskorns befinden, sollte Vollreis in der Ernährung, vor Parboiled Reis und poliertem Reis, der Vorzug gegeben werden.

Zusammensetzung /100g Reis	Reis poliert	Reis unpoliert
Energie	1460 kJ	1463 kJ
	344 kcal	345 kcal
Hauptbestandteile von Reis (g/100g)		
Wasser	12,9 g	13,1 g
Stickstoff gesamt	1,18 g	1,25 g
Protein (N x 5,8)	6,83 g	7,22 g
Protein (N x 6,25)	7,36 g	7,78 g
Fett	0,62 g	2,2 g
Verfügbare Kohlenhydrate	77,7 g	74,1 g
Ballaststoffe gesamt	1,39 g	2,22 g
Mineralien	0,53 g	1,2 g

Tabelle 2: Zusammensetzung des polierten und unpolierten Reiskorns (mod. nach [SOUCI et al., 2000])

2.8.1. Kohlenhydrate

Das Reiskorn besteht zu ca. 74% aus Stärke, die aus Amylose und Amylopektin besteht. Der Amylosegehalt kann von 1 bis 20% schwanken, wobei Reis mit niedrigem Amylosegehalt nach dem Kochen klebrig und weich ist und jener mit hohem Amylosegehalt kaum klebrig und hart ist [JULIANO, 1993; BECHTEL et al., 2004]. Weiters vorhanden sind Saccharose und Phytinsäure [SOUCI et al., 2000].

2.8.2. Protein

Der durchschnittliche Proteingehalt von unpoliertem Reis liegt bei ca. 9%, kann aber je nach Sorte von 4,3% bis hin zu 18,2% schwanken. Die häufigsten Aminosäuren sind Asparaginsäure, Glutaminsäure, Alanin, Serin, Prolin, Glycin und Arginin [Bechtel, Champagne, Juliano, Wood; 2004]. Limitiert ist vor allem Lysin, bzw. Methionin und Cystein. Gekochtes Reisprotein hat beim Menschen eine Verdaulichkeit von $88 \pm 4\%$ [JULIANO, 1993].

Aminosäuren (mg/100g)	Reis poliert	Reis unpoliert
Alanin	500	550
Arginin	570	600
Asparaginsäure	780	840
Cystein	110	100
Glutaminsäure	1580	1640
Glycin	410	460
Histidin	170	190
Isoleucin	340	340
Lysin	290	300
Methionin	170	170
Prolin	420	390
Serin	410	470
Threonin	280	330
Valin	490	500

Tabelle 3: Auswahl von AS in poliertem und unpoliertem Reis (mod. nach [SOUCI et al., 2000])

2.8.3. Vitamine

Reis enthält praktisch kein Vitamin A, Vitamin D und Vitamin C, ist jedoch eine gute Quelle für B Vitamine und Vitamin E. Ein großer Anteil der B Vitamine befindet sich im Silberhäutchen, 95% des Tocopherols ist im Embryo gespeichert [JULIANO, 1993].

Vitamine (µg/100g)	Reis poliert	Reis unpoliert
Vitamin E Aktivität	184	740
Tocopherole gesamt	800	1900
Alpha-Tocopherol	100	562
Beta-Tocopherol	100	100
Gamma-Tocopherol	100	108
Alpha-Tocotrienol	100	400
Gamma-Tocotrienol	300	669
Delta-Tocotrienol	100	-
Vitamin B1	60	410
Vitamin B2	32	91
Niacin	1300	5200
Pantothensäure	600	1700
Vitamin B6	150	275
Biotin	3,0	12
Folsäure	11	16

Tabelle 4: Vitamine in poliertem und unpoliertem Reis (mod. nach [SOUCI et al., 2000])

2.8.4. Mineralstoffe

Reis ist vor allem reich an Phosphor, Kalium, Magnesium und Eisen. Lediglich Kalzium ist limitiert. Auch der Großteil der Mineralstoffe befindet sich im Silberhäutchen (50%) und dem Embryo (10%) [JULIANO, 1993].

Mineralien & Spurenelemente	Einheit /100g	Reis poliert	Reis unpoliert
Natrium	mg	3,9	10
Kalium	mg	109	238
Magnesium	mg	32	119
Kalzium	mg	6,1	16
Mangan	mg	1,0	2,1
Eisen	mg	0,8	3,2
Kupfer	µg	203	288
Zink	mg	1,0	1,6
Nickel	µg	10	37
Chrom	µg	2,0	2,6
Molybdän	µg	80	31
Phosphor	mg	114	282
Fluor	µg	50	42
Iod	µg	2,0	2,2
Brom	µg	24	275
Selen	µg	7,0	10
Silizium	mg	-	9,0

Tabelle 5: Mineralstoffe und Spurenelemente in poliertem und unpoliertem Reis (mod. nach [SOUCI et al., 2000])

2.8.5. Fett

Die Fette werden bei Reis hauptsächlich in der Aleuronschicht des Silberhäutchens und dem Embryo gespeichert. Die häufigsten Fettsäuren sind Ölsäure und Palmitinsäure und Linolsäure. Aus Reiskleie wird auch Reisöl gewonnen [JULIANO, 1993].

Fettsäuren (mg/100g)	Reis poliert	Reis unpoliert
Myristinsäure	-	30
Palmitinsäure	118	540
Stearinsäure	12	40
Palmölsäure	-	10
Ölsäure	225	540
Linolsäure	220	780
Linolensäure	12	30

Tabelle 6: Fettsäuren in poliertem und unpoliertem Reis (mod. nach [SOUCI et al., 2000])

2.8.6. Antinutritive Inhaltsstoffe

Phytinsäure ist in Reis in höheren Mengen vorhanden, als in anderen Getreidearten. Sie kommt als Kalium- oder Magnesiumsalz vor, ist hitzestabil und bildet unlösliche Komplexe mit Kalzium, Zink, Eisen und Proteinen [EASTMAN und ORTHOEFER, 2004].

Trypsin Inhibitor, ein Albumin, kommt hauptsächlich im Reiskeimling (85-95%) vor und fehlt in poliertem Reis völlig. Es unterscheidet sich vom Trypsin-Inhibitor der Sojabohne dadurch, dass es nicht wasserlöslich ist und nur durch heißen Dampf (100°C, 6 min) zerstört werden kann [EASTMAN und ORTHOEFER, 2004].

Oryzacystatin ist ein proteinogener Proteaseinhibitor. Es inhibiert Cysteinproteasen wie Papain, Chymopapain und Cathepsin C [JULIANO, 1993].

Hämagglutinine, auch als Lectine bekannt, binden an die roten Blutkörperchen von Säugetieren an und können somit agglutinieren bzw. Cluster bilden. Weiters binden sie spezifisch an Kohlenhydratrezeptoren von intestinalen Mucosazellen und verhindern so die Aufnahme von Nährstoffen über die Intestinalwand. Lectine sind Glycoproteine mit 27% Kohlenhydraten, bestehend aus Glukose, Xylose und Arabinose, kommen ausschließlich im Keimling vor und können durch Hitzeeinwirkung (100°C, 6 min) zerstört werden [JULIANO, 1993; EASTMAN und ORTHOEFER, 2004].

2.9. Bedeutung von Reis in der menschlichen Ernährung

Reis liegt in Bezug auf die weltweiten Anbauflächen und die Erntemengen zwar hinter Weizen, geht man jedoch von dem Anteil aus, der ausschließlich der menschlichen Ernährung dient, so ist Reis mit einem Anteil von 90% das wichtigste Nahrungsmittel weltweit. Für ca. 50% der Weltbevölkerung dient Reis als Hauptnahrungsmittel. 21% der weltweiten pro Kopf Energieaufnahme und 15% der pro Kopf Proteinaufnahme werden von Reis gedeckt [MACLEAN, 2002]. Vor allem in asiatischen Ländern hat Reis eine immens wichtige Stellung in der Ernährung. So haben Myanmar, Laos, Vietnam, Bangladesch, Kambodia und Indonesien einen pro Kopf-Verbrauch von über 200 kg Reis jährlich. Weitere 21

Staaten haben einen pro Kopf-Verbrauch von 100-200 kg jährlich und somit um ein Vielfaches mehr als Industriestaaten [INTERNATIONAL RICE COMMISSION, 2005]. In Österreich beispielsweise, liegt der pro Kopf-Verzehr von Reis bei lediglich 3.8 kg im Jahr [ELMADFA et al., 2003].

2.10. Vorkommen von Aflatoxinen in Reis

Während etwa die Aflatoxinkontamination von Mais bereits Grundlage vieler Forschungsarbeiten war, ist das vorhandene Datenmaterial über die Belastung von Reis eher gering. Weiters existieren fast nur Daten für Aflatoxin B₁, da bei diesem das toxische Gefahrenpotenzial am höchsten ist.

In Vietnam wurden hundert Reisproben, je zur Hälfte aus der Trocken- bzw. Regenzeit, auf eine Belastung mit Aflatoxin B₁ hinaus untersucht. In 51% der Proben konnte AFB₁ nachgewiesen werden, 10 der Proben haben die erlaubten Höchstgehalte der EU von 2 ng/g überschritten. Es zeigte sich weiter, dass die Aflatoxingehalte in der Regenzeit um ein Vielfaches höher waren [NGUYEN et al., 2007].

Auch in der Elfenbeinküste wurden Reisproben auf AFB₁ untersucht. Bei allen 10 Proben konnte AFB₁ mit Konzentrationen von unter 1,5 bis 10 ng AF/g Reis nachgewiesen werden [SANGARE-TIGORI et al., 2006].

In den Philippinen wurden 78 Proben von braunem und poliertem Reis untersucht. Es zeigte sich, dass die totale Aflatoxinbelastung in braunem Reis mit durchschnittlich 2,7 ng/g deutlich höher war als in poliertem Reis mit einem Durchschnittswert von 1,5 ng/g. Der höchste gemessene Wert lag bei 8,7 ng AF/g Reis [SALES und YOSHIZAWA, 2005].

Eine spanische Forschergruppe untersuchte mehrere Sorten künstlich mit *A. flavus* beimpfter Reisproben. Man fand heraus, dass die Aflatoxinkonzentration, unabhängig von der Reissorte, nach 11 bzw. 13 Tagen Inkubationszeit am höchsten ist. Entspelzen und Polieren der Reiskörner führte zu einer Reduktion der Aflatoxinkonzentration von 85,5 bis 97% [CASTELLS et al., 2007].

In einer schottischen Studie, in der ethnic food, darunter auch Langkorn- und Basmatireis, untersucht wurde, konnten in Basmatireis weder *A. flavus* noch *A.*

parasiticus, wohl aber andere Aspergillien identifiziert werden [CANDLISH et al., 2001].

In einer weiteren Studie von Tam et. al wurden 349 Frühstück- und Getreideprodukte für Babys, Kleinkinder und Kinder auf Aflatoxine untersucht. In 26 auf Reis basierenden Produkten für Kleinkinder reichte die Kontamination von AFB₁ von 0,002 bis 0,996 ng/g, jene von AFB₂ von 0,002 bis 0,108 ng/g. AFG₁ und AFG₂ konnten nicht nachgewiesen werden. Lediglich 9 der Proben überschritten die in der EU für Babys und Kinder erlaubten Höchstwerte für AFB₁ von 0,1 ng/g [TAM et al., 2006].

Untersuchungen zeigten, dass bei der Lagerung die Aflatoxinproduktion in Parboiled Reis generell höher ist, als die in Vollreis oder gemahlenem Vollreis. Man führt dies darauf zurück, dass Lagerpilze wie *A. flavus* das aufgeweichte und oft nicht ausreichend getrocknete Reiskorn leichter befallen können. Weiters konnten in Reiskleie aus indischen Mühlen Aflatoxin B₁ Belastungen von bis zu 2000 ng/g festgestellt werden [KUMAR et al., 2008].

Von 1511 indischen Parboiled Reis-Proben konnte bei 581 Proben (38%) eine AFB₁-Konzentration von >5 ng/g festgestellt werden. Vereinzelt höhere Werte reichten bis zu einem Maximum von 800 ng/g [TOTEJA et al., 2006].

Bei Reis, der von Fraßschädlingen wie dem Reistrüsselkäfer befallen wird, kommt es ebenfalls zu einer höheren Befallsrate durch Schimmelpilze [KUMAR et al., 2008].

Wie aus den oben angegebenen Studien ersichtlich, liegen wenige Daten vor, betreffend einer Aflatoxinbelastung von Reis am europäischen Markt.

2.11. Einfluss der Lagerung auf den Aflatoxingehalt

Es gibt bereits zahlreiche Studien, die versuchen, der Beziehung zwischen Lagerungsdauer und der Kontamination mit Aflatoxinen auf den Grund zu gehen. Um gute Qualität zu gewährleisten, wird Reis meist für zwei bis drei Monate gelagert, bevor er in den Handel kommt. Dabei kommt es im Reiskorn vor allem zu Änderungen der Härte, der Gelkonsistenz und der Viskosität. Vermindertes Zusammenkleben der Reiskörner mit steigender Lagerungsdauer wird auf ge-

ringer werdende Wechselwirkungen zwischen Stärke und dem Reishauptprotein Oryzenin zurückgeführt [CHRASTIL, 1990].

Einige Studien legen die Vermutung nahe, dass längere, vor allem unzureichende Lagerung von Reis zur Kontamination mit Aflatoxinen bzw. zu einer Erhöhung des Aflatoxingehalts beiträgt. So wurden Paddyreis-Proben aus verschiedenen Regionen Pakistans mit einer Lagerungsdauer von 2-3 und 12-18 Monaten untersucht. Der Aflatoxin B₁-Gehalt stieg im Durchschnitt von 27,1 auf 31,9 ng/g und zeigte damit einen signifikanten Zusammenhang zwischen Lagerungsdauer und Aflatoxingehalt [SALEEMULLAH et al., 2006]. In einer anderen Studie stieg der Gehalt an AFB₁ in polierten Reisproben von 30 ng/g, auf 60 ng/g nach einjähriger Lagerung [KUMAR et al., 2008].

Der Gehalt an Aflatoxinen in Reis wird wahrscheinlich von den Lagerungsbedingungen und der Lagerungsdauer beeinflusst. Dabei steigt die Wachstumsrate der Schimmelpilze und ihrer Toxine meist mit höherem Luftfeuchtigkeitsgrad und/oder höherer Restfeuchte der Reiskörner an [SALEEMULLAH et al., 2006]. Während in den USA der Schimmelpilzbefall vorwiegend vor der Ernte Probleme bereitet, wird Reis in tropischen Ländern oft erst nach der Ernte befallen [MILLER, 1995].

2.12. Faktoren, die die Aflatoxinbildung beeinflussen

2.12.1. Wasseraktivität

Sowohl das Schimmelpilzwachstum als auch die Toxinproduktion sind abhängig vom Vorhandensein von ausreichend Wasser. Untersuchungen zeigten, dass die Aflatoxinproduktion von *A. flavus* bei hohen Wasseraktivitätswerten über 0,89 a_w am höchsten ist [KLICH, 2007].

2.12.2. Temperatur

Die optimale Temperatur für *A. flavus* und *A. parasiticus* für die Aflatoxinproduktion liegt generell zwischen 24°C und 30°C, kann jedoch bei einigen Arten und Substraten variieren [KLICH, 2007].

2.12.3. Substratquelle

Die Art des Substrats spielt eine wichtige Rolle für die Produktion von Aflatoxinen. So konnten bei *A. parasiticus* die höchsten Toxinmengen mit Glukose und Saccharose als Kohlenstoffquelle festgestellt werden. Bei einem Isolat von *A. flavus* konnten die höchsten Aflatoxinwerte mit Pepton als Stickstoffquelle erzielt werden, während ein anderes Isolat darauf mit verringerter Toxinproduktion reagierte.

Weiters konnte man Zink als einen die Aflatoxinproduktion beeinflussenden Faktor identifizieren. Zugabe von 1-25 µg/ml Zink zu *A. parasiticus* Kulturen führte zu erhöhten Aflatoxinlevels [KLICH, 2007].

2.12.4. pH-Wert

Auch der optimale pH-Wert ist abhängig vom jeweiligen Pilzisolat. Bei pH-Werten zwischen 4 bis 6 konnte eine höhere Expression der Aflatoxin-Biosynthese-Gene festgestellt werden, was darauf hindeutet, dass der pH-Wert größeren Einfluss auf die Aflatoxinproduktion hat, als die Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle [KLICH, 2007].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Menge der produzierten Aflatoxine von mehreren Faktoren wie Substrat, a_w -Wert, pH-Wert abhängig ist. Eine Bewertung der einzelnen Einflussfaktoren ist jedoch schwierig, da jeder einzelne bei der Vielzahl an Schimmelpilzisolaten höchst unterschiedliche Auswirkungen haben kann.

3. Mykotoxine

Mykotoxine sind sekundäre Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen, die in Nahrungs- und Futtermitteln gebildet werden können. Sie haben bereits in geringen Konzentrationen toxische Wirkung auf Mensch und Tier [BENNET und KLICH, 2003]. Während der stationären Wachstumsphase angereicherte Zwischenprodukte des primären Glukosestoffwechsels werden durch einen Sekundärmetabolismus in sekundäre Stoffwechselprodukte umgewandelt. Unter anderem kommt es dabei zur Bildung von Mykotoxinen [MÜCKE und LEMMEN, 2004].

Voraussetzung für die Mykotoxinbildung ist das Vorhandensein von ausreichend Nährstoffen, ein geeigneter pH-Wert, entsprechende Temperatur- und Feuchtigkeitsbedingungen. Je länger Lebens- oder Futtermittel bei ungeeigneten Lagerungsbedingungen aufbewahrt werden, desto wahrscheinlicher und höher ist die Bildung von Schimmelpilzen und ihren Mykotoxinen. Heute sind ungefähr 200 Toxin bildende Schimmelpilzarten bekannt. Ihre chemische Strukturen und Wirkungsweisen sind höchst unterschiedlich [MÜCKE und LEMMEN, 2004].

3.1. Möglichkeiten der Nahrungsmittelkontamination

3.1.1. Primärkontamination

Wird ein Lebensmittelrohstoff wie z.B. Getreide von einem toxinbildenden Schimmelpilz befallen, könnte es mit Mykotoxin kontaminiert sein. Durch weitere Verarbeitungsschritte wird das Pilzmycel so zerkleinert oder ist so fein verteilt, dass für den Endverbraucher oft keine Kontamination erkennbar ist [REISS, 1998].

3.1.2. Sekundärkontamination

Auf einem Lebensmittel wie z.B. Brot, bildet sich ein Schimmelpilz und produziert Toxine. In diesem Fall kann der Konsument den Schimmelpilzbefall an der durch Konidienbildung verfärbten Pilzkolonie erkennen [REISS, 1998].

3.1.3. Carry-over

Fressen Nutztiere mit Mykotoxinen kontaminiertes Futter, so könnten diese in unveränderter oder metabolisierter Form in den Organen gespeichert oder z.B. in Milch oder Harn ausgeschieden. Verzehrt der Konsument das Fleisch oder trinkt die Milch der betroffenen Tiere, so könnten die Pilztoxine in den menschlichen Organismus kommen [REISS, 1998].

3.2. Einteilung Mykotoxin bildender Schimmelpilze

Schimmelpilze, die Getreide befallen, können in Feldpilze und Lagerpilze eingeteilt werden. Feldpilze benötigen einen höheren Wassergehalt ($> 20\%$) und befallen das Getreide noch vor der Ernte. Fraßschädlinge wie beispielsweise der europäische Maisbohrer fördern den Befall indem sie die Getreidekörner verletzen und Schimmelpilzsporen übertragen. Lagerpilze haben geringere Feuchtigkeitsansprüche ($14 - 15\%$) und werden in der Regel erst durch unsachgemäße Lagerung gebildet, die das Schimmelpilzwachstum und die Ausbreitung unterstützt [REISS, 1998].

3.2.1. Feldpilze

Die größte Gruppe toxinbildender Feldpilze ist die Pilzgattung *Fusarium*. Die Fusarientoxine weisen chemisch sehr unterschiedliche Strukturen auf.

3.2.1.1. Trichothecene

Eine große Gruppe von *Fusarium*-Toxinen sind die Trichothecene. Betroffen sind meist Getreide und Futtermittel in Ländern mit feucht-gemäßigtem Klima.

Wichtige Vertreter der Trichothecene sind T-2-Toxin, Deoxynivalenol (DON), Nivalenol und Fusarenon X. In vielen Fällen wirken Trichothecene immun-suppressiv, teratogen, neurotoxisch, hämorrhagisch oder dermatotoxisch. Der Grad der Toxizität variiert jedoch stark je nach dem jeweiligen Vertreter [MÜCKE und LEMMEN, 2004].

3.2.1.2. Fumonisine

Weitere Vertreter der Fusarium-Toxine sind die Fumonisine. Den häufigsten Vertreter Fumonisin B₁ findet man häufig auf Getreide, besonders betroffen ist Mais. Fumonisine wirken als Tumorpromotoren vor allem nephrotoxisch und hepatotoxisch [MÜCKE und LEMMEN, 2004].

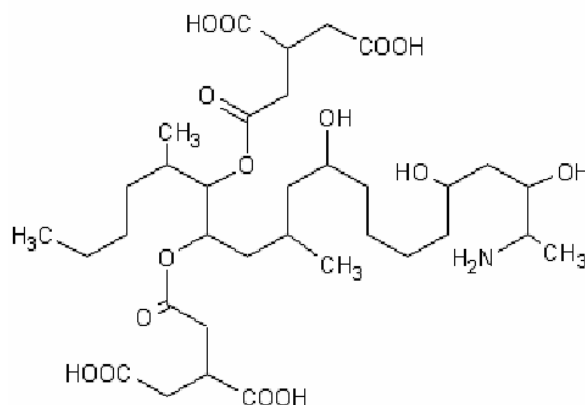


Abbildung 5: Struktur von Fumonisin B₁

3.2.1.3. Zearalenon

Zearalenon zählt ebenfalls zu den Fusarium-Toxinen. In geringen Mengen kommt es in fast allen Getreidearten in europäischen Anbaugeländen vor. Durch seine östrogene Wirkung kann es bei Haustieren zu Hyperöstrogenismus-Symptomen wie beispielsweise Uterushypertrophie oder Fertilitätsstörungen kommen. Weiters konnte eine teratogene Wirkung bei Ratten und Schweinen nachgewiesen werden [MÜCKE und LEMMEN, 2004].

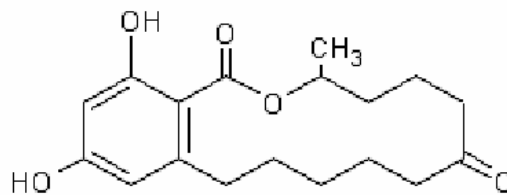


Abbildung 6: Struktur von Zearalenon

3.2.1.4. Moniliformin

Moniliformin findet man häufig auf Mais und Weizen. Seine toxische Wirkung beruht auf der irreversiblen Hemmung der Pyruvat-Dehydrogenase und führt in höheren Dosen zu Aszites, Myokardschäden und Blutungen in den Eingeweiden [MÜCKE und LEMMEN, 2004].

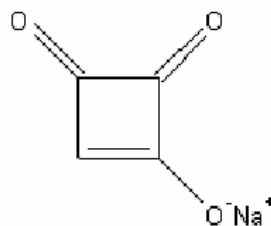


Abbildung 7: Struktur von Moniliformin

3.2.2. Lagerpilze

3.2.2.1. Ochratoxin A

Aus der Gruppe der Ochratoxine ist das von Asperillus- und Penicillium-Arten gebildete Ochratoxin A das stärkste und zugleich auch häufigste Mykotoxin. Ochratoxin A findet in unserer gemäßigten Klimaregion weite Verbreitung, besonders auf gelagertem Getreide. Über die Nahrungskette gelangt es auch in den menschlichen Organismus, wo es vor allem seine nephrotoxische Wirkung entfaltet. Die in den Ländern des Balkan auftretende, so genannte Balkan endemic nephropathy (BEN), wird mit der erhöhten Aufnahme von Ochratoxin A in dieser Region in Zusammenhang gebracht [MÜCKE und LEMMEN, 2004].

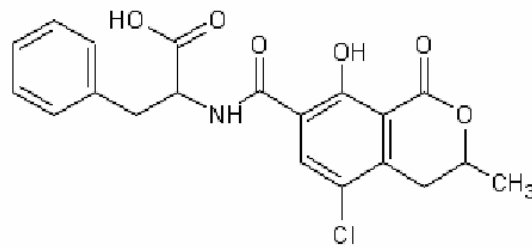


Abbildung 8: Struktur von Ochratoxin A

3.2.2.2. Citrinin

Citrinin wird häufig als Begleittoxin von Ochratoxin A nachgewiesen. Wie viele andere von Penicillien oder Aspergillen gebildete Toxine hat es antibiotische Wirkung. Neben Brot und Getreide kann es auch bei Fleisch zu einem Befall mit Citrinin bildenden Schimmelpilzen kommen. Die Gefährlichkeit von Citrinin beruht hauptsächlich auf seiner zytotoxischen und nephrotoxischen Wirkung [MÜCKE und LEMMEN, 2004].

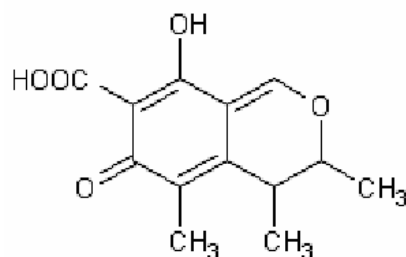


Abbildung 9: Struktur von Citrinin

3.2.2.3. Patulin

Das antibiotisch wirksame Patulin kann von verschiedenen Schimmelpilzen gebildet werden, darunter von Penicillien und Aspergillen. Verbreitung findet es auf Getreide, Gemüse und ganz besonders auf Obst. Aufgrund seiner hitzestabilen Eigenschaften kann Patulin häufig auch in technologisch verarbeiteten Produkten wie z.B. Fruchtsäften nachgewiesen werden [MÜCKE und LEMMEN, 2004].

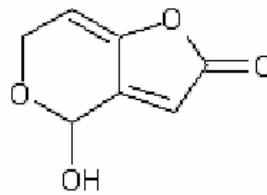


Abbildung 10: Struktur von Patulin

3.2.2.4. Sterigmatocystin

Das von einigen Aspergillus-Arten gebildete Sterigmatocystin ist strukturell eng verwandt mit den Aflatoxinen. Gefunden wird es in stark verschimmelten Lebensmitteln oder Produkten aus stark verschimmelten Rohmaterialien. Seine leberkanzerogene Wirkung entfaltet Sterigmatocystin erst durch Epoxidbildung im tierischen oder menschlichen Organismus [MÜCKE und LEMMEN, 2004].

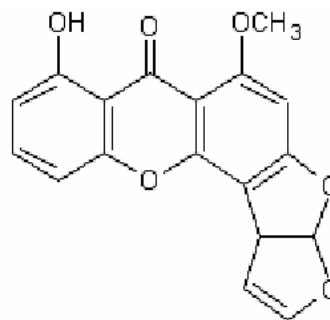


Abbildung 11: Struktur von Sterigmatocystin

3.3. Aflatoxine

3.3.1. Allgemeines

Erstmals entdeckt wurden die Aflatoxine durch den Tod von mehr als 100.000 Truthähnen in England 1961. Die als turkey-X disease bekannt gewordene Krankheit wurde durch die Verfütterung von verschimmeltem Erdnussfutter ausgelöst [RICHARD, 2007].

Die von *Aspergillus*-Arten gebildeten und nach ihnen benannten Aflatoxine gelten als die bei weitem gefährlichsten Mykotoxine. Ihr heterozyklisches Grundgerüst besteht aus fünf Ringen und ihre häufigsten Vertreter sind die Dihydrofuranofurane B₁, G₁, sowie die Tetrahydrofuranofurane B₂, G₂. Nachweisbar sind sie durch grüne (G₁, G₂) bzw. blaue (B₁, B₂) Fluoreszenz unter langwelligem UV-Licht. Die Aflatoxine M₁ und M₂ sind Hydroxyderivate von B₁ und B₂, die sowohl in Milch und Urin von laktierenden Haustieren, als auch des Menschen nachgewiesen werden können [MÜCKE und LEMMEN, 2004].

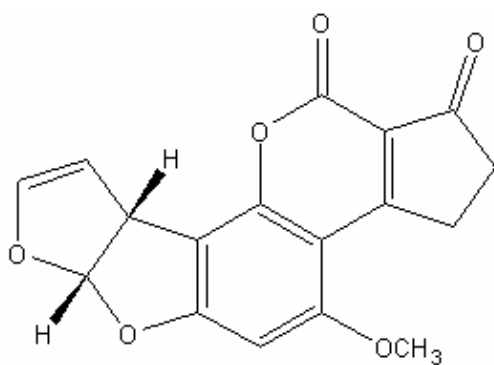
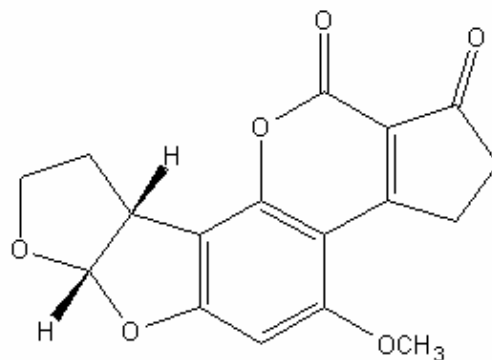
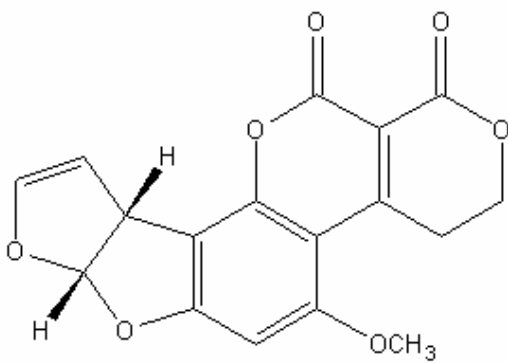
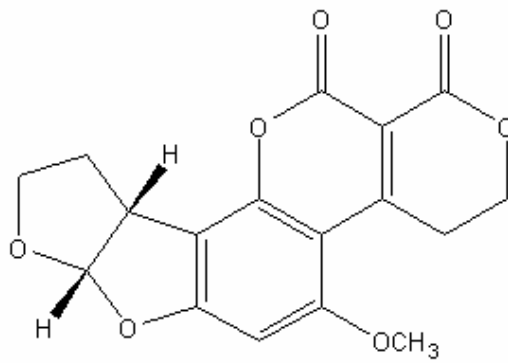
Aflatoxin B₁Aflatoxin B₂

Abbildung 12: Strukturformel von AFB₁ und AFB₂

Aflatoxin G₁Aflatoxin G₂

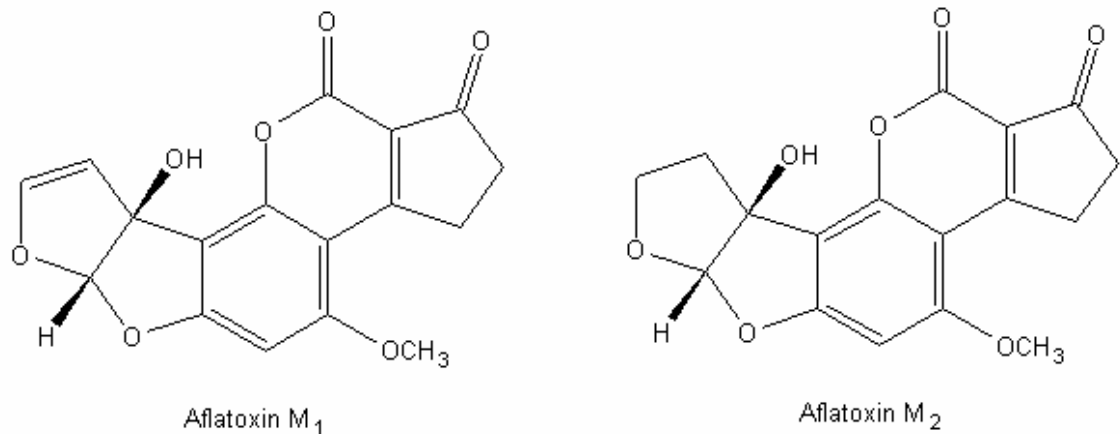


Abbildung 13: Strukturformeln von AFG₁, AFG₂, AFM₁ und AFM₂

Bis dato konnten über 20 verschiedene Aflatoxine identifiziert werden. Das mit Abstand stärkste von ihnen ist Aflatoxin B₁ (AFB₁). Es ist eines der wirkungsvollsten chemischen Kanzerogene und wirkt vor allem lebertoxisch [MÜCKE und LEMMEN, 2004].

Gebildet werden die Aflatoxine hauptsächlich von *Aspergillus flavus* und *Aspergillus parasiticus*, geringere Bedeutung haben *Aspergillus nomius* und *Aspergillus niger*. Die Arten unterscheiden sich dabei durch die Produktion der Toxine. Während *A. flavus* nur AFB₁ und AFB₂ synthetisiert, produziert *A. parasiticus* alle vier Toxine [MÜCKE und LEMMEN, 2004].

In unseren Breiten stellt man selten eine Kontamination mit Aflatoxin bildenden Schimmelpilzen fest. Weit häufiger zu einer Kontamination kommt es in den tropischen und subtropischen Gebieten Afrikas, Amerikas und Asiens. Dort können bis über 90% der Schimmelpilzisolat Toxine bilden. Das Temperatur-optimum für die Toxinbildung bei den Schimmelpilzen liegt zwischen 22°C und 35°C [RUSTOM, 1997].

Als besonders anfällig für eine Kontamination mit Aflatoxinen gelten fettreiche, pflanzliche Produkte wie Erdnüsse, Mandeln, Pistazien, etc. und bestimmte Getreidearten wie z.B. Mais und Reis, die in Ländern mit feucht-tropischem Klima angebaut und gelagert werden [MÜCKE und LEMMEN, 2004].

3.3.2. Aufnahme und Biotransformation

Aflatoxine werden oral über die Nahrung aufgenommen. Sie gelangen über den Magen-Darm-Trakt ins Blut und anschließend in die Leber. Weiters besteht die Möglichkeit der inhalativen Aufnahme durch aflatoxinhaltige Staubpartikel aus der Luft, vor allem bei Transport und Verarbeitung aflatoxinbelasteter Lebens- und Futtermittel. Auch eine Aufnahme über die Haut ist möglich [REISS, 1998].

Die Aflatoxine B₁, G₁, M₁ können durch Oxidation der Doppelbindung am äußeren Furanring in hochreaktive 8,9-Epoxide umgewandelt werden. Erst in der Epoxidform entfalten die Aflatoxine ihre kanzerogene und mutagene Wirkung durch Adduktbildung mit der DNA am N⁷-Guanin oder mit Proteinen [Bennet J. W., Klich M.; 2003]. Die Aflatoxine B₂, G₂, M₂ bilden selbst keine Epoxide, können aber zum Teil in AFB₁ umgewandelt werden. An der auch als Giftung bezeichneten Aktivierung der Aflatoxine sind zumindest fünf verschiedene Cytochrom-P₄₅₀-abhängige Monooxygenasen involviert. Alle anderen gebildeten Metabolite (P₁, Q₁, B_{2a}, M₁, M₂, etc.) weisen eine geringere Toxizität als das Aflatoxin-8,9-Epoxid auf und tragen somit zur Entgiftung bei. Eine Ausnahme stellt die Umwandlung von Aflatoxin B₁ in das wenig toxische Aflatoxicol dar, da diese Reaktion reversibel ist [MÜCKE und LEMMEN, 2004].

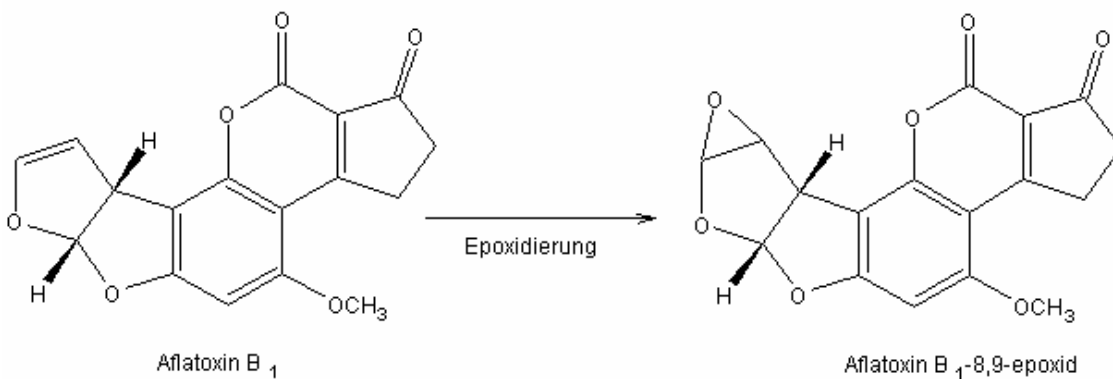


Abbildung 14: Bildung des Aflatoxin B₁-8,9-epoxids

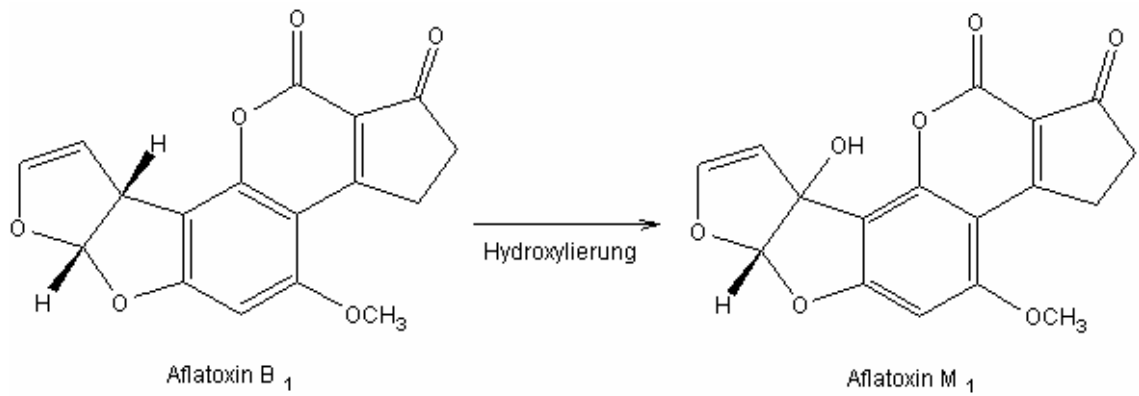


Abbildung 15: Hydroxylierung zu Aflatoxin M₁

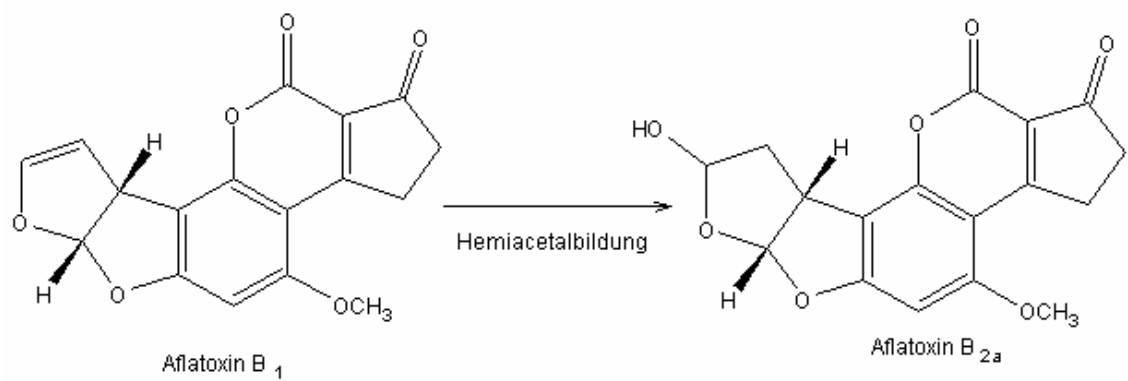


Abbildung 16: Bildung des Hemiacetals Aflatoxin B_{2a}

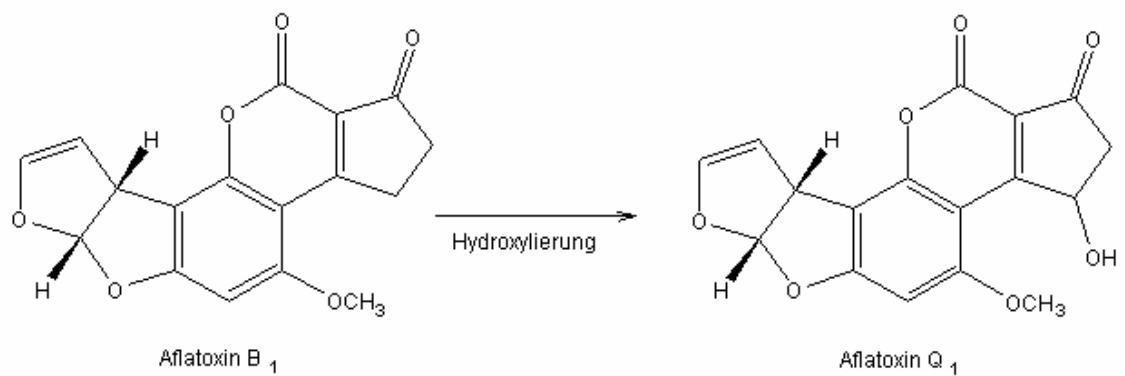


Abbildung 17: Hydroxylierung zu Aflatoxin Q₁

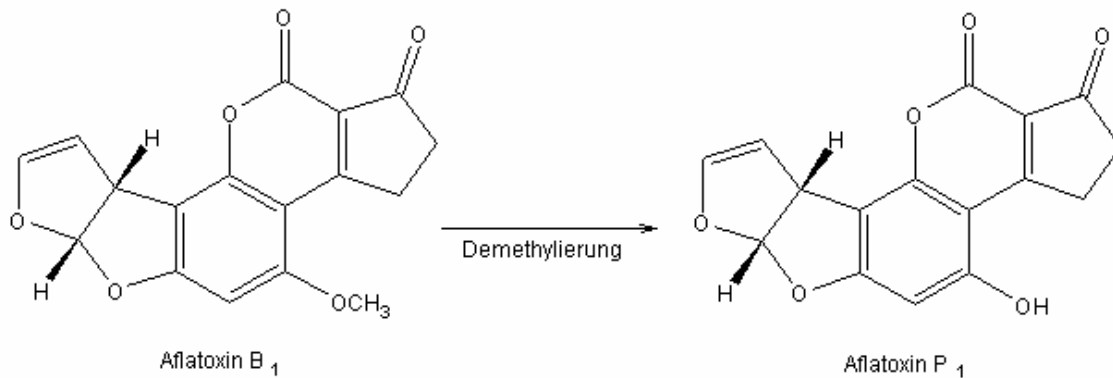


Abbildung 18: Demethylierung von AFB₁ zu Aflatoxin P₁

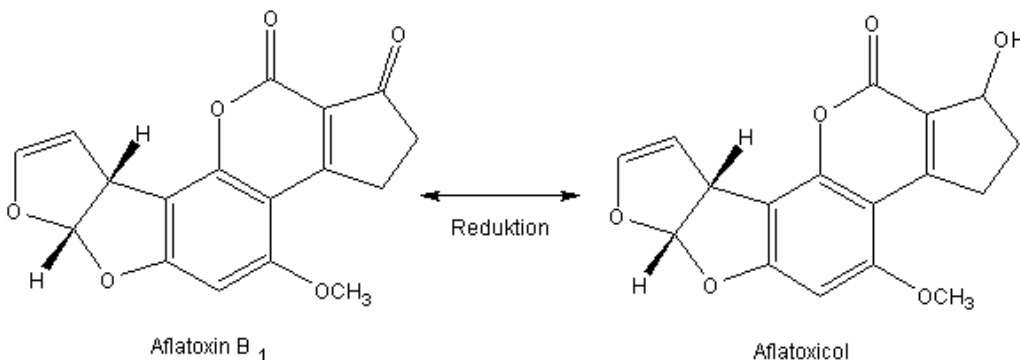


Abbildung 19: Reversible Reduktion von AFB₁ zu Aflatoxinol

Ein alternativer Weg der Aktivierung von Aflatoxin B₁ ist die Oxidation durch Lipidhydroperoxid-abhängige Vorgänge. Dies geschieht extrahepatisch, vor allem in Lunge, Niere und embryonalem Gewebe [MÜCKE und LEMMEN, 2004].

3.3.3. Ausscheidung

Die Ausscheidung des Epoxids erfolgt über Konjugation mit Glutathion durch die Glutathion-S-Transferase (GST) und Abtransport über den Gallenweg. Das Epoxid wird jedoch nicht vollständig ausgeschieden, da es durch partielle Hydrolyse des Konjugats durch die intestinale Mikroflora, in den enterohepatischen Kreislauf gelangt. Bedeutung bei der Entgiftung haben ferner UDP-Glucuronyl-Transferasen und Sulfotransferasen. Die anderen Aflatoxine werden in Form von Glucuroniden und Sulfatkonjugaten über den Urin ausgeschieden.

DNA- und Proteinaddukte dienen als Aflatoxin-Biomarker für eine bestehende Aflatoxinexposition, da die Aflatoxinaufnahme mit den ausgeschiedenen Derivaten im Harn korreliert. Für die Untersuchung längerer Expositionszeiten eignet sich an Serumalbumin gebundenes Aflatoxin B₁ aufgrund der längeren Halbwertszeit von Albumin besser [MÜCKE und LEMMEN, 2004].

3.3.4. Wirkungsmechanismus

Die starke Toxizität der Aflatoxine beruht auf ihrer Biotransformation in Aflatoxin-8,9-Epoxide. Durch diese kommt es zu Adduktbildung mit Nukleinsäuren und Proteinen. DNA-Addukte besitzen vorwiegend mutagene bzw. kanzerogene Eigenschaften. Akute toxische und immunsuppressive Wirkung sind Folge RNA- bzw. Proteinaddukten.

Über das Stickstoffatom an der Position 7 des Guanins bildet das Aflatoxin-8,9-Epoxid kurzlebige Primäraddukte. Diese können zu stabilen Sekundäraddukten und apurinischen Stellen umgebaut werden und in der Folge durch Punktmutationen Tumorsuppressorgene inaktivieren und Onkogene aktivieren. Die für Aflatoxikose charakteristische Transversion von Guanin zu Thymin im Codon 249 des p53-Suppressorgens, verhindert die Apoptose geschädigter bzw. mutierter DNA. Ungefähr 50 % der primären Leberkarzinome weisen mutierte p53-Suppressorgene auf [MÜCKE und LEMMEN, 2004].

3.3.5. Toxizität

Bei einer akuten oder chronischen Vergiftung mit Aflatoxinen spricht man von einer so genannten Aflatoxikose. Die stärkste Toxizität weist Aflatoxin B₁ auf, gefolgt von G₁, B₂, G₂. Primär tritt dabei eine Schädigung der Leber auf. Im Tierversuch konnte festgestellt werden, dass die Toxizität der Aflatoxine je nach Spezies stark schwankt. Grund dafür ist die für die Entgiftung hauptverantwortliche Glutathion-S-Transferase. Nur die Maus bildet ein Isoenzym der GST, das eine effiziente Entgiftung des Aflatoxin B₁-8,9-Epoxids ermöglicht. Die Gefahr einer Aflatoxikose beim Menschen ist vor allem durch regelmäßige Auf-

nahme von Aflatoxinen über die Nahrung gegeben [MÜCKE und LEMMEN, 2004].

3.3.5.1. Akute Toxizität

Die letale Dosis von Aflatoxin B₁ für einen erwachsenen Menschen wird mit 1-10 mg/kg Körpergewicht angegeben. Bei akuten Vergiftungen ist primär die Leber betroffen. Es können Nekrosen im Leberparenchym gebildet werden und es kann zur Proliferation des Gallengangepithels kommen. Weitere Anzeichen sind Blutungen in Nieren und Verdauungstrakt, sowie Störungen des Nervensystems [MÜCKE und LEMMEN, 2004].

Aflatoxin		LD ₅₀ -Wert (mg/kg)
Aflatoxin B ₁	Entenküken	0,2 – 0,6
	Schwein	0,6
	Forelle	0,5 – 0,8
	Ratte	1,7 – 5
	Mensch	1 – 10
	Maus, neugeboren	9,5
	Maus, adult	50
Aflatoxin B ₂	Entenküken	1,7
Aflatoxin G ₁	Entenküken	0,8
Aflatoxin G ₂	Entenküken	3,5
Aflatoxin M ₁	Entenküken	0,8
Aflatoxin M ₂	Entenküken	3,1

Tabelle 7: LD₅₀-Werte von Aflatoxinen oral in mg/kg KG [MÜCKE und LEMMEN, 2004]

3.3.5.2. Chronische Toxizität

Häufiger als zu akuten, kommt es zu chronischen Vergiftungen mit Aflatoxinen. In Gebieten, in denen eine hohe Aflatoxinbelastung von Nahrungsmitteln des täglichen Verzehrs bekannt war, konnte eine erhöhte Rate von Leberzirrhosen und primären Leberkarzinomen festgestellt werden. Im Tierversuch führten bereits einmalige Gaben von 10µg Aflatoxin B₁ pro kg Körpergewicht bei Ratten zur Ausbildung von Leberkarzinomen [MÜCKE und LEMMEN, 2004].

Primärer Leberkrebs gehört zu den weltweit häufigsten Krebsformen. Während bisher in Europa kein Zusammenhang zwischen der Ausbildung eines primären Leberkarzinoms und einer Aflatoxinexposition nachgewiesen werden konnte, schätzt man, dass in Afrika südlich der Sahara und in Südostasien bis zu 50% der Leberkrebsfälle auf mit Aflatoxinen belasteten Nahrungsmittel zurückzuführen sind. Eine synergistische Wirkung von Aflatoxinen und einer Hepatitis B-Erkrankung bei der Entstehung von primären Leberkarzinomen konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Während die Wahrscheinlichkeit, Leberkrebs zu entwickeln, bei einem Risikofaktor noch relativ gering ist (bei Aflatoxinen 3,4-fach, bei Hepatitis B 7-fach erhöht), steigt sie mit beiden Risikofaktoren auf das 30 bis 60-fache an [MÜCKE und LEMMEN, 2004].

In Tierversuchen führte die Aflatoxinzufuhr über einen längeren Zeitraum zu verschiedenen immunsuppressiven Effekten. Grund dafür ist der Funktionsverlust zellulärer Proteine durch Adduktbildung mit den Aflatoxin-Epoxiden. Auch bei Menschen, die Aflatoxine regelmäßig über die Nahrung aufnehmen, zeigt sich eine verringerte Infektionsabwehr [REISS, 1998].

Bei vom Reye-Syndrom betroffenen Kindern, einer Enzephalopathie mit fettiger Degeneration der Eingeweide, konnte in Leber und Blut der Betroffenen Aflatoxin B₁ nachgewiesen werden. Eine Beteiligung von Aflatoxin B₁ an der Krankheitsentstehung wird vermutet [REISS, 1998].

Auch bei der durch schweren Proteinmangel ausgelösten Kwashiorkor-Krankheit, die bei Kleinkindern tropischer und subtropischer Gebiete auftritt und mit Wachstumsstörungen, Ödemen, Anämie und verminderter Widerstandsfähigkeit verbunden ist, konnte man in Blutserum und Organen bis zu zehnfach erhöhte Aflatoxinwerte, sowie den Aflatoxinmetabolit Aflatoxicol nachweisen. Vermutet wird, dass durch den Proteinmangel S-haltige Aminosäuren für die Aflatoxinentgiftung durch Glutathion-S-Transferase fehlen [REISS, 1998].

Weniger beachtet wurde lange Zeit die Gefahr, die vom Einatmen toxinhaltiger Staubpartikel ausgeht. Untersuchungen in der ehemaligen CSSR zeigten ein erhöhtes Auftreten von Krebsfällen bei Arbeitern, die aflatoxinhaltigem Staub ausgesetzt waren [REISS, 1998].

Seit 1987 werden natürlich vorkommende Aflatoxine von der Internationalen Agentur für Krebsforschung (IARC) für den Menschen als Kanzerogene der Kategorie I eingestuft [MÜCKE und LEMMEN, 2004].

3.3.6. Gesetzliche Regelungen

Erlaubte Höchstgehalte an Aflatoxinen und anderen Mykotoxinen in Lebens- und Futtermitteln werden zentral von der EU festgelegt und gelten für alle Mitgliedsstaaten. Diese Bestimmungen gelten auch für sämtliche in die EU eingeführten Produkte. Die Einhaltung der erlaubten Höchstmengen wird durch regelmäßig durchgeführte Stichprobenkontrollen überprüft. Die in der Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 der Europäischen Union erlaubten Höchstgehalte für Aflatoxine in Lebensmitteln sind in Tab. 8 aufgelistet. Der Höchstgehalt für AFB₁ liegt bei 2 µg/kg, der für alle vier Aflatoxine zusammen bei 4 µg/kg. Diese Höchstwerte gelten für Lebensmittel, die zum direkten Verzehr vorgesehen sind und keiner weiteren Sortierung oder physikalischen Behandlung unterzogen werden [MÜCKE und LEMMEN, 2004].

Erzeugnis	Höchstgehalt Aflatoxine (µg/kg)		
	<i>B₁</i>	<i>Summe aus B₁, G₁, B₂, G₂</i>	<i>M₁</i>
Erdnüsse, die vor ihrem Verzehr oder ihrer Verwendung als Lebensmittelzutat einer Sortierung oder einer anderen physikalischen Behandlung unterzogen werden sollen	8,0	15,0	–
Schalenfrüchte, die vor ihrem Verzehr oder ihrer Verwendung als Lebensmittelzutat einer Sortierung oder einer anderen physikalischen Behandlung unterzogen werden sollen	5,0	10,0	–
Erdnüsse, Schalenfrüchte und deren Verarbeitungserzeugnisse, die zum unmittelbaren Verzehr oder zur Verwendung als Lebensmittelzutat bestimmt sind	2,0	4,0	–

Trockenfrüchte, die vor ihrem Verzehr oder ihrer Verwendung als Lebensmittelzutat einer Sortierung oder einer anderen physikalischen Behandlung unterzogen werden sollen	5,0	10,0	–
Trockenfrüchte und deren Verarbeitungserzeugnisse, die zum unmittelbaren Verzehr oder zur Verwendung als Lebensmittelzutat bestimmt sind	2,0	4,0	–
Getreide und Getreideerzeugnisse, einschließlich verarbeitete Getreideerzeugnisse, außer die gesondert aufgeführten Erzeugnisse	2,0	4,0	–
Mais, der vor seinem Verzehr oder seiner Verwendung als Lebensmittelzutat einer Sortierung oder einer anderen physikalischen Behandlung unterzogen werden soll	5,0	10,0	–
Rohmilch, wärmebehandelte Milch und Werkmilch	–	–	0,050
Folgende Gewürzsorten: Capsicum spp. (getrocknete Früchte, ganz oder gemahlen, einschließlich Chili, Chilipulver, Paprika und Cayennepfeffer) Piper spp. (Früchte, einschließlich weißer und schwarzer Pfeffer) Myristica fragrans (Muskat) Zingiber officinale (Ingwer) Curcuma longa (Gelbwurz)	5,0	10,0	–
Getreidebeikost und andere Beikost für Säuglinge und Kleinkinder	0,1	–	–
Säuglingsanfangsnahrung und Folgenahrung, einschließlich Säuglingsmilchnahrung und Folgemilch	–	–	0,025
Diätetische Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke, die eigens für Säuglinge bestimmt sind	0,1	–	0,025

Tabelle 8: In der EU gesetzlich erlaubte Höchstgehalte von Aflatoxinen in Lebensmitteln [EUROPÄISCHE KOMMISSION: Verordnung (EG) Nr. 1831/2003, 2006]

In Tab.9 sind die Regelungen der EU für die Höchstgehalte an AFB₁ in Futtermitteln angeführt.

Erzeugnis	Höchstgehalt AFB₁ (µg/kg)
Alle Futtermittel-Ausgangserzeugnisse	20,0
Alleinfuttermittel für Rinder, Schafe und Ziegen, ausgenommen Milchvieh, Kälber und Lämmer	20,0
Alleinfuttermittel für Milchvieh	5,0
Alleinfuttermittel für Kälber und Lämmer	10,0
Alleinfuttermittel für Schweine und Geflügel (ausgenommen Jungtiere)	20,0
Andere Alleinfuttermittel	10,0
Ergänzungsfuttermittel für Rinder, Schafe und Ziegen (ausgenommen Ergänzungsfuttermittel für Milchvieh, Kälber und Lämmer)	20,0
Ergänzungsfuttermittel für Schweine und Geflügel (ausgenommen Jungtiere)	20,0
Andere Ergänzungsfuttermittel	5,0

Tabelle 9: In der EU gesetzlich erlaubte Höchstgehalte für AFB₁ in Futtermitteln
[EUROPÄISCHES PARLAMENT und RAT DER EUROPÄISCHEN UNION: Richtlinie (EG) Nr. 32/2002, 2002]

4. Methoden für den Nachweis von Aflatoxinen

4.1. HPLC

4.1.1. Aufbau

Eine HPLC-Anlage besteht aus einem Reservoir mit der mobilen Phase, für deren Beförderung durch das HPLC-System eine oder mehrere Pumpen notwendig sind. Durch ein Injektionsventil wird ein definiertes Probenvolumen in das Chromatographiesystem eingebracht. In den meisten Fällen kommt dabei eine Injektionsschleife zum Einsatz, bei der es eine Füll- und eine Injektionsposition gibt. In der Füllposition wird die Probenschleife mit der Probenlösung gefüllt, durch Umschalten auf die Injektionsposition wird die Probenlösung in die mobile Phase überführt. Die Probenschleife hat dabei ein genau definiertes Volumen. Die Injektion erfolgt entweder manuell mittels Spritze oder, heute häufiger, mittels Autosampler [CAMMANN, 2001].

Auf das Injektionssystem folgen die Vorsäule, die Filterfunktion hat und danach die Trennsäule. Trennsäulen bestehen aus Edelstahlrohren unterschiedlicher Länge und sind mit porösen Mikropartikeln bepackt, die ein dichtes und druckstabiles Chromatographiebett ergeben. Als Packungsmaterial wird meist Kieselgel verwendet, daneben finden noch Aluminiumoxid und Zirkonia Anwendung [DOYLE und DORSEY, 1998]. Man unterscheidet zwischen Normal-Phase-Chromatographie und Reversed-Phase-Chromatographie. Bei Ersterer wird für die stationäre Phase zumeist polares, reines Silica verwendet, das sich für unpolare mobile Phasen eignet. Bei Letzterer wird die Polarität des Kieselgels durch Modifikation mit unpolaren Resten umgekehrt, weshalb man von einer Umkehrphase spricht. Verwendung als Modifier finden Octyl-, Octadecyl-, Cyanopropyl-, Phenyl- oder auch Aminopropylgruppen. Mit seiner unpolaren stationären Phase eignet sich die RP-Chromatographie für polare mobile Phasen [CAMMANN, 2001].

Auf die Trennsäule folgt letztlich der Detektor. Er ist für die Registrierung eines Probensignals und dessen Weiterleitung an ein PC-Auswertesystem verantwortlich [CAMMANN, 2001].

4.1.2. Entgasung der mobilen Phase

Bevor die mobile Phase auf das chromatographische Bett der Trennsäule gelangt, sollte man sie entgasen, um Schwankungen der Basislinie und spontane Detektorausschläge zu vermeiden. Das kann durch Ultraschallbad, on-line-Entgasung mit Helium oder Vakuumentgasung erreicht werden [CAMMANN, 2001].

4.1.3. Elutionsmethoden der HPLC

4.1.3.1. HPLC mit isokratischer Elution

Bei isokratischen Elutionsbedingungen bleibt die Zusammensetzung der mobilen Phase während des Trennvorgangs konstant. Dadurch ergibt sich während des gesamten chromatographischen Prozesses eine konstante Elutionskraft [CAMMANN, 2001].

4.1.3.2. HPLC mit Gradientenelution

Bei der Gradientenelution wird die Elutionskraft der mobilen Phase während der Laufzeit des Chromatogramms geändert. Aus verschiedenen Reservoirs werden die Komponenten der mobilen Phase in einem bestimmten Verhältnis angesaugt und gemischt. Dadurch verkürzt sich die Laufzeit des Chromatogramms und die einzelnen Peaks eines Analyten werden schärfer getrennt. Die Gradientenelution findet hauptsächlich Anwendung bei besonders komplexen Gemischen mit starken Polaritätsunterschieden. Weiters unterscheidet man zwischen einem Hochdruck- und einem Niederdruck-Gradientensystem [CAMMANN, 2001].

4.1.4. Parameter der HPLC

4.1.4.1. Der Verteilungskoeffizient

Im Zuge der Verteilungschromatographie kommt es zu Wechselwirkungen zwischen der stationären und der mobilen Phase. Es stellt sich dabei ein Gleichgewicht zwischen den beiden Phasen ein. Dieser Zusammenhang mit dem Verteilungskoeffizienten ausgedrückt.

$$K_C = C_S / C_M$$

Die Auftrennung von Substanzen beruht somit auf ausreichend unterschiedlichen Verteilungskoeffizienten [CAMMANN, 2001].

4.1.4.2. Retentionsfaktor und Lineargeschwindigkeit

Die Retentionszeit t_R eines Analyten wird am Peakmaximum bestimmt. Sie hilft bei der Identifizierung von Analyten. Die Zeit, die die mobile Phase vom Injektor zum Detektor benötigt, wird als Durchflusszeit oder auch Totzeit bezeichnet. Die Lineargeschwindigkeit v der mobilen Phase ist abhängig von der Länge der Trennsäule L und der Durchflusszeit t_M [CAMMANN, 2001].

$$v = L / t_M$$

4.1.4.3. Trennfaktor α

Mit dem Trennfaktor α kann man die relative Retention zweier benachbarter Peaks angeben. Er ist stets größer oder gleich eins. Bei einem Trennfaktorwert von eins überlagern sich die Peaks, bei höheren Werten sind sie mehr oder weniger getrennt [CAMMANN, 2001].

$$\alpha = (t_{R2} - t_M) / (t_{R1} - t_M)$$

α = Trennfaktor

t_{R1} = Retentionszeit Substanz 1

t_{R2} = Retentionszeit Substanz 2

t_M = Durchflusszeit

4.1.5. Peakverbreiternde Prozesse

Ziel bei Messungen mit der HPLC ist der Erhalt möglichst scharfer, gaußförmiger Peaks, die die Auswertung erleichtern und die Empfindlichkeit verbessern. Praktisch kommt es jedoch häufig zu Peak-Fronting oder Peak-Tailing, einem flachen Anstieg bzw. flachen Abfall des Signals. Verantwortlich dafür sind verschiedene Einflüsse.

4.1.5.1. Van-Deemter-Gleichung

Die als van-Deemter-Gleichung bekannte Beziehung beschreibt den quantitativen Zusammenhang zwischen der Trennstufenhöhe H der stationären Phase und der Geschwindigkeit v der mobilen Phase.

$$H = A + B / v + Cv$$

H = Trennstufenhöhe

A = Eddy-Diffusion

B = Longitudinaldiffusion

C = Massentransport-Effekt

v = Lineargeschwindigkeit

Der A-Term beschreibt die so genannte Eddy-Diffusion. Bei der Wanderung einer Substanz durch eine gepackte Säule, legen die Analytmoleküle unterschiedlich lange Wege zurück, wenn sie das Packungsmaterial umwandern.

Größe, Homogenität und Dichte des Packungsmaterials beeinflusst die Breite von Peaks.

Der B-Term der van-Deemter-Gleichung bezeichnet die Longitudinaldiffusion. Während der Wanderung einer Substanz durch die Säule, kommt es zur longitudinalen Diffusion der Substanzmoleküle. Die Diffusion ist abhängig von der Verweildauer des Analyten in der Säule und dem Diffusionskoeffizienten D_M . In der Flüssigkeitschromatographie kann dieser Term aufgrund sehr niedriger D_M -Werte vernachlässigt werden.

Der C-Term wird als Massentransport-Effekt bezeichnet. Er beschreibt den Zusammenhang zwischen der Geschwindigkeit, mit der sich die mobile Phase durch die Säule bewegt und der Einstellung eines Gleichgewichts zwischen stationärer und mobiler Phase. Je langsamer die mobile Phase durch die Säule fließt, desto besser kann ein Gleichgewicht zwischen stationärer und mobiler Phase hergestellt werden und desto geringer fällt die Bandenverbreiterung aus [CAMMANN, 2001].

4.1.5.2. Extra-Column-Effects

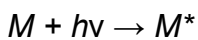
Außerhalb der Säule kann es ebenfalls zu Peak verbreiternden Prozessen kommen. Grund dafür ist der Transport von Analyten durch die Verbindungsstücke der einzelnen Komponenten der HPLC. Die Gesamtheit dieser Volumina wird als Totvolumen bezeichnet. Aufgrund der laminaren Strömung werden Analytmoleküle in der Mitte einer Kapillare schneller fortbewegt als solche an den Kapillarwänden. Um Extra-Column-Effects möglichst gering zu halten, sollten die Verbindungsstücke zwischen Injektor und Säule bzw. zwischen Säule und Detektor möglichst kurz gehalten werden [CAMMANN, 2001].

4.2. HPLC-Detektoren

Die Auswahl eines Detektors sollte der jeweiligen analytischen Fragestellung angepasst werden. Wichtige Kriterien sind die benötigte Nachweisgrenze, ein geeigneter linearer Messbereich, Kompatibilität mit der mobilen Phase, die Selektivität und Flexibilität des Detektors, sowie der Preis.

4.2.1. UV/vis–Detektoren

UV/vis–Detektoren messen die durch einen Analyten verursachte Lichtschwächung durch Anregung äußerer Elektronen von Molekülen durch Licht im ultravioletten und sichtbaren Bereich. Voraussetzung für die Absorption von Licht ist das Vorhandensein so genannter chromophorer Gruppen, Molekülen mit einem konjugierten π -Elektronensystem. Durch die Zufuhr von Energie in Form von Photonen einer bestimmten Wellenlänge, werden Elektronen eines Moleküls aus ihrem Grundzustand in einen energetisch höheren Zustand gebracht.



Grundlage der quantitativen Absorptionsspektroskopie ist das Lambert-Beer'sche Gesetz:

$$\log I_0 / I = E_\lambda = \varepsilon_\lambda c d$$

I = Intensität des durchgelassenen Lichts
 I_0 = Intensität des eingestrahnten Lichts
 c = molare Konzentration
 d = Schichtdicke
 ε = molarer Extinktionskoeffizient
 E = Extinktion

Die Extinktion E (Lichtschwächung) eines Analyten ist demnach abhängig vom molaren Extinktionskoeffizienten ε bei einer gewählten Wellenlänge λ , der Schichtdicke d und der Konzentration c .

Bei den UV/vis-Spektrometern unterscheidet man zwischen Festwellenlängen-Detektoren, Detektoren mit variabler Wellenlänge und Photodiodenarray-Detektoren. Die Messung der Extinktion erfolgt in einer Durchflussküvette. Als Lichtquelle für den UV-Bereich dienen Deuterium-Lampen, für den sichtbaren Bereich werden Wolfram-Halogen-Lampen verwendet [CAMMANN, 2001].

4.2.2. Fluoreszenzdetektoren

Grundlage der Fluoreszenzdetektion ist die Intensitätsmessung von Licht, das von angeregten Analytmolekülen emittiert wird. Auch Fluorophore besitzen ein π -Elektronensystem und absorbieren Licht aus dem UV/vis-Bereich. Elektronen werden durch die Energie von Photonen aus ihrem Singulett-Grundzustand in einen angeregten Singulett-Zustand gebracht. Bei der Rückkehr aus dem angeregten Zustand in den Grundzustand erfolgt die Lichtemission durch überschüssige Energie. Mit der Quantenausbeute gibt man an, welcher Teil der absorbierten Strahlung als Fluoreszenzlicht emittiert wird.

Auch bei der Fluoreszenz kann der Zusammenhang zwischen der Konzentration einer Probe und ihrer Lichtemission mit dem Lambert-Beer'schen Gesetz erklärt werden:

$$I_{em} = \Phi I_0 (1 - 10^{-\epsilon c \chi})$$

I_0 = Intensität des eingestrahnten Lichtes
 I_{em} = Intensität des emittierten Lichtes
 Φ = Quantenausbeute
 ϵ = Extinktionskoeffizient
 χ = Weglänge
 c = molare Konzentration

Die Fluoreszenzdetektion hat im Vergleich zur UV/vis-Absorption bis zu 10^3 niedrigere Nachweisgrenzen. Grund dafür ist ein viel geringeres Hintergrundsignal. Bei der Fluoreszenzmessung muss sowohl das eingestrahlte Licht, als auch das von der Probe emittierte Licht monochromatisiert werden, um Hintergrundfluoreszenz und Streulicht zu eliminieren. Durch Interferenzfilter wird bei eingestrahlttem und emittiertem Licht nur ein enger Wellenlängenbereich ausgewählt, wodurch bedeutend niedrigere Nachweisgrenzen und höhere Selektivität als bei der UV-Detektion erreicht werden können.

Die Anregung erfolgt durch Licht von Deuterium- oder Hochdruck-Xenon-Bogenlampe.

Die Detektion kann auf unterschiedlicher geometrischer Anordnung basieren. Meist trifft der Anregungslichtstrahl zentral auf die Küvette oder die Durchflussmazzelle der Probe, während die Fluoreszenz bzw. das emittierte Licht im rechten Winkel dazu gemessen wird.

Einige chemische Substanzen wie z.B. aromatische Kohlenwasserstoffe zeigen eine natürliche Fluoreszenz. Bei Substanzen, die keine native Fluoreszenz zeigen, kann man den Analyten durch eine Derivatisierungsreaktion mit einem Fluoreszenzmarker fluorimetrisch detektierbar machen [CAMMANN, 2001].

4.3. Derivatisierungsmethoden für Aflatoxine

Für den Nachweis von Aflatoxinen in einer Probe durch eine HPLC-Anlage, müssen die Aflatoxine B₁ und G₁ derivatisiert werden, um ihre natürliche Fluoreszenz unter UV-Licht zu verstärken und ihre Detektion dadurch zu verbessern. Es existieren verschiedene Derivatisierungsmethoden, die in Vorsäulenderivatisierung und Nachsäulenderivatisierung eingeteilt werden.

4.3.1. Möglichkeiten der Vorsäulenderivatisierung

4.3.1.1. Derivatisierung mit Trifluoressigsäure

Bei der Methode mit Trifluoressigsäure (TFA) wird die Aflatoxin-hältige Lösung vorher mit Stickstoff abgedampft. Die Aflatoxine werden in einem kleinerem Volumen TFA wieder aufgenommen, um die Probe vor der HPLC-Analyse zu derivatisieren und zu konzentrieren. Der Nachteil dieser Methode ist, dass es beim Abdampfen der Probe mit Stickstoff zu Verlusten kommen kann. Weiters sollte man darauf achten, dass kein Toxin an der Oberfläche des verwendeten Röhrchens zurückbleibt. Bei dieser Methode werden die Aflatoxinderivate sehr früh eluiert, wodurch sie sehr leicht durch Matrixpeaks mit ähnlichen Retentionszeiten verdeckt werden können. Eine weitere Einschränkung ist, dass die Derivatisierungsreaktion mit TFA 30 Minuten bei einer Temperatur von 50°C benötigt und TFA eine sehr aggressive Substanz ist [KOK et al., 1986].

4.3.2. Möglichkeiten der Nachsäulenderivatisierung

4.3.2.1. Derivatisierung mit Pyridiniumbromid-Perbromid

Bei der Nachsäulenderivatisierung mit Pyridiniumbromid-Perbromid (PBPB) wird das Reagens dem Eluat der HPLC-Säule zugegeben. Die Reaktion findet bei 20°C in einem 30cm langen Edelstahlrohr ohne Wasserbad statt. Die Nachteile dieser Methode sind der Einsatz einer zweiten Pumpe, die Schwierigkeit, das PBPB aufzulösen, sowie die gefährliche Natur des Reagens [STROKA et al., 2003].

4.3.2.2. Prinzip der Derivatisierung mit Iod

Für die Nachsäulenderivatisierung mit Iod benötigt man eine zweite Pumpe, die das Iod in eine Reaktionsschleife befördert. Die Reaktion findet in einer Reaktionsschleife aus rostfreiem Stahl statt, wobei diese entweder in einem Wasserbad oder einem Säulenofen steht. Die Reaktion selbst benötigt nur 40 Sekunden bei 60°C, danach wird die Probe im Fluoreszenzdetektor detektiert. Die Nachteile dieser Methode sind längere Reaktionszeiten bei höherer Temperatur (Peakverbreiterung) und der zusätzliche Geräteaufwand. Das für die Reaktion benötigte Iod muss aufgrund seiner instabilen Natur, jeden Tag frisch hergestellt werden und die regelmäßige Reinigung der gesamten Apparatur ist notwendig, um die Ausbildung von Iodkristallen innerhalb der Reaktionsschleife zu verhindern [KOK et al., 1986].

4.3.2.3. Derivatisierung mit Cyclodextrin

Die native Fluoreszenz von AFB₁ und AFG₁ kann durch Cyclodextrine (CD) sowohl durch Vorsäulen- als auch durch Nachsäulenderivatisierung erhöht werden. Cyclodextrine sind zyklische Oligosaccharide bestehend aus mehreren α -1,4 konfigurierten Glukosemolekülen, die je nach Anzahl der Glukosemoleküle in α -, β - oder γ -CD eingeteilt werden. Der Grund für die Erhöhung der nativen Fluoreszenz von Aflatoxinen durch CD wird in der Erhöhung der Wechselwir-

kungen zwischen dem Cumarin-System der Aflatoxine und CD vermutet, eine andere Theorie geht davon aus, dass es durch CD zu einer Reduktion der Wechselwirkungen der Fluorophore mit Wasser kommt und somit zu einer Erhöhung der Fluoreszenz. Die größte Erhöhung der Fluoreszenz konnte für AFB₁ mit Succinyl-β-CD, für AFG₁ mit (2,6-di-O-methyl)-β-CD (DIMEB) festgestellt werden [MARAGOS et al., 2008].

4.3.2.4. Derivatisierung mittels elektrochemischer Zelle

Für die Analyse von Aflatoxinen hat sich die Derivatisierung mit Hilfe einer elektrochemischen Zelle (Kobrazelle) bewährt. Sie umgeht viele Probleme der vorher genannten Methoden, indem sie auf alternative Derivatisierungsmöglichkeiten zurückgreift. Die elektrochemische Zelle produziert aus Kaliumbromid (KBr) in der mobilen Phase reaktives Brom für die Derivatisierung von Aflatoxinen. Die Reaktion zwischen den Aflatoxinen und reaktivem Brom findet statt, bevor die Probe in den Fluoreszenzdetektor kommt. Es resultiert eine stark erhöhte Fluoreszenz von AFB₁ und AFG₁ und ermöglicht dadurch eine sensitivere Detektion der Aflatoxine durch den Fluoreszenzdetektor [KOK et al., 1986].

Vor- und Nachteile dieser Methode sind:

- die tägliche Herstellung eines Derivatisierungsreagens entfällt
- keine Stabilitätsprobleme mit der mobilen Phase
- kein Einsatz von halogenierten Substanzen
- keine zusätzliche Pumpe notwendig
- keine Korrosion der Pumpe
- niedrige Instandhaltungskosten
- starke Erhöhung der Fluoreszenzaktivität der Aflatoxine
- einfache Handhabung
- hohe Reproduzierbarkeit von Ergebnissen
- Derivatisierung bei Raumtemperatur innerhalb von 4 Sekunden
- Hohe Investitionskosten

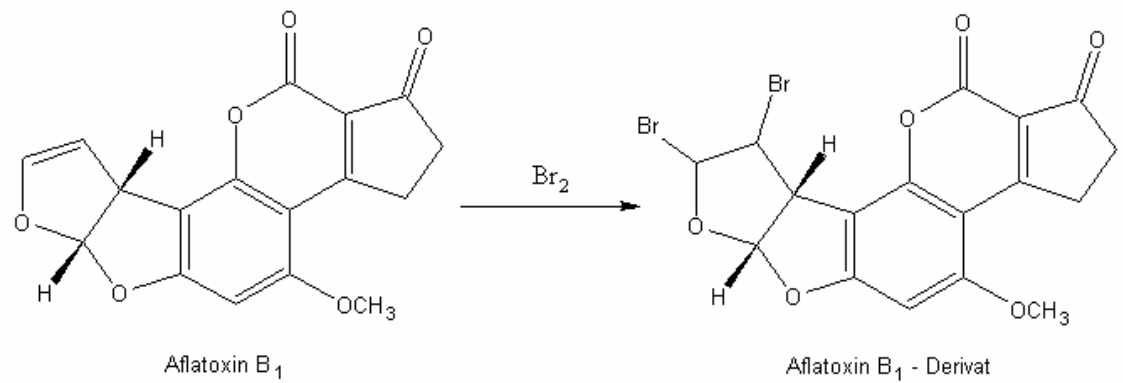


Abbildung 20: Derivatisierungsreaktion von Aflatoxin B₁ mit reaktivem Brom

5. Methoden der Probenvorbereitung

Probenvorbereitungsverfahren dienen der Reinigung und der Aufkonzentrierung der zu analysierenden Probe.

5.1. Flüssig-Flüssig-Extraktion

Mit Hilfe beispielsweise eines Scheidetrichters wird eine zu analysierende wässrige Probe mit einem organischen, mit H_2O nicht mischbaren Lösungsmittel ausgeschüttelt. Das verwendete Lösungsmittel sollte einen hohen Reinheitsgrad besitzen. Nach Trennung der beiden Phasen, wird die organische Phase gesammelt, wobei sich mehrmaliges Ausschütteln mit kleinen Mengen Lösungsmittel als wirkungsvoller erwiesen hat [CAMMANN, 2001].

5.2. Festphasen-Extraktion

Bei der Festphasen-Extraktion kommen entweder Glas- oder Kunststoffkartuschen zum Einsatz, in denen ein festes Adsorbens als stationäre phase dient. Als Adsorptionsmaterial dienen unter anderem Kieselgel, Aluminiumoxid, modifizierte Kieselgele und Ionenaustauscher. Nach Reinigung des Adsorbens und Aktivierung mit Hilfe des verwendeten Lösungsmittels, wird die zu analysierende Probe durch die Kartusche gesaugt. Analytmoleküle reichern sich an der Oberfläche des Adsorbensmaterials an und können am Ende mit geringen Mengen eines geeigneten organischen Lösungsmittels mit hoher Elutionskraft eluiert werden [CAMMANN, 2001].

5.3. Immunaффinitätschromatographie (IAC)

Hauptanwendungsgebiet der IAC ist die Reinigung und Konzentration von Proteinen, Antikörpern und anderen Biomolekülen. Sie ist eine Trennmethode mit unvergleichbar hohem Reinigungseffekt und hoher Selektivität. Grund dafür sind starke Wechselwirkungen zwischen Analytmolekülen und einem Matrix-

gebundenem affinen Liganden nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip [COOPER, 1981].

Die Aufgabe der Matrix in der IAC ist die Ligandenbindung. Wichtige Matrixeigenschaften sind Stabilität über weite Bereiche des pH-Werts, der Ionenstärke und gegenüber denaturierenden Substanzen. Selektive Bindung, hohe Durchlässigkeit und Porosität ermöglichen den Analytmolekülen auch bei geringer Affinität eine Bindung mit ihren Liganden einzugehen.

Neben Agarose-Gel, der meistverwendeten Matrix in der IAC, eignen sich auch Polyacrylamid-Gel und Glasperlen.

Bei der IAC werden Liganden in Form von Antikörpern in der Matrix kovalent gebunden, so genannte Spacer helfen, Bindungsproblemen aufgrund sterischer Hinderung auszuschalten. Wird nun ein Extrakt mit einem aufzureinigendem Analyten auf eine IAC-Säule aufgetragen, so binden die Antigene aus dem Probenextrakt spezifisch an die Antikörper in der Gelmatrix und bilden Antigen-Antikörper-Komplexe, während andere Bestandteile die Säule ungehindert passieren. Nach einem Waschschrift wird die Bindung zwischen Antigen und Antikörper mit einem geeigneten Elutionsmittel zerstört und das Antigen eluiert [COOPER, 1981]. Das Prinzip der Affinitätschromatographie ist in Abb. 21 veranschaulicht.

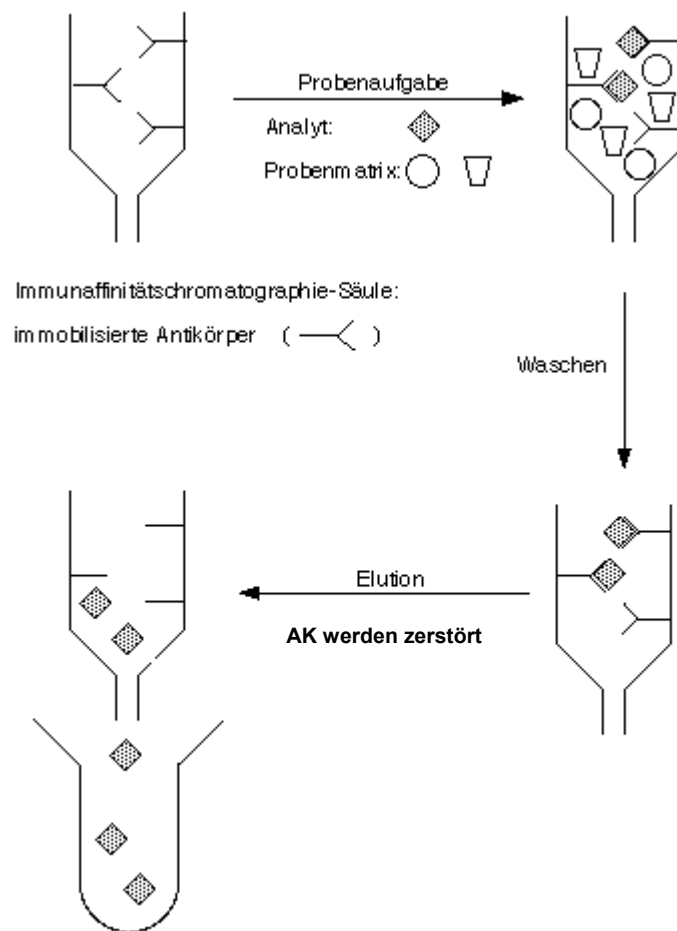


Abbildung 21: Prinzip der Immunaффinitätschromatographie
(mod. nach [<http://www.pdeleuw.de/diss/analytik.html>, 1997])

6. Material und Methoden

6.1. Reagenzien und Referenzproben

- Acetonitril; HPLC gradient grade (Fisher Scientific; Pittsburgh, USA)
- Aflatoxin Mix Kit-M: Lot. LB49762, Bestell.-Nr. 46304-U (Supelco; Taufkirchen, Deutschland)
- H₂O bidestilliert (UPW-Anlage)
- Kaliumbromid (Merck; Darmstadt, Deutschland)
- Methanol; HPLC gradient grade (Fisher Scientific; Pittsburgh, USA)
- PBS (Fluka; Buchs, Schweiz)
- Salpetersäure (Fisher Scientific; Pittsburgh, USA)
- Skippy Erdnussbutter (Unilever; USA)
- Stickstoff verdichtet 5.0 (Linde; Stadl-Paura, Österreich)
- Toluol (Merck; Darmstadt, Deutschland)
- Zertifiziertes Referenzmaterial Mais für AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, Bestell.-Nr. T04105 (FAPAS®; Hamburg, Deutschland)

6.2. Sonstige Gegenstände

- Bechergläser (Merck; Darmstadt, Deutschland)
- Epruvetten (Merck; Darmstadt, Deutschland)
- Erlenmeyerkolben (Merck; Darmstadt, Deutschland)
- Faltenfilter: 595 ½; Ø 125 mm (Schleicher & Schuell; Dassel, Deutschland)
- Filterpapier: White GSWP, 0,22 µm, Ø 47 mm (Millipore; Billerica, USA)
- Glastrichter (Merck; Darmstadt, Deutschland)
- Immunaффinitätssäulchen: AFLA-CleanTM, Lot.-Nr. 122, Bestell.-Nr. 10514 (LCTech; Dorfen, Deutschland)
- Immunaффinitätssäulchen: AflaStarTM, Lot.-Nr. AF-121, Bestell.-Nr. COI-AC1000 (Romer Labs; Tulln, Österreich)

- Immunaффinitätssäulchen: EASI-EXTRACT® AFLATOXIN, Lot.-Nr. UE 330/10, Bestell.-Nr. RP71 (R-Biopharm Rhône LTD; Darmstadt, Deutschland)
- Spatel
- Spritze 10 ml
- Wägeschälchen

6.3. Geräte

6.3.1. HPLC-Apparatur

Pumpe:	Shimadzu Liquid Chromatograph LC-9A (Kyoto, Japan)
Autosampler:	Merck-Hitachi AS-2000 (Darmstadt, Deutschland)
Säule:	Bischoff Chromatography Lichrospher 100_RP 18E 5 µm (250 x 4 mm) (Leonberg, Deutschland)
Vorsäule:	Bischoff Chromatography Lichrospher 100_RP 18E 5 µm (20 x 4 mm) (Leonberg, Deutschland)
Säulenofen:	Column thermostat, Jetstream 2 Plus (Erkerode, Deutschland)
Elektroch. Zelle:	R-Biopharm, Rhône LTD; 100 µA (Darmstadt, Deutschland)
Detektor:	Waters 474 Scanning Fluoreszenzdetektor: Ex-W: 365 nm; Em-W: 440 nm (Milford, USA)
Auswertesystem:	Stratos®; Version 4.5; Polymer Laboratories (Shropshire, Großbritannien)

6.4. Sonstige Geräte

- Analysenwaage: Mettler Toledo AB 184-S-A
- Analysenwaage: Mettler Toledo PB 4002-S
- Filteranlage: FilterSys™ Mobile Phase Filtrationssystem
- Pipette Eppendorf: 0,5 – 10 µl

- Pipette Eppendorf: 1,000 – 5,000 µl
- Pipette Eppendorf: 100 – 1000 µl
- Pipette Eppendorf: 20 – 200 µl
- Pipette Eppendorf: 10 – 100 µl
- Magnetrührer: Labinco
- Mühle: Silva Life Like Multimixer (Küchenmixer)
- Spektralphotometer: Hitachi U-3000 (Tokyo, Japan)
- Vortex Mixer: IKA^R MS1

6.5. Methoden

6.5.1. Reisproben

Die 76 zu untersuchenden Reisproben unterschiedlicher Herkunft wurden in verschiedenen Geschäften in Wien und Umgebung gekauft. Neben handelsüblichen 0,5 und 1 kg Packungen, wurden auch größere Gebinde mit 2, 2,5 und 5 kg erworben. Zusätzlich wurden auch verarbeitete Reisprodukte wie Reiswaffeln in die Untersuchung miteinbezogen, wie aus Tabelle 9 ersichtlich ist. Bei der Auswahl der Proben wurde sowohl Reis aus konventionellem als auch aus biologischem Anbau berücksichtigt. Die Reiswaffeln stammen zur Gänze aus biologischer Produktion.

Anbaumethode		Reisprodukt					
		<i>Basmati-reis</i>	<i>Jasmin-reis</i>	<i>Lang-korn</i>	<i>Rund-korn</i>	<i>Voll-reis</i>	<i>Reis-waffeln</i>
Anzahl	Biologisch	9	4	6	4	9	5
	Konventionell	30	7	4	1	2	-
Gesamt		39	11	10	5	11	5

Tabelle 10: Sorte und Anzahl der verschiedenen analysierten Reisprodukte

6.5.2. Herkunftsländer der Reisproben

Wie aus Tabelle 10 ersichtlich, stammt ein Großteil der Reisproben aus Indien und besteht hauptsächlich aus Basmatireis. Jasminreis stammt fast zur Gänze aus Thailand. Die aus Italien stammenden Proben setzen sich aus Rundkorn- bzw. Risottoreis und Langkornreis zusammen. Weitere Herkunftsländer sind Pakistan, Spanien und Ägypten.

	Herkunftsland							
	<i>Thailand</i>	<i>Pakistan</i>	<i>EU</i>	<i>Indien</i>	<i>Spanien</i>	<i>Italien</i>	<i>Ägypten</i>	<i>Unbekannt</i>
Anzahl	11	3	1	37	1	18	1	4
Gesamt								76

Tabelle 11: Herkunftsländer der analysierten Reisproben

6.5.3. Probennahme

Bei größeren Gebinden wird 1 kg Reisprobe entnommen, wobei an mehreren verschiedenen Stellen 100 – 200 g entnommen werden. Vor dem Mahlprozess werden die Reisproben in einer Plastikwanne intensiv gemischt. Anschließend werden die Reisproben mit Hilfe eines Küchenmixers vermahlen und nochmals durchmischt. Gebinde von 0,5 bzw. 1 kg werden gänzlich vermahlen.

6.5.4. Extraktion

Jeweils 50 g Probe werden in 250 ml Gefäße mittels einer Analysenwaage eingewogen und mit 100 ml Extraktionslösung (Methanol/H₂O dest. 80:20) versetzt. Die Proben werden luftdicht verschlossen und mittels Magnetprüher 30 Minuten bei hoher Geschwindigkeit gemischt und anschließend über Faltenfilter in 100 ml Gefäße filtriert.

6.5.5. Clean-up

Das Extrakt wird noch einmal gründlich gemischt, danach ein Aliquot von 2 ml mit 14 ml PBS-Puffer (pH 7,2) versetzt, sodass die Methanolkonzentration höchstens 10% beträgt. Das verdünnte Extrakt wird mit einer Flussrate von 1 ml/min auf die Immunaффinitätssäulchen (LC-Tech AflaCLEAN™) aufgetragen. Anschließend erfolgt ein Waschschrift mit 20 ml PBS mit einer Flussrate von 5 ml/min. Die restliche in dem Säulchen verbliebene Flüssigkeit wird vorsichtig mittels Anlegen eines leichten Vakuums oder durch Durchblasen von Luft mit einer Spritze entfernt. Die Elution erfolgt mit insgesamt 1,5 ml Methanol, wobei man das Methanol vor der ersten Elution laut Herstellerangabe ca. 5 Min. auf die Gelmatrix einwirken lassen sollte. Um sicherzustellen, dass der monoklonale Antikörper bei der Elution vollständig denaturiert und die Aflatoxine freigesetzt werden, ist weiters eine dreimalige Rückspülung (Umkehrung der Flussrichtung mittels Spritze) durchzuführen. Für die Rückspülung den Stempel der Spritze behutsam heben und senken, während der Eluent durch die Säule läuft und in einer Glaseprovette aufgefangen wird. Nach der Elution wird das Säulchen mit 1,5 ml dest. Wasser gespült, sodass zum Schluss ein Volumen von 3 ml vorhanden ist. Die Probe wird gevortext und 100 µl in das HPLC System injiziert.

6.5.6. Quantifizierung mittels HPLC

Die RP-HPLC dient zur Quantifizierung der Aflatoxine. Je 100 µl Proben- oder Standardlösung werden mittels Autosampler eingespritzt. In der Säule erfolgt aufgrund von Wechselwirkungen die Auftrennung der einzelnen Komponenten. Die Analysezeit zur Bestimmung der Aflatoxine schwankt zwischen 14 und 16 Minuten, bedingt durch Ungenauigkeiten bei der Herstellung der mobilen Phase.

Zusammensetzung von 1l mobile Phase:620 ml/l H₂O

220 ml/l MeOH

160 ml/l ACN

119 mg/l KBr

350 µl/l 4M HNO₃HPLC-Bedingungen:

Flussrate: 1 ml/min

Säulentemperatur: 40°C

Stromstärke an der Elektrochemischen Zelle: 100 µA

Fluoreszenzdetektor: Ex-W: 365nm; Em-W: 440nm

Im Anschluss an die Trennung erfolgt eine Verstärkung des Signals durch die Reaktion an der Elektrochemischen Zelle und die anschließende Detektion mittels Fluoreszenzdetektor. Die Auswertung der Signale und deren Quantifizierung erfolgt mittels Stratos[®] Version 4.5.

6.5.7. Berechnung der Probenkonzentration

Um vom Probensignal, der Fläche unter der Kurve (Area), auf die tatsächliche Probenkonzentration in ng/g Reis zu kommen, muss unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors in die Geradengleichung $y = kx + d$ eingesetzt werden. Die Formel lautet wie folgt:

$$\text{ng/g Reis} = (\text{Area [mV]} - d) / k * 3 \text{ (Verdünnungsfaktor)}$$

6.5.8. Herstellung von Aflatoxinstandard-Stocklösungen

Die in kristalliner Form vorhandenen Aflatoxinstandards B₁, B₂, G₁, G₂ werden mit Löschpapier bedeckt bei 50°C eine Stunde lang getrocknet. Danach werden mit einer Präzisionswaage je 2,5 mg der Standards in jeweils einem 100 ml Kolben eingewogen und mit Toluol-Acetonitril Gemisch (9:1) zu einem Drittel

aufgefüllt und auf einem Schüttler geschüttelt, bis sich alle Kristalle lösen. Danach werden die Kolben bis zur 100 ml Markierung aufgefüllt. Die Konzentrationen der so erhaltenen Aflatoxin-Stocklösungen werden anschließend mittels Spektralphotometer photometrisch gemessen. Die Stocklösungen werden in vorher mit 2 molarer Schwefelsäurelösung gespülten braunen Fläschchen bei -20°C aufbewahrt [NESHEIM und STACK, 2001].

Für die Berechnung der Konzentration der Aflatoxinstandard-Lösungen wird das Lambert-Beer'sche Gesetz angewandt.

$$C = E / \epsilon \cdot d \cdot MG \cdot 1000$$

Der molare Extinktionskoeffizient wird bei Aflatoxinen bei 350 nm gemessen und unterscheidet sich je nach Lösungsmittel und Aflatoxin.

Für die in Toluol/Acetonitril (9:1) gelöste Aflatoxinstandards gelten folgende Werte:

AFB ₁ :	$\epsilon = 19300$	MG = 312,3 g/mol
AFB ₂ :	$\epsilon = 21000$	MG = 314,3 g/mol
AFG ₁ :	$\epsilon = 16400$	MG = 328,3 g/mol
AFG ₂ :	$\epsilon = 18300$	MG = 330,3 g/mol

[BIOPURE, 2004]

Die photometrische Konzentrationsbestimmung der in Toluol/Acetonitril (9:1) hergestellten Stocklösungen ergab folgende Werte:

AFB ₁ :	22,060 µg/ml
AFB ₂ :	24,987 µg/ml
AFG ₁ :	31,353 µg/ml
AFG ₂ :	30,388 µg/ml

6.5.9. Herstellung von Aflatoxin-Mixstandard-Lösungen

Um aus den verschiedenen konzentrierten Stocklösungen einen so genannten Mix-Standard herzustellen, der alle vier Aflatoxine in einer Konzentration von 1 µg/ml bzw. 1000 ng/ml enthält, wurden die dafür notwendigen Mengen der einzelnen Standards mit Hilfe der Formel $c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$ berechnet. Es ergaben sich folgende Werte:

AFB ₁ -Stocklösung:	217,4 µl
AFB ₂ -Stocklösung:	200,1 µl
AFG ₁ -Stocklösung:	159,5 µl
AFG ₂ -Stocklösung:	164,5 µl

Diese Volumina der oben angegebenen Aflatoxin-Stocklösungen wurden in einen 5 ml Kolben pipettiert und das Toluol/Acetonitril-Lösungsmittel mit Hilfe von Stickstoff abgedampft. Danach wurden die Aflatoxine in 5 ml Methanol wieder aufgenommen. Der so hergestellte Aflatoxin-Mixstandard wies nun eine Konzentration von 1000 ng/ml für alle vier Aflatoxine auf. Mit Hilfe von Messkolben wurden nach dem in Tab. 12 folgenden Pipettierschema weitere geringer konzentrierte Standards mit Methanol als Lösungsmittel hergestellt.

Standard	Verdünnung	Volumen Standard (µl)	Volumen MeOH (µl)	Endkonz. (ng/ml)
Standard 1		5000		1000
Standard 2	1:10	100 St. 1	900	100
Standard 3	1:2	500 St. 2	500	50
Standard 4	1:5	200 St. 2	800	20
Standard 5	1:2	500 St. 4	500	10
Standard 6	1:2	500 St. 5	500	5
Standard 7	1:2	500 St. 6	500	2,5
Standard 8	1:5	200 St. 4	800	2,0

Tabelle 12: Pipettierschema

Die nach obigem Pipettierschema hergestellten Mix-Standards wurden ebenfalls in vorher mit 2 molarer Schwefelsäurelösung gespülten braunen Fläschchen gefüllt, beschriftet und bei -20°C aufbewahrt.

Um die Wirksamkeit der Signalverstärkung von AFB₁ und AFG₁ durch Erhöhung der Fluoreszenz durch die elektrochemische Zelle zu überprüfen, wurde ein 100 ng/g Aflatoxin-Mixstandard einmal mit eingeschalteter und einmal mit abgeschalteter elektrochemischer Zelle gemessen.

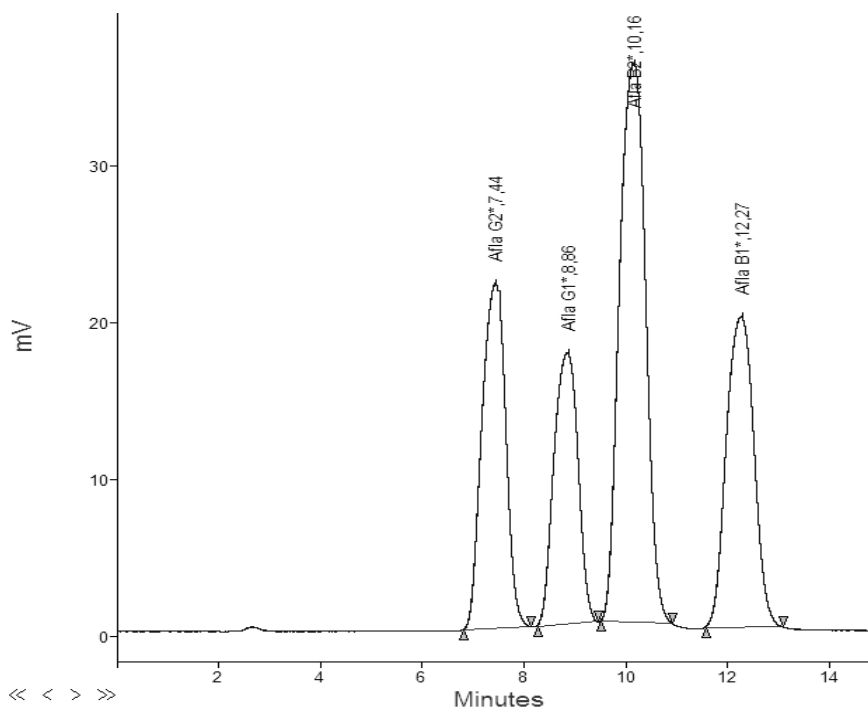


Abbildung 22: Chromatogramm einer 100 ng/g Aflatoxin-Mixstandard-Lösung mit Signalverstärkung durch eine elektrochemische Zelle (Kobra-Zelle)

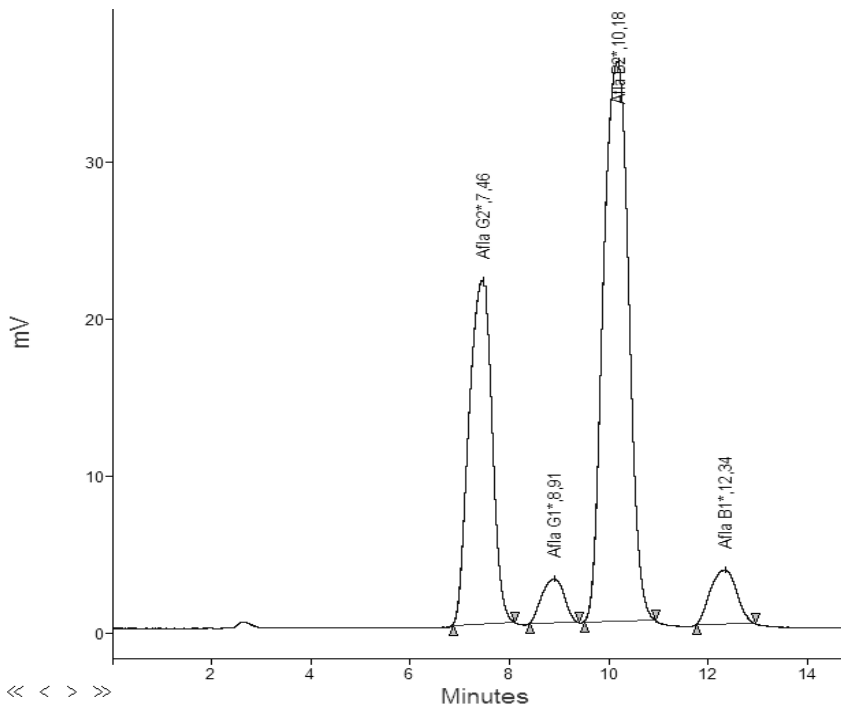


Abbildung 23: Chromatogramm einer 100 ng/g Aflatoxin-Mixstandard-Lösung ohne Signalverstärkung durch eine elektrochemische Zelle (Kobra-Zelle)

6.5.10. Herstellung der Standardlösungen (Supelco)

Aus Standard 1, einem zertifizierten Aflatoxin-Mixstandard (Supelco) der die Aflatoxine AFB₁, AFB₂, AFG₁ und AFG₂ enthält, werden durch Verdünnungsschritte weitere Standardlösungen hergestellt, die in Tab. 11 dargestellt sind. Der jeweilige Ausgangsstandard wird auf dem Vortex kurz gemischt, das nötige Volumen mittels Eppendorff-Pipette entnommen und in einen 1 ml Messkolben pipettiert. Der Messkolben wird anschließend mit der Verdünnungslösung aus destilliertem Wasser und Methanol (50:50) bis zur Ringmarke aufgefüllt. Anschließend wird der Standard am Vortex gründlich gemischt und schließlich in ein braunes Fläschchen gefüllt und bis zur Messung im Dunklen aufbewahrt.

Für die einzelnen Aflatoxinstandardlösungen ergeben sich nach erfolgter Verdünnung folgende Konzentrationen:

Standard	Verd.	Konzentration			
		AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
Standard 1	–	893 ng/ml	304 ng/ml	1046 ng/ml	334 ng/ml
Standard 2	1:10	89,3 ng/ml	30,4 ng/ml	104,6 ng/ml	33,4 ng/ml
Standard 3	1:5	17,9 ng/ml	6,1 ng/ml	20,9 ng/ml	6,7 ng/ml
Standard 4	1:5	3,6 ng/ml	1,2 ng/ml	4,2 ng/ml	1,3 ng/ml
Standard 5	1:2	1,8 ng/ml	0,6 ng/ml	2,1 ng/ml	0,7 ng/ml
Standard 6	1:2	0,9 ng/ml	0,3 ng/ml	1,1 ng/ml	0,3 ng/ml
Standard 7	1:2	0,5 ng/ml	0,2 ng/ml	0,5 ng/ml	0,2 ng/ml

Tabelle 13: Aflatoxinkonzentrationen der hergestellten Standards

6.5.11. Bestimmung der Wiederfindung

50 g Aflatoxin-freier Reis wird gemahlen, mit 100 ml MeOH/H₂O (80:20) dest. 30 Minuten lang extrahiert und anschließend filtriert. Zu 2 ml Reisextrakt werden 100 µl eines Aflatoxin-Mixstandards (AFB₁: 1,79 ng/ml, AFB₂: 0,61 ng/ml, AFG₁: 2,10 ng/ml, AFG₂: 0,67 ng/ml) hinzugefügt. Die Probe wird mit der IAC aufgearbeitet, in das HPLC-System injiziert und gemessen. Der Messwert wird anschließend mit einer Probe verglichen, die auf dieselbe Weise aufgearbeitet wird, der jedoch erst nachdem das Eluat aus der IAC gewaschen wurde, 100 µl Standard gleicher Konzentration zugespiked werden.

7. Ergebnisse und Diskussion

7.1. Entwicklung und Etablierung des Probenaufarbeitungs- verfahrens basierend auf der IAC

Bevor mit der Analyse der Reisproben begonnen werden konnte, musste zuerst eine geeignete Probenaufarbeitungsmethode etabliert werden.

7.1.1. Probenaufarbeitung

Die Aufarbeitung der Reisproben erfolgte anfangs nach der Probenextraktionsvorschrift des Immunaффinitätssäulen-Herstellers (LC-Tech).

50 g Probe wurden in 250 ml MeOH/H₂O dest. (80:20) aufgenommen und mit Hilfe eines Magnetkerns 30 Minuten auf einem Magnetrührer extrahiert. Das Extrakt wurde durch einen Faltenfilter filtriert. 5 ml des filtrierten Probenextrakts wurden mit 45 ml PBS Pufferlösung (pH 7,2) verdünnt und anschließend mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min auf die Immunaффinitätssäule aufgetragen. Danach wurde die Immunaффinitätssäule mit 10 ml H₂O dest. gespült, in der Säule verbleibendes Wasser wird vorsichtig durch Anlegen eines leichten Vakuums entfernt. Anschließend wurde in der Säule gebundenes Aflatoxin zwei Mal mit je 1 ml Methanol in eine Glaseprouvette eluiert, wobei das Methanol beim ersten Auftragen 5 Minuten auf die Gelmatrix der IAC einwirken sollte.

2 ml Methanol des Eluats wurden mit Stickstoff bei 40°C abgedampft, die an der Oberfläche der Epruvette zurückbleibenden Aflatoxine wurden in 1 ml mobiler Phase wieder aufgenommen und auf einem Vortexgerät sorgfältig gemischt. 100 µl davon wurden in das HPLC-System eingespritzt und gemessen [LC-Tech; 2007].

7.1.2. Erstmalige Bestimmung der Wiederfindung

Bevor erste Proben gemessen werden konnten, musste die Genauigkeit und Richtigkeit der angewandten Aufarbeitungsmethode überprüft werden. Dafür eignet sich besonders die Bestimmung der Wiederfindungsrate, durch die Verluste bei der Probenaufarbeitung erkennbar werden würden.

Für die erste Wiederfindungsmessung wurden von vorangegangenen Forschungsprojekten noch vorhandene Aflatoxinstandards (AFB₁: 50 ng/ml; AFB₂, AFG₁, AFG₂ jeweils 200 ng/ml) verwendet. Aus diesen wurde ein Aflatoxin-Mixstandard mit einer Konzentration von 40 ng/ml hergestellt. 1 ml dieses Mixstandards wurde mit Stickstoff abgedampft und mit 50 ml Reisextrakt verdünnt. Aus diesem Pool wurden 5 Mal je 5 ml entnommen, mit 45 ml PBS auf eine Endkonzentration von 4 ng/ml verdünnt, in einen Aufsatz, der als Reservoir diente, gefüllt und mit einer Flussrate von 1 ml/min auf die IAC-Säulen aufgetragen. 3 Mal je 5 ml Reisextrakt wurde ohne die Zugabe des Aflatoxin-Mixstandards mit 45 ml PBS verdünnt und ebenfalls auf IAC-Säulen aufgetragen. Nach einem Waschschrift und anschließender Elution wurden die Eluate mit Stickstoff abgedampft. Zu zwei jener drei Eluate, denen bisher kein Aflatoxin-Mixstandard zugesetzt wurde, wurde nun jeweils 1 ml des 1:10 verdünnten Aflatoxin-Mixstandards (4 ng/ml) hinzugefügt und ebenfalls abgedampft. Jene Probe, der kein Aflatoxinstandard zugesetzt wurde, diente als Blankprobe. Alle 8 abgedampften Proben werden in 1 ml mobiler Phase aufgenommen, am Vortex gemischt und jeweils 100 µl in das HPLC-System eingespritzt. Die vor dem Auftragen auf die IAC gespickten Proben wurden dann mit jenen nach Auftragen auf die IAC verglichen, davon ausgehend, dass die Konzentrationen der nachher gespickten Proben 100 % war.

Probe	Wiederfindung			
	<i>AFB₁</i>	<i>AFB₂</i>	<i>AFG₁</i>	<i>AFG₂</i>
Konz.	4 ng/ml bzw. 4 ng/g Reis	4 ng/ml bzw. 4 ng/g Reis	4 ng/ml bzw. 4 ng/g Reis	4 ng/ml bzw. 4 ng/g Reis
Vor IAC gespik				
V 1	95,5 %	94,7 %	84,2 %	70,6 %
V 2	78,6 %	78,8 %	64,5 %	54,3 %
V 3	28,3 %	30,3 %	48,9 %	37,8 %
V 4	50,2 %	56,2 %	43,2 %	40,6 %
V 5	76,5 %	80,3 %	70,9 %	60,1 %
Nach IAC gespik				
Kontrolle	100 %	100 %	100 %	100 %
Blankprobe	0 %	0 %	0 %	0 %

Tabelle 14: Messung der Wiederfindungsrate mit 4 ng/ml Aflatoxin-Mixstandard

Die in Tab. 14 dargestellten Ergebnisse der ersten Bestimmung der Wiederfindungsrate erwiesen sich als höchst unterschiedlich und insgesamt zu niedrig. Gründe dafür könnten Fehler in der Aufarbeitung aufgrund der noch mangelnden Laborpraxis sein, die Verwendung alter Standards oder nicht optimale Clean-up-Methoden. Um Fehlerquellen schrittweise auszuschalten, wurden zuerst neue Aflatoxin-Standards hergestellt.

7.1.3. Wiederholung der Bestimmung der Wiederfindungsrate

Eine Reisprobe, die keine Aflatoxine enthielt, wurde auf die bereits in 7.1.2 beschriebene Weise aufgearbeitet. 5 Aliquote von 5 ml Reisextrakt wurden direkt mit jeweils 100 µl 20 ng/ml Aflatoxin-Mixstandard gespikt und wie 3 weitere unbehandelte Proben, eine davon als Blankprobe, mit 45 ml PBS verdünnt und auf die IAC aufgetragen. Nach der Elution wurde die beiden unbehandelten Proben ebenfalls mit 100 µl 20 ng/ml Aflatoxin-Mixstandard gespikt, sodass eine Endkonzentration von 4 ng/g Reis erreicht wurde. Alle Proben wurden mit Stickstoff abgedampft, in 0,5 ml mobiler Phase aufgenommen, am Vortex gemischt und jeweils 100 µl in das HPLC-System eingespritzt.

Auch bei diesem Versuch erwies sich die Wiederfindungsrate als zu niedrig. Auffallend sind vor allem die besonders niedrigen Wiederfindungsraten von AFB₁ und AFB₂ von weit unter 50 %, wie aus Tab. 15 zu entnehmen ist.

Probe	Wiederfindung			
	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
Vor IAC gespiked				
V 1	33,4 %	36,7 %	58,7 %	49,5 %
V 2	41,9 %	43,2 %	84,3 %	72,1 %
V 3	75,6 %	74,8 %	90,3 %	74,8 %
V 4	42,8 %	44,6 %	94,7 %	78,2 %
V 5	41,5 %	43,1 %	90,5 %	79,1 %
Nach IAC gespiked				
Kontrolle	100 %	100 %	100 %	100 %
Blankprobe	0 %	0 %	0 %	0 %

Tabelle 15: Wiederfindungsraten mit 2 ng/ml Aflatoxin-Mixstandard

7.1.4. Elution der Proben mit verdoppeltem Methanolvolumen

Die Wiederfindung wurde ein weiteres Mal wiederholt, wobei je 2 Proben vor und je 2 Proben nach dem Auftragen auf die IAC mit einer Endkonzentration von 2 ng/ml Aflatoxin-Mixstandard gespiked wurden. Eine Blankprobe wurde ebenfalls gemessen. Die Elution der Aflatoxine aus den IAC-Säulen erfolgte bei diesem Versuch mit 3 ml Methanol. Die Proben wurden in Doppelbestimmung in die HPLC-Anlage injiziert.

Für die Wiederfindung ergaben sich, wie aus Tab. 16 ersichtlich, extrem niedrige Werte. Da die Messwerte der nach der Elution gespikten Proben mit denen eines ebenfalls gemessenen reinen 2 ng/ml Aflatoxin-Mix-Standards übereinstimmten, wird der Fehler beim Clean-up mit den IAC-Säulen vermutet.

Probe	Wiederfindung			
	<i>AFB₁</i>	<i>AFB₂</i>	<i>AFG₁</i>	<i>AFG₂</i>
Vor IAC gespiked				
V 1	15,3 %	20,5 %	13,7 %	13,7 %
V 2	32,7 %	40,5 %	33,0 %	27,7 %
Nach IAC gespiked				
Kontrolle	100 %	100 %	100 %	100 %
Blankprobe	0 %	0 %	0 %	0 %

Tabelle 16: Bestimmung der Wiederfindungsrate mit einem 2 ng/ml Aflatoxin-Mix-Standard

7.1.5. Vergleich der Wiederfindungsraten zweier verschiedener Hersteller

Die Bestimmung der Wiederfindung wurde ein weiteres Mal wiederholt. Es wurden 2 Reisextrakt-Proben mit einer Endkonzentration von jeweils 2 ng/ml Aflatoxin-Mixstandard gespiked und anschließend mit PBS verdünnt und auf die IAC-Säulen aufgebracht. Der Waschschrift wurde diesmal mit 10 ml PBS-Tween und anschließend 10 ml H₂O dest. durchgeführt. Alle weiteren Schritte wurden, wie in 7.1.2 beschrieben, durchgeführt.

Um einen Produktionsfehler der LC-Tech Immunaффinitätssäulen auszuschließen, wurde die Analyse auch mit IAC-Säulen der Firma Romer Labs® nach der Anleitung von Romer Labs durchgeführt [ROMER LABS, 2004].

Durchführung:

50 g gemahlener Reis wurde mit 200 ml MeOH/H₂O (60:40) mit einem Magneten 30 Minuten auf einem Magnetrührer extrahiert und anschließend filtriert. 2 x 4 ml Extrakt (1 g Probe) wurden jeweils mit 100 µl 20 ng/ml Aflatoxin-Mixstandard gespiked, mit 12 ml PBS verdünnt und auf die IAC-Säulen aufgetragen. Gewaschen wurde 2 x mit 10 ml H₂O dest., die Elution erfolgte mit 2 x 1,5 ml Methanol. Eine dritte Probe wurde erst nach der Elution ebenfalls mit 100 µl 20 ng/ml Standard gespiked [ROMER LABS, 2004].

Probe	Wiederfindung			
	<i>AFB₁</i>	<i>AFB₂</i>	<i>AFG₁</i>	<i>AFG₂</i>
Vor IAC gespiked				
<i>V 1 (LC-Tech)</i>	36,4 %	42,5 %	47,6 %	39,4 %
<i>V 2 (LC-Tech)</i>	49,4 %	60,4 %	36,7 %	34,4 %
<i>V 1 (Romer Labs)</i>	23,2 %	27,6 %	27,8 %	25,4 %
<i>V 2 (Romer Labs)</i>	58,5 %	65,4 %	22,6 %	21,5 %
Nach IAC gespiked				
<i>Kontrolle</i>	100 %	100 %	100 %	100 %
<i>Blankprobe</i>	0 %	0 %	0 %	0 %

Tabelle 17: Mit IAC-Säulen zweier verschiedener Hersteller erzielte Wiederfindungsraten

Die in Tab. 17 angeführten Ergebnisse zeigen, dass weder die mit IAC-Säulen von LC-Tech aufgearbeiteten Proben, noch jene mit IAC-Säulen von Romer Labs aufgearbeiteten Proben akzeptable Wiederfindungsraten aufwiesen. Damit konnten fehlerhafte IAC-Säulen ausgeschlossen werden und ein Fehler bei der Probenaufarbeitung mit den IAC-Säulen wurde immer wahrscheinlicher.

7.1.6. Versuche mit alternativen Lösungsmitteln

Da mit IAC-Säulchen der Firma Romer Labs keine Verbesserung der Wiederfindungsraten erreicht werden konnte, wurde die Bestimmung der Wiederfindungsrate mit IAC-Säulen von LC-Tech erneut wiederholt. Das Reisextrakt wurde nun mit verschiedenen Lösungsmitteln verdünnt.

2 Proben wurden wie in 7.1.2 beschrieben mit 45 ml PBS verdünnt, 2 Proben wurden mit 45 ml PBS-Tween verdünnt und bei einer Probe wurde anstatt des Reisextrakts 2 ml MeOH/H₂O (80:20) verwendet, die mit 45 ml PBS verdünnt wurden. Alle Proben wurden mit einem Aflatoxin-Mixstandard mit einer Konzentration von 2 ng/ml gespiked. Zusätzlich wurde wieder eine Blankprobe gemessen.

Auch die in Tab. 18 ersichtlichen Versuche mit PBS-Tween brachten keine Verbesserung der Wiederfindungsrate. Die beiden mit PBS verdünnten Proben wiesen Wiederfindungsraten von 22,4 bis 68,4% auf. Bei jener Probe, bei der anstatt des Reisextrakts 2 ml MeOH/H₂O (80:20) verwendet wurden, zeigten sich für AFB₁ und AFB₂ besonders niedrige Wiederfindungsraten von 9 bzw.

11,1% und für AFG₁ und AFG₂ 37,9 bzw. 32,1%. Die beiden mit PBS-Tween verdünnten Proben ergaben ebenfalls niedrigere Werte, als jene mit PBS verdünnten Proben. Das bedeutete, dass die Verwendung von PBS als Extraktionsmittel nicht der Grund für die niedrigen Wiederfindungsraten sein konnte.

Probe	Wiederfindung			
	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
Vor IAC gespiked				
<i>V 1 (PBS)</i>	22,4 %	32,2 %	50,0 %	50,8 %
<i>V 2 (PBS)</i>	26,1 %	36,6 %	62,6 %	68,4 %
<i>V 3 (ohne Reis-Extrakt + PBS)</i>	9,0 %	11,1 %	37,9 %	32,1 %
<i>V 4 (PBS-Tween)</i>	16,7 %	18,0 %	44,2 %	28,0 %
<i>V 5 (PBS-Tween)</i>	16,4 %	19,5 %	53,7 %	46,2 %
Nach IAC gespiked				
<i>Kontrolle</i>	100 %	100 %	100 %	100 %
<i>Blankprobe</i>	0 %	0 %	0 %	0 %

Tabelle 18: Bestimmung der Wiederfindung unter Verwendung verschiedener Lösungsmittel

7.1.7. Änderung der Probenvorbereitung mit der IAC

Da sämtliche vorgenommenen Versuche bei der Probenvorbereitung und auch eine Anfrage bei LC-Tech, dem Hersteller der IAC-Säulen, zu keiner Verbesserung der Wiederfindungsraten führten, wurden IAC-Säulen der Firma R-Biopharm herangezogen. Die Proben wurden nach der Anleitung von R-Biopharm [R-BIOPHARM, 2007] aufgearbeitet, die sich in einigen Punkten von der bisher angewandten Methode unterschied.

Durchführung:

50 g Probe werden mit 100 ml MeOH/H₂O dest. (80:20) 30 Minuten auf einem Magnetrührer extrahiert und anschließend filtriert. 2 ml des Filtrats werden mit 14 ml PBS verdünnt und mit einer Flussrate von 5 ml/min auf die IAC aufgetragen. Danach wird die Säule mit 20 ml PBS gespült und durch Pressen von Luft getrocknet.

Für die Elution werden 1,5 ml Methanol auf die Säule aufgebracht. Nach kurzer Einwirkzeit der Aflatoxine wird mit einer Flussrate von einem Tropfen pro Se-

kunde eluiert. Um eine vollständige Denaturierung des monoklonalen Antikörpers und damit die Loslösung des Aflatoxins von der Säulenmatrix zu erreichen, sollte während der Elution eine dreimalige Rückspülung (Umkehr der Flussrichtung) mit Hilfe einer Spritze vorgenommen werden. Zur vollständigen Entfernung des Eluats aus der Säule wird Luft hindurchgedrückt. Anschließend werden 1,5 ml H₂O dest. durch die Säule geschickt, sodass das Endvolumen, in dem die Aflatoxine gelöst sind, 3 ml beträgt. Es erfolgt kein weiterer Konzentrationsschritt, 100 µl dieser Probenlösung werden in das HPLC-System eingespritzt und gemessen [R-Biopharm, 2007].

Gespiked wurde nicht mit dem selbst hergestellten Aflatoxin-Mixstandard, sondern mit 100 µl eines zuerst 1:10 und danach 1:5 verdünnten Aflatoxin-Mixstandard von Supelco mit den in Tabelle 19 angegebenen Konzentrationen.

	Konzentration (ng/ml)		
Aflatoxin	Standard 1	Standard 2 (Standard 1 1:10 verdünnt)	Standard 3 (Standard 2 1:5 verdünnt)
AFB₁	893 ng/ml	89,3 ng/ml	17,86 ng/ml
AFB₂	304 ng/ml	30,4 ng/ml	6,08 ng/ml
AFG₁	1046 ng/ml	104,6 ng/ml	20,92 ng/ml
AFG₂	334 ng/ml	33,4 ng/ml	6,68 ng/ml

Tabelle 19: Konzentrationen von Aflatoxin-Mixstandards (Supelco)

Die Wiederfindung wurde sowohl mit den bisher verwendeten IAC-Säulen von LC-Tech, als auch mit jenen von R-Biopharm nach dem neuen Aufarbeitungsprozedere durchgeführt:

- 1 x LC-Tech vor der Säule gespiked
- 1 x LC-Tech nach der Säule gespiked
- 1 x R-Biopharm vor der Säule gespiked
- 1 x R-Biopharm nach der Säule gespiked
- 1 x Blankprobe

Probe	Wiederfindung			
	<i>AFB₁</i>	<i>AFB₂</i>	<i>AFG₁</i>	<i>AFG₂</i>
Vor IAC gespiked				
<i>V 1 (LC-Tech)</i>	89,7 %	95,4 %	103,7 %	98,0 %
<i>V 2 (R-Biopharm)</i>	89,8 %	92,4 %	82,5 %	98,1 %
Nach IAC gespiked				
<i>Kontrolle (LC-Tech)</i>	100 %	100 %	100 %	100 %
<i>Kontrolle (R-Biopharm)</i>	100 %	100 %	100 %	100 %
Blankprobe	0 %	0 %	0 %	0 %

Tabelle 20: Wiederfindungsraten für nach Vorschrift von R-Biopharm aufgearbeitete Proben

Die Wiederfindungsrate konnte, wie in Tab. 20 ersichtlich, mit der Probenaufbereitung nach R-Biopharm erheblich verbessert werden. Nach Aufarbeitung der Proben durch IAC-Säulen beider Hersteller und anschließender Messung wurden annähernd gleiche Wiederfindungsraten festgestellt, lediglich die Werte für *AFG₁* lagen 20% auseinander. Für IAC-Säulen von LC-Tech konnten 89,7%, 95,4%, 103,7% und 98,0% für *AFB₁*, *AFB₂*, *AFG₁*, *AFG₂*, mit IAC-Säulen von R-Biopharm konnten Werte von 89,8%, 92,4%, 82,5% und 98,1% erreicht werden. Die in den vorangegangenen Messungen erzielten niedrigen Wiederfindungsraten, könnten durch den fehlenden Schritt der Rückspülung bei der Elution der Proben bedingt gewesen sein.

7.1.8. Bestätigung der erzielten Messwerte

Um die Messwerte zu bestätigen und die Richtigkeit zu überprüfen, wurde die Wiederfindung erneut bestimmt. Es wurde auch überprüft, ob Menge und Verdünnung des Extrakts Einfluss auf die Wiederfindungsrate haben. Gespiked

wurde jeweils mit 100 µl des Supelco Aflatoxin-Mixstandards mit den Konzentrationen AFB₁: 17,86 ng/ml, AFB₂: 6,08 ng/ml, AFG₁: 20,92 ng/ml und AFG₂: 6,68 ng/ml.

5 x vor der Säule gespiked (2 ml Reisextrakt + 14 ml PBS)

2 x nach der Säule gespiked (2 ml Reisextrakt + 14 ml PBS)

2 x vor der Säule gespiked (5 ml Reisextrakt + 45 ml PBS)

1 x nach der Säule gespiked (5 ml Reisextrakt + 45 ml PBS)

1 x Blankprobe

Probe	Wiederfindung			
	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
Vor IAC gespiked (2 + 14 ml)				
V 1	94,2 %	100,4 %	100,8 %	91,7 %
V 2	95,4 %	102,3 %	101,3 %	102,2 %
V 3	100,5 %	104,5 %	103,5 %	99,9 %
V 4	101,7 %	103,7 %	101,3 %	101,0 %
V 5	96,5 %	99,9 %	92,6 %	98,7 %
Vor IAC gespiked (5 + 45 ml)				
V 1	76,5 %	93,3 %	88,8 %	88,4 %
V 2	76,1 %	97,4 %	94,2 %	94,5 %
Nach IAC gespiked				
Kontrolle	100 %	100 %	100 %	100 %
Blankprobe	0 %	0 %	0 %	0 %

Tabelle 21: Bestimmung der Wiederfindung mit zertifiziertem Aflatoxin-Mixstandard

Die hohen Wiederfindungsraten des vorangegangenen Versuchs konnten bestätigt und sogar noch verbessert werden. Wie anhand der in Tab. 21 dargestellten Messwerte ersichtlich, zeigten sich bei der Verwendung von 2 ml Reisextrakt verdünnt mit 14 ml PBS höhere Wiederfindungsraten, als bei der Verwendung von 5 ml Reisextrakt verdünnt mit 45 ml PBS. Besonders deutlich zeigte sich der Unterschied bei AFB₁. Bei 5 ml Reisextrakt verdünnt mit 45 ml PBS war die Wiederfindungsrate mit 76,5% bzw. 76,1% deutlich niedriger, als jene mit 2 ml Reisextrakt verdünnt mit 14 ml PBS mit Wiederfindungsraten von 94,2% bis 101,7%.

7.2. Kalibration mittels Standardgerade

Zur Ermittlung der tatsächlichen Probenkonzentration wurde täglich eine Kalibrationsgerade erstellt.

Als Stocklösung diente ein zertifizierter Aflatoxin-Mixstandard mit folgenden Konzentrationen:

AFB₁: 893 ng/ml

AFB₂: 304 ng/ml

AFG₁: 1046 ng/ml

AFG₂: 334 ng/ml

Da die Einzelwerte der Kalibrationsgerade für möglichst exakte Messungen im Bereich der Probenwerte liegen sollten, wurde eine Vier-Punkt-Kalibration mit den Standards 4 bis 7 aus Tab. 12 verwendet. Für jedes Aflatoxin wurde eine Standardgerade erstellt.

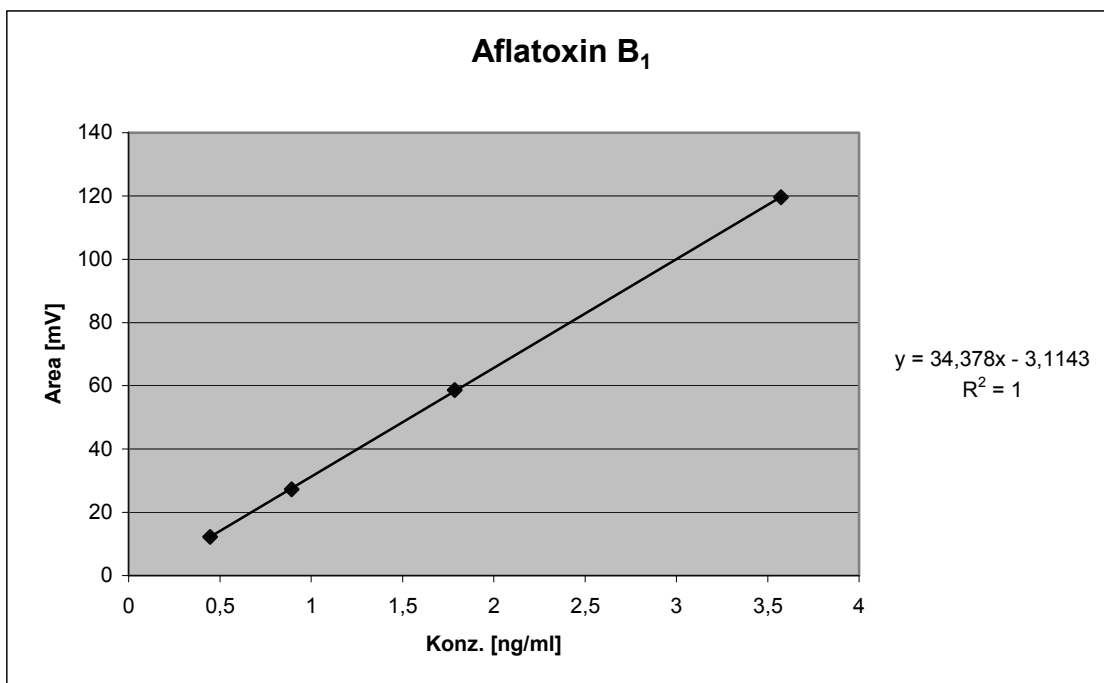


Abbildung 24: Kalibrationsgerade für AFB₁

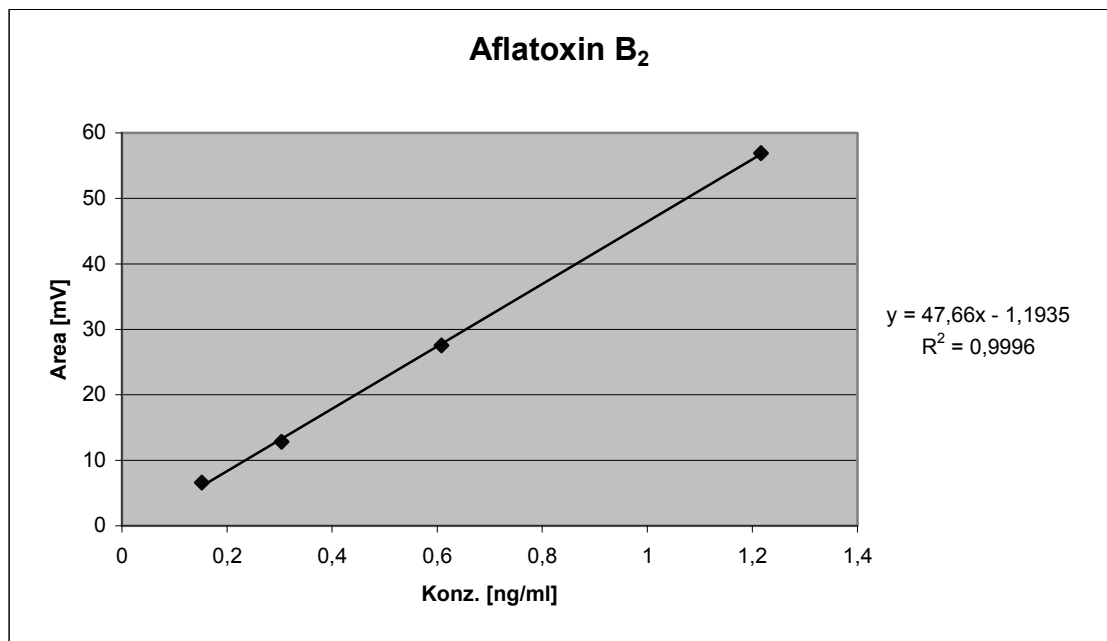


Abbildung 25: Kalibrationsgerade für AFB₂

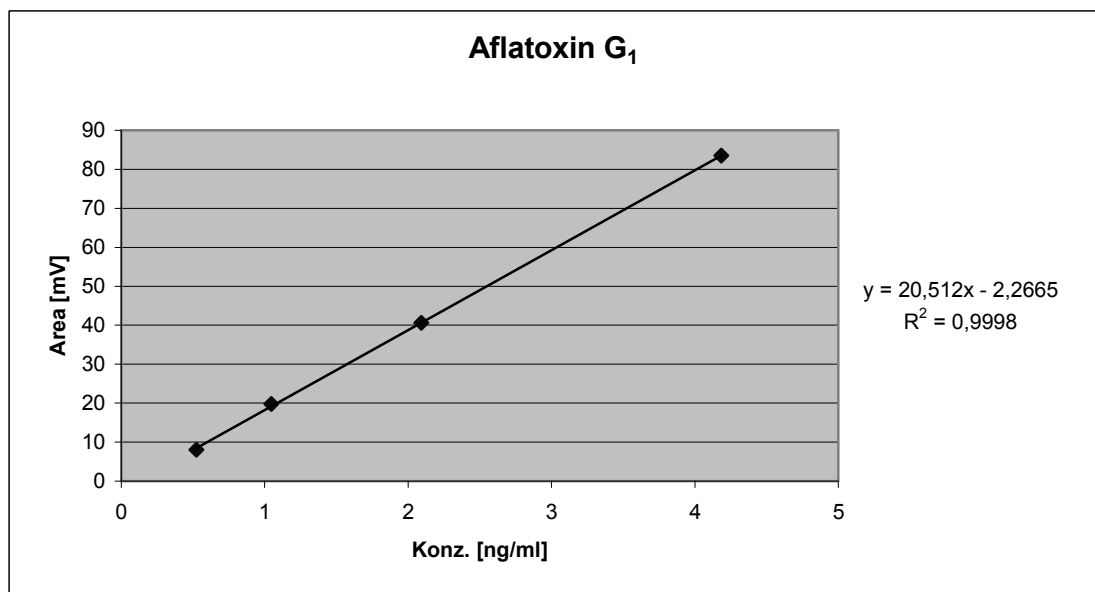


Abbildung 26: Kalibrationsgerade für AFG₁

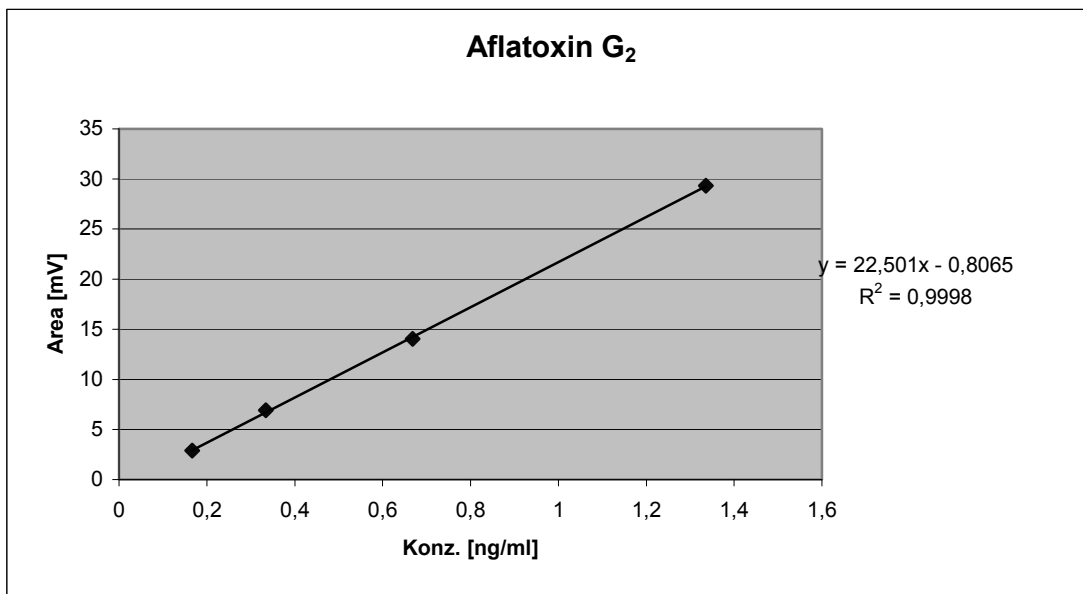


Abbildung 27: Kalibrationsgerade für AFG₂

7.3. Bestimmung der Nachweis- und Quantifizierungsgrenze

Die Nachweisgrenze (NG) bezeichnet jenen Wert einer Messung, bei der ein Probensignal gerade noch vom Rauschen der Basislinie unterscheidbar ist. Ein vereinfachter Wert für die Nachweisgrenze ist ein Signal/Rausch-Verhältnis (S/R) von 3:1. Dazu bestimmt man einerseits die Peakhöhe der Probe und andererseits die Höhe der Rauschzacken der Basislinie.

Die Quantifizierungsgrenze (QG) gibt die kleinste Konzentration eines Analyten an, die quantitativ mit ausreichender statistischer Sicherheit (99,9%) bestimmt werden kann. Dafür ist vereinfacht ein Signal/Rausch-Verhältnis von 10:1 notwendig.

Um die Nachweis- bzw. Quantifizierungsgrenze zu bestimmen, wurde eine negativ auf Aflatoxine getestete Reisprobe (E080166) nach der Probenvorbereitungsvorschrift aufgearbeitet und 2 ml Extrakt auf die IAC aufgetragen und anschließend mit 1,5 ml MeOH und 1,5 ml H₂O dest. eluiert. Daraufhin wurde aus

einem zertifizierten Standard (AFB_1 : 1,8 ng/ml; AFB_2 : 0,6 ng/ml; AFG_1 : 2,1 ng/ml; AFG_2 : 0,7 ng/ml) eine Verdünnungsreihe erstellt. Wie aus Tab. 22 ersichtlich, wurde zur Herstellung der Standards 1 bis 4 die jeweilige Menge des Ausgangsstandards in eine Epprovette pipettiert und mit Eluat auf ein Endvolumen von jeweils 500 μ l aufgefüllt.

Standard NG/QG	Menge Standard	Menge Eluat	Endvolumen Verdünnung	Konzentration (ng/ml)			
				AFB_1	AFB_2	AFG_1	AFG_2
<i>Standard 1</i>	83,2 μ l	416,8 μ l	500 μ l	0,89	0,30	1,05	0,33
<i>Standard 2</i>	41,6 μ l	458,4 μ l	500 μ l	0,45	0,15	0,52	0,18
<i>Standard 3</i>	20,8 μ l	479,2 μ l	500 μ l	0,22	0,08	0,26	0,08
<i>Standard 4</i>	12,5 μ l	487,5 μ l	500 μ l	0,11	0,04	0,13	0,04

Tabelle 22: Standards für die Bestimmung der Nachweis- und Quantifizierungsgrenze

Von den so hergestellten Aflatoxinlösungen wurden jeweils 100 μ l in die HPLC injiziert. Für die Auswertung der Nachweisgrenze und der Quantifizierungsgrenze wurden die Chromatogramme (Abb. 27 – 30) der einzelnen Messungen vergrößert, ausgedruckt und händisch ausgemessen.

Für die Nachweisgrenzen und die Quantifizierungsgrenzen ergaben sich folgende Werte:

	Nachweisgrenze (ng/g)		Quantifizierungsgrenze (ng/g)	
	<i>S/N</i>	<i>Konzentration</i>	<i>S/N</i>	<i>Konzentration</i>
Aflatoxin				
AFB_1	3,6:1	0,11	9:1	0,45
AFB_2	3:1	0,08	9:1	0,50
AFG_1	3:1	0,13	7:1	0,52
AFG_2	3:1	0,16	8:1	0,60

Tabelle 23: Nachweisgrenze bzw. Quantifizierungsgrenze von Aflatoxinen in Reis

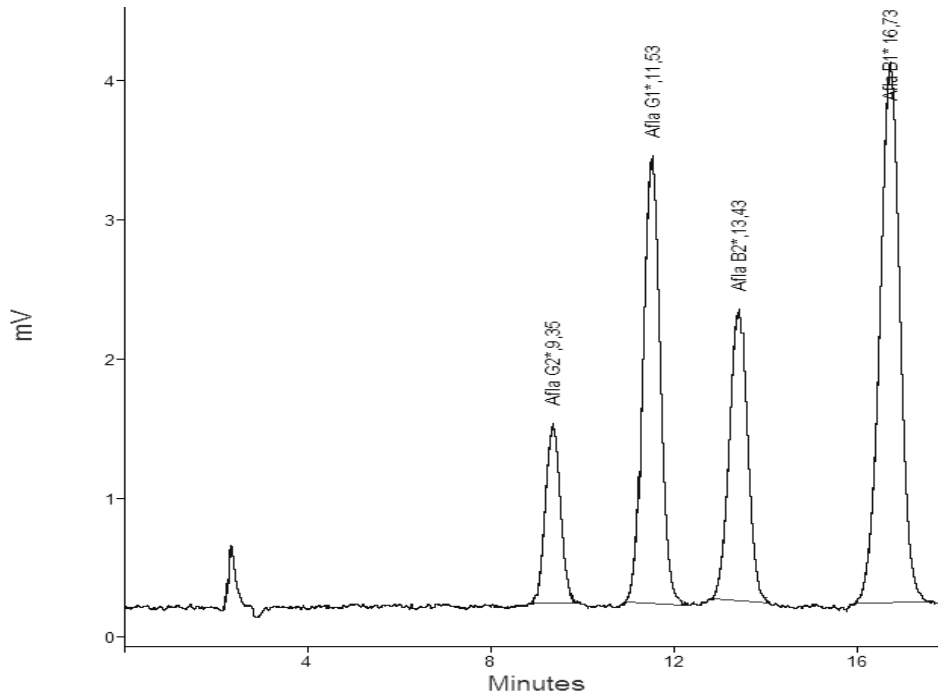


Abbildung 28: Chromatogramm Standard 1 mit folgenden Konzentrationen: AFG₂: 0,32 ng/g (S/R: 5:1), AFG₁: 1,02 ng/g (S/R: 13:1), AFB₂: 0,29 ng/g (S/R: 10:1), AFB₁: 0,90 ng/g (S/R: 19:1)

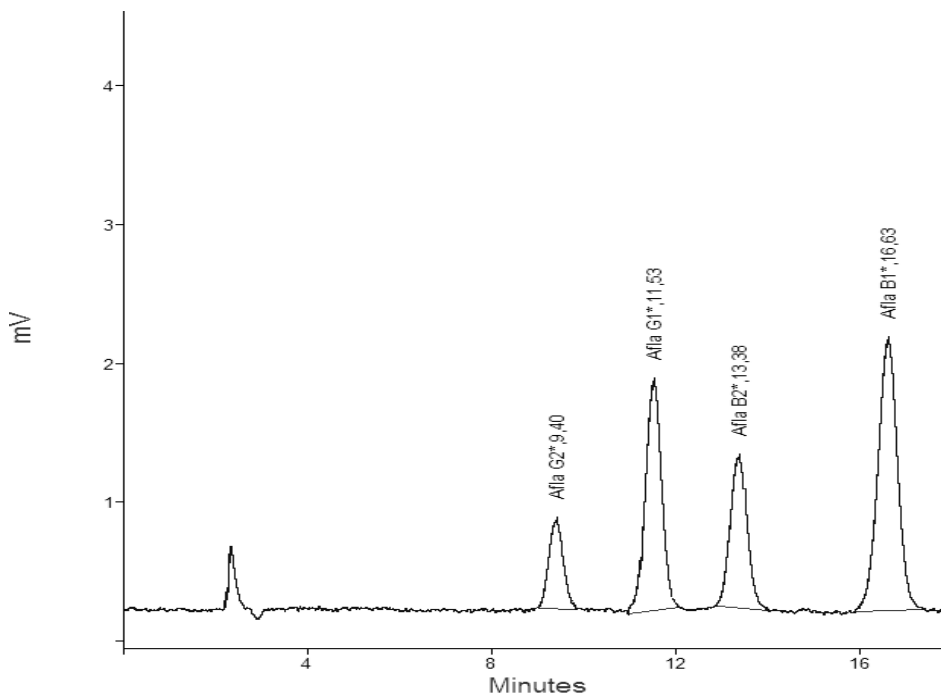


Abbildung 29: Chromatogramm Standard 2 mit folgenden Konzentrationen: AFG₂: 0,16 ng/g (S/R: 1:3), AFG₁: 0,52 ng/g (S/R: 7:1), AFB₂: 0,15 ng/g (S/R: 5:1), AFB₁: 0,45 ng/g (S/R: 9:1)

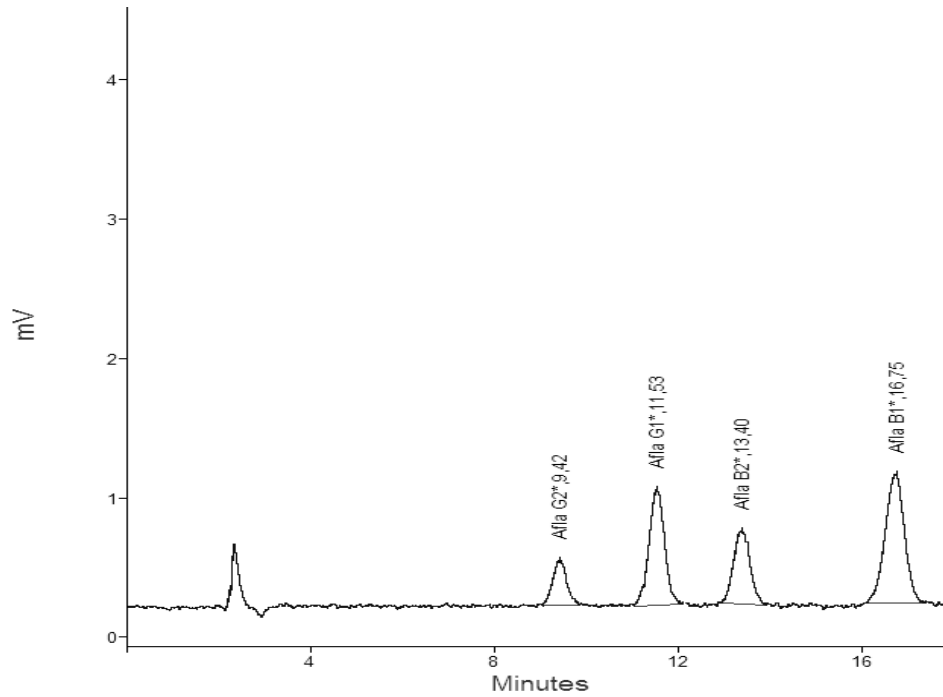


Abbildung 30: Chromatogramm Standard 3 mit folgenden Konzentrationen: AFG₂: 0,08 ng/g (S/R: 2:1), AFG₁: 0,26 ng/g (S/R: 4,6:1), AFB₂: 0,08 ng/g (S/R: 3:1), AFB₁: 0,22 ng/g (S/R: 5,7:1)

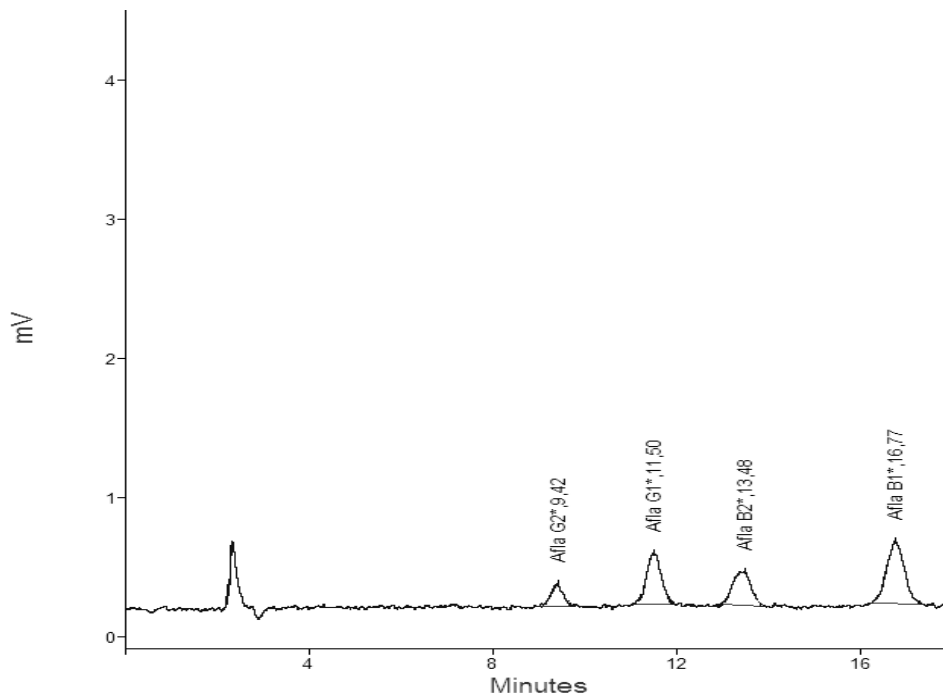


Abbildung 31: Chromatogramm Standard 4 mit folgenden Konzentrationen: AFG₂: 0,04 ng/g (S/R: 1,6:1), AFG₁: 0,13 ng/g (S/R: 1:3), AFB₂: 0,04 ng/g (S/R: 1,8:1), AFB₁: 0,11 ng/g (S/R: 3,6:1)

7.4. Analyse der Reis- und Reiswaffelproben

Nach Optimierung der Probenvorbereitung mittels IAC und Validierung der gesamten Methode, wurden die 76 Reisproben und 5 Reiswaffeln mit der neuen Methode aufgearbeitet und mit Hilfe der HPLC analysiert. Zur Quantifizierung der Proben wurden jeweils jeden Tag Kalibrationsgeraden erstellt.

Von den insgesamt 81 analysierten Proben, deren Messergebnisse in Tabelle 24 nach einzelnen Reissorten aufgelistet sind, waren 15 (18,5%) mit Aflatoxinen belastet. Bei weiteren 9 (11%) wurden geringe nicht verifizierbare Konzentrationen festgestellt, die zwar über der Nachweisgrenze, nicht aber über der Quantifizierungsgrenze lagen (siehe Tab. 25).

Von 39 Basmatireis-Proben waren 22 (56%) mit AFB₁ bzw. mit AFB₁ und AFB₂ belastet, von 10 Langkornreis-Proben waren 2 (20%) positiv. Bei allen positiv getesteten Proben handelte es sich um polierten Reis. Bei poliertem Hom Mali und poliertem Rundkornreis sowie bei Vollreis und Reiswaffeln konnte keine Aflatoxinkontamination nachgewiesen werden.

Auffallend war, dass es sich bei 22 der 24 positiven Proben um Basmatireis handelte. Der Grund, warum vor allem Basmatireis von einer Kontamination durch Aflatoxine betroffen war, könnte in den bei dieser Reissorte üblichen langen Lagerungszeiten liegen. Nachdem die Reiskörner poliert wurden, werden sie häufig 8 Monate und länger gelagert. Die länglichen Reiskörner weisen durch die lange Lagerungsdauer einen sehr niedrigen Wassergehalt auf. Sie verlieren innerhalb von 8 Monaten noch 40 – 70% ihres Ausgangsfeuchtigkeitsgehalts. Beim Kochen können einzelne Sorten bis über 300 g Wasser pro 100 g Reis aufnehmen, verkleben aber nicht [BHATTACHARJEE et al., 2002]. Wird Reis jedoch nicht ausreichend getrocknet oder bei zu feuchten Bedingungen gelagert, wird ein Befall durch Aflatoxin bildende Schimmelpilze erleichtert. So konnte nach Lagerung ein erhöhtes Auftreten von *A. flavus* in Reis festgestellt werden [KUMAR et al., 2008]. In einer anderen Studie zeigten Liu et al., dass die Aflatoxinkonzentrationen in Reis nicht linear ansteigen und nach 7-8 Jahren Lagerung die höchsten Werte erreichen [LIU et al., 2006].

Reisproben	Analysierte Proben	Positive Proben	Konzentration der Aflatoxine (ng/g)				
			AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	Aflatoxine gesamt
<i>Basmati</i>	39	22	0,45 – 9,86	1,53 – 1,53	n. d.	n. d.	0,45 – 11,39
<i>Hom Mali</i>	11	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
<i>Langkorn</i>	10	1	1,15	n. d.	n. d.	n. d.	1,15 – 1,15
<i>Rundkorn</i>	5	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
<i>Vollreis</i>	11	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
<i>Reiswaffeln</i>	5	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.

Tabelle 24: Aflatoxinkonzentrationen in analysierten Reisproben

7.4.1. Positive Reisproben unter der Quantifizierungsgrenze

In Tab. 25 sind jene Reisproben veranschaulicht, deren Aflatoxinkonzentrationen zwar über der Nachweisgrenze, jedoch unter der Quantifizierungsgrenze lagen. Bei den detektierten Substanzen handelte es sich zwar Aflatoxine, jedoch handelte es sich um Konzentrationen im Spurenbereich, die nicht quantifizierbar waren. 9 (11%) der Proben wiesen nur in Spuren Aflatoxine auf und fielen in diese Kategorie.

Bei allen Reisproben, deren Aflatoxinkonzentration nicht quantifizierbar war, handelt es sich um bereits polierten Reis (1 Langkornreis, 8 Basmatireis).

Unter den in Tab. 25 aufgelisteten analysierten Reisproben waren auch 3, die aus biologischem Anbau stammten und Spuren von Aflatoxinen enthielten. Bei den Proben handelte es sich um einen polierten Langkornreis aus Ägypten (E071299) und zwei polierte Basmatireis aus Indien (E080170, E080180).

Nur in der in Abb. 31 dargestellten Probe eines ägyptischen Langkornreis (E071299) konnten Spuren von AFB₂ und AFG₂ gefunden werden. Alle anderen positiven Reisproben stammten entweder aus Indien (20) oder Pakistan (2) und enthielten nur AFB₁. Bei den untersuchten 18 italienischen und 11 thailändischen Proben konnten keine Spuren von Aflatoxinen gefunden werden.

Reisprobe			Aflatoxingehalt (ng/g)			
	Reissorte	Herkunftsland	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
E071264	Basmati	Indien	0,34	n. d.	n. d.	n. d.
E071299	Langkorn	Ägypten	n. d.	0,30	n. d.	0,32
E071379	Basmati	Indien	0,27	n. d.	n. d.	n. d.
E071381	Basmati	Indien	0,21	n. d.	n. d.	n. d.
E071384	Basmati	Indien	0,30	n. d.	n. d.	n. d.
E080170	Basmati	Indien	0,28	n. d.	n. d.	n. d.
E080176	Basmati	Indien	0,20	n. d.	n. d.	n. d.
E080180	Basmati	Indien	0,37	n. d.	n. d.	n. d.
E080186	Basmati	Pakistan	0,37	n. d.	n. d.	n. d.
Nachweisgrenze			0,10	0,08	0,15	0,16
Proben über NG (%)			23 (28,4%)	15 (18,5%)	0 (0%)	1 (1,2%)
Quantifizierungsgrenze			0,45	0,50	0,52	0,60
Proben über QG (%)			15 (18,5%)	1 (1,2%)	0 (0%)	0 (0%)

Tabelle 25: Reisproben mit nicht verifizierbaren Aflatoxinkonzentrationen unter der Quantifizierungsgrenze (AFB₁: 0,45 ng/g, AFB₂: 0,50 ng/g, AFG₁: 0,52 ng/g, AFG₂: 0,60 ng/g)

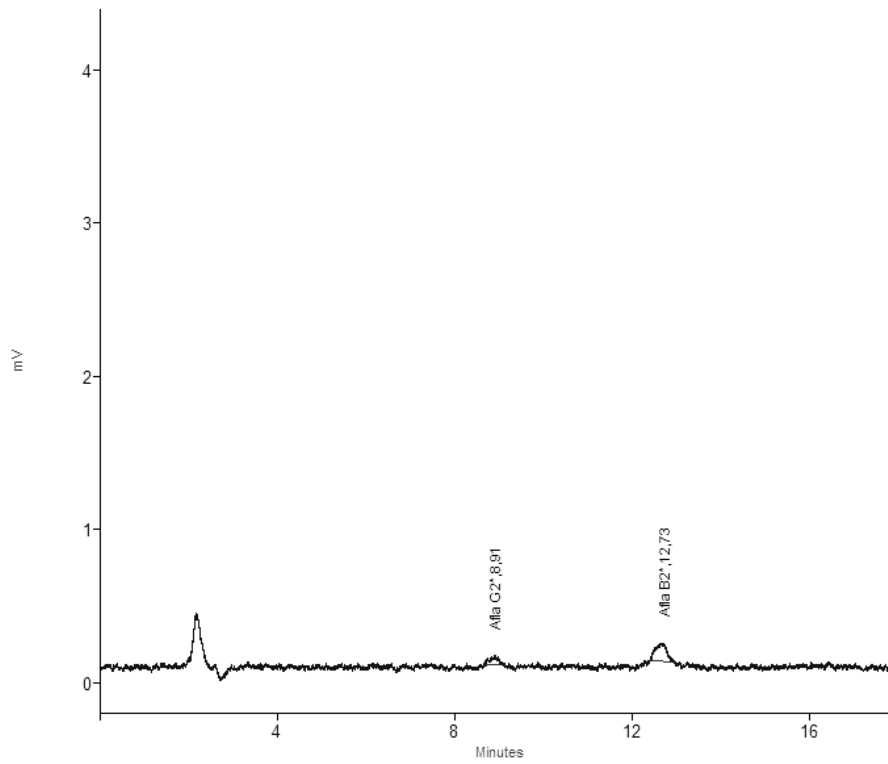


Abbildung 32: Chromatogramm einer Probe (ägyptischer Langkornreis E071299)

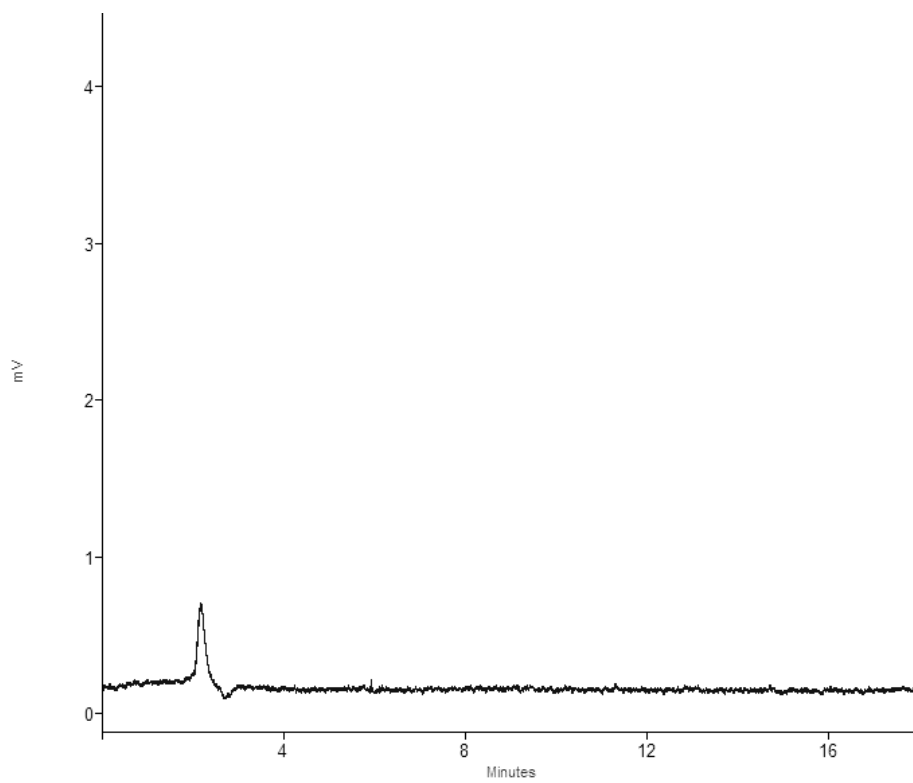


Abbildung 33: Chromatogramm einer negativen Probe Jasmin-Vollreis (E071371)

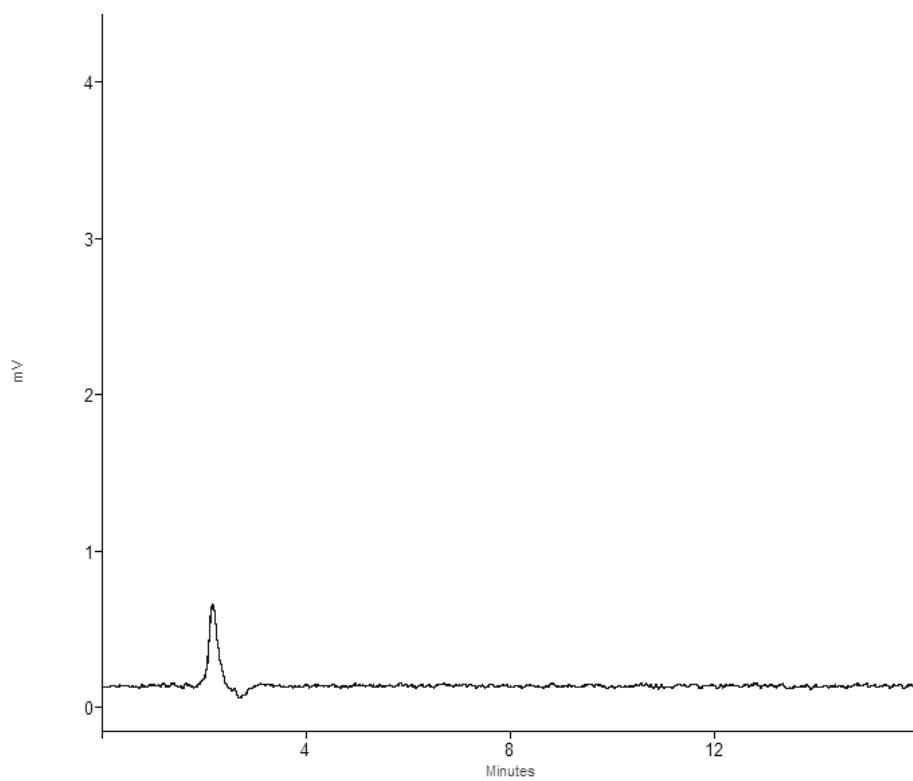


Abbildung 34: Chromatogramm einer negativen Probe polierter Jasminreis (E071375)

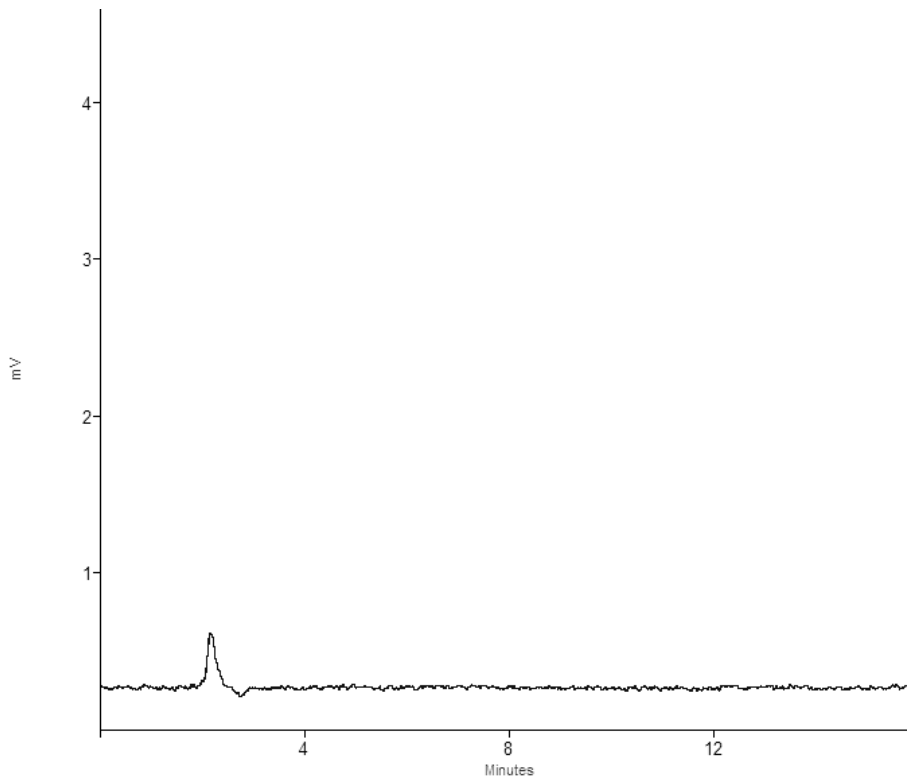


Abbildung 35: Chromatogramm eines negativen Rundkornreis (E080169)

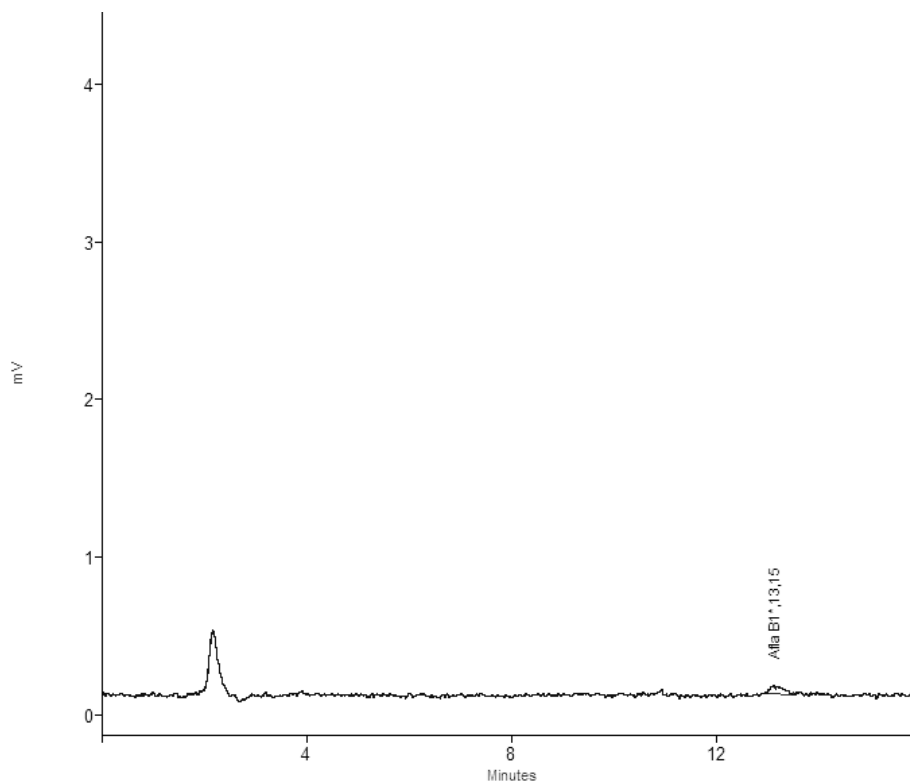


Abbildung 36: Chromatogramm eines Basmatireis mit nicht verifizierbarer AFB₁-Konz. unter der Quantifizierungsgrenze (E080180)

7.4.2. Positive Reisproben über der Quantifizierungsgrenze

Wie Tab. 26 zeigt, enthielten 15 (18,5%) der Reisproben Aflatoxinkonzentrationen, die über der Quantifizierungsgrenze lagen. In diesen Fällen waren die Messergebnisse verifizierbar.

In 14 Fällen konnte AFB₁ und AFB₂, in einem Fall nur AFB₁ nachgewiesen werden. Dies deutet auf einen Befall durch *A. flavus* hin, da dieser Schimmelpilzstamm ausschließlich jene beiden Toxine bilden kann [MÜCKE und LEMMEN, 2004]. *A. flavus*-Stämme bilden AFB₁ offenbar in größeren Mengen als AFB₂. Grund für diese Annahme ist, dass im Zuge der Untersuchungen AFB₂ erst ab AFB₁-Konzentrationen von ca. 0,70 ng/g nachgewiesen werden konnte. Ähnliche Ergebnisse zeigte eine Studie von Tam et al., bei der in auf Reis basierenden Frühstückszerealien AFB₂ mittels HPLC ebenfalls in deutlich geringeren Mengen detektiert wurde als AFB₁ [TAM et al., 2006]. Bei einer ebenfalls mit IAC und HPLC durchgeführten Studie von Sales und Yoshizawa wurden 78 Reisproben auf den Philippinen auf Aflatoxine untersucht. In 74 (94,8%) Fällen konnte Aflatoxin nachgewiesen werden, die AFB₁-Konzentrationen reichten bis zu 8,33 ng/g mit einem Durchschnittswert von 1,48 ng/g, die AFB₂-Konzentrationen waren auch hier mit maximal 0,33 ng/g und einem Durchschnittswert von 0,08 ng/g deutlich niedriger [SALES und YOSHIZAWA, 2005].

Reisprobe	Aflatoxingehalt (ng/g)					
	Reissorte (Marke)	Herkunftsland	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
E071285	Basmati (Alino)	Indien	1,42	0,18	n. d.	n. d.
E071286	Basmati (Alino)	Indien	2,85	0,41	n. d.	n. d.
E071286 (2)	Basmati (Alino)	Indien	9,86	1,53	n. d.	n. d.
E071385	Basmati (Hayadari- Nejat)	Indien	0,77	0,12	n. d.	n. d.
E080120	Basmati (Alino)	Indien	0,90	0,14	n. d.	n. d.
E080121	Basmati (Alino)	Indien	1,09	0,12	n. d.	n. d.
E080122	Basmati (Alino)	Indien	1,49	0,16	n. d.	n. d.
E080123	Basmati (Alino)	Indien	1,86	0,18	n. d.	n. d.
E080124	Basmati (Alino)	Indien	0,97	0,12	n. d.	n. d.
E080171	Basmati (Viva Vital)	Indien	0,79	0,13	n. d.	n. d.
E080173	Basmati (Mulackal)	Indien	0,45	n. d.	n. d.	n. d.
E080175	Basmati (Delikatessa)	Indien	2,16	0,24	n. d.	n. d.
E080178	Langkorn (Euro Basmati)	Indien	1,15	0,15	n. d.	n. d.
E080184	Basmati (Laila)	Pakistan	0,84	0,19	n. d.	n. d.
E080185	Basmati (Rehman)	Indien	1,39	0,18	n. d.	n. d.

Tabelle 26: Positive Reisproben mit Aflatoxinkonzentrationen über der Quantifizierungsgrenze

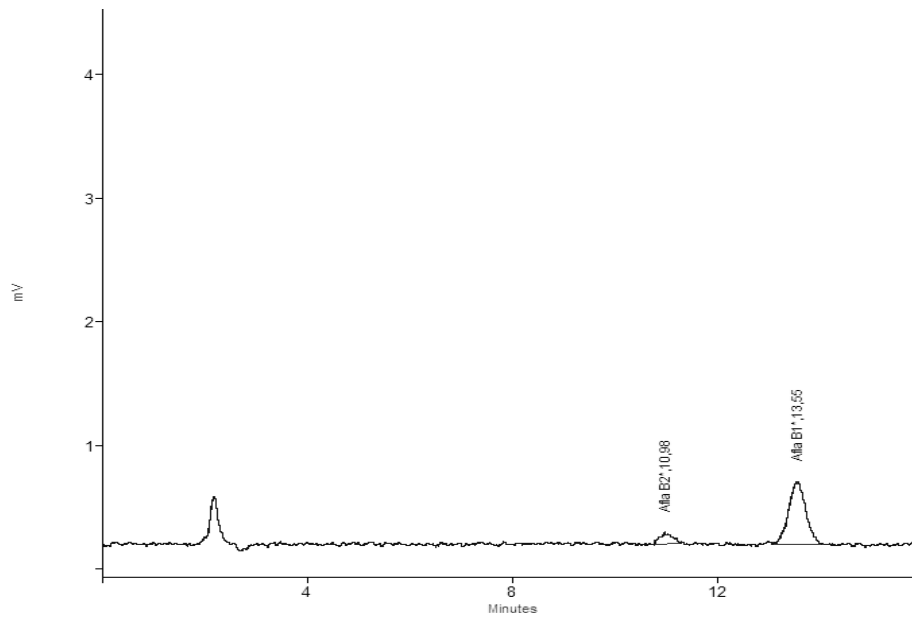


Abbildung 37: Chromatogramm eines positiven indischen Langkornreis (E080178) mit AFB₁: 1,15 ng/g, AFB₂: 0,15 ng/g

7.4.3. Reisproben mit Aflatoxinkonzentrationen über den gesetzlich erlaubten Höchstwerten

Wie aus Tabelle 27 ersichtlich, haben 3 der insgesamt 81 analysierten Proben die von der EU erlaubten 2 ng/g Reis für AFB₁ überschritten. Es sind dies die Proben E071286 (2) mit 9,86 ng/g, E071286 mit 2,85 ng/g, sowie E080175 mit 2,16 ng/g. Bei den drei Proben handelte es sich jeweils um polierten Basmati-reis in 1kg Gebinden. Die in Abb. 37 dargestellte Probe E071286 (2) hat mit 9,86 ng/g nicht nur die gesetzlich erlaubte Höchstgrenze für AFB₁ von 2 ng/g Reis deutlich überschritten, sondern mit 11,39 ng/g auch die Höchstgrenze der erlaubten Gesamtaflatoxinbelastung von 4 ng/g Reis.

Reisprobe	Aflatoxingehalt (ng/g)						
	Reissorte (Marke)	Herkunfts- land	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	Aflatoxine gesamt
E071286	Basmati (Alino)	Indien	2,85	0,41	n. d.	n. d.	3,26
E071286 (2)	Basmati (Alino)	Indien	9,86	1,53	n. d.	n. d.	11,39
E080175	Basmati (Delikatessa)	Indien	2,16	0,24	n. d.	n. d.	2,40

Tabelle 27: Positive Reisproben mit Aflatoxinkonzentrationen über den gesetzlichen erlaubten Höchstwerten der EU

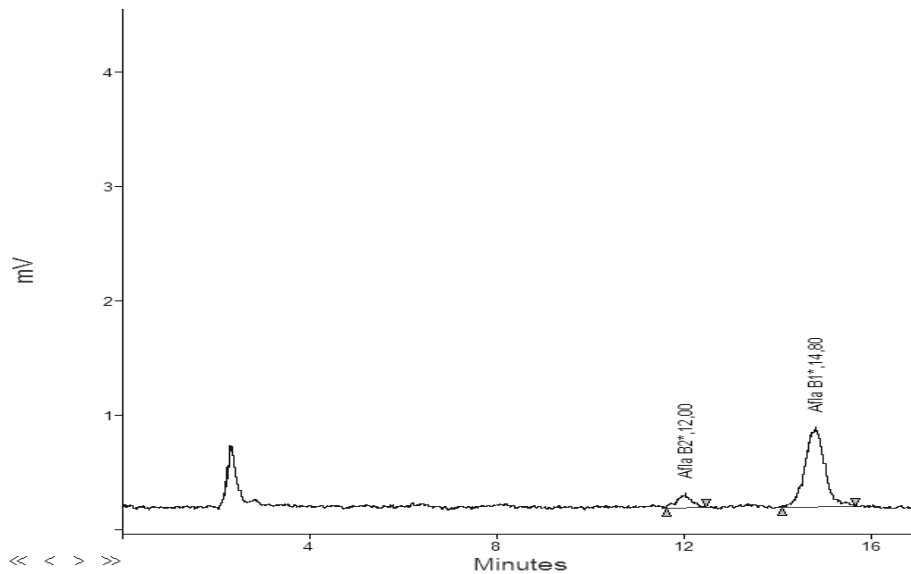


Abbildung 38: Chromatogramm eines polierten indischen Basmatireis (E080175) mit AFB₁-Konzentration (2,16 ng/g) über dem gesetzlich erlaubten Höchstwert

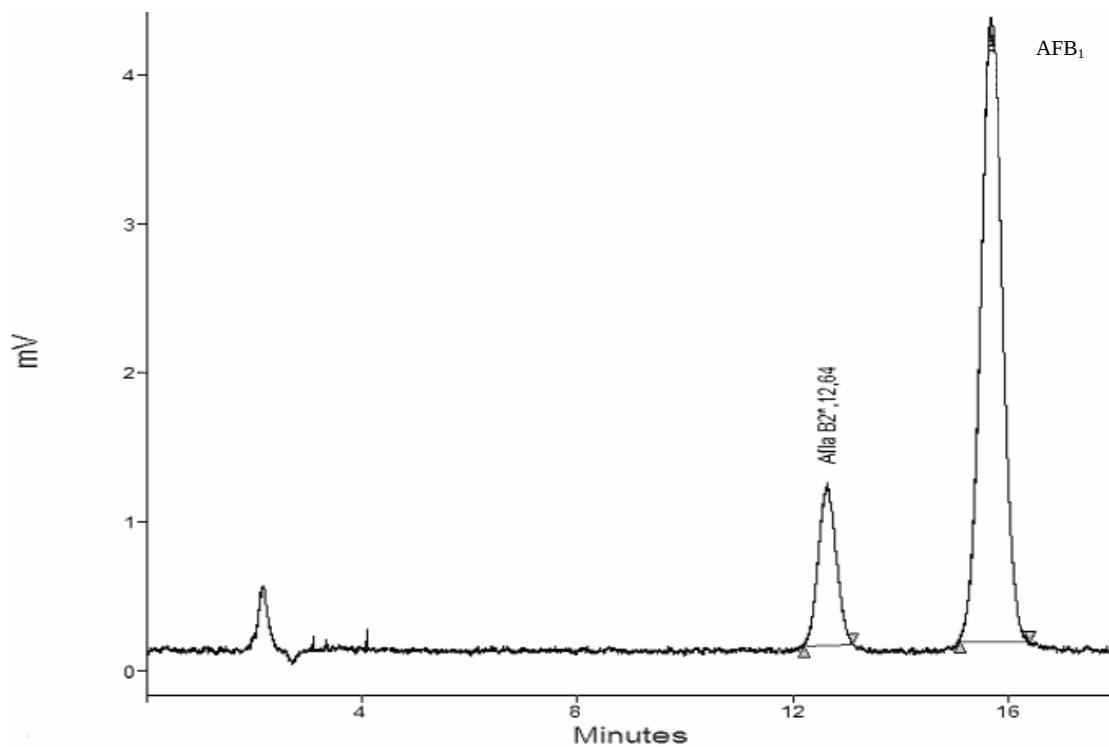


Abbildung 39: Höchste gemessene Aflatoxinkonzentrationen mit 9,86 ng/g AFB₁ und 1,53 ng/g AFB₂ in einer Probe poliertem indischen Basmatireis (E071286 (2))

In der Literatur finden sich häufig nur Angaben zu AFB₁, da dieses am weitaus toxischsten ist. Nguyen et al. analysierten mit der HPLC 100 vietnamesische Reisproben unter anderem auf AFB₁, In 51 Proben konnte AFB₁ nachgewiesen

werden, von diesen haben 10 die erlaubten Höchstwerte der EU überschritten [NGUYEN et al., 2007]. In einer an der Elfenbeinküste durchgeführten Studie mit ELISA konnten in 10 von 10 Reisproben AFB₁-Konzentrationen von < 1,5 bis 10 ng/g ermittelt werden, wobei der erlaubte Höchstwert in 40% der Fälle überschritten wurde [SANGARE-TIGORI et al., 2006]. In Indien wurden 1511 parboiled Reisproben mittels DC analysiert, von denen 38% AFB₁ in Konzentrationen $\geq$ 5 ng/g enthielten [TOTEJA et al., 2006]. Bei einer weiteren Studie auf den Philippinen wurden 78 Reisproben mit der HPLC untersucht, wobei 94,8% des polierten Reis und 100% vom Vollreis mit Aflatoxinen kontaminiert waren. Die Konzentrationen variierten zwischen n.d. – 8,33, n.d. – 0,33, n.d. – 0,08 ng/g für AFB₁, AFB₂ und AFG₁. [SALES und YOSHIZAWA, 2005].

Studien, die in der EU durchgeführt wurden, berichten kaum über Fälle, bei denen die erlaubten Aflatoxinhöchstwerte von 2 ng/g AFB₁ und 4 ng/g Aflatoxine gesamt in Reis überschritten wurden. Insgesamt 100 Proben wurden bei einer Studie der britischen Food Standards Agency, bei der verschiedene Reissorten unter anderem auf Aflatoxine untersucht wurden, analysiert. Die Aflatoxinkonzentrationen lagen zwischen 0,2 und 1,8 ng/g. Die höchsten Konzentrationen wurden in Basmatireis gefunden, von denen 50% der 18 Proben positiv waren [FOOD STANDARDS AGENCY, 2002]. Bei Nordkvist et al. wiesen 10 von 10 analysierte Basmatireis-Proben jeweils Aflatoxinkonzentrationen unter 1,5 ng/g auf [NORDKVIST et al., 2006].

7.4.4. Reiswaffeln

Von den 5 analysierten, allesamt biologischen Reiswaffelproben (3 Proben Vollkornreiswaffeln, 2 Proben „Weissreis“-Reiswaffeln), konnten in keinem Fall Aflatoxine detektiert werden. Für einen Nachweis von Aflatoxinen im Spurenbereich war die Empfindlichkeit der angewandten Analysenmethode mit 0,11, 0,08, 0,13 und 0,16 ng/g für AFB₁, AFB₂, AFG₁ und AFG₂ zu gering. Die Nachweisgrenzen für Aflatoxine bei der Studie von Tam et al., die unter anderem Frühstückszerealien für Kinder auf Reisbasis untersuchten und ebenfalls IAC und HPLC anwandten, lagen mit 0.002 ng/g für AFB₁ und AFB₂ und mit 0.004 ng/g für AFG₁ und AFG₂ deutlich niedriger [TAM et al., 2006].

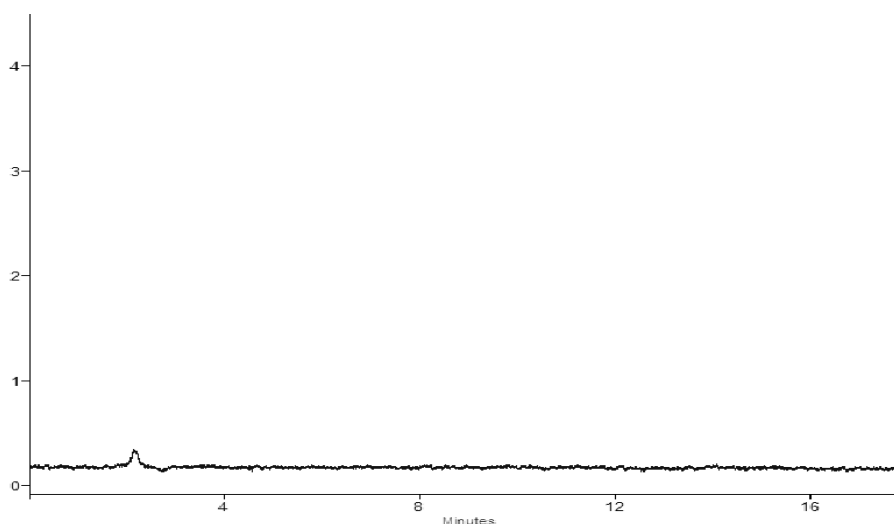


Abbildung 40: Chromatogramm einer Vollkornreiswaffel (E071293)

7.5. Validierung der Methode

7.5.1. Bestimmung der Wiederfindung in Reisextrakt und Reproduzierbarkeit an verschiedenen Tagen

Zur Bestimmung der Wiederfindung wurde Reisextrakt mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen Aflatoxin-Mixstandard gespiked (0,89, 0,3, 1,05, 0,33 ng/g bzw. 1,79, 0,61, 2,1, 0,67 ng/g für AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂). Die Wiederfindungsraten wurden zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit an drei aufeinanderfolgenden Tagen gemessen. In Tabelle 28 sind die Wiederfindungsraten der einzelnen Messungen angegeben.

Bei den insgesamt 18 Messungen zeigten sich AFB₁, AFB₂ und AFG₁, unabhängig von der Konzentration, mit Wiederfindungsraten von 90 – 100 % als sehr konstant. Auffallend war, dass die Wiederfindungsraten von AFG₂ eine größere Schwankungsbreite zeigten, als die anderen Aflatoxine. Tam et al. berichten in einer Studie mit Frühstückszerealien auf Reisbasis über ähnliche Werte. Dort waren die durchschnittlichen Wiederfindungsraten der Aflatoxine B₁, B₂ und G₁ größer 85,1 %, während die von AFG₂ nur 68,8 % betrug [TAM et al., 2006].

Durchschnittlich ergaben sich Werte für die Wiederfindung von 99,3 %, 98,1 %, 98,1 % und 91,1 % für AFB₁, AFB₂, AFG₁ und AFG₂. Diese Werte sind in Tab. 29 den Herstellerangaben entgegengestellt.

Aflatoxine		Reproduzierbarkeit der Wiederfindung							
	Konzentration (ng/g Reis)	Aufarbei- tung A	Aufar- beitung B	Aufar- beitung C	Aufar- beitung D	Aufar- beitung E	x_M	StAW	StAW (%)
Tag 1									
<i>AFB</i> ₁	1,79	101,0 %	101,4 %	97,2 %	99,7 %	96,4 %	99,1 %	± 2,2 %	± 2,2
<i>AFB</i> ₂	0,61	96,4 %	90,4 %	97,1 %	87,5 %	106,9 %	95,7 %	± 7,5 %	± 7,7
<i>AFG</i> ₁	2,10	96,3 %	94,4 %	94,9 %	93,1 %	93,9 %	94,5 %	± 1,2 %	± 1,2
<i>AFG</i> ₂	0,67	79,4 %	79,4 %	83,9 %	78,6 %	95,8 %	83,4 %	± 7,2 %	± 9,1
Tag 2									
<i>AFB</i> ₁	1,79	94,2 %	95,4 %	100,5 %	101,7 %	96,5 %	97,7 %	± 3,3 %	± 3,5
<i>AFB</i> ₂	0,61	100,8 %	102,3 %	104,5 %	103,7 %	99,9 %	102,2 %	± 1,9 %	± 1,9
<i>AFG</i> ₁	2,10	100,4 %	101,3 %	103,5 %	101,3 %	92,6 %	99,8 %	± 4,2 %	± 4,2
<i>AFG</i> ₂	0,67	91,8 %	102,2 %	99,9 %	101,0 %	98,7 %	98,7 %	± 4,1 %	± 4,5
Tag 3									
<i>AFB</i> ₁	0,89	104,2 %	100,1 %	102,5 %			102,3 %	± 2,0 %	± 2,0
<i>AFB</i> ₂	0,30	94,7 %	96,6 %	94,2 %			95,2 %	± 1,3 %	± 1,3
<i>AFG</i> ₁	1,05	103,2 %	103,2 %	97,2 %			101,2 %	± 3,5 %	± 3,5
<i>AFG</i> ₂	0,33	93,6 %	88,2 %	91,4 %			91,1 %	± 2,7 %	± 2,7

Tabelle 28: Reproduzierbarkeit der Wiederfindung mit IAC bei verschiedenen Konzentrationen

Wiederfindung	Aflatoxine			
	<i>AFB₁</i>	<i>AFB₂</i>	<i>AFG₁</i>	<i>AFG₂</i>
Wiederfindung über 3 Tage				
x_M	99,3 %	98,1 %	98,1 %	91,1 %
StAW	± 3,0 %	± 5,6 %	± 4,2 %	± 8,5 %
StAW (%)	± 3,1	± 5,8	± 4,2	± 9,4
Herstellerangaben				
Wiederfindung	99,0 %	99,0 %	99,0 %	84,0 %
StAW (%)	± 6,0	± 7,0	± 5,0	± 6,0

Tabelle 29: Mit IAC-Säulen erzielte durchschnittliche Wiederfindung gespikter Reisproben über 3 Tage im Vergleich zu den Herstellerangaben

7.5.2. Bestimmung der Wiederfindung mit Erdnussbutter

Um die Genauigkeit der Methode für die quantitative Analyse von Aflatoxinen zu überprüfen, wurden 3 x 5,00 g einer mit Aflatoxinen kontaminierten Erdnussbutter mit bekannter AFB₁-Konzentrationen aufgearbeitet und analysiert.

Die Ergebnisse der Analyse der 3 Erdnussbutterproben sind in Tab. 30 ersichtlich. Für AFB₁ konnten der Referenz (HPLC) nahe liegende Werte erzielt werden. Für die erzielten AFB₂- und AFG₁-Messwerte gibt es keine Referenzdaten, sie weisen jedoch, ähnlich den AFB₁-Werten, eine geringe Standardabweichung auf. Die Werte der Referenz wurden durch Extraktion, Immunultrafiltration und anschließender Analyse der Probe mit der HPLC erreicht [REITER, 2007].

Probe	Aflatoxine (ng/g)			
	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
Referenzwerte	18,00	k. A.	k. A.	k. A.
Skippy 1	19,63	4,44	0,58	n. d.
Skippy 2	18,82	4,20	0,66	n. d.
Skippy 3	19,60	4,30	0,68	n. d.
Mittelwert	19,35	4,31	0,64	n. d.
StAW	± 0,46	± 0,12	± 0,05	n. d.
StAW (%)	± 2,36	± 2,89	± 7,75	n. d.

Tabelle 30: Analyse von Erdnussbutter als Referenz

7.5.3. Validierung der Methode mittels zertifiziertem Referenzmaterials

Um die Messgenauigkeit der entwickelten Methode zur Quantifizierung von Aflatoxinen in Reis zu überprüfen, wurde eine Referenzprobe (FAPAS T04105) mit bekannten Aflatoxinkonzentrationen nach den gleichen Schritten aufgearbeitet, wie die bereits zuvor untersuchten Reisproben. Da Reis als Referenzmatrix nicht verfügbar war, bestand das Referenzmaterial aus mit den Aflatoxinen B₁, B₂, G₁, G₂ kontaminiertem, gemahlenem Maispulver.

Die Aufarbeitung der Referenzproben (2 x je 5,0001 g) erfolgte wie in 5.7.2 und 5.7.3 beschrieben. Davon abweichend wurden jeweils 2 ml Reisextrakt beider Referenzproben je einmal mit 28 ml H₂O und je einmal mit 28 ml PBS verdünnt, da das Reisextrakt bei der Verdünnung mit 14 ml PBS leichte Opaleszenz aufwies.

		Aflatoxine (ng/g)			
	<i>Verdünnt in</i>	<i>AFB₁</i>	<i>AFB₂</i>	<i>AFG₁</i>	<i>AFG₂</i>
<u>Hersteller</u>					
Referenzbereich		2,92 – 7,50	1,27 – 3,26	1,30 – 3,35	0,55 – 1,41
Sollwerte		5,21	2,26	2,32	0,98
<u>Messwerte</u>					
Messung 1a	PBS	5,08	2,45	2,63	1,08
Messung 1b	H ₂ O dest.	4,98	2,33	2,57	1,00
Messung 2a	PBS	5,27	2,73	2,94	1,26
Messung 2b	H ₂ O dest.	5,28	2,71	2,87	1,11
Mittelwert		5,15	2,56	2,75	1,11
StAW		± 0,15	± 0,20	± 0,18	± 0,11
StAW (%)		± 2,9	± 7,7	± 6,5	± 9,8

Tabelle 31: Validierung der Methode mittels zertifiziertem Referenzmaterial (FAPAS)

Alle gemessenen Aflatoxinkonzentrationen lagen, wie in Tabelle 31 erkennbar, im vom Hersteller angegebenen Referenzbereich und somit wurde die Messge-

naugigkeit der erstellten Methode zur Quantifizierung von Aflatoxinen in Reis bestätigt. Zwischen den Messwerten der mit PBS und jener mit H₂O verdünnten Proben wurde kein signifikanter Unterschied bemerkt. Die höhere Verdünnungsrate des Maisextrakts wirkte sich nicht negativ auf die Wiederfindungsrate aus.

7.5.4. Messung einer Positivkontrolle an verschiedenen Tagen

Eine anfangs auf AFB₁ und AFB₂ positiv getestete Basmatireisprobe (E071286) wurde täglich bei jeder weiteren Analyse von Reisproben erneut aufgearbeitet und gemessen. Ziel war es, Schwankungen in der Messgenauigkeit der Analysemethode festzustellen bzw. Fehler in der Probenaufarbeitung durch signifikant geringere Messwerte zu erkennen. Insgesamt wurde die Probe an 13 verschiedenen Tagen gemessen.

Probe	Aflatoxine (ng/g)			
	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
Basmatireis (E071286)				
Mittelwert (13)	2,90	0,41	n. d.	n. d.
StAW	± 0,36	± 0,07	n. d.	n. d.
StAW (%)	± 12,75	± 18,25	n. d.	n. d.

Tabelle 32: Durchschnittliche Aflatoxinkonzentrationen einer positiven Kontrollprobe gemessen an verschiedenen Tagen

Tabelle 32 zeigt, dass die Messwerte der AFB₁-Konzentration durchschnittlich um 0,4 ng/g Reis schwanken, jene von AFB₂ um 0,07 ng/g Reis. So liegt bei AFB₁ der niedrigste gemessene Wert bei 2,25 ng/g Reis, der höchste bei 3,38 ng/g Reis. Die Schwankungsbreite könnte dadurch erklärbar sein, dass die Aflatoxine in der Reisprobe möglicherweise nicht homogen verteilt waren. Weiters könnte sie auch auf Messungenauigkeiten bei der Analyse zurückzuführen sein. In Abb. 41 bzw. 42 sind die Messwerte von AFB₁ und AFB₂ der positiven Kontrollprobe an den einzelnen Analysentagen veranschaulicht.

Zur Verifizierung der Messwerte wurde Probe E071286 in einem Aflatoxinreferenzlabor in Schweden (National Veterinary Institute, Uppsala, Sweden) analy-

siert. Das Ergebnis dieser Messung (AFB₁: 2,59 ng/g, AFB₂: 0,30 ng/g) bestätigte die bisherigen Messergebnisse.

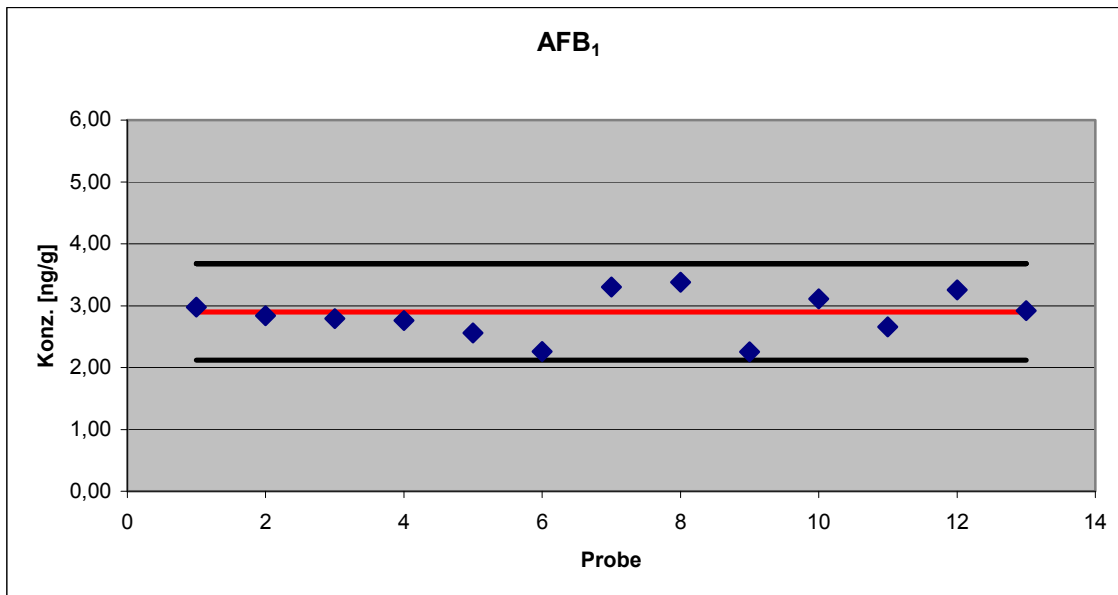


Abbildung 41: AFB₁-Messwerte mit MW (rot) und 2facher STABW der positiven Kontrollprobe an verschiedenen Tagen

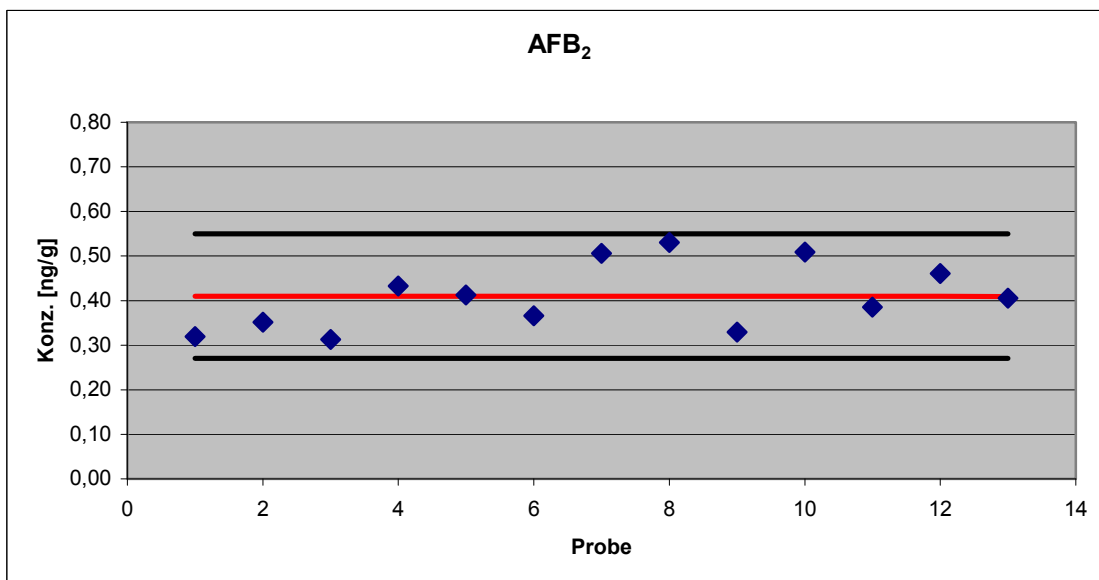


Abbildung 42: AFB₂-Messwerte mit MW (rot) und 2facher STABW der positiven Kontrollprobe an verschiedenen Tagen

7.5.5. Bestimmung der Wiederfindung in Reis fester Form

Zusätzlich zu der üblichen Bestimmung der Wiederfindung von Aflatoxinen in Reisextraktlösung, wurde gemahlener Reis noch vor dem Extraktionsschritt mit MeOH/H₂O (80:20) mit Aflatoxin-Mixstandards mit der Endkonzentration von 4 ng/g Reis bzw. 1 ng/g Reis gespiked.

Die negative Basmatireisprobe E071296 wurde mit 4 ng/g Reis, die negative Basmatireisprobe E071287 mit 1 ng/g Reis gespiked und die Wiederfindung beider jeweils vier Mal bestimmt.

	Soll-Konzentration	End-Konzentration	Wiederfindung	StAW	StAW (%)
AFB₁	3,8 ng/g	2,64 ng/g	69,4 %	± 4,4 %	± 6,4
AFB₂	4 ng/g	3,58 ng/g	89,6 %	± 3,1 %	± 3,5
AFG₁	4 ng/g	3,26 ng/g	81,4 %	± 5,2 %	± 6,4
AFG₂	4 ng/g	3,47 ng/g	86,9 %	± 3,5 %	± 4,0
AFB₁	0,95 ng/g	0,76 ng/g	76,1 %	± 0,03 %	± 3,3
AFB₂	1 ng/g	0,94 ng/g	94,2 %	± 0,03 %	± 2,8
AFG₁	1 ng/g	0,86 ng/g	85,8 %	± 0,03 %	± 3,6
AFG₂	1 ng/g	0,84 ng/g	83,7 %	± 0,04 %	± 5,4

Tabelle 33: Durchschnittliche Wiederfindung direkt gespikter Reisproben

Die in Tab. 33 angeführten Wiederfindungsraten von auf gemahlenen Reis gespikten Aflatoxinen fallen um ca. 10 Prozentpunkte niedriger aus, als jene bei denen zu Reisextrakt gespiked wurde. Fehler in der Probenaufarbeitung dürften dafür weniger in Frage kommen. Der Grund dürfte im höheren Arbeitsaufwand und der damit verbundenen Aufsummierung von Fehlerquellen liegen. So könnten Ungenauigkeiten beim Spiken oder inhomogene Verteilung der Aflatoxine im Reismehl für niedrigere Messergebnisse verantwortlich sein. Sobolev erreichte mit einer Spikekonzentration von 0,5 ng/g auf polierten Reis, anschließendem Clean-up mit IAC und Analyse mit HPLC-MS durchschnittliche Wieder-

findungsraten von 84,6%, 86,5%, 88,7% und 87,9% für AFB₁, AFB₂, AFG₁ und AFG₂. Mit einer Spikekonzentration von 5 ng/g erreichte er 92,8%, 92,7%, 94,8% und 97,1% [SOBOLEV, 2007].

7.5.6. Versuche mit alternativem Extraktionsmittel

Um zu untersuchen, ob mit ACN/H₂O (60:40) als Extraktionsmittel bessere Wiederfindungsraten erzielbar wären, wurde negativer Basmatireis (E071287) fester Form mit 1 ng/g Aflatoxin-Mixstandard gespiked und mit verschiedenen Extraktionsmitteln extrahiert. Die gespikete Probe wurde 2 x mit MeOH/H₂O dest. (80:20) und 5 x mit ACN/H₂O dest. (60:40) extrahiert. Bei zweien der mit ACN/H₂O dest. extrahierten Proben wurde das Extrakt statt mit PBS mit H₂O dest. verdünnt. Auch der Waschschrift nach dem Auftragen des verdünnten Probenextrakts auf die IAC wurde in diesem Fall mit H₂O dest. durchgeführt.

Die in Tab. 34 angeführten Messergebnisse zeigen, dass sich MeOH/H₂O dest. (80:20) als Extraktionsmittel für die Extraktion von Aflatoxinen aus Reismatrix besser eignet, als ACN/H₂O dest. (60:40). Die mit ACN/H₂O dest. extrahierten Proben zeigten sowohl bei Verdünnung mit H₂O dest. als auch bei Verdünnung mit PBS deutlich niedrigere Wiederfindungsraten als jene mit MeOH/H₂O dest. (80:20) extrahierten Proben. Weiters zeigte sich eine höhere Schwankung bei den einzelnen Messergebnissen. Auch bei Sobolev [SOBOLEV, 2007] war für die Extraktion von Aflatoxinen aus Reismatrix MeOH/H₂O (80:20) Extraktionsmittel der Wahl. Stroka et al. berichten, dass sich, bei trockenen Probenmaterialien bzw. solchen mit einem hohen Anteil an wasserlöslichen Komponenten, wässrige Extraktionsmittel besser eignen, als solche, die Acetonitril enthalten [STROKA et al., 1999].

	Verdünnung in	<i>AFB</i> ₁	<i>AFB</i> ₂	<i>AFG</i> ₁	<i>AFG</i> ₂
ACN/H₂O	H ₂ O dest.				
Wiederfindung		73,7 %	94,1 %	77,7 %	51,5 %
StAW		± 0,1 %	0,0 %	0,1 %	± 0,1 %
StAW (%)		± 13,3	± 1,8	± 17,7	± 21,7
ACN/H₂O	PBS				
Wiederfindung		69,5 %	85,5 %	73,2 %	69,2 %
StAW		± 0,2 %	0,2 %	0,2 %	± 0,2 %
StAW (%)		± 25,9	± 22,3	± 27,0	± 33,0
MeOH/ H₂O	PBS				
Wiederfindung		83,4 %	92,1 %	93,2 %	81,9 %
StAW		± 0,0 %	± 0,0 %	± 0,0 %	± 0,0 %
StAW (%)		± 3,7	± 0,1	± 0,4	± 2,8

Tabelle 34: Wiederfindungsraten für verschiedene Extraktionsmittel aus mit 1 ng/g gespiktem Reismehl

8. Schlussbetrachtung

Bereits nach kurzer Zeit stellte sich heraus, dass das größte Problem im Zuge dieser Diplomarbeit darin lag, eine funktionierende Methode für die Aufarbeitung der Reisproben mit der IAC zu finden. Erste Versuche mit Reismatrix zeigten zu niedrige Wiederfindungsraten, woraufhin eine langwierige Suche nach den Fehlerquellen begann. Experimentiert wurde unter anderem mit alternativen Extraktionslösungen, der Flussrate beim Auftragen des Reisextrakts auf die IAC, verschiedenen Lösungen zur Reisextraktverdünnung (H₂O, PBS, PBS-Tween) und doppelter Menge an Methanol bei der Elution der Aflatoxine. Schlussendlich konnte die Effizienz der Aufarbeitungsmethode mit Hilfe der Berücksichtigung eines Rückspülschrittes während der Probenelution deutlich verbessert werden.

Auffallend an den Ergebnissen war, dass, bis auf 3 Ausnahmen, Aflatoxine ausschließlich in indischem Basmatireis nachgewiesen wurden. In der Literatur fanden sich lediglich Daten über Aflatoxingehalte in Reis, nicht aber speziell für Basmatireis. Erleichtert wird die Kontamination mit Aflatoxin bildenden Schimmelpilzen, wenn Reis nach der Ernte nicht entsprechend gelagert wird. So kann nicht saisonaler Regen, zu hoher Feuchtigkeitsgehalt der Reiskörner oder Schädlingsbefall vor allem in tropischen und subtropischen Ländern in weiterer Folge zur Bildung von Aflatoxinen führen [KUMAR et al., 2008]. Weiters wurde festgestellt, dass die Aflatoxinkonzentration mit der Lagerungsdauer anstieg [KUMAR et al., 2008; SALEEMULLAH et al., 2006; LIU et al., 2006]. Möglicherweise hängt die häufig über 8 Monate dauernde Lagerung [BHATTACHARJEE et al., 2002] von Basmatireis mit der festgestellten häufigeren Aflatoxinkontamination zusammen.

Trotz chargenweiser Kontrollen bei der Einfuhr in die EU kann nicht verhindert werden, dass Reis in einzelnen Gebinden Aflatoxinkonzentrationen enthält, die die in der EU gesetzlich erlaubten Höchstmengen überschreiten. Da diese Fälle jedoch selten sind und der pro Kopf-Verbrauch von Reis in den Mitgliedsstaaten der EU im Vergleich zu asiatischen Ländern gering ist, kann Reis weiterhin bedenkenlos verzehrt werden.

9. Zusammenfassung

Aflatoxine sind sekundäre Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen und wirken bereits in geringen Konzentrationen toxisch auf Mensch und Tier. Die häufigsten Vertreter sind die Aflatoxine B₁, B₂, G₁ und G₂ sowie die so genannten Milchtoxine M₁ und M₂. Gebildet werden Aflatoxine hauptsächlich von den beiden Schimmelpilzarten *A. flavus* und *A. parasiticus*.

Die Wirkung der Aflatoxine ist in erster Linie lebertoxisch. So gilt AFB₁ als eines der stärksten chemischen Kanzerogene, vor allem für Leberkrebs. Aus diesem Grund wurden für Aflatoxine weltweit Höchstgehalte in Lebensmitteln festgelegt.

Im Zuge dieser Diplomarbeit sollten Aflatoxine in am österreichischen Markt erhältlichen Reisproben bestimmt werden. Die Reisproben wurden mittels Immunaффinitätschromatographie (IAC) vorbereitet und anschließend mit der HPLC analysiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zuerst die vom IAC-Säulen-Hersteller angeführte Aufarbeitungsprozedur für die Aufarbeitung der Reisproben optimiert, da die Wiederfindungsraten der Aflatoxine anfangs nicht zufrieden stellend waren. Die Validierung der angewandten Methode erfolgte durch Messung von zertifiziertem Referenzmaterial, Messung einer Probe (E071286) an jedem Tag, Kontrolle einer Probe (E071286) durch ein Referenzlabor und Messung der Wiederfindung an 3 verschiedenen Tagen.

Untersucht wurden insgesamt 76 Reisproben und 5 Reiswaffelpuben. Die Auswertung der Messergebnisse ergab, dass bei 24 (29,5%) der Proben Aflatoxine nachgewiesen werden konnten. Bis auf drei Ausnahmen waren alle positiv getesteten Proben Basmatireis, die Konzentrationen reichten von 0,45 bis 9,86 ng/g Reis für AFB₁ und einmal 1,53 ng/g Reis für AFB₂. AFG₁ und AFG₂ konnten jeweils nur einmal in Spuren nachgewiesen werden. 3 Reisproben haben die in Lebensmitteln erlaubten Höchstgehalte der EU von 2 ng/g Reis überschritten. Bei den 5 analysierten Reiswaffelpuben konnten keine Aflatoxine nachgewiesen werden.

10. Summary

Aflatoxins are secondary metabolites of moulds, which are toxic for humans and animals at very low concentrations. Most common aflatoxins are AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂ and the so-called milktoxins AFM₁ and AFM₂. Aflatoxins are mainly produced by *A. flavus* and *A. parasiticus*.

Aflatoxins are primarily liver toxic. AFB₁ is one of the strongest chemical carcinogens and causes liver cancer. This is the reason, why there exist regulatory limits for aflatoxins in foodstuffs.

In the course of this diploma thesis rice, purchased from the Austrian market, was analysed for the presence of aflatoxins. After sample preparation rice extract was filtered through Immunoaffinity columns (IAC) to purify aflatoxins and analysed by HPLC afterwards.

Because aflatoxin recovery rates were not satisfying, the sample preparation procedure of the IAC-manufacturer has been changed and optimized. Validation of the used method was performed by analysing a certified reference material, a positive rice sample every day and the recovery rates were determined on three different days. Additionally, one rice sample was sent to a reference laboratory for controlling the results.

76 rice samples and 5 samples of rice wafers were analysed. 24 (29,5%) of the samples contained aflatoxins. All but three of the positive samples were Basmati. Aflatoxin concentrations ranged from 0.45 ng AF/g rice to 9.86 ng AF/g rice for AFB₁, AFB₂ was found in only one sample containing 1.53 ng AF/g rice. AFG₁ and AFG₂ were found only once at trace levels. Three of the positive rice samples contained AFB₁ in concentrations above the EU regulatory limit of 2 ng AF/g rice. In 5 samples of rice wafers no aflatoxins were found at all.

11. Literaturverzeichnis

BECHTEL DB, CHAMPAGNE ET, JULIANO BO, WOOD DF. The rice grain and its gross composition. In: Rice: Chemistry and technology, (Champagne ET, Hrsg.). American Association of Cereal Chemists Inc., St. Paul, Minnesota, 2004; 16 (3): 77-107.

BENNETT JW, KLICH M.A. Mycotoxins. Clinical Microbiology Reviews, 2003; 497-516.

BHATTACHARJEE P, SINGHAL RS, KULKARNI PR. Basmati rice: A review. International journal of Food Science and Technology, 2002; 37: 1-12.

BIOPURE. Mycotoxin data collection. Biopure Referenzsubstanzen GmbH, Tulln, 2004.

BLIGH HFJ. Detection of adulteration of Basmati rice with non-premium long-grain rice. International Journal of Food Science and Technology, 2000; 35: 257-265.

CALPE C. Review of the rice market situation in 2007. In: International Rice Commission Newsletter, FAO, Rome, 2007; 56: 1-16.

CAMMANN K. Instrumentelle Analytische Chemie, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Berlin – Heidelberg, 2001.

CANDLISH AAG et al.: A survey of ethnic foods for microbial quality and aflatoxin content, Food Additives and Contaminants, Vol. 18, No. 2, 2001; 129-136.

CASTELLS M, RAMOS AJ, SANCHIS V, MARIN S. Distribution of Total Aflatoxins in Milled Fractions of Hulled Rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007; 55: 2760-2764.

COOPER TG. *Biochemische Arbeitsmethoden*. Walter De Gruyter, Berlin, New York, 1981.

CHANG T. Origin, Domestication, and Diversification. In: *Rice: Origin, History, Technology, and Production*, (Smith CW, Dilday RH, Hrsg.), Wiley Series in Crop Science, John Wiley & Sons Inc., Hoboken, New Jersey, 2003; 3-25.

CHEAPUN K, WONGOIYACHON S, KONGSEREE N. Improving rice grain quality in Thailand. In: *Rice is Life: Scientific Perspectives for the 21st Century – Proceedings of the World Rice Research Conference*, Tsukuba, Japan (Toriyama K, Heong KL, Hardy B, Hrsg.), International Rice Research Institute, 2005; 249-250.

CHRASTIL J. Protein-starch interactions in rice grains. Influence of storage on oryzenin and starch. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1990; 38: 1804–1809.

CHILDS NW. Production and utilization of rice. In: *Rice: Chemistry and Technology*, Third Edition, (Champagne ET, Hrsg.). American Association of Cereal Chemists Inc., St. Paul, Minnesota, 2004; 1-23.

DOYLE C, DORSEY J. Reversed-Phase HPLC: Preparation and Characterization of Reversed-Phase Stationary Phases. In: *Handbook of HPLC, Part III HPLC Instrumentation* (Katz E, Eksteen R, Schoenmakers P and Miller N; Hrsg.). Marcel Dekker, New York, 1998; 293-324.

ELMADFA I, FREISLING H, KÖNIG J, et al. *Österreichischer Ernährungsbericht* 2003, 1. Auflage. Institut für Ernährungswissenschaften, Wien, 2003; 2.

EUROPÄISCHE KOMMISSION. VERORDNUNG (EG) Nr. 1881/2006 DER KOMMISSION vom 19. Dezember 2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln. Europäische Kommission, 2006.

EUROPÄISCHES PARLAMENT UND RAT DER EUROPÄISCHEN UNION. RICHTLINIE (EG) Nr. 32/2002 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 7. Mai 2002 über unerwünschte Stoffe in der Tierernährung. Europäisches Parlament und Rat der europäischen Union, 2002.

FAOSTAT. World Rice Statistics 2006.

<http://www.irri.org/science/ricestat/pdfs2/Table01.pdf> (Zugriff: 11.06.2008)

FOOD STANDARDS AGENCY. Survey of retail rice for a range of mycotoxins. Food Survey Information Sheet, UK, 2002; 22.

INTERNATIONAL RICE COMMISSION. Rice is Life – International Year of Rice 2004 and its Implementation. FAO, Rome, 2005.

Internet: <http://de.wikipedia.org/wiki/Reis> (Zugriff: 30.10.2008)

Internet: <http://www.ikisan.com/Images/ri.%20gm.%20Rice1.gif>
(Zugriff: 22.10.2008)

Internet: <http://ipmworld.umn.edu/chapters/heinrich/eah001.gif>
(Zugriff: 22.10.08)

Internet: <http://www.pdeleuw.de/diss/analytik.html>
(Zugriff: 13.10.2008)

JULIANO BO. Rice in human nutrition. FAO Food and Nutrition Series, No. 26, Rome, 1993.

KOK WT, VAN NEER TCH, TRAAG WA, TUINSTRA LGMT. Determination of aflatoxins in cattle feed by liquid chromatography and post-column derivatization with electrochemically generated bromine. *Journal of Chromatography*, 1986; 367: 231-236.

KUMAR V, BASU MS, RAJENDRAN TP. Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. *Crop Protection*, 2008; 27: 891-905.

KLICH MA. Environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Mycoscience*, 2007; 48: 71-80.

LAMPE K, WITZIGMANN E, KHOO T, TEUBNER C. Das große Buch vom Reis – Geschichte, Anbau, Sorten, Küchenpraxis und Rezepte. Teubner Edition, Füssen, 1997; 6-42.

LC-TECH. Sample Extraction and Cleanup Procedure. LC-Tech GmbH, Dorfen, Germany, 2007.

LIU Z, GAO J, YU J. Aflatoxins in stored maize and rice grains in Liaoning Province, China. *Journal of Stored Products Research*, 2006; 42: 468-479.

MACLEAN JL, DAWE DC, HARDY B, HETTEL GP. Rice Almanac, Source Book for the Most Important Economic Activity on Earth, Third Edition. CABI Publishing in association with IRRI, WARDA, CIAT and FAO, Wallingford, 2002.

MARAGOS CM, APPELL M, LIPPOLIS V, VISCONTI A, CATUCCI L, PASCALE M. Use of cyclodextrins as modifiers of fluorescence in the detection of mycotoxins. *Food Additives and Contaminants*, 2008; 25 (2): 164-171.

MILLER DJ. Fungi and mycotoxins in grain: Implications for stored product research. *Journal of Stored Products Research*, 1995; 31: 1-16.

MOLDENHAUER KA, GIBBONS JH. Rice Morphology and Development. In: *Origin, History, Technology, and Production*, (Smith C. W., Dilday R. H., editors), Wiley Series in Crop Science, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2003; 103-127.

MÜCKE W, LEMMEN CH. Schimmelpilze, 3. Auflage. Ecomed Medizin, Verlagsgruppe Hüthig Jehle Rehm GmbH, 2004.

NESHEIM S, STACK ME. Preparation of Mycotoxin Standards. In: *Mycotoxin Protocols - Methods in Molecular Biology* 157 (Trucksess MW, Pohland AW; Hrsg.). Humana Press Inc., New Jersey, 2001; 31-36.

NGUYEN VN. Rice production, consumption and nutrition. *FAO Rice Information*, 2002; 3: 1-9.

NGUYEN MT, TOZLOVANU M, TRAN TL, PFOHL-LESZKOWICZ A. Occurrence of Aflatoxin B₁, Citrinin, Ochratoxin A in rice in five provinces of the central region of Vietnam. *Food Chemistry*, 2007; 105: 42-47.

NORDKVIST E, HÄGGBLOM P, STEPINSKA A, SVENSSON B. Rice by-products as a source for aflatoxin contamination in milk – a case study. Dept. of Animal Feed, National Veterinary Institute, Uppsala, Sweden, 2006.

R-BIOPHARM. Kobra Cell – An electrochemical cell for the derivatisation of Aflatoxins. R-Biopharm Rhône LTD, Darmstadt, 2002.

R-BIOPHARM. EASI-EXTRACT^R AFLATOXIN - For Detection of Total Aflatoxins Using HPLC. R-Biopharm Rhône LTD, Darmstadt, 2007.

REISS J. Schimmelpilze: Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung. 2. Auflage, Springer Verlag, Berlin, 1998.

REITER E. Die Entwicklung und Qualitätssicherung einer immunanalytischen Methode für die Aflatoxinbestimmung in Lebensmitteln. Universität Wien, Wien, 2007.

ROMER LABS. AflaStarTM-Immunaффinitätssäulchen. Romer Labs Diagnostic GmbH, Tulln, 2004.

SALEEMULLAH, IQBAL A, KHALIL I, SHAH H. Aflatoxin contents of stored and artificially inoculated cereals and nuts. Food Chemistry, 2006; 98: 699-703.

SALES AC, YOSHIZAWA T. Updated profile of aflatoxin and Aspergillus section Flavi contamination in rice and its byproducts from the Philippines. Food Additives and Contaminants, 2005; 22 (5): 429-436.

SANGARE-TIGORI B, MOUKHA S, KOUADIO JH, BETBEDER A, DANO DS, CREPPY EE. Co-occurrence of Aflatoxin B₁, fumonisin B₁, Ochratoxin A and zearalenone in cereals and peanuts from Cote d'Ivoire. Food Additives and Contaminants, 2006; 23 (10): 1000-1007.

SIDDIQ FA, MURALIDHARAN K, SHOBHA RN. Basmati rice. Directorate of Rice Research, Indian Council of Agricultural Research, New Delhi, 1997; 1-14.

SOBOLEV VS. Simple, Rapid, and Inexpensive Cleanup Method for Quantitation of Aflatoxins in Important Agricultural Products by HPLC. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007; 55: 2136-2141.

SOUCI SW, FACHMANN W, KRAUT H. Die Zusammensetzung der Lebensmittel-Nährwerttabellen, 6. Edition. (Deutsche Forschungsanstalt für LM-Chemie) Medpharm, Stuttgart, 2000; 557-62.

STROKA J, HOLST C, ANKLAM E, REUTTER M. Immunaaffinity Column Cleanup with Liquid Chromatography Using Post-Column Bromination for Determination of Aflatoxin B₁ in Cattle Feed: Collaborative Study. *Journal of Association Of Analytical Communities International*, 2003; 86 (6): 1179-1186.

STROKA J, PETZ M, JOERISSEN U, ANKLAM E. Investigation of various extractants for the analysis of aflatoxin B₁ in different food and feed matrices. *Food Additives and Contaminants*, 1999; 16 (8): 331-338.

TAM J, MANKOTIA M, MABLY M, PANTAZOPOULOS P, NEIL RJ, CALWAY P, SCOTT PM. Survey of breakfast and infant cereals for aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂. *Food Additives and Contaminants*, 2006; 23 (7): 693-699.

TOTEJA GS, MUKHERJEE A, DIWAKAR S, SINGH P, SAXENA BN, SINHA KK, SINHA AK, KUMAR N, NAGARAJA KV, BAI G, KRISHNA PRASAD CA, VANCHINATHAN S, ROY R, SARKAR S. Aflatoxin B₁ contamination of par-boiled rice samples collected from different states of India: A multi-centre study. *Food Additives and Contaminants*, 2006; 23 (4): 411-414.

USDA. Exports of milled rice (000 t), by country and geographical region, 1961-2007. USDA, 2007.

<http://www.irri.org/science/ricestat/data/may2008/WRS2008-Table12-USDA.pdf>
(Zugriff: 20.04.2008)

USDA. Rough rice production (000 t), by country and geographical region, 1961-2007. USDA, 2007.

<http://www.irri.org/science/ricestat/data/may2008/WRS2008-Table01-USDA.pdf>
(Zugriff: 20.04.2008)

WIKIPEDIA. Reis. <http://de.wikipedia.org/wiki/Reis> (Zugriff: 20.04.2008)

12. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gondwana mit verschiedenen Genomtypen von wildem Reis
(mod. nach [CHANG, 2003])

Abbildung 2: Entwicklung der zwei Kulturformen *O. sativa* und *O. glaberrima*
(mod. nach [CHANG, 2003])

Abbildung 3: Schematischer Aufbau einer Reispflanze
(mod. nach [<http://ipmworld.umn.edu/chapters/heinrich/eah001.gif>])

Abbildung 4: Aufbau des Reiskorns
(mod. nach [<http://www.ikisan.com/Images/ri.%20gm.%20Rice1.gif>])

Abbildung 5: Struktur von Fumonisin B₁

Abbildung 6: Struktur von Zearalenon

Abbildung 7: Struktur von Moniliformin

Abbildung 8: Struktur von Ochratoxin A

Abbildung 9: Struktur von Citrinin

Abbildung 10: Struktur von Patulin

Abbildung 11: Struktur von Sterigmatocystin

Abbildung 12: Strukturformel von AFB₁ und AFB₂

Abbildung 13: Strukturformeln von AFG₁, AFG₂, AFM₁ und AFM₂

Abbildung 14: Bildung des Aflatoxin B₁-8,9-epoxids

Abbildung 15: Hydroxylierung zu Aflatoxin M₁

Abbildung 16: Bildung des Hemiacetals Aflatoxin B_{2a}

Abbildung 17: Hydroxylierung zu Aflatoxin Q₁

Abbildung 18: Demethylierung von AFB₁ zu Aflatoxin P₁

Abbildung 19: Reversible Reduktion von AFB₁ zu Aflatoxicol

Abbildung 20: Derivatisierungsreaktion von Aflatoxin B₁ mit reaktivem Brom

Abbildung 21: Prinzip der Immunaффinitätschromatographie
(mod. nach [<http://www.pdeleuw.de/diss/analytik.html>, 1997])

Abbildung 22: Chromatogramm einer 100 ng/g Aflatoxin-Mixstandard-Lösung
mit Signalverstärkung durch eine elektrochemische Zelle (Kobra-Zelle)

Abbildung 23: Chromatogramm einer 100 ng/g Aflatoxin-Mixstandard-Lösung
ohne Signalverstärkung durch eine elektrochemische Zelle (Kobra-Zelle)

Abbildung 24: Kalibrationsgerade für AFB₁

Abbildung 25: Kalibrationsgerade für AFB₂

Abbildung 26: Kalibrationsgerade für AFG₁

Abbildung 27: Kalibrationsgerade für AFG₂

Abbildung 28: Chromatogramm Standard 1 mit folgenden Konzentrationen:
AFG₂: 0,32 ng/g (S/R: 5:1), AFG₁: 1,02 ng/g (S/R: 13:1), AFB₂: 0,29 ng/g (S/R: 10:1), AFB₁: 0,90 ng/g (S/R: 19:1)

Abbildung 29: Chromatogramm Standard 2 mit folgenden Konzentrationen:
AFG₂: 0,16 ng/g (S/R: 1:3), AFG₁: 0,52 ng/g (S/R: 7:1), AFB₂: 0,15 ng/g (S/R: 5:1), AFB₁: 0,45 ng/g (S/R: 9:1)

Abbildung 30: Chromatogramm Standard 3 mit folgenden Konzentrationen:
AFG₂: 0,08 ng/g (S/R: 2:1), AFG₁: 0,26 ng/g (S/R: 4,6:1), AFB₂: 0,08 ng/g (S/R: 3:1), AFB₁: 0,22 ng/g (S/R: 5,7:1)

Abbildung 31: Chromatogramm Standard 4 mit folgenden Konzentrationen:
AFG₂: 0,04 ng/g (S/R: 1,6:1), AFG₁: 0,13 ng/g (S/R: 1:3), AFB₂: 0,04 ng/g (S/R: 1,8:1), AFB₁: 0,11 ng/g (S/R: 3,6:1)

Abbildung 32: Chromatogramm einer Probe (ägyptischer Langkornreis E071299)

Abbildung 33: Chromatogramm einer negativen Probe Jasmin-Vollreis (E071371)

Abbildung 34: Chromatogramm einer negativen Probe polierter Jasminreis (E071375)

Abbildung 35: Chromatogramm eines negativen Rundkornreis (E080169)

Abbildung 36: Chromatogramm eines Basmatireis mit nicht verifizierbarer AFB₁-Konz. unter der Quantifizierungsgrenze (E080180)

Abbildung 37: Chromatogramm eines positiven indischen Langkornreis (E080178) mit AFB₁: 1,15 ng/g, AFB₂: 0,15 ng/g

Abbildung 38: Chromatogramm eines polierten indischen Basmatireis (E080175) mit AFB₁-Konzentration (2,16 ng/g) über dem gesetzlich erlaubten Höchstwert

Abbildung 39: Höchste gemessene Aflatoxinkonzentrationen mit 9,86 ng/g AFB₁ und 1,53 ng/g AFB₂ in einer Probe poliertem indischen Basmatireis (E071286 (2))

Abbildung 40: Chromatogramm einer Vollkornreiswaffel (E071293)

Abbildung 41: AFB₁-Messwerte mit MW (rot) und 2facher STABW der positiven Kontrollprobe an verschiedenen Tagen

Abbildung 42: AFB₂-Messwerte mit MW (rot) und 2facher STABW der positiven Kontrollprobe an verschiedenen Tagen

13. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Reisspezies, Chromosomenzahl, Genomabkürzung und geographische Verbreitung (mod. nach [CHANG, 2003])

Tabelle 2: Zusammensetzung des polierten und unpolierten Reiskorns (mod. nach [SOUCI et al., 2000])

Tabelle 3: Auswahl von AS in poliertem und unpoliertem Reis (mod. nach [SOUCI et al., 2000])

Tabelle 4: Vitamine in poliertem und unpoliertem Reis (mod. nach [SOUCI et al., 2000])

Tabelle 5: Mineralstoffe und Spurenelemente in poliertem und unpoliertem Reis (mod. nach [SOUCI et al., 2000])

Tabelle 6: Fettsäuren in poliertem und unpoliertem Reis (mod. nach [SOUCI et al., 2000])

Tabelle 7: LD₅₀-Werte von Aflatoxinen oral in mg/kg KG [MÜCKE und LEMMEN, 2004]

Tabelle 8: In der EU gesetzlich erlaubte Höchstgehalte von Aflatoxinen in Lebensmitteln [EUROPÄISCHE KOMMISSION: Richtlinie (EG) Nr. 1881/2006, 2006]

Tabelle 9: In der EU gesetzlich erlaubte Höchstgehalte für AFB₁ in Futtermitteln [EUROPÄISCHES PARLAMENT und RAT DER EUROPÄISCHEN UNION: Richtlinie (EG) Nr. 32/2002, 2002]

Tabelle 10: Sorte und Anzahl der verschiedenen analysierten Reisprodukte

Tabelle 11: Herkunftsländer der analysierten Reisproben

Tabelle 12: Pipettierschema

Tabelle 13: Aflatoxinkonzentrationen der hergestellten Standards

Tabelle 14: Messung der Wiederfindungsrate mit 4 ng/ml Aflatoxin-Mixstandard

Tabelle 15: Wiederfindungsraten mit 2 ng/ml Aflatoxin-Mixstandard

Tabelle 16: Bestimmung der Wiederfindungsrate mit einem 2 ng/ml Aflatoxin-Mix-Standard

Tabelle 17: Mit IAC-Säulen zweier verschiedener Hersteller erzielte Wiederfindungsraten

Tabelle 18: Bestimmung der Wiederfindung unter Verwendung verschiedener Lösungsmittel

Tabelle 19: Konzentrationen von Aflatoxin-Mixstandards (Supelco)

Tabelle 20: Wiederfindungsraten für nach Vorschrift von R-Biopharm aufgearbeitete Proben

Tabelle 21: Bestimmung der Wiederfindung mit zertifiziertem Aflatoxin-Mixstandard

Tabelle 22: Standards für die Bestimmung der Nachweis- und Quantifizierungsgrenze

Tabelle 23: Nachweisgrenze bzw. Quantifizierungsgrenze von Aflatoxinen in Reis

Tabelle 24: Aflatoxinkonzentrationen in analysierten Reisproben

Tabelle 25: Reisproben mit nicht verifizierbaren Aflatoxinkonzentrationen unter der Quantifizierungsgrenze (AFB₁: 0,45 ng/g, AFB₂: 0,50 ng/g, AFG₁: 0,52 ng/g, AFG₂: 0,60 ng/g)

Tabelle 26: Positive Reisproben mit Aflatoxinkonzentrationen über der Quantifizierungsgrenze

Tabelle 27: Positive Reisproben mit Aflatoxinkonzentrationen über den gesetzlichen erlaubten Höchstwerten der EU

Tabelle 28: Reproduzierbarkeit der Wiederfindung mit IAC bei verschiedenen Konzentrationen

Tabelle 29: Mit IAC-Säulen erzielte durchschnittliche Wiederfindung gespikter Reisproben über 3 Tage im Vergleich zu den Herstellerangaben

Tabelle 30: Analyse von Erdnussbutter als Referenz

Tabelle 31: Validierung der Methode mittels zertifiziertem Referenzmaterial (FAPAS)

Tabelle 32: Durchschnittliche Aflatoxinkonzentrationen einer positiven Kontrollprobe gemessen an verschiedenen Tagen

Tabelle 33: Durchschnittliche Wiederfindung direkt gespikter Reisproben

Tabelle 34: Wiederfindungsraten für verschiedene Extraktionsmittel aus mit 1 ng/g gespiktem Reismehl

14. Abkürzungen

ACN	Acetonitril
AFB ₁	Aflatoxin B ₁
AFB ₂	Aflatoxin B ₂
AFG ₁	Aflatoxin G ₁
AFG ₂	Aflatoxin G ₂
AFM ₁	Aflatoxin M ₁
AFM ₂	Aflatoxin M ₂
AS	Aminosäure
DC	Dünnschichtchromatographie
DIMEB	Heptakis-di-O-methyl- β -cyclodextrin
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
H ₂ O	Wasser
HNO ₃	Salpetersäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
IAC	Immunaффinitätschromatographie
IgA	Immunglobulin A
KBr	Kaliumbromid
NG	Nachweisgrenze
QG	Quantifizierungsgrenze
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometer
n. d.	nicht detektierbar
PBPB	Pyridiniumbromidperbromid
PBS	Phosphat Buffered Saline
STAW	Standardabweichung
TFA	Trifluoressigsäure
MW	Mittelwert

15. Lebenslauf

Florian Rudolf Vouk



Geburtsdatum: 24.05.1985

Geburtsort: Klagenfurt

Vater: Roman Vouk, Pädagoge

Mutter: Eveline Vouk-Schöfnagl, Pädagogin

Ausbildung: 1991 – 1995 Dr. Karl Renner Volksschule (zweisprachig Deutsch/Slowenisch)
 1995 – 2003 Europagymnasium Klagenfurt
 2003 – 2009 Studium Ernährungswissenschaften an der Universität Wien

Fremdsprachen: Englisch
 Italienisch
 Slowenisch

Praktika: OMV Gas Kärnten (2004)
 Magistrat Klagenfurt Abt. Umweltschutz (2004)
 Inst. f. Med. Chemie, Wien (2006)
 Vereinigte Kärntner Brauereien AG (2007)
 Veterinärmed. Universität Wien, Inst. f. Ernährung (2008)
