Zeitschrift: Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchungen und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 93 (2002)

Heft: 3

Artikel: Koffein als Störfaktor bei der Ochratoxin-A-Analyse

Autor: Good, Patrik, / Kandler, Helmut / Koch, Priska

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-981723

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 11.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Koffein als Störfaktor bei der Ochratoxin-A-Analyse

Patrik Good, Helmut Kandler, Priska Koch und Thomas Schärer, SQTS, Dietikon

Eingegangen 28. November 2001, angenommen 7. Mai 2002

Einleitung

Ochratoxin A (OTA) ist ein Sekundärmetabolit von Schimmelpilzen der Gattung *Penicillium* und *Aspergillus*. Dieses Mykotoxin wird auch in kalten oder gemässigten Klimazonen auf Lebens- und Futtermitteln gebildet. Die Bildung wird besonders durch die Temperatur sowie den Feuchtigkeitsgehalt während der Ernte und der Lagerzeit beeinflusst und ist durch geeignete Trocknungs-, Transport- und Lagerbedingungen weitgehend vermeidbar (1). OTA wurde in Getreide, Nüssen, Gewürzen, getrockneten Früchten, Fruchtsäften, Kaffee, Soja, Kakao, Mais, fermentierten Getränken (Wein, Bier), Fleisch, tierischen Organen sowie auch in Humanproben nachgewiesen (2) und hat karzinogene, nephrotoxische, teratogene sowie immunotoxische Eigenschaften (3, 4). Zum Nachweis von OTA wurden verschiedene Methoden publiziert, so z.B. konventionelle Säulenchromatographie mit HPLC-Detektion (5) oder immunochemische Methoden wie ELISA (6, 7). Die meisten dieser Methoden haben den Nachteil, dass sie nur für eine beschränkte Anzahl von Matrizes verwendbar sind. So zeigte die von uns verwendete Methode, die auf Arbeiten von *Pittet et al.* (8) basiert, in Kaffee wesentlich schlechtere Wiederfindungsraten als z.B. in Hafer, sobald die Beladung der Immunoaffinitätssäule einen bestimmten Wert überschreitet (OTA-haltiger Kaffee: ca. 0,6 g bei einer Konzentration von 6,5 mg Kaffee/ml Extrakt). Zudem ist mit der von Pittet beschriebenen Methode die OTA-Belastung von Gewürzen, wie z.B. Pfeffer, nicht messbar, da bei der HPLC-Analyse Störpeaks auftreten.

In dieser Studie wird eine modifizierte Methode für die OTA-Analyse in Kaffee[1] beschrieben. Diese Methode scheint auch für Gewürze verwendbar zu sein. Wie in Abbildung 4 ersichtlich, kann sie z.B. für weissen Pfeffer verwendet werden.

[1] Diese Studie wurde mit löslichem, gefriergetrocknetem Kaffee durchgeführt.

Experimentelles

Alle in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte aus Dreifach- oder Vierfachbestimmungen.

Material

Geräte

Schüttelgerät: SM25 (E. Bühler Laborgeräte); Vakuumsystem: Visiprep (Supelco); Stickstoff-Abdampfapparatur: Vapostat Berkely (Hugi); Vortexgerät: Vibrofix VF1 Elektronik (IKA-Labortechnik); HPLC-System HP 1050 bestehend aus: Autosampler HP 1050, Gradientenpumpe HP 1050, On-Line-Entgaser und Fluoreszenzdetektor HP 1046 AX, HP Chemstation.

Chemikalien

Alle verwendeten Lösungsmittel wiesen analytische Qualität auf. Als HPLC-Laufmittel wurden Lösungsmittel zur Chromatographie eingesetzt.

Bortrifluorid in Methanol (Fluka 15716); Koffein (Fluka 27602); Natriumacetattrihydrat (Merck 1.06267); Natriumhydrogencarbonat (Fluka 71630); Ochratest Immunoaffinitätssäulen (Vicam); Ochratoxin A (Sigma); Phosphate-buffered saline tablets (Oxoid); Stickstoff N50 (Carba Gas).

Proben

Für die Aufarbeitung der Proben wurde destilliertes Wasser verwendet. Für die Experimente wurden gefriergetrocknete, lösliche Kaffees verwendet: Blue Dream, koffeinfrei (Voncafe, Migros), Koffeingehalt 0,08 %[2]; Columban (Voncafe, Migros), Koffeingehalt 2,5 %[1].

Methoden

25,0 g feingemahlene und homogenisierte Probe wurden mit 200 ml Methanol/3 % $NaHCO_3$ (1:1 v/v) versetzt. Zur Extraktion wurde die Mischung 1 h auf dem Schüttelgerät geschüttelt und anschliessend filtriert. Zur Abtrennung von störender Matrix wurden 10,0 ml des Rohextraktes zweimal mit je 10 ml Dichloromethan extrahiert. Nach sorgfältiger Phasentrennung (bei Emulsionsbildung zentrifugieren bei 4000 rpm) wurden 5,0 ml der oberen Phase (entkoffeinierte wässerig-methanolische Lösung) in einen 100-ml-Messzylinder pipettiert und mit gesättigter phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) auf 100 ml verdünnt. Die verdünnte Extraktlösung wurde mit einem Fluss von ca. 1 Tropfen/s durch die Ochratestsäule eluiert. Anschliessend wurde die Säule mit 10 ml dest. Wasser (Fluss von ca. 2 Tropfen/s) gespült und mittels Vakuum kurz trocken gesaugt. Noch vorhandene Wasserspuren (Säule, Säulenausgang) wurden mittels Kleenexpapier und Wattestäbchen vorsichtig

[2] Koffeinbestimmung nach SLMB, Kapitel 36 C.

entfernt. Das gebundene Ochratoxin A wurde mit 4 ml Methanol in ein 10-ml-Braunglasröhrchen eluiert (Fluss ca. 1 Tropfen/2 s). Das Eluat wurde bei 50° C am N_2-Strom gerade zur Trockne eingeengt. Der erhaltene Rückstand wurde mit 250 µl mobiler Phase versetzt und durch 30 s schütteln (Vibrofix) gelöst. Vor dem Einspritzen in das HPLC-System wurde der gelöste Rückstand filtriert (Spartan-Einmalfilter 13/20) (9). Endkonzentration der Probenextrakte: 2,50 g Probe/ml Eluent. Die Extrakte bleiben bei Raumtemperatur ca. 12 h stabil.

Chromatographie

Säule:	Spherisorb ODS II, 5 mm, 250 × 3 mm
Vorsäule:	LiChroCART, 4-4 Kartusche mit LiChrospher 100 RP-18 (5 µm)
Mobile Phase:	40 % Acetonitril und 60 % eines Gemisches (19 + 1 v/v) bestehend aus einer wässeriger 4 mM Natriumacetatlösung sowie Essigsäure
Flussrate:	0,6 ml/min
Trenntemperatur:	50° C
Injektionsvolumen:	80 µl
Detektion:	Fluoreszenz; Anregung bei 330 nm, Emission bei 470 nm, Kantenfilter: 370 nm (FLD HP 1046 AX)

Nachweisgrenzen und Kalibrierung

Die Nachweisgrenze (S/N ca. 2) lag bei ca. 0,2 µg/kg Ochratoxin A in der Probe. Die Kalibrationen waren im untersuchten Bereich linear und verliefen durch den Nullpunkt.

Resultate und Diskussion

Diese Untersuchung wurde durchgeführt, weil bei Analysen von OTA in gefriergetrocknetem, löslichem Kaffee deutlich tiefere Wiederfindungen erhalten wurden als z.B. in Hafer (Abb. 1). So lagen die Wiederfindungsraten bei OTA-Gehalten in gefriergetrocknetem, löslichem Kaffee von über 5 µg/kg teilweise sogar unter 60 %, wenn die auf Arbeiten von *Pittet* basierende Methode (8) (ohne Extraktion mit Dichloromethan) verwendet wurde.

Aus Abbildung 1 ist ersichtlich, dass die Wiederfindung von OTA in Hafer auch bei steigender OTA-Konzentration relativ konstant bleibt (ca. 80 %), während jene von gefriergetrocknetem, löslichem Kaffee bei steigender OTA-Konzentration deutlich sinkt (von ca. 80 % bei einer OTA-Konzentration von 1 µg/kg auf ca. 60 % bei 8,5 µg/kg).

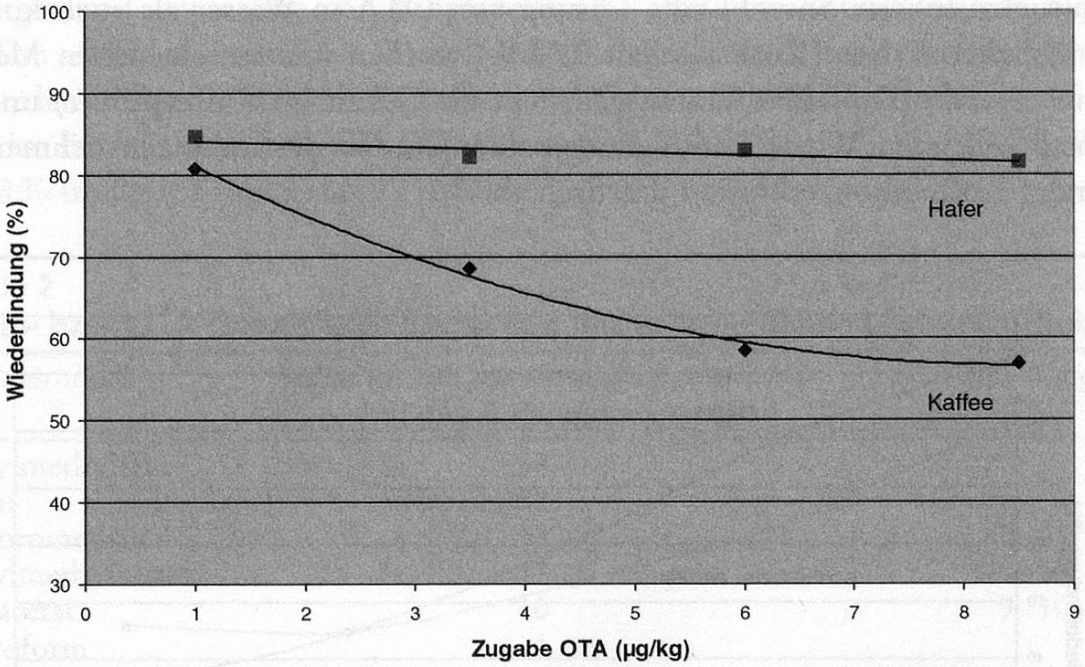

Abbildung 1 **Wiederfindung von OTA in gefriergetrocknetem, löslichem Kaffee und in Hafer**

Tabelle 1
Wiederfindung von OTA in verschiedenen Matrizes

Matrix	*OTA-Zusatz* (µg/kg)*	*Koffein-zusatz (%)*	*Wieder-findung (%)*	*(%)*	*(%)*	*(%)*	*Durchschnitt WF (%)*
Kaffeepulver	1		83	87	73		81
(gefriergetrocknet,	3,5		64	69	73		69
Koffeingehalt 2,5%)	6		57	56	62		58
	8,5		56	59	55		57
Hafer	1		89	70	95		85
	3,5		83	84	80		82
	6		82	83	83		83
	8,5		84	76	84		81
Wasser**	5	0	100	90	93	89	93
	5	2	83	71	83	81	80
	5	4	55	68	59	59	60
	5	6	43	43	47	45	45
	5	8	38	34	38	31	35
Kaffeepulver	5	0	83	80	83		82
(gefriergetrocknet,	5	2	68	64	61		64
Koffein-Gehalt 0,08 %)	5	4	57	52	50		53
	5	6	46	47	42		45
	5	8	46	47	44		46

* Bezogen auf Gehalt in Matrix; ** Zugabe gleicher Menge wie bei Kaffeepulver

Wie aus Abbildung 2 ersichtlich, ist der Matrixeffekt der Kaffeeproben auf Koffein zurückzuführen. Sowohl eine Lösung von OTA in Wasser als auch koffeinfreier löslicher Kaffee (Koffeingehalt 0,08 %) wurden mit verschiedenen Mengen Koffein versetzt (Koffeinzusatz ausgedrückt als Gehalt im Kaffeepulver) und auf die entsprechenden Wiederfindungen geprüft. Die Wiederfindungen nehmen mit steigender Koffeinkonzentration drastisch ab.

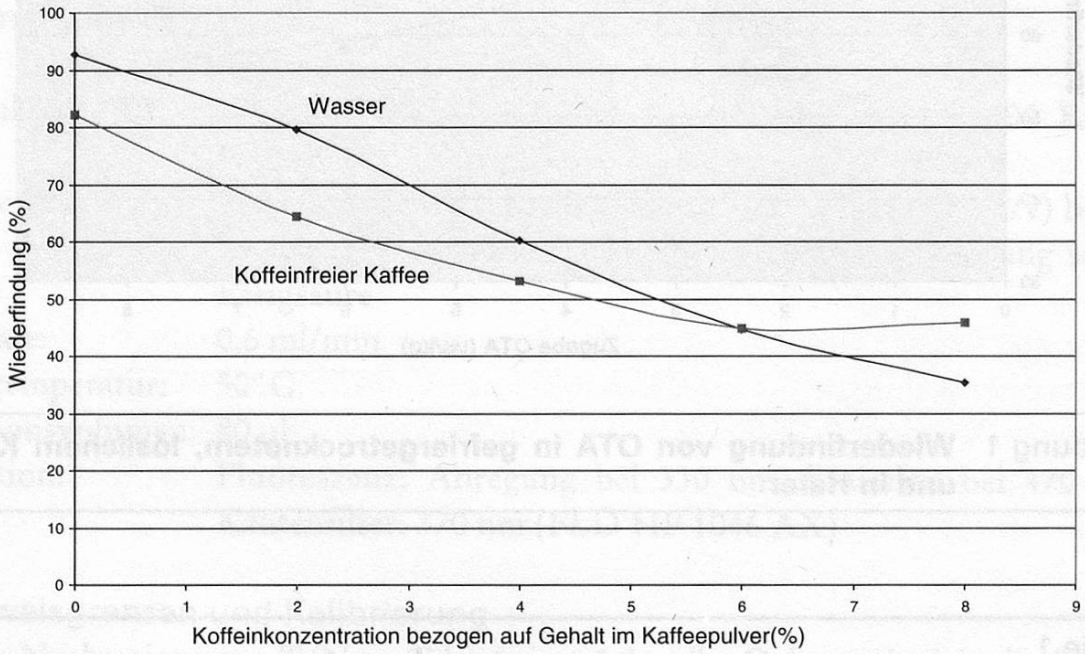

Abbildung 2 **Wiederfindung von OTA bei steigender Koffeinkonzentration in Wasser und in koffeinfreiem, löslichem Kaffee**

Kaffee kann bis zu 3 % Koffein enthalten, dies macht eine Koffeinentfernung bei der OTA-Analyse unabdingbar. Industriell bekannte Verfahren zum Entkoffeinieren von Kaffee sind: Extraktion mit Dichloromethan, kontinuierliche Entkoffeinierung mit überkritischem Kohlendioxid, Verwendung von Quellkohlensäure/Wasser bzw. von Wasser mit Kohlefiltern.

Da Dichloromethan ein problematisches Lösungsmittel ist (Toxikologie/Ökologie), wurde in der Folge untersucht, ob Alternativlösungsmittel verwendet werden können.

Ethylacetat, Diethylether, t-Butylmethylether und i-Butylmethylketon ergaben aber, auch teilweise unter Aussalzen, eine schlechte Phasentrennung. Butanol, Aceton sowie Ethylmethylketon brachten, auch mit Aussalzen, keine Phasentrennung. Eine gute Phasentrennung von Kaffee-Extrakt wurde hingegen mit chlorierten Lösungsmitteln wie Dichloromethan, Chloroform und 1.1.1-Trichloroethan sowie mit Toluen erreicht.

Wie aus Tabelle 2 ersichtlich ist, ergibt nur die Verwendung der chlorierten Lösungsmittel sowie jene von Ethylacetat eine effiziente Extraktion von Koffein. Deutlich schlechter schneidet i-Butylmethylketon ab, und als unbrauchbar betrachtet werden können t-Butylmethylether und Toluen. Die Wiederfindung von OTA nach der Extraktion betrug mit Dichloromethan 82–92 %, mit i-Butylmethylketon 43–58 % und mit Ethylacetat 9–10 %.

Tabelle 2
Koffein- bzw. OTA-Gehalt nach Extraktion mit verschiedenen Lösungsmitteln

Lösungsmittel	*Koffeingehalt (zweimalige Extraktion) (%) des Anfangsgehaltes*	*Wiederfindung OTA (%)*
t-Butylmethylether	38	
Toluen	52	
Dichloromethan	3	82–92
i-Butylmethylketon	27	43–58
Ethylacetat	10	9–10
Chloroform	1	

Diese Experimente zeigen deutlich, dass Dichloromethan mit den untersuchten Lösungsmitteln nicht ersetzt werden kann.

Dass die Wiederfindung mittels der neu entwickelten Methode konstant in einem Bereich von 80–90 % liegt, zeigte die Untersuchung von mehr als dreissig verschiedenen Kaffeesorten. Sowohl löslicher als auch gerösteter Kaffee wurde mit jeweils 5 µg/kg OTA versetzt und die Wiederfindung bestimmt.

Unter Verwendung der verbesserten Methode bei der Extraktion von gefriergetrocknetem, löslichem Kaffee steigen nicht nur die Wiederfindungsraten, auch die Chromatogramme sind wesentlich besser auswert- und interpretierbar. Dies ist in Abbildung 3 ersichtlich, wo ein Chromatogramm eines Kaffee-Extraktes, der nach der Pittet-Methode (8) hergestellt wurde (links) mit einem Chromatogramm eines Extraktes mit zusätzlicher Dichloromethan-Extraktion (rechts) verglichen wird.

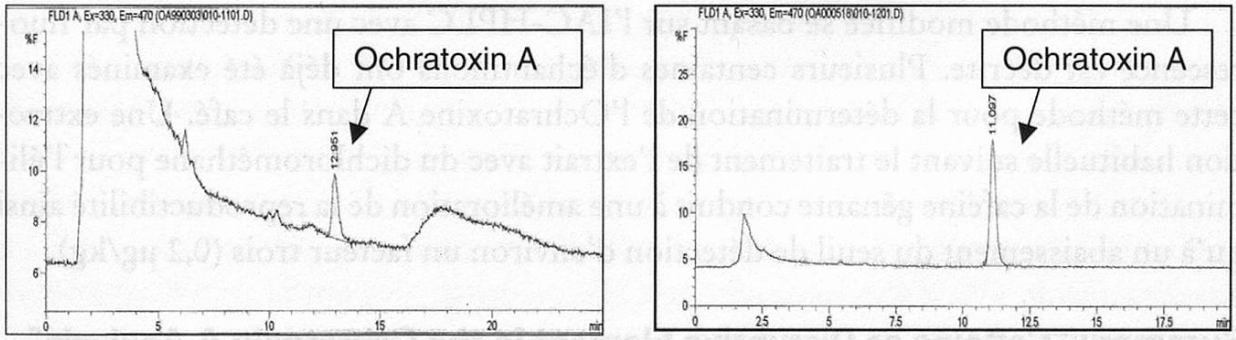

Abbildung 3 **Vergleich der Chromatogramme von löslichem Kaffee ohne/mit zusätzlicher Dichloromethan-Extraktion**

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze konnte mit diesem zusätzlichen Extraktionsschritt um den Faktor drei gesenkt werden.

Ein noch drastischeres Bild wird erhalten, wenn Gewürze untersucht werden. Auch bei Gewürzen werden Substanzen, die die Chromatographie erheblich stören, durch die zusätzliche Extraktion entfernt. In Abbildung 4 werden Chromatogramme von weissem Pfefferextrakt gezeigt. Auch hier wird der Vorteil der Dichloromethan-Extraktion mehr als deutlich (rechtes Chromatogramm: weisser Pfefferextrakt nach Dichloromethan-Extraktion).

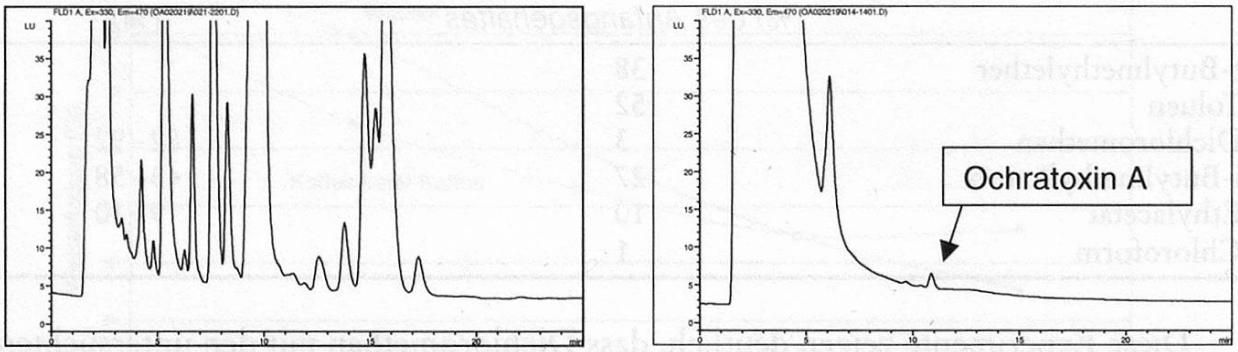

Abbildung 4 **Vergleich der Chromatogramme von weissem Pfeffer ohne/mit zusätzlicher Dichloromethan-Extraktion**

Zusammenfassung

Es wird eine modifizierte auf IAC-HPLC mit Fluoreszenzdetektion basierende Methode zur Bestimmung von Ochratoxin A in Kaffee beschrieben, mit der bereits mehrere Hundert Proben untersucht wurden. Eine der üblichen Extraktion folgende Behandlung des Extrakts mit Dichloromethan zur Entfernung von störendem Koffein führt zu einer Verbesserung der Wiederfindung sowie zu einer Senkung der Nachweisgrenze um den Faktor drei auf 0,2 µg/kg.

Résumé

Une méthode modifiée se basant sur l'IAC-HPLC avec une détection par fluorescence est décrite. Plusieurs centaines d'échantillons ont déjà été examinés avec cette méthode pour la détermination de l'Ochratoxine A dans le café. Une extraction habituelle suivant le traitement de l'extrait avec du dichlorométhane pour l'élimination de la caféine gênante conduit à une amélioration de la reproductibilité ainsi qu'à un abaissement du seuil de détection d'environ un facteur trois (0,2 µg/kg).

Summary "Caffeine as Disruptive Element in the Ochratoxin A Analysis"

Several hundreds of analyses were already performed with the described method for the analysis of OTA in coffee, which is based on IAC-HPLC with fluorescence detection. After the usual extraction of the sample, an additional extraction with

dichloromethane was performed in order to remove disturbing caffeine. This treatment of the sample enhances the recovery and lets the limit of detection drop by a factor of three to 0.2 µg/kg.

Key words

Ochratoxin A, Analysis, Coffee, Spices

Literatur

1 *Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG):* Ochratoxin A: Vorkommen und toxikologische Bewertung. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1990.

2 *Petzinger, E.:* Ochratoxin A aus toxikologischer Sicht. Getreide, Mehl, Brot **52**, 358–362 (1998).

3 *Kuiper-Goodman, T.* and *Scott, P.M.:* Review: Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. Biomed. Environ. Sci. **2**, 179–248 (1989).

4 *Trucksess, M.W.* and *Pohland, A.E.:* Mycotoxin protocols. Humana Press, New Jersey 2000.

5 *Majerus, P., Weber, R.* und *Wolff, J.:* Nachweis und Bestimmung von Ochratoxin A in Getreide und Getreideprodukten. Bundesgesundheitsbl. **11**, 454–458 (1994).

6 *Clarke, J.R., Marquardt, R.R., Frohlich, A.A.* and *Pitura, R.J.:* Quantification of ochratoxin A in swine kidneys by enzyme-linked immunosorbent assay using a simplified sample preparation procedure. J. Food Protection **57**, 991–995 (1994).

7 *Morgan, M.R.A., McNerney, R.* and *Chan, H.W.S.:* Enzyme-linked immunosorbent assay of ochratoxin A in barley. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **67**, 45 (1984).

8 *Blanc, M., Pittet, A., Munoz-Box, M.* and *Viani, R.:* Behavior of ochratoxin A during green coffee roasting and soluble coffee manufacture. J. Agric. Food Chem. **11**, 3564–3569 (1996).

9 *Berchner, C.:* Optimierung der Aflatoxinbestimmung in Nüssen mittels HPLC. Diplomarbeit, Technische Fachhochschule Berlin 1993.

Korrespondenzadresse: Dr. Priska Koch, SQTS, Postfach 252, CH-8953 Dietikon 1