

Ochratoxin A – Bestimmung von Ochratoxin A in Serum mittels CE-LIF

Biomonitoring-Methode

G. Köller¹
U. E. Rolle-Kampczyk¹
P. Popp²
O. Herbarth^{1,3}

T. Göen^{4,*}
A. Hartwig^{5,*}
MAK Commission^{6,*}

Keywords:

Ochratoxin A, OTA,
Biomonitoring, Serum, Blut,
CE-LIF

- ¹ Entwickler der Methode, Helmholtz Zentrum für Umweltforschung (UFZ), Department Expositions- und Epidemiologie, Permoserstraße 15, 04318 Leipzig, Deutschland
- ² Entwickler der Methode, Helmholtz Zentrum für Umweltforschung (UFZ), Department Analytik, Permoserstraße 15, 04318 Leipzig, Deutschland
- ³ Entwickler der Methode, Institut für Umweltmedizin und Hygiene, Medizinische Fakultät der Universität Leipzig, Liebigstraße 27, 04103 Leipzig, Deutschland
- ⁴ Leiter der Arbeitsgruppe „Analysen in biologischem Material“, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, Friedrich-Alexander-Universität (FAU) Erlangen-Nürnberg, Henkestraße 9–11, 91054 Erlangen, Deutschland
- ⁵ Vorsitzende der Ständigen Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung Lebensmittelchemie und Toxikologie, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Adenauerring 20a, Geb. 50.41, 76131 Karlsruhe, Deutschland
- ⁶ Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Kennedyallee 40, 53175 Bonn, Deutschland

* E-Mail: T. Göen (thomas.goeen@fau.de), A. Hartwig (andrea.hartwig@kit.edu), MAK Commission (arbeitsstoffkommission@dfg.de)

Abstract

The working group “Analyses in Biological Materials” of the Permanent Senate Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in the Work Area developed the presented biomonitoring method.

The method enables the determination of ochratoxin A in small volumes of serum. The samples are purified by liquid-liquid extraction and the analyte is extracted from the acidified sample with dichloromethane. After the extraction agent has been removed, the residue is dissolved in water. The extracts are injected into the capillary, then the individual components are separated by capillary electrophoresis and detected by laser-induced fluorescence. Coumarin-3-carboxylic acid is used as an internal standard.

Calibration standards are prepared in serum and processed in the same way as the samples to be analysed.

Citation Note:

Köller G, Rolle-Kampczyk UE, Popp P, Herbarth O, Göen T, Hartwig A, MAK Commission. Ochratoxin A – Bestimmung von Ochratoxin A in Serum mittels CE-LIF. Biomonitoring-Methode. MAK Collect Occup Health Saf. 2020 Dez;5(4):Doc093. DOI: [10.34865/bi30347d5_4or](https://doi.org/10.34865/bi30347d5_4or)

Manuskript abgeschlossen:
24 Apr 2008

Publikationsdatum:
21 Dez 2020

License: This article is distributed under the terms of the Creative Commons 4.0 International License. See license information at <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



1 Kenndaten der Methode

Matrix	Serum
Analytisches Messprinzip	Kapillarelektrophorese mit laserinduzierter Fluoreszenzdetektion (CE-LIF)

Parameter und entsprechender Arbeitsstoff

Arbeitsstoff	CAS-Nr.	Parameter	CAS-Nr.
Ochratoxin A	303-47-9	Ochratoxin A	303-47-9

Zuverlässigkeitskriterien

Ochratoxin A

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 20,5\%$, 11,6 % bzw. 4,90 %
	Streubereich	$u = 88,2\%$, 49,9 % bzw. 21,1 %
	bei einer dotierten Konzentration von 0,5 µg, 2,0 µg bzw. 10,0 µg Ochratoxin A pro Liter Serum und n = 3 Bestimmungen	
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 27,9\%$, 17,0 % bzw. 6,90 %
	Streubereich	$u = 120\%$, 73,2 % bzw. 29,7 %
	bei einer dotierten Konzentration von 0,5 µg, 2,0 µg bzw. 10,0 µg Ochratoxin A pro Liter Serum und n = 3 Bestimmungen	
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel.)	$r = 95\%$
	bei einer dotierten Konzentration von 5,0 µg Ochratoxin A pro Liter Serum und n = 4 Bestimmungen	
Nachweisgrenze:	0,2 µg Ochratoxin A pro Liter Serum	
Bestimmungsgrenze:	0,6 µg Ochratoxin A pro Liter Serum	

2 Allgemeine Informationen zu Ochratoxin A

Ochratoxin A ist ein natürlich vorkommendes Mykotoxin, das erstmals im Jahr 1965 isoliert und chemisch charakterisiert wurde (Abbildung 1).

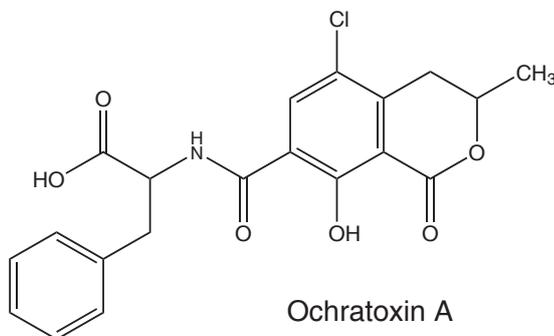


Abb. 1 Struktur des Ochratoxin A

Ochratoxin A wird von verschiedenen Schimmelpilzarten der Gattungen *Penicillium* und *Aspergillus* (*Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius*, *Penicillium verrucosum*) gebildet, die in der Natur weit verbreitet vorkommen. Mykotoxine wie Ochratoxin A können sich während des Pflanzenwachstums bilden, meistens entstehen sie jedoch später bei der Lagerung pflanzlichen Materials. Dementsprechend findet sich Ochratoxin A sowohl in Futtermitteln für Nutztiere als auch in für die menschliche Ernährung vorgesehenen Lebensmitteln.

Was die menschliche Ernährung anbelangt, so sind hauptsächlich Getreide und Getreideprodukte (Rizzo et al. 2002), Trockenfrüchte, Gewürze (Scheuer und Gareis 2002), Nüsse (Overy et al. 2003) und Kaffee (Joosten et al. 2001; Taniwaki et al. 2003) sowie Wein (Battilani und Pietri 2002; Visconti et al. 1999) mit Ochratoxin A belastet. Aber auch die aus dem Tierfutter resultierenden Gehalte von Ochratoxin A in Schweine- und Geflügelfleisch sowie Käse können zur Exposition des Menschen beitragen (CONTAM 2019).

In der Europäischen Union sind die Höchstgehalte für Ochratoxin A in pflanzlichen Lebensmitteln in der Verordnung EG 1881/2006 (Europäische Kommission 2006) festgesetzt und liegen – mit Ausnahme von Süßholzextrakt – zwischen 0,5 µg/kg und 20 µg/kg. Die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (*European Food Safety Authority*, EFSA) legt für Ochratoxin A aktuell, aufgrund der kanzerogenen und genotoxischen Wirkung des Stoffes, keinen TDI-Wert (*Tolerable Daily Intake*, tolerierbare tägliche Aufnahmemenge) fest (CONTAM 2019).

Das durch den Verzehr Ochratoxin A-haltiger Nahrungsmittel in den menschlichen Organismus gelangte Mykotoxin lässt sich im Blutserum (Malir et al. 2016; Thuvander et al. 2001) sowie im Urin (Malir et al. 2016) nachweisen. Die Tatsache, dass in fast allen menschlichen Blutseren, so auch in Deutschland, Ochratoxin A nachgewiesen werden kann, lässt auf eine kontinuierliche Ochratoxin A-Belastung des Verbrauchers durch pflanzliche und tierische Lebensmittel schließen (Märtlbauer et al. 2009).

Während die nicht beruflich belastete Allgemeinbevölkerung Ochratoxin A hauptsächlich mit der Nahrung aufnimmt, ist an Arbeitsplätzen auch die inhalative Aufnahme von Ochratoxin A-haltigen Stäuben möglich. Untersuchungen an Beschäftigten ergaben, dass es in der Lebensmittelproduktion (Degen et al. 2007), der Lebensmittelverarbeitung (Iavicoli et al. 2002) und auch im Bereich der Abfallwirtschaft (Degen et al. 2003) zu erhöhten Ochratoxin A-Expositionen kommen kann (Tabelle 1).

Tab. 1 Ochratoxin A im Serum nach beruflicher Belastung

Tätigkeitsbereich (Land)	Personenzahl n	Ochratoxin A im Serum [$\mu\text{g/l}$]			Literatur
		Mittelwert	Median	Bereich	
Mälzerei/Gerste – Juli (Deutschland)	7	–	0,34	0,13–2,60	Gareis und Meussdoerffer 2000
Mälzerei/Gerste – Oktober (Deutschland)	7	–	0,58	0,49–0,93	
Kontrolle/Allgemeinbevölkerung (Deutschland)	74	–	0,21	0,07–0,91	
Lebensmittelverarbeitung (Kaffee, Kakao, Gewürze) (Italien)	6	2,29 \pm 0,99	–	0,94–3,28	Iavicoli et al. 2002
Kontrolle (Italien)	23	0,33 \pm 0,25	–	0,03–0,95	
Deponiarbeiter (EU)	76	–	0,36	o. A. ^{a)} –1,65	Degen et al. 2003
Wertstoffarbeiter (EU)	60	–	0,53	o. A.–2,89	
Kontrolle (EU)	84	–	0,39	o. A.–2,00	
Getreideanbau (Norwegen)	106	0,37	–	0,021–2,84	Skaug 2003
Kontrolle (Norwegen)	104	0,42	–	0,036–5,53	
Güterumschlag (Getreide, Rohkaffee) (Deutschland)	9	0,53 \pm 0,30	0,42	0,14–1,04	Degen et al. 2005
Getreidesilos (Gerste, Weizen, Reis, Hafer) (Deutschland)	61	0,28 \pm 0,13	0,26	0,07–0,75	Degen et al. 2007

^{a)} ohne Angabe

Nach oraler Aufnahme wird Ochratoxin A schnell resorbiert und liegt im menschlichen Organismus fast vollständig an Albumin oder andere Serumproteine gebunden vor. Daraus resultiert eine lange Eliminationshalbwertszeit von bis zu 35 Tagen. Ochratoxin A wird hauptsächlich zu Ochratoxin-alpha verstoffwechselt und in glucuronidierter Form ausgeschieden. Grundsätzlich werden Ochratoxin A und seine Metabolite beim Menschen vor allem über die Nieren ausgeschieden, die auch das Hauptzielorgan der toxikologischen Wirkung darstellen (CONTAM 2019).

Von der Kommission wurde Ochratoxin A in Kategorie 2 der krebserzeugenden Arbeitsstoffe eingestuft und in die Keimzellmutagenitäts-Kategorie 3 B (DFG 2020). Die IARC (*International Agency for Research on Cancer*) stuft Ochratoxin A in Gruppe 2B, also als möglicherweise krebserzeugend für den Menschen ein (IARC 1993). Details zur toxikologischen Bewertung des Ochratoxin A können der entsprechenden MAK-Begründung (Greim 2003) und der EFSA-Publikation (CONTAM 2019) entnommen werden.

Die hier dargestellte Methode wurde bereits international publiziert (Köller et al. 2004).

3 Grundlage des Verfahrens

Die vorliegende Methode dient der Erfassung von Ochratoxin A in kleinen Serumvolumina. Die Proben werden durch Flüssig-Flüssig-Extraktion aufgereinigt und der Analyt aus der angesäuerten Probe mit Dichlormethan extrahiert. Nach Abblasen des Extraktionsmittels wird der Rückstand in Wasser aufgenommen. Die Extrakte werden in die Kapillare eingebracht, die einzelnen Bestandteile mittels Kapillarelektrophorese getrennt und mit laserinduzierter Fluoreszenz detektiert. Cumarin-3-carbonsäure wird als interner Standard (ISTD) verwendet.

Die Kalibrierung erfolgt mit Kalibrierstandards, die in Serum angesetzt und in der gleichen Weise behandelt werden wie die zu analysierenden Proben.

4 Geräte, Chemikalien und Lösungen

4.1 Geräte

- Kapillarelektrophorese-System (z. B. HP3D, Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn)
- Helium-Cadmium-Laser, 325 nm (z. B. Melles Griot Serie 56, IDEX Health & Science, New York, USA)
- Laserinduziertes Fluoreszenz-Detektionssystem (LIF-Detektor) (z. B. Picometrics ZetaLIF, ADELIS SAS, Grabels, Frankreich)
- Kapillarsäule aus Quarzglas mit einem Innendurchmesser von 50 µm (z. B. Molex Polymicro™, Optronics GmbH, Kehl)
- Mikrozentrifuge (z. B. Galaxy 14D, VWR International GmbH, Darmstadt)
- Vortex-Schüttler (z. B. Vortex 2, IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen)
- pH-Meter (z. B. Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin)
- Präzisionswaage (z. B. Sartorius AG, Göttingen)
- Bechergläser (z. B. Brand GmbH & Co. KG, Wertheim)
- 10-ml-, 100-ml- und 500-ml-Messkolben (z. B. VWR International GmbH, Darmstadt)
- 10-ml-Vollpipette (z. B. Brand GmbH & Co. KG, Wertheim)
- Mikroliterpipetten, variabel einstellbar mit passenden Pipettenspitzen (z. B. Eppendorf AG, Hamburg)
- 2-ml-Glasvials mit Schraubverschluss und PTFE-kaschierten Septen (z. B. Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn)
- 0,5-ml-Polypropylen-Reaktionsgefäße (z. B. Eppendorf AG, Hamburg)
- 0,2-ml-Polypropylen-Vials (z. B. Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn)
- Spritzenvorsatzfilter, 0,45 µm (z. B. MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren)
- 4-ml-Serummonovetten (z. B. Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht)

4.2 Chemikalien

Wenn nicht anders angegeben, sind alle genannten Chemikalien mindestens in p. a.-Qualität zu verwenden.

- Acetonitril (z. B. Merck KGaA, Darmstadt, Nr. 100017)
- Cumarin-3-carbonsäure (z. B. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Nr. C85603)
- Dichlormethan (z. B. Merck KGaA, Darmstadt, Nr. 100668)
- Dinatriumhydrogenphosphat-Heptahydrat (z. B. Merck KGaA, Darmstadt, Nr. 106575)
- Methanol (z. B. Merck KGaA, Darmstadt, Nr. 100837)
- Natriumchlorid (z. B. Merck KGaA, Darmstadt, Nr. 106404)

- Natriumhydrogencarbonat (z. B. Merck KGaA, Darmstadt, Nr. 106329)
- Natriumhydroxidplättchen (z. B. Merck KGaA, Darmstadt, Nr. 106469)
- Ochratoxin A aus *A. ochraceus* (z. B. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Nr. O3007)
- *ortho*-Phosphorsäure 85 % (z. B. Merck KGaA, Darmstadt, Nr. 100552)
- *ortho*-Phosphorsäure 20 % (z. B. VWR International GmbH, Darmstadt, Nr. KRAF20132.2000)
- Hochreines Wasser (z. B. Milli-Q plus VE System (>18 MΩ), Merck KGaA, Darmstadt)
- Argon 5.0 (z. B. Linde GmbH, Pullach)

4.3 Lösungen

Alle Lösungen werden vor Gebrauch mit einem 0,45-µm-Spritzenvorsatzfilter filtriert.

- Lösung A
Genau 1,68 g Natriumhydrogencarbonat werden in einen 100-ml-Messkolben eingewogen und in hochreinem Wasser gelöst. Der Messkolben wird bis zur Markierung mit hochreinem Wasser aufgefüllt.
- Lösung B
In einen 10-ml-Messkolben werden genau 1,2 g Natriumchlorid eingewogen und in ca. 2 ml hochreinem Wasser gelöst. Es werden 1,3 ml 85%iger *ortho*-Phosphorsäure hinzupipettiert und der Messkolben bis zur Markierung mit hochreinem Wasser aufgefüllt.
- Natronlauge (1 mol/l)
In einem 250-ml-Becherglas werden 50 ml hochreines Wasser vorgelegt. Genau 4 g Natriumhydroxidplättchen werden hinzugegeben und unter Rühren gelöst. Die Lösung wird unter Nachspülen mit Wasser in einen 100-ml-Messkolben umgefüllt und dieser bis zur Markierung mit hochreinem Wasser aufgefüllt.
- Natronlauge (0,1 mol/l)
10 ml der 1 mol/l Natronlauge werden in einem 100-ml-Messkolben vorgelegt und dieser mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.
- Phosphatpuffer (60 mmol/l, pH 7)
Genau 4,02 mg Dinatriumhydrogenphosphat-Heptahydrat werden in ein 600-ml-Becherglas eingewogen und in 400 ml hochreinem Wasser gelöst. Durch Zutropfen einer 20%igen Phosphorsäure wird der pH-Wert auf pH 7 eingestellt. Die Lösung wird in einen 500-ml-Messkolben umgefüllt und dieser mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.

Die Lösungen werden bei Raumtemperatur gelagert und sind unter diesen Bedingungen mindestens drei Monate haltbar.

4.4 Interner Standard (ISTD)

- ISTD-Stammlösung (2900 mg/l)
29 mg Cumarin-3-carbonsäure werden in einen 10-ml-Messkolben eingewogen und in Acetonitril gelöst. Der Messkolben wird mit Acetonitril bis zur Markierung aufgefüllt.

Die ISTD-Stammlösung wird bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und ist unter diesen Bedingungen mindestens zwei Monate haltbar.

- ISTD-Dotierlösung (870 mg/l)

In einem 2-ml-Glasvial werden $330\text{ }\mu\text{l}$ der Cumarin-3-carbonsäure-Stammlösung mit $770\text{ }\mu\text{l}$ hochreinem Wasser versetzt und gut durchmischt.

Die ISTD-Dotierlösung wird arbeitstäglich frisch hergestellt und vor Gebrauch mit einem $0,45\text{-}\mu\text{m}$ -Spritzenvorsatzfilter filtriert.

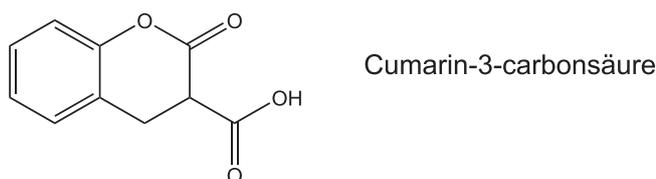


Abb. 2 Struktur des internen Standards (Cumarin-3-carbonsäure)

4.5 Kalibrierstandards

- Ochratoxin A-Stammlösung (500 mg/l)

5 mg Ochratoxin A werden in einen 10-ml-Messkolben exakt eingewogen und in Methanol gelöst. Der Messkolben wird mit Methanol bis zur Markierung aufgefüllt.

Die Ochratoxin A-Stammlösung wird bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und ist unter diesen Bedingungen mindestens drei Monate ohne Analytverlust stabil.

- Ochratoxin A-Arbeitslösung 1 (5 mg/l)

$100\text{ }\mu\text{l}$ der Ochratoxin A-Stammlösung werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert. Der Messkolben wird bis zur Markierung mit hochreinem Wasser aufgefüllt und die Lösung gut gemischt.

- Ochratoxin A-Arbeitslösung 2 (250 $\mu\text{g/l}$)

$500\text{ }\mu\text{l}$ der Ochratoxin A-Arbeitslösung 1 werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert. Der Messkolben wird bis zur Markierung mit hochreinem Wasser aufgefüllt und die Lösung gut gemischt.

Die Ochratoxin A-Arbeitslösungen sind bei Lagerung bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Kühlschrank maximal eine Woche haltbar.

Dotierlösungen in einem Konzentrationsbereich von $0,5\text{--}250\text{ }\mu\text{g/l}$ werden aus der Ochratoxin A-Arbeitslösung 2 durch Verdünnen mit Wasser hergestellt. Aus diesen Dotierlösungen werden die Kalibrierstandards hergestellt, indem jeweils $25\text{ }\mu\text{l}$ Dotierlösung zu $100\text{ }\mu\text{l}$ Serum pipettiert werden. Die so hergestellten Kalibrierstandards werden auf dem Vortex-Schüttler gut durchmischt. In Tabelle 2 ist das Pipettierschema für die Herstellung der Kalibrierstandards dargestellt.

Tab. 2 Pipettierschema für die Herstellung der Kalibrierstandards zur Bestimmung von Ochratoxin A in Serum

Kalibrierstandard	Ochratoxin A-Arbeitslösung 2 [µl]	Hochreines Wasser [µl]	Konzentration Dotierlösung [µg/l]	Konzentration Kalibrierstandard [µg/l]
1	10	990	2,5	0,5
2	20	980	5	1
3	50	950	12,5	2,5
4	100	900	25	5
5	200	800	50	10
6	500	500	125	25
7	1000	0	250	50

Die Kalibrierstandards werden arbeitstäglich frisch hergestellt. In Abhängigkeit von den zu erwartenden Belastungen kann der Konzentrationsbereich der Kalibrierung angepasst werden. Im Normalfall sollte eine Kalibrierung bis 10 µg/l ausreichen.

5 Probenahme und Probenaufbereitung

5.1 Probenahme

Die Blutentnahme erfolgt mit Serum-Monovetten. Die Monovetten werden nach der Blutentnahme mehrmals leicht geschwenkt und anschließend mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Blutzellen werden durch Zentrifugation (10 Minuten bei 3000 U/min; 4 °C) abgetrennt und das Serum abpipettiert.

5.2 Probenaufbereitung

In ein 0,2-ml-Polypropylen-Vial werden 20 µl Serum und 20 µl der Lösung A pipettiert. Die alkalische Probenlösung (pH > 9) wird zweimal mit 100 µl Dichlormethan ausgeschüttelt, wobei die organische Phase jeweils abgetrennt und verworfen wird. Danach wird durch Zugabe von 100 µl der Lösung B angesäuert und dreimal mit 100 µl Dichlormethan extrahiert. Das Ausschütteln erfolgt dabei mit einem Vortex-Schüttler jeweils für fünf Minuten. Im Anschluss an die Extraktionsschritte wird jeweils für zweieinhalb Minuten bei 14 000 × g zentrifugiert, um eine bessere Phasentrennung zu erzielen. Nach dem Zentrifugieren entsteht ein Dreiphasengemisch, bei dem die obere wässrige Phase und die untere organische Phase durch die als weißer Ring erscheinende Proteinfraktion getrennt sind. Die organische Phase wird jeweils abpipettiert und in ein Gläschen mit konischem Insert gegeben. Die vereinigten Extrakte werden im Argonstrom bis zur Trockne abgeblasen. Der Rückstand wird in 20 µl der ISTD-Dotierlösung aufgenommen.

Sofern die Notwendigkeit eines Mikroansatzes nicht gegeben ist, kann mit größeren Probenvolumina gearbeitet werden.

6 Instrumentelle Arbeitsbedingungen

Die analytische Bestimmung erfolgt mit Kapillarelektrophorese und laserinduzierter Fluoreszenzdetektion (CE-LIF).

Die Kapillarelektrophoreseanlage besteht aus einer thermostatisierten Kapillare, die mit ihren Enden in ein Kathoden- und ein Anodenpufferreservoir taucht. Auch die an das Hochspannungsnetzgerät angeschlossenen Elektroden tauchen in diese Reservoirs. Nahe dem anodenseitigen Ende befindet sich das Messfenster, das durch den

Strahlengang von Laser und Photozelle reicht. Das Signal des Detektors wird auf einen PC übertragen. Der schematische Aufbau einer CE-LIF-Apparatur ist in Abbildung 3 dargestellt.

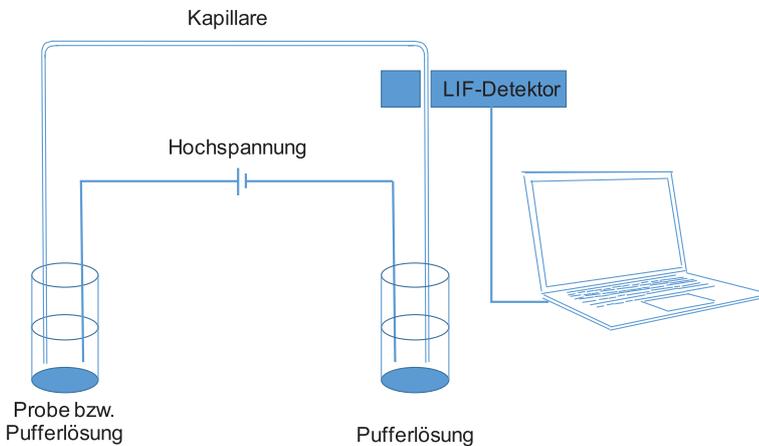


Abb. 3 Schematischer Aufbau einer CE-LIF-Apparatur

6.1 Kapillarelektrophorese mit laserinduzierter Fluoreszenzdetektion (CE-LIF)

Kapillarsäule:	Material:	Quarzglas
	Länge:	75 cm
	Effektive Länge:	60 cm
	Innendurchmesser:	50 μm
	Temperatur:	20 °C
LIF-Detektor:	Helium-Cadmium-Laser:	15 mW
	Anregungswellenlänge:	325 nm
Injektion:	Hydrodynamisch:	50 mbar für 30 s
	Stacking:	-20 kV für 30 s
	Trennung:	+23 kV (konstant)

Sämtliche Einstellungen der Kapillarelektrophorese sowie des Detektionssystems sind gerätespezifisch und müssen vom Anwender individuell eingestellt werden. Die angegebenen Parameter können daher lediglich als Orientierungshilfe herangezogen werden.

7 Analytische Bestimmung

Nach dem Einbau wird die Kapillare für 15 Minuten mit Methanol, für 5 Minuten mit hochreinem Wasser, für 20 Minuten mit 1 molarer Natronlauge, für 10 Minuten mit 0,1 molarer Natronlauge und schließlich für 20 Minuten mit Phosphatpuffer gespült.

Weiterhin wird die Kapillare täglich vor Messbeginn nacheinander für 10 Minuten mit hochreinem Wasser, 10 Minuten mit 1 molarer Natronlauge, 10 Minuten mit 0,1 molarer Natronlauge und 15 Minuten mit Phosphatpuffer gespült. Von den nach Abschnitt 5.2 aufgearbeiteten Proben wird ein Aliquot in die Kapillare injiziert, wobei die Injektion hydrodynamisch für 30 Sekunden mit einem Druck von 50 mbar erfolgt. Danach wird eine Spannung von -20 kV angelegt. Nach 30 Sekunden wird die Polarität des elektrischen Stromes durch Umschalten auf +23 kV geändert. Es wird der zeitliche Verlauf der mit 325 nm angeregten Fluoreszenz aufgezeichnet. Das jeweils vom Detektor aufgezeichnete Elektropherogramm zeigt ein charakteristisches Bild, das von der Probenzusammensetzung, von der Art der Injektion, der Detektion und weiteren Parametern abhängt.

Die Identifizierung des Ochratoxin A und des ISTD erfolgt anhand der Migrationszeiten (Tabelle 3). Die Laufzeit einer Analyse beträgt gut 15 Minuten. Im Anschluss an jede Messung wird eine Minute mit 0,1 molarer Natronlauge und zwei Minuten mit Phosphatpuffer gespült.

Tab. 3 Migrationszeiten für die Bestimmung von Ochratoxin A in Serum

Analyt	Migrationszeit [min]
Ochratoxin A	~8,5
Cumarin-3-carbonsäure	~9,6

Die in Tabelle 3 angegebenen Migrationszeiten können nur als Anhaltspunkt dienen. Der Anwender hat sich selbst von der Leistung des verwendeten CE-Systems und dem daraus resultierenden Migrationsverhalten der Substanzen zu überzeugen. Die Abbildungen 4 und 5 zeigen Elektropherogramme zweier Seren, die mit 0,5 µg bzw. 1 µg Ochratoxin A je Liter dotiert wurden.

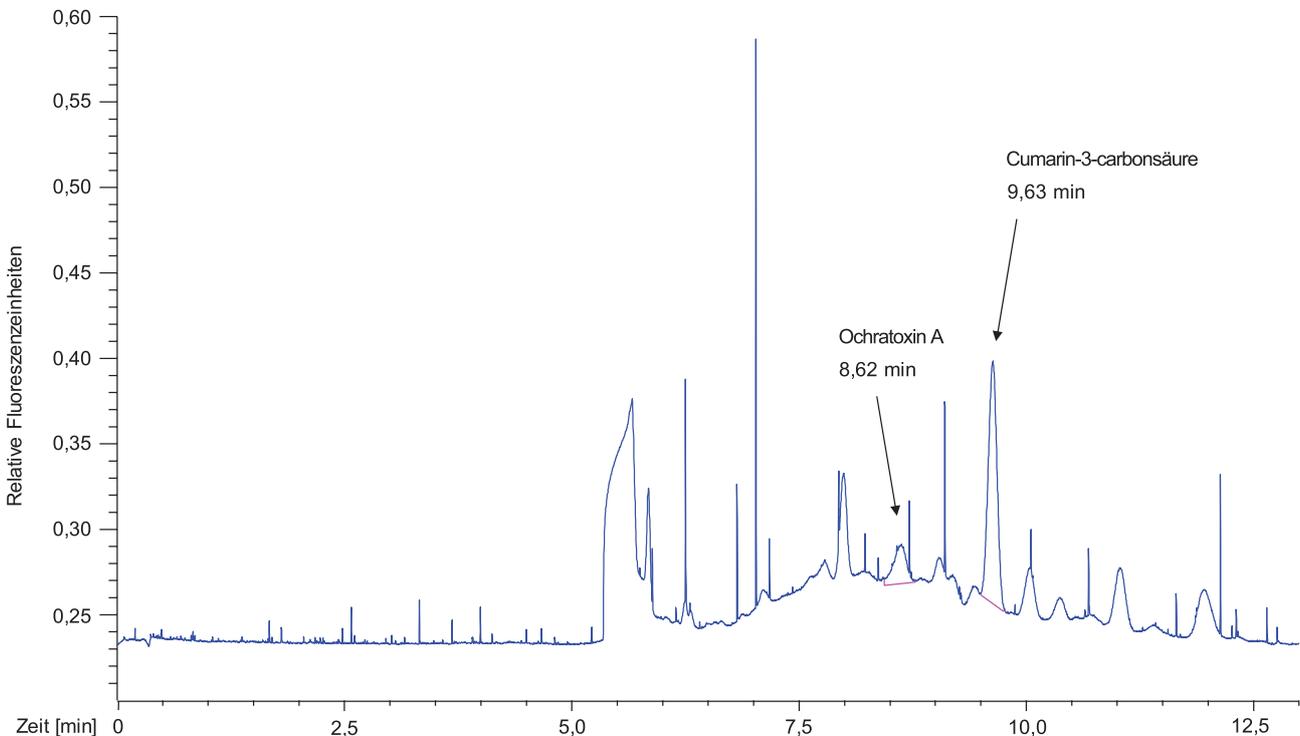


Abb. 4 Elektropherogramm einer mit 0,5 µg Ochratoxin A pro Liter dotierten Serumprobe

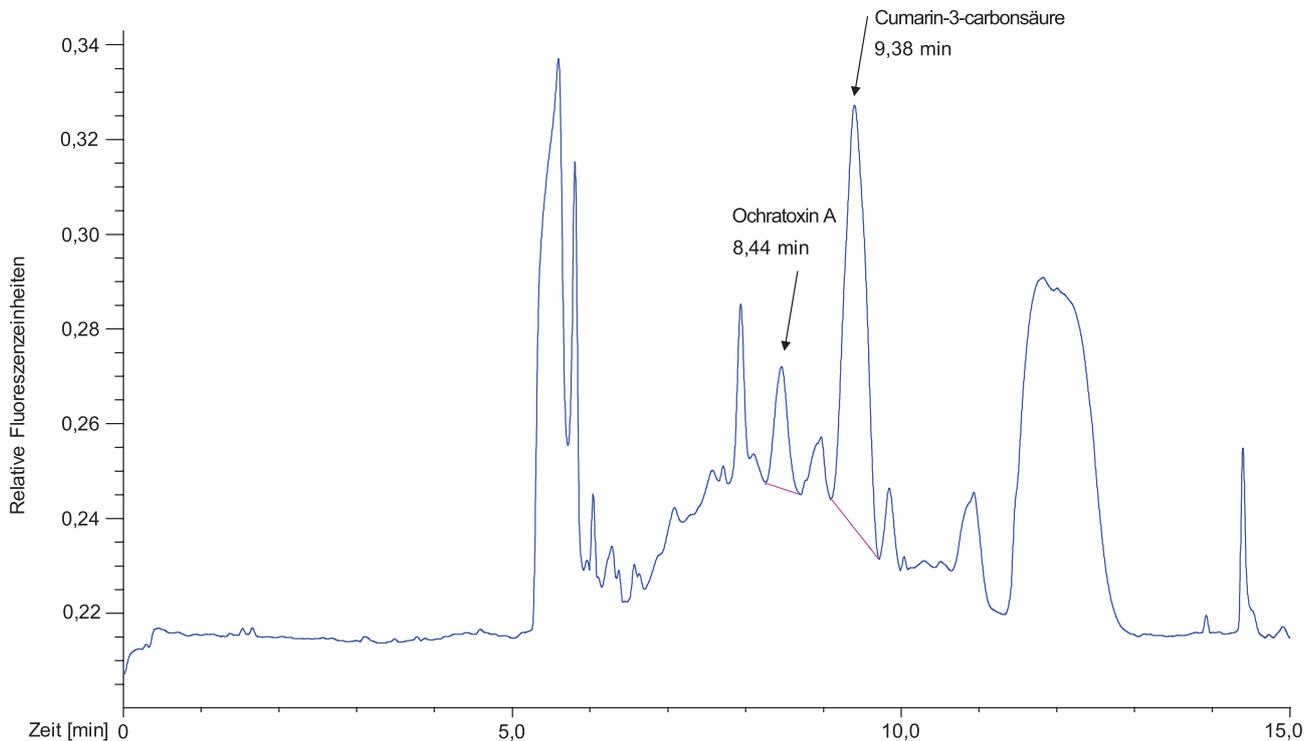


Abb. 5 Elektropherogramm einer mit 1 µg Ochratoxin A pro Liter dotierten Serumprobe

8 Kalibrierung

Zur Kalibrierung werden die unter Abschnitt 4.5 beschriebenen Kalibrierstandards analog zu den Proben aufgearbeitet (Abschnitt 5) und mittels CE-LIF (Abschnitt 7) analysiert. Die Erstellung der Kalibriergeraden erfolgt durch Auftragen der Quotienten aus der Peakfläche des Analyten und des internen Standards gegen die Konzentration der Kalibrierstandards. Die Kalibriergerade ist unter den beschriebenen Analysebedingungen im Konzentrationsbereich von 0,5 µg/l bis 50 µg/l linear. Abbildung 6 zeigt beispielhaft eine Kalibriergerade für Ochratoxin A in Serum.

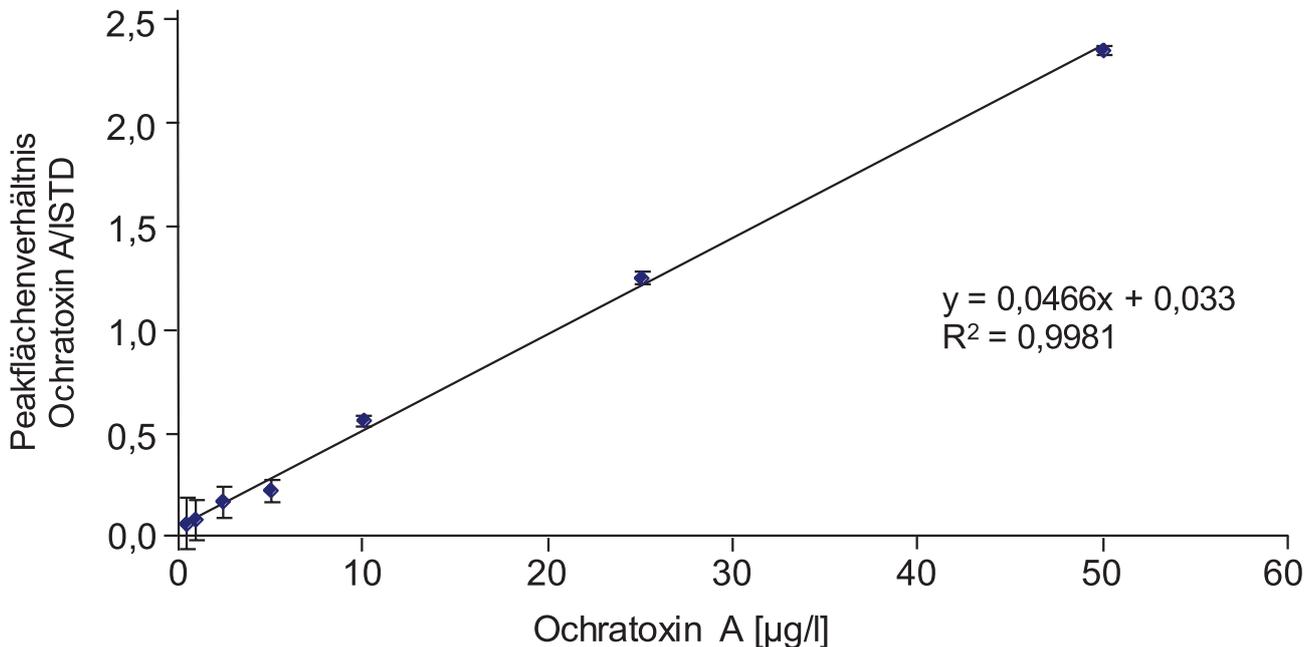


Abb. 6 Kalibriergerade für die Bestimmung von Ochratoxin A in Serum

In Abhängigkeit von den zu erwartenden Belastungen kann der Konzentrationsbereich der Kalibrierung angepasst werden. Im Normalfall sollte eine Kalibrierung bis 10 µg/l ausreichen.

9 Berechnung der Analyseergebnisse

Die Berechnung der Analytgehalte in den Serumproben erfolgt mithilfe der zur Analysenserie gehörenden Kalibrierfunktion (Abschnitt 8). Zur Bestimmung des Analytgehaltes einer Probe wird der Quotient aus der Peakfläche des Analyten und des ISTD bestimmt und in die nach Abschnitt 8 berechnete Kalibrierfunktion eingesetzt. Man erhält den Analytgehalt in µg/l. Eventuell auftretende Reagenzienleerwerte werden durch Subtraktion berücksichtigt.

10 Standardisierung der Messergebnisse und Qualitätssicherung

Zur Sicherung der Qualität der Analyseergebnisse wird gemäß den Richtlinien der Bundesärztekammer und den allgemeinen Vorbemerkungen dieser Publikationsreihe verfahren (Bader et al. 2010; Bundesärztekammer 2014). Zur Präzisionskontrolle werden in jeder Analysenserie drei Qualitätskontrollproben mit unterschiedlichen Konzentrationen des Analyten aufweisen. Da käufliches Material nicht zur Verfügung steht, muss das Kontrollmaterial selbst hergestellt werden. Hierzu wird Serum in drei unterschiedlichen Konzentrationen mit der Standardlösung des Analyten versetzt, so dass die Konzentration der Kontrollmaterialien im entscheidungsrelevanten Konzentrationsbereich liegt (z. B. 0,5 µg/l, 2 µg/l, 10 µg/l). Aliquote dieser Proben werden bei -20 °C gelagert und bei jeder Analysenserie als Qualitätskontrollproben mitgeführt. Dabei muss auf eine gleichmäßige Verteilung innerhalb der Analysensequenz geachtet werden. Der Sollwert und die Toleranzbereiche der Qualitätskontrollmaterialien werden im Rahmen einer Vorperiode ermittelt (Bader et al. 2010). Bei jeder Analysenserie wird neben den Qualitätskontrollproben jeweils auch ein Reagenzienleerwert mit analysiert.

11 Beurteilung des Verfahrens

Die Zuverlässigkeit des Verfahrens wurde durch eine umfassende Validierung sowie durch Vergleichsmessungen in einem zweiten, unabhängigen Labor bestätigt.

11.1 Präzision

Zur Bestimmung der Präzision in der Serie wurden die mit 0,5 µg, 2,0 µg bzw. 10 µg Ochratoxin A pro Liter Serum dotierten Qualitätskontrollproben (siehe Abschnitt 10) verwendet. Das Material wurde dreifach parallel aufgearbeitet und analysiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tab. 4 Präzisionen in der Serie für die Bestimmung von Ochratoxin A in Serum (n = 3)

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Gemessene Konzentration [µg/l]	Standardabweichung (rel.) s_w [%]	Streubereich u [%]
Ochra-toxin A	0,5	0,45	20,5	88,2
	2,0	2,1	11,6	49,9
	10,0	9,8	4,9	21,1

Die Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag erfolgte durch Aufarbeitung und Analyse von aufdotierten Serumproben an drei aufeinanderfolgenden Tagen. Für diese Untersuchungen wurden ebenfalls die mit 0,5 µg, 2,0 µg bzw. 10 µg Ochratoxin A pro Liter Serum dotierten Qualitätskontrollproben (siehe Abschnitt 10) verwendet. Die ermittelten Präzisionsdaten sind Tabelle 5 zu entnehmen.

Tab. 5 Präzisionen von Tag zu Tag für die Bestimmung von Ochratoxin A in Serum (n = 3)

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Gemessene Konzentration [µg/l]	Standardabweichung (rel.) s_w [%]	Streubereich u [%]
Ochra-toxin A	0,5	0,45	27,9	120
	2,0	2,16	17,0	73,2
	10,0	10,5	6,9	29,7

11.2 Richtigkeit

Zur Bestimmung der Wiederfindung wurde eine Ochratoxin A-Lösung mit einer Konzentration von 5,0 µg/l verwendet. Die Lösung wurde vierfach aufgearbeitet und vermessen, wobei sich Wiederfindungen im Bereich von 86–103 % ergaben (siehe Tabelle 6).

Tab. 6 Mittlere relative Wiederfindungsrate für die Bestimmung von Ochratoxin A in Serum (n = 4)

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Mittlere rel. Wiederfindung [%]	Bereich [%]
Ochratoxin A	5,0	95	86–103

11.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze erfolgte auf Grundlage des dreifachen Signal/Rausch-Verhältnisses für die Nachweisgrenze und des neunfachen Signal/Rausch-Verhältnisses für die Bestimmungsgrenze. Die für die Bestimmung von Ochratoxin A im Serum berechneten Werte sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tab. 7 Nachweis- und Bestimmungsgrenze für die Bestimmung von Ochratoxin A in Serum (n = 6)

Analyt	Nachweisgrenze [$\mu\text{g/l}$]	Bestimmungsgrenze [$\mu\text{g/l}$]
Ochratoxin A	0,2	0,6

11.4 Störeinflüsse

Bei der Kapillarelektrophorese können die Migrationszeiten von Analysenserie zu Analysenserie schwanken. Um diese Schwankungen, die durch den Einbau einer neuen Kapillarsäule oder durch Pufferverbrauch auftreten können, auszugleichen, kann das von Li et al. (2000) publizierte Korrekturverfahren angewendet werden. Die Migrationszeiten des Analyten bzw. des ISTD können auch durch Matrixbestandteile beeinflusst werden. In solchen Fällen empfiehlt es sich, die Probe mit $5 \mu\text{g}$ Ochratoxin A pro Liter zu dotieren und die Messung zu wiederholen.

12 Diskussion der Methode

Das beschriebene Verfahren erlaubt die Quantifizierung von Ochratoxin A in sehr geringen Serumvolumina, wobei die Probenaufbereitung mit zweifacher Flüssig-Flüssig-Extraktion einfach und wenig zeitintensiv ist. Die Analysendauer beträgt von Messung zu Messung gut 15 Minuten, so dass sich pro Stunde drei bis vier Proben messen lassen. Für eine Automatisierung ist das Verfahren allerdings nicht geeignet.

Bei der Kapillarelektrophorese (CE) beruht die Auftrennung der Probenbestandteile auf ihrem unterschiedlichem Migrationsverhalten in einer Kapillare, an die Hochspannung angelegt wird. Bei der eingesetzten Kapillarenzonelektrophorese, einer Varianten der CE, wird durch Verwendung einer Pufferlösung ein homogenes elektrisches Feld aufgebaut. Die Detektion basiert dabei auf der induzierten Fluoreszenz der Analyten, die durch das Messfenster der Kapillare fließen. Die eingesetzte laserinduzierte Fluoreszenz-Detektion ist aufgrund der kurzen Lichtwege anderen optischen Detektionsmethoden hinsichtlich Spezifität und Sensitivität deutlich überlegen.

Durch die Anwendung einer speziellen Injektionstechnik (Stacking) konnte trotz der kleinen Probenvolumina eine Nachweisgrenze von $0,2 \mu\text{g/l}$ erreicht werden. Die Präzisionsdaten können als zufriedenstellend angesehen werden. Sofern die Notwendigkeit eines Mikroansatzes nicht gegeben ist, kann mit größeren Probenvolumina gearbeitet werden. Dadurch sollte sich auch die Handhabung bei der Probenaufarbeitung vereinfachen und die Präzision der Methode weiter verbessern lassen.

Das Verfahren eignet sich aufgrund der zu erreichenden Bestimmungsgrenze ausschließlich für die Erfassung von erhöhten Ochratoxin A-Belastungen im umweltmedizinischen oder arbeitsmedizinischen Bereich. Die Hintergrundbelastung der Allgemeinbevölkerung, die in Deutschland im Mittel bei $0,21 \mu\text{g}$ Ochratoxin A pro Liter Serum liegt (siehe Tabelle 1), lässt sich mit der Methode nicht erfassen.

Verwendete Messgeräte HP3D-Kapillarelektrophorese-Anlage mit einer Polymicro™ Kapillarsäule aus Quarzglas (Molex Polymicro™, Optronics GmbH, Kehl); laserinduzierte Fluoreszenz-Detektion mit Helium-Cadmium-Laser (Melles Griot Serie 56, 325 nm) und Picometrics ZetaLIF-Detektor (Picometrics ZetaLIF, ADELIS SAS, Grabels, Frankreich).

Literatur

- Bader M, Barr D, Göen T, Schaller KH, Scherer G, Angerer J (2010) Zuverlässigkeitskriterien einer analytischen Methode. Allgemeine Vorbemerkungen. In: Angerer J, Hartwig A (Hrsg) Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Bd 2: Analysen in biologischem Material, 19. Lieferung. Wiley-VCH, Weinheim, 284–336. Auch erhältlich unter DOI: [10.1002/3527600418.bireliabd0019](https://doi.org/10.1002/3527600418.bireliabd0019)
- Battilani P, Pietri A (2002) Ochratoxin A in grapes and wine. *Eur J Plant Pathol* 108: 639–643. DOI: [10.1023/A:1020693410428](https://doi.org/10.1023/A:1020693410428)
- Bundesärztekammer (2014) Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. *Dtsch Arztebl* 111: A1583–A1618. <https://www.aerzteblatt.de/pdf.asp?id=161921>, abgerufen am 20 Apr 2020
- CONTAM (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain) (2019) Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of ochratoxin A in food. Draft. https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/consultation/consultation/CONTAM_3502_draft_opinion_OTA_rev.40.pdf, abgerufen am 28 Apr 2020
- Degen GH, Blaszkewicz M, Lektarau Y, Grüner C (2003) Ochratoxin A Analysen im Blut von Arbeitnehmern in der Abfallwirtschaft. *Mycotoxin Res* 19: 3–7. DOI: [10.1007/BF02940082](https://doi.org/10.1007/BF02940082)
- Degen GH, Meifort J, Blaszkewicz M (2005) Pilotstudie zum Biomonitoring für Ochratoxin A bei Beschäftigten im Getreide- und Rohkaffee-Umschlag. *Mycotoxin Res* 21: 168–171. DOI: [10.1007/BF02959256](https://doi.org/10.1007/BF02959256)
- Degen GH, Mayer S, Blaszkewicz M (2007) Biomonitoring of ochratoxin A in grain workers. *Mycotoxin Res* 23: 88–93. DOI: [10.1007/BF02946032](https://doi.org/10.1007/BF02946032)
- DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft) (Hrsg) (2020) MAK- und BAT-Werte-Liste 2020. Maximale Arbeitsplatzkonzentrationen und Biologische Arbeitsstofftoleranzwerte. Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Mitteilung 56. German Medical Science, Düsseldorf. DOI: [10.34865/mbwl_2020_deu](https://doi.org/10.34865/mbwl_2020_deu)
- Europäische Kommission (2006) Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 der Kommission vom 19. Dezember 2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln. *ABl L* (364): 5–24
- Gareis M, Meussdoerffer F (2000) Dust of grains and malts as a source of ochratoxin A exposure. *Mycotoxin Res* 16: 127–130. DOI: [10.1007/BF02942999](https://doi.org/10.1007/BF02942999)
- Greim H (Hrsg) (2003) Ochratoxin A. In: Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten, 37. Lieferung. Wiley-VCH, Weinheim. Auch erhältlich unter DOI: [10.1002/3527600418.mb30347d0037](https://doi.org/10.1002/3527600418.mb30347d0037)
- IARC (International Agency for Research on Cancer) (1993) Ochratoxin A. In: Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk to humans, Bd 56. IARC Press, Lyon, 489–521. https://publications.iarc.fr/_publications/media/download/1901/a815bd2f53a323de205a5e997377bc38cc80e4b9.pdf, abgerufen am 28 Apr 2020
- Iavicoli I, Brera C, Carelli G, Caputi R, Marinaccio A, Miraglia M (2002) External and internal dose in subjects occupationally exposed to ochratoxin A. *Int Arch Occup Environ Health* 75: 381–386. DOI: [10.1007/s00420-002-0319-3](https://doi.org/10.1007/s00420-002-0319-3)
- Joosten HMLJ, Goetz J, Pittet A, Schellenberg M, Bucheli P (2001) Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries. *Int J Food Microbiol* 65: 39–44. DOI: [10.1016/S0168-1605\(00\)00506-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00506-7)
- Köller G, Rolle-Kampezyk U, Lehmann I, Popp P, Herbarth O (2004) Determination of ochratoxin A in small volumes of human blood serum. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 804: 313–317. DOI: [10.1016/j.jchromb.2004.01.025](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.01.025)
- Li X-F, Ren H, Le X, Qi M, Ireland ID, Dovichi NJ (2000) Migration time correction for the analysis of derivatized amino acids and oligosaccharides by micellar capillary electrochromatography. *J Chromatogr A* 869: 375–384. DOI: [10.1016/S0021-9673\(99\)00893-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00893-6)
- Märtlbauer E, Usleber E, Dietrich R, Schneider E (2009) Ochratoxin A in human blood serum – retrospective long-term data. *Mycotoxin Res* 25: 175–186. DOI: [10.1007/s12550-009-0025-z](https://doi.org/10.1007/s12550-009-0025-z)
- Malir F, Ostry V, Pfohl-Leszkowicz A, Malir J, Toman J (2016) Ochratoxin A: 50 years of research. *Toxins (Basel)* 8: 191. DOI: [10.3390/toxins8070191](https://doi.org/10.3390/toxins8070191)
- Overy DP, Seifert KA, Savard ME, Frisvad JC (2003) Spoilage fungi and their mycotoxins in commercially marketed chestnuts. *Int J Food Microbiol* 88: 69–77. DOI: [10.1016/S0168-1605\(03\)00086-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00086-2)
- Rizzo A, Eskola M, Atroshi F (2002) Ochratoxin A in cereals, foodstuffs and human plasma. *Eur J Plant Pathol* 108: 631–637. DOI: [10.1023/A:1020683130901](https://doi.org/10.1023/A:1020683130901)
- Scheuer R, Gareis M (2002) Occurrence of ochratoxin A and B in spices. *Mycotoxin Res* 18: 62–66. DOI: [10.1007/BF02946698](https://doi.org/10.1007/BF02946698)

- Skaug MA (2003) Levels of ochratoxin A and IgG against conidia of *Penicillium verrucosum* in blood samples from healthy farm workers. *Toxicol Lett* 144 Suppl 1: s65. DOI [10.1016/S0378-4274\(03\)90228-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(03)90228-1)
- Taniwaki MH, Pitt JI, Teixeira AA, Iamanaka BT (2003) The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. *Int J Food Microbiol* 82: 173–179. DOI: [10.1016/S0168-1605\(02\)00310-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00310-0)
- Thuvander A, Paulsen JE, Axberg K, Johansson N, Vidnes A, Enghardt-Barbieri H, Trygg K, Lund-Larsen K, Jahrl S, Widenfalk A, Bosnes V, Alexander J, Hult K, Olsen M (2001) Levels of ochratoxin A in blood from Norwegian and Swedish blood donors and their possible correlation with food consumption. *Food Chem Toxicol* 39: 1145–1151. DOI: [10.1016/S0278-6915\(01\)00080-1](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(01)00080-1)
- Visconti A, Pascale M, Centonze G (1999) Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 864: 89–101. DOI: [10.1016/S0021-9673\(99\)00996-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00996-6)