

Institut für Chemie
Physikalische Chemie

Optische Spektroskopie zum Nachweis von Schimmelpilzen und deren Mykotoxine

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
"doctor rerum naturalium"
(Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin
"Physikalische Chemie"**

**eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam**

**von
Claudia Rasch**

Potsdam, Oktober 2010

Dieses Werk ist unter einem Creative Commons Lizenzvertrag lizenziert:
Namensnennung - Keine kommerzielle Nutzung - Weitergabe unter
gleichen Bedingungen 3.0 Unported

Um die Bedingungen der Lizenz einzusehen, folgen Sie bitte dem
Hyperlink:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>

Online veröffentlicht auf dem

Publikationsserver der Universität Potsdam:

URL <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2011/5074/>

URN [urn:nbn:de:kobv:517-opus-50746](http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-50746)

<http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-50746>

ABKÜRZUNGEN

| | |
|--------|---|
| 1PA | Einphotonenanregung |
| 2PA | Zweiphotonenanregung |
| 2PAQ | Zweiphotonen-Absorptionsquerschnitt (σ_2) |
| AFB1 | Aflatoxin B ₁ |
| ATB | Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim |
| a_w | Wasseraktivität |
| c | Konzentration |
| CD | Cyclodextrin |
| DON | Deoxynivalenol |
| E | Extinktion / Absorption / optische Dichte |
| ELISA | Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay |
| FUM | Fumonisin B ₁ |
| GM | Göppert-Mayer (1 GM = 10^{-50} cm ⁴ s/Photon) |
| HPLC | engl. High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigchromatographie) |
| LOD | engl. Limit of Detection (Nachweisgrenze) |
| MCR | engl. Multivariate curve resolution (Kurvenauflösungsverfahren) |
| MLR | Multiple lineare Regression |
| NIR | Nah-Infrarot |
| NWG | Nachweisgrenze |
| OTA | Ochratoxin A |
| PCA | engl. Principle Component Analysis (Hauptkomponentenanalyse) |
| PLS | engl. Partial Least Squares Regression (Projektion auf latente Strukturen) |
| UV-Vis | Ultraviolett-sichtbarer Spektralbereich |
| ZEA | Zearalenon |

INHALTSVERZEICHNIS

| | Seite |
|--|--------------|
| 1. Einleitung | 1 |
| 2. Grundlagen | 7 |
| 2.1 Schimmelpilze und Mykotoxine | 7 |
| 2.1.1 Was sind Mykotoxine? | 9 |
| 2.1.2 Entstehung von Mykotoxinen | 10 |
| 2.1.3 Bedeutung der Mykotoxine und gesetzliche Regelungen | 11 |
| 2.1.4 Methoden zum Nachweis von Mykotoxinen | 13 |
| 2.2 Spektroskopische Methoden | 15 |
| 2.2.1 Absorption | 15 |
| 2.2.2 Fluoreszenz | 16 |
| 2.2.3 Zweiphotonenspektroskopie | 18 |
| 2.2.4 Diffuse Reflexionsspektroskopie | 24 |
| 2.3 Cyclodextrine | 29 |
| 2.4 Chemometrische Auswerteverfahren – Multivariate Datenanalyse | 32 |
| 2.4.1 Hauptkomponentenanalyse (PCA) | 33 |
| 2.4.2 Multiple lineare Regression (MLR) | 35 |
| 2.4.3 Projektion auf latente Strukturen (Partial Least Squares Regression - PLS) | 36 |
| 3. Material und experimentelle Methoden | 38 |
| 3.1 Mykotoxine | 38 |
| 3.1.1 Absorption und Fluoreszenzspektroskopie | 38 |
| 3.1.2 Zweiphotonenspektroskopie | 40 |
| 3.1.3 Nachweis von Aflatoxin B ₁ in Wein und Bier | 40 |
| 3.1.4 Spiken von Weizenmehl und -körnern mit Ochratoxin A | 41 |
| 3.2 Cyclodextrine | 42 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3.3 | Getreideproben | 43 |
| 3.3.1 | Auswahl und Charakterisierung des Getreides | 43 |
| 3.3.2 | Infektion mit Pilzstämmen | 44 |
| 3.3.3 | Natürlich kontaminiertes Getreide | 45 |
| 3.4 | Absorptions- und Fluoreszenzmessungen | 46 |
| 3.4.1 | Absorptionsmessungen | 46 |
| 3.4.2 | Fluoreszenzmessungen | 46 |
| 3.5 | Zweiphotonenspektroskopie | 48 |
| 3.4 | Reflexionsspektroskopie | 50 |
| 3.4.1 | Datenvorbehandlung | 50 |
| 4. | Ergebnisse und Diskussion | 54 |
| 4.1 | Photophysikalische Eigenschaften der Mykotoxine | 54 |
| 4.1.1 | Absorption und Lumineszenzeigenschaften | 54 |
| 4.1.2 | Ochratoxin A | 56 |
| 4.1.3 | Aflatoxin B ₁ | 60 |
| 4.2 | Die Anwendung von Cyclodextrinen zur Verstärkung von Lumineszenzintensitäten | 64 |
| 4.2.1 | Aflatoxin B ₁ | 64 |
| 4.2.2 | Ochratoxin A | 68 |
| 4.3 | Zweiphotonenspektroskopie | 72 |
| 4.3.1 | Bestimmung des Zweiphotonen-Absorptionsquerschnittes von Ochratoxin A und Aflatoxin B ₁ | 72 |
| 4.3.2 | Nachweis von Aflatoxin B ₁ in alkoholischen Lebensmitteln - Bier und Wein - mittels Zweiphotonenanregung | 75 |
| 4.3.3 | Vergleich von Einphotonen- und Zweiphotonenanregung | 81 |
| 4.3.4 | Bestimmung der Nachweisgrenze | 81 |

| | | |
|-----------|--|-------------|
| 4.4 | Matrix „Getreide“ | 85 |
| 4.4.1 | Intrinsische Fluoreszenz des Getreides | 85 |
| 4.4.2 | Abhängigkeit der Fluoreszenz vom Feuchtegehalt des Getreides | 88 |
| 4.4.3 | Reflexionseigenschaften der Getreidekörner | 91 |
| 4.4.4 | Abhängigkeit der Reflexion vom Feuchtegehalt des Getreides | 94 |
| 4.5 | Nachweis von Schimmelpilzen mittels Reflexions- spektroskopie | 97 |
| 4.6 | Nachweis von Mykotoxinen auf Körnern | 102 |
| 4.6.1 | Fluoreszierende Mykotoxine – am Beispiel von Ochratoxin A | 102 |
| 4.6.2 | Nicht-fluoreszierende Mykotoxine – am Beispiel von Deoxynivalenol | 105 |
| 4.7 | Kombination der optischen Methoden zum Nachweis von Schimmelpilzen und deren Mykotoxine in Realproben | 109 |
| 5. | Zusammenfassung und Ausblick | 113 |
| | Anhang | i |
| | Abbildungsverzeichnis | viii |
| | Tabellenverzeichnis | xii |
| | Literaturverzeichnis | xiii |

1. EINLEITUNG

Gesunde und qualitativ hochwertige Nahrungsmittel sind wichtige Voraussetzungen, um einerseits die Lebensmittelsicherheit entlang der Wertschöpfungskette (Wachstum, Verarbeitung, Lagerung und Transport) sowie andererseits einen vorbeugenden Verbraucherschutz zu gewährleisten. Die Belastung von Nahrungsmitteln mit Rückständen jeglicher Art stand in letzter Zeit häufig im Mittelpunkt weltweiter öffentlicher Diskussionen, z.B. Hormone und Antibiotika in Fleischprodukten, Glykol im Wein, Acrylamid in Kartoffelchips, Dioxin in Fischprodukten und diverse Giftstoffe im Milchpulver [1]. Qualitätsminderungen von Nahrungs- und Futtermitteln durch Schimmelpilze werden dagegen selten in der Öffentlichkeit wahrgenommen, haben aber für Landwirtschaft und Verbraucherschutz eine erheblichere Bedeutung.

Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Gruppe von natürlichen, strukturell unterschiedlichen Giftstoffen, die unter bestimmten Bedingungen durch Schimmelpilze gebildet werden, sogenannte Mykotoxine, die Qualität von Lebens- und Futtermitteln stark beeinträchtigen und somit ein gesundheitliches Risiko für Pflanzen, Tiere und Menschen darstellen. Kontaminationen von Lebens- und Futtermitteln mit Mykotoxinen sind ein weltweites Problem: Allein der wirtschaftliche Schaden durch Mykotoxine in den USA wird auf jährlich etwa 1.000 Mio. USD geschätzt [2]. Innerhalb der Europäischen Union wurden hierzu noch keine Daten erhoben.

In unterschiedlichen Bereichen der Land- und Ernährungswirtschaft werden wir mit Schimmelpilzen konfrontiert. Sie können einerseits positive Auswirkungen haben, wie die Geschmacksverbesserung durch Schimmelpilze bei Käse und Wurst, aber auch die Qualität von Nahrungs- oder Futtermitteln als Schadorganismen, die giftige Stoffwechselprodukte (Mykotoxine) freisetzen können, negativ beeinflussen. Mykotoxine können in einer breiten Palette von Lebensmitteln vorhanden sein. Das bevorzugte Ziel ist Getreide, da es wegen der Lagerung in großen Mengen besonders anfällig ist. Man findet sie aber auch auf Früchten und Gemüse, Trauben, Nüssen, Erdnüssen, sowie Kaffee und Kakao. Für den menschlichen Organismus sind kontaminierte Lebensmittel äußerst gesundheitsschädlich und zum Teil lebensbedrohlich. Die Kontamination von Lebensmitteln mit Schimmelpilzen und damit mit Mykotoxinen ist ein ubiquitär auftretendes Problem, das zukünftig noch eine große Herausforderung für die lebensmittelverarbeitende Industrie werden wird.

Der Verderb bestimmter Lebensmittel geht auf einzelne Arten von Schimmelpilzen zurück, die aufgrund der besonderen stofflichen Eigenschaften eines Lebensmittels, z.B. Konsistenz, Wassergehalt, Zusammensetzung der Nährstoffe, etc. geeignet sind, diese zu besiedeln. So sind in der Regel für viele Lebensmittel meist nur ein bis drei Pilzarten für den Verderb charakteristisch. Insbesondere die Fähigkeit einen geringeren Wassergehalt oder geringere Verfügbarkeit von Wasser in einem Lebensmittel zu tolerieren, befähigt nur einige spezielle Arten, trockene Lebensmittel zu verderben. Aus diesem Grund basieren viele Verfahren der Haltbarmachung von Lebensmitteln auf Trocknung oder Bindung von Feuchtigkeit. Diese Bindung der Feuchtigkeit wird z. B. durch Salz beim Pökeln oder sehr hohe Zuckerkonzentrationen (z. B. in Konfitüre) erreicht. Andere Lebensmittel wie z. B. Nüsse weisen einen hohen Fettgehalt auf, der ebenfalls den Wasseranteil reduziert. Ein erhöhter Säuregehalt führt zu einem sehr beschränkten Spektrum an Verderbniserregern. Es werden daher einige Lebensmittel mit Essig sauer eingelegt [3].

Offensichtlich verschimmelte Lebens- und Futtermittel sind grundsätzlich als toxisch zu betrachten, solange nicht der Gegenbeweis erbracht wurde. Besonders problematisch sind Mykotoxine, wenn sie getarnt auftreten oder durch die technologische Weiterverarbeitung ein vorgängiger Pilzbefall im Produkt oft nicht mehr sichtbar ist (z.B. Wein, Apfelsaft, etc.). Sichtbar verschimmelte Ware sollte in jedem Fall von der Produktion ausgeschlossen werden. Nach heutigem Wissensstand besteht bei der Anwesenheit von Schimmelpilzen immer die Gefahr, dass Mykotoxine gebildet worden sind. Um mit Sicherheit gesundheitliche Folgeschäden ausschließen zu können, sollten Futter- und Lebensmittel daher möglichst schimmelpilzfrei sein. In der Praxis kann dies nur durch die Reduktion von Pilzinfektionen stattfinden. Wichtige Voraussetzungen liegen hierfür im agrartechnischen Bereich durch Auswahl der Fruchtfolge, Anbau standortgerechter Sorten, schonende Ernteverfahren und im Bereich der sachgemäßen Lagerung, Verarbeitung sowie Konservierung von Futter- und Lebensmitteln [4, 5].

Bei Getreide sind insbesondere bei Lagerung, Aufbereitung und Verarbeitung häufig belastete Partien zu finden. In den Feldbeständen können sowohl regional als auch zeitlich sehr unterschiedliche Vorkommen an Feldpilzen und deren Toxinen registriert werden.

Getreide als Lebens- und Futtermittel spielt eine entscheidende Rolle bei der menschlichen Ernährung. In Deutschland liegt der jährliche Verzehr an Getreideerzeugnissen aus Weizen und Roggen bei 66 kg pro Einwohner. Weltweit einzigartig ist Deutschlands Vielfalt an Brot. Es gibt rund 300 verschiedene Sorten, die bei 94% der Deutschen täglich auf dem Teller

liegen [6]. Deutschland liegt mit seiner Getreideproduktion (Weizen, Roggen, Triticale und Sommergerste) im Jahr 2010 in Höhe von 43.7 Mio. Tonnen [7] weltweit an zehnter Stelle, wovon zwei Drittel als Futtermittel eingesetzt werden. Von der gesamten Jahresgetreideernte verderben drei bis vier Prozent im Nacherntebereich, hauptsächlich durch Pilzbefall [8].

In der Erntesaison 2009 wurden weltweit insgesamt 2219 Mio. Tonnen Getreide produziert [9]. Für 2010 prognostiziert die Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO, Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen) weltweit einen leichten Rückgang aufgrund von Hitze und Trockenheit bzw. häufigen Witterungswechseln und schätzt, dass bis zu 25 Prozent der weltweit produzierten Nahrungsmittel mit Pilzgiften belastet sind. In der EU enthalten etwa 20 Prozent der Getreideernte messbare Mengen an Mykotoxinen [10].

Bisher ist von mehr als 250 Schimmelpilzarten bekannt, dass sie Mykotoxine bilden können. Während einige Pilzgifte nur von einer begrenzten Zahl von Arten synthetisiert werden, werden andere wiederum von vielen Arten aus unterschiedlichen Pilzgattungen gebildet. Viele werden nur unter Laborbedingungen in relevanten Mengen gebildet, und nur eine relativ geringe Zahl kommt häufig und in höheren Konzentrationen natürlich vor und ist damit für die Lebensmittelsicherheit von Bedeutung [11-13].

Mykotoxine sind als natürlich vorkommende, sekundäre Stoffwechselprodukte oder Stoffwechselendprodukte von Schimmelpilzen (Metaboliten) definiert, die in Abhängigkeit von vorherrschenden Konditionen beim Wachstum (z.B. Temperatur, Feuchtigkeit, konkurrierende Mikroflora) auf nährstoffreichen Substraten, Lebens- und Futtermitteln in unterschiedlichem Umfang gebildet werden und beim Mensch und Tier zum Teil eine toxische Wirkung zeigen, bzw. eine Mykotoxikose verursachen. Sie stellen neben den Antibiotika die zweitgrößte von Mikroorganismen synthetisierte Wirkstoffgruppe dar und sind weltweit verbreitet [14-16].

Es lassen sich drei Wege unterscheiden, über die Mykotoxine in Nahrungsmittel gelangen können [17-19], über:

1. Primärkontamination

d.h. Lebensmittelrohstoffe, wie z.B. Getreide, sind von Toxinbildnern befallen und im Endprodukt ist der Befall für den Verbraucher nicht mehr optisch erkennbar.

2. Sekundärkontamination

d.h. lagernde, schon fertige Lebensmittel verschimmeln und werden so mit Mykotoxinen kontaminiert. An der wachsenden, oft schon charakteristisch durch Konidien(Sporen)bildung verfärbten Pilzkolonie kann der Konsument ein mögliches Mykotoxinrisiko erkennen.

3. carry over

d.h. Nutztiere, die toxische Futtermittel aufgenommen haben, können einzelne Mykotoxine in unveränderter oder metabolisierter Form in verschiedenen Organen ablagern oder ausscheiden. Auf diese Weise können Lebensmittel tierischer Herkunft (Fleisch, Eier, Milch, Milchprodukte) Mykotoxine enthalten, ohne dass das Produkt selbst verschimmelt ist. Eine solche Kontamination ist äußerlich für den Konsumenten nicht erkennbar.

Die Gefährlichkeit der Mykotoxine wurde lange Zeit nicht erkannt bzw. unterschätzt. Erst durch den Einsatz genauerer Analysemethoden bei der Untersuchung von Lebensmitteln und deren Bestandteilen zeigte sich, dass Mykotoxine Ursache für verschiedene Krankheiten sein können. In Abhängigkeit der Art und Menge kann die toxische Wirkung akut oder chronisch sein [20-25]. Während Mykotoxine, die keine akuten Symptome auslösen, im Verdacht stehen, krebserregend und erbgutschädigend zu sein, können bei einer akuten Vergiftung nachweisbare Leber- und Nierenschäden auftreten. Aufgrund der regelmäßigen Kontrollen kommen akute Mykotoxinvergiftungen in Deutschland sehr selten vor. Der Verzehr von offensichtlich verschimmelten Lebensmitteln ist sicherlich die wahrscheinlichste Quelle für eine Vergiftung. Eine Belastung kann aber auch durch Inhalation der Sporen erfolgen. Neben unspezifischen gesundheitlichen Problemen wie Kopf- und Gliederschmerzen können hohe Mykotoxin-Raumluftkonzentrationen die Ursache für das Auftreten infektiöser Pilzkrankungen (Mykosen) bei abwehrgeschwächten Personen sein [26].

Aufgrund der Vielzahl an schädigenden Wirkungen existieren für Mykotoxinkonzentrationen gesetzlich festgelegte Höchstmengen, die eingehalten werden müssen. Um das Einhalten dieser Grenzwerte kontrollieren zu können, sind hochsensitive analytische Methoden erforderlich. Da eine sichere Vorhersage der Toxinbelastung aufgrund der Vielfalt der Einflussfaktoren und deren Kombinationswirkung schwierig erscheint, werden neben den Routinemethoden schnellere und zerstörungsfreie Methoden benötigt, um die Lebensmittel direkt auf Schimmelpilze und deren Mykotoxine zu untersuchen [26]. Zur lebensmittelrechtlichen Beurteilung müssen

möglichst repräsentative Proben gezogen werden. Die Probennahme bzw. Probenaufarbeitung ist daher - wie so oft - der erste entscheidende Schritt einer exakten Nachweismethode. Die häufig zu beobachtende nesterartige Verschimmelung in z.B. Getreide kann eine inhomogene Verteilung der Mykotoxine verursachen, zudem stellt die vergleichsweise geringe Konzentration der Mykotoxine in den Proben große Anforderungen an die Analytik [27].

Das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) förderte im Zeitraum von Juli 2006 bis Dezember 2009 das Verbundvorhaben *ProSenso.net² - „Erschließung von Nachhaltigkeitspotenzial durch Nutzung innovativer Sensortechnologie und ganzheitlicher Bewertungsmodelle in der Produktionskette von pflanzlichen Lebensmitteln“* -, welches vom Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V. (ATB) koordiniert wurde. Im Teilprojekt 1.2 *„Indikatoren und Sensortechnologie zur Identifikation von mykotoxinproduzierenden Pilzen in der Verarbeitung von Getreide“* wurden neuartige sensorgestützte Lösungskonzepte zur Erkennung und Vermeidung von Mikroorganismen und Toxinen in der Wertschöpfungskette Getreide erarbeitet. Ein in Entwicklung befindliches Analysenverfahren soll die Produktqualität sicherstellen und es ermöglichen, in einem einzigen Analysensystem mehrere relevante Mykotoxine im bewegten Gutstrom (bei Ein- bzw. Auslagerung) gleichzeitig zu erfassen. Kurze Analysezeiten sollen für eine schnelle Beurteilung der untersuchten Probe sorgen [28]. In dieser Arbeit werden Ergebnisse des Teilprojektes 1.2 vorgestellt.

Die Kombination moderner Spektroskopiemethoden basierend auf Absorption-, Lumineszenz- und Reflexionsspektroskopie, im UV/Vis/NIR-Bereich wird hinsichtlich ihrer Eignung bewertet, vorhandene spektroskopische Verfahren optimiert und der Einsatz chemometrischer Auswerteverfahren in Betracht gezogen. Es wird einerseits die Frage geklärt, ob die Methode der Zweiphotonenspektroskopie Erkenntnisse liefern kann, die nicht mit den klassischen Methoden der Absorption- und „regulären“ Fluoreszenzspektroskopie erzielt werden können und ob andererseits der Einsatz von Cyclodextrinen die spektroskopischen Eigenschaften der Mykotoxine verändert und die Nachweisgrenze erniedrigen kann.

Die Verknüpfung der verschiedenen spektroskopischen Methoden wird anhand von Realproben - hochveredelte Lebensmittel wie Bier und Wein sowie Getreideproben aus dem Vorerntemonitoring des Landes Brandenburgs - zu einer zerstörungsfreien, leistungsstarken und gleichzeitig mit minimaler

Probenvorbereitung verbundenen in-situ Analytik konzipiert. Durch die Entwicklung spektroskopiebasierter Methoden soll zukünftig an relevanten Prozessabschnitten entlang der Produktionskette von Lebensmitteln, der Befall durch Schimmelpilze bzw. Mykotoxine ermittelt und so das gezielte und dokumentierte Ausschleusen belasteter Produkte ermöglicht werden [29].

2. GRUNDLAGEN

2.1 Schimmelpilze und Mykotoxine

Mykotoxine beschäftigen die Menschheit seit Beginn des organisierten Nahrungsmittelanbaus. Der Ergotismus, eine Krankheit, die nach Verzehr von Mutterkorn auftritt, wird bereits in der Bibel beschrieben. An Mutterkornvergiftung starben im Mittelalter Hunderttausende von Menschen (*Sankt-Antonius-Feuer* oder auch lat. *ignis sacer* - "heiliges Feuer", "Kribbelkrankheit", im 11. Jahrhundert) [30-34]. Andere Daten weisen daraufhin, dass auch die Giftstoffe von Fusarienpilzen schon im Europa des Mittelalters bis hin zur amerikanischen Kolonialzeit eine bedeutende Krankheitsursache waren [35].

Die Suche nach Mykotoxinen rührt ursprünglich von der Erforschung einzelner menschlicher oder tierischer Erkrankungen her, für die man keine Ursachen wie Mikroorganismen, Pflanzengifte, Schwermetalle oder Pestizidrückstände finden konnte. Schritt für Schritt wurde klar, dass verschimmelter Tierfutter oder mit Schimmelpilzen infizierte Futtermittel für eine Reihe von Erkrankungen bei Nutztieren verantwortlich waren, wie z.B. das Östrogensyndrom bei Schweinen, Futterverweigerung bzw. eine Erkrankung von Truthähnen in England und den USA um 1960, die sogenannte "*Turkey X Disease*". Dass die selben Verbindungen auch in menschlichen Nahrungsmitteln vorhanden sein können und damit möglicherweise Ursache von Krankheiten sind, zeigte sich erst nachdem die Untersuchungsmethoden genauer wurden und man in der Lage war, eine Vielzahl von Lebensmitteln und Lebensmittelbestandteilen zu untersuchen [36-41].

Die umgangssprachliche Bezeichnung "*Schimmelpilze*" bezieht sich auf den weißen bis kräftig gefärbten pelzigen Belag, mit dem manche Pilze ihre Substrate überziehen. "*Schimmel*" ist somit kein systematischer Begriff, sondern eine Sammelbezeichnung für Pilzarten, die vor allem durch die Bildung asexueller Sporen gekennzeichnet sind und saprophytisch wachsen, d.h. abgestorbene organische Substanzen als Nahrungsquellen verwerten können. Weitere Kriterien, die in ihrer Summe den Begriff "*Schimmelpilze*" definieren, sind ihr ubiquitäres Vorkommen, der filamentöse Wuchs der Myzelien, der umfangreiche sowie der für eine Pilzart spezifische Sekundärmetabolismus [42].

Die Einteilung der Schimmelpilze erfolgt in Feld- und Lagerpilze. Zu den erstgenannten gehören *Fusarium*- und *Alternaria*-Arten, zu den letztgenannten *Aspergillus*- und *Penicillium*-Arten (Abbildung 1). Feldpilze brauchen meist

grüne Pflanzenteile und können Pflanzenkrankheiten verursachen. In der Regel vermehren sie sich schneller bei „geschwächten“ Pflanzen oder an absterbenden Pflanzenteilen (z. B. in Abreife). Lagerpilze treten erst nach der Ernte bei ungünstigen Lagerbedingungen auf [35, 43, 44].

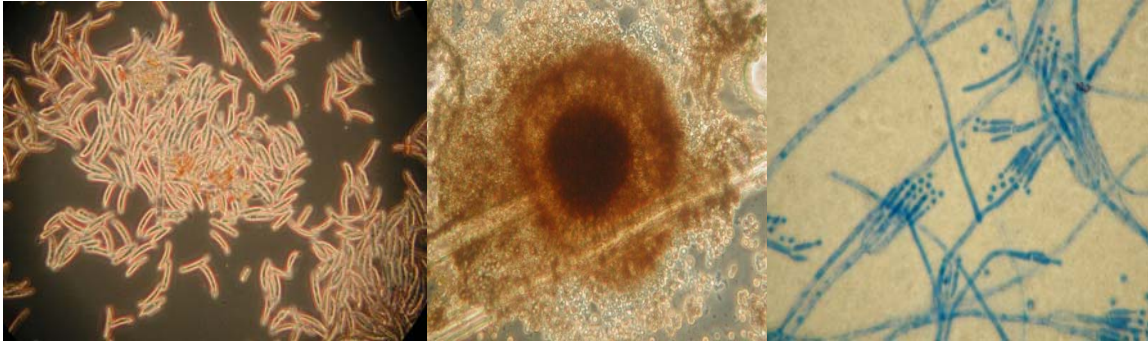


Abbildung 1: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Schimmelpilze (1000fache Vergrößerung), von links nach rechts: *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* spp.

Die wichtigsten in Lebensmitteln vorkommenden Schimmelpilze und deren Toxine sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Die bedeutendsten Toxinproduzenten finden sich unter den *Aspergillen*, *Penicillien* und *Fusarien*. Viele von ihnen sind häufig Besiedler von Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft. Im Gegensatz zu parasitischen Pilzen sind sie leicht im Labor zu kultivieren und daher gut zu untersuchen.

Tabelle 1: Toxinbildende Schimmelpilze und ihre Mykotoxine

| Mykotoxin | Mykotoxinbildende Schimmelpilze | Lebensmittel |
|---|--|--|
| Aflatoxin B ₁ (AFB ₁) | <i>Aspergillus</i> spp. z. B. <i>A. flavus</i> (Lagerpilz) | Nüsse, Getreide, Mais, Gewürze, Milch und Milchprodukte |
| Ochratoxin A (OTA) | <i>Aspergillus</i> spp. z. B. <i>A. ochraceus</i> <i>Penicillium</i> spp. (Lagerpilz) | Getreide, Kaffee, Nüsse, Wein, Essig, Kakao, Bier, Milch, Fleisch |
| Patulin | <i>Aspergillus</i> spp. <i>Penicillium</i> spp. | Apfelsaft, Äpfel und andere Obstarten (insb. Kernobst), Gemüse |
| Trichothecene Typ A und B (T-2 Toxin; HT- 2 Toxin; Deoxynivalenol (DON); Nivalenol); Zearalenon (ZEA); Fumonisin B ₁ (FUM); Monilliformin | <i>Fusarium</i> spp. (Feldpilz) | Getreide, Nüsse |
| Alternariol | <i>Alternaria</i> spp. (Feldpilz) | |
| Ergotalkaloide "Mutterkorn" | <i>Claviceps</i> spp. | Getreide, besonders Roggen |

2.1.1 Was sind Mykotoxine?

Der Begriff „Mykotoxin“ wird aus dem griechischen *myko* und aus dem lateinischen *toxicum* abgeleitet, was Pilz bzw. Gift bedeutet [45].

Es sind ca. 300 verschiedene Mykotoxine bekannt, die etwa 25 Strukturtypen zugeordnet werden und aufgrund ihrer chemischen Strukturen unterschiedliche toxische Wirkungen zeigen. Sie gehören den verschiedensten Stoffgruppen an: Cumarinderivate sind relativ häufig, doch kommen daneben cyclische Peptide, Anthrachinone, Pyrone, Steroide, Nonadride und substituierte Fettsäuren vor [46-49].

Wichtige Vertreter der Mykotoxine sind die Aflatoxine, Ochratoxine, Patulin, Fumonisine, Zearalenon und die Trichothecene Deoxynivalenol, HT-2 Toxin und T-2 Toxin (Abbildung 2).

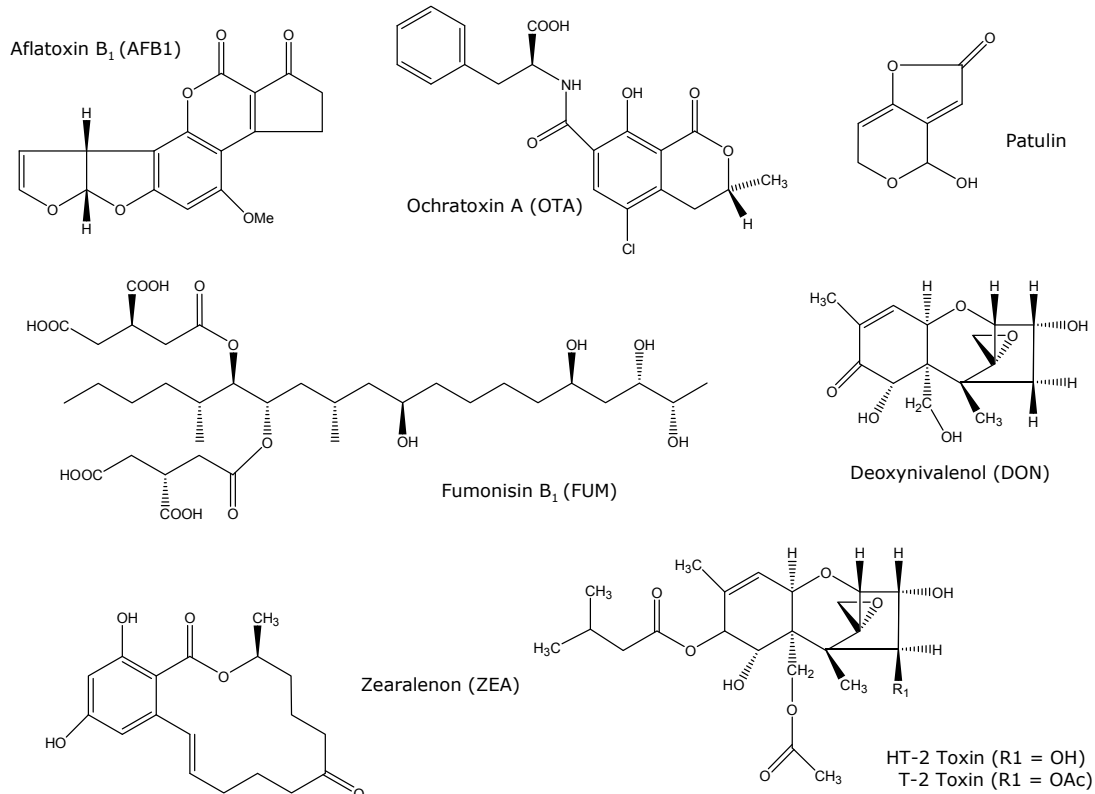


Abbildung 2: Wichtige Mykotoxine in Europa

2.1.2 Entstehung von Mykotoxinen

Nahrungsmittel besitzen ideale Voraussetzungen für die meisten Schimmelpilzarten: Kohlenhydrate, pflanzliche und tierische Öle, organisch und anorganisch gebundener Stickstoff erlauben bei günstiger Temperatur, günstigem pH-Wert und ausreichendem Wassergehalt ein optimales Wachstum. Ein üppiges Pilzwachstum muss aber nicht gleichzeitig mit einer starken Toxinbildung verbunden sein. Umgekehrt kann auch ein schwaches Pilzwachstum eine starke Toxinbildung zur Folge haben. Pilze wachsen nicht nur an der Oberfläche, sondern dringen tief in das Ernteprodukt oder die Lebensmittel ein. Mykotoxine werden entweder in das Substrat, auf dem die Pilze wachsen, ausgeschieden oder in die Zellen eingelagert und dann freigesetzt, wenn das Pilzmyzel (Zellverbund der Pilzfäden) auseinander bricht. Auch die Sporen der Schimmelpilze können Mykotoxine enthalten. Nicht alle

Schimmelpilze bilden Mykotoxine. Meist sind es nur bestimmte Arten, wobei sich das Toxinbildungsvermögen bei einer Art wiederum von Stamm zu Stamm stark unterscheiden kann [35, 42].

Die Funktion der Mykotoxinbildung im Stoffwechsel der Pilze ist bisher nicht bekannt. Diskutiert werden metabolische Kontrollfunktionen sowie eine ökologische Rolle bei Interaktionen mit anderen Organismen. Im Gegensatz zu den Produkten des Primärstoffwechsels sind die sekundären Stoffwechselprodukte nicht bei allen Organismen zu finden, sondern sind charakteristisch für ihren Produzenten. Dazu werden sie oft nur unter bestimmten Temperatur- und Feuchtigkeitsbedingungen, bei reichlichem Nährstoffangebot oder in bestimmten Entwicklungsphasen gebildet. Häufig entsteht nicht nur eine Substanz, sondern eine ganze Familie chemisch verwandter Verbindungen. Mykotoxine sind weitgehend hitzestabil und werden daher bei der Nahrungsmittelverarbeitung in der Regel nicht zerstört [35].

Bei Untersuchungen des Einflusses der Wasseraktivität a_w (Menge an freiem Wasser in einem Produkt, welches von Mikroorganismen genutzt werden kann oder 1/100 der relativen Luftfeuchte) auf die Entwicklung und Bildung von Mykotoxinen von *Aspergillus flavus* (Aflatoxine), *Aspergillus versicolor* (Sterigmatocystin), *Aspergillus ochraceus* (Ochratoxin A), *Penicillium chrysogenum* (Citrinin) und *Penicillium expansum* (Patulin) wurde ein Minimalwert von 0.77 für die Bildung des jeweiligen Pilzes gefunden. Die meisten Lebensmittel besitzen einen Wert zwischen 0.7 und 0.98 [50]. Während des Wachstums der Pilze wird der a_w -Wert des Substrates zunächst vermindert (Verbrauch von Wasser während Sporenceimung und Anfangswachstum) und anschließend dann erhöht (Einsetzen des sekundären Stoffwechsels und Bildung des Mykotoxins).

2.1.3 Bedeutung der Mykotoxine und gesetzliche Regelungen

Wegen der hohen Standards in der Nahrungsmittelproduktion in Europa und anderen entwickelten Staaten wird eine akute Gefährdung durch Mykotoxine als gering eingeschätzt. Wo jedoch Gefahren erkannt werden, werden wirksame gesetzliche Maßnahmen ergriffen. In subtropischen und tropischen Gebieten bestehen nach den Ergebnissen epidemiologischer Untersuchungen zum Teil erhebliche Risiken, die unter anderem durch das Klima, besondere Essgewohnheiten, mangelhafte Lagertechniken und Ausbildungsmangel verursacht werden. Darüber hinaus dürfte es aus lebensmittelhygienischer Sicht recht interessant sein, wenn z.B. Gehalte an Ochratoxin A in Wein [51] oder Patulin in Apfelsaft [52-55] Rückschlüsse auf die Qualität der verarbeiteten Rohware (hier Weintrauben bzw. Äpfel) ermöglichen.

Da im Falle der Aufnahme von mykotoxinkontaminierten Lebensmitteln mit der Möglichkeit einer Gesundheitsgefährdung gerechnet werden muss, sind gesetzliche Regelungen entsprechend der Verordnung über Höchstmengen in Lebensmitteln nötig [56]. In der Verordnung (EG) Nr. 1881 / 2006 wurden Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten festgelegt [57], u. a. für die Mykotoxine DON, ZEA, OTA, FUM, den Aflatoxinen und Patulin (Anhang A1). Nicht für alle Mykotoxine liegen bisher Höchstmengenregelungen vor; für diese gilt das Vorsorgeprinzip.

Zum Schutz der öffentlichen Gesundheit ist es erforderlich, alle Kontaminationen, die auf jeder Stufe von der Erzeugung bis zum Verbrauch in die Lebensmittel gelangen können, in toxikologisch vertretbaren Grenzen zu halten. Mit der Verordnung (EWG) Nr. 315/93 des Rates zur Festlegung von gemeinschaftlichen Verfahren zur Kontrolle von Mykotoxinkontamination wurde die erforderliche Grundlage im Gemeinschaftsrecht der EU erlassen. Auf der Grundlage dieser Verordnung können Höchstwerte festgesetzt sowie Probennahme- und Analysenmethoden festgeschrieben werden. Danach darf kein Lebensmittel in den Verkehr gebracht werden, das einen Kontaminanten in einer gesundheitlich und insbesondere toxikologisch nicht vertretbaren Menge enthält. Mykotoxinkontaminationen sind in Lebensmitteln auf so niedrige Werte zu begrenzen, wie sie durch gute Praxis bei der Gewinnung, Verarbeitung, Behandlung, Lagerung, Beförderung und Zubereitung sinnvoll erreicht werden können. Um einen wirksamen Schutz der öffentlichen Gesundheit sicherzustellen, sollten Erzeugnisse mit einem Gehalt an Kontaminationen, der über dem zulässigen Höchstgehalt liegt, weder als solche in den Verkehr gebracht, noch mit anderen Lebensmitteln oder als Lebensmittelzusatz vermischt werden [58].

Für Futtermittel bestehen gegenwärtig Höchstmengenregelungen in Form von Grenzwerten, Richtwerten und Orientierungswerten. Während das Überschreiten eines Grenzwertes ein totales Verfütterungs- und Vermischungsverbot der betroffenen Partie mit anderen Futtermitteln nach sich zieht, kann die Mykotoxinkonzentration eines Futtermittels bei einer Richt- oder Orientierungswert-Überschreitung durch Mischen mit einem weniger belasteten Futtermittel „verdünnt“ werden [59].

Da Mykotoxine in Lebensmitteln sehr heterogen verteilt sein können, spielt die Probennahme eine entscheidende Rolle für die Genauigkeit der Bestimmung ihres Gehaltes. In der Verordnung (EG) Nr. 401/2006 werden Kriterien und Verfahrensweisen der Beprobung bei amtlichen Kontrollen des Mykotoxingehaltes in Lebensmitteln geregelt und so eine repräsentative Probennahme gewährleistet. Um sicherzustellen, dass die Kontrolllaboratorien Methoden mit vergleichbarem Leistungsniveau anwenden, wurden allgemeine

Kriterien für Probenaufbereitung und Analysemethoden festgelegt. Diese Referenzmethoden werden in jährlich stattfindenden Ringversuchen in den Laboratorien überprüft [60].

2.1.4 Methoden zum Nachweis von Mykotoxinen

Die Bedeutung der Schimmelpilze und der von ihnen gebildeten Mykotoxine in der Nahrungs- und Futtermittelkette wurde in den letzten Jahrzehnten intensiv erforscht. Schwerpunkte bestanden dabei in der Methodenentwicklung für die Analyse der Mykotoxine in verschiedenen Lebens- und Futtermitteln sowie in der Aufklärung von Einflussfaktoren der Infektionen von Ackerfrüchten mit toxinogenen Schimmelpilzen und in der Bildung von Mykotoxinen [61].

Für Mykotoxine mit gesetzlich regelten Grenzwerten (Aflatoxine, OTA, DON, ZEA, FUM und Patulin) liegen genormte Analysenverfahren zur Überprüfung dieser Grenzwerte im $\mu\text{g}/\text{kg}$ -Bereich ($1 \mu\text{g}/\text{kg} = 1 \text{ ppb}$) vor. Diese Methoden basieren hauptsächlich auf flüssigchromatographischen Verfahren (HPLC) oder Kapillarelektrophorese (CE) mit anschließender Fluoreszenz – oder UV-Detektion [62-73]. Die Kombination der HPLC mit Massenspektrometrie - HPLC/MS und HPLC/MS-MS - mit Dünnschichtchromatographie (DC) oder mit Gaschromatographie (GC) ist ein weiteres Verfahren, das sich zum Nachweis verschiedener Mykotoxine wie Mutterkornalkaloide in Getreideerzeugnissen eignet und zunehmend Anwendung findet [74-79]. Auch für viele bisher nicht gesetzlich geregelte Mykotoxine wie z. B. T-2 und HT-2 Toxin existieren GC-, HPLC- oder andere Methoden, an deren Verbesserung ständig gearbeitet wird. In letzter Zeit werden zunehmend flüssigchromatographische Methoden mit massenselektiver Detektion (LC-MS und LC-MS/MS Verfahren) genutzt, die viele Vorteile aufweisen. Diese Methoden sind hochselektiv, gewährleisten eine niedrige Nachweisgrenze im unteren $\mu\text{g}/\text{kg}$ -Bereich und können auch Mykotoxine erfassen, die mit HPLC- oder GC-Methoden nicht nachzuweisen sind [80-82]. Ein wesentlicher Vorteil liegt in der gleichzeitigen Erfassbarkeit einer Vielzahl von Mykotoxinen in einem Analysengang.

Neben den oben beschriebenen chromatographischen Methoden, die apparativ recht aufwändig sowie arbeits- und kostenintensiv sind und darüber hinaus gut geschultes Personal voraussetzen, gibt es eine Reihe von Schnellmethoden, die schneller und billiger sind sowie einfacher zu Analyseergebnissen führen. Der Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA) ist eine inzwischen gut etablierte immunochemische Schnellmethode, die apparativ mäßig aufwändig ist und Ergebnisse innerhalb von ca. 30 Minuten liefert, die gut zu den HPLC-Ergebnissen korreliert sind. Die Zeit- und Kostenersparnis ist aber oft mit einer geringeren Empfindlichkeit verbunden. Die Spezifität und Reproduzierbarkeit

der kommerziell erhältlichen Testsysteme kann variieren, so dass eine Vergleichbarkeit der generierten Daten teilweise nicht möglich ist. Zudem können die Tests häufig nicht zwischen chemisch ähnlichen Verbindungen differenzieren.

Seit einigen Jahren sind für den Nachweis einiger Mykotoxine auch Schnell- oder Streifentests (Dipstick Assays) erhältlich [83-89]. Sie liefern Ergebnisse auf immunchemischer Basis innerhalb weniger Minuten und sind auch mit einfachen Mitteln durchzuführen. Eine Beurteilung erfolgt anhand der Ausbildung von Farbbanden in einem Messfeld. Die unterschiedliche Intensität der Farbbanden ist visuell oder mit Hilfe eines Scanners auszuwerten und erlaubt eine quantitative Bewertung.

Im Bereich der indirekten Schnellmethoden sind die FT-IR-Spektroskopie (Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie) und die visuelle Bonitur ganzer Getreidekörner zu nennen. Kos et al. [90] haben mittels FT-IR den Fusarienbefall von Maisproben analysiert und eine Klassifizierung in befallene und unbefallene Körner vorgenommen. Auch die visuelle Bonitur (Besatzanalyse) ist zur Erfassung fusariengeschädigter Körner weit verbreitet. Beide Methoden sind jedoch als Schnellmethoden zur Ermittlung von Mykotoxingehalten wenig bis nicht geeignet. Offensichtlich existiert kein direkter Zusammenhang zwischen dem Mykotoxin-Gehalt und der Veränderung der Inhaltsstoffe des Getreidekorns (Kohlenhydrate, Eiweiß, Fett) durch Schimmelpilzbefall. Ebenso ist eine starke Verpilzung nicht unbedingt gleichbedeutend mit einem hohen Mykotoxin-Gehalt [91, 92].

Die Schlussfolgerung, ob ein gesetzlich vorgeschriebener Grenzwert für eine Getreidepartie überschritten wurde, kann nicht allein auf der Basis eines Schnelltests erfolgen. Für eine erste Bewertung der Mykotoxinbelastung einer Getreidepartie beim Landwirt oder in Mühlen ist die Verwendung eines Schnelltests jedoch geeignet und einer visuellen Beurteilung ganzer Körner vorzuziehen. Ergibt sich im Test der Verdacht auf Überschreitung des Grenzwertes, muss sich eine Untersuchung mit den o.g. labordiagnostischen Methoden anschließen.

2.2 Spektroskopische Methoden

Optische Methoden sind im weitesten Sinne wohl die wichtigsten Hilfsmittel zur Aufklärung der mikroskopischen Struktur der Materie. Vorteil ist die Bestimmung der photophysikalischen Eigenschaften ohne aufwändige Probenvorbereitung.

2.2.1 Absorption

Licht wird physikalisch als transversale elektromagnetische Wellenbewegung definiert - mit periodischen Änderungen elektrischer und magnetischer Felder. Damit ein System Licht in Form von Photonen aufnehmen bzw. abgeben kann, muss ein Übergang zwischen einem elektronischen Grund- und einem elektronisch angeregten Zustand möglich sein. Für jeden dieser elektronischen Übergänge gilt die Resonanzbedingung (1), wobei h das Plancksche Wirkungsquantum, E_{photon} die Energie und ν_{photon} die Frequenz des mit dem System wechselwirkenden Lichtquants ist. Dabei muss E_{photon} gleich der Energiedifferenz der beiden beteiligten elektronischen Zustände E_1 und E_0 sein [93].

$$E_{\text{photon}} = h\nu_{\text{photon}} = |E_1 - E_0| \quad (1)$$

Falls dann noch gewisse Voraussetzungen (Auswahlregeln) erfüllt sind, zeigen sich bei den entsprechenden Energien Absorptionslinien, die charakteristisch für die untersuchten Gase, Flüssigkeiten oder Festkörper sind.

Tritt Licht geeigneter Wellenlänge λ in eine Probe ein, so verringert sich dessen Intensität. Als Maß für diese Abnahme dient die Transmission T , welche als Quotient der Intensitäten von transmittiertem Licht I und einfallendem Licht I_0 definiert ist (2).

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (2)$$

Aus Beobachtungen folgt, dass die Intensität des Lichts exponentiell mit dem in der Probe zurückgelegten Weg d abnimmt. Dabei besteht ein Zusammenhang zwischen der Konzentration c des absorbierenden Stoffes, der Länge d des Lichtweges durch den Stoff und der Intensität des einfallenden und des transmittierten Lichts (3), wobei $\epsilon(\lambda)$ der molare dekadische Absorptionskoeffizient oder auch Extinktionskoeffizient ist. Er stellt eine stoffspezifische, wellenlängen-, temperatur- und lösungsmittelabhängige Größe dar.

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot d} \quad (3)$$

Mit der Definition der Extinktion E (auch Absorption oder optische Dichte) als dekadischer Logarithmus der reziproken Transmission (4),

$$E = \lg \frac{I_0}{I} \text{ bzw. } E = -\lg T \quad (4)$$

folgt das Lambert-Beersche Gesetz (5), das einen direkten Zusammenhang zwischen der experimentell zugänglichen Extinktion und der Konzentration der absorbierenden Spezies darstellt.

$$E = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot d \quad (5)$$

Die Gültigkeit des Lambert-Beerschen-Gesetzes ist nur für verdünnte Lösungen gewährleistet, und der absorbierende Stoff darf sich nicht in Abhängigkeit von der Konzentration verändern. Somit ist es möglich, durch Messungen der Absorption bei bekanntem Extinktionskoeffizienten auf die Konzentration der untersuchten Spezies zu schließen [94, 95].

2.2.2 Fluoreszenz

Nach der Absorption von Licht befindet sich das Molekül in einem elektronisch angeregten Zustand. Um wieder in den thermodynamisch stabilen Grundzustand zu gelangen, muss das Molekül Energie abgeben. Das kann entweder auf photophysikalischem oder photochemischem Weg erfolgen. Die photophysikalischen Möglichkeiten der Deaktivierung lassen sich am einfachsten anhand eines in Abbildung 3 dargestellten Jablonski-Schemas verdeutlichen [96].

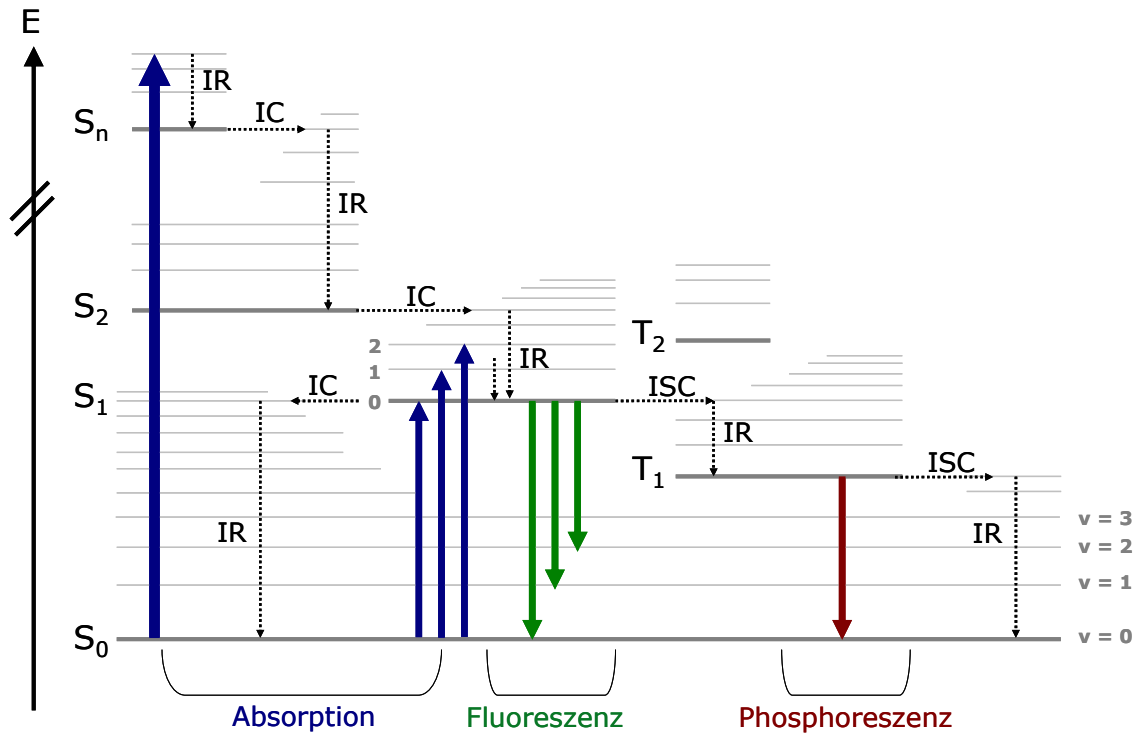


Abbildung 3: Jablonski-Diagramm zur Veranschaulichung von Absorptions- und Emissionsvorgängen im Molekül

(S: Singulett-Zustand, T: Triplett-Zustand, IR: innere Relaxation, IC: innere Umwandlung, ISC: Interkombination)

Daraus lassen sich die Energiezustände für die elektronischen und vibratorischen Niveaus charakterisieren. Die elektronischen Zustände sind durch lange, etwas dickere Linien dargestellt. Der Abstand der Schwingungsniveaus nimmt mit steigender Zahl ab. Darüber hinaus sind die Schwingungszustände durch dünnere Linien charakterisiert.

In diesem Schema finden sich zwei Arten von elektronischen Zuständen: Singulett-Zustände S und Triplett-Zustände T. Diese Nomenklatur ergibt sich aus der Multiplizität (M) der Zustände.

$$M = 2S + 1 \quad (6)$$

mit
$$S = \sum_{i=1}^N s_i \quad (7)$$

Hierbei ist s_i der Spin $s = \pm 1/2$ des Elektrons i . S ist der Gesamtspin aller Elektronen N als Summe der Einzelspins s_i . Für Singulett-Zustände ist der Gesamtspin $S = 0$, für Triplett-Zustände entsprechend $S = 1$ [97].

Die Deaktivierungsprozesse werden nach strahlenden und nichtstrahlenden Prozessen unterschieden. Nichtstrahlende Prozesse sind die innere Umwandlung (*internal conversion, IC*), die innere Relaxation (*internal relaxation, IR*) und die Interkombination (*intersystem crossing, ISC*). Bei der inneren Umwandlung geht das in höhere Zustände angeregte Elektron isoenergetisch in einen hochschwingungsangeregten Zustand eines unteren Niveaus gleicher Multiplizität über, in dem es dann durch innere Relaxation in einen niedrigeren Schwingungszustand durch Wärmeabgabe gelangen kann. Über die innere Umwandlung erreichen die Elektronen dann den tiefstliegenden Zustand gleicher Multiplizität (Regel von *Kasha*) [98]. Interkombination liegt vor, wenn die innere Konversion von Spin-Bahn-Kopplungen abhängig ist. Im Regelfall erfolgt der Übergang vom untersten angeregten Singulett-Zustand in den untersten Triplett-Zustand. Da für die Interkombination Spin-Bahn-Kopplungen von Bedeutung sind, nimmt die Wahrscheinlichkeit der Interkombination bei der Einführung von Schweratomen oder paramagnetischen Atomen in die untersuchten Moleküle zu. Aus den untersten angeregten Zuständen können die Elektronen dann strahlend durch Fluoreszenz (Singulett-Zustand) bzw. Phosphoreszenz (aus dem Triplett-Zustand) in den Grundzustand zurückkehren.

2.2.3 Zweiphotonenspektroskopie

Die Theorie der Zweiphotonenabsorption (2PA) wurde in den 1930er Jahren zunächst von *Maria Göppert-Mayer* entwickelt [99] und im Jahr 1961 – seit der Erfindung des Lasers – erstmals durch *Wolfgang Kaiser* und *C.G.B. Garrett* in den *Bell Laboratories* (USA) [100] experimentell nachgewiesen. Mit der Entwicklung und Verbreitung der Subpikosekundenlaser, insbesondere des Titan-Saphir-Lasers, in den 1990er Jahren wurde die Erforschung der Zweiphotonenabsorption intensiviert. Die Entwicklung der Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie durch *Webb, Xu et al.* [101-103] und die schnelle Umsetzung dieser Technik auf Seiten der Hersteller von Konfokalmikroskopen hat das Interesse an Mehrphotonenprozessen aller Art sprunghaft ansteigen lassen.

Bei der Absorption eines Photons regt ein einzelnes Photon mit der Energie $h\nu_1$ ein Fluorophor an. Je nach Energie des Photons und dem entsprechenden Absorptionsspektrum wird dieses Fluorophor in höhere Schwingungszustände des S_1 - oder z.B. bis in den S_2 -Zustand angeregt (Abbildung 4).

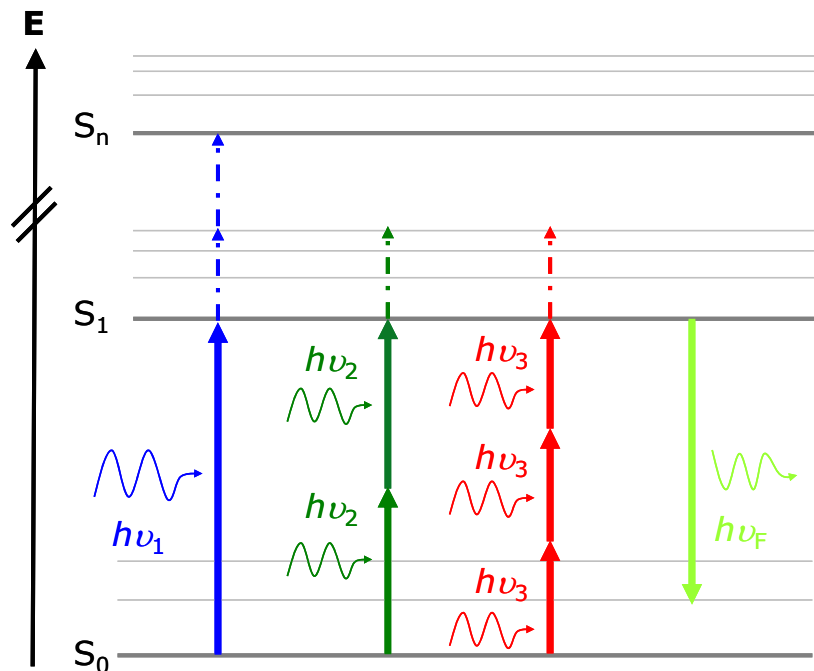


Abbildung 4: Jablonski-Diagramm für Ein- (blau), Zwei- (grün) bzw. Dreiphotonenanregung (rot). In hellgrün ist die Möglichkeit der strahlenden Desaktivierung durch Fluoreszenzemission gezeigt. Die durchgezogenen Pfeile zeigen die möglichen S_0 - S_1 - bzw. S_1 - S_0 -Übergänge. Die gepunkteten Pfeile zeigen die Möglichkeit der Anregung in höhere Schwingungsniveaus der angeregten Zustände [104].

Neben dieser Anregung durch ein Photon gibt es auch die Möglichkeit, dass Fluorophore durch die Absorption mehrerer Photonen (Multi-Photonen-Absorption) angeregt werden können. Bei der Zweiphotonenabsorption werden zwei Photonen der doppelten Wellenlänge des Einphotonen-Absorptionsmaximums ohne existierenden Übergangszustand simultan absorbiert. Dadurch wird der Fluorophor mit deutlich energieärmerer Strahlung in einen angeregten Zustand versetzt (Abbildung 5).

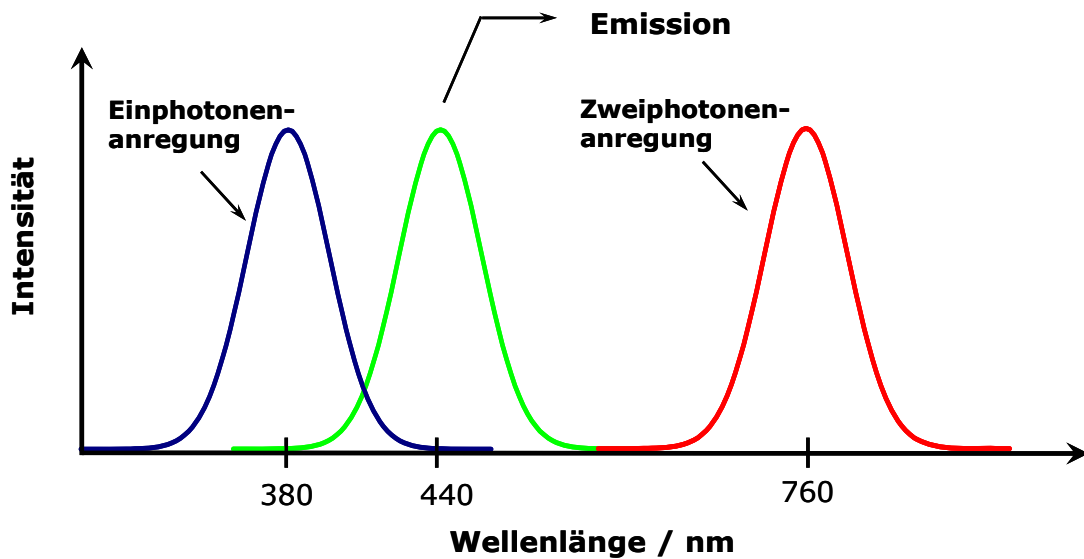


Abbildung 5: Beispielhaftes Fluoreszenzemissionspektrum (grün) nach Ein- (blau, $\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$) bzw. Zweiphotonenanregung (rot, $\lambda_{\text{ex}} = 760 \text{ nm}$)

Für eine solche simultane Absorption benötigt man hohe Puls-Spitzenleistungen, um sicher zu stellen, dass genügend Photonen gleichzeitig zur Verfügung stehen [105]. Deshalb werden häufig Titan-Saphir-Laser mit hohen Puls-Spitzenleistungen (Pulsbreite $\approx 100 \text{ fs}$) als Anregungsquelle verwendet. Die Wahrscheinlichkeit, dass zwei oder mehr Photonen zeitgleich auf ein Molekül treffen, wird durch die hohe Anzahl an Photonen im fokussierten Femtosekundenpuls sehr groß. Fluoreszenz kann ausschließlich im Fokus des Laserstrahls entstehen, da sich nur in diesem Bereich genügend Photonen befinden. Ein Anregungswellenlängenbereich von 690-1000 nm ist geeignet, da viele fluoreszierende Verbindungen im Bereich von 700-900 nm eine hohe Wahrscheinlichkeit zur Zweiphotonenabsorption aufweisen [106].

Der Hauptunterschied zwischen Einphotonenabsorption (1PA) und Zweiphotonenabsorption (2PA) besteht darin, dass die 2PA die praktisch zeitgleiche Wechselwirkung mit zwei Photonen bedingt und daher mit dem Quadrat der Lichtintensität zunimmt, während die 1PA linear von der Lichtintensität abhängt. Ebenso hat die 2PA den entscheidenden Vorteil gegenüber der Einphotonenanregung, dass die zur Anregung genutzte Strahlung langwelliger und damit energieärmer ist. Dadurch werden insbesondere lichtempfindliche Proben geschont.

Die meisten Anwendungsmöglichkeiten der Zweiphotonenanregung resultieren aus dieser Abhängigkeit von der Intensität. Bei der Einphotonenanregung ist die Anzahl der absorbierten Photonen in jeder senkrecht zum Laserstrahl stehenden Ebene im Abstand x proportional zur Intensität des Anregungslichtes in dieser Ebene. Fokussiert man den Laserstrahl auf die Mitte

der Probe, ändert man zwar die Form des Strahls und damit die Fläche des bestrahlten Teils der Ebene, nicht aber die Anzahl der Photonen, die die einzelnen Ebenen der Probe passieren. Man erhält einen sanduhrförmigen Emissionsbereich. Ein großer Teil der Einphotonenabsorption tritt auf, bevor das Licht den Brennpunkt erreicht. Die Anregungsintensität und damit die Emissionsintensität bleibt über alle Abstände x konstant.

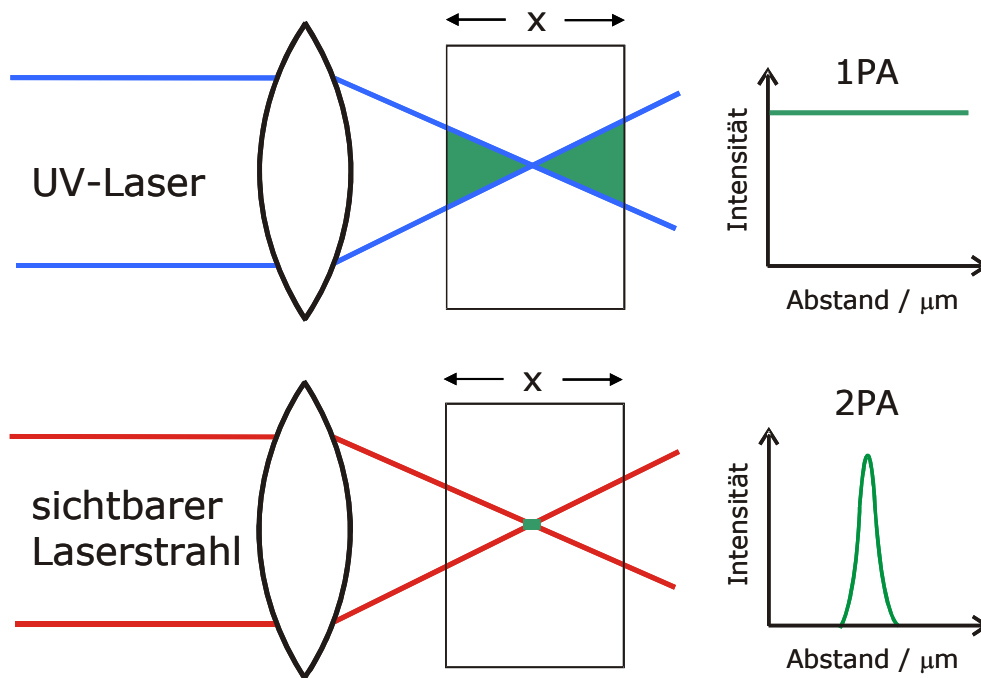


Abbildung 6: Schematischer Vergleich von Einphotonen- (oben) mit Zweiphotonenanregung (unten) [107]

Betrachtet man die Anregung derselben Probe durch einen Zweiphotonenprozess, zeigt sich eine scharfe begrenzte Emission im Brennpunkt. Die Anzahl der absorbierten Photonen ist proportional zum Quadrat der Intensität des Anregungslichtes. Dieser Lichtstrahl wird nun durch Fokussierung verkleinert, aber seine Intensität jedoch wird im Fokus soweit erhöht, dass es zur Absorption kommt. Die Zahl der absorbierten Photonen ist nicht über x konstant, sondern hat im Fokus ein Maximum (Abbildung 6).

Da es sich bei der Zweiphotonenanregung um einen nichtlinearen Prozess handelt, gelten andere Auswahlregeln als die der Einphotonenanregung [108]. Die Energiezustände, die man quantenmechanisch berechnen kann, sind durch bestimmte diskrete Werte (Quantenzahlen) gekennzeichnet. Erst durch die Angabe von vier Quantenzahlen ist der Energiezustand gekennzeichnet. Eine dieser Quantenzahlen gibt z.B. die Größe des Drehimpulses des Elektrons in

dem betreffenden Zustand an. Die Existenz dieser Drehimpulsquantenzahl l ist bedingt durch eine spezielle Symmetrieeigenschaft, die Kugelsymmetrie. Bei Einphotonenübergängen lautet somit die Auswahlregel: $\Delta l = \pm 1$. Die Auswahlregel bei Zweiphotonenübergängen lautet dann $\Delta l = 0$ oder ± 2 .

Daraus ergeben sich Unterschiede in den jeweiligen Absorptionsspektren ein und derselben Substanz. Es ist zu beachten, dass die y-Achse für die Zweiphotonenabsorption logarithmisch, für die Einphotonenabsorption relativ aufgetragen und auf 1 normiert ist. Um die Spektren besser vergleichen zu können, wird zusätzlich das Einphotonen-Absorptionsspektrum gegen die doppelte Wellenlänge aufgetragen. Dadurch können beide Spektren auf der gleichen Wellenlängenskala betrachtet werden. Am Beispiel der bekannten Fluoreszenzfarbstoffe Rhodamin B und Fluorescein wurde dies in der Literatur [109, 110] dargestellt (Abbildung 7).

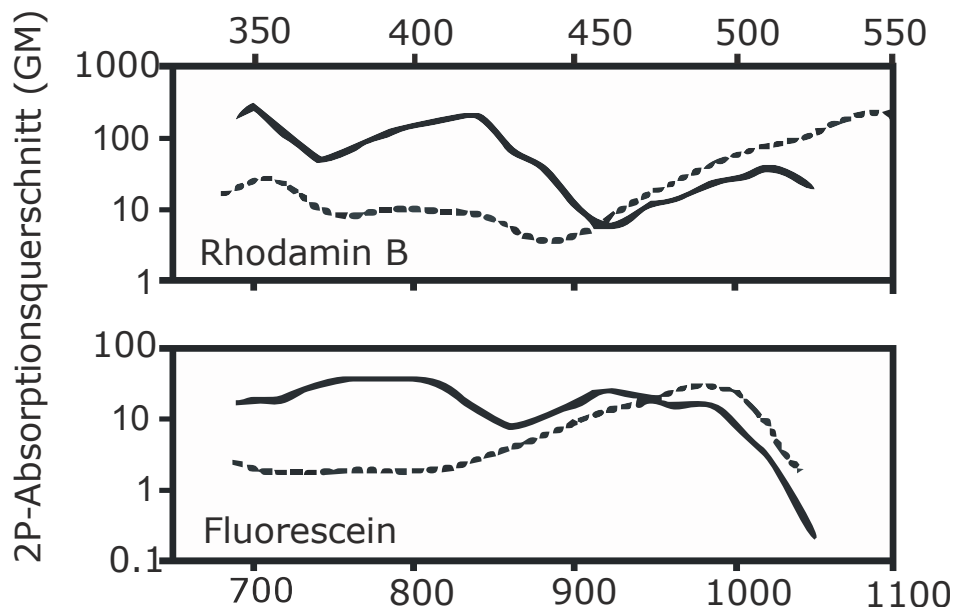


Abbildung 7: Vergleich der Fluoreszenzanregungsspektren von Rhodamin B und Fluorescein für Ein- (---) und Zweiphotonenabsorption (—)

Die Spektren unterscheiden sich deutlich. Im Fall von Rhodamin B sieht man, dass die Absorption bei 400 nm schwächer ist als bei 500 nm. Bei der 2PA hingegen ist die Absorption für 800 nm stärker als für 1000 nm. Es ist klar zu erkennen, dass auf einer relativen Skala die 2PA unterhalb des doppelten 1P-Absorptionsmaximums größer ist als die Absorption für den Einphotonenprozess. Dieses Phänomen wurde auch für zahlreiche andere Fluorophore beobachtet.

Eine für Absorptionsprozesse wichtige Stoffeigenschaft ist der wellenlängenabhängige Absorptionsquerschnitt σ . Im Falle der

Einphotonenabsorption entspricht dieser der Fläche, mit der ein einzelnes Molekül einfallendes Licht absorbieren kann. Die Anzahl der pro Sekunde absorbierten Photonen N_1 ist für die Einphotonen-Absorption durch

$$N_1 = \sigma_1 I \quad (8)$$

gegeben.

Dabei ist I die Intensität des einfallenden Lichtes mit der Einheit Photon/cm²s und σ_1 der Absorptionsquerschnitt. Da N_1 die Einheit Photon/s hat, ergibt sich somit für σ_1 die Einheit cm².

Wenn man entsprechende Annahmen wie beim Lambert-Beer-Gesetz für die Einphotonenabsorption trifft, dann ist die Abschwächung eines Lichtstrahls mit Gleichung (9) zu beschreiben:

$$\frac{\partial I}{\partial z} = N_2 = \sigma_2 I^2 = -N \delta F I \quad (9)$$

Darin ist I die Intensität, z die Wellenlänge im Medium, N die volumenbezogene Chromophorzahl und σ_2 ein molekularer Koeffizient für die 2PA. Die Intensität kann auch ausgedrückt werden als ein Photonenfluss $F=I/h\nu$ (10).

$$\frac{\partial F}{\partial z} = -\sigma_2 h\nu F^2 \quad (10)$$

σ_2 hat die Einheit cm⁴s/Photon, damit die Einheiten auf beiden Seiten der Gleichung übereinstimmen. Hier wurde die Einheit GM (benannt nach Maria **G**öppert-**M**ayer) eingeführt und entspricht 10⁻⁵⁰cm⁴s/Photon. Weitere detaillierte Informationen sind in [111] zu finden.

Es gibt zwei Wege den Zweiphotonen-Absorptionsquerschnitt (2PAQ) für Fluorophore zu bestimmen: Erstens ist dies durch die direkte Messung des 2PAQ, indem die Schwächung des Lichtes beim Durchgang durch eine Lösung detektiert wird. Die zweite Möglichkeit besteht in der Messung der Intensität der Fluoreszenzemission nach einer Zweiphotonenanregung. Sie liefert direkte Informationen über die Effizienz einer 2PA, da der Zweiphotonen-

Fluoreszenzanregungsquerschnitt σ_{2PE} proportional zum Zweiphotonen-Absorptionsquerschnitt σ_2 ist (11).

$$\sigma_{2PE} = \phi_2 \sigma_2 \quad (11)$$

Die Proportionalitätskonstante ist die Fluoreszenzquanteneffizienz ϕ . Dabei wird vorausgesetzt, dass $\phi_1 = \phi_2$ ist und sowohl bei der Einphotonen- bzw. Zweiphotonenanregung derselbe elektronisch angeregte Zustand erreicht wird bzw. die Fluoreszenzquanteneffizienz über den gesamten Wellenlängenbereich konstant bleibt.

Seit der Entwicklung durch *Xu und Webb* [102] wurden einige Varianten dieses Verfahrens entwickelt. Ist eine geeignete Bezugsverbindung mit bekanntem 2PA-Spektrum verfügbar, dann ist es am einfachsten, die Fluoreszenzspektren der Probe nach Ein- und Zweiphotonenanregung mit Spektren zu vergleichen, welche für die Bezugsverbindung unter identischen Bedingungen erhalten wurden. Zweiphotonenanregungs-Experimente erfordern einen Pulslaser, mit einer Pulsdauer von üblicherweise 100 fs. Wie bei den meisten Fluoreszenzmessungen werden verdünnte Lösungen verwendet (mit optischen Dichten um 0.1), so dass geringe Probenmengen ausreichen. Die Intensität des Zweiphotonenanregungs-Signals nimmt mit dem Quadrat der Laserintensität zu. Durch Überprüfen dieser Proportionalität ist es möglich, zu kleine oder überhöhte Werte für σ zu erkennen, die auf eine Fluoreszenz nach Einphotonenanregung zurückgehen. Einschränkungen der Methode sind 1) dass sie nicht in Spektralbereichen mit Einphotonenabsorption anwendbar ist und 2) dass die Probe eine Photolumineszenz aufweisen muss.

2.2.4 Diffuse Reflexionsspektroskopie

Die Oberflächenbeschaffenheit einer Probe entscheidet, ob das eingestrahlte Licht diffus oder regulär gestreut wird. Ideal glatte Oberflächen reflektieren das Licht regulär, ideal matte dagegen diffus, das heißt die gestreute Strahlung verlässt die Oberfläche in alle Raumrichtungen mit gleicher Intensität, die Winkelverteilung ist isotrop und wird mittels Mie-Theorie ausgewertet. Solche diffus reflektierenden Oberflächen erfüllen das Lambertsche Kosinusetz und werden als Lambertstrahler bezeichnet (Abbildung 8, links). Bei der regulären Reflexion wird - gemäß dem Reflexionsgesetz - der austretende Strahl mit dem Winkel β , der gleich dem Einfallswinkel α ist, reflektiert (Abbildung 8, rechts).

Wenn der Durchmesser der Teilchen der Probe kleiner als die Wellenlänge des Lichtes werden, wird nicht mehr von Reflexion gesprochen, sondern von Streuung (Teilchendurchmesser $\geq \lambda/10$). Die Vorgänge Brechung, Beugung und Reflexion sind hier nicht mehr voneinander zu unterscheiden. Die Winkelverteilung der Strahlungsintensität ist abhängig von der Form, Größe und Polarisierbarkeit der Teilchen und ist in Bezug auf die Einstrahlrichtung des Lichtes in alle Raumrichtungen verteilt [112, 113].

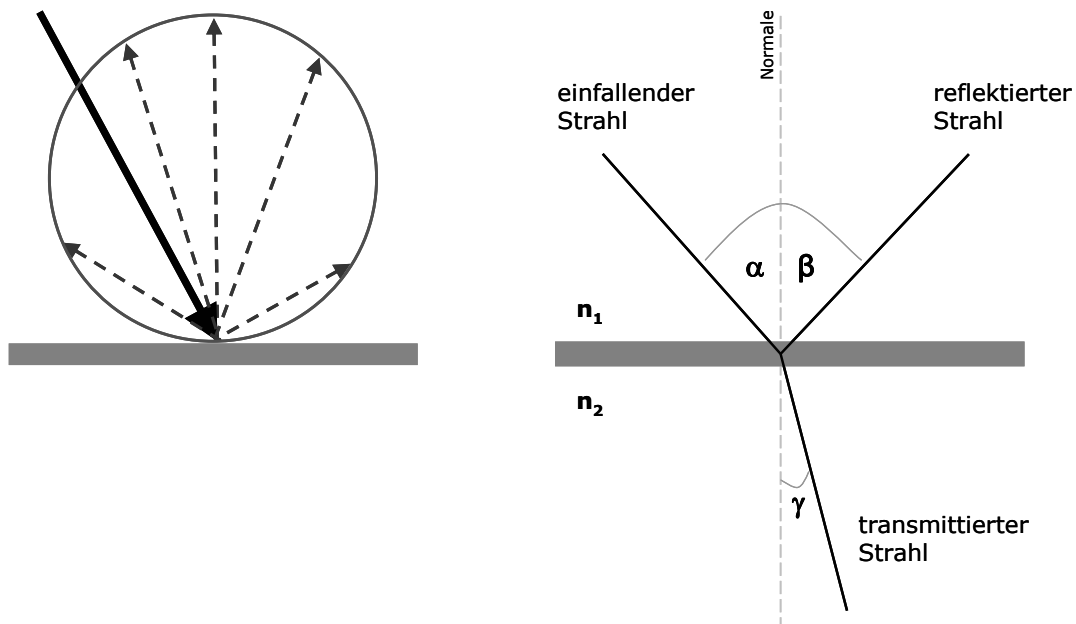


Abbildung 8: Diffuse (links) und reguläre (rechts) Reflexion

Eine sehr gleichmäßige Streulichtverteilung erhält man, wenn viele Streuzentren dicht beieinander liegen, z.B. in feinkristallinem Pulver. Dabei entsteht diffuse Reflexion R , die sich als Verhältnis der Intensität des zurückgestreuten Lichtes I zur Intensität des eingestrahlten Lichtstromes I_0 , ergibt:

$$R = \frac{I}{I_0} \quad (12)$$

Aufgrund der Überlagerung von Absorptions- und Streueffekten ist der Zusammenhang zwischen der diffusen Reflexion und der Konzentration des Analyten in der Feststoffprobe komplizierter als vom Lambert-Beer-Gesetz bekannt. Eine Möglichkeit der Auswertung dieser gemessenen

Reflexionsspektren erfolgt durch die von *Kubelka* und *Munk* [114] entwickelte Zweikonstantentheorie. Ziel ist es, sowohl den Absorptions- als auch den Rückstreuoeffizienten einer bestrahlten Schicht zu bestimmen. Der Absorptionskoeffizient S beschreibt dabei, wie viel des eingestrahlten Lichtes durch die Probe absorbiert wird. Der Streukoeffizient K quantifiziert den Verlust an Strahlungsintensität, welcher durch Streuung hervorgerufen wird, in Abhängigkeit von der Teilchengröße und -form sowie von der eingestrahlten Wellenlänge. Da Transmission und Reflexion sich in der Praxis aus sehr komplexen Vorgängen zusammensetzen, werden von Anfang an folgende Vereinfachungen angenommen [115]:

- Das Lambertsche Kosinusetz ist gültig.
- Die untersuchte Schicht besteht aus regellos verteilten Teilchen.
- Die Teilchen sind sehr viel kleiner als die Dicke der Schicht.
- Die Bestrahlung erfolgt diffus.

Bereits im Jahre 1931 haben *Kubelka* und *Munk* eine Theorie entwickelt, die die Zusammenhänge zwischen diffuser Reflexion und Durchlässigkeit lichtstreuender und lichtabsorbierender Schichten beschreibt. Für den Fall einer unendlich dicken Schicht, gilt die *Kubelka-Munk-Funktion* [114]:

$$F(R_\infty) = \frac{(1 - R_\infty)^2}{2R_\infty} = \frac{K}{S} \quad (13)$$

oder in logarithmischer Darstellung [116]:

$$\log F(R_\infty) = \log K - \log S = \log K + \text{const.} \quad (14)$$

$F(R_\infty)$ entspricht dem Quotienten von diffus reflektierter Strahlung I zur einfallenden Strahlungsintensität I_0 , wobei R_∞ das sog. "absolute diffuse Reflexionsvermögen" ist. Wird R durch Absorptionsprozesse geschwächt, steigt $F(R_\infty)$, analog der Extinktion bei Messung von Lösungen.

Führt man anstelle von K den molaren Extinktionskoeffizienten ein, so erhält man:

$$F(R_\infty) = \frac{(1 - R_\infty)^2}{2R_\infty} = \frac{K}{S} = \frac{\varepsilon_\lambda c}{S} = \text{prop.} \cdot \varepsilon \quad (15)$$

$F(R_\infty)$ ist abhängig vom Absorptionskoeffizienten, dieser wird die diffuse Reflexion umso stärker schwächen, je größer er ist oder je höher die

Konzentration des absorbierenden Analyten ist. Von daher sollte ein linearer Zusammenhang durch Auftragung von $F(R_\infty)$ gegen die Konzentration zu beobachten sein. Durch die Messung der Reflexion einer dünnen Schicht auf schwarzen Hintergrund und die Messung mit endlicher Schichtdicke lassen sich der Rückstreu- und Absorptionskoeffizient jeweils separat berechnen [116].

Die Messung der diffusen Reflexion liefert ein Reflexionsspektrum, auch Remissionsspektrum genannt, das mit dem Absorptionsspektrum einer Verbindung in Lösung vergleichbar ist. Aus experimentellen Gründen misst man in der Regel nicht das absolute, sondern das auf einen gut reflektierenden (Weiß-)Standard - z. B. Bariumsulfat, Spectralon - bezogene relative Reflexionsvermögen

$$R'_\infty = \frac{R_{\infty \text{ Probe}}}{R_{\infty \text{ Standard}}} \quad (16)$$

und erhält das Verhältnis K/S als Funktion der Wellenlänge. Für die Untersuchung chemischer Probleme mit Reflexionsmessungen ist man häufig darauf angewiesen, den Weißstandard so auszuwählen, dass eine merkliche Eigenabsorption des Weißstandards das Spektrum der Probe nicht verfälscht, ähnlich wie die Eigenabsorption des Lösungsmittels bei Durchsichtsmessungen. Es ist daher erwünscht, das Reflexionsvermögen im Ganzen bisher zugänglichen Spektralbereich zu messen [117].

Wird einer Matrix eine absorbierende Substanz zugesetzt, ändert sich der Rückstreuoeffizient zunächst nicht, weil S weiterhin durch das Streuvermögen des Verdünnungsmittels (der Matrix) bestimmt wird [118, 119]. Das Reflexionsvermögen wird dennoch sinken, weil es proportional zur Konzentration des Absorbers ist [117]. Dies erklärt, warum Oberflächen Licht nicht zu 100% reflektieren können. Schon kleinste Verunreinigungen führen zur Abschwächung des eingestrahnten Lichtes [120]. Die Verdünnungsmethode zur Eliminierung der regulären Reflexion ist für reflexionsspektroskopische Untersuchungen besonders geeignet, da alle durch reguläre Reflexion oder durch Unterschiede in der Korngröße von Probe und Standard bedingten Unsicherheiten praktisch vollständig ausgeschaltet werden.

Die käuflichen UV-Vis-Spektrometer sind in der Regel mit einem besonderen Ansatz für diffuse Reflexionsmessungen versehen, und zwar für die diffuse Einstrahlung über eine Integrationskugel (ugs. *Ulbricht*-Kugel). Für analytische UV-Vis-NIR- oder IR-Oberflächenspektroskopie werden Ulbrichtkugeln standardmäßig verwendet. Abbildung 9 illustriert das Funktionsprinzip der

Ulbrichtkugel: Licht trifft in die Öffnung der Kugel und wird im Innenraum der Kugel reflektiert und gestreut, so dass das aus der Kugel wieder austretende Licht ein homogenes räumlich integriertes (*Lambertsches*) Strahlungsfeld ist, das unempfindlich auf räumliche, winkelabhängige und polarisationsbedingte Änderungen des einfallenden Lichtes reagiert. Das eingestrahelte Licht wechselwirkt mit der Probe, wodurch Rückschlüsse auf dessen Zusammensetzung möglich sind [121].

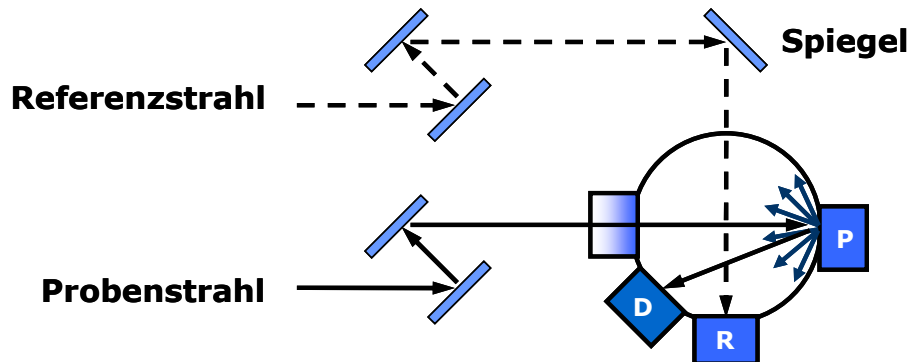


Abbildung 9: Schematischer Aufbau der Integrationskugel (P – Probe, R – Referenz, D – Detektor)

2.3 Cyclodextrine

Cyclodextrine (CD) sind eine Klasse von Verbindungen, die zu den cyclischen Oligosacchariden gehören. Sie stellen ringförmige Abbauprodukte von Stärke dar. Die Cyclodextrine bestehen aus α -1,4-glykosidisch verknüpften Glukosemolekülen (Abbildung 10).

Je nach Anzahl der sie aufbauenden Glukosemoleküle erhalten sie einen griechischen Buchstaben als Präfix:

α -Cyclodextrin: n = 6 Glukosemoleküle

β -Cyclodextrin: n = 7 Glukosemoleküle

γ -Cyclodextrin: n = 8 Glukosemoleküle

Über die oben erwähnten Cyclodextrine hinaus werden in der Literatur Cyclodextrine und dessen Derivate mit wesentlich mehr Glukoseeinheiten detailliert beschrieben [122]. Beispiele für Strukturen befinden sich im Anhang A2.

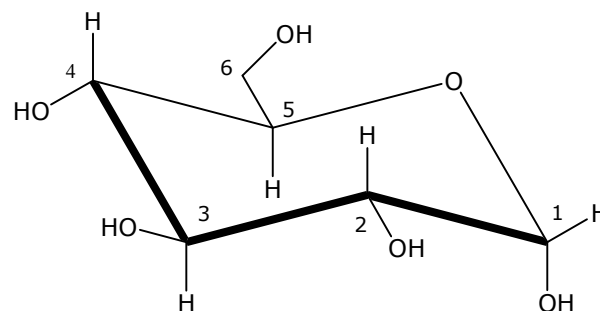


Abbildung 10: Allgemeine Strukturformel der Glukoseeinheit

Die Glukosemoleküle ordnen sich in der „Sessel“-Form so an, dass die „Sitzflächen der Sessel“ in etwa parallel zur Achse des Cyclodextrins stehen. Damit ergibt sich ein unterer Teil mit den Ring-Sauerstoffatomen und den C5-Atomen der Glukosemoleküle. Deshalb stehen die Hydroxymethylengruppen (mit den primären Hydroxylgruppen) auch alle nach unten. Im mittleren Bereich liegen die Kohlenstoffatome und Sauerstoffatome der α -1,4-glykosidischen Bindungen zwischen den Glukoseeinheiten. Im oberen Teil befinden sich die Kohlenstoffatome 2 und 3 der Glukosemoleküle mit ihren (sekundären) Hydroxylgruppen. Auf der Seite der primären Hydroxylgruppe ist der Innenraum enger, da sie frei rotieren können und dadurch den

Innendurchmesser effektiv verringern. Durch diese Anordnung ergibt sich eine toroidale (wulstartige) Struktur mit einem zentralen Hohlraum. Die nichtbindenden Elektronenpaare der glykosidischen Sauerstoff-Brückenatome zeigen nach innen. Dies führt zu einer hohen Elektronendichte und verleiht dem Innenraum anteilig den Charakter einer Lewis-Base. Durch die Stellung der Hydroxylgruppen an den Rändern besteht im Inneren ein hydrophober Hohlraum und außen ein hydrophiler Bereich.

Die hydrophobe Kavität im Inneren und die polare Außenfläche ermöglichen es den Cyclodextrinen sogenannte Einschlussverbindungen mit organischen Verbindungen, z.B. Mykotoxinen, einzugehen. Man spricht von einer Wirt-Gast-Beziehung. Für die Ausbildung des Komplexes zwischen dem Cyclodextrin als Wirtsmolekül und dem Mykotoxin als Gastmolekül müssen mehrere Bedingungen erfüllt sein: In erster Linie muss das Gastmolekül mit seiner Größe und Geometrie in den Hohlraum des Cyclodextrins passen. Dann müssen intermolekulare Wechselwirkungen zwischen Wirt und Gast möglich sein. Die Abbildung 11 zeigt schematisch den Vorgang bei der Komplexbildung in Gegenwart von Wasser.

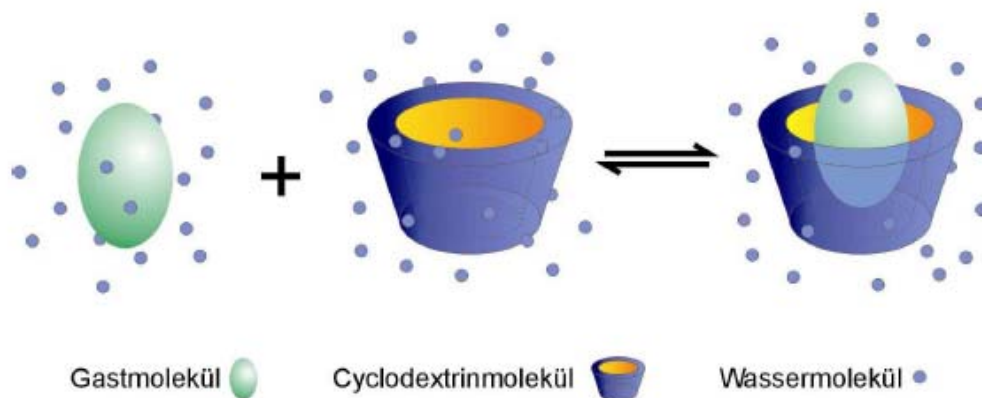


Abbildung 11: Schematische Abbildung der Komplexbildung

Man kann bei der Bildung der Komplexe mehrere Schritte annehmen: Zunächst nähert sich das Gastmolekül an. Dabei können die hydratisierenden Wassermoleküle aktiv mit den Hydroxylgruppen am Rand des Cyclodextrins wechselwirken. Auf diese Weise schirmen sie womöglich das eintretende hydrophobe Molekül von diesen Hydroxylgruppen ab. Dann werden die Wassermoleküle aus dem Hohlraum entfernt und unter der Zunahme der Entropie an das umgebende Wasser abgegeben. Nun bilden sich als Wechselwirkungen van-der-Waals-Kräfte und womöglich Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Wirt und Gast aus. Schließlich wird die Hydratstruktur um den Komplex restrukturiert.

Die treibende Kraft der Komplexbildung ist das Auswechseln der Wassermoleküle gegen die hydrophoben Gastmoleküle. Dabei entstehen Wechselwirkungen zwischen unpolaren Molekülteilen von Wirt und Gast, und die Ringspannung sinkt, was zu einem stabileren Zustand mit geringerer Energie führt.

Die Cyclodextrine sind mit den Mykotoxinen nicht durch starke chemische Bindungen verbunden. Es handelt sich im Wesentlichen um van-der-Waals-Kräfte und möglicherweise Wasserstoffbrückenbindungen. Durch spezifische räumliche Anordnungen können diese so ausgeprägt sein, dass sie die „Stärke“ einer kovalenten Bindung erreichen.

Diese Interaktionen sind hilfreich, da die CDs z. B. die spektroskopischen Eigenschaften der Mykotoxine, z.B. die Absorption und Fluoreszenz, positiv verändern. Einige Mykotoxine fluoreszieren erst durch die „Derivatisierung“ mit Cyclodextrinen, z.B. T2-Toxin [123].

Dabei ändert sich die Umgebung des CD-Chromophors vom hydrophoben Käfig zur polaren wässrigen Umgebung, was zu einer Änderung der Fluoreszenzintensität führt. Auf diese Weise kann die Konzentration eines Mykotoxins in wässriger Lösung (z.B. in Lebensmitteln wie Bier und Wein) gemessen werden, ohne dass die Mykotoxin-Fluoreszenz durch die Anwesenheit von weiteren Getränkeinhaltsstoffen gequenchet wird. Diese Fähigkeit, die Wasserlöslichkeit und die Eignung, eingeschlossene Substanzen vor Zersetzung und dem umgebenden Wasser zu schützen sowie die Lumineszenzeigenschaften der Mykotoxine positiv zu verändern [124], sind von großem Interesse für die Anwendung zum Nachweis von Mykotoxinen in flüssigen Lebensmitteln.

2.4 Chemometrische Auswerteverfahren – Multivariate Datenanalyse

Der Begriff "Chemometrie" ist nicht scharf definiert. Sie ist eine chemische Disziplin, die verschiedene mathematische und statistische Verfahren einsetzt, um optimale Messverfahren und -parameter auszuwählen und die Messdaten zu interpretierbaren Informationen weiterzuverarbeiten. Damit soll ein Maximum an chemisch relevanten und problembezogenen Informationen aus den experimentellen Messdaten gewonnen werden. Alle Verfahren der analytischen Chemie für die Optimierung einer Methode oder einer Messung, sowie für die Auswertung von Messdaten werden üblicherweise zur Chemometrie gezählt. Viele der chemometrischen Techniken sind längst bekannte statistische Verfahren. Da ein Charakteristikum vieler chemometrischer Techniken die Mehrdimensionalität ist, sind die Grundlagen der Methoden mit der Matrixalgebra einfach und kompakt darstellbar.

In den letzten Jahren sind in vielen Fällen abbildende optische Verfahren zur Qualitätskontrolle für die berührungslose Charakterisierung der Materialien und Endprodukte entwickelt worden (Beispiel Bildanalyse). Spektroskopische online Sensoren im Frequenzband des ultravioletten und sichtbaren Spektralbereichs (UV/VIS) sowie des nahen, mittleren und fernen Infrarotbereichs (NIR und (mid)-IR) werden in der chemischen Industrie zunehmend bei flüssigen oder festen, homogenen Materialien verwendet. Bei der Untersuchung von Festkörpern und Festkörperoberflächen ist dies schwieriger. Gründe dafür sind, dass die Inhomogenität des Festkörpers und seiner Oberfläche stark schwankt und zum anderen aufgrund der Oberflächenrauigkeit unterschiedliche Anteile an diffuser und gerichteter Reflexion als überlagernde Informationen erhalten werden. Nachteil dieser Verfahren ist, dass sehr viele überlagernde Informationen gleichzeitig erlangt werden [125-127].

Bei der Analyse komplexer Proben ist es mit Hilfe moderner Analysensysteme möglich, simultan eine Vielzahl von Eigenschaften zu bestimmen und so einen typischen "Fingerabdruck" von Merkmalen einer Probe zu erhalten. Dabei sammelt sich sehr schnell ein großer Datenbestand an. Bei der Interpretation dieser großen Datenmengen ist die Erkennung und Veranschaulichung von Zusammenhängen zwischen scheinbar weit auseinander liegenden Messgrößen notwendig.

In der Prozessüberwachung, der Qualitätssicherung und auch der Marktforschung, werden routinemäßig große Mengen an Daten erfasst, deren Informationsgehalt häufig nur zum Teil ausgewertet wird, da sich die wichtigen Informationen oft in den Kombinationen der Daten verstecken und die traditionellen statistischen Auswertemethoden hierbei schnell an ihre Grenzen stoßen. Die Hauptkomponentenanalyse (PCA, engl. Principle Component

Analysis) und die Projektion auf latente Strukturen (PLS, engl. Partial Least Squares Regression) sind sicher die am häufigsten verwendeten Verfahren der multivariaten Datenanalyse zum Auffinden und Herausarbeiten von Informationen aus großen Datensätzen. Bei beiden Verfahren erfolgt die Faktorenerlegung nach rein mathematischen Gesichtspunkten, weshalb die Faktoren häufig nur schwer zu verstehen und zu deuten sind.

Um die Interpretierbarkeit vor allem vom chemischen Standpunkt aus zu erhöhen, wurden die klassischen multivariaten Verfahren in letzter Zeit durch Rotationsverfahren, wie z.B. der Multivariate Curve Resolution (MCR) erweitert. Dies bietet dem Anwender speziell in der Spektroskopie große Vorteile. Bei der MCR erfolgt die Zerlegung in chemisch interpretierbare Basisspektren, welche die Grundkomponenten der vorhandenen Mischungsspektren wiedergeben [128-130].

2.4.1 Hauptkomponentenanalyse (PCA)

Die Hauptkomponentenanalyse ist ein statistisches Verfahren, das angewandt wird, wenn viele Eigenschaften (z.B. Spektrum, Konzentration, ...), die an vielen Objekten (Proben) gemessen wurden, auf wenige gemeinsame, aber unabhängige Einflussgrößen reduziert werden sollen. Mit dieser Methode besteht die Möglichkeit einen n-dimensionalen Raum auf einen m-dimensionalen Raum zu reduzieren, wobei $m < n$ sein kann. Das Besondere dabei ist, dass die wesentlichen Informationen, die in den Daten enthalten sind, bewahrt bleiben und in den meisten Fällen sogar deutlicher dargestellt werden. Die Methode fasst dazu Variablen, die stark untereinander korreliert sind, zusammen. Denn Variablen, die stark untereinander korreliert sind, liefern weitgehend dasselbe Ergebnis. Außerdem geht die Hauptkomponentenanalyse von der Annahme aus, dass es bei stark korrelierten Größen eine dritte Größe gibt, die nicht direkt messbar ist, jedoch hinter diesen korrelierten Variablen steht und sich quasi in ihnen äußert. Das bedeutet, die messbaren Größen sind nur eine andere Erscheinungsform von Größen, die im Hintergrund stehen und nicht direkt gemessen werden können. Man nennt diese im Hintergrund stehenden Größen Hauptkomponenten (PC, engl. Principal Components) oder Faktoren. Ziel der Hauptkomponentenanalyse ist es, solche Hintergrundgrößen bzw. Faktoren aus den gemessenen Variablen zu ermitteln, welche die beobachteten Zusammenhänge möglichst vollständig erklären [129, 131-133].

Zur Bestimmung der Hauptkomponenten wird in den Ausgangsdaten die maximale Varianz bestimmt - unter der Bedingung, dass die Hauptkomponenten orthogonal zueinander sind. Die auf diese Weise

gefundenen Hauptkomponenten stellen ein neues Koordinatensystem dar, das welches Ausgangsdaten besser beschreibt. Dabei erklärt die erste Hauptkomponente PC1 die größtmögliche Varianz in den Daten und die zweite Hauptkomponente PC2 dementsprechend die zweitgrößte. Mit steigender Anzahl der berechneten Hauptkomponenten sinkt der Anteil der erklärten Varianz der jeweiligen Hauptkomponenten mit der Gefahr, dass die darauf folgende Hauptkomponente nur irrelevante Informationen enthält.

Die Form des Hauptkomponentenmodells kann man allgemein ausdrücken wie Abbildung 12 dargestellt:

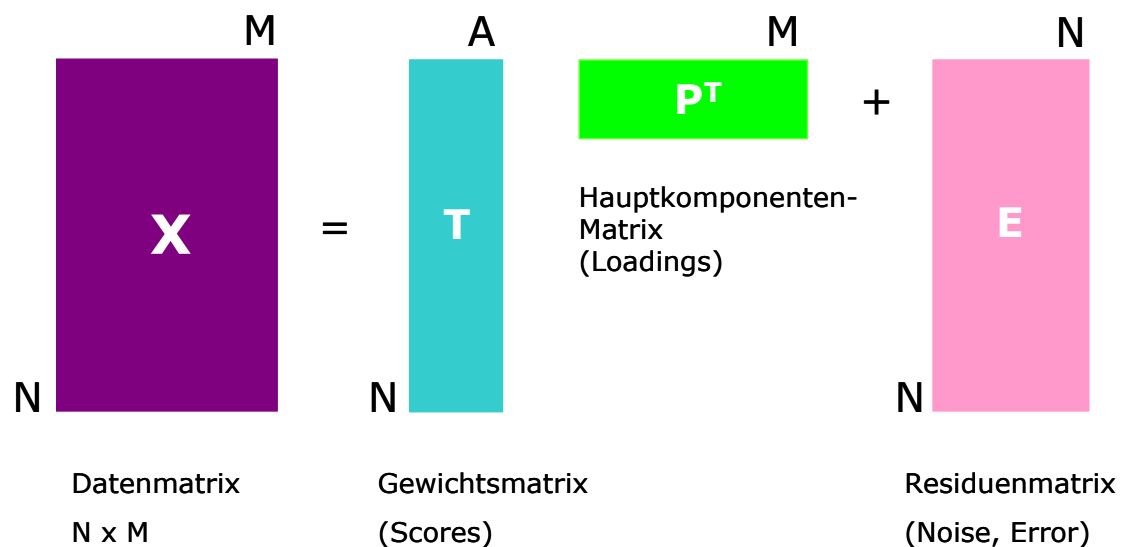


Abbildung 12: Matrizen der Hauptkomponentenanalyse

Die Datensätze der multivariaten Analyse sind mehrdimensional. In der Regel handelt es sich dabei um zweidimensionale Matrizen. In der mathematischen Formulierung der Hauptkomponentenanalyse wird der zu untersuchende Datensatz X als das Produkt einer möglichst kleinen Anzahl von Hauptkomponenten P und Gewichtsvektoren T dargestellt.

Zusammengesetzt ist die Datenmatrix aus N Zeilen, in denen die Objekte (Proben) stehen, und M Spalten, welche die Eigenschaften (Merkmale, Variablen) angeben. In den Zeilen der Matrix P stehen die Hauptkomponenten, die für alle Objekte der Datenmatrix X gleich sind. In der T -Matrix (Scorematrix) stehen die Gewichtsvektoren für jedes einzelne Objekt. Die Matrix P hat genauso viele Spalten, wie die Matrix X (=Anzahl der Variablen). Die Matrix T hat genauso viele Zeilen wie die Matrix X (= Anzahl der Objekte) und genauso viele Spalten wie die Matrix P Zeilen hat (= Anzahl der Faktoren). Die Matrix E ist die Residuenmatrix. Je besser die Faktoren- und die

Scorematrix die Daten beschreiben, umso kleiner wird die Residuenmatrix [134].

Neben dem Herausheben der Informationen kommt es auch zur Datenreduktion. Es wird normalerweise eine deutlich geringere Anzahl an Hauptkomponenten berechnet als es aufgrund der Anzahl der Variablen möglich wäre. Bei der Datenreduktion und der Vereinfachung will man für die große Datenmenge ein kleineres überschaubares Modell entwickeln, das die Daten beschreibt. Mit diesen Modellen lassen sich dann auch unbekannte Objekte beschreiben, wenn für diese die gleichen Messungen vorgenommen werden. Damit können auch Ausreißer erkannt werden, da sie zu keiner bekannten Klasse gehören. Außerdem kann mit Hilfe der PCA die Korrelation zwischen den Variablen herausgefunden werden, die für die gegebene Anwendung von besonderer Wichtigkeit sind.

Eine weitere wichtige Anwendung ist die Vorhersage bestimmter Zielgrößen aus den gemessenen Eigenschaften. Die Hauptkomponentenanalyse geht hier in die Regression über. In der Regel wird dies mit dem Verfahren der Partial Least Squares Regression durchgeführt [135, 136].

2.4.2 Multiple lineare Regression (MLR)

Bei der multiplen linearen Regression wird der funktionale Zusammenhang zwischen einer abhängigen Y-Variablen und vielen unabhängigen X-Variablen gesucht. Man kann das Modell der MLR für die abhängige Y-Variable folgendermaßen darstellen:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + \dots + b_nx_n + e \quad (17)$$

Die Zielgröße y setzt sich zusammen aus dem Absolutglied b_0 , das für zentrierte Variablen gleich dem Mittelwert ist, den linearen Beiträgen der unabhängigen X-Variablen, die auch häufig als Zustandsgrößen bezeichnet werden und die als fehlerfrei angenommen werden sowie einem Fehler e , der in der Regel bei der Messung von y entsteht. Ziel der MLR ist es, den unbekannt Regressionskoeffizienten b_0 bis b_n zu bestimmen und damit den funktionalen Zusammenhang zwischen x und y herzustellen. Dazu werden mehrere Messungen von y für verschiedene Einstellungen der Zustandsgrößen x_i durchgeführt. Es wird eine Kalibrierung durchgeführt und zur Auswertung erhält man ein lineares Gleichungssystem. Liegen genau n voneinander linear unabhängige Gleichungen vor, dann ist das Gleichungssystem bestimmt und eindeutig lösbar, indem die inverse Matrix berechnet wird.

Die multivariate Regression läuft immer in mehreren Schritten ab: 1. Kalibrierung, 2. Validierung und 3. Vorhersage.

Zur Fehlerabschätzung der MLR wird der systematische Fehler (BIAS, Verzerrung), die Standardabweichung der Residuen (SEP, engl. Standard Error of Prediction), der mittlere quadratische Fehler der Kalibration (RMSEP, engl. Root Mean Square Error of Prediction) und das Bestimmtheitsmaß R^2 bestimmt.

2.4.3 Projektion auf latente Strukturen (Partial Least Squares Regression - PLS)

Die *Partial Least Square Regression* gehört zu den multivariaten Regressionsmethoden und kombiniert die Eigenschaften der Hauptkomponentenanalyse und der multiplen lineare Regression, um ein Regressionsmodell zwischen den Scores der X- und Y-Daten zu erstellen, wobei die X-Werte bei der multivariaten Regression häufig wellenabhängige Intensitäten (aus Spektren) sind, und die Y-Werte die meist aufwändig zu bestimmende Referenzwerte (Konzentrationen) darstellen. Allgemein hat die Regressionsanalyse die Zielsetzung, einen funktionalen Zusammenhang zwischen den unabhängigen Variablen (X-Werte) und den davon abhängigen Variablen (Y-Werte) zu beschreiben und eine mathematische Formel zu erstellen, mit der man bei bekannten X-Variablen die zugehörigen Y-Werte vorhersagen kann. Das Besondere an der PLS ist, dass die Hauptkomponenten der X- und Y-Daten gleichzeitig und voneinander abhängig berechnet werden. Es wird mit den X- und Y-Daten eine PCA durchgeführt, wobei die X-Daten die PCA der Y-Daten beeinflusst und umgekehrt [137].

Auch bei der PLS Regression werden die X-Daten in die Matrizen T und P zerlegt, wie bei der PCA. Allerdings wird bei der Zerlegung in die Hauptkomponenten für die X-Daten die Zielgröße Y schon mit einbezogen (Abbildung 13).

Bei der Ermittlung der Hauptkomponenten findet zwischen der X- und Y-Datenmatrix ein gegenseitiger Informationsaustausch statt. Auf der einen Seite ist die Datenmatrix X, die mit Hilfe der PCA in die beiden Matrizen P (Faktormatrix) und T (Scorematrix) zerlegt wird:

$$X=TP^T \quad (18)$$

Auf der anderen Seite hat man die Zielgrößenmatrix Y , die auch nur aus einem einzigen Vektor bestehen kann. Hat diese Y -Matrix mehr als 1 Vektor, so erstellt man auch hier eine PCA und erhält die Faktormatrix Q mit der zugehörigen Scorematrix U :

$$Y = UQ^T \quad (19)$$

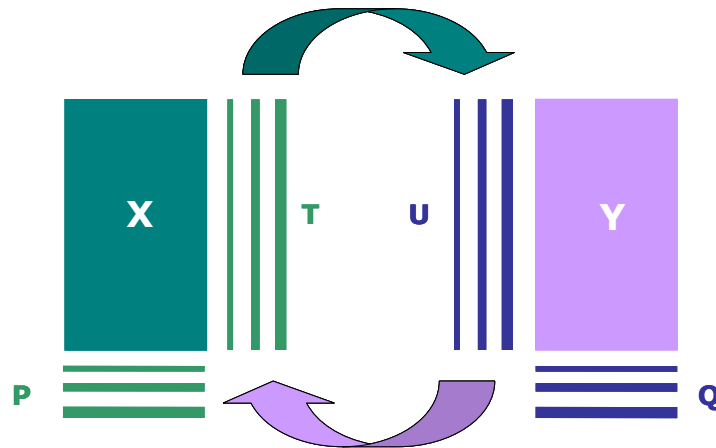


Abbildung 13: Schematische Darstellung der PLS und der beteiligten Matrizen

Bei der PLS werden nun diese beiden Datenräume X und Y miteinander verbunden und zwar durch die Scorevektoren. Für die Berechnung des ersten Faktors P_1 im X -Datenraum wird der Y -Vektor mit der größten Varianz gewählt und eingesetzt. Mit diesem Anfangswert wird die erste Schätzung für den Faktor P_1 berechnet. Nach einigen Normierungen wird dann aus dem Faktor P_1 wieder der zugehörige Scorevektor berechnet und dieser wird nun als Ausgangswert für die Berechnung der PCA auf der Y -Seite genommen. Auf diese Art und Weise spielt der Algorithmus für die PLS die neu berechneten Scorevektoren immer wieder von der X -Seite auf die Y -Seite und berechnet damit Hauptkomponenten für die X -Daten, bei denen die Struktur der Y -Daten berücksichtigt ist [131, 136, 138-140].

Wenn alle Hauptkomponenten ermittelt wurden, stellen die Daten von X und Y , die nach Abzug der Information der letzten berechneten Hauptkomponente übrig bleiben, die jeweilige Restvarianz dar und werden als Residuenmatrix bezeichnet. Im Anschluss werden nun die Regressionskoeffizienten berechnet.

Mit Hilfe des berechneten PLS-Kalibriermodells kann schließlich aus den gemessenen X -Werten die Zielgröße Y für unbekannte Objekte bestimmt werden.

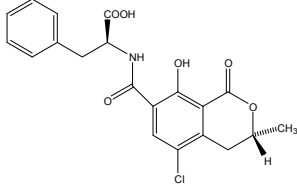
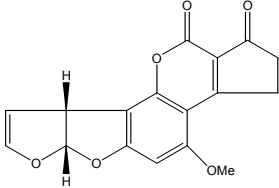
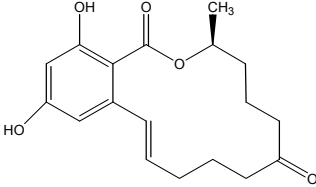
3. MATERIAL UND METHODEN

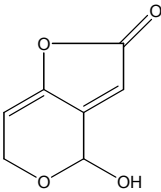
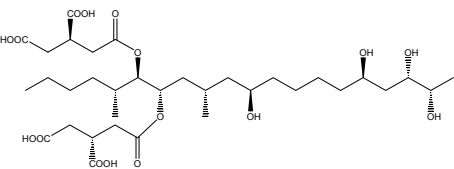
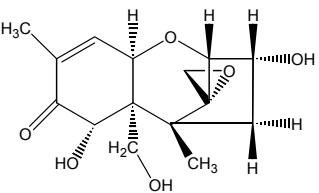
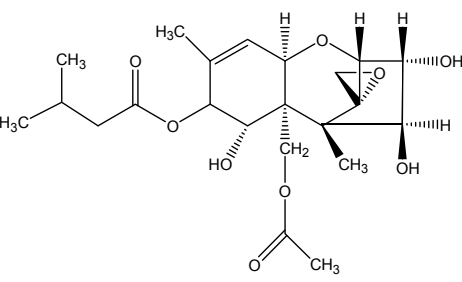
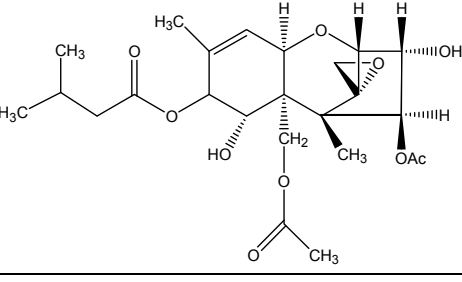
3.1 Mykotoxine

3.1.1 Absorption und Fluoreszenzspektroskopie

Die in Tabelle 2 aufgeführten Mykotoxine wurden bei Sigma Aldrich erworben und jeweils eine Stammlösung von 1 mg Mykotoxin auf 10 mL Lösungsmittel hergestellt. Die Konzentrationen der Stammlösungen sind ebenso in Tabelle 2 dargelegt.

Tabelle 2: Verwendete Mykotoxine

| Mykotoxin | Mykotoxin- bildner | Summenformel / molare Masse in g/mol | Konzentration in mol/L |
|---|----------------------------------|--|---------------------------|
| Ochratoxin A  | <i>Aspergillus ochraceus</i> | C ₂₀ H ₁₈ ClNO ₆ / 403.8 | 2.5·10 ⁻⁴ |
| Aflatoxin B ₁  | <i>Aspergillus flavus</i> | C ₁₇ H ₁₂ O ₆ / 312.3 | 3.2·10 ⁻⁴ |
| Zearalenon  | <i>Fusarium</i> spp. | C ₁₈ H ₂₂ O ₅ / 318.4 | 3.1·10 ⁻⁴ |

| Mykotoxin | Mykotoxin- bildner | Summenformel / molare Masse in g/mol | Konzentration in mol/L |
|---|---------------------------------|--|---------------------------|
| Patulin  | keine Angabe | $C_7H_6O_4$ / 154.1 | $6.5 \cdot 10^{-4}$ |
| Fumonisin B ₁  | <i>Fusarium moniliform</i> | $C_{34}H_{59}NO_{15}$ / 721.8 | $1.4 \cdot 10^{-4}$ |
| Deoxynivalenol  | <i>Fusarium graminearum</i> | $C_{15}H_{20}O_6$ / 296.4 | $3.4 \cdot 10^{-4}$ |
| HT-2 Toxin  | <i>Fusarium</i> spp. | $C_{22}H_{32}O_8$ / 424.5 | $2.4 \cdot 10^{-4}$ |
| T-2 Toxin  | <i>Fusarium</i> spp. | $C_{24}H_{34}O_9$ / 466.5 | $2.1 \cdot 10^{-4}$ |

Ausgehend von diesen Stammlösungen wurden Verdünnungen zur Ermittlung des Extinktionskoeffizienten $\varepsilon(\lambda)$, der Absorptionsmaxima $\lambda_{\text{abs,max}}$ und der

Fluoreszenzemissionen in Abhängigkeit des Lösungsmittels (Acetonitril, DMF, Ethanol, n-Hexan, Wasser) sowie des pH-Wertes erstellt.

3.1.2 Zweiphotonenspektroskopie

Zur Bestimmung des Zweiphotonen-Absorptionsquerschnittes der Mykotoxine Ochratoxin A und Aflatoxin B₁ wurden folgende Lösungen hergestellt (Tabelle 3):

Tabelle 3: Verwendete Mykotoxinlösungen

| Konzentration in mol / L | |
|---------------------------------|----------------------|
| Fluorescein | $1.5 \cdot 10^{-4}$ |
| Aflatoxin B₁ | |
| Ethanol | $3.2 \cdot 10^{-4}$ |
| Wasser / Ethanol (pH = 4) | $3.2 \cdot 10^{-4}$ |
| Ochratoxin A | |
| Ethanol | $1.24 \cdot 10^{-4}$ |
| Wasser / Ethanol (pH = 4) | $1.24 \cdot 10^{-4}$ |
| Wasser / Ethanol (pH = 11) | $1.24 \cdot 10^{-4}$ |
| DMF | $1.24 \cdot 10^{-4}$ |

3.1.3 Nachweis von Aflatoxin B₁ in Wein und Bier

Für den Nachweis des Mykotoxins Aflatoxin B₁ in handelsüblichem Weißwein und Bier wurde zunächst ein dem Wein ähnliches Modellsystem erstellt. Dazu wurde eine 12%ige Ethanol-Wasser-Mischung (Modelllösung) hergestellt und auf den pH-Wert von 4 eingestellt (für Wein und Bier wurde derselbe Wert bestimmt). Danach wurde AFB₁ zur Modelllösung und zu den alkoholischen Getränken gegeben (Tabelle 4), wobei angenommen wurde, dass die untersuchten alkoholischen Getränke keinerlei Mykotoxine enthalten. Der Nachweis wird anschließend mittels Fluoreszenz nach Ein- und Zweiphotonanregung durchgeführt sowie die Nachweisgrenze für jede Technik bestimmt.

Der Nachweis von OTA in Bier und Wein erweist sich aufgrund seiner spektroskopischen Eigenschaften in „sauren“ Lebensmitteln als nicht möglich (siehe Kapitel 4.1).

Tabelle 4: Verwendete Mykotoxinlösungen

| Konzentration in mol/L | |
|--|---------------------|
| Fluorescein | $1.5 \cdot 10^{-5}$ |
| Aflatoxin B₁ | |
| Modelllösung (Wasser / Ethanol, pH = 4) | $3.2 \cdot 10^{-5}$ |
| Weißwein | $3.2 \cdot 10^{-5}$ |
| Bier | $3.2 \cdot 10^{-5}$ |

3.1.4 Spiken von Weizenmehl und -körnern mit Ochratoxin A

Weizenkörner mit einer Feuchte von 11% sowie gemahlene Körner wurden mit unterschiedlich konzentrierten Ochratoxin A bzw. Aflatoxin B₁-Lösungen gespickt. Danach wurde gewartet, bis das Lösungsmittel verdampft war und anschließend der Gehalt an Mykotoxin mittels Lumineszenz- und Reflexionsspektroskopie nachgewiesen [141-145]. Für die Fluoreszenzuntersuchungen müssen geeignete Wellenlängenpaare (Anregungs- / Emissionswellenlänge) gewählt werden.

3.2 Cyclodextrine

Die eingesetzten Cyclodextrine sind in Tabelle 5 dargestellt und wurden bei Sigma Aldrich erworben (Strukturen: siehe Anhang A2):

Tabelle 5: Verwendete Cyclodextrine

| Cyclodextrin | molare Masse in g/mol |
|--|------------------------------|
| α -Cyclodextrin | 972.9 |
| β -Cyclodextrin | 1135.0 |
| γ -Cyclodextrin | 1297.1 |
| 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin | 1396.0 |
| Heptakis(2,6-di-O-methyl)- β -cyclodextrin | 1331.4 |

Die ethanolische Aflatoxin B₁- (0.1mg/ml, c = 0.125 mmol) und Ochratoxin A- (0.1mg/ml, c = 0.25 mmol) Stammlösung wurde mit Wasser auf die benötigten Konzentrationen verdünnt. Danach wurden die erforderlichen pH-Werte 4 und 8 eingestellt. Die Cyclodextrine (c = 25 mmol) wurden in Wasser gelöst und die Stammlösung entsprechend der benötigten Konzentrationen verdünnt.

Um den Einfluss verschiedener Cyclodextrine auf die Intensität der Fluoreszenzemission zu untersuchen, wird das Mykotoxin Aflatoxin B₁ mit α -Cyclodextrin in unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen (1:10² bis 1:10⁵) versetzt, um die größte Steigerung der Fluoreszenzintensität ($\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$) zu bestimmen. Dies wird bei allen eingesetzten CDs überprüft.

Danach wird Ochratoxin A und Aflatoxin B₁ ($\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$) mit den in Tabelle 5 angegebenen Cyclodextrinen in den geeigneten Konzentrationen gemischt und die Fluoreszenzintensitäten nach Ein- bzw. Zweiphotonenanregung detektiert. Ziel ist es, das geeignete Cyclodextrin zu finden, welches die Fluoreszenzintensität am meisten erhöht und damit die Nachweisgrenze bei beiden Techniken erniedrigt. Als Anregungswellenlängen für AFB₁ wurden entsprechend des Absorptionsmaximum bei $\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$ (1PA) bzw. 720 nm (2PA) und bei OTA bei $\lambda_{\text{ex}} = 330 \text{ nm} / 380 \text{ nm}$ (1PA) bzw. 760 nm (2PA) gewählt.

3.3 Getreideproben

Für die spektroskopischen Untersuchungen wurden vom Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V. (ATB) verschiedene Roggen- und Weizenproben zur Verfügung gestellt. Das Getreide wurde in Form von unbehandelten, sterilisierten, wieder befeuchteten sowie künstlich inokulierten Körnern bereitgestellt. In die Untersuchungen wurde jedoch auch natürlich kontaminiertes Getreide einbezogen.

3.3.1 Auswahl und Charakterisierung des Getreides

Für die Versuche standen Roggen und Weizen, bezogen von der Saatgutfirma S.G.L. GmbH in Alttrebbin-Altlewin, zur Verfügung. Roggen wurde zunächst nach regionalen Anbaustrategien ausgewählt. Im Verlauf der Untersuchungen erwiesen sich allerdings die Inhomogenität und starke Variabilität in Form, Farbe und Größe der Körner des Getreides als problematisch, vor allem für die spektroskopischen Modelluntersuchungen (Abbildung 14).



Abbildung 14: Variabilität des Roggens in Korngröße, Kornform und Kornfarbe

Weizen stellte als Untersuchungsmaterial durch die Homogenität im Korn eine Alternative dar. Eingesetzt wurde gereinigter E-Weizen der Sorte CAPO. Die Angaben zu den Inhaltsstoffen und dem Feuchtegehalt des Weizens und Roggens sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Inhaltsstoffe der verwendeten Getreidearten (TM - Trockenmasse)

| Parameter | Feuchtegehalt / | Stärke / | Rohprotein / | Rohasche / |
|------------------|------------------------|-----------------|---------------------|-------------------|
| | % | % TM | % TM | % TM |
| Roggen | 10.35 | 57.94 | 11.26 | 1.95 |
| Weizen | 12.19 | 60.20 | 18.69 | 1.86 |

3.3.2 Infektion mit Pilzstämmen

Am ATB wurden zusätzlich für die künstliche Inokulation mit Schimmelpilzen Schimmelpilzstämme unterschiedlicher Herkunft, die zur Feld- bzw. Lagerflora gehören, und von denen das Toxinbildungsvermögen bekannt ist, eingesetzt (Tabelle 7).

Tabelle 7: Schimmelpilzstämme für die künstliche Inokulation von Weizen

| Spezies |
|--------------------------------|
| <i>Alternaria spec.</i> |
| <i>Fusarium culmorum</i> |
| <i>Fusarium graminearum</i> |
| <i>Fusarium poae</i> |
| <i>Aspergillus niger</i> |
| <i>Aspergillus versicolor</i> |
| <i>Penicillium verrucosum</i> |
| <i>Penicillium chrysogenum</i> |

Für alle Ansätze wurde steriler Weizen auf einen Feuchtegehalt von 25% befeuchtet. Das entspricht einer Wasseraktivität von 0.96-0.99 und liegt damit im Bereich der Mykotoxinbildung durch Schimmelpilze (Tabelle 8). Für Vergleichsuntersuchungen wurden dieselben Spezies als Reinkulturen auf Nährmedium (Kartoffel-Dextrose Agar) angelegt und für spektroskopische Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

Tabelle 8: Wasseraktivität für Wachstum und Toxinbildung

| | a_w-Wert Wachstumsoptimum | a_w-Wert Toxinbildung |
|-------------------------|--|--|
| <i>F. graminearum</i> | 0.90 – 0.995 | 0.95 – 0.995 |
| <i>F. culmorum</i> | 0.90 – 0.995 | 0.8 – 0.85 / > 0.9 |
| <i>Aspergillus spp.</i> | 0.77 – 0.78 | 0.80 – 0.99 |
| <i>Penicillium spp.</i> | 0.82 | 0.83 – 0.99 |

3.3.3 Natürlich kontaminiertes Getreide

Es wurden natürlich kontaminierte Getreidepartien bezogen und für Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Solche Getreideproben wurden vom Zentrum für Agrarlandschaftsforschung Müncheberg e.V. (ZALF) und vom Institut für Getreideverarbeitung Nuthetal (IGV) zur Verfügung gestellt.

3.4 Absorptions- und Fluoreszenzmessungen

Alle vorgenommenen spektroskopischen Untersuchungen der gelösten Mykotoxine werden in Quarzküvetten (Hellma GmbH, $d = 10 \text{ mm}$) durchgeführt.

3.4.1 Absorptionsmessungen

Die Aufnahme der Absorptionsspektren erfolgt mit einem UV-Vis-Absorptionsspektrometer (Cary 500, Varian) gegen eine mit Lösungsmittel gefüllte Küvette im Referenzstrahlengang. Der aufgenommene Wellenlängenbereich liegt zwischen $200 \text{ nm} < \lambda_{\text{abs}} < 600 \text{ nm}$. Vor jeder Messreihe wird eine Basislinienkorrektur (0%- und 100%- Transmission) und ein Nullabgleich durchgeführt. Folgende Messparameter werden festgelegt:

Datenintervall: 1 nm

Messzeit pro Datenpunkt: 0.5 s

3.4.2 Fluoreszenzmessungen

Stationäre Fluoreszenzspektren werden mit dem FluoroMax3-P Spektrometer (Spex-Jobin Yvon, Horiba, NL) aufgenommen. Die Fluoreszenzspektren der gelösten Mykotoxine werden in der klassischen 90° -Geometrie aufgenommen, bei der das Anregungslicht die Probe von der einen Seite bestrahlt und der Detektor im rechten Winkel positioniert ist.

Für Feststoffproben gibt es die spezielle Methode der "Front-Face"-Fluoreszenzspektroskopie. Das einfallende Licht trifft mit einem Winkel von $30^\circ/60^\circ$ auf die Probe, um sicherzustellen, dass innere Filtereffekte, Reflexion, Streuung und Depolarisierung [146] minimiert werden (Abbildung 15).

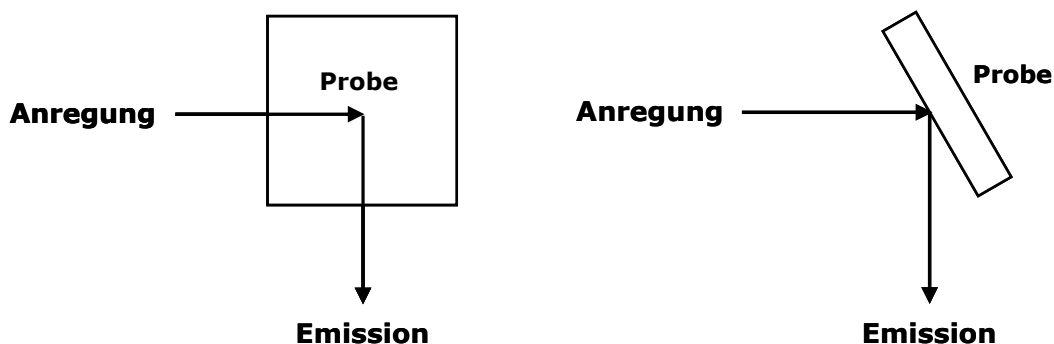


Abbildung 15: Klassische (links) und Front-Face-Fluoreszenzspektroskopie (rechts)

Für alle Fluoreszenzmessungen der Flüssigkeiten und der Feststoffe haben sich folgende Parameter bewährt:

Datenintervall: 0.5 nm

Messzeit pro Datenpunkt: 0.5 s

Spaltbreiten (Anregung und Emission): 2 nm / 2 nm

Gemessen wurden jeweils das reine Fluoreszenzsignal S sowie das korrigierte Signal S_c/R , wobei R die Lampenkorrektur ist und bei c eine Korrekturfunktion einfließt, die die spektrale Empfindlichkeitsverteilung des Detektors berücksichtigt. Für die Auswertung werden die erhaltenen Spektren basislinienkorrigiert und auf 1 normiert.

Die optischen Dichten der Lösungen zur Aufnahme von Fluoreszenzspektren sowie zur Bestimmung von Fluoreszenzquantenausbeuten ϕ_F (mittels PL Quantum Yield Measurement System - Typ C9920 - mit Ulbrichtkugel, Hamamatsu Photonics K.K.) wurden im Bereich um das entsprechende Absorptionsmaximum / Anregungswellenlänge auf einen Wert von 0.1 verdünnt [147].

Zur Übersicht wurden bei der Untersuchung von Weizenkörnern (pur und "verpilzte" Weizenkörner) Fluoreszenzemissionsspektren mit Anregungswellenlängen von 220 nm bis 500 nm und Emissionswellenlängen ab 10 nm oberhalb der Anregungswellenlänge λ_{ex} aufgenommen (Batch-Scan). Es entstand eine dreidimensionale "Landkarte", die sogenannte Fluoreszenz-Anregungs-Emissions-Matrix (EEM) [148].

3.5 Zweiphotonenspektroskopie

Um eine Zweiphotonenabsorption nachzuweisen, wurden leistungsabhängige Fluoreszenz-Intensitätsmessungen an Aflatoxin B₁ und Ochratoxin A in verschiedenen Lösungsmitteln und mit unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt. Zusätzlich wurde Fluorescein als positiver und Wasser als negativer Standard vermessen.

Als Anregungslichtquelle dient ein Titan-Saphir-Laser (Tsunami 3960, Spectra Physics, 80.2 MHz), welcher in ein Fluoreszenzspektrometer (FLS920, Edinburg Instruments, Edinburgh UK) eingekoppelt wird. Der Laserstrahl wird durch eine Sammellinse auf die Mitte der Lösungen fokussiert und die Emission der Probe im 90°-Winkel zur Anregung detektiert. Mit einer Anregungswellenlänge im Spektralbereich $700 \text{ nm} < \lambda_{\text{ex}} < 860 \text{ nm}$, einem Messbereich $350 \text{ nm} < \lambda_{\text{em}} < 650 \text{ nm}$ in 1 nm-Schritten und der Integrationszeit von 1 s werden die quantenkorrigierten Emissionsspektren bzw. die Flächenintegrale der Emissionsspektren mittels Software F900 (Edinburg Instruments, Edinburgh UK) bestimmt. Die Spektren werden aufgrund der Wellenlängenabhängigkeit der Response Funktion der Photomultiplier Tube (PMT) um einen Faktor korrigiert.

Die Leistung des Lasers wurde mit Hilfe eines Grauradfilters stufenweise erniedrigt und mit einem Leistungsmessgerät quantifiziert. Zu jeder eingestellten Laserleistung wurde ein Emissionsspektrum gemessen und das Integral bestimmt, da die Leistung P mit der Intensität (Flächenintegral) I nach folgender Gleichung zusammenhängt [110, 149-151]:

$$I \approx P^2 \quad (20)$$

$$\log I \approx 2 \log P \quad (21)$$

Wird nun die Intensität gegen die Leistung doppellogarithmisch aufgetragen und erhält man einen linearen Anstieg von 2, so ist die Zweiphotonenabsorption nachgewiesen [150].

Danach kann der wellenlängen- und stoffspezifische Zweiphotonen-Absorptionsquerschnitt σ_2 nach Rumi et al. [152] berechnet werden, mit Kenntnis der Quantenausbeute des Mykotoxins im jeweiligen Lösungsmittel.

$$\sigma_2 = \sigma_2^{FL} \frac{\int F dv \cdot c^{FL} \cdot \phi^{FL}}{\int F^{FL} dv \cdot c \cdot \phi} \quad (22)$$

Hierbei sind ϕ die Quantenausbeute, c die Konzentrationen und Fdv das Integral der Flächen unter den Emissionskurven. Der Index FL rührt vom Standard Fluorescein [153].

3.6 Reflexionsspektroskopie

Die Aufnahme der Reflexionsspektren erfolgt mit einem Absorptionsspektrometer (Lambda 750, Perkin Elmer) mit eingebauter Integrationskugel (Durchmesser: 60 mm, siehe Abbildung 9), welche mit *Spectralon* (Labsphere) ausgekleidet ist. Die Messungen lagen im Wellenlängenbereich zwischen $200 \text{ nm} < \lambda < 2500 \text{ nm}$. Vor jeder Messreihe wurde eine Basislinienkorrektur (0%- und 100%-Reflexion) durchgeführt. Die Proben wurden in einem Feststoffprobenhalter präpariert und gegen den Reflexionsstandard *Spectralon* vermessen.

Folgende Messparameter wurden festgelegt:

Datenintervall: 1 nm

Aufnahmegeschwindigkeit: 266.75 nm / min

Die Zuordnung der spektralen Banden zu den Inhaltsstoffen der Getreideprodukte erfolgt anhand tabellierter Daten [154-158].

Die erhaltenen Spektren, welche den Reflexionsgrad $R\%$ angeben, werden mittels der Messsoftware in die logarithmische Auftragung umgewandelt, wobei gilt:

$$\log \frac{1}{R} = \log \frac{100}{R\%} \quad (23)$$

Nach der Datenvorbehandlung - zur besseren Auswertbarkeit - werden die Spektren gemäß *Kubelka-Munk*-Funktion umgerechnet und somit das Absorptionsspektrum des untersuchten Systems bei gleich bleibenden Streukoeffizienten erhalten [159].

3.6.1 Datenvorbehandlung

Als wichtigste Parameter, welche die Qualität der Spektren bestimmen, sind zu nennen:

- genaue Probenpräparation
- Auswahl des geeigneten Spektralbereichs
- geeignete Datenvorbehandlung

-
- zur chemometrischen Auswertung: geeigneter Datensatz zur Modellerstellung und korrekte Auswahl der Anzahl an Hauptkomponenten

Mit der Auswahl des geeigneten Wellenlängenbereichs werden Bereiche ohne Informationen ausgeschlossen. Dadurch werden die Einbindung von Beiträgen von Störkomponenten und irrelevante Informationen (spektrales Rauschen) in das Modell verhindert, die die Qualität des Modells verschlechtern. Mit Hilfe von geeigneten Datenvorbehandlungen kann die chemische Information in den spektralen Daten hervorgehoben werden, wodurch eine bessere Korrelation zwischen den spektralen Daten (Reflexionsspektren) und der gesuchten Variable (z.B. Mykotoxinkonzentration, Inhaltsstoffe) möglich ist [160-162].

Basislinienkorrektur und Glätten: Basislinieneffekte führen zu systematischen Abweichungen von der Grundlinie, die keine chemischen Informationen enthalten. Sie können von Verunreinigungen und Streuverluste verursacht werden oder durch systematische Probleme der Messapparatur entstehen. Durch die (erste oder zweite) Ableitung der Spektren können Basislinieneffekte aus den Spektren entfernt werden.

Das Spektrometer selbst kann Störsignale (Rauschen) in den Spektren verursachen und damit die Modellherstellung für die chemometrische Auswertung erschweren. Durch Glättung kann das Rauschen beseitigt werden, wodurch das Signal/Rausch-Verhältnis verbessert wird.

Streueffekte können die chemische Information in den Spektren überdecken und können mit Hilfe der multiplikativen Streukorrektur (MSC, engl. Multiplicative Scatter Correction) und der Standard Normal Variate (SNV) Transformation korrigiert werden. Vor allem unterschiedliche Teilchengrößen (z.B. Mehl und Korngrößen) in den Proben führen zur Streuung. Weiterhin ist die Streuung von der Wellenlänge und vom Brechungsindex abhängig. Gerade bei den vorliegenden Proben müssen Streueffekte durch inhomogene Verteilungen der Streuzentren (Packungsdichte) beachtet werden, die das erhaltene Reflexionsspektrum beeinflussen [163].

Multiplikative Streukorrektur (MSC): Bei der multiplikativen Streukorrektur wird angenommen, dass eine Abtrennung der wellenlängenabhängigen Streueffekte von der chemischen Information möglich ist. Dafür wird ein Mittelwertspektrum (Referenzspektrum) aller im Datensatz vorhandener Spektren gebildet, das die mittlere Streuung b und einen mittleren Offset a repräsentiert. Anschließend wird jedes Spektrum dann mit

Hilfe eines Least Square Verfahrens auf dieses Mittelwertspektrum gefittet, wobei e idealerweise die chemische Information enthält:

$$x_n = a_n + b_n \bar{x} + e_n \quad (24)$$

So werden für jedes Spektrum x_n die MSC-Korrekturkoeffizienten a_n und b_n berechnet und man erhält schließlich das MSC-korrigierte Spektrum x_{MSC} :

$$x_{MSC} = \frac{x_n - a_n}{b_n} \quad (25)$$

Bei der MSC ist zu beachten, dass zur Korrektur ein Mittelwertspektrum als Referenzspektrum herangezogen wird. Daher muss das MSC-Modell neu berechnet werden, wenn es zu Veränderungen des Datensatzes durch Erweiterung oder Kürzung (z.B. Eliminierung von Ausreißern) kommt [164].

Standard Normal Variate (SNV) Transformation: Im Gegensatz zur MSC wird bei der SNV jedes Spektrum für sich transformiert, und der gebildete Mittelwert aller Spektren und die Standardabweichung beziehen sich jeweils auf ein einzelnes Spektrum [165]. Im vorliegenden Fall der Reflexionsspektroskopie wird die erhaltene Intensität ($\log(1/R)$ bzw. Ableitung des Reflexionsspektrums) bei der Wellenlänge i korrigiert:

$$x_{i,SNV} = \frac{(x_i - \bar{x})}{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^p (x_i - \bar{x})^2}{p-1}}} \quad (26)$$

Dabei steht x_i für die erhaltene Intensität bei der Wellenlänge i und \bar{x} ist der Mittelwert für alle Intensitäten bei allen gemessenen Wellenlängen (p) des Spektrums. Die SNV ist gegenüber der MSC vorteilhafter, wenn die Variabilitäten zwischen den Spektren groß sind.

Erste und Zweite Ableitung der Spektren: Basislinieneffekte lassen sich mit Hilfe von Ableitungen entfernen. Vorteilhaft ist, dass sie überlagerte Banden hervorheben und damit die spektrale Auflösung verstärken. Dafür verlieren die Spektren durch die Ableitungen ihre spektrale Form. Deshalb erfolgen die Ableitungen in Kombination mit einer Polynomglättung (Savitzky-Golay-Glättung). Durch die vorausgehende Glättung wird die Ableitung robuster gegenüber im Spektrum vorhandenem Rauschen. Erfolgt die Ableitung ohne vorherige Glättung, würde durch die Ableitung das Rauschen hervorgehoben werden.

Dieses mit einem Polynom des Grades n lokal beschriebene Spektrum wird nun abgeleitet:

$$1. \text{ Ableitung: } \frac{\delta(\log 1/R)}{\delta\lambda} \quad (27)$$

$$2. \text{ Ableitung: } \frac{\delta^2(\log 1/R)}{\delta\lambda^2} \quad (28)$$

Die erste Ableitung entfernt Störeffekte wie eine konstante Basislinie und mit Hilfe der zweiten Ableitung können noch zusätzlich multiplikative Effekte - z.B. Streueffekte - aus den Spektren herausgerechnet werden [166].

Chemometrische Auswerteverfahren: Die chemometrischen Auswertungen und die Datenvorbehandlung werden mittels Software Unscrambler 9.8 (Camo, Norwegen) durchgeführt.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 Photophysikalische Eigenschaften der Mykotoxine

4.1.1 Absorption und Lumineszenzeigenschaften

Wegen teils unvollständiger und fehlerhafter Angaben der photophysikalischen Eigenschaften der Mykotoxine in der Literatur [167, 168] wurden grundlegende photophysikalische Parameter zur Absorption bzw. Fluoreszenz der wichtigsten Vertreter der Mykotoxine in Europa - Aflatoxin B₁ (AFB₁), Ochratoxin A (OTA), Fumonisin B₁ (FUM), Patulin, Zearalenon (ZEA), Deoxynivalenol (DON) sowie T-2 und HT-2 Toxin in verschiedenen Lösungsmitteln - u.a. Ethanol, Acetonitril, Wasser - erneut bestimmt (Tabelle 9).

Tabelle 9: Absorptionsmaxima ($\lambda_{\text{abs,max}}$) und Extinktionskoeffizienten (ϵ) der Mykotoxine in verschiedenen Lösungsmitteln

| Mykotoxine | $\lambda_{\text{abs,max}} / \text{nm} (\epsilon / \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$ | | |
|--------------------------|---|-------------|-------------|
| | Acetonitril | Ethanol | Wasser |
| Ochratoxin A | 390 (9700) | 220 (29600) | 333 (3200) |
| | | 333 (6500) | 380 (3000) |
| Aflatoxin B ₁ | 224 (28100) | 224 (28700) | 224 (16800) |
| | 265 (14400) | 264 (14500) | 267 (11400) |
| | 356 (24000) | 360 (26500) | 365 (18200) |
| Fumonisin B ₁ | 225 (~1200) | 230 (~200) | 228 (~3300) |
| Patulin | 273 (29600) | 275 (14900) | 279 (1200) |
| Zearalenon | 236 (27400) | 237 (31500) | 236 (75800) |
| | 273 (11600) | 275 (15200) | 271 (34100) |
| | 315 (5300) | 315 (7700) | 311 (13900) |
| Deoxynivalenol | 218 (8000) | 218 (7000) | 215 (7500) |
| HT-2 Toxin | 275 (~400) | 270 (~200) | 272 (~200) |
| T-2 Toxin | 275 (~300) | 273 (~200) | 275 (~200) |

Alle untersuchten Mykotoxine absorbieren im Spektralbereich von $200 \text{ nm} < \lambda_{\text{abs}} < 400 \text{ nm}$, und einige zeigen eine intrinsische Lumineszenz bei Emissionswellenlängen $\lambda_{\text{em}} > 350 \text{ nm}$.

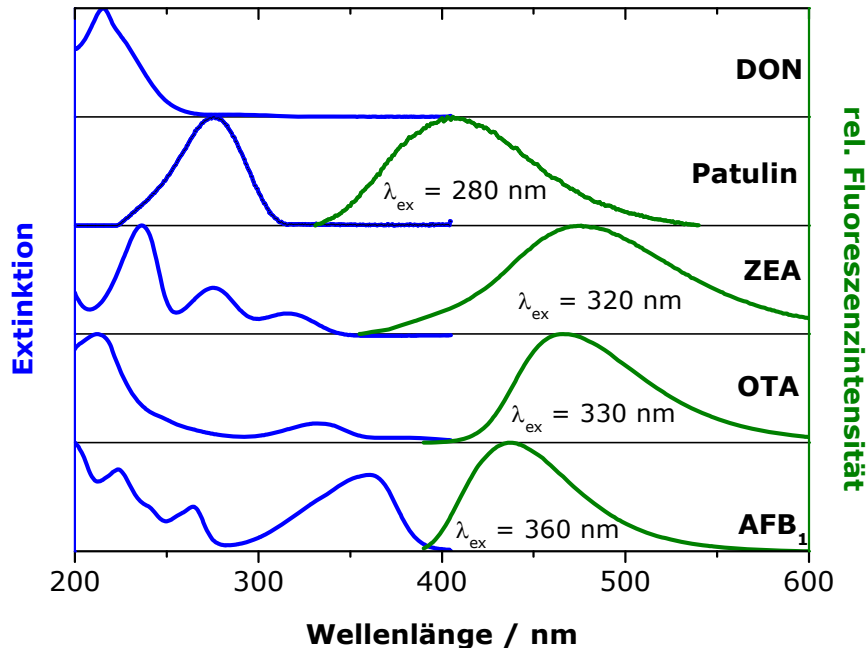


Abbildung 16: Absorptions- und Emissionsspektren der untersuchten Mykotoxine in ethanolischer Lösung

Die Emissionsmaxima von Aflatoxin B₁, Ochratoxin A, Zearalenon und Patulin liegen in ethanolischer Lösung zwischen $420 \text{ nm} < \lambda_{\text{em}} < 470 \text{ nm}$ (Abbildung 16). Die Maxima in einer Acetonitril- bzw. wässrigen Lösung sind unverändert oder nur wenig bathochrom verschoben (Anhang A3 / A4). Patulin fluoresziert in wässriger Lösung und Acetonitril nicht. Die Fluoreszenzeffizienzen liegen zwischen 1% und 50% und die entsprechenden Fluoreszenzabklingzeiten im ns-Bereich. Fumonisin B₁, HT-2 sowie T-2 Toxin absorbieren im untersuchten Spektralbereich nur schwach und fluoreszieren unter den gewählten experimentellen Bedingungen nicht.

In den nachfolgenden Untersuchungen wird speziell auf die Mykotoxine Aflatoxin B₁ und Ochratoxin A eingegangen. Beide Mykotoxine sind im Ranking nach *Hesseltine* [169] die bedeutendsten Pilzgifte. Beide werden von den Feldpilzen *Aspergillus* spp. gebildet und können in ähnlichen Lebensmitteln (Getreide, Wein) gefunden werden. Nachfolgend sind die Besonderheiten der beiden Mykotoxine bei den spektroskopischen Untersuchungen aufgeführt.

4.1.2 Ochratoxin A (OTA)

Abbildung 17 zeigt die Strukturformel von Ochratoxin A, die aus einer Isocumarin- und Phenylalanin-Einheit zusammengesetzt ist.

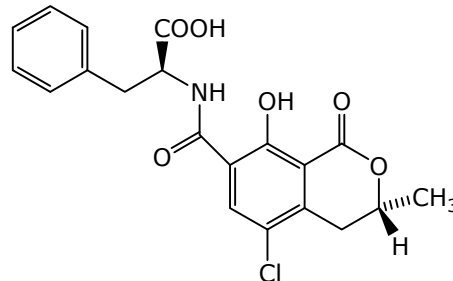


Abbildung 17: Strukturformel von Ochratoxin A

Das Proton der Carboxylgruppe der Phenylalanin-Einheit besitzt einen pK_A -Wert von 4.3 ± 0.1 , das phenolische Proton einen pK_A -Wert von 7.2 ± 0.2 [170]. Bei pH-Werten kleiner 7 ist eine Keto-Enol-Tautomerie möglich: Die Carbonylgruppe liegt in der Form mit der Doppelbindung zum Sauerstoff als auch in einer Form mit der Doppelbindung zwischen dem Carbonyl-Kohlenstoff und dem α -Kohlenstoff vor. In letzterer Form ist ein Proton vom α -C-Atom zum Sauerstoff der Carbonylgruppe gewandert und bildet eine Hydroxylgruppe, es entsteht ein „Enol“.

Die Keto-Enol-Tautomerie beim OTA ist abhängig vom Lösungsmittel (Abbildung 18). Besteht die Möglichkeit die Enol-Form über Wasserstoffbrückenbindungen (z.B. in Wasser) zu stabilisieren, liegt das Gleichgewicht nahezu vollständig auf der Seite des Enols E. In aprotischen Lösungsmitteln (z.B. DMF) kann die Enol-Form nicht über intramolekulare H-Bindungen stabilisiert werden und die Keto-Form K wird begünstigt.

Die intramolekulare Protonenwanderung verläuft vor allem in aprotischen Lösungsmitteln sehr schnell, so dass eine eindeutige Unterscheidung von Keton und Enol nicht möglich ist.

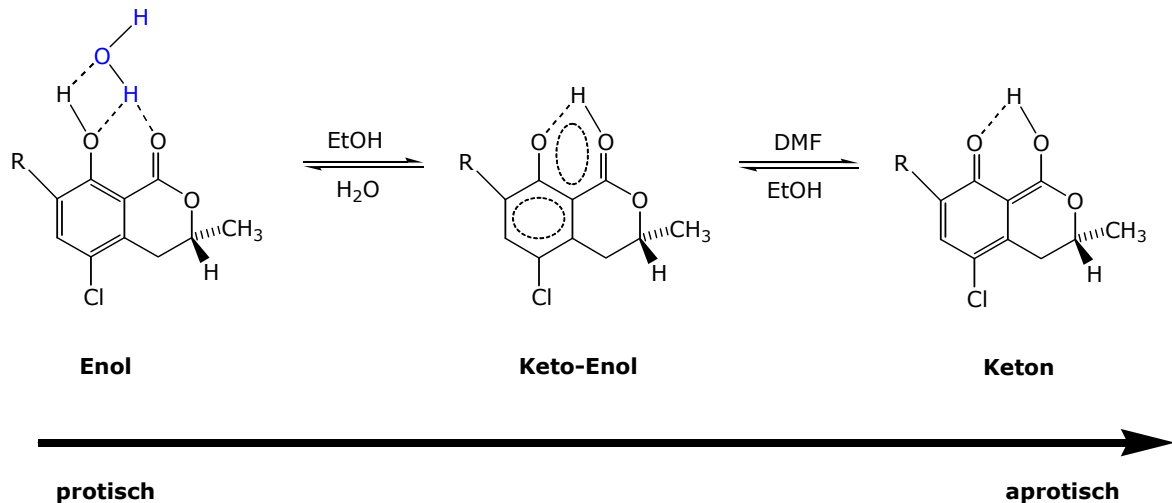


Abbildung 18: Keto-Enol-Tautomerie des OTA in Abhängigkeit vom Lösungsmittel

In Abbildung 19 sind die Fluoreszenzanregungsspektren von OTA in verschiedenen Lösungsmitteln dargestellt. Die Fluoreszenzbande um $\lambda_{\text{ex,max}} = 333 \text{ nm}$ ist in saurer Lösung breiter als in neutraler Lösung. Die Bande um $\lambda_{\text{ex,max}} = 380 \text{ nm}$ ist nur im Lösungsmittel DMF sichtbar. In ethanolischer Lösung sind beide Fluoreszenzbanden erkennbar, wobei die Intensität der Bande um $\lambda_{\text{ex,max}} = 380 \text{ nm}$ ein Drittel gegenüber der um $\lambda_{\text{ex,max}} = 333 \text{ nm}$ beträgt.

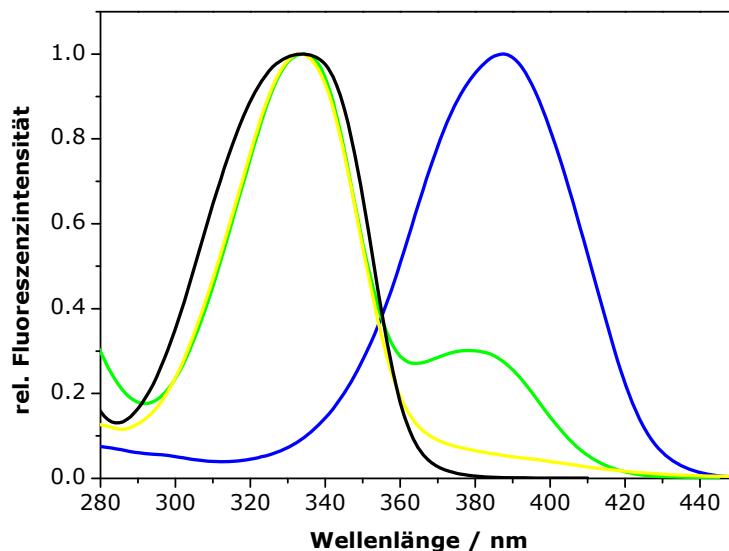


Abbildung 19: Fluoreszenzanregungsspektren von Ochratoxin A in Ethanol (grün), DMF (blau), Wasser (gelb) und Wasser pH<4 (schwarz)

Strukturell beinhalten Mykotoxine oftmals funktionelle Gruppen (z. B. OH-Gruppen), die die Photophysik der Verbindung nachhaltig prägen können. Im angeregten Zustand unterscheiden sich die Säure-Base-Eigenschaften des Moleküls gegenüber dem Grundzustand aufgrund der veränderten Elektronendichteverteilung, wodurch Protonentransferreaktionen im angeregten Zustand (ESIPT, engl. excited state intramolecular proton transfer reaction) [171] ermöglicht werden (Abbildung 20).

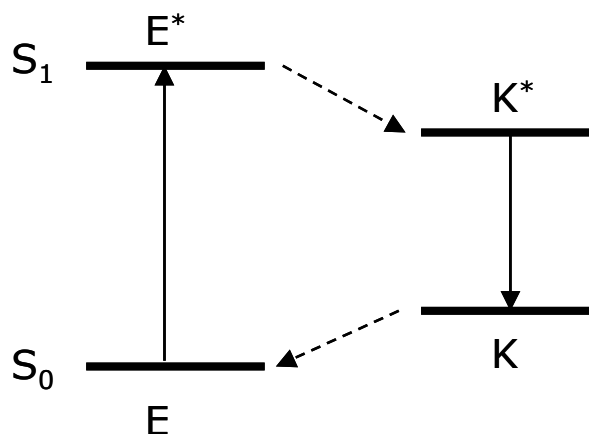


Abbildung 20: Energiediagramm, welches die Anregung des Enols aus dem Grundzustand (S_0) in den ersten angeregten Zustand (S_1) darstellt, gefolgt von einem ESIPT zur angeregten Ketostruktur K^* mit anschließender Emission in den Grundzustand K und der Rückreaktion zur stabileren Enolform E [172].

In Tabelle 10 sind die Emissionsmaxima von OTA in Abhängigkeit vom Lösungsmittel und der Wellenlänge zusammengefasst. In Ethanol liegt das Emissionsmaximum nach einer Anregung mit $\lambda_{\text{ex,max}} = 380$ nm bei $\lambda_{\text{em,max}} = 427$ nm und bei $\lambda_{\text{em,max}} = 456$ nm ($\lambda_{\text{ex,max}} = 333$ nm). Die Emission in einer DMF-Lösung liegt bei $\lambda_{\text{em,max}} = 437$ nm ($\lambda_{\text{ex,max}} = 390$ nm).

Tabelle 10: Emissionsmaxima von OTA in Abhängigkeit des Lösungsmittel und der Anregungswellenlänge

| Lösungsmittel | $\lambda_{\text{ex,max}} / \text{nm}$ | $\lambda_{\text{em,max}} / \text{nm}$ |
|---------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| DMF | 390 | 437 |
| Ethanol | 333 | 456 |
| Ethanol | 380 | 427 |
| Wasser | 333 | 456 |
| Wasser, pH<2 | 333 | 470 |

In wässriger saurer Lösung ist die Phenolgruppe der Isocumarineinheit des OTA wie bereits vorab beschrieben, durch Keto-Enol-Tautomerie stabilisiert. Erst wird nur die carboxylische Gruppe der Phenylalanin-Einheit deprotoniert (Abbildung 21) und es bildet sich das Monoanion (OTA^-). OTA und OTA^- zeigen die gleiche Absorption bei $\lambda_{\text{abs}} = 333 \text{ nm}$. Die Fluoreszenzabklingzeit der monoanionischen Form beträgt $\tau = 5.9 \text{ ns}$ [173].

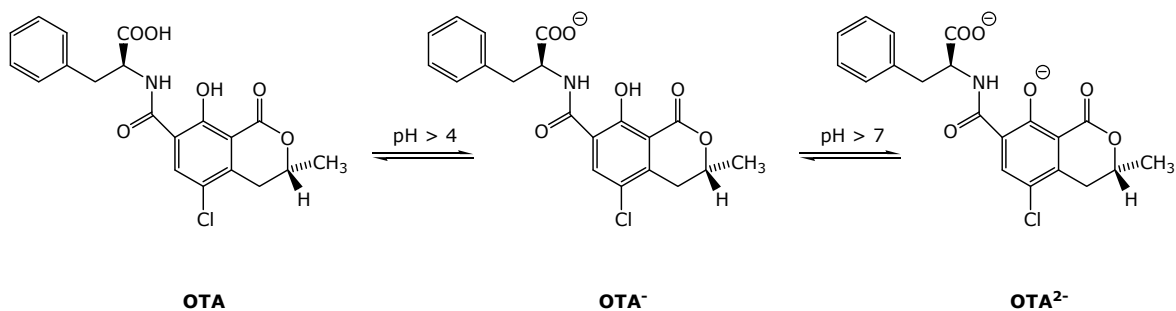


Abbildung 21: Deprotonierung von Ochratoxin A

Unter Zugabe einer Base oder nach dem Lösen in aprotischen Lösungsmitteln (z. B. DMF) bildet sich das Dianion (OTA^{2-}). Das Absorptionsmaximum ist auf $\lambda_{\text{abs}} = 380 \text{ nm}$ bzw. 390 nm (DMF) bathochrom verschoben, während das Fluoreszenzmaximum von $\lambda_{\text{em}} = 455 \text{ nm}$ zu $\lambda_{\text{em}} = 427 \text{ nm}$ hypsochrom verschoben ist (Abbildung 22). Die Fluoreszenzabklingzeit der dianionischen Form beträgt $\tau = 5.1 \text{ ns}$ [173].

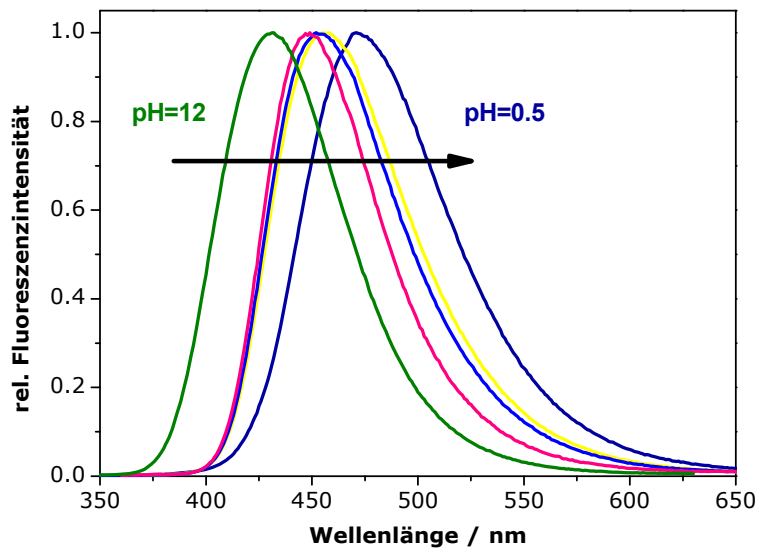


Abbildung 22: Fluoreszenzemissionsspektren von Ochratoxin A in Wasser bei unterschiedlichen pH-Werten

So ergibt sich anhand von zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen zur Bestimmung der Abklingzeiten und Geschwindigkeitskonstanten der einzelnen Spezies eine Säurekonstante von $pK_A^* = 1.5 \pm 0.4$, die gut mit der Acidität der phenolischen OH-Gruppe übereinstimmt und im elektronisch-angeregten Zustand um ca. 5 Größenordnungen verstärkt wird [174].

4.1.3 Aflatoxin B₁

Aflatoxin B₁ ist eine heterozyklische Verbindung, die aus einer Dihydrofuranofuraneinheit besteht und mit einem substituierten Cumarinring verbunden ist (Abbildung 23).

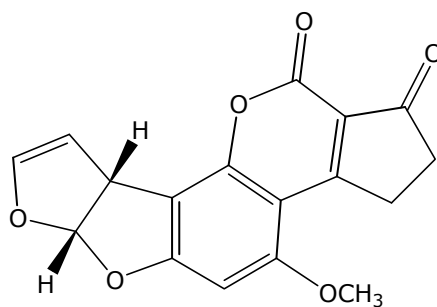


Abbildung 23: Strukturformel von Aflatoxin B₁

Die Absorptionsspektren von Aflatoxin B₁ in Ethanol weisen drei charakteristische Banden um $\lambda_{\text{abs}} = 224 \text{ nm}$, 264 nm und 360 nm auf. Eine Verschiebung des langwelligsten Absorptionsmaximums zu kleineren Wellenlängen ist in unpolaren und aprotischen Lösungsmitteln (Hexan, Acetonitril) zu beobachten (Abbildung 24). Dies weist auf einen $\pi \rightarrow \pi^*$ -Charakter der langwelligsten Absorptionsbande hin.

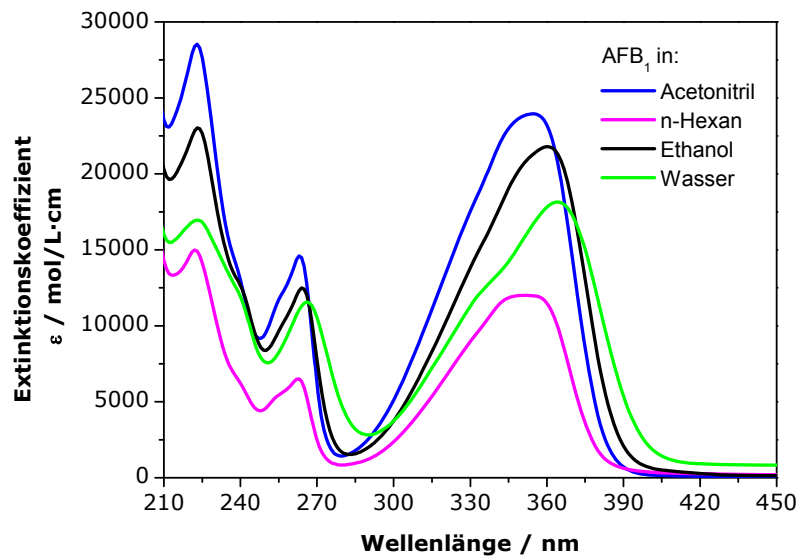
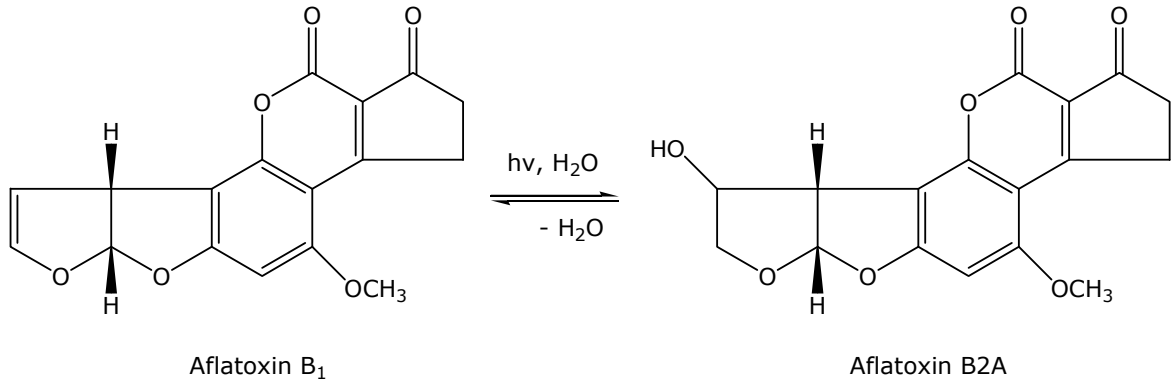


Abbildung 24: Absorptionsspektren des AFB₁ in den Lösungsmitteln: Acetonitril (blau), n-Hexan (pink), Ethanol (schwarz) und Wasser (hellgrün); $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol / L}$

Die Gestalt des Absorptionsspektrums von AFB₁ in Wasser lässt die Herausbildung einer Zweitstruktur von AFB₁ vermuten. Die Banden mit einem Absorptionsmaximum von $\lambda_{\text{abs}} = 223 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{abs}} = 364 \text{ nm}$ zeigen jeweils die Ausbildung einer Schulter bei $\lambda_{\text{abs}} = 240 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{abs}} = 340 \text{ nm}$. Eine mögliche zugrunde liegende Reaktion ist eine photochemisch induzierte Hydroxylierung unter Addition von Wasser (Abbildung 25) an die Doppelbindung des Furanrings.

Abbildung 25: Hydroxylierung von Aflatoxin B₁

Die Struktur der Spektren impliziert auch einen Einfluss des Lösungsmittels auf die Intensität der Absorptionsübergänge. Dabei weisen die Absorptionsspektren von AFB₁ in Wasser und Hexan eine deutlich geringere Absorption als im Spektrum des Lösungsmittels Ethanol bei gleicher Konzentration auf.

Ähnliche Veränderungen lassen sich bei wässrigen Lösungen mit unterschiedlichen pH-Wert beobachten (Abbildung 26). Bei pH = 4 ist eine Schulter bei $\lambda_{\text{abs}} = 340 \text{ nm}$ zu sehen, die auf die Ausbildung von AFB_{2A} hinweist, da die Gegenwart von Mineralsäuren eine Derivatisierung zu AFB_{2A} begünstigt. Bei pH = 11 ist eine bathochrome Verschiebung des Maximums zu erkennen [175].

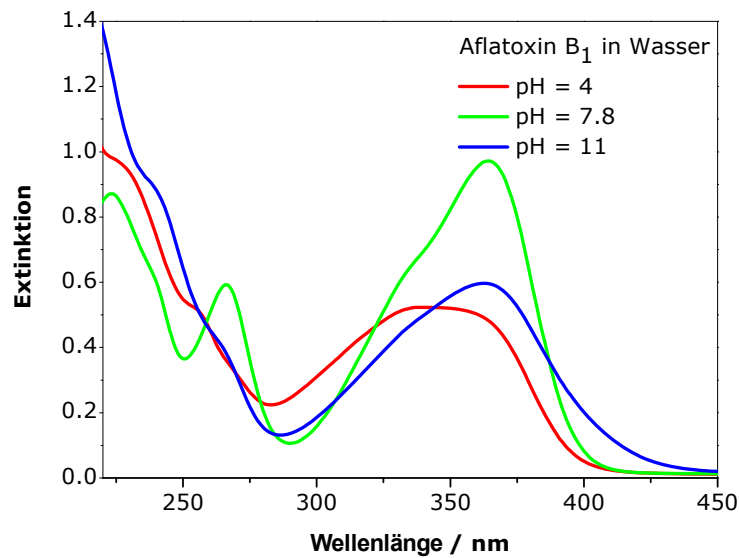


Abbildung 26: Absorptionsspektren des AFB₁ in Wasser bei den pH-Werten: 4 (rot), 7.8 (grün) und 11 (blau); $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol / L}$

Weil die dargestellten Mykotoxine in einem großen Umfang in unterschiedlichen Lebensmitteln gefunden werden können, ist es für deren Nachweis wichtig, die photophysikalischen Eigenschaften in Abhängigkeit von der Umgebung zu kennen. Im Kapitel 4.3.2 wird der Nachweis von Ochratoxin A und Aflatoxin B₁ in Wein und Bier erläutert. Da die Mykotoxine dort in nur in Spurenmengen zu finden sind, ist zunächst der Einsatz von Cyclodextrinen zur Verstärkung der Fluoreszenzintensität zu untersuchen.

4.2 Die Anwendung von Cyclodextrinen zur Verstärkung von Lumineszenzintensitäten

Anhand quantenmechanischer Berechnungen zu Bindungsenergien von Mykotoxinen an Cyclodextrinen und Komplexbildungskonstanten haben sich beispielhaft für Aflatoxin B₁ und Ochratoxin A zwei unterschiedliche Arten von Einschlusskomplexen mit β -Cyclodextrin (β -CD) in Wasser ergeben [176]. Abhängig von der räumlichen Anordnung des Einschlusses kann das Fluoreszenzsignal erhöht oder gelöscht werden. Bei AFB₁ sind die fluoreszierenden Gruppen tief im CD eingeschlossen und damit vor Fluoreszenzlöschung geschützt (Abbildung 27, links). Es kommt zur Verstärkung der Fluoreszenzintensität. Das OTA wird vor Wasser nicht geschützt (Abbildung 27, rechts), da die fluoreszierenden Gruppen dem Wasser ausgesetzt werden und damit die Fluoreszenzintensität teils vermindert wird. Folglich wäre eine Funktionalisierung hilfreich, um die Gruppen zu schützen.

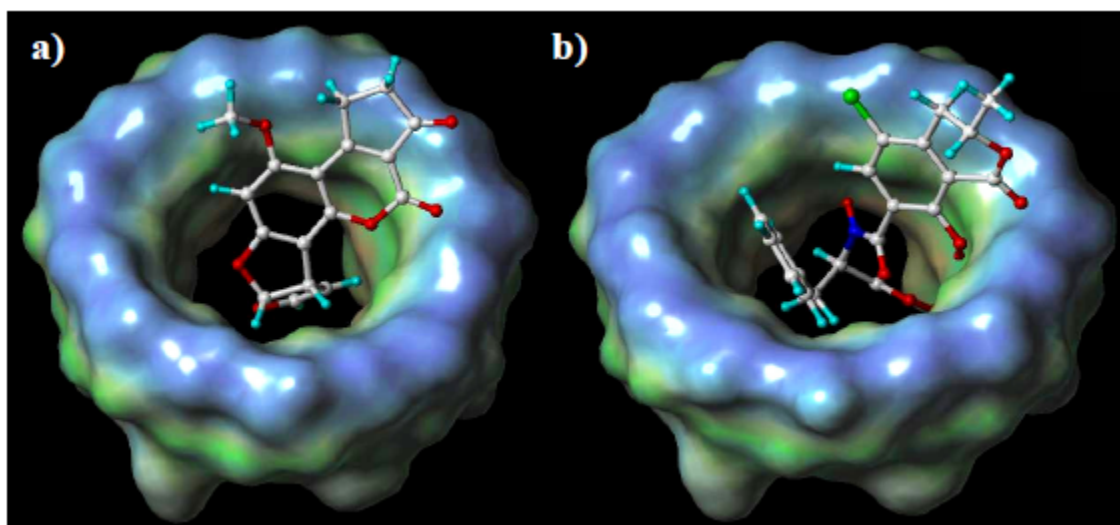


Abbildung 27: Einschlussverbindungen von a) Aflatoxin B₁ und β -CD und b) OTA und β -CD [176]

4.2.1 Aflatoxin B₁

Die Aflatoxine haben eine natürliche Fluoreszenz, die mit einer Anregung von $\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$ hervorgerufen wird. Die Effekte der Cyclodextrine und substituierten Cumarine (ähnlich den Aflatoxinen), wurden bereits untersucht [177].

In der Literatur wurde von *Ramirez-Galicia et al.* [178] ein möglicher Mechanismus des Einschlusskomplexes entwickelt, welcher besagt, dass die

Carbonylgruppe des Aflatoxins nach Zugabe des Cyclodextrins weniger mit Wasser wechselwirkt, d.h. die Fluoreszenz wird dadurch gelöscht und es kommt somit zu einer Erhöhung der Intensität. Basierend auf diesem Modell wird gemutmaß, dass AFB1 in den CD-Käfig eingeschlossen wird und sich ein 1:1-Komplex ausbildet [179], der eine mögliche Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Carbonylgruppe des Mykotoxins und der zweiten Hydroxylgruppe des Cyclodextrins herstellt.

Die Abbildung 28 zeigt die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensitäten von Aflatoxin B₁ ($c = 2.5 \cdot 10^{-7}$ mol/L, pH = 4) mit α -Cyclodextrin bei unterschiedlicher Konzentration des Cyclodextrins in wässriger Lösung, nach einer Fluoreszenzanregung von $\lambda_{\text{ex}} = 360$ nm. Wässrige Lösungen des α -Cyclodextrins wurden entsprechend den Verhältnissen $1:10^2$ bis $1:10^5$ verdünnt.

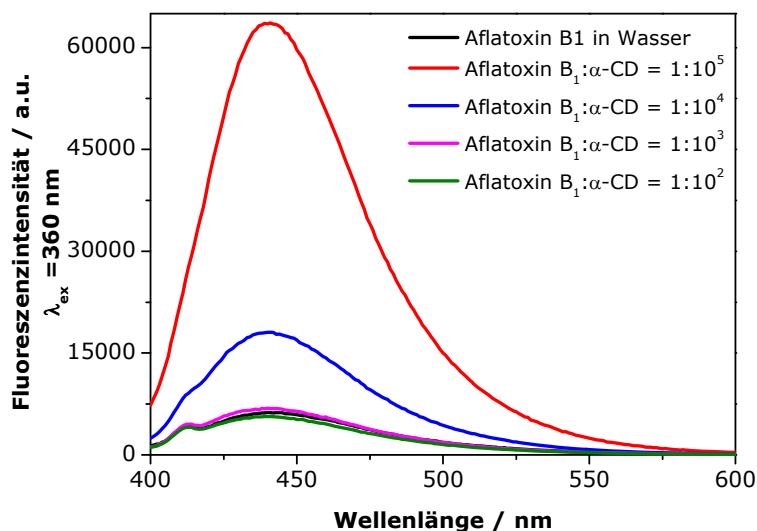


Abbildung 28: Fluoreszenzspektren von AFB1 ($c = 2.5 \cdot 10^{-7}$ mol/L) in Ab- und Anwesenheit von α -Cyclodextrin, $\lambda_{\text{ex}} = 360$ nm

Es ist deutlich erkennbar, dass die Intensität der Fluoreszenzemission ($\lambda_{\text{em,max}} = 440$ nm) in Anwesenheit von α -CD ansteigt. Die höchste Steigerung ist bei einem Verhältnis von $1:10^5$, also bei einer CD-Konzentration $c = 2.5 \cdot 10^{-2}$ mol/L zu beobachten. Eine weitere Erhöhung des Verhältnisses und damit einer Konzentration an α -Cyclodextrin in der Lösung über $c = 1 \cdot 10^{-2}$ mol/L war aufgrund der geringen Löslichkeit des Cyclodextrins in Wasser nicht möglich.

Anhand der Kenntnis des geringen Komplexbildungsvermögens ($\lg K = 2.5$) des gebildeten 1:1-Komplexes aus AFB1 und α -CD [179] konnte mittels Massenwirkungsgesetz (Anhang A5) berechnet werden, dass bei einem Verhältnis von $1:10^5$ 95% von AFB1 mit α -Cyclodextrin komplexiert ist. Im Gegensatz dazu ist bei einem Verhältnis $1:10^2$ nur 7% komplexiert.

In Tabelle 11 ist das Verhältnis F_n der Fluoreszenzintensität des reinen AFB1 in Wasser F_0 und der Fluoreszenzintensität F des CDs mit verschiedenen Konzentrationen dargestellt. Beim Verhältnis von $1:10^5$ die höchste Steigerung zu erkennen, in diesem Fall eine 11fache Intensivierung. Bei kleiner werdendem Verhältnis sind nur noch geringe Steigerungen bis maximal 3 sichtbar, so dass für die künftigen Untersuchungen nur noch Lösungen von Mykotoxinen und Cyclodextrinen im Verhältnis $1:10^5$ eingesetzt wurden.

Tabelle 11: Steigerung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Konzentration von α -CD, $\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em,max}} = 440 \text{ nm}$

| Konzentration α -CD / mol/L | Verhältnis AFB1 : α -CD | $F_n = F / F_0$ |
|---------------------------------------|-----------------------------------|-----------------|
| 0 | - | 1 |
| $2.5 \cdot 10^{-5}$ | $1:10^2$ | 1.1 ± 0.1 |
| $2.5 \cdot 10^{-4}$ | $1:10^3$ | 1.3 ± 0.1 |
| $2.5 \cdot 10^{-3}$ | $1:10^4$ | 3.3 ± 0.3 |
| $2.5 \cdot 10^{-2}$ | $1:10^5$ | 11.2 ± 0.2 |

Zur Abschätzung, welches Cyclodextrin die höchste Steigerung der Fluoreszenzemission von Aflatoxin B_1 zur Folge hat, wurden die herkömmlichen, unsubstituierten (α -CD, β -CD, γ -CD) und die substituierten CD (2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin, Heptakis(2,6-di-O-methyl)- β -cyclodextrin) in wässriger Lösung untersucht (Abbildung 29).

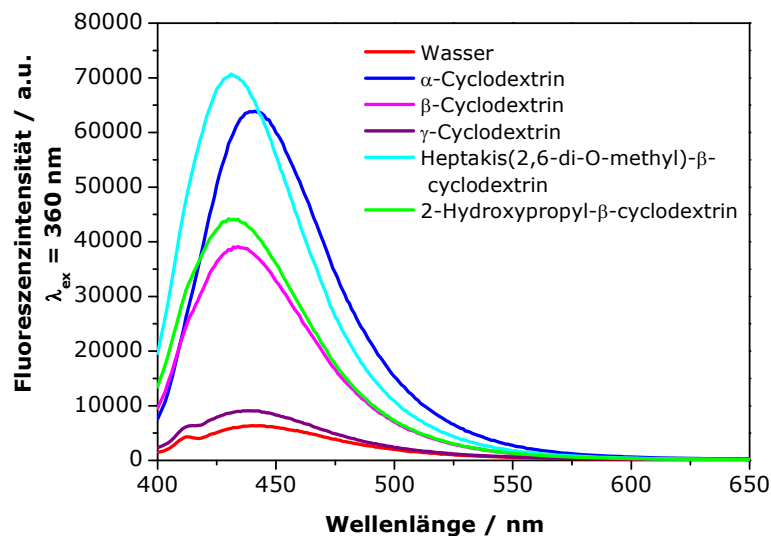


Abbildung 29: Fluoreszenzspektren von AFB1 in Wasser ($c = 2.5 \cdot 10^{-7}$ mol/L) in Kombination mit verschiedenen Cyclodextrinen, $\lambda_{\text{ex}} = 360$ nm und $c(\text{CD}) = 2.5 \cdot 10^{-2}$ mol/L

Die meisten Cyclodextrine verursachen eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität und eine Blauverschiebung des Emissionsmaximums von 440 nm um maximal 10 nm. Diese beiden Tatsachen bestätigen eine Interaktion des Mykotoxins mit den Cyclodextrinen. Insbesondere sind die Shifts der Emissionsmaxima dieselben, die man in den Spektren von AFB1 in weniger polaren Lösungsmitteln als Wasser ebenso beobachten konnte.

Bei den unsubstituierten CDs sind allein α - und β -CD geeignet, das Mykotoxin in sich aufzunehmen. Die Fluoreszenzemission des γ -CD-Komplex ist nur geringfügig höher. In der Literatur wird dies mit der Größe des des γ -Käfigs begründet, der zu groß (10 Å) und zu beweglich erscheint, um einen stabilen Einschlußkomplex zu bilden [178]. Ferner ist dort beschrieben, dass α -CD aufgrund der geringen Größe von 4.7 Å zu klein für den Einschluss des AFB1 ist. Quantenmechanische Berechnungen [179] widersprechen jedoch dieser These und belegen, dass alle o.g. unsubstituierten CDs Einschlußkomplexe bilden können.

Die substituierten CDs sind ebenfalls geeignet. Die größte Intensivierung wurde durch den Einsatz von Heptakis(2,6-di-O-methyl)- β -cyclodextrin beobachtet, welcher zu einer Steigerung um das 11fache führt. Auch ist der Vergleich von unsubstituiertem β -CD und dem neutralen 2-Hydroxypropyl- β -CD nicht aus den Augen zu lassen, bei dem das letztgenannte Cyclodextrin eine Vervielfachung der Intensität von 7 und unsubstituiertes β -CD nur von 6

hervorrufen. Dies lässt sich anhand der geringfügig höheren Komplexbildungskonstante des 1:1-Komplexes von AFB1 mit Heptakis(2,6-di-O-methyl)- β -cyclodextrin ($K = 892 \pm 92$ L/mol) im Vergleich zu AFB1 mit β -Cyclodextrin ($K = 399 \pm 65$ L/mol) erklären [179].

Nutzt man die Zweiphotonenanregung für den AFB1:CD-Komplex ($\text{pH} = 4$) mit einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{ex}} = 720$ nm und detektiert im Bereich um $\lambda_{\text{em,max}} = 440$ nm, dann erhält man ähnliche Erhöhungen der Fluoreszenzintensitäten. Ganz anders verhält es sich, wenn man eine Aflatoxin B₁-Lösung ($\text{pH} = 8$) mit Cyclodextrinen versetzt und die Fluoreszenzintensitäten nach Ein- bzw. Zweiphotonenanregung ermittelt (Tabelle 12).

Tabelle 12: Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten nach Ein- bzw. Zweiphotonenanregung bei AFB1 ($\text{pH} = 8$)

| Cyclodextrin | Verhältnis I/I_0 ($\lambda_{\text{em,max}} = 440$ nm) | |
|--|--|--------------------------------|
| | $\lambda_{\text{ex}} = 360$ nm | $\lambda_{\text{ex}} = 720$ nm |
| α -Cyclodextrin | 24.5 ± 0.2 | 7.4 ± 0.4 |
| β -Cyclodextrin | 23.4 ± 0.2 | 6.1 ± 0.4 |
| γ -Cyclodextrin | 3.0 ± 0.2 | 1.1 ± 0.4 |
| 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin | 35.7 ± 0.2 | 8.2 ± 0.4 |
| Heptakis(2,6-di-O-methyl)- β -cyclodextrin | 20.3 ± 0.2 | 5.4 ± 0.4 |

Bis auf γ -Cyclodextrin ermöglichen alle verwendeten CDs eine Intensivierung der Fluoreszenz. Nach der Einphotonenanregung ist eine Steigerung bis zum 35fachen (2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin) möglich, bei der Zweiphotonenanregung nur eine Steigerung bis zum 8fachen Wert.

4.2.2 Ochratoxin A

Ochratoxin A zeigt - wie bereits unter 4.1.2 beschrieben - abhängig vom pH-Wert und Lösungsmittel Besonderheiten in den spektroskopischen Eigenschaften. Es wird daher in den nachfolgenden Ergebnissen nur auf die OTA-Lösung mit $\text{pH} = 8$ eingegangen, da selbige beide Absorptionsmaxima aufweist wie eine Lösung mit $\text{pH} = 4$ ($\lambda_{\text{abs,max}} = 330$ nm) und $\text{pH} = 11$ ($\lambda_{\text{abs,max}} = 380$ nm) und der Anteil von Mono- und Dianion gleich ist [180].

Verrone *et al.* [181] haben bereits das Verhalten eines OTA/ β -CD-Komplexes in Abhängigkeit des pH-Wertes untersucht und stets einen starken (bis zum 6fachen) Anstieg der Fluoreszenzintensität sehen können. Dieses Verhalten konnte weder bei der Einphotonen-, noch bei der Zweiphotonenanregung reproduziert werden. Die Behauptung, dass die protonierte und deprotonierte Form des OTA (siehe Abbildung 21) mit dem CD gleich stark interagieren und die Fluoreszenz des zweifach deprotonierten Moleküls am stärksten ist, trifft nicht zu [182].

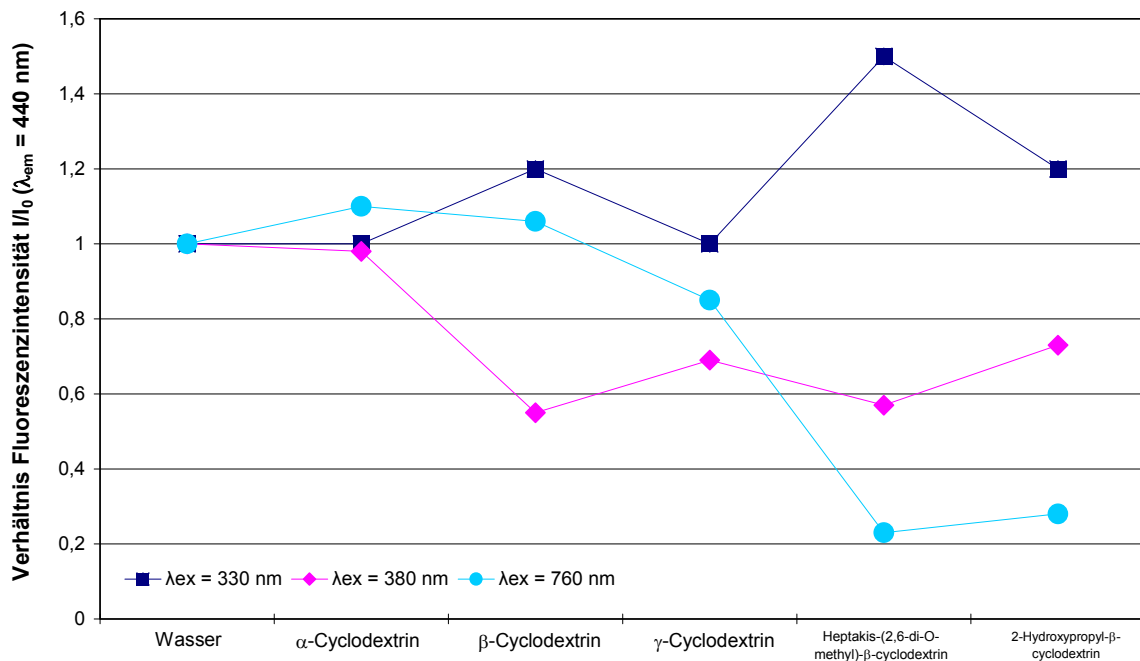


Abbildung 30: Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von AFB1 zu Cyclodextrin bei $\lambda_{em} = 440 \text{ nm}$, $c(\text{CD}) = 2.5 \cdot 10^{-2} \text{ mol/L}$

Die hier dargestellten Ergebnisse (Abbildung 30) zeigen, dass eine Steigerung der Intensität bei einer Anregung von $\lambda_{ex} = 330 \text{ nm}$ bei Mischungen mit β -Cyclodextrin (1.2), Heptakis(2,6-di-O-methyl)- β -cyclodextrin (1.5) und 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (1.2) zu sehen ist. Im Gegensatz dazu nehmen die Intensitäten der Fluoreszenz nach einer Anregung von $\lambda_{ex} = 380 \text{ nm}$ (deprotonierte Form) teils um das Zweifache ab, bei der Zweiphotonenanregung nach Anregung mit $\lambda_{ex} = 760 \text{ nm}$ bleibt teilweise sogar nur ein Fünftel der Intensität erhalten.

Eine Erklärung hierfür liefern i) die Präparation der OTA-Lösung und ii) das Bindungsverhalten des OTA. Die wässrige Ochratoxin A-Lösung wurde aufgrund der besseren Löslichkeit aus einer ethanolischen OTA-Lösung

hergestellt. Es sind daher in der Lösung noch geringe Anteile an Ethanol enthalten und die spektroskopischen Eigenschaften des OTA in Ethanol müssen geringfügig bei der Auswertung einbezogen werden.

Die natürliche Fluoreszenz des OTA wird durch die Isocumarin-Einheit verursacht und wird erhöht, wenn OTA an ein "starres" Molekül (Lösungsmittel) unter Ausbildung einer intramolekularen Wasserstoffbindung zwischen Phenolgruppe und amidischer Carbonyl- (α -Form) oder Carbonylfunktion der Esterguppe (β -Form) bindet. Wird das Molekül in einen angeregten Zustand überführt, verteilt sich die Elektronendichte neu und das Dipolmoment ändert sich. Ein Nicht-Gleichgewichtszustand wird gebildet, da das Lösungsmittel der Änderung während der Relaxation in den "neuen" Zustand nicht folgen kann. Die Wechselwirkung zwischen OTA- und dem Lösungsmittelmolekül ändert sich daher.

Die dianionische Form des OTA ($\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$) emittiert in Abhängigkeit des Lösungsmittels mit einem Maximum um $\lambda_{\text{em,max}} = 445 \text{ nm}$ (Wasser) und ist in Ethanol zu $\lambda_{\text{em,max}} = 425 \text{ nm}$ blauverschoben. Auch der kleine Shift im Anregungsmaximum von 10 nm (Ethanol: $\lambda_{\text{abs,max}} = 375 \text{ nm}$, Wasser: $\lambda_{\text{abs,max}} = 385 \text{ nm}$) ist auf die Polarität des Lösungsmittel zurückzuführen und stammt von der spezifischen Interaktion zwischen Lösungsmittel und gelöstem OTA - hauptsächlich von einer Wasserstoffbindung zwischen OTA^{2-} und dem Lösungsmittel. Es kommt zur Erhöhung des Dipolmomentes des im angeregten Zustand befindlichen Moleküls im Vergleich zum Grundzustand [180, 181].

Der Effekt auf die Verschiebungen in den Emissionsspektren durch die Addition von Wasser in eine ethanolische OTA-Lösung ergab die gleichen Ergebnisse wie die Untersuchungen der einzelnen Lösungsmittel. Die Abnahmen der Fluoreszenzintensitäten nach Anregung mit $\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$ bestätigen sich. Dies resultiert aus dem durch Wasser verursachten dynamischen Löschen ("Quenchen") der Fluoreszenz von OTA in Ethanol. Unter dynamischem Löschen versteht man die Wechselwirkung zwischen einem fluoreszierenden Molekül und einem Löscher ("Quencher"), der die Quanteneffizienz des Fluorophors herabsetzt [183]. Ausgehend von einer linearen Korrelation von

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{SV} [Q] \quad (29)$$

ist die Berechnung der Quenchkonstante K_{SV} (Anstieg) aus dem Verhältnis der Fluoreszenzintensität ohne Quencher I_0 und mit Quencher I in Abhängigkeit der Quencher-Konzentration $[Q]$ möglich.

Abbildung 31 zeigt die Auftragung der modifizierten Stern-Volmer-Gerade für den Quench-Effekt von Wasser (Quencher) auf die Fluoreszenz von OTA in Ethanol. Nach der linearen Auftragung von $\frac{I_0}{I_0 - I}$ gegen $\frac{1}{[Q]}$ erhält man $K_{SV} = (0.19 \pm 0.01) \text{ l/mol}$. In der Literatur [180] wird dieser Wert bestätigt.

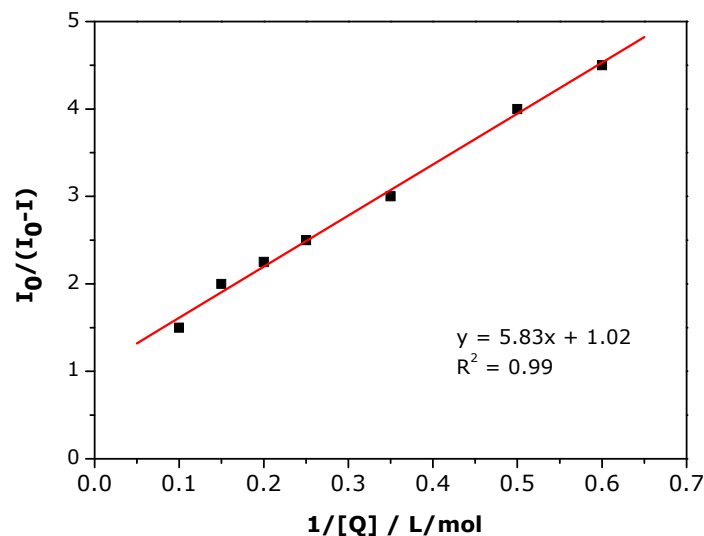


Abbildung 31: Modifizierte Stern-Volmer-Gerade für den Löscheffekt von Wasser auf die OTA-Fluoreszenz

Die Löscheffizienz bezieht sich auf die Möglichkeit der Ausbildung einer Wasserstoffbrücke durch das Quenchemolekül. Das Hinzufügen von Wasser zu Ethanol kann u.a. die Eigenschaften des Lösungsmittels wie pH-Wert, Polarität, Solvent-Solvent-Wechselwirkungen ändern. Die Aktivität der Protonen ist in Ethanol geringer als in Wasser, ausgehend von der Fähigkeit des Ochratoxin A als Wasserstoff-Donor zu fungieren und der Natur des Ethanols als Wasserstoff-Akzeptor. Die Zunahme der Wasserkonzentration in einer ethanolischen OTA-Lösung führt zu einer Abnahme des Anteils der dianionischen OTA-Form und letztendlich zu einer Abnahme der Fluoreszenzemission nach einer Anregung mit $\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$.

Schlussfolgernd ist der Einsatz von Cyclodextrinen beim Nachweis von Aflatoxin B₁ in wässriger Lösung geeignet und kann bei Ochratoxin A unter bestimmten Umständen nicht in Betracht gezogen werden.

4.3 Zweiphotonenspektroskopie

Der Nachweis der Mykotoxine mit Multiphotonenanregung erfolgte bisher nach einer Kapillarelektrochromatographie und durch das Hinzufügen von Cyclodextrinen [184]. Im folgenden Teil soll der Nachweis der Mykotoxine AFB₁ und OTA in verschiedenen Lösungsmitteln mittels Detektion der Fluoreszenzemission nach einer Zweiphotonenanregung erfolgen. Die Bestimmung des wellenlängenabhängigen Zweiphotonen-Absorptionsquerschnittes (2PAQ) ist dabei zentrales Thema. Ziel dieser Methode ist die schnelle Identifikation der o.g. Mykotoxine in alkoholischen Getränken (Wein und Bier), ohne aufwändige Probenpräparation.

4.3.1 Bestimmung des Zweiphotonen-Absorptionsquerschnittes von Ochratoxin A und Aflatoxin B₁

Diese Untersuchungsmethode wurde für Aflatoxin B₁ in Ethanol und einer Ethanol/Wasser (pH = 4) sowie Ochratoxin A in DMF und Ethanol/Wasser (pH = 8) angewandt.

Für die Bestimmung der Zweiphotonen-Absorptionsquerschnitte von Aflatoxin B₁ und Ochratoxin A erfolgten leistungsabhängige Messungen der Fluoreszenzemissionen im Wellenlängenbereich von $350 \text{ nm} < \lambda_{\text{em}} < 650 \text{ nm}$ nach einer Anregung zwischen $700 \text{ nm} < \lambda_{\text{ex}} < 860 \text{ nm}$ (Titan-Saphir-Laser). Zusätzlich wurde Fluorescein als positiver und Wasser als negativer Standard vermessen. Zum Nachweis der Zweiphotonenanregung wurden die ermittelten Flächenintegrale gegen die mittleren Leistungen doppellogarithmisch aufgetragen. Aufgrund der großen Datenmenge sind die Ergebnisse der linearen Auftragung nach Anregung mit $\lambda_{\text{ex}} = 760 \text{ nm}$ nur beispielhaft in Abbildung 32 dargestellt.

Für Ochratoxin A in Lösung erweist sich ein auf Zweiphotonenanregung basierender Nachweis schwieriger als im Vergleich zu Aflatoxin B₁, da OTA bei pH = 4 sowohl als protonierte Form (OTA) und als Monoanion (OTA⁻, Absorptionsmaximum $\lambda = 333 \text{ nm}$) vorliegt und apparativ bedingt nur eine minimale Anregungswellenlänge von 700 nm (entsprechend einer Einphotonabsorption bei $\lambda = 350 \text{ nm}$) möglich ist. Somit konnten nur sehr ungünstige Anregungsbedingungen realisiert werden und dieses gestaltet den Nachweis in sauren Lösungen (z.B. Lebensmitteln, wie Wein und Bier) schwieriger im Vergleich zum AFB₁.

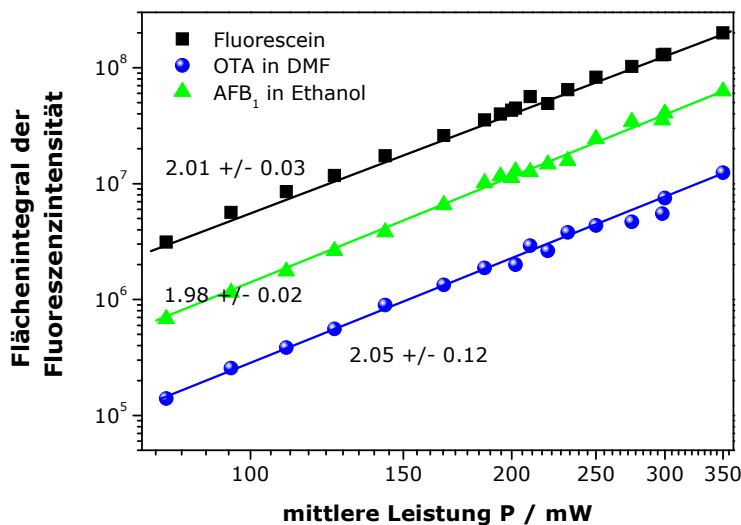


Abbildung 32: Doppellogarithmische Auftragung der Flächenintegrale der Emissionspektren und der Laserleistung von Fluorescein, Aflatoxin B1 in Ethanol und OTA in DMF nach einer Anregung von $\lambda_{\text{ex}} = 760 \text{ nm}$

Um einen Zweiphotonenprozess nachzuweisen, der stets durch einen Anstieg der logarithmischen Auftragung von zwei gekennzeichnet ist, wurden die in Tabelle 13 aufgeführten Werte und Fehler der Anstiege ermittelt. Für alle anderen Anregungswellenlängen im Bereich zwischen $700 \text{ nm} < \lambda_{\text{ex}} < 860 \text{ nm}$ konnte der Zweiphotonenprozess ebenfalls belegt werden.

Tabelle 13: Ermittelte Anstiege und Fehler der Regression

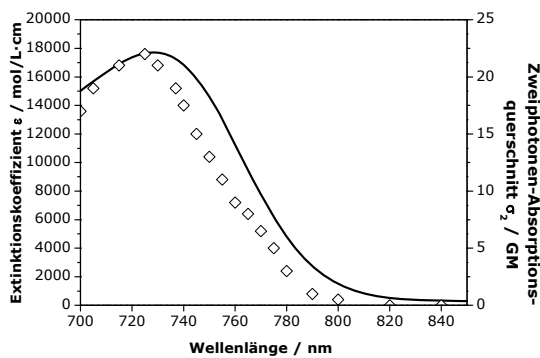
| | ermittelter Anstieg ± Fehler der Regression |
|-----------------------------------|--|
| Fluorescein | 2.01 ± 0.03 |
| AFB1 in Wasser / Ethanol (pH = 4) | 2.03 ± 0.08 |
| AFB1 in Ethanol | 1.98 ± 0.02 |
| OTA in Wasser / Ethanol (pH = 8) | 2.08 ± 0.09 |
| OTA in DMF | 2.05 ± 0.12 |

Nachdem der Zweiphotonenprozess für jede Lösung festgestellt wurde, ist die Berechnung des Absorptionsquerschnittes σ_2 im Bereich zwischen $700 \text{ nm} < \lambda_{\text{ex}} < 860 \text{ nm}$ für die Mykotoxine möglich (Gleichung 22), wenn u.a.

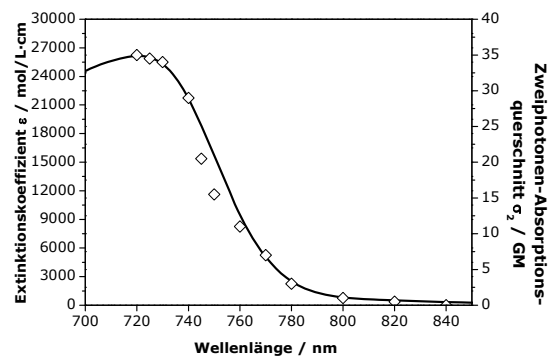
die Quantenausbeute der Mykotoxine im jeweiligen Lösungsmittel und als Referenz die in der Literatur [103] aufgeführten (wellenlängenabhängigen) Absorptionsquerschnitte σ_2 des Fluorescein bekannt sind.

Unter Verwendung der berechneten Absorptionsquerschnitte (Anhang A6) sind die gesamten Zweiphotonenanregungsspektren für Aflatoxin B₁ und Ochratoxin A im Wellenlängenbereich $700 \text{ nm} < \lambda_{\text{ex}} < 860 \text{ nm}$ in Abhängigkeit vom Lösungsmittel und pH-Wert bestimmt worden (Abbildung 33).

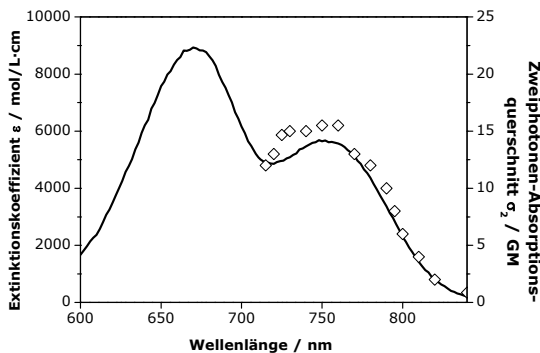
a)



b)



c)



d)

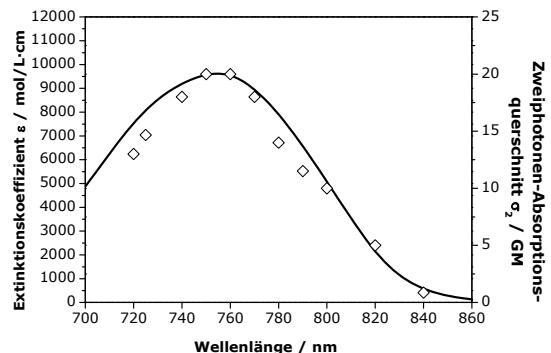


Abbildung 33: Vergleich der Absorptions- (Linie) und Zweiphotonenanregungs- (Punkte) Spektren von :

- a) Aflatoxin B₁ in wässriger Ethanol-Lösung (pH = 4)
- b) Aflatoxin B₁ in Ethanol
- c) Ochratoxin A in wässriger Ethanol-Lösung (pH = 8)
- d) Ochratoxin A in DMF

Für die Darstellung des Einphotonen-Absorptionsspektrums sind die entsprechenden Absorptionswellenlängen als $2 \cdot \lambda$ zum besseren Vergleich dargestellt.

In den Spektren sind gute Übereinstimmungen in der spektralen Form des Einphotonen- sowie Zweiphotonen-Absorptionsspektrum zu erkennen. Ebenso spiegeln sich in den Absorptionskoeffizienten die Extinktionskoeffizienten sowie die unterschiedliche Quantenausbeute wieder (siehe Gleichung 11). Beim AFB1 in Ethanol ist das Absorptionsmaximum ($\lambda_{\text{abs,max}} = 360 \text{ nm}$) mit einem Extinktionskoeffizienten $\varepsilon = 26.000 \text{ mol/L}\cdot\text{cm}$ verbunden. Der dazugehörige 2PAQ ($\lambda_{\text{ex}} = 720 \text{ nm}$) beträgt $\sigma_2 = 35 \text{ GM}$ und ist damit größer als der Wert für AFB1 ($\sigma_2 = 22 \text{ GM}$) in wässriger Lösung, bei dem auch der Extinktionskoeffizient kleiner ist. Ein ähnliches Ergebnis lässt sich bei Ochratoxin A im Maximum $\lambda = 380 / 760 \text{ nm}$ belegen.

Die unterschiedlichen 2PAQ für OTA und AFB1 sind mit den Quanteneffizienzen zu erklären. Da diese Werte für OTA in DMF ($\phi=0.49$) und in wässriger Ethanol-Lösung ($\phi=0.35$) größer sind als für AFB1 in Ethanol ($\phi=0.042$) und in wässriger Ethanol-Lösung ($\phi=0.038$), wird bei der Berechnung nach Gleichung 22 der resultierende 2PAQ kleiner.

4.3.2 Nachweis von Aflatoxin B₁ in alkoholischen Lebensmitteln - Bier und Wein - mittels Zweiphotonenanregung

Berichte über das Vorkommen von Mykotoxinen in Bier zeigen, dass es sich aufgrund des hohen Konsums des alkohol- und säurehaltigen Getränks, welches durch Gärung aus den Grundzutaten Wasser, Hopfen und Malz (aus Gerste) gewonnen wird, um ein weltweites Problem handelt. Für ein kontrolliertes Auslösen des Gärvorganges wird meistens Hefe zugesetzt. In Studien mit verschiedenen Mykotoxinen durch Zugabe während des Brauens, konnte belegt werden, dass das AFB1 vom kontaminierten Korn ins Bier übergeht. Momentan hat die Europäische Union noch keine Höchstgrenzen für Mykotoxine in Bier festgelegt, lediglich für das Vorkommen in Gerste und Malz.

Das Vorkommen von Mykotoxinen (OTA) im Wein ist laut Verordnung über Höchstmengen in Lebensmitteln auf maximal 2 ppb (= 2 $\mu\text{g/kg}$) beschränkt. Die Quelle von AFB1 und OTA in Wein sind am Rebstock mit Schimmelpilzen (*Aspergillus carbonarius*) befallene Trauben, die während der Weinproduktion in den Wein übertragen werden. Daher ist das Interesse an schnellen und nicht-invasiven Untersuchungsmethoden zur Bestimmung von diesen Mykotoxinen von großem (wissen- und wirtschaftlichen) Interesse.

Speziell die Zweiphotonenspektroskopie scheint eine viel versprechende Technik zum Nachweis von Mykotoxinen in komplexen flüssigen Proben zu sein. Die Photonen sind im Vergleich zur „regulären“ Einphotonenanregung von doppelter Wellenlänge („zwei rote Photonen“ statt „eines blauen Photons“). Dadurch gelingt es, experimentell Störungen durch die

Matrixlumineszenz zu minimieren bzw. in optisch dichten Proben eine höhere Eindringtiefe zu erreichen. Dies ist besonders für flüssige Proben - wie Wein und Bier - von großer Bedeutung, denn die Limitierung durch die intrinsischen optischen Eigenschaften der Matrix schränken eine breite Anwendung von einzig auf regulären Fluoreszenzmessungen basierende in-situ-Detektion von Mykotoxinen merklich ein.

Der Nachweis von Ochratoxin A kann außen vor bleiben, da sich der auf Zweiphotonenanregung basierende Nachweis als schwieriger im Vergleich zu Aflatoxin B₁ erweist, da OTA bei pH = 4 als Monoanion (Absorptionsmaximum: $\lambda = 330 \text{ nm}$) vorliegt und apparativ bedingt nur eine minimale Anregungswellenlänge von $\lambda = 700 \text{ nm}$ (entsprechend eine Einphotonenabsorption bei $\lambda = 350 \text{ nm}$) möglich ist. Es beschränkt sich daher hier die Auswertung auf AFB₁.

Ausgehend von den in den Kapiteln 4.1 und 4.2 dargestellten Ergebnissen wird für die Bestimmung von AFB₁ in alkoholischen Getränken eine Modell-Lösung (12% ethanolische Lösung, pH = 4) hergestellt, welche als Phantom für die hochwertig veredelten Getreide- und Traubenprodukte, Bier bzw. Wein eingesetzt wird.

Bevor der Nachweis mit der Zweiphotonenanregung erfolgen kann, müssen die photophysikalischen Eigenschaften der Modell-Lösung und des in Weißwein gelösten AFB₁ geprüft werden. Aflatoxin B₁, gelöst in der Modell-Lösung, zeigt das gleiche Absorptionsverhalten und Fluoreszenzemissionsmaxima um $\lambda_{em,max} = 440 \text{ nm}$ nach erfolgter Anregung mit $\lambda_{ex} = 360 \text{ nm}$ wie in wässriger Lösung (Abbildung 34) und im Wein (Abbildung 35).

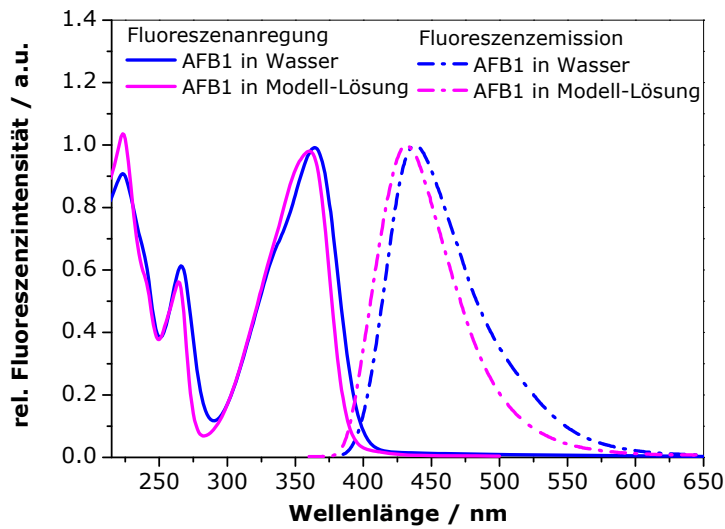


Abbildung 34: Fluoreszenzanregungs- (Linie) und Emissionsspektren (Punkt-Strich) von Aflatoxin B₁ in Wasser (blau) und Modell-Lösung (pink)

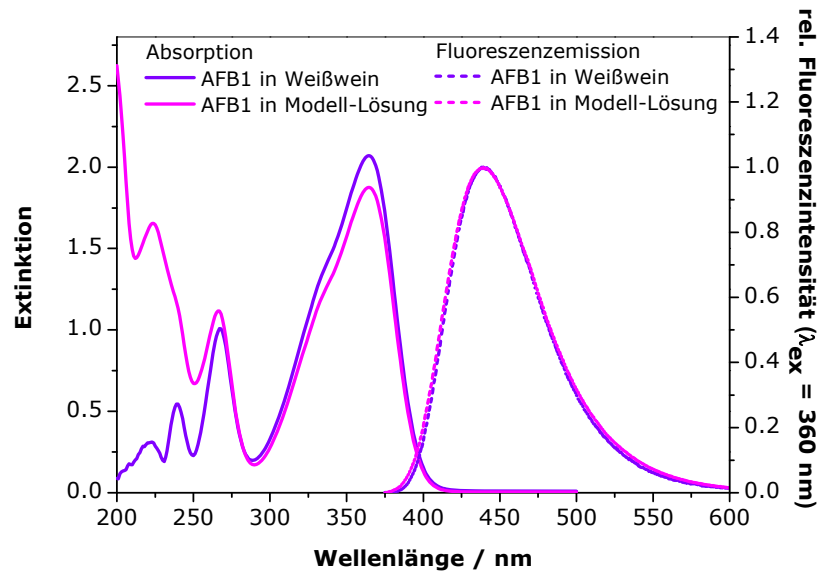


Abbildung 35: Absorption (Linie) und Emissionsspektren (Punkt) von Aflatoxin B₁ in Modell-Lösung (pink) und Wein (lila)

Ausgehend von den vorstehend aufgezeigten und in Tabelle 14 zusammengefassten Ergebnissen nach der Einphotonenanregung kann ein Einfluss des Lösungsmittels auf das Absorptions- und Fluoreszenzverhalten von AFB₁ beobachtet werden [185].

Tabelle 14: Absorptionsmaxima ($\lambda_{\text{abs,max}}$), Extinktionskoeffizient (ϵ), Fluoreszenzemissionsmaxima ($\lambda_{\text{em,max}}$) und Quanteneffizienz ϕ des Aflatoxin B₁ in verschiedenen Lösungsmitteln

| | $\lambda_{\text{abs,max}} / \text{nm}$ ($\epsilon / \text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) | | | $\lambda_{\text{em,max}} / \text{nm}$ | Fluoreszenzquanteneffizienz ϕ / % ($\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$) |
|--------------------------|--|----------------|----------------|---------------------------------------|--|
| | | | | | |
| Wasser | 224 (16800) | 267 (11400) | 365 (18200) | 440 | 1.3 |
| Ethanol | 224 (28700) | 265 (14500) | 360 (26500) | 430 | 4.2 |
| Modell-Lösung, pH = 4 | 224 | 265 | 365 (18800) | 440 | 3.8 |

Aufgrund der starken Hintergrundfluoreszenz von Bier und Wein im Wellenlängenbereich $200 \text{ nm} < \lambda < 300 \text{ nm}$ kann AFB₁ nur im Bereich des Absorptionsmaximums um $\lambda = 360 \text{ nm}$ oder $\lambda = 365 \text{ nm}$ (wie in der Modell-Lösung) angeregt werden. Im nächsten Schritt, der Bestimmung des Zweiphotonen-Absorptionsquerschnitts, wird vermutet, dass die Fluoreszenzquanteneffizienz von Aflatoxin B₁ in Wein und Bier niedriger ist, als in der Modell-Lösung. Der gemessene Wert ($\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$) von $\phi = 2.3 \%$ bestätigt dies. Wie bereits im theoretischen Teil erklärt ist, wird für die Berechnung des Zweiphotonen-Absorptionsquerschnittes die gleiche Quanteneffizienz angenommen wie für einen Einphotonenprozess [110].

Die kleinere Quantenausbeute des AFB₁ in Wein und Bier resultiert aus der höheren Absorption bedingt durch die Matrix bzw. die Inhaltsstoffe der Getränke verursachenden Löschung der Fluoreszenz. In Abbildung 36 ist ein Fluoreszenzemissionspektrum von Bier sowie Weiß- und Roséwein nach einer Fluoreszenzanregung mit $\lambda_{\text{ex}} = 720 \text{ nm}$ dargestellt. Es wird vorausgesetzt, dass das Rotwein-Spektrum dem Spektrum von Roséwein, entspricht, da Rotwein aufgrund seiner optischen Dichte im Verhältnis 1:10 mit der Modell-Lösung verdünnt wurde.

Das Maximum des Bierspektrums ist gegenüber den Weinspektren auf $\lambda = 450 \text{ nm}$ bathochrom verschoben. Die Intensität aller Fluoreszenzspektren ist im Bereich von 400 nm bis 500 nm am größten und geht auf die Inhaltsstoffe und Riboflavin zurück. Die Fluoreszenzcharakteristik stammt von aromatischen Aminosäuren, NADH, Riboflavin, Vitamin B₆, Polyphenolen und Iso- α -Säuren, die für die Bitterkeit im Bier verantwortlich sind.

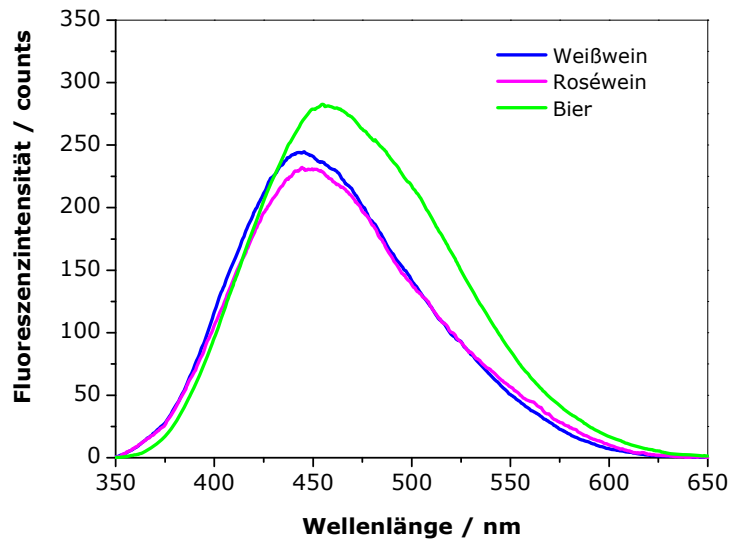


Abbildung 36: Fluoreszenzemissionsspektrum nach Zweiphotonenanregung ($\lambda_{\text{ex}} = 720 \text{ nm}$) von Bier (gelb), Weißwein (blau) und Roséwein (pink)

Die Bestimmung des Zweiphotonen-Absorptionsquerschnitt von Aflatoxin B₁ in der Modell-Lösung und den alkoholischen Getränken nach Anregung ($\lambda_{\text{ex}} = 720 \text{ nm}$) und einer Detektion im Wellenlängenbereich $350 \text{ nm} < \lambda_{\text{em}} < 650 \text{ nm}$ wird - wie bereits oben beschrieben - durchgeführt. Die Spektren werden jeweils dreimal aufgenommen und gegen das Lösungsmittelspektrum, d.h. gegen Bier oder Wein, korrigiert.

Ebenso wurden leistungsabhängige Messungen von AFB₁ in der Modell-Lösung und in den alkoholischen Getränken durchgeführt, um die Zweiphotonenabsorption (Abbildung 37) durch Auftragung der Flächenintegrale der Spektren gegen die mittlere Leistung nachzuweisen. Die Anstiege der Geraden sind bei allen Messungen nahezu 2.

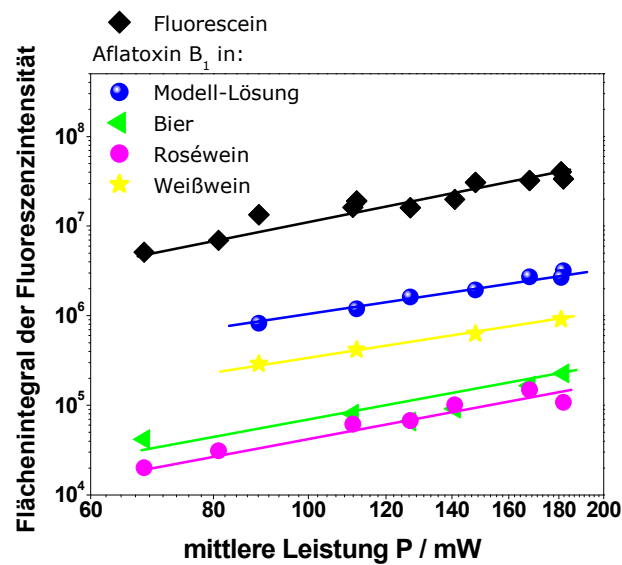


Abbildung 37: Doppellogarithmische Auftragung der Flächenintegrale der Emissionsspektren gegen die Laserleistung von Fluorescein und Aflatoxin B_1 in verschiedenen alkoholischen Getränken sowie der Modell-Lösung, Anregung: $\lambda_{\text{ex}} = 720 \text{ nm}$

Die Berechnung der 2PAQ nach Gleichung 22 ergeben in den unterschiedlichen Medien nahezu gleiche Werte (Tabelle 15). In der Modell-Lösung ist der 2PAQ (22 GM) genauso so groß wie der von AFB1 in wässriger Ethanol-Lösung ($\text{pH} = 4$) aus Kapitel 4.3.1 und bestätigt diese Messungen sehr gut. Die etwas höheren, innerhalb der Fehlergrenze liegenden Werte in den alkoholischen Getränken rühren von schwankenden Laserintensitäten und an dem beschriebenen Fluoreszenzquenchen durch die Inhaltsstoffe bzw. der fehlerbehafteten Fluoreszenzeffizienz.

Tabelle 15: Zweiphotonen-Absorptionsquerschnitt σ_2 von Aflatoxin B_1 in verschiedenen Lösungen, $\lambda_{\text{ex}} = 720 \text{ nm}$

| Zweiphotonen-Absorptionsquerschnitt σ_2 von Aflatoxin B_1 / GM | |
|--|------------|
| Modell-Lösung | 22 ± 3 |
| Bier | 24 ± 5 |
| Weißwein | 23 ± 3 |
| Roséwein | 23 ± 5 |
| Rotwein (1:10-Verdünnung) | 25 ± 8 |

4.3.3 Vergleich von Einphotonen- und Zweiphotonenanregung

In der Literatur wird oftmals beschrieben, dass die durch Ein- und Zweiphotonenanregung gewonnenen Emissionsspektren die gleichen sind. Allerdings gibt es auch Fälle, in denen sich diese unterscheiden [186, 187]. In Abbildung 38 sind die Spektren von Aflatoxin B₁ in Weißwein, nach Ein- und Zweiphotonenanregung dargestellt.

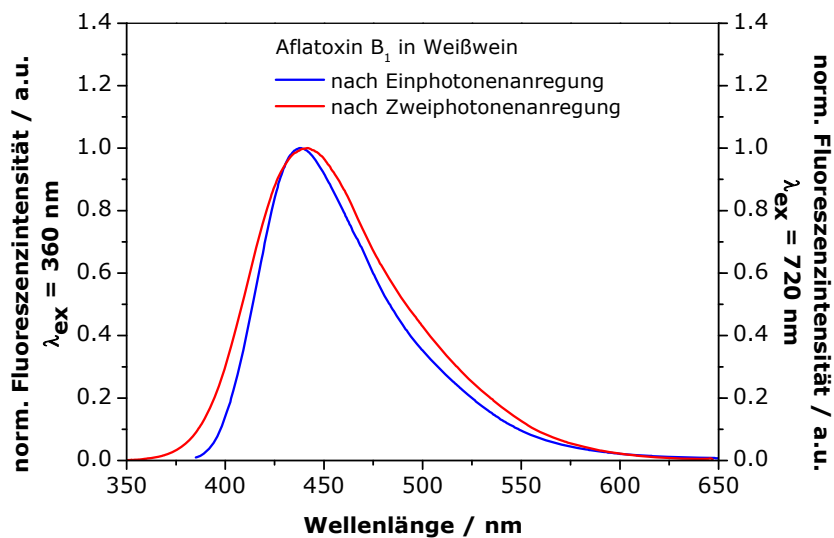


Abbildung 38: Fluoreszenzemissionsspektren von Aflatoxin B₁ in Weißwein nach Einphotonen- (blau) und Zweiphotonenanregung (rot)

Der Vergleich der beiden Spektren zeigt, dass die durch Ein- und Zweiphotonenanregung erhaltenen Emissionsspektren ähnlich sind. So sind gleiche Formen der Emissionsbanden und Emissionsmaxima bei $\lambda_{\text{em}} = 440 \text{ nm}$ zu finden. Es ist allerdings zu beachten, dass die Spektren nicht quantitativ verglichen werden können, da beide Methoden auf unterschiedlichen experimentellen Aufbauten beruhen.

4.3.4 Bestimmung der Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenzen (LOD - Limit of Detection) für die Ein- und Zweiphotonen-induzierte Fluoreszenz nach einer Anregung bei $\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$ bzw. 720 nm werden gleichzeitig bestimmt. Die Konzentration des AFB₁ in der Modell-Lösung und den alkoholischen Getränken wurde dabei in kleinen Schritten durch Zugabe des gelösten Mykotoxins erhöht. Die erhaltenen Spektren werden jeweils um das zugehörige Lösungsmittel korrigiert. Die

gemessenen Intensitäten der Emissionen werden im Wellenlängenbereich $435 \text{ nm} < \lambda < 445 \text{ nm}$ aufsummiert und gegen die Konzentration des Mykotoxins aufgetragen. Aus dem Anstieg und der Standardabweichung der Gerade lassen sich die Nachweisgrenzen bestimmen.

Die Nachweisgrenze bestimmt die niedrigste Konzentration des Analyten, die mit der Methode noch zuverlässig nachgewiesen werden kann. Das Kriterium des zuverlässigen Nachweises wird auf die Präzision des Messverfahrens bei einer Nullmessung (gegen Lösungsmittel) oder Leermessung bezogen. Damit ist der statistische Fehler oder die Schwankung des Meßsignals gemeint, wenn noch kein Analyt in der Probe vorhanden ist (Hintergrundsignal oder Blindwert).

Die Nachweisgrenze wird bestimmt über die Gleichung

$$LOD = y_B + 3s_B \quad (30)$$

wobei y_B der Mittelwert des Blindwertes, also die Fluoreszenzintensität der mit Lösungsmittel gefüllten Küvette und s_B die Standardabweichung der Intensität sind. Da die mit Lösungsmittel gefüllte Küvette hier als Blindprobe fungiert und zehnmal AFB1 hinzugefügt wurde, lässt sich die Nachweisgrenze aus der linearen Auftragung der Summe der Intensitäten gegen die Konzentration gemäß Gleichung

$$LOD = \frac{3s_B}{m} \quad (31)$$

bestimmen, in der m der Anstieg der erhaltenen Geraden ist. Beispielhaft ist die Ermittlung der Nachweisgrenze für AFB1 in Weißwein nach Einphotonen- und Zweiphotonenanregung in Abbildung 39 gezeigt.

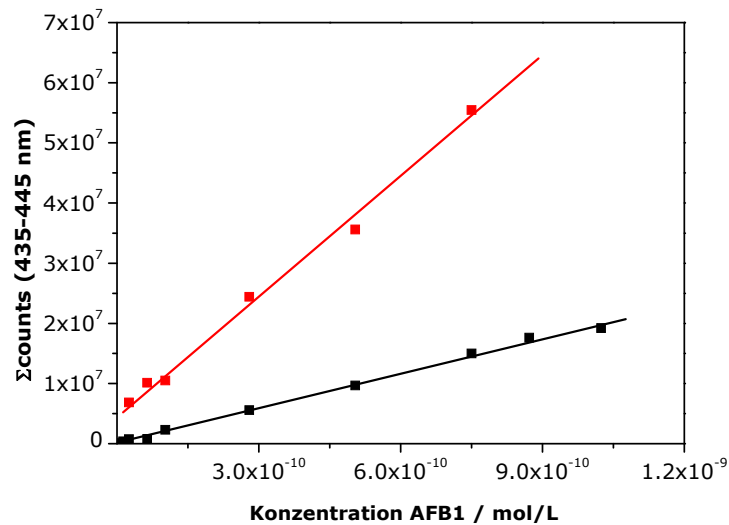


Abbildung 39: Lineare Auftragung der Summe der Fluoreszenzintensitäten gegen die Konzentration von AFB1 in Weißwein nach Ein- (schwarz) und Zweiphotonenanregung (rot)

Tabelle 16: Nachweisgrenze von Aflatoxin B₁ in der Modell-Lösung und den alkoholischen Getränken - Vergleich von Einphotonen- ($\lambda_{\text{ex}} = 360$ nm) und Zweiphotonenspektroskopie ($\lambda_{\text{ex}} = 720$ nm)

| | Modell-Lösung | Weißwein | Roséwein | Bier |
|-----------|----------------------|-----------------|-----------------|-------------|
| LOD (1PA) | < 1 ppb | 31 ppb | 43 ppb | 62 ppb |
| LOD (2PA) | < 1 ppb | 6 ppb | 20 ppb | 46 ppb |

Für die Ein- und Zweiphotonen-induzierte Fluoreszenz wurden die Nachweisgrenzen für AFB1 bestimmt (Tabelle 16). Obwohl die alkoholischen Getränke eine starke Eigenlumineszenz sowohl bei der "regulären" als auch bei der Zweiphotonen-induzierten Fluoreszenz aufweisen, können niedrige LODs ermittelt werden. Die LOD von Aflatoxin B₁ in der Modell-Lösung ist kleiner als 1 ppb (=µg/kg). Dieses Ergebnis wurde wegen des Fehlens der Hintergrundfluoreszenz des Lösungsmittels auch nicht anders erwartet. In Wein und Bier ist eine höhere Nachweisgrenze erwartet worden, was sich mit 31 ppb und 43 ppb in Wein und 62 ppb in Bier bestätigte. Die LODs bei der Zweiphotonenspektroskopie sind mit 6 ppb und 20 ppb in Wein und 46 ppb in Bier niedriger. Das kommt von der Minimierung der Hintergrundfluoreszenz der Matrix.

Zudem ist bekannt, dass die Emissionsintensitäten für einen fluoreszenzbasierten Nachweis verschiedener Mykotoxine vergrößert und damit die LOD verkleinert werden können, indem zu einer wässrigen Lösung des Mykotoxins Cyclodextrine gegeben werden (Vgl. Kapitel 4.2.1). Es bilden sich Einschlussverbindungen, wodurch eine Erhöhung der Fluoreszenz der Probe zu beobachten ist, z.T. um das 10fache (nach Einphotonenanregung) und um das 4fache (nach Zweiphotonenanregung) bei AFB1 (pH = 4). Es besteht ferner die Möglichkeit, dass „Fluoreszenzlöscher“, z.B. Weinhaltstoffe, so „unschädlich“ gemacht werden [185] und durch eine Addition von Cyclodextrinen eine direkte Analyse des Mykotoxins ohne Separationsschritt möglich ist [188]. Das wurde für die Zweiphotonenspektroskopie geprüft, jedoch ergab die Addition des CDs zu Wein eine ebenso große Steigerung der Fluoreszenzintensität von 1.3 wie die Addition von CDs zu AFB1 in Wein (Abbildung 40) und kann somit nicht zu den gewünschten Ergebnissen führen.

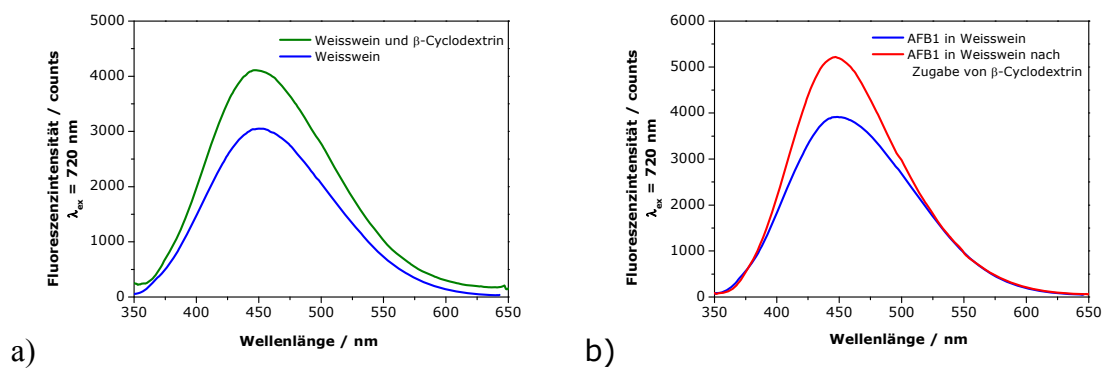


Abbildung 40: Fluoreszenzemissionsspektren nach Zweiphotonenanregung ($\lambda_{ex} = 720 \text{ nm}$) von:

- Weißwein (blau) und nach Zugabe von β -Cyclodextrin (grün, $c = 2.5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$)
- Aflatoxin B_1 ($c = 2.5 \cdot 10^{-7} \text{ mol/L}$) in Weißwein (blau) unter Zusatz von β -Cyclodextrin (rot, $c = 2.5 \cdot 10^{-2} \text{ mol/L}$)

4.4 Matrix „Getreide“

Das Potential der Fluoreszenzspektroskopie zur Untersuchung von Getreide ist durch die technische Entwicklung der Spektrometer und der Anwendung von chemometrischen Hilfsmitteln gestiegen. Die optische Spektroskopie ist in einer Matrix wie Getreide extrem schwierig, da es bei den Körnern eine große natürliche Variationsbreite hinsichtlich Größe, Form, Oberflächenbeschaffenheit und Färbung gibt. Ferner können noch in Abhängigkeit von den Witterungs- bzw. Lagerungsbedingungen zentrale Größen wie der Feuchtigkeitsgehalt stark variieren. Es ist daher sehr wichtig, die experimentellen Messbedingungen an die anspruchsvolle Matrix „Getreide“ anzupassen. Dies kann in ersten Schritten durch Referenzproben geschehen. Als Referenzprobenmaterial können z.B. lagerfähige Roggen- und Weizenkörner oder befeuchtete Körnerproben mit definiertem Feuchtegehalt (11 bis 28 Prozent) herangezogen werden, die mittels Fluoreszenz- und/oder Reflexionsspektroskopie untersucht werden.

4.4.1 Intrinsische Fluoreszenz des Getreides

Zandomenighi et al. [189] hatten bereits in den 1990er Jahren die "Front-Face-Fluorescence"-Spektroskopie zur Unterscheidung von Getreidearten etabliert. In Studien der Arbeitsgruppen von *Zandomenighi* [190, 191], *Karoui* [192] und *Bonomi et al.* [193] wurden die charakteristischen Wellenlängen zur Bestimmung der Getreideinhaltsstoffe und zur Unterscheidung der Getreidearten bestimmt.

Es sind mindestens drei Emissionsbanden im Spektralbereich $250 \text{ nm} < \lambda < 600 \text{ nm}$ nachweisbar, sowie vier Absorptionsbanden mit den Maxima $\lambda_{\text{abs,max}} = 280 \text{ nm}$ (Bande I), 330 nm (Bande II), 400 nm (Bande III) und 450 nm (Bande IV). Die intensivsten Banden um $\lambda = 280 \text{ nm}$ und 330 nm sowie die um $\lambda = 450 \text{ nm}$ finden sich bei der Fluoreszenzanregung (Abbildung 41, blau) wieder. Die Intensität der Bande lässt Rückschlüsse auf die Konzentration des Chromophors, welches den Anteil am zugehörigen Inhaltsstoff des Getreidekorns erfasst, zu. Damit lässt sich ein typisches „Fingerprint“-Spektrum jeder Getreideart erstellen.

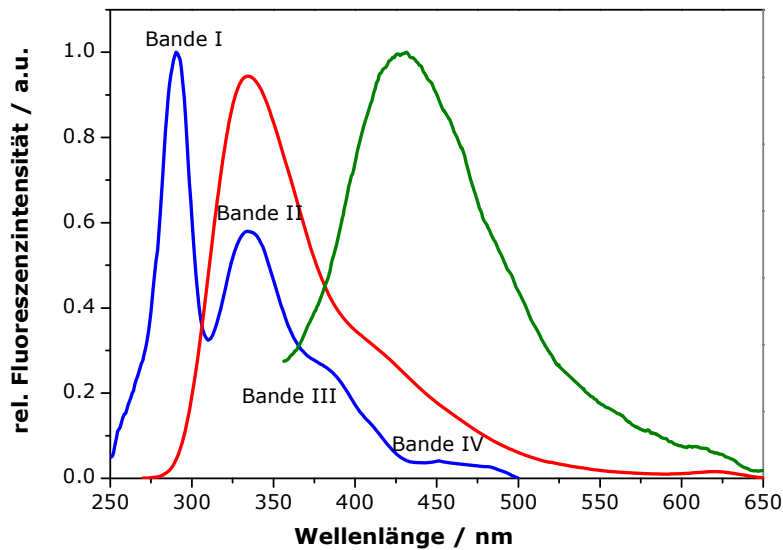


Abbildung 41: Fluoreszenzanregungsspektrum (blau) und Emissionsspektren (rot: $\lambda_{\text{ex}} = 275 \text{ nm}$, grün: $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$) von Weizenmehl

Die Herkunft der Bande I ($\lambda_{\text{ex}} = 275 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em,max}} = 335 \text{ nm}$) stammt von aromatischen Fluorophoren der Proteine, z.B. Tryptophan und Tyrosin. Bande II ($\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em,max}} = 420 \text{ nm}$) stammt von niedermolekularen Molekülen wie Tocopherole, Aminosäuren der Proteine, etc., die im Mehlkörper vorkommen. Bande III ($\lambda_{\text{ex}} = 400 \text{ nm}$) kann keiner spezifischen Emission und die Bande IV ($\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em,max}} > 450 \text{ nm}$) dem Gehalt an Xanthophyll - einem Carotenoid - im Mehlkörper zugeordnet werden. Das Maximum um $\lambda_{\text{em,max}} = 520 \text{ nm}$ (nach Anregung mit $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$) kann Riboflavin (Vitamin B₂) zugeordnet werden. Da der Carotenoidgehalt in Mehlen 2-5 fach höher als der Gehalt an Riboflavin ist, konkurrieren beide Intensitäten der Anregungsmaxima [191].

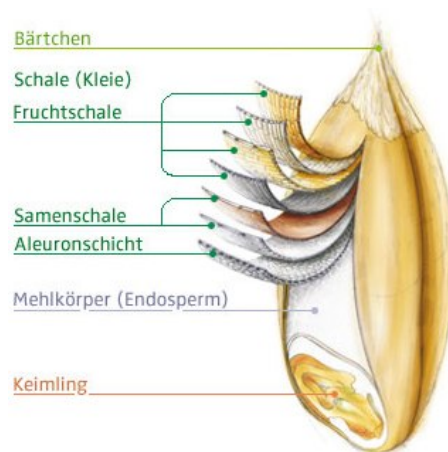


Abbildung 42: Aufbau eines Getreidekorns [194]

Es kann eine phänomenologische Zuordnung der spektralen Daten zu den verschiedenen Kornbestandteilen durch eine Zerlegung von Getreidekörnern in ihre Hauptbestandteile (Abbildung 42) – Frucht- und Samenschale, Mehlkörper und Keimling – gemacht werden.

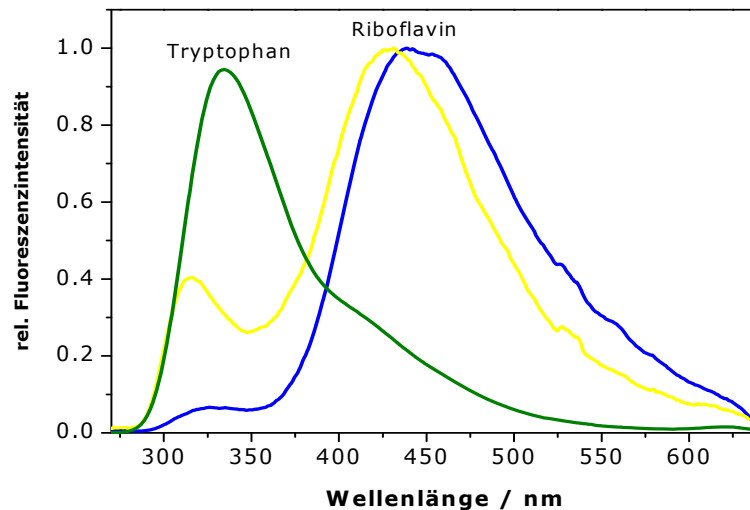


Abbildung 43: Emissionsspektren der Getreidebestandteile ($\lambda_{\text{ex}} = 270 \text{ nm}$) (blau: Frucht- und Samenschale, gelb: Keimling, grün: Mehlkörper)

In Abbildung 43 sind die Fluoreszenzspektren der drei Hauptbestandteile eines Getreidekorns nach Anregung bei $\lambda_{\text{ex}} = 270 \text{ nm}$ dargestellt. Die Emissionsbanden bei $\lambda_{\text{em,max}} = 335 \text{ nm}$ werden Tryptophan und bei $\lambda_{\text{em,max}} = 430 \text{ nm}$ Riboflavin zugeordnet.

Bei Anregungswellenlängen $\lambda_{\text{ex}} < 320 \text{ nm}$ überlappen die schwache Emissionsbande von Tryptophan ($\lambda_{\text{em,max}} = 320 \text{ nm}$) und die intensivere von Riboflavin ($\lambda_{\text{em,max}} = 425 \text{ nm}$) stark mit der Fluoreszenz verschiedener Mykotoxine (siehe Abbildung 16). Anhand der dargelegten photophysikalischen Eigenschaften der Mykotoxine und des Getreides wird erkennbar, dass die Unterscheidung von Mykotoxin- und intrinsischer Matrixfluoreszenz problematisch wird. In Einzelfällen, bedingt durch die spezifischen Eigenschaften des jeweiligen Mykotoxins z.B. bei OTA überschneiden sich die Emissionsbanden im gesamten Spektralbereich. Im Falle von fluoreszenzbasierten Techniken ist die Wahl der Anregungswellenlänge ein zentraler Selektionsparameter und müssen daher allerdings so gewählt werden, dass eine qualitative und quantitative fluoreszenzbasierte online Fluoreszenzanalytik möglich ist.

4.4.2 Abhängigkeit der Fluoreszenz vom Feuchtegehalt des Getreides

Voraussetzung für die Biosynthese von Mykotoxinen auf Getreide ist das Wachstum von Schimmelpilzen. Wachstum und Toxinproduktion funktionieren nur dann, wenn gleichzeitig ausreichend Wasser zur Verfügung steht. Der Wasserbedarf der einzelnen Schimmelpilzarten ist jedoch verschieden. In der Praxis spricht man von der Wasseraktivität a_w und meint damit den für die Schimmelpilze verfügbaren Wasseranteil im Getreide. Es handelt sich dabei um die Wassermenge, die bei längerem Aufenthalt des Produktes mit der umgebenden relativen Luftfeuchte im Gleichgewicht steht.

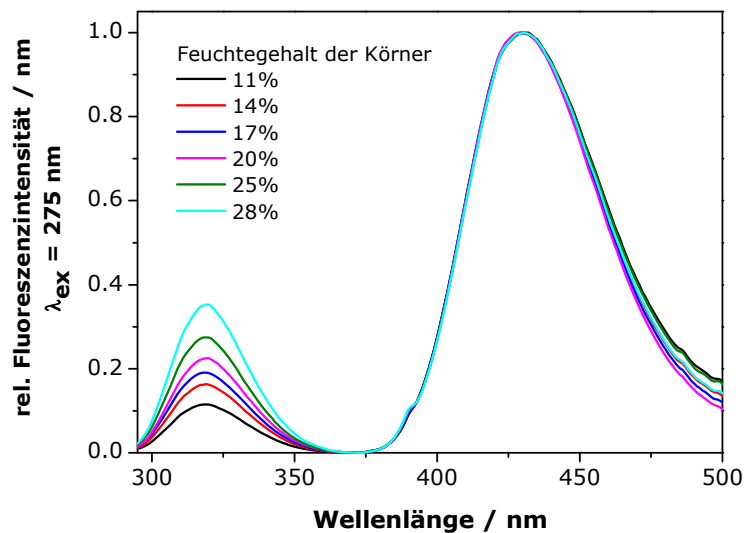


Abbildung 44: Fluoreszenzemissionsspektren befeuchteter Weizenkörner, $\lambda_{\text{ex}} = 275 \text{ nm}$

In Abbildung 44 werden die auf die spezifische Tryptophan-Fluoreszenz [192] normierten Emissionsspektren ($\lambda_{\text{ex}} = 275 \text{ nm}$) von "trockenen" Weizenkörnern (Feuchtegehalt 11%) und „feuchten“ Weizenkörnern (Feuchtegehalt bis 28%) verglichen. In den Spektren sind zwei dominante Banden ($\lambda_{\text{em,max}} = 320 \text{ nm}$ und 430 nm) zu sehen. Die Emissionsbande $\lambda_{\text{em,max}} = 320 \text{ nm}$ zeigt bei steigendem Wassergehalt eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität. Die Erhöhung der Intensität ist zurückzuführen auf eine kleinere Streuung, Absorption und Rückstreuung des Lichtes bei nassen Proben [195].

Die Tryptophan-Fluoreszenz ($\lambda_{\text{em,max}} = 320 \text{ nm}$) ist hochselektiv gegenüber der Umgebungspolarität, d.h. beim Anstieg der Hydrophobie kann sich das Maximum der Emission teils bathochrom um 10 nm , das der Anregung bis zu 15 nm verschieben.

Wie bereits beschrieben wird der a_w -Wert des Substrates während des Wachstums der Pilze zunächst vermindert (Verbrauch von Wasser während der Sporenkeimung und des Anfangswachstums) und anschließend erhöht (Einsetzen des sekundären Stoffwechsels). In einem 14tägigen Dauerversuch wurde diese Erkenntnis mittels Bestimmung der spektroskopischen Eigenschaften der Körner bei der Bildung der Schimmelpilze und möglicher Toxine untersucht. Dazu wurden Weizenkörner (25% Feuchtegehalt) künstlich mit *Aspergillus niger* und *Penicillium verrucosum* inokuliert und an den Tagen 4, 6 und 10 nach der Inokulation mittels Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Eine sterile Probe ohne Pilzbefall diente als Referenz. Parallel fand die Bestimmung der Keimzahlen und der möglichen Toxinbildung mittels Dipsticks statt. Die Keimzahl gibt die Anzahl der vermehrungsfähigen Keime eines Teils der Mikroorganismen an, die in einer bestimmten Substratmenge enthalten sind. Sie sagt jedoch nichts über die Arten, Nützlichkeit oder Schädlichkeit dieser Organismen aus.

Zur Übersicht wurden von den Getreideproben Fluoreszenzemissionsspektren mit Anregungswellenlängen im Bereich $270 \text{ nm} < \lambda_{\text{ex}} < 360 \text{ nm}$ und Emissionswellenlängen jeweils 10 nm oberhalb der Anregungswellenlänge aufgenommen. Zur besseren Darstellung werden diese Daten als totales Fluoreszenzspektrum oder EEM-Spektrum (Excitation-Emission-Matrix) in Abbildung 45 wiedergegeben.

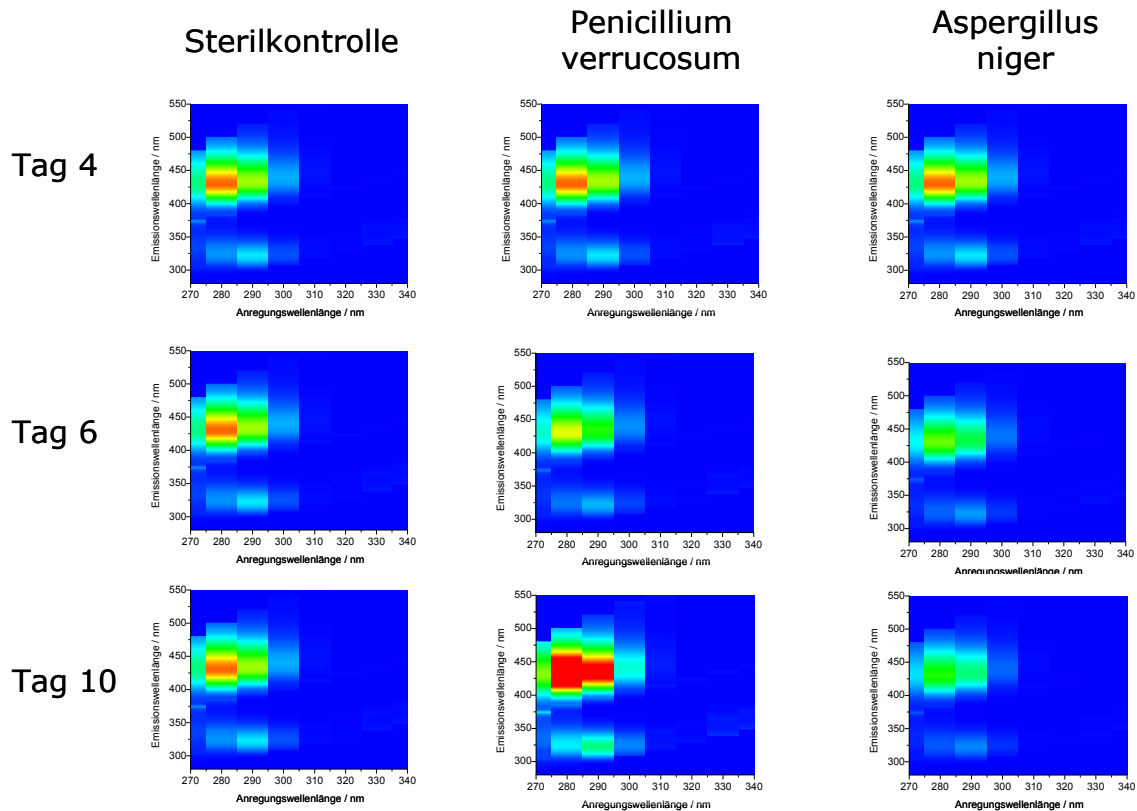


Abbildung 45: Anregungs-Emissions-Matrix der Fluoreszenz von unbelasteten sowie mit verschiedenen Schimmelpilzen belasteten Weizenkörnern

Es wird die Fluoreszenzintensität als Funktion von Anregungs- und Emissionswellenlänge in einer dreidimensionalen Matrix dargestellt. Den Zusammenhang von Farbe zu einem Intensitätswert verdeutlicht die Änderung des Farbverlaufes, wobei Blau den niedrigsten Wert und Rot den höchsten Wert der Intensität widerspiegelt. Das Spektrum links zeigt die Fluoreszenz der unbelasteten Probe (Weizenkörner - Sterilkontrolle), die übrigen Grafiken die Fluoreszenz von Schimmelpilzbelasteten Weizenproben in Abhängigkeit der Messtage nach der Inokulation.

Die Intensität der Fluoreszenzemission, die charakteristisch für die Hydrophobie des Tryptophans ist und damit die Abnahme des Feuchtegehaltes darstellt, nimmt durch das eingesetzte Pilzwachstum ab (Anstieg der Keimzahlen auf 10^5 bis 10^6). Beim Befall der Körner mit *Aspergillus niger* verschwindet der rote Bereich zunehmend und am Tag 10 ist die geringste Intensität zu erkennen.

Die Spektren sind ebenfalls zum großen Teil von der Fluoreszenz der natürlichen Weizenbestandteile dominiert und unterscheiden sich in dieser Darstellung wenig, d.h. die Wellenlängen der Emissionsmaxima der belasteten

Weizenkörner sind nicht verschoben zur Fluoreszenz der unbelasteten Körner. Das belegt u.a., dass die Schimmelpilze keine Autofluoreszenz zeigen. Bei Anwesenheit von fluoreszenzfähigen Mykotoxinen würde man im roten Bereich eine Zunahme der Fluoreszenzintensität erwarten. Am Beispiel des *Penicillium verrucosum*, dessen Fluoreszenzintensität am zehnten Tag gegenüber dem sechsten Tag wieder ansteigt, wird hier deutlich, dass die Bildung von Ochratoxin A eingesetzt hat, welches man mittels OTA-ELISA-Test nachweisen konnte (37 µg/kg) .

Die hingegen mehr oder weniger beobachtbare Abnahme der Fluoreszenzintensität bei Anwesenheit von Schimmelpilzen kann auch noch weitere Ursachen haben:

- Durch die von Schimmelpilzen verursachten Verfärbungen („Pilzteppich“) ändern sich die optischen Eigenschaften der Probe, wodurch das intrinsische Fluoreszenzspektrum der natürlichen Pflanzeninhaltsstoffe verzerrt wird.
- Durch die Schimmelpilze werden die natürlichen Pflanzeninhaltsstoffe soweit chemisch verändert, dass sich die Fluoreszenzeigenschaften ändern oder schlicht abgebaut werden.
- Die verschiedenen Fluoreszenzintensitäten der drei dargestellten Proben haben natürliche Ursachen, d.h. die Konzentrationen bzw. die Konzentrationsverhältnisse der Inhaltsstoffe sind variabel.

Je nachdem, welche Ursache für die geringere Fluoreszenzintensität im markierten Spektralbereich der Pilz befallenen Weizenproben verantwortlich ist, besteht die Aussicht, diese Abnahme der Fluoreszenzintensität als Indiz für Schimmelpilzbefall auszuwerten. Der eigentliche Nachweis des Pilzbefalls erfolgt mittels Reflexionsspektroskopie.

4.4.3 Reflexionseigenschaften der Getreidekörner

Nah-Infrarot (NIR)-Spektroskopie schließt an das sichtbare Spektrum bei 780 nm an und endet bei 2500 nm. Diese Technik wurde erstmals in der Landwirtschaft eingesetzt, um den Feuchtegehalt von Körnern zu bestimmen [166]. Durch die Überlagerung von Schwingungen ist die Peakdichte und damit der Informationsgehalt dieses Spektralbereiches höher als in anderen Wellenlängenbereichen. Diese Vielfalt kompliziert aber auch die qualitative Auswertung der Spektren, da jede Molekülstrukturinformation im

Oberschwingungsbereich nur als Bandenverschiebung oder Formveränderung statt des Auftretens separierter Banden beobachtet werden kann, anders ist das bei der quantitativen Analyse. Ein großer Vorteil ist die Gültigkeit des *Lambert-Beerschen-Gesetzes* im NIR und macht daher eine Datenkorrelation einfach (siehe *Kubelka-Munk-Funktion*).

NIR-Spektren von Getreide werden durch breite Banden charakterisiert, die durch Oberton- und Kombinationsschwingungen von C-H, O-H und N-H Bindungen resultieren. Bei großen Molekülen oder komplexen Matrixes - wie Getreide - werden die Banden durch Überlagerungen verbreitert. Die Konzentrationen der Inhaltsstoffe, wie Wasser, Proteine, Fette und Kohlenhydrate könnten im Prinzip durch diese Methode bestimmt werden. Für die meisten Getreidearten gilt allerdings, dass die chemischen Informationen aus Änderungen im Spektrum durch die natürliche Variationsbreite der Körner hinsichtlich Größe, Form, Oberflächenbeschaffenheit und Färbung sowie Feuchte resultieren [125]. Normalerweise wird die NIR-Spektroskopie routinemäßig für die Charakterisierung der Lebensmittelbestandteile, Prozeßintermediaten und Endprodukte eingesetzt. Die Analysen sind in der Regel einfach und sehr schnell und können zur Online-Detektion eingesetzt werden. Auch kann die NIR-Spektroskopie im Gegensatz zur Fluoreszenzspektroskopie Getreidebestandteile (Proteine, Fett, Stärke, Wasser) qualitativ und quantitativ nebeneinander nachweisen und somit die Qualitätsparameter bestimmen, die für den Verkauf am Markt preisbestimmend sind.

Durch die Erweiterung des Wellenlängenbereichs bis in den UV-Vis-Bereich ist somit zusätzlich die Bestimmung des Schimmelpilzbefalls und der Toxinbildung möglich. Das bedeutet, dass die NIR-Spektroskopie als zweite Referenzmethode neben der Fluoreszenzspektroskopie genutzt werden kann, um der Fragestellung des Nachweises von Schimmelpilzen und deren Mykotoxine nachzugehen [164].

Die Aufnahme und Auswertung der diffusen Reflexionsspektren von unbefallenen und befallenen Getreidekörnern benötigen jedoch genaue Kenntnisse über die Zuordnung der erhaltenen Banden sowie spezifische Datenvorbehandlungen und chemometrische Auswerteverfahren, um die relevanten Informationen aus den strukturellen Spektrenänderungen zu verstehen und eine molekulare Interpretation der Ergebnisse zuzulassen.

In Abbildung 46 sind das logarithmierte Reflexionsspektrum eines Weizenkorns mit einem Feuchtegehalt von 25% und dessen zweite Ableitung dargestellt.

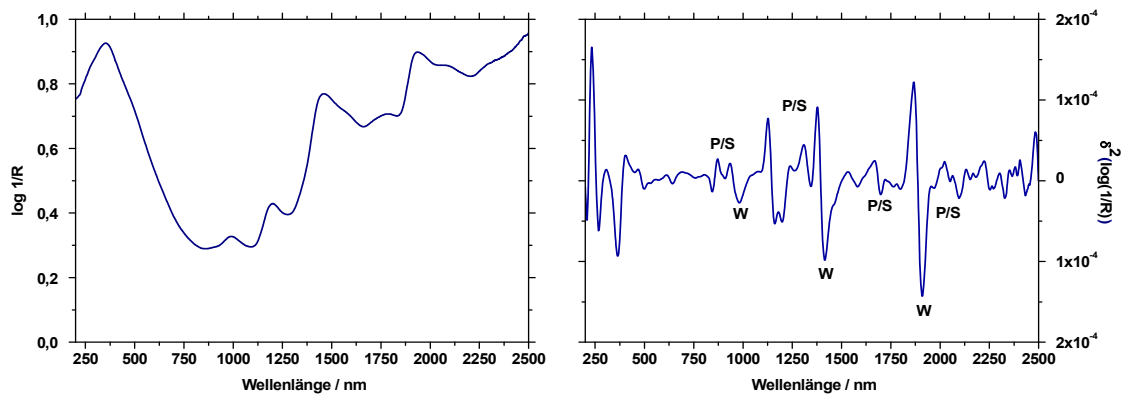


Abbildung 46: links: Reflexionsspektrum einer befeuchteten, sterilen Weizenprobe mit 25% Feuchte; rechts: die zweite Ableitung des Reflexionsspektrums (W - Wasser, P/S - Proteine, Stärke, Öle)

Das Reflexionsspektrum wird dominiert durch die charakteristischen Obertonschwingungen des Wassers um 980 nm und 1410 nm und einer Kombinationsschwingung um 1940 nm. Schwingungen, die Stärke, Proteinen und Ölen zugeordnet werden, können um 1200 nm, 1380 nm und 1760 nm beobachtet werden. Bedingt durch Variationen in Form, Größe [196], Farbe [197], Dichte, Zusammensetzung und Feuchtigkeitsgehalt [198] werden in den Reflexionsspektren von Getreidekörnern Bandenvariationen von bis zu 30 nm gefunden. Die Farbe der Weizenkörner variiert von hellgelb bis rotbraun in Abhängigkeit von der Samenschale und von den Wachstumsbedingungen und kann ergänzend zur Bestimmung der Sorte genutzt werden. Um den Einfluss der Korngrößen zu umgehen, werden Schritte der Datenvorbehandlung vor der Auswertung durchgeführt.

In Tabelle 17 sind nochmals alle im NIR-Bereich durch Getreideinhaltsstoffe verursachten Banden zusammengefasst.

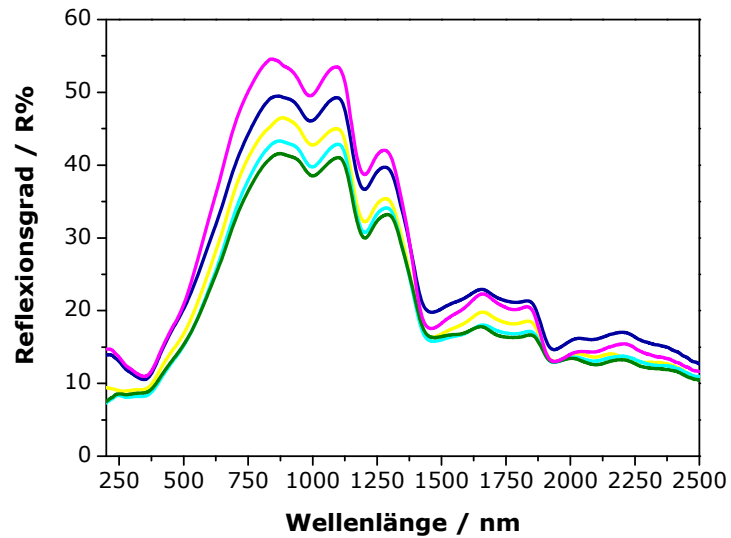
Tabelle 17: Zuordnung bestimmter Banden im NIR in Abhängigkeit von der Struktur

| Wellenlänge / nm | Zuordnung | Bestandteil |
|--------------------------------|---|-----------------------|
| 1920 – 1950 | O-H (2. Obertonschwingung) | Wasser |
| 1790 | O-H (Kombinationsschwingung) | |
| 1400 - 1450 | O-H (1. Obertonschwingung) | |
| 2080 - 2220 und 1560 - 1670 | - NH (Deformationsschwingung) | Proteine – Peptide |
| 1680 - 1760 | - CH ₂ und CH ₃ (Kombinationsschwingung) | Fette |
| 1200 | - CH | |
| 2060-2150 | C-O, O-H stretch | Kohlenhydrate |
| 1540 | O-H | Stärke |

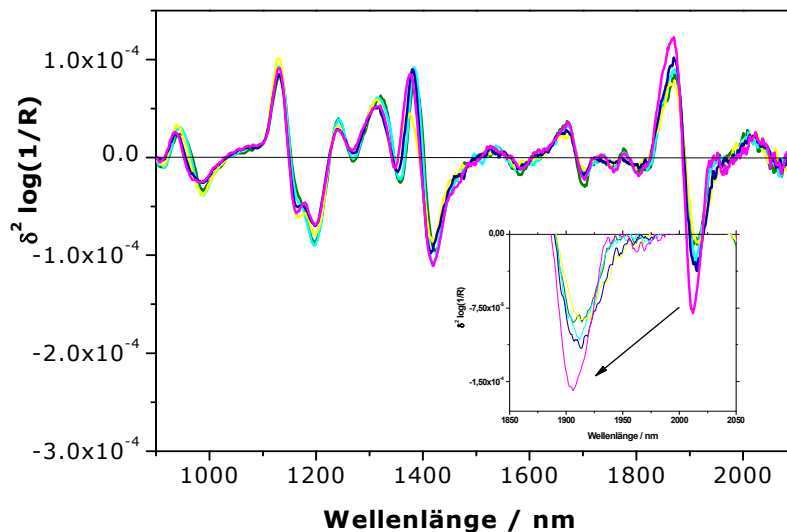
4.4.4 Abhängigkeit der Reflexion vom Feuchtegehalt des Getreides

Wasser ist der wichtigste chemische Bestandteil in Getreide. Weizen kann im Feuchtegehalt zwischen 6 und 25% bei der Ernte variieren, abhängig von den Wetterbedingungen während der Ernte und dem Ort der Ernte. Zugleich müssen während der Lagerung in Silos folgende Bedingungen gelten, um Pilzbefall zu vermeiden: Feuchtigkeit unter 14%, Temperatur unter 20°C (am günstigsten sind Temperaturen zwischen 5-8°C). Getreide ist erst ab 14.5% Feuchte sicher lagerfähig. Da je nach Witterung auch mit einer höheren Feuchte gedroschen wird, muss die Feuchte vor der Lagerung durch Trocknen entzogen werden.

Weil Wasser stark im NIR absorbiert, wird das Spektrum dadurch in seinen Banden dominiert. Das Spektrum wird noch verkompliziert durch wellenlängenabhängige Streueffekte, Heterogenitäten in der Zusammensetzung, durch Messapparaturen verursachtes Rauschen dem Umgebungsmedium und anderen Effekten. Daher werden alle Spektren vorbehandelt oder zur besseren Transformationen in die zweite Ableitung übergeführt.



a)



b)

Abbildung 47: a) Reflexionsspektren von unkontaminierten Weizen mit variablem Feuchtegehalt: 11% (grün), 14% (hellblau), 18% (gelb), 21% (blau) und 25% (pink); b) zweite Ableitung o.g. Spektren

In Abbildung 47 sind Reflexionsspektren von fünf verschiedenen Feuchtegehalten von Weizenkörnern abgebildet, wobei 11% und 14% lagerfähiges Getreide und die restlichen die Feld- bzw. erntefeuchten Proben symbolisieren. Die markante Wasserbande ist um 1930 nm (11% Feuchte) zu finden und verschiebt sich mit zunehmendem Feuchtegehalt bis zu 20 nm zu kleineren Wellenlängen [198]. Anhand von Kalibrationen ist es möglich, den

Feuchtegehalt genau zu bestimmen, allerdings benötigt man hierzu eine große Datenbank an Spektren, die alle Informationen zu Einflussvariablen wie Sorten, Form, Farbe, Größe, Dichte und Zusammensetzung der Körner sowie zum Feuchtigkeitsgehalt, Wetterbedingungen und Anbauort beinhalten.

4.5 Nachweis von Schimmelpilzen mittels Reflexionsspektroskopie

Schimmelpilze befallen das Getreide sowohl auf dem Feld als auch während der Lagerung. Sie besiedeln zunächst die Oberfläche des Korns und dringen dann mittels Hyphen (Pilzfäden) tief in das Korn ein und bilden Dauerformen. Die Mykotoxine werden entweder auf dem besiedelten Substrat freigesetzt oder in den Zellen der Pilzfäden gespeichert. Der Pilz- und Toxinbefall ist dabei kornspezifisch. Eine Beurteilung einer Weizenpartie gestaltet sich schwierig, da die Mykotoxinverteilung im Einzelkorn und in der gesamten Getreidepartie sehr heterogen sind. In der Regel liegt der mit Pilzen belastete Anteil unter 5%, während in diesen Körnern ca. 80% des Mykotoxingehaltes anzufinden ist. Für die Analyse zur Mykotoxinbestimmung empfiehlt sich die Vermahlung der Probe.

Beim Nachweis des Pilzes, der sich zunächst auf der Kornoberfläche befindet, und zudem einen spektralen Informationsgewinn über die Körner (vgl. Kapitel 4.4.3) ermöglicht, scheint für diffuse Reflexionsmessungen von Kornoberflächen (Eindringtiefe max. einige Mikrometer) im NIR-Bereich aussichtsreich zu sein. Es entfällt der Probenvorbereitungsschritt der Vermahlung. Wie bereits vorab beschrieben ist ein Nachweis mittels Fluoreszenz nicht möglich.

Die Proben, die in diffuser Reflektion gemessen werden, zeigen häufig spektrale Unterschiede, die von den physikalischen Eigenschaften der Körner stammen. Dies hat zur Folge, dass die chemischen Informationen oftmals in starkem Maße von auftretenden Streueffekten überdeckt werden. Vor den Auswertungen wurden Datenvorbehandlungen durchgeführt, z.B. die Standard Normal Variate (SNV) Transformation oder Multiplicative Signal Correction (MSC).

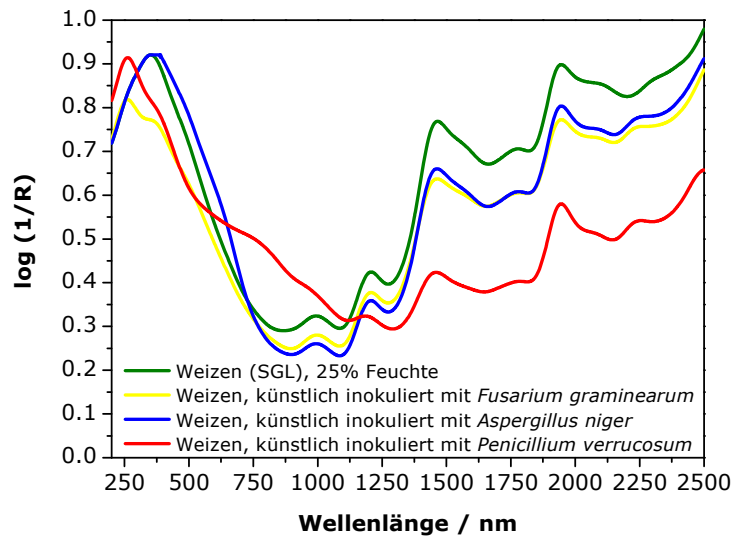


Abbildung 48: Reflexionsspektren von sterilen, unkontaminierten Weizenkörnern und künstlich mit Schimmelpilzen inokulierten Weizenproben gleicher Feuchte (25%)

Abbildung 48 zeigt aus zehn Messungen gemittelte Reflexionsspektren von sterilen unbefallenen Weizenkörnern sowie von Weizenkörnern, jeweils künstlich inokuliert mit den Schimmelpilzen *Fusarium graminearum*, *Aspergillus niger* und *Penicillium verrucosum*. Da alle Körner auf einen Feuchtegehalt von 25% eingestellt wurden, scheiden hier die verursachten Verschiebungen aus.

Zu allererst ist zu erkennen, dass die Spektren im Wellenlängenbereich oberhalb 1250 nm von den Bandenformen relativ gleich sind. Unterhalb von 1250 nm unterscheiden sie sich in ihrem Reflexionsgrad sowie in der Bandenform. Es zeigt sich eine deutliche Abgrenzung des Spektrums von *Penicillium verrucosum* zu den anderen Spektren. Die weiteren pilzbelasteten Weizenkörner zeigen Spektren mit kleinerer Reflektivität als die Weizenkörner. Diese Kurven liegen größtenteils unter der Kurve von Weizen. Die Verfärbung der Körner durch den Pilzbefall könnte hier die Erklärung für die geringe Änderung der Reflektivität sein.

Ein Vergleich und die Zuordnung der Pilze zu den Spektren sind anhand der Messung von Schimmelpilzen auf Agar möglich. Die Durchführung einer Hauptkomponentenanalyse zeigt, dass eine Zuordnung der Körner zu den Pilzgattungen möglich ist.

Abbildung 48 zeigt einen Score/Score-Plot der Hauptkomponenten 1 und 2 (PC1 und PC2). Die Datenvorbehandlung hat sich nur auf ein Minimum

beschränkt, es wurden Mittelwerte der Spektren gebildet und eine Streukorrektur durchgeführt. Es wurden für die Erstellung der Hauptkomponentenanalyse je Schimmelpilz 25 Proben von unterschiedlichen Inokulationsversuchen und der Wellenlängenbereich $200 \text{ nm} < \lambda < 1200 \text{ nm}$ einbezogen.

Bei der Interpretation der PCA ist zu sehen, dass sich kontaminierte von den unkontaminierten Proben unterscheiden. Es kristallisieren sich vier Bereiche heraus. Einerseits können kontaminierte von unkontaminierten Körnern abgegrenzt und andererseits die kontaminierten Proben in die Gattungen eingeteilt werden. Das belegt das Ergebnis der ersten beiden Hauptkomponenten, die 96% der spektralen Informationen enthalten. Die unbelasteten Proben liegen auf dem positiven Abschnitt der ersten Hauptkomponente, die belasteten im negativen Bereich beider Hauptkomponenten. Der größte Unterschied der Pilzspektren zu den Spektren von unkontaminierten Körnern ist durch *Penicillium verrucosum* verursacht. Die Spektren der *Aspergillen* unterscheiden sich weniger von unbefallenen und den der *Fusarien*.

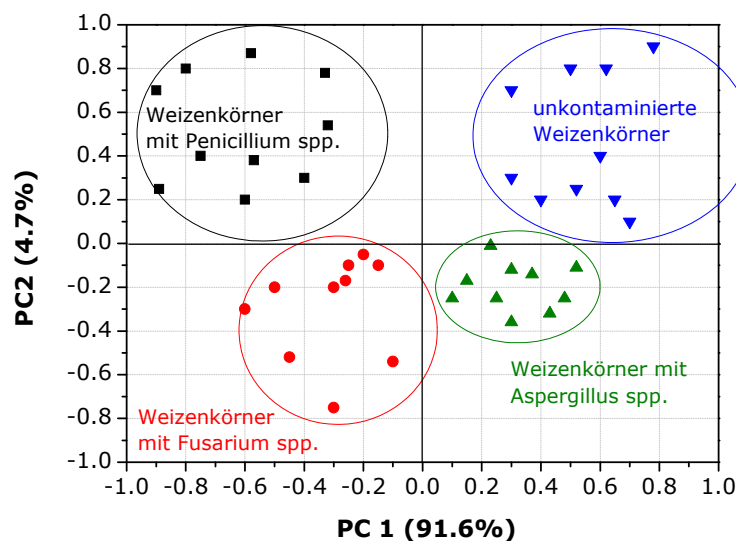


Abbildung 49: Score/Score Plot der Reflexionsspektren (PC1 vs PC2) von unbefallenen und künstlich inokulierten Weizenkörnern

Eine Unterscheidung in den Pilzarten (z.B. zwischen *Fusarium graminearum* und *Fusarium poae*, Abbildung 50a) ist mittels Hauptkomponentenanalyse nicht möglich, da sich beim Vermessen der Reinkulturen auf Agar gezeigt hat, dass innerhalb einer Gattung die spektralen Unterschiede nicht vorhanden

sind. Das liegt zum einen am charakteristischen "Schimmel", der dieselbe Farbe aufweist und zum anderen an der Ausbreitung der Pilze, da in den meisten Fällen "nesterartige" Verschimmelungen durch mehrere Unterarten oder auch mehrere Pilze gebildet werden. Eine deutliche Einteilung mittels PCA in Feld- und Lagerpilze ist auch aufgrund der Farbe der Pilze ebenso nicht möglich, z.B. bilden *Penicillium* spp. und *Aspergillus* spp. gleichfarbige (grüne) "Pilzteppiche" (Abbildung 50b).

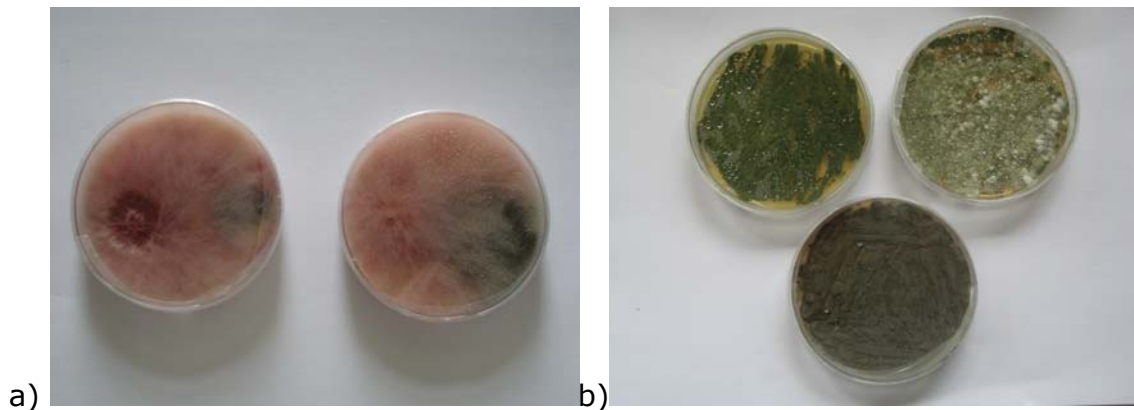


Abbildung 50: Verschiedene Pilzisolat auf Agar angezogen

- a) links: Pilzgemisch aus *Fusarium graminearum* (Feldpilz) und *Aspergillus niger* (Lagerpilz), rechts: Pilzgemisch aus *Fusarium poae* und *Alternaria* spp. (Feldpilze)
 b) oben: *Penicillium verrucosum*, unten: *Aspergillus niger* (Lagerpilze)

Weiterhin hat sich gezeigt, dass künstlich inokulierte Weizenproben mit Schimmelpilzen mittels Reflexionsspektroskopie bestimmt werden, jedoch nur einzelne Pilze, keine Pilzgemische (Abbildung 51) - wie sie bei Realproben auf dem Feld oder im Lager gefunden werden können. Auch wurden die „Veränderungen“ erst detektiert, als der Befall schon für den Menschen ersichtlich wurde – „Verschimmelung“ des Kornes.

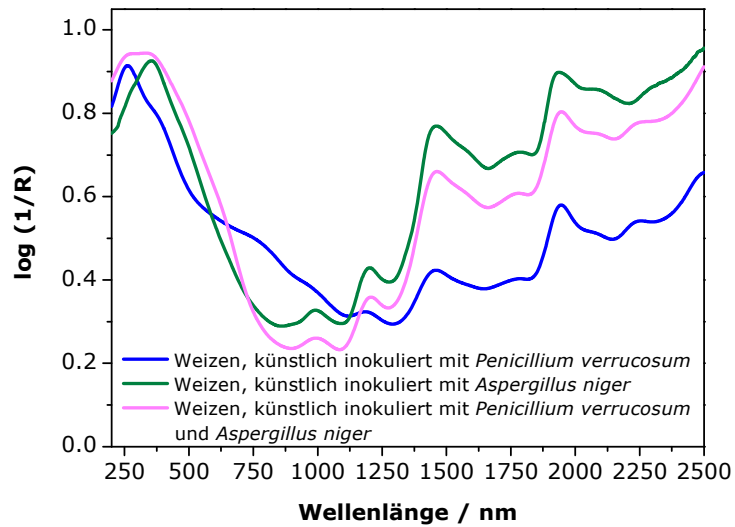


Abbildung 51: Reflexionsspektren von künstlich mit Schimmelpilzen inokulierten Weizenkörnern gleicher Feuchte (25%): *Penicillium verrucosum* (blau) und *Aspergillus niger* (grün) sowie einem Gemisch aus beiden Pilzen (pink)

4.6 Nachweis von Mykotoxinen auf Körnern

In natürlich mit Mykotoxinen kontaminierten Getreideproben muss davon ausgegangen werden, dass mehrere Toxine gleichzeitig und in unterschiedlichen Mengen vorliegen. Für weitere systematische Untersuchungen zur Detektion von Mykotoxinen mittels verschiedener Methoden ist jedoch das Vorliegen nur eines Toxins von Vorteil. Deshalb wurden für weitere Modellversuche Getreideproben gezielt mit jeweils einem Mykotoxin in unterschiedlichen Mengen versetzt (gespikt). Es wurden systematisch verschiedene Einflussgrößen wie die Applikationsform des Getreides (ganzes Korn, Mehl) untersucht.

4.6.1 Fluoreszierende Mykotoxine – am Beispiel von Ochratoxin A

Die Reflexions- und Fluoreszenzuntersuchungen der Weizenkörner auf Mykotoxine war möglich, anhand der Wahl geeigneter Anregungs- und Detektionswellenlängen, jedoch konnte keine Quantifizierung erfolgen, weil das Mykotoxin beim Aufbringen ebenso in das Korn eindringt und damit nicht mehr an der Kornoberfläche detektiert werden kann – es kann also bestenfalls ein semi-quantitativer Nachweis erfolgen.

Aufgrund dessen wurden die Körner vermahlen und erneut vermessen. In Abbildung 52 sind die in die *Kubelka-Munk-Funktion* [160] umgewandelten Reflexionsspektren des mit OTA versetzten Weizenmehls, im Wellenlängenbereich $200 \text{ nm} < \lambda < 500 \text{ nm}$, dargestellt.

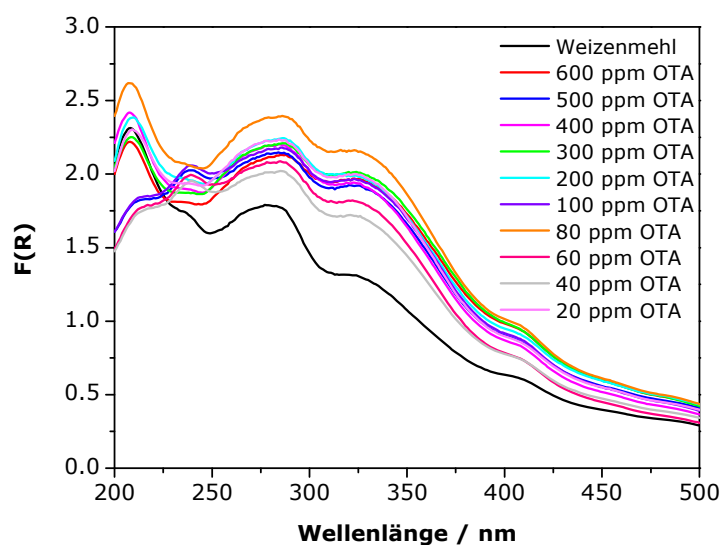


Abbildung 52: Reflexionsspektren von mit OTA gespiktem Weizenmehl

Es müsste nun ein linearer Zusammenhang bei $\lambda = 330 \text{ nm}$ (Absorptionsmaximum des Ochratoxin A in ethanolischer Lösung) durch Auftragung von $F(R)$ gegen die Konzentration zu beobachten sein (Abbildung 53), da ein Zusammenhang zum *Lambert-Beerschen-Gesetz* besteht (vgl. 2.2.4) und anhand des bekannten Absorptionskoeffizientens von Ochratoxin A Rückschlüsse auf die Konzentration gezogen werden, womit eine Quantifizierung möglich ist. Beim Betrachten von Abbildung 51 zeigt sich aber, dass keine lineare Steigerung von $F(R)$ mit steigendem OTA-Gehalt, analog der Extinktion bei Messung von Lösungen, ersichtlich wird. Das liegt vermutlich an der inhomogenen Zusammensetzung der Inhaltsstoffe des Mehls am Messpunkt, die im gleichen Bereich absorbieren wie das Ochratoxin A. Die Unterscheidung von Mykotoxin und Matrix ist daher mittels Reflexionsspektroskopie problematisch.

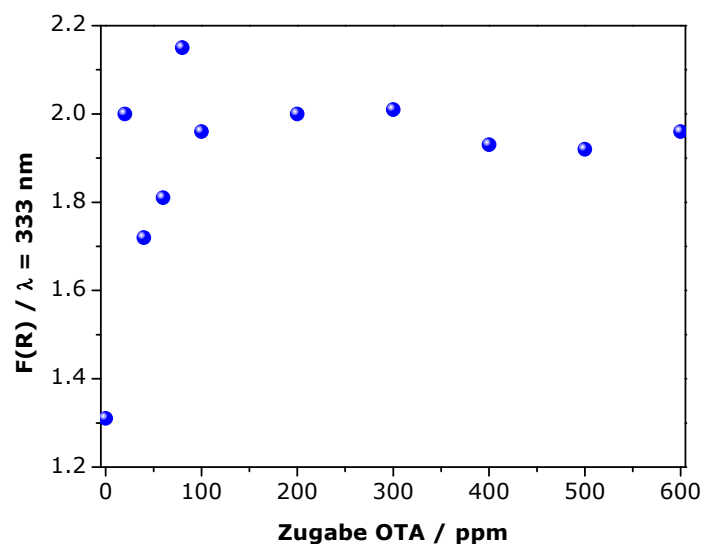


Abbildung 53: Auftragung von $F(R)$ bei $\lambda_{em} = 333 \text{ nm}$ gegen die OTA-Zugabe

In Einzelfällen, bedingt durch die spezifischen Eigenschaften des jeweiligen Mykotoxins, können die experimentellen Parameter allerdings selektiv so gewählt werden, dass eine qualitative und quantitative fluoreszenzbasierte Fluoreszenzanalytik möglich ist. In Abbildung 54 sind die Emissionsspektren derselben Proben, welche mit OTA kontaminiert wurden, bei einer Anregung $\lambda_{ex} = 330 \text{ nm}$ abgebildet. Es zeigt eine schrittweise Erhöhung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der OTA-Konzentration. Die Spektren wurden jeweils um das Spektrum des reinen Weizenmehls korrigiert.

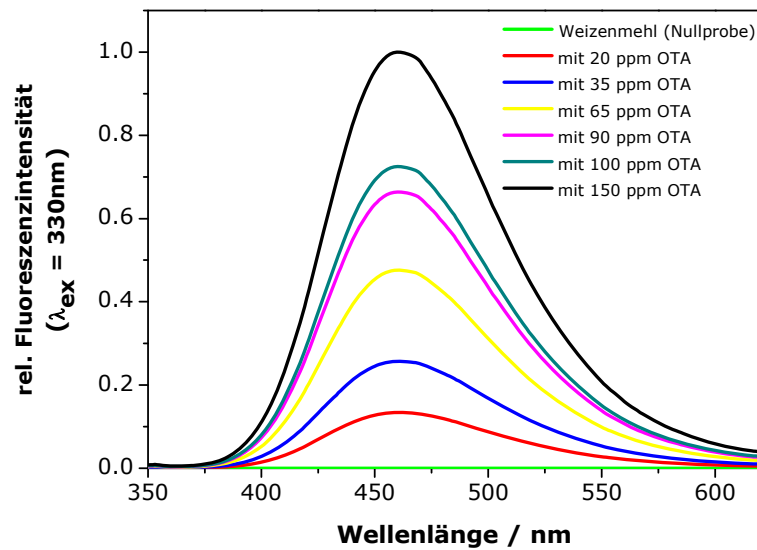


Abbildung 54: Front-Face-Emissionsspektren von gemahlene Weizenkörnern nach der Zugabe von unterschiedlichen Mengen an in Ethanol gelöstem OTA, $\lambda_{\text{ex}} = 330 \text{ nm}$

Die Auftragung der normierten Fluoreszenzintensität am Emissionsmaximum $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$ gegen die Zugabe an Ochratoxin A zum Weizenmehl ergibt eine Gerade (Abbildung 55). Die Nachweisgrenze beträgt 2 ppm (=mg/kg).

Anhand dieser Kalibration mit 7 Werten kann man nun eine Prüfung auf Richtigkeit, eine sog. Validierung mittels PLS durchführen, welche eine Korrelation zwischen den Intensitäten und den quantitativen Angaben zu berechnen versucht.

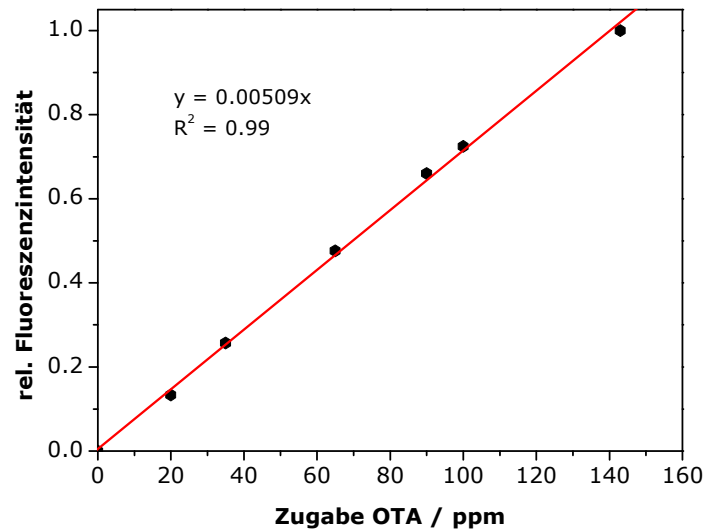


Abbildung 55: Lineare Auftragung der Fluoreszenzintensität am Maximum ($\lambda_{em} = 460 \text{ nm}$) gegen die OTA-Konzentration

Für die Validierung wurden nochmals 12 Proben mit verschiedenem OTA-Gehalt hergestellt, vermessen und der vorhergesagte Wert (aus der Kalibration berechnete OTA-Wert) gegen den gemessenen Wert aufgetragen (Abbildung 56).

Bei der PLS wird ein Messwert durch ein zuvor trainiertes Modell abgeschätzt und eine quantitative Größe für eine Variable (Deskriptor oder Merkmal) berechnet. Bei der Variablen kann es sich um jede beliebige Größe handeln, sofern diese quantisierbar in einem quasilinearen Zusammenhang mit den Sensorsignalen steht. Es gibt unterschiedliche Möglichkeiten von quantitativen Variablen. Sie können je nach Anwendung frei definiert werden. Hier ist es die Konzentration des OTA in der Probe. Genutzt wird die PLS-Vorhersage immer bei Anwendungen, in denen die Sensorsignale mit einer quantitativen Angabe korreliert werden sollen und dementsprechend bestimmte quantitative Merkmale mit den Musterdaten zu verknüpfen sind. Die PLS-Vorhersage unterscheidet sich von den anderen Auswertungen dadurch, dass sie quantitative Werte für die in der Musterdatei enthaltenen PLS-Merkmale berechnet und ausgibt. Sie ist daher kein Klassifikator der eine Entscheidung herbeiführt, sondern eher größenmäßige Angaben berechnet. Der aktuelle Wert wird mit dem vorhergesagten Wert verglichen.

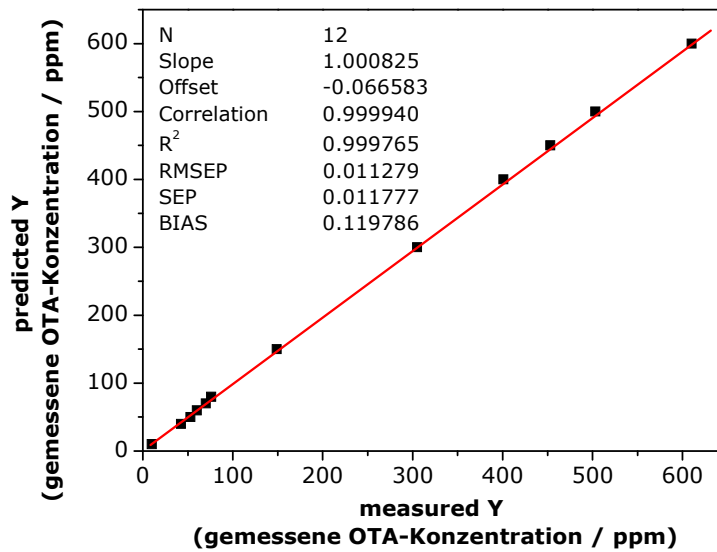


Abbildung 56: Validierung: Predicted versus measured OTA-Konzentration

Die Abbildung zeigt, dass alle Werte für die berechneten OTA-Konzentrationen mit denen der gemessenen Konzentrationen gut übereinstimmen. Der Schätzfehler der Vorhersage (RMSEP) liegt bei 0.11 ppm. Es wird somit eine gute Vorhersage von OTA in Mehl ermöglicht.

4.6.2 Nicht-fluoreszierende Mykotoxine – am Beispiel von Deoxynivalenol

Bei Deoxynivalenol handelt es sich um ein nicht-fluoreszenzierendes Mykotoxin (vgl. 4.1.1), welches in Kombination mit Zearalenon (ZEA) auftreten kann. Beide werden im Gegensatz zu OTA von Feldpilzen gebildet und gehören zu den häufigsten Mykotoxinen unter den gemäßigten klimatischen Verhältnissen in Deutschland.

Zur Bestimmung von DON wurden folgende kontaminierte Weizenproben des Erntejahres 2006 (Herkunft: ZALF), welche zwischendurch getrocknet worden sind, herangezogen. Für die Reflexionsmessungen wurden die Proben nach Abwesenheit von ZEA ausgewählt (HPLC-Ergebnisse unter der Nachweisgrenze - NWG), da ZEA selbst fluoreszierend ist und die Ergebnisse verfälschen könnte. In Tabelle 18 sind die mittels HPLC ermittelten Mykotoxinkonzentrationen aufgelistet. Sie repräsentieren Proben, die deutlich über (1770 ppb / 1885 ppb) und unterhalb (640 ppb sowie < NWG), aber auch in der Nähe (710 ppb / 740 ppb) der in Deutschland erlaubten Höchstmenge (> 750 ppb in Getreidemehl) liegen.

Tabelle 18: Mykotoxinkonzentrationen der untersuchten Weizenproben

| Probe | ZEA-Gehalt | DON-Gehalt |
|--------------|-------------------|-------------------|
| | µg / kg | µg / kg |
| 1 | < NWG | 1885 |
| 2 | < NWG | 1770 |
| 3 | < NWG | 740 |
| 4 | < NWG | 710 |
| 5 | < NWG | 640 |
| 6 | < NWG | < NWG |

Für die Auswertung wurde der Wellenlängenbereich der Absorption des DON (200 nm < λ_{abs} < 400 nm) einbezogen. Eine Betrachtung der Hauptkomponentenanalyse in Abbildung 57 zeigt, dass auch hier kein Zusammenhang zwischen der Konzentration des Mykotoxins DON und der Position in der PCA zu erkennen ist. Das Ergebnis kommt trotz Einbeziehung des gesamten Messbereiches zustande, unter Berücksichtigung der Zusammensetzung des Mehles und des Feuchtegehaltes.

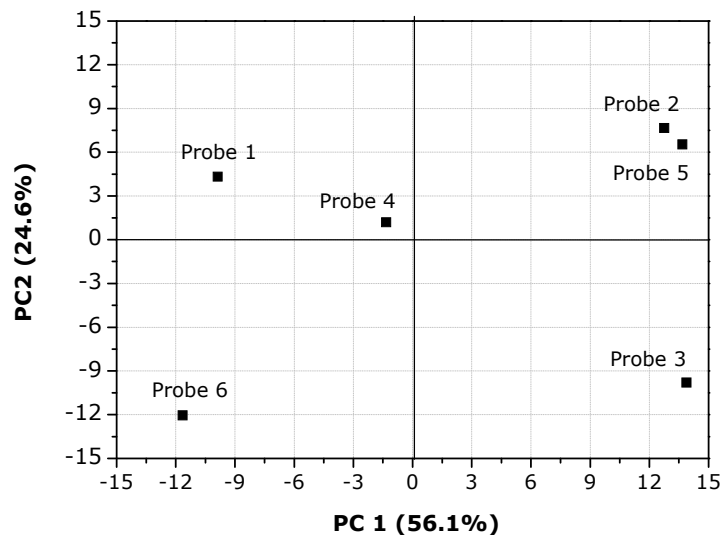


Abbildung 57: Score/Score Plot der Reflexionsspektren (PC1 vs PC2) von natürlich mit DON kontaminierten Weizenkörnern

Dasselbe Ergebnis ergab sich bei der Untersuchung der gemahlene Getreidekörner mittels Reflektionsspektroskopie. Es gestaltet sich auch der Vergleich mit Referenzuntersuchungen (z. B. HPLC-Ergebnisse) als schwierig, da die Probennahme vollkommen unterschiedlich ist. Aus einer 100 kg großen Teilprobe wurden Teilmengen für die Extraktion und für die Spektroskopie genommen. Außerdem wurden für die HPLC-Untersuchungen 100 g Materialproben extrahiert und die Mykotoxingehalte bestimmt. Bei den spektroskopischen Methoden sind nur geringe Probenmengen erforderlich (ca. 2 g für die Untersuchung mittels Reflexionspektroskopie), was zu Verringerung der Nachweis eines Befalls von Korn mit Toxin führt. Wenn die gesamte Probenmenge des Extraktionsmaterials vermessen und anschließend der Gehalt an Mykotoxinen in Lösung mittels klassischer Fluoreszenzspektroskopie bestimmt wird, ergibt sich eine Übereinstimmung von 93%.

4.7 Kombination der optischen Methoden zum Nachweis von Schimmelpilzen und deren Mykotoxine in Realproben

Aus den durchgeführten Messungen an Laborproben und den daraus resultierenden Ergebnissen kann ein Schema für die Untersuchung von Realproben, d. h. Feld- und Lagerproben, entwickelt werden (Abbildung 58).

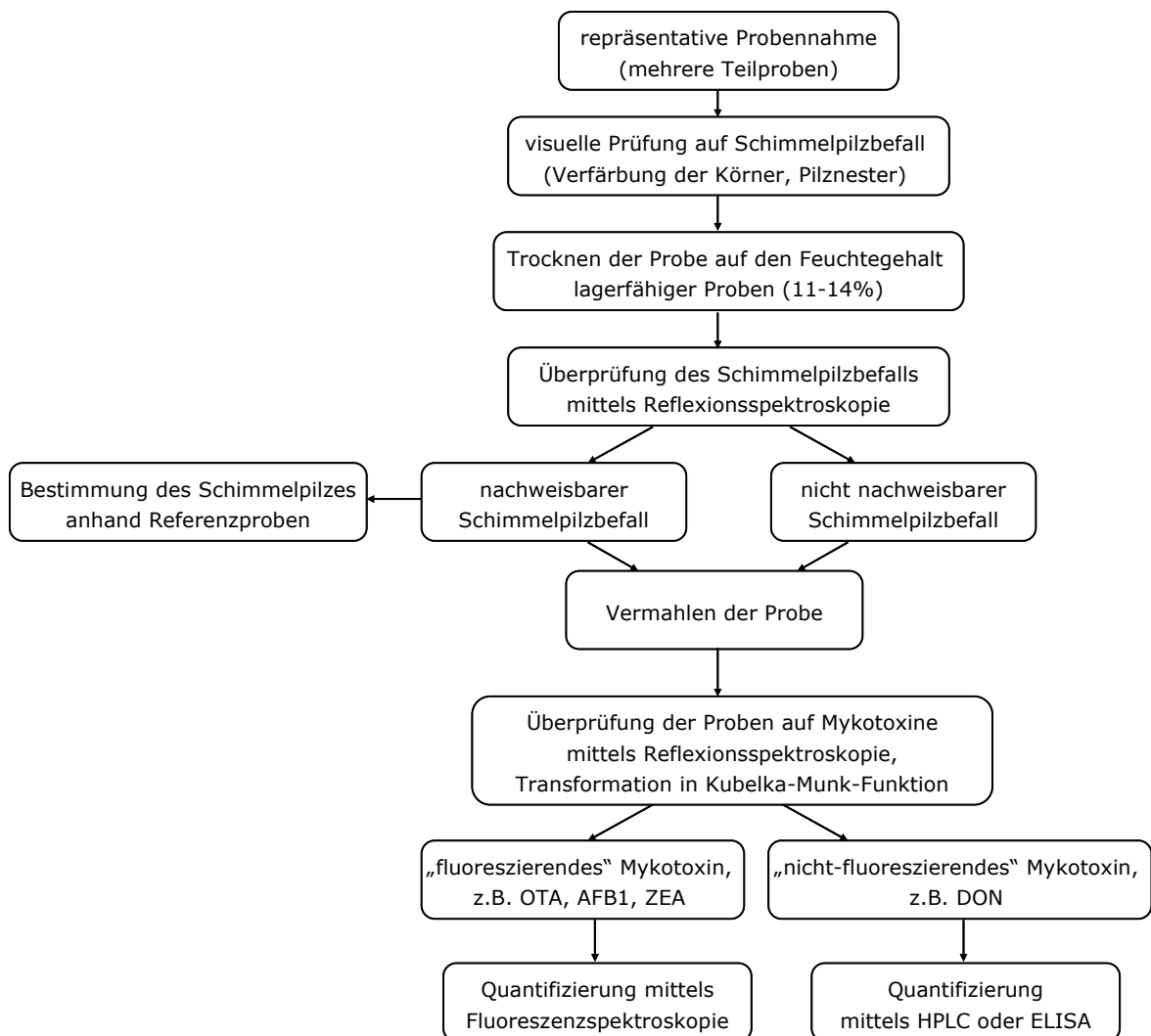


Abbildung 58: Ablaufdiagramm zur Untersuchung von Getreideproben auf Schimmelpilze und Mykotoxine

Die ordnungsgemäße Probennahme an sich ist der wichtigste Schritt. Als Probe benötigt man einen repräsentativen Querschnitt des Erntegutes vom Feld bzw. aus dem Silo. Die Proben werden auf mehrere Teilproben aufgeteilt und einer visuellen Prüfung unterzogen. Nachdem die Körner zur besseren Vergleichbarkeit auf einen Feuchtegehalt von 11% bis 14% getrocknet werden, werden sie auf Schimmelpilzbefall auf der Oberfläche des Kornes

untersucht. Wird Schimmelpilzbefall belegt, wird unter Verwendung der Spektrendatenbank der Laborproben geprüft, um welche Pilzgattung es sich handelt. Anschließend erfolgt eine Prüfung auf mögliche Mykotoxine. Dafür werden einerseits die Reflexionsspektren mittels *Kubelka-Munk*-Funktion transformiert und das Absorptionsspektrum der Probe erhalten. Durch den Vergleich mit Spektren der Mykotoxine in Lösung andererseits wird ermittelt, ob sich "fluoreszierende" (z.B. OTA, AFB₁, ZEA) oder "nicht-fluoreszierende" (z.B. DON) Mykotoxine gebildet haben. Die fluoreszierenden Toxine werden mittels Fluoreszenzspektroskopie und vorhandener Kalibration quantifiziert. Die Quantifizierung der "nicht-fluoreszierenden" Mykotoxine erfolgt mittels HPLC oder ELISA.

Das Fließschema und die Ergebnisse der Voruntersuchungen wurden auf 7 Proben aus dem Vorerntemonitoring des Landes Brandenburgs (Herkunft: IGV) aus dem Jahr 2009 angewandt. Das im Jahr 2007 in Brandenburg eingeführte Mykotoxin-Frühwarnsystem für Getreide dient der frühzeitigen Abschätzung der Mykotoxinbelastung des Erntegutes. Für das Monitoring werden von Weizen-Schlägen vor der Ernte Ährenproben geschnitten und untersucht. Als Leittoxin wird Deoxynivalenol gewählt, weil dieses Toxin am häufigsten und in z. T. hohen Konzentrationen in Getreide vorkommt. Die Höhe des DON-Gehaltes in den Körnern dient als Indikator für die mögliche Belastung des Erntegutes. Die Mehrzahl der untersuchten Proben bestand aus sogenannten Risikoschlägen, welche bereits für *Fusarium* anfällige Sorten sind. Wenn in den Proben keine erhöhten Mykotoxingehalte auftreten, ist davon auszugehen, dass Getreide von Feldern mit geringerem Risiko ebenfalls keine erhöhten Werte aufweisen. Im umgekehrten Fall gibt die Feststellung von hohen DON-Gehalten in den Proben einen Hinweis auf eine allgemein zu erwartende höhere Belastung.

Die Probennahme erfolgt zehn Tage vor dem geplanten Erntetermin. Die Ähren werden getrocknet, die Getreidekörner aus den Spelzen gelöst, vermahlen und ihr DON-Gehalt ermittelt. Die Proben werden parallel mittels HPLC bzw. ELISA untersucht. Die Gehalte an Mykotoxin beziehen sich jeweils auf 14% Kornfeuchte.

Im Jahr 2009 waren die Witterung und damit die Infektionsbedingungen während der Getreideblüte regional sehr unterschiedlich. Diese Unterschiede ließen sich aus den Untersuchungsergebnissen der Vorernteproben ablesen [59]. Im Weizen wurden DON-Gehalte zwischen 50 und 2160 µg/kg gemessen (HPLC-Ergebnisse, ATB). 6% der Proben wiesen Gehalte oberhalb des Grenzwertes von 1250 µg/kg auf. Der Mittelwert der 47 Proben lag bei 426 µg/kg.

Exemplarisch sind in Tabelle 19 sieben Proben aufgezählt, die für die Bestimmung ausgewählt wurden. Drei dieser Proben überschritten die in Deutschland zulässige Höchstmenge (1562 bis 2297 $\mu\text{g}/\text{kg}$), ein Wert lag gering darunter (1081 $\mu\text{g}/\text{kg}$) und die Werte der restlichen drei Proben war niedrig (<50 bis 638 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Die DON-Gehalte sind mittels HPLC bestimmt worden.

Tabelle 19: DON-Gehalte der untersuchten Weizenproben aus dem Vorerntemonitoring 2009

| Probe | DON-Gehalt / $\mu\text{g}/\text{kg}$ |
|--------------|--|
| 2W | 1081 |
| 3W | 449 |
| 4W | <50 |
| 5W | 2297 |
| 11W | 1562 |
| 12W | 1368 |
| 13W | 638 |

Die Proben wurden mittels Reflexionsspektroskopie im Wellenlängenbereich der Absorption des DON ($200 \text{ nm} < \lambda < 400 \text{ nm}$) vermessen. Es kann keine Quantifizierung der DON-Gehalte mittels Reflexion erfolgen, aber die HPLC-Ergebnisse können mit den Daten korreliert werden. Die Betrachtung der Hauptkomponentenanalyse in Abbildung 57 zeigt, dass sich hier der Zusammenhang zwischen der Konzentration des Mykotoxins DON und den Ergebnissen der HPLC widerspiegeln.

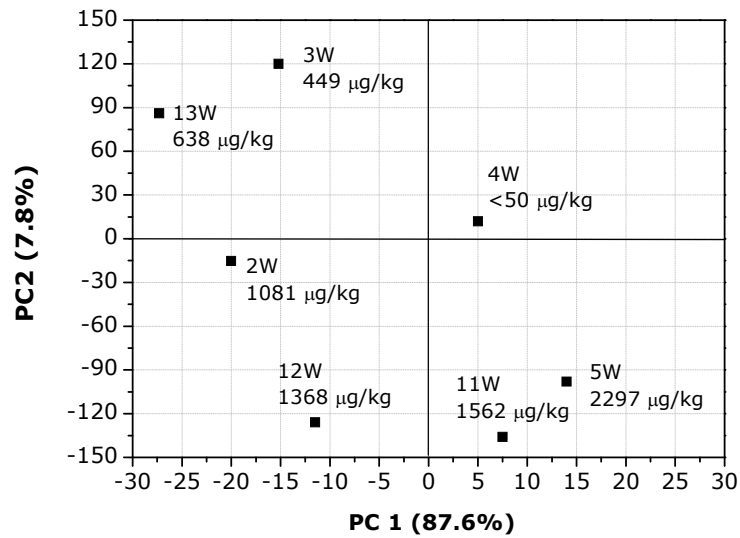


Abbildung 59: Score/Score Plot der Reflexionsspektren (PC1 vs PC2) von natürlich mit DON kontaminierten Weizenkörnern aus dem Vorerntemonitoring 2009

Die HPLC- und Reflexionsergebnisse lassen sich sehr gut korrelieren. Es bilden sich vier Gruppen heraus, die eine Aufteilung nach Gehalten ermöglicht. Dabei werden die höchsten Gehalte in einer Gruppe gefunden (Proben 5W und 12W), die nächst niedrigeren (Proben 2W und 12W) in der nächsten, usw..

Die Kombination der Fluoreszenzdaten auf Vorhandensein von Ochratoxin A und Zearalenon, welches in Kombination mit DON vorkommt, und der Reflexionsdaten brachte in diesem Fall keinerlei Ergebnisse, da die OTA- und ZEA-Gehalte bei der Fluoreszenzspektroskopie unter den Nachweisgrenze von 2 ppm lagen.

5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

In dieser Arbeit wird das Potenzial von ausgewählten optisch-basierten spektroskopischen Methoden für die in-situ bzw. in-line Detektion von Schimmelpilzen sowie Mykotoxinen in Getreide(produkten) untersucht. Es werden Absorptions- und Reflexionsmethoden einerseits und Fluoreszenztechniken andererseits eingesetzt. Die spektroskopischen Methoden werden dabei auf Proben unterschiedlicher Komplexität angewandt - beginnend mit der Untersuchung der photophysikalischen Eigenschaften der reinen Mykotoxine in Lösung über künstlich mit verschiedenen Mykotoxinen kontaminierten Getreideproben bis hin zu mit Pilzen befallenem Getreide und hochveredelte Lebensmittel (Wein und Bier) als Proben höchster Komplexität.

Mykotoxine

Zunächst werden grundlegende photophysikalische Parameter der wichtigsten Vertreter der Mykotoxine (Aflatoxin B₁, Ochratoxin A, Fumonisin B₁, Patulin, Zearalenon, Deoxynivalenol sowie T-2 und HT-2 Toxin) in verschiedenen Lösungsmitteln bestimmt. Alle untersuchten Mykotoxine absorbieren im Spektralbereich von $200 \text{ nm} < \lambda_{\text{abs}} < 400 \text{ nm}$ und einige zeigen eine intrinsische Lumineszenz bei Emissionswellenlängen $\lambda_{\text{em}} > 350 \text{ nm}$.

Im Nachfolgenden wird besonders auf die spezielle Photophysik der Mykotoxine Ochratoxin A (OTA) und Aflatoxin B₁ (AFB₁) eingegangen: Untersuchungen haben dabei gezeigt, dass die Lumineszenzeigenschaften der beiden Mykotoxine stark vom pH-Wert und vom gewählten Lösungsmittel abhängen.

OTA ist aufgrund seines strukturellen Aufbaus (heteroatomhaltige Gruppen, Keto-Enol-Tautomerie) besonders interessant, da die Hydroxylgruppe am Isocumarinring eine Protonentransferreaktion im elektronisch angeregten Zustand erfährt und sich dessen Acidität im elektronisch angeregten Zustand um 5 Größenordnungen ($\text{pK}_{\text{A}}^* = 1.5 \pm 0.4$) verstärkt. Das hat zur Folge, dass in Lösung (in Abhängigkeit vom Lösungsmittel und pH-Wert) zwei OTA-Spezies (Mono- und Dianion) zu beobachten sind. Die Unterschiede sind vor allem in den Absorptions- und Fluoreszenzspektren zu sehen. Das Absorptionsmaximum des Monoanions liegt bei $\lambda_{\text{abs}} = 333 \text{ nm}$, das des Dianions bei $\lambda_{\text{abs}} = 380 \text{ nm}$, während sich das Emissionsmaximum von $\lambda_{\text{em,max}} = 456 \text{ nm}$ hypsochrom auf $\lambda_{\text{em,max}} = 427 \text{ nm}$ verschiebt.

Bei AFB₁ in saurer, wässriger Lösung lässt die Gestalt des Absorptionsspektrums die Herausbildung einer Zweitstruktur vermuten. Das Absorptionsspektrum zeigt zusätzlich die Ausbildung einer Schulter bei $\lambda_{\text{abs}} = 240 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{abs}} = 340 \text{ nm}$. Eine mögliche zugrunde liegende Reaktion ist eine photochemisch induzierte Hydroxylierung unter Addition von Wasser an die Doppelbindung des Furanrings.

Aus den vorangegangenen Messungen zeigt sich, dass im Einzelfall durch die Wahl der Messbedingungen (besonders für den Fall von fluoreszenzbasierter Techniken) ein qualitativer bzw. quantitativer Nachweis der Mykotoxine möglich ist. Die Bildung von Einschlussverbindungen in wässrigen Lösungen durch die Addition von (substituierten und unsubstituierten) Cyclodextrinen führen zur Steigerung der Fluoreszenzintensität bei AFB₁ ($\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$) um das bis zu 35fache, um das Zweifache beim OTA-Monoanion ($\lambda_{\text{ex}} = 330 \text{ nm}$) sowie zur Verringerung beim OTA-Dianion ($\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$) aufgrund der räumlichen Anordnung des Einschlusses. Die fluoreszierenden Gruppen ragen aus der Einschlussverbindung heraus und werden dem Wasser ausgesetzt, was zur Fluoreszenzlöschung führt.

Zweiphotonenspektroskopie

Für spezielle Anwendungsfelder werden innovative spektroskopische Methoden getestet, speziell die durch Zweiphotonenanregung induzierte Fluoreszenz. Durch Zweiphotonenanregung werden u.a. Signalbeiträge, die von intrinsischen Komponenten der Matrix herrühren, wirkungsvoll unterdrückt. Zweiphotonenanregung wurde für die direkte Detektion von OTA und AFB₁ in alkoholischen Getränken, z.B. Wein und Bier, charakterisiert. Es wird gezeigt, dass Aflatoxin B₁ und Ochratoxin A separationsfrei direkt in Bier und Wein nachgewiesen und die Nachweisgrenze gegenüber der „regulären“ Fluoreszenz teils halbiert werden kann. Ebenso sind die gesamten Zweiphotonenanregungsspektren für Aflatoxin B₁ und Ochratoxin A im Wellenlängenbereich $700 \text{ nm} < \lambda_{\text{ex}} < 860 \text{ nm}$ in Abhängigkeit vom Lösungsmittel und pH-Wert bestimmt.

Sowohl die „reguläre“ als auch die durch Zweiphotonen-induzierte Fluoreszenz eignen sich zum nicht-invasiven und zerstörungsfreien Nachweis in flüssigen Lebensmitteln. Die in Deutschland gesetzlich geregelte Höchstmenge in Höhe von 2 ppb (= 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, laut Verordnung über Höchstmengen in Lebensmitteln) wird dabei nicht erreicht. Die auf Zweiphotonenanregung basierten Nachweisverfahren sind derzeit im Bereich der hochveredelten Produkte (z.B. Bier, Wein und Apfelsaft) denkbar. Es müssen jedoch zur Erniedrigung der Nachweisgrenzen leistungsfähigere und mobile Femtosekunden-Lasersysteme

zur Verfügung stehen, wodurch dann eine entsprechende Methode für die mobile, vor-Ort Analytik interessant wird.

Eine zerstörungsfreie Anwendung der Zweiphotonenspektroskopie ist bei Getreide aufgrund des apparativen Aufbaus und des energiereichen Fokus des Laserstrahls nicht möglich, so dass andere spektroskopische Methoden gefunden werden müssen, um Mykotoxine und Schimmelpilze auf Getreidekörnern nachzuweisen.

Nachweis von Schimmelpilzen und dessen Mykotoxine

Die Vielfältigkeit der Schimmelpilze, der Mykotoxine und des Probenmaterials im Gemisch führt zu aufwändig auswertbaren Fluoreszenz- und Reflektionsspektren. Da die Fluoreszenz- und Reflektionsspektroskopie beides Methoden zur Untersuchung von Kornoberflächen, und nicht des Inneren sind, wird ein Befall des Korns im Inneren nicht berücksichtigt und die Körner vor der Untersuchung auf Mykotoxine vermahlen.

Die Anwendung der Fluoreszenzspektroskopie zur Untersuchung von Getreide ist schwierig, da es eine große natürliche Variationsbreite der Körner hinsichtlich Größe, Form, Oberflächenbeschaffenheit und Färbung gibt. Darüber hinaus können noch in Abhängigkeit von den Witterungs- bzw. Lagerungsbedingungen zentrale Größen wie der Feuchtigkeitsgehalt stark variieren. Anhand der Wahl der Anregungs- ($\lambda_{\text{ex}} = 275 \text{ nm}$) und der Emissionswellenlänge ($\lambda_{\text{em,max}} = 320 \text{ nm}$) des Getreideinhaltsstoffs Tryptophans als zentralen Selektionsparameter lassen sich "trockene" Weizenkörner (Feuchtegehalt 11%) von „feuchten“ Weizenkörnern (Feuchtegehalt bis 28%) unterscheiden. Der Feuchtegehalt spiegelt die Wasseraktivität des Korns wieder und gibt damit Hinweise auf die Bildung von Schimmelpilzen und Mykotoxinen (Verbrauch von Wasser während Sporenkeimung und Anfangswachstum und anschließende Erhöhung durch Einsetzen des sekundären Stoffwechsels). In einem 14tägigen Dauerversuch wurde dieser Sachverhalt mittels Bestimmung der spektroskopischen Eigenschaften der Körner bei der Bildung der Schimmelpilze und möglicher Toxine untersucht. Diese Daten werden als totales Fluoreszenzspektrum oder EEM-Spektrum (Excitation-Emission-Matrix) dargestellt.

Es hat sich gezeigt, dass bei Fluoreszenzmessungen die Interferenzen durch die komplexen Matrixes erheblich sind, so dass ein alleiniger Nachweis von Mykotoxinen bzw. Pilzen durch fluoreszenzbasierte Techniken eingeschränkt ist.

Künstlich mit Schimmelpilzen inokulierte Weizenproben können mittels Reflexionsspektroskopie bestimmt werden. Die Kombination mit

chemometrischen Auswerteverfahren (z.B. Hauptkomponentenanalyse, multiple lineare Regression und Projektion auf latente Strukturen) erlaubt eine Unterscheidung z.B. von befallenen und nicht-befallenen Körnern, jedoch nur einzelner Schimmelpilze, aber keiner Pilzgemische wie bei Realproben auf dem Feld gefunden werden können. Dabei sind die „Veränderungen“ erst detektierbar sobald der Befall für den Menschen sichtbar wird.

Die Erweiterung des Wellenlängenbereichs bis in den UV-Vis-Bereich ermöglicht zusätzlich zur Bestimmung des Schimmelpilzbefalls die Toxinbildung. Durch die Umwandlung der Reflexionsspektren in Absorptionsspektren mittels Kubelka-Munk-Funktion können fluoreszierende und nicht-fluoreszierende Mykotoxine bestimmt werden. Das bedeutet, dass die NIR-Spektroskopie als zweite Referenzmethode neben der Fluoreszenzspektroskopie genutzt werden kann, um den Nachweis von Schimmelpilzen und deren Mykotoxine zu führen.

Ausblick

Der Einsatz spektroskopischer Methoden in der Lebensmittelkontrolle und -überwachung, welche zerstörungsfrei und mit minimaler Probenvorbereitung verbunden sind, wird zukünftig an relevanten Prozessabschnitten entlang der Produktionskette von Getreide zunehmen. Die Kombination von Absorption-, Fluoreszenz- und Reflexionsspektroskopie hat gezeigt, dass diese leistungsfähigen und sensitiven Verfahren zur Detektion von Mykotoxinen in Lösung und Schimmelpilzen auf Feststoffoberflächen geeignet sind. So werden die gewonnenen Ergebnisse aus dem Labor auf Realproben übertragen. Die zusätzliche Verwendung der Ramanspektroskopie scheint geeignet, um die Probleme mit dem Feuchtegehalt beim Korn zu umgehen, da die Raman-Schwingungen des Wassers inaktiv sind und damit nicht in den Spektren sichtbar werden.

In der Zukunft sollten Sensoren bzw. miniaturisierte und mobile Geräte entwickelt werden, die an vielen Stellen der Produktionskette die Lebensmittel auf Schimmelpilze und deren Toxine kontrollieren können. Im Weiteren werden mittels dieser Ergebnisse die Voraussetzungen für die Entwicklung eines Arrays verschiedener Sensortypen geschaffen, welche für das gezielte und dokumentierte Ausschleusen belasteter Partien geeignet sein sollen.

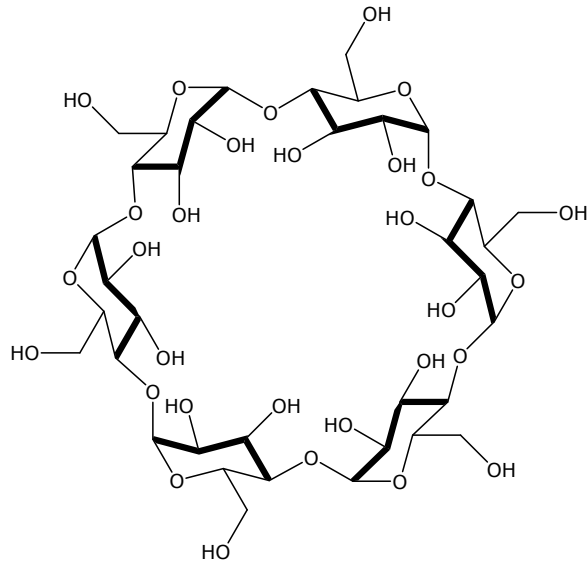
ANHANG

A 1: Höchstgehalte für bestimmte Mykotoxine in Lebensmitteln in µg/kg (Auszug)

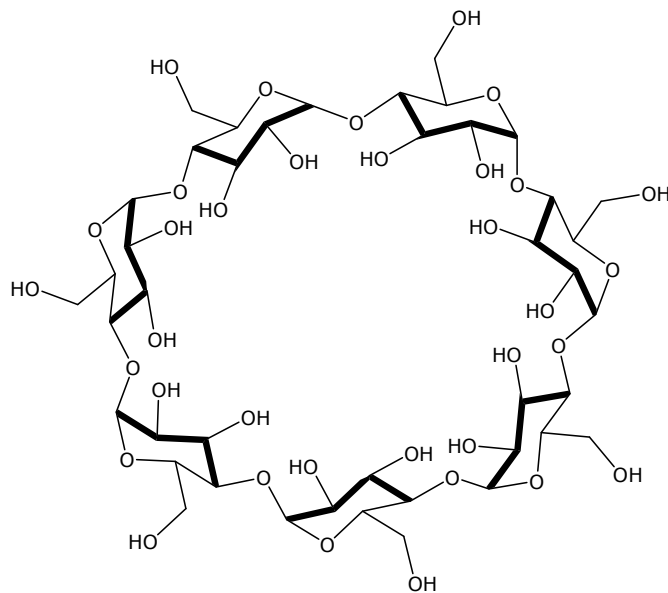
| Erzeugnis | Höchstgehalt in µg/kg |
|---|--------------------------|
| Aflatoxin B₁ | |
| Getreide und dessen Verarbeitungserzeugnisse, mit Ausnahme von unverarbeitetem Mais | 2 |
| Gewürzsorten: Chilipulver, Paprikapulver, Cayennepfeffer, Muskatnuss, Ingwer | 5 |
| Ochratoxin A | |
| Rohe Getreidekörner (einschließlich roher Reis) | 5 |
| Getreideerzeugnisse | 3 |
| Geröstete Kaffeebohnen sowie gemahlener gerösteter Kaffee außer löslicher Kaffee | 5 |
| Löslicher Kaffee (Instant-Kaffee) | 10 |
| Wein (rot, rosé und weiß) sowie Getränke auf Wein- und/oder Traubenmostbasis | 2 |
| Patulin | |
| Fruchtsäfte | 50 |
| Apfelerzeugnisse einschließlich Apfelkompott und Apfelpüree | 25 |
| Deoxynivalenol | |
| Unverarbeitetes Getreide (ausgenommen Hartweizen, Hafer und Mais) | 1250 |
| Getreidemehl | 750 |
| Brot, feine Backwaren, Kekse, Getreidesnacks und Frühstückscerealien | 500 |
| Teigwaren | 750 |
| Zearalenon | |
| Unverarbeitetes Getreide (ausgenommen Mais) | 100 |
| Getreidemehle (ausgenommen Maismehl) | 75 |
| Brot, feine Backwaren, Kekse, Getreidesnacks | 50 |
| Getreidesnacks und Frühstückscerealien | 50 |
| Summe der Fumonisine B₁ und B₂ | |
| Unverarbeiteter Mais | 2000 |
| Lebensmittel aus Mais zum unmittelbaren Verzehr | 200-400 |

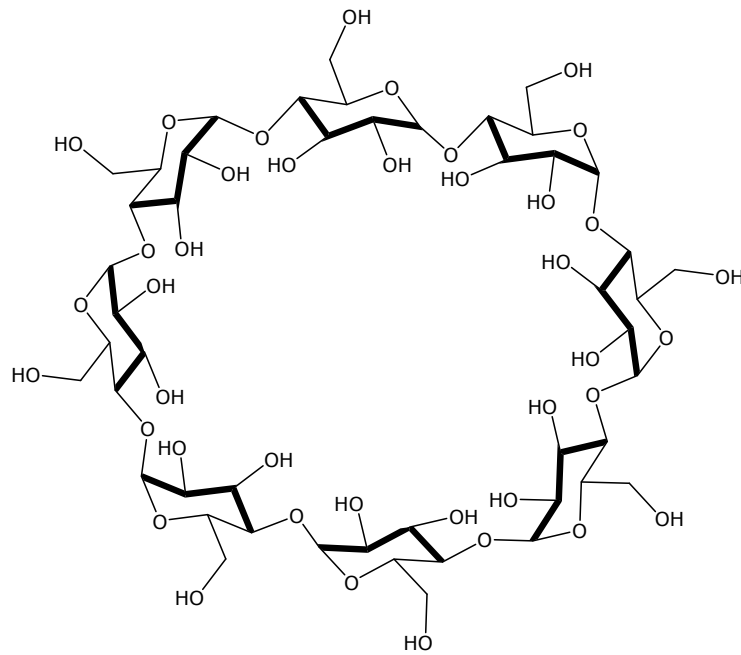
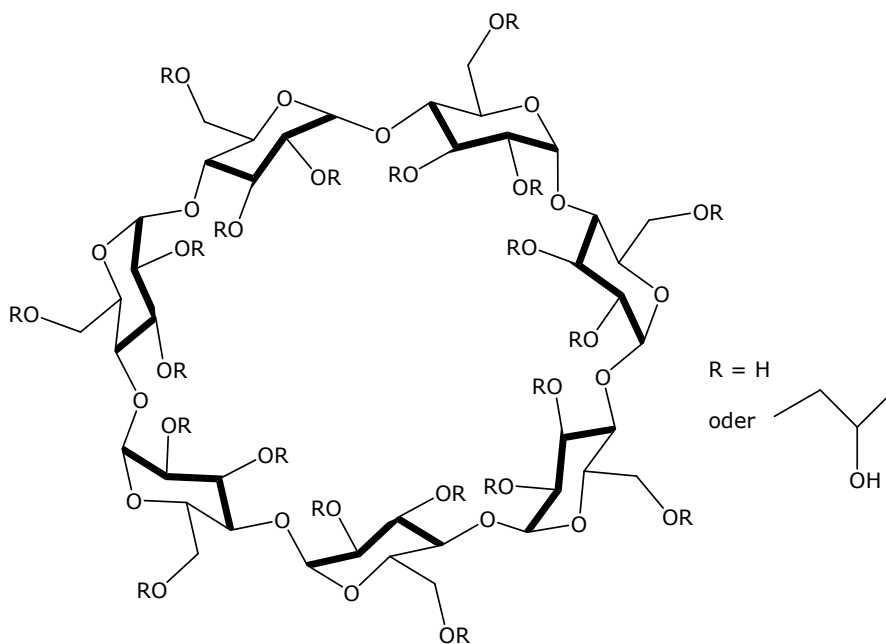
A 2: Chemische Strukturen der ausgewählten Cyclodextrine

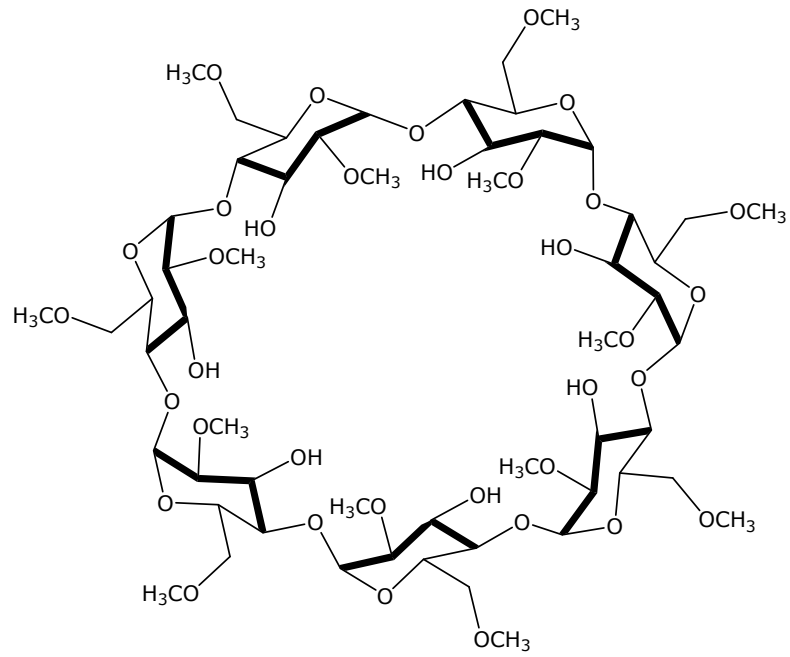
α -Cyclodextrin



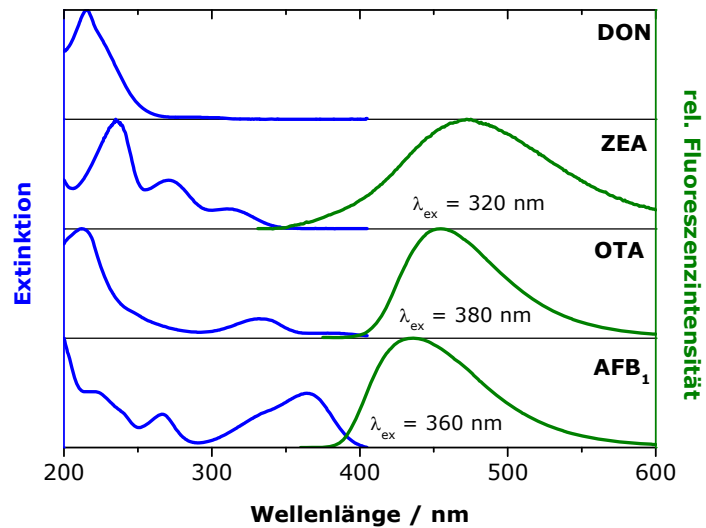
β -Cyclodextrin



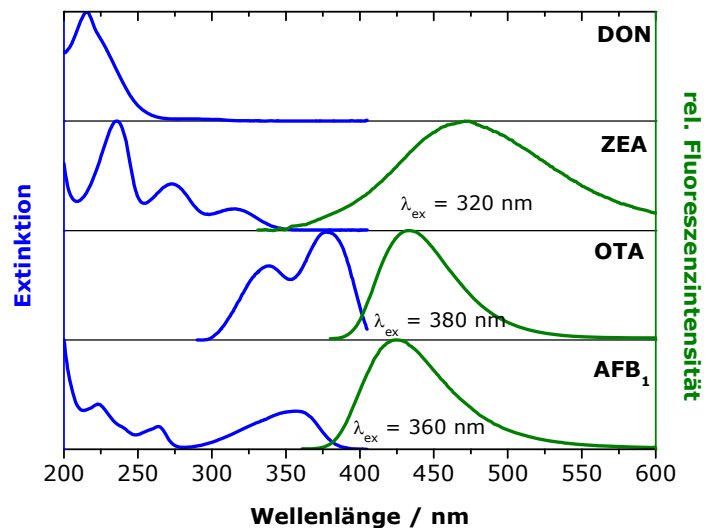
γ -Cyclodextrin**2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin**

Heptakis(2,6-di-O-methyl)- β -cyclodextrin

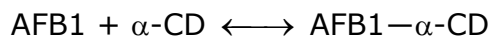
A 3: Absorptions- und Emissionsspektren der untersuchten Mykotoxine in wässriger Lösung



A 4: Absorptions- und Emissionsspektren der untersuchten Mykotoxine in Acetonitril



A5: Reaktion zur Bildung des Komplexes AFB1- α -CD und Berechnung der Konzentration des Komplexes anhand des Massenwirkungsgesetzes



$$K = \frac{[\text{AFB1-}\alpha\text{-CD}]}{[\text{AFB1}] \cdot [\alpha\text{-CD}]}$$

$$K = \frac{[\text{AFB1-}\alpha\text{-CD}]}{([\text{AFB1}]_0 - [\text{AFB1-}\alpha\text{-CD}]) \cdot ([\alpha\text{-CD}]_0 - [\text{AFB1-}\alpha\text{-CD}])}$$

Umstellen der Gleichung und Null setzen:

$$0 = [\text{AFB1-}\alpha\text{-CD}]^2 - [\text{AFB1-}\alpha\text{-CD}] \cdot \left([\text{AFB1}]_0 + [\alpha\text{-CD}]_0 + \frac{1}{K} \right) + [\text{AFB1}]_0 \cdot [\alpha\text{-CD}]_0$$

Lösen der quadratischen Funktion:

$$[\text{AFB1-}\alpha\text{-CD}] = \frac{[\text{AFB1}]_0 + [\alpha\text{-CD}]_0 + \frac{1}{K}}{2} \pm \sqrt{\left(\frac{[\text{AFB1}]_0 + [\alpha\text{-CD}]_0 + \frac{1}{K}}{2} \right)^2 - [\text{AFB1}]_0 \cdot [\alpha\text{-CD}]_0}$$

A6: Berechnete Zweiphotonen-Absorptionsquerschnitte σ_2 von AFB1 und OTA in verschiedenen Lösungsmitteln und pH-Werten (leere Felder: Keine Messdaten vorhanden). Die Fehler wurden durch mehrmaliges Vorbereiten der Proben und wiederholtes Messen bestimmt.

| Wellenlänge / nm | Absorptionsquerschnitt σ_2 / GM | | | |
|---------------------|---|----------------|--|--------------|
| | AFB1 / H ₂ O/EtOH (pH = 4) | AFB1 / EtOH | OTA / H ₂ O/EtOH (pH = 8) | OTA / DMF |
| 700 | 17 ± 3 | | | |
| 705 | 19 ± 2 | | | |
| 715 | 20 ± 3 | | 12 ± 3 | |
| 720 | 22 ± 3 | 35 ± 4 | 13 ± 2.5 | 13 ± 2 |
| 725 | 21 ± 2.5 | 34.5 ± 3 | 14.5 ± 4 | 14.5 ± 1.5 |
| 730 | 21 ± 3 | 34 ± 4 | 15 ± 3 | |
| 740 | 17.5 ± 4 | 29 ± 3 | 15 ± 1.5 | 18 ± 2 |
| 745 | 15 ± 4 | | | |
| 750 | 13 ± 4.5 | 15.5 ± 3 | 15.5 ± 3 | 20 ± 1 |
| 755 | 11 ± 3 | | | |
| 760 | 9 ± 2 | 11 ± 4.5 | 15.5 ± 3 | 20 ± 0.5 |
| 765 | 8 ± 2 | | | |
| 770 | 6.5 ± 2 | 7 ± 2.5 | 13 ± 3.5 | 18 ± 2 |
| 775 | 5 ± 1.5 | | | |
| 780 | 3 ± 1 | 3 ± 1.5 | 12 ± 3.5 | 14 ± 2 |
| 790 | 1 ± 0.5 | | 10 ± 3 | 11.5 ± 5 |
| 795 | | | 8 ± 3 | |
| 800 | 0.5 ± 0.5 | 1 ± 0.5 | 6 ± 3.5 | 10 ± 3 |
| 810 | | | 4 ± 2 | |
| 820 | 0 | 0.5 ± 0.5 | 2 ± 3 | 5 ± 2.5 |
| 840 | 0 | 0 | 1 ± 1 | |

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- 1 Lichtmikroskopische Aufnahmen der Schimmelpilze (1000fache Vergrößerung) von *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* spp.
- 2 Wichtige Mykotoxine in Europa
- 3 Jablonski-Diagramm zur Veranschaulichung von Absorptions- und Emissionsvorgängen im Molekül
- 4 Jablonski-Diagramm für Ein-, Zwei- bzw. Dreiphotonenanregung
- 5 Beispielhaftes Fluoreszenzemissionspektrum nach Ein- ($\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$) bzw. Zweiphotonenanregung ($\lambda_{\text{ex}} = 760 \text{ nm}$)
- 6 Schematischer Vergleich von Einphotonen- mit Zweiphotonenanregung
- 7 Vergleich der Fluoreszenzanregungsspektren von Rhodamin B und Fluorescein für Ein- und Zweiphotonenabsorption
- 8 Diffuse und reguläre Reflexion
- 9 Schematischer Aufbau der Integrationskugel
- 10 Allgemeine Strukturformel der Glukoseeinheit
- 11 Schematische Abbildung der Komplexbildung
- 12 Matrizen der Hauptkomponentenanalyse
- 13 Schematische Darstellung der PLS und der beteiligten Matrizen
- 14 Variabilität des Roggens in Korngröße, Kornform und Kornfarbe
- 15 Klassische und Front-Face-Fluoreszenzspektroskopie
- 16 Absorptions- und Emissionsspektren der untersuchten Mykotoxine in ethanolischer Lösung
- 17 Strukturformel von Ochratoxin A
- 18 Keto-Enol-Tautomerie des OTA in Abhängigkeit vom Lösungsmittel
- 19 Fluoreszenzanregungsspektren von Ochratoxin A in Ethanol, DMF, Wasser und Wasser pH<4

-
- 20 Energiediagramm, welches die Anregung des Enols aus dem Grundzustand (S_0) in den ersten angeregten Zustand (S_1) darstellt, gefolgt von einem ES IPT zur angeregten Ketostruktur K^* mit anschließender Emission in den Grundzustand K und der Rückreaktion zur stabileren Enolform E
 - 21 Deprotonierung von Ochratoxin A
 - 22 Fluoreszenzemissionsspektren von Ochratoxin A in Wasser bei unterschiedlichen pH-Werten
 - 23 Strukturformel von Aflatoxin B_1
 - 24 Absorptionsspektren des AFB1 in den Lösungsmitteln: Acetonitril, n-Hexan, Ethanol und Wasser
 - 25 Hydroxylierung von Aflatoxin B_1
 - 26 Absorptionsspektren des AFB1 in Wasser bei den pH-Werten: 4, 7.8 und 11
 - 27 Einschlussverbindungen von a) Aflatoxin B_1 und β -CD und b) OTA und β -CD
 - 28 Fluoreszenzspektren von AFB1 in Ab- und Anwesenheit von α -Cyclodextrin
 - 29 Fluoreszenzspektren von AFB1 in Wasser in Kombination mit verschiedenen Cyclodextrinen
 - 30 Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von AFB1 zu Cyclodextrin bei $\lambda_{em} = 440$ nm
 - 31 Modifizierte Stern-Volmer-Gerade für den Löscheffekt von Wasser auf die OTA-Fluoreszenz
 - 32 Doppellogarithmische Auftragung der Flächenintegrale der Emissionsspektren und der Laserleistung von Fluorescein, Aflatoxin B_1 in Ethanol und OTA in Wasser (pH = 11) nach einer Anregung von $\lambda_{ex} = 760$ nm
 - 33 Vergleich der Absorptions- und Zweiphotonenanregungsspektren
 - 34 Fluoreszenzanregungs- und Emissionsspektren von Aflatoxin B_1 in Wasser und Modell-Lösung
 - 35 Absorption und Emissionsspektren von Aflatoxin B_1 in Modell-Lösung und Wein
 - 36 Fluoreszenzemissionsspektrum nach Zweiphotonenanregung ($\lambda_{ex} = 720$ nm) von Bier, Weißwein und Roséwein

-
- 37 Doppellogarithmische Auftragung der Flächenintegrale der Emissionsspektren gegen die Laserleistung von Fluorescein und Aflatoxin B₁ in verschiedenen alkoholischen Getränken sowie der Modell-Lösung, Anregung: $\lambda_{\text{ex}} = 720 \text{ nm}$
- 38 Fluoreszenzemissionsspektren von Aflatoxin B₁ in Weißwein nach Einphotonen- und Zweiphotonenanregung
- 39 Lineare Auftragung der Summe der Fluoreszenzintensitäten gegen die Konzentration von AFB₁ in Weißwein nach Ein- und Zweiphotonenanregung
- 40 Fluoreszenzemissionsspektren nach Zweiphotonenanregung ($\lambda_{\text{ex}} = 720 \text{ nm}$)
- 41 Fluoreszenzanregungsspektrum und Emissionsspektren von Weizenmehl
- 42 Aufbau eines Getreidekorns
- 43 Emissionsspektren der Getreidebestandteile
- 44 Fluoreszenzemissionsspektren befeuchteter Weizenkörner
- 45 Anregungs-Emissions-Matrix der Fluoreszenz von unbelasteten sowie mit verschiedenen Schimmelpilzen belasteten Weizenkörnern
- 46 Reflexionsspektrum einer befeuchteten, sterilen Weizenprobe mit 25 % Feuchte; die zweite Ableitung des Reflexionsspektrums
- 47 Reflexionsspektren von unkontaminierten Weizen mit variablem Feuchtegehalt: 11%, 14%, 18%, 21% und 25% und die zweite Ableitung o.g. Spektren
- 48 Reflexionsspektren von sterilen, unkontaminierten Weizenkörnern und künstlich mit Schimmelpilzen inokulierten Weizenproben gleicher Feuchte (25%)
- 49 Score/Score Plot der Reflexionsspektren (PC1 vs PC2) von unbefallenen und künstlich inokulierten Weizenkörnern
- 50 Verschiedene Pilzisolat auf Agar angezogen
- 51 Reflexionsspektren von künstlich mit Schimmelpilzen inokulierten Weizenkörnern gleicher Feuchte (25 %): *Penicillium verrucosum* und *Aspergillus niger* sowie einem Gemisch aus beiden Pilzen
- 52 Reflexionsspektren von mit OTA gespicktem Weizenmehl
- 53 Auftragung von F(R) bei $\lambda_{\text{em}} = 333 \text{ nm}$ gegen die OTA-Zugabe
-

- 54 Front-Face-Emissionsspektren von gemahlene Weizenkörnern nach der Zugabe von unterschiedlichen Mengen an in Ethanol gelöstem OTA, $\lambda_{\text{ex}} = 330 \text{ nm}$
- 55 Lineare Auftragung der Fluoreszenzintensität am Maximum ($\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$) gegen die OTA-Konzentration
- 56 Validierung: Predicted versus measured OTA-Konzentration
- 57 Score/Score Plot der Reflexionsspektren (PC1 vs PC2) von natürlich mit DON kontaminierten Weizenkörnern
- 58 Ablaufdiagramm zur Untersuchung von Getreideproben auf Schimmelpilze und Mykotoxine
- 59 Score/Score Plot der Reflexionsspektren (PC1 vs PC2) von natürlich mit DON kontaminierten Weizenkörnern aus dem Vorerntemonitoring 2009

TABELLENVERZEICHNIS

- 1 Toxinbildende Schimmelpilze und ihre Mykotoxine
- 2 Verwendete Mykotoxine
- 3 Verwendete Mykotoxinlösungen
- 4 Verwendete Mykotoxinlösungen
- 5 Verwendete Cyclodextrine
- 6 Inhaltsstoffe der verwendeten Getreidearten
- 7 Schimmelpilzstämme für die künstliche Inokulation von Weizen
- 8 Wasseraktivität für Wachstum und Toxinbildung
- 9 Absorptionsmaxima und Extinktionskoeffizienten der Mykotoxine in verschiedenen Lösungsmitteln
- 10 Emissionsmaxima von OTA in Abhängigkeit des Lösungsmittel und der Anregungswellenlänge
- 11 Steigerung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Konzentration von α -CD
- 12 Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten nach Ein- bzw. Zweiphotonenanregung bei AFB1 (pH = 8)
- 13 Ermittelte Anstiege und Fehler der Regression
- 14 Absorptionsmaxima, Extinktionskoeffizient, Fluoreszenz-emissionmaxima und Quanteneffizienz des Aflatoxin B₁ in verschiedenen Lösungsmitteln
- 15 Zweiphotonen-Absorptionsquerschnitt σ_2 von Aflatoxin B₁ in verschiedenen Lösungen, $\lambda_{ex} = 720$ nm
- 16 Nachweisgrenze von Aflatoxin B₁ in der Modell-Lösung und den alkoholischen Getränken - Vergleich von Einphotonen- ($\lambda_{ex} = 360$ nm) und Zweiphotonenspektroskopie ($\lambda_{ex} = 720$ nm)
- 17 Zuordnung bestimmter Banden im NIR in Abhängigkeit von der Struktur
- 18 Mykotoxinkonzentrationen der untersuchten Weizenproben
- 19 DON-Gehalte der untersuchten Weizenproben aus dem Vorerntemonitoring 2009

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] www.spiegel.de/thema/lebensmittelskandale (letzter Zugriff: 08.08.2010)
- [2] DOHLMAN, E.; *Mycotoxin Hazards and Regulations—Impacts on Food and Animal Feed Crop Trade*; in: International Trade and Food Safety: Economic Theory and Case Studies, J. BUZBY (Hrsg.), Agricultural Economic Report No. 828, U.S. Department of Agriculture, Economic Research Service, November **2003**, 97-108
- [3] ROTH, F.; FRANK, H.; KORMANN, K.; *Giftpilze. Pilzgifte. Schimmelpilze. Mykotoxine*; Nikol Verlagsgesellschaft, Hamburg **2001**
- [4] REISS, J.; *Schimmelpilze*; 2. Auflage, Springer, Berlin 1997
- [5] BARTELS, G.; RODEMANN, B.; Strategien zur Vermeidung von Mykotoxinen im Getreide; *Gesunde Pflanzen* **2003**, 55(5), 125-135
- [6] www.bayercropscience.com (letzter Zugriff: 10.07.2010)
- [7] Berliner Zeitung vom 13. August 2010, Seite 10
- [8] Antwort der Bundesregierung auf die Kleine Anfrage der Abgeordneten vom 14.04.2009 - Drucksache 16/12625
- [9] www.fao.org/docrep/011/ai482e/ai482e02.htm (letzter Zugriff: 16.08.2010)
- [10] www.fao.org (letzter Zugriff: 20.08.2010)
- [11] REISS, J.; *Mykotoxine in Lebensmitteln*; Gustav Fischer Verlag, Stuttgart **1981**
- [12] BHAT, R. ET AL.; Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns; *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2010**, 9, 57-81
- [13] MÜLLER, A.; LÖFFLER, W.; *Mykologie. Grundriß für Naturwissenschaftler und Mediziner*; Thieme, Stuttgart **1992**
- [14] BRÄSE, S. ET AL.; Chemistry and Biology of Mycotoxins and Related Fungal Metabolites; *Chemical Reviews* **2009**, 109, 3903-3990
- [15] MARASAS, W.F.O. ET AL.; *Mycotoxins: A global problem*; in: Leslie, J.F. (Hrsg.) Mycotoxins: detection methods, management, public health and agricultural trade; Cab International, UK **2008**, 29-40
- [16] BENNETT, J.W.; KLICH, M.; Mycotoxins; *Clinical Microbiology Reviews* **2003**, 16, 497-516
- [17] SHREEVE, B.J. ET AL.; The 'carry-over' of aflatoxin, ochratoxin and zearalenone from naturally contaminated feed to tissues, urine and milk of dairy cows; *Food and Cosmetic Toxicology* **1979**, 17(2), 151-152

-
- [18] KUIPER-GOODMAN, T.; Risk Assessment to Humans of Mycotoxins in Animal-Derived Food Products; *Veterinary and Human Toxicology* **1991**, 33(4), 325-333
- [19] www.mycotoxins.org (letzter Zugriff am 22.08.2010)
- [20] LINDNER, E.; *Toxikologie der Nahrungsmittel*; Georg Thieme Verlag, Stuttgart **1986**
- [21] FRANCK, B.; Mykotoxine aus Schimmelpilzen – Waffen ungebeter Tischgenossen von Mensch und Tier: Strukturen, Wirkungen, Biosynthese und Schutzmöglichkeiten; *Angewandte Chemie* **1984**, 96(7), 462-474
- [22] RICHARD, J.L.; Some major mycotoxins and their mycotoxicoses – an overview; *International Journal of Food Microbiology* **2007**, 119(1-2), 3-10
- [23] HELBLING, A.; Pilze als Allergene; *Allergologie* **2003**, 26, 482-489
- [24] MARAGOS, C.M.; Emerging Technologies for Mycotoxin Detection; *Journal of Toxicology* **2004**, 23(2&3), 317-344
- [25] HOF, H.; Medical relevance of mycotoxins; *Deutsche medizinische Wochenschrift* **2008**, 133(20), 1084-1088
- [26] www.mycored.eu (letzter Zugriff: 16.08.2010)
- [27] KRŠKA, R.; MOLINELLI, A.; Mycotoxin analysis: state-of-the-art and future trends; *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2007**, 387, 145-148
- [28] IDLER, C. ET AL.; Sensoren zur Erkennung und Vermeidung von Schimmelpilzen und Mykotoxinen in der Getreidekette; *Mühle + Mischfutter* **2010**, 147(12), 354-357
- [29] Schlussbericht zum Teilprojekt 1.2 des Verbundvorhaben "ProSenso.Net2": "Indikatoren und Sensortechnik zur Erkennung von Mykotoxinbildnern in der Getreideaufbereitung"
- [30] STEYN, P.S.; STANDER, M.A.; Mycotoxins as Causal Factors of Diseases in Humans; *Toxin Reviews* **1999**, 18(3-4), 229-243
- [31] MALLOY, C.D.; MARR, J.S.; Mycotoxins and Public Health: A Review; *Journal of Public Health Management & Practice* **1997**, 3(3), 61-69
- [32] STRELLER, S.; ROTH, K.; Der gehörnte Roggen. Ein chemischer Blick auf den Isenheimer Altar; *Chemie in unserer Zeit* **2009**, 43(5), 272-287
- [33] HUSSEIN, H.S.; BRASEL, J.M.; Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals; *Toxicology* **2001**, 167(2), 101-134
- [34] CIEGLER, A.; BENNETT, J.W.; Mycotoxins and Mycotoxicoses; *BioScience* **1980**, 30(8), 512-515
- [35] MÜCKE, W.; LEMMEN, CH.; *Schimmelpilze. Vorkommen. Gesundheitsgefahren. Schutzmaßnahmen*; 3. Auflage, ecomed Medizin, Landsberg am Lech **2004**

- [36] RUSTOM, I.Y.S.; Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods; *Food Chemistry* **1997**, 59(1), 57-67
- [37] ENGELHARDT, G.; *Mykotoxine - Giftige Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen*; Bayerische Landesanstalt für Ernährung **1999**
- [38] WEBER, R.; Mycotoxine in Lebensmitteln; *Chemie in unserer Zeit* **1983**, 17(5), 146-151
- [40] LUHMANN, F.; *Die Bedeutung der Mykotoxine als Lebensmittelkontaminanten*; Technikerarbeit, Staatliche Fachschule für Lebensmittelanalytik an der Emil-Fischer-Schule zu Berlin **1999**
- [41] BRADBURN, N. ET AL.; The aetiology of turkey 'x' disease; *Phytochemistry* **1994**, 35(3), 817
- [42] KÜCK, U. ET AL.; *Schimmelpilze. Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung*; 3. Auflage, Springer, Heidelberg **2009**
- [43] WEIDENBÖRNER, M.; *Encyclopedia of Food Mycotoxins*; Springer, Berlin **2009**
- [44] STEYN, P.S.; Multimycotoxin analysis; *Pure and Applied Chemistry* **1981**, 53, 891-902
- [45] WORLD HEALTH ORGANIZATION; *Selected mycotoxins: ochratoxins, trichothecenes, ergot. Environmental health criteria 105*, Genf **1978**, 13-16
- [46] STEYN, P.S.; Mycotoxins, general view, chemistry and structure; *Toxicology Letters* **1995**, 82-83, 843-851
- [47] POHLAND, A.E.; Mycotoxins in Review; *Food Additives and Contaminants* **1993**, 10, 17-28
- [48] MOSS, M.O.; Mycotoxin review; *Mycologist* **2002**, 16(4), 158-161
- [49] NIELSON, K.F. ET AL.; Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group; *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2009**, 395, 1225-1242
- [50] REISS, J.; Mycotoxins in Foodstuffs; *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung* **1978**, 167, 419-422)
- [51] DIN EN14133: Bestimmung von Ochratoxin A in Wein und Bier
- [52] RYCHLIK, M.; SCHIEBERLE, P.; Quantification of the Mycotxin Patulin by a Stable Isotope Dilution Assay; *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, 47, 3749-3755
- [53] GERTZ, C.; BÖSCHMEYER, L.; Verfahren zur Bestimmung verschiedener Mykotoxine in Lebensmitteln; *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung* **1980**, 171(5), 335-340

- [54] FRITZ, W. ET AL.; Zur Analytik und lebensmittelhygienisch-toxikologischen Bedeutung von Patulin in Obst und Obstprodukten; *Die Nahrung* **1979**, 23(2), 159-167
- [55] POLZHOFFER, K.; Patulinbestimmung in Lebensmitteln; *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung* **1977**, 163, 183-185
- [56] FRANK, H.K.; Einführung in die Problematik der Mykotoxine; *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung* **1973**, 151(4), 225-230
- [57] European Commission (2006): Regulation (EC) No. 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Off. J. Eur. Union L364:5–23
- [58] VERSTRAETE, F.; *EU legislation on mycotoxins in food and feed: Overview of the decision-making process and recent and future developments*; in: LESLIE, J.F. (Hrsg.) *Mycotoxins: detection methods, management, public health and agricultural trade*; Cab International, UK **2008**, 77-100
- [59] Broschüre "Mykotoxine. Vorkommen und Bekämpfungsstrategien in Brandenburg"; Ministerium für Infrastruktur und Landwirtschaft des Landes Brandenburg **2010**
- [60] HUMPF, H.-U.; Schwack, W.; Kontamination und Rückstände. Trendberichte Lebensmittelchemie 1999; *Nachrichten aus der Chemie* **2000**, 48, 355-358
- [61] BISELLI, S.; Analytische Methoden für die Kontrolle von Lebens- und Futtermitteln auf Mykotoxine; *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* **2006**, 1, 106-114
- [62] MARAGOS, C.M.; Plattner, R.D.; Rapid Fluorescence Polarization Immunoassay for the Mycotoxin Deoxynivalenol in Wheat; *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, 50, 1827-1832
- [63] PENA, R. ET AL.; Screening of aflatoxins in feed samples using a flow system coupled to capillary electrophoresis; *Journal of Chromatographia A* **2002**, 967, 303-314
- [64] MARAGOS, C.M. ET AL.; Fluorescence polarization as a tool for the determination of deoxynivalenol in wheat; *Food Additives and Contaminants* **2002**, 19(4), 400-407
- [65] MARAGOS, C.M.; GREER, J.I.; Analysis of Aflatoxin B₁ in Corn Using Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detection; *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1997**, 45, 4337-4341
- [66] WEINBERGER, R.; Capillary electrophoresis of venoms and toxins; *Electrophoresis* **2001**, 22, 3639-3647
- [67] ISSAQ, H.J.; Capillary Electrophoresis of natural products; *Electrophoresis* **1997**, 18, 2438-2452

- [68] ASAM, S.; RYCHLIK, M.; Quantitation of type B-trichothecene mycotoxins in food and feeds by a multiple stable isotope dilution assay; *European Food Research and Technology* **2007**, *224*, 769-783
- [69] LINDENMEIER, M. ET AL.; Quantification of Ochratoxin A in foods by stable isotope dilution assay using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; *Journal of Chromatographia A* **2004**, *1023*, 57-66
- [70] CATALDI, T.R.I ET AL.; Assessment of riboflavin and flavin content in common food samples by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection; *Food Chemistry* **2003**, *82(2)*, 309-314
- [71] JUAN-GARCÍA, A. ET AL.; Determination of organic contaminants in food by capillary electrophoresis; *Journal of Separation Science* **2005**, *28*, 793-812
- [72] CORNELI, S.; MARAGOS, C.M.; Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence: Method for the Mycotoxin Ochratoxin A; *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1998**, *46*, 3162-3165
- [73] TSAO, R.; ZHOU, T.; Micellar Electrokinetic Capillary Electrophoresis of Rapid Analysis of Patulin in Apple Cider; *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, *48*, 5231-5235
- [74] TRUCKSESS, M.W.; POHLAND, A.E.; *Mycotoxin Protocols*; Humana Press, Totowa **2001**
- [75] OLSSON, J. ET AL.; Detection and quantification of ochratoxin A and deoxynivalenol in barley grains by GC-MS and electronic nose; *International Journal of Food Microbiology* **2002**, *72(3)*, 203-214
- [76] PASCALE, M.; VISCONTI, A.; Overview of detection methods for mycotoxins; in: LESLIE, J.F. (Hrsg.) *Mycotoxins: detection methods, management, public health and agricultural trade*; Cab International, UK **2008**, 171–183
- [77] CHUN H.S. ET AL.; A fluorescence polarization immunoassay for the detection of zearalenone in corn; *Analytica Chimica Acta* **2009**, *639*, 83–89
- [78] CUNHA S.C. ET AL.; Determination of patulin in apple and quince products by GC-MS using ¹³C₅-7 patulin as internal standard; *Food Chemistry* **2009**, *115*, 352–359
- [79] SHEPHARD, G.S.; Determination of mycotoxins in human foods; *Chemical Society Reviews* **2008**, *37*, 2468–2477
- [80] ZHENG, M.Z. ET AL.; A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins; *Mycopathologia* **2006**, *161*, 261–273
- [81] LATTANZIO, V.M.T. ET AL.; Simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A and Fusarium toxins in maize by liquid chromatography/tandem mass spectrometry after multitoxin immunoaffinity cleanup; *Rapid Communication Mass Spectrometry* **2007**, *21*, 3253–3261

-
- [82] LATTANZIO, V.M.T. ET AL.; Determination of trichothecenes in cereals and cereal-based products by liquid chromatography--tandem mass spectrometry; *Food Additives and Contaminants* **2008**, *25*, 320–33
- [83] NASIR, M.S., JOLLEY, M.E.; Development of a Fluorescence Polarization Assay for the Determination of Aflatoxins in Grains; *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, *50*, 3116-3121
- [84] BARNA-VETRÓ, I. ET AL.; Sensitive ELISA Test for Determination of Ochratoxin A; *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1996**, *44*, 4071-4074
- [85] KRŠKA, R.; MOLINELLI, A.; Rapid test strips for analysis of mycotoxins in food and feed; *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2009**, *393*, 67-71
- [86] BÖHM, J. ET AL.; Survey and risk assessment of the mycotoxins deoxynivalenol, zearalenone, fumonisins, ochratoxin A, and aflatoxins in commercial dry dog food; *Mycotoxin Research* **2010**, *26(3)*, 147-153
- [87] VAN DER GAAG, B. ET AL.; Biosensors and multiple mycotoxin analysis; *Food Control* **2003**, *14*, 251-254
- [88] GORYACHEVA, I.Y. ET AL.; Immunochemical methods for rapid mycotoxin detection: evolution from single to multiple analyte screening. A review; *Food Additives and Contaminants* **2007**, *24*, 1169–1183
- [89] SCHNEIDER, E. ET AL.; Multimycotoxin dipstick enzyme immunoassay applied to wheat; *Food Additives and Contaminants* **1995**, *12*, 313-321
- [90] VOLANTE, M.; BRANCA, P.; *Pesticides, Mycotoxins and Residues Analysis in Food*; In: Encyclopedia of Analytical Chemistry; R.A. MEYER (Hrsg.), John Wiley & Sons Ltd., Chichester **2000**, 4153-4181
- [91] STROKA, J. ET AL.; Novel sampling methods for the analysis of mycotoxins and the combination with spectroscopic methods for the rapid evaluation of deoxynivalenol contamination; *Toxicology Letters* **2004**, *153*, 99-107
- [92] TRIPATHI, S.; MISHRA, H.N.; A rapid FT-NIR method for estimation of aflatoxin B1 in red chili powder; *Food Contaminants* **2009**, *20*, 840–846
- [93] MENZEL, R.; *Photonics: Linear and Nonlinear Interactions of Laser Light and Matter*; Springer, Berlin **2001**
- [94] ATKINS, P. W.; *Physical Chemistry*; Oxford University Press **2001**
- [95] LAKOWICZ, J.R.; *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; 3rd Edition; Springer, Berlin **2006**
- [96] OTTO, M.; *Analytische Chemie*; 3. Auflage, Wiley VCH, Weinheim **2006**
- [97] RÖTHLEIN, B.; *Schrödingers Katze. Einführung in die Quantenphysik*; Deutscher Taschenbuch Verlag, München **1999**
- [98] KASHA, M.; *Discussions of the Faraday Society* **1950**, *9*, 14-19

-
- [99] GÖPPERT-MAYER, M.; Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Annalen der Physik*, **1931**, 9, 273-294
- [100] GARRETT, C.G.B.; KAISER, W.; Two-Photon Excitation in CaF₂: Eu²⁺; *Physical Review Letters* **1961**, 7(6), 229-232
- [101] DENK, W ET AL.; Two-photon laser scanning fluorescence microscopy; *Science* **1990**, 248, 73 – 76
- [102] XU, C.; WEBB, W.W.; Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm; *Journal of the Optical Society of America B* **1996**, 13(3), 481-491
- [103] ALBOTA, M.A. ET AL.; Two-photon fluorescence excitation cross sections of biomolecular probes from 690 to 960 nm; *Applied Optics* **1998**, 37(31), 7352-7356
- [104] LAHN, M.; *Untersuchung der intrazellulären Chloridionenkonzentration in Insektengewebe mittels FLIM-Mikroskopie*; Diplomarbeit, Potsdam **2007**
- [105] MESHALKIN, Y.P. ET AL.; Two-photon excitation of dyes in a polymer matrix by femtosecond pulses from a Ti:sapphire laser; *Quantum Electronics* **2003**, 33(9), 803-806
- [106] HAKEN, H.; WOLF, H.C.; *Molekülphysik und Quantenchemie. Einführung in die experimentellen und theoretischen Grundlagen*; Springer; Berlin
- [107] LAKOWICZ, J.R. (Hrsg.); *Multiphoton Excitation and Microscopy*; in: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; 3. Auflage, Springer, New York **2006**
- [108] FRÖHLICH, D.; 2-Photonenspektroskopie; *Physik in unserer Zeit* **1975**; 6 (2), 47-51
- [109] XU, C. ET AL.; Multiphoton fluorescence excitation: New spectral windows for biological nonlinear microscopy; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1996**, 93, 10763–10768
- [110] PAWLICKI, M. ET AL.; Zweiphotonenabsorption und das Design von Zweiphotonenfarbstoffen; *Angewandte Chemie* **2009**, 121, 3292 – 3316
- [111] LAKOWICZ, J.; *Topics in Fluorescence Spectroscopy, Volume 5: Nonlinear and Two-Photon-Induced Fluorescence*; Plenum Press, New York **1997**
- [112] REICH, O.; *Photonendichtewellenspektroskopie mit intensitätsmodulierten Diodenlasern*; Dissertation, Potsdam **2005**
- [113] KORTÜM, G.; OELKRUG, D.; Reflektionsspektren fester Stoffe; *Zeitschrift für Naturwissenschaften* **1966**, 53(23), 600-609
- [114] KUBELKA, P., MUNK, F.; Beitrag zur Optik der Farbanstrich; *Zeitschrift für technische Chemie* **1931**, 11a, 593-601
- [115] KORTÜM, G.; *Reflexionsspektroskopie – Grundlagen, Methodik, Anwendungen*; Springer-Verlag, Berlin **1969**
-

- [116] KORTÜM, G.; BRAUN, W.; Photochemische Reaktionen des Anthracens in adsorbiertem Zustand; *Liebigs Annalen der Chemie* **1960**, 632(1), 104-115
- [117] KORTÜM, G. ET AL.; Prinzip und Meßmethodik der diffusen Reflektionsspektroskopie; *Angewandte Chemie* **1963**, 75(14), 653-661
- [118] KORTÜM, G.; OELKRUG, D.; Über den Streukoeffizienten der Kubelka-Munk-Theorie; *Zeitschrift für Naturforschung* **1964**, 19a, 28-37
- [119] FRASER, D.J.J.; GRIFFITHS, P.R.; Effect of Scattering Coefficient on Diffuse Reflectance Infrared Spectra; *Applied Spectroscopy* **1990**, 44(2), 193-199
- [120] KORTÜM, G.; SCHREYER, G.; Über die Gültigkeit der Kubelka-Munk-Funktion für Reflexionsspektren an Pulvern; *Zeitschrift für Naturforschung* **1956**, 11a, 1018-1022
- [121] BERGMANN, L.; Schäfer, C.; *Lehrbuch der Experimentalphysik*; Band 3; Gruyter, Berlin **1993**
- [122] HIRSENKORN, R.; Molekulare Zuckertüten mit vielfältigen Aufgaben; *Werk + Wirken* **1994**, 6, 6-9.
- [123] MARAGOS, C.M. ET AL.; Use of cyclodextrins as modifiers of fluorescence in the detection of mycotoxins; *Food Additives and Contaminants* **2008**, 25(2), 164-171
- [124] DALL'ASTA, C. ET AL.; Fluorescence Enhancement of Aflatoxins using Native and Substituted Cyclodextrins; *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **2003**, 45, 257-263
- [125] OSBORNE, B.G.; *Near-Infrared Spectroscopy in Food Analysis*; In: Encyclopedia of Analytical Chemistry; R.A. MEYER (Hrsg.), John Wiley & Sons Ltd., Chichester **2000**, 4069-4081
- [126] KOS, G. ET AL.; Development of a Method for the Determination of Fusarium Fungi on Corn Using Mid-Infrared Spectroscopy with Attenuated Total Reflection and Chemometrics; *Analytical Chemistry* **2003**, 75, 1211-1217
- [127] DE JUAN, A. ET AL.; *Chemometric Tools for Image Analysis*; in: Infrared and Raman Spectroscopic Imaging; R. SALZER (Hrsg.); Wiley VCH, Weinheim **2009**, 65-112
- [128] OTTO, M.; *Chemometrie - Statistik und Computereinsatz in der Analytik*; Wiley-VCH, Weinheim **1997**
- [129] MARK, H.; WORKMAN, J. (Hrsg.); *Chemometrics in spectroscopy*; Academic Press-Elsevier, NL **2007**
- [130] BROWN, S.D. ET AL. (Hrsg.); *Comprehensive Chemometrics: chemical and biochemical data analysis*; Elsevier, NL **2009**

-
- [131] DANZER, K. ET AL.; *Chemometrik - Grundlagen und Anwendungen*; Springer, Berlin **2001**
- [132] KESSLER, W.; *Multivariate Datenanalyse für die Pharma-, Bio- und Prozessanalytik*; Wiley VCH, Weinheim **2007**
- [133] KESSLER, R. (Hrsg.); *Prozessanalytik*; Wiley-VCH, Weinheim **2006**
- [134] NORGAARD, L.; A multivariate chemometric approach to fluorescence spectroscopy; *Talanta* **1995**, 42, 1305-1324
- [135] DOERFFEL, K.; *Statistik in der Analytischen Chemie*; 5. Auflage, Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig **1990**
- [136] ESBENSEN, K.H.; *Multivariate Data Analysis*; 5. Auflage, Camo, Norwegen **2002**
- [137] CHRISTY, A.A.; KVALHEIM, O.M.; *Latent-Variable Analysis of Multivariate Data in Infrared Spectrometry*; in: Near-Infrared Spectroscopy in Food Science and Technology; Y. OZAKI (Hrsg.); John Wiley & Sons Ltd., Hoboken **2007**
- [138] HENRION, R.; HENRION, G.; *Methoden zur Interpretation multivariater Daten mit Beispielen aus der analytischen Chemie*; Springer, Berlin **1994**
- [139] MASSART, D.L. ET AL.; *Chemometrics - a Textbook*; Elsevier, Amsterdam **1988**
- [140] SHARAF, M.A. ET AL.; *Chemometrics. Chemical Analysis Series Vol. 82*; Wiley, New York **1986**
- [141] PEARSON, T.C. ET AL.; Detecting Aflatoxin in single corn kernels by transmittance and reflectance spectroscopy; *Transaction of the ASAE* **2001**, 44(5), 1247-1254
- [142] PETTERSSON, H.; ÅBERG, L.; Near infrared spectroscopy for determination of mycotoxins in cereals; *Food Control* **2003**, 14, 229-232
- [143] BOLDUAN, R. ET AL.; Bestimmung des Fusarienbefalls / Deoxynivalenol-Gehalts (DON) bei Einzelkörnern von Weizen mittels Reflektionsspektroskopie im UV-, sichtbaren und Nahinfrarot-Bereich sowie Untersuchungen zur Einzelkorn-Fluoreszenz; *Getreidetechnologie* **2008**, 62(2), 93-100
- [144] WETZEL, D.L.; Near-Infrared Reflectance Analysis: Sleeper Among Spectroscopic Techniques; *Analytical Chemistry* **1983**, 55(12), 1165A-1176A
- [145] McClure, W.F.; Farsaie, A.; Dual-Wavelength Fiber Optic Photometer measures Fluorescence of Aflatoxin contaminated Pistachio Nuts; *Transactions of the ASAE* **1980**, 23(1), 204-207
- [146] KAROUI, R.; BLECKER, C.; Fluorescence and Ultraviolet-Visible (UV-Vis) spectroscopies of Intact Food Systems - A review; *Food and Bioprocess Technology* **2010**, DOI: 10.1007/s11947-010-03700

- [147] STRASBURG, G.M.; LUDESCHER, R.D.; Theory and Application of Fluorescence Spectroscopy in Food Research; *Trends in Food Science and Technology* **1995**, 6, 69-75
- [148] SÁDECKÁ, J.; TÓTHOVÁ, J.; Fluorescence Spectroscopy and Chemometrics in the Food Classification - a Review; *Czech Journal of Food Science* **2007**, 25(4), 159-173
- [149] REINHARDT, B.A. ET AL.; Highly Active Two-Photon Dyes: Design, Synthesis and Characterization toward Application; *Chemical Materials* **1998**, 10, 1863-1874
- [150] STREHMEL, B. ET AL.; The influence of σ and π Acceptors on Two-Photon Absorption and Solvatochromism of Dipolar and Quadrupolar Unsaturated Organic Compounds; *ChemPhysChem* **2003**, 4, 101-111
- [151] OHEIM, M. ET AL.; Principles of two-photon excitation fluorescence microscopy and other nonlinear imaging approaches; *Advanced Drug Delivery Reviews* **2006**, 58, 788-808
- [152] RUMI, M. ET AL.; Structure-Property Relationships for Two-Photon Absorbing Chromophores: Bis-Donor Diphenylpolyene and Bis(styryl)benzene Derivatives; *Journal of the American Chemical Society* **2000**, 122, 9500-9510
- [153] HILLE, C. ET AL.; Two-photon fluorescence lifetime imaging of intracellular chloride in cockroach salivary glands; *Photochemical & Photobiological Sciences* **2009**, 8, 319-327
- [154] DAVIES, A.M.C.; GRANT, A.; Review: Near infra-red analysis of food; *International Journal of Food Science and Technology* **1987**, 20, 191-207
- [155] MARIHART, J.; Erfahrungen mit der NIR-Reflexionsspektroskopie bei der Routine-Analyse von Stärken, Stärkederivaten und Stärkeverzuckerungsprodukten; *Starch* **1984**, 36(2), 51-55
- [156] WILLIAMS, P.; *Near-infrared Spectroscopy of Cereals; Handbook of Vibrational Spectroscopy*, P. GRIFFITHS (Hrsg.), Wiley & Sons, New York **2006**
- [157] GOSH, P.K.; JAYAS, D.S.; Use of spectroscopic data for automation in food processing industry; *Sensing & Instrumental Food Quality* **2009**, 3, 3-11
- [158] BERARDO, N. ET AL.; Rapid Detection of Kernel Rots and Mycotoxins in Maize by Near-Infrared Reflectance Spectroscopy; *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, 53, 8128-8134
- [159] SCHOBER, L.; Löhmannsröben, H.-G.; Determination of optical parameters for light penetration in particulate materials and soils with diffuse reflectance (DR) spectroscopy; *Journal of Environmental Monitoring* **2000**, 2, 651-655
- [160] KRŠKA, R.; Mycotoxins; *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2009**, 395, 1203-1204

- [161] RINNAN, A. ET AL.; *Data pre-processing*; in: *Infrared Spectroscopy for food quality analysis and control*; DA-WEN SUN (Hrsg.), Elsevier, USA **2009**, 29-50
- [162] OSBORNE, B.G.; *Near-Infrared Spectroscopy in Food Analysis*; *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, R.A. MEYER (Hrsg.), John Wiley & Sons Ltd., Chichester **2000**, 4069-4081
- [163] MAZEROLLES, G. ET AL.; Chemometric methods for the coupling of spectroscopic techniques and for the extraction of the relevant information contained in the spectral data tables; *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **2002**, 63, 57-68
- [164] NICOLAI, B.M. ET AL.; Nondestructive measurement of fruits and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: A review; *Postharvest Biology and Technology* **2007**, 46, 99-118
- [165] BARNES, R.J. ET AL.; Standard Normal Variate Transformation and De-trending of Near-Infrared Diffuse Reflectance Spectra; *Applied Spectroscopy* **1989**, 43(5), 772-777
- [166] BOLDUAN, R.; KESSLER, W.; Bestimmung des Fusariumbefalls/Deoxynivalenol-Gehalts (DON) bei Einzelkörnern von Weizen mittels Reflexionsspektroskopie im UV-, sichtbaren und Nahinfrarotbereich sowie Untersuchungen zur Einzelkorn-Fluoreszenz; *Getreidetechnologie* **2008**, 62(2), 93-99
- [167] POHLAND, A.E. ET AL.; Physicochemical Data for some selected mycotoxins; *Pure and Applied Chemistry* **1982**, 54(11), 2219-2284
- [168] SYDENHAM, E.W. ET AL.; Physicochemical Data for Some Selected Fusarium Toxins; *Journal of AOAC International* **1996**, 79(6), 1365-1379
- [169] HESSELTINE, C.W.; *Global significance of mycotoxins*; in: *Mycotoxins and Phytotoxins*, P.S. STEYN (Hrsg.); Elsevier, NL **1986**
- [170] IL'ICHEV, J.V. ET AL.; The pH-Dependent Primary Photoreactions of Ochratoxin A; *Journal of Physical Chemistry B* **2001**, 105, 11369-11376
- [171] BROW, M.E. ET AL.; Photochemically Catalyzed Reaction of Ochratoxin A with D- and L-cysteine; *Photochemistry and Photobiology* **2002**, 76(6), 649-656
- [172] FRENETTE, C. ET AL.; Structure-activity relationships for the fluorescence of ochratoxin A: Insight for detection of ochratoxin A metabolites; *Analytica Chimica Acta* **2008**, 617(1-2), 153-161
- [173] STEINBRÜCK, D.; *Photophysik von Mykotoxinen in komplexen Matrices: Am Beispiel Ochratoxin A auf Mehl und Getreidekörnern*; Diplomarbeit, Potsdam **2008**

- [174] STEINBRÜCK, D. ET AL.; Photophysics of Ochratoxin A in Aqueous Solution; *Zeitschrift für Naturforschung* **2008**, *63b*, 1321-1326
- [175] BÖTTCHER, M.; *Photophysikalische Eigenschaften von Aflatoxin B1 in verschiedenen Lösungsmitteln und Nachweis des Mykotoxins in Weißwein*; Bachelorarbeit, Potsdam **2009**
- [176] COZZINI, P. ET AL.; Mycotoxin Detection Plays "Cops and Robbers": Cyclodextrin Chemosensors as Specialized Police?; *International Journal of Molecular Sciences* **2008**, *9*, 2474-2494
- [177] VAZQUEZ, M.L. ET AL.; Cyclodextrins as modifiers of the luminescence characteristics of aflatoxins; *Analytica Chimica Acta* **1991**, *255*, 343-350
- [178] RAMIREZ-GALICIA, G. ET AL.; Effect of water molecules on the fluorescence enhancement of Aflatoxin B1 mediated by Aflatoxin B1:β-cyclodextrin complexes. A theoretical study; *Photochemical and Photobiological Sciences* **2007**, *6*, 110-118
- [179] DALL'ASTA, C. ET AL.; Fluorescence Enhancement of Aflatoxins using Native and Substituted Cyclodextrins; *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **2003**, *45*, 257-263
- [180] HASHEMI, J.; ALIZADEH, N.; Investigation of solvent effect and cyclodextrins on fluorescence properties of ochratoxin A; *Spectrochimica Acta Part A* **2009**, *73*, 121-126
- [181] VERONNE, R. ET AL.; Effect of β-cyclodextrin on spectroscopic properties of ochratoxin A in aqueous solution; *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **2007**, *57(1-4)*, 475-479
- [182] AMADASI, A. ET AL.; Explaining cyclodextrin-mycotoxin interactions using a 'natural' force field; *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2007**, *15*, 4585-4594
- [183] KOSTOV, Y.; RAO, G.; Low-Cost optical instrumentation for biomedical measurements; *Review of Scientific Instruments* **2000**, *71(12)*, 4361-4374
- [184] WEI, J. ET AL.; Determination of Biological Toxins using Capillary Electrokinetic Chromatography with Multiphoton-Excited Fluorescence; *Analytical Chemistry* **2000**, *72*, 1360-1363
- [185] RASCH, C. ET AL.; Determination of Aflatoxin B₁ in alcoholic beverages: Comparison of one- and two-photon-induced fluorescence; *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2010**, *397(1)*, 87-92
- [186] CURLEY P.F. ET AL.; Application of a femtosecond self-sustaining mode-locked Ti:sapphire laser to the field of laser scanning confocal microscopy; *Optical and Quantum Electronics* **1992**, *24*, 851-859
- [187] PARMA, L.; OMENETTO, N.; Fluorescence behavior of 7-hydroxycoumarin excited by one-photon and two-photon absorption by means of a tunable dye laser; *Chemical Physics Letters* **1978**, *54(3)*, 544-546

- [188] CHRISTENSEN, J. ET AL.; Multivariate Autofluorescence of Intact Food Systems; *Chemical Reviews* **2006**, 106(6), 1979-1994
- [189] ZANDOMENEGHI, M.; Fluorescence of Cereal Flours; *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, 47, 878-882
- [190] ZANDOMENEGHI, M. ET AL.; Front-Surface Absorbance Spectra of Wheat Flour: Determination of Carotenoids; *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, 48, 2216-2221
- [191] ZANDOMENEGHI, M. ET AL.; Direct Fluorometric Determination of Fluorescent Substances in Powders: The Case of Riboflavin; *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, 51, 2888-2895
- [192] KAROUI, R. ET AL.; Front-Face Fluorescence Spectroscopy as a Rapid and Nondestructive Tool for Differentiating Various Cereal Products: A Preliminary Investigation; *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, 54, 2027-2034
- [193] BONOMI, F. ET AL.; Probing structural features of water-insoluble proteins by front-face fluorescence; *Analytical Biochemistry* **2004**, 329, 104-111
- [194] www.lungau.de/muehlenweg/tafeln/getreidekorn.jpg
- [195] ZUDE, M. (Hrsg.); *Optical Monitoring of Fresh and Processed Agricultural Crops*; CRC Press, USA **2009**
- [196] WANG, D. ET AL.; Single Wheat Kernel Size Effects on Near-Infrared Reflectance Spectra and Color Classification; *Cereal Chemistry* **1999**, 76(1), 34-37
- [197] WANG, D. ET AL.; Single Wheat Kernel Color Classification by Using Near-Infrared Reflectance Spectra; *Cereal Chemistry* **1999**, 76(1), 30-33
- [198] RIDGWAY, C.; CHAMBERS, J.; Detection of External and Internal Insect Infestation in Wheat by Near-Infrared Reflectance Spectroscopy; *Journal of Science of Food and Agriculture* **1996**, 71, 251-264

PUBLIKATIONSLISTE

Veröffentlichungen

- C. Rasch, M. Kumke, H.-G. Löhmannsröben; Mykotoxine in Getreide spektroskopisch erfassen; Nachrichten aus der Chemie 2008, 56(11), 1154-1158
- D. Steinbrück, C. Rasch, M. Kumke; Photophysics of Ochratoxin A in Aqueous Solution; Zeitschrift für Naturforschung 2008, 63b, 1321-1326
- C. Rasch, M. Böttcher, M. Kumke; Determination of Aflatoxin B₁ in alcoholic beverages: Comparison of one- and two-photon-induced fluorescence; Analytical and Bioanalytical Chemistry 2010, 397(1), 87-92
- C. Rasch, M. Kumke, H.-G. Löhmannsröben; Sensor technology for the identification of mycotoxin producing fungi in the processing of grains; Food and Bioprocess Technology: An International Journal 2010, 3(6), 908-916

Vorträge

- C. Rasch, M. Kumke, H.-G. Löhmannsröben; "Spectroscopic identification of fungus and mycotoxins on grains", 30. Mykotoxin-Workshop, Utrecht (NL), 28. bis 30. April 2008
 - M. Ditz, C. Idler, C. Rasch, M. Kumke, A. Walte; "Exposure of corn with mould and mycotoxins - detection by sensor technology", 8th International Conference - Mycotoxins and moulds, Bydgoszcz (PL), 25. bis 27. Juni 2008
 - C. Rasch; "Non-invasive determination of mycotoxin producing fungus on grains", 11. Frühjahrssymposium des Jungchemikerforums der GDCh, Essen, 11. bis 14. März 2009
 - C. Rasch, M. Kumke, H.-G. Löhmannsröben; "Photophysikalischer Nachweis von Mykotoxinen - am Beispiel von Ochratoxin A (OTA) - und Schimmelpilzen auf Getreide", ANAKON 2009, Berlin, 17. bis 20. März 2009
 - M. Ditz, C. Idler, C. Rasch, M. Kumke; "Indicators and sensor technology for the identification of mycotoxin producing fungi in the processing of grain", 31. Mykotoxin-Workshop, Münster, 15. bis 17. Juni 2009
-

-
- C. Rasch, M. Kumke, H.-G. Löhmannsröben; "Sensor technology for the identification of mycotoxin producing fungi in the processing of wheat grain", 5th International Technical Symposium on Food Processing, Monitoring Technology in Bioprocesses and Food Quality Management, Potsdam, 31. August bis 02. September 2009

Poster

- C. Idler, A. Jonitz, M. Kumke, C. Rasch; "Indicators and sensor technology for the identification of mycotoxin producing fungi in the processing of grain", 29. Mykotoxin-Workshop, Stuttgart-Fellbach, 13. bis 16. Mai 2007
 - C. Rasch, D. Steinbrück, M. Kumke, H.-G. Löhmannsröben; "Sensor technology for the identification of mycotoxins in cereals", 8. Dresdner Sensor-Symposium, Dresden, 10. bis 12. Dezember 2007
 - C. Rasch, M. Kumke, H.-G. Löhmannsröben; "Spectroscopic identification of mycotoxins in cereals", 2. interdisziplinäre Doktorandentagung der GDCh, Fachgruppe Analytische Chemie:, Arbeitskreise Chemometrik und Labordatenverarbeitung, Chemo- und Biosensoren, Prozessanalytik, Qualitätsmanagement und Elektroanalytische Chemie, Attendorn, 10. bis 12. Februar 2008
 - C. Rasch, M. Kumke, H.-G. Löhmannsröben, "New spectroscopic insights for the identification of mycotoxins in cereals", 10. Frühjahrssymposium des Jungchemikerforums der GDCh, Rostock, 26. bis 29. März 2008
 - C. Rasch, M. Kumke, H.-G. Löhmannsröben; "Spectroscopic identification of mycotoxins in cereals", Europact 2008 - 1. European Conference on Process Analytics and Control Technology (EUROPACT), Frankfurt / Main, 22. bis 25. April 2008
 - C. Idler, C. Rasch, M. Ditz, M. Kumke; "Sensor technology for the identification of mycotoxins and fungi in the processing of grain - first results", 30. Mykotoxin-Workshop, Utrecht (NL), 28. bis 30. April 2008
 - C. Rasch, D. Steinbrück, M. Kumke, H.-G. Löhmannsröben; "Spectroscopic properties of Ochratoxin A and B", 30. Mykotoxin-Workshop, Utrecht (NL), 28. bis 30. April 2008
 - C. Rasch, M. Kumke, H.-G. Löhmannsröben; "Spectroscopic identification of mycotoxins in cereals", Doktorandensymposium der Potsdam Graduate School, Potsdam, 09. Dezember 2008
-

-
- C. Idler, M. Ditz, C. Rasch, M. Kumke, A. Walte; "Sensoren zur Detektion von Schimmelpilzen auf Getreide", 11. Fachsymposium der Lebensmittelmikrobiologie, Wildbad Kreuth, 22. bis 24. Juni 2009
 - C. Rasch, M. Böttcher, M. Kumke, H.-G. Löhmannsröben; "Spectroscopic methods for the analysis of Aflatoxins in alcoholic beverages and foodstuff", GDCh-Wissenschaftsforum Chemie 2009, Frankfurt / Main, 30. August bis 02. September 2009
 - C. Rasch, M. Böttcher, M. Kumke, H.-G. Löhmannsröben; "Spectroscopic proof of Aflatoxin B₁ in alcoholic beverages and foodstuff", Euroanalysis 2009, Innsbruck (AT), 06. bis 10. September 2009
 - C. Rasch, M. Kumke, H.-G. Löhmannsröben; "Schimmelpilzgifte durch Licht erfassen", 2. Doktorandensymposium der Potsdam Graduate School, Potsdam, 22. September 2009 (2. Posterpreis)
 - C. Rasch, M. Kumke, H.-G. Löhmannsröben; "Mykotoxinbildner auf Getreide spektroskopisch erfassen", 5. Kolloquium des Arbeitskreises Prozessanalytik in der GDCh-Fachgruppe Analytische Chemie und in der DECHEMA, Göttingen, 30. November bis 01. Dezember 2009
 - C. Rasch, M. Böttcher, M. Kumke, H.-G. Löhmannsröben; "Two-photon-induced fluorescence for the determination of Aflatoxin B₁ in alcoholic beverages", Laser Optics Berlin, Studententag, 23. März 2010 (Posterpreis)
 - C. Rasch, M. Böttcher, M. Kumke, H.-G. Löhmannsröben; "Two-photon-induced fluorescence for the determination of Aflatoxin B₁ in alcoholic beverages", 32. Mykotoxin-Workshop, Kopenhagen (DK), 14. bis 16. Juni 2010
-

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von Oktober 2006 bis Oktober 2010 am Institut für Chemie der Universität Potsdam.

- Herrn Prof. Hans-Gerd Löhmannsröben danke ich für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe "Physikalische Chemie" und für die „Anregungen, Ideen und Verbesserungsvorschläge“.
- Mein besonderer Dank geht an Herrn PD Dr. Michael Kumke für die interessante Themenstellung, die vertrauensvolle Zusammenarbeit, die vielen Anregungen und die stete Bereitschaft für Diskussionen und Korrekturen.
- Ein besonders herzliches Dankeschön geht an Frau Michaela Ditz, Frau Veronika Egert und Frau Dr. Christine Idler vom Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim für die Probenpräparation, Unterstützung und Diskussionsbereitschaft sowie Herrn Dr. Frank Lewitzka von der Optimare Analytik GmbH Wilhelmshaven für die konstruktive Zusammenarbeit im Teilprojekt 1.2 im Verbundvorhaben „ProSenso.Net²“.
- Darüber hinaus möchte ich mich bei Frau Dipl.-Chem. Diana Hill und Herrn Dr. Jörg Schappel für die kritische Durchsicht des Manuskriptes und das Korrekturlesen bedanken sowie bei Herrn Eberhard Tietz, der mir bei Problemen mit der Formulierung zur Seite stand.
- Desweiteren gilt mein besonderer Dank allen Mitgliedern der Physikalischen Chemie für die fachliche Unterstützung sowie den (wechselnden) Bewohnern des „Sonnenkinderbüros“ für die angenehme Arbeitsatmosphäre.
- Außerhalb meines Arbeitsumfeldes möchte ich mich vor allem bei meinen Eltern, Sabine und Dr. Klaus Rasch, und meinen Freunden für die Unterstützung innerhalb der letzten Jahre bedanken.
- Meinem Freund Marcel Tietz bin ich zu tiefsten Dank verpflichtet für die unvergesslichen vier Jahre in Berlin, für die liebevolle Unterstützung und unendliche Geduld. Er hat mir die ganze Zeit den Rücken frei gehalten und mich stets bestärkt, wenn ich an mir gezweifelt habe. Und daher widme ich ihm diese Arbeit.

Und selbstverständlich danke ich allen, die sich angesprochen fühlen und in dieser Aufzählung vergessen wurden.

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation an keiner anderen Hochschule eingereicht sowie selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt wurde.

Claudia Rasch

Potsdam, 13. Oktober 2010
