

Internationaler Proficiency Test zur Bestimmung von Ochratoxin A in Lakritzprodukten

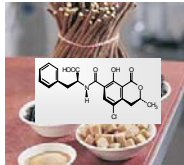


Marion Raters¹, Reinhard Matissek¹, Winni van Haaren², Koop Fledderus²

¹ LCI, Lebensmittelchemisches Institut des Bundesverbandes der Deutschen Süßwarenindustrie (BDSI) e. V., Adamsstr. 52-54, 51063 Köln, www.lci-koeln.de
² Ruitenberg Ingredients B.V., Griftstraat 8, 7391 TM Twello – Niederlande, www.ruitenberg.nl

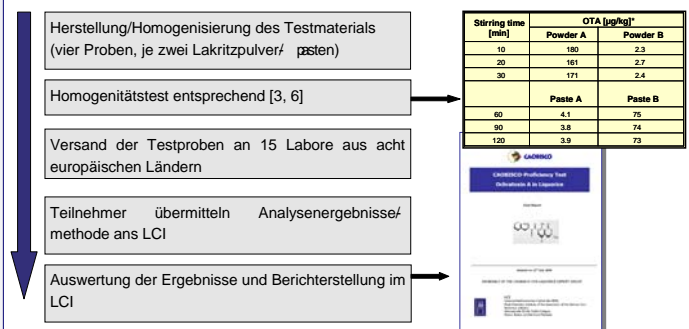
Hintergrund

Bei Ochratoxin A (OTA) handelt es sich um einen Sekundärmetaboliten toxischer Schimmelpilze insbesondere der Gattung *Aspergillus ochraceus*. Sein Vorkommen ist typisch für einheimische stärkehaltige Cerealien, Nüssen, Kaffee und Gewürzen aber auch in Süßholzwurzel und den daraus gewonnenen Extrakten sowie in Lakritzprodukten konnten positive Befunde dieses Mykotoxins festgestellt werden [1, 2].



Da für die Bestimmung von OTA in Süßholzextrakten und Lakritzprodukten keine einheitliche validierte Analysenmethode existierte, wurde im Auftrag von CAOBISCO (Association of the Chocolate, Biscuit and Confectionery Industries of the EU) ein europäischer Proficiency Test organisiert, koordiniert und ausgewertet. Ziel des Proficiency Testes war es einerseits, im europäischen Vergleich die Performance der teilnehmenden Labore bei der OTA Analytik von Lakritzprodukten zu überprüfen und andererseits den Einfluss des Extraktionslösungsmittels auf die Qualität der Ergebnisse zu untersuchen.

Organisation des Proficiency Tests



Ergebnisse

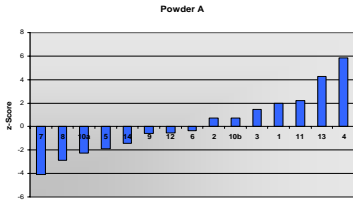


Abbildung 1: Ergebnisse Lakritzpulver A – Z-score-Darstellung

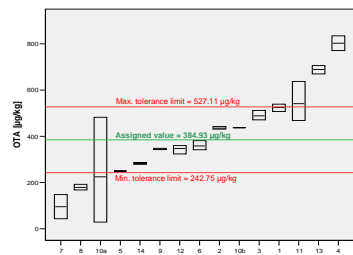


Abbildung 2: Ergebnisse Lakritzpulver A – Boxplot-Darstellung mit Max, Min, Mittel

Der Proficiency Test wurde in Anlehnung an internationale Maßgaben (IUPAC/ISO/AOAC) ausgewertet [3]. Insgesamt wurden die Ergebnisse von 14 teilnehmenden Laboren in die Berechnungen einbezogen. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse des Proficiency Tests ist Tabelle 1 zu entnehmen.

Der sog. *assigned OTA-value X* der vier Testproben wurde aus den einzelnen Analyseergebnissen (jeweils Dreifachbestimmungen) der Teilnehmer unter Anwendung robuster Statistiken berechnet. Zielgröße und Zielstandardabweichung zur Ermittlung der jeweiligen z-scores wurden mit Hilfe der *Huber H15 Methode* [4] bzw. der *Horwitz Funktion* [5] ermittelt. Diese Auswertetechnik hat den Vorteil, dass eine Eliminierung von Ausreißern nicht notwendig ist, da jeder Wert mit einem bestimmten Faktor gewichtet wird. Die Ergebnisse der teilnehmenden Labore sowie die individuellen z-scores für zwei der vier Testproben sind in den Abbildungen 1-4 exemplarisch dargestellt.

Zur Bewertung der Ergebnisse wurde das Kriterium der relativen Standardabweichung der Reproduzierbarkeit angewandt (RSD_R). Der RSD_R deutet auf eine deutliche Variation zwischen den einzelnen Laboren hin. Es wurden RSD_R -Werte zwischen 46,8 und 91,8 % berechnet.

Tabelle 1: Zusammenfassung der Ergebnisse des Proficiency Tests

Sample	Assigned value X (Huber) [µg/kg]	Mean [µg/kg]	Median [µg/kg]	S_p [µg/kg]	RSD_R [%]	Min tolerance limit [µg/kg] *	Max tolerance limit [µg/kg] *
Powder A	384,93	400,15	358,33	200,88	52,19	242,75	527,11
Powder B	6,39	7,29	5,90	5,87	91,86	2,02	10,76
Paste A	8,49	8,55	8,90	3,97	46,76	2,93	14,05
Paste B	177,92	175,56	198,62	85,65	48,14	104,10	251,74

*) Bei Anwendung des z-score-Kriteriums ($|Z| \leq 2,0$)

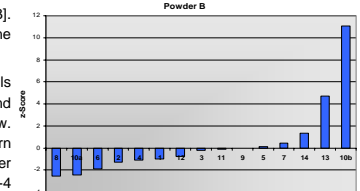


Abbildung 3: Ergebnisse Lakritzpulver B – Z-score-Darstellung

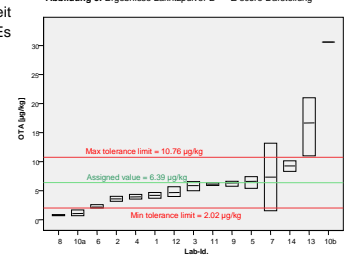


Abbildung 4: Ergebnisse Lakritzpulver B – Boxplot-Darstellung mit Max, Min, Mittel

Einfluss der Extraktion

Ziel des Proficiency Testes war es, eine geeignete Methode für die Bestimmung von OTA in Lakritzprodukten zu etablieren. Die von den teilnehmenden Laboren angewandten Analysemethoden unterschieden sich insbesondere in der Art des eingesetzten Extraktionslösungsmittels. Ein Teil der Labore verwendete eine chloroformhaltige, der andere Teil eine rein wässrige Extraktion.

Mit Hilfe des ANOVA-Tests (Analysis of Variance) wurden die Varianzen in beiden Gruppen untersucht [3]. Für die theoretische Nullhypothese gilt, dass die Varianz innerhalb zweier Gruppen und die Varianz zwischen den beiden Gruppen sich nicht signifikant voneinander unterscheiden. Die Ergebnisse der ANOVA-Berechnung sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2: Zusammenfassung der Ergebnisse des Proficiency Testes

Sample	Method/Extraction	n Labs	Mean [µg/kg]	Variance [µg/kg]	Test value (F)	F-value (table value)
Powder A	With CH_2Cl_2	7	397,76	57671,44	0,002	4,667
	Without CH_2Cl_2	8	402,23	23002,96		
Powder B	With CH_2Cl_2	7	5,10	4,74	1,135	4,667
	Without CH_2Cl_2	8	9,21	99,36		
Paste A	With CH_2Cl_2	7	8,17	4,46	0,166	4,667
	Without CH_2Cl_2	8	8,89	18,38		
Paste B	With CH_2Cl_2	7	164,59	9170,43	0,223	4,667
	Without CH_2Cl_2	8	185,17	5270,50		

Es konnte kein signifikanter Unterschied der Analyseergebnisse in den beiden betrachteten Gruppen festgestellt werden. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass die Verwendung von Chloroform bei der Extraktion von OTA aus Lakritzprodukten keinen Einfluss auf die Qualität der Ergebnisse hat.

Fazit

Als Ergebnis des Proficiency Tests kann zusammenfassend festgestellt werden, dass die Ergebnisse der Analytik von OTA in Süßholz- bzw. Lakritzzerzeugnissen einer deutlichen Variation der einzelnen teilnehmenden Labore unterliegt. Diese Variation ist bei Lakritzpulver ausgeprägter als bei Lakritzpasten. Der Einsatz von Chloroform zur Probenextraktion hat hierbei jedoch keine Auswirkungen auf die Qualität der Ergebnisse.

Aus den Resultaten des Proficiency Testes wurde eine sog. ECO METHOD entwickelt, die auf einer rein wässrigen Probenextraktion basiert. Diese chloroformfreie ECO METHOD wurde im Anschluss in einem europäischen Ringtest auf ihre Performance überprüft.

Literatur

- [1] Bresch H (2000) Ochratoxin A in food containing liquorice. *Nahrung* 44: 276-278.
- [2] Majerus P, Max M, Klafke H, Palavinskas R (2000) Ochratoxin A in Süßholz, Lakritze und daraus hergestellten Erzeugnissen. *Deutsche Lebensmittel Rundschau* 12: 451-454.
- [3] Thompson M, Wood R (1993) International Harmonised Protocol for the Proficiency Testing of (Chemical) Analytical Laboratories, J AOAC Int 76: 926-940.
- [4] Analytical Methods Committee (1989) *Analyst*, 114, 1693-1697.
- [5] Horwitz W, Kamps L R, Boyer K W (1980) Quality Assurance in the Analysis of Foods for Trace Constituents, JAOAC 63: 1344-1354.
- [6] Raters M, Matissek R, van Haren W, Fledderus K (2008) Determination of ochratoxin A in liquorice products using HPLC. *J Agric Food Chem. Part I: Proficiency test* (beim Verlag eingereicht).