



Mykotoxine – Bestimmung von Aflatoxinen, Ochratoxin A, freiem Ochratoxin α, Gliotoxin, Citrinin und Dihydrocitrinon in Urin mittels LC-MS/MS

Biomonitoring-Methode

M. Berger ¹	S. Siodlaczek ²
M. Deharde ¹	T. Göen ^{3,*}
J. Neuhoff ¹	A. Hartwig ^{4,*}
B. Monien ²	MAK Commission ^{5,*}

- 1 Methodenentwicklung, Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAuA), Fachbereich 4 Gefahrstoffe und biologische Arbeitsstoffe, Gruppe 4.2 – Medizinischer Arbeitsschutz, Biomonitoring, Nöldnerstraße 40/42, 10317 Berlin
- 2 Methodenpr
 üfung, Bundesinstitut f
 ür Risikobewertung, Fachgruppe 54 Abt. Lebensmittelsicherheit, Max-Dohrn-Stra
 ße 8–10, 10589 Berlin
- 3 Leitung der Arbeitsgruppe "Analysen in biologischem Material" der Ständigen Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, Henkestraße 9–11, 91054 Erlangen
- 4 Vorsitz der Ständigen Senatskommission zur Pr
 üfung gesundheitssch
 ädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Institut f
 ür Angewandte Biowissenschaften, Abteilung Lebensmittelchemie und Toxikologie, Karlsruher Institut f
 ür Technologie (KIT), Adenauerring 20a, Geb
 äude 50.41, 76131 Karlsruhe
- 5 Ständige Senatskommission zur Pr
 üfung gesundheitssch
 ädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Kennedyallee 40, 53175 Bonn
- * E-Mail: T. Göen (thomas.goeen@fau.de), A. Hartwig (andrea.hartwig@kit.edu), MAK Commission (arbeitsstoffkommission@dfg.de)

Abstract

The working group "Analyses in Biological Materials" of the German Senate Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in the Work Area (MAK Commission) developed and verified the presented biomonitoring method. The aim of this method is the selective and sensitive quantitation of aflatoxins (aflatoxins B1, B2, G1, G2, M1), ochratoxin A (OTA), free ochratoxin α (OT α), gliotoxin (GT), citrinin (CIT) and dihydrocitrinone (DH-CIT) in urine. Sample preparation comprises enrichment and purification of the analytes by solid-phase extraction using OASIS HLB cartridges. Calibration is performed with comparative standards prepared in pooled urine and treated analogously to the samples to be analysed. The aflatoxins, OTA, CIT, and DH-CIT are quantified using isotope-labelled internal standards (ISTDs), whereas $OT\alpha$ and GT are quantified without an ISTD. Determination is carried out by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The method provides reliable and accurate analytical results, as shown by the good precision data with standard deviations below 9% for the aflatoxins, $OT\alpha$, GT and CIT, below 13% for OTA, and below 20% for DH-CIT. Good accuracy data were obtained with mean relative recoveries in the range of 93–107% for the aflatoxins, $OT\alpha$, GT and CIT, in the range of 83-103% for OTA, and in the range of 81-108% for DH-CIT. The method is both selective and sensitive, and has quantitation limits in the range of $0.013-0.022 \ \mu g/l$ for the aflatoxins and OTA and a quantitation limit of 1.0 $\mu g/l$ for OT α , 1.5 μ g/l for GT, 0.0075 μ g/l for CIT, and 0.01 μ g/l for DH-CIT.

Keywords

Mykotoxine; Aflatoxine; Ochratoxin A; Gliotoxin; Citrinin; Schimmelpilzgift; Biomonitoring; Urin; LC-MS/MS

Citation Note:

Berger M, Deharde M, Neuhoff J, Monien B, Siodlaczek S, Göen T, Hartwig A, MAK Commission. Mykotoxine – Bestimmung von Aflatoxinen, Ochratoxin A, freiem Ochratoxin α, Gliotoxin, Citrinin und Dihydrocitrinon in Urin mittels LC-MS/MS. Biomonitoring-Methode. MAK Collect Occup Health Saf. 2025 Jun;10(2):Doc043. https://doi. org/10.34865/bi116265d10_20r

Manuskript abgeschlossen: 14 Jun 2022

Publikationsdatum: 30 Jun 2025

Lizenz: Dieses Werk ist lizenziert unter einer Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz.





1 Kenndaten der Methode

Matrix	Urin		
Analytisches Messprinzip	Flüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS)		
Parameter und entsprechend	e Arbeitsstoffe		
Arbeitsstoff	CAS-Nr.	Parameter	CAS-Nr.
Aflatanin D1 (AED1)	11/0 /5 0	Aflatoxin B1 (AFB1)	1162-65-8
Allatoxin BI (AFBI)	1162-65-8	Aflatoxin M1 (AFM1)	6795-23-9
Aflatoxin B2 (AFB2)	7220-81-7	Aflatoxin B2 (AFB2)	7220-81-7
Aflatoxin G1 (AFG1)	1165-39-5	Aflatoxin G1 (AFG1)	1165-39-5
Aflatoxin G2 (AFG2)	7241-98-7	Aflatoxin G2 (AFG2)	7241-98-7
Ochrotovia A (OTA)	303-47-9	Ochratoxin A (OTA)	303-47-9
Ochratoxin A (OTA)		Ochratoxin α (OT α)	19165-63-0
Gliotoxin (GT)	67-99-2	Gliotoxin (GT)	67-99-2
		Citrinin ^{a)} (CIT)	518-75-2
	518-75-2	Dihydrocitrinon ^{a)} (DH-CIT)	65718-85-6

^{a)}Informationen zur Bestimmung von Citrinin und Dihydrocitrinon finden sich im Anhang.

Zuverlässigkeitskriterien

Aflatoxin B1 (AFB1)

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.) Streubereich bei einer dotierten Konzentration von 0,0375 μg n=6 Bestimmungen	$s_w = 2,9\%$ bzw. 1,8% u = 7,4% bzw. 4,6% g oder 0,13 µg AFB1 pro Liter Urin und
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.) Streubereich bei einer dotierten Konzentration von 0,0375 μg n=6 oder 8 Bestimmungen	$s_w = 5,2\%$ bzw. 3,6% u = 13,4% bzw. 8,6% g oder 0,13 µg AFB1 pro Liter Urin und
Richtigkeit in der Serie:	Wiederfindung (rel.) bei einer dotierten Konzentration von 0,0375 µg n=6 Bestimmungen	r=98,8 % bzw. 100 % g oder 0,13 μg AFB1 pro Liter Urin und
Richtigkeit von Tag zu Tag:	Wiederfindung (rel.) bei einer dotierten Konzentration von 0,0375 µg n=6 oder 8 Bestimmungen	r= 106 % bzw. 93,5 % g oder 0,13 μg AFB1 pro Liter Urin und
Nachweisgrenze:	0,004 µg AFB1 pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	0,013 μg AFB1 pro Liter Urin	

Aflatoxin B2 (AFB2)

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.) Streubereich bei einer dotierten Konzentration von 0,0654 μg n = 6 Bestimmungen	s_w = 2,4 % bzw. 2,2 % u= 6,2 % bzw. 5,6 % oder 0,22 µg AFB2 pro Liter Urin und
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.) Streubereich bei einer dotierten Konzentration von 0,0654 μ g n=6 oder 8 Bestimmungen	s_w = 2,2 % bzw. 3,6 % u= 5,6 % bzw. 8,5 % oder 0,22 µg AFB2 pro Liter Urin und
Richtigkeit in der Serie:	Wiederfindung (rel.) bei einer dotierten Konzentration von 0,0654 μg n = 6 Bestimmungen	r = 104 % bzw. 102 % oder 0,22 µg AFB2 pro Liter Urin und
Richtigkeit von Tag zu Tag:	Wiederfindung (rel.) bei einer dotierten Konzentration von 0,0654 μ g n = 6 oder 8 Bestimmungen	r= 103 % bzw. 95,7 % oder 0,22 μg AFB2 pro Liter Urin und
Nachweisgrenze:	0,007 µg AFB2 pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	0,022 µg AFB2 pro Liter Urin	

Aflatoxin G1 (AFG1)

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.) Streubereich bei einer dotierten Konzentration von 0,0375 μg n = 6 Bestimmungen	s_w = 3,5 % bzw. 2,6 % u= 9,1 % bzw. 6,8 % oder 0,13 µg AFG1 pro Liter Urin und
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.) Streubereich bei einer dotierten Konzentration von 0,0375 μ g n=6 oder 8 Bestimmungen	s_w = 4,9% bzw. 3,5% u = 12,5% bzw. 8,3% oder 0,13 µg AFG1 pro Liter Urin und
Richtigkeit in der Serie:	Wiederfindung (rel.) bei einer dotierten Konzentration von 0,0375 μg n=6 Bestimmungen	r=99,4% bzw. 100% oder 0,13 μg AFG1 pro Liter Urin und
Richtigkeit von Tag zu Tag:	Wiederfindung (rel.) bei einer dotierten Konzentration von 0,0375 μ g n = 6 oder 8 Bestimmungen	r= 107 % bzw. 94,6 % oder 0,13 μg AFG1 pro Liter Urin und
Nachweisgrenze:	0,004 µg AFG1 pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	0,013 µg AFG1 pro Liter Urin	

Aflatoxin G2 (AFG2)

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.) Streubereich bei einer dotierten Konzentration von 0,163 μ g o n=6 Bestimmungen	$s_w = 2,0\%$ bzw. 3,2% u = 5,0% bzw. 8,3% oder 0,54 µg AFG2 pro Liter Urin und
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.) Streubereich bei einer dotierten Konzentration von 0,163 μ g o n=6 oder 8 Bestimmungen	s _w = 2,7 % bzw. 3,3 % u = 7,0 % bzw. 7,8 % oder 0,54 μg AFG2 pro Liter Urin und



Biomonitoring-Methoden – Aflatoxine, ΟΤΑ, ΟΤα, GT, CIT und DH-CIT in Urin

Richtigkeit in der Serie:	Wiederfindung (rel.) bei einer dotierten Konzentration von 0,163 μ g on = 6 Bestimmungen	r= 100 % bzw. 103 % oder 0,54 μg AFG2 pro Liter Urin und
Richtigkeit von Tag zu Tag:	Wiederfindung (rel.) bei einer dotierten Konzentration von 0,163 μ g c n = 6 oder 8 Bestimmungen	r=95,8 % bzw. 96,3 % oder 0,54 μg AFG2 pro Liter Urin und
Nachweisgrenze:	0,02 µg AFG2 pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	0,054 μg AFG2 pro Liter Urin	

Aflatoxin M1 (AFM1)

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.) Streubereich bei einer dotierten Konzentration von 0,066 μg o n = 6 Bestimmungen	s_w = 3,1 % bzw. 3,6 % u= 7,9 % bzw. 9,4 % oder 0,22 µg AFM1 pro Liter Urin und
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.) Streubereich bei einer dotierten Konzentration von 0,066 μ g e n = 6 oder 8 Bestimmungen	s _w =3,6 % bzw. 5,9 % u=9,3 % bzw. 13,9 % oder 0,22 μg AFM1 pro Liter Urin und
Richtigkeit in der Serie:	Wiederfindung (rel.) bei einer dotierten Konzentration von 0,066 µg o n = 6 Bestimmungen	r=108 % bzw. 101 % oder 0,22 μg AFM1 pro Liter Urin und
Richtigkeit von Tag zu Tag:	Wiederfindung (rel.) bei einer dotierten Konzentration von 0,066 μ g o n = 6 oder 8 Bestimmungen	r= 103 % bzw. 96,4 % oder 0,22 μg AFM1 pro Liter Urin und
Nachweisgrenze:	0,007 μg AFM1 pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	0,022 μg AFM1 pro Liter Urin	

Ochratoxin A (OTA)

Standardabweichung (rel.)	$s_w = 1,5 \%$ bzw. 3,6 %
Streubereich	<i>u</i> = 3,9 % bzw. 9,4 %
bei einer dotierten Konzentration von 0,0377 µg n = 6 Bestimmungen	oder 0,13 µg OTA pro Liter Urin und
Standardabweichung (rel.)	<i>s</i> _w =8,8 % bzw. 12,5 %
Streubereich	<i>u</i> = 22,7 % bzw. 30,6 %
bei einer dotierten Konzentration von 0,0377 μg n = 6 oder 7 Bestimmungen	oder 0,13 µg OTA pro Liter Urin und
Wiederfindung (rel.)	<i>r</i> =103 % bzw. 93,5 %
bei einer dotierten Konzentration von 0,0377 µg n = 6 Bestimmungen	oder 0,13 µg OTA pro Liter Urin und
Wiederfindung (rel.)	<i>r</i> =92,5 % bzw. 82,9 %
bei einer dotierten Konzentration von 0,0377 µg n = 6 oder 7 Bestimmungen	oder 0,13 μg OTA pro Liter Urin und
0,004 µg OTA pro Liter Urin	
0,013 µg OTA pro Liter Urin	
	Standardabweichung (rel.) Streubereich bei einer dotierten Konzentration von 0,0377 μ g n = 6 Bestimmungen Standardabweichung (rel.) Streubereich bei einer dotierten Konzentration von 0,0377 μ g n = 6 oder 7 Bestimmungen Wiederfindung (rel.) bei einer dotierten Konzentration von 0,0377 μ g n = 6 Bestimmungen Wiederfindung (rel.) bei einer dotierten Konzentration von 0,0377 μ g n = 6 oder 7 Bestimmungen 0,004 μ g OTA pro Liter Urin 0,013 μ g OTA pro Liter Urin

Ochratoxin α (OT α)

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 1,3\%$ bzw. 4,0%
	Streubereich	u = 3,3 % bzw. 10,4 %
	bei einer dotierten Konzentration von 2,5 μ g od	er 6,25 μg OTα pro Liter Urin und
	n=6 Bestimmungen	
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 5,2\%$ bzw. 6,5\%
	Streubereich	<i>u</i> = 13,2 % bzw. 15,3 %
	bei einer dotierten Konzentration von 2,5 µg od $n=6$ oder 8 Bestimmungen	er 6,25 μg ΟΤα pro Liter Urin und
Richtigkeit in der Serie:	Wiederfindung (rel.)	<i>r</i> =95,4 % bzw. 93,4 %
	bei einer dotierten Konzentration von 2,5 µg od $n=6$ Bestimmungen	er 6,25 μg ΟΤα pro Liter Urin und
Richtigkeit von Tag zu Tag:	Wiederfindung (rel.)	<i>r</i> =99,9% bzw. 99,5%
	bei einer dotierten Konzentration von 2,5 μ g od n=6 oder 8 Bestimmungen	er 6,25 μg ΟΤα pro Liter Urin und
Nachweisgrenze:	0,4 μg OTα pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	1,0 μg OTα pro Liter Urin	

Gliotoxin (GT)

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 1,7 \%$ bzw. 4,9 %
	Streubereich	<i>u</i> = 4,4 % bzw. 12,7 %
	bei einer dotierten Konzentration von 3,75 $\mu\mathrm{g}$ o	oder 8,75 μg GT pro Liter Urin und
	n=6 Bestimmungen	
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 6.6\%$ bzw. 8,6%
	Streubereich	u = 16.9 % bzw. 20,4 %
	bei einer dotierten Konzentration von 3,75 µg o $n = 6$ oder 8 Bestimmungen	oder 8,75 μg GT pro Liter Urin und
Richtigkeit in der Serie:	Wiederfindung (rel.)	<i>r</i> =95,4% bzw. 92,9%
	bei einer dotierten Konzentration von 3,75 µg o $n = 6$ Bestimmungen	oder 8,75 μg GT pro Liter Urin und
Richtigkeit von Tag zu Tag:	Wiederfindung (rel.)	<i>r</i> =97,1 % bzw. 104 %
	bei einer dotierten Konzentration von 3,75 μ g on $n = 6$ oder 8 Bestimmungen	oder 8,75 $\mu g~GT$ pro Liter Urin und
Nachweisgrenze:	0,5 μg GT pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	1,5 µg GT pro Liter Urin	

Citrinin (CIT)^{a)}

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.) Streubereich bei einer dotierten Konzentration von 0,01 μ g, 0 und n = 6 Bestimmungen	s _w =3,1%, 6,0% bzw. 6,5% u=9,4%, 16,5% bzw. 17,2% ,1 μg oder 1,0 μg CIT pro Liter Urin
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.) Streubereich bei einer dotierten Konzentration von 0,01 μ g, 0 und n = 6 Bestimmungen	s _w =6,4%, 5,9% bzw. 2,1% u=17,5% 15,2% bzw. 6,2% ,1 μg oder 1,0 μg CIT pro Liter Urin

Biomonitoring-Methoden – Aflatoxine, OTA, OTα, GT, CIT und DH-CIT in Urin

Richtigkeit in der Serie:	Wiederfindung (rel.) $r = 94,1\%$, 88,6% bzw. 93,3%bei einer dotierten Konzentration von 0,01 µg, 0,1 µg oder 1,0 µg CIT pro Liteund n = 6 Bestimmungen		
Richtigkeit von Tag zu Tag:	Wiederfindung (rel.) bei einer dotierten Konzentration von 0,01 μ g, 0 und n = 6 Bestimmungen	r=99,8 %, 99,0 % bzw. 98,5 %),1 μg oder 1,0 μg CIT pro Liter Urin	
Nachweisgrenze:	0,0003 µg CIT pro Liter Urin		
Bestimmungsgrenze:	0,001 µg CIT pro Liter Urin		

^{a)} Diese Daten wurden von den Prüfern der Methode erhoben. Angaben zur Bestimmung von Citrinin und Dihydrocitrinon finden sich im Anhang.

Dihydrocitrinon (DH-CIT)^{a)}

Präzision von Tag zu Tag:Standardabweichung (rel.) $s_w = 19,3\%, 5,4\%$ bzw. $3,4\%$ Strouboroich $u = 54.7\%, 12.1\%$ bzw. 0.0%	iter
bei einer dotierten Konzentration von 0,01 µg, 0,1 µg oder 1,0 µg DH-CIT pro I Urin und n = 6 Bestimmungen	iter
Richtigkeit in der Serie:Wiederfindung (rel.) $r = 108\%, 80.9\%$ bzw. 88.5% bei einer dotierten Konzentration von $0.01 \ \mu g$, $0.1 \ \mu g$ oder $1.0 \ \mu g$ DH-CIT pro I Urin und $n = 6$ Bestimmungen	iter
Richtigkeit von Tag zu Tag:Wiederfindung (rel.) $r = 108\%, 88,4\%$ bzw. 96,4%bei einer dotierten Konzentration von 0,01 µg, 0,1 µg oder 1,0 µg DH-CIT pro I Urin und n = 6 Bestimmungen	iter
Nachweisgrenze: 0,0075 μg DH-CIT pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze: 0,01 μg DH-CIT pro Liter Urin	

^{a)} Diese Daten wurden von den Pr
üfern der Methode erhoben. Angaben zur Bestimmung von Citrinin und Dihydrocitrinon finden sich im Anhang.

2 Allgemeine Informationen zu den Mykotoxinen

Die Strukturformeln der mit dieser Methode quantifizierbaren Mykotoxine und ihrer Metaboliten sind in Abbildung 1 dargestellt. Eine Methode zur Bestimmung weiterer Mykotoxine im Urin (Deoxynivalenol und Deepoxydeoxynivalenol) wurde von der Kommission publiziert (Berger et al. 2025).



Biomonitoring-Methoden – Aflatoxine, OTA, OTα, GT, CIT und DH-CIT in Urin



Abb.1 Strukturformeln von Aflatoxin B1, Aflatoxin B2, Aflatoxin G1, Aflatoxin G2, Aflatoxin M1, Ochratoxin A, Ochratoxin α, Gliotoxin, Citrinin sowie Dihydrocitrinon

Aflatoxine

Die natürlich vorkommenden Aflatoxine AFB1, AFB2, AFG1 und AFG2 sind Bisfuranocumarinverbindungen, die von verschiedenen Schimmelpilzen der Gattung *Aspergillus*, insbesondere *A. flavus* und *A. parasiticus*, produziert werden (CONTAM et al. 2020).

Aflatoxine wirken beim Menschen genotoxisch und krebserzeugend (CONTAM et al. 2020). Die Kommission hat Aflatoxine in die Kanzerogenitäts-Kategorie 1 und in die Keimzellmutagenitäts-Kategorie 3A eingestuft (Greim 2008).

Aflatoxine können sowohl oral als auch inhalativ aufgenommen werden (Greim 2008). In-vitro-Experimente zeigen für AFB1 zudem eine geringe dermale Penetrationsfähigkeit (Boonen et al. 2012). Toxikokinetische Daten aus Humanexperimenten liegen ausschließlich für AFB1 vor. Nach oraler Aufnahme wird AFB1 rasch über den Gastrointestinaltrakt resorbiert, wobei maximale Konzentrationen im Blutplasma innerhalb einer Stunde erreicht werden (Jubert et al. 2009). Für AFB1 wird eine zweiphasige Kinetik beobachtet: einer schnellen Verteilungs- und Ausscheidungsphase mit einer Plasmahalbwertszeit von ca. 2,9 h folgt eine langsame Ausscheidungsphase mit einer Plasmahalbwertszeit von ca. 64 h. 95% des über den Urin ausgeschiedenen AFB1 wird innerhalb eines Tages ausgeschieden (Jubert et al. 2009). Aflatoxine werden hauptsächlich in der Leber metabolisiert (Al-Jaal et al. 2019), wobei für AFB1 vier Hauptstoffwechselpfade bekannt sind: Demethylierung zu Aflatoxin P1, Ketoreduktion zu Aflatoxicol, Hydroxylierung zu AFM1 und Epoxidierung zum AFB1-8,9-Epoxid (Dohnal et al. 2014). Die durch Oxidierung der Furandoppelbindung gebildeten 8,9-Epoxide von AFB1 und AFG1 können mit der DNA und anderen Nukleophilen reagieren (CONTAM et al. 2020). AFB1 bildet dabei kovalente DNA-Addukte mit N7-Guanin und verursacht DNA-Läsionen (CONTAM et al. 2020).

Die Allgemeinbevölkerung nimmt Aflatoxine durch den Verzehr belasteter Lebensmittel (u. a. von Erdnüssen und Gewürzen) auf (CONTAM et al. 2020). Berufliche Expositionen sind für die Landwirtschaft und Lebensmittelproduktion sowie für die Abfallentsorgung beschrieben (Brera et al. 2002; Ferri et al. 2017; Fromme et al. 2016; Viegas et al. 2013, 2015, 2018 a).

Als Urinbiomarker einer Aflatoxinexposition werden neben den Aflatoxinen selbst (AFB1, AFB2, AFG1 und AFG2) der Metabolit AFM1 und das Guanin-Addukt 8,9-Dihydro-8-(N7-guanyl)-9-hydroxy-AFB1 (AFB1-N7-Gua) verwendet (Al-Jaal et al. 2019). Dabei gelten AFM1 und AFB1-N7-Gua als valide Biomarker einer erst kurz zurückliegenden Aflatoxinexposition (CONTAM et al. 2020). Aufgrund der Verfügbarkeit analytischer Standards wird AFM1 häufiger als Biomarker verwendet (Martins et al. 2021).

Ochratoxin A (OTA)

OTA wird von Schimmelpilzen der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium* gebildet und besitzt krebserzeugende, nephrotoxische, reproduktionstoxische und immuntoxische Eigenschaften (Tao et al. 2018). Die Kommission hat OTA in die Kanzerogenitäts-Kategorie 2 und in die Keimzellmutagenitäts-Kategorie 3B eingestuft (Greim 2003).

Oral aufgenommenes OTA wird gut über den Gastrointestinaltrakt resorbiert und anschließend nahezu vollständig an Serumproteine, wie Albumin, gebunden. Der Anteil ungebundenen OTAs im Blut ist mit 0,02 % gering (Hagelberg et al. 1989).

Die Exkretion erfolgt beim Menschen hauptsächlich über die Nieren. Aufgrund der starken Proteinbindung findet eine glomeruläre Filtration nur in begrenztem Umfang statt und OTA gelangt stattdessen durch tubuläre Sekretion in den Harn. In allen Segmenten des Nephrons wird OTA rückresorbiert, wodurch eine Akkumulation in der Niere erfolgen kann (HBM-Kommission 2014).

Sowohl im Tierversuch als auch beim Menschen (n = 1) wird eine zweiphasige Toxikokinetik beobachtet, wobei einer schnellen Verteilungs- und Ausscheidungsphase mit einer Plasmahalbwertszeit von ca. 20 h eine langsame Ausscheidungsphase mit einer Plasmahalbwertszeit von ca. 35 Tagen folgt (Studer-Rohr et al. 2000). Etwa 50 % des aufgenommenen OTAs werden unmetabolisiert ausgeschieden. OTA wird in Nieren, Leber und Darm verstoffwechselt. Hauptmetabolit ist OT α , das zum Teil auch als Glucuronid und/oder Sulfatester vorliegt (Muñoz et al. 2010).

Die Allgemeinbevölkerung nimmt OTA durch den Verzehr belasteter Lebensmittel (u.a. von Kaffee und Getreideprodukten) auf. Berufliche Expositionen sind für die Landwirtschaft und Lebensmittelproduktion (Brera et al. 2002; Fromme et al. 2016; Viegas et al. 2019) sowie für die Abfallentsorgung (Degen et al. 2003; Viegas et al. 2018 b) beschrieben. Aufgrund der langen Plasmahalbwertszeit werden chronische Expositionen (über mehrere Wochen) durch eine Bestimmung der OTA-Konzentration im Serum/Plasma erfasst. OTA-Konzentrationen im Urin hingegen bilden akute Expositionen besser ab (Duarte et al. 2011; EFSA 2006).

Gliotoxin (GT)

GT ist ein schwefelhaltiges Mykotoxin, das zur Gruppe der Epipolythiodioxopiperazine gehört und von verschiedenen Schimmelpilzen, u.a. *Aspergillus fumigatus, Eurotium chevalieri, Trichoderma virens* und *Neosartorya pseudofischeri,* gebildet wird (Scharf et al. 2016). GT wirkt immunsuppressiv, genotoxisch und zytotoxisch (Nieminen et al. 2002 a, b). Darüber hinaus steht es unter Verdacht einen Einfluss auf die Virulenz von *A. fumigatus* zu haben und dadurch die Ausbildung einer invasiven Aspergillose zu fördern (Hof und Kupfahl 2009). Gliotoxin wurde noch nicht von der Kommission bewertet.

Über Toxikokinetik und den Metabolismus im menschlichen Körper liegen kaum Informationen vor. De Santis et al. (2017) konnten in 71,6 % der Urinproben von Kindern GT mit einer maximalen Konzentration von 114,7 µg/l bestimmen. Darüber hinaus wird der Einsatz von GT als Biomarker in Serum- und Urinproben zur Früherkennung von invasiver Aspergillose diskutiert (Cerqueira et al. 2014; Gao et al. 2019).

Hohe Konzentrationen des ubiquitär auftretenden *A. fumigatus* werden u. a. in Bioaerosolproben in der Bioabfallbehandlung beobachtet (Fischer et al. 2000). Nur wenige Studien haben GT in Luft- und Staubproben im landwirtschaftlichen Sektor untersucht. In Staubproben aus Getreidelagern lagen GT-Konzentrationen von bis zu 319,6 μ g/g vor (Tangni und Pussemier 2007). Lanier et al. (2010) berichten von Stallluftkonzentrationen von bis zu 3,7 μ g/m³ bei der Verfütterung von Maissilage, Heu und Ölsaaten.

Systematische Untersuchungen über die Verunreinigung von Lebensmitteln mit GT und zur ernährungsbedingten Hintergrundbelastung liegen nicht vor (Scharf et al. 2016).

Citrinin (CIT)

CIT ist ein Polyketid, das von Pilzen als sekundäres Stoffwechselprodukt gebildet wird und nach *Penicillium citrinum* benannt ist, aus dem es erstmals isoliert wurde. CIT wird von verschiedenen Spezies der Gattungen *Penicillium, Aspergillus*, sowie *Monascus* gebildet und kann in unterschiedlichen Klimazonen nachgewiesen werden (CONTAM 2012).

CIT wird häufig zusammen mit dem strukturell und toxikologisch ähnlichem OTA gefunden. Die Niere ist bei verschiedenen Säugetierspezies das primäre Zielorgan beider Mykotoxine (CONTAM 2012; EFSA 2006). Die International Agency for Research on Cancer (IARC) hat CIT – wegen eines Verdachts auf Kanzerogenität bei Ratten und unzureichender Beweise beim Menschen – in Gruppe 3 eingestuft (nicht klassifizierbar hinsichtlich der Humankanzerogenität) (IARC 1986). Die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (European Food Safety Authority; EFSA) konnte das mögliche kanzerogene Potential von CIT nicht bewerten (CONTAM 2012). CIT wurde bisher noch nicht von der Kommission bewertet.

CIT kommt vor allem in gelagertem Getreide und Getreideprodukten vor, aber auch in anderen mit Schimmelpilzen belasteten pflanzlichen Produkten, wie Früchten, Kräutern und Gewürzen. CIT entsteht zumeist während der Lagerung, wobei Konzentrationen bis zu 1500 µg/kg nachgewiesen wurden (CONTAM 2012). Sehr hohe Gehalte an CIT (> 2000 µg/kg) wurden in Rotschimmelreis nachgewiesen, der als Konservierungsmittel und Farbstoff in asiatischen Lebensmitteln verwendet und als Nahrungsergänzungsmittel vermarktet wird (Degen et al. 2022).

CIT wird vor allem mit der Nahrung aufgenommen, aber eine dermale (Boonen et al. 2012) und inhalative (Föllmann et al. 2016) Aufnahme scheint ebenfalls möglich zu sein. Untersuchungen zur CIT-Kinetik beim Menschen zeigen nach oraler Aufnahme eine schnelle Resorption und eine mittlere Halbwertszeit im Blutplasma von 9,4 h (Degen et al. 2018). CIT wird weitgehend zu DH-CIT verstoffwechselt, das zusammen mit der nicht metabolisierten Verbindung mit dem Urin ausgeschieden wird. Die mittleren Exkretions-Halbwertszeiten von CIT und DH-CIT im Urin betragen



6,7 h bzw. 8,9 h. Dabei werden etwa 40 % (Summe von CIT und DH-CIT) der aufgenommenen Menge innerhalb von 24 h ausgeschieden (Degen et al. 2018).

3 Grundlage des Verfahrens

Das hier beschriebene Verfahren dient der Erfassung von Aflatoxinen (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, AFM1), OTA, freiem OT α und GT in Humanurin mittels LC-MS/MS. Die Probenvorbereitung umfasst die Aufreinigung der Proben mittels Festphasenextraktion an OASIS-HLB-Kartuschen gefolgt von einer Aufkonzentrierung der Eluate im Stickstoffstrom. Die Kalibrierung erfolgt mit Vergleichsstandards, die in Urin angesetzt und in der gleichen Weise behandelt werden wie die zu analysierenden Proben. Die Quantifizierung erfolgt für die Aflatoxine mit ¹³C₁₇-AFB1, für OTA mit ¹³C₂₀-OTA und für OT α und GT ohne ISTD.

Bei der Methodenprüfung wurden zusätzlich CIT und dessen Metabolit DH-CIT in die Methode integriert. Informationen zur Bestimmung dieser Parameter und die entsprechenden Validierungsdaten finden sich im Anhang.

4 Geräte, Chemikalien und Lösungen

4.1 Geräte

- HPLC-Anlage mit binärer Pumpe, Autosampler, Säulenofen und Degasser (z.B. Nexera XR, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg)
- Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (z. B. AB SCIEX QTRAP 5500, AB SCIEX Germany GmbH, Darmstadt)
- Analytische HPLC-Trennsäule (z. B. Kinetex[®] Core-Shell Technologie; Kinetex[®] 2,6 μm Biphenyl 100 Å, 100 × 2,1 mm, Phenomenex Ltd. Deutschland, Aschaffenburg)
- UHPLC-Vorsäule (z. B. Nr. AJO-9209, SecurityGuard ULTRA Cartridges, Biphenyl 2,1 mm ID, inklusive Säulenhalter, Phenomenex Ltd. Deutschland, Aschaffenburg)
- Stickstoffgenerator (z. B. cmc Instruments GmbH, Eschborn)
- Reinstwasseranlage (z. B. Veolia Water Solutions & Technologies, Saint-Maurice, Frankreich)
- Laborzentrifuge (z. B. Fisher Scientific GmbH, Schwerte)
- Analysenwaage (z. B. Sartorius AG, Göttingen)
- pH-Meter (z.B. Mettler-Toledo GmbH, Gießen)
- Abblasstation (z. B. Biotage Sweden AB, Uppsala, Schweden)
- Ultraschallbad zum Entgasen der Eluenten (z. B. SONOREX SUPER RK 510 H, BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin)
- Rotationsmischer (z. B. Cole-ParmerTM StuartTM, Fisher Scientific GmbH, Schwerte)
- Vortex-Schüttler (z. B. IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen)
- Vorrichtung für die Festphasenextraktion (z.B. VisiPrepTM SPE-Vakuumverteiler, Supelco[®], Merck KGaA, Darmstadt)
- Variabel einstellbare Pipetten mit passenden Pipettenspitzen (z. B. Eppendorf AG, Hamburg)
- 2500-ml-Glasflaschen mit Schraubverschluss (z.B. DURAN[®], Schott AG, Mainz)
- Verschiedene Messkolben und Bechergläser (z. B. DURAN®, Schott AG, Mainz)
- 10-ml-Braunglasflaschen (z. B. DURAN[®], Schott AG, Mainz)
- 0,2-µm-Spritzenvorsatzfilter (13 mm, regenerierte Zellulose) (z.B. CS Chromatographie Service GmbH, Langerwehe)

- SPE-Kartuschen, OASIS[®] HLB, 150 mg/6 ml (z. B. Waters GmbH, Eschborn)
- 15-ml-Polypropylen-Zentrifugenröhrchen mit konischem Boden (z. B. COTECH Vertriebs GmbH, Berlin)
- 13-ml-Polypropylen-Zentrifugenröhrchen mit rundem Boden (z. B. COTECH Vertriebs GmbH, Berlin)
- 5-ml-Luer-Lock-Einmalspritzen mit Einmal-Injektionskanülen (z. B. Omnifix® Luer Solo, B. Braun SE, Melsungen)
- 1,5-ml-Polypropylen-Gewindefläschchen mit Schraubkappen (z. B. MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren)
- Urinbecher aus Polypropylen (z. B. Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht)

4.2 Chemikalien

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

- Acetonitril, LC-MS (z. B. Nr. 15037, Burdick & JacksonTM, Honeywell International Inc., Morristown, USA)
- Ammoniumacetat (z. B. Nr. 15681570, Honeywell FlukaTM, Fisher Scientific GmbH, Schwerte)
- Essigsäure, LiChropur[®], 100 % (z.B. Nr. 533001, Supelco[®], Merck KGaA, Darmstadt)
- Isopropanol, LiChrosolv[®], für die Hinterkolbenspülung der Pumpen (z.B. Nr. 102781, Supelco[®], Merck KGaA, Darmstadt)
- Methanol, LiChrosolv[®], ≥ 99,97 % (z. B. Nr. 106035, Supelco[®], Merck KGaA, Darmstadt)
- Salzsäure, ROTIPURAN[®], 37 % (z. B. Nr. 4625.1, Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe)
- Hochreines Wasser (z. B. Veolia Water Solutions & Technologies, Saint-Maurice, Frankreich)
- Nativer Urin von Freiwilligen mit möglichst geringen Mykotoxin-Hintergrundgehalten

4.3 Referenzstandards und ISTDs

- Aflatoxin B1, 2 µg/ml in Acetonitril (z. B. Romer Labs Division Holding GmbH, Getzersdorf, Österreich)
- ¹³C₁₇-Aflatoxin B1, 0,501 μg/ml in Acetonitril (z. B. Nr. DRE-A10047150AL-0.5, LGC Standards GmbH, Wesel)
- Aflatoxin B2 (z. B. Nr. A9887, Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt)
- Aflatoxin G1, 2 µg/ml in Acetonitril (z. B. Romer Labs Division Holding GmbH, Getzersdorf, Österreich)
- Aflatoxin G2, 0,51 µg/ml in Acetonitril (z. B. Romer Labs Division Holding GmbH, Getzersdorf, Österreich)
- Aflatoxin M1, 0,506 µg/ml in Acetonitril (z. B. Romer Labs Division Holding GmbH, Getzersdorf, Österreich)
- Ochratoxin A, 10,05 µg/ml in Acetonitril (z.B. Romer Labs Division Holding GmbH, Getzersdorf, Österreich)
- ¹³C₂₀-Ochratoxin A, 10,10 μg/ml in Acetonitril (z. B. Romer Labs Division Holding GmbH, Getzersdorf, Österreich)
- Gliotoxin (z. B. Nr. G9893, Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt)
- Ochratoxin α, 10,2 µg/ml in Acetonitril (z. B. Romer Labs Division Holding GmbH, Getzersdorf, Österreich)

4.4 Lösungen

• Eluent A

In einen 1000-ml-Messkolben werden 77,08 mg Ammoniumacetat eingewogen und in ein wenig hochreinem Wasser gelöst. Anschließend wird 1 ml Essigsäure in den Kolben pipettiert und dieser mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.

• Eluent B

In einen 1000-ml-Messkolben werden 77,08 mg Ammoniumacetat eingewogen und in ein wenig Methanol gelöst. Anschließend wird 1 ml Essigsäure in den Kolben pipettiert und dieser mit Methanol bis zur Markierung aufgefüllt.

- Gradientenlösung (Eluent A : Eluent B; 98 : 2 (V : V))
 2 ml Eluent B werden in einen 100-ml-Messkolben pipettiert, anschließend wird der Messkolben mit Eluent A bis zur Markierung aufgefüllt.
- verdünnte Salzsäure (55 mM)
 In einem 1000-ml-Messkolben werden ca. 550 ml hochreines Wasser vorgelegt und 4,56 ml der 37%igen Salzsäure dazugegeben. Anschließend wird der Messkolben mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.
- Methanol (2 % in hochreinem Wasser) In einem 100-ml-Messkolben werden 2 ml Methanol vorgelegt. Anschließend wird der Messkolben mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.

Die Lösungen werden bei Raumtemperatur gelagert.

4.5 Interner Standard (ISTD)

• ISTD-Dotierlösung (ISTD-DL; 30,12 µg $^{13}C_{17}$ -AFB1/l und 30,3 µg $^{13}C_{20}$ -OTA/l) In einem 1,5-ml-Polypropylengewindefläschchen werden 60 µl des $^{13}C_{17}$ -AFB1-Standards und 3 µl des $^{13}C_{20}$ -OTA-Standards mit 937 µl Acetonitril gemischt.

Die ISTD-Dotierlösung wird bei –20 °C gelagert und muss wöchentlich neu hergestellt werden.

4.6 Kalibrierstandards

• AFB2-Arbeitslösung I (100 mg/l)

5 mg AFB2 werden in einen 50-ml-Messkolben eingewogen und 5 ml Methanol dazu pipettiert. Anschließend wird der Messkolben mit Acetonitril bis zur Markierung aufgefüllt und das AFB2 durch Umschütteln gelöst.

Die Arbeitslösung I wird in 10-ml-Braunglasflaschen mit Plastikschraubverschluss portioniert und bei –20 °C gelagert.

AFB2-Arbeitslösung II (1 mg/l)
 10 μl der AFB2-Arbeitslösung I werden mit 990 μl Acetonitril versetzt und gemischt.

Die AFB2-Arbeitslösung II wird für jede Kalibrierung und zum Ansetzen der Qualitätskontrollproben neu hergestellt.

OTA-Arbeitslösung (2,01 mg/l)
 40 µl der OTA-Stammlösung (10,05 mg/l Acetonitril) werden mit 160 µl Acetonitril versetzt und die Lösung gut gemischt.

Die OTA-Arbeitslösung wird für jede Kalibrierung und zum Ansetzen der Qualitätskontrollproben neu hergestellt.

GT-Arbeitslösung I (500 mg/l)
 5 mg GT werden in einen 10-ml-Messkolben eingewogen und in ein wenig Acetonitril gelöst. Der Messkolben wird anschließend bis zur Markierung mit Acetonitril aufgefüllt.

Die GT-Arbeitslösung I wird in 1,5-ml-Polypropylengewindefläsch
chen portioniert und bei −20 °C gelagert.

 GT-Arbeitslösung II (100 mg/l) In 1,5-ml-Polypropylengewindefläschchen werden 200 µl der GT-Arbeitslösung I mit 800 µl Acetonitril versetzt und die Lösung wird gut gemischt.

Die GT-Arbeitslösung II wird für jede Kalibrierung und zum Ansetzen der Qualitätskontrollproben neu hergestellt.

Dotierlösung 1 (DL 1) Die Dotierlösung 1 wird nach dem in Tabelle 1 gegebenen Pipettierschema in einem 1,5-ml-Polypropylengewindefläschchen angesetzt.

Analyt	Lösung	Volumen [µl]	Acetonitril [µl]	Analytkonzentration [µg/l]
AFB1	AFB1-Stammlösung	10		20
AFB2	AFB2-Arbeitslösung II	35		35
AFG1	AFG1-Stammlösung	10	(05	20
AFG2	AFG2-Stammlösung	170	095	86,7
AFM1	AFM1-Stammlösung	70		35,4
OTA	OTA-Arbeitslösung	10		20,1

Tab. 1 Pipettierschema zur Herstellung der Dotierlösung 1

•

- Dotierlösung 2 (DL 2; 500 μg OTα/l) In einem 1,5-ml-Polypropylengewindefläschchen werden 50 μl der OTα-Stammlösung mit 950 μl Methanol gemischt.
- Dotierlösung 3 (DL 3; 1000 µg GT/l)

In einem 1,5-ml-Polypropylengewindefläsch
chen werden 10 μ l der GT-Arbeitslösung II mit 990 μ l Acetonitril gemischt.

Die Dotierlösungen 1 bis 3 werden bei –20 °C gelagert und müssen wöchentlich neu hergestellt werden.

Die Kalibrierstandards werden in möglichst unbelastetem Urin angesetzt. Zur Herstellung der Kalibrierstandards werden die Dotierlösungen 1 bis 3 gemäß dem in Tabelle 2 gegebenen Pipettierschema zu 4 ml Urin pipettiert. In Tabelle 3 sind die Konzentrationen der Analyten in den jeweiligen Kalibrierstandards aufgeführt. Die Aufarbeitung der Kalibrierlösungen erfolgt analog zu den zu vermessenden Proben wie unter Abschnitt 5 angegeben, allerdings ohne Zugabe von ISTD.

Lösung	DL 1 [µl]	DL 2 [µl]	DL 3 [µl]	ISTD-DL [µl]
DB ^{a)}	0	0	0	0
B ^{b)}	0	0	0	20
K1	2,5	8	6	20
K2	5	16	12	20
K3	10	24	18	20
K4	15	32	24	20
K5	20	40	30	20
K6	30	60	40	20

Tab. 2 Pipettierschema zur Herstellung der Kalibrierstandards

^{a)} Doppelblindprobe

^{b)} Blindprobe

Biomonitoring-Methoden – Aflatoxine, OTA, OTα, GT, CIT und DH-CIT in Urin

Lösung	Konzentration [µg/l]									
	¹³ C ₁₇ -AFB1	¹³ C ₂₀ -OTA	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	AFM1	ΟΤΑ	ΟΤα	GT
DB ^{a)}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B ^{b)}	0,15	0,15	0	0	0	0	0	0	0	0
K1	0,15	0,15	0,013	0,022	0,013	0,054	0,022	0,013	1	1,5
K2	0,15	0,15	0,025	0,044	0,025	0,108	0,044	0,025	2	3
K3	0,15	0,15	0,05	0,088	0,05	0,217	0,088	0,05	3	4,5
K4	0,15	0,15	0,075	0,131	0,075	0,325	0,133	0,075	4	6
K5	0,15	0,15	0,1	0,175	0,1	0,434	0,177	0,101	5	7,5
K6	0,15	0,15	0,15	0,262	0,15	0,65	0,265	0,151	7,5	10

Tab. 3 Konzentration der Analyten und ISTDs in den Kalibrierstandards

^{a)} Doppelblindprobe

^{b)} Blindprobe

4.7 Kontrollstandardlösung

Die Messung einer Kontrollstandardlösung wird zur Überprüfung des equilibrierten Messsystems eingesetzt (Überprüfung von Druck, Peakintensitäten und Retentionszeiten). Der Kontrollstandard wird zu Beginn und am Ende einer Sequenz injiziert.

Zur Herstellung der Kontrollstandardlösung werden in einem 1,5-ml-Polypropylengewindefläschchen jeweils 20 μ l der Dotierlösungen 1 bis 3 sowie 20 μ l der ISTD-Dotierlösung mit 920 μ l Gradientenlösung gemischt. Die Lösung wird bei –20 °C gelagert und wöchentlich frisch angesetzt. In Tabelle 4 sind die Konzentrationen der Analyten und ISTDs in der Kontrollstandardlösung aufgeführt.

 Tab. 4
 Konzentrationen der Analyten und ISTDs in der Kontrollstandardlösung

Analyt/ISTD	Konzentration [µg/l]
AFB1	0,4
AFB2	0,7
AFG1	0,4
AFG2	1,7
AFM1	0,71
OTA	0,4
ΟΤα	10
GT	20
¹³ C ₁₇ -AFB1	0,6
¹³ C ₂₀ -OTA	0,6

5 Probenahme, Probenaufbereitung und Festphasenextraktion

5.1 Probenahme

Die Urinproben werden in Polypropylen-Urinbechern gesammelt, aliquotiert und bis zur Probenaufbereitung bei -20 °C gelagert.

5.2 Probenaufbereitung

Vor der Probenaufbereitung werden die Urinproben auf Raumtemperatur gebracht und homogenisiert. Aus der Urinprobe werden 4 ml in ein 13-ml-Zentrifugenröhrchen mit rundem Boden gegeben, mit 4 ml hochreinem Wasser und 20 µl der ISTD-Dotierlösung versetzt und gut durchmischt. Anschließend werden die Urinproben bei 10 °C mit 2045 × g für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues 13-ml-Zentrifugenröhrchen mit rundem Boden dekantiert.

5.3 Festphasenextraktion

Die Analyten werden mit Hilfe von Oasis-HLB-Kartuschen angereichert. Die Kartuschen werden mit 5 ml Methanol und anschließend mit 5 ml verdünnter Salzsäure (55 mM, pH=1,3) konditioniert. Die Proben werden portionsweise ohne Anlegen eines Vakuums aufgegeben (Flussrate ca. 1 ml/min) und die 13-ml-Zentrifugenröhrchen mit 2 ml hochreinem Wasser gespült, das ebenfalls auf die Kartuschen gegeben wird. Nach Aufgabe der Proben wird die stationäre Phase jeweils mit 2 ml 2 %igem Methanol in hochreinem Wasser gewaschen. Die Kartuschen werden durch ein kurzes Anlegen von Vakuum (ca. 5 min) getrocknet. Bei der beschriebenen Konditionierung der Kartuschen und bei der Probenaufgabe dürfen die Kartuschen nicht trocken laufen.

Die Analyten werden mit 2 × 2,5 ml Methanol in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen mit konischem Boden, in dem 200 µl hochreines Wasser vorgelegt wurden, eluiert. Die Kartuschen werden unter leichtem Vakuum kurz trocken gesaugt. Anschließend werden die Eluate bei 40 °C unter Stickstoffstrom auf ca. 200 µl eingeengt. Die eingeengten Eluate werden mit 300 µl Gradientenlösung versetzt, auf einem Vortex-Schüttler homogenisiert und anschließend über Spritzenvorsatzfilter in 1,5-ml-Gewindefläschchen aus Polypropylen filtriert.

6 Instrumentelle Arbeitsbedingungen

Die analytischen Messungen erfolgten an einer Gerätekonfiguration bestehend aus einem Flüssigkeitschromatographen (HPLC-System: Nexera XR, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg) und einem Tandem-Massenspektrometer (AB SCIEX QTRAP 5500, AB SCIEX Germany GmbH, Darmstadt).

6.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

HPLC-Säule:	Kinetex [®] Biphenyl; 2,6 μm; 100 × 2,1 mm
Vorsäule:	UHPLC-Vorsäule Biphenyl; 2,1 mm ID
Temperatur Säulenofen:	40 °C
Temperatur Autosampler:	15 °C
Injektionsvolumen:	20 µl
Eluent A:	0,1 % Essigsäure und 1 mM Ammonium acetat in hochreinem Wasser
Eluent B:	0,1 % Essigsäure und 1 mM Ammoniumacetat in Methanol
Gradientenprogramm:	siehe Tabelle 5

Zeit [min]	Fluss [ml/min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0,01	0,45	98	2
2	0,45	98	2
5	0,45	20	80
5,2	0,45	2	98
8	0,45	2	98
8,01	0,45	98	2
11	0,45	98	2

Tab. 5 Gradientenprogramm für die Bestimmung von Aflatoxinen, Ochratoxin A, freiem Ochratoxin α und Gliotoxin in Urin

6.2 Tandem-Massenspektrometrie

Quelle:	TurboSpray
Ionisierungsmodus:	ESI, positiv bzw. negativ
Ionenspray-Spannung:	5500 V bzw. –4500 V
Quellentemperatur:	500 °C
Nebuliser-Gas:	Stickstoff, 80 psi
Turbo-Heater-Gas:	Stickstoff, 80 psi
Curtain-Gas:	Stickstoff, 35 psi
Kollisionsgas:	Stickstoff
Scan-Modus:	Multiple Reaction Monitoring (MRM)
Dwell-Time:	20 ms bzw. 60 ms
Parameterspezifische Einstellungen:	siehe Tabelle 6

Die gerätespezifischen Parameter müssen vom Anwender individuell für das eingesetzte MS/MS-System ermittelt und eingestellt werden. Die in diesem Abschnitt genannten gerätespezifischen Parameter sind für das für die Methodenentwicklung verwendete System bestimmt und optimiert worden.

Für die Analyten wurden jeweils zwei Massenübergänge ausgewählt. Ein Übergang dient zur Quantifizierung (Quantifier) und der andere zur Bestätigung (Qualifier). Für die ISTDs wurden zwei bzw. drei Massenübergänge verwendet. Die ausgewählten Übergänge sind zusammen mit den Retentionszeiten und weiteren MRM-Parametern in Tabelle 6 zusammengefasst. Die angegebenen Retentionszeiten dienen nur als Anhaltspunkt, der Anwender muss sich von der Trennleistung der von ihm verwendeten LC-Säule und dem daraus resultierenden Retentionsverhalten der Substanzen überzeugen.

Tab. 6Retentionszeiten und MRM-Parameter f
ür die Bestimmung von Aflatoxinen, Ochratoxin A, freiem Ochratoxin α und Gliotoxin
in Urin

Analyt/ISTD	Retentionszeit [min]	Q1 (<i>m/z</i>)	Q3 (<i>m/z</i>)	DP [V]	EP [V]	CE [V]	CXP [V]
AFB1 7,2	7.0	285 ^{a)} 313 241	285 ^{a)}	100	10	31	18
	1,2		241	100	10	49	18
AFB2	7,06	315	287,2 ^{a)}	96	10	37	18
			259,2	96	10	43	18

Tab.6 (Fortsetzung	J)
--------------------	----

Analyt/ISTD	Retentionszeit [min]	Q1 (<i>m/z</i>)	Q3 (<i>m/z</i>)	DP [V]	EP [V]	CE [V]	CXP [V]
4.504	× 05		243 ^{a)}	80	10	37	12
AFGI	6,95	329	200	80	10	53	12
A ECO	(8)	221	313,2	111	10	35	18
AFG2	6,82	331	245,2 ^{a)}	111	10	43	14
A EM 1		220.07	272,9 ^{a)}	91	10	33	16
Агмп	0,00	329,07	228,9	91	10	55	14
	(7)	404	239 ^{a)}	91	10	32	12
OIA	6,72		102	91	10	105	12
			377,2 ^{a)}	44	10	19	34
¹³ C ₂₀ -OTA	6,72	424,1	203,1	60	10	59	12
			250,1	44	10	31	33
13C AEP1	7.0	220.2	301,2 ^{a)}	80	10	35	16
	1,2	330,3	284,3	80	10	47	16
ΟΤα	F 70	955	167 ^{a)}	-55	-10	-34	-11
	5,78	255	211,1	-55	-10	-22	-15
GT	6 3 2	205.1	261 ^{a)}	-35	-10	-14	-14
61	0,32	325,1	243,2	-35	-10	-22	-17

^{a)} Quantifier

7 Analytische Bestimmung

Von den nach Abschnitt 5 aufgearbeiteten Proben werden jeweils 20 µl in das LC-MS/MS-System injiziert. Die Identifizierung der Analyten erfolgt anhand der spezifischen Ionenübergänge und Retentionszeiten. Die Abbildungen 2 und 3 zeigen beispielhaft Chromatogramme des K1-Kalibrierstandards.





Abb. 2 Quantifier-MRM-Spuren für a) Aflatoxin B1 (0,013 µg/l; *m/z* 313 → 285), b) Aflatoxin G1 (0,013 µg/l; *m/z* 329 → 243), c) Aflatoxin B2 (0,022 µg/l; *m/z* 315 → 287,2) sowie d) Aflatoxin G2 (0,054 µg/l; *m/z* 331 → 245,2)



Abb. 3 Quantifier-MRM-Spuren für a) Aflatoxin M1 (0,022 μ g/l; *m/z* 329 \rightarrow 272,9), b) Gliotoxin (1,5 μ g/l; *m/z* 325,1 \rightarrow 261), c) Ochratoxin A (0,013 μ g/l; *m/z* 404 \rightarrow 239) sowie d) Ochratoxin α (1 μ g/l; *m/z* 255 \rightarrow 167)

8 Kalibrierung

Die unter Abschnitt 4.6 beschriebenen Kalibrierlösungen werden so wie die Proben aufgearbeitet (vgl. Abschnitt 5, ohne Zugabe von ISTD) und mittels LC-MS/MS (vgl. Abschnitt 6) analysiert.

Die Erstellung der Kalibriergeraden für die Aflatoxine und OTA erfolgt durch Auftragung der Quotienten aus der Peakfläche des Analyten und der Peakfläche des isotopenmarkierten ISTDs gegen den Quotienten der dotierten Konzentration des Analyten und der dotierten Konzentration des isotopenmarkierten ISTDs. Für die Quantifizierung der Aflatoxine und OTA werden die Peakflächen auf ${}^{13}C_{17}$ -AFB1 bzw. ${}^{13}C_{20}$ -OTA bezogen. Die Erstellung der Kalibriergeraden für OT α und GT erfolgt durch Auftragen der Peakflächen gegen die jeweils dotierte Analyt-konzentration. Für alle Analyten lag in den untersuchten Konzentrationsbereichen eine lineare Korrelation mit Korrelationskoeffizienten von r \ge 0,995 vor (1/x-Gewichtung). Die Abbildung 4 zeigt beispielhaft die Kalibriergeraden für die Bestimmung der Aflatoxine sowie von OTA, OT α und GT in Urin.



Abb.4 Kalibriergeraden für die Bestimmung von a) Aflatoxin B1 und Aflatoxin G1, b) Aflatoxin B2 und Aflatoxin G2, c) Aflatoxin M1 und Ochratoxin A sowie d) freiem Ochratoxin α und Gliotoxin in Urin (lineare Regression nach 1/x-Gewichtung)

9 Berechnung der Analysenergebnisse

Zur Berechnung der Gehalte an Aflatoxinen und OTA in einer Urinprobe wird der Quotient aus der Peakfläche des jeweiligen Analyten und der Peakfläche des ISTDs gebildet. Mithilfe der zur Analysenserie gehörigen Kalibrierfunktion kann aus dem ermittelten Quotienten der Analytgehalt in μ g/l Urin berechnet werden. Für OT α und GT wird der Analytgehalt in μ g/l Urin mithilfe der zur Analysenserie gehörigen Kalibrierfunktion aus der ermittelten Peakfläche berechnet.

10 Standardisierung der Messergebnisse und Qualitätssicherung

Zur Sicherung der Qualität der Analysenergebnisse wird gemäß den Richtlinien der Bundesärztekammer und den Angaben in dem von der Kommission veröffentlichten allgemeinen Kapitel verfahren (Bader et al. 2010; Bundesärztekammer 2014).

Im Rahmen der Qualitätssicherung werden mit jeder Kalibrierreihe in Urin angesetzte Blind- und Doppelblindproben gemessen. Die Doppelblindproben enthalten weder Analyt noch ISTD, die Blindproben werden mit den ISTDs dotiert, aber nicht mit den Analyten. Zudem wird in jeder Analysenserie ein Reagenzienleerwert (hochreines Wasser anstelle der Urinprobe) aufgearbeitet und gemessen.

Zur Präzisionskontrolle werden in jeder Analysenserie mindestens zwei Qualitätskontrollproben mit bekannter Konzentration der Analyten mituntersucht. Da käufliches Material nicht zur Verfügung steht, wird das Kontrollmaterial selbst hergestellt, indem Urin mit Standardlösungen der Analyten im relevanten Konzentrationsbereich dotiert wird (siehe Tabellen 7 und 8). Zusätzlich werden in jeder Sequenz die Kontrollstandardlösung (siehe Abschnitt 4.7) sowie undotierte Gradientenlösung mitgemessen und Spülschritte mit Methanol durchgeführt.

Lösung	DL 1 [µl]	DL 2 [μl]	DL 3 [µl]	ISTD-DL [µl]	Urin [µl]
$Q_{\rm low}$	7,5	20	15	20	4000
$Q_{\rm high}$	25	50	35	20	4000

 Tab. 7
 Pipettierschema zur Herstellung der Qualitätskontrollproben

			•
Tab. 8	Konzentration der Analyt	en und ISTDs in den	Qualitätskontrollproben

Lösung	Konzentration [µg/l]									
	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	AFM1	ΟΤΑ	ΟΤα	GT	¹³ C ₁₇ -AFB1	¹³ C ₂₀ -OTA
Q_{low}	0,0375	0,0654	0,0375	0,163	0,066	0,0377	2,5	3,75	0,15	0,15
$Q_{\rm high}$	0,13	0,22	0,13	0,54	0,22	0,13	6,25	8,75	0,15	0,15

11 Beurteilung des Verfahrens

Die Zuverlässigkeit des Verfahrens wurde durch eine umfassende Validierung sowie durch Nachstellung und Prüfung der Methode in einem zweiten, unabhängigen Labor bestätigt.

Von den Methodenprüfern wurden zusätzlich das Mykotoxin CIT und dessen Metabolit DH-CIT in die Methode integriert. Die Validierungsdaten für diese beiden Parameter sind im Anhang aufgeführt, allerdings wurden diese nicht unabhängig überprüft.

11.1 Präzision

Die Präzision in der Serie wurde bestimmt, indem die hergestellten Qualitätskontrollproben Q_{low} und Q_{high} sechsfach parallel aufgearbeitet und analysiert wurden. Die ermittelten Präzisionsdaten sind in Tabelle 9 dargestellt.

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Anzahl <i>n</i>	Gemessene Konzentration [µg/l]	Standardabweichung (rel.) s _w [%]	Streubereich <i>u</i> [%]
A ED1	0,0375	6	0,0370	2,9	7,4
AFBI	0,13	6	0,1302	1,8	4,6
A ED 9	0,0654	6	0,0683	2,4	6,2
AFD2	0,22	6	0,2239	2,2	5,6
A EC1	0,0375	6	0,0373	3,5	9,1
AFGI	0,13	6	0,1303	2,6	6,8
AECO	0,163	6	0,1636	2,0	5,0
AFG2	0,54	6	0,5549	3,2	8,3
A EM 1	0,066	6	0,0714	3,1	7,9
AFMI	0,22	6	0,2218	3,6	9,4
OTA	0,0377	6	0,0390	1,5	3,9
UIA	0,13	6	0,1216	3,6	9,4
OT	2,5	6	2,38	1,3	3,3
ΟΙα	6,25	6	5,84	4,0	10,4
CT.	3,75	6	3,58	1,7	4,4
GI	8,75	6	8,13	4,9	12,7

Tab. 9 Präzision in der Serie für die Bestimmung der Aflatoxine sowie von Ochratoxin A, freiem Ochratoxin α und Gliotoxin in Urin

Zur Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag wurden die Kontrollmaterialien Q_{low} und Q_{high} je nach Analyt an sechs bis acht Tagen doppelt aufgearbeitet und analysiert. Die ermittelten Präzisionsdaten sind in Tabelle 10 dargestellt.

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Anzahl <i>n</i>	Gemessene Konzentration [µg/l]	Standardabweichung (rel.) s _w [%]	Streubereich <i>u</i> [%]
A ED 1	0,0375	6	0,0396	5,2	13,4
AFBI	0,13	8	0,1215	3,6	8,6
AEDO	0,0654	6	0,0673	2,2	5,6
AFB2	0,22	8	0,2106	3,6	8,5
A EC1	0,0375	6	0,0399	4,9	12,5
AFGI	0,13	8	0,1231	3,5	8,3
AECO	0,163	6	0,1562	2,7	7,0
AFG2	0,54	8	0,5200	3,3	7,8
A T.) (1	0,066	6	0,0681	3,6	9,3
Armi	0,22	8	0,2121	5,9	13,9
OTA	0,0377	6	0,0349	8,8	22,7
UIA	0,13	7	0,1077	12,5	30,6
OTa	2,5	6	2,50	5,2	13,2
ΟΙα	6,25	8	6,22	6,5	15,3
CT.	3,75	6	3,64	6,6	16,9
GT	8,75	8	9,08	8,6	20,4

Tab. 10 Präzision von Tag zu Tag für die Bestimmung der Aflatoxine sowie von Ochratoxin A, freiem Ochratoxin α und Gliotoxin in Urin

11.2 Richtigkeit

Die Richtigkeit des Verfahrens wurde aus den Daten der Präzision in der Serie sowie der Präzision von Tag zu Tag ermittelt. Die errechneten mittleren relativen Wiederfindungen für die einzelnen Analyten sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tab. 11Mittlere relative Wiederfindungen f
ür die Bestimmung der Aflatoxine sowie von Ochratoxin A, freiem Ochratoxin α und Gliotoxin
in Urin

Analyt	Dotierte		Präzision in der Serie		Präzision von Tag zu Tag			
	Konzentration [µg/l]	Anzahl n	Wiederfindung (rel.) <i>r</i> [%]	Bereich [%]	Anzahl <i>n</i>	Wiederfindung (rel.) <i>r</i> [%]	Bereich [%]	
	0,0375	6	98,8	95,4–103	6	106	98,8-113	
AFBI	0,13	6	100	98,0-103	8	93,5	88,2-100	
4 EDo	0,0654	6	104	99,8–107	6	103	99,7–105	
AFB2	0,22	6	102	98,3–104	8	95,7	91,8-102	
4.004	0,0375	6	99,4	94,8-104	6	107	99,4–112	
AFG1	0,13	6	100	97,7–104	8	94,6	89,9–100	
	0,163	6	100	97,4–103	6	95,8	92,6-100	
AFG2	0,54	6	103	97,5–107	8	96,3	93,1-103	
	0,066	6	108	105-114	6	103	98,1–108	
AFMI	0,22	6	101	95,5-106	8	96,4	86,9–105	
074	0,0377	6	103	102-105	6	92,5	84,0-103	
OIA	0,13	6	93,5	87,8-96,3	7	82,9	70,4-96,0	
OT	2,5	6	95,4	94,3-97,5	6	99,9	91,6-104	
ΟΙα	6,25	6	93,4	90,3-100	8	99,5	93,4–112	
OT	3,75	6	95,4	93,2-97,2	6	97,1	90,8-108	
GI	8,75	6	92,9	86,8-97,1	8	104	92,9–117	

11.3 Absolute Wiederfindung

Von den Prüfern der Methode wurden die aufarbeitungsbedingten Verluste bestimmt. Dazu wurden Urinproben vor der Aufarbeitung mit den Analyten auf drei Konzentrationsniveaus dotiert und die ISTDs zugegeben (Serie A) oder nach der Probenaufbereitung mit den maximal erwartbaren Mengen der Analyten versetzt (Serie B). Die Quotienten der Peakflächen der Probenserie A und der Probenserie B bilden die Analytverluste durch die Probenaufarbeitung ab und sind für die untersuchten Konzentrationen in Tabelle 12 zusammengestellt.

Tab. 12 Absolute Wiederfindung für die Bestimmung der Aflatoxine sowie von Ochratoxin A, freiem Ochratoxin α und Gliotoxin in Urin (n = 6)

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Peakflächenverhältnis Serie A/Serie B
	0,01	0,91
AFB1	0,0503	0,94
	0,1005	0,91
	0,0176	0,96
AFB2	0,0878	0,96
	0,1757	0,93



Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Peakflächenverhältnis Serie A/Serie B
	0,01	0,87
AFG1	0,0508	0,92
	0,1015	0,86
	0,0426	0,97
AFG2	0,2129	0,94
	0,4259	0,90
	0,0175	0,91
AFM1	0,0877	0,95
	0,1754	0,91
	0,01	0,90
OTA	0,0502	0,95
	0,1003	0,90
	0,77	0,85
ΟΤα	3,06	1,05
	5,1	1,02
	1,0	0,73
GT	4,5	0,83
	7,5	0,90

Tab. 12 (Fortsetzung)

11.4 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die in Tabelle 13 aufgeführten Nachweisgrenzen wurden jeweils aus dem dreifachen und die Bestimmungsgrenzen aus dem zehnfachen Signal/Rausch-Verhältnis geschätzt.

Tab.13 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die Bestimmung der Aflatoxine sowie von Ochratoxin A, freiem Ochratoxin α und Gliotoxin in Urin

Analyt	Nachweisgrenze [µg/l]	Bestimmungsgrenze [µg/l]
AFB1	0,004	0,013
AFB2	0,007	0,022
AFG1	0,004	0,013
AFG2	0,02	0,054
AFM1	0,007	0,022
OTA	0,004	0,013
ΟΤα	0,4	1,0
GT	0,5	1,5

11.5 Analytstabilität in der Urinmatrix

Die Analytstabilität in der Urinmatrix wurde bei Raumtemperatur, bei 4 ℃ und bei –20 ℃ untersucht. Die Stabilität bei Raumtemperatur wurde über einen Zeitraum von 24 Stunden untersucht und ist für die Probenvorbereitung relevant. Die Stabilität bei der Lagerung im Kühlschrank bei 4 ℃ wurde über einen Zeitraum von 48 Stunden untersucht und ist für eine Kurzzeitlagerung von Urinproben von Relevanz. Die Stabilität bei −20 °C ist für eine längere Probenlagerung wichtig und wurde nach einer Woche, nach zwei Wochen und nach viereinhalb Wochen bestimmt.

Zur Bestimmung der Analytstabilität wurden Q_{low} - und Q_{high} -Proben jeweils doppelt aufgearbeitet und analysiert. Als Akzeptanzkriterium wurde die Entscheidung 2002/657/EG der Europäischen Union zugrunde gelegt, welche eine Abweichung vom Nominalwert von –50 bis +20 % erlaubt (Europäische Kommission 2002).

Die Wiederfindungen der Analyten nach Lagerung bei Raumtemperatur, 4 ℃ und –20 ℃ lagen im Akzeptanzbereich, die Daten sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Analyt	Dotierte	Raumtemperatur	4°C	-20°C	-20°C	-20 °C
	Konzentration [µg/l]	Wiederfindung nach 24 h [%]	Wiederfindung nach 48 h [%]	Wiederfindung nach 1 Woche [%]	Wiederfindung nach 2 Wochen [%]	Wiederfindung nach 4,5 Wochen [%]
	0,0375	107	110	101	90,6	91,8
AFBI	0,13	104	108	99,2	91,6	102
A EDo	0,0654	102	104	103	90,4	99,0
AFB2	0,22	99,6	102	97,8	91,3	110
4.7.04	0,0375	103	112	83,6	72,6	110
AFG1	0,13	115	113	82,7	78,6	118
A E Ca	0,163	95,8	98,0	92,6	88,2	98,2
AFG2	0,54	99,1	104	92,0	89,9	108
	0,066	96,8	103	86,9	84,1	118
AFM1	0,22	100	100	80,6	80,1	107
074	0,0377	82,7	88,8	106	102	91,4 ^{a)}
OIA	0,13	82,2	79,1	98,8	88,5	94,7 ^{a)}
07	2,5	95,1	99,6	90,8	80,0	90,2
ΟΙα	6,25	88,9	81,2	87,4	92,8	110
	3,75	84,9	85,3	119	99,0	80,5 ^{a)}
GT	8,75	92,8	91,8	113	112	83,2 ^{a)}

Tab. 14 Wiederfindung der Analyten nach Lagerung bei Raumtemperatur, 4 °C und -20 °C

^{a)} Wiederfindung nach 5 Wochen

11.6 Analytstabilität in den messfertigen Proben

Die Stabilität der Analyten im Extrakt der aufgearbeiteten Qualitätskontrollproben wurde nach ein- sowie vierwöchiger Lagerung bei −20 °C bestimmt. Als Akzeptanzkriterium wurde wiederum die Entscheidung 2002/657/EG der Europäischen Union zugrunde gelegt (Europäische Kommission 2002). Die Ergebnisse zur Analytstabilität in den messfertigen Proben sind in Tabelle 15 zusammengestellt. Die Wiederfindungen der Analyten in den Extrakten lagen nach Lagerung bei −20 °C zwischen 80,8 % und 105 %.

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Wiederfindung nach 1 Woche [%]	Wiederfindung nach 4 Wochen [%]
4 5 5 4	0,0375	105	97,4
AFBI	0,13	104	100
A EDo	0,0654	102	101
AFB2	0,22	104	104
A EC1	0,0375	82,3	108
AFGI	0,13	80,8	105
	0,163	96,6	108
AFG2	0,54	98,8	104
A T. \ { 1	0,066	94,5	114
AFMI	0,22	88,2	111
OTA	0,0377	105	101 ^{a)}
OIA	0,13	98,4	106 ^{a)}
	2,5	95,0	96,0
ΟΤα	6,25	90,1	110
OT.	3,75	102	105 ^{a)}
61	8,75	109	105 ^{a)}

Tab. 15 Analytstabilität in den messfertigen Proben nach Lagerung bei -20 °C

^{a)} Wiederfindung nach 2 Wochen

11.7 Störeinflüsse

Für die Herstellung der Kalibrierstandards wurden Urine verschiedener Personen auf die Gehalte der zu messenden Analyten getestet. Da in fast allen untersuchten Urinproben nicht vernachlässigbare Gehalte an OTA zu finden waren, konnte kein Poolurin verwendet werden. Die Kalibrierstandards wurden schließlich in einem nahezu unbelasteten nativen Urin angesetzt, der in größeren Mengen gesammelt und bei –20 °C gelagert wurde.

12 Diskussion der Methode

Diese Methode ermöglicht die zuverlässige Bestimmung von Aflatoxinen, OTA, freiem OT α und GT in Urin. Die Validierungsdaten zeigen eine gute Reproduzierbarkeit, Richtigkeit und Empfindlichkeit der Methode. Die von den Entwicklern der Methode ermittelte Bestimmungsgrenze für OTA ist ähnlich wie die anderer Methoden (Föllmann et al. 2016). Für OT α lag die Bestimmungsgrenze mit 1 µg/l Urin über den in anderen Studien angegebenen Werten (Njumbe Ediage et al. 2012). Für GT liegen bislang keine Daten aus anderen Studien vor. Die bei der Methodenentwicklung für die Aflatoxine ermittelten Bestimmungsgrenzen entsprachen zum Teil denen anderer Methoden (Gerding et al. 2015; Schmidt et al. 2021), lagen teilweise aber auch unterhalb der in anderen Studien angegeben Werte (Penczynski et al. 2022; Schmidt et al. 2021). Bei der externen Methodenprüfung wurden für alle Analyten noch niedrigere Bestimmungsgrenzen ermittelt, was wahrscheinlich auf die Verwendung eines empfindlicheren Tandem-Massenspektrometers zurückzuführen ist.

Im Rahmen der Methodenentwicklung wurden verschiedene SPE-Materialien zur Aufreinigung und Anreicherung sowie verschiedene HPLC-Trennsäulen und Eluentengemische für die HPLC getestet. Was die analytische Säule anbelangt, so war die Kinetex Biphenyl-Säule (Phenomenex) die einzige, die zu einer befriedigenden Auftrennung der Mykotoxine führte. Mit anderen RP-Säulen war es zudem nicht möglich, die Analyten von der Urinmatrix abzutrennen. Die Auswertung der Aflatoxine erfolgte mit dem ISTD ${}^{13}C_{17}$ -AFB1. Zu Beginn der Methodenentwicklung wurden weitere ISTDs (${}^{13}C_{17}$ -AFB2 und ${}^{13}C_{17}$ -AFM1) verwendet. Umfangreiche Prüfungen ergaben jedoch, dass der ISTD ${}^{13}C_{17}$ -AFB1 für alle untersuchten Aflatoxine eingesetzt werden kann. Die Auswertung von OTA erfolgte mit ${}^{13}C_{20}$ -OTA, die von OT α und GT ohne ISTD.

Die Konzentrationen der Kalibrierstandards wurden während der Methodenentwicklung an Realproben einer laufenden Studie angepasst, konkret wurden die Kalibrierbereiche der einzelnen Analyten nach unten korrigiert. Die Konzentrationen der ISTDs wurden allerdings nicht geändert, so dass Anwender der Methode diese gegebenenfalls in geringeren Konzentrationen einsetzen können.

Die Untersuchung der Analytstabilität in der Urinmatrix sowie in den messfertigen Proben bestätigte die bereits in der Literatur beschriebene Instabilität von GT in Urin (Cerqueira et al. 2014), so dass die Lösungen für GT wöchentlich neu angesetzt werden sollten.

Mit dieser Methode untersuchten die Prüfer der Methode 32 Urinproben (24-h-Urine) von 16 Rohköstlern sowie 16 Kontrollpersonen (Veganer und Omnivoren). In den meisten Proben wurden quantifizierbare Gehalte an OTA (94%) und CIT (94%) detektiert. Im Vergleich zur Kontrollgruppe wurden im Urin der Rohköstler geringere Mengen OTA und CIT gefunden. Aflatoxine, freies OTα oder GT wurden in keiner der Proben nachgewiesen.

Verwendete Messgeräte HPLC-Anlage mit binärer Pumpe, Autosampler, Säulenofen und Degasser (Nexera XR, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg); Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (Modell AB SCIEX QTRAP 5500 mit Elektrosprayionisierung, AB SCIEX Germany GmbH, Darmstadt)

Anmerkungen

Interessenkonflikte

Die in der Kommission etablierten Regelungen und Maßnahmen zur Vermeidung von Interessenkonflikten (www.dfg. de/mak/interessenkonflikte) stellen sicher, dass die Inhalte und Schlussfolgerungen der Publikation ausschließlich wissenschaftliche Aspekte berücksichtigen.

Literatur

- Al-Jaal BA, Jaganjac M, Barcaru A, Horvatovich P, Latiff A (2019) Aflatoxin, fumonisin, ochratoxin, zearalenone and deoxynivalenol biomarkers in human biological fluids: a systematic literature review, 2001–2018. Food Chem Toxicol 129: 211–228. https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.04.047
- Bader M, Barr D, Göen T, Schaller KH, Scherer G, Angerer J (2010) Allgemeine Vorbemerkungen. Zuverlässigkeitskriterien einer analytischen Methode. In: Angerer J, Hartwig A, Hrsg. Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe. Band 2: Analysen in biologischem Material. 19. Lieferung. Weinheim: Wiley-VCH. S. 284–336. Auch erhältlich unter https://doi.org/10.1002/3527600418. bireliabd0019
- Berger M, Marske L, Monien B, Siodlaczek S, Göen T, Hartwig A, MAK Commission (2025) Mykotoxine Bestimmung von Deoxynivalenol und Deepoxydeoxynivalenol in Urin mittels LC-MS/MS. Biomonitoring-Methode. MAK Collect Occup Health Saf 10(2): Doc044. https://doi. org/10.34865/bi5148110d10_20r
- Boonen J, Malysheva SV, Taevernier L, Diana Di Mavungu J, De Saeger S, De Spiegeleer B (2012) Human skin penetration of selected model mycotoxins. Toxicology 301(1–3): 21–32. https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.06.012
- Brera C, Caputi R, Miraglia M, Iavicoli I, Salerno A, Carelli G (2002) Exposure assessment to mycotoxins in workplaces: aflatoxins and ochratoxin A occurrence in airborne dusts and human sera. Microchem J 73(1–2): 167–173. https://doi.org/10.1016/s0026-265x(02)00061-9
- Bundesärztekammer (2014) Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. Dtsch Ärztebl 111(38): A1583–A1618
- Cerqueira LB, de Francisco TMG, Gasparetto JC, Campos FR, Pontarolo R (2014) Development and validation of an HPLC-MS/MS method for the early diagnosis of aspergillosis. PLoS ONE 9(4): e92851. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092851
- CONTAM (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain) (2012) Scientific opinion on the risks for public and animal health related to the presence of citrinin in food and feed. EFSA J 10(3): 2605. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2605



- CONTAM (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain), Schrenk D, Bignami M, Bodin L, Chipman JK, Mazo J, Grasl-Kraupp B, Hogstrand C, Hoogenboom LR, Leblanc J, Nebbia CS, Nielsen E, Ntzani E, Petersen A, Sand S, Schwerdtle T, Vleminckx C, Marko D, Oswald IP, Piersma A, Routledge M, Schlatter J, Baert K, Gergelova P, Wallace H (2020) Risk assessment of aflatoxins in food. EFSA J 18(3): e6040. https://doi. org/10.2903/j.efsa.2020.6040
- De Santis B, Raggi M, Moretti G, Facchiano F, Mezzelani A, Villa L, Bonfanti A, Campioni A, Rossi S, Camposeo S, Soricelli S, Moracci G, Debegnach F, Gregori E, Ciceri F, Milanesi L, Marabotti A, Brera C (2017) Study on the association among mycotoxins and other variables in children with autism. Toxins (Basel) 9(7): 203. https://doi.org/10.3390/toxins9070203
- Degen GH, Blaskewicz M, Lektarau Y, Grüner C (2003) Ochratoxin A Analysen im Blut vonArbeitnehmern in der Abfallwirtschaft. Mycotoxin Res 19(1): 3–7. https://doi.org/10.1007/BF02940082
- Degen GH, Ali N, Gundert-Remy U (2018) Preliminary data on citrinin kinetics in humans and their use to estimate citrinin exposure based on biomarkers. Toxicol Lett 282: 43–48. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.10.006
- Degen GH, Reinders J, Kraft M, Völkel W, Gerull F, Burghardt R, Sievering S, Engelmann J, Chovolou Y, Hengstler JG, Fromme H (2022) Citrinin exposure in Germany: urine biomarker analysis in children and adults. Toxins (Basel) 15(1): 26. https://doi.org/10.3390/toxins15010026
- Dohnal V, Wu Q, Kuča K (2014) Metabolism of aflatoxins: key enzymes and interindividual as well as interspecies differences. Arch Toxicol 88(9): 1635–1644. https://doi.org/10.1007/s00204-014-1312-9
- Duarte SC, Pena A, Lino CM (2011) Human ochratoxin A biomarkers—from exposure to effect. Crit Rev Toxicol 41(3): 187–212. https://doi.org/10.3 109/10408444.2010.529103
- EFSA (European Food Safety Authority) (2006) Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to ochratoxin A in food. EFSA J 4(6): 365. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2006.365
- Europäische Kommission (2002) Entscheidung der Kommission vom 12. August 2002 zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen (2002/657/EG). ABI L (221): 8–36
- Ferri F, Brera C, De Santis B, Fedrizzi G, Bacci T, Bedogni L, Capanni S, Collini G, Crespi E, Debegnach F, Ferdenzi P, Gargano A, Gattei D, Luberto F, Magnani I, Magnani M, Mancuso P, Menotta S, Mozzanica S, Olmi M, Ombrini G, Sala O, Soricelli S, Vicentini M, Giorgi Rossi P (2017) Survey on urinary levels of aflatoxins in professionally exposed workers. Toxins (Basel) 9(4): 117. https://doi.org/10.3390/toxins9040117
- Fischer G, Müller T, Schwalbe R, Ostrowski R, Dott W (2000) Exposure to airborne fungi, MVOC and mycotoxins in biowaste-handling facilities. Int J Hyg Environ Health 203(2): 97–104. https://doi.org/10.1078/s1438-4639(04)70014-0
- Föllmann W, Ali N, Blaszkewicz M, Degen GH (2016) Biomonitoring of mycotoxins in urine: pilot study in mill workers. J Toxicol Environ Health A 79(22–23): 1015–1025. https://doi.org/10.1080/15287394.2016.1219540
- Fromme H, Gareis M, Völkel W, Gottschalk C (2016) Overall internal exposure to mycotoxins and their occurrence in occupational and residential settings an overview. Int J Hyg Environ Health 219(2): 143–165. https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2015.11.004
- Gao S, Zheng X, Tang Y, Cheng Y, Hu X, Wu J (2019) Development of a fluorescently labeled aptamer structure-switching assay for sensitive and rapid detection of gliotoxin. Anal Chem 91(2): 1610–1618. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05094
- Gerding J, Ali N, Schwartzbord J, Cramer B, Brown DL, Degen GH, Humpf H-U (2015) A comparative study of the human urinary mycotoxin excretion patterns in Bangladesh, Germany, and Haiti using a rapid and sensitive LC-MS/MS approach. Mycotoxin Res 31(3): 127–136. https://doi.org/10.1007/s12550-015-0223-9
- Greim H, Hrsg (2003) Ochratoxin A. In: Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten. 37. Lieferung. Weinheim: Wiley-VCH. Auch erhältlich unter https://doi.org/10.1002/3527600418.mb30347d0037
- Greim H, Hrsg (2008) Aflatoxine. In: Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten. 44. Lieferung. Weinheim: Wiley-VCH. Auch erhältlich unter https://doi.org/10.1002/3527600418.mb140268d0044
- Hagelberg S, Hult K, Fuchs R (1989) Toxicokinetics of ochratoxin A in several species and its plasma-binding properties. J Appl Toxicol 9(2): 91–96. https://doi.org/10.1002/jat.2550090204
- HBM-Kommission (Kommission "Human-Biomonitoring" des Umweltbundesamts) (2014) Stoffmonographie Ochratoxin A. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz 57(4): 476–487. https://doi.org/10.1007/s00103-014-1939-y
- Hof H, Kupfahl C (2009) Gliotoxin in Aspergillus fumigatus: an example that mycotoxins are potential virulence factors. Mycotoxin Res 25(3): 123–131. https://doi.org/10.1007/s12550-009-0020-4
- IARC (International Agency for Research on Cancer) (1986) Citrinin. In: Some naturally occurring and synthetic food components, furocoumarins and ultraviolet radiation. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Band 40. Lyon: IARC Press. S. 67–82. https://publications.iarc.fr/_publications/media/download/1588/b44fc9b27cd20fc2ded878cba92708e1a68d2165.pdf, abgerufen am 31 Mrz 2025
- Jubert C, Mata J, Bench G, Dashwood R, Pereira C, Tracewell W, Turteltaub K, Williams D, Bailey G (2009) Effects of chlorophyll and chlorophyllin on low-dose aflatoxin B, pharmacokinetics in human volunteers. Cancer Prev Res (Phila) 2(12): 1015–1022. https://doi.org/10.1158/1940-6207. capr-09-0099
- Lanier C, Richard E, Heutte N, Picquet R, Bouchart V, Garon D (2010) Airborne molds and mycotoxins associated with handling of corn silage and oilseed cakes in agricultural environment. Atmos Environ 44(16): 1980–1986. https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2010.02.040

- Martins C, Assunção R, Nunes C, Torres D, Alvito P (2021) Are data from mycotoxins' urinary biomarkers and food surveys linked? A review underneath risk assessment. Food Rev Int 37(4): 373–398. https://doi.org/10.1080/87559129.2019.1709200
- Muñoz K, Blaszkewicz M, Degen GH (2010) Simultaneous analysis of ochratoxin A and its major metabolite ochratoxin alpha in plasma and urine for an advanced biomonitoring of the mycotoxin. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 878(27): 2623–2629. https://doi. org/10.1016/j.jchromb.2009.11.044
- Nieminen SM, Kärki R, Auriola S, Toivola M, Laatsch H, Laatikainen R, Hyvärinen A, von Wright A (2002 a) Isolation and identification of Aspergillus fumigatus mycotoxins on growth medium and some building materials. Appl Environ Microbiol 68(10): 4871–4875. https:// doi.org/10.1128/aem.68.10.4871-4875.2002
- Nieminen SM, Mäki-Paakkanen J, Hirvonen M-R, Roponen M, von Wright A (2002 b) Genotoxicity of gliotoxin, a secondary metabolite of Aspergillus fumigatus, in a battery of short-term test systems. Mutat Res 520(1–2): 161–170. https://doi.org/10.1016/s1383-5718(02)00202-4
- Njumbe Ediage E, Diana Di Mavungu J, Song S, Wu A, Van Peteghem C, De Saeger S (2012) A direct assessment of mycotoxin biomarkers in human urine samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry. Anal Chim Acta 741: 58–69. https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.06.038
- Penczynski KJ, Cramer B, Dietrich S, Humpf H-U, Abraham K, Weikert C (2022) Mycotoxins in serum and 24-h urine of vegans and omnivores from the risks and benefits of a vegan diet (RBVD) study. Mol Nutr Food Res 66(6): 2100874. https://doi.org/10.1002/mnfr.202100874
- Scharf DH, Brakhage AA, Mukherjee PK (2016) Gliotoxin bane or boon? Environ Microbiol 18(4): 1096-1109. https://doi.org/10.1111/1462-2920.13080
- Schmidt J, Cramer B, Turner PC, Stoltzfus RJ, Humphrey JH, Smith LE, Humpf H-U (2021) Determination of urinary mycotoxin biomarkers using a sensitive online solid phase extraction-UHPLC-MS/MS method. Toxins (Basel) 13(6): 418. https://doi.org/10.3390/toxins13060418
- Studer-Rohr I, Schlatter J, Dietrich DR (2000) Kinetic parameters and intraindividual fluctuations of ochratoxin A plasma levels in humans. Arch Toxicol 74(9): 499–510. https://doi.org/10.1007/s002040000157
- Tangni EK, Pussemier L (2007) Ergosterol and mycotoxins in grain dusts from fourteen Belgian cereal storages: a preliminary screening survey. J Sci Food Agric 87(7): 1263–1270. https://doi.org/10.1002/jsfa.2838
- Tao Y, Xie S, Xu F, Liu A, Wang Y, Chen D, Pan Y, Huang L, Peng D, Wang X, Yuan Z (2018) Ochratoxin A: toxicity, oxidative stress and metabolism. Food Chem Toxicol 112: 320–331. https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.01.002
- Viegas S, Veiga L, Figueredo P, Almeida A, Carolino E, Sabino R, Veríssimo C, Viegas C (2013) Occupational exposure to aflatoxin B₁: the case of poultry and swine production. World Mycotoxin J 6(3): 309–315. https://doi.org/10.3920/wmj2012.1531
- Viegas S, Veiga L, Figueiredo P, Almeida A, Carolino E, Viegas C (2015) Assessment of workers' exposure to aflatoxin B1 in a Portuguese waste industry. Ann Occup Hyg 59(2): 173–181. https://doi.org/10.1093/annhyg/meu082
- Viegas S, Assunção R, Nunes C, Osteresch B, Twarużek M, Kosicki R, Grajewski J, Martins C, Alvito P, Almeida A, Viegas C (2018 a) Exposure assessment to mycotoxins in a Portuguese fresh bread dough company by using a multi-biomarker approach. Toxins (Basel) 10(9): 342. https://doi.org/10.3390/toxins10090342
- Viegas S, Osteresch B, Almeida A, Cramer B, Humpf H-U, Viegas C (2018 b) Enniatin B and ochratoxin A in the blood serum of workers from the waste management setting. Mycotoxin Res 34(2): 85–90. https://doi.org/10.1007/s12550-017-0302-1
- Viegas C, Faria T, Caetano LA, Carolino E, Quintal-Gomes A, Twarużek M, Kosicki R, Viegas S (2019) Characterization of occupational exposure to fungal burden in Portuguese bakeries. Microorganisms 7(8): 234. https://doi.org/10.3390/microorganisms7080234

Anhang

Bei der Methodenprüfung wurden – zusätzlich zu den Aflatoxinen, OTA, freiem OTα und GT – CIT und dessen Metabolit DH-CIT in die Methode integriert. Die allgemeine Vorgehensweise entsprach dabei der beschriebenen Methode der Entwickler, so dass an dieser Stelle nur die zur Quantifizierung von CIT und DH-CIT benötigten Informationen ergänzend dargestellt werden. Die von den Prüfern der Methode erhobenen Validierungsdaten sind im Folgenden aufgeführt, allerdings wurden diese nicht unabhängig überprüft.

Geräte, Chemikalien und Lösungen

Geräte

- UPLC-Anlage mit binärer Pumpe und Säulenofen (z.B. Acquity UPLC I-Class mit SM-FTN-Sample Manager, Waters GmbH, Eschborn)
- Tandem-Massenspektrometer (z. B. AB SCIEX QTRAP 6500, AB SCIEX Germany GmbH, Darmstadt)

Referenzstandards und ISTD

- Citrinin, 100,1 μg/ml in Acetonitril (z. B. Romer Labs Division Holding GmbH, Getzersdorf, Österreich)
- Dihydrocitrinon (z. B. AnalytiCon Discovery GmbH, Potsdam)
- ¹³C₁₃-Citrinin, 10,17 μg/ml in Acetonitril (z. B. Romer Labs Division Holding GmbH, Getzersdorf, Österreich)

Lösungen – Referenzstandards und ISTD

 ¹³C₁₃-CIT-Dotierlösung (¹³C₁₃-CIT-DL; 203,4 μg ¹³C₁₃-CIT/l) In einem 1,5-ml-Polypropylengewindefläschchen werden 20 μl des ¹³C₁₃-CIT-Standards mit 980 μl Acetonitril gemischt.

Die $^{13}\mathrm{C}_{13}$ -CIT-Dotierlösung wurde bei –80 °C gelagert. Bei dieser Lagerungstemperatur war der Analyt über einen Zeitraum von zwölf Wochen stabil.

 CIT-Arbeitslösung (1,001 mg/l) 100 μl der CIT-Stammlösung werden in einen 10 ml-Messkolben pipettiert. Der Messkolben wird anschließend bis zur Markierung mit Acetonitril aufgefüllt.

Die CIT-Arbeitslösung wird bei −80 °C gelagert und ist drei Monate stabil.

DH-CIT-Arbeitslösung I (500 mg/l)
 5 mg DH-CIT werden in einen 10-ml-Messkolben eingewogen und in ein wenig Acetonitril gelöst. Der Messkolben wird anschließend bis zur Markierung mit Acetonitril aufgefüllt.

Die DH-CIT-Arbeitslösung I wird bei –80 °C gelagert und ist drei Monate stabil.

 DH-CIT-Arbeitslösung II (5 mg/l) 100 μl der DH-CIT-Arbeitslösung I werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert. Der Messkolben wird anschließend bis zur Markierung mit Acetonitril aufgefüllt.

Die DH-CIT-Arbeitslösung II wird für jede Kalibrierung und zum Ansetzen der Qualitätskontrollproben neu hergestellt.

 CIT- und DH-CIT-Dotierlösung (CIT- und DH-CIT-DL; 50,05 μg CIT/l und 50,0 μg DH-CIT/l) In einem 1,5-ml-Polypropylengewindefläschchen werden 50 μl der CIT-Arbeitslösung und 10 μl der DH-CIT-Arbeitslösung II mit 940 μl Acetonitril gemischt.

Die CIT- und DH-CIT-Dotierlösung wird für jede Kalibrierung und zum Ansetzen der Qualitätskontrollproben neu hergestellt.

Kalibrierstandards

Bei der Methodenprüfung wurden die Kalibrierlösungen in nahezu unbelastetem nativem Urin angesetzt. Da Urinproben normalerweise messbare Gehalte verschiedener Mykotoxine aufweisen, wurde Urin von einer Person gesammelt, die fünf Tage auf Getreideprodukte, Reis, Milchprodukte, Gewürze, Wein sowie Kaffee verzichtet hatte. Die Mykotoxingehalte dieses Urins lagen in der Regel unter den Nachweisgrenzen.

Zur Herstellung der Kalibrierstandards pipettierten die Methodenprüfer die Dotierlösungen gemäß dem in Tabelle 16 angegebenen Pipettierschema zu 4 ml Urin. Für die Analytkonzentrationen im Bereich von 0,001 µg/l bis 0,025 µg/l wurde die CIT- und DH-CIT-Dotierlösung weiter verdünnt.

Lösung	CIT- und DH-CIT-DL [µl]	CIT-Konzentration [µg/l]	DH-CIT-Konzentration [µg/l]	¹³ C ₁₃ -CIT-DL [μl]	¹³ C ₁₃ -CIT-Konzentration [μg/l]
DB ^{a)}	0	0	0	0	0
B ^{b)}	0	0	0	20	1,017
K1	4 ^{c)}	0,001	0,001	20	1,017
K2	10 ^{c)}	0,0025	0,0025	20	1,017
K3	20 ^{c)}	0,005	0,005	20	1,017
K4	30 ^{c)}	0,0075	0,0075	20	1,017
K5	40 ^{c)}	0,01	0,01	20	1,017
K6	100 ^{c)}	0,025	0,025	20	1,017
K7	4	0,05	0,05	20	1,017
K8	8	0,1	0,1	20	1,017
K9	40	0,5	0,5	20	1,017
K10	80	1,001	1	20	1,017
K11	160	2,002	2	20	1,017

Tab. 16 Pipettierschema zur Herstellung der Kalibrierlösungen für die Bestimmung von Citrinin und Dihydrocitrinon in Urin

^{a)} Doppelblindprobe

^{b)} Blindprobe

 $^{\rm c)}$ vorheriger Verdünnungsschritt: 20 µl der Dotierlösung mit 980 µl Acetonitril

Die Aufarbeitung der Kalibrierlösungen erfolgt analog zu den Proben wie unter Abschnitt 5 angegeben, allerdings ohne Zugabe von ISTD.

Die Kalibrierstandards sind dafür ausgelegt, den linearen Bereich der Detektion sowie die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen zu bestimmen. Zur Kalibrierung werden alle elf Lösungen verwendet, wobei die Konzentrationen unterhalb der Bestimmungsgrenze der jeweiligen Analyten nicht in die Kalibrierung eingeschlossen werden.

Kontrollstandardlösung

Die Kontrollstandardlösung wurde durch Verdünnen der CIT- und DH-CIT-Dotierlösung mit Gradientenlösung hergestellt, in 250-µl-Volumina aliquotiert und bei −80 °C gelagert. In Tabelle 17 sind die CIT und DH-CIT-Konzentrationen in dieser Lösung aufgeführt.

Analyt/ISTD	Konzentration [µg/l]
CIT	1,001
DH-CIT	1,0
¹³ C ₁₃ -CIT	2,034

Tab. 17 Konzentrationen der Analyten und des ISTDs in der Kontrollstandardlösung

Instrumentelle Arbeitsbedingungen

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

HPLC-Säule:	Kinetex® Biphenyl; 2,6 µm; 100 × 2,1 mm
Vorsäule:	UHPLC-Vorsäule Biphenyl; 2,1 mm ID
Temperatur Säulenofen:	40 °C



Temperatur Autosampler:	10 °C
Injektionsvolumen:	10 µl
Eluent A:	0,1 % Essigsäure und 1 mM Ammoniumacetat in hochreinem Wasser
Eluent B:	0,1 % Essigsäure und 1 mM Ammoniumacetat in Methanol
Gradientenprogramm:	siehe Tabelle 18

Tab. 18	Gradientenprogramm	für die Bestimmung	von Citrinin und Dir	ydrocitrinon in Urin
---------	--------------------	--------------------	----------------------	----------------------

Zeit [min]	Fluss [ml/min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	0,45	95	5
1	0,45	95	5
8	0,45	2	98
9	0,45	2	98
9,01	0,45	95	5
11	0,45	95	5

Tandem-Massenspektrometrie

TurboSpray
ESI negativ
-4500 V
450 °C
Stickstoff, 60 psi
Stickstoff, 50 psi
Stickstoff, 40 psi
Stickstoff
Multiple Reaction Monitoring (MRM)
siehe Tabelle 19

Tab. 19	Retentionszeiten und MRM-Parameter für die Bestimmung vo	on Citrinin und Dihydrocitrinon in Urin
	5	

Analyt/ISTD	Retentionszeit [min]	Q1 (<i>m/z</i>)	Q3 (<i>m/z</i>)	Dwell-time [msec]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
		280.0 [M H, CH OH]-	248,9 ^{a)}	40	-60	-22 -15	-15
CIT 5,23	5,23	280,9 [M-n+Cn ₃ On]	204,9	40	-60	-32	-11
		248,9 [M-H] ⁻	176,9	40	-150	-30	-11
DH-CIT	5,13		220,9 ^{a)}	40	-50	-30	-13
		264,9 [M-H] ⁻	246,9	40	-50	-30	-15
			176,9	40	-50	-34	-17

Tab. 19 (Fortsetzung)

Analyt/ISTD	Retentionszeit [min]	Q1 (<i>m/z</i>)	Q3 (<i>m/z</i>)	Dwell-time [msec]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
¹³ C ₁₃ -CIT	5,23	293,99 [M-H+CH ₃ OH] ⁻	261,96 ^{a)}	40	-40	-24	-7
			217,0	40	-40	-32	-21

^{a)}Quantifier

CE: Kollisionsenergie; CXP: Kollisionszellen-Austrittspotential; DP: Declustering-Potential

Analytische Bestimmung

Von den aufgearbeiteten Proben werden jeweils 10 µl in das LC-MS/MS-System injiziert. Abbildung 5 zeigt beispielhaft Chromatogramme für CIT und DH-CIT.



Abb. 5 Chromatogramme von Leerurin dotiert mit a) 0,5 μ g Citrinin/I (Quantifier *m/z* 281 \rightarrow 249) sowie mit b) 0,5 μ g Dihydrocitrinon/I (Quantifier *m/z* 265 \rightarrow 221)

Kalibrierung

Für die Erstellung der Kalibriergeraden zur Bestimmung von CIT und DH-CIT werden die Peakflächen jeweils auf ${}^{13}C_{13}$ -CIT bezogen und gegen die Quotienten der dotierten Konzentration des Analyten und der dotierten Konzentration des ISTDs aufgetragen. Für CIT und DH-CIT lag in den untersuchten Konzentrationsbereichen eine lineare Korrelation mit Bestimmtheitsmaßen von R² \ge 0,998 vor (lineare Regression ohne Gewichtung). In Abbildung 6 sind beispielhaft die Kalibriergeraden für die Bestimmung von CIT und DH-CIT in Urin dargestellt.



Abb. 6 Kalibriergerade für die Bestimmung von Citrinin und Dihydrocitrinon (lineare Regression ohne Gewichtung)

Berechnung der Analysenergebnisse

Zur Berechnung des CIT- oder DH-CIT-Gehaltes einer Probe wird jeweils der Quotient aus der Peakfläche des Analyten und der Peakfläche des $^{13}C_{13}$ -CITs gebildet. Mithilfe der zur Analysenserie gehörigen Kalibrierfunktion kann aus den ermittelten Quotienten der Analytgehalt in µg/l Urin berechnet werden.

Standardisierung der Messergebnisse und Qualitätssicherung

In den drei bei der Methodenprüfung verwendeten Kontrollmaterialien lagen die Konzentrationen für CIT und DH-CIT bei 0,01 $\mu g/l,$ 0,1 $\mu g/l$ sowie 1 $\mu g/l.$

Beurteilung des Verfahrens

Die Validierungsdaten für CIT und DH-CIT wurden nicht unabhängig überprüft.

Präzision

Für CIT und DH-CIT wurde die Präzision in der Serie von den Prüfern der Methode bestimmt, indem die drei Kontrollmaterialien jeweils sechsfach aufgearbeitet und analysiert wurden.

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Anzahl n	Gemessene Konzentration [µg/l]	Standardabweichung (rel.) s _w [%]	Streubereich <i>u</i> [%]
	0,01	6	0,01	3,1	9,4
CIT	0,1	6	0,09	6,0	16,5
	1,0	6	0,93	6,5	17,2
	0,01	6	0,0108	14,0	37,5
DH-CIT	0,1	6	0,08	3,3	10,1
	1,0	6	0,89	8,9	23,9

 Tab. 20
 Präzision in der Serie f
 ür die Bestimmung von Citrinin und Dihydrocitrinon in Urin

Für die Präzision von Tag zu Tag wurden die drei Kontrollmaterialien an sechs Tagen aufgearbeitet und analysiert.

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Anzahl <i>n</i>	Gemessene Konzentration [µg/l]	Standardabweichung (rel.) s _w [%]	Streubereich <i>u</i> [%]
	0,01	6	0,01	6,4	17,5
CIT	0,1	6	0,10	5,9	15,2
	1,0	6	0,98	2,1	6,2
	0,01	6	0,01	19,3	54,7
DH-CIT	0,1	6	0,09	5,4	12,1
	1,0	6	0,96	3,4	9,9

Tab. 21 Präzision von Tag zu Tag für die Bestimmung von Citrinin und Dihydrocitrinon in Urin

Richtigkeit

Die Richtigkeit des Verfahrens wurde aus den Daten der Präzision in der Serie sowie der Präzision von Tag zu Tag ermittelt.

 Tab. 22
 Mittlere relative Wiederfindungen f
 Gir die Bestimmung von Citrinin und Dihydrocitrinon in Urin

Analyt	Dotierte		Präzision in der Serie	Präzision von Tag zu Tag			
	Konzentration [µg/l]	Anzahl n	Wiederfindung (rel.) <i>r</i> [%]	Bereich [%]	Anzahl <i>n</i>	Wiederfindung (rel.) <i>r</i> [%]	Bereich [%]
	0,01	6	94,1	89,3-98,2	6	99,8	90,4-108
CIT	0,1	6	88,6	79,7-94,3	6	99,0	91,2-106
	1,0	6	93,3	89,1–105	6	98,5	89,1–105
	0,01	6	108	93,0-134	6	108	75,9–135
DH-CIT	0,1	6	80,9	77,0-85,2	6	88,4	82,3-93,1
	1,0	6	88,5	81,2–102	6	96,4	90,7–100

Absolute Wiederfindung

Auch für CIT und DH-CIT wurden die aufarbeitungsbedingten Verluste bestimmt. Dazu wurden Urinproben vor der Aufarbeitung mit den Analyten sowie den ISTDs dotiert (Serie A) oder nach der Probenaufbereitung mit den maximal erwartbaren Mengen der Analyten versetzt (Serie B). Die Quotienten der Peakflächen der Probenserie A und der Probenserie B bilden den Analytverlust durch die Probenaufarbeitung ab.

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Peakflächenverhältnis Serie A/Serie B		
	0,01	1,03		
CIT	0,1	0,93		
	1,0	0,99		
	0,01	1,04		
DH-CIT	0,1	0,95		
	1,0	1,01		

Tab. 23 Absolute Wiederfindungen für die Bestimmung von Citrinin und Dihydrocitrinon in Urin (n = 6)

Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die Bestimmung von CIT und DH-CIT wurden aus dem dreifachen bzw. zehnfachen Signal/Rausch-Verhältnis berechnet.

Der sehr matrixarme Leerurin führte in Kombination mit einem sensitiveren Tandem-Massenspektrometer (AB SCIEX QTRAP 6500 statt AB SCIEX QTRAP 5500) zu sehr niedrigen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen. In einer aus fünf Individualurinen gepoolten Urinprobe fielen die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen höher aus (Tabelle 24).

Tab. 24	Nachweis- und B	estimmungsgrenzen	für die	Bestimmung von	Citrinin und I	Dihydrocitrinon	in I	Urin
---------	-----------------	-------------------	---------	----------------	----------------	-----------------	------	------

Analyt	Blindurin			Poolurin		
	Nachweisgrenze [µg/l]	Bestimmungsgrenze [µg/l]	Nachweisgrenze [µg/l]	Bestimmungsgrenze [µg/l]		
CIT	0,0003 ^{a)}	0,001 ^{a)}	0,01 ^{b)}	0,025 ^{b)}		
DH-CIT	0,0075	0,01	0,5 ^{b)}	0,5 ^{b)}		

a) Der Blindurin enthielt niedrige Hintergrundgehalte an Citrinin. Zur Abschätzung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurden die S/N-Werte aller Proben (Abszisse) gegen die Nominalkonzentrationen (Ordinate) aufgetragen. Nach Abzug des mittleren S/N-Wertes aus undotierten Blindurinproben, wurden die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen aus den resultierenden Regressionsfunktionen abgeschätzt und visuell bestätigt.

^{b)} Der Poolurin enthielt niedrige Grundwerte von CIT und DH-CIT. Zur Abschätzung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurden die S/N-Werte aller Proben (Abszisse) gegen die Nominalkonzentrationen (Ordinate) aufgetragen. Nach Abzug des mittleren S/N-Wertes aus undotierten Poolurinproben, wurden Nachweis- und Bestimmungsgrenze aus den resultierenden Regressionsfunktionen abgeschätzt und visuell bestätigt.

Störeinflüsse und Diskussion

Mit der beschriebenen Methode lassen sich CIT und DH-CIT sensitiv und zuverlässig in Humanurin bestimmen. Die unter Verwendung von gepooltem Urin erhobenen Bestimmungsgrenzen von 0,025 µg CIT pro Liter Urin und 0,5 µg DH-CIT pro Liter Urin erlauben die Quantifizierung der ernährungsbedingten Hintergrundbelastung in der Allgemeinbevölkerung.

Die Validierungsdaten für CIT und DH-CIT zeigen eine gute Reproduzierbarkeit, Richtigkeit und Empfindlichkeit der Methode. So liegen die Standardabweichungen sowohl bei der Präzision in Serie als auch bei der Präzision von Tag zu Tag – für alle Analytkonzentrationen oberhalb der jeweiligen Bestimmungsgrenze – unter 10 %. Standardabweichungen von 14,0 % und 19,3 % ergaben sich für den in Höhe der Bestimmungsgrenze dotierten DH-CIT-Standard (0,01 μ g DH-CIT pro Liter).

Die aus den Präzisionsdaten berechneten mittleren relativen Wiederfindungen lagen zwischen 80,9 % und 108 % und können damit als sehr gut bezeichnet werden. Darüber hinaus zeigt die absolute Wiederfindung, dass es durch die Probenaufarbeitung zu keinen aufarbeitungsbedingten Analytverlusten kommt. Biomonitoring-Methoden – Aflatoxine, OTA, OTa, GT, CIT und DH-CIT in Urin

Verwendete Messgeräte UPLC-Anlage mit binärer Pumpe und Säulenofen (z. B. Acquity UPLC I-Class mit SM-FTN-Sample Manager, Waters GmbH, Eschborn); Tandem-Massenspektrometer (z. B. AB SCIEX QTRAP 6500, AB SCIEX Germany GmbH, Darmstadt)