

# Überlegungen zu einem Grenzwert für Ochratoxin A in Wein

HERBERT OTTENEDER und PAUL MAJERUS

Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz  
Institut für Lebensmittelchemie  
D-54295 Trier, Maximineracht 11a

*Auf Grund zahlreicher Untersuchungen ist die Belastungssituation von Weinen verschiedener Herkunftsländer mit dem Mykotoxin Ochratoxin A (OTA) ausreichend beschrieben. Der Großteil der OTA-Gehalte, d.h. die Gehalte von ca. 90 % der untersuchten Weine, war unter 0,5 µg/l. Da in vielen Proben der OTA-Gehalt unter der Nachweisgrenze von 0,01 µg/l liegt, kann die mittlere Belastung einer repräsentativen Stichprobe von 90 Weiß-, 63 Rosé- und 303 Rotweinen nur schlecht über das arithmetische Mittel berechnet werden. In dieser Arbeit wird eine statistische Auswertung mittels Prozessanalyse vorgestellt, die eine präzisere und sinnvollere Ermittlung der zu erwartenden OTA-Belastung für den Weinkonsumenten ermöglicht. Unter Berücksichtigung der so erhaltenen Daten würde je nach Festlegung des OTA-Grenzwertes zwischen 0,5 und 2 µg/l und einem angenommenen Weinkonsum von 0,5 Liter der empfohlene TDI-Wert (tolerable daily intake) zwischen 2,2 und 2,7 % ausgeschöpft werden.*

**Schlagwörter:** Wein, Mycotoxine, Ochratoxin A, Prozessanalyse, Grenzwert

*Considerations on a limit value for ochratoxin A in wine. Due to numerous investigations the contamination with the mycotoxin ochratoxin A (OTA) of wines from different countries is well known. Most OTA contents (those of approx. 90 % of the wines investigated) were below 0.5 µg/l. Because of the fact that the OTA content was below the detection limit in many samples, the average contamination of a representative sample of 90 white, 63 rosé and 303 red wines can only be calculated with difficulty by the arithmetical mean. In this paper a statistical evaluation by means of process analysis is introduced which facilitates a more precise and useful assessment of the expected OTA contamination for the wine consumer. If these obtained data are taken into account only 2.2 to 2.7 % of the recommended TDI-value (tolerable daily intake) are reached with respect to a maximum residue limit between 0.5 and 2 µg/l and an assumed consumption of 0.5 litre of wine.*

**Key words:** Wine, mycotoxins, ochratoxin A, process analysis, maximum residue limit

*Réflexions sur une valeur limite pour l'ochratoxine A dans le vin. Grâce à de nombreuses analyses, nous disposons d'une description suffisante de la contamination des vins de différents pays d'origine par la mycotoxine ochratoxine A (OTA). La plupart des teneurs en OTA, soit les teneurs d'environ 90 % des vins examinés, étaient inférieures à 0,5 µg/l. Puisque, dans beaucoup d'échantillons, la teneur en OTA se situe en dessous de la limite de détection de 0,01 µg/l, il est difficile de calculer au moyen de la moyenne arithmétique la contamination moyenne d'un échantillon représentatif prélevé au hasard de 90 vins blancs, 63 vins rosés et 303 vins rouges. Le présent travail propose un dépouillement statistique sur la base d'une analyse de processus, permettant une détermination plus précise et plus significative de la nuisance prévisible causée par l'OTA pour le consommateur du vin. En considération des données ainsi recueillies, la valeur TDI (tolerable daily intake) recommandée serait atteinte à un taux entre 2,2 et 2,7% seulement, en supposant une valeur limite de l'OTA fixée entre 0,5 et 2 µg/l et une consommation de vin de 0,5 litres.*

**Mots clés :** vin, mycotoxines, ochratoxine A, analyse de processus, valeur limite

In der EG-Kontaminanten-VO (EU, 2002) ist geregelt, dass bis spätestens zum 31. Dezember 2003 die Einsetzung eines Ochratoxin A (OTA)-Höchstgehaltes für Wein zu prüfen ist. In den Erwägungsgründen steht u.a., dass OTA in Kaffee, Wein, Bier, Traubensaft, Kakao und Gewürzen nachgewiesen wurde. Die Mitgliedsstaaten und interessierte Kreise sollten Untersuchungen und Forschungsarbeiten durchführen, um die Fakten der Bildung von OTA zu ermitteln und Vorbeugemaßnahmen zur Verhinderung des Auftretens zu treffen. Daran schließt sich folgende Forderung an: Werden keine Anstrengungen unternommen, um den OTA-Gehalt zu senken, wird ein Höchstgehalt festgesetzt, ohne dass die technische Machbarkeit eingeschätzt wird.

Ein konkreter Wert für Wein wird hier nicht genannt, wohl aber in einem nicht weiter verfolgten früheren Entwurf für die Änderung der Kontaminanten-VO Nr. 194/97 (EU, 1999) aus dem Jahr 1999 mit 0,5 µg OTA pro Liter Wein. Dieser Wert sollte ab 31. Dezember 2002 gelten, falls bis dahin weder ausreichende Untersuchungen noch Vorsorgemaßnahmen getroffen worden sind.

Im Internationalen Amt für Rebe und Wein (O.I.V.) war die bisherige Diskussion hierzu uneinheitlich. Es gibt einen Resolutionsentwurf (O.I.V. 2001a) mit einem Grenzwert von 1 µg/l, der nach Diskussion in der Expertengruppe „Lebensmittelsicherheit“ vom 11. März 2002 ab 2004 gelten sollte. In der 42. Sitzung der Unterkommission „Analysemethoden“ des O.I.V. vom März 2002 wurde ein Grenzwert von 3 µg/l für Wein sowie 5 µg/l für „bestimmte Weine“ von Frankreich zur Diskussion gestellt, wobei der Begriff „bestimmte Weine“ nicht weiter definiert wurde. Ganz aktuell liegt für die Generalversammlung 2002 in Bratislava ein Vorschlag des Technischen und Wissenschaftlich-technischen Komitees (CST) mit 2 µg/l vor.

Mit den nachfolgenden Ausführungen soll anhand von Daten dargelegt werden, welche Auswirkungen die unterschiedlichen Grenzwerte auf den Verbraucherschutz bzw. den Handel haben können.

Grundsätzlich sind bei der Festsetzung von Grenzwerten für Kontaminanten drei Kriterien zu beachten:

- die toxikologischen Eigenschaften
- die Analytik
- das Vorkommen (in welchen Lebensmitteln tritt die Kontaminante wie häufig und in welchen Konzentrationen auf?)

## Die toxikologischen Eigenschaften von Ochratoxin A

Hierzu kann zunächst auf die Erwägungsgründe der EG-Kontaminanten-VO (EU, 2002) zurückgegriffen werden. Danach hat OTA u.a. karzinogene Eigenschaften. Dies ist der primäre Grund für eine seit annähernd zehn Jahren bestehende Forderung für die Festsetzung eines Grenzwertes von OTA in Lebensmitteln. Konkret stützt sich diese Forderung auf die Bewertung der IARC (International Agency for Research on Cancer), die OTA als für den Menschen möglicherweise karzinogen einstufte (Gruppe 2B: possibly carcinogenic to humans) (IARC, 1993). Diese Bewertung resultiert aus Tierversuchen an verschiedenen Spezies, in denen sich OTA als potentes Nierenkanzerogen erwies. Des Weiteren gibt es eine Bewertung durch die Expertengruppe für Lebensmitteltoxikologie der nordischen Staaten, der sich der Wissenschaftliche Lebensmittelausschuss der Europäischen Kommission (SCF) (EU, 1998) im Jahr 1998 anschloss, die einen TDI-Wert von 5 ng pro kg Körpergewicht und Tag festlegte. Dieser TDI-Wert liegt im unteren Bereich der Ergebnisse verschiedener Studien mit Werten zwischen 1,2 und 14 ng/kg KG/Tag als maximal tolerierbare tägliche Dosis. Er leitet sich von einem NOEL-Wert (no effect level) von 21 µg/kg KG/Tag mit einem Sicherheitsfaktor von 4200 ab. Dies belegt, dass dieser toxikologische Wert, der allen weiteren Überlegungen bei der Grenzwertsetzung zu Grunde gelegt wurde, besonders konservativ angesetzt ist.

## Analytik

Sowohl für Monitoring-Untersuchungen und in besonderem Maß für die Überwachung eines Grenzwertes ist eine geeignete Untersuchungsmethode unabdingbar. Diese Anforderungen erfüllt eine von VISCONTI et al. (1999) entwickelte HPLC-Methode. Bei ihr werden die Proben mit Natriumhydrogencarbonat gepuffert und mit Polyethylenglykol versetzt. Mittels Immunoaffinitätsäule wird OTA spezifisch durch eine Antigen/Antikörper-Reaktion abgetrennt, angereichert und anschließend mittels HPLC/Fluoreszenzdetektion auf einer Umkehrphase mittels eines sauren Eluenten quantifiziert. Dank seiner fluoreszierenden Eigenschaften ist OTA empfindlich und spezifisch im Nanogramm-Bereich nachweis- und bestimmbar. Der praktische Messbereich liegt zwischen 0,01 und 3 µg/l. Validiert wurde das Verfahren im internationalen Ringversuch mit Rot-

und Weißweinproben, die mit OTA-Konzentrationen zwischen 0,1 und 2 µg/l dotiert waren. Die Leistungsfähigkeit des Verfahrens dokumentieren relative Wiederhol- und Vergleichsstandardabweichungen von unter 10 bzw. unter 15 % sowie Wiederfindungsraten, die in der Regel über 90 % liegen. Mit der O.I.V.-Resolution OENO/16/2001 (O.I.V., 2001b), die im Oktober 2001 auf der 81. Generalversammlung verabschiedet wurde, wird dieses Verfahren in den Anhang A der O.I.V.-Sammlung internationaler Untersuchungsverfahren (O.I.V., 2003) aufgenommen.

## Vorkommen

Tabelle 1:  
OTA-Gehalte in Wein nach Literaturangaben

Probenzahl		% positiv	Mittelwert (µg/l)	Spannweite (µg/l)	Autoren
24	weiß	27	0,01	0,003 - 0,18	ZIMMERLI and DICK, 1996
79	rot	47	0,04	0,003 - 0,39	
7	weiß	29	0,05	0,01 - 0,06	VISCONTI et al. 1999
27	rot	96	1,27	0,01 - 7,6	
90	weiß	20	0,07	0,01 - 1,36	OTTENEDER und MAJERUS, 2000
303	rot	52	0,18	0,01 - 7,00	
1.470	weiß/ rot	59	0,36	0,003 - 15,6	EU, 2001

Die Zusammenstellung enthält eine kleine Auswahl von Publikationen zum Vorkommen von OTA in Wein, soweit die hier aufgeführten statistischen Angaben verfügbar waren. Danach ist das Bild in Bezug auf die Streubreiten und die festgestellten mittleren Gehalte recht unterschiedlich. Diesen und den weiteren Arbeiten (OSPITAL et al., 1998; BURDASPAL and LEGARDA, 1999; CERUTTI et al., 2000; MARKAKI et al., 2001; SOLEAS et al., 2001) ist aber, unabhängig von den ermittelten Streubreiten der Gehalte, die Tendenz gemeinsam, dass

Rotweine häufiger und höher mit OTA kontaminiert sind. Einen Überblick über das derzeit europaweit existierende umfangreiche Datenmaterial gibt der SCOOP-Bericht 2001 (Tab. 1) (EU, 2001). Er schließt alle Extremwerte mit ein, eignet sich aber nicht für weitgehende Auswertungen.

## Material und Methoden

Für die nachfolgenden Prognosen zu den Auswirkungen von Grenzwerten auf die bisherige Belastungssituation wurde ausschließlich auf den eigenen Datenpool mit der repräsentativen Zahl von über 300 Einzelproben Rotwein zurückgegriffen. Auf Rotwein deshalb, weil die bisherigen Untersuchungen zeigten, dass relevante OTA-Aufnahmen überwiegend auf Rotwein zurückgehen. Die Daten wurden in den Jahren 1996 bis 1999 erhoben und wurden im Jahr 2001 durch die Untersuchung von 33 deutschen Rot-, Rosé- und Weißweinen des Jahrgangs 2000 ergänzt. Damit sollte der Kritik begegnet werden, dass zum einen deutsche Weine unterrepräsentiert, und zum anderen der Aspekt faulen Leseguts bei deutschen Weinen nicht ausreichend berücksichtigt worden sei. Untersucht wurde daher der Jahrgang 2000, der potenziell OTA-verdächtigstes Probenmaterial enthalten sollte.

Die Untersuchungen wurden in einer kleinen Laborvergleichsuntersuchung am ILC Trier mittels HPLC und parallel dazu im Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin Berlin (BgVV) und im Chemischen Landes- und Staatlichen Veterinäruntersuchungsamt Münster jeweils mittels LC/MS/MS nach Direktinjektion durchgeführt, wobei nur in zwei Rotweinproben übereinstimmend durch alle drei Institute Gehalte von 0,03 µg/l nachgewiesen wurden. In allen übrigen Fällen, in denen mittels HPLC keine Gehalte über der Nachweisgrenze von 0,01 µg/l festgestellt wurden, konnte dies durch die MS-Untersuchung bestätigt werden.

## Ergebnisse

### Statistische Prozessanalyse

Die Feststellung, dass Rotweine stärker OTA-belastet sind, war bisher nicht durch exakte Zahlenvergleiche, z.B. der Mittel- oder Medianwerte, zu untermauern, da bei Weiß- und Roséweinen mehr als 50 % und bei Rotweinen annähernd 50 % unter der Nachweisgrenze la-

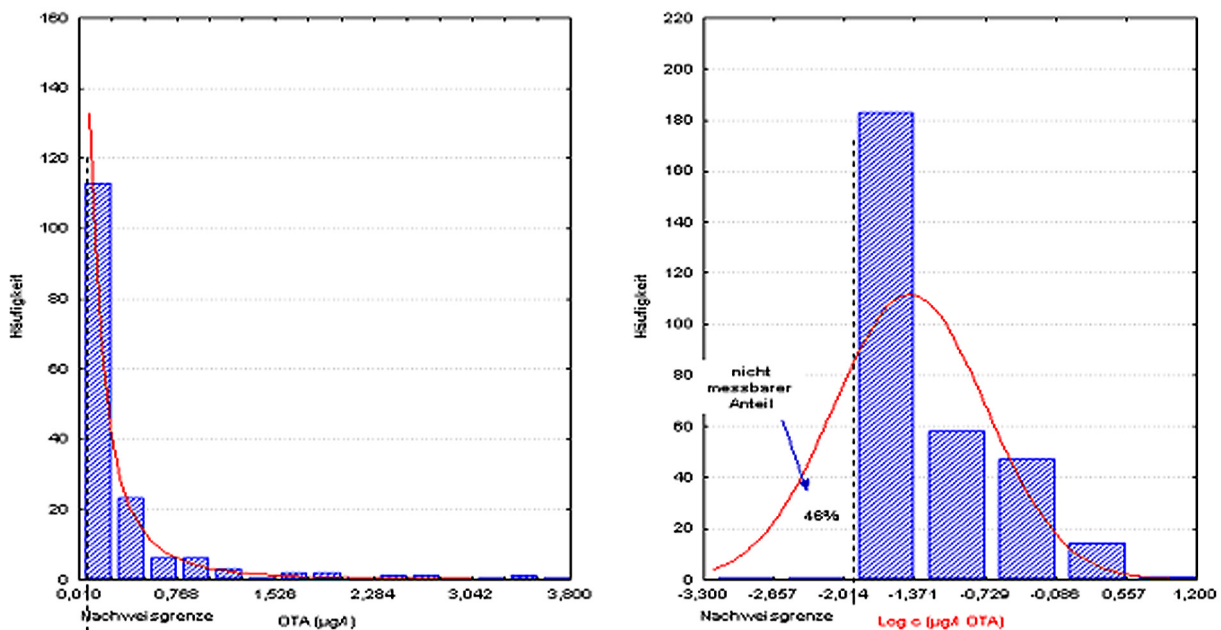


Abb. 1: Häufigkeitsverteilung von OTA-Gehalten in Rotwein, normaler und logarithmischer Maßstab

gen. Damit sind Medianwerte nicht und Mittelwerte nur sehr grob abschätzbar. Die bisherigen Schätzungen beruhen z.B. auf der Konvention zur Berechnung des arithmetischen Mittelwertes, bei Werten unter der Nachweisgrenze die halbe Nachweisgrenze anzusetzen. Einen Ausweg bietet hier die sog. statistische Prozessanalyse (UERKVITZ, 1999).

Dabei werden die linksseitig verschobenen Häufigkeitsverteilungen rechnerisch durch Logarithmieren der Werte für die Konzentrationen in eine Normalverteilung konvertiert.

Tab. 2: OTA-Gehalte in Wein (Werte in µg/l)

	weiß	rosé	rot	gesamt
Probenzahl	90	63	303	456
positiv %	20	37	52	43
Mittelwert <sup>1</sup>	0,073	0,105	0,179	0,148
Median <sup>2</sup>	0,0004	0,006	0,020	0,012
Minimum	0,01	0,01	0,01	0,01
Maximum	1,36	2,38	7,0	7,0

<sup>1</sup> = arithmetischer Mittelwert

<sup>2</sup> = graphisch ermittelter Medianwert

Man erhält eine durch die Nachweisgrenze zensierte Verteilung (Abb. 1), diese lässt sich im Wahrscheinlichkeitsnetz als Gerade darstellen und der Medianwert durch Extrapolation graphisch ermitteln (Abb. 2).

Mit Hilfe dieses Verfahrens kommt man dem Median deutlich näher als über die Berechnung der halben Nachweisgrenze.

Aus Tabelle 2 ist klar zu ersehen, dass bei der Berechnung der Mittelwerte unter Berücksichtigung der halben Nachweisgrenze die mittlere OTA-Belastung deutlich überschätzt wird. Zum anderen zeigen aber die graphisch ermittelten Medianwerte die deutlichen Unterschiede der OTA-Belastung zwischen Weiß-, Rosé- und Rotweinen auf.

### Überlegungen zur Festlegung eines OTA-Grenzwertes

Aus der Verteilungsfunktion für die OTA-Gehalte in Rotwein lässt sich der jeweilige Anteil an Proben und damit in grober Annäherung auch das Handelsvolumen abschätzen, das bei den verschiedenen, fiktiv angesetzten Grenzwerten noch oder nicht mehr verkehrsfähig wäre.

Tabelle 3 zeigt deutlich, dass sich die bisherige Situation bei einem Grenzwert von 3 µg/l kaum ändern würde,

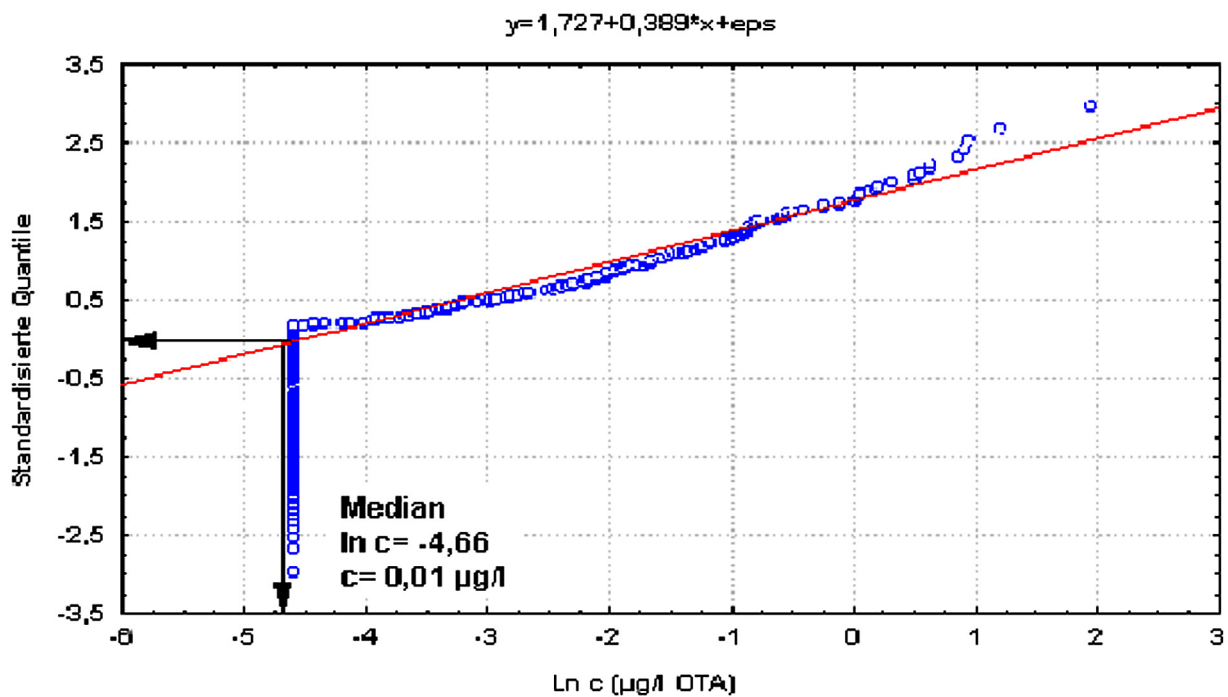


Abb. 2: OTA-Gehalte in Wein (rot, weiß und rosé), Häufigkeitsverteilung, Darstellung im Wahrscheinlichkeitsnetz

Tabelle 3:

Prozentueller Anteil nicht verkehrsfähiger Weine in der Stichprobe aus 303 Rotweinen weltweiter Herkunft bei Festlegung unterschiedlicher OTA-Grenzwerte

Fiktiver Grenzwert (µg/l)	% Proben über dem Grenzwert
0,1	25,2
0,5	8,9
1,0	5,4
2,0	2,7
3,0	1,8
4,0	1,3
5,0	1,1

da fast alle Weine verkehrsfähig wären. Ein spürbarer Effekt, bei dem kontaminierte Weine ausgeschlossen werden, kann erst ab 1 µg/l erkannt werden. Dies würde zu einer 5%igen Ablehnungsquote führen.

### Fiktive Belastungssituation für Konsumenten

Aus diesen Daten lässt sich aber auch abschätzen, inwieweit sich die Belastungssituation für den Verbraucher ändert. Unter Annahme eines verhältnismäßig hohen Verzehrwertes von 0,5 l Rotwein pro Tag, der ca. 20-fach über dem statistisch ermittelten Pro-Kopf-Verbrauch liegt, ergäbe sich in der jetzigen Situation eine Ausschöpfungsrate von ca. 2,8 % des Wertes für die tägliche tolerierbare Aufnahme (TDI-Wert). Diese Quote würde erst bei einem Grenzwert von 0,1 µg/l spürbar auf die Hälfte reduziert (Tab. 4).

Die Darstellung in Tabelle 4 zeigt einerseits, dass bei den derzeit bestehenden OTA-Werten die Belastung aus toxikologischer Sicht für den Verbraucher gering ist. Andererseits haben aber technisch machbare Grenzwerte zwischen 0,5 und 3 µg/l nur eine geringe Auswirkung auf die Ausschöpfungsrate des TDI-Wertes und damit einen geringen Effekt. Sofern ein Ochratoxin A-Grenzwert für Wein im Bereich von 0,5 bis 2 µg/l angesiedelt ist, leistet er primär lediglich einen Beitrag zur Qualitätssteigerung. Um dem Minimierungsgebot der

Tabelle 4:  
OTA-Grenzwerte/Ausschöpfung des TDI-Wertes

Spannweite/ Grenzwert (µg/l)	Quantil %	Median (µg/l)	% TDI
≥7,0	100,0	0,020	2,8
5,0	98,9	0,020	2,8
4,0	98,7	0,020	2,8
3,0	98,2	0,019	2,8
2,0	97,3	0,019	2,7
1,0	94,9	0,018	2,5
0,5	91,1	0,016	2,2
0,2	83,2	0,012	1,8
0,1	74,8	0,010	1,4

EU-Kontaminanten-VO (EU, 2002) zu entsprechen, sind jedoch neben einer Grenzwertregelung Untersuchungen zu den Bedingungen der OTA-Bildung unabdingbar. Hierzu liegen nach wie vor noch keine detaillierten Erkenntnisse vor. Es muss deshalb zum jetzigen Stand damit gerechnet werden, dass die Kommission der Gemeinschaft die im Erwägungsgrund 13 der Kontaminanten-VO (EU, 2002) genannte Ankündigung wahr macht und einen Grenzwert ohne Rücksicht auf die technische Machbarkeit festlegt.

## Literatur

- BURDASPAL, P.A. y LEGARDA, T.M. 1999: Ochratoxin A en vinos, mostos y zumos de uva elaborados en Espana y en otros paises Europeos. *Alimentaria* (299): 107-114
- CERUTTI, G., D' AMATO, A. e ZUCCHETTI, M. 2000: Sulla presenza di ocratoxina A, nitrato e nitrito nel vino. *Tecniche Nuove* (Maggio 2000): 39-43
- EU (1998): Europäische Kommission, DG XXIV: SCF, Opinion on Ochratoxin A, CS/CNTM/MYC/14 Final (im Druck)
- EU (1999): Entwurf, Verordnung (EG) der Kommission zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 194/97 vom 31. Januar 1997 zur Festsetzung der zulässigen Höchstgehalte an Kontaminanten in Lebensmitteln vom 18.11.1999, SANCO/3347/99-DE
- EU (2001): Framework of co-operation by Member States in the scientific examination of questions relating to food, Task 3.2.7: Assessment of dietary intake of Ochratoxin A by the population of EU Member States
- EU (2002): Verordnung (EG) Nr. 472/2002 der Kommission vom 12. März 2002 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 466/2001 zur Festlegung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln; Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft vom 16.03.2002 Nr. L 75, S. 18 - 19
- IARC (1993): Some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and Mycotoxins. - IARC Monographs on evaluation of carcinogenic risks to humans 56: S. 489-521
- MARKAKI, P., DELPONT-BINET, C., GROSSO, F. and DRAGACCI, S. 2001: Determination of Ochratoxin A in red wine and vinegar by immunoaffinity high-pressure liquid chromatography. *J. Food Protection* 64(4): 533-537
- O.I.V. (2001a): Resolutionsentwurf Nr. OENO/SECAL/01/192/Step 4. - Paris: O.I.V., 2001
- O.I.V. (2001b): O.I.V. Resolution OENO/6/2001, Determination of Ochratoxin A by column of immuno-affinity. - Paris: O.I.V., 2001
- O.I.V. (2003): Recueil des Méthodes Internationales d' Analyses des Vins et des Moûts. - Paris: O.I.V. (im Druck)
- OSPITAL, M., CAZABEIL, J.-M., BETBEDER, A.-M., TRICARD, C., CREPPY, E. et MEDINA, B. 1998: L' ochratoxin A dans les vins. *Revue Française Oenologie* (169): 16-18
- OTTENEDER, H. and MAJERUS, P. 2000: Occurrence of Ochratoxin A (OTA) in wines : influence of the type of wine and its geographical origin. *Food Additives and Contaminants* 17: 793-798
- SOLEAS, G.I., YAN, Y. and GOLDBERG, D.M. 2001: Assay of Ochratoxin A in wine and beer by high-pressure liquid chromatography photodiode array and gas chromatography mass selective detection. *J. Agric. Food Chem.* 49: 2733-2740
- UERKVITZ, R. 1999: Prozessniveau im Grenzbereich, Zensierte Lognormalverteilungen zur Prozessbeurteilung für extrem asymmetrische Messwertverteilungen. *QZ Qualität und Zuverlässigkeit* 11: 1400-1403
- VISCONTI, A., PASCALE, M. and CENTONZE, G. 1999: Determination of Ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatography A* (864): 89-101
- ZIMMERLI, B. and DICK, R. 1996: Ochratoxin A in table wine and grape juice: occurrence and risk assessment. *Food Additives and Contaminants* 13: 655-668

Manuskript eingelangt am 7. Juni 2002