

G. Fuchs, S. Koswig

Bestimmung von Thiabendazol (TBZ) in Zitrusäften

• HPLC • Thiabendazol • Zitrusäfte • Zitrusaft-Konzentrate



G. Fuchs



S. Koswig

1. Einleitung

Thiabendazol [2-(4-thiazolyl)benzimidazol] (TBZ) ist ein vielseitig einsetzbarer Wirkstoff und dient vor allem bei der Lagerung von Zitrusfrüchten und Bananen als Fungizid, um die Oberfläche der Früchte vor Pilzbefall zu schützen.

Eingesetzt wird TBZ aber auch als Pflanzenbehandlungsmittel im Obst- und Gemüseanbau sowie als Arzneimittel in der Tiermedizin.

Die Richtlinie Nr. 95/2/EG [1] führt in Anhang III Teil C Thiabendazol als Konservierungsmittel auf und legt für die Oberflächenbehandlung von Zitrusfrüchten eine Höchstmenge von 6 mg/kg und für Bananen von 3 mg/kg fest.

Derart behandelte Früchte dürfen aber zur Herstellung von Fruchtsaft nicht verwendet werden, da die Fruchtsaft-Verordnung [2] festlegt, das zur Herstellung von Fruchtsaft „nur Früchte verwendet werden dürfen, die frisch oder durch Kälte haltbar gemacht sind.“

Eine Verwendung von mit Thiabendazol konservierten Zitrusfrüchten ist danach ausgeschlossen.

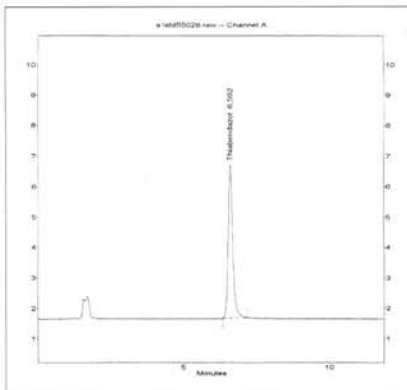


Abb. 1a: Chromatogramm eines TBZ-Standards; Konzentration: 52,4 µg/L TBZ; HPLC-Bedingungen s. 2.4

Nach Anlage 2 zur Pflanzenschutzmittel-Höchstmengen-Verordnung vom 1. September 1994 [3] dürfen „andere Pflanzliche Lebensmittel“ als Kartoffeln, Kernobst, Kohlgemüse, Rapssamen und Getreide maximal 0,1 mg/kg TBZ enthalten.

Im Rahmen der Umsetzung der EG-Richtlinie 95/2 in nationales Recht sieht der z. Zt. vorliegende Entwurf der Bundesregierung zur Änderung der Rückstandshöchstmengen-Verordnung (Stand: 1. April 1996) eine Änderung dieses Grenzwertes auf 0,05 mg/kg vor.

Es erschien deshalb sinnvoll, eine Methode zur Bestimmung von Thiabendazol in Zitrusfrüchten und daraus hergestellten Produkten zu entwickeln, die insbesondere geeignet ist, die Verwendung von mit Thiabendazol konservierten Früchten bei der Fruchtsaftherstellung nachzuweisen.

2. Methode und Material

2.1 Kurzbeschreibung

Das Thiabendazol wird mit Methanol/Wasser 1:1 durch intensives Schüt-

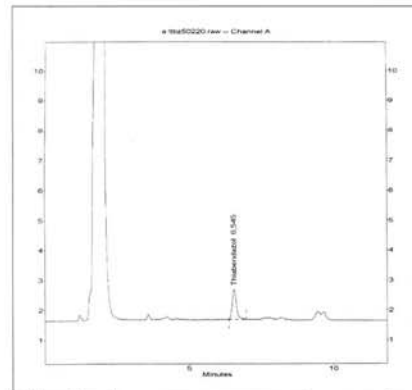


Abb. 1b: Chromatogramm eines Orangensaftes; Konzentration: 13,0 µg/L TBZ; Aufarbeitung unter HPLC-Bedingungen s. 2.4

teln und Ultraschallbehandlung aus der Probe extrahiert, die Lösung durch Zentrifugation von festen Begleitstoffen befreit und das Thiabendazol nach Verdünnen mit Wasser an Bakerbond spe-Säulen gebunden. Nach Elution von den Säulen mittels Dimethylformamid erfolgt die Abtrennung mit Hilfe der HPLC und anschließender Fluoreszenz-Detektion. Die Quantifizierung wird anhand der Methode des externen Standards über die Peakflächen bzw. -höhen vorgenommen.

2.2. Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, sind analysenreine Chemikalien zu verwenden. Das Wasser muß HPLC-Qualität besitzen.

- Acetonitril (HPLC-Qualität)
- Methanol
- N,N-Dimethylformamid
- Extraktionslösung
50 Volumenteile Wasser werden mit 50 Volumenteilen Methanol gemischt
- Phosphorsäure/Natriumchlorid-Pufferlösung
0,404 g Phosphorsäure (85%ig) und 0,018 g Natriumchlorid werden in 1 l Wasser gelöst.
- Elutionslösung für HPLC
35 Volumenteile der Pufferlösung werden mit 65 Volumenanteilen Acetonitril gemischt.
- Stammlösung
ca. 50 mg reines Thiabendazol werden in einen 100 ml Meßkolben genau eingewogen. Sie werden in 10 ml Dimethylformamid gelöst und mit Wasser zur Marke aufgefüllt: (Stammlösung ca. 500 ppm). Diese Stammlösung wird in drei Schritten jeweils 1 : 10 mit Wasser verdünnt.

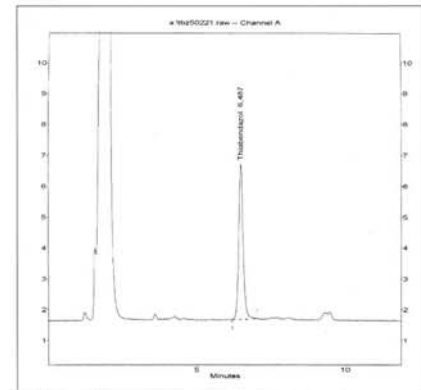


Abb. 1c: Chromatogramm eines Orangensaftes mit TBZ-Zusatz; Konzentration: 62,0 µg/L TBZ; Wiederfindung: 94%; Aufarbeitung unter HPLC-Bedingungen s. 2.4

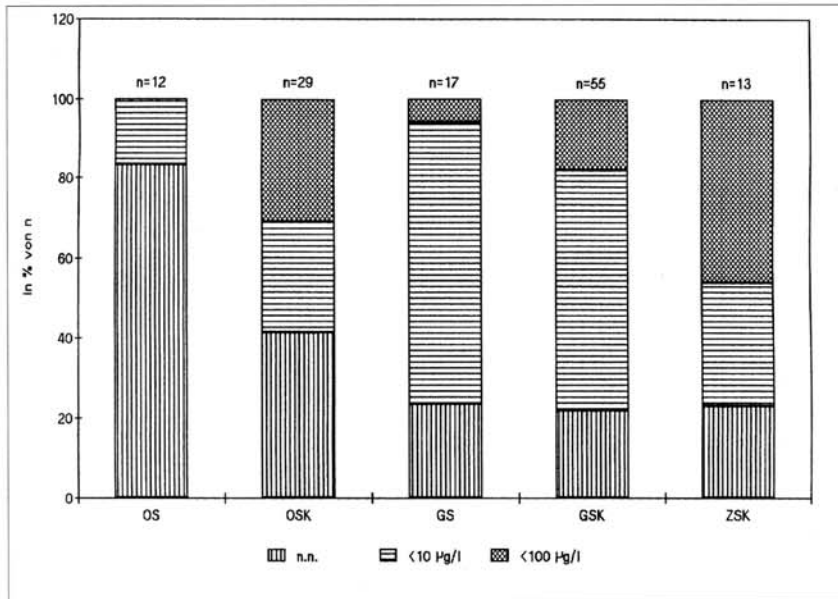


Abb.2: Thiabendazol in Citrussäften, Konzentrate umgerechnet auf Saftstärke

- Standardlösung
10 ml der 3. Verdünnung (500 ppb) werden in einen 100 ml Meßkolben pipettiert und mit Wasser zur Marke aufgefüllt. (Standardlösung ca. 50 ppb). Analog kann durch Verdünnen von 1,2,5,7,8 oder 15 ml der 3. Verdünnung eine Verdünnungsreihe (5,10,25,35,40, oder 75 ppb) erstellt werden. Die Standardlösungen sind bei ca. 4 °C sechs Wochen stabil.
- Vakuumeinheit für HPLC-Probenvorbereitungssäulen BAKER spe-12G
- Probenvorbereitungssäulen für HPLC C-18, 6 ml, 2000 mg Füllung BAKER-BOND spe 7020-08
- Hochleistungsflüssigkeitschromatograph, bestehend aus Pumpe, Probengeber, Fluoreszenzdetektor mit variabler Wellenlängeneinstellung für Anregungs- und Meßwellenlänge Auswertesystem
- Analytische HPLC-Säule 250 x 4,6 mm gefüllt mit Bakerbond-Diol, 5 µm; alternativ BAKERBOND CN, 5 µm Ultraschallbad
- hydrophobe Membranfilter, z.B. mit PTFE-Membran 0,2 µm

2.3. Geräte und Hilfsmittel

- Analysenwaage
- Zentrifuge ca. 4500 g

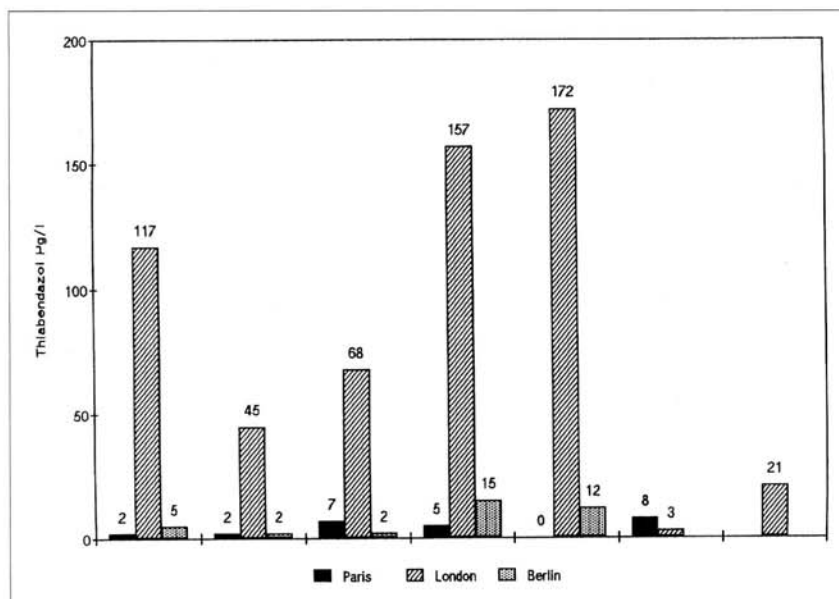


Abb.3: Orangendirektsaft; gekauft in Paris, London, Berlin

2.4. Durchführung

2.4.1. Aufarbeitung von Zitrusäften bzw. -konzentraten

10 ml Saft und 12,5 ml Methanol werden in einen 25 ml-Meßkolben pipettiert und nach Temperierung auf 20 °C mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

Bei der Analyse von Konzentraten werden 2,5 g Konzentrat eingewogen und mit einem Methanol/Wasser Gemisch (1:1) auf 25 ml aufgefüllt.

Anschließend wird 1 Minute intensiv geschüttelt und für mindestens 2 min im Ultraschallbad behandelt.

Der Inhalt wird 20 Minuten bei 27000 g zentrifugiert. 20 ml des überstandes werden mit 200 ml Wasser verdünnt und diese Lösung wird durch die vorher konditionierte (3 x 5 ml Methanol, 5 x 5 ml Wasser, ohne trockenlaufen zu lassen) C-18-Säule gesaugt. (1 Tropfen/Sekunde)

Die Säule wird mit wenig Wasser nachgewaschen und sorgfältig trocken gesaugt (20 min). Anschließend wird das Thiabendazol mit Dimethylformamid in einen 10 ml Meßkolben eluiert und für die Chromatographie benutzt.

Diese Elution muß sehr langsam erfolgen, da sie sonst unvollständig ist.

2.4.2. Aufarbeitung von Zitrusölen

Öle werden direkt im Meßkolben eingewogen und 1:5 bis 1:50 mit Dimethylformamid verdünnt. Klare Öle sind direkt einsetzbar, trübe werden durch hydrophobe Membranfilter filtriert. Da bei der Bestimmung in Ölen leichte Verschiebungen der Retentionszeit eintreten können, empfiehlt sich die Absicherung durch eine Parallelprobe mit Zusatz von Thiabendazol.

2.4.3. Aufarbeitung von Zitrusfrüchten

Von den ausgewogenen Früchten wird die Schale möglichst dünn abgetrennt und ebenfalls ausgewogen. Die Schale wird zerkleinert und in Methanol/Wasser (1:1) intensiv geschüttelt. Anschließend erfolgt eine 5minütige Behandlung im Ultraschallbad. Die Lösung wird abfiltriert und die Schalen erneut extrahiert. Die vereinigten Filtrate werden auf ein definiertes Volumen aufgefüllt und ein aliquoter Teil gemäß 2.4.1. aufgearbeitet.

2.4.4. HPLC

- Trennsäule: Bakerbond Diol, 5 µm, 250 x 4,6 mm, Edelstahl
- Säulentemperatur: 40 °C
- Fließgeschwindigkeit: 1,5 ml/min

- Injektionsvolumen: 10 µl
- Fluoreszenzdetektor:
E (ex) = 305 nm
E (em) = 350 nm
Time constant = 1 sec
Sensitivity = 100

2.4.5. Identifizierung und quantitative Bestimmung

Die Identifizierung erfolgt durch Vergleich der jeweiligen Retentionszeit mit der Standardsubstanz. Eine zusätzliche Identifizierungsmöglichkeit bietet sich durch Zumischen der Standardsubstanz. (Abb. 1a, 1b, 1c)

2.5. Auswertung

Die quantitative Bestimmung erfolgt nach der Methode des externen Standards durch Integration der Peakflächen bezogen auf die entsprechenden Werte der Standardsubstanz und unter Berücksichtigung der vorgenommenen Verdünnung.

Die Ergebnisse werden ohne Dezimale in µg/l bzw. µg/kg oder in mg/l bzw. mg/kg.

2.6. Zuverlässigkeit der Methode

Die Methode wurde im Rahmen eines Methodenvergleichs von verschiedenen Laboratorien getestet. Die Wiederfindungsraten eines TBZ-Zusatzes betragen:

- Orangensaft
(Zusatz: 10 µg/l): 90 - 113 %
- Grapefruitsaft
(Zusatz: 28 µg/l): 101 - 109 %
- Zitronensaft
(Zusatz: 42 µg/l): 93 - 104 %
- Nachweisgrenze: 1 ppb

3. Ergebnisse

3.1. Zitrus säfte und Zitrus saftkonzentrate

Der Thiabendazolgehalt wurde in Orangen- und Grapefruitsäften und -Konzentraten sowie in Zitronensaftkonzentrat bestimmt. Die Werte der Konzentrate wurden auf Saftstärke umgerechnet. (Orange: 11,18 °Brix, Grapefruit: 10 ° Brix, Zitrone: 8° Brix)

Tab. 1 gibt einen Überblick, über die ermittelten Minimum-, Maximum- und Mittelwerte anhand von beispielhaft zusammengestellten Werten der oben genannten Produkte.

In Abb. 2 sind die Ergebnisse als prozentuale Verteilung in drei Konzentrationsstufen (n.n., <10, <100 µg/l) dargestellt.

In den untersuchten Orangensäften des Handels liegen alle Gehalte unter 10

µg/l. Grapefruitsäfte zeigen höhere Gehalte, aber auch hier liegen 94 % unter 10 µg/l.

Anders sieht es bei den Konzentraten aus. Bei 31 % der auf Saftstärke rückverdünnten Orangensaftkonzentrate wurden Gehalte von über 10 µg/l gefunden.

Kernobst'96

und die BEGEROW-Systemleistung

- ▶ Panzym MK
... zur wirtschaftlichen Einmischung
- ▶ Panzym P5 und Super E
... zur vollständigen Saftdepektinisierung
- ▶ Panzym Flux
... für die Steigerung der Filterleistung
- ▶ Panzym F1 und F2
... die fädchenfreie Kalt- und Heißamylase
- ▶ Panzym HT (30 - 55° C)
... hochkonzentriert und wirtschaftlich
- ▶ SIHA-Ca- und Aktiv-Bentonit
... ideal für die Kalt- und Heißklärung
- ▶ SIHA-Klärgelatine und Baykisol® 30
... für die optimale Klärung
- ▶ BECOLITE® und BECOGUR®
... hochreine und wirtschaftliche Filtermittel
- ▶ BECO BM-Filterschichten
... für die wirtschaftliche Klärfiltration

Mit Sicherheit mehr Wirtschaftlichkeit.
Bestellen Sie jetzt . . .

BEGEROW
ZUVERLÄSSIGKEIT IST UNSER KONZEPT

Filtertechnik • Getränkechutz

... unter unserer Hotline
Tel. 0 67 04 - 20 41 41 oder
Fax 20 41 27

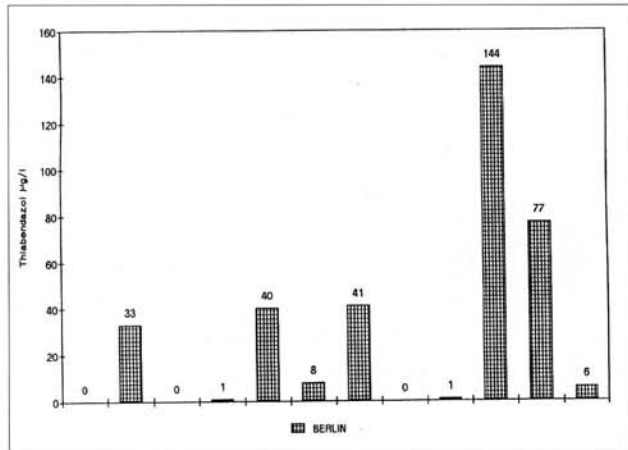


Abb. 4: Orangensaft, frisch gepreßt; gekauft in Bars und Restaurants

Bei Grapefruitsaftkonzentraten war dies in 18,2 % und bei Zitronensaftkonzentraten in 42,2 % der Proben gegeben.

Die unterschiedlichen Ergebnisse bei Säften und Konzentraten sind auf den bei industrieller Herstellung schon aus sensorischen Gründen üblichen Einsatz verschiedener Rohwaren zurückzuführen.

Es war zu vermuten, daß sich die Situation bei Direktsäften, also nicht aus Konzentrat rekonstituierten Säften, und bei frisch gepreßten Säften, wie sie in Bars und Restaurants angeboten werden, anders darstellt.

3.2. Orangen-Direktsäfte

In den europäischen Hauptstädten Paris, London und Berlin wurden Orangen-Direktsäfte im Markt gekauft und der Thiabendazolgehalt bestimmt.

Während bei den in Frankreich gekauften sechs Säften alle Gehalte unter 10 µg/l lagen, zeigten zwei von fünf in

Berlin gekauften Säften Gehalte über 10 µg/l.

Ausgesprochen hohe Werte wurden in den in London gekauften Direktsäften gefunden. Von sieben Proben hatte nur eine einen Gehalt unter 10 µg/l, während bei drei Proben sogar Gehalte über 100 µg/l festgestellt werden konnten. (Abb.3)

3.3. Frisch gepreßter Orangensaft

Unter der Voraussetzung, daß Thiabendazol als erlaubter Konservierungsstoff während der Lagerung bei Citrusfrüchten eingesetzt wird, sollten die daraus in Bars und Restaurants frisch gepreßten Säfte erhöhte Thiabendazolwerte aufweisen.

Bei 12 derartigen, in Berlin gekauften, Säften fanden wir Werte, die teilweise weit über denen von industriell hergestellten Säften lagen (Abb.4).

Tab. 1: Thiabendazol – Konzentrate auf Saftstärke umgerechnet

	n	min µg/l	max µg/l	x µg/l	s
Orangensaft (OS)	12	0	8	1	2,203
Orangensaftkonzentrat (OSK)	29	0	62	10	16,549
Grapefruitsaft (GS)	17	0	37	5	8,458
Grapefruitsaftkonzentrat (GSK)	55	0	78	7	12,72
Zitronensaftkonzentrat (ZSK)	13	0	30	10	10,756

4. Zusammenfassung

Es wird eine HPLC-Methode zur Bestimmung von Thiabendazol in Citrusfrüchten beschrieben. Die mit dieser Methode in verschiedenen Citrusfrucht-Produkten ermittelten Werte werden mitgeteilt.

5. Literatur

1. Richtlinie Nr. 95/2/EG des Europäischen Parlamentes und des Rates der Europäischen Union über andere Lebensmittelzusatzstoffe als Farbstoffe und Süßungsmittel vom 20. Februar 1995 Amtsbl. D. EG 38, Nr. L 61, S. 1 (1995)
2. Verordnung über Fruchtsaft, konzentrierten Fruchtsaft und getrockneten Fruchtsaft (Neufassung) BGBI. I S. 193 vom 17. 2. 1982
3. Verordnung über Höchstmengen an Rückständen von Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmitteln, Düngemittel und sonstigen Mitteln in oder auf Lebensmitteln und Tabakerzeugnissen BGBI. I S. 2299 vom 1.9.1994
4. Wyhowski de Bukanski, B., Degroot, J.-M. Beernaert, H.: ZUL 193, 130-133 (1991)
5. Schwedt, G., Schwadorf, K.: DLR 82, 209-216 (1986)
6. Collinge, A., Noifalaise, A.: J. Chrom. 257, 416-418 (1983)
7. Sannino, A.: Food Chem. 52, 57-61 (1995)

Verfasser: Dr.rer.nat. Günter Fuchs und Dr.rer.nat. Susanne Koswig, GfL, Gesellschaft für Lebensmittel-Forschung, D-10787 Berlin

Materialien zur Marktberichterstattung Band 9 – Verkaufspreise im ökologischen Landbau

160 Seiten, A5-Format, Juni 1996, DM 30,- (Ausland DM 50,-) einschl. Versandkosten, zzgl. Mehrwertsteuer, Zentrale Markt- und Preisberichtsstelle GmbH (ZMP), PF 2569, 53015 Bonn, Tel. 0228/9777-173, Fax 0228/9777-179, ISBN 3-930399-91-1

Das stetig wachsende Angebot ökologischer Agrarprodukte am deutschen Markt war Anlaß für die ZMP, dieses

Marktsegment zu beobachten. Im Oktober 1991 begann der Aufbau eines Berichtssystems in den Bundesländern Nordrhein-Westfalen, Rheinland-Pfalz und Saarland. 1994 wurde das Meldernetz bundesweit ausgedehnt.

Die für die Saison 1995/96 erarbeiteten Informationen über kurzfristige Preisänderungen, aktuelle Markttendenzen und Produktionsentwicklungen für wichtige Produkte des ökologischen Landbaus sind

im Arbeitsbericht 1996 beschrieben. Dabei werden die Saisonverläufe der Preisentwicklung unterschiedlicher Absatzwege den Ergebnissen der Vorjahresaison graphisch gegenübergestellt.

Ergänzend werden die aktuellen Entwicklungen auf dem konventionellen Markt beschrieben, die oftmals einen beträchtlichen Einfluß auf das Geschehen am Markt für ökologisch erzeugte Produkte nehmen. •