

Determinação de ocratoxinas em cervejas, por injeção direta da amostra empregando uma coluna cromatografica IS-aniônica

Ochratoxins determination in beers by direct injection of the sample using a IS-anionic column chromatography

RIALA6/1133

Eliane M. R. S. SIMIONATO^{1*}; Manoel Lima de MENEZES²

*Endereço para correspondência: ¹Universidade do Sagrado Coração (USC), Centro de Ciências da Saúde, Rua Irmã Arminda 10-50, Bauru, SP/Brasil, CEP 17011-160, fone: 2107-7258. Fax: 2107-7000. esimionato@usc.br

²Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências, Departamento de Química, Campos Bauru, SP/Brasil. Av. Eng. Luiz Edmundo Carrijo Coube n° 14-01, CEP 17033-360.

Recebido: 26/07/2007 – Aceito para publicação: 28/12/2007

RESUMO

A ocratoxina A é nefrotóxica e tem sido encontrada em milho, soja, trigo, cevada, arroz e amendoim. O brasileiro consome em média 49 litros de cerveja por ano, sendo que a matéria-prima principal é a cevada, além de milho e o arroz. A determinação das ocratoxinas A e B em bebidas requerem o *clean up* ou colunas de imunoafinidade. Um método analítico, por injeção direta da amostra, empregando cromatografia líquida de alta eficiência, com uma coluna cromatográfica IS-aniônica (Internal Surface Reverse Phase) foi desenvolvido. A recuperação do método variou de 78,5 a 92,1% para os níveis de ocratoxina A na faixa de 0,25 a 4,00 $\mu\text{g.L}^{-1}$; e de 76,5 a 93,1% para a ocratoxina B na faixa de 1,25 a 20,00 $\mu\text{g.L}^{-1}$; limites de detecção de 0,15 e 0,35 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para ocratoxina A e B, e os limites de quantificação 0,25 e 0,60 $\mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. Num total de 42 amostras de cervejas comercializadas em Bauru e região 2,4 % das amostras de cervejas nacionais, e 11,1 % das cervejas importadas estavam contaminadas com ocratoxina A entre 0,32 e 0,80 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Quanto a ocratoxina B, foi encontrada apenas em 2,4% das amostras de cervejas nacionais, no nível de 0,78 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Palavras-chave. cerveja, cromatografia, ocratoxinas, injeção direta, IS-aniônica.

ABSTRACT

Ochratoxin A is nephrotoxic and has been found in corn, soy, wheat, barley, rice, sorghum and peanut samples. Brazilians consume in average 49 liters of beer yearly, barley being the main raw material, besides maize and rice in a second level. The determination of the ochratoxins A and B in alcoholic beverages require clean-up or immunoaffinity columns. A new analytical method by direct injection of the sample of beer, using liquid chromatography of high efficiency, with a IS-anionic chromatographic column (*Internal Surface Reverse Phase*) was developed. The considered method presented a recovery that varied from 78.5 to 92.1% for the levels of ochratoxin A in the range of 0.25 to 4.00 $\mu\text{g.L}^{-1}$; and 76.5 to 93.1% for the ochratoxin B at the level of 1.25 to 20.00 $\mu\text{g.L}^{-1}$. The limits of detection were 0.15 and 0.35 $\mu\text{g.L}^{-1}$ and the limits of quantification 0.25 and 0.60 $\mu\text{g.L}^{-1}$ for ochratoxins A and B, respectively. In a total of 42 samples of beers commercialized in Bauru and region, 2.4% of the samples of national beers and 11.1% of the imported ones were contaminated with ochratoxin A above the of quantification, being the level detected between 0.32 and 0.80 $\mu\text{g.L}^{-1}$. ochratoxin B was detected in only 2.4% of national beer samples at the level of 0.78 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Key words. beer, chromatography, direct injection, ochratoxins, IS-anionic.

INTRODUÇÃO

Dentre as micotoxinas o grupo das ocratoxinas divide-se em ocratoxina A, ocratoxina B e ocratoxina C. Quimicamente, são compostos que apresentam uma fenilalanina ligada a uma isocumarina por ligação amida. A ocratoxina A apresenta fluorescência verde e uma molécula de cloro na fórmula, responsável pelo caráter tóxico. A ocratoxina B, possui fluorescência azulada, não revela toxicidade pela ausência de molécula de cloro. A ocratoxina C com fluorescência verde, constitui um etil éter da ocratoxina A, sendo muito menos tóxica que a outra¹.

A ocratoxina A (OTA), produzida por *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium verrucosum*, é classificada pela Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC) como sendo uma substância do Grupo 2B, ou seja, um agente possivelmente cancerígeno para o homem². O Comitê Científico para Aditivos e Contaminantes (JECFA) da Organização Mundial de Saúde/Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO/WHO) propôs um limite máximo tolerável para ingestão semanal de 0,1 µg.kg⁻¹ de peso corpóreo³.

São vários os alimentos que têm apresentado OTA, dentre eles alguns fazem parte do consumo alimentar diário do brasileiro, como arroz, feijão, café, milho, cevada, trigo e vinho^{4,5,6,7,8}.

A cerveja é a bebida não destilada obtida pela fermentação alcoólica de mosto de cereal maltado, geralmente malte de cevada. É facultativa a adição de outro material amiláceo (milho, arroz) e de lúpulo; em geral o teor alcoólico é baixo, entre 0,5% para o tipo sem álcool e 7% ou mais para cerveja de alto teor alcoólico⁹.

No mercado de cerveja, o Brasil ocupa a quinta posição. Em 2005 apresentou aumento na produção em relação ao ano anterior, totalizando 9,02 bilhões de litros, sendo o consumo per capita do brasileiro de 49,0 litros/ano, segundo estimativa do Sindicato Nacional da Indústria da Cerveja, SINDICERV¹⁰.

O processo de fermentação não é capaz de eliminar totalmente a OTA presente no malte e nos demais cereais, o que torna bastante viável a ocorrência deste composto na cerveja^{11,12,13}.

A separação e quantificação das ocratoxinas em diferentes tipos de amostras, tem apresentado algumas dificuldades no que se refere à preparação da amostra, fase que visa remover os interferentes, aumentando a seletividade do método; concentrar o analito, tornando o método mais sensível; converter o analito, se necessário, em um analito mais adequado para detecção ou separação. Além disso, o procedimento de preparo da amostra deve ser rápido e prático, com perdas mínimas de analito e baixo custo de análise.

Há várias técnicas ditas *off-line* para o pré-tratamento de amostras, sendo as mais clássicas a extração em fase sólida (*solid-phase extraction*) e a extração líquido-líquido (*liquid-liquid extraction*).

O uso de procedimentos de extração *on-line* é particularmente atrativo em situações onde um grande número

de amostras deva ser analisado rotineiramente e/ou materiais perigosos (tóxicos) ou altamente infectantes devam ser processados. Dentre as técnicas de injeção direta e repetitiva de amostras não tratadas no sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a que utiliza fases RAM (*Restricted-Access Media*) tem um enorme destaque, sendo extremamente vantajosa em pesquisas e análises clínicas, toxicológicas e farmacêuticas e outras, devido a sua capacidade de reduzir o tempo e o manuseio laborioso empregados no procedimento analítico.

Visando acelerar a velocidade analítica, desenvolvemos um novo método por injeção direta da amostra de cerveja, empregando cromatografia líquida de alta eficiência com uma pré-coluna cromatográfica IS-aniônica (Internal Surface anionic Phase).

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Preparo das amostras para a validação da metodologia

Uma amostra de 50 mL de cerveja, considerada amostra controle, foi desaerada em banho ultrassônico por 30 minutos e depois foi fortificada com a quantidade calculada para cada nível desejado, a seguir, foi diluída na proporção de 1:5 (cerveja:água destilada) e realizada a determinação por CLAE utilizando a técnica de padrão externo com auxílio de uma curva padrão.

Amostras de cervejas

As amostras de cerveja foram adquiridas no comércio de Bauru, Estado de São Paulo e região, no período de maio a agosto de 2005, foram analisadas 42 amostras de cervejas nacionais e 09 amostras de cervejas importadas sendo: 03 da Alemanha, 02 do México, 01 Argentina, 01 Canadá, 01 da Holanda e 01 do Japão. Das cervejas líderes de mercado foram analisadas 3 amostras diferentes de cada marca, das demais apenas uma amostra foi analisada.

Entre as cervejas analisadas estão relacionadas cervejas do tipo Pilsen, cervejas escuras e sem álcool.

Metodologia

A coluna aniônica (IS-aniônica) empregada como pré-coluna foi obtida com a fase estacionária cloreto de N, N-propiltriethylaminônio silano. A imobilização da proteína nesta coluna seguiu o procedimento descrito por Menezes e Félix¹⁴. A coluna analítica empregada posteriormente a IS-aniônica foi uma coluna cromatográfica C₁₈, 5 µm, 110 Å, 250mm x 2,0mm DI.

Os experimentos cromatográficos foram realizados sob condições isocráticas em um sistema de CLAE - Varian modelo Pro Star Polaris, com detector de fluorescência emissão em 325nm e excitação 460nm. As soluções padrão foram injetadas em uma válvula Rheodyne 7125. Foi utilizada uma alça de

injeção com volume de 1000 μ L. Uma segunda válvula Rheodyne 7000 foi empregada para efetuar a mudança de fluxo para a segunda fase móvel, empregando a técnica de *column switching* (Figura 1). As fases móveis empregadas foram: Bomba A - água destilada, vazão 1,0mL.min⁻¹, por 10 minutos,

para a extração dos analitos e Bomba B - solução aquosa de ácido clorídrico 1,0% (v/v): acetonitrila (60:40) (v/v), vazão 0,4mL.min⁻¹, por mais 35 minutos, para a separação analítica. Os tempos de retenção foram 31 e 40 minutos para OTB e OTA respectivamente.

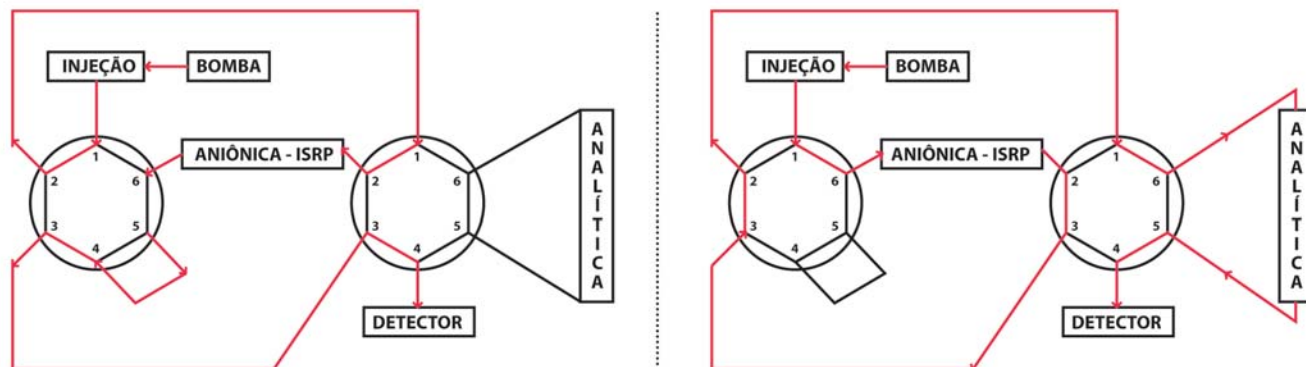


Figura 1. Representação do *column switching system* para transferências das ocratoxinas A e B para a coluna analítica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Validação da Metodologia Analítica

Os resultados obtidos indicaram que o método proposto é eficiente para a detecção e quantificação de OTA e OTB em cervejas, pois apresentou uma recuperação que variou de 78,5 a 92,1% para os níveis de OTA na faixa de 0,25 a 4,00 μ g.L⁻¹ e de 76,5 a 93,1% para a OTB na faixa de 1,25 a 20,00 μ g.L⁻¹ com precisão estimada pelo coeficiente de variação (CV) entre 5,36 a 11,48% para OTA e 4,09 a 10,72% para a OTB nas faixas acima estabelecidas. A recuperação foi efetuada em quadruplicata para cada nível proposto (Tabela 1).

Os limites de detecção (LD) foram determinados como a menor massa das substâncias detectadas, nas condições do método proposto, com sinal no mínimo de três vezes o valor do ruído do cromatograma, sendo 0,15 e 0,35 μ g.L⁻¹ para OTA e OTB. Os limites de quantificação (LQ) foram estabelecidos como a menor concentração que pode ser determinada com precisão aceitável sob as condições do ensaio, sendo 0,25 e 0,60 μ g.L⁻¹ para OTA e OTB, respectivamente.

As curvas padrão construídas nas faixas de 0,05 a 0,80 μ g.L⁻¹ e entre 0,25 a 4,0 μ g.L⁻¹ para OTA e OTB apresentaram coeficiente de correlação de 0,9996 e 0,9987 respectivamente. Assim foi possível efetuar a extração e pré-concentração *on line* das ocratoxinas A e B presentes em amostras de cervejas.

Análise de Amostras Reais

As Tabelas 2 e 3 mostram os valores encontrados nos diferentes tipos de cerveja, cada amostra foi analisada em triplicata. Nas cervejas nacionais apenas uma (2,4%) apresentou OTA quantificável igual a 0,32 μ g.L⁻¹ e em outras duas amostras

(4,8%) valores entre LD e LQ. A OTA foi verificada em quantidade bastante elevada em uma amostra de cerveja do Canadá, que apresentou concentração de 0,80 μ g.L⁻¹. Os valores encontrados para OTA nas cervejas analisadas, tanto nacionais como importadas estão em acordo aos valores observados em outros artigos.

Quanto a OTB 11 amostras nacionais (26,2%) apresentaram valores entre LD e LQ e uma (2,4%) apresentou valor quantificável de 0,78 μ g.L⁻¹.

Scott e Kanhere¹⁵ analisaram 41 amostras de cervejas canadenses e 11 amostras importadas (República Tcheca, Dinamarca, Alemanha, Irlanda, Itália, Japão, Quênia, Holanda, Polônia, Reino Unido e Estados Unidos) e verificaram a presença de traços de OTA (< LD = 0,2ng.mL⁻¹) em 63,4% das amostras.

Legarda e Burdaspal¹⁶ analisaram 38 amostras de cervejas espanholas sendo 30 com álcool e 8 sem álcool, encontraram OTA em 96,75 e 100% das amostras, sendo a média de 0,026ng.mL⁻¹ e 0,018ng.mL⁻¹ respectivamente. Também analisaram 34 amostras de cervejas importadas, sendo que encontraram OTA em todas as amostras, com valores médios de 0,026ng.mL⁻¹ para cerveja com álcool e 0,025ng.mL⁻¹ para as cervejas sem álcool.

Nakajima et al.¹⁷ analisaram 94 amostras de cervejas importadas e 22 de origem japonesa, sendo que das importadas 91,5% apresentaram OTA com valor médio de 10,1 pg.mL⁻¹ e 95,5% das japonesas apresentaram valor médio 12,5pg.mL⁻¹.

Degelmann et al.¹⁸ analisaram 35 amostras de cervejas alemãs e encontraram traços de OTA em 60% destas, outras 26% apresentaram OTA entre 0,1 e 0,26 μ g.L⁻¹.

Filali et al.¹⁹ analisaram 5 amostras de cerveja da região de Marrocos, sendo que nenhuma delas apresentou OTA acima do limite de quantificação do método 0,01 μ g.L⁻¹.

Tabela 1. Recuperação de OTA e OTB em amostras de Cerveja Pilsen.

OTA na amostra controle ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	% de Recuperação (média)	Desvio Padrão	C.V. (%)	OTB na amostra controle ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	% de Recuperação (média)	Desvio Padrão	C.V. (%)
0,25	78,5	9,00	11,48	1,25	76,58	3,12	4,08
0,50	80,8	4,65	5,75	2,50	4,68	8,73	10,30
1,00	92,1	9,01	9,78	5,00	7,28	5,87	6,73
2,00	86,8	4,66	5,36	10,00	3,59	3,38	4,04
4,00	91,3	6,02	6,59	20,00	3,1	9,99	10,72

C.V.= coeficiente de variação.

Tabela 2. Determinação de OTA e OTB em amostras de cervejas nacionais.

Tipos de cervejas	Número de amostras	OTA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Número de amostras	OTB ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
Pilsen	30	<LD	20	<LD
	02	<LQ e >LD	11	<LQ e >LD
	01	0,32	01	0,78
Escura	05	<LD	05	<LD
Sem álcool	03	<LD	04	<LD
	01	<LQ e >LD	01	<LQ e >LD
Total	42	01	42	01

Tabela 3. Determinação de OTA e OTB em amostras de cervejas importadas.

Tipos de cervejas	Número de amostras	OTA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Número de amostras	OTB ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
Pilsen	05	<LD	07	<LD
	01	<LQ e >LD		
	01	0,80		
Escura	01	<LD	01	<LD
Sem álcool	01	<LD	01	<LD
Total			09	-

Soleas et al.²⁰ analisaram 107 amostras de cerveja de cinco regiões distintas: Canadá, Reino Unido, Europa, EUA e Oriente. Em apenas duas amostras foram encontradas OTA entre 0,05 e 0,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Tangni et al.²¹ analisaram 62 amostras de cervejas belgas sendo que 82% das amostras apresentaram OTA entre 10 e 200 ng.L^{-1} , com valor médio de 33 ng.L^{-1} , variando de 10 a 185 ng.L^{-1} ; 15% apresentaram traços. Também analisaram 20 amostras importadas e 85% das amostras apresentaram OTA

entre 10 e 200 ng.L^{-1} , sendo o valor médio 32 ng.L^{-1} , variando de 12 a 87 ng.L^{-1} ; 15% apresentaram traços.

Odhav e Naicker²² analisaram 6 marcas comerciais de cervejas da África do Sul e não encontraram OTA. Dez amostras do total de 29 cervejas caseiras apresentaram OTA (34,5%), com níveis de 3 a 2340 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Pesquisadores brasileiros avaliaram a ocorrência de OTA em cervejas brasileiras e importadas. Nas amostras brasileiras encontraram apenas traços (<LQ= 0,008 $\mu\text{g.L}^{-1}$) e

nas amostras importadas verificaram presença entre 0,25 e 0,83 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de OTA²³. Outros pesquisadores analisaram 123 amostras de cervejas na região de Campinas de 24 marcas diferentes, sendo que apenas cinco, todas do tipo *Pilsen*, apresentaram teores que variaram de 1 a 18ng.mL⁻¹ de ocratoxina A²⁴.

Em apenas um artigo observamos a pesquisa de OTB na Alemanha, onde 161 amostras de cerveja foram analisadas e não foi verificada sua presença, mas os autores não relataram em seu artigo qual o limite de detecção do método empregado²⁵.

CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho indicaram que o método desenvolvido empregando uma coluna cromatográfica IS-aniônica instalada em série com uma coluna analítica C₁₈, possibilita efetuar a injeção direta das amostras de cervejas, com a extração e separação *on line*, sem o tratamento prévio das amostras de cerveja.

O método proposto é eficiente para a detecção e quantificação de ocratoxinas A e B em cervejas, pois apresentou uma recuperação que variou de 78,5 a 92,1% para os níveis de OTA na faixa de 0,25 a 4,00 $\mu\text{g.L}^{-1}$; e de 76,5 a 93,1% para a OTB na faixa de 1,25 a 20,00 $\mu\text{g.L}^{-1}$ com precisão estimada pelo coeficiente de variação (CV) entre 5,36 a 11,48% para OTA e 4,09 a 10,72% para a OTB nas faixas acima estabelecidas. Limites de detecção na amostra de 0,15 e 0,35 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para OTA e OTB, respectivamente.

O levantamento da ocorrência de OTA e OTB em cervejas comercializadas em Bauru e região mostraram que 2,4 % das amostras de cervejas nacionais e 11,1 % das cervejas importadas estavam contaminadas com OTA acima do LQ, 0,32 e 0,80 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Quanto à OTB, foi encontrada em 2,4 % das amostras de cervejas nacionais no nível de 0,78 $\mu\text{g.L}^{-1}$. A OTB não foi detectada nas amostras importadas de cerveja.

AGRADECIMENTO

À FAPESP pela aprovação do Projeto, a qual possibilitou a compra dos equipamentos utilizados neste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Scussel VM. Micotoxinas em alimentos. Florianópolis: Insular; 1998. 144p.
2. IARC. Volume 56 - Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. 21 ago 1997. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/>

3. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Summary of Evaluation Performed. 25 abr 2002. Disponível em: <<http://jecfa.ils.org/evaluation.cfm?chemical=OCHRATOXIN%20A&keyword=%20>>. Acesso em 21/05/2007.
4. Soares LMV, Amaya DBR. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. *JAOAC Int* 1989; 72(1):22-6.
5. Van Egmond HP, Speijers GJA. Survey of data on the incidence and levels of ochratoxin A in food and animal feed worldwide. *J Nat Tox* 1994; 3(2):125-44.
6. Studer-Rohr I, Dietrich DR, Schlatter J, Schlatter C. The occurrence of ochratoxin A in coffee. *Food Chem Toxicol* 1995;33(5):341-55.
7. Furlong EB, Soares LAS, Vieira AP, Dadalt G. Aflatoxinas, ocratoxina a e zearalenona em alimentos da região sul do Rio Grande do Sul. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 1999;58(2): 105-11.
8. Visconti A, Pascale M, Centoze G. Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1999;864(1):89-101.
9. Venturini Filho WG, Cereda MP. Cerveja. In: Aquarone, E, Borzani, W, Schmidell, W, Lima, UA. Alimentos e bebidas produzidos por fermentação. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. p. 91-144.
10. Sindcerv: Sindicato Nacional da Indústria da Cerveja. Mercado. Jan/jun 2006. Disponível em: <<http://www.sindicerv.com.br/pdf/Consumo%20Agregado%201985%20-%202006.pdf>>. Acesso em: 21/06/2007.
11. Chu FS, Chang CC, Ashoor SH, Prentice N. Stability of aflatoxin B₁ and ochratoxina A in brewing. *Appl Microbiol* 1975;29(3):313-16.
12. Alldrick AJ. The effects of processing on the occurrence of ochratoxin A in cereals. *Food Addit Contam* 1996;13 Suppl 1:S27-8.
13. Scott PM. Mycotoxins transmitted into beer from contaminated grains during brewing. *JAOAC Int* 1996; 79(4):875-82.
14. Menezes ML, Félix G. Analysis of organochlorine pesticides in plain milk using direct injection on a ISRP column, with column switching. *J Liq Chromatogr* 1996; 19:3221-8.
15. Scott PM, Kanhere SR. Determination of ochratoxin A in beer. *Food Addit Contam* 1995; 12(4):591-8.
16. Legarda TM, Burdaspal PA. Ocratoxina A em cervezas elaboradas em espana y em otros países europeos. *Alimentaria* 1998;115-22.

17. Nakajima M, Tsubouchi H, Miyabe M. A survey of ochratoxin A and aflatoxins in domestic and imported beers in Japan by immunoaffinity and liquid chromatography. *J Assoc Off Anal Chem* 1999; 82(4):897-902.
18. Degelmann P, Becker M, Herderich M, Humpf HH. Determination of ochratoxin A in beer by high-performance liquid chromatography. *Chromatographia* 1999; 49(9/10):543-6.
19. Filali A, Ouammi, L, Betheder AM, Baudrimont I, Soulaymani R, Benayada A, et al. Ochratoxin A in beverages from Morocco: a preliminary survey. *Food Addit Contam* 2001; 18(6):565-98.
20. Soleas GJ, Yan J, Goldberg DM. 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* 2001; 49:2733-40.
21. Tangni EK, Ponchaut S, Maudoux M, Rozemberg R, Larondelle Y. Ochratoxin A in domestic and imported beers in Belgium: occurrence and exposure assessment. *Food Addit Contam* 2002; 19(12):1169-79.
22. Odhav B, Naicker V. Mycotoxins in South African traditionally brewed beers. *Food Addit Contam* 2002; 19(1):55-61.
23. Prado G, Oliveira MS, Carvalho, EP, Lima LCO, Veloso T, Souza LAF, et al. Ochratoxin A determination in beer by immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. *Ciênc Tecnol Aliment* 2003; 23:58-61.
24. Vieira AP, Valente Soares LM, editores. Ocorrência de ocratoxina A em cerveja nacional. In: XIX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos Estratégia para o Desenvolvimento: 2004, Recife: CBCTA, 2004, CD-ROM.
25. Meyer RA, Neugebauer S. Bestimmung von ochratoxin A in bier mit automatischer probenreinigung an immunaffinitätsäulen. *Nahrung* 2000; 44(1):58-9.