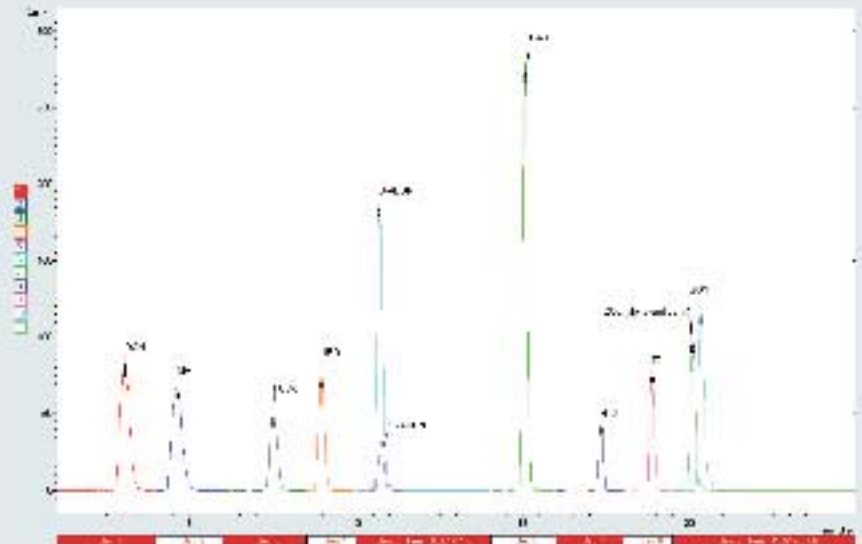


Multimethode zur Bestimmung von Fusarientoxinen

Schimmelpilzgifte in der Nahrung stellen eine Gefahr für die menschliche Gesundheit dar. Daher ist deren Nachweis gerade in Lebensmitteln besonders wichtig. Mit einer schnellen HPLC-MS/MS-Methode können elf Fusarientoxine in Getreide gleichzeitig nachgewiesen werden. Extraktion, Probenvorbereitung und Analyse wurden für die Arbeit mit großen Probensets optimiert.



1 LC-MS/MS-Chromatogramm einer Standardmischung von elf Fusarientoxinen auf einer Polaris C18-Ether (3 μ , 100 x 2,0 mm). Die Ionisierung wechselt nach Bedarf in den Segmenten vom positiven zum negativen Modus.

URSULA HETTWER* UND PETR KARLOVSKY*

Die Getreidepathogene der Gattung *Fusarium* sind in der Lage ein breites Spektrum von toxischen, kanzerogenen und mutagenen Stoffen zu bilden, außerdem solche mit hormonellen Wirkungen. Zum Schutz der Verbraucher sind für die wichtigsten dieser Toxine EU-weite Grenzwerte im $\mu\text{g}/\text{kg}$ -Bereich festgelegt worden. Die meist polaren, hitzestabilen Verbindungen werden im Getreide – aber auch nach dessen Verarbeitung zu Lebensmitteln – in relevanten Konzentrationen

*Dr. U. Hettwer, Dr. P. Karlovsky, Molekulare Phytopathologie und Mykotoxinforschung, Department für Nutzpflanzenwissenschaften, Universität Göttingen, 37077 Göttingen

gefunden. Der Nachweis in verschiedenen Matrices erfordert die Verwendung geeigneter Systeme. Als besonders geeignet zur Spurenbestimmung polarer Verbindungen hat sich die massenspektrometrische Detektion (MS) nach Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) erwiesen. Die LC-MS/MS (MS/MS: Erzeugung von Vorläufer-Ionen, die gezielt zu Produktionen fragmentiert werden) ist die Methode der Wahl, wenn Proben mit hoher Sensitivität und Selektivität untersucht werden sollen. Da die Ionen in wenigen Millisekunden erzeugt und getrennt werden, ist die MS gleichzeitig besonders geeignet für Multimethoden. Die hohen Investitionen zum Betrieb eines solchen Gerätes machen eine

maximale Ausnutzung jeder Chromatographie erstrebenswert.

Mit der hier vorgestellten Methode können elf wichtige Toxine gleichzeitig in einem Schritt über eine Festphasenkartusche aufgereinigt und in einer Chromatographie über HPLC-MS/MS spezifisch und sensitiv bestimmt werden (s. Abb. 1).

Optimierung von SPE und HPLC ermöglicht sensitive Multimethoden

Die gleichzeitige Extraktion und Aufreinigung der wichtigsten Fusarientoxine ist wegen deren sehr unterschiedlicher Polarität nicht einfach. So sind die Toxine aus der Trichothecen-Gruppe relativ polar – Typ B noch mehr als Typ A – während das

Tabelle 1: Wiederfindungsraten in Prozent nach Aufreinigung von Extrakten mit Bond-Elut-Mycotoxin (jeweils fünf Wiederholungen).

| Toxin | Kürzel | Wiederfindung in Prozent | relative Standardabweichung |
|--------------------------|---------|--------------------------|-----------------------------|
| Deoxynivalenol | DON | 109 | ±21 |
| Nivalenol | NIV | 59 | ±23 |
| Fusarenon X | FUSX | 75 | ±10 |
| Neosolaniol | NEO | 65 | ±5 |
| 15-Acetyl-Deoxynivalenol | 15-ADON | 71 | ±6 |
| 3-Acetyl-Deoxynivalenol | 3-ADON | 97 | ±7 |
| Diacetoxyscirpenol | DAS | 90 | ±6 |
| H-T2-Toxin | HT2 | 87 | ±8 |
| T2-Toxin | T2 | 89 | ±5 |
| Zearalenon | ZON | 94 | ±6 |
| Zearalenol | ZOL | 92 | ±5 |

ebenfalls wichtige Zearalenon ein relativ unpolares Molekül ist. Das Extraktionsmittel muss also eine passende Mischung von organischem Lösungsmittel mit Wasser darstellen, wobei auch die Art der Probe berücksichtigt werden muss. Weizen- und Maismehle sind hier durch ihren hohen Gehalt an Stärke bzw. Lipiden als durchaus problematische Matrix anzusehen. So werden die relativ polaren Trichothecene zwar gut durch Gemische mit hohem Wasseranteil extrahiert, aber der Nachweis ist auf einigen Phasen unter Umständen empfindlich gestört. Insbesondere trifft dies auf einfache RP-18-Phasen zu, wo die Toxine ebenso wie ein großer Teil der im wässrigen extrahierten Matrixbestandteile wenig retardiert werden. Festphasenextraktion mit den hier eingesetzten Bond-Elut-Mycotoxin-Kartuschen entfernt insbesondere polare Substanzen effektiv. Trotzdem ist die Wiederfindung für die Zielsubstanzen gut, was Tabelle 1 veranschaulicht.

Im Anschluss an die Aufreinigung ist eine Trennung auf einer polar modifizierten RP-Phase wie der hier verwendeten Polaris C18-Ether von Varian empfehlenswert, um vor allem die polaren Toxine ausreichend zu retardieren. Das ist bei der Verwendung eines LC-MS-Systems nicht nur – wie bei UV-Detektion – zur optimalen Trennung von interferierenden Substanzen von Belang. Auch die Elektrosprayionisierung gelingt umso besser, je näher die

Probe am optimalen Gemisch von Methanol-Wasser (50:50) eluiert.

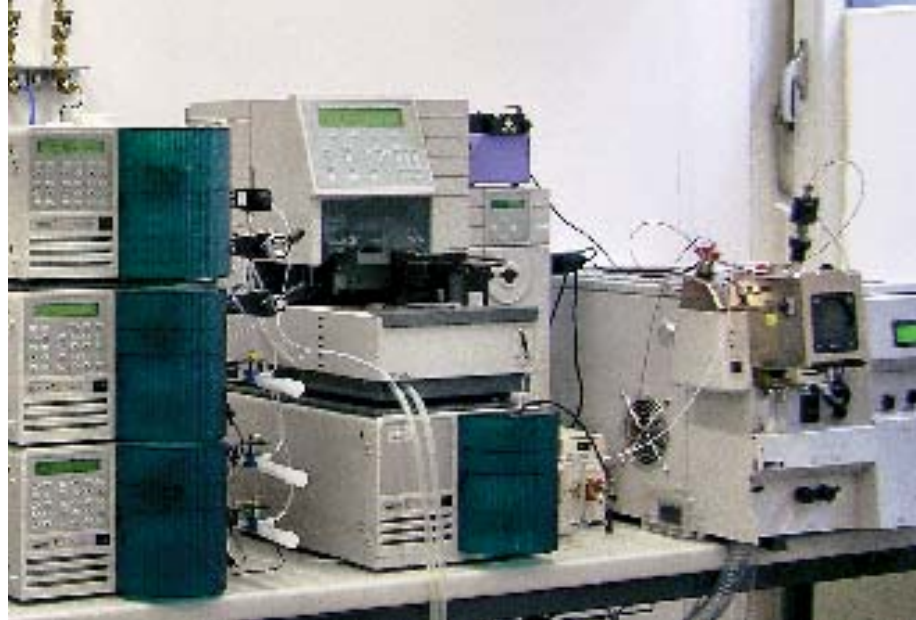
Die Probenvorbereitung und Chromatographie im Detail

Um eine repräsentative Probe zu bearbeiten, wurde ein 5g-Aliquot von 500g gemahlene Weizen- oder Maiskörnern im achtfachen Volumen extrahiert. Als Extraktionsmittel wurde ein Acetonitril-Wasser-Gemisch verwendet. Der Wassergehalt konnte bis zu 25 Prozent betragen, da die nachfolgende Reinigung vor allem polare Matrixbestandteile entfernt. Der nach Zentrifugation des Extraktes erhaltene Überstand wurde zur Entfernung von Matrixbestandteilen ohne weitere Vorbehandlung über Festphasenextraktion (Bond-Elut-Mycotoxin von Varian) aufgereinigt. Da die Probe direkt durch die Kartusche gedrückt, bzw. über eine Vakuumkammer in Auffanggefäße gesaugt werden kann, ist dieser Schritt schnell und einfach durchzuführen. Ein Aliquot der gereinigten Extrakte wurde in einer Vakuumzentrifuge zur Trockene eingeeengt. Durch die einfache Handhabung der Kartuschen ist es möglich, viele Proben gleichzeitig aufzuarbeiten. Die Proben wurden nach dem Trocknen in 200 µl eines Methanol-Wasser-Gemisches mit geringem Anteil Ammoniumacetat (0,2 mM, pH-neutral) aufgenommen und filtriert. Das Arbeiten mit derart kleinen Volumina wurde durch den Einsatz eines Autosamplers

(Prostar 430 von Varian) im HPLC-System vereinfacht, der außer mit 1,5 ml-Probengefäßen auch mit Mikrotiterplatten (in vorliegendem Fall 350-µl-Volumen-Modelle mit Spitzboden) bestückt werden kann. Bei der Auftrennung der Toxine wurde mit einem binären Methanol-Wasser-Gradienten gearbeitet. Dabei wurde der Methanol-Anteil im Zeitraum von 20 Minuten kontinuierlich von 15 auf 70 Prozent erhöht. Die Trennung erfolgte auf einer polar modifizierten C18-Säule (Polaris-C18 Ether von Varian) bei einem Fluss von 0,2 ml/min. Die massenspektrometrische Detektion der Toxine erfolgte mit einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer mit Elektrospray-Interface (1200LC von Varian) (s. Abb. 2). Die Ionisierung schaltete in zuvor definierten Zeitsegmenten von Positiv- auf Negativmodus, um jeweils optimale Ausbeuten der Vorläufer-Ionen zu erhalten. Über ein Schaltventil wurde das Eluat in den Wasch- und Reequilibrierungszeiten in ein Abfallgefäß geleitet, während eine dritte Pumpe in den „Messpausen“ ein Methanol-Wasser-Gemisch in die ESI-Quelle förderte. Diese Maßnahme verhindert die Verschmutzung des Gerätes sehr effektiv, das Spray wurde stabilisiert und die Reproduzierbarkeit der Analysen deutlich verbessert.

Zusammenfassende Bewertung der Methode

Durch die Kombination einer einfachen, aber effektiven Reinigung mit einem empfindlichen Detektionssystem wird die Quantifizierung bis weit unter die gesetz-

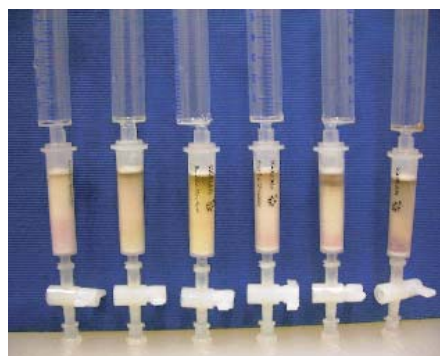


2 LC-MS/MS-System für großen Probendurchsatz, mit mikrotiterplattengeeignetem Autosampler, Schaltventil zur zeitgesteuerten Einleitung des Eluates in das MS, und dritter Pumpe zur Stabilisierung des Elektrosprays außerhalb der Mess-Segmente.

lich festgelegten Grenzen möglich. Die derzeit gewöhnlich zur Trichothecen-Aufreinigung verwendete Mycosep-Kartuschen zeichnen sich zwar ebenfalls durch einfache Handhabung und gute Wiederfindungsraten für die Trichothecene aus, sind aber teuer und entfernen zudem durch ihren Gehalt an Aktivkohle das häufig gemeinsam mit den Trichothecenen auftretende Zearalenon. Die für den Trichothecen-Nachweis über UV-Absorption unerlässliche Entfernung von Farbstoffen über Aktivkohle tritt beim Einsatz eines Massenspektrometers zur Detektion in den Hintergrund.

Die hier verwendeten Kartuschen Bond-Elut-Mycotoxin adsorbieren Zearalenon im Gegensatz zur Mycosep-Kartusche kaum. Stark gefärbte Extrakte von Mehl oder Fusarienkulturen wurden aber auch von

Bond-Elut-Mycotoxin komplett entfärbt (s. Abb. 3). Die beste Reinigung komplexer Matrices lässt sich sicherlich durch die Verwendung von Immunoaffinitätsäulen erreichen. Ihre hohe Spezifität schließt aber die Verwendung in Multimethoden und damit für Screenings aus. Außerdem besteht die Gefahr der Überladung, wodurch der Toxingehalt einer Probe unterschätzt werden kann. Bei einer Aufreinigungsmethode, die auf Adsorption von Matrixbestandteilen statt des Analyten beruht, kann bei Überladung nur die Effizienz der Reinigung leiden, nicht jedoch die Wiederfindungsrate. Die beschriebene Methode eignet sich für die Bestimmung von Fusarientoxinen in allen getesteten Materialien, d.h. Mehlen von Mais, Weizen, Reis und Soja, Pilzkulturextrakten und Extrakten von grünen Pflanzen. **LP**



3 Adsorption von Matrixbestandteilen des Acetonitril-Wasser-Extraktes von Maismehl (links) und Pilzkulturfiltraten (rechts) an Bond-Elut-Mycotoxin.

Weitere Informationen:
www.laborpraxis.de

InfoClick 209133

- Die Bond-Elut-Säulen im Detail mit Broschürendownload
- Mehr Infos zu den HPLC-Autosamplern Prostar inkl. technischer Daten
- Das Produktportfolio der Polaris-HPLC-Säulen von Varian
- Weitere Applikationen zur LC/MS-Methode
- Der direkte Kontakt zu Varian