

Neun auf einen Streich

Produktiv ist, wer mit geringem Aufwand viel erreicht. Die TeLA GmbH, das neuerdings in Geestland bei Bremerhaven ansässige, auf die Untersuchung von Lebensmitteln und Umweltproben spezialisierte Auftragslabor, hat jüngst eine HPLC/MS-Multimethode zum Nachweis neun verschiedener Mykotoxine entwickelt und erfolgreich in die Routineanalytik eingeführt.

Von Franziska Chmelka, Mariia Mathoviskaia und Norbert Helle,
TeLA GmbH, Handelspark 4-6, 27624 Geestland, buero@tela-bremerhaven.de

Die lateinische Bezeichnung mag den Laien an Asterix und Obelix erinnern, die Jagd machen auf römische Legionäre. Doch Kenner wissen: Einem Schimmelpilz namens *Aspergillus parasiticus* oder *Aspergillus flavus* kommt man weder mit einem Zaubertrank bei noch mit unbändiger Körperkraft; diese braucht man allenfalls, um das Ekelgefühl im Zaum zu halten, das einen befällt, wird man eines Schimmelpilzes ansichtig, der über Wochen in einer vergessenen Brotdose gewuchert ist.

Der Anblick eines unkontrolliert gewachsenen Schimmelpilzes ist selten appetlich, dennoch ist er harmlos. Gefährliches Potenzial besitzt vielmehr das, was das Auge nicht sieht: Im Zuge ihres Stoffwechsels produzierten Schimmelpilze Gifte, sogenannte Mykotoxine, denen eine chronische und akute Toxizität zugeschrieben wird, teilweise auch krebserregende, erbgutverändernde und hormonaktive Eigenschaften [1].

Die Dosis macht das Gift

Wer Getreide, Nüsse, Früchte, Gewürze und andere Feldfrüchte verarbeitet, wird mit dem Auftreten von Schimmelpilzen rechnen müssen. Schimmel ist ein geradezu ubiquitäres Problem, das sich nicht verhindern, höchstens eindämmen lässt. Dieser Tatsache trägt der Gesetzgeber Rechnung, indem er hinsichtlich der Toxizität Höchstmengen für Mykotoxine festgelegt hat [2]:

Aflatoxin B₁: 8,0 µg/kg (Erdnüsse),
0,1 µg/kg (Säuglingsnahrung); Summe der
Aflatoxine B₁, B₂, G₁ und G₂: 15 µg/kg
(Erdnüsse), 4,0 µg/kg (Getreide)

Ochratoxin A: 10 µg/kg (Kaffee, Rosinen),
0,5 µg/kg (Säuglingsnahrung)

Zearalenon: 200 µg/kg (Mais),
20 µg/kg (Säuglingsnahrung)

T-2-/HT-2-Toxin: noch nicht festgelegt

Fumonisin B₁: 2000 µg/kg (Mais),
200 µg/kg (Säuglingsnahrung)

Problem der klassischen Mykotoxinanalytik

Die Vorgabe von Höchstmengen impliziert die Anwendung geeigneter Analyseverfahren und -methoden, mit denen sich die Einhaltung der gesetzlichen Vorgaben überprüfen lässt. Klassischerweise, sprich gemäß §64 Lebens- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB), erfolgt der Nachweis von Mykotoxinen gruppenweise mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion. Vor der Bestimmung erfolgt eine Aufreinigung durch Immunoaffinitätskartuschen. Und teilweise, namentlich bei Aflatoxinen und Fumonisin, ist eine Derivatisierung durchzuführen. Eine HPLC-MS/MS-Methodik ist ausschließlich bei T-2 und HT-2 normiert.

Die herkömmliche Vorgehensweise beim Nachweis von Mykotoxinen ist wirksam, birgt allerdings Optimierungspotenzial in puncto Produktivität. Der Einsatz von Immunoaffinitätskartuschen zwecks Aufreinigung der Proben etwa ist recht teuer. Hinzu kommt der zeit- und arbeitsintensive Aufreinigungsschritt, zumal die verschiedenen Mykotoxine in Gruppen analysiert werden.

Optimierungspotenziale erschließen

Nach genauer Betrachtung der Methode erschien es denkbar, die Effizienz und Produktivität der Mykotoxinanalytik signifikant zu steigern. Optimierungspotenzial wurde an verschiedenen Stellen der Methode ausfindig gemacht. Unter anderem liegt nahe, einen Großteil der Mykotoxine in einer Nachweismethode zusammenzu-



© TelA GmbH

Die Multimethode zum Nachweis von neun Mykotoxinen wurde erfolgreich auf einem HPLC-MS/MS-System von Agilent Technologies in Kombination mit einem GERSTEL-MPS (Dual-Head-Variante) automatisiert. Angelegt wurde ein Lösemittelgradient (A: 5 mM Ameisensäure, B: Acetonitril; Fluss: 0,2 mL/min, 50 °C), bei der stationären Phase handelte es sich um ein C18-Reversed-Phase-Material. Detektiert wurde im positiven ESI-Modus.

fassen. Und statt die Proben zur Aufreinigung über teure Immunoaffinitätskartuschen laufen zu lassen, könnte eine vergleichsweise günstige Festphasenextraktion zu ähnlichen Resultaten führen. Ein weiteres Plus zeichnete sich ab, da sich sämtliche Schritte der Probenvorbereitung auf einem Standardautosampler automatisieren ließen, was zu einer Arbeitserleichterung führen sollte. Nicht zuletzt erschien es möglich, Spezifität und Empfindlichkeit der



Auf der Fahndungsliste

Aflatoxine

Aflatoxine werden von verschiedenen *Aspergillus*-Species, etwa *Aspergillus flavus* oder *Aspergillus parasiticus*, gebildet und finden sich vor allen Dingen in Nüssen und Gewürzen. Aflatoxine sind hochtoxisch und kanzerogen, von Bedeutung sind vor allem die Aflatoxine B₁, B₂, G₁ und G₂. Sehr häufig wird insbesondere das Aflatoxin B₁ in Lebensmitteln gefunden. Weil Aflatoxine thermostabil sind, lassen sie sich nicht durch Kochen zerstören.

Ochratoxine

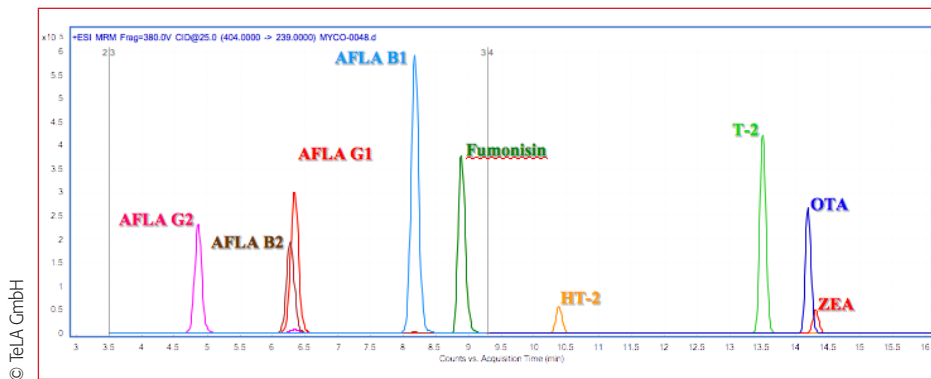
Neben den Aflatoxinen zählt das Ochratoxin A zu den wohl gefährlichsten Mykotoxinen. Ochratoxin A wirkt nierenschädigend und im Tierversuch kanzerogen. Häufig lässt sich dieses Mykotoxin in Kaffee, Getreide, Bier und Trockenobst nachweisen. Für Ochratoxin A gilt Ähnliches wie für Aflatoxine: Es ist thermostabil und wird zum Beispiel im Kaffeeröstprozess nicht zerstört.

Fusarientoxine

Fusarientoxine werden von diversen *Fusarium*-Arten und anderen Species produziert und finden sich häufig in Getreide. Zu den Fusarientoxinen zählen unter anderem Zearalenon, T-2-Toxin und HT-2-Toxin. Ihre akute Toxizität wird als gering eingestuft.

Fumonisine

Weltweit verbreitete, stark polare Mykotoxine, die durch *Fusarium verticillioides* und *Fusarium proliferatum* insbesondere auf Mais gebildet werden. Die giftigste Verbindung ist Fumonisin B₁. Seine Bildung auf Ernteprodukten und Nahrungsmitteln hängt von Umwelteinflüssen wie auch von den Lagerbedingungen ab. Fumonisine sind wasserlöslich und werden während der meisten Prozesse der Lebensmittelverarbeitung nicht inaktiviert.



Chromatogramm einer Standardmischung der Mykotoxine Aflatoxin B₁, B₂, G₁ und G₂, Ochratoxin A, Zearalenon, T-2- und HT-2-Toxin sowie Fumonisin B₁.

Messung zu erhöhen, indem die Fluoreszenzdetektion durch eine MS/MS-Detektion ersetzt würde.

Nach einer hinreichenden Anzahl an Experimenten stand die Multimethode zum Nachweis der Mykotoxine Aflatoxin B₁, B₂, G₁ und G₂, Ochratoxin A (OTA), Zearalenon (ZEA), T-2- und HT-2-Toxin und Fumonisin B₁. Für die Analyse verwendet wurde ein System bestehend aus einer Agilent 1290 HPLC mit

6495-Triple-Quadrupol-Massenspektrometer von Agilent Technologies in Kombination mit einem GERSTEL-MultiPurposeSampler (MPS) in der DualHead-Ausführung, also ausgestattet mit zwei Türmen, um für die verschiedenen

Arbeitsschritte im Rahmen der Probenvorbereitung und Probenaufgabe diverse Werkzeuge verfügbar zu haben.

Automatisierte Probenvorbereitung macht's möglich

Nach Abschluss der Entwicklungsarbeit stellte sich der Ablauf der Probenvorbereitung, vollständig automatisiert ausgeführt, wie folgt dar: Die SPE-Kartuschen werden

Unternehmensporträt

TeLA GmbH an neuem Standort und mit erweiterter Geschäftsführung



© Guido Deußing

Zeichen für die Geschicke der TeLA verantwortlich: Franziska Chmelka, Lebensmitteltechnologin und Geschäftsführerin, und Dr. Norbert Helle, geschäftsführender Gesellschafter des Unternehmens.

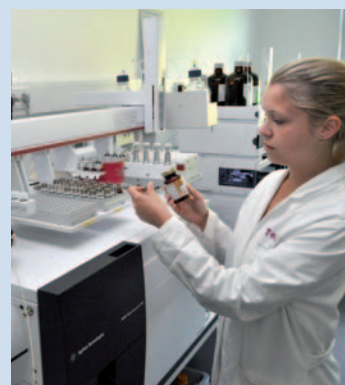
Die TeLA GmbH ist ein bei der Deutschen Akkreditierungsstelle (DAKKS) in Berlin nach DIN EN ISO/IEC 17025:2005 akkreditiertes, auf die instrumentelle chemische Analyse von Lebensmitteln und Umweltproben spezialisiertes Prüflaboratorium. TeLA und GERSTEL kooperieren in puncto HPLC-MS/MS-Methodenentwicklung. Im Januar 2015 hat das Unternehmen seinen Standort von Bremerhaven nach Geestland verlegt, wo es einen eigenen neuen Gebäudekomplex bezogen hat.

Seit August zeichnet die langjährige Mitarbeiterin und Applikationsexpertin Franziska Chmelka als Geschäftsführerin der TeLA GmbH neben dem geschäftsführenden Gesellschafter Dr. Norbert Helle verantwortlich für die Geschicke des Unternehmens.

Als unabhängiger, kompetenter und zuverlässiger Partner unterstützt die TeLA GmbH ihre Kunden und Partner darin, die einwandfreie Qualität von Lebensmitteln und Getränken sicherzustellen, Inhalts- und Wirkstoffe von Lebensmittel-, Umwelt- und Arzneimittelproben qualitativ und quantitativ zu bestimmen sowie möglicherweise darin enthaltene Kontaminationen auch in geringsten Spuren sicher und reproduzierbar nachzuweisen.

Die TeLA GmbH ist technisch-analytisch und methodologisch auf dem neuesten Stand und aufgrund ihres Know-hows bestens in der Lage, rasch und flexibel auf analytische Kundenwünsche einzugehen. Die Entwicklung individueller Analysemethoden sowie auch umfangreiche Forschungs- und Entwicklungsaufgaben erfolgen im Rahmen der Laborroutine. Einen besonderen Schwerpunkt legt die TeLA GmbH auf die Untersuchung von Fischereierzeugnissen, Nahrungsergänzungsmitteln, Kaffee und Tee sowie Obst, Gemüse und Gewürzen.

Dr. Norbert Helle, Gründer und geschäftsführender Gesellschafter der TeLA GmbH, ist ein von der Industrie- und Handelskammer (IHK) öffentlich bestellter und vereidigter Handels- und Lebensmittelchemiker sowie amtlich zugelassener Gegenprobensachverständiger. Bis zur Gründung des Unternehmens 2003 in Bremerhaven war Dr. Norbert Helle über viele Jahre in leitender Position u. a. für das Niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) sowie für das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) tätig. Dr. Norbert Helle ist ausgewiesener HPLC/MS-Experte und als solcher Partner zahlreicher Unternehmen unterschiedlicher Branchen im In- und Ausland; die TeLA kooperiert mit GERSTEL in puncto Applikation und Methodenentwicklung (HPLC/MS). Die personelle und technische Ausstattung der TeLA GmbH sowie eine flache Hierarchie im Unternehmen gewährleisten die größtmögliche Nähe zum Kunden sowie eine unmittelbare und flexible Bearbeitung seiner Anfragen. Aufgrund der exzellenten Ausbildung der Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter erfolgt die Kommunikation zwischen Kunden und der TeLA GmbH auf Augenhöhe. GD



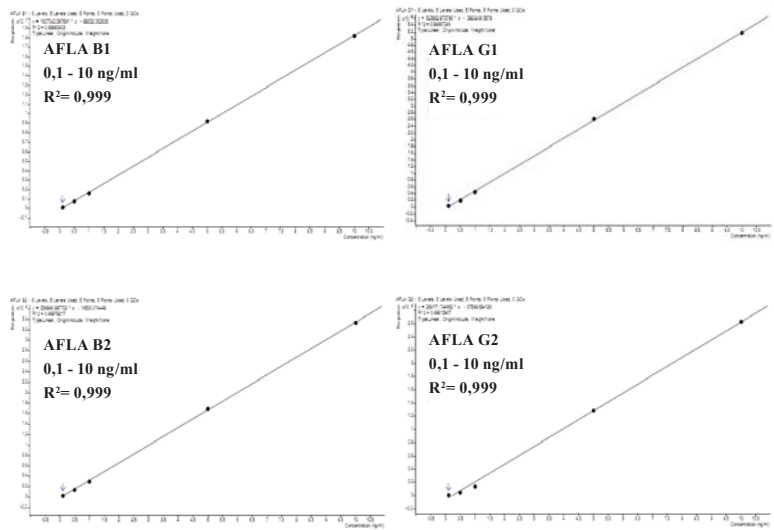
© Guido Deußing

Einen analytischen Schwerpunkt setzt die TeLA GmbH auf die HPLC-MS/MS.

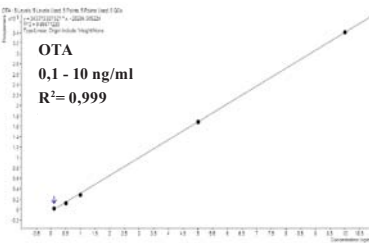
TeLA

Ihr Kontakt:
TeLA GmbH
 Handlungspark 4-6
 27624 Geestland
 Telefon: 04745/93112-0
 Fax: 04745/93112-13
 E-Mail: buero@tela-bremerhaven.de

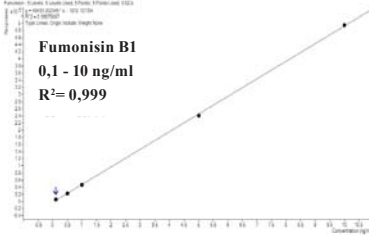
Kalibrierung Aflatoxine



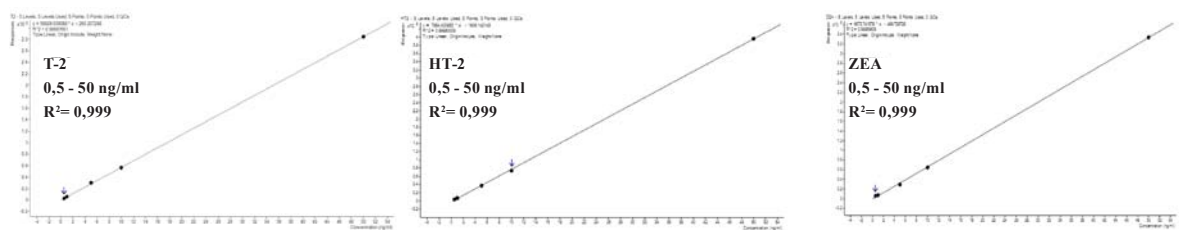
Kalibrierung Ochratoxin A



Kalibrierung Fumonisin



Kalibrierung Fusarientoxine



© TeLA GmbH

Sehr gute Linearität über einen weiten Kalibrationsbereich.

Validierungsdaten der Multimethode zum Nachweis von neun Mykotoxinen.

	Level [µg/kg]	WDF [%]	RSD [%]
Fumonisin	2	79	5,4
T-2	2	105	6,1
HT-2	2	103	6,5
OTA	2	88	4,3
Aflatoxin G ₂	2	94	5,7
Aflatoxin G ₁	2	91	4,8
Aflatoxin B ₂	2	95	4,5
Aflatoxin B ₁	2	89	3,9
ZEA	2	108	5,9

mit Methanol und Wasser konditioniert, anschließend dosiert der MPS sieben Milliliter Probe über die Kartuschen. Das Kartuschenbett wird mit vier Millilitern Wasser gewaschen, sodann mit Stickstoffgas getrocknet. Die Elution der Analyten erfolgt mit 1,5 Millilitern Essigester. Das Eluat wird in die MultiPosition Evaporation Station (™VAP) überführt und bis zur Trockene eingedampft; der Rückstand wird letztlich in 500 µL des Laufmittels wieder aufgenommen und in dieser Lösung auf die Trennsäule gegeben.

Summa summarum wurde das Ziel, eine vollständig automatisierte Multimethode zum Nachweis von Mykotoxinen, namentlich Aflatoxin B₁, B₂, G₁ und G₂, Ochratoxin A, Zearalenon, T-2- und HT-2-Toxin sowie Fumonisin B₁ erfolgreich in die Praxis umgesetzt. Aus dem vereinfachten Analysenablauf, da alle Mykotoxine der gleichen Probenvorbereitung unterliegen, resultierte eine erhebliche Zeitersparnis im Vergleich zur klassi-

schen manuellen Vorgehensweise. Durch eine zeitliche Verschachtelung von Probenvorbereitung und Analysenlauf (PrepAhead-Funktion) ließ sich die Analysenzeit auf 52 Minuten für die erste Probe sowie 30 Minuten für jede weitere Probe reduzieren.

Überaus zufriedenstellende Resultate

Eine Festphasenextraktion zur Aufreinigung durchzuführen, statt teure Immunoaffinitätskartuschen zu verwenden, ermöglichte es, die Kosten pro Analyse zu senken. Obendrein gelang es, die Fluoreszenzdetektion durch die sehr viel sensitivere und selektivere MS/MS-Detektion zu ersetzen, was letztlich auch zu niedrigeren Bestimmungsgrenzen (0,1-0,3 µg/kg) führte. Alles in allem deuteten auch gute statistische Parameter wie Wiederfindung von durchschnittlich 94,6 Prozent und eine relative Standardabweichung von im Mittel 5,2 Prozent auf die erfolgreiche Umsetzung des Vorhabens hin. Die Kalibrierung aller Mykotoxine war von sehr guter Linearität im Bereich von 0,1 bis 10 ng/µL (Aflatoxine, Ochratoxin A und Fumonisin) beziehungsweise 0,5 bis 50 ng/µL (T-2, HT-2 und Zearalenon). In der Routine erweist sich die Mykotoxin-Multimethode als stabil und zuverlässig.

Referenzen

- [1] Guido Deußing, Schnell Gewissheit über geringste Aflatoxinbelastungen, GERSTEL Aktuell 35 (2006) 18-21
- [2] Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 der Kommission vom 19. Dezember 2006 zur Festssetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln [VO(EG) Nr. 1881/2006]