

Nachweis der Mykotoxine Moniliformin und Cyclopiazonsäure in Getreideprodukten mittels LC-MS/MS

Naeff Michael

Bachelor-Thesis, Molecular Life Sciences, Analytische Chemie

Auftraggeber: dipl. Chemiker J. Noser, Kantonlabor Basel-Landschaft
Experte: Dr. M. Ehrat
Begleitdozent: Prof. Dr. G. Schlotterbeck, FHNW Muttenz

ZUSAMMENFASSUNG

Der Befall von Getreide mit Schimmelpilzen (Kolben- /Stängelfäule oder Fusariose) kann zu einer Kontamination der Getreideprodukte mit Mykotoxinen führen. Diese Gifte werden von den Pilzen als sekundäre Metaboliten gebildet und können für Menschen, Tiere und Pflanzen schädlich sein [1]. Für viele dieser Substanzen sind in der Schweiz Grenzwerte definiert, jedoch noch nicht für Moniliformin oder die Cyclopiazonsäure.

In dieser Bachelor-Thesis wurde eine LC-MS/MS Methode zur simultanen quantitativen Analyse dieser Substanzen erarbeitet. Mit einer Gemini C6-Phenyl Säule konnte eine chromatographische Trennung erreicht werden und die Aufarbeitung wurde über eine «Quick and Dirty»-Methode mit Entfettungsschritt gemacht. Die Validierung wurde bei 50 µg/kg in einer Maisgriess-Matrix durchgeführt und auf Roggen und Weizen ausgeweitet. In über 85 % der gemessenen Proben war Moniliformin zu finden, jedoch keine Cyclopiazonsäure.

EINLEITUNG

Moniliformin (MON) ist ein Mykotoxin, das mit seiner kleinen Masse von 98.01 g/mol und seiner hohen Polarität ein Spezialfall darstellt. Produziert wird es von der Schimmelpilzgattung *Fusarium*. Es kommt in der Natur als Natrium- oder Kaliumsalz vor und wird nach IUPAC als 3-Hydroxycyclobut-3-en-1,2-dion ($C_4H_2O_3$) beschrieben. Durch die Enol-Funktion besitzt das Molekül eine hohe Säurestärke ($pK_S \approx 1$). Das MON wird verdächtigt, die ATP-Produktion zu hemmen und es sind vor allem Schädigungen am Herzmuskel bekannt [2].

Die Cyclopiazonsäure (CPA) ist ein grösseres Molekül mit einer Masse von $C_{20}H_{20}N_2O_3 = 336.15$ g/mol und es ist eine ähnliche räumliche Struktur mit dem MON zu erkennen. Die Säurestärke liegt bei $pK_S \approx 3$. Die Substanz wird vor allem von den Schimmelpilzgattungen *Penicillium* und *Aspergillus* produziert. Die CPA schädigt vor allem Muskeln, Leber und Milz [3].

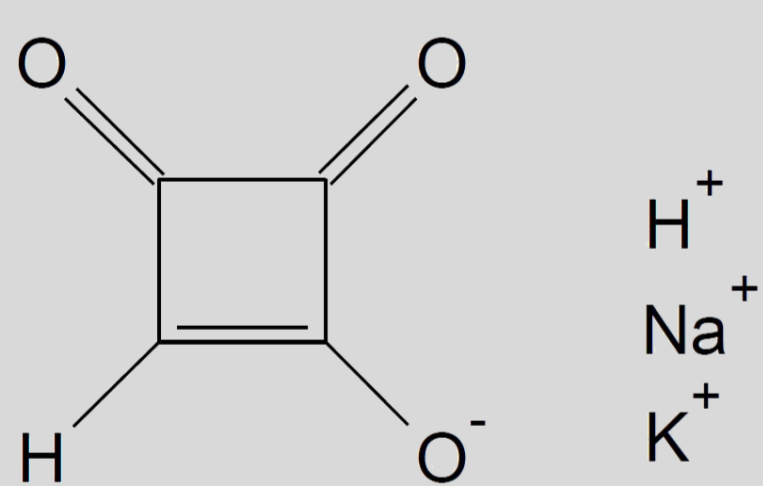


Abbildung 1: Moniliformin

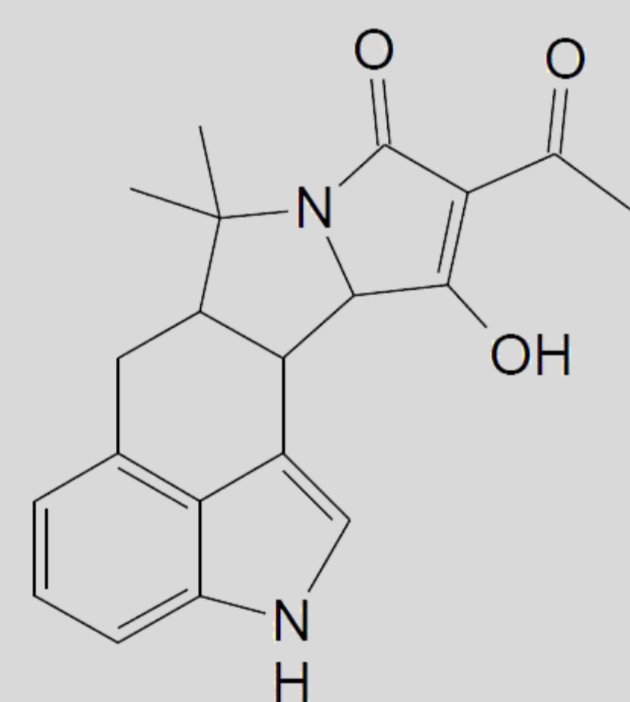


Abbildung 2: Cyclopiazonsäure



Abbildung 3: Mais mit Kolben- und Stängelfäule

RESULTATE

1. Aufarbeitung

Die Aufarbeitung der beiden Analyten mit unterschiedlicher Polarität war eine Herausforderung. Mit Anionenaustauscher-Kartuschen wurde versucht, durch Solid Phase Extraction (SPE) eine Aufreinigung zu erreichen. Da die Wiederfindungsraten zu tief (< 50 %) waren, wurde eine «Quick and Dirty»-Methode mit 10-facher Aufkonzentrierung am Syncore und einem Entfettungsschritt mit Hexan entwickelt.

- Eigenschaften der Methode:
- + schnelle Aufarbeitung
 - + billig, da keine Kartuschen nötig
 - Matrixeffekte können unterschiedlich sein



Abbildung 4: Büchi Syncore Polyvap

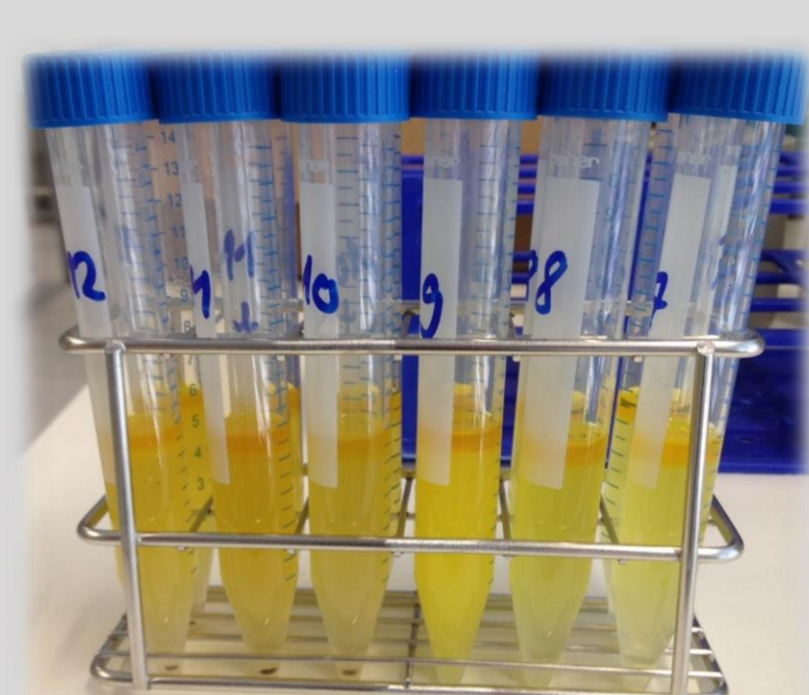


Abbildung 5: Entfettungsschritt mit Hexan

2. LC-MS/MS Methode

Mit einer Gemini C₆-Phenyl Säule (100 x 2.0 mm, 3.0 µm) konnte eine Retention für MON von $k' > 0.5$ erreicht werden und eine LC-Methode von 5 Minuten wurde entwickelt. Im MS/MS wurde das MON über sein einziges Fragment von 41 m/z und die CPA mit den Übergängen 140, 154 und 180 m/z quantifiziert.

3. Validierung

Die Methode wurde mit einer Maisgriess-Matrix auf 50 µg/kg mittels sechsfacher Aufarbeitung validiert. Der validierte Konzentrationsbereich liegt zwischen 1-500 µg/kg und für beide Substanzen wurde 1.0 µg/kg als Bestimmungsgrenze definiert. Die totale Wiederfindungsrate von MON liegt bei 128 % mit einer Präzision von 1.2 % relative Standardabweichung. Bei der CPA ist ein Verlust zu erkennen und es wird eine totale Wiederfindung von 72 % erreicht.

4. Gemessene Proben

Durch 15 analysierte Proben aus dem Detailhandel wurde die Methode getestet. Die Proben bestanden aus Maisgriess (1-3, 7-9), Mais-Chips (5-6, 10-12), Roggen- (13), Weizen-Mehl (14) und Büchsenmais (15). Wichtig bei der Probenmessung ist die Sicherstellung der Homogenität und die Bestimmung der Wiederfindungsrate für jede Probe.

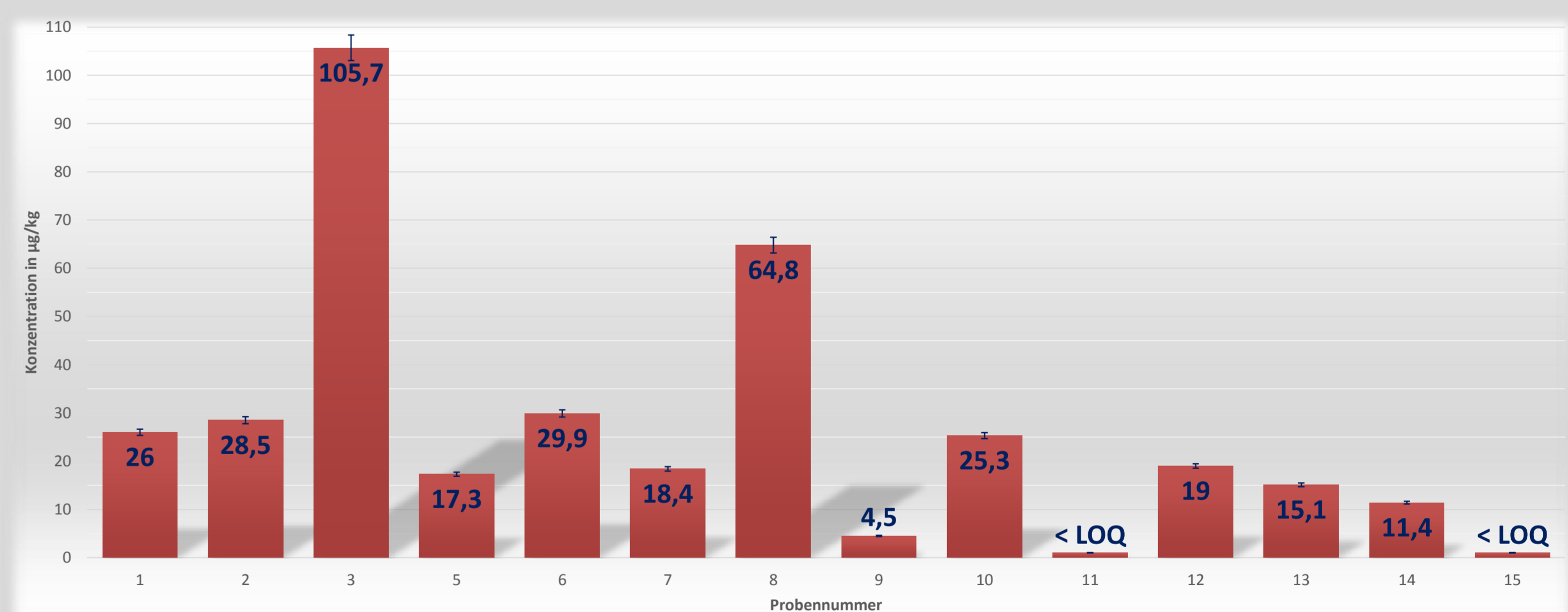


Abbildung 6: MON-Konzentration der gemessenen Proben in µg/kg

SCHLUSSFOLGERUNG

Wie in Abbildung 5 zu erkennen ist, kommt das Mykotoxin Moniliformin in über 85 % der gemessenen Proben vor. Bei erhöhten Konzentrationen kann dieses Gift dem menschlichen oder tierischen Körper Schaden zufügen und deshalb sollte diese Substanz genauer untersucht werden. Es wird erwartet, dass in den nächsten paar Jahren von der EU Grenzwerte für die Mykotoxine Moniliformin und Cyclopiazonsäure festgesetzt werden, und dann wird eine Analysenmethode benötigt. Die entwickelte Methode kann im Kantonlabor für kommende Kampagnen mit Getreide-Produkten verwendet werden. Sie ist für die genannten Matrizen mit einer guten Präzision als verlässliches Verfahren anwendbar. Der Probendurchsatz mit einem Syncore beträgt sechs Getreideprodukte pro Tag. Als weiterführende Arbeit könnten noch andere Mykotoxine in die Methode implementiert werden.

REFERENZEN

- [1] Jestoi, M. (2008). Emerging Fusarium-Mycotoxins Fusaproliferin, Beauvericin, Enniatins, And Moniliformin-A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutri.*, Vol. 48, S.21-49.
- [2] Cole, R., & Cox, R. (1981). Handbook of Toxic Fungal Metabolites. New York: Academic Press Inc.
- [3] Moldes-Anaya, A., Asp, T., Eriksen, G., Skaar, I., & Rundberget, T. (2009). Determination of cyclopiazonic acid in food and feeds by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chrom. A*, Vol. 1216, S.3812-3818.

