

Bevor Lebensmittel krank machen

Schnell Gewissheit über geringste Aflatoxinbelastungen



Auch wenn die wohl sortierte Käsetheke vom Gegenteil überzeugen mag: Wer verschimmelte Lebensmittel verzehrt – die nicht Schimmelkäse sind – setzt seine Gesundheit aufs Spiel. Grund sind so genannte Mykotoxine: Gifte, die beim Stoffwechsel bestimmter Schimmelpilze entstehen, und denen, wie es das Niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (Laves) beschreibt: eine chronische und akute Toxizität zugeschrieben wird, hervorgerufen durch krebserzeugende, erbgutverändernde und hormonaktive Eigenschaften, die insbesondere für Säuglinge und Kleinkinder schädlich sind.

Natürliches Karzinogen birgt die größte Gefahr

Wissenschaftlich beschrieben wurden bislang mehr als 300 Mykotoxine, die von rund 250 Schimmelpilzarten gebildet werden können. Für die Lebensmittelsicherheit bedeutend sind allerdings nur wenige Mykotoxine beziehungsweise Schimmelpilze, etwa die der Gattung *Aspergillus flavus* und

Wer in Rohstoffen oder Lebensmitteln, insbesondere solchen, die für die Herstellung von Arzneimitteln und Babynahrung bestimmt sind, Schimmelpilzgifte, so genannte Mykotoxine, sicher und sensitiv bestimmen will, setzt auf die LC/MS nach vorangegangener Festphasenextraktion (SPE). Das garantiert, dass man die Nachweisgrenzen erreicht, die unterhalb der vom Gesetzgeber festgelegten Grenzwerte liegen. Während das eigentliche Probenhandling im Vorfeld der LC/MS-Analyse von Aflatoxinen, den wirksamsten Mykotoxinen überhaupt, nur begrenzt Spielraum für Optimierung bietet, lassen sich zuverlässige und verwertbare Messergebnisse in weniger als der Hälfte der bisher üblichen Zeit erreichen, wird die Festphasenextraktion automatisiert.

Aspergillus parasiticus, die vor allem unter feucht-warmen Bedingungen auf öl- und stärkehaltigen Samen, Erd-, Wal- und Haselnüssen, Pistazien, Mandeln, Feigen, Kokos, Obst, Getreide, Reis, Mais und Soja sowie in Trockenfrüchten und Gewürzen gedeihen. Die vom *Aspergillus flavus* und *Aspergillus parasiticus* produzierten Aflatoxine B1, B2, G1 und G2 sowie M1 zählen zu den wirksamsten Mykotoxinen überhaupt, wobei vom Aflatoxin B1 die größte Gefahr ausgeht aufgrund seines krebserregenden Potenzials.

Das Risiko einer akuten Vergiftung durch hohe Mykotoxinkonzentrationen ist aufgrund der allgemein guten Lebensmittelqualität in Deutschland laut Laves eher niedrig. Anders verhalte es sich in Afrika und Asien, wo der Verzehr verschimmelter Erdnüsse oder Maisprodukte, bedingt durch schlechte Wachstums-, Lagerungs- und Transportbedingungen, immer wieder zu akuten Aflatoxin-Vergiftungen mit Todesfällen führe; die letale Aflatoxin-Dosis für einen Erwachsenen liegt laut Literatur bei 1 bis 10 mg pro Kilogramm Körpergewicht.

Ubiquitäre Verteilung bedingt Höchstwerte

„Die Mykotoxinkontamination von Lebens- und Futtermitteln ist ein weltweites Problem. Die UN Food and Agriculture Organization (FAO) schätzt, dass bis zu 25 % der Weltproduktion von Nahrungsmitteln mit Mykotoxinen kontaminiert sind. Etwa 20 % der Cerealenernte der EU enthält messbare Mengen Mykotoxine.

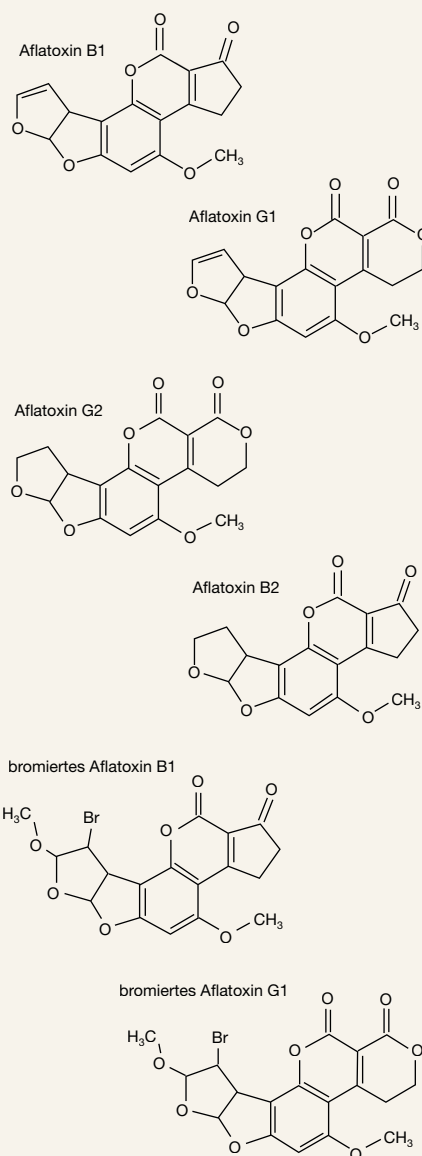
Über die Wirkung geringer Mengen oder einer Mischung von Mykotoxinen – vor allem bei lebenslanger Aufnahme – liegen dagegen kaum Erkenntnisse vor“, heißt es auf der Homepage des Bayerischen Staatsministeriums für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz.

Aufgrund der Gesundheitsgefährdung, die von Schimmel ausgeht, und seiner natürlichen ubiquitären Verbreitung, hat der Gesetzgeber Grenz- beziehungsweise Höchstwerte für Mykotoxine im Bereich weniger Mikrogramm pro Kilogramm ($\mu\text{g}/\text{kg}$) festgelegt:

Unter anderem gelten für Erdnüsse, Schalenfrüchte, Trockenfrüchte und Ge-

Chemische Struktur der Aflatoxine

■ Aflatoxine sind fluoreszierende, heterozyklische Verbindungen, bestehend aus einer Dihydro- oder Tetrahydrofuran-Einheit, die mit einem substituierten Coumarin-Ring verbunden ist. Die Gruppe der Aflatoxine umfasst mehr als 20 verschiedene Toxine. Relevant sind vor allem aber die Aflatoxine B1, B2, G1, und G2, wobei B1 in der Häufigkeit überwiegt. Aflatoxin M1, das unter anderem in Milch und Milchprodukten gefunden wird, entsteht im Verlauf des Stoffwechsels bei Tieren und Menschen, wenn sie zuvor Aflatoxin B1 über kontaminierte Nahrungs- beziehungsweise Futtermittel aufgenommen haben. Aflatoxin M1 ist in seiner Giftigkeit mit Aflatoxin B1 vergleichbar; die karzinogene Wirkung des M1 ist aber deutlich reduziert.



treide, die für den direkten Verzehr oder als Lebensmittelzutat vorgesehen sind, zulässige Höchstmengen von 2 µg/kg Aflatoxin B1 beziehungsweise 4 µg/kg als Summenwert für B1, B2, G1 und G2. Der Wert für Aflatoxin M1 in Milch darf 0,05 µg/kg nicht überschreiten. Bei Nahrungsmitteln für Säuglinge und Kleinkinder begrenzt die Diätverordnung die zulässige Menge an Aflatoxin B1 auf 0,05 µg/kg, die für M1 auf 0,025 µg/kg.

chen Zeit erreichen, wenn die Immunoaffinitätschromatographie an Festphasenkartuschen automatisiert wird.“

Dr. Norbert Helle hat eine LC/MS-Methode zum Nachweis der Aflatoxine B1, B2, G1 und G2 in Lebensmitteln entwickelt, die zum Beispiel für Pistazien, Paprikagewürz und verschiedene Früchte geeignet ist, bei der die Aflatoxine B1 und G1 nach Aufreinigung mittels Immunoaffinitätschromatographie über Einwegkartuschen bromiert, sprich derivatisiert werden und schließlich ein Aliquot der Probe auf die LC-Säule aufgegeben wird.

„Sämtliche Schritte der Probenvorbereitung, von der Zugabe des internen Standards über die SPE und Derivatisierung bis zur Probenaufgabe, verlaufen voll automatisiert“, erklärt der Applikationsexperte und ergänzt: „Durch die software-gesteuerte Verschachtelung von Probenvorbereitung und Analyse besteht zu keinem Zeitpunkt das Risiko etwa eines Substanzverlusts oder unerwünschter chemischer Reaktionen, weil sämtliche Schritte der Probenvorbereitung – einschließlich Derivatisierung – sozusagen *just-in-time* erfolgen.“

Schneller und empfindlicher: Niedrigste Nachweisgrenzen in kürzerer Zeit erreichen

Zur Derivatisierung versetzte der Chemiker den Probenextrakt mit einer Lösung elementaren Broms in Chloroform. Dr. Norbert Helle: „Dibromierte Komponenten waren nicht zu detektieren.“ Den Ergebnissen nach zu urteilen, sagt der Applikationsexperte, zeigen die erhaltenen monobromierten Aflatoxine längere Retentionszeiten in der Umkehrphasenchromatographie als nicht-bromierte Verbindungen, was unter anderem in einer bes-



„Zuverlässige und verwertbare Messergebnisse lassen sich in der Hälfte der bisher üblichen Zeit erreichen, wenn

die Immunoaffinitätschromatographie an Festphasenkartuschen automatisiert wird.“ Dr. Norbert Helle

Mittel der Wahl zum sicheren und sensitiven Nachweis von Aflatoxinen ist die LC/MS nach vorangegangener spezifischer Festphasenextraktion (SPE) beziehungsweise Affinitätschromatographie; das garantiert, dass man die Nachweisgrenzen erreicht, die unterhalb der vom Gesetzgeber festgelegten Grenzwerte liegen. „Während das eigentliche Probenhandling im Vorfeld der LC/MS-Analyse von Aflatoxinen nur begrenzt Spielraum für Optimierung bietet“, erklärt Dr. Norbert Helle, Applikationsspezialist und Inhaber der TeLA GmbH, einem Auftragslabor in Bremerhaven, „lassen sich zuverlässige und verwertbare Messergebnisse in weniger als der Hälfte der bisher übli-

seren Trennung der vier Aflatoxine resultiert. Auch wird eine deutliche Minimierung von Interferenzen durch Matrixbestandteile beobachtet. Wichtiger noch sei aber die Tatsache: die Derivatisierung führt zu einer signifikant besseren MS-Response verbunden mit einem charakteristischen Brom-Muster im Massenspektrum – letztlich der Grund, sagt Dr. Nobert Helle, „warum wir die Nachweisgrenze für alle untersuchten Aflatoxine unter 0,01 µg/kg senken konnten.“

Helle gelangt zudem sehr viel schneller zu sensitiven, sicheren und aussagekräftigen Ergebnissen, als es herkömmlich der Fall sei:

„Während die manuelle Aufarbeitung der Kartuschen bei acht Proben alles in allem rund 4 Stunden erfordert“, erklärt der Wissenschaftler, „betrug der Zeitaufwand unter Einsatz des MultiPurposeSamplers MPS mit SPE-Option für die gleiche Anzahl an Proben gerade einmal 80 bis 95 Minuten, je nach verwendeter Kartusche. Das bedeutet eine Zeitersparnis von weit über 50 Prozent.“

GERSTEL-MPS mit SPE-Option

Seine Methode entwickelte Dr. Norbert Helle auf einem 1100 LC/MSD von Agilent Technologies mit integriertem GERSTEL-MultiPurposeSampler MPS mit SPE-Op-

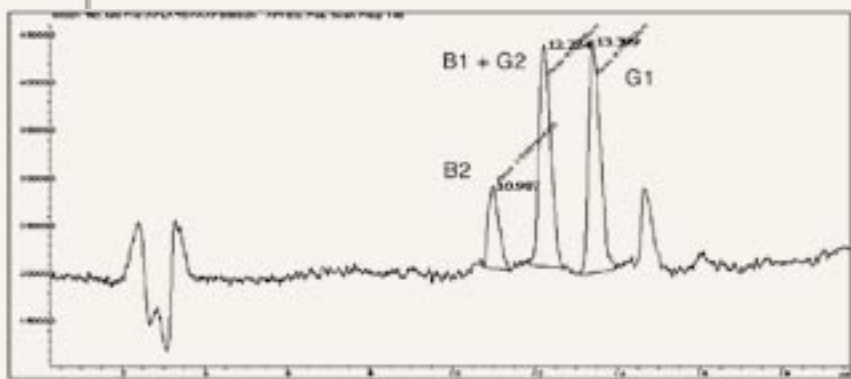
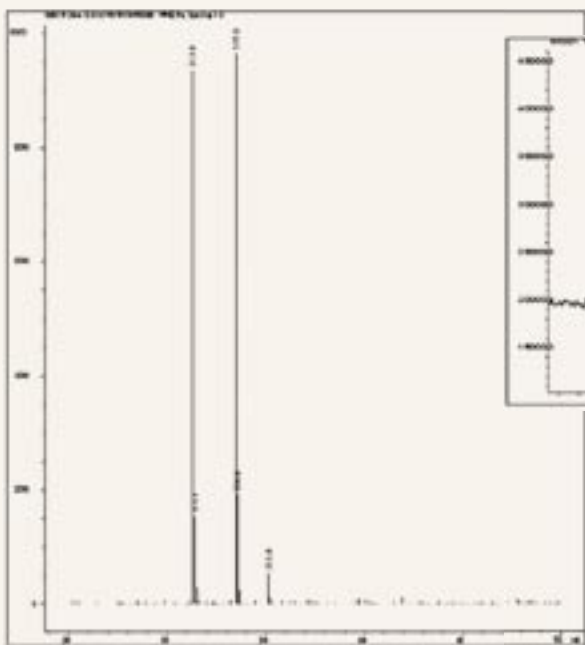
tion zur automatisierten Probenvorbereitung und Probenaufgabe. Das LC/MS-System wurde mit Elektronenspray-Ionisierung im positiven Ionenmodus betrieben. Bei der verwendeten Säule handelte es sich um eine Phenomenex synergi max RP (250*2,1 Millimeter, 4 µm Partikelgröße) mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,3 mL/min. Die Trennung erfolgte unter Einsatz eines Lösemittelgradienten (Eluent A: 0,1-%ige Ameisensäure, Eluent B: Acetonitril). Die Steuerung des kompletten Systems – einschließlich Autosampler und LC/MSD sowie die Datenauswertung erfolgten aus der ChemStation von Agilent Technologies.



Die Probenvorbereitungsmethode wird einfach per Mausklick aus einem Menü der MAESTRO-Software zur fertigen Prozedur zusammengestellt.



- MOVE** Transport des Probenvials in die SPE-Vial-Position, Transport der Kartusche in den Schlitten (SPE-Waste-Position)
- ADD 1** Aufgabe von 4 mL Probe auf die Kartusche, Tropfgeschwindigkeit: 50 µL/s
- ADD 2** Spülen der Säule mit 20 mL H₂O, Tropfgeschwindigkeit: 50 µL/s
- SPE - SHIFT** Transport des Schlittens mit der Kartusche von der SPE-Waste- zur SPE-Vial-Position
- ADD 3** Elution der Aflatoxine mit 0,5 mL MeOH, Tropfgeschwindigkeit: 30 µL/s
- ADD 3** Elution der Aflatoxine mit 0,5 mL MeOH, Tropfgeschwindigkeit: 30 µL/s
- ADD 3** Elution der Aflatoxine mit 0,5 mL MeOH, Tropfgeschwindigkeit: 30 µL/s
- WAIT** 30 Sekunden warten zum Abtropfen des Eluenten
- MOVE** Abwerfen der Kartusche in das Abfallgefäß
- SPE - SHIFT** Transport des Schlittens von der SPE-Vial- zur SPE-Waste-Position
- MOVE** Transport des Probenvials zum Tray



Monobromierte Aflatoxine zeigen längere Retentionszeiten als nicht-bromierte Verbindungen, woraus eine bessere Trennung der vier Aflatoxine resultiert und was zu einer deutlichen Minimierung von Interferenzen durch Matrixbestandteile führt (Abb. oben). Die Derivatisierung der Aflatoxine B1 und G1 führt zu einer signifikant besseren MS-Response, verbunden mit einem charakteristischen Brom-Muster im Massenspektrum: Die Nachweisgrenze für alle untersuchten Aflatoxine liegt unter 0,01 µg/kg (Abb. links).