

Bestimmung von Zearalenon in Speiseölen mit GPC und LC-ESI-MS/MS

O. Kappenstein¹, H. St. Klaffke¹, I. Mehlitz¹, R. Tiebach¹, R. Weber¹, J. Lepschy², R. Wittkowski¹

¹Bundesinstitut für Risikobewertung, Thielallee 88-92, D-14195 Berlin

²Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Vöttinger Strasse 38, D-85354 Freising

Abstract

Determination of zearalenone in edible oils with SEC and LC-ESI-MS/MS

A new method for the determination of zearalenone in edible oils with size exclusion chromatography (SEC) followed by LC-MS/MS as well as HPLC-FLD was developed and validated. By using the LC-MS/MS determination no further clean up step is necessary after the SEC. The correlation coefficient of 0.999 for the two detection systems is acceptable. In this research 77 edible oils were analyzed. The mean average value of 38 corn germ oils was 169 µg/kg, the maximum value amounted up to 921 µg/kg.

Keywords: mycotoxin, zearalenone, size exclusion chromatography, mass spectrometry, corn germ oil

Einleitung

Das Vorkommen von Zearalenon in getreidehaltigen Lebensmitteln konnte in europaweiten Untersuchungen mit einer Inzidenz von 32% (N=4918) festgestellt werden (1). In den einzelnen EU-Mitgliedstaaten wurden für Weizen und Weizenprodukte Mittelwerte von 0,083 µg/kg bis 26 µg/kg und für Mais und Maisprodukte von 5,2 µg/kg bis 627 µg/kg bestimmt.

Über das Vorkommen von Zearalenon in den entsprechenden Maiskeim-, Soja- und Weizenkeimölen stehen nur unzureichend Daten zur Verfügung. Bereits Untersuchungen von Lauren *et al.* zeigten aber, dass bei unterschiedlichen Fusarientoxinen während der Nassvermahlung wie von Mais eine Anreicherung von Zearalenon in der Fraktion der Keimlinge (2) entsteht. So konnte auch in einem daraus hergestellten Maiskeimöl ein Gehalt an Zearalenon von 4,6 mg/kg nachgewiesen werden. Auf Grund dieser Beobachtungen war es notwendig, eine geeignete Methode zur Bestimmung von Zearalenon in Getreideölen zu entwickeln.

Für die Bestimmung von Zearalenon in unterschiedlichen Lebensmitteln stehen erprobte, matrixangepasste Clean Up Methoden zur Verfügung. Neben der Flüssig-Flüssig Verteilung (3, 4, 5) sind Aufreinigungsschritte mittels SPE-Materialien (Florisil, RP-Materialien, Kieselgel) (6) und Immunoaffinitätschromatographie (IAC) (7) bekannt. Die Anwendung der Gelpermeationschromatographie (GPC) in der Mykotoxanalytik ist nur für die Aufreinigung von Aflatoxinen bekannt (8).

Methode

Probenvorbereitung

Es wurden 4,00 g Probe auf 0,01 g in einen 20 mL Messkolben eingewogen und mit 5 mL GPC-Elutionsmittel Cyclohexan/Ethylacetat (1/1, V/V) aufgelöst. Anschließend wurden 50 µL α -d4-Zearalenol (Interner Standard) hinzugefügt und mit dem GPC-Elutionsmittel bis zur Marke aufgefüllt. Das gelöste Öl wurde in ein Probenvial für die GPC überführt.

Aufreinigung mittels Gelpermeationschromatographie (GPC)

Die Aufreinigung der natürlich kontaminierten Speiseöle mittels GPC erfolgt wie in Abbildung 1 dargestellt. Dabei wurde die lipidhaltige erste Fraktion mit einem Elutionsvolumen von 100 mL (entsprechend 20 Minuten) verworfen. Die darauf folgende Fraktion wurde mit einem Elutionsvolumen von 50 mL (entsprechend 10 Minuten) in einen vorgelegten

Presented at the 26th Mykotoxin-Workshop in Herrsching, Germany, May 17-19, 2004

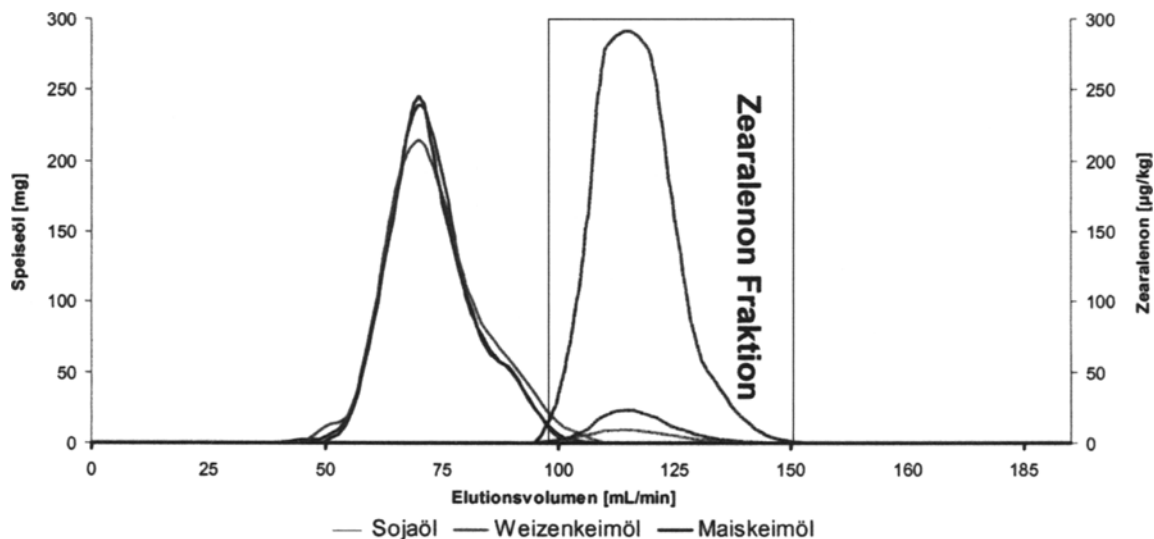
Correspondence: Oliver Kappenstein, Bundesinstitut für Risikobewertung, Thielallee 88-92, D-14195 Berlin (o.kappenstein@bfr.bund.de)

Financial support: Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft, Verbundforschungsvorhaben „Vorkommen und Analytik von Fusarientoxinen (Deoxynivalenol und Zearalenon) sowie Aufnahme dieser Toxine durch den deutschen Verbraucher“

Spitzkolben eluiert. Das Eluat wurde mittels Vakuumrotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. Für die LC-MS/MS wurde der

GPC-Rückstand in 1 mL 50%igen wässrigen Acetonitril aufgenommen und direkt dieser Analytik zugeführt.

Abbildung 1. Fraktionierung von natürlich kontaminierten Speiseölen in der GPC



Aufreinigung und Analytkonzentrierung mittels Immunoaffinitätschromatographie (IAC)

Der erhaltene Rückstand wurde in 1 mL Methanol gelöst. Diese Lösung wurde mit 10 mL Tween/PBS-Puffer verdünnt, in ein Vorratsgefäß überführt und über die IAC-Säule eluiert (Durchfluss 1-2 Tropfen/Sekunde). Die Säule wurde mit 5 mL Tween/PBS-Puffer nachgewaschen. Die auf der IAC-Säule haftende Flüssigkeit wurde unter leichtem Stickstoffstrom ausgeblasen. Anschließend wurde mit 5 mL Methanol (Durchfluss 1-2 Tropfen/Sekunde) in ein vorgelegtes Reagenzglas eluiert. Nach der Elution wurde das auf der IAC-Säule haftende Methanol mittels Stickstoffstrom in die Vorlage überführt. Das aufgefangene Eluat wurde bei 45 °C in einer Evaporationsstation mittels Stickstoff bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 1 mL 50%igen wässrigen Acetonitril aufgenommen.

Material

Gelpermeationschromatographie (GPC)-Anlage

Die GILSON ABIMED Anlage für die Größenausschlusschromatographie wurde mit einer Säule (500x25 mm) mit folgendem Packungsinhalt betrieben: BIO-BEADS S-X3; 200-400 Mesh. Als Laufmittel wurde ein Cyclohexan/Ethylacetat-Gemisch (1/1, V/V) mit

einem Durchfluss von 5 mL/min verwendet. Das Injektionsvolumen beträgt 5 mL.

HPLC-FLD – Anlage: Shimadzu 10 AVP mit Fluoreszenzdetektor RF-10AXL

Die chromatographische Trennung (Durchfluss 1,0 mL/min.) erfolgt mittels Gradient an einer Nucleosil C₁₈-Säule (100-5 Protect 1; 250 x 4,6 mm). Injektionsvolumen: 100 µL.

Fluoreszenzdetektor: Anregungs-Wellenlänge: 274 nm; Emmisions-Wellenlänge: 446 nm
 Laufmittel: Eluent A = Acetonitril;
 Eluent B = 1% wässrige Essigsäure
 Gradient:

Zeit [Minuten]	Eluent B [%]
0,00	60
30,00	20
30,01	20
35,00	60
35,01	60
45,00	60

HPLC-MS/MS – Anlage: Agilent 1100 mit Applied Biosystems API 4000 MDS Sciex

Die chromatographische Trennung (Durchfluss 0,2 mL/min.) erfolgt mittels Gradient an einer Nucleosil C₁₈-Säule (100-5 Protect 1; 150 x 2,1 mm)-Säule. Als Quantifizierungsspur wurde für Zearalenon das Ionenmassenpaar 319/283 m/z (Abbildung 2), als Bestätigungsspur

das Ionenmassenpaar 319/231 m/z (Abbildung 2) und für den Internen Standard α -d4-Zearalenol das Ionenmassenpaar 325/307 m/z herangezogen.

Laufmittel: Eluent A = Acetonitril;
 Eluent B = 0,1% Ameisensäure mit 5 mM NH_4COOH ;
 Gradient:

Zeit [Minuten]	Eluent B [%]
0,00	45
3,00	45
3,01	80
12,00	80
12,01	45
17,00	45

Ergebnisse

Die Bestimmung von Zearalenon in Speiseölen mit Gelpermeationschromatographie und anschließender LC-MS/MS sowie HPLC-FLD Detektion wurde validiert. Für die LC-MS/MS Bestimmung ist nach der GPC kein weiterer Aufreinigungsschritt notwendig (Abbildung 2), wohingegen die Bestimmung von ZEA mittels HPLC-FLD mit einem weiteren Aufreinigungsschritt (hier IAC) verbunden ist. Die Korrelation der beiden Nachweisverfahren ist zufrieden stellend (Abbildung 3; Tabelle 2). Im Rahmen dieses Forschungsvorhabens wurden 77 Speiseölproben untersucht. Der Mittelwert von 38 Maiskeimölen lag bei 169,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$, der Maximalwert bei 921 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Tabelle 1).

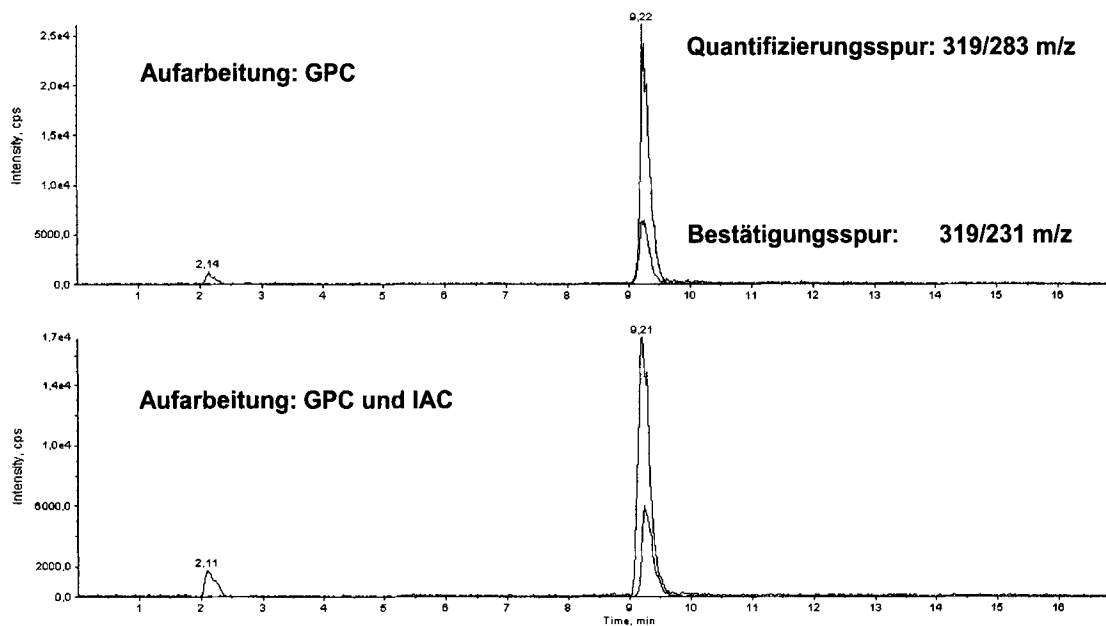


Abbildung 2. LC-MS/MS Chromatogramme der verschiedenen Aufarbeitungsabschnitte am Beispiel einer natürlich kontaminierten Maiskeimöl Probe (29 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

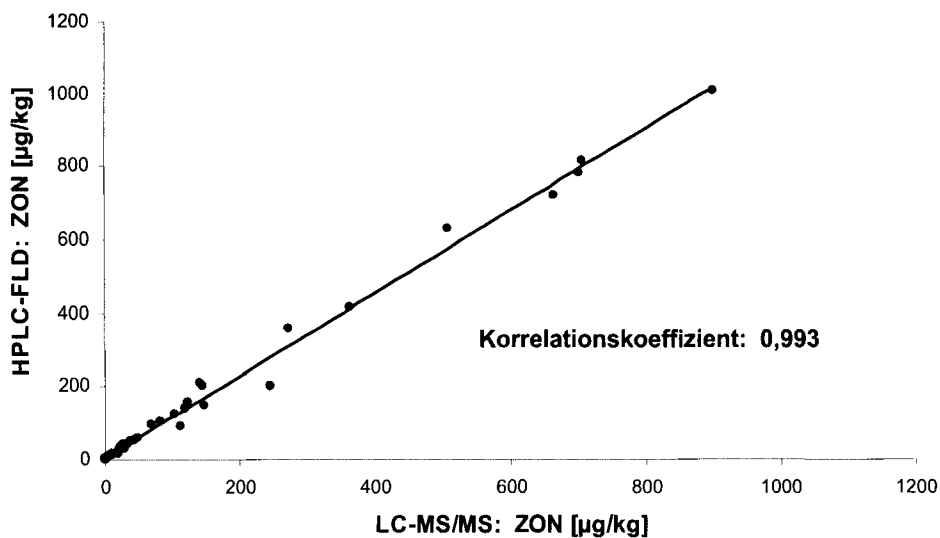


Abbildung 3. Korrelation der angewandten Detektionen LC-MS/MS und HPLC-FLD

Tabelle 1. Zearalenonuntersuchungen an Speiseölproben des Handels

	Maiskeimöl	Sojaöl	Weizenkeimöl	Andere Öle
Probenanzahl	38	20	11	8
davon positiv	38 (100%)	14 (70%)	10 (91%)	0
Mittelwert [µg/kg]	169,7	4,2	12,7	-
Median [µg/kg]	65,9	0,8	1,7	-
Max. Wert [µg/kg]	921	41,4	46,2	-

Tabelle 2. Validierungsdaten der beschriebenen Methoden

	Linearer Bereich	Korrelationskoeffizient	Nachweisgrenze	Wiederfindung (n = 3)		RSD _i
				Konzentration [µg/kg]	Ergebnis	
LC-MS/MS	0,2-1000 µg/kg	0,9999	0,3 µg/kg	500	98%	1,4
				100	90%	2,9
				20	85%	2,6
HPLC-FLD	2-200 µg/kg	0,9998	3 µg/kg	500	88%	0,7
				100	79%	2,7
				20	88%	5,8

Literaturverzeichnis

- 1 Reports on tasks for scientific cooperation. Report of experts participating in Task 3.2.10. April 2003
- 2 Lauren DR, Ringrose MA (1997) Determination of the fate of three *Fusarium* mycotoxins through wet-milling of maize using an improved HPLC analytical technique. *Food Addit. Contam.* 14: 435-443
- 3 Scott PM, Panalaks T, Kanhere S (1978) Determination of zearalenone in cornflakes and other corn-based foods by thin-layer chromatography, high-pressure liquid chromatography, and gas-liquid chromatography - high resolution mass spectrometry. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 61: 593-600
- 4 Ware GM, Thorpe CW (1978) Determination of zearalenone in corn by high-pressure liquid-chromatography and fluorescence detection. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 61: 1058-1062
- 5 Eppley RM (1968) Screenig method for zearalenone aflatoxin and ochratoxin. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 51: 74-78
- 6 Seidel V, Poglis E, Schiller K, Lindner W (1993) Simultaneous determination of Ochratoxin-A and zearalenone in maize by reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and beta-cyclodextrin as mobile phase additive. *J. Chromatography* 635: 227-235
- 7 Visconti A, Pascale M (1998) Determination of zearalenone in corn by means of immunoaffinity clean-up and high-performance liquid-chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* 815: 133-140
- 8 Hetmanski MT, Scudamore KA (1989) A simple quantitative HPLC method for determination of aflatoxins in cereals and animal feedstuffs using gel-permeation chromatography clean-up. *Food Addit. Contam.* 6: 35-48