

Bestimmung von Deoxynivalenol und Deepoxy-Deoxynivalenol in Milch

V. Curtui, C. Seidler, E. Schneider, E. Usleber

Professur für Milchwissenschaften, Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Justus-Liebig-Universität, Ludwigstr. 21, D-35390 Giessen

Abstract

Determination of deoxynivalenol and deepoxy-deoxynivalenol in milk

A HPLC method with UV/diode array detection for the determination of deoxynivalenol (DON) and deepoxy-deoxynivalenol (DOM-1) in milk was developed. Milk was incubated with β -glucuronidase and then defatted. After purification by immunoaffinity chromatography, DON and DOM-1 were separated on a C18 reversed phase column with acetonitril/water (10/90) as the mobile phase and detected at 218 nm. Limits of quantification were 1 μ g/l for both toxins, with mean recoveries (1-10 μ g/l) of 97% (DON) and 84% (DOM-1), respectively. Milk samples (pasteurized, UHT; n=32) from German retail shops were analysed by this method. Neither DON/DOM-1 nor their glucuronides were found in any sample. These results are consistent with published studies indicating that in lactating cows, DON and DOM-1 are mostly eliminated through urine, and that the carry-over into milk is negligible.

Keywords: deoxynivalenol, deepoxy-deoxynivalenol, consumer milk

Einleitung

Der mögliche Übergang von DON bzw. seinem Hauptmetaboliten DOM-1 aus dem Futter in die Milch wurde in mehreren Fütterungsversuchen überprüft (1, 2, 3, 4). DON wurde nach einmaliger hochdosierter oraler Applikation von 920 mg/Kuh (1,9 mg/kg KGW) in Konzentrationen bis zu 4 μ g/l in der Milch gefunden, DOM-1 wurde in dieser Studie nicht untersucht (1). In einer anderen Studie wurde nach 5-tägiger Fütterung eines künstlich mit DON kontaminiertem Mais (66 mg DON/kg Futtermittel; 0,7 mg/kg KGW) DOM-1 in Konzentrationen bis zu 26 μ g/l Milch nachgewiesen (2). Nach den Ergebnissen dieser Studien liegt das carry-over von DON in Milch bei weniger als 0,1% der aufgenommenen Menge. Da unter realistischen Bedingungen die DON-Aufnahme deutlich niedriger als in den oben angegebenen Studien liegt, ist prinzipiell nicht von einem relevanten Übergang von

DON in die Milch auszugehen. Da allerdings auch keine Untersuchungen zur Belastung von Konsummilch mit DON bzw. Metaboliten vorliegen, sollte diese Frage im Rahmen eines Verbundforschungsprojekts zur Ermittlung der Belastung der Lebensmittel mit DON geklärt werden. Hierzu wurde eine hochempfindliche HPLC-Methode für DON und DOM-1 bzw. deren Glucuronid-Metaboliten in Milch entwickelt, unter Einsatz der Immunoaffinitätschromatographie.

Methodik

Die Toxinstandards DON bzw. DOM-1 wurden von den Firmen Sigma bzw. Biopure bezogen. Konsummilchproben (verschiedene Fettgehaltsstufen, pasteurisiert bzw. ultrahocherhitzt; n=32) wurden im Zeitraum von August 2003 bis Januar 2004 in mittelhessischen Einzelhandelsgeschäften gekauft.

Zur Probenextraktion wurden 25 ml Milch mit 25.000 Einheiten β -Glucuronidase (enthält auch Sulfatase; Sigma, G-7017) 2 h bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Die Milch wurde anschließend in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, zentrifugiert (2000 x g, 15 min, 20 °C) und das Fett mit einer Pasteurpipette entfernt. Ein Teil (20 ml) der entfetteten Milch

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

Correspondence: Valeriu Curtui, Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Justus-Liebig-Universität, Ludwigstr. 21, D-35390 Giessen (Milchwissenschaften@vetmed.uni-giessen.de)

Financial support: Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft (BLE 00 HS 055)

wurde in ein 50 ml Becherglas überführt und der pH-Wert auf $7,0 \pm 0,2$ mit NaOH (3 mol/l) eingestellt. Die Aufreinigung der Toxine erfolgte mittels Immunitätsäule (IAC) (DONPREP Säule, r-Biopharm) gemäß Herstellerangaben, mit geringfügigen Modifikationen. Eine wie oben beschrieben vorbehandelte Milchprobe wurde langsam (Flussrate maximal 1 Tropfen/sec) auf eine vorbereitete IAC-Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule in zwei Schritten mit jeweils 10 ml A. dest. gewaschen (1-2 Tropfen/sec). Die Toxine wurden mit 2 ml Methanol eluiert (0,5-1 Tropfen/sec), das Lösungsmittel bei 60 °C unter Stickstoff abgedampft und der Rückstand in 200 µl Acetonitril/Wasser (10/90) gelöst. Ein Teil (50 µl, entsprechend 5 ml Milch) dieses Extraktes wurde in das HPLC-System injiziert. Die Trennung erfolgte unter folgenden chromatographischen Bedingungen: stationäre Phase: RP-18 Säule (LiChroCART 125-4 mm, 5 µm, Merck) mit RP-18 Vorsäule (LiChroCART 4-4 mm, 5 µm, Merck); mobile Phase: Acetonitril/Wasser (10/90), 1 ml/min; Säulentemperatur: 25 °C. Die Detektion erfolgte mittels DAD (200-400 nm) bei 218 nm.

Ergebnisse und Diskussion

Die enzymatische Behandlung mit β -Glucuronidase/Sulfatase diente der Erfassung der glucuronidierten Metaboliten von DON bzw. DOM-1, wie von anderen Autoren beschrieben (1, 2). Eine Überprüfung der Effizienz dieser Vorbehandlung war allerdings aufgrund des Fehlens glucuronidierter Standards für DON bzw. DOM-1 nicht möglich. Die in den verwendeten IAC-Säulen für DON immobilisierten Antikörper wiesen in Vorversuchen eine

ausreichende Bindung des Metaboliten DOM-1 auf (Kapazität annähernd gleich wie für DON), so dass beide Verbindungen simultan aus dem Probenmaterial isoliert werden konnten. Unter den beschriebenen chromatographischen Bedingungen lag die Nachweisgrenze für DON bzw. DOM-1 bei ca. 1 ng absolut injizierter Menge, entsprechend ca. 0,2 µg/l Milch (Signal/Rausch-Verhältnis 3:1). Die Bestimmungsgrenze (Signal/Rausch-Verhältnis 10:1) lag für beide Toxine bei jeweils ca. 1 µg/l. Ab einer injizierten Menge von ca. 2 ng war neben der Detektion bei 218 nm eine zusätzliche Überprüfung der Peakidentität durch Auswertung des UV-Absorptionsspektrums zur Retentionszeit von DON bzw. DOM-1 möglich (Abbildung 1). Eine Überprüfung der HPLC-Methode unter Verwendung künstlich mit DON bzw. DOM-1 kontaminierten Probenmaterials (Tabelle 1, Abbildung 1) ergab mittlere Wiederfindungsraten von 97% (DON) bzw. 84% (DOM-1). Damit wies die hier beschriebene Methode eine Sensitivität auf, die derjenigen der GC-MS (1) und LC-MS (3) vergleichbar war.

Eine Untersuchung von Konsummilch (n=32) aus dem Einzelhandel ergab für keine Probe Hinweise auf eine Belastung mit DON bzw. DOM-1 oder ihre Glucuroniden.

Die hier beschriebene Methode eignete sich somit gut zum gleichzeitigen Nachweis von DON bzw. DOM-1 in Milch. Die Verwendung der IAC ermöglichte eine relativ einfach durchzuführende Probenaufbereitung mit gleichzeitiger Aufkonzentrierung, so dass sehr niedrige Nachweisgrenzen erzielt werden konnten.

Tabelle 1. Wiederfindung von DON bzw. DOM-1 in künstlich kontaminierter Konsummilch

Toxin-Zugabe (µg/l)	DON			DOM-1		
	n	Wiederfindung (%)	Variationskoeffizient (%)	n	Wiederfindung (%)	Variationskoeffizient (%)
1	2	110	1,3	2	85	7,4
2,5	3	95	2,2	3	86	1,8
5	4	93	3,0	4	82	5,6
10	2	97	2,2	2	86	1,6
Mittelwert		97	7,4		84	4,5

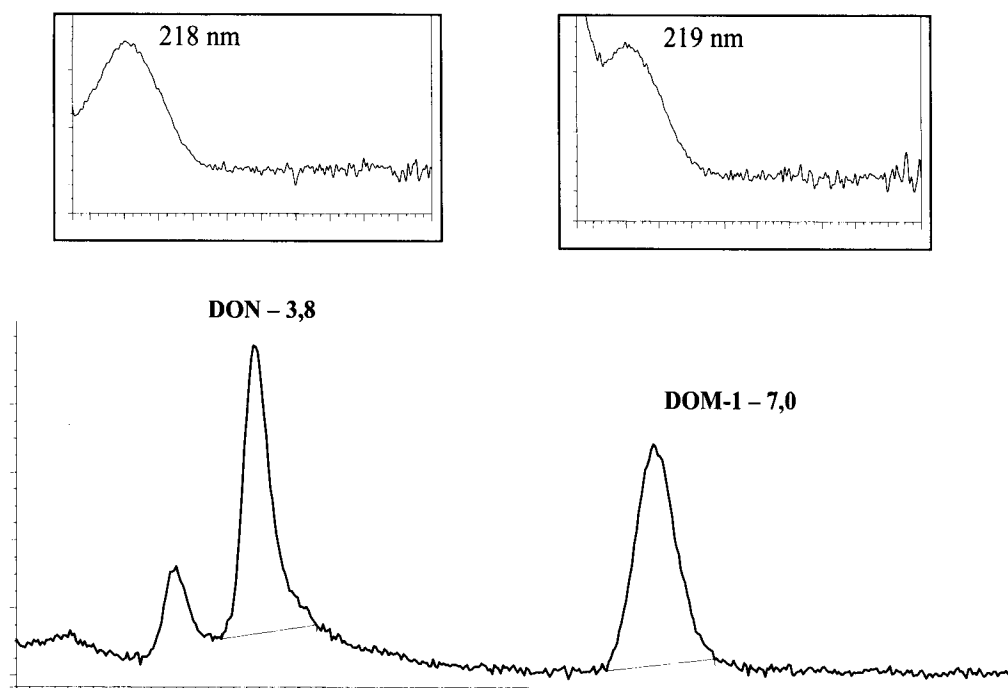


Abbildung 1. Chromatogramm einer künstlich mit DON und DOM-1 kontaminierten (je 2,5 µg/l) Konsummilchprobe; kleine Kästchen: UV-Spektrum im Peakmaximum von DON (3,8 min) bzw. DOM-1 (7,0 min)

Die Tatsache, dass sich in den eigenen Untersuchungen keine Hinweise auf eine Kontamination von Konsummilch mit DON, DOM-1 bzw. ihren Glucuroniden ergaben, ist konsistent mit den publizierten Ergebnissen früherer Fütterungsversuche (1, 2, 3) bei Kühen. Die carry-over Raten für DON in Milch einzelner Tiere nach einmaliger oder wiederholter Gabe hoher Dosen DON lagen stets unter 0,1%, zumeist sogar unter 0,01%. Eine Belastung von Milch mit DON bzw. DOM-1 in Konzentrationen um 1 µg/l ist daher erst bei mittleren DON-Gehalten in Futtermitteln ab 5-10 mg/kg zu erwarten (1), eine Belastung über 10 µg/l erst bei mehr als 50 mg DON/kg im Futtermittel (2). Derart hohe DON-Konzentrationen im Futter sind in Einzelfällen zwar durchaus möglich, entsprechen aber keinesfalls der Normalbelastung der Futtermittel in Deutschland. Da Konsummilch einen „Pool“ vieler milcherzeugender Betriebe darstellt, minimiert sich das Belastungsrisiko zusätzlich.

Bei einem angenommenen täglichen Milchkonsum von 1 Liter liegt die tägliche Gesamtaufnahme von DON bzw. DOM-1 durch Milch unter 1 µg. Aufgrund dieser Ergebnisse stellt Milch keine relevante Quelle für eine Belastung des deutschen Verbrauchers mit Deoxynivalenol dar.

Literatur

- 1 Prelusky DB, Trenholm HL, Lawrence GA, Scott PM (1984) Nontransmission of deoxynivalenol (vomitoxin) to milk following oral administration to dairy cows. *J. Environ. Sci. Health B* 19: 593-609
- 2 Côté LM, Dahlem AM, Yoshizawa T, Swanson SP, Buck WB (1986) Excretion of deoxynivalenol and its metabolite in milk, urine and faeces of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 69: 2416-2423
- 3 Charmley E, Trenholm HL, Thompson BK, Vudathala D, Nicholson JWG, Prelusky DB, Charmley LL (1993) Influence of level of deoxynivalenol in the diet of dairy cows on feed intake, milk production, and its composition. *J. Dairy Sci.* 76: 3580-3587
- 4 Vudathala DK, Prelusky DB, Trenholm HL (1994) Analysis of trace levels of deoxynivalenol in cow's milk by high pressure liquid chromatography. *J. Liquid Chromatography* 17: 673-683