

Die unsichtbare Gefahr

Schneller und sensibler Nachweis von Mykotoxinen in Babynahrung

Dr. Ute Potyka

Shimadzu Europa GmbH

Sie sind natürlich, jedoch für Mensch und Tier toxisch – Mykotoxine sind Stoffwechselprodukte niederer Pilze, zu denen auch die Schimmelpilze gehören. Sie entstehen bei falscher Lagerung von Nahrungs- und Futtermitteln oder unter ungünstigen Bedingungen wie erhöhter Feuchtigkeit oder Temperatur bereits auf dem Feld. Da es kaum zu akuten Vergiftungen kommt, erregen diese Substanzen wenig Aufmerksamkeit.

Sehr hohe Gehalte von Mykotoxinen können zwar akut toxisch wirken, das größere Gefahrenpotenzial hingegen lauert in ihrer Kanzerogenität, Mutagenität und Teratogenität bei Aufnahme niedriger Mengen über einen längeren Zeitraum. Darüber hinaus muss davon ausgegangen werden, dass die Akkumulation von Mykotoxinen im Organismus für die Entstehung von Organkrankheiten wie Nerven-, Nieren-, Leber-, und Herzschäden verantwortlich ist.

Auch für die weltweite Landwirtschaft ist die Kontamination mit Feld- und Lagerpilzen bzw. deren Mykotoxinen ein ernsthaftes Problem. Nach Schätzungen der Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen (FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations) sind bis zu 25% der Weltproduktion an Getreide und daraus hergestellten Grundnahrungsmitteln mit Mykotoxin bildenden Pilzen befallen. Betroffen sind vor allem Getreide, ölhaltige Samen und Nüsse, Kaffee, Obst, Gemüse sowie Gewürze.

Einführung von Grenzwerten

Seit 2006 gelten in Europa zum Schutz der Verbraucher einheitliche Höchstgehalte in bestimmten Lebensmitteln. Diese Höchstmengen sind abhängig von der Toxizität des Mykotoxins sowie der geplanten Verwendung des Nahrungsmittels. Die Verarbeitung zu Babynahrung ist besonders kritisch, da die kleinen Konsumenten besondere Bedürfnisse haben. So ist der Organismus eines Kleinkinds besonders sensitiv gegenüber toxischen Verbindungen, aufgrund des niedrigen

Körpergewichts, des höheren Grundumsatzes und der nur wenig entwickelten Fähigkeit zur Entgiftung von Kontaminationen und Fremdstoffen (Xenobiotika). Daher hat die Europäische Kommission speziell für Säuglings- und Kindernahrung sehr niedrige Grenzwerte festgelegt.

Die niedrigsten Werte gelten für das hochtoxische Ochratoxin A (0,5 µg/kg) sowie die Aflatoxine B1 (0,1 µg/kg) und M1 (0,025 µg/kg), da sie zu den stärksten bekannten Kanzerogenen gehören.

Eine empfindliche Analytik zum Schutz insbesondere der ganz jungen Verbraucher ist daher unerlässlich. Diese Applikation stellt eine neue Methode zur ultraschnellen Analyse von Mykotoxinen in verschiedenen Arten von Babynahrung mit dem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer LCMS-8050 vor. Folgende Nahrungsmittel wurden unter die Lupe genommen: Pulver zur Herstellung von Babymilch, Getreidemehle aus Reis und Maniokwurzel, die zur Verdickung von Babynahrung eingesetzt werden sowie verschiedene Gemüse-Getreidebreie.

Material und Methoden

Probenvorbereitung:

Die homogenisierte Probe (5 g) wird mit 20 ml eines Wasser-Acetonitril-Gemischs (Volumenverhältnis 1:1) versetzt, 5 Minuten im Ultraschallbad geschallt und danach weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Zentrifugieren (3.000 g, 10 Min.) wird der Überstand mit Wasser im Volumenverhältnis 1:4 verdünnt. Die Extraktionssäulen (Isolute® Myco, Biotage, Sweden; 60 mg/3 ml) werden zuerst mit 2 ml Acetonitril, dann mit 2 ml Wasser konditioniert. 3 ml des verdünnten Überstands werden bei möglichst geringer Flussrate auf die Extraktionssäule gegeben.

Es folgen zwei Waschgänge, zuerst mit 3 ml Wasser, danach mit 3 ml Wasser-Acetonitril (Volumenverhältnis 9:1). Nach dem Trocknen werden die Komponenten schrittweise mit

2 ml Acetonitril, angesäuert mit 0,1% Ameisensäure, und anschließend mit 2 ml Methanol von der Säule eluiert. Das Eluat wird mit Stickstoff bei 35°C bis zur völligen Trockne eingengt (Turbovap, Biotage, Sweden). Die Probe wird mit 150 µl eines Lösungsmittelgemischs (Wasser/Methanol/Acetonitril im Volumenverhältnis 80:10:10 und 0,1% Ameisensäure) versetzt.

LC-MS/MS Analyse:

Die Trennung des Extrakts wird mit einer Nexera X2 UHPLC Anlage (Shimadzu, Japan) durchgeführt, die an ein Triple-Quadrupol-Massenspektrometer LCMS-8050 von Shimadzu gekoppelt ist. Die Analysen der Proben wurden im MRM-Modus (Multiple Reaction Monitoring) mit zwei Übergängen pro Komponente durchgeführt. Die Parameter der Ionenquelle und des Interface, also Gasflüsse, Spannungen und Temperaturen, wurden sorgfältig aufeinander abgestimmt, so dass aufgrund ihrer synergistischen Wirkung die optimale Empfindlichkeit insbesondere für die kritischen Analyten, in diesem Fall die Aflatoxine, aus dem LCMS-8050 erreicht werden kann.



Abb. 1: Nexera X2 UHPLC gekoppelt mit dem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer LCMS-8050

45 Mykotoxine in weniger als neun Minuten

Abbildung 2 zeigt das Chromatogramm eines Mykotoxin-Standards mit einer Konzentration von 2 ppb für die Aflatoxine (B1, B2, G1, G2, M1) und Ochratoxine A, B sowie 50 ppb für die restlichen Mykotoxine.

Als Kriterium für die Qualität der Analyse-methode wurden die Wiederfindungsraten

der Probenvorbereitung (Extraction recovery) bestimmt sowie der Matrixeffekt bei der Ionisierung (Ionisation recovery) für die Aflatoxine. Die Messungen wurden in drei verschiedenen Matrices durchgeführt. In Tabelle 1 sind exemplarisch die Werte für Getreide-Gemüsebrei aufgeführt (Vergleich der Peakflächen von vor und nach der Extraktion mit Standard gespikter Matrix sowie der Vergleich mit den Peakflächen der reinen Standardlösung). Die Ergebnisse für die Wiederfindungsraten in den beiden anderen Matrices (Babymilchpulver, Getreidemehl als Verdickungsmittel in Babymilch) unterscheiden sich kaum von den in Tabelle 1 dargestellten Werten.

Zusätzlich wurde die Reproduzierbarkeit der Analysenergebnisse untersucht. Abbildung 3 zeigt die gute Reproduzierbarkeit ($n = 4$) der Aflatoxine bei einer Konzentration von 0,1 ppb in der Matrix (Matrix in diesem Beispiel: zur Verdickung der Milch eingesetztes Getreidemehl).

Anhand der Abbildungen 4 und 5 wird deutlich, dass der geforderte gesetzliche Grenzwert von 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ für Aflatoxin B1 (MRM Quan. 312,6 > 284,9, MRM Qual. 312,6 > 240,9) sowie 0,025 $\mu\text{g}/\text{kg}$ für Aflatoxin M1

(MRM Quan. 329,1 > 237, MRM Qual. 329,1 > 229) problemlos erreicht wird.

Fazit

Gerade wegen ihres hohen toxischen und kanzerogenen Potenzials, ist die sichere und empfindliche Bestimmung von Mykotoxinen unerlässlich, insbesondere zum Schutz von Säuglingen und Kleinkindern. Die vorliegende Applikation beschreibt eine verlässliche Methode zur Quantifizierung von 45 Mykotoxinen in Babynahrung. Mit der ultraschnellen Scanrate des LCMS-8050 und einem Polaritätswechsel von nur 5 ms gelingt die Analytik in weniger als neun Minuten. Wiederfindungsraten und Reproduzierbarkeitsmessungen in drei verschiedenen Babynahrungsmitteln verdeutlichen die Zuverlässigkeit der Methode.

	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	AFM1
Extraction recovery	101 %	109 %	104 %	114 %	118 %
Ionisation recovery	49 %	90 %	96 %	106 %	91 %
Total recovery	49 %	98 %	100 %	121 %	108 %

Tab. 1: Wiederfindungsraten der Aflatoxine in Getreide-Gemüsebrei

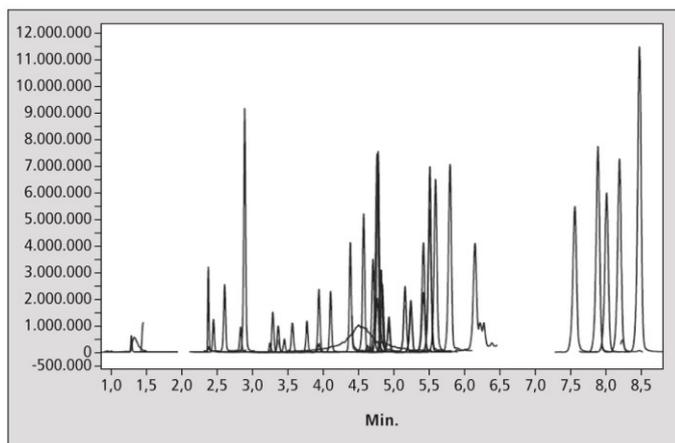


Abb. 2: Chromatogramm eines Mykotoxinstandards mit 45 Komponenten bei einer Konzentration von 50 ppb (2 ppb für die Aflatoxine und Ochratoxine)

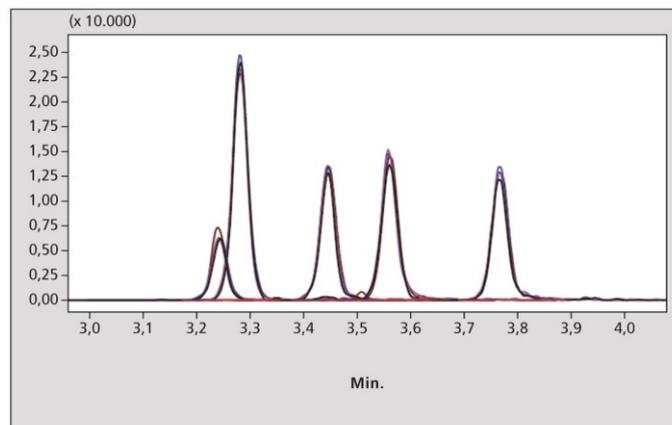


Abb. 3: Der Ausschnitt eines Chromatogrammvergleichs zeigt die Reproduzierbarkeit ($n = 4$) für 5 Aflatoxine ($c = 0,1$ ppb) in Getreidemehl, das als Verdickungsmittel der Säuglingsmilch zugesetzt wird.

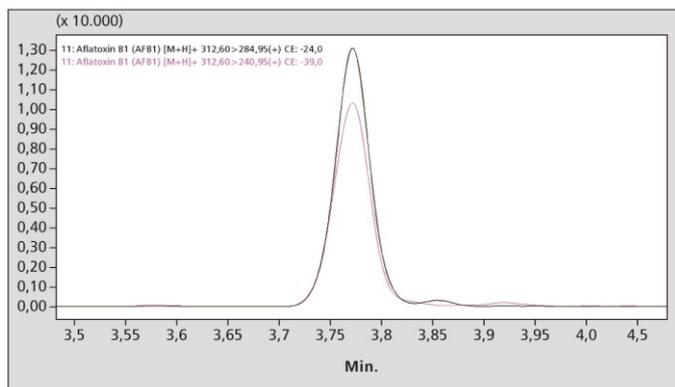


Abb. 4: Aflatoxin B1 bei einer Konzentration von 0,2 ppb

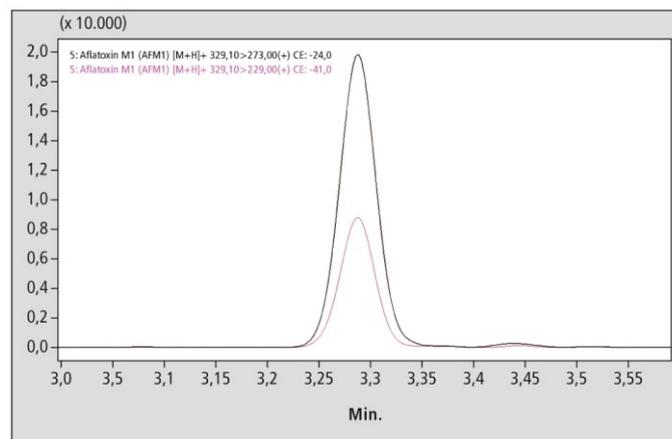


Abb. 5: Aflatoxin M1 bei einer Konzentration von 0,2 ppb

Geschichte und Entdeckung der Mykotoxine

Älter als die Menschheit und weltweit verbreitet, rückten die Toxine der Schimmelpilze erst in den letzten Jahrzehnten in das Interesse der Forscher. Bereits in der Bibel gibt es Berichte über eine Krankheit, die nach Verzehr von Mutterkorn auftritt. Und im Mittelalter fielen dieser heute als Ergotismus bekannten Krankheit Hunderttausende zum Opfer («St. Antonius Feuer»). Selbst rätselhafte Phänomene der Geschichte wie der Untergang mancher Hochkultur oder die geheimnisvollen Todesfälle von ca. 30 Personen, die an der Öffnung und Erforschung des Grabes des ägyptischen Pharaos Tutenchamun beteiligt waren, können höchstwahrscheinlich auf akute Vergiftungen mit Mykotoxinen zurückgeführt werden.

Auch in jüngerer Zeit gibt es immer wieder Berichte über zunächst unergründliche Krankheiten, die später mit der tödlichen Wirkung von Schimmelpilzen in Zusammenhang gebracht werden konnten. Zum Beispiel wurde Anfang des 20. Jahrhunderts in der damaligen UdSSR eine durch Fusarienpilze (in verschimmelter Hirse und Weizen) hervorgerufene Krankheit erwähnt, die vermutlich zuerst im Jahr 1891 auftrat und bis über das Ende des Zweiten Weltkriegs hinaus Hunderttausende Menschenleben forderte (Quelle: Bestimmung von Aflatoxinen und Patulin mittels online-SPE-LC von Andreas Sascha Wendt).

Tatsächlich entdeckt und identifiziert wurden die ersten Mykotoxine hingegen erst, als man 1961 dem Grund für das mysteriöse Sterben von 100.000 Putenküken in England nachspürte. Nach intensiver Suche stießen die Wissenschaftler in dem verschimmelten Tierfutter auf Aflatoxine. In den folgenden Jahren kam es zu einer nahezu explosionsartigen Entdeckung neuer toxischer Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen. Dass diese Verbindungen auch in menschlichen Nahrungsmitteln vorhanden und Ursache von Krankheiten sein können, zeigte sich erst im Laufe der Zeit, durch optimierte Analysemethoden und moderne Gerätetechnik, die eine empfindliche und schnelle Überwachung von Lebensmitteln und Lebensmittelbestandteilen erst ermöglichte.

Bislang sind ca. 300 verschiedene Mykotoxine bekannt, die von mehr als 250 Schimmelpilzarten während ihres Wachstums produziert werden (Quelle: BfR, Bundesinstitut für Risikobewertung). Davon sind aber nur einige für die Lebens- und Futtermittelsicherheit relevant. Dazu zählen die

- Aflatoxine,
- Ochratoxine,
- Mutterkornalkaloide,
- Fusarientoxine (Trichothecene, Fumonisine, Zearalenon),
- Patulin

Mykotoxine selbst sind nicht sichtbar und können auch nach Abtrennung des Pilzes im Lebensmittel verbleiben. Stark verarbeitete Lebensmittel, bei denen eine Pilzbestimmung oftmals nur noch schwer oder gar nicht mehr möglich ist, können trotzdem Mykotoxine beinhalten. Umgekehrt muss ein optisch bereits deutlich verpilztes Lebensmittel nicht zwangsläufig Mykotoxine enthalten, trotzdem wird von dem Verzehr dringend abgeraten.

Da Mykotoxine chemisch sehr stabile Verbindungen sind, hitzestabil bis zu sehr hohen Temperaturen, werden sie bei der Nahrungsmittelverarbeitung in der Regel nicht zerstört. Einen sogenannten „Carry-over effect“ findet man bei Nutztieren, die toxische Futtermittel aufgenommen haben. Einzelne Mykotoxine können in unveränderter oder metabolisierter Form in verschiedenen Organen abgelagert oder ausgeschieden werden. Auf diese Weise gelangen die Mykotoxine in Lebensmittel tierischer Herkunft (Fleisch, Eier, Milch, Milchprodukte), ohne dass das Produkt selbst verschimmelt ist. Auch eine solche Kontamination ist äußerlich nicht erkennbar, mit empfindlichen Analysengeräten sind jedoch der Nachweis und die Identifizierung selbst extrem niedriger Konzentrationen möglich.