

## Bestimmung von T-2- und HT-2-Toxin in Getreide und Getreideerzeugnissen mittels LC-MS/MS nach automatisierter Reinigung über Immunoaffinitätssäulen.\*)

\* ) aus: [Deutsche Lebensmittelrundschau](#) 1, S. 22-24 (2008)

*Maria Barricelli, Klaus Schmidt und Bettina Börner*

*Landeslabor Berlin-Brandenburg, Standort Invalidenstr. 60, D-10557 Berlin*

### Zusammenfassung

Es wird eine Methode zur Bestimmung von T-2- und HT-2-Toxin in Getreide und Getreideerzeugnissen mittels LC-MS/MS nach automatisierter Reinigung an Immunoaffinitätssäulen beschrieben.

### Summary

This paper describes a method of the determination of T-2- and HT-2-Toxin in cereal grains and cereal-based foods by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry after automated immunoaffinity clean-up.

### Keywords

T-2- und HT-2-Toxin, Getreide, Getreideerzeugnisse, HPLC-MS/MS, T-2- and HT-2-Toxin, cereal grains, cereal-based foods, HPLC-MS/MS

### Einleitung

Viele Fusarien – Fusarien sind allgemein verbreitete Bodenpilze – produzieren eine Reihe verschiedener Mykotoxine, die der Gruppe der Trichothecene angehören, wie zum Beispiel Deoxynivalenol (DON), Nivalenol (NIV), **T-2-Toxin und HT-2-Toxin**, sowie weitere Toxine (Zearalenon und Fumonisine). Fusarien kommen häufig auf Getreide in den gemäßigten Zonen Amerikas, Europas und Asiens vor. Mehrere der Toxin bildenden Fusarien können in unterschiedlichem Maße zwei oder mehr dieser Toxine bilden.

Die Toxizität von T-2-Toxin und dem Hauptmetaboliten HT-2-Toxin wurde 2001 vom Wissenschaftlichen Lebensmittelausschuss (Scientific Committee on Food -SCF-) bewertet. Sehr kritisch werden vor allem die allgemeine Toxizität, die Hämato- sowie die Immunotoxizität von T-2-Toxin beurteilt.

Der TDI-Wert beträgt für beide Toxine 0,06 µg/kg Körpergewicht pro Tag [1] [2]. Für die Bestimmung von T-2- und HT-2-Toxin lagen uns verschiedene Methoden vor, die nach Anreicherung und Separation an Immunoaffinitätssäulen (IAC) [3] [4] [5] mit anschließender HPLC T-2- und HT-2-Toxin nach Vorsäulenderivatisierung mit Fluoreszenzdetektion bestimmen. Weitere

Methoden beschreiben die Aufreinigung über Festphasensäulen (MycoSep™-Kartuschen) mit anschließender HPLC-MS/MS [6] [7] [8] [10] [11] [12] [13]. Wir haben uns entschieden, die Aufreinigung an Immunoaffinitätssäulen mit der HPLC-MS/MS zu kombinieren, da wir bei der Bestimmung von Mykotoxinen routinemäßig gute Erfahrungen mit IAC-Säulen gemacht haben. Durch die Messung mit der HPLC-MS/MS werden matrixbedingte Interferenzen und die aufwendige Derivatisierung vermieden. Weiterhin sind Nachweis- und Bestimmungsgrenze zufriedenstellend. Um die Effektivität der Aufreinigung bei guter Reproduzierbarkeit zu steigern, wurde die Reinigung an Immunoaffinitätssäulen automatisiert.

## **Material und Methode**

### **Chemikalien**

T-2 Toxin Standard z.B. von Fa. Biopure Referenzsubstanzen GmbH, 5 mg,

Bestell-Nr. BRM 001011

HT-2 Toxin Standard z.B. von Fa. Biopure Referenzsubstanzen GmbH, 5 ml,

Bestell-Nr. BRM 002036

Ammoniumacetat z.B. Fractopur Merck Art.-Nr. 1.16103

Acetonitril gradient grade, Merck Art.-Nr. 1.00030

Methanol picograde für die Extraktion Promochem Art.-Nr. SO-1263-B040

Methanol gradient grade, Merck Art.-Nr. 1.00030

NaCl, Merck Art.-Nr. 1.064.04

Osmosewasser, Herstellung Millipore-Anlage

Methanol/Wasser Gemisch, 90 Vol.T/10 Vol.T

### **Geräteparameter**

Die HPLC/MS/MS-Anlage setzte sich aus einer HPLC-Anlage der Serie Alliance 2695 mit quaternärer Pumpe, Autosampler, Mikrodegasser und Säulenthermostat und einem Massenspektrometer Quattro Micro der Firma Waters (Eschborn) zusammen. Verwendet wurde eine HPLC-Säule Synergi™ Polar-RP® der Firma Phenomenex (Aschaffenburg). Diese Säule gehört nicht zu den klassischen Alkylsäulen. Das Adsorbens enthält eine kurze Alkylkette (C3) mit eingebauter Ethergruppe („embedded Phase“), polarer Endgruppe (Phenyl) und hydrophilem Endcapping. Die Partikelgröße beträgt 4 µm bei einer Porengröße von 80 Å. Ihre Länge betrug 150 mm und ihr Innendurchmesser 2 mm. Als Vorsäule wurde ein Security-Cartridge-System von Phenomenex (Aschaffenburg) benutzt, das hochreines C-18 Material enthält (2 mm Länge, 2 mm Durchmesser).

## Chromatographie

Eluent A: Osmosewasser

Eluent B: Acetonitril

Eluent C: 50 mmol Ammoniumacetat pH 5

Gradient: [%]

Zeit [min]	A	B	C	Flussrate [ml/min]
0	60	20	20	0,2
10	0	80	20	0,2
10	0	80	20	0,1
15	0	80	20	0,1
16	60	20	20	0,2
20	60	20	20	0,2

Säulentemperatur: 30 °C

Injektionsvolumen: 25 µl

## Parameter für das MS/MS

Das Massenspektrometer wurde mit der Electrospray-Ionenquelle (ESI+) zur Ionisierung der Analyten bestückt und im Multiple Reaction Monitoring Modus (MRM) betrieben.

Polarity	ES+
Cone Voltage	19 V
Source Temperature	120°C
Desolvation Temperature	450°C
Desolvation Gas	600 l/h
Cone Gas	100 l/h

Tabelle 1: Einstellungen der Parameter der Ionenquelle

Komponente	Channel	Reaction	Dwell [sec]	Cone [V]	Collision
HT-2	1	442,3 > 263,2	0,3	15	15
HT-2	2	442,3 > 215,2	0,3	15	13
T-2	3	484,2 > 215,2	0,1	19	20
T-2	4	484,2 > 245,2	0,1	19	14

Tabelle 2: MRM Experimente der Funktion 1, Inter Channel Delay: 0,02 sec, RT Window: 8 bis 20 min

Als Quantifizierungsspur wird für HT-2-Toxin das Ionenmassenpaar 442,3/263,2 m/z; als Bestätigungsspur das Ionenmassenpaar 442,3/215,2 m/z herangezogen. Für T-2-Toxin wird als Quantifizierungsspur das Ionenmassenpaar 484,2/215,2 m/z, als Bestätigungsspur das Ionenmassenpaar 484,2/245,2 m/z herangezogen.

## Aufarbeitung

50 g der gemahlene Probe + 1 g NaCl werden in einen Erlenmeyerkolben eingewogen, mit 100 ml Methanol/Wasser 90:10 (v/v) versetzt und 2 min. bei mittlerer Geschwindigkeit mit dem Ultra Turrax homogenisiert. Der Extrakt wird 10 min. bei ca. 8000 U/min. zentrifugiert. Vom Überstand werden 10 ml abgenommen und mit 40 ml Wasser gemischt und filtriert.

10 ml des Filtrats werden auf die Immunoaffinitätssäule (EASI-EXTRACT® T-2 and HT-2, Fa. R-Biopharm Rhône LTD) gegeben.

Die Probe wird mit 1 bis 2 ml/min. durch die Säule laufen gelassen (schwaches Vakuum ca. 750 mbar), anschließend mit 10 ml Wasser bei 2 ml/min. gespült und 1 min. trocken gesaugt. Die Elution erfolgt mit 2 ml Methanol.

Das Eluat wird in einem 10 ml Reagenzglas mit Schliff aufgefangen (ca. 1–2 Tropfen/sec.) und das Methanol im N<sub>2</sub>-Strom bei 55 °C eingengt. Der Rückstand wird mit 1,5 ml HPLC-Eluent aufgenommen (Ultraschall!).

Die Quantifizierung erfolgte durch externe Kalibrierung im Bereich von 1 – 100 ng/ml HT-2- bzw. T-2-Toxin. Die Anwendbarkeit der Methode wurde durch Aufarbeitung und Analyse einer dotierten analytfreien Probe Haferflocken im Bereich von 2-50 µg/kg HT-2- bzw. T-2-Toxin überprüft.

Es wurden die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen nach DIN 32645 und die mittleren Wiederfindungen ermittelt.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt.

Analyt	Nachweisgrenze [µg /kg]	Bestimmungsgrenze [µg/kg]	Mittlere Wiederfindung [%]
T-2-Toxin	2	5	99
HT-2-Toxin	5	20	109

Tabelle 3: Ermittelte Nachweis- und Bestimmungsgrenzen und Wiederfindungen (manuelle Reinigung)

## Automatisierung der Aufreinigung über Immunoaffinitätssäulen

Die unter Aufarbeitung beschriebenen Schritte der Aufreinigung an Immunoaffinitätssäulen wurden mit dem ASPEC™ XLi der Fa. Gilson International, Bad Camberg durchgeführt. Es handelt sich dabei um ein Probenvorbereitungssystem für die automatisierte Festphasenextraktion. Alle Schritte der Extraktion über Immunoaffinitätssäulen sind mit Hilfe dieses Systems automatisiert möglich: Konditionieren der Säule, Beladen, Waschen und Eluieren. In Abbildung 1 sind mit Hilfe eines Fließdiagramms die Schritte der Extraktion und Aufreinigung bis zur sich anschließenden HPLC-MS/MS schematisch dargestellt, wobei die durch das ASPEC-System durchgeführten Reinigungsschritte durch die Angabe „ASPEC™ XLi“ hervorgehoben sind.

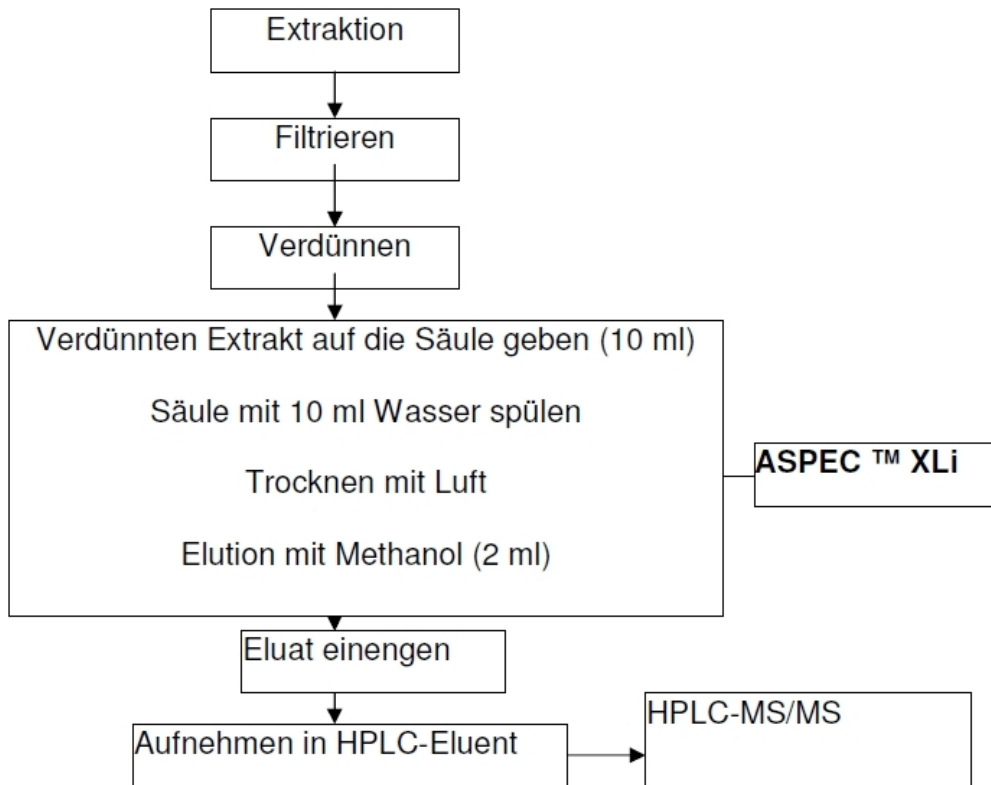


Abbildung 1: Arbeitsschritte

### Ergebnis

Es wurden die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen nach DIN 32645 und die mittleren Wiederfindungen ermittelt. Dazu wurden wie bei der manuellen Methode Dotierungsversuche entsprechend durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt.

Analyt	Nachweisgrenze [µg /kg]	Bestimmungsgrenze [µg/kg]	Mittlere Wiederfindung [%]
T-2-Toxin	1	4	109
HT-2-Toxin	2	6	84

Tabelle 4: Ermittelte Nachweis- und Bestimmungsgrenzen und Wiederfindungen (automatisierte Reinigung mit ASPEC XLi)

### Vergleich manuelle/automatisierte Aufreinigung

Der Vergleich der automatisierten zur manuellen Methode ergab Folgendes:

Die analytischen Ergebnisse beider Methoden zeigen eine sehr gute Vergleichbarkeit. Die Automatisierung bietet eine sehr gute Reproduzierbarkeit, der Probendurchsatz kann gesteigert

werden und es resultiert ein Zeitgewinn, da das Gerät quasi „alleine“ arbeitet und nicht, wie bei der manuellen Aufreinigung, „beobachtet“ werden muss. Die Effizienz des Labors kann erhöht werden. Weiterhin liegen die ermittelten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen bei der automatisierten Methode niedriger als bei der manuellen Methode.

## Literatur

- [1] Stellungnahme des wissenschaftlichen Lebensmittelausschusses zu Fusarientoxinen, Teil 5: T-2- und HT-2-Toxin (vom 30. Mai 2001).  
[http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out88\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out88_en.pdf)
- [2] A. Visconti, V.-M.-T. Lattanzio, M. Pascale, M. Haidukowski: Analysis of T-2 and HT-2 toxins in cereal grains by immunoaffinity clean-up and liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* 1075 (2005) 151-158.
- [3] M. Pascale, M. Haidukowski, A. Visconti: Determination of T-2 toxin in cereal grains by liquid chromatography with fluorescence detection after immunoaffinity column clean-up and derivatization with 1-anthroylnitrile. *J. Chromatogr. A* 989 (2003) 257-264.
- [4] R-Biopharm: Easi-Extract T-2 and HT-2, INSTRUCTIONS FOR USE.
- [5] Verordnung (EG) Nr. 466/2001 der Kommission zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln.
- [6] M. Klötzl, B. Gutsche, U. Lauber, and H.-U. Humpf: Determination of 12 Type A and B Trichothecenes in Cereals by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 8904-8910.
- [7] A. Biancardi, M. Gasparini, C. Dall'Asta, & R. Marchelli: A rapid multiresidual determination of type A and type B trichothecenes in wheat flour by HPLC-ESI-MS. *Food Additives and Contaminants*, March 2005; 22(3): 251-258.
- [8] Biselli et. al.: Analysis of Fusarium Toxins using LC/MS-MS: Application to Various Food and Feed Matrices. *Recent Applications in LC-MS LC-GC Eur.*, 25-31 (2004).
- [9] R. Kostianen: Identification of trichothecenes by thermospray, plasmaspray and dynamic fast-atom bombardment liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 562 (1991) 555-562 Biomedical Applications.
- [10] F. Berthiller, R. Schuhmacher, G. Buttinger, R. Krska: Rapid simultaneous determination of major type A- and B-trichothecenes as well as zearalenone in maize by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1062 (2005) 209-216.
- [11] C. Dall'Asta, S. Sforza, G. Galaverna, A. Dossena, R. Marchelli: Simultaneous detection of type A and B trichothecenes in cereals by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry using NaCl as cationization agent. *J. Chromatogr. A*, 1054 (2004) 389-395.
- [12] C. Dall'Asta, G. Galaverna, A. Biancardi, M. Gasparini, S. Sforza, A. Dossena, R. Marchelli: Simultaneous liquid chromatography-fluorescence analysis of type A and type B trichothecenes as fluorescent derivatives via reaction with coumarin-3-carbonyl chloride. *J. Chromatogr. A*, 1047 (2004) 241-247.
- [13] E. Razzazi-Fazeli, B. Rabus, B. Cecon, J. Böhm: Simultaneous quantification of A-trichothecene mycotoxins in grains using liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 968 (2002) 129-142.