
GC, GC/MS und SIDA in der Mykotoxinanalytik

Wolfgang Brodacz
AGES Kompetenzzentrum
„Cluster Chemie Linz“
Forum Analytik Wien 9. 02. 2010

- **Vitamine** (LM, FM)
- **Biomonitoring** (Gras; Blätter)
- **PAK (polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe)** (LM, FM, Boden etc.)
→ **nationales Referenzlabor (NRL)**
- **Mykotoxine** (LM, FM)
→ **nationales Referenzlabor (NRL)**

Agenda

- **Mykotoxine allgem.**
- **B-Trichothecene → GC/ECD → GC/MSD**
- **Trennungsoptimierung
Computersimulation**
- **A-Trichothecene → GC/MSD**
- **SIDA / SIVA**
- **Isotopenmarkierte interne Standards**
- **EU-Vorgaben / Leistungskriterien**

- **Schimmelpilzgifte**

- sekundäre Stoffwechselprodukte

- akut oder chronisch toxisch für Mensch und Tier
- hautreizend brechreizend immunsuppressiv nekrotisierend östrogen mutagen karzinogen nephrotoxisch

- **Lagerpilze (z.B. *Penicillium*, *Aspergillus*).**

- Aflatoxine, Ochratoxin A, Patulin

- **Feldpilze der Gattung *Fusarium***

- Zearalenon, Fumonisine, **Trichothecene**

Trichothecene



Fusarientoxine Feldpilze

weit verbreitet

Zerealien

bedeutsamste
Mykotoxinklasse
in Österreich

B-Trichothecene

Leitsubstanz

DON

hochtoxische

A-Trichothecene:

T-2 Toxin

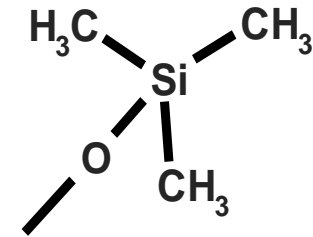
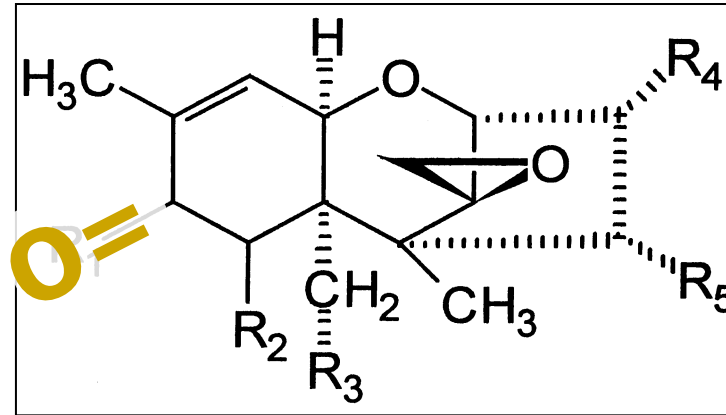
HT-2 Toxin

Struktur der Trichothecene

Silylierung

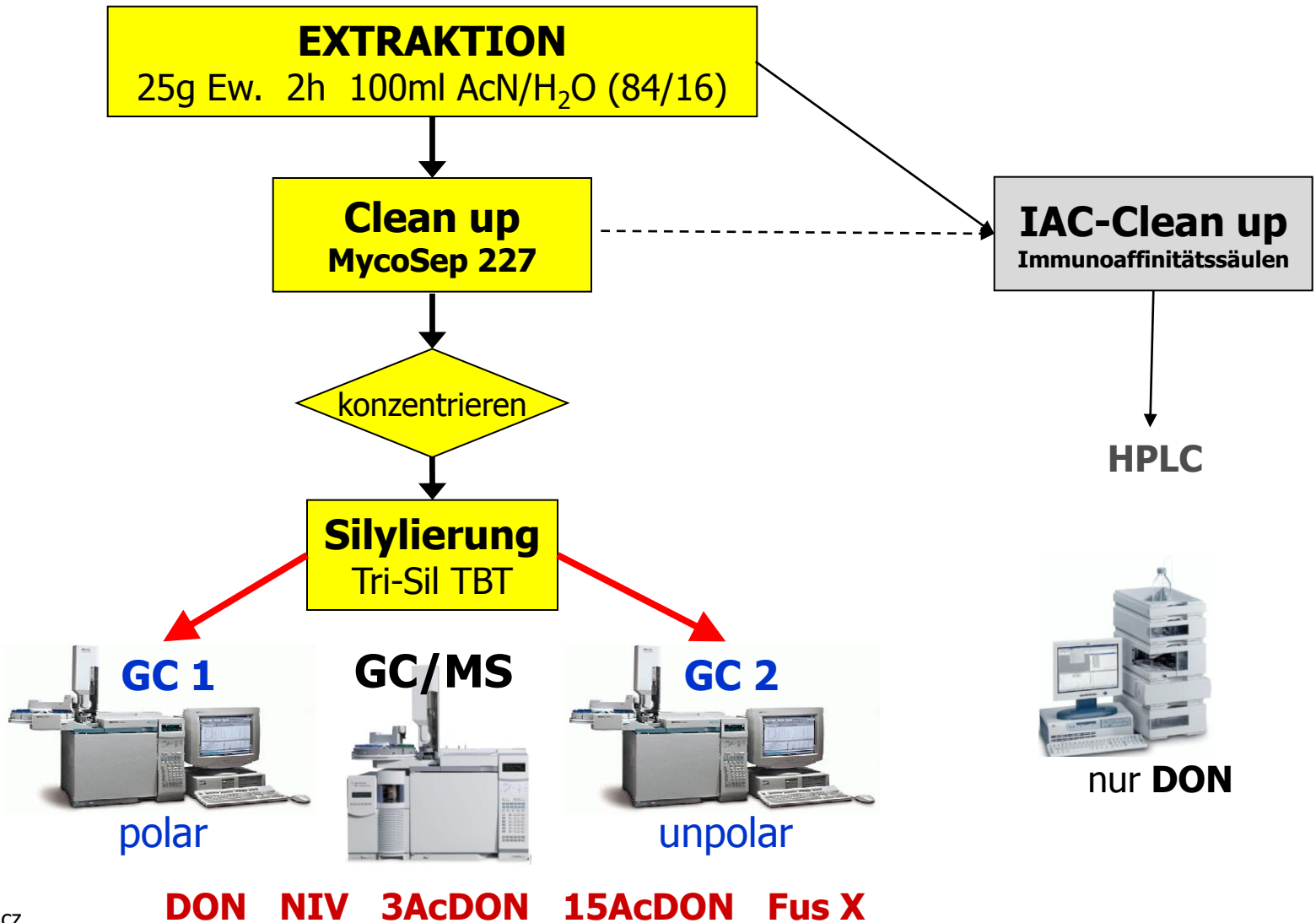
A-Typ:
MSTFA

B-Typ:
Tri-Sil-TBT

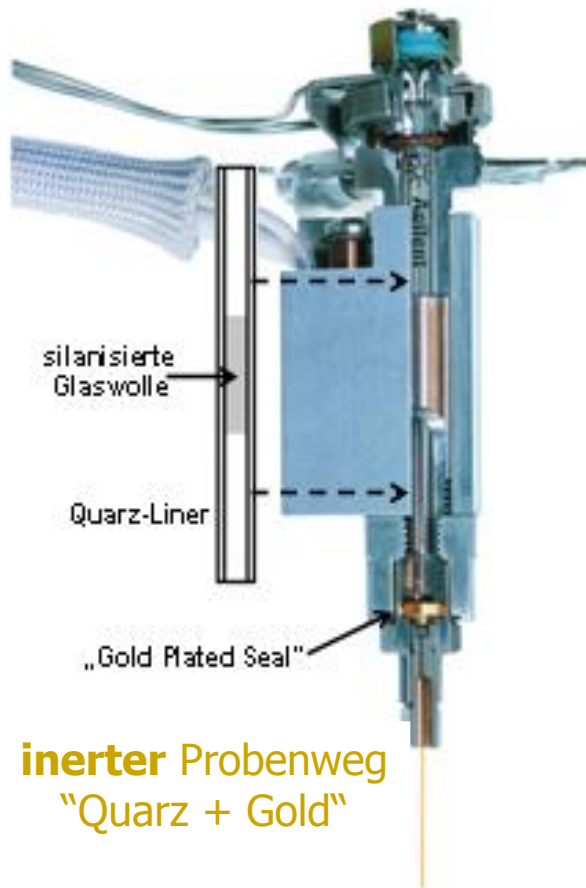


Typ	Substanz	Abkürzung	R1	R2	R3	R4	R5
A	Monoacetoxy-scirpenol	MAS	H	H	O-Acetyl	OH	OH
A	Diacetoxy-scirpenol	DAS	H	H	O-Acetyl	OH	O-Acetyl
A	HT-2 Toxin	HT-2	O-Isovaleroyl	H	O-Acetyl	OH	OH
A	T-2 Toxin	T-2	O-Isovaleroyl	H	O-Acetyl	OH	O-Acetyl
B	Deoxynivalenol	DON	=O	OH	OH	OH	H
B	3-Acetyldeoxynivalenol	3-AcDON	=O	OH	OH	O-Acetyl	H
B	15-Acetyldeoxynivalenol	15-AcDON	=O	OH	O-Acetyl	OH	H
B	Fusarenon X	Fus X	=O	OH	OH	OH	O-Acetyl
B	Nivalenol	NIV	=O	OH	OH	OH	OH

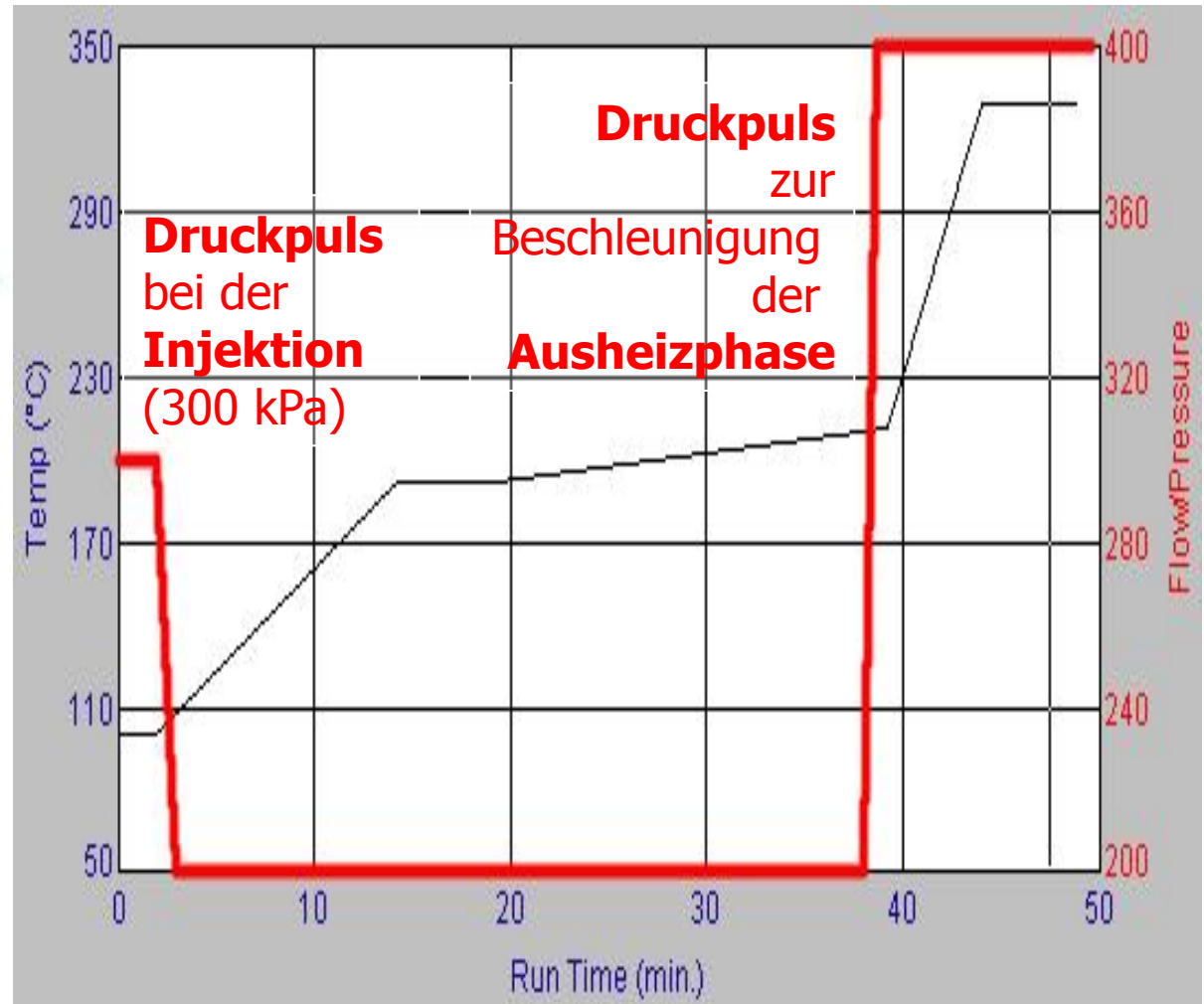
Methodenschema B-Trichothecene



Splitless-Injektion mit Pressure Pulse



inert Probenweg
"Quarz + Gold"



Thermodynamische Retentionsindizes

1. Kalibrierexperiment

Temperaturprogramm - 1

Retentionszeiten - 1

Halbwertsbreiten - 1

**Peak Width
Tuning**

Coating
Efficiency

Säulenparameter :
Länge
Innendurchmesser
Filmdicke

**TRI -
Algorithmus**

$$\ln k' = \frac{\Delta H}{R} * \frac{1}{T} + \ln \frac{\Delta S}{\beta^* R}$$

**Thermodynamische
Retentionsindizes**

2. Kalibrierexperiment

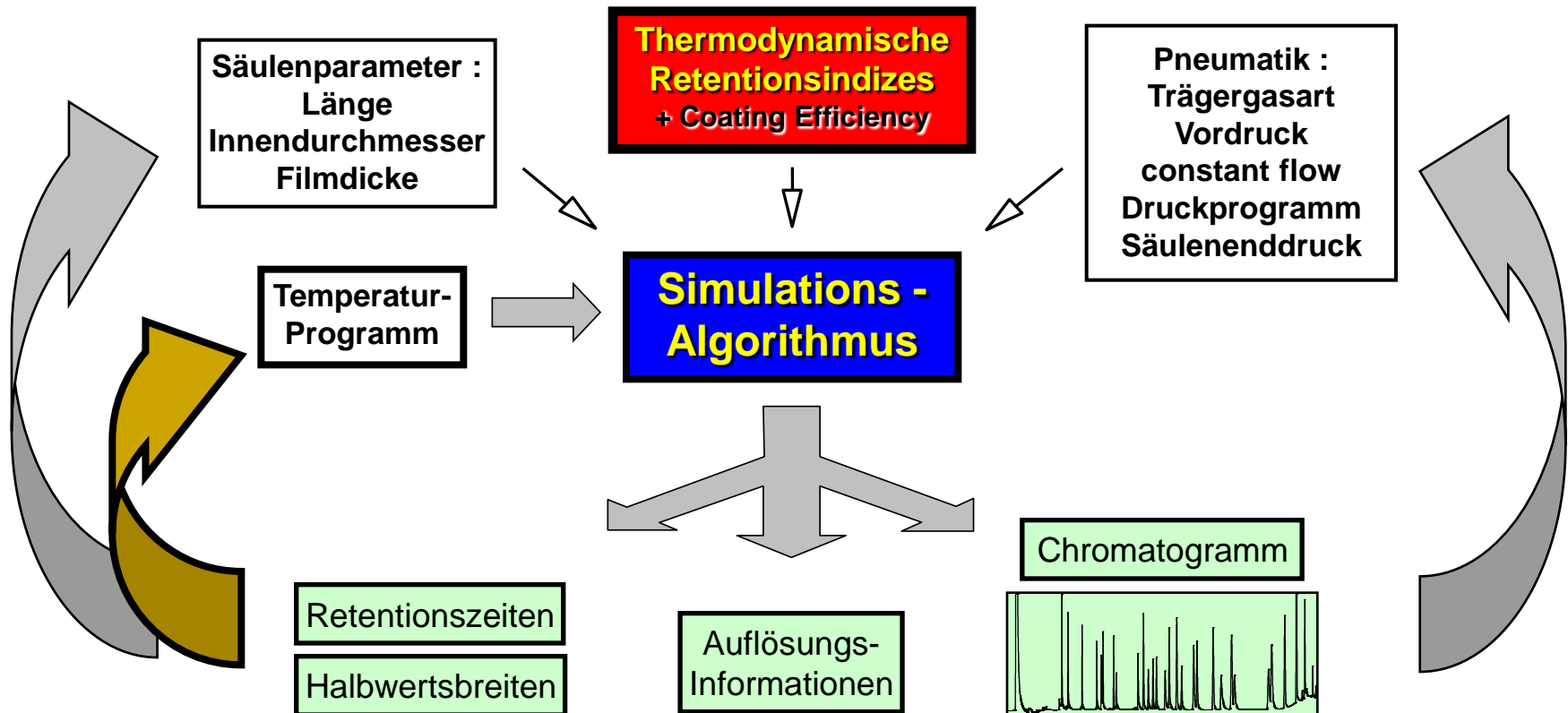
Temperaturprogramm - 2

Retentionszeiten - 2

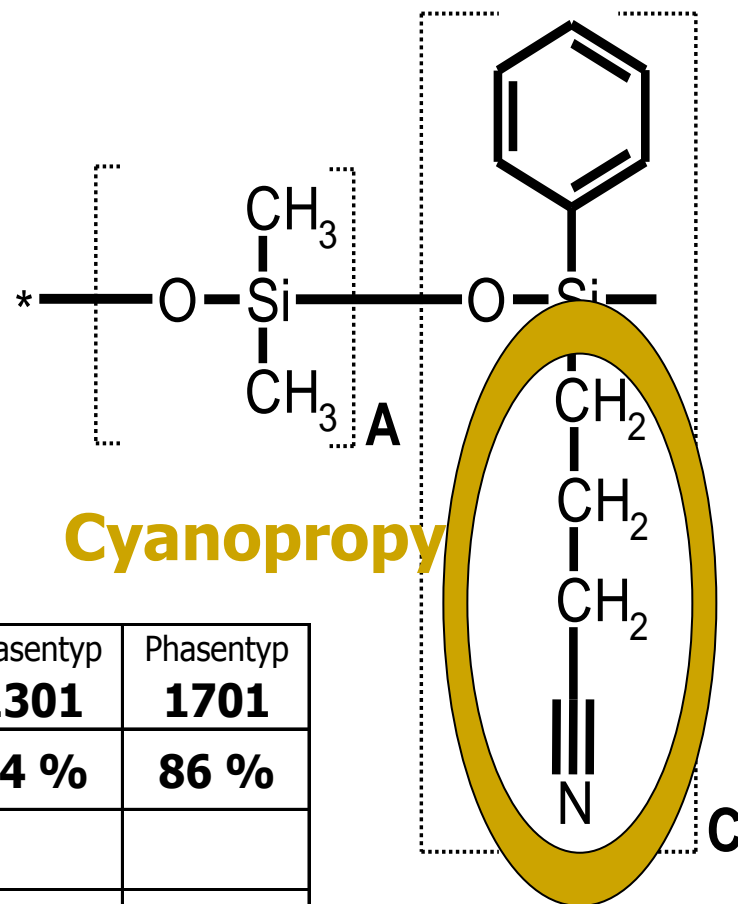
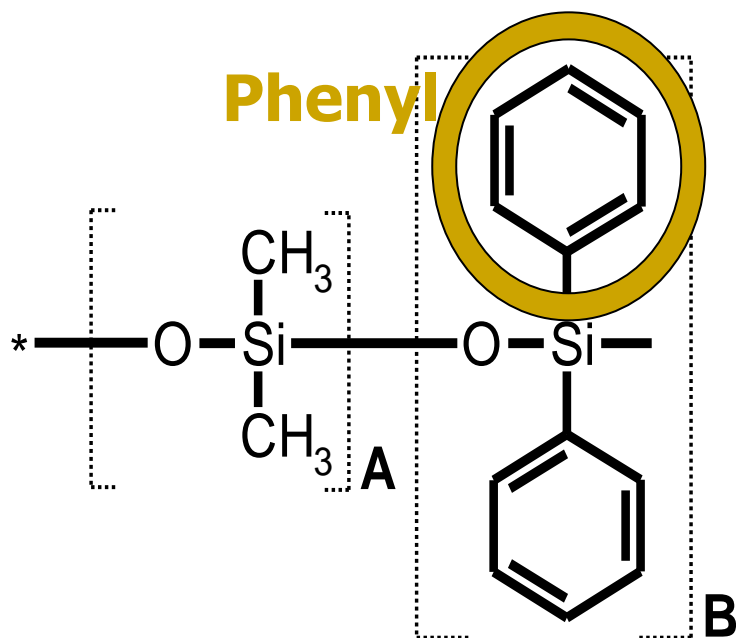
Pneumatik :
Trägergasart
Vordruck
constant flow
Druckprogramm
Säulenenddruck

Totzeitmessung

Computersimulation Trennungsoptimierung

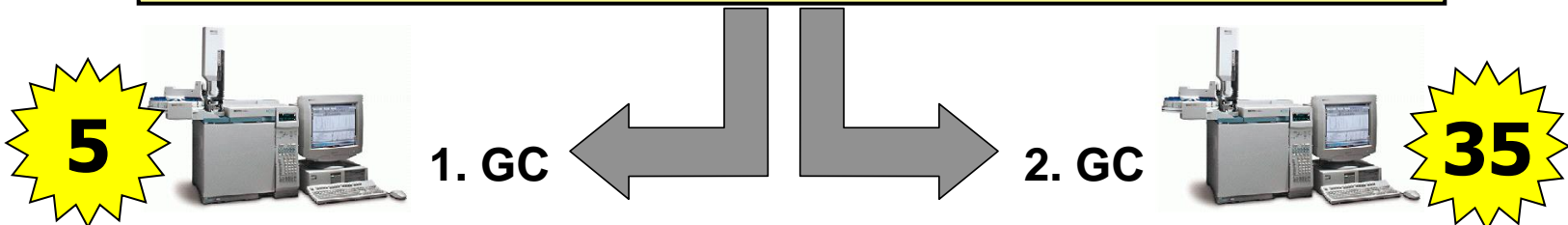
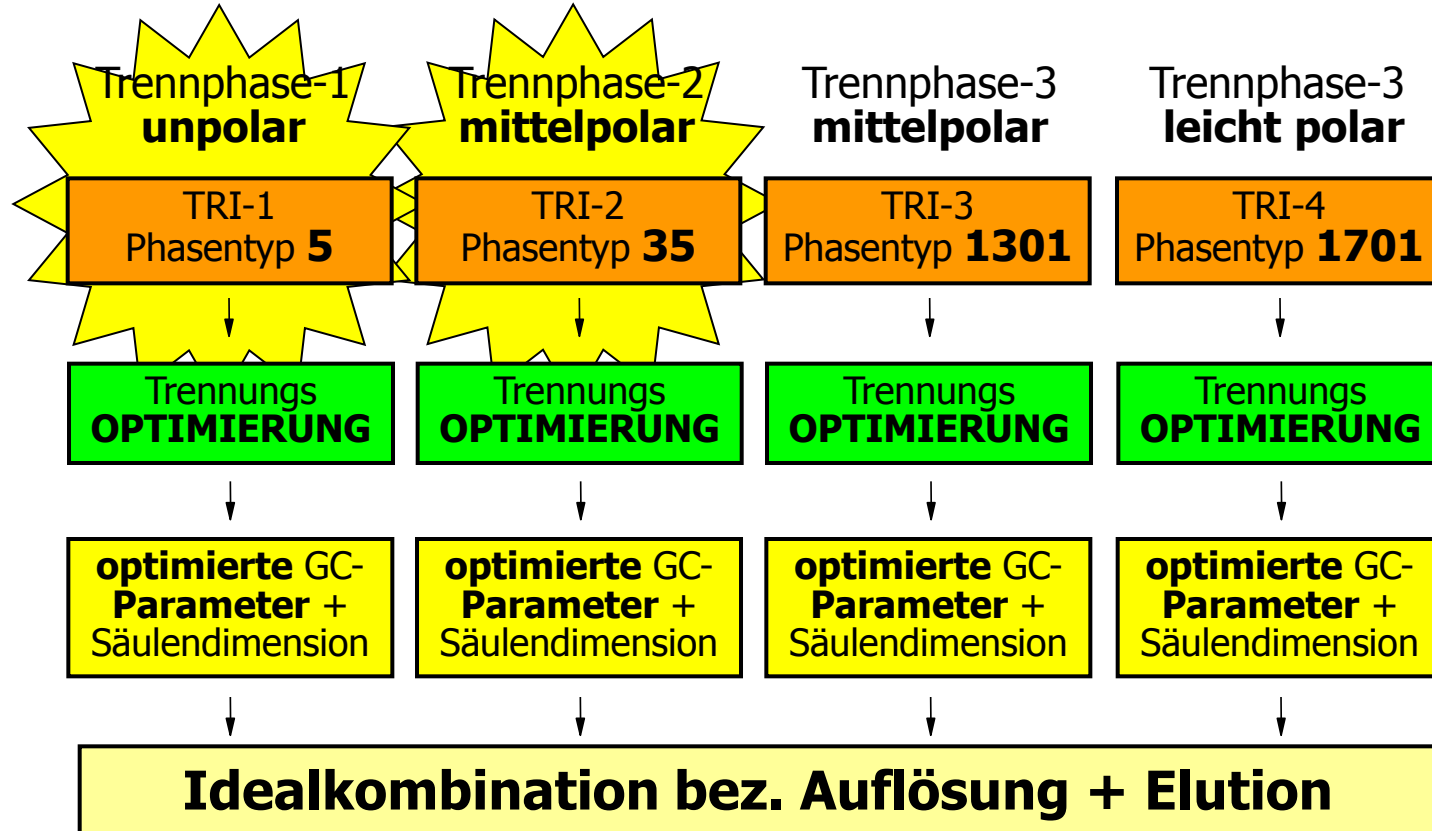


GC-Phasen Übersicht

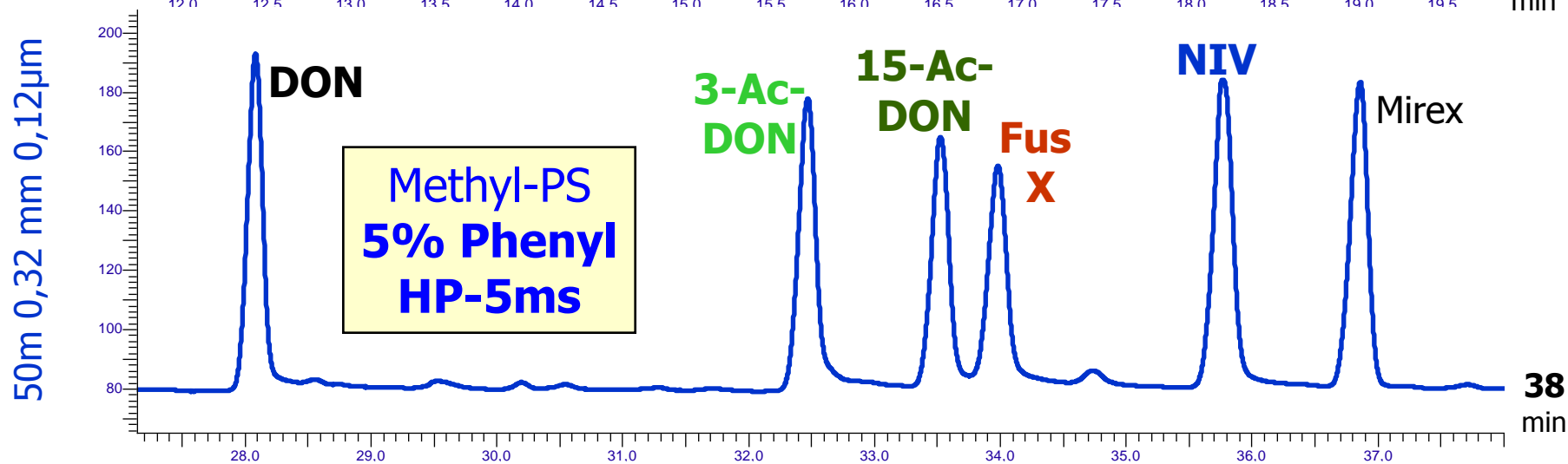
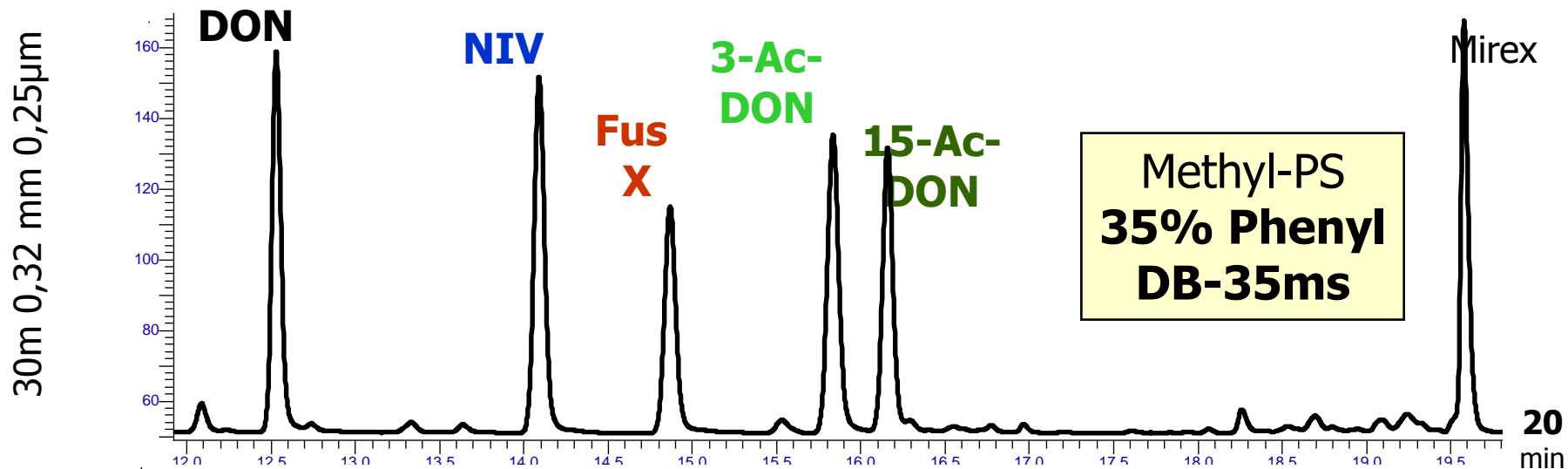


		Phasentyp 5	Phasentyp 35	Phasentyp 1301	Phasentyp 1701
A	Methyl	95 %	65 %	94 %	86 %
B	Phenyl	5 %	35 %		
C	Cyanopropyl- Phenyl			6 %	14 %

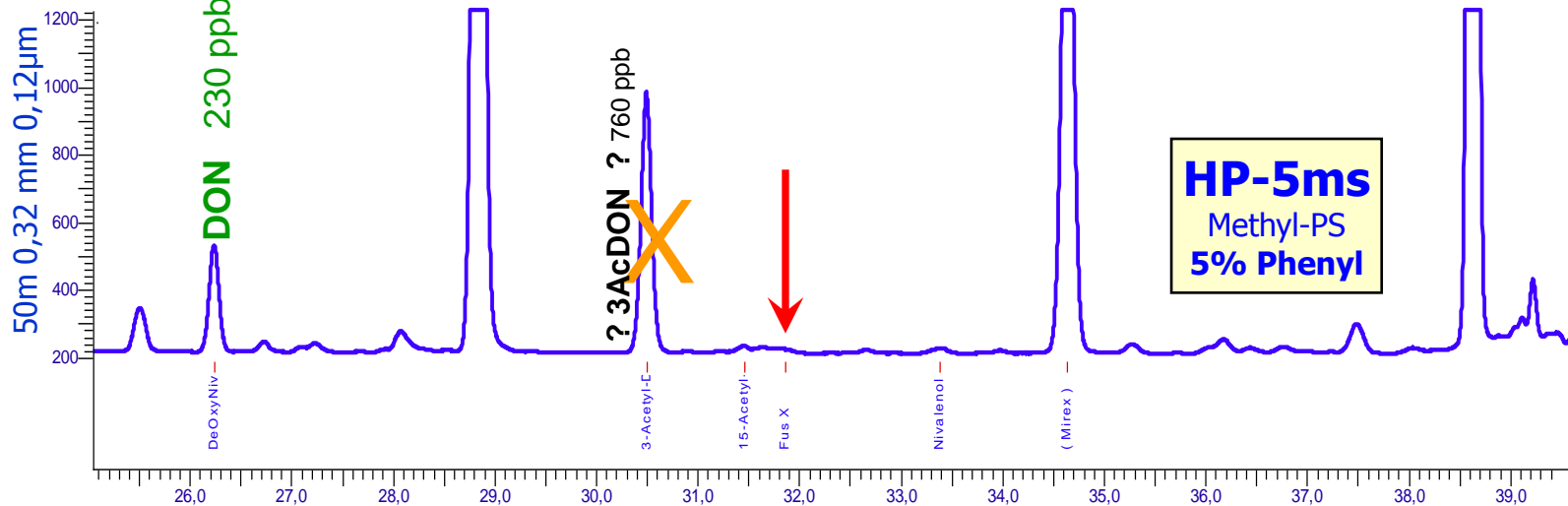
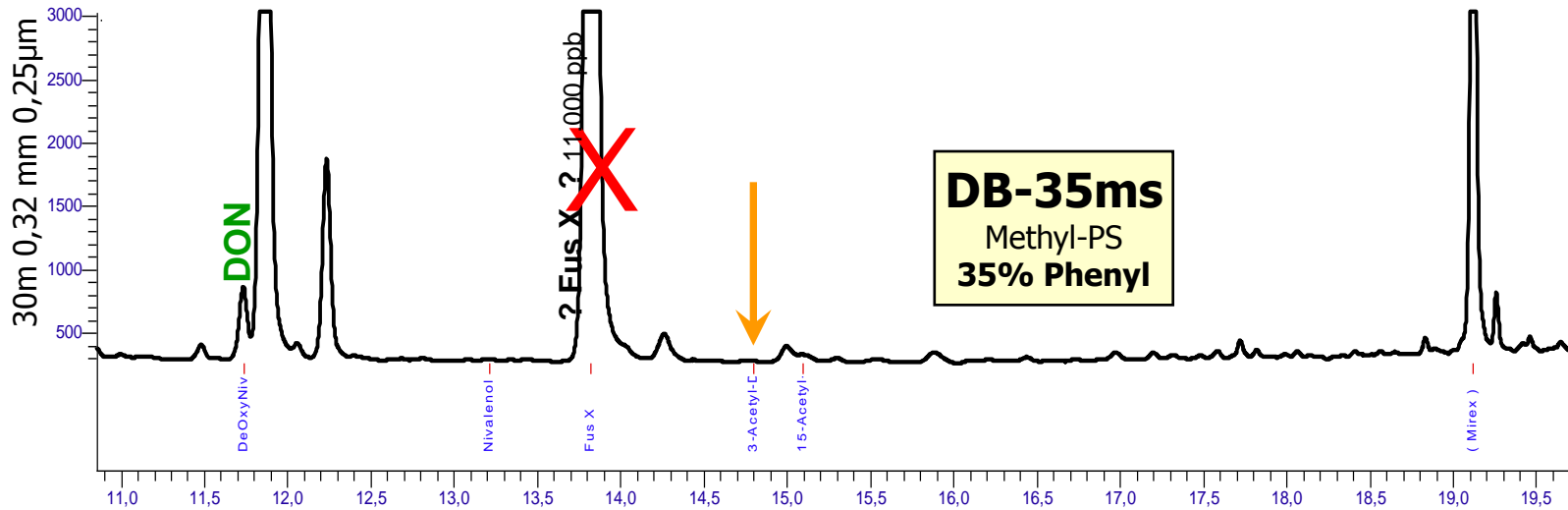
Trennungsoptimierung TRI-Computersimulation



5 B-Trichothecene (als TMS) auf 2 GC-Phasen

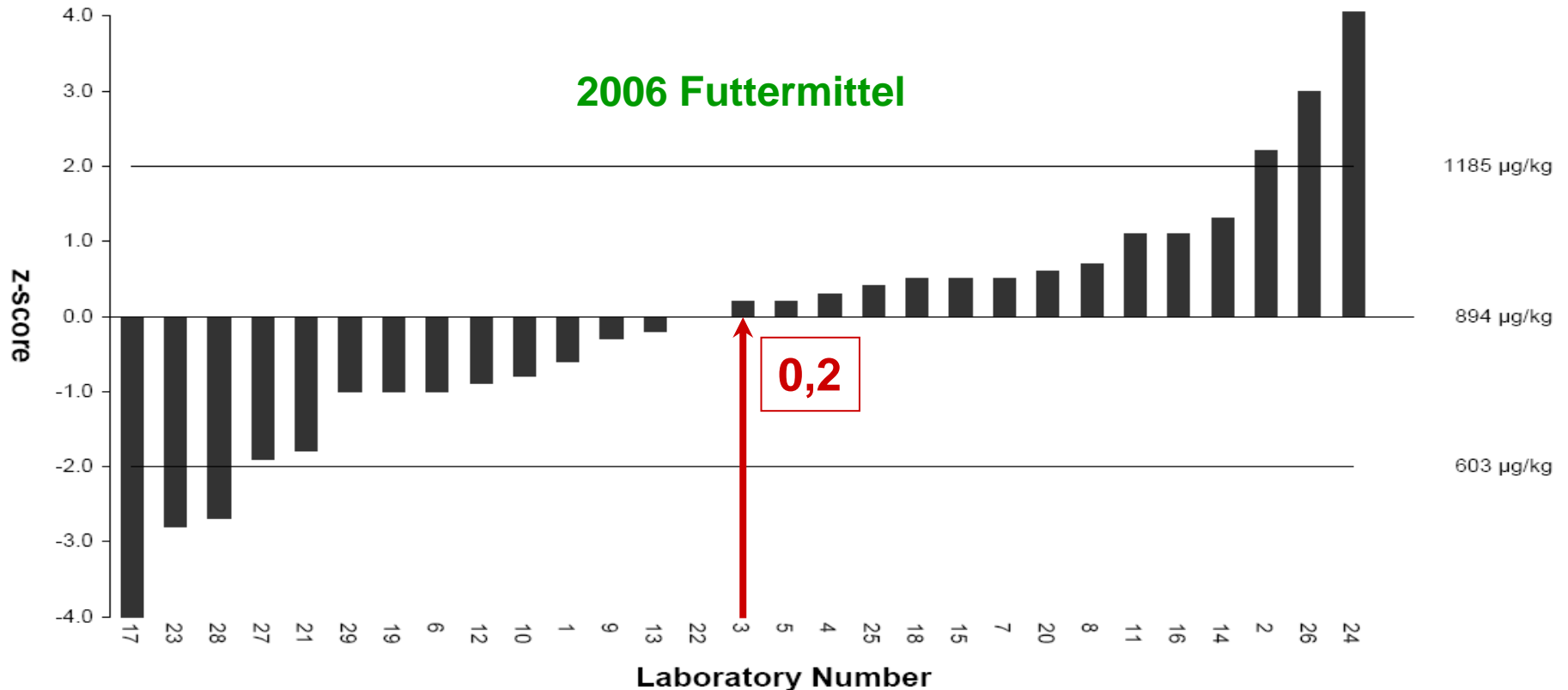


Praxisbeispiel Schweinemast-FM



FAPAS - Proficiency Tests internat. Laborvergleiche

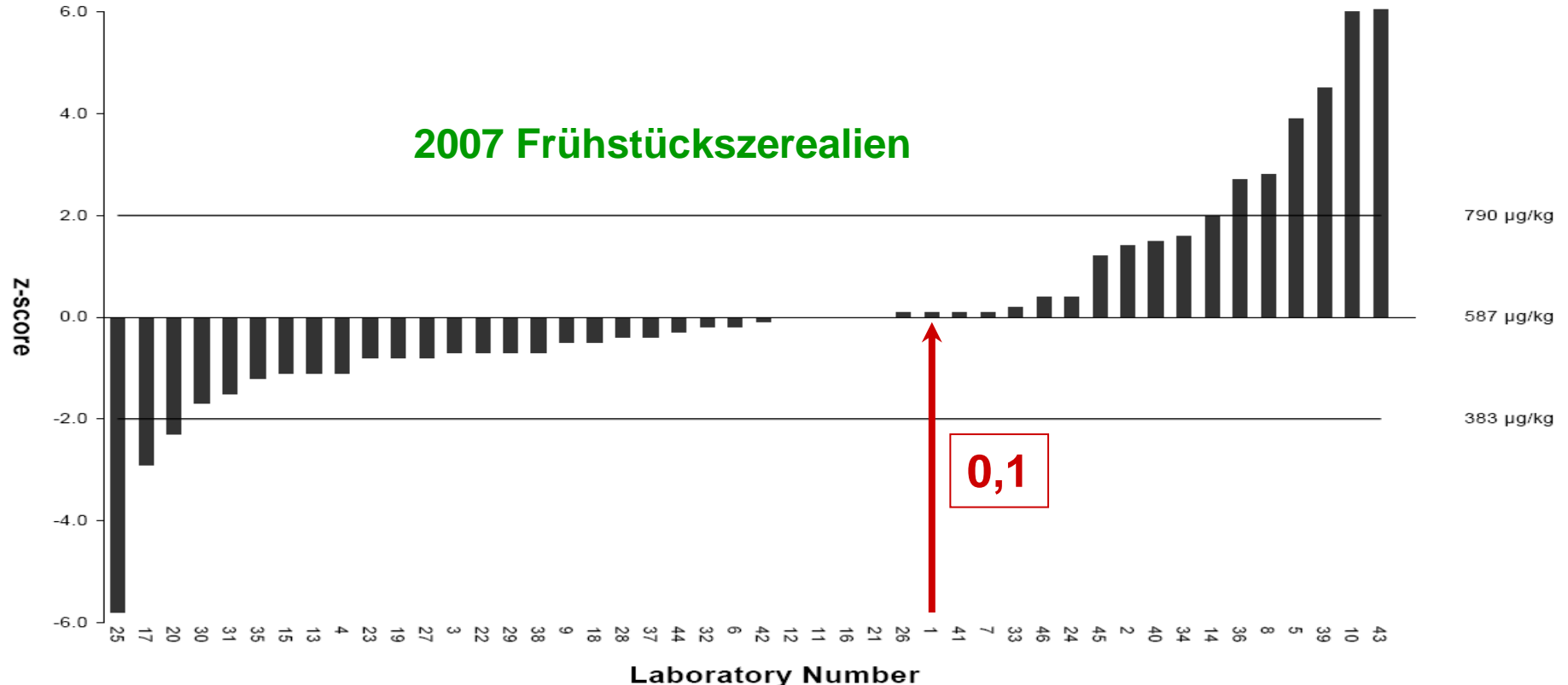
FAPAS® 2230 Deoxynivalenol in Animal Feed Report
CERTIFIED DOCUMENT



Z-SCORE ad DON

FAPAS - Proficiency Tests internat. Laborvergleiche

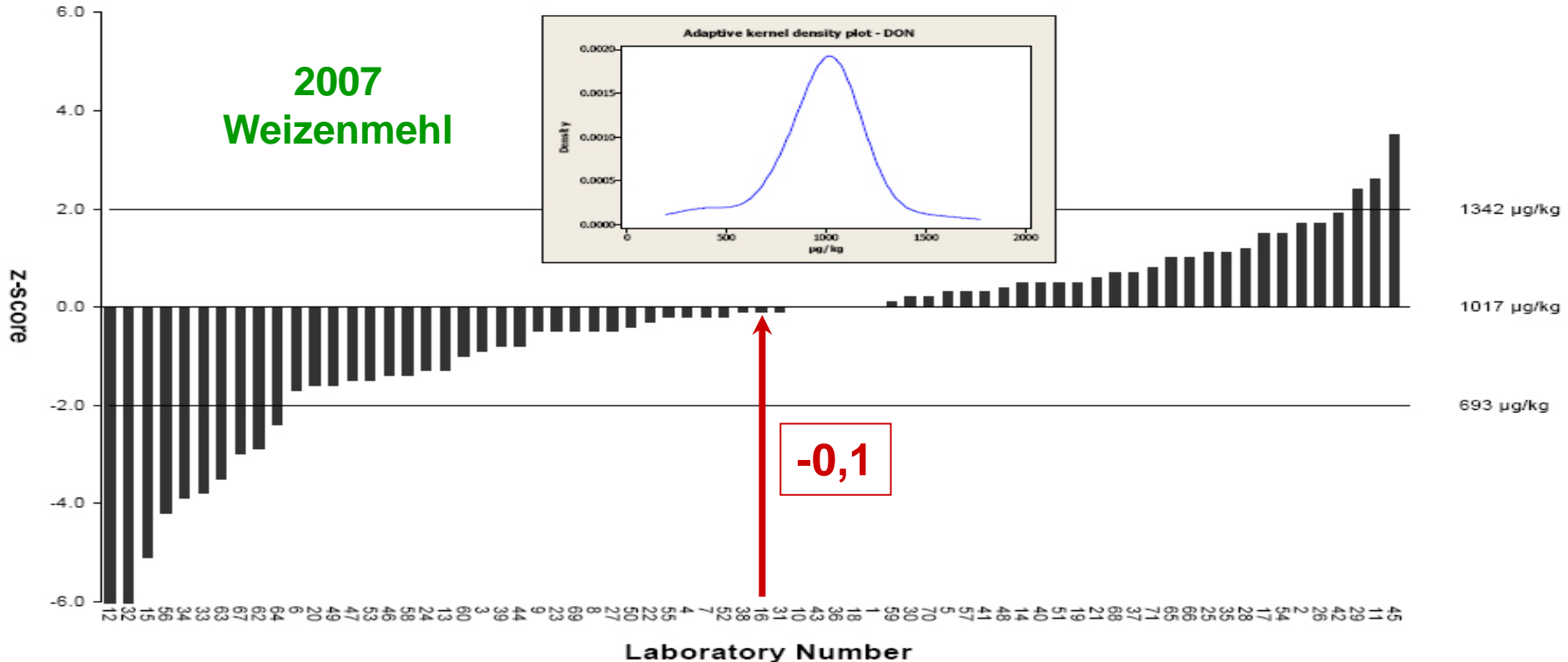
FAPAS® 2235 Deoxynivalenol in Breakfast Cereal Report
CERTIFIED DOCUMENT



Z-SCORE ad DON

FAPAS - Proficiency Tests internat. Laborvergleiche

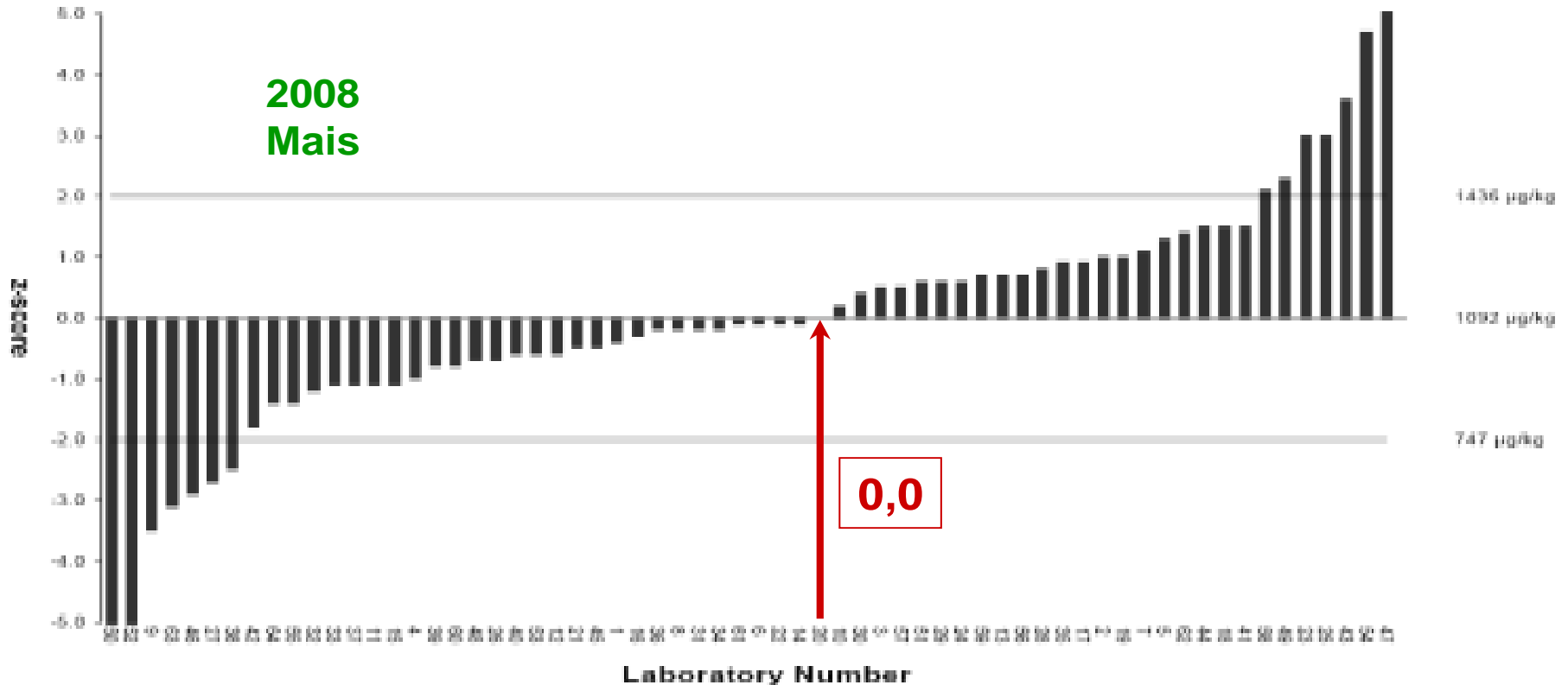
FAPAS® 2238 Deoxynivalenol in Wheat Flour Report
CERTIFIED DOCUMENT



Z-SCORE ad DON

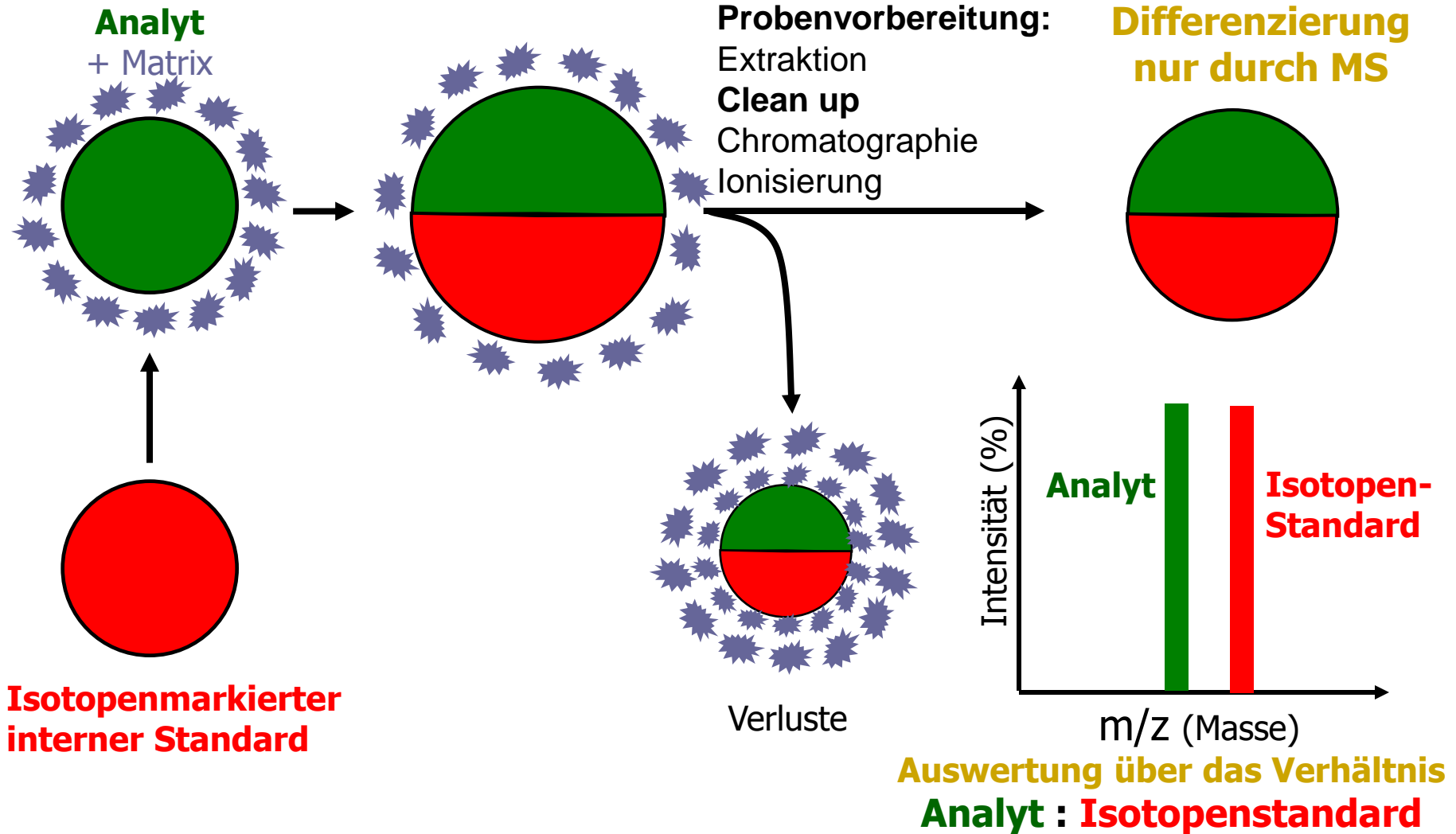
FAPAS - Proficiency Tests internat. Laborvergleiche

FAPAS[®] Deoxynivalenol in Maize Report 2244
CERTIFIED DOCUMENT



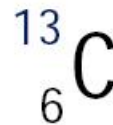
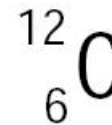
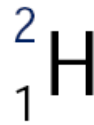
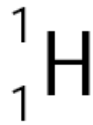
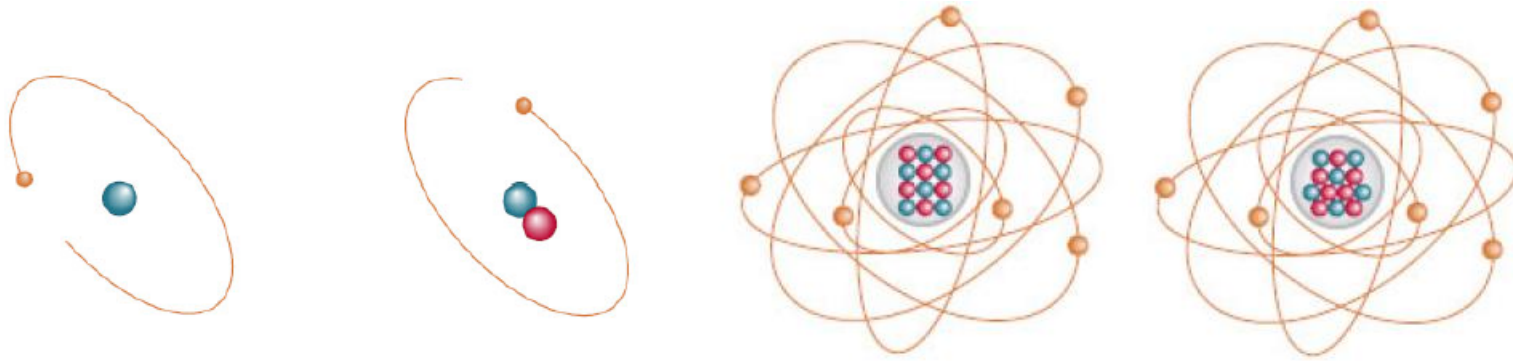
Z-SCORE ad DON

SIVA Stabilisotopen-Verdünnungsanalytik



- Austauschvarianten:
 - **H** durch **D**
 - **¹²C** durch **¹³C**
- vollständige **¹³C**-Markierung bevorzugt
 - stabiler
 - geringerer Isotopeneffekt
 - besser mit MS differenzierbar
- gleiche physikalisch-chemische Eigenschaften
- identes Verhalten bei der Chromatographie

Isotopeneffekt



Vorkommen:	99.99%	→	0.01%	98.9%	→	1.1%
Atommasse:	1.008 u	→	2.014 u	12.000 u	→	13.003 u
Massenunterschied:			100%			8%

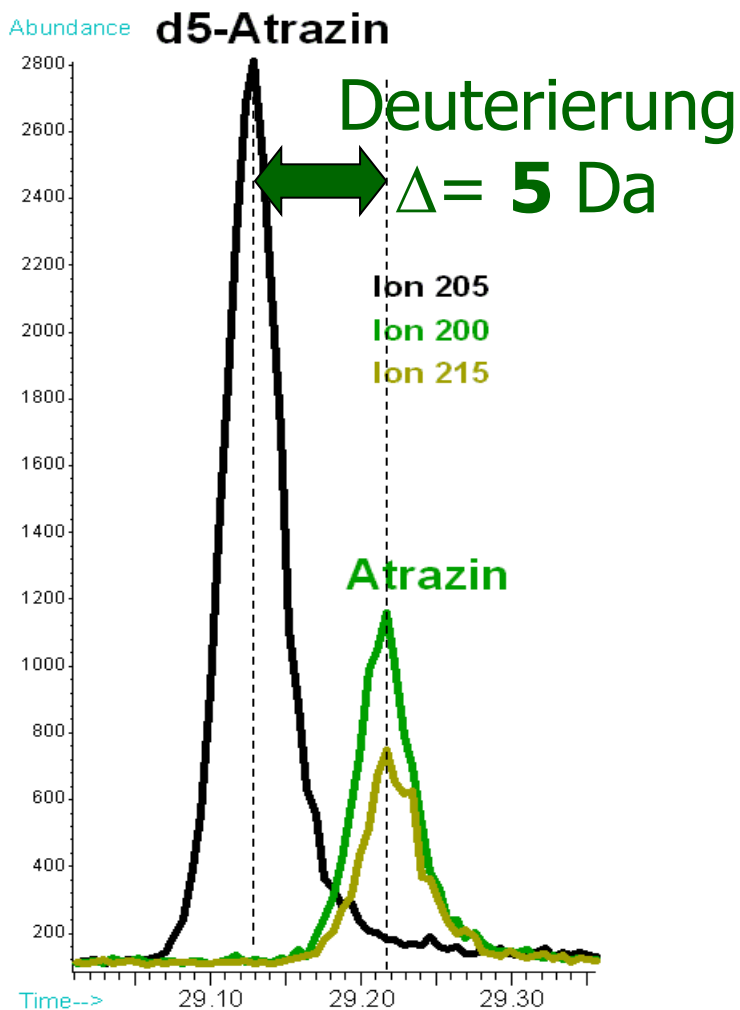
Reduktion
 Reaktionsgeschw.
C ↔ H

mit **D**
6 – 10 fach
 langsamer

¹³C nur um **4 %**
 langsamer

Deuterierung zeigt ausgeprägten Isotopeneffekt

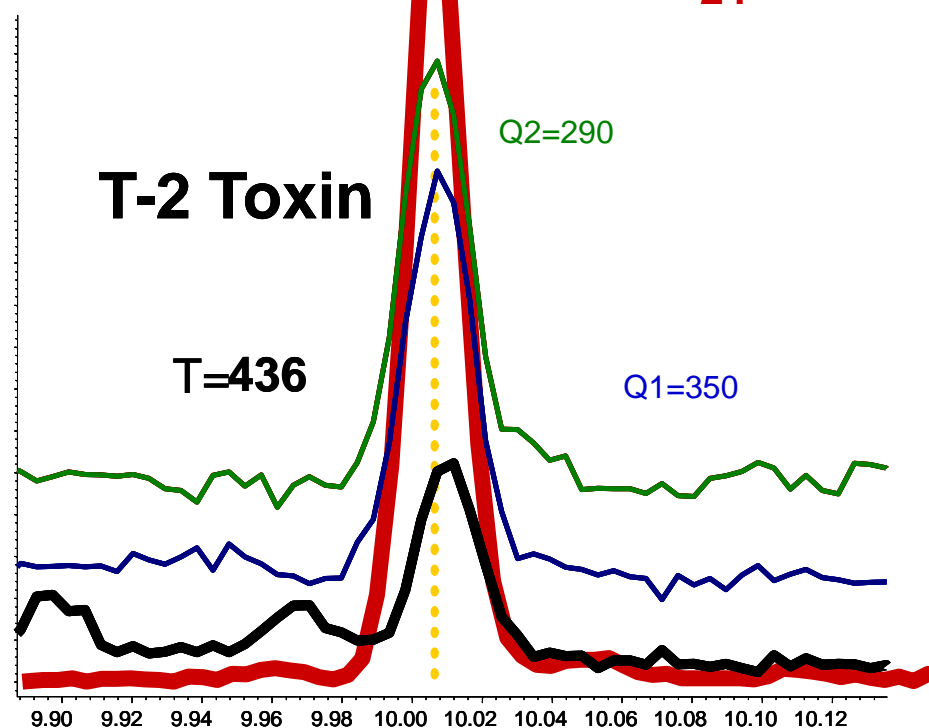
Isotopeneffekt bei Deuterierung



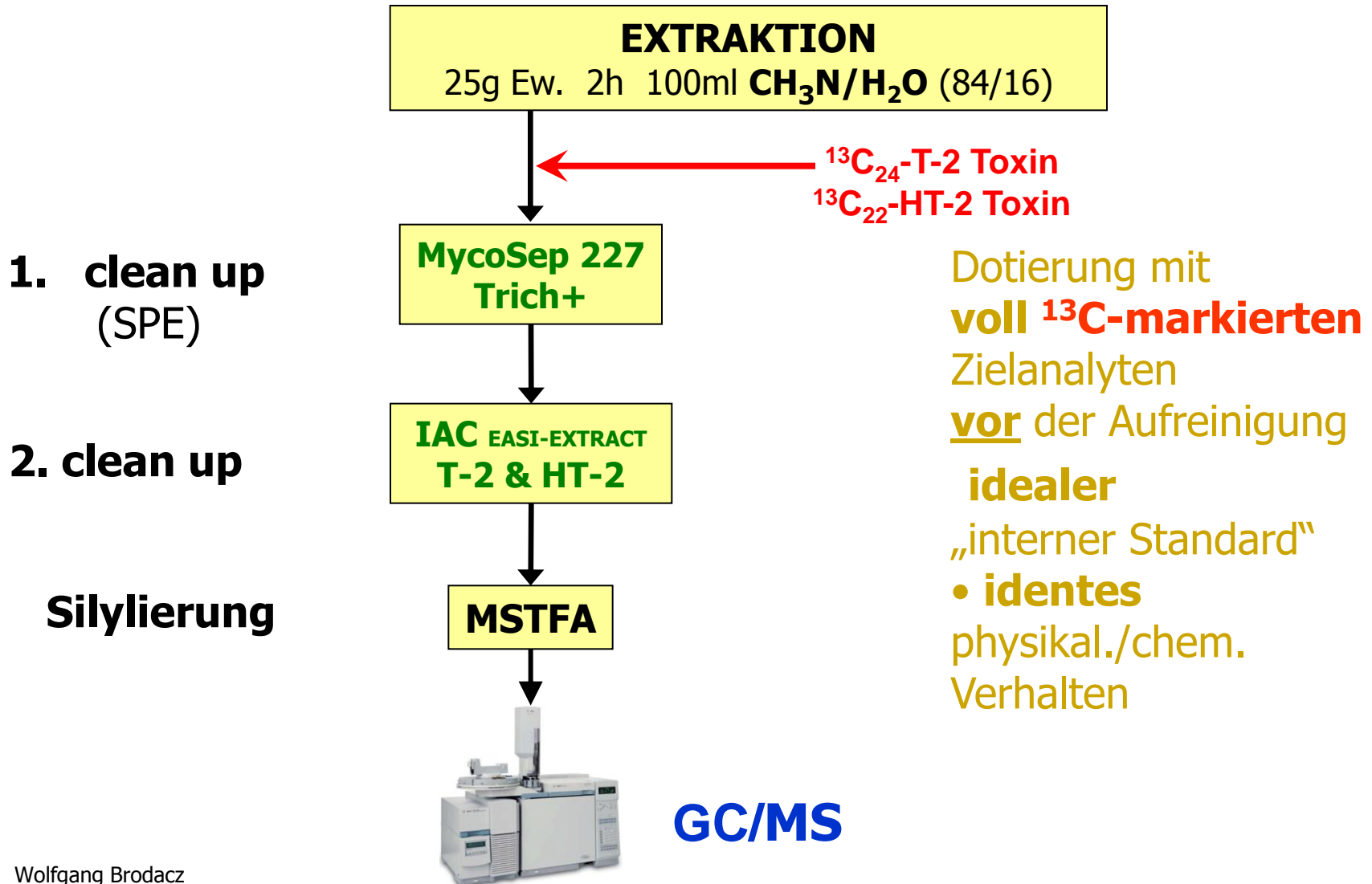
volle ^{13}C -Markierung

$\Delta = 24$ Da

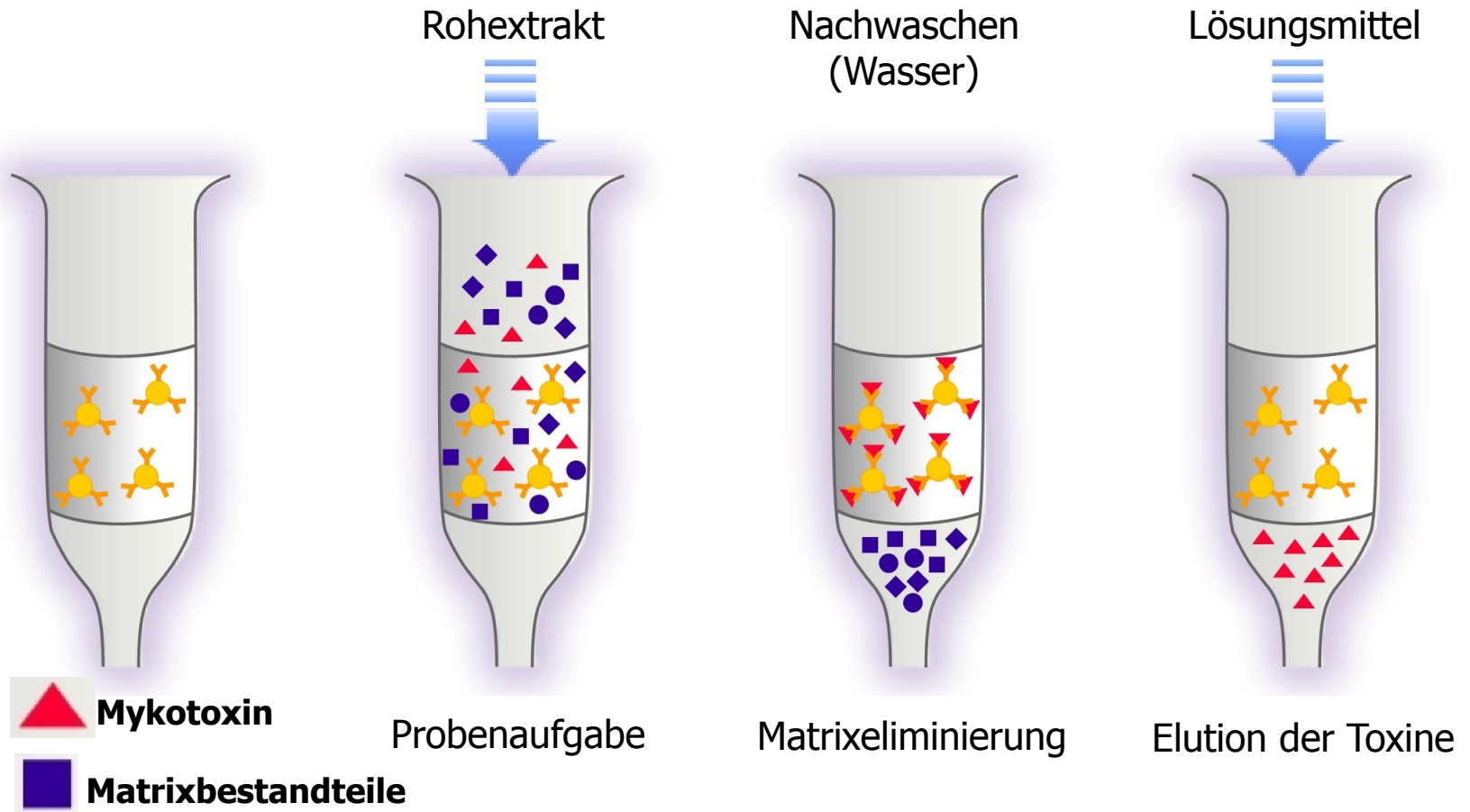
IStd $^{13}\text{C}_{24}$ T-2



A-Trichothecene Isotopenverdünnungs-Methode

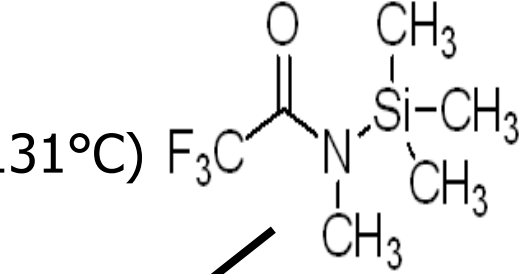
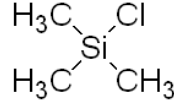
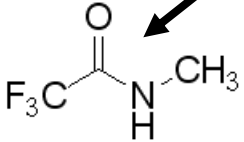


IAC - Clean Up



Silylierung MSTFA schnell & einfach

MSTFA + 1% TMCS

- N-methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamide (Kp=131°C) 
- Trimethylchlorosilane 1% (Kp=57°C) 
 - → N-Methyltrifluoroacetamide (Kp=156°C) 

hohe Flüchtigkeit + gute Reaktivität

- → Doppelfunktion: **Lösungsmittel + Derivatisierungsmittel**

Hydrolyse & Re-Extraktion entfallen !


- zur Trockene (50)- 100µl MSTFA 30min bei RT

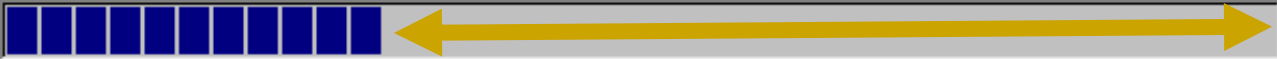
silyliert Probenweg im GC-System


- GC-Phasen ausreichend stabil


Splitless-Injektion mit 5 μl


Solvent Vapor Volume Calculator [X]

Approximate vapor volume (ul): 




Injection Volume (ul): 

Inlet Temp (C): 


Inlet Pressure: 

Pressure Units: KPa psi bar


Solvent Properties



Boiling Pt (C): 131
Denisty (g/cm3): 1.075
Mol Wt. (amu): 199.25



Injection Liner Volume (ul)

 990

Capacity limits (%)
75 100

ausreichend
Reserven
bei

5 μl MSTFA

**300 kPa
Druckpuls**

EU-Richtlinie ad Mykotoxine (Gr. B)

European Commission, Commission Decision **2002/657/EC**
(Durchführung von **Analysemethoden** und die **Auswertung von Ergebnissen**)

- **ECD → zwei Säulen mit unterschiedlicher Polarität**
 - relativer Retentionszeit $\pm 0,5 \%$ Mindest-RT = 2 * Totzeit
- **GC/MS → Full-Scan mit diagnostischen Ionen**
 - Molekül-Ion
 - charakteristische Addukte des $M^{(+)}$
 - charakteristische Fragment-Ionen
 - Isotopen-Ionen
 - > 10 % Abundance
- **SIM-GC/MS → 3 Identifizierungspunkte**

EU-Richtlinie

Identifizierungspunkte IP

European Commission, Commission Decision **2002/657/EC**

- **MS** **1 SIM-Ion** **1 IP** (HR: 2)
- **MSⁿ** **1 Vorläufer-Ion** **1 IP** (HR: 2)
- **MSⁿ** **1 Übergangsprodukt** **1,5 IP** (HR: 2,5)

Rel. Intens. (% des Basisp.)	EI-GC-MS	CI-GC-MS, GC-MS ⁿ LC-MS, LC-MS ⁿ
50 %	± 10 %	± 20 %
> 20 %-50 %	± 15 %	± 25 %
> 10 %-20 %	± 20 %	± 30 %
≤ 10 %	± 50 %	± 50 %

Verfahren Identifizierungspunkte IP

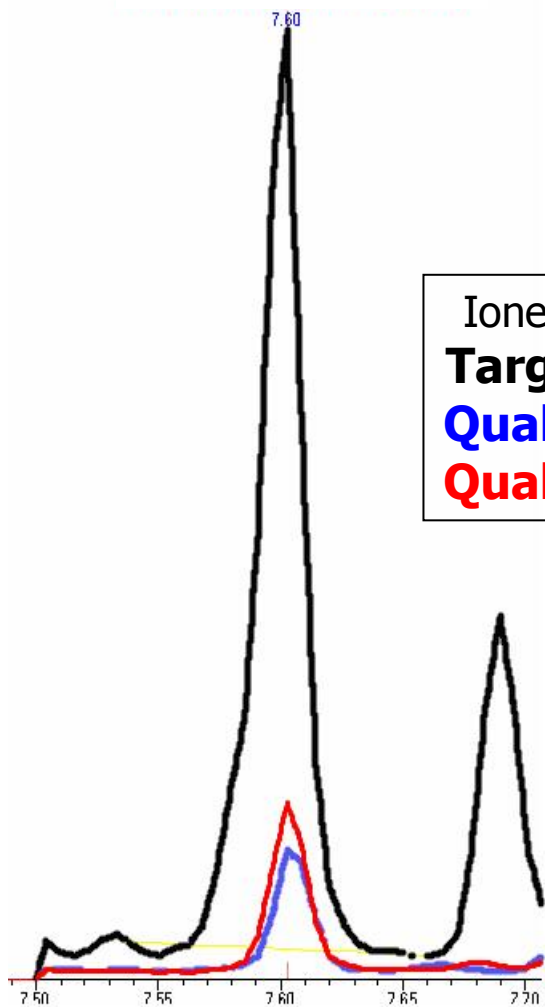
European Commission, Commission Decision **2002/657/EC**

- **GC-MS** **3 SIM-Ionen** **→ 3 IP**
- **LC-MS-MS** **1 VL → 2 Töchter** **→ 4 IP**
- **LC-MS-MS** **2 VL → je 1 Tochter** **→ 5 IP**
- **GC-MS** **2 EI-SIM + 2 CI-SIM** **→ 4 IP**
- **GC-MS**
 +LC-MS **2 GC-SIM + 2 LC-SIM** **→ 4 IP**

Selected Ion Monitoring 3 diagnost. Ionen („IP“)

Mais-Matrix

Standard 100 ppb



- **Identifizierungs-
Erfordernisse:**
- **exakte
RT-
Übereinstimmung
mit Standard**
- **alle SIM-Ionen
zentriert
vorhanden**
- **übereinstimmende
Ionenverhältnisse
mit Standard**

EU-Kriterien vs AGES

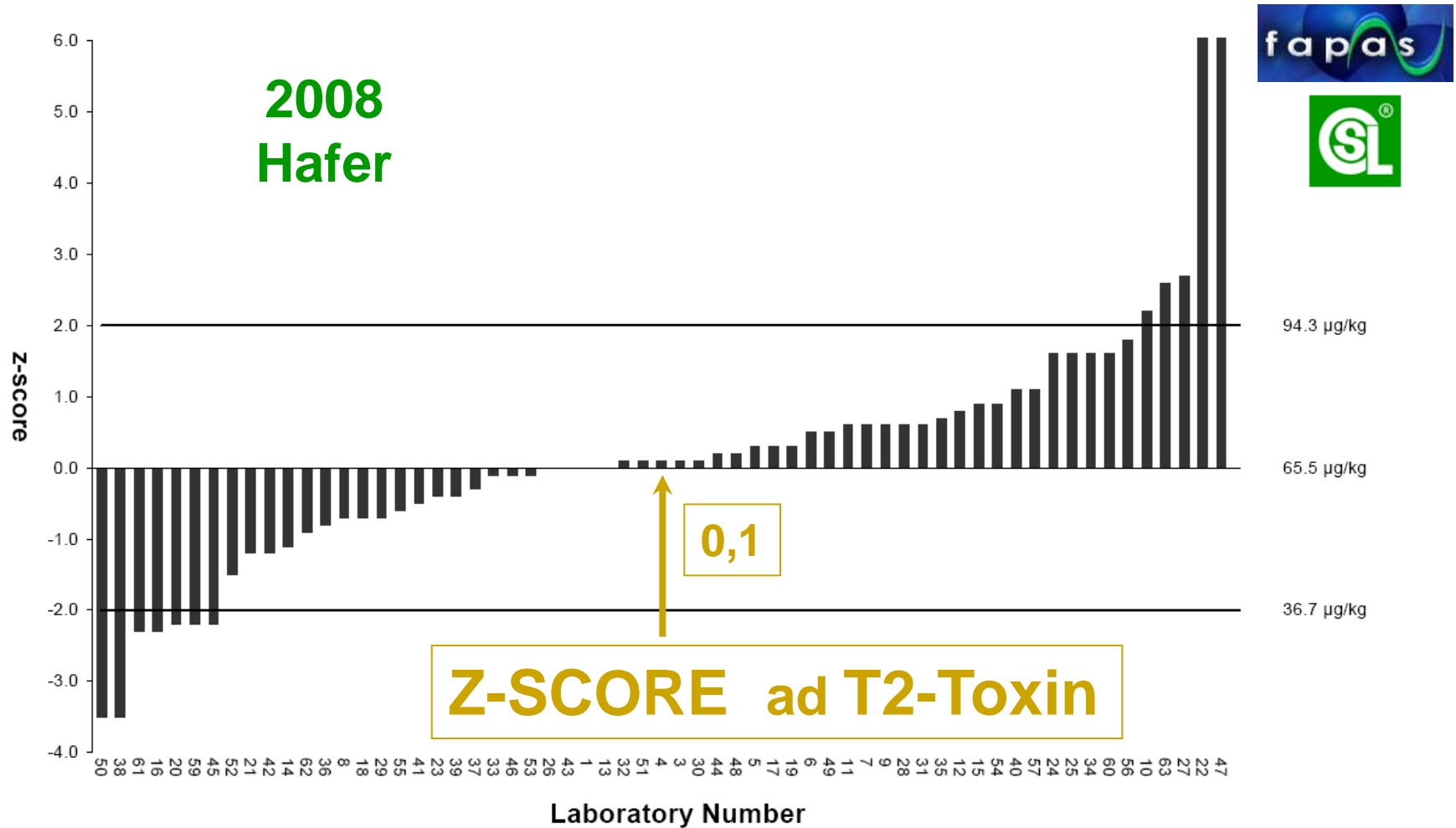
Konzentrationsbereich $\mu\text{g}/\text{kg}$	T-2 Toxin	
	RSD r (%)	Wiederfindg. (%)
50 - \leq 250 > 250	\leq 40 \leq 30	60-130 60-130
AGES CC CLUSTER 4 Matrices n=35	7,5	99

EU-Kriterien vs AGES

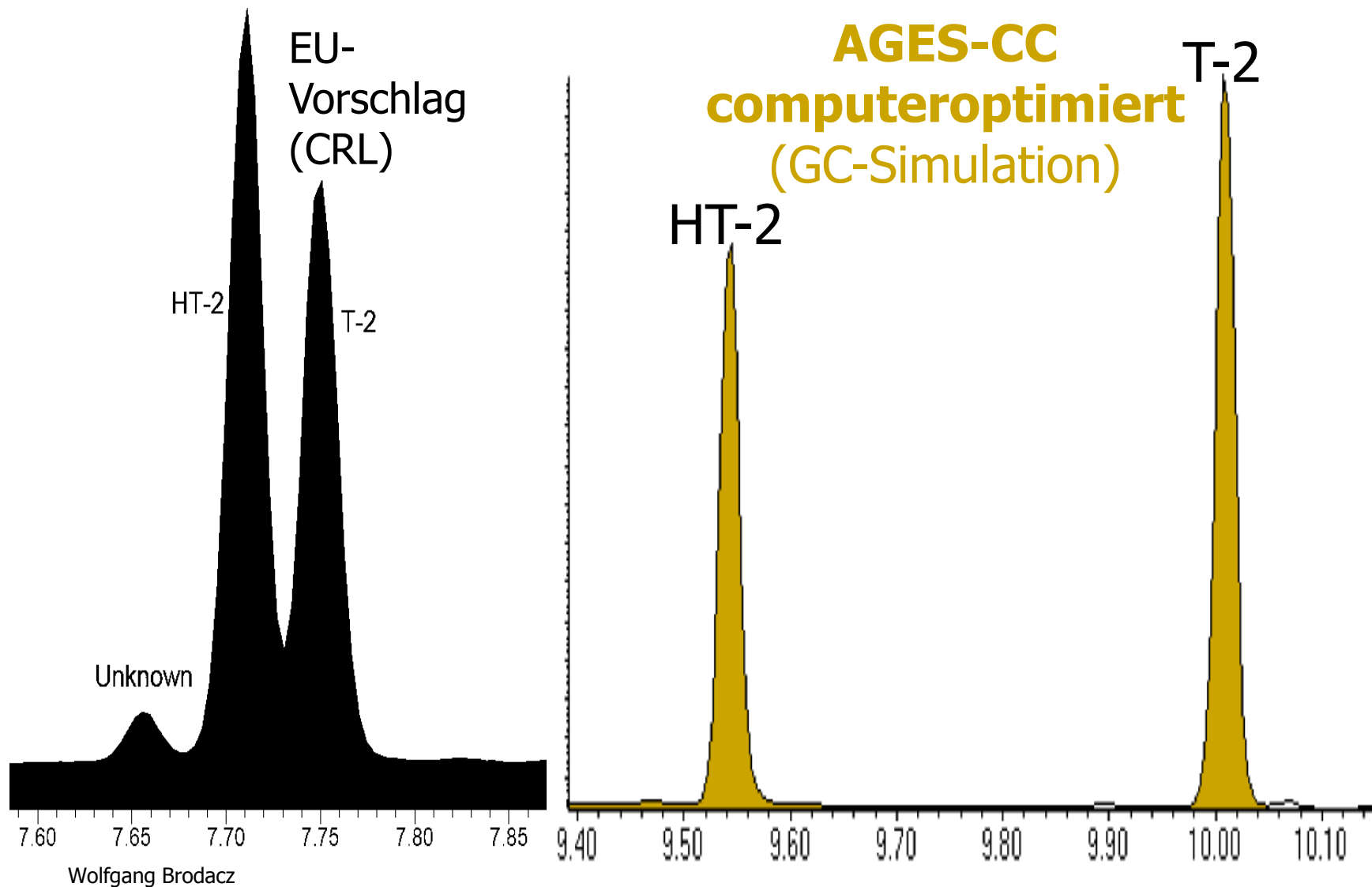
Konzentrationsbereich $\mu\text{g}/\text{kg}$	HT-2 Toxin	
	RSD r (%)	Wiederfindg. (%)
100 - \leq 200 > 200	\leq 40 \leq 30	60-130 60-130
AGES CC CLUSTER 4 Matrices n=35	7,7	92

FAPAS - Proficiency Test internat. Laborvergleich

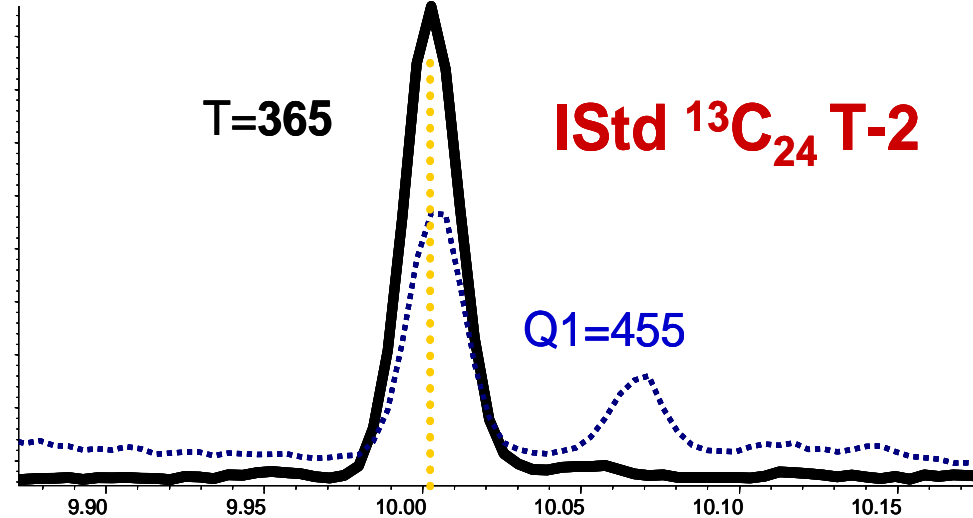
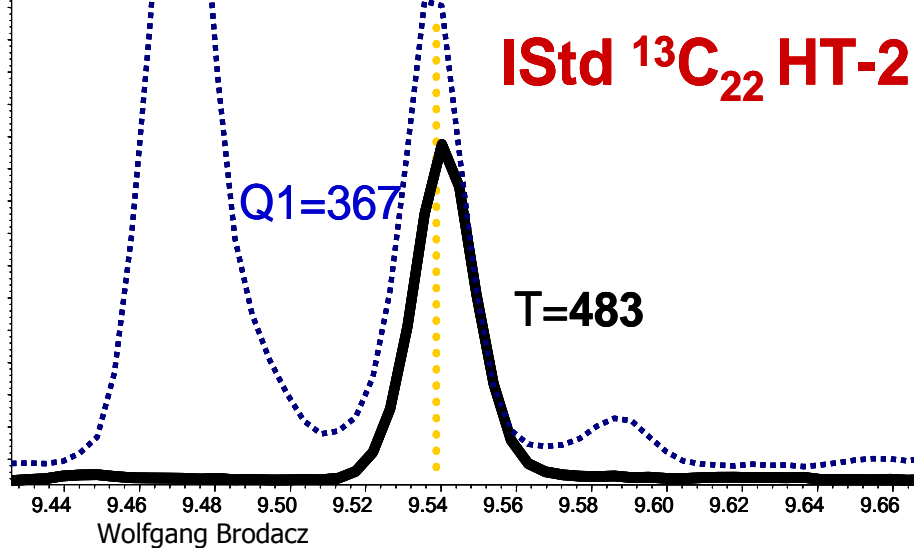
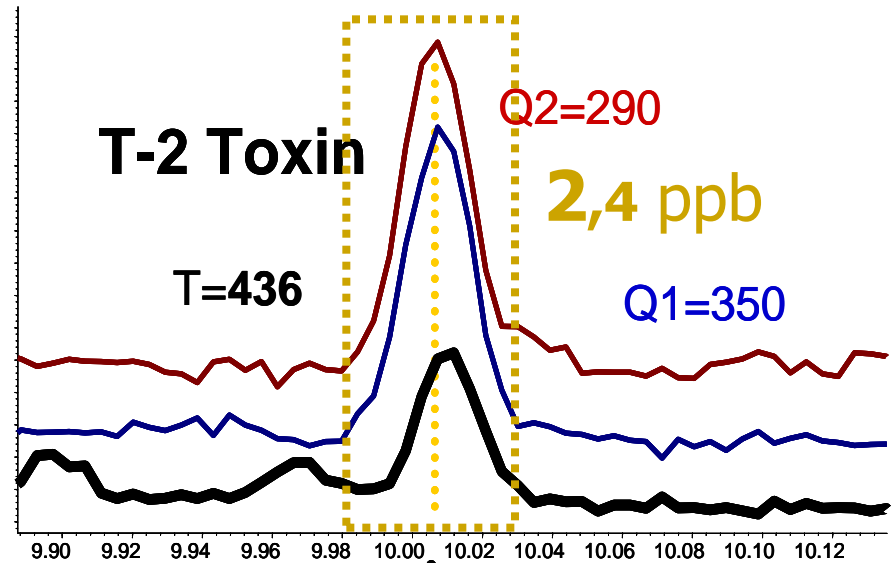
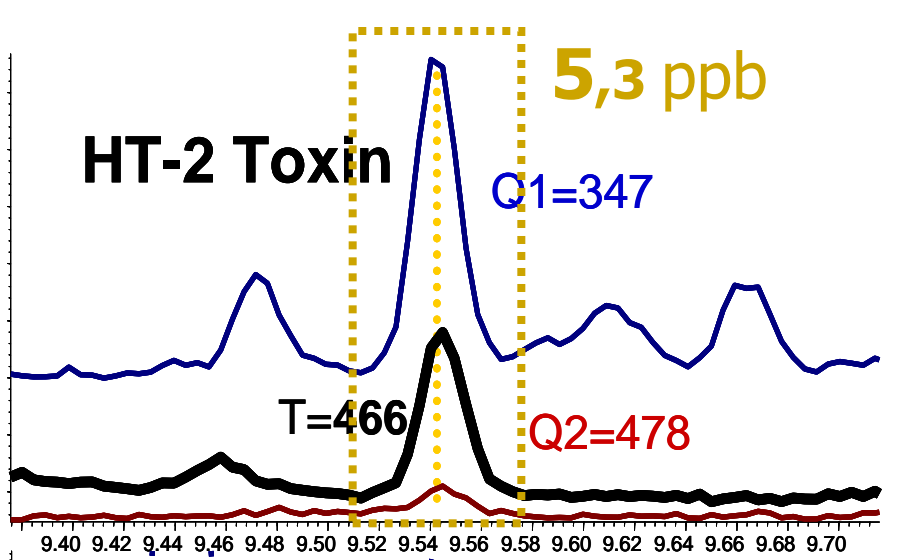
FAPAS® T-2 & HT-2 Toxins in Oats Report 2243
CERTIFIED DOCUMENT



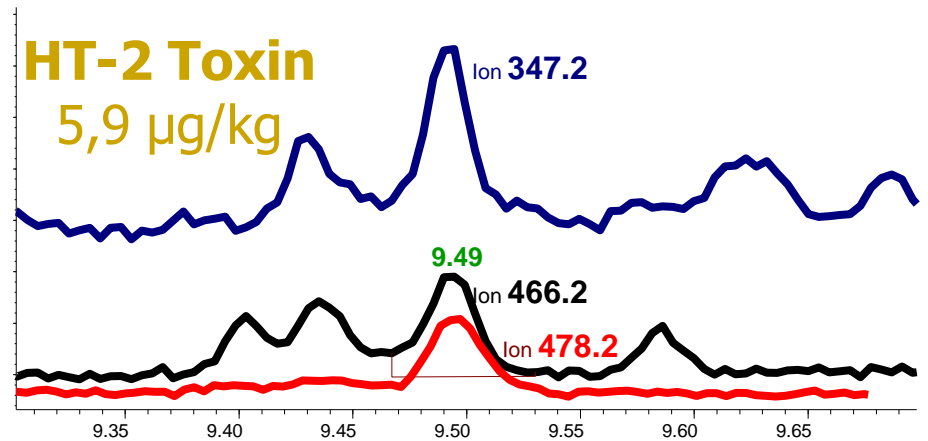
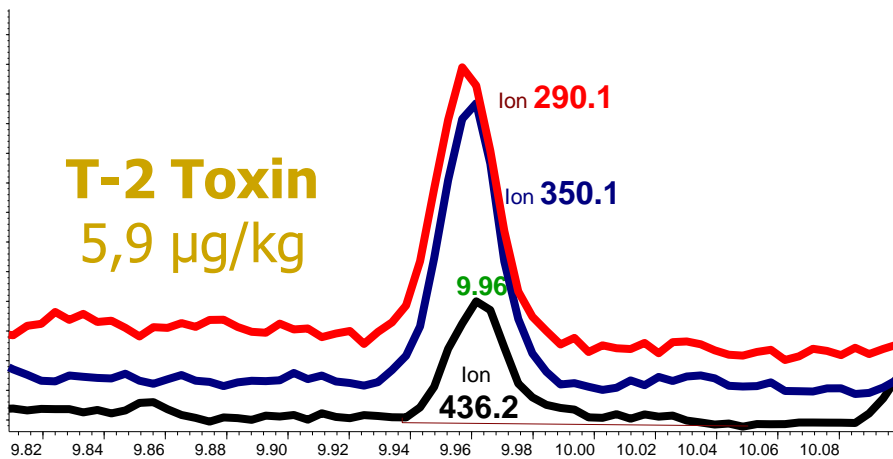
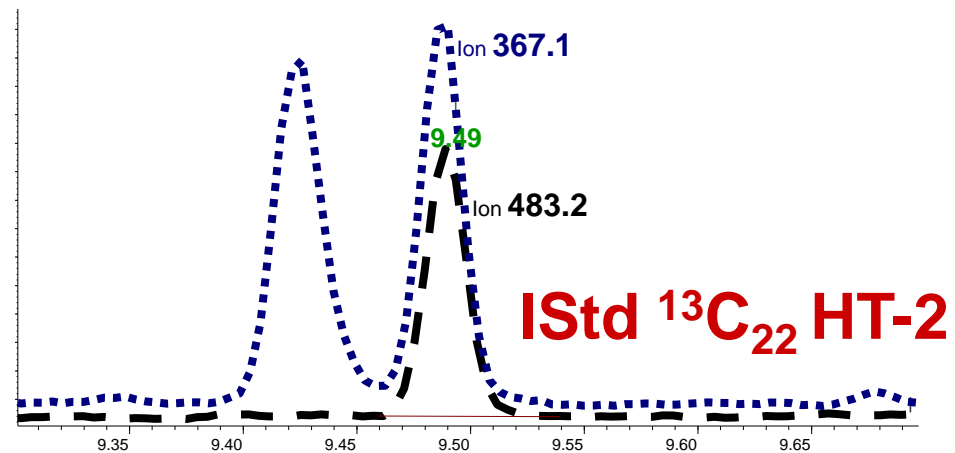
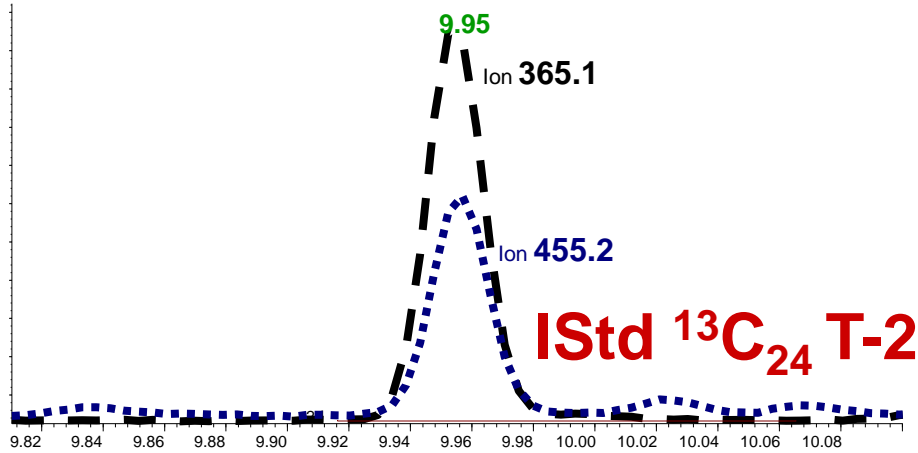
Auftrennung hochtoxische A-Trichothecene



Sensitivität (Gerste)



Weizenbier dunkel



- **GC** nur in „**Premium-Qualität**“
 - optimierte Zwei-Säulen-Verifizierung
 - selektive Detektoren
- **GC/MS**
 - ≥ 3 diagnostische Ionen (SIM)
 - Komplettspektren (scan bzw. SIM/scan)
- **Isotopenverdünnungs-GC/MS**
 - voll ^{13}C -markierte Toxine
 - ideale IStd (optim. Verlustkomp.)
 - Königsklasse der MS-Quantifizierung
- **Trend: Multitoxinanalytik LC-MS/MS**

▶ [Gesundheit](#)

▼ [Ernährungssicherheit](#)

▶ [Flüssige Lebensmittel](#)

▶ [Thema: Ernährung](#)

▶ [GVO](#)

▶ [Haltbarkeit von
Lebensmitteln](#)

▶ [Lebensmittelbedingte
Krankheiten](#)

▶ [Vitamine](#)

▼ [Rückstände /
Kontaminanten](#)

[Mykotoxine](#)

▶ [Pflanzenschutzmittel-
rückstände in
Lebensmittel](#)

[Polyzyklische
aromatische
Kohlenwasserstoffe
\(PAK\)](#)

[Biomonitoring](#)

▶ [Arzneimittel- und
Hormonrückstände](#)

[Schwermetalle](#)

▶ [Dioxine und PCB](#)

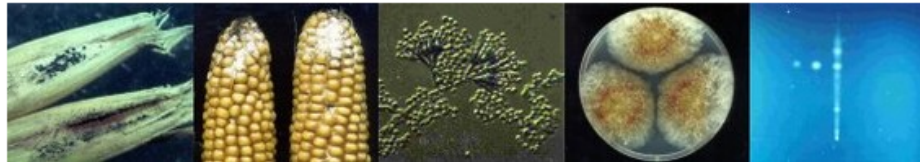
▶ [Kokain-Spuren in Red
Bull Cola](#)

▶ [Produkte und Tarife](#)

▶ [Über Uns](#)

Autor: [CC-Cluster Chemie Linz](#)

Mykotoxine



Was sind Mykotoxine ?

Mykotoxine sind **Pilzgifte**. Sie sind natürliche, sog. **sekundäre Stoffwechselprodukte** von Schimmelpilzen, die bei Menschen und Tieren eine toxische Wirkung zeigen, bzw. eine Mykotoxikose verursachen. Nicht zu den Mykotoxinen gezählt werden die Giftstoffe, die in bestimmten höheren Pilzen (z.B. Knollenblätterpilz) enthalten sind.

Im Gegensatz zu den Produkten des Primärstoffwechsels sind diese sekundären Stoffwechselprodukte nicht bei allen Organismen zu finden, sondern sind charakteristisch für ihre Produzenten.

Bedeutung

Die FAO schätzt, dass bis zu 25 % der Weltproduktion von Nahrungsmitteln mit Mykotoxinen kontaminiert sind. Etwa 20 % der Getreideernte der EU enthalten messbare Mengen von Mykotoxinen.

GLOSSAR

VERWANDTE INHALTE

[Die wichtigsten
Mycotoxine](#) ▶

[Fleischuntersuchungen ▶](#)

[Pflanzenschutzmittel-
rückstände in
Lebensmittel](#) ▶

[Lebensmittelzusatzstoffe](#) ▶

[Farbstoffe](#) ▶

[Thema: Ernährung](#) ▶

[++Weitere Inhalte++](#) ▶

 [AGES Newsletter](#)

 [AGES Akademie](#)

