

Afdeling Contaminanten Datum: 1983-05-03

RAPPORT 83.42 Pr.nr. 505.0420

Onderwerp: Literatuuronderzoek naar analysemethoden voor de bepaling van deoxinivalenol in granen en veevoeders.

Verzendlijst: directeur, direktie VKA, sektorhoofd (2x), afdeling Contaminanten (5x), afdeling Normalisatie (Humme), projektbeheer, projekteider.

Project: Ontwikkeling methoden voor het aantonen en bepalen van microbiële toxinen.

Onderwerp: Literatuuronderzoek naar analysemethoden voor de bepaling van deoxynivalenol in granen en veevoeders.

Doel:

Het geven van een literatuuroverzicht van de verschillende analysemethoden voor de bepaling van deoxynivalenol in granen en veevoeders.

Samenvatting:

Een analysemethode voor de bepaling van deoxynivalenol kan onderverdeeld worden in drie stappen: extractie, zuivering en detectie. De meest gebruikte extractiemethode is die waarbij gebruik gemaakt wordt van een methanol/watermengsel als extractievloeistof. Bij de zuivering worden vloeistof-vloeistof scheiding, silicagel kolom chromatografie en preparatieve dunnelaagchromatografie gebruikt. Meestal worden twee of meer zuiveringsstappen toegepast. De scheiding vindt plaats met behulp van dunnelaagchromatografie of gas-vloeistof-chromatografie met vlamionisatie- of electron capture detectie. Een lage detectiegrens wordt bereikt bij gebruik van GLC met electron capture detectie.

Kwantitatieve bevestiging kan plaatsvinden door middel van GLC met daaraan gekoppeld massaspectrometrie.

Conclusie:

Om een lage detectiegrens bij de bepaling van deoxynivalenol in graanprodukten en veevoeders te bereiken, lijkt GLC met electron capture detectie de beste methode. Voor een kwantitatieve bevestiging is GLC gevolgd door massaspectrometrie zeer goed bruikbaar.

Verantwoordelijk: ir L.G.M.Th. Tuinstra

Medewerker/samensteller: N. Duijnhouwer

Projectleider: W. Haasnoot

Verschillende analysemethoden voor de bepaling van deoxynivalenol in granen en veevoeders

Er zijn verschillende analysemethoden om de aanwezigheid van deoxynivalenol in een produkt te bepalen. In dit literatuurverslag worden de verschillende methoden beschreven. De analyse kan onderverdeeld worden in drie stappen: extraktie, zuivering en detektie.

Extraktie

Deoxynivalenol is goed oplosbaar in polaire oplosmiddelen zoals water, alcoholen en acetonitril. In veel extraktiemethoden wordt gebruik gemaakt van mengsels van methanol en water, in verschillende verhoudingen: 3:1 (10), 6:4 (12), 9:1 (1), 1:1 (5), 95:5 (4), 8:2 (6).

Verder worden extrakties uitgevoerd met acetonitril/water 5:1 (2), 84:16 (7), chloroform/ethanol 8:2 (8) en met ethylacetaat en daarna methanol (3). Een andere extraktiemethode is die waarbij gebruik gemaakt wordt van petroleumether/methanol/water 100:55:45 gevolgd door extraktie met dit mengsel plus een 20%-ige oplossing van loodacetaat (9). Zie voor een overzicht tabel 1.

De meest gebruikte extraktiemethode is die met methanol en water. Na extraktie volgt een zuivering (clean-up).

Tabel 1. De gebruikte extraktievloeistoffen

<u>extraktievloeistof</u>	<u>substaat</u>	<u>methode</u>	<u>referentie</u>
MeOH/H ₂ O 3:1	mais	GLC	10
MeOH/H ₂ O 6:4	mais	GLC/MS	1, 12
MeOH/H ₂ O 9:1	mais	TLC	1
MeOH/H ₂ O 1:1	gerst, tarwe, granen	GLC	1, 5
MeOH/H ₂ O 95:5	graan, graanprod.	GLC, TLC	4
MeOH/H ₂ O 8:2	mais	GLC, GLC/MS	6
Acetonitril/H ₂ O 5:1	graan veevoeder	GLC/MS, TLC	2
Acetonitril/H ₂ O 84:16	veevoeder	GLC	7
Chloroform/ethanol 8:2	granen	GLC	8
H ₂ O/ethylacetaat, methanol	veevoeder	GLC/MS	3
Petroleumether/methanol/water 100:55:45	mais, veevoeder	GLC/TLC	9
+ loodacetaat in H ₂ SO ₄			

Zuivering

Verschillende zuiveringsmethoden kunnen toegepast worden; vloeistof-vloeistof scheiding, silicagel kolomchromatografie en preparatieve dunnelaagchromatografie. Meestal worden twee of meer zuiveringsstappen toegepast vóór de detektie van deoxynivalenol.

Waterige methanolextrakten worden of direkt geëxtraheerd met hexaan, gevolgd door opname van het DON in chloroform of ethylacetaat, of het extrakt wordt drooggedampt voor de zuivering. De extraktievloeistof kan geconcentreerd worden onder vacuüm en daarna kan aceton toegevoegd worden om precipiterende stoffen te verwijderen. Het geconcentreerde materiaal wordt dan verder gezuiverd door middel van preparatieve dunnelaagchromatografie of kolomchromatografie. Wanneer DON is opgenomen in chloroform of ethylacetaat, wordt de vloeistof verdampt en verdere zuivering vindt plaats met behulp van silicagel kolomchromatografie en/of preparatieve dunnelaagchromatografie.

In bijna alle zuiveringsmethoden wordt gebruik gemaakt van silicagel. Kamimura e.a. gebruiken een amberlite XAD-4 kolom en een florisilkolom. (Vesonder e.a. zuiveren over een Sephadex LH-20 kolom na een eerste zuivering over een silicagelkolom).

Als elutievloeistoffen worden zowel chloroform/methanol (9:1, 3:1, 1:1) als ethylacetaat/tolueen (3:1) en chloroform/aceton (3:2), hexaan/aceton (1:1) en methyleenchloride/methanol (95:5) gebruikt (1, 10, 5, 4). Voor de hier besproken en andere zuiveringsmethoden zie tabel 2.

Tabel 2. De verschillende zuiveringsmethoden

extraktie- vloeistof	voorbewerking	vloeistof/ vloeistof scheiding	vloeistofchromatografie		
			vaste fase	elutie- vloeistof	referentie
MeOH/H ₂ O 6:4	voorextraktie met BuOH, concentreren, EtOH, concentreren MeOH/aceton concentreren		1 silicagel kolom 2 sephadex LH-20	CHCl ₃ /MeOH (1:1-1:3) aceton	1
MeOH/H ₂ O 6:4	concentreren aceton precipitatie		PTLC* silicagel	CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O (90:10:1)	1
MeOH/H ₂ O 6:4	voorextraktie met BuOH		silicagel kolom	1. CHCl ₃ 2. CHCl ₃ /MeOH (95:5) 3. CHCl ₃ /MeOH (90:10) 4. MeOH	12
MeOH/H ₂ O 1:1		concentreren hexaan ethylacetaat	PTLC silicagel	ethylacetaat/ tolueen (3:1) CHCl ₃ /aceton (3:2)	1
MeOH/H ₂ O 3:1	concentreren	hexaan 3 x CHCl ₃	PTLC silicagel	ethylacetaat/ tolueen (3:1) CHCl ₃ /aceton (3:2)	10
MeOH/H ₂ O 9:1	concentreren	hexaan 3 x CHCl ₃ MeOH aceton	1 silicagel kolom 2 PTLC silicagel	hexaan/aceton (1:1) CHCl ₃ /MeOH (3:1)	1
MeOH/H ₂ O 1:1	20%-ige (NH ₄) ₂ SO ₄	4 x ethyl- acetaat	1 silicagel kolom	methyleenchloride/ methanol (95:5)	5
MeOH/H ₂ O 95:5	concentreren		1. Amberlite XAD-4 kolom 2. Florisil- kolom	1. methanol 2. CHCl ₃ /methanol (9:1)	4

* preparatieve TLC

Vervolg tabel 2. De verschillende zuiveringsmethoden

extraktie- vloeistof	voorbewerking	vloeistof/ vloeistof scheiding	vloeistofchromatografie		
			vaste fase	elutie- vloeistof	referentie
MeOH/H ₂ O 8:2	methanol wegdampen	ethylacetaat/ H ₂ O acetonitril/ petroleumether	1. PHPLC silicagelkol. en Porasil A 2. PTLC silicagel 3. HPLC	1. methyleen- chloride/ methanol (98:2) 2. CHCl ₃ /MeOH (9:1) 3. H ₂ O/MeOH (9:1)	6
acetonitril/H ₂ O 5:1		petroleumether ijzerchloride hydrochloride chloroform	silicagelkol. PTLC	tolueen/ethylace- taat/aceton (3:2:1) indien nodig: CHCl ₃ /aceton/propanol (85:10:5)	2
H ₂ O/ethylacetaat methanol		petroleum/ 33%-ige MeOH	-	-	3
acetonitril/H ₂ O 84:16			1. mycocharkol. 2. Florisilkol.	2. chloroform/ methanol (95:5)	7
chloroform/ ethanol 8:2	drogen		1. silicagel Sep pak kolom 2. Sephadex LH-20 3. Cyano extraktiekolom	1. methanol/ dichloromethaan (5:95) 2. methanol/ dichloromethaan (2:8) 3. tolueen/ acetonitril (8:2)	8
petroleumether/ methanol/H ₂ O 100:55:45		petroleum ether	Sep Pak TM C18 kolom	MeOH/H ₂ O (2:3)	9
20% opl. van loodacetaat in azijnzuur		CHCl ₃	gefraktionneerd d.m.v. HPLC		

Detektie

Bij de meeste detektiemethoden wordt gebruik gemaakt van levend celmateriaal (dierproeven), deze methoden zijn niet specifiek en bovendien niet erg kwantitatief. Dit overzicht geeft alleen chemische detektiemethoden.

De gebruikelijke detektiemethoden voor deoxynivalenol en andere trichothecenen zijn dunnelaagchromatografie en gaschromatografie.

Dunnelaagchromatografie wordt het meest gebruikt vanwege de grotere specificiteit als gevolg van een combinatie van twee ontwikkelrichtingen met verschillende elutievloeistoffen en verschillende besproeiingsreagentia. Een groot nadeel van deze methode is de relatief hoge detektiegrens ten opzichte van gas-vloeistofchromatografie (GLC).

Veel elutievloeistoffen voor TLC van trichothecenen zijn een combinatie van chloroform en een alcohol, meestal methanol. Ook wordt gebruik gemaakt van benzeen/aceton, ethylacetaat/hexaan, ethylacetaat/tolueen en benzeen/tetrahydrofuran.

Het probleem met deoxynivalenol is dat de stof niet fluoresceert wanneer de gebruikelijke besproeiingsreagentia, zwavelzuur en zuur p-anisaldehyde gebruikt worden. Kamimura e.a. (4) besproeiden de dunnelaagplaat na ontwikkelen in chloroform/methanol (93:7) met een 20% AlCl_3 in ethanoloplossing, na verhitten werd deoxynivalenol als een blauwfluorescerende vlek waargenomen onder UV licht met een golflengte van 365 nm. De detektiegrens van DON, toegevoegd aan mais, gerst en tarwe bedroeg 20-50 $\mu\text{g/kg}$.

Stahr e.a. (2) ontwikkelen de dunnelaagplaat met tolueen/ethylacetaat/aceton (3:2:1) en besproeien met anisaldehyde.

Na verhitten geeft DON onder UV licht met een golflengte van 360 nm een gele tot rode kleur, de absolute detektiegrens is 0,1 μg .

Gaschromatografie (GLC) heeft een lagere detektiegrens dan dunnelaagchromatografie. Omdat deoxynivalenol 3 OH groepen bevat (zie figuur 1: de structuurformule van DON), wordt deze verbinding in de meeste gevallen eerst gederivatiseerd.

De gebruikte derivatiseringsreagentia voor het maken van trimethylsilylderivaten zijn N,O-bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (BSTFA) 99% en 1% trimethylchlorosilaan (TMCS) en een mengsel van trimethylsilylimidazool (TSIM), N,O-bis-(trimethylsilyl)acetamide (BSA) en trimethylchlorosilaan (TMCS), dit mengsel is bekend als Tri-Sil-TBT.

Het is ook mogelijk om heptafluorboterzuurderivaten te maken, het derivatiseringsreagens is dan n-heptafluorbutyrylimidazool (HFBJ). In enkele gevallen wordt het deoxynivalenol niet gederivatiseerd, maar direkt geïnjecteerd in de GC.

De gehalogeneerde derivaten worden gedetekteerd door middel van GLC met electron capture detektie, de silylethers door GLC met vlamionisatiedetektie. De electron capture detektie is veel gevoeliger dan de vlamionisatiedetektie.

De vloeistoffase bij GLC kan bestaan uit een methylsilicoon (SE-30, OV-1), een methyltrifluorpropylsilicoon (OF-1) of een methylphenylsilicoon (OV-17).

Een goed bruikbare kwantitatieve bevestigingsmethode is GLC gevolgd door massaspectrometrie. Het triheptafluorboterzuurderivaat van deoxynivalenol heeft een $m/z = 884$. Deze hoge waarde heeft een grote specificiteit tot gevolg, maar vereist ook een type massaspectrometer waarmee zeer hoge waarden gemeten kunnen worden.

Voor een overzicht van de verschillende GLC toepassingen zie tabel 3 (a en b).

Tot slot nog iets over vloeistofchromatografische methoden:

Daar de meeste trichothecenen geen UV absorptie vertonen zijn deze methoden in zulke gevallen niet bruikbaar. Deoxynivalenol vertoont echter wel absorptie, het maximum ligt bij een golflengte van 225 nm (11). Schweighardt e.a. (9) gebruiken HPLC, maar alleen om te fraktioneren, DON wordt daarna bepaald met GLC of TLC.

Tabel 3a. De bepaling van het deoxynivalenolgehalte met behulp van GLC

detektor	detektie grens ng/g	recovery	produkt voedsel	referentie
vlamionisatie	100	89-93%	voedsel	2
vlamionisatie	50-100		voer	3
electroncapture	2		mais,gerst,tarwe	4
vlamionisatie	100	72,80%	mais,gerst,tarwe	4
electroncapture	< 10		tarwe	5
electroncapture	100		mais	7
electroncapture	50	89,8%	mais,gerst,tarwe	8
vlamionisatie	25	25-35%	mengvoeder	9
vlamionisatie		85%	mais	10
electroncapture	100	68-101%	granen	1
electroncapture	3-15	94-96%	granen	1
vlamionisatie		65-92%	mais	12

Tabel 3b. De condities voor gas-vloeistof-chromatografie

kolom	temperatuur (°C)	derivatisering	detektor	referentie
3% OV-1	150-250	BSTFA	vlamionisatie massaspectrometer	1
3% OV-1	150-280	TMS reagens	vlamionisatie	10
3% OV-1	260	ongederivatiseerd	massaspectrometer	2
10% OV-101	260	ongederivatiseerd	massaspectrometer	2
Dexsil 300	270	ongederivatiseerd	massaspectrometer	2
OV-101	180-280	Tri-Sil-TBT	FID, MS	3
OV-17	180-280	Tri-Sil-TBT	FID, MS	3
2% OV-17	250	TSIM/TMCS/ ethylacetaat	vlamionisatie	4
2% OV-17	240	TSIM/TMCS/ ethylacetaat	electroncapture	4
9% OV-3	170	HFBI	electroncapture	5
9% OV-3	180	HFBI	massaspectrometer	5
3% OV-1	150-250	Tri-Sil-TBT	massaspectrometer	6
3% OV-1	165-240	HFBI	electroncapture	7
SE-54	100-300	HFBI	electroncapture	8
3% Se-30	220	HFBI	massaspectrometer	8
5% SP2250	160-260	Tri-Sil-TBT	vlamionisatie	9
3% OV-101	160-250	Tri-Sil-TBT	vlamionisatie	12

BSTFA = Bis (trimethylsilyl)fluoroacetamide

Tri-Sil-TBT = trimethylsilylimidazool, N,O-bis(trimethylsilyl)acetamide
en trimethylchlorosilaan

TSIM = trimethylsilylimidazool

TMCS = trimethylchlorosilaan

HFBI = heptafluorobutyrylimidazool

Conclusie

Om een lage detectiegrens bij de bepaling van deoxynivalenol in graanprodukten en veevoeders te bereiken, lijkt GLC met electron capture detectie de beste methode.

Tot deze conclusie kwam Scott (11) ook.

Voor een kwalitatieve bevestiging is GLC gevolgd door massaspectrometrie het meest geëigend.

Twee uitgebreide overzichtsaltikelen met betrekking tot methode voor de bepaling van deoxynivalenol en andere trichothecenen zijn gepubliceerd door Eppley (1) en Scott (11).

Literatuur

1. R.M. Eppley, JAOCs, vol. 56, 824-829 (1979).
2. H.M. Stahr e.a., Applied Spectroscopy, vol. 33, no. 3, 294-297, (1979).
3. Cs. Szathmary e.a., J. Chromatogr., 191, 327-331 (1980).
4. H. Kamimura e.a., J. Assoc. Off. Anal. Chem., vol. 64, no. 5, 1067-1073 (1981).
5. P.M. Scott e.a., J. Assoc. Off. Anal. Chem., vol. 64, no. 6, 1364-1371 (1981).
6. G.A. Bernett e.a., JAOCs, vol. 58, 1002-1005 (1981).
7. L. Terwel, Stageverslag K.v.W. te Rotterdam (1982).
8. H. Cohen e.a., J. Assoc. Off. Anal. Chem., vol. 65, no. 6, 1429-1434 (1982).
9. H. Schweighardt e.a., Chromatographia, vo. 13, no. 7, 447-450 (1980).
10. D.M. Forsyth e.a., Appl. Environ. Microbiol., vol. 34, no. 5, 547-552 (1977).
11. P.M. Scott, J. Assoc. Off. Anal. Chem., vol. 65, no. 4, 876-883 (1982).
12. R.F. Vesonder e.a., Appl. Environ. Microbiol., vol. 36, no. 6, 885-888 (1978).

Figuur 1. De structuurformule van Deoxynivalenol (DON).

