STAATLICHE BETRIEBS-
GESELLSCHAFT FÜR UMWELT
UND LANDWIRTSCHAFT

Freistaat
SACHSEN

Analytik von Mykotoxinen im landwirtschaftlichen Bereich

Cindy Scheunemann

Mykotoxine in Getreide und Futtermitteln

Einführung

STAATLICHE BETRIEBS-GESELLSCHAFT FÜR UMWELT UND LANDWIRTSCHAFT | Freistaat SACHSEN

Tiergesundheit

Mykotoxine durch Dürre: Die unterschätzte Gefahr im Futter

Agrarheute – 17.02.23

(1)

USA: Mykotoxine bereits in geringen Konzentrationen schädlich

DGS – 08.03.23

(2)

Wie gefährlich sind Mykotoxine und Mutterkorn?

Die Qualität und Sicherheit GmbH (QS) veröffentlicht im neuen Monitoring-Report Futtermittel 2019 aktuelle Ergebnisse zur Mykotoxin- und Mutterkorngefahr.

topAgrar – 17.09.2019

(3)

Special: Unsichtbare Gefahr

Kerstin Wackermann am 19. Januar 2023 um 13:34

Teilen | Twittern | Email

(4)

St.Georg – 19.01.23

Pferde nehmen Pilzsporen und -gifte nicht nur über die Atemluft auf, sondern auch über Futter. Und sogar das Auge können sie befallen. Das führt zu vielen verschiedenen, zum Teil schweren Krankheiten. (Schaufenster)

(1) https://www.agrarheute.com/tier/mykotoxine-duerre-unterschaetzte-gefahr-futter-603618
(2) https://www.dgs-magazin.de/aktuelles/news/article-7475913-4627/usa-mykotoxine-bereits-in-geringen-konzentrationen-schaedlich-.html
(3) whttps://www.topagrar.com/schwein/news/wie-gefaehrlich-sind-mykotoxine-und-mutterkorn-11815420.html
(4) https://www.st-georg.de/wissen/special-unsichtbare-gefahr/

Mykotoxine in Getreide und Futtermitteln

Allgemeines

STAATLICHE BETRIEBS-GESELLSCHAFT FÜR UMWELT UND LANDWIRTSCHAFT

Freistaat SACHSEN

- Mykotoxine …
  - natürlich vorkommende Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen
  - strukturell extrem verschiedene organische Verbindungen
  - über 300 Verbindungen bekannt
  - unterschiedlichste toxische Wirkungen

(5)

(6)

(8)

(7)

(5) www.pflanzenkrankheiten.ch
(6) & (7) www.lfl.bayern.de
(8) www.aerzteblatt.de

Mykotoxine in Getreide und Futtermitteln

Systematik

STAATLICHE BETRIEBS-
GESELLSCHAFT FÜR UMWELT
UND LANDWIRTSCHAFT

Freistaat
SACHSEN

Feldpilze

(9)

Lagerpilze

(10)

(9) www.pflanzenkrankheiten.ch
(10) www.lfl.bayern.de

Feldpilze

Fusarien

- Trichothecene
  - Deoxynivalenol
  - Nivalenol
  - HT-2 & T-2-Toxin
  - …
- Fumonisine
  - Fumonisin B1, B2, B3
- Zearalenon

Alternaria

- Alternariatoxine

Claviceps

- Ergotalkaloide

Mykotoxine in Getreide und Futtermitteln

Analytik in Zahlen

STAATLICHE BETRIEBS-
GESELLSCHAFT FÜR UMWELT
UND LANDWIRTSCHAFT

Freistaat
SACHSEN

▪ Amtliche Futtermittelkontrolle	**~ 150 Proben/Jahr**
▪ Sächsisches Getreidemonitoring	**~ 200 Proben/Jahr**
▪ Grundfutteruntersuchung (Mais und Hofmischungen sächsischer Bauern)	**~ 100 Proben/Jahr**
▪ Projektfragestellungen	**~ 100 Proben/Jahr**
	= 550 Proben/Jahr

Mykotoxine in Getreide und Futtermitteln

Nachweisverfahren

STAATLICHE BETRIEBS-
GESELLSCHAFT FÜR UMWELT
UND LANDWIRTSCHAFT

Freistaat
SACHSEN

Methoden der Rückstandsanalytik (instrumentell)	
Chromatographische Methoden	(
Hochdruck- Flüssigkeitschromatographie (HPLC) mit Ultraviolett (UV) - bzw. Fluoreszenzdetektion (FLD) oder Massenspektrometrie (MS)	i F
- nach Erstellung einer Kalibrierkurve sichere Quantifizierung möglich	- - -
relativ teuer geringerer Probendurchsatz langsam	
gut gesicherte Ergebnisse	

Mykotoxine in Getreide und Futtermitteln

instrumentelle Methoden

STAATLICHE BETRIEBS-GESELLSCHAFT FÜR UMWELT UND LANDWIRTSCHAFT

Freistaat SACHSEN

Analyten	Methode	Detektion
Aflatoxin B1 (+ B2, G1, G2)	DIN EN ISO 17375:2006	HPLC-FLD mit Nachsäulenderivatisierung (Bromierung)
Ochratoxin A	DIN EN 16007:2009	HPLC-FLD
Fusarientoxine	VDLUFA MB III (2012) 16.13.1	LC-MSMS
Fumonisine	Hausmethode	LC-MSMS

Mykotoxine in Getreide und Futtermitteln

Analytik von Aflatoxin

STAATLICHE BETRIEBS-
GESELLSCHAFT FÜR UMWELT
UND LANDWIRTSCHAFT

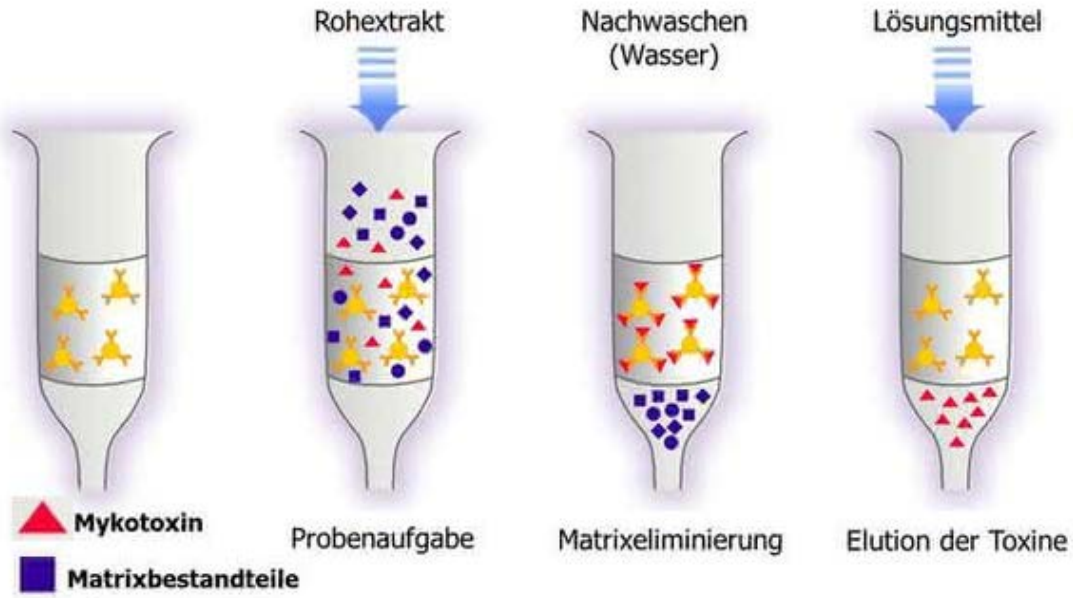
Freistaat
SACHSEN

Extraktion

- 25 g Probe + 125 mL EM (Aceton/H_2O [85/15])
- 45 min Schütteln + Filtrieren
- 5 ml Aliquot auf 50 ml mit H_2O

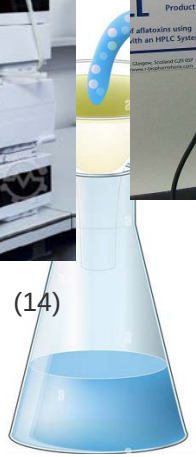
Clean up

- SPE mit Immunoaffinitätssäule
- Einengen des Eluats und Aufnahme in H_2O/MeOH



(11)

(15)



(14)

(12)

(13)

Mykotoxine in Getreide und Futtermitteln

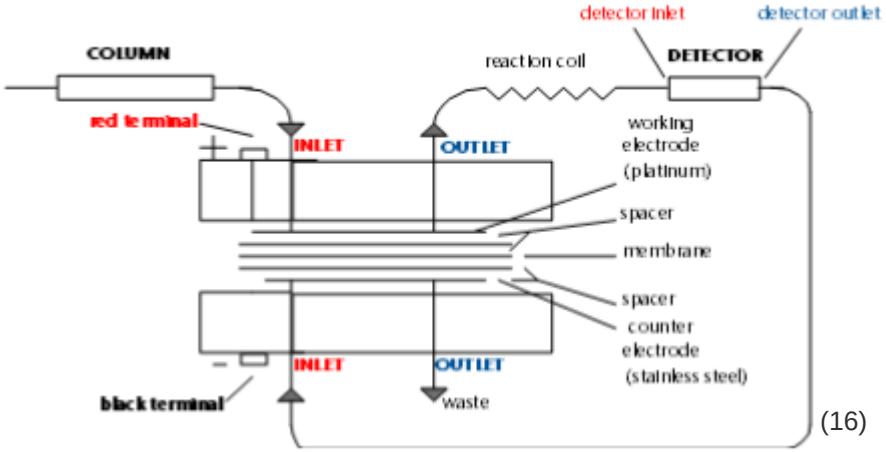
Prinzip Nachsäulenderivatisierung Aflatoxin

STAATLICHE BETRIEBS-
GESELLSCHAFT FÜR UMWELT
UND LANDWIRTSCHAFT

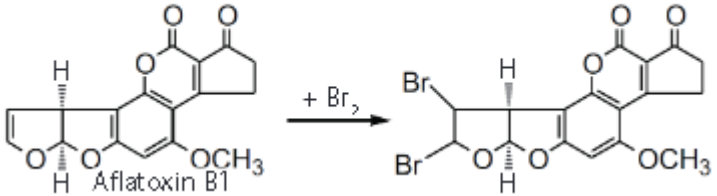
Freistaat
SACHSEN

- Kobra-Zelle = elektrochemische Zelle
- Reaktion von Brom aus Elutionsmittel mit Aflatoxin B1
- Verbesserung der Fluoreszenz-Reaktion in FLD

(15)



(16)



(17)

Mykotoxine in Getreide und Futtermitteln

Qualitätssicherung

STAATLICHE BETRIEBS-
GESELLSCHAFT FÜR UMWELT
UND LANDWIRTSCHAFT

Freistaat
SACHSEN

- pro Durchlauf einer Probenserie:
  - Blindwert der Matrix
  - Ongoing Validation
    - Matrix dotiert mit Analyt → Wiederfindung
  - Referenzmaterial
- erster Proben-Durchlauf im Screening-Verfahren
- bei Detektion von höchstgehaltrelevanter Ergebnisse→ Mehrfachaufarbeitung
- bei fragwürdigen Messergebnissen → Standardaddition

Mykotoxine in Getreide und Futtermitteln

Quantifizierung

STAATLICHE BETRIEBS-GESELLSCHAFT FÜR UMWELT UND LANDWIRTSCHAFT

Freistaat SACHSEN

Externe Kalibrierung

- Erstellung Kalibrierreihe in Lösungsmittel oder Blindwert
- Kalibrierreihe: 1 – 500 ng/mL
- Quantifizierung erfolgt über Flächenverhältnis Analyt

Interne Kalibrierung

- Probe + (^{13}C)-markierter Standard(mix)
  - z.B. 100µL i.Std. zu 10mLExtrakt
  - Kalibrierreihe 1 – 500 ng/mL + je 40ng/mL i.St.
  - Quantifizierung erfolgt über Flächenverhältnis Analyt / i.St.
  - **Ergebnis bleibt unbeeinflusst von evtl. Verlusten bei der Aufarbeitung, Matrixeffekten und Messgeräteschwankungen**

Mykotoxine in Getreide und Futtermitteln

Höchstgehalt von Aflatoxin und Mutterkorn in Futtermitteln

VO (EU) 574/2011

STAATLICHE BETRIEBS-GESELLSCHAFT FÜR UMWELT UND LANDWIRTSCHAFT

Freistaat SACHSEN

unerwünschter Stoff	**zur Tierernährung bestimmte Erzeugnisse**	**Höchstgehalt in mg/kg, bezogen auf ein Futtermittel mit einem Feuchtigkeitsgehalt von 12%**
Aflatoxin B1	**Futtermittelausgangserzeugnisse**	**0,02**
	Allein-und Ergänzungsfuttermittel	**0,01**
	ausgenommen: - Mischfuttermittel für Milchrinder, Kälber, Milchschafe und Lämmer, Milchziegen und Ziegenlämmer, Ferkel und Junggeflügel	**0,005**
	- **Mischfuttermittel** für Rinder, Schafe, Ziegen, Schweine und Geflügel	**0,02**
Mutterkorn* (Claviceps purpurea)	**Futtermittelausgangserzeugnisse und Mischfuttermittel, die ungemahlenes Getreide enthalten**	**1000**

* bezogen auf das gesamte Menge an Korn im Futtermittel

Mykotoxine in Futtermitteln

Richtwerte für Fusarientoxine sowie OTA und Fumonisine (2006/576/EG & 2016/1319 EU)

Mykotoxin	Zur Fütterung bestimmte Erzeugnisse	Richtwert in mg/kg für ein Futtermittel mit einem Feuchtegehalt von 12%
DON	**Futtermittelausgangserzeugnisse**	
	- Getreide und Getreideerzeugnisse	**8**
	- Maisnebenprodukte	**12**
	Ergänzungs- und Alleinfuttermittel außer für:	**5**
	- Schweine	**0,90**
	- Kälber, Lämmer und Ziegenlämmer	**2**
ZEA	**Futtermittelausgangserzeugnisse**	
	- Getreide und Getreideerzeugnisse	**2**
	- Maisnebenprodukte	**3**
	Ergänzungs- und Mischfuttermittel für:	
	- Ferkel, Jungsauen, Welpen, junge Katzen, Hunde und Zuchtkatzen	**0,1**
	- ausgewachsene Hunde und Katzen für andere Zwecke als zur Zucht	**0,2**
	- Sauen und Mastschweine	**0,25**
	- Kälber, Milchkühe, Schafe und Ziegen	**0,5**
OTA	**Futtermittelausgangserzeugnisse**	
	- Getreide und Getreideerzeugnisse	**0,25**
	Ergänzungs- und Alleinfuttermittel für:	
	- Schweine	**0,05**
	- Geflügel	**0,1**
	- Mischfuttermittel für Katzen und Hunde	**0,01**
Fumonisin B1+B2	**Futtermittelausgangserzeugnisse**	
	- Mais und Maiserzeugnisse	**60**
	Ergänzungs- und Alleinfuttermittel für:	
	- Schweine, Pferde, Kaninchen, Heimtiere	**5**
	- Fische	**10**
	- Geflügel, Kälber, Lämmer, Ziegenlämmer	**20**
	- Wiederkäuer und Nerze	**50**

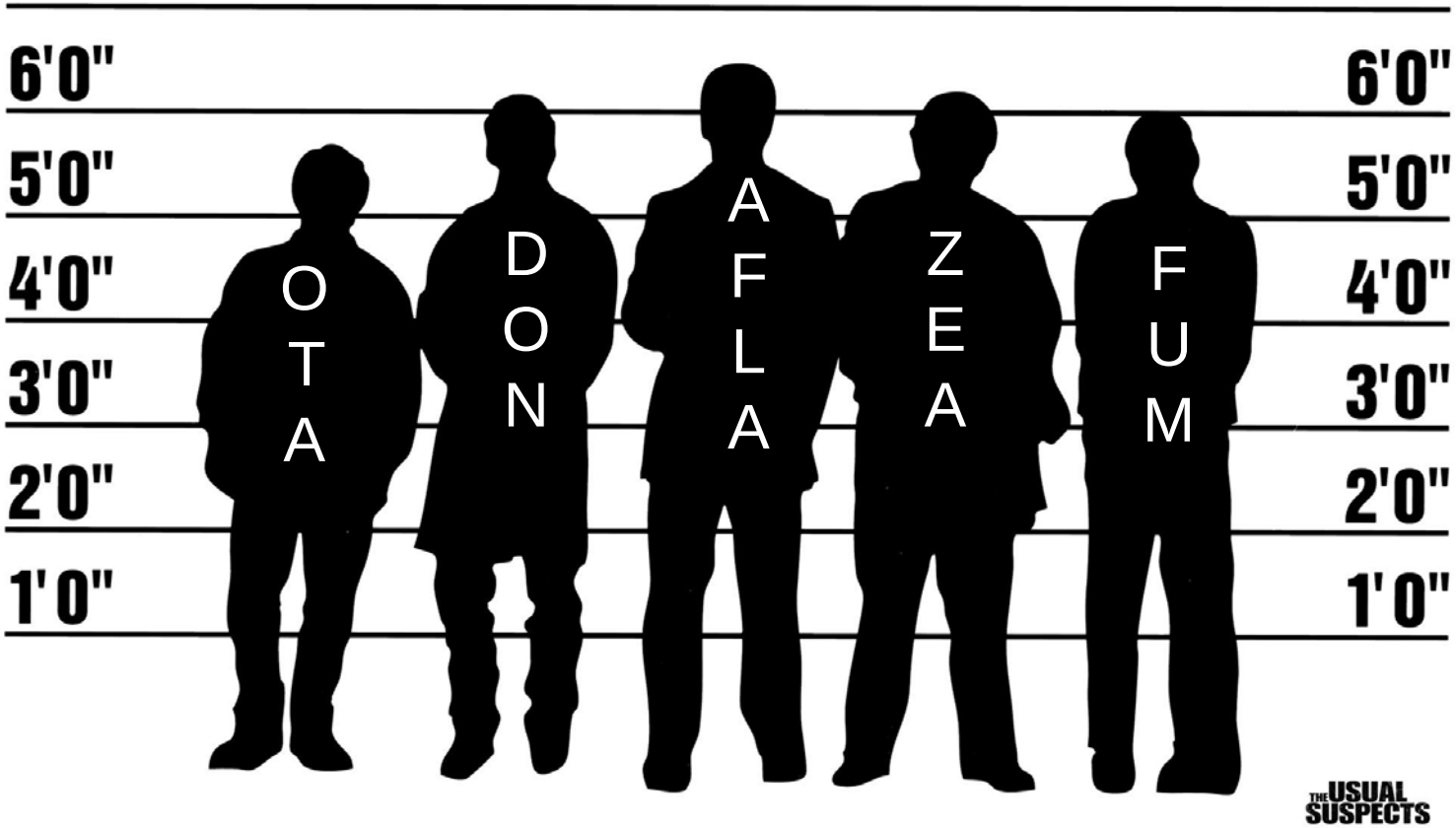
Mykotoxine in Futtermitteln

STAATLICHE BETRIEBS-
GESELLSCHAFT FÜR UMWELT
UND LANDWIRTSCHAFT

Freistaat
SACHSEN

*Richtwerte für **HT-2 und T-2***
für Lebensmittel und Futtermittel (2013/165/EU)

	Richtwert für die Summe der Toxine T-2 und HT-2 (mg/kg)
Unverarbeitetes Getreide	
Gerste (einschließlich Malzgerste) und Mais	**0,2**
Hafer (ungeschält)	**1,0**
Weizen, Roggen und sonstige Getreide	**0,1**
Getreidekörner für den unmittelbaren menschlichen Verzehr	
Hafer	**0,2**
Mais	**0,1**
Sonstige Getreide	**0,05**
Getreideerzeugnisse für den menschlichen Verzehr	
Haferkleie und Haferflocken	**0,2**
Getreidekleie außer Haferkleie, Hafermahlerzeugnisse, Haferflocken, sowie Maismahlerzeugnisse	**0,1**
Sonstige Getreidemahlerzeugnisse	**0,05**
Frühstücksgetreideerzeugnisse, einschließlich geformte Getreideflocken	**0,075**
Brot, feine Backbaren, Kekse, Getreide-Snacks, Nudeln	**0,025**
Getreidebeikost für Säuglinge und Kleinkinder	**0,015**
Getreideprodukte für Einzel- und Mischfuttermittel	
Hafermahlerzeugnisse (Spelzen)	**2,0**
Sonstige Getreideerzeugnisse	**0,5**
Mischfuttermittel mit Ausnahme von Futtermitteln für Katzen	**0,25**



(18)

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!

Bildquellen

(11) https://www.fishersci.de/shop/products/shaker-vibramax-100/10588751

(12) https://www.alamy.de/fotos-bilder/filtration-equipment-lab.html?sortBy=relevant

(13) https://www.labo.de/umweltanalytik/automatisierte-probenvorbereitung------effizienzsteigerung-im-spurenanalytischen-labor.htm

(14) https://www.werktuigen.de/agilent+technologies-1260+infinity+ii+lc+system/wt-768-1628

(15) https://ridacom.com/en/products/view/630

(16) https://fssai.gov.in/upload/uploadfiles/files/Manual_Analysis _Mycotoxin_25_05_2018.pdf

(17) https://www.interchim.fr/ft/C/CP3920.pdf

(18) https://www.pinterest.de/pin/784611566310934546/

Methode zur Bestimmung von Trichothecene und ZEA in Futtermittel, Pflanzen, Getreide & Mais

10g Probe in 300mL Erlenmeyerkolben einwiegen

↓

Zugabe von 60mL Acetonitril /Wasser bidest. = 84/16 v/v

↓

90 min schütteln und filtrieren

↓

20µL Essigsäure, 10mL Filtrat und 100µL int. Standard 1ppm in ein Spezialreagenzglas füllen, verschließen und schütteln

↓

Aufreinigung am SPE mittels Multisep AflaZON Säule

↓

4ml des Eluates zur Trockne einengen

↓

in 1ml Eluent aufnehmen, mit dem Minishaker aufmischen und kurz ins US-Bad stellen

↓

Lösung in ein HPLC-Vial überführen und mittels LC-MS/MS vermessen