

# Forsøg med enkeltkerne-analyser af majs fra Sydafrika

Kan man kvantificere med et UHPLC-qTOF? Læs om arbejdet med at anvende qTOF til kvantitativ analyse af fumonisiner i majs-kerner fra små sydafrikanske husmandsbrug.

Af Anita Iversen & Kristian Fog Nielsen, Center for Mikrobiel Bioteknologi, Institut for System Biologi, DTU

Triple-quadrupol massespektrometre koblet sammen med en UHPLC, anses p.t. for *state of the art* til kvantificering af mange forbindelser – endda i multimetoder, hvor op til 700 stoffer kan detekteres og kvantificeres.

TOF-massespektrometre leverer, som nævnt i ”Ny generation af analyseteknikker” på side 16, en meget nøjagtig massebestemmelse og har en høj resolution. Til gengæld har de været kendt for at have et meget begrænset lineært interval og en dårlig følsomhed. To faktorer der er afgørende for en god kvantitativ metode. Den nyeste generation af TOF’er kan, ud over høj massepræcision til identifikation af ukendte analytter, præstere et større lineært interval og højere sensitivitet.

Kan 3G MaXis qTOF fra Bruker Daltronics anvendes til at kvantificere fumonisiner i majs-kerner fra sydafrikanske husmandsbrug? Vi besluttede os for at teste det.

## Sådan gjorde vi

Fumonisin B<sub>1</sub> og B<sub>2</sub> (FB<sub>1</sub> og FB<sub>2</sub>) er mykotoxiner, der dannes ved svampeangreb fra en række *Fusarium*-arter i majs. Svam-

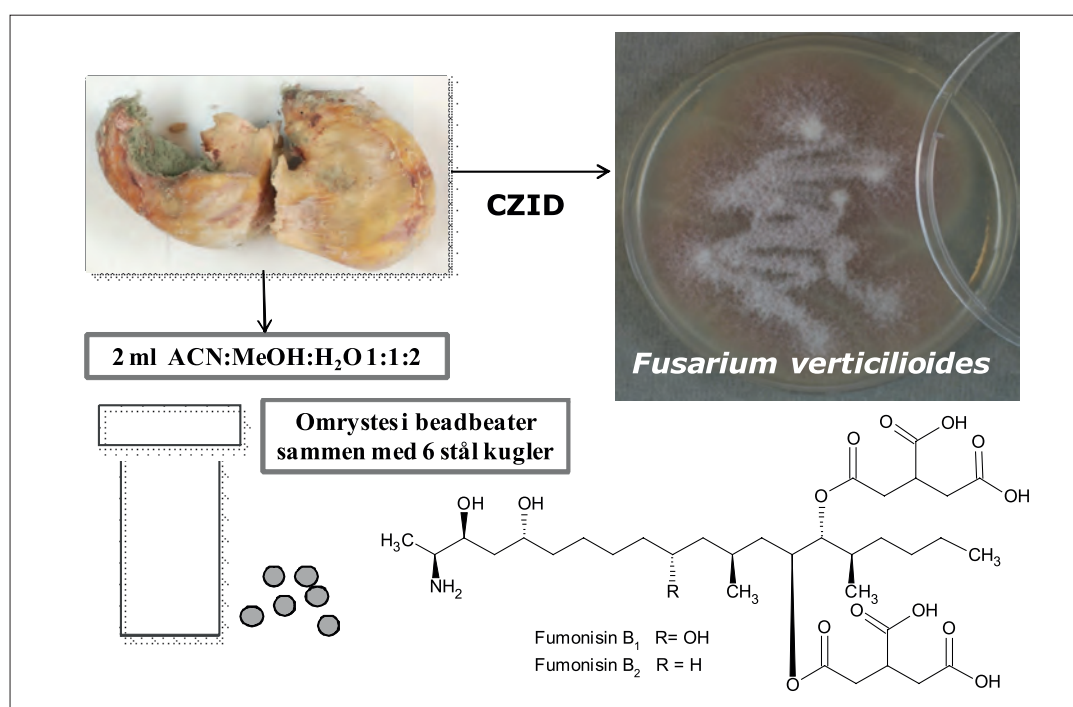
pene kan også danne andre toksiske stoffer, og derfor er det nødvendigt at kunne screene prøven for anden kontaminering. Derfor valgte vi at lave en prøveforberedelse uden oprensning.

Når man oprenser en prøve for at minimere matrix-baggrund, kommer man nemt til at frasortere kemisk forskellige svampestoffer. Uden oprensning må man til gengæld leve med en høj baggrund fra prøven og eventuelle matrix-effekter, hvor komponenter fra prøvematrix påvirker ioniseringen. På figur 1 vises den anvendte prøveforberedelse til enkeltkerne-analyser. Den manglende oprensning har en stor fordel, da vi nemt kan analysere mellem 80 og 100 prøver på en dag. Den klassiske immunoaffinitets-oprensningsmetode er ca. 8 gange langsommere og meget dyr i kolonner.

Majskernerne var indsamlet fra små husmandsbrug i Sydafrika, hvor fumonisiner i majs er et stort problem. Vi ønskede at undersøge, hvor stor en variation der var for fumonisin-indholdet fra kerne til kerne, idet det er muligt for kvinderne at sortere nogle af de synligt inficerede kerner fra, før de tilbereder majs (figur 2).

For at kunne kvantificere skal man bruge kalibreringskurver, som vist i figur 3 (side 22) for FB<sub>1</sub> og FB<sub>2</sub> svarende til et interval på 110-17.000 µg/kg. Der er to kurver oven i hinanden – den

Figur 1. Prøveforberedelse til kvantitativ bestemmelse af fumonisin B<sub>1</sub> og B<sub>2</sub> i hele majs-kerner. Den hele majs-kerne kommes i en lille plastbeholder sammen med stål-kugler og ekstraktionssolvent. Prøven rystes med stor kraft på en bead-beater i 5 min, så majs-slås i stykker. Derefter ekstraheres den yderligere en time på et rystebord, centrifugeres og filtreres før den analyseres med UHPLC-qTOF. Vi isolerede samtidig svampe fra kernen for at se, hvilken *Fusarium*-art der var skyld i evt. producerede toksiner.





Figur 2. Majskerne er indsamlet fra små husmandsbrug i Sydafrika, hvor fumonisiner i majs er et stort problem. Vi ønskede at se, hvor stor en variation der var for fumonisin-indholdet fra kerne til kerne, idet det er muligt for kvinderne at sortere nogle af de synligt inficerede kerner fra, før de tilbereder majs.

G L O B A L   A N A L Y T I C A L   S O L U T I O N S





## Skær analysetiden ned på GC og LC

Med GERSTEL-systemer kan du automatisere

- SPE
- Twister
- SPME
- Linerskift
- Headspace
- Derivatisering
- Dynamisk Headspace
- Inddampning
- Termisk Desorption
- mm

Totalløsninger hos MSC/MSCi

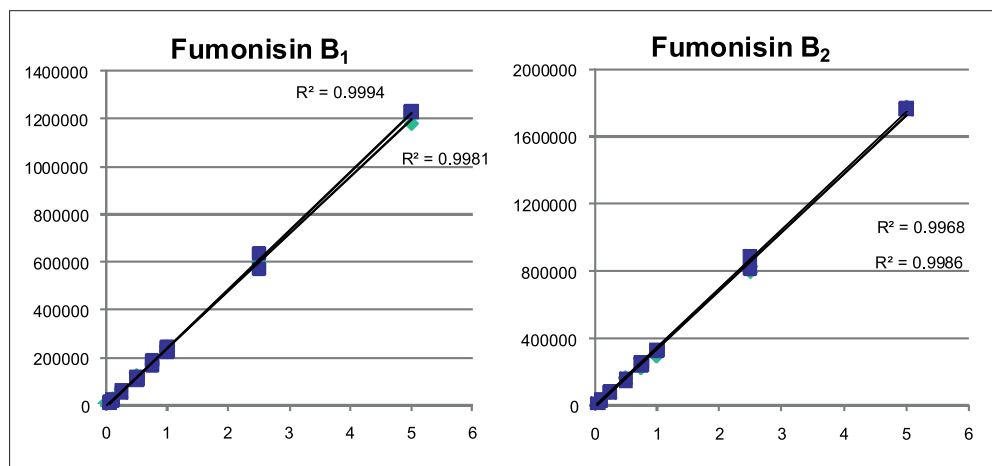
- Salg
- Service/Support
- Træning/kurser
- Metodeudvikling
- Applikationer

**www.msconsult.dk**

*MSCi er Nordisk distributør af GERSTEL-systemer. Besøg vores demolab i Skovlunde*







Figur 3. Kalibreringskurver for FB<sub>1</sub> og FB<sub>2</sub> i majs. På x-aksen er enheden µg/ml og y-aksen er signalintensiteten. Kurverne spænder over et interval for fumonisiner i majs svarende til 110-17.000 µg/kg. Det er svært at se, men der ligger to kurver oven i hinanden – nemlig en ren standardkurve og en matrix-assisteret kalibreringskurve. At de ligger præcist oven i hinanden betyder, at majsens ikke påvirker signalet fra fumonisinerne.

rene standardkurve og en kurve, hvor en majsprøve er ekstraheret og brugt som baggrund til den rene standardopløsning. Standardkurven følger den med majs i. Det betyder, at stoffer fra majsens ikke påvirker ioniseringen af fumonisinerne – der er altså ingen matrix-effekt. Detektionsgrænsen blev bestemt til 110 µg/kg.

Metodens følsomhed er tilstrækkelig, idet den maksimale EU-grænse for fumonisiner i babymad er 200 µg/kg (den mest restriktive). Den anden ende af skalaen udgøres af majs, som anvendes til foder til køer, der har en vejledende grænseværdi på 60.000 µg/kg. Finder vi en prøve med et højt indhold af fumonisin, der ligger uden for kalibreringskurven, så fortynder vi prøven. Da vi ikke har nogen matrix-effekt, er der intet problem i det. Genfindingsforsøg viste en lige så god nøjagtighed som andre metoder til bestemmelse af fumonisiner.

## Resultater

Lad os vende tilbage til majskerne fra Sydafrika, som gav os vigtige informationer om fumonisiners fordeling i majs. Ud af 30 kerner analyseret fra en majske indeholdt kun 2 fumonisin. Den ene til gengæld i høje mængder – over 250 ppm dvs. 250 mg/kg majs. I en anden tidligere undersøgelse, hvor vi sorterede et stort antal kerner, fandt vi, at op til 1,4% af en majske kan bestå af fumonisin B<sub>1</sub> og B<sub>2</sub>.

Nu vejer en enkelt majske heldigvis ikke ret meget, men totalt indeholdt denne ene kerne alligevel 52 µg ren fumonisin B<sub>1</sub> og B<sub>2</sub>. Hvis den blev blandet op med de andre 29 kerner, ville

de opnå et samlet totalindhold af fumonisin på ca. 5.000 µg/kg. Det overstiger dermed langt det maksimalt tilladte indhold af fumonisin i majs anvendt til babyer – og disse majs bliver brugt til netop dette formål i Afrika.

Foruden fumonisiner fandt vi, med den brede screeningsmetode, også andre komponenter i majsens. Vha. qTOF'ens evne til at bestemme den akkurate masse og isotopmønstret for hver enkelt stof, kunne de identificeres til at være andre mykotoxiner og sekundære metabolitter fra svampe. Vi fandt høje mængder af fusarinolsyre, mange analoger af fumonisin samt siccanol og gibberelliner. Sidstnævnte er vækstfaktorer, som *Fusarium* sender ud i majsplanten. Historien om majskerne fra Sydafrika viser, at en qTOF kan anvendes til kvantitativ analyse af fumonisiner i majs.

Vores studie er lavet i samarbejde med en forskergruppe fra South African Medical Research Council, som i en anden undersøgelse har vist, at optimeret sortering og vask af majske før anvendelse kan reducere indholdet af fumonisiner med omkring 70%<sup>1)</sup>.

## E-mail-adresser

Kristian Fog Nielsen: kfn@bio.dtu.dk

Anita Iversen: aive@bio.dtu.dk

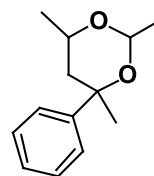
## Fodnote

<sup>1)</sup> Van der Westhuizen et al (2011). Optimising sorting and washing of home-grown maize to reduce fumonisin contamination under laboratory-controlled conditions. Food Control 22:396-4



## ... Psykotrop duft af jasmin

Benzodiazepiner hører til blandt verdens mest ordinerede psykotrope mediciner. Men de kan føre til afhængighed, depression, svimmelhed, forhøjet blodtryk, muskelsvækkelse og formindsket koordinationsevne. Det er nu vist at duften af jasmin (*Gardenia jasminoides*) har samme hypnotiske og afslappende effekt som benzodiazepiner eller barbiturater. Ved forsøg med mus viser det sig, at en komponent i duften – vertacetalcoeur og en syntetisk modifikation stimulerer virkningen af organismens γ-aminosmørsyre (GABA) mere end fem gange. Det er netop GABA, der fremmer den beroligende, angstdæmpende og aggressionshæmmende virkning.



2,4,6-trimethyl-4-phenyl-1,3-dioxan fra jasmin har samme virkning som den syntetiske 4'-methylphenylanalog.

Carsten Christophersen

Fragrant Dioxane Derivatives Identify β1-Subunit-containing GABA<sub>A</sub> Receptors O. A. Sergeeva et al. Journal of Biological Chemistry 2010, Bind 285, Side 23985-23993.