

Aflatoxin Analytik

HPLC Analytik und photochemische Nachsäulenderivatisierung

Aflatoxine sind natürlich vorkommende Toxine und gehören zur Gruppe der Mykotoxine (Pilzgifte), die für Säugetiere stark toxisch sind. Die Aflatoxine werden von Schimmelpilzen (*Aspergillus flavus*) erzeugt und sind stark leberkanzerogen.

Aflatoxine kommen in Nüssen (Erdnüsse, Paranüsse,...), Getreide, getrockneten Paprika und vielen anderen pflanzlichen Lebensmitteln vor.

Die Kürzel der Aflatoxine setzen sich zusammen aus der Farbe ihrer Fluoreszenz (*Blau* oder *Grün*) bzw. ihres Vorkommens (*Milch*) und der relativen chromatographischen Mobilität (*1* oder *2*).

Aflatoxin M1 (M = Milk) wird aus Aflatoxin B1 nach der Futteraufnahme im Organismus des Tiers gebildet und findet sich in der Milch wieder.

Wegen der schädlichen Wirkung auf den Menschen, wird der Maximalgehalt einiger Mykotoxine in zahlreichen Matrices in EU-Verordnungen reglementiert (etwa EG No. 1881/2006).

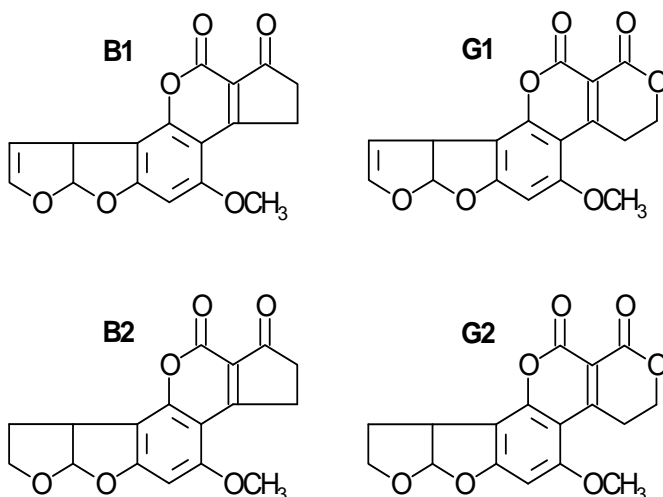


Abb..1: Strukturen der Aflatoxine

Methodenbeschreibung

Zur Messung von Aflatoxinen mittels HPLC und Fluoreszenz-Detektion ist es oft notwendig, die Untersuchungen unter Einbeziehung einer Nachsäulenderivatisierung durchzuführen. Ansonsten können die zum Teil sehr niedrigen Werte für die zulässigen Höchstwerte an Aflatoxinen in Lebensmitteln auf Grund der geringen Eigenfluoreszenz der beiden wichtigsten Aflatoxine B1 und G1 oft nicht erreicht werden.

Die Empfindlichkeit der Messung wird durch die Derivatisierung von Aflatoxin B1 und G1 deutlich erhöht und in Kombination mit modernen HPLC-Anlagen bzw. Fluoreszenz-Detektoren kann auf weitere arbeitsintensive Schritte wie Aufkonzentrieren zur Trockene und Wiederauflösen in einem geringen Volumen HPLC-Laufmittel oft verzichtet werden. Auch können die Matrixbeladungen generell niedriger ausfallen, so dass über den gesamten Prozess vorteilhaft gearbeitet werden kann.

Entsprechend den Matrixerfordernissen, werden die Aflatoxine aus der jeweiligen Matrix mit organischen Lösungsmitteln wie Methanol oder Acetonitril extrahiert. Der nächste Schritt ist eine Aufreinigung des verdünnten Rohextrakts mittels Immunoaffinitäts-Säulen gefolgt von HPLC, Derivatisierung und Fluoreszenz-Detektion bei 365/460 nm. Die Trennung wird auf einer speziellen analytischen 150 mm Säule mit Vorsäule durchgeführt, die sich durch eine kurze Laufzeit bei gleichzeitiger Basislinien-Separation auszeichnet.

Die erzielbaren Nachweisgrenzen liegen je nach System und Aufarbeitung im unteren ppt-Bereich.

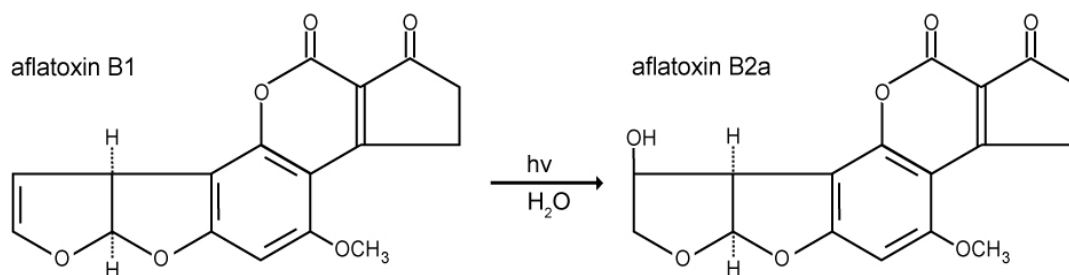


Abb. 2: Photochemische Derivatisierung von Aflatoxin B1 zu B2a



Abb. 3: 3 mL AlaCLEAN™
Immunoaffinitätssäulen

UVE™ - Photochemische Nachsäulenderivatisierung

Wie bereits oben beschrieben, weisen nur die Aflatoxine B2 und G2 eine Eigenfluoreszenz auf, deshalb müssen B1 und G1 zur Bestimmung derivatisiert werden. Dies kann einfach, bequem und kostengünstig mit dem UVE™ durch photochemische Bestrahlung mit UV-Licht bei 254 nm durchgeführt werden.

Der UVE™ wird einfach mit dem Säulenausgang der HPLC und dem Einlass des Fluoreszenz-Detektors verbunden. Es werden keine Reagenzien benötigt, da das im HPLC-Eluenten vorhandene Wasser als solches fungiert. Ein weiterer Vorteil ist die direkte Bestätigungsanalyse durch simples Ausschalten des Gerätes ohne anhaltende Derivatisierung durch Nachbluten an Reagenzien.

Die Vergleichbarkeit der Methode mit der gängigen Derivatisierung durch Brom wurde bereits in einer Veröffentlichung (A. Papadopoulou-Bouraoui, J. Stroka, E. Anklam, J. AOAC Intl. 85, No. 2, 2002, 411 – 416) gezeigt. Das System findet bereits weltweit erfolgreich Verwendung in akkreditierten behördlichen wie privaten Laboratorien und konnte auch in FAPAS Ringversuchen 0490/2006 „Aflatoxin-Analyse in Pistazien“ und, 04143/2009 „Aflatoxin Analysis in Baby Food“ und 04148/2009 „Aflatoxins B&G in Maize“ sehr erfolgreich bestehen.

Durch die photochemische Reaktion, welche der UVE auslöst, werden die Aflatoxine B1 und G1 hydroxyliert (formal eine Anlagerung von Wasser an die Doppelbindung), was zu einer stabilen messbaren Fluoreszenz führt. Durch die photochemische Umsetzung werden die chemischen bzw. messtechnischen Eigenschaften der anderen Aflatoxine (B2, G2) nicht verändert.

Die Bestimmungsgrenze wird im Wesentlichen von der Probenvorbereitung und insbesondere von der Leistungsfähigkeit des Detektors beeinflusst. Ist diese ausreichend empfindlich, können die Aflatoxine ohne weitere Schritte nach der Elution von der AflaCLEAN™- bzw. Afla-OtaCLEAN-Säule gemessen werden.



Abb. 4: UVE™, Modul für die photochemische Derivatisierung.

UVE™, Technische Daten

Spannungsversorgung	220 – 265 V, 50/60 Hz
Leistungsaufnahme	100 W
Maße (B x H x T)	145 x 100 x 275 mm
Gewicht	3 kg
Reaktorschleife	1 mL

UVE™ ist ein Markenzeichen der LCTech GmbH, Dorfen, Deutschland

Chromatogramme

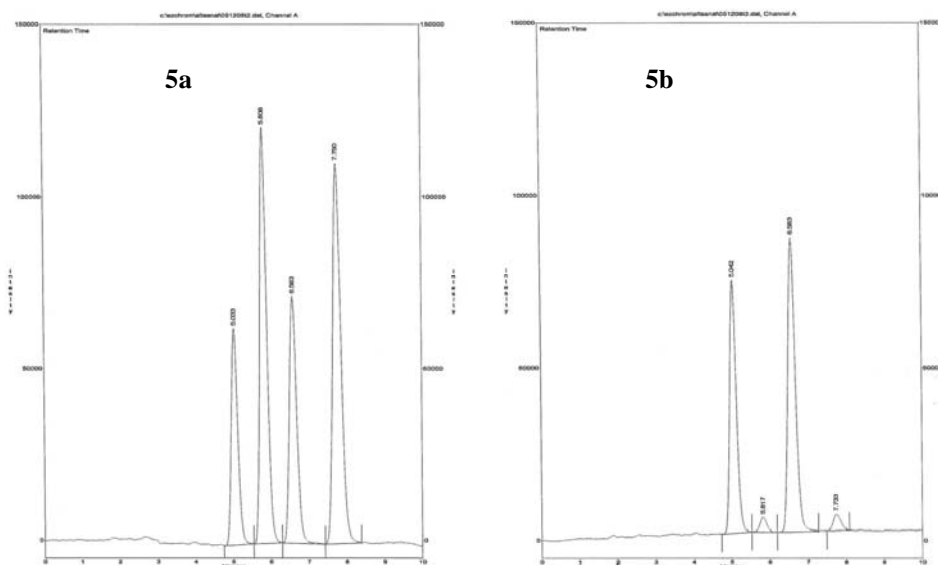


Abb. 5: Chromatogramme der Aflatoxine G2 (5.0 min), G1 (5.8 min), B2 (6.6 min) und B1 (7.7 min); gemessen auf LCTechs spezieller Säule mit Vorsäule für die Aflatoxin-Analytik. 5a: Nach photochemischer Derivatisierung bei 254 nm mit dem UVE™. 5b: Ohne Nachsäulenderivatisierung (UVE™ ausgeschaltet). Die Fluoreszenzverstärkung ist ungefähr 30-fach für die Aflatoxine B1 bzw. G1. Die injizierten Mengen waren 0.25 ng (B2, G2) und 1 ng (B1, G1) in jedem Chromatogramm. Die Peakbreite von Aflatoxin B1 auf halber Peakhöhe in Abb. 5a beträgt 13.6 s.

Literatur

- 1) A. Papadopoulou-Bouraoui, J. Stroka, E. Anklam, J. AOAC Intl. 85, No. 2, 2002, 411 – 416
- 2) V.S. Sobolev, J.W. Dorner, J. AOAC Intl. 85, No. 3, 2002, 642 – 645
- 3) AOAC Official Method 2005.08, Aflatoxins in Corn, Raw Peanuts, and Peanut Butter; Liquid Chromatography with Post-Column Photochemical Derivatization

HPLC	
Betriebsmodus	Isokratisch
Eluent	Wasser/Acetonitril/Methanol (60/15/30 // v/v/v)
HPLC-Säule	150 x 4.6 mm; C-18 mit Vorsäule
Säulentemperatur	36 °C
Flussrate	1,2 mL/min
Injektionsvolumen	10 – 100 µL
Nachsäulenderivatisierung	
Photochemischer Reaktor UVE™	254 nm
Reaktorvolumen	1 mL
Detektion	
Messart	Fluoreszenz-Detektion
Anregungswellenlänge	365 nm
Emissionswellenlänge	430 nm

Bestellinformationen	
10519	Photochemischer Reaktor UVE™, 1 mL Reaktorvolumen
10563	Ersatz UVC Lampe
10520	Ersatz Reaktorschleife, 1 mL
10514	AflaCLEAN™, Immunoaffinitäts-Säulen, 3mL PP widebore, 25/Pck
11022	Afla-OtaCLEAN, Immunoaffinitäts-Säulen, 3mL PP widebore, 25/Pck
10522	Analytische Säule für die Aflatoxin Analytik, 150 x 4.6 mm, C18
10750	Vorsäulenhalter mit 3 Kartuschen 10523 für 10522
10523	Vorsäulen für 10522, 3/Pck