



August 2017

Aflatoxine B/G in Erdnussbutter ~ manuell und automatisiert ~

Haben Sie einen speziellen Wunsch, welche Matrix wir für Sie testen sollen? Kontaktieren Sie uns per E-Mail an: mycotoxins@LCTech.de

Probenvorbereitung

MYKOTOXINE

Die Geschichte der Erdnussbutter

Die Erdnussbutter ist eine Erfindung von Dr. John Harvey Kellogg aus dem 19. Jahrhundert, der damals auch die Cornflakes erfand. Er pürierte Erdnüsse, um ein nahrhaftes Lebensmittel für Patienten ohne Zähne zu erhalten. Heute geht etwa die Hälfte der Erdnussernte der USA in die Produktion von Erdnussbutter. Da das aber immer noch nicht ausreicht, werden weitere Tonnen von Nüssen und des fertigen Produkts importiert. Trotz des hohen Kaloriengehalts (90 Kalorien pro Esslöffel!), ist Erdnussbutter gesund: Es enthält reichlich Vitamin E und H und ist ein sehr guter Energielieferant. In den USA wird es als klassischer Aufstrich fürs Schulbrot verwendet, aber auch Erdnussbutter-Kekse, -Brownies oder -Kuchen sind sehr beliebt.

Beim Import von Lebens- und Futtermittel gelten EU-weit jedoch strenge gesetzliche Regelungen für den zulässigen Gehalt an Mykotoxinen. Somit ist eine effektive und aussagekräftige Analytik unerlässlich. Allein 2016 wurden von den deutschen Lebensmitteluntersuchungsämtern 177 Grenzwertüberschreitungen von Aflatoxinen B/G in Erdnüssen festgestellt mit der Folge eines Importverbots. [Quelle: RASFF-Portal]

Automatisierte Bearbeitung mit FREESTYLE SPE

Die Anzahl der SPE-Methoden ist kaum überschaubar. Die Anforderungen in den Methoden können kaum unterschiedlicher sein. Und dennoch können nahezu alle Methoden ohne Kompromisse auf dem FREESTYLE SPE automatisiert werden.

Durch die verschiedenen Varianten der Probenaufgabe ergeben sich viele unterschiedliche Anwendungsmöglichkeiten: von großvolumig bis ca. 100 mL in der Mykotoxinanalytik bis hinab zu nur wenigen µL etwa in der Forensik. Zuverlässig und konsequent werden diese Aufgaben am Tag, in der Nacht und am Wochenende bearbeitet.



Protokoll zur manuellen Bearbeitung

Versetzen Sie 20 g homogenisierte Erdnussbutter mit 2 g Natriumchlorid und extrahieren Sie die Mischung durch 100 mL Methanol/Wasser (80/20 (v/v)) und 50 mL n-Hexan, um Fette und Öle zu entfernen. Führen Sie diese Extraktion für 20 - 30 Minuten durch.

Zentrifugieren Sie den Extrakt zur Unterstützung der Phasentrennung zwischen der wässrigen und der n-Hexan Phase bei 2000 x g für 10 Minuten. Verdünnen Sie von der wässrigen (unteren) Phase 10,5 mL mit 64,5 mL PBS-Puffer. Im Falle von Präzipitationen filtrieren Sie die Probe durch einen Glasfaserfilter.

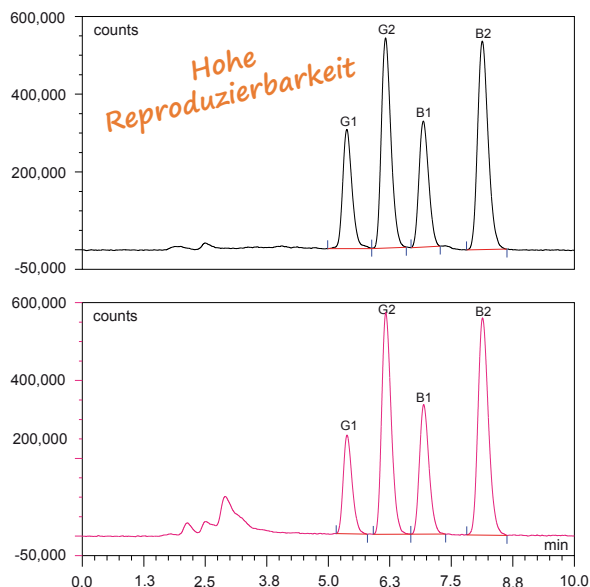
Laden Sie 50 mL (1,4 g Matrix) des Extrakts auf eine Immunoaffinitätssäule AflaCLEAN. Spülen Sie anschließend das Vorlagengefäß mit 2 x 5 mL deionisiertem Wasser und laden Sie diese Waschlösung ebenfalls auf die IAC-Säule.

Trocknen Sie die Säule und eluieren Sie anschließend mittels 2 mL Methanol. Achten Sie hierbei darauf, dass das Methanol in das Säulenbett einfließt und 5 Minuten inkubiert, um die vollständige Auflösung der Antikörper-Toxinbindung sicher zu stellen. Verdünnen und messen Sie das Eluat für die analytische Messung mittels HPLC auf Laufmittelverhältnisse.

Hervorragende Ergebnisse

Die nebenstehende Tabelle zeigt die guten Wiederfindungen und die hohe Korrelation zwischen Toxin-Beladung und Wiederfindung, die mit der AflaCLEAN Säule erzielt werden. So ist die Immunoaffinitätssäule in der Lage, in einem sehr weitem Messbereich (0,4 - >20 ppb Toxinbeladung) vergleichbar gute Wiederfindungen zu erzielen.

In den nachfolgenden Chromatogrammen sehen Sie, wie effizient die AflaCLEAN Säule eine Anreicherung der Aflatoxine B/G erzielt und gleichzeitig Störstoffe, die die Analytik negativ beeinflussen, entfernt. Sie erhalten präzise Chromatogramme ohne störende Begleitsignale.



Schwarz: Standard 14ng/2 mL (10 ppb), Rot: Erdnussbutter gespikt 10 ppb

HPLC-Laufbedingungen (Aflatoxin B/G)

HPLC	isokratisch
Säulenofen	36 °C
Trennsäule	RP C-18 (P/N 10544)
Flussrate	1,2 mL/min
Laufmittel	HPLC-Wasser/ Methanol/ Acetonitril (60/30/15 (v/v/v))
Fluoreszenzdetektion	Derivatisierung mit UVE Photochemischer Reaktor
Anregungswellenlänge	365 nm
Emmissionswellenlänge	460 nm

Wiederfindungen

Gehalte an Aflatoxin B/G in Erdnussbutter

Aflatoxine B/G	B1	B2	G1	G2
Standard*	100	100	100	100
Wiederfindungsraten** Erdnussbutter				
0,4 ppb Gesamttoxin (0,1 ppb B1)	103	100	93	79
Fehler (%)	5	2	3	3
1 ppb Gesamttoxin (0,4ppb B1)	94	93	89	74
Fehler (%)	5	2	4	3
2 ppb Gesamttoxin (0,8 ppb B1)	95	91	95	78
Fehler (%)	3	3	3	1
4 ppb Gesamttoxin (1,6 ppb B1)	91	92	91	73
Fehler (%)	6	6	6	3
5 ppb Gesamttoxin (2 ppb B1)	103	104	102	83
Fehler(%)	4	4	4	3
10 ppb Gesamttoxin (4 ppb B1)	97	98	97	75
Fehler (%)	4	4	4	4
20 ppb Gesamttoxin (8 ppb B1)	98	99	97	76
Fehler (%)	5	5	6	4

*Standard wurde 100% gesetzt, **korrigiert mit nicht gespikter Probe / Die mittleren Ergebnisse stimmen mit den Performancevorgaben der EC 401/2006 überein (Abs. 4.3.1)

Diese LC Tech Produkte kamen zum Einsatz:

AflaCLEAN, Immunoaffinitätssäule
für Aflatoxine B/G
P/N 10514 / 11721

UVE, Photochemischer Reaktor
P/N 10519

FREESTYLE SPE, Robotiksystem
für die automatisierte Probenvorbereitung
P/N 12663 / 12668