



Juli 2019

Aflatoxin B/G und Ochratoxin A in Knoblauch ~ 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

Knoblauch

Die einen lieben ihn, die anderen können den intensiven Geruch gar nicht riechen. Der Knoblauch gehört zur Gattung der Lauchpflanzen und wurde bereits im Mittelalter verwendet. Zuerst als Wirkstoff gegen die Pest, später war er aufgrund der antibakteriellen Wirkung in fast jeder Apotheke zu finden.

Grundsätzlich sagt man, dass Knoblauch Blut, Herz und Gefäße gesund hält. Der Stoff, der für die antimikrobielle Wirkung verantwortlich ist, nennt sich Allicin. Es handelt sich dabei um ein schwefelhaltiges, ätherisches Öl, das freie Radikale im Körper abfängt und zudem den typischen Geschmack verleiht.

Das ursprüngliche Verbreitungsgebiet der Pflanze reicht von Zentralasien bis zum nordöstlichen Iran. Darüber hinaus kommt er aber in vielen Ländern angepflanzt oder verwildert vor. China ist mit Abstand das wichtigste Land für den Anbau und Export von Knoblauch. Rund 80 % des Knoblauchs werden in China angepflanzt.

Der Knoblauch wird oft als Gewürz getrocknet oder in verkapselter Form verarbeitet. In diesem Prozess oder bei falscher Lagerung können Mykotoxine entstehen, die bei einer zu hohen Kontamination für den Menschen giftig sein können. Aus diesem Grund gibt es EU-weite Regulierungen, die den Grenzwert an Mykotoxinen festlegen.

Automatisierte Probenaufreinigung mit FREESTYLE SPE

Vom gefilterten und verdünnten Rohextrakt ohne manuelle Zwischenschritte zum Chromatogramm. Das ermöglicht das FREESTYLE SPE automatisiert.

Das Robotiksystem arbeitet unbeaufsichtigt 24/7 an ihren täglichen Routineaufgaben im Bereich der Mykotoxanalytik. Dies spart Ihnen Zeit im Labor, um andere wichtige Tätigkeiten auszuführen.

Die Anwendungsbereiche erstrecken sich dabei von Lebens- und Futtermittel über Umweltproben, bis hin zu forensischen Applikationen und Dopingproben. Jede manuelle SPE-Methode, die sich in Ihrem Labor bereits bewährt hat, lässt sich direkt auf das System übertragen. Sie können ihre Methoden dabei abspeichern, wiederverwenden und modifizieren.



Bearbeitungsprotokoll zu Aflatoxin B/G

Homogenisieren Sie 10 g Knoblauch und versetzen Sie ihn mit 2 g Natriumchlorid. Extrahieren Sie die Mischung durch 100 mL Methanol/Wasser (80/20 (v/v)) und 50 mL n-Hexan, um Fette und ätherische Öle zu entfernen.

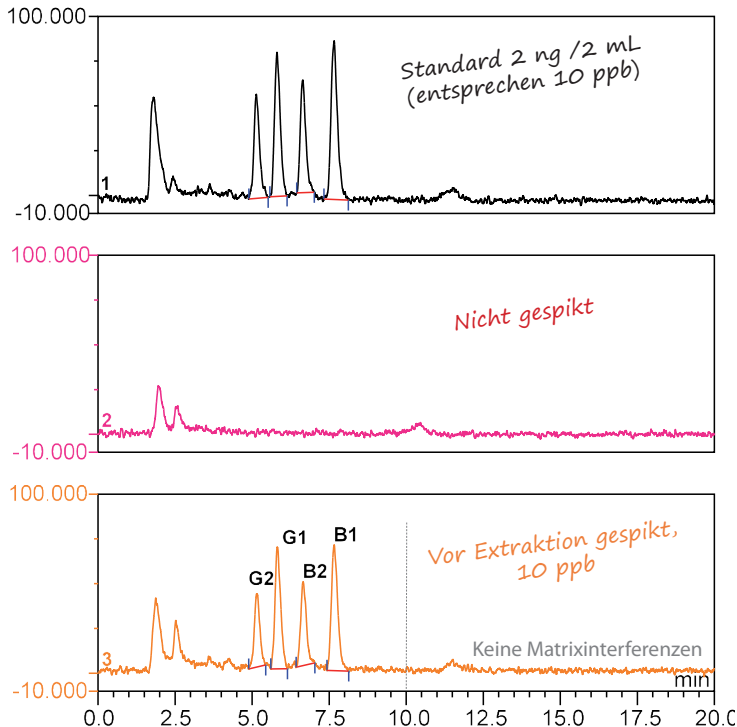
Führen Sie die Extraktion mindestens 30 Minuten durch, um hohe Extraktionseffizienzen zu erzielen.

Filtrieren Sie anschließend den Rohextrakt und verdünnen Sie 2 mL der n-Hexan freien Phase mit 12 mL PBS (enthält 8 % Tween). Laden Sie 14 mL der Probe (entspricht 0,2 g Matrix) auf eine Immunoaffinitätssäule AflaCLEAN. Waschen Sie die Säule zweimal mit 5 mL deionisiertem Wasser, um Detergenzienreste effizient zu entfernen.

Eluieren Sie die Säule mit 2 mL Methanol. Achten Sie drauf, dass das Methanol 5 Minuten in das Säulenbett einwirkt und somit die Denaturierung der Antikörper und die vollständige Freisetzung des Toxins zu gewährleisten.

Das Eluat kann nun auf das Laufverhältnis der HPLC verdünnt werden.

Chromatogramm



Analytik von Aflatoxin und Ochratoxin

LCTech entwickelte die Immunoaffinitätssäulen Afla- und OtaCLEAN für die Probenvorbereitung innerhalb der Routineanalytik. Die AflaCLEAN Säule ist für die Aufreinigung von Aflatoxine B1, B2, G1 und G2 in Lebens- sowie in Futtermitteln ausgelegt. Die OtaCLEAN Säule ist hingegen in der Lage das Ochratoxin A hochspezifisch zu binden. Auch für schwierige Matrices sind die beiden Säulen geeignet und weisen sehr gute Wiederfindungsraten auf.

Für die Analytik von beiden Mykotoxinen in einem Arbeitsgang hat LCTech eine kombinierte Immunoaffinitätssäule Alfa-OtaCLEAN entwickelt. So kann in einem Arbeitsschritt eine Probe auf Ochratoxine und Aflatoxine untersucht werden. Im Folgenden finden Sie auch ein Protokoll zur Ochratoxin A Untersuchung in Knoblauch.

HPLC-Laufbedingungen (Aflatoxin B/G)

Mykotoxin	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:	Photochemische Derivatisierung mit UVE
Anregungswellenlänge:	365 nm
Emmissionswellenlänge:	460 nm

Wiederfindungen

Gehalte an Aflatoxin B/G in Knoblauch

Mykotoxine	B1	B2	G1	G2
Standard*	100	100	100	100
Wiederfindungsraten** Knoblauch, 10 ppb (AflaCLEAN)	93	87	98	91

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

Bearbeitungsprotokoll zu Ochratoxin A

Homogenisieren Sie 20 g getrockneten Knoblauch und versetzen Sie ihn mit 2 g Natriumchlorid. Extrahieren Sie die Mischung durch 100 mL Methanol/Wasser (80/20 (v/v)) und 50 mL n-Hexan, um Fette und ätherische Öle zu entfernen.

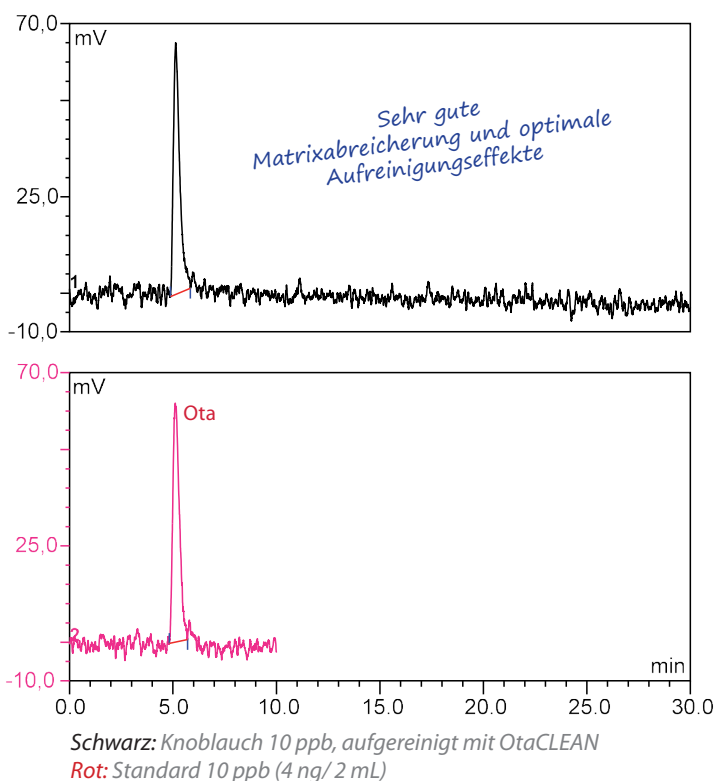
Für die Erzielung einer hohen Extraktionseffizienz, führen Sie die Extraktion mindestens 10 Minuten durch. Filtrieren Sie anschließend den Rohextrakt und verdünnen Sie 2 mL mit 12 mL PBS (enthält 8 % Tween).

Laden sie 14 mL der Probe (entspricht 0,4 g Marix) auf die Immunoaffinitätssäule OtaCLEAN. Im Anschluss waschen Sie die Säule mit 10 mL deionisiertem Wasser, um die Detergenzienreste effizient zu entfernen. Geben Sie die Waschlösung portioniert auf die Säule.

Eluieren Sie, wie zuvor für die AflaCLEAN Säule, die Säule mit 2 mL Methanol. Achten sie drauf, dass das Methanol 5 Minuten in das Säulenbett einwirkt und somit die Denaturierung der Antikörper und die vollständige Freisetzung des Toxins zu gewährleisten.

Am Ende verdünnen Sie das Eluat auf das Laufverhältnis der HPLC und Sie können nun die Probe injizieren.

Chromatogramm



HPLC-Laufbedingungen (Ochratoxin A)

Mykotoxin	Ochratoxin A
HPLC:	isokratisch
Säulenofen:	40 °C
Trennsäule:	RP EC 125/3 nucleosil 120-3 C18
Flussrate:	0,6 mL/min
Laufmittel:	HPLC-Wasser/ Methanol/Acetonitril (40/55/5 (v/v/v)) + 1 % Essigsäure
Fluoreszenzdetektion:	Ohne Derivatisierung
Anregungswellenlänge:	335 nm
Emmissionswellenlänge:	465 nm

Wiederfindungen

Gehalte an Ochratoxin A in Knoblauch

Mykotoxine	OTA
Standard*	100
Wiederfindungsraten** Knoblauch, 10 ppb (OtaCLEAN)	96

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

Diese LCTech Produkte kamen zum Einsatz:

OtaCLEAN Immunoaffinitätssäulen für Ochratoxin A
P/N 10515 / 11535

AflaCLEAN Immunoaffinitätssäulen für Aflatoxin B/G
P/N 10514 / 11721

HPLC Trennsäule RP C-18
P/N 10522

FREESTYLE SPE Robotic System für automatisierte
Probenvorbereitung
P/N 12663 / 12668

UVE Photochemischer Reaktor
P/N 10519