



Aflatoxin B/G und Ochratoxin A in Hunde- und Katzenfutter

Aufgereinigt mit *Afla-OtaCLEAN*



Probenvorbereitung

Hunde- und Katzenfutter

Die USFDA hat 2020 eine Liste von Futtermittel-Lots publiziert, die einen zu hohen Aflatoxin-Gehalt aufwiesen. In Folge der Verwendung dieser Futtermittel kamen mehrere hundert Tiere zu Schaden. Meist sind hohe Getreideanteile für die hohen Aflatoxin-Gehalte verantwortlich. Auch 2021 wurden ähnliche Befunde mit einer Erkrankung von mehreren hundert Katzen im Vereinigten Königreich in Verbindung gebracht.

Die Qualität und Prüfung der Futtermittel ist essentiell, um ein hochwertiges, gesundes Futtermittel bereitzustellen und umso schwieriger, je komplexer das Futtermittel zusammengesetzt ist. Die Zusammensetzung der Inhaltsstoffe stellt hohe Herausforderungen an die Probenvorbereitung im Bereich der Mykotoxanalytik,

die schon in geringen Dosen für die Tiere gesundheitsschädlich sein können. Aus diesem Grund ist die Entfettung und Bearbeitung mittels einer hochselektiven, spezifischen Aufreinigung im Zusammenhang mit einer effizienten Matrixreduktion hilfreich, um die quantitative Analyse zu ermöglichen und größeren Interpretationsaufwand zu minimieren.

Afla-OtaCLEAN - beste Resultate auch bei schwierigen Matrices

Die Afla-OtaCLEAN-Säulen sind im praktischen 3 mL Polypropylen-Format erhältlich, das in der Handhabung deutliche Vorteile aufweist und im Verhältnis zum Säulenbett einen kleineren Durchmesser hat. Die Immunoaffinitätssäule Afla-OtaCLEAN wurde für die Probenvorbereitung innerhalb der Lebensmittelanalytik mittels HPLC mit Fluoreszenz-Detektion bzw. LC-MS entwickelt. LC Tech bietet die perfekte Lösung um Ihre Arbeitszeit bei der Aufreinigung zu verringern. Untersuchen Sie Ihre Probe in nur einem Arbeitsschritt auf mehrere Mykotoxine.

Vorteile auf einen Blick:

- 3 mL Format
- 18 Monate haltbar bei Raumtemperatur zwischen 4 und 30° C
- Beladungskapazität Aflatoxin B1: 150 ng Aflatoxin B1
- Beladungskapazität Ochratoxin A: 200 ng Ochratoxin A
- Beste Wiederfindungen: B1 > 90 %, B2 > 80 %, G1 > 90 %, G2 > 60 %, Ochratoxin A > 90 %
- Geeignet für die automatisierte Bearbeitung



Immunoaffinitätssäulen Afla-OtaCLEAN



Bearbeitungsprotokoll

Wiegen Sie 20 g homogenisiertes Futtermittel ein und versetzen Sie diese Matrix mit 2 g Natriumchlorid. Extrahieren Sie die Toxine indem Sie 100 mL Methanol/Wasser (80/20(v/v)) und 50 mL n-Hexan zugeben. Die Extraktion geschieht optimalerweise für 3-5 Minuten in einem Ultraturrax (Blender jar) oder durch Rühren bzw. Schütteln für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur. Filtrieren Sie den Extrakt und zentrifugieren Sie das Filtrat bei 3000 xg für 5 Minuten. Für die weitere Bearbeitung verwenden Sie die untere n-Hexan freie Phase. Verdünnen Sie 2 mL der n-Hexan freien Phase mit 12 mL PBS-Puffer (8% Tween 20) und vermischen Sie die Probe vorsichtig. Die verdünnte Probe (14 mL entsprechen 0,4 Gramm Matrix) wird mit einer maximalen Flussrate von 1-2 mL/min auf die Immunoaffinitäts-säule Afla-OtaCLEAN geladen. Danach wird das Proben-vorlagegefäß zweimal mit 5 mL deionisiertem Wasser gespült und die Spüllösung ebenfalls auf die Säule geladen. Vor dem Waschen der Säule sollte sichergestellt werden, dass keine Probenreste mehr über dem Säulenbett stehen, da ansonsten die Wascheffizienz verschlechtert wird.

Nach dem Waschen trocknen Sie die Säule mit kurzem Luftstrom. Ist die Säule vollständig getrocknet, eluieren Sie das Toxin mittels 2x 1 mL Methanol. Wichtig ist ein Inkubieren des Methanols für 5 Minuten im Säulenbett, um eine vollständige Denaturierung der Antikörper zu erzielen. Eluatreste werden ebenfalls mit leichtem Überdruck aus der Säule entfernt und zusammen mit dem Eluat aufgefangen. Abschließend werden die Eluate auf Laufmittelverhältnisse verdünnt/angepasst und mittels Flüssigkeitschromatographie, Fluoreszenzdetektion oder LC-MS/MS gemessen.

Tipp vom Experten

Durch den Einsatz der photochemischen Derivatisierung (UVE) werden die Fluoreszenzintensitäten der Toxine B1 und G1 mehr als verzehnfacht. Dies erlaubt eine präzisere, schnellere Analytik ohne den Einsatz weiterer Derivatisierungsreagenzien. Die Kompatibilität der photochemischen Derivatisierung mit HPLC, aber auch mit UPLC ist gegeben und ermöglicht schnelle, basisliniengetrennte Chromatographie aller Aflatoxine und eine Reduktion von Störstoffen und halogenierten Abfällen.

Laufbedingungen

HPLC / UPLC	isokratisch
Säulenofen	36 °C
Trennsäule	P/N 10522 RP C18 150 mm
Flussrate, Laufmittel	1.2 mL/min; HPLC-Wasser/Methanol/Acetonitril (60/30/15 (v/v/v))
Fluoreszenzdetektion	Mit Derivatisierung (UVE/photochemisch)
Anregungswellenlänge	365 nm
Emissionswellenlänge	460 nm

Wiederfindungsraten**

Toxin	B1	B2	G1	G2	OTA
Standard*	100	100	100	100	100
Hundefutter 20 ppb	93	93	92	93	97
Katzenfutter 20 ppb	85	87	86	87	99

* Standard wurde = 100% gesetzt

** Korrigiert mit nicht gespikter Probe / Die Ergebnisse stimmen mit den Performancevorgaben der EC 401 / 2006 (Abschnitt 4.3.1) überein.

Fazit

Die Analyse von komplexem Tierfutter mittels Afla-OtaCLEAN erlaubt eine schnelle und valide Untersuchung auf die Schimmelpilzgifte Aflatoxin B/G und Ochratoxin A, kompatibel mit allen Flüssigkeitschromatographischen Analysemethoden, egal ob LC-MS/MS, HPLC-FLD oder UPLC-FLD. Mit hoch selektiven Aufreinigungssäulen werden schnelle, präzise Analysen und ein hoher Probendurchsatz durch kurze Chromatographie-Zeiten ermöglicht.

Diese LCTech Produkte kamen zum Einsatz:

11022	Afla-OtaCLEAN (25 Stück/VE)
10522	HPLC-Säule für Mykotoxine
10519	UVE-Photochemisches Gerät zur Aflatoxin Derivatisierung

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