

SOLUTIONS BY



Bestimmung von Aflatoxin M1 mittels FREESTYLE ThermELUTE™ mit online HPLC-Messung

Bestimmung vom Aflatoxin M1 mittels FREESTYLE ThermELUTE™ mit online HPLC-Messung

Grundlage der Methode

Aflatoxin M1 ist ein hochtoxisches Mykotoxin, das über die Aufnahme von Aflatoxin B1 durch Futtermittel in Tieren gebildet wird. Das Toxin (Abb. 1) wird in Milch, Milchprodukten, Fleisch und Eiern gefunden. Aufgrund seiner hohen Toxizität für Menschen wurden sehr niedrige Höchstmengen in verschiedenen Matrices durch die EU geregelt; siehe hierzu Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 und (EG) Nr. 165/2010.

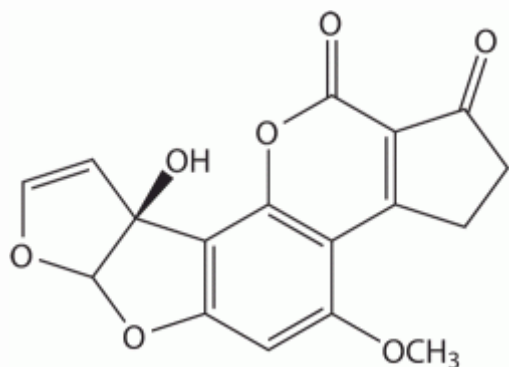


Abb. 1: Struktur von Aflatoxin M1

In der vorliegenden Applikationsnote wird das entsprechend den Vorgaben extrahierte Toxin automatisiert mit dem FREESTYLE ThermELUTE™-System bearbeitet, über die Immunoaffinitätssäule AflaCLEAN M1 SMART aufgereinigt und zur Messung online in ein HPLC-System mit Fluoreszenzdetektor injiziert.

Bedingt durch die besondere Prozesstechnik werden für den gesamten Vorgang einschließlich Aufreinigung und Messung nur rund 30 min Prozesszeit benötigt und der Analyt ohne manuelle Zwischenschritte im unteren ppt-Bereich robust gemessen.

Vorgehensweise

Die Proben werden für die jeweilige Matrix entsprechend der Vorgaben im AflaCLEAN M1 SMART-Handbuch extrahiert, verdünnt, filtriert und ein Aliquot in einem 16 mL Probengefäß in das FREESTYLE ThermELUTE™ System gestellt. Die zur Bearbeitung benötigten Immunoaffinitätssäulen werden in ein separates Rack entsprechend der benötigten Probenanzahl gestellt. Wenn die Einsatzbereitschaft der HPLC-Anlage hergestellt worden ist, kann die automatisierte Bearbeitung gestartet werden. In einem kontinuierlichen Fluss können so mehr als 70 Proben pro Tag vollständig bearbeitet und gemessen werden, da während der Messung bereits die nachfolgende Probe durch das FREESTYLE-System bearbeitet wird.

ThermELUTE™ und SMART Säulen **Die schnelle Kombination**

Materialien und Chemikalien

- | | |
|--|--|
| 1. FREESTYLE BASIC | Best.-Nr. 12663 |
| 2. FREESTYLE SPE | Best.-Nr. 12668 |
| 3. FREESTYLE ThermELUTE™ | Best.-Nr. 13691 |
| 4. Justagevorrichtung für SMART Säulen | Best.-Nr. 13768 |
| 5. Probenrack für 60 SMART Säulen | Best.-Nr. 13497 |
| 6. Träger für Racks, justierbar | Best.-Nr. 14062 |
| 7. Probenrack für 30 x 16 mL Flaschen | Best.-Nr. 11933 |
| 8. Träger für Racks | Best.-Nr. 11915 |
| 9. Gewindeflasche 16 mL | Best. Nr. V0016 (100 St./Pkg.) |
| 10. AflaCLEAN M1 SMART | Best.-Nr. 14246 (100 St./Pkg.) oder
Best.-Nr. 14248 (1000 St./Pkg.) |
| 11. Injektionsnadeln für SPE Säulen | Best.-Nr. 13544 (1000 St./Pkg.) |
| 12. Methanol für die HPLC | |
| 13. Wasser für die HPLC | |
| 14. Aflatoxin M1-Eluator | |
| 15. Standard Laborausrüstung einschließlich HPLC mit Fluoreszenzdetektor | |



Greifer nimmt Adapter



Adapter nimmt Säule



Säule wird in ThermELUTE™ Modul positioniert.

Parametrierung der Methode im FREESTYLE ThermELUTE™

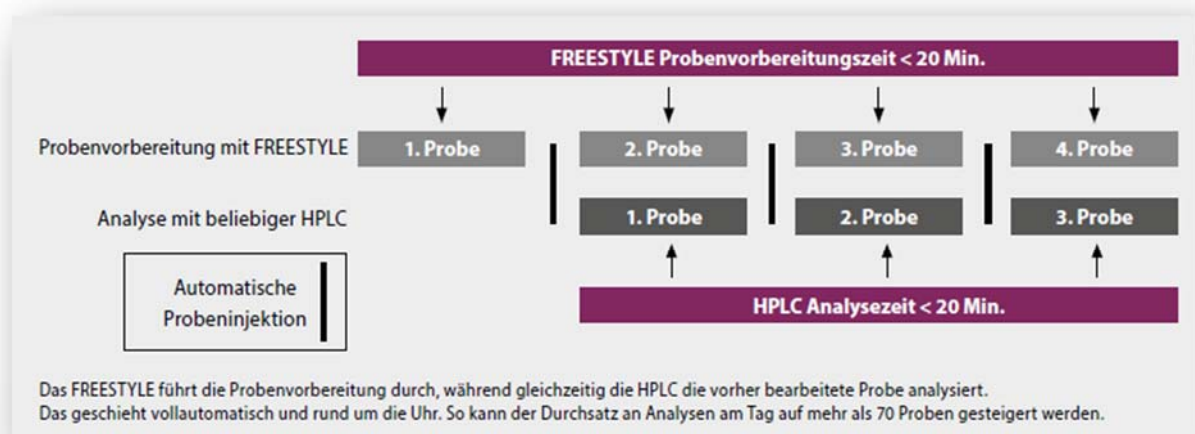
FREESTYLE™
AUTOMATISCHES PROBENVORBEREITUNG

LCTech FreeStyle - Bericht zu Methoden: ThermElute

Datum: 18.11.2014 Zeit: 10:32:53

Name: Aflatoxin_M1_Milch.tel

Säule:	AflaCLEAN_SMART.col	
Initial Systemreinigung Port:	9	40/60 methanol/wasser
Probenvolumen:	20 ml	Glastyp: Type1@60 ml
Flussrate Probe:	1 ml / min.	
Port für 1. Reinigung nach dem Laden	9	40/60 methanol/wasser
Port für 2. Reinigung nach dem Laden	1	hplc wasser
Volumen Waschlösung:	4 ml	
Flussrate Waschlösung:	1 ml / min.	
Port für 2. Waschlösung:	1	hplc wasser
Elutions Positioniervolumen:	810 µl	
	Standard = 600 µl	
Flussrate Elutionslösung:	1.5 ml / min.	
Elutionslösung:	11	Elutionsmittel
Temperatur Heizung:	98 °C	
Heizdauer:	360 sec.	
Abkühlzeit:	0 sec.	
Reinigungsschritt - Lösung aus Port:	9	40/60 methanol/wasser
Minimale Prozesszeit für längere HPLC-Messzeit abwarten		
		20 min.
Bei Laden und Waschen Maximaldruck überwachen		
Druckgrenze für Spritzenpumpe		80 digits
Wenn Überdruck ausgelöst wurde:		
Zeit von Probenstart bis Injektion für HPLC		20 min.
Maximale Anzahl von Proben mit Überdruck in Folge		3 Probe /n



Ergebnisse

Wiederfindungen und Chromatogramme

Exemplarische Wiederfindungsraten

Die Matrices wurden gemäß den empfohlenen Extraktionsprotokollen aufgearbeitet und im FREESTYLE ThermELUTE™ prozessiert.

Gehalte an Aflatoxin M1 für die verschiedenen Matrices:

Matrix	Matrixbeladung [g]	Wiederfindung [%]
Milch	10	96
Rohmilch	10	90
Milchpulver	1,0	98

Die Proben wurden mit jeweils 80 ppt (80 ng/kg) gespikt und die Wiederfindungsrate anhand einer Standardkalibrierungskurve ermittelt.

Die Wiederfindungsraten wurde um die in den jeweils nicht gespikten Proben gefundenen Toxinmengen korrigiert.

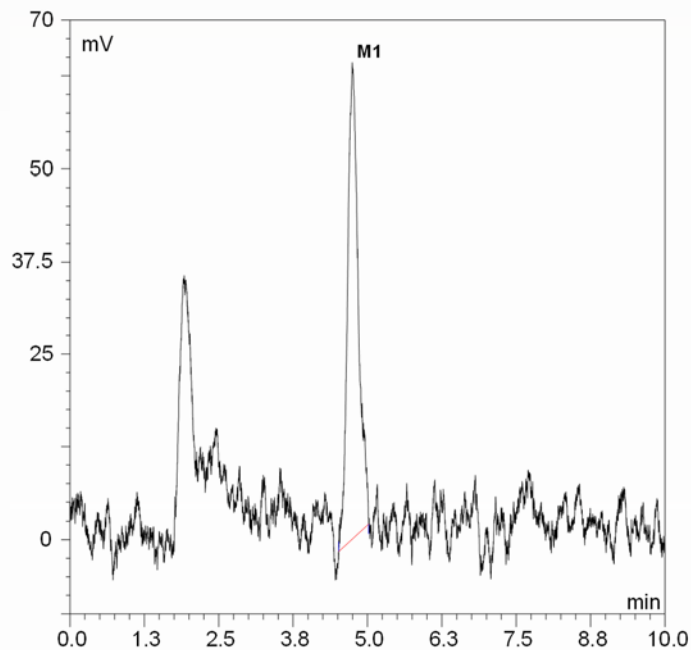


Exemplarische Chromatogramme

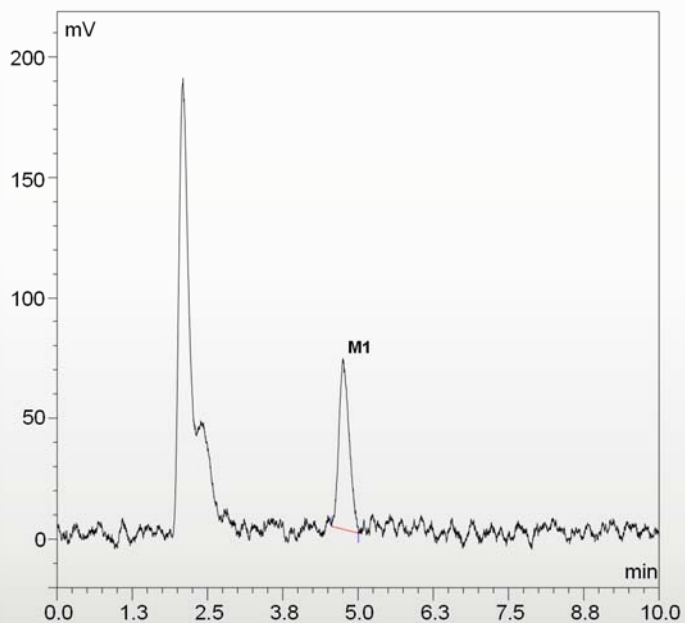
HPLC-Bedingungen:

Flussmittel:	(Acetonitril/Wasser/Methanol (15/60/30 (v/v/v)))
Flussrate:	1.2mL/min
Trennsäule:	RP C18 (LCTech P/N 10522)
Fluoreszenzdetektion	
Anregungswellenlänge:	365nm
Emissionswellenlänge:	435 nm

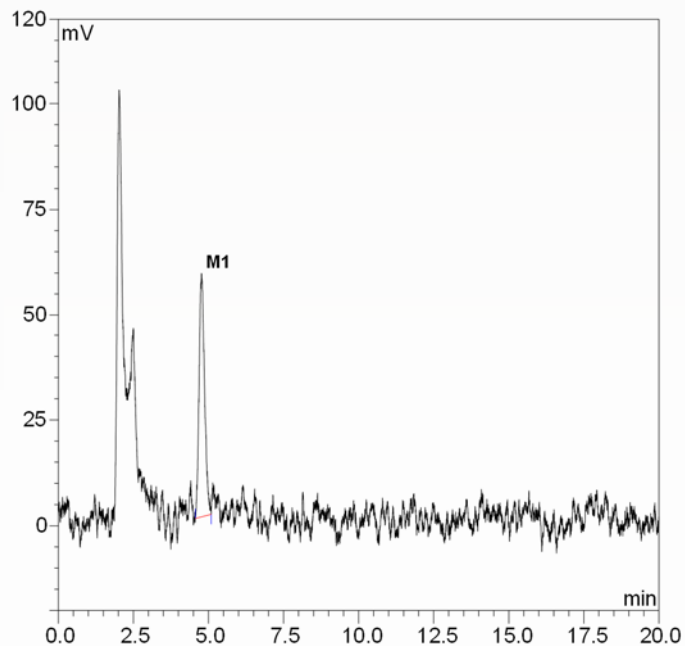
Chromatogramm eines 0,8 ng/400 μ L Aflatoxin M1 Standards



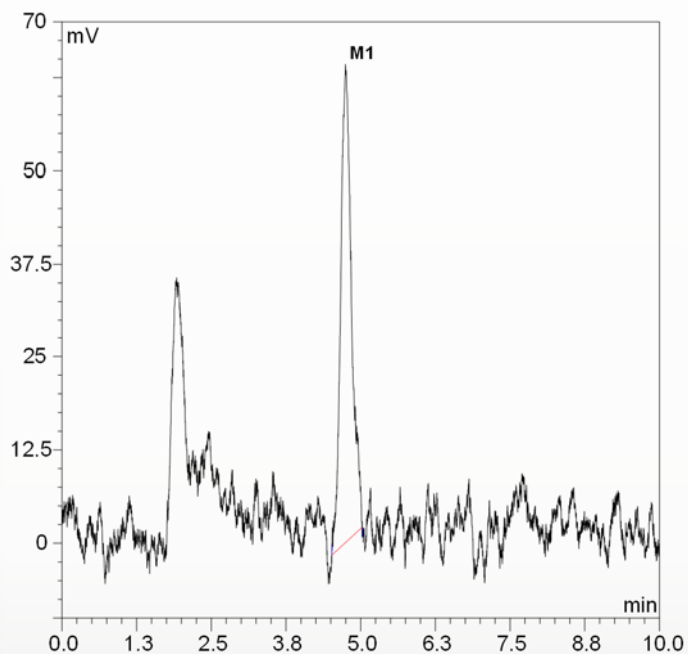
Chromatogramm von Aflatoxin M1 0,8 ng in 10 mL H-Milch (80 ppt) extrahiert, dem Protokoll für H-Milch und Rohmilch gemäß



Chromatogramm von Aflatoxin M1, extrahiert von Rohmilch gemäß der offiziellen AOAC 2000.08 Methode, gespikt mit 80 ppt Aflatoxin M1.



Chromatogramm von Aflatoxin M1, extrahiert von Milchpulver gemäß dem entsprechenden Protokoll und gespikt mit 80 ppt Aflatoxin M1.



Literatur und Regularien

- AOAC Official Method 2000.08
Aflatoxin M1 in Liquid Milk.
Immunoaffinity Column by Liquid Chromatography.
First Action 2000
- DIN EN ISO 14501:2008-01
Milch und Milchpulver - Bestimmung des Gehalts an Aflatoxin M1 - Reinigung
durch Immunaффinitäts-Chromatographie und Bestimmung mit Hochleistungs-
Flüssigchromatographie (ISO 14501:2007)
- VERORDNUNG (EG) Nr. 165/2010 DER KOMMISSION
zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 zur Festsetzung der
Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln hinsichtlich
Aflatoxinen
- H. Marina Martins, RPCV (2007) 102 (563-564) 321-325
Aflatoxin M1 determination in cheese by immunoaffinity column clean-up coupled
to high-performance liquid chromatography

Kontakt

LCTech GmbH
Daimlerstraße 4
84419 Obertaufkirchen
Deutschland

Tel.: +49 8082 2717-0
Fax: +49 8082 2717-100
E-Mail: info@LCTech.de

www.LCTech.de
www.LCTech-online.com

SOLUTIONS BY

