

SOLUTIONS BY



Bestimmung von Ochratoxin A in Kaffee mittels FREESTYLE ThermELUTE™ und online HPLC-Messung

Bestimmung von Ochratoxin A mittels FREESTYLE ThermELUTE™ mit online HPLC-Messung

Grundlage der Methode

Ochratoxin A ist ein hochtoxisches Mykotoxin, welches von verschiedenen Pilzen während der Lagerung von Matrices gebildet wird. Das Toxin (Abb. 1) kann in Kaffee, Lakritze, Gewürzen, Getreide und aus diesen Lebensmitteln hergestellten Produkten gefunden werden. Wegen der toxischen Wirkung hat die europäische Kommission (EC) einen maximalen Gehalt in verschiedenen Matrices festgelegt und diese in der Regulation No 1881/2006 festgehalten und in der Verordnung 105/2010 auch für weitere Matrices ergänzt.

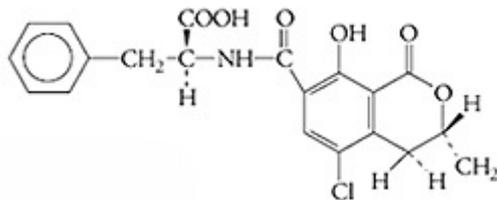


Abb. 1: Ochratoxin A

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

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 OtaCLEAN 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. OtaCLEAN SMART | Best.-Nr. 13346 (100 St./Pkg.) oder
Best.-Nr. 13351 (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. PBS Puffer verdünnt 1 zu 500 | |
| 15. PBS Puffer pH 7,4 enthält 8% Tween20 | |
| 16. Standard Laborausrüstung einschließlich HPLC mit Fluoreszenzdetektor | |



Greifer nimmt Adapter.



Adapter nimmt Säule.



Säule wird in ThermELUTE™ Modul positioniert.

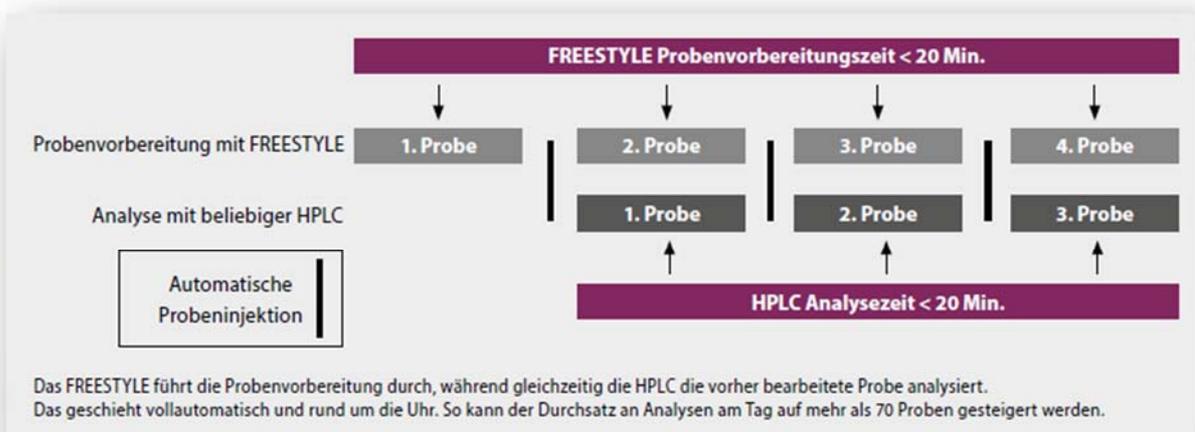
Parametrierung der Methode im FREESTYLE ThermELUTE™

FREESTYLE™
AUTOMATISIERTE PROBENVORBEREITUNG

LC Tech FreeStyle - Bericht zu Methoden: ThermELute

Datum: 14.01.2015 Zeit: 16:46:27

Name: OTA_2,8mL.tel		
Säule:	OtaCLEAN_SMART.col	
Initial Systemreinigung Port:	1	H2O
Probenvolumen:	2.8 ml	Glastyp: Type1@16 ml
Flussrate Probe:	1.5 ml / min.	
Port für 1. Reinigung nach dem Laden	7	40/60 MeOH/H2O
Port für 2. Reinigung nach dem Laden	1	H2O
Volumen Waschlösung:	2 ml	
Flussrate Waschlösung:	1.5 ml / min.	
Port für 2. Waschlösung:	9	1:500 PBS
Elutions Positioniervolumen:	810 µl Standard = 600 µl	
Flussrate Elutionslösung:	1.5 ml / min.	
Elutionslösung:	8	Eluator
Temperatur Heizung:	98 °C	
Heizdauer:	360 sec.	
Abkühlzeit:	0 sec.	
Reinigungsschritt - Lösung aus Port:	7	40/60 MeOH/H2O
Minimale Prozesszeit für längere HPLC-Messzeit abwarten	5 min.	
Bei Laden und Waschen Maximaldruck überwachen		
Druckgrenze für Spritzenpumpe	100 digits	
Wenn Überdruck ausgelöst wurde:		
Zeit von Probenstart bis Injektion für HPLC	5 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 Ochratoxin A für verschiedene Matrices:

Matrix	Matrixbeladung [g]	Wiederfindung [%]
Chili	0,08	98
Kaffee	0,08	98
Bier	1,428	97
Paprika	0,08	98
Reis	0,4	104

Die Proben wurden mit jeweils 5 ppb (5 µg/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:

Flussrate: 0,6 mL/min, Acetonitril / Wasser / Methanol (15/60/30 (v/v/v) enthält 1% Essigsäure)

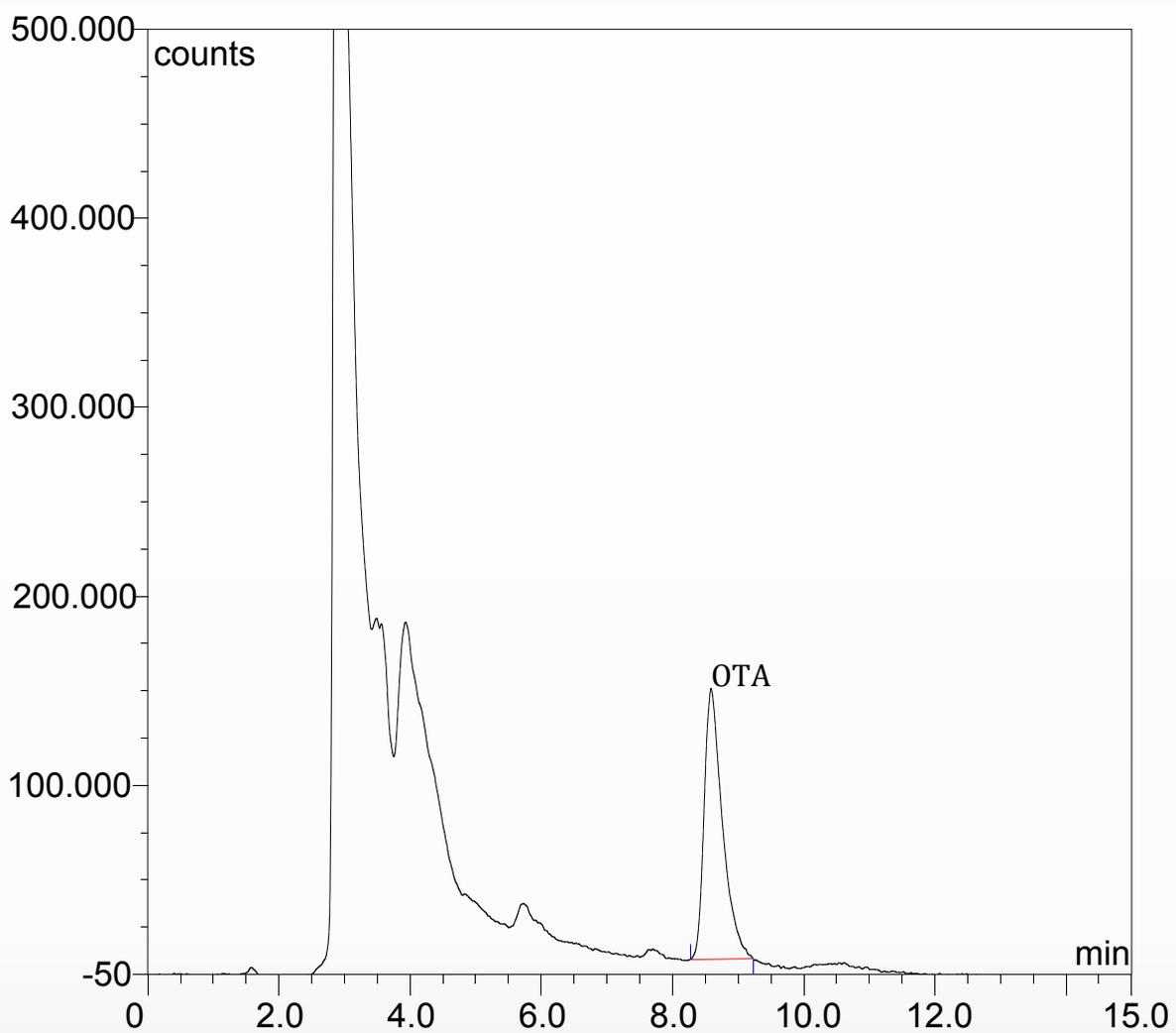
Trennsäule: RP C18 (LCTech Best.-Nr. 10522)

Fluoreszenzdetektion: UltiMate™ 3000 RS Fluoreszenzdetektor

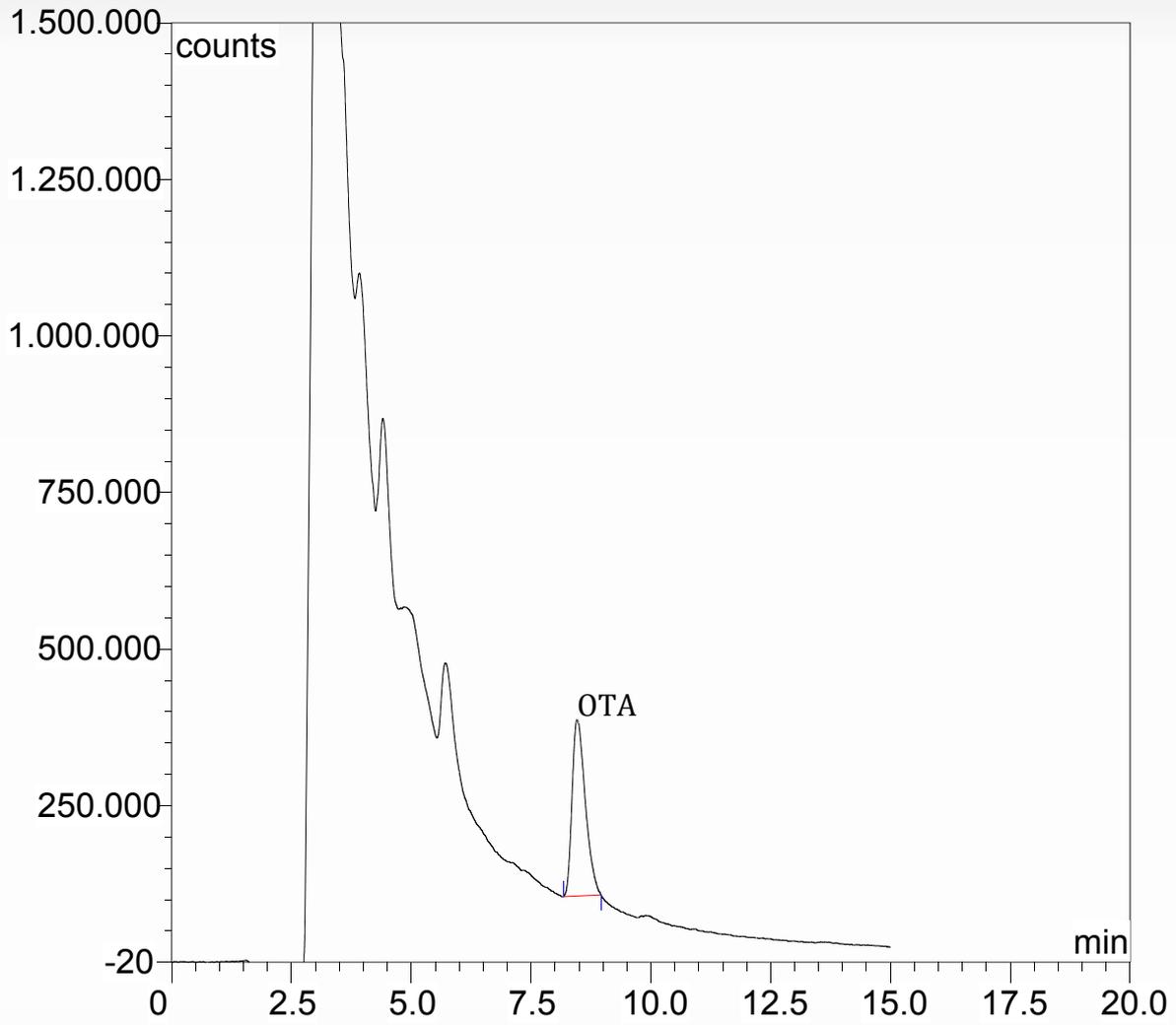
Anregungswellenlänge: 335nm

Emissionswellenlänge: 465 nm

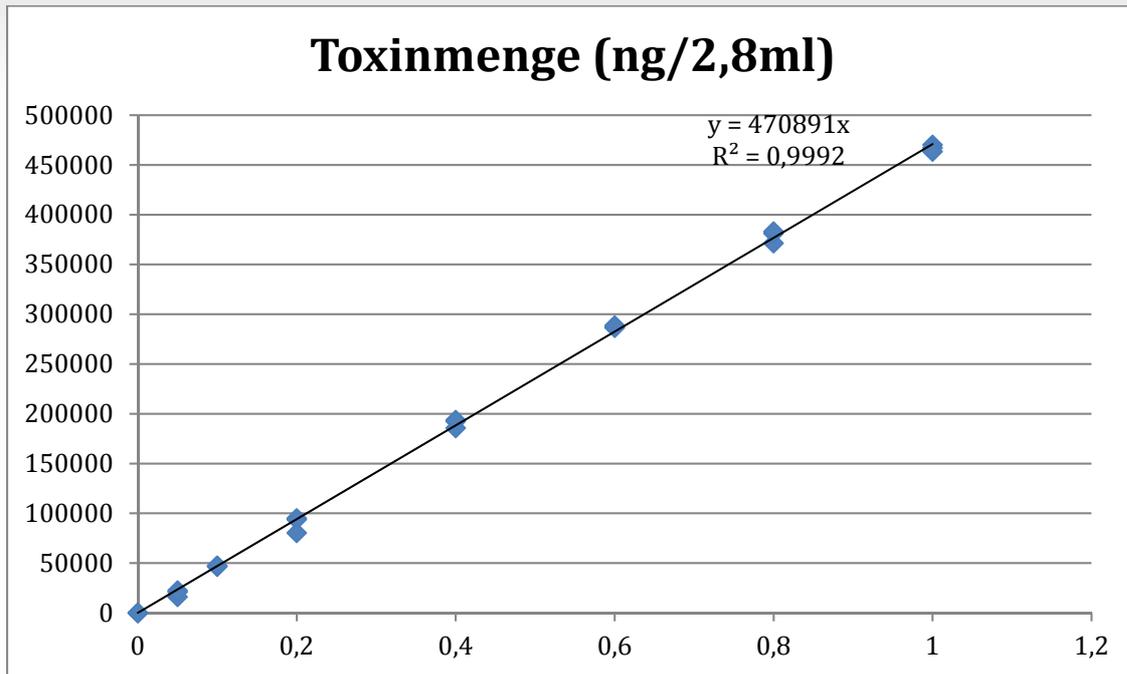
Chromatographie von Ochratoxin A 0,1 ng in 2,8 mL Probe (repräsentiert 1,25 µg/Kg (1,25 ppb)).



Real kontaminierte Kaffeeprobe (Nr. 47594)



Linearität und Reproduzierbarkeit



Von 0 bis 1 ng / 2,8 mL (0 bis 12,5 ppb) wurden drei Standards analysiert und für die Erstellung einer Kalibrierungskurve genutzt. Der Korrelationskoeffizient wurde an allen Datenpunkten berechnet (8 (n=3)). Die Nachweisgrenze, die von der Sensitivität des Fluoreszenzdetektors abhängt, wurde mit 0,05 ppb ermittelt (Signal-Stör-Verhältnis (1:5)).

Datenvergleich

Vergleich der Daten, die mittels FREESTYLE ThermELUTE™ mit HPLC und Fluoreszenzdetektion von LCTech und mit HPLC und Fluoreszenzdetektion von CR3 - Kaffeeveredlung M. Hermsen GmbH gemessen wurden.

Probe	ThermELUTE™ ppb (µg/kg)	CR3 ppb (µg/kg)
1	0,38	0,36
2	0,77	0,77
3 (no. 47594)	3,34	4,4
4	0,15	< 0,2

Identische Proben wurden in verschiedenen Laboren extrahiert und analysiert. Die Extraktion und die Aufreinigung wurden entsprechend der Extraktions- und Aufreinigungsvorgaben von OtaCLEAN durchgeführt. Der Datenvergleich zeigt eine sehr gute Korrelation.

Literatur und Regularien Danksagung

- COMMISSION REGULATION (EU) No 105/2010 of 5 February 2010 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards ochratoxin A
- P. Good, H. Kandler, P. Koch und T. Schärer, *Mitt. Lebensm. Hyg.* 93, (2002) 186-193
- P. M. Scott and S. R. Kanhere, *Food Additives and Contaminants* 12 (4), (1995) 591-598
- Visconti, M. Pascale, G. Centonze, *J. Chrom. A* 864 (1999) 89-101
- Zimmerli, R. Dick, *J. Chrom. B Biomed. Appl.* 666 (1995) 85 – 99
- Thellmann, W. Weber, *DLR* 1 93 (1997) 1-3
- S. Kastrup, U. Aulwurm, *GIT* 9, (2002) 975-977

Danksagung

Der CR3 - Kaffeeveredlung M. Hermsen GmbH, insbesondere dem Laborleiter Dr. Klaus Beckmann, danken wir ganz herzlich für die Bereitstellung der Proben und der gemessenen Daten.



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

