



Oktober 2019

Aflatoxin B/G und Ochratoxin A in Pistazien ~ 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

Pistazien

Ob salzig, als Eis oder als edle Deko auf Pralinen - Pistazien begegnen uns in den unterschiedlichsten Formen. Die Steinfrucht gehört zur Familie der Sumachgewächse. Bereits in der Antike wurde Sie als Delikatesse geschätzt, im römischen Reich sogar als Heilmittel verwendet. Die Frucht besteht zum größten Teil aus ungesättigten Fettsäuren und hat einen großen Anteil an B-Vitaminen.

Pistazien sind besonders anfällig für das Entstehen von Mykotoxinen, da Sie eine gute Grundlage für das Wachstum von Schimmelpilzen bieten, deren Stoffwechselprodukte toxische Wirkungen haben können. Ein zu hoher Anteil an Mykotoxinen kann daher für Menschen giftig sein. Aus diesem Grund finden EU-weit strenge Kontrollen beim Import von Pistazien statt. Bei einem zu hohen Mykotoxingehalt werden sie an das Herkunftsland zurückgewiesen.

Kombinierte Analytik von Ochratoxin A und Aflatoxin B/G

Aflatoxine B/G und Ochratoxine A werden oft gemeinsam in vielen Lebens- und Futtermitteln gefunden. Um die Extraktion der beiden Mykotoxine zu erleichtern, entwickelte LCTech die Alfa-OtaCLEAN Säulen für eine kombinierte Aufreinigung. Die Afla-OtaCLEAN Säulen sind im praktischen 3 mL Format erhältlich.

Zusätzlich bietet LCTech auch miniaturisierten 1 mL Säulen an. Sie können die Immunoaffinitätssäule AflaCLEAN SMART und OtaCLEAN SMART aufeinander stecken und somit ebenfalls Aflatoxine B/G und Ochratoxine A in einem Arbeitsschritt aufreinigen.

Auf der nachfolgenden Seite finden Sie ein Bearbeitungsprotokoll mit der Verwendung einer Afla-OtaCLEAN 3 mL Säule und mit einer AflaCLEAN SMART bzw. OtaCLEAN SMART Säule.



1 mL SMART Säule und 3 mL Säule

Bearbeitungsprotokoll

Homogenisieren Sie 20 g Pistazien durch 100 mL Methanol/ Wasser (80/20 (v/v)). Für die Erzielung einer hoher Extraktionseffizienz, führen Sie die Extraktion unter Verwendung einer Ultraturrax 3 - 5 Minuten und unter Verwendung eines Magnetrührers für 10 - 20 Minuten durch. Filtrieren Sie den Rohextrakt und verdünnen Sie im Anschluss 7 mL der n-Hexan freien Phase mit 43 mL PBS. Filtrieren Sie den verdünnten Extrakt durch einen Whatman Glasfaserfilter zur Entfernung von Trübungen.

AflaCLEAN SMART und OtaCLEAN SMART Säule:

Stecken Sie die AlfaCLEAN SMART Säule über den Male/Female-Luer Anschluss auf die OtaCLEAN SMART Säule. Die Säulen können durch den speziellen Anschluss druckdicht kombiniert werden. Laden Sie 10 mL Probe (entsprechen 0,28 Gramm Matrix) mit einer maximalen Flussrate von 1,5 mL/ min auf die Säulen. Spülen Sie das Probengefäß mit 2 mL deionisierten Wasser und laden Sie die Spüllösung ebenfalls auf die Säule.

Eluieren Sie die AflaCLEAN SMART und OtaCLEAN SMART mit 400 µL Methanol. Die Elution beider Säulen gleichzeitig ist möglich, insofern die Analytik eine gleichzeitige Messung der beiden Toxingruppen vorsieht. Achten Sie darauf, dass das Elutionsmittel mindestens 5 Minuten in das Säulenbett einwirkt bevor das Eluat aufgefangen wird. Trocknen Sie die Säule durch einen kurzen Luftstrom und fangen Sie Reste des Eluats auf.

Alfa-OtaCLEAN Säule:

Laden Sie 50 mL Probe auf die 3 mL Afla-OtaCLEAN Säule (entsprechen 1,4 g Matrix). Spülen Sie das Probengefäß mit 10 mL deionisiertem Wasser und laden Sie die Spüllösung ebenfalls auf die Säule. Trocknen Sie das Säulenbett mit einem kurzen Luftstrom und eluieren Sie die Toxine mit 2 mL Methanol. Achten Sie darauf, dass das Methanol 5 Minuten in das Säulenbett einwirkt und somit eine vollständige Denaturierung der Antikörper und die vollständige Freisetzung des Toxins gewährleistet wird.

Fazit:

Im Vergleich zur 3 mL Afla-OtaCLEAN Säule erhalten Sie mit AflaCLEAN SMART und OtaCLEAN SMART ein geringeres Volumen bei gleichbleibender Konzentration. Damit sparen Sie nicht nur Lösungsmittel, sondern auch Geld.

HPLC-Laufbedingungen

(Aflatoxin B/G / Ochratoxin A)

Mykotoxin:	Aflatoxin B/G	Ochratoxin A
HPLC:	isokratisch	isokratisch
Säulenofen:	36 °C	40 °C
Trennsäule:	RP C-18 (P/N 10544)	RP EC 125/3 nucleosil 120-3 C18
Flussrate:	1,2 mL/min	0,6 mL/min
Laufmittel:	HPLC-Wasser/ Methanol/Acetonitril (60/30/15 (v/v/v))	HPLC-Wasser/ Methanol/Acetonitril (40/55/5 (v/v/v)) + 1 % Essigsäure
Fluoreszenzdetektion:	Derivatisierung mit UVE Photochemischer Reaktor	Ohne Derivatisierung
Anregungswellenlänge:	365 nm	335 nm
Emissionswellenlänge:	460 nm	465 nm

Wiederfindungen

Gehalt an Aflatoxin B/G in Pistazien

Aflatoxine B/G	B1	B2	G1	G2
Standard*	100	100	100	100
Wiederfindungsraten** Pistazien, 10 ppb Afla-OtaCLEAN	86	108	110	102
rel. Fehler (%)	3	9	5	4
Wiederfindungsraten** Pistazien 10 ppb AflaCLEAN SMART	93	108	110	102
rel. Fehler (%)	3	5	3	4

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

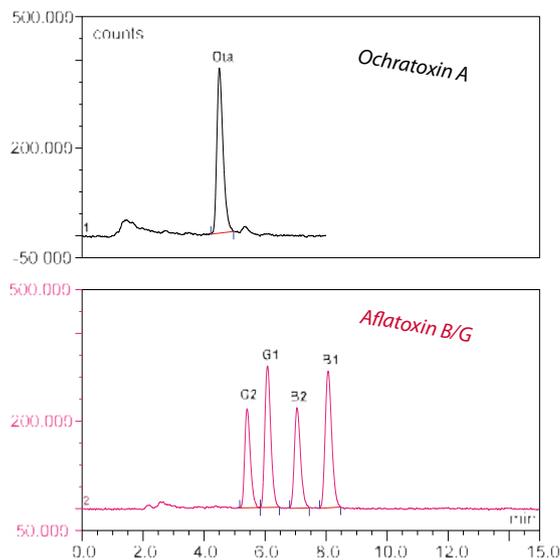
Wiederfindungen

Gehalt an Ochratoxin A in Pistazien

Mykotoxin	Ochratoxin
Standard*	100
Wiederfindungsraten** Pistazien, 10 ppb Afla-OtaCLEAN	86
Wiederfindungsraten** Pistazien 10 ppb OtaCLEAN SMART	90
rel. Fehler (%)	4

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

Chromatogramm



Pistazien, aufgereinigt mit 10 ppb



Klein + schnell + günstig = SMART

- Sowohl für die manuelle als auch für die automatisierte Bearbeitung z. B. mit dem Robotiksystem FREESTYLE ThermELUTE™ geeignet
- Deutliche Reduzierung der Bearbeitungszeit auf weniger als 20 Minuten bei wesentlichen Schritten der Aufreinigung vom Rohextrakt bis zum Eluat
- Einsparung von bis zu 80 % der Lösungsmittel
- Sehr gute Wiederfindungen für alle Matrices
- Reproduzierbare Ergebnisse
- Bessere Chromatographie und Datenanalyse
- Handliches Format der SMART Säulen

Diese LCTech Produkte kamen zum Einsatz:

OtaCLEAN SMART Immunoaffinitätssäulen für Ochratoxin A
P/N 10514 / 11721

AlfaCLEAN SMART Immunoaffinitätssäulen für Aflatoxin B/G
P/N 12862 / 12863

Alfa-OtaCLEAN Immunoaffinitätssäulen für Aflatoxin B/G und Ochratoxin A
P/N 11022 / 11771

UVE Photochemischer Reaktor
P/N 10519