



November 2019

## Aflatoxine B/G und Ochratoxin A in Schokolade ~ Manuell und automatisiert ~

Haben Sie einen speziellen Wunsch, welche Matrix wir für Sie testen sollen? Kontaktieren Sie uns per E-Mail an: [info@LCTech.de](mailto:info@LCTech.de)

### Probenvorbereitung

### MYKOTOXINE

#### Schokolade

Schokolade ist aus unserem Leben einfach nicht mehr wegzudenken. Kaum ein Mitteleuropäer kommt einen Monat ohne Schokolade aus. Sei es als Brotaufstrich, Keksfüllung, in Torten oder einfach nur als kleines „Dankeschön“ - jeder liebt sie. Der süße Genuss regt unseren Körper an, das Glückshormon Serotonin auszuschütten. Dieses wirkt direkt im Gehirn, wodurch wir uns ausgeglichen, zufrieden und glücklich fühlen.

Die zur Herstellung der Schokolade benötigten Kakaobohnen werden überwiegend aus der Elfenbeinküste und anderen Ländern rund um den Äquator importiert. Da die Bohnen nach der Ernte einen hohen Wassergehalt aufweisen, müssen diese vor dem Import nach Deutschland bzw. vor der weiteren Verarbeitung im Herkunftsland getrocknet werden. Beim Trocknungsprozess oder unter falschen Lagerbedingungen, können Mykotoxine in der Kakaobohne entstehen. Diese können für den Menschen in einem zu hohen Anteil giftig sein.

#### Probenaufreinigung leicht gemacht durch Automation mit FREESTYLE SPE

Am Tag, in der Nacht und sogar am Wochenende - das automatisierte FREESTYLE System übernimmt unbeaufsichtigt rund um die Uhr Ihre täglichen Routineaufgaben im Bereich der Mykotoxinanalytik, damit Ihnen mehr Zeit für andere wichtige Tätigkeiten im Labor bleibt.

Jede manuelle SPE-Methode, die sich in Ihrem Labor bewährt hat, lässt sich direkt auf das System übertragen. Erstellte Methoden können abgespeichert und danach wiederverwendet oder modifiziert werden.

Die Anwendungsbereiche erstrecken sich dabei von Lebens- und Futtermittel- über Umweltproben, bis hin zu forensischen Applikationen und Dopingproben.

Führen Sie einfach die auf der nachfolgenden Seite beschriebenen Bearbeitungsschritte zur Vorbereitung durch. Positionieren Sie anschließend die Schokoladenprobe im FREESTYLE SPE, parametrieren Sie in der Software mit wenigen Mausklicks die Methode und starten Sie das System - fertig.



## Bearbeitungsprotokoll

Homogenisieren Sie 10 g Schokolade und versetzen Sie die Probe 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 hoher Extraktionseffizienzen, führen Sie die Extraktion mindestens 30 Minuten durch.

Filtrieren Sie anschließend den Rohextrakt und verdünnen Sie 2 mL des Filtrats mit 12 mL PBS (enthält 8 % Tween). Im nächsten Schritt laden Sie 14 mL der Probe auf eine Immunoaffinitätsäule Afla-OtaCLEAN. Um eine effiziente Bindung der Toxine an die Antikörper zu ermöglichen, sollte die Flussgeschwindigkeit 2 mL / min nicht überschreiten.

Spülen Sie die Säule mit 10 mL deionisiertem Wasser und laden Sie die Spüllösung ebenfalls auf die Säule, um Matrixinterferenzen aus der Säule zu entfernen.

Trocknen Sie die Säule mit einem kurzen Luftstrom und eluieren Sie anschließend das Toxin mit 2 mL Methanol. Achten Sie darauf, dass das Methanol 5 Minuten in das Säulenbett einwirkt, um somit die vollständige Denaturierung der Antikörper zu gewährleisten.



## Wiederfindungen

Gehalt an Aflatoxinen B1, B2, G1, G2 in Schokolade

Aflatoxine B/G	B1	B2	G1	G2
Standard*	100	100	100	100
Wiederfindungsraten** Vollmilchschokolade, 10 ppb	98	98	84	92
Wiederfindungsrate** Noisette Schokolade, 10 ppb	102	99	86	95
Wiederfindungsrate** Zartbitterschokolade, 10 ppb	96	91	100	98
Wiederfindungsrate** Trauben-Nuss-Schokolade, 10 ppb	102	93	90	82
Wiederfindungsraten** Rum-Traube-Nuss-Schokolade, 10 ppb	100	100	90	94

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

## HPLC-Laufbedingungen

(Aflatoxin B/G / Ochratoxin A)

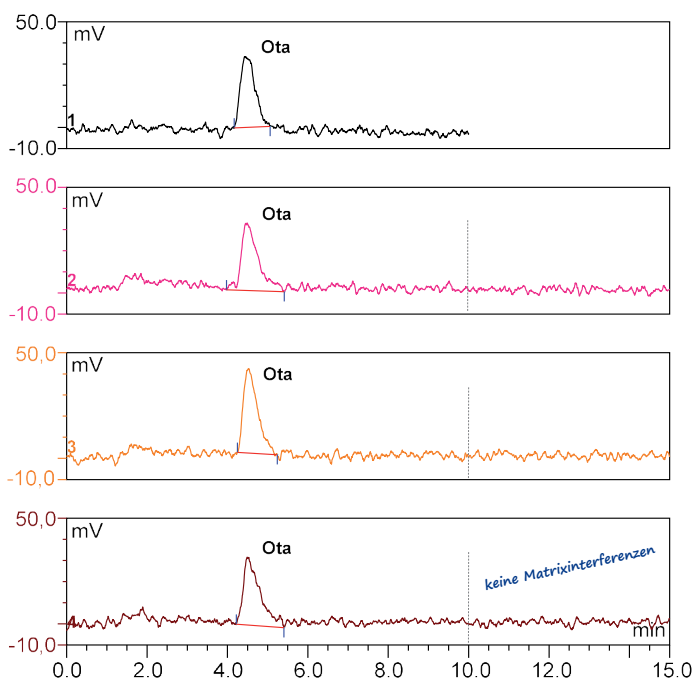
Mykotoxin	Aflatoxin B/G	Ochratoxin A
HPLC:	isokratisch	isokratisch
Säulenofen:	36 °C	40 °C
Trennsäule:	RP C-18 (P/N 10522)	RP EC 125/3 nucleosil 120-3 C18
Flussrate:	1,2 mL/min	0,6 mL/min
Laufmittel:	HPLC-Wasser/ Methanol/Acetonitril (60/30/15 (v/v/v))	HPLC-Wasser/ Methanol/Acetonitril (40/55/5 (v/v/v)) +1% Essigsäure
Fluoreszenz- detektion:	Derivatisierung mit UVE Photochemi- scher Reaktor	ohne Derivatisierung
Anregungs- wellenlänge:	365 nm	335 nm
Emmissions- wellenlänge:	460 nm	465 nm

## Wiederfindungen

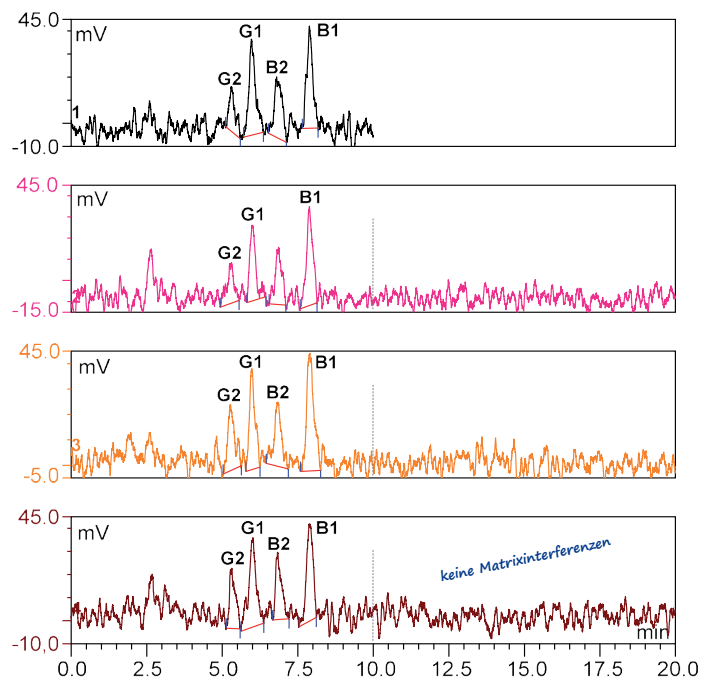
Gehalt an Ochratoxin A in Schokolade

Mykotoxin	Ochratoxin A
Standard*	100
Wiederfindungsrate** Vollmilchschokolade, 5 ppb	95
Wiederfindungsrate** Noisette Schokolade, 5 ppb	99
Wiederfindungsrate** Zartbitterschokolade, 5 ppb	99
Wiederfindungsrate** Trauben-Nuss-Schokolade, 5 ppb	94
Wiederfindungsrate** Rum-Traube-Nuss-Schokolade, 5 ppb	94

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



Schwarz = Standard 5 ppb (2 ng/2 mL)  
 Rot = Vollmilchschokolade, aufgereinigt 5 ppb  
 Orange = Noisette Schokolade, aufgereinigt 5 ppb  
 Braun = Zartbitterschokolade, aufgereinigt 5 ppb



Schwarz = Standard 10 ppb Total Aflatoxin (B1/G1 entspr. 4 ppb; B2/G2 entspr. 1 ppb)  
 Rot = Vollmilchschokolade, aufgereinigt 10 ppb  
 Orange = Noisette Schokolade, aufgereinigt 10 ppb  
 Braun = Zartbitterschokolade, aufgereinigt 10 ppb

## Alles in einem – schnell und effizient

Aflatoxine B/G und Ochratoxin A sind natürlich vorkommende Mykotoxine und werden von Pilzen bei feuchter bzw. falscher Lagerung gebildet. Um die Extraktion der beiden Mykotoxine zu erleichtern, hat LCTech die kombinierte Immunoaffinitätsäule Afla-OtaCLEAN zur Aufreinigung von Aflatoxin B1, B2, G1, G2 und Ochratoxin A entwickelt. Da LCTech sowohl Antikörper als auch Aufreinigungssäulen produziert, stellen umfangreiche Qualitätstests während des gesamten Produktionsprozesses die hohe Produktqualität sicher.



Immunoaffinitätsäule Afla-OtaCLEAN,  
für Aflatoxine B/G und Ochratoxin A

## Fazit

Die Wiederfindungsraten zeigen eine effiziente Anreicherung der Toxine trotz schwierigen Matrices, wie zum Beispiel kakaohaltige Süßspeisen. Chromatographisch sind innerhalb von 10 - 15 Minuten keine auffälligen Störstoffe detektierbar, wodurch eine schnelle und saubere Analyse Ihrer Proben innerhalb von 10 Minuten ermöglicht wird.

### Diese LCTech Produkte kamen zum Einsatz:

Afla-OtaCLEAN Immunoaffinitätsäulen  
für Aflatoxin B/G und Ochratoxin A  
P/N 11022 / 11771

HPLC Trennsäule RP C-18  
P/N 10522

UVE Photochemischer Reaktor  
P/N 10519

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