

Application Note

► Online SPE-LC Analyse von Aflatoxinen – Fortschritte in der Probenvorbereitung

Kategorie	Lebensmittel
Matrix	Nahrungsmittel
Methode	Online SPE, HPLC
Schlagwort	Aflatoxine, Coring Zelle
Analyten	Aflatoxin
ID	VFD4, Dezember 2007

Zusammenfassung

Probenvorbereitung ist für die instrumentelle Analytik von entscheidender Bedeutung sowohl für die Qualität des Ergebnisses als auch für die Geschwindigkeit der Analyse. In der Flüssigchromatographie (liquid chromatography, LC) ist die Festphasenextraktion (solid phase extraction, SPE) ein weit verbreitetes Verfahren zur Anreicherung der Analyten und zur Abtrennung von Matrixbestandteilen, insbesondere für Analyten, die nur in Spuren vorkommen, wie z. B. Antibiotika in tierischen Lebensmitteln.

Einleitung

Nachteile der klassischen manuellen SPE-Aufarbeitung sind in erster Linie der hohe Zeit- und Personalaufwand sowie eine geringere Reproduzierbarkeit im Vergleich zu automatisierten Systemen. Eine Automatisierung kann mit unabhängig von der LC-Analyse arbeitenden offline-Systemen erreicht werden oder mit parallel zur LC-Trennung arbeitenden online-Systemen. Neue Möglichkeiten für die diese online-SPE-LC-Technik eröffnet dabei die Probenvorbereitungseinheit 6300 (Abb. 1). Die Vorteile dieses Systems werden am Beispiel der Online SPE-LC-Analyse von Aflatoxinen gezeigt.

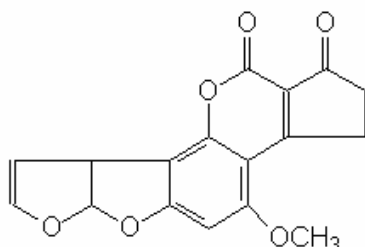
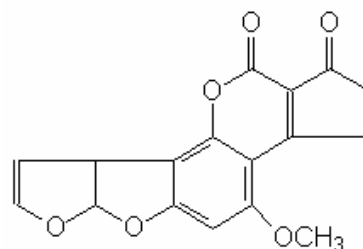
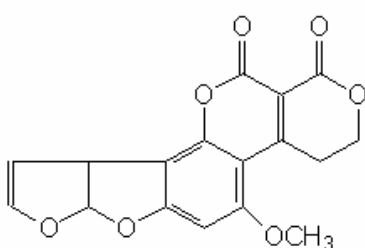
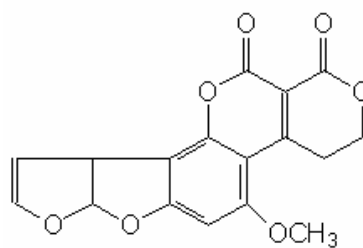


Abb. 1

KNAUER Smartline Sample Preparation Unit 6300

Aflatoxine gelten als die giftigsten Vertreter der Schimmelpilzgifte (Mykotoxine). Während die akute Toxizität (in erster Linie Leberschädigungen) in der Praxis eine eher unterordnete Rolle spielt, stellt ihre chronische Toxizität ein besonderes Problem dar. Insbesondere die ausgeprägte Cancerogenität dieser Verbindungsgruppe verdient besonderes Augenmerk [1]. Das am häufigsten auftretende Aflatoxin B1 (AFB1) gilt als stärkstes natürlich vorkommendes Cancerogen [2]. Zu den Lebensmitteln mit einem erhöhten Aflatoxin-Risiko gehören v.a. Nüsse und Samen (Pistazien, Erdnüsse etc.), Trockenfrüchte, Gewürze wie Paprika oder Pfeffer sowie Mais und andere Getreidearten [1]. Wie Warnungen der Europäischen Union zeigen, werden bei Kontrollen immer wieder Aflatoxin-belastete Lebensmittel gefunden [3].

Chemische Strukturen

Aflatoxin B₁Aflatoxin B₂Aflatoxin G₁Aflatoxin G₂

Grenzwerte

Um die Gefährdung des Verbrauchers durch Aflatoxin-belastete Lebensmittel zu minimieren, wurden vom europäischen wie auch vom nationalen Gesetzgeber eine Reihe von Grenzwerten im unteren µg/kg(ppb)-Bereich erlassen (Tab. 1), nachzulesen in der europäischen Kontaminanten-Höchstgehaltsverordnung 466/2001 [4] und ergänzend in der nationalen Mykotoxin-Höchstmengenverordnung (MHmV) [5] sowie der deutschen Diätverordnung [6]. Des weiteren wurden Details der Probenahme und der Analysemethoden festgelegt [7].

Lebensmittel	Maximalwert (µg/kg)			Rechtliche Grundlage
	B1	B1 + B2 + G1 + G2	M1	
Erdnüsse, Schalenfrüchte und Trockenfrüchte und deren Verarbeitungs-erzeugnisse ¹⁾	2,0	4,0	---	466/2001 [4]
Getreide und dessen Verarbeitungserzeugnisse ¹⁾	2,0	4,0	---	466/2001 [4]
Bestimmte Gewürze (v.a. Paprika, Chili, Pfeffer, Muskat, Ingwer, Gelbwurz)	5,0	10,0	---	466/2001 [4]
Sonstige Lebensmittel	2,0	4,0	---	MHmV [5]
Enzyme und -zubereitungen zur Lebensmittelherstellung	---	0,05	---	MHmV [5]
Diätetische Lebensmittel für Säuglinge und Kleinkinder	0,05	0,05	0,01	DiätV [6]
Beikost für Säuglinge und Kleinkinder	0,10	---	---	466/2001 [4]
Säuglingsanfangs- und Folgenahrung	---	---	0,025	466/2001 [4]
Diätetische Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke, die für Säuglinge bestimmt sind	0,10	---	0,025	466/2001 [4]
Milch	---	---	0,05	466/2001 [4] & MHmV [5]
Milcherzeugnisse	---	---	0,05	MHmV [5]

Tabelle 1.

Auswahl der wichtigsten Grenzwerte (Angaben in µg/kg)

Analytische Methoden

Für die Analyse von Aflatoxinen sind genormte Methoden wie die ASU (Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren) § 64 LFGB-Methode L 15.00-2 [8] verfügbar. Für die Probenvorbereitung stehen mit kommerziell erhältlichen Immunoaffinitäts(IA)-Säulen (z. B. von r-biopharm, Darmstadt, und Coring System Diagnostix, Gernsheim) spezielle SPE-Säulen zur Verfügung, bei denen die Aflatoxine an selektiv bindenden Antikörpern aus der Matrix isoliert und mit organischen Lösungsmitteln eluiert werden. Die erhaltenen Probenextrakte werden abschließend mittels LC analysiert, wobei die Detektion mittels Fluoreszenz nach Nachsäulenderivatisierung zumeist mittels Brom (CoBra-Zelle, Coring System Diagnostix, Gernsheim) oder Iodlösung erfolgt.

Diese Analysenmethoden zeichnen sich durch eine Reihe von Vorteilen wie hohe Selektivität und Reproduzierbarkeit und für LC-Methoden sehr niedrige Nachweisgrenzen aus. Dem gegenüber stehen relativ hohe Kosten für die nur als Einwegartikel einzusetzenden Immunoaffinitätssäulen sowie der hohe Zeit- und Personalaufwand bei der manuellen Aufarbeitung.

Bisherige Arbeiten zur Automatisierung konzentrieren sich zumeist auf den Einsatz von Automaten zur Durchführung der SPE unter Nutzung von Einweg-IA-Säulen (z.B. [9]), auch der Einsatz von selbst hergestelltem IA-Material in Verbindung mit automatisierter SPE zur Analyse von Aflatoxinen ist beschrieben [10]. Jedoch ist die Mehrfachnutzung von handelsüblichen Immunoaffinitätssäulen in der Routineanalytik bisher nicht eingeführt. Mit der **KNAUER Smartline Sample Preparation Unit 6300** besteht nun die Möglichkeit zur automatischen online-SPE-Probenvorbereitung auch in der Aflatoxin-Analytik.

Prinzip der online SPE

Die Smartline SPE-Probenvorbereitungseinheit kann in praktisch jedes HPLC-System zwischen Autosampler und Trennsäule integriert werden. Das Arbeitsprinzip ist in Abb. 2 gezeigt

Abb. 2

Schritt 1: Probenaufgabe

Der Autosampler injiziert direkt auf die mit einem geeigneten SPE-Material (hier: Immunoaffinitätsmaterial) gefüllte SPE-Kartusche

Schritt 2: Waschen

Die Smartline Probenvorbereitungseinheit 6300 pumpt Wasser über die Kartusche, um die Matrix in den Abfall zu befördern.

Schritt 3: Füllen der Transferschleife

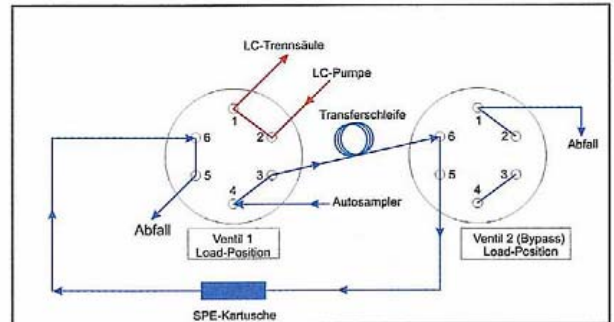
Als Besonderheit bei der Analyse von Aflatoxinen wird eine Bypass-Schaltung über das zweite Ventil genutzt, um bei jedem Transferschritt dem LC-Eluenten ein definiertes Volumen (200 µL) eines Acetonitril-Wasser (67:33, v/v)-Gemisches vorweg zu schicken. Dies erlaubt eine effektivere Elution der Analyten.

Schritt 4: Transfer-Schritt

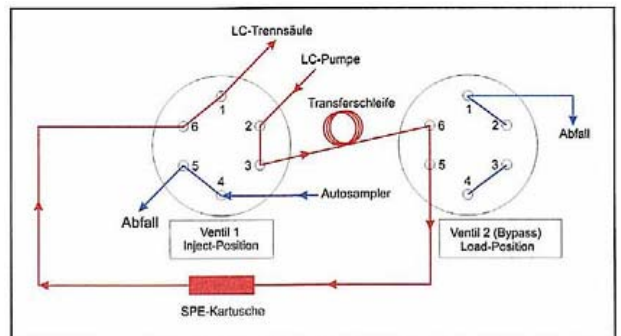
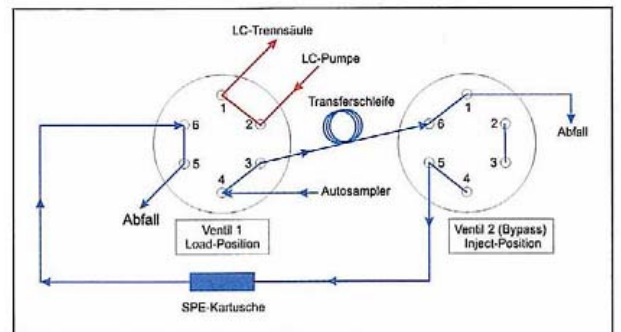
Nach Schalten des Ventils fließt der LC-Eluent von der Pumpe über die SPE-Kartusche und schiebt dabei die Füllung der Transferschleife vor sich her. Auf diesem Weg werden die Analyten auf die Trennsäule transferiert.

Schritt 5: Rekonditionierung

Parallel zur LC-Trennung wird, nach erneuter Schaltung in die Ausgangsposition, die SPE-Kartusche mit Wasser gereinigt und rekonditioniert. Danach steht sie für eine weitere automatisierte Probenvorbereitung zur Verfügung.



Schritt 1, 2 und 5: Probenaufgabe, Waschschritt, Rekonditionierung



Material und Methoden:

Probenvorbereitung

Die Probe mahlen und homogenisieren, 4 g der homogenisierten Probe in ein 30 ml-Polypropylenröhrchen einwiegen. Nach Zugabe von 20 ml Extraktionslösung (Methanol/Wasser 70:30, v/v) das Röhrchen 30 min schütteln und zentrifugieren (5 min, 6000 g). Anschließend 5 ml des Probenextrakts in ein 16-ml-Zentrifugenröhrchen pipettieren und den Methanolanteil im Stickstoffstrom bei 40 °C entfernen. Die zurückbleibende wässrige Lösung auf 5 ml mit Reinstwasser/Methanol (95:5, v/v) ergänzen, membranfiltrieren und in ein 2 ml-Autosamplergefäß abfüllen.

Tabelle 2

HPLC-Methode

HPLC-Trennsäule	RP-18, 5 µm, 250 x 4 mm
Eluent A	Destilliertes Wasser*
Eluent B	Acetonitril:Methanol, 50:50 (v/v)*
Flussrate	0,7 ml/min
Inj.-Volumen	1000 µl
Säulentemperatur	20 °C
HPLC-System	KNAUER Smartline NDG (Niederdruckgradienten)-System
Online SPE-Einheit	KNAUER Smartline Sample Preparation Unit 6300
SPE-Kartuschenfüllmaterial	Immunoaffinitätsmaterial, entnommen RIDA Aflatoxin Columns (r-biopharm, Darmstadt, Germany)
Nachsäulenderivatisierung	Coring elektrochemische Zelle (bekannt als CoBrA-Zelle, Coring System Diagnostix, Gernsheim, Deutschland)
Detektion	Fluoreszenz (Anreg. 362 nm, Em. 440 nm)
Quantifizierung	Matrixkalibrierung (Dotierung mit ca. 2 µg/kg Aflatoxin B1 und G1 bzw. ca. 0,6 µg/kg Aflatoxin B2 und G2)

* jeweils mit 100 µl HNO₃ (65%) und 119 mg KBr je Liter liter

Ergebnisse

Basierend auf dem Prinzip der klassischen ASU § 35 LMBG-Methode L 15.00-2 [8] wurde eine LC-Methode zur Analyse von Aflatoxinen entwickelt, bei der die Immunoaffinitäts-SPE-Aufarbeitung vor der LC-Trennung online mit Hilfe der **KNAUER Smartline Sample Preparation Unit 6300** (Prinzip s. oben) durchgeführt wird. Die verwendete Kartusche wird dabei mit handelsüblichem Immunoaffinitätsmaterial gefüllt. Das Problem der eingeschränkten Stabilität dieses Materials gegenüber organischen Lösungsmitteln konnte dabei durch Verwendung eines milderen Elutionsmittels (Zusatz von Wasser zum üblichen organischen Lösungsmittel) weitgehend behoben werden. Unter den beschriebenen Elutionsbedingungen ist es damit möglich, die Analyten einerseits vollständig zu eluieren. Andererseits werden die Antikörper des Immunoaffinitätsmaterials nicht nennenswert denaturiert und können somit mehrfach genutzt werden. Dies veranschaulicht Abbildung 3, die das erhaltene Chromatogramm einer Standardlösung bei der 19. Nutzung einer Immunoaffinitätskartusche im Vergleich mit der zweiten Nutzung zeigt.

Die Effektivität der Elution verdeutlicht Abbildung 4, die das Chromatogramm einer unbelasteten Probe (Tortilla-Chips aus Mais) zeigt, wohingegen Abbildung 5 eine entsprechende dotierte Probe (ca. 2 µg/kg Aflatoxin B1 und G1 bzw. ca. 0,6 µg/kg Aflatoxin B2 und G2) darstellt.

Die Leistungsdaten der Methoden an der Matrix Mehl sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Die erreichten Bestimmungsgrenzen erlauben demnach Arbeiten im Bereich der Grenzwerte (2 bis 5 µg/kg AFB1, s. [4-6]). Derzeit wird die Methode darüber hinaus an weiteren Risikolebensmitteln wie Erdnüssen, Pistazien und Maisprodukten (Abb. 5) validiert.

Ein weiterer Vorteil der online-Analytik besteht in der automatischen Wiederfindungskorrektur des SPE-Schrittes, da Standard- und Probelösungen über die gleiche Kartusche aufgearbeitet werden.

Abb. 3

Stabilität der Immunoaffinitätskartusche bei Mehrfachnutzung

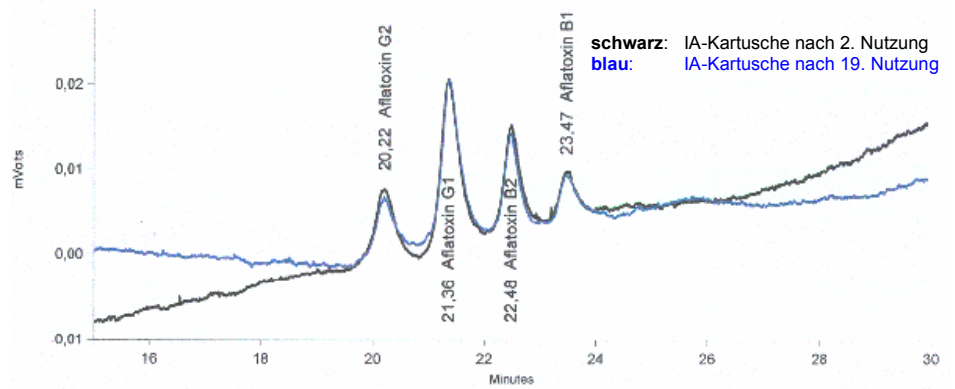


Abb. 4

Chromatogramm einer unbelasteten Probe.

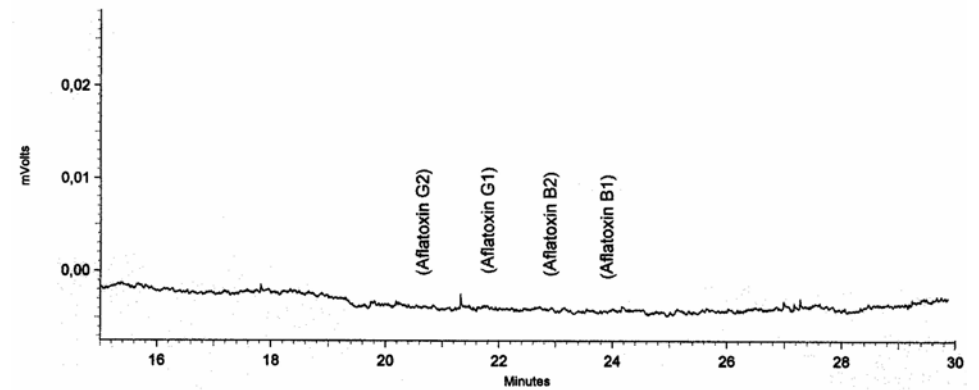
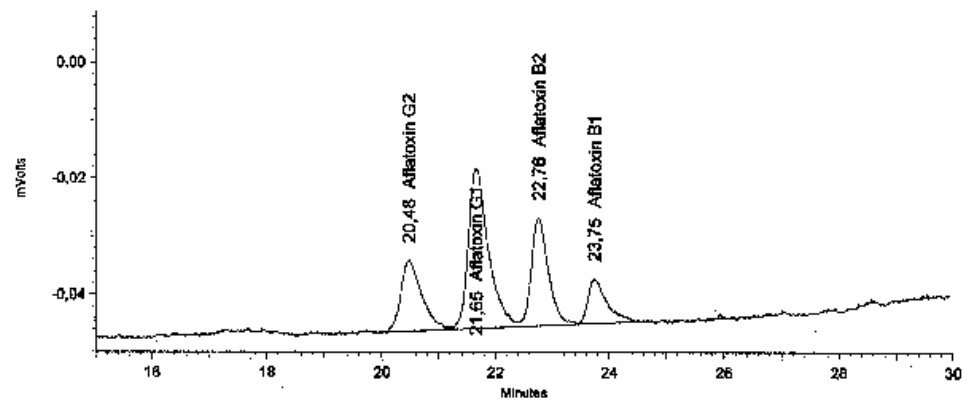


Abb. 5

Chromatogramm einer dotierten Probe (AFB1/AFG1 je ca. 2 µg/kg; AFB2/AFG2 je ca. 0,6 µg/kg)



Methoden Leistungsdaten

Tabelle 3

Online-SPE-LC-Analyse von Aflatoxinen (Matrix: Mehl).

Substanz	LOD ¹ (µg/kg)	Zusatz (µg/kg)	Mittlere Wiederfindung ² (%)	%RSD ³
Aflatoxin B ₁	1,93	92,6	92,6	8,8
Aflatoxin B ₂	0,54	96,3	96,3	9,2
Aflatoxin G ₁	2,00	94,0	94,0	6,9
Aflatoxin G ₂	0,63	92,1	92,1	27,1

¹ limit of detection (Bestimmungsgrenze); Signal/Rausch-Verhältnis = 5² n = 3 (Wiederholungsmessungen)³ drei Wiederholungsmessungen von 4 Dotierungsniveaus (ca. 1, 2, 3 und 6 µg/kg (Aflatoxine B1, G1) bzw. 0,3, 0,6, 0,9 und 1,8 µg/kg (Aflatoxine B2, G2))

Schlussfolgerung

Die hier vorgestellten Methoden zeigen am Beispiel Aflatoxine die Möglichkeiten einer automatisierten online-SPE-LC-Analyse. Die Kombination der online-SPE-Aufarbeitung mittels der **KNAUER Smartline Probenvorbereitungseinheit 6300** mit den klassischen ASU § 35 LMBG-Methoden bietet folgende Vorteile:

- kostensparend durch einfache und schnelle Probenvorbereitung mit geringem Personalaufwand unter Mehrfachnutzung des teuren Immunoaffinitäts-Säulenmaterials
- hohe Selektivität durch Verwendung spezifischer Antikörper in Verbindung mit selektiver Detektion (Fluoreszenz in Verbindung mit Nachsäulenderivatisierung)
- gute Reproduzierbarkeit aufgrund der Automatisierung
- niedrige Bestimmungsgrenzen (z. B. Aflatoxin B1: 0,2 µg/kg)

Die hier beschriebene online-SPE-Aufreinigung kann selbstverständlich auch mit jedem Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie-(LC-MS)-System kombiniert werden, so dass die hier beschriebenen Vorteile auch in Kombination mit MS-Detektion genutzt werden können.

Das Beispiel Aflatoxine zeigt dabei nur einen von vielen Anwendungsbereichen der online-SPE-Technik auf. Weitere Applikationsbeispiele aus der Lebensmittelanalytik sind:

- Antibiotika (Sulfonamide, Streptomycin, Chloramphenicol etc.)
- Pestizide (Carbendazim, Chlorfenvinphos etc.)

Literatur

- [1] Weidenböner, M.: Encyclopedia of Food Mycotoxins, Springer, 2001, p. 5 et. seq.
- [2] Squire, R.A.: Ranking animal carcinogens: a proposed regulatory approach, Science 214, 877-880 (1981)
- [3] http://www.europa.eu.int/comm/food/food/rapidalert/index_en.htm
- [4] Commission Regulation (EC) No. 466/2001 of 8 March 2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, Official Journal of the European Communities L 77/1
- [5] Verordnung über Höchstmengen an Mykotoxinen in Lebensmitteln (Mykotoxin-Höchstmengenverordnung – MHmV) vom 2. Juni 1999, BGBl. I S.1248 (German governmental regulation)
- [6] Verordnung über diätetische Lebensmittel (Diätverordnung) i.d.F. der Bekanntmachung v. 28. April 2005, BGBl. I S.1161 (German governmental regulation)
- [7] Richtlinie 98/53/EG der Kommission vom 16. Juli 1998 zur Festlegung von Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Kontrolle bestimmter Lebensmittel auf Einhaltung der Höchstgehalte für Kontaminanten, ABL. Nr. 2, 201/93
- [8] BVL, Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB), Beuth-Verlag
- [9] Sharman, M.; Gilbert, J.: Automated aflatoxin analysis of foods and animal feeds using immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatographic determination, J. Chromatogr. 543, 220-225 (1991)
- [10] Urano, T.; Trucksess, M.W.; Page, S.W.: Automated Affinity Liquid Chromatography System for On-Line Isolation, Separation, and Quantification of Aflatoxins in methanol-Water Extracts of Corn or Peanuts. J. Agric. Food Chem. 41, 1982-1985 (1993)

Autoren

**Andreas-Sascha Wendt &
Dr. Kurt-Peter Raezke**
APPLICA GmbH, Bremen, Germany
Tel.: +49 (0) 421-65727-1
a.wendt@aplica-analytik.de
www.aplica-analytik.de

Prof. Dr. Peter Winterhalter
Technische Universität Braunschweig
Tel.: +49 (0)531-391 7200
p.winterhalter@tu-braunschweig.de

Dieser Artikel wurde ursprünglich in der "GIT Labor Fachzeitschrift", Ausgabe 4/2006 veröffentlicht.

Kontakt

Wissenschaftliche Gerätebau
Dr. Ing. Herbert Knauer GmbH
Hegauer Weg 38
D-14163 Berlin, Germany

Tel: +49 (0)30 / 809727-0
Fax: +49 (0)30 / 8015010
E-Mail: info@knauer.net
Internet: www.knauer.net