

Schnell und sensitiv

Aflatoxin B1 ab einer Bestimmungsgrenze von 10 ppt analysieren

Aflatoxine sind natürlich vorkommende Schimmelpilzgifte, die zusammen mit anderen Mykotoxinen zu den wichtigsten Kontaminanten von Nahrungs- und Futtermitteln gehören. Bei der empfindlichen und schnellen Analyse eines hohen Probenaufkommens hilft moderne Laborautomation.

RITA ROTT*

Bei der Analyse von Aflatoxinen mussten im Hamburger Labor der GBA Gesellschaft für Bioanalytik bislang alle Arbeitsschritte manuell durchgeführt werden. Um dem Laborpersonal die Arbeit zu erleichtern und den Aufwand im Routinelabor zu reduzieren, setzt die GBA nun seit kurzem das modulare Robotik-System Freestyle von LCTech ein, das dank des so genannten Thermelute-Moduls die Probenvorbereitung zur Mykotoxin-Analytik vollautomatisch übernimmt. Da das Gerät direkt mit einer Standard-HPLC oder einer LC-MS kombiniert werden kann, gelangt man vom gefilterten und verdünnten Rohextrakt ohne manuelle Zwischenschritte bis zum Chromatogramm.

So lässt sich bei der Probenaufarbeitung im Labor deutlich Arbeitszeit einsparen und die Analysezahlen erhöhen. Das System verwendet eigens entwickelte Immunoaffinitätsäulen (Smart-IAC-Säulen), bei denen nur geringe Proben volumina zur Analyse notwendig sind, sowie ein thermisches Verfahren zur Denaturierung der Toxin-Antikörper-Bindung. Die Messung in Verbindung mit dem Freestyle und den Smart-Säulen ist deutlich empfindlicher als das klassische Verfahren, sodass um ein Zehnfaches niedrigere Gehalte bestimmt werden können: Bei der GBA kann Aflatoxin B1 mittels Thermelute-FLD ab einer Bestimmungsgrenze von 10 ppt bestimmt werden.

„Um den Arbeitsaufwand für die Labormitarbeiter zu reduzieren, haben wir uns für den Einsatz eines Freestyle-Systems bestehend aus der Grundeinheit mit SPE-

Modul, dem Thermelute- sowie dem Evaporations-Modul entschieden. Derzeit setzen wir die SPE- und die Thermelute-Einheit für die Aflatoxinanalytik ein“, erklärt Ingo Hoffmann, Leiter der HPLC-Abteilung bei der GBA. „Bis zur Verdünnung der Extrakte mit PBS-Puffer sind die klassische Aufarbeitung und die mit dem Freestyle identisch. Der Rest der Analyse erfolgt nach der Freestyle- und HPLC-Programmierung dann vollautomatisch“, so Hoffmann.

Weniger Lösemittel erforderlich

Nach der Extraktion erfolgen die nächsten Schritte bereits mit dem Freestyle: Als erstes wird die extrahierte, verdünnte und gefilterte Probe über das Robotik-System auf die eigens entwickelten Smart-Säulen aufgegeben, die die Standard-Immunoaffinitätsäulen mit einem Fassungsvermögen von 1 bzw. 3 mL ersetzen. „Im Regelfall nutzt der Anwender nur ein Aliquot der aufgereinigten Probe für die Injektion in das Analysegerät, muss aber dennoch enorm viel Zeit und Lösemittel für die Probenvorbereitung aufwenden. Bei den Smart-Säulen hingegen können gegenüber herkömmlichen Bearbeitungsprotokollen bis zu 80% an Zeit und Lösemitteln eingespart werden“, sagt Michael Baumann, Geschäftsführer bei LCTech. Die Smart-Säulen verfügen über eine Beladungskapazität von 100 ng Aflatoxin B1 bzw. Ochratoxin A und sind damit AOAC-konform (AOAC, Association of Analytical Communities).

Nach der Anreicherung der Aflatoxine über die Smart-Säulen werden die Säulen erst gewaschen und anschließend in einer Heizbacke erhitzt. Dadurch wird die Bindung zwischen Toxin und Antikörper aufgebrochen, im Gegensatz zu bisherigen Verfahren wird hierzu kein Lösemittel be-

*R. ROTT:
LCTech GmbH, 84405 Dorfen,
Tel. +49-8081-9368-83



1 Das neue Robotik-Gerät Freestyle übernimmt Anreicherung, Waschen, Elution und On-line-Injektion der Proben zur HPLC-FLD-Messung.

Bilder: LC Tech



2 Das modulare Robotik-System ermöglicht die vollautomatische Mykotoxin-Analytik mit Hilfe eines so genannten Thermelute-Moduls.

nötigt. Als nächstes werden die Aflatoxine mit einer wässrigen Lösung eluiert und die abschließende HPLC-FLD-Messung durchgeführt.

Zeitersparnis und Sensitivität

Die Elution erfolgt dabei direkt in die HPLC-Probenschleife und zwar als Teilbefüllung mit wässriger Lösung, ohne Zwischenschritte wie Evaporation oder Lösemittelaustausch. „Das Injektionsventil schaltet, die Probe wird auf die Säule geladen, die Analyten getrennt, danach derivatisiert und im Fluoreszenzdetektor detektiert“, erläutert Baumann. Mit dem Freestyle-System können HPLCs aller Hersteller verwendet werden.

Da ein Großteil der bislang manuellen Schritte vollautomatisiert durchgeführt wird, reduziert sich die Dauer der Probenvorbereitung von bisher rund 90 auf 20 Minuten. Zudem kann, während die HPLC die erste Probe analysiert, mit dem Freestyle bereits die nächste Probe bearbeitet

werden. Dies kann rund um die Uhr erfolgen, manuelle Eingriffe sind dabei nicht notwendig. „Da durch das Freestyle-System Arbeitszeit bei der Probenaufarbeitung eingespart wird, haben die Mitarbeiter mehr Zeit für andere Aufgaben, zum Beispiel das Vorbereiten weiterer Probenextrakte“, sagt Hoffmann. „Der Probenumsatz kann damit bei gleicher Personaldecke stark gesteigert werden. Ich halte eine Verdoppelung der Probenanzahl für realistisch.“ Bislang konnten im GBA-Labor pro Woche 180 Analysenläufe durchgeführt werden. Mit dem Freestyle in Verbindung mit einer LC können bei voller Auslastung mehr als 72 Proben am Tag und damit in der Woche mehr als 500 Proben vollautomatisch vom Extrakt zum Chromatogramm bearbeitet werden.

Das Freestyle-Gerät wird im GBA-Labor auch für sehr schwierige Proben wie beispielsweise Muskatnüsse und Pfeffer eingesetzt. „Muskatnüsse belegen teilweise die Antikörper der Immunoaffinitätsäulen, was sich durch Minderbefunde be-

LP-TIPP ■ Vollautomatisierter Nachweis

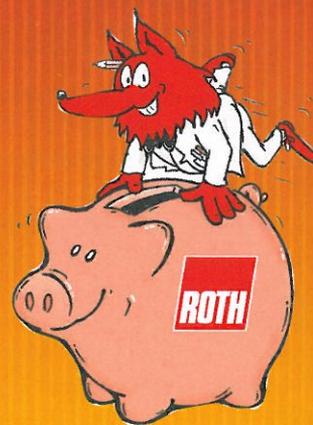
Das hier beschriebene modulare Robotik-System übernimmt vollautomatisch die Probenvorbereitung zur Mykotoxin-Analytik. Da das Gerät direkt mit einer Standard-HPLC oder einer LC-MS kombiniert werden kann, gelangt man vom gefilterten und verdünnten Rohextrakt ohne manuelle Zwischenschritte bis zum Chromatogramm. So lässt sich Arbeitszeit einsparen und die Analysezahlen auf mehr als 500 Analysenläufe pro Woche erhöhen. Das System verwendet eigens entwickelte Immunoaffinitätsäulen, bei denen nur geringe Probenvolumina zur Analyse notwendig sind, sowie ein thermisches Verfahren zur Denaturierung der Toxin-Antikörper-Bindung. Die Messung ist deutlich empfindlicher als das klassische Verfahren, sodass deutlich niedrigere Aflatoxin-Gehalte bestimmt werden können.

Sonderangebote und Neuheiten regelmäßig ...



... in den **GÜNSTIG-MAILINGS**

... aus den Bereichen Laborbedarf, Life Science und Chemikalien!



0800/5699 000 gebührenfrei

www.carlroth.de - Aktuelles

Laborbedarf - Life Science - Chemikalien

Carl Roth GmbH + Co. KG

Schoemperlenstraße 3-5 - 76185 Karlsruhe
Tel: 0721/5606 0 - Fax: 0721/5606 149
info@carlroth.de - www.carlroth.de



Bild: GBA Gesellschaft für Bioanalytik GmbH



DIGITAL: Mehr zu diesem Thema finden Sie unter dem Stichwort „Mykotoxine“ auf www.laborpraxis.de.

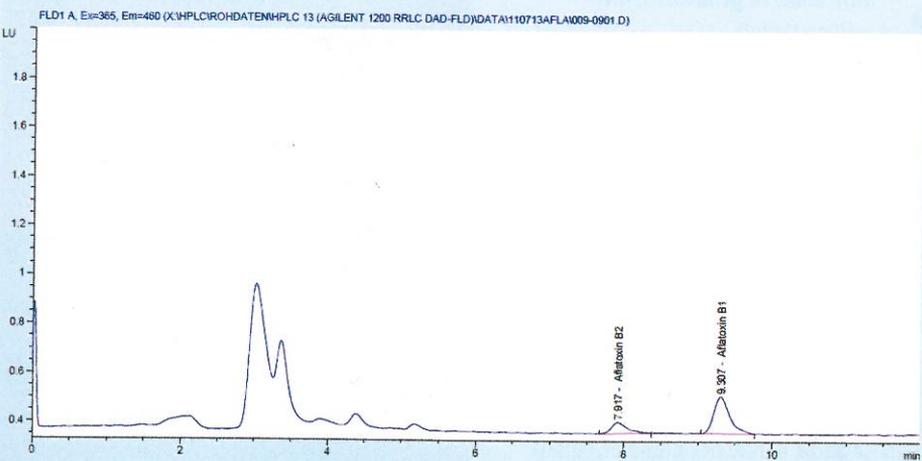
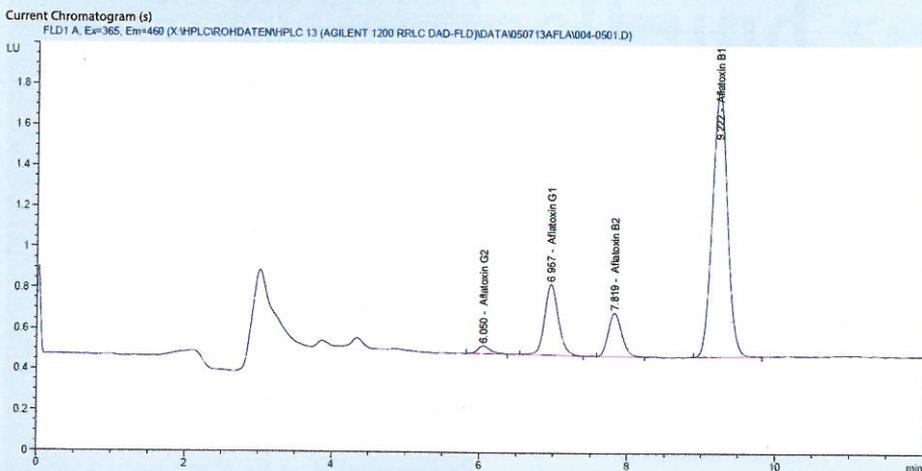
EVENTS: Besuchen Sie LCTech auf der diesjährigen Analytica vom 1. bis 4. April in München: Halle A2, Stand 400B.

SERVICES: Mehr Informationen zu den gesetzlichen Grundlagen der Analytik finden Sie unter www.lctech.de/de/gesetzliche-grundlage.

auch noch die geringsten Spuren von Mykotoxinen erkennen. Damit ist die Bestimmungsgrenze der Toxine leicht zu erreichen, was auch die Messung weit geringerer Toxinmengen ermöglicht, als in der gesetzlichen Regulation vorgesehen. Gleichzeitig garantiert dies, beispielsweise bei Babynahrung, eine besonders hohe Sicherheit und einen Überblick über die tatsächlich vorhandenen Belastungen.

Racks ermöglichen Flexibilität

Zudem zeichnet sich das Robotikgerät durch ein einfaches und flexibles Handling aus. Das System kann trotz Aufrüstung mit dem Thermelute-Modul auch für gänzlich andere SPE-Anwendungen verwendet werden – ohne jeglichen Umbau. „Beim Freestyle gibt es nur eine Plattform auf der verschiedene Racks für verschiedene Probengefäße – von 1 mL-Vials bis zu 1 L-Flaschen – kombiniert werden können, je nach Bestückung sind bis zu 180 Proben pro Probensequenz möglich“, so Baumann. Die Racks lassen sich einfach einhängen, ein spontaner Nutzungswechsel ist so innerhalb kürzester Zeit möglich. In der Software müssen dann lediglich Einhängeposition und Racktypus mit wenigen Mausklicks verbunden werden, Position, Abmessung und Volumina der Gläser sind dadurch bereits eindeutig identifiziert. Auch alle handelsüblichen SPE-Säulen im Standardformat 1 mL bis 15 mL sowie verschlossene Immunitätssäulen sind über Adapter mit dem System kompatibel. ■



4 Durch die spezielle Methodik ist die Messung mit dem Freestyle Thermelute deutlich empfindlicher als das klassische Verfahren, sodass um ein Zehnfaches niedrigere Toxin-Gehalte bestimmt werden können: Bei der GBA kann Aflatoxin B1 mittels Thermelute-FLD ab einer Bestimmungsgrenze von 10 ppt bestimmt werden. Exemplarisch Chromatogramme von Quittenkernen (oben) und Reis (unten).

merkbar macht. Pfeffer enthält eine Reihe von Substanzen, die die Chromatographie stören. Dies kann zu falsch positiven Befunden führen“, erklärt Hoffmann. Durch die Reduktion der Matrixbelastung können diese Effekte kompensiert werden. Ein wesentlicher Vorteil des Freestyle liegt zudem darin, dass die Messung durch die spezielle Methodik mit dem Freestyle Thermelute deutlich empfindlicher ist als beim klassischen Verfahren, sodass um ein Zehnfaches niedrigere Gehalte be-

stimmt werden können. Die extreme Erhöhung der Sensitivität wird durch die Direktinjektion bzw. Elution von der Säule in die Probenschleife der HPLC erzielt. „Ein quantitativer Nachweis im Bereich von 10 ppt für Aflatoxin B1 und 30 ppt für Ochratoxin A kann mit einem modernen Fluoreszenzdetektor erreicht werden“, erläutert Baumann. „Es ergeben sich vergleichbare und leicht interpretierbare Chromatogramme unabhängig von der Matrix.“ Die hohe Empfindlichkeit lässt

Online-Special: Bioanalytik



Das Special zum Thema Bioanalytik finden Sie unter:

---> www.laborpraxis.de/specials/bioanalytik

