

Kobras in der Analytik

In der Aflatoxin-Verordnung sind die Höchstwerte für einzelne Aflatoxine in Lebensmitteln festgelegt. Um die Einhaltung dieser Höchstwerte überprüfen zu können, ist es erforderlich, geringste Gehalte auch im Konzentrationsbereich unter 1 µg/kg quantitativ nachzuweisen. Während früher in erster Linie dünnschichtchromatographische Nachweisverfahren angewandt wurden, ist jetzt die Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) mit Fluoreszenzdetektion die Methode der Wahl. Gesteigert werden kann die Nachweisgenauigkeit heute noch, wenn im Untersuchungsgang eine spezifische Aufreinigung mittels selektiver Immunoaffinitätsäulen und die Derivatisierung der Aflatoxine vor der Detektion in einer speziellen Kobra-Zelle (s. Abb.) durchgeführt wird.

Zwei Innovationen – wie optimieren sie die Analytik?

Zuerst zu den Immunoaffinitätsäulen. - Nach der Zerkleinerung und Homogenisierung der Probe

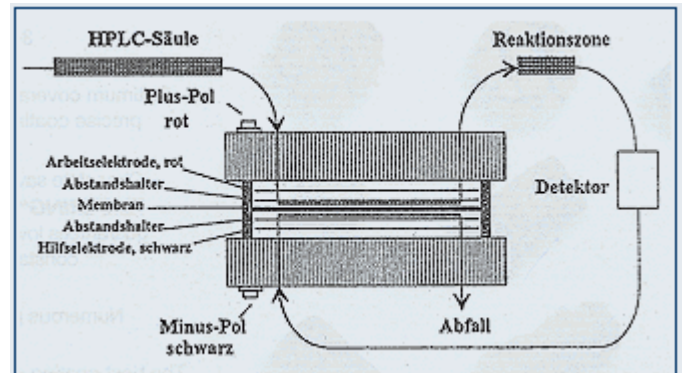
werden die Aflatoxine aus dem Probenmaterial mit einem geeigneten organischen Lösungsmittel extrahiert. Danach passiert der Extrakt die spezifischen Immunoaffinitätsäulen, die für die Isolierung der Aflatoxine B₁, B₂, G₁ und G₂ im Handel erhältlich sind. Diese Säulen enthalten eine Gel-Suspension monoklonaler Antikörper, die kovalent an eine feste Trägerphase gebunden sind. Die im Probenextrakt enthaltenen Aflatoxine werden beim Durchlaufen der Immunoaffinitätsäule quantitativ und selektiv von den speziellen Antikörpern gebunden. Störende Begleitstoffe aus der Probenmatrix können so in Waschschrritten aus der Säule entfernt werden.

Der Antikörper-Aflatoxin-Komplex wird anschließend mit einem reinen organischen Lösungsmittel denaturiert, wodurch die Bindung zwischen den Aflatoxin- und den Antikörpermolekülen wieder gelöst wird. Die Aflatoxine werden eluiert und können direkt anschließend mittels HPLC nach einem Derivatisierungsschritt quantitativ bestimmt werden.

Was geschieht bei der Derivatisierung?

Die Detektion der Aflatoxine erfolgt fluoreszenzphotometrisch. Während die Aflatoxine B₂ und G₂ eine natürliche Fluoreszenz besitzen, müssen bei den Aflatoxinen B₁ und G₁ die fluoreszierenden Eigenschaften zuvor durch eine chemische Derivatisierungsreaktion erzeugt werden. Bislang gab es hierzu zwei verschiedene Verfahren, die beide auf rein chemischen Reaktionen beruhen, die Vorsäulenderivatisierung mit Trifluoressigsäure und die Nachsäulenderivatisierung mit Jod.

Die Kobra-Zelle stellt nun eine neue innovative Methode dar, die eine Vereinfachung der Derivatisierung



bei gleichzeitiger Steigerung der Empfindlichkeit ermöglicht. Sie ist eine aus zwei Teilkammern aufgebaute elektrochemische Zelle, deren beide Teilkammern durch eine Membran voneinander getrennt sind. Diese Membran dient der elektrischen Verbindung zwischen einer Platin-Arbeits Elektrode und einer Hilfelektrode aus Stahl. Das Prinzip der Kobra-Zelle besteht nun darin, aus dem in der mobilen Phase enthaltenen Kaliumbromid das für die Derivatisierung benötigte Brom auf elektrochemischem Weg, durch Anlegen eines konstanten Strompotentials an die Platinelektrode, an der Membran zu erzeugen. Die bereits auf der HPLC-Säule aufgetrennten Aflatoxine und das elementare Brom reagieren nach Verlassen der Kobra-Zelle innerhalb von ca. vier Sekunden auf dem Weg zum Fluoreszenzdetektor zu bromierten, fluoreszierenden Aflatoxinderivaten.

Nach dieser Methode können die Aflatoxine B₁, B₂, G₁ und G₂ mit einer Bestimmungsgrenze von jeweils 0,04 µg/kg Lebensmittel sicher bestimmt werden.

SÜSSWAREN (1999) Heft 4