Eine rationelle Methode zur Bestimmung von Aflatoxin M in Milch und Milchpulver im unteren ppt-Bereich = An efficient method for the determination of aflatoxin M in milk and milk powder in the lower ppt region

Autor(en): **Steiner, W. / Battaglia, R. / Romann, E.**

Objekttyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **74 (1983)**

Heft 2

PDF erstellt am: **25.05.2024**

Persistenter Link: https://doi.org/10.5169/seals-983007

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.
Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.
Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Ein Dienst der *ETH-Bibliothek*
ETH Zürich, Rämistrasse 101, 8092 Zürich, Schweiz, www.library.ethz.ch

http://www.e-periodica.ch

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **74**, 140—146 (1983)
Eingegangen 11. April 1983. Angenommen 27. April 1983

Eine rationelle Methode zur Bestimmung von Aflatoxin M_1 in Milch und Milchpulver im unteren ppt-Bereich

An Efficient Method for the Determination of Aflatoxin M_1 in Milk and Milk Powder in the Lower ppt Region

W. Steiner und *R. Battaglia*
Kantonales Laboratorium, Zürich
(Direktor: Dr. *E. Romann)*

Einleitung

In der Milch ist ca. 1% der von einer Kuh aufgenommenen Aflatoxin-B_1-Menge als Aflatoxin M_1 zu finden (1, 2).

Tierversuche und Messungen des kovalenten Bindungsindex (CBI) in Ratten zeigten, daß Aflatoxin M_1, obwohl weniger karzinogen als Aflatoxin B_1, als starkes Hepatokarzinogen einzustufen ist (3, 4). Weil Milch (vor allem bei Kleinkindern!) eines der Hauptnahrungsmittel darstellt, ist ein tiefer Aflatoxin-M_1-Gehalt erstrebenswert. In der Schweiz gilt für Lieferantenmilch ein Grenzwert von 50 ng/kg, für trinkfertige Kindernährmittel inklusive Säuglingsmilch ein solcher von 10 ng/kg. Zur Ermittlung dieses Gehalts existieren verschiedene Methoden (5—8). Die hier beschriebene Methode zeichnet sich durch einen sehr sparsamen Verbrauch an Lösungsmitteln, einen hohen Probendurchsatz und eine tiefe Nachweisgrenze (3—5 ng/kg) aus. Der Extraktionsschritt beruht auf einer Publikation von *Winterlin* und Mitarbeitern (9).

Experimenteller Teil

Prinzip

Eine Sep-Pak-C_{18}-Kartusche dient zur Isolierung von Aflatoxin M_1 aus verdünnter Milch. Mit einem Gemisch von Acetonitril und Wasser wird das Aflatoxin M_1 eluiert und mit Dichlormethan aus dem Eluat extrahiert. Der Extrakt wird dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und der Gehalt an Aflatoxin M_1 densitometrisch ermittelt.

Reagenzien

Standardlösung M_1 (0,05 µg/ml in Toluol/Acetonitril [9 + 1], Gehalt überprüft nach 10), Bezugsquelle: Prof. Leistner, Bundesanstalt für Fleischforschung, 8650 Kulmbach/BRD

Sämtliche übrigen Reagenzien (vorwiegend Lösungsmittel) wiesen p.a.-Qualität auf.

Geräte und Materialien

20-ml-Einmalspritzen (Once, Luer)
Sep-Pak C_{18} Cartridges (Waters)
Gerät zur gleichzeitigen Verwendung von 6 Sep-Pak-Kartuschen, mit stufenloser Geschwindigkeitseinstellung (Abb. 1)
Dünnschichtchromatographie: Kieselgel 60 auf Alufolie, ohne F (Merck, Kat. Nr. 5553). Auftraggerät: CAMAG Linomat III
Densitometer: DC/HPDC-Scanner 76500 (CAMAG)

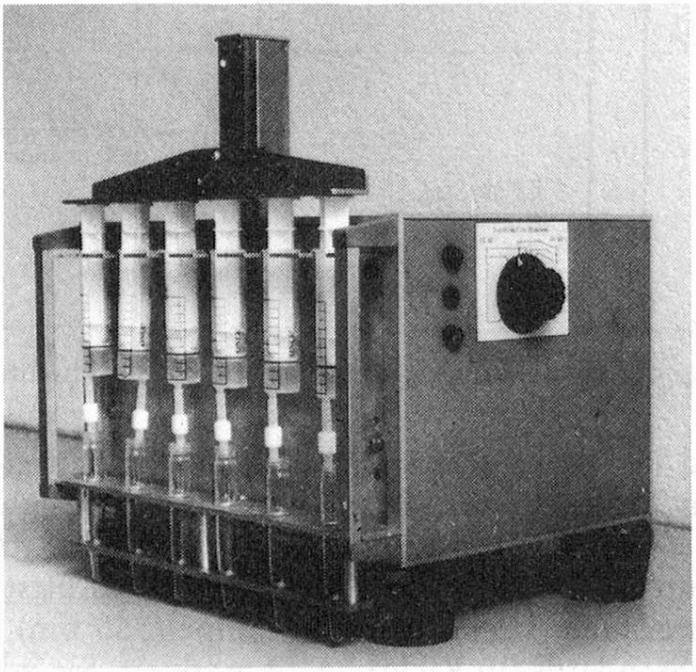

Abb. 1. Gerät zur gleichzeitigen Verwendung von 6 Sep-Pak-Kartuschen (Eigenkonstruktion)

Ausführung der Bestimmung

Aufarbeitung

Eine Sep-Pak-C_{18}-Kartusche wird mit 5 ml entionisiertem Wasser und darauf mit 5 ml Acetonitril gespült.

20 ml Milch (oder rekonstituierte Milch) werden mit entionisiertem Wasser auf 50 ml verdünnt und mit einer Einmalspritze durch die vorbereitete Kartusche

gepreßt (Fließgeschwindigkeit: 5 ml/min). Die Kartusche wird darauf mit 5 ml entionisiertem Wasser und 20 ml Acetonitril/Wasser (1+9, v/v) gespült. Aflatoxin M_1 wird anschließend mit 4 ml Acetonitril/Wasser (3+7, v/v) in ein verschließbares 15-ml-Zentrifugenglas eluiert. Mit 4 ml Dichlormethan wird das Eluat 1 min lang geschüttelt und die Emulsion zentrifugiert (3 min, 4000 rpm). Die organische Phase wird über wenig Watte in ein 10-ml-Spitzkölbchen pipettiert, die wässerige Phase noch einmal mit 2 ml Dichlormethan extrahiert und erneut zentrifugiert. Im Wasserstrahlvakuum werden die vereinigten organischen Phasen bei 40 °C gerade bis zur Trockne eingedampft und der Rückstand in 100 µl Toluol/Acetonitril (9+1, v/v) aufgenommen.

Dünnschichtchromatographie

50 µl des Extraktes (entsprechend 10 ml Milch) sowie 3mal 10 µl Standardlösung (für 50 ng/kg) bzw. 3mal 5 µl Standardlösung (für 10 ng/kg) werden in 12 cm Höhe mit einer Bandbreite von 8 mm (Linomat) auf eine Kieselgel-Alufolie aufgetragen (Abb. 2).

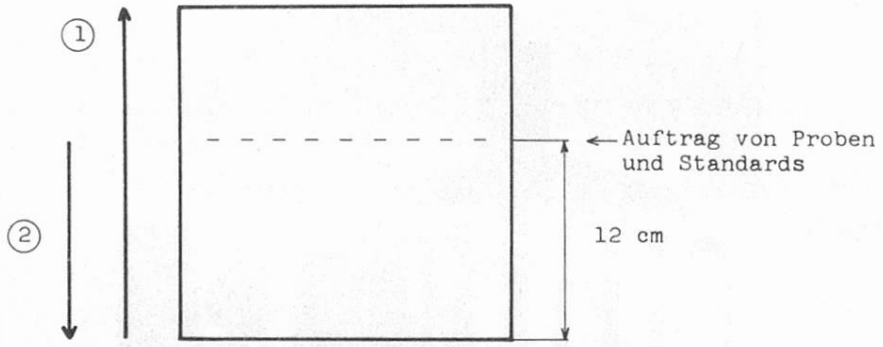

Abb. 2. Auftrags- und Entwicklungsschema für die Dünnschichtchromatographie

Die Platte wird in Diethylether (Richtung ①, ungesättigte Kammer) entwickelt. Nach kurzem Trocknen bei Raumtemperatur wird sie in Toluol/Ethylacetat/Ameisensäure (6+3+1, v/v, ungesättigte Kammer) in Richtung ① entwickelt. Die Folie wird nun 3—5 min im ca. 40 °C warmen Luftstrom getrocknet, einige Sekunden unter einer schwachen UV-Lampe (360 nm) betrachtet und 4—6 mm oberhalb der Standards (in Richtung ①) markiert. Sie wird parallel zur Auftragslinie entzweigeschnitten und in Chloroform/Aceton/Propanol-2 (87+10+3, v/v, ungesättigte Kammer) in Richtung ② entwickelt.

Die Quantifizierung erfolgt densitometrisch mit Fluoreszenzmessung (Anregung: 365 nm, Emission 435 nm; verwendet wurde ein zwischen 400 und 500 nm durchlässiges Kantenfilter).

Bestätigung von Aflatoxin M_1 (11)

Nach der densitometrischen Auswertung werden die M_1-Standards und die Flecken (bzw. Banden) mit gleichem R_f-Wert mit Bleistift markiert. 3—5 µl Trifluoressigsäure werden strichförmig auf die markierten Flecken aufgetragen, die

Tabelle 1. Resultate der Zusatzversuche von Aflatoxin M_1 zu Milch und Milchpulver

Probe	Zusatz ng/kg	Nicht derivatisiert			Als Trifluoracetylderivat		
		ng/kg	$\bar{x}$*	Ausbeute % ($\bar{x} \pm s$)	ng/kg	$\bar{x}$*	Ausbeute** % ($\bar{x} \pm s$)
Vollmilch	50	31 49 36 37 34	37	75 ± 14	27 37 32 36 23	31	62 ± 12
Vollmilchpulver	50	41 39 43 43	42	83 ± 4	42 41 44 43	43	85 ± 3
Vollmilch	10	8 10 10 12 11	10	102 ± 15	12 11 11 11 10	11	110 ± 7
Vollmilchpulver	10	5 12 11 11 8	9	94 ± 29	4 9 7 8 7	7	70 ± 19

* Werte gerundet
** Als Gesamtausbeute berechnet

Folie zwischen zwei in einem Trockenschrank auf 75 °C geheizte Glasplatten gelegt und 10 min bei dieser Temperatur belassen. Die überschüssige Trifluoressigsäure wird 5—10 s mit einem Fön weggeblasen, die Folie 4—6 mm unterhalb der markierten Standards und Proben entzweigeschnitten und in Chloroform/Methanol/Essigsäure/Wasser (92+8+2+0,8, v/v, ungesättigte Kammer) entwickelt. Die densitometrische Messung wird analog der nicht derivatisierten Probe durchgeführt.

Resultate und Diskussion

Milch und Vollmilchpulver wurden je mit 50 ng/kg und 10 ng/kg Aflatoxin M_1 kontaminiert. Tabelle 1 gibt die wiedergefundenen Mengen mit Mittelwert und Ausbeuten an, Abbildung 3 zeigt Densitogramme der Extrakte von Milchpulver, welchen 10 ng/kg Aflatoxin M_1 zugesetzt wurden.

Die Werte wurden durch Fluoreszenzmessung von Aflatoxin M_1 und dessen Trifluoracetylderivat bestimmt. Normalerweise dient das auf der Dünnschichtfolie gebildete Derivat zur qualitativen Bestätigung des Vorliegens von Aflatoxin M_1. In einigen Fällen mußte es jedoch densitometrisch ausgewertet werden, weil die Quantifizierung von Aflatoxin M_1 durch Substanzen mit gleichem R_f-Wert verunmöglicht wurde.

Für Aflatoxin-M_1-Zusätze von 50 ng/kg sind in der Tabelle 1 mittlere Ausbeuten von 75% (für Milch) und 83% (für Milchpulver) wiedergegeben. Diese Werte entsprechen den Resultaten von vielen weiteren Versuchen, die je nach Matrix der untersuchten Proben Ausbeuten zwischen 70% und 90% ergaben.

In der mit 10 ng/kg kontaminierten Milch wurde für das Aflatoxin M_1 wie für das Derivat eine zu hohe Ausbeute erhalten. Vermutlich enthielt die Milch na-

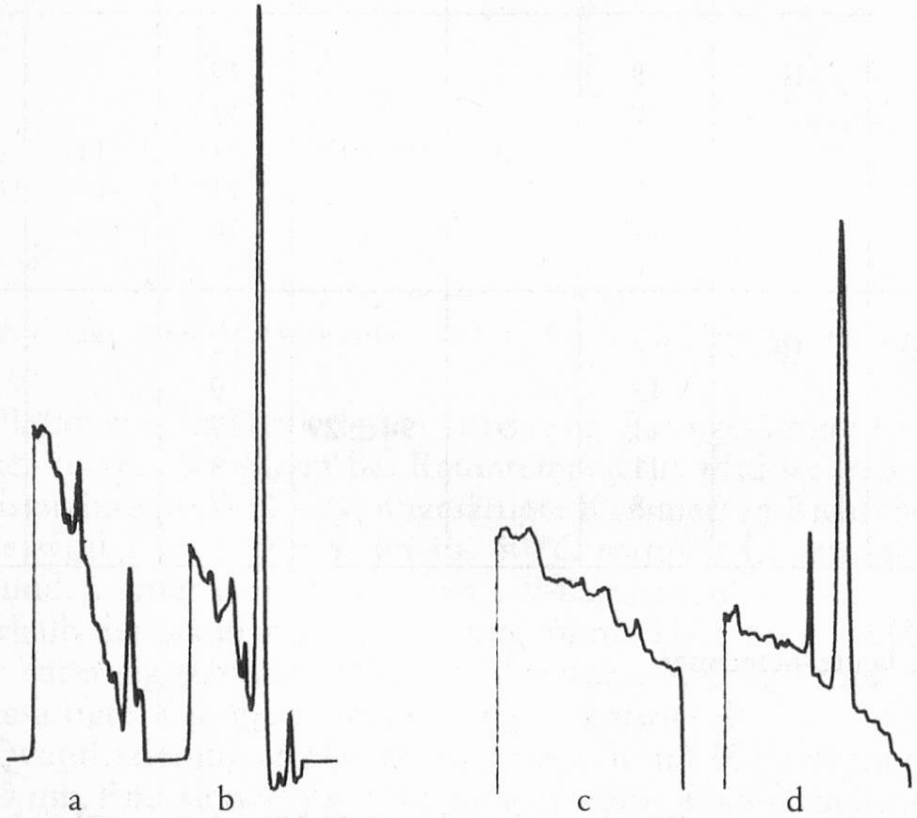

Abb. 3. Densitogramme der Extrakte von Milchpulver. Die aufgetragene Menge entspricht jeweils 10 ml Milch

a = Probe, nicht kontaminiert, nicht derivatisiert
b = Probe, kontaminiert mit 10 ng/kg, nicht derivatisiert
c = Probe, nicht kontaminiert, derivatisiert
d = Probe, kontaminiert mit 10 ng/kg, derivatisiert

türlicherweise Aflatoxin M_1 in einer Konzentration, die unterhalb dem Erfassungsbereich dieser Methode liegt (3 ng/kg). Für das mit 10 ng/kg kontaminierte Milchpulver wurden für Aflatoxin M_1 ebenfalls einzelne Werte über 10 ng/kg gefunden. Die Quantifizierung des Derivates hingegen ergab Werte, die alle unter 10 ng/kg lagen. Bei der empfindlichen Einstellung des Densitometers zur Messung von 0,1 ng Aflatoxin M_1 können auch geringe Mengen fluoreszierender Substanzen mit gleicher Wanderungsstrecke wie Aflatoxin M_1 das Resultat verfälschen. Eine zusätzliche Quantifizierung des Trifluoracetylderivates ist daher in diesem tiefen Nachweisbereich unbedingt erforderlich.

Mit der beschriebenen Methodik und dem in Abbildung 1 gezeigten Gerät, das in unserem Labor entwickelt wurde, können von einer geübten Person 12 Analysen pro Tag durchgeführt werden. Das Verfahren wird bei uns seit zwei Jahren routinemäßig auf Milch angewandt. Es eignet sich ebenfalls für rückstandsfrei rekonstituierbare Milchpulver.

Dank

Wir danken Fräulein *Rüegger*, Fräulein *Leimbacher* und Herrn *Müller* für die sorgfältige Durchführung der Analysen. Herrn *Demauer* danken wir für die Konstruktion des Gerätes zur gleichzeitigen Elution von 6 Sep-Pak-Kartuschen.

Zusammenfassung

Aflatoxin M_1 in Milch und Milchpulver wurde nach Reinigung über Sep-Pak C_{18} und Dünnschichtchromatographie, unverändert und als Trifluoracetylderivat densitometrisch bestimmt. Bei einer Aflatoxin-M_1-Konzentration von 50 ng/kg wurden Ausbeuten ($\bar{x} \pm s$, in % des Zusatzes) von 83 ± 4 bzw. 85 ± 3 (Trifluoracetylderivat) für Milchpulver und 75 ± 14% bzw. 62 ± 12 (Trifluoracetylderivat) für Milch erhalten. Für Aflatoxin-M_1-Konzentrationen von 10 ng/kg betrugen die Ausbeuten 94 ± 29 bzw. 70 ± 19 (Derivat) für Milchpulver und 102 ± 15 bzw. 110 ± 7 (Derivat) für Milch. Die Methode ist schnell und sparsam im Lösungsmittelverbrauch. Ihre Nachweisgrenze beträgt 3—5 ng/kg.

Résumé

Une méthode (rapide et économisant les solvants) pour doser l'aflatoxine M_1 dans le lait est décrite. Après passage du lait (ou de lait reconstitué) à travers une cartouche Sep-Pak C 18, l'éluat est extrait avec du dichlorométhane et l'extrait est chromatographié sur couche mince. Le dosage est effectué par densitométrie de la toxine libre et de son dérivé avec l'acide trifluoroacétique (TFA). Les rendements suivants (% de l'addition) ont été obtenus pour des échantillons de lait frais et de lait en poudre, additionnés de 10 ppt et de 50 ppt d'aflatoxine M_1 (premier résultat = toxine libre, deuxième résultat = dérivé TFA): 102 ± 15, 110 ± 7 ($n = 5$, 10 ppt, lait); 94 ± 29, 70 ± 19 ($n = 5$, 10 ppt, lait en poudre); 75 ± 14, 62 ± 12 ($n = 5$, 50 ppt, lait); 83 ± 4, 85 ± 3 ($n = 4$, 50 ppt, lait en poudre). La limite de détection est de 3 à 5 ppt.

Summary

An efficient method for the determination of aflatoxin M_1 in the low ppt range in milk and milk powder is described. Milk or reconstituted milk is passed through a Sep-Pak C_{18} cartridge, the toxin is eluted and the extract of the eluate is chromatographed on Silica thin layer plates. Densitometric quantitation is carried out before and after derivatisation with trifluoracetic acid. Milk and milk powder were spiked with 10 ng/kg and 50 ng/kg aflatoxin M_1. The recoveries (% of addition) were (first figure as free toxin, second figure as derivative): 102 ± 15, 110 ± 7 (n = 5, 10 ppt, milk); 94 ± 29, 70 ± 19 (n = 5, 10 ppt, milk powder); 75 ± 14, 62 ± 12 (n = 5, 50 ppt, milk); 83 ± 4, 85 ± 3 (n = 4, 50 ppt, milk powder). The detection limit is 3 to 5 ppt; the method is well suited for large sample numbers.

Literatur

1. *Kiermeier, F., Reinhardt, V.* und *Behringer, G.:* Zum Vorkommen von Aflatoxin in Rohmilch. Dtsch. Lebensm. Rundsch. **71**, 35–38 (1975).
2. *Sieber, R.* und *Blanc, R.:* Zur Ausscheidung von Aflatoxin M_1 in die Milch und dessen Vorkommen in Milch und Milchprodukten – eine Literaturübersicht. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **69**, 477–491 (1978).
3. *Schlatter, Ch.:* Zur Karzinogenität der Aflatoxine. Arbeitstagung Gesundheitsgefährdung durch Aflatoxine, Zürich, 21.–22. 3. 1978. Eigenverlag Institut für Toxikologie der ETH und der Universität Zürich, Schwerzenbach, S. 51–64 (1978).
4. *Lutz, W.:* In vivo covalent binding of aflatoxin B_1 and aflatoxin M_1 to liver DNA of pig and rat. Arbeitstagung Gesundheitsgefährdung durch Aflatoxine, Zürich, 21.–22. 3. 1978. Eigenverlag Institut für Toxikologie der ETH und der Universität Zürich, Schwerzenbach, S. 65–71 (1978).
5. *Knutti, R., Sutter, K.* und *Schlatter, Ch.:* Aflatoxinrückstände in der Milch. Swiss Food **1** (6), 17–21 (1979).
6. *Gauch, R., Leuenberger, U.* und *Baumgartner, E.:* Rapid and simple determination of aflatoxin M_1 in milk in the low parts per 10^{12} range. J. Chromatogr. **178**, 543–549 (1979).
7. *Tripet, F., Riva, C.* et *Vogel, J.:* Recherche des aflatoxines et dosages de l'aflatoxine M_1 dans les produits laitiers. Trav. chim. aliment. hyg. **72**, 367–379 (1981).
8. *Tuinstra, L.* and *Bronsgeest J.:* Determination of aflatoxin M_1 in milk at the parts per trillion level. J. Chromatogr. **111**, 448–451 (1975).
9. *Winterlin, W., Hall, G.* and *Hsieh, D.:* On column chromatographic extraction of aflatoxin M_1 from milk and determination by reversed phase high performance liquid chromatography. Anal. Chem. **51**, 1873–1874 (1979).
10. Official methods of analysis of the AOAC, 13th edition. Natural poisons, mycotoxins, pp. 414– 416. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D. C. 1980.
11. *Egmond, H., Paulsch, W.* and *Schuller, P.:* Confirmatory test for aflatoxin M_1 on a thin layer plate. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **61**, 809–812 (1978).

Dr. W. Steiner
Dr. R. Battaglia
Kant. Laboratorium Zürich
Postfach
CH-8030 Zürich