

Uebersicht über Bestimmungsmethoden der Aflatoxine B, G und M in Lebens- und Futtermitteln

Autor(en): **Lüthy, J.**

Objektyp: **Article**

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

Band (Jahr): **69 (1978)**

Heft 2

PDF erstellt am: **12.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-983323>

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.

Uebersicht über Bestimmungsmethoden der Aflatoxine B₁, G und M in Lebens- und Futtermitteln

J. Lüthy

Institut für Toxikologie der ETH und der Universität Zürich, Schwerzenbach

Einleitung

Obwohl die Carcinogenität der Aflatoxine schon seit 1961 (1), das Vorkommen in Lebensmitteln seit 1963 (2) bekannt sind, ist der Problembereich Aflatoxin von ungebrochener Aktualität und weit entfernt davon, gelöst zu sein. Verschiedene Befunde lassen vermuten, daß Aflatoxine einen ernstzunehmenden Faktor in der Aetiologie des Leberkrebses darstellen. Aflatoxin B₁ gilt heute als das stärkste chemische Carcinogen überhaupt und hat bei allen bisher getesteten Tierarten Leberkrebs induziert (3, 4). Von besonderer Wichtigkeit sind Versuche von *Wogan* et al. (5), in denen gezeigt wurde, daß schon kleinste Mengen von Aflatoxin B₁ (AF B₁) im Futter von Ratten in dieser Hinsicht wirksam sind, so führte ein Gehalt von 1 ppb AF B₁ im Futter (entsprechend einer täglichen Aufnahme von 0,05 µg B₁/kg KG) bei 10% der Tiere zu Lebertumoren. Neben zahlreichen Tierversuchen liegt eine ganze Reihe von epidemiologischen Studien vor, in denen die mittlere tägliche Belastung der Bevölkerung mit Aflatoxinen mit dem Auftreten von Leberkrebs korreliert wird. Bei diesen Studien (Thailand (4, 6, 7), Uganda (8), Kenya (4, 9), Mozambique (4, 10), Swaziland (11, 12)) wurde eine positive Korrelation gefunden. Es scheint, daß bei einer durchschnittlichen täglichen Aflatoxin-aufnahme im Bereich von 1—100 ng/kg KG die Lebercarcinom-Häufigkeit merklich ansteigt.

Schon seit mehr als zehn Jahren ist bekannt, daß Milchkühe einen Teil der mit dem Futter aufgenommenen Aflatoxine B₁ und B₂ in Form der Metaboliten M₁ und M₂ (siehe Abb.) in der Milch wieder ausscheiden (22, 23, 24, 1). Die biologische Aktivität dieser Metaboliten ist in der Folge schon recht gut untersucht worden (für eine Uebersicht siehe (25)). Die Carcinogenität von Aflatoxin M₁ ist an bisher zwei verschiedenen Tierarten bewiesen und seine Potenz mit derjenigen von Aflatoxin B₁ verglichen worden: Dabei hat sich AF M₁ bei Ratten (26) und bei Forellen (27, 28) als etwas weniger carcinogen als AF B₁ erwiesen.

Dem Auftreten von Aflatoxin M in Milch (29, 30) auch in kleinsten Mengen sollte bei einem derart wichtigen Grundnahrungsmittel Beachtung geschenkt werden. Der Kontrolle — und damit einer einwandfreien Analytik — von Aflatoxinen in Futtermitteln kommt deshalb große Bedeutung zu.

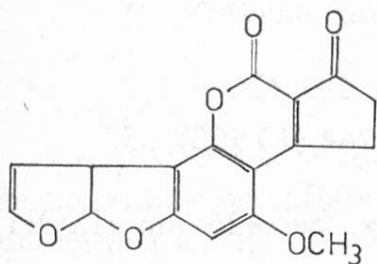
Ausgehend von diesen Befunden muß von toxikologischer Seite gefordert werden, die noch zu tolerierende Menge an Aflatoxinen in Lebensmitteln so tief wie irgend möglich anzusetzen. Bei der Festlegung eines Toleranzwertes spielen aber nicht nur toxikologische Ueberlegungen, sondern ebenso sehr Fragen der Analytik eine Rolle. Ein für die Lebensmittelkontrolle vernünftiges analytisches Konzept sollte drei Punkte berücksichtigen*:

1. Empfindlichkeit (möglichst tiefe Nachweisgrenze)
2. Sicherheit (eindeutige Identifizierung, Reproduzierbarkeit, Wiederfindungsrate)
3. Aufwand (zeitlich und apparativ)

Im folgenden soll unter Berücksichtigung dieser drei Punkte eine Uebersicht über die bestehenden Methoden der Aflatoxin-Analytik gegeben werden.

Chemisch-physikalische Eigenschaften der Aflatoxine

AF B₁



C₁₇H₁₂O₆, M. G. 312, Smp. 268—9°C

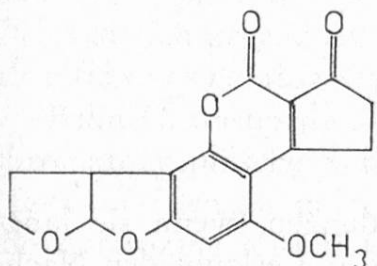
UV: $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ 223 (25 600), 265 (13 400), 362 (21 800) nm (Lit. 13)

Fluoreszenz: Emissionsmax. bei 425 nm (EtOH) 410 nm (CHCl₃)

Anregung bei 365 nm (Lit. 14)

MS: u. a. 228 (8), 241 (6), 256 (6), 269 (6), 284 (12), 312 (100, M⁺), 313 (19, M⁺⁺¹) (Lit. 15)

AF B₂



C₁₇H₁₄O₆, M. G. 314, Smp. 286—9°C

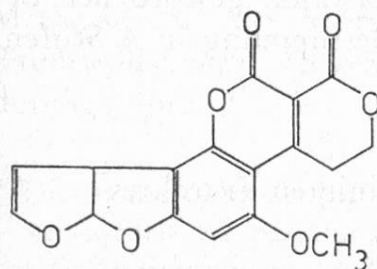
UV: $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ 222 (17 000), 265 (11 000), 363 (20 800) nm

Fluoreszenz: Emissionsmax. bei 423 nm (EtOH) 413 nm (CHCl₃)

Anregung bei 365 nm (Lit. 14)

MS: u. a. 271 (25), 285 (12), 314 (100, M⁺), 315 (19, M⁺⁺¹) (Lit. 15)

AF G₁



C₁₇H₁₂O₇, M. G. 328, Smp. 244—6°C

UV: $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ 243 (11 500), 264 (10 000), 362 (16 100) nm (Lit. 14)

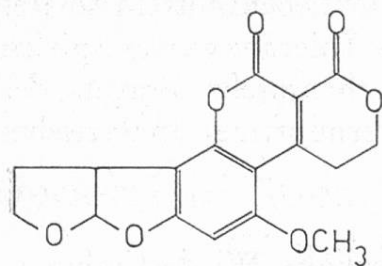
Fluoreszenz: Emissionsmax. bei 440 nm (EtOH) 425 nm (CHCl₃)

Anregung bei 365 nm (Lit. 14)

MS: u. a. 227 (8), 255 (5), 300 (6), 328 (100, M⁺), 329 (19, M⁺⁺¹) (Lit. 15)

* Auf das Problem der Probenahme kann hier nicht eingegangen werden und deshalb muß auf die Literatur verwiesen werden (46, 106).

AF G₂



C₁₇H₁₄O₇, M. G. 330, Smp. 237—9°C

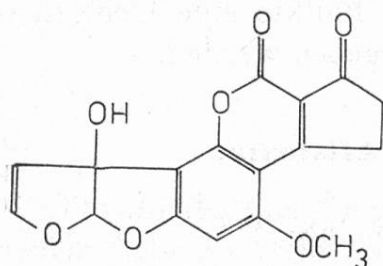
UV: $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ 214 (28 100), 265 (11 600), 363 (20 900) nm

Fluoreszenz: Emissionsmax. bei 440 nm (EtOH) 426 nm (CHCl₃)

Anregung bei 365 nm (Lit. 14)

MS: u. a. 287 (10), 301 (6), 330 (100, M⁺), 331 (19, M⁺+1) (Lit. 15)

AF M₁



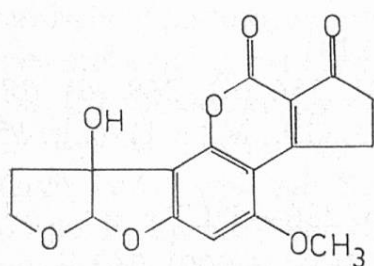
C₁₇H₁₂O₇, M. G. 328, Smp. 299°C

UV: $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ 226 (23 100), 265 (11 600), 357 (19 000) nm

Fluoreszenz: Emissionsmax. bei 425 nm (EtOH) Anregung bei 365 nm

MS: u. a. 243 (18), 257 (9), 271 (38), 286 (5), 299 (65), 300 (7), 302 (6), 328 (100, M⁺), 329 (19, M⁺+1) (Lit. 15)

AF M₂



C₁₇H₁₄O₇, M. G. 330, Smp. 293°C

UV: $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ 221 (20 000), 264 (10 900), 357 (21 000) nm

Fluoreszenz: Emissionsmax. bei 425 nm (EtOH) Anregung bei 365 nm

Allgemeines zur Analytik

Die Aflatoxine sind intensiv fluoreszierende Verbindungen, wenn sie langwelligem UV-Licht ausgesetzt sind. Dieser glückliche Umstand erlaubt den Nachweis und die Bestimmung von außerordentlich kleinen Mengen: 0,2 ng können auf diesem Wege auf dem Dünnschichtchromatogramm noch nachgewiesen werden (16, 17). Dies bildet die Basis für die meisten der bisher bekannt gewordenen Bestimmungsmethoden. Im allgemeinen vollzieht sich die Bestimmung in 4 Stufen:

1. Extraktion der Aflatoxine aus dem Lebensmittel
2. Reinigung des Extraktes
3. Dünnschichtchromatographische Auftrennung des gereinigten Extraktes
4. Quantitative Bestimmung der Aflatoxine

Da verschiedene Lebens- und Futtermittel (z. B. Kokosnuß oder Baumwollsamensamen) störende fluoreszierende Verbindungen enthalten, die einen positiven Aflatoxinbefund vortäuschen können, sollten zur Absicherung weitere Bestäti-

gungsanalysen durchgeführt werden. In Frage kommen hier: weitere TLC-Analysen mit verschiedenen Laufmitteln, Derivatisierung, Fluoreszenzspektrum und — als biologische Methode — der Hühnerembryonen-Test.

Als neuere Methode wird auch zunehmend die Flüssigkeitschromatographie (anstelle oder als Ergänzung der TLC) und gelegentlich zur Bestätigung das Massenspektrum herangezogen. Vorgeschlagen worden sind außerdem die UV-Spektroskopie und die Polarographie. Bei der Methodenauswahl sollte man sich aber jederzeit über Aussagekraft, Nachweisgrenze und Substanzbedarf im klaren sein.

Im folgenden wollen wir nun besprechen: die wichtigsten allgemeinen (für die meisten Lebens- oder Futtermittel anwendbaren) Analysenmethoden, Änderungen im Clean-up (Analysenmethoden, zugeschnitten für spezielle Lebens- oder Futtermittel) und die erwähnten Bestätigungsmethoden. Ganz kurz gestreift werden sollen außerdem aussichtsreiche Versuche, einen Radioimmunoassay für Aflatoxin B₁ zu entwickeln.

Probenaufbereitung bei der Bestimmung von Aflatoxinen

Lebensmittel

In Tabelle 1 sind fünf wichtige allgemeine Methoden zum Nachweis und zur Bestimmung von Aflatoxinen in Lebensmitteln vorgestellt: es sind dies die offiziellen deutschen (18) und holländischen (19) Methoden sowie die drei wichtigsten amerikanischen Methoden (20).

Zur Extraktion der Aflatoxine aus dem Lebensmittel werden durchwegs Mischungen von relativ polaren organischen Lösungsmitteln und Wasser verwendet. Dies hat sich gegenüber einer Verwendung von reinen organischen Lösungsmitteln als effektiver herausgestellt.

Beim Clean-up des Extraktes wird bei den Methoden 1, 3 und 4 eine säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel vorgeschrieben: Nach Entfettung mit Hexan werden die polarerer Verunreinigungen mit Aether entfernt und erst dann die Aflatoxine mittels Chloroform-Methanol, bzw. Chloroform-Aceton von der Säule eluiert. Die beiden anderen Methoden 2* und 5 verzichten auf Säulenchromatographie und beschränken sich auf Ausschütteln des wäßrigen Methanol-Extraktes mit Hexan und Chloroform. Bei der aufwendigsten «Cottonseed-Method», die bei Störsubstanzen enthaltenden Substraten (z. B. Gossypol in Baumwollsamensamen) Anwendung findet, wird zusätzlich eine Fällung mit Bleiacetat durchgeführt.

* Die in der Schweiz für die Lebensmittelkontrolle zuständigen kantonalen Laboratorien verwenden als Screening-Methode im wesentlichen das Clean-up dieser Methode mit einer geringfügigen Modifikation: Nach Arnold (21) erfolgt eine zusätzliche Reinigung des Extraktes direkt auf dem TLC durch Entwickeln mit Aether oder Benzol. Abschneiden der Verunreinigungen, Drehen der Platte um 180° und anschließend normaler Entwicklung mit CHCl₃-Aceton-H₂O (88+12+0,2).

Tabelle 1. Operationsdiagramm und Vergleich der verschiedenen allgemeinen Methoden

	1 Offizielle deutsche Methode	2 Offizielle holländische Methode	3 «CB-Method»	4 «Cottonseed-Method»	5 «BF-Method»
Extraktion	50 g Probenmaterial mit $H_2O/CHCl_3$ (1+10) 275 ml mit Magnetrührer 30 min	50 g Probenmaterial — mit H_2O/CH_3OH (1+10) 110 ml — H_2O 30 ml in Waring Blendor 2×2 min	50 g Probenmaterial mit $H_2O/CHCl_3$ (1+10) 275 ml 30 min schütteln	25 g Probenmaterial mit Aceton / H_2O / HOAc (85+15+0,8) 250 ml 30 min schütteln	100 g (bzw. 50 g) Probenmaterial mit $MeOH / H_2O$ (55+45) 500 ml und 200 ml Hexan 1 min in Waring Blendor zentrifugieren
Reinigung des Extraktes	Säulen-chromatographie an 10 g Silicagel: Eluieren mit a) 100 ml Hexan b) 100 ml Et_2O c) 150 ml $MeOH-CHCl_3$ (3+97) (enthält Aflatoxine) Eluat c) eindampfen und in 1 ml Benzol-Acetonitril (98+2) aufnehmen	Ausschütteln mit a) 50 ml $PeAc$ (enthält Fett) b) 90 ml $CHCl_3$ + 20 ml H_2O (enthält Aflatoxine) $CHCl_3$ -Phase mit Na_2SO_4 trocknen, eindampfen und in 1 ml $CHCl_3$ aufnehmen	Säulen-chromatographie an 10 g Silicagel: Eluieren mit a) 150 ml Hexan b) 150 ml Et_2O c) 150 ml $MeOH-CHCl_3$ (3+97) (enthält Aflatoxine)	— Fällung mit $Pb(OAc)_2$ — Filtrat einengen, H_2O zugeben und mit $CHCl_3$ ausschütteln — Säulen-chromatographie an 15 g Silicagel: Eluieren mit a) 150 ml Et_2O -Hexan (90+30) b) 200 ml $CHCl_3$ -Aceton (4+1) (enthält Aflatoxine)	— 25 ml $MeOH$ -Phase mit 25 ml $CHCl_3$ ausschütteln — $CHCl_3$ -Phase eindampfen und Rückstand in 200 μ l Benzol-Acetonitril (98+2) aufnehmen

	1 Offizielle deutsche Methode	2 Offizielle holländische Methode	3 «CB-Method»	4 «Cottonseed-Method»	5 «BF-Method»
Nachweis und Bestimmung	2-dimensionale TLC (1. Fließmittel Et ₂ O/MeOH/H ₂ O 94+4,5+1,5; 2. Fließmittel CHCl ₃ / Aceton 90+10) Auswertung mit UV-Lampe oder Chromatogramm- spektralphotometer	wie deutsche Methode	TLC (CHCl ₃ - Aceton 9+1)	TLC (CHCl ₃ - Aceton 9+1)	TLC (CHCl ₃ - Aceton 9+1)
Bestätigung	— Weitere TLC mit anderen Fließmitteln — Derivatisierung				

Nachweis und Bestimmung von Aflatoxinen in Futtermitteln vollzieht sich nach ähnlichen Methoden, wie sie bei Lebensmitteln Anwendung finden. Bei Mischfuttermitteln ist relativ häufig mit Störsubstanzen zu rechnen (31): In diesen Fällen sind Methoden mit aufwendigerem Clean-up anzuwenden. Eine ausführliche Diskussion dieser Problematik findet sich in der Arbeit von *Kablau* und *Gedeck* (32). Bei der amtlichen Methode in Deutschland (33) handelt es sich um eine modifizierte «CB-Method» (20) mit zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie. *Romer* (31) extrahiert die Probe mit Methanol und reinigt den Extrakt mittels Bleiacetatfällung und Säulenchromatographie. Nachweis und Bestimmung der Aflatoxine erfolgt densitometrisch. Die Wiederfindungsrate beträgt 92%, die Empfindlichkeit wird mit 2—4 ppb B₁ angegeben. Eine weitere für verschiedene Futtermittel-Typen anwendbare Methode wurde von *Strzelecki* und *Gasiorowska* (34) publiziert.

Eine Screening-Methode, die auf TLC verzichtet und die Aflatoxine auf einer mit Florisil gefüllten Minisäule absorbiert und fluorimetrisch bestimmt, wurde von *Velasco* (35, 36, 37, 38) entwickelt. *Romer* (39) hat diese modifiziert und war in der Lage, in Mischfuttermitteln und verschiedenen Lebensmitteln Gesamtaflatoxingehalte im Bereich von 5—15 ppb zu bestimmen. Eine Gemeinschaftsstudie (40) verschiedener Laboratorien an 11 verschiedenen Produkten im Bereich von 0—25 ppb Aflatoxin ergab folgende Resultate: 84% der negativen Proben und 89% der 10—25 ppb Aflatoxin enthaltenden Proben wurden korrekt identifiziert.

Dünnschichtchromatographie der Aflatoxine

Für eine TLC-Analyse werden die verschieden gereinigten Extraktionsrückstände in einer bekannten Menge Chloroform oder Benzol-Acetonitril 98+2 aufgenommen. Nach *Stoloff* et al. (41) verdient letzteres den Vorzug, da es kleinere und besser auswertbare Aflatoxinflecken auf der Platte liefert. Die Aflatoxine werden auf Kieselgelplatten mit oder ohne Gipszusatz mit dem Laufmittel Chloroform-Aceton (90+10) aufgetrennt und mit den mitgelaufenen Standards verglichen. Zahlreiche weitere geeignete Fließmittel sind beschrieben worden (18, 20), z. B. Diäthyläther-Methanol-Wasser (94+4,5+1,5), Chloroform-Trichloräthylen-Amylalkohol-Ameisensäure (80+15+4+1), Chloroform-Isopropanol 99+1 usw. Die Aflatoxine B₁ und B₂ erscheinen beim Betrachten unter einer langwelligen UV-Lampe als bläulich, G₁ und G₂ als grünlich fluoreszierende Flecken. Die Reihenfolge (abnehmende R_F-Werte) auf der Platte ist B₁, B₂, G₁, G₂ bei allen erwähnten Fließmitteln. Für die Bestätigungsanalysen interessante Eigenschaften zeigt das Fließmittel Methylenechlorid-Chloroform-n-Amylalkohol-Ameisensäure (80+15+4+1) (20): Die Reihenfolge der R_F-Werte lautet hier B₁, G₁, B₂, G₂. Gute Möglichkeiten, störende Fluoreszenzen als solche zu erkennen, bietet auch die zweidimensionale TLC, die ein integrierender Bestandteil verschiedener er-

wählter Methoden ist (18, 19, 33). Nachteilig ist hier allerdings, daß pro Platte lediglich eine Probe untersucht werden kann.

Die quantitative Bestimmung wird mittels Konzentrationsreihe durchgeführt, wobei die Auswertung visuell oder fluorodensitometrisch (17, 18, 42, 43, 44) erfolgt. Wichtig ist in diesem Zusammenhang, daß reine Standardsubstanzen bekannter Konzentrationen verwendet werden. Reinheit und Konzentration der Standardlösungen werden am besten UV-spektralphotometrisch überprüft (18, 20).

Ringversuche und Erfahrungen bei speziellen Lebensmitteln

Die erwähnten allgemeinen Methoden der Aflatoxinanalytik (18, 19, 20) sind bei fast allen in Frage kommenden Lebensmitteln anwendbar. So etwa wird die amtliche deutsche Methode (18) für folgende Lebensmittel empfohlen: eiweißreiche Oelsamen (Nüsse, Erdnüsse usw.), Marzipan, Kokosraspel, Getreide und Getreideerzeugnisse, Brot und Backwaren, Fleisch und Fleischerzeugnisse, Ei und Eiprodukte, Butter, Milchpulver, Margarine, Fruchtsäfte, Wein und Enzympräparate. Trotzdem existieren in der Literatur noch zahlreiche weitere Vorschläge zur Aflatoxinanalytik einzelner Lebensmittel. Oft tragen diese Vorschläge oder Modifikationen zu bereits bekannten Methoden allerdings mehr zur Verwirrung als zu einer Klärung bei und erschweren die Einarbeitung in dieses komplexe Gebiet. Wir wollen deshalb im folgenden eher die Frage besprechen, bei welchen Lebensmitteln mit Störungen zu rechnen ist, bzw. auf einige Kollektivstudien an bestimmten Lebensmitteln mit den bekannten Analysemethoden eingehen.

Frank und *Eyrich* (45) haben eine ganze Anzahl von unverdorbenen und verschimmelten Lebensmitteln auf das Vorkommen von Aflatoxin vortäuschenden Substanzen dünn-schichtchromatographisch untersucht und bei Getreideprodukten, Fruchtsäften, Konfitüren und Weinen derartige interferierende Stoffe gefunden. Es handelt sich in der Regel (sofern nicht andere Schimmelpilz-Metaboliten im Spiel sind) um pflanzliche Pigmente, die in vielen Fällen durch Schwermetallionen (Blei oder Zink) ausgefällt werden können. Am besten bekannt ist hierbei das Gossypol, ein natürlicher Inhaltsstoff von Baumwollsaamen (46). Andere interferierende Stoffe in der Aflatoxin B₂-, G₁- und G₂-Region sollen bei Kokosnußprodukten vorkommen (46), während Reis und Mais in dieser Hinsicht kaum Probleme machen. Werden Pistazien nach der «BF-Method» (20) untersucht, können auf der Dünnschichtplatte häufig rötliche Flecken in der B₁- und G₁-Region beobachtet werden (47). *Strezleck* und *Kogan* (48) berichten über eine fluoreszierende Aflatoxin B₁ vortäuschende Verbindung in den roten Samenschalen gewisser Erdnußsorten.

Von verschiedener Seite wurde auf die Schwierigkeiten bei der quantitativen Bestimmung der Aflatoxine in Lebensmitteln (siehe z. B. 49) aufmerksam gemacht. In Tabelle 2 sind die Ergebnisse einiger Ringversuche von hauptsächlich amerikanischen Methoden mit verschiedenen Lebensmitteln zusammengestellt: Während die Wiederfindungsraten etwa bei befriedigenden 70—100% liegen, sind die Va-

Tabelle 2. Ringversuche mit verschiedenen Lebensmitteln

Lebensmittel	Methode	Konzentrationsbereich	Variationskoeffizient*	Wiederfindungsrate**	Autoren
Erdnußbutter	«CB-Method» (14)	30 ppb	35 ⁰ / ₀	100 ⁰ / ₀	Eppley et al. (1968) (50)
Erdnußschrot	«CB», Celite-(54)	20 ppb	35 ⁰ / ₀	70 ⁰ / ₀	Walkling (1970) (51)
Erdnüsse	+ «BF-» (20)				
Erdnußbutter	CB, BF	5—10 ppb	30 ⁰ / ₀	80 ⁰ / ₀	Stack (1974) (52)
Erdnußbutter	Holländische Methode***	3— 6 ppb	35 ⁰ / ₀ ***	100 ⁰ / ₀	Beljaars et al. (1974) (19)
Baumwollsamem	«Cottenseed-Method» (55)	30 ppb B ₁ +B ₂	12 ⁰ / ₀	90 ⁰ / ₀	Pons jr. (1969) (53)
Baumwollsamem	vereinfachte «Cottonseed-Method» (56)	7—266 ppb	30—40 ⁰ / ₀		Pons jr. (1975) (57)
Kopra,	Modifizierte CB-Methode (20)	35 ppb	35 ⁰ / ₀		Baur und Armstrong (1971) 58
Kokosnuß-Prod.	CB-Methode (20)	20 ppb B ₁ +G ₁	30 ⁰ / ₀	70 ⁰ / ₀	Shotwell und Stubblefield (1972) (59)
Mais		5—10 ppb B ₁ +G ₁	60 ⁰ / ₀	70 ⁰ / ₀	
Pistazien	CB-Methode (20)	35—60 ppb	40 ⁰ / ₀	85 ⁰ / ₀	Di Prossimo (1974) (47)
		15 ppb	50 ⁰ / ₀		
	BF-Methode (20)	35—60 ppb	40 ⁰ / ₀	65 ⁰ / ₀	
		15 ppb	70 ⁰ / ₀		
Sojabohnen	CB-Methode (20)	20—60 ppb B ₁ +G ₁	45 ⁰ / ₀	70 ⁰ / ₀	Shotwell und Stubblefield (1972) (59)
Kakaobohnen	CB-Methode (20)	45—70 ppb	35 ⁰ / ₀	85 ⁰ / ₀	Scott und Pryzbylski (1971) (60)
		18 ppb	50 ⁰ / ₀		
Kaffeebohnen	CB-Methode modifiziert (61)	25—80 ppb B ₁	50 ⁰ / ₀	70 ⁰ / ₀	Levi (1969) (62)

* Variationskoeff. = $\frac{\text{Standard-Abweichung}}{\text{Mittelwert}}$ in %

** soweit Proben mit Zusatz von bekannten Aflatoxinmengen verwendet wurden

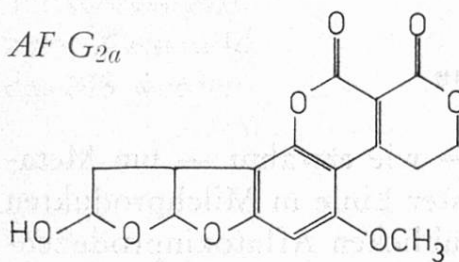
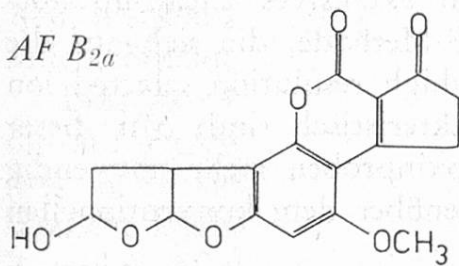
*** lediglich Prüfung eines gereinigten Extraktes von Erdnußbutter mittels 2dimensionaler TLC und Quantifizierung

riationskoeffizienten im allgemeinen recht hoch. Der Variationskoeffizient ist erwartungsgemäß um so größer, je niedriger der Konzentrationsbereich ist. Im Bereich von wenigen ppb steigt er bei den meisten Methoden auf über 50%. Obwohl es deshalb analytisch wenig zu befriedigen vermag, derart kleine Mengen noch quantitativ zu bestimmen, wäre es dennoch falsch, positiven Aflatoxinbefunden in diesem Bereich keine Beachtung zu schenken, so lange zumindest, als mit Sicherheit falsche positive Resultate ausgeschlossen werden können.

Methoden zur Identifizierung von Aflatoxinen

Das mögliche Vorkommen von fluoreszierenden Verbindungen mit ähnlichem chromatographischem Verhalten wie die Aflatoxine zwingt den Analytiker zu einer Absicherung positiver Befunde. Bei den amtlichen deutschen Methoden zur Untersuchung von Futter- (33) und Lebensmitteln (18) sind einige zusätzliche Bestätigungen sogar bindend vorgeschrieben.

Eine einfache zusätzliche Bestätigung ist die Dünnschichtchromatographie mit verschiedenen Fließmittelsystemen.



Bedeutend mehr Sicherheit bietet die Derivatisierung kombiniert mit TLC. Man macht dabei von den nucleophilen Eigenschaften der Enolätherfunktion in den Molekülen von Aflatoxin B₁ und G₁ Gebrauch. Die säurekatalysierte Anlagerung von Wasser führt zu den ebenfalls blau bzw. grün fluoreszierenden Derivaten B_{2a} und G_{2a} (siehe Abb.). Diese Verbindungen haben aber auf der TLC-Platte eine ganz andere Mobilität und können leicht von B₁ und G₁ unterschieden werden. Die Aflatoxine B₂ und G₂ können aus chemischen Gründen keine analogen Derivate bilden. Der darauf basierende Test wurde ursprünglich von *Andrellos* und *Reid* (63) entwickelt und von *Pobland* et al. (64) und *Przybylski* (65) weiter verbessert.

Hierbei können Mengen von sogar weniger als 1 ng B₁ oder G₁ direkt auf der Platte mit Trifluoressigsäure behandelt und die entstandenen Derivate mit einem geeigneten Fließmittel entwickelt werden. Ein zusätzlicher Test ist das Besprühen der entwickelten Platten mit Schwefelsäure (66): Die Fluoreszenz der Aflatoxine B₁, B₂, G₁, G₂, M₁, B_{2a} und G_{2a} ändert darauf von blau oder blau-grün auf gelb. Diese Reaktion ist allerdings nicht spezifisch für Aflatoxine. Weiter wurde eine Derivatisierung von B₁ und G₁ mit Salzsäure / Acetanhydrid (64) vorgeschlagen. Alle diese Tests wurden in mehreren Ringversuchen studiert (67, 68, 69) und es wurden zufriedenstellende Ergebnisse erzielt. *Frank* und *Eyrich* (45) erwähnen zwei weitere Sprühreagenzien für TLC (Antimontrichlorid und Wismutnitrat), die zwar

spezifischer sind als Schwefelsäure, aber wegen mangelnder Empfindlichkeit in der Praxis nur wenig benutzt werden.

Einige Autoren benutzten zur Bestätigung das UV- oder das Fluoreszenzspektrum der chromatographisch gereinigten einzelnen Aflatoxine (14, 70, 71, 72). Der Substanzbedarf liegt bei 1 ng/ml bei der Fluoreszenzspektrophotometrie und bei 1 µg/ml für das UV-Spektrum, letzteres ist also — obwohl aussagekräftiger als das Fluoreszenzspektrum — für die besonders kritische Identifizierung von sehr kleinen Mengen Aflatoxinen wenig geeignet.

Von mehreren vorgeschlagenen biologischen Testsystemen hat lediglich der 1964 von *Verrett et al.* (20, 73) eingeführte Hühnerembryonen-Test in der Praxis größere Bedeutung erlangt. Hierbei wird eine chromatographisch gereinigte Lösung von Aflatoxin B₁ in die Luftblase von befruchteten Hühnereiern eingespritzt und diese werden während 20 Tagen bebrütet. Die LD₅₀ beträgt 25 ng/Ei; da aus statistischen Gründen mehrere Eier verwendet werden müssen, sind aber total >2 µg B₁ notwendig. Der Test wurde von der US FDA an über 500 Proben geprüft und dabei 100%ige Übereinstimmung mit den chemischen Methoden erzielt.

Alle Aflatoxine zeigen typische Massenspektren mit intensiven Molekularionen und nur geringer Fragmentierung. 10—50 ng genügen für eine MS-Bestätigung (15, 74). Hier handelt es sich um eine zwar apparativ aufwendige, dafür aber sehr sichere Bestätigungsmethode. Nachteilig ist, daß ein extensives Clean-up notwendig ist. *Haddon et al.* (74) beschreiben eine MS-Methode, die sich auf die Registrierung von bestimmten Ionen beschränkt («high resolution selected ion monitoring» = HRSIM), die für Aflatoxine charakteristisch sind: Mit dieser Methode, bei der auch keine hochgereinigten Aflatoxinproben mehr notwendig sind, ist eine Herabsetzung der Nachweisgrenze gegenüber dem konventionellen MS um mindestens das 100fache möglich.

Analytik der M-Aflatoxine

Bei den Aflatoxinen M₁ und M₂ handelt es sich — wie erwähnt — um Metaboliten der Aflatoxine B₁ und B₂, vorkommend in erster Linie in Milchprodukten und Fleisch. Allerdings sind auch einige Stämme der üblichen Aflatoxinproduzenten *Aspergillus flavus* und *A. parasiticus* fähig, in kleinen Mengen Aflatoxin M zu produzieren (75, 76).

Aehnlich wie bei der Analytik der B- und G-Aflatoxine finden sich in der Literatur zahlreiche Vorschläge zum Nachweis von Aflatoxin M₁. *Stubblefield et al.* (77) vergleichen 6 verschiedene Methoden zur Bestimmung von Aflatoxin M₁ in Milch und Trockenmilch (78—82). Als beste Methode wird Extraktion der Milch mit Methanol-Wasser (4+1), wobei gleichzeitig die Milchproteine ausgefällt werden, Entfettung mit Hexan und anschließendes Ausschütteln in Chloroform angegeben (modifizierte Methode von *Jacobson et al.* (80)). Nachweis und Quantifizierung erfolgt mit TLC bzw. densitometrisch. Die Wiederfindungsrate beträgt 70—80% bei einem Gehalt von 0,1 µg M₁/l.

Die Methode von *Pons et al.* (20, 83) benutzt zur Extraktion von Milch ein Aceton-Wasser-Gemisch (77+23), Ausfällung der Proteine und Phospholipide erfolgt mit Bleiacetat, Entfettung mit Hexan und Ausschütteln der Aceton-Wasser-Phase mit Chloroform. Bei der Analyse von Kondensmilch und Käse wird der Chloroformextrakt vor der TLC weiter durch Säulenchromatographie an Cellulose gereinigt. Die Nachweisgrenze liegt bei ca. 0,01 µg M₁/l Milch (84).

In einem Versuch, diese Nachweisgrenze weiter zu senken, gehen *Tuinstra* und *Bronsgest* (85) von großen Mengen Milch aus, benutzen als Clean-up u. a. eine Säulenchromatographie an desaktiviertem Silicagel und zur quantitativen Bestimmung zweidimensionale TLC mit den Fließmitteln Aether-Methanol-Wasser (94,5 : 4,5 : 1,5) bzw. Chloroform-Aceton-Isopropanol (85 : 10 : 5). Die Nachweisgrenze wird mit 4 ng M₁/l Milch angegeben. *Bodine et al.* (84) verglichen die Methode von *Pons et al.* (83) mit derjenigen von *Tuinstra* and *Bronsgest* (85) und geben letzterer wegen höherer Empfindlichkeit und geringerem Zeitaufwand den Vorzug.

Kiermeier und *Weiß* (86) überprüften — «um die zahlreichen Vorschläge zur Aflatoxinanalytik nicht noch weiter zu vermehren» — die amtliche deutsche Methode (18) zur Bestimmung der Aflatoxine B₁, B₂, G₁ und G₂ (siehe Tabelle 1) auf die zusätzliche Erfassung des Aflatoxins M₁. Mit verhältnismäßig geringen Aenderungen gelingt die quantitative Erfassung aller dieser Aflatoxine in flüssiger Milch, Milchpulver, Butter, Käse, Quark, Sahne, Joghurt und Fruchtjoghurt.

Eine weitere gelegentlich verwendete Methode stammt von *Schuller et al.* (87), die auf säulenchromatographische Reinigung verzichtet. *Patterson* and *Roberts* (88) modifizierten die Methode von *Roberts* and *Allcroft* (81) durch eine zusätzliche Dialyse-Reinigung, ähnlich wie dies *Frank* (89) schon zur Reinigung der B- und G-Aflatoxine in anderen Lebensmitteln vorgeschlagen hat.

Zur Identifizierung von Aflatoxin M₁ kann ebenfalls die Derivatisierung mit Trifluoressigsäure direkt auf der Dünnschichtplatte (90) bzw. Kochen mit HCl zum Wasseraddukt M_{2a} (91) herangezogen werden. Auch das UV-Spektrum und das MS werden zur Bestätigung benutzt (30).

Neuere Methoden der Aflatoxin-Analytik

Anwendung der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Anwendung von HPLC in der Aflatoxinanalytik ist in den letzten Jahren auf zunehmendes Interesse gestoßen. Diese neue Technik bietet eine Alternative zur bisher verwendeten Dünnschichtchromatographie (TLC), wobei ihre Vorteile in höherer Präzision bei der quantitativen Bestimmung und geringerem Zeitaufwand liegen. Ob damit auch die Nachweisgrenze und Selektivität gegenüber den bisherigen Methoden wesentlich verbessert werden kann, hängt davon ab, ob es in Zukunft gelingt, Trennsystem und Detektion der Aflatoxine zu optimieren und aufeinander abzustimmen.

In der Literatur sind mehrere HPLC-Trennsysteme beschrieben, mit denen sich eine befriedigende Trennung der Aflatoxine B₁, B₂, G₁, G₂ erreichen läßt. Ver-

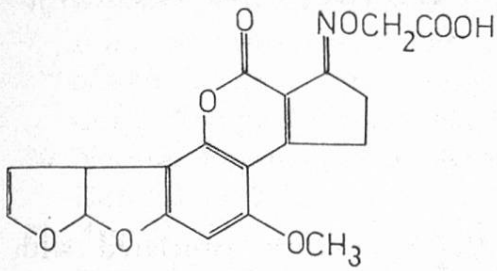
wendet werden in der Regel Kieselgel-Säulen und Elutionsmittel wie Chloroform-Isooctan (92), wassergesättigtes Methylenchlorid mit 0,3% Methanol (93), Methylenchlorid-Chloroform (3 : 2) 50% ges. mit H₂O (94), wassergesättigtes Chloroform-Cyclohexan-Acetonitril (25+7,5+1,0) +1,5% Aethanol (95) usw. Andere Trenneigenschaften und Elutionsreihenfolge weisen die sog. Reversed-Phase-Systeme auf, bei denen unpolare Kolonnenpackungen und als Elutionsmittel z. B. Wasser-Methanol-Mischungen Anwendung finden (96, 97).

Zur Detektion der Aflatoxine kommen entweder ein UV- oder Fluoreszenzdetektor in Frage. Mit den UV-Detektoren wird in der Regel bei einer Wellenlänge um 360 nm (gelegentlich auch bei 254 nm) gearbeitet: Sowohl Extinktionskoeffizienten wie auch das Absorptionsmaximum um 360 nm der verschiedenen Aflatoxine sind — verglichen mit den entsprechenden Emissionsdaten (98, 99) — nicht wesentlich vom Lösungsmittel abhängig. Als Nachteil muß dagegen die nicht in allen Fällen genügende Empfindlichkeit der UV-Detektoren angesehen werden: Die Nachweisgrenze liegt nach Literaturberichten bei 1—2 ng pro Aflatoxin (95, 97). Dies ist ein Grund, den empfindlicheren Fluoreszenzdetektor einzusetzen. Hier macht aber gerade die Erfassung des wichtigsten Aflatoxins B₁ erhebliche Mühe, während die G-Aflatoxine (im Falle der Reversed-Phase-Systeme die Aflatoxine B₂ und G₂) im gleichen Konzentrationsbereich noch leicht registriert werden können. Die ungünstigen Signalverhältnisse der verschiedenen Aflatoxine sind aber nicht nur vom verwendeten Elutionsmittel, sondern auch von den spektralen Eigenschaften des Fluoreszenzdetektors abhängig. Als wesentliche Verbesserung muß deshalb die Einführung der Silicagel-gepackten Fluoreszenzzelle (97, 100) angesehen werden. Nach *Zimmerli* (101) kann damit die Detektorempfindlichkeit z. B. für Aflatoxin B₁ stark gesteigert werden und liegt erheblich über derjenigen eines UV-Detektors. Eine andere Möglichkeit liegt in der Derivatisierung der Aflatoxine B₁ und G₁ zu den stark fluoreszierenden B_{2a} und G_{2a}, die mittels Reversed-Phase-HPLC und normalem Fluoreszenzdetektor auch in sehr kleinen Mengen noch gut bestimmbar sind. *Takahashi* (102) wandte kürzlich dieses System zur Bestimmung von Aflatoxinen in Wein an und gibt als Nachweisgrenze 20 ppt an.

Die Isolierung und anschließende MS-Bestätigung von kleinen Mengen an Aflatoxinen kann mittels Liquid-Chromatographie einfacher und schonender als mit TLC vorgenommen werden (103).

Radioimmunoassay (RIA)

Zwei kürzlich publizierte Arbeiten, die die Erzeugung von Aflatoxin-B₁-Antikörpern und deren analytische Verwendung im Radioimmunoassay zum Thema haben, scheinen wichtig genug, um hier noch Erwähnung zu finden. *Langone* und *Van Vunakis* (104) setzten Aflatoxin B₁, das selbst keine antigene Wirkung hat, chemisch zum Aflatoxin-B₁-O-carboxymethyloxim (Abb.) um. Dieses reaktionsfähige Derivat wurde mit einem Polylysin (MG 90 000) konjugiert und das Konjugat zur Herstellung von Antikörpern benutzt. Mit dem damit durchführbaren



RIA lassen sich unter Verwendung von hoch (^3H)-markiertem Aflatoxin B_1 noch 0,06 ng AF B_1 in ungereinigten Extrakten von Mais und Erdnußbutter nachweisen. Die Affinität der Antikörper gegenüber den einzelnen Aflatoxinen wurde wie folgt bestimmt (1 = höchste Affinität): $\text{B}_1 = 1$, $\text{B}_2 = 2,3$, $\text{G}_1 = 6,6$, $\text{G}_2 = 21$, $\text{P}_1 = 447$, $\text{Q}_1 = 12$, $\text{B}_{2a} = 87$.

Chu und *Ueno* (105) schlugen bei der Herstellung der Antikörper einen etwas anderen Weg ein und erreichten damit eine bessere Spezifität gegenüber AF B_1 — die entsprechenden Zahlen sind: B_1 (1), B_2 (9), G_1 (11) und G_2 (89) — bei vergleichbarer Empfindlichkeit des RIA wie in der ersten Arbeit (104).

Während von der HPLC-Technik in erster Linie Verbesserungen in der quantitativen Aflatoxinbestimmung zu erwarten sind, haben wir mit dem RIA möglicherweise eine hochempfindliche Screening-Methode in der Hand. Wieweit diese beiden neuen (sich ergänzenden) Methoden die althergebrachte und vom Aufwand her einfache Dünnschichtchromatographie in der Aflatoxinanalytik ablösen werden, ist allerdings eine offene Frage.

Zusammenfassung

Es wird eine Uebersicht über die wichtigsten Methoden der Aflatoxinanalytik gegeben. Im einzelnen wird eingegangen auf: chemisch-physikalische Eigenschaften der Aflatoxine, Bestimmungsmethoden für B- und G-Aflatoxine in Lebens- und Futtermitteln, Ringversuche mit diesen Methoden, Möglichkeiten zur Identifizierung und Analytik der M-Aflatoxine. Den Abschluß bildet eine Zusammenfassung der neueren Literatur über Anwendung der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie und des Radioimmunoassay in der Aflatoxinanalytik.

Résumé

Il est donné un aperçu des méthodes d'analyses les plus importantes des aflatoxines. Les données suivantes sont traitées en détail: les caractéristiques physico-chimiques des aflatoxines, les méthodes de dosage des aflatoxines B et G dans les denrées alimentaires et les fourrages, les études collectives avec ces méthodes, les possibilités d'identification et d'analyse des aflatoxines M. A la fin du travail l'auteur donne un résumé de la littérature récente sur l'application de la chromatographie liquide à haute pression (HPLC) et de la «radioimmunoassay» (RIA) à l'analyse des aflatoxines.

Summary

A review with the most important methods for the analysis of aflatoxins is given. The following subjects are treated: chemical-physical properties of aflatoxins, estimation methods for aflatoxin B and G in foodstuffs and feed, collaborative studies with these methods, possibilities for identification and analysis of aflatoxin M. The application of

high pressure liquid chromatography (HPLC) and radioimmunoassay for detection of aflatoxins are discussed.

Literatur

1. Lancaster, M. C., Jenkins, F. P. and Philp, J. McL.: Toxicity associated with certain samples of groundnuts. *Nature* **192**, 1095—1096 (1961).
2. Allcroft, R. and Carnaghan, R. B. A.: Groundnut toxicity: An examination for toxin in human food products from animals fed toxic groundnut meal. *Vet. Record* **75**, 259—263 (1963).
3. Wogan, G. N.: Aflatoxin carcinogenesis. *Methods Cancer Res.* **7**, 309—344 (1973) (H. Busch, Ed., Academic Press, New York).
4. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man, Vol. 10: Some naturally occurring substances. International Agency for Research on Cancer, Lyon 1976.
5. Wogan, G. N., Paglialunga, S. and Newberne, P. M.: Carcinogenic effects of low dietary levels of aflatoxin B₁ in rats. *Food Cosmet. Toxicol.* **12**, 681—685 (1974).
6. Shank, R. C., Gordon, J. E., Wogan, G. N., Nondasuta, A. and Lubhamani, B.: Dietary aflatoxins and human liver cancer. III. Field survey of rural Thai families for ingested aflatoxins. *Food Cosmet. Toxicol.* **10**, 71—83 (1972).
7. Shank, R. C., Bhamarapravati, N., Gordon, J. E. and Wogan, G. N.: Dietary aflatoxins and human liver cancer. IV. Incidence of primary liver cancer in two municipal populations of Thailand. *Food Cosmet. Toxicol.* **10**, 171—179 (1972).
8. Alpert, M. E., Hutt, M. S. R., Wogan, G. N. and Davidson C. S.: Association between aflatoxin content of food and hepatoma frequency in Uganda. *Cancer N. Y.* **28**, 253 (1971).
9. Peers, F. G. and Linsell, C. A.: Dietary aflatoxins and liver cancer — a population based study in Kenya. *Brit. J. Cancer* **27**, 473—484 (1973).
10. Van Rensburg, S. J., Van der Watt, J. J., Purchase, I. F. H., Continho, L. P. and Markham, R.: Primary liver cancer rate and aflatoxin intake in a high cancer area. *S. African Med. J.* **48**, 2508a—2508d (1974).
11. Keen, P. and Martin, P.: Is aflatoxin carcinogenic in man? The evidence in Swaziland. *Trop. geogr. Med.* **23**, 44 (1971).
12. Peers, F. G., Gilman, G. A. and Linsell, C. A.: Dietary aflatoxins and human liver cancer. A study in Swaziland. *Int. J. Cancer* **17**, 167—176 (1976).
13. Asao, T., Büchi, G., Abdel-Kader, M. M., Chang, S. B., Wick, E. L. and Wogan, G. N.: Aflatoxins B and G. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 1706—1707 (1963).
14. Teichmann, B. und Krug, G.: Spektrophotometrische Untersuchungen an Aflatoxin B₁ und Aflatoxin G₁. *Arch. Geschwulstforsch.* **45**, (1), 25—33 (1975).
15. Haddon, W. F., Wiley, M. and Waiss jr., A. C.: Aflatoxin detection by TLC-MS. *Anal. Chem.* **43**, 268—270 (1971).
16. Pons jr., W. A. and Goldblatt, L. A.: Physicochemical assay of aflatoxins in aflatoxin, Ed. by L. A. Goldblatt. Academic Press, New York 1969.
17. Pons, W. A., Robertson, J. A. and Goldblatt, L. A.: Objective fluorometric measurement of aflatoxins on TLC-Plates. *J. Am. Oil Chemists' Soc.* **43**, 665—669 (1966).
18. Analysenverfahren zur Bestimmung der Aflatoxine B₁, B₂, G₁ und G₂ in Lebensmitteln. *Bundesgesundheitsblatt* **18**, 230 (1975) publiziert in *Deut. Lebensm. Rundschau* **71** (9), 332—335 (1975).

19. *Beljaars, P. R., Verhülsdonk, C. A. H., Paulsch, W. E. and Liem, D. H.*: Collaborative study of two-dimensional thin-layer chromatographic analysis of aflatoxin B₁ in peanut butter extracts using the antidiagonal spot application technique. *J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists* **56**, 1444—1451 (1973).
20. *Natural Poisons (1975)*. Reprint of Chapter 26 from *Official Methods of Analysis* 12th Ed. (1975).
21. *Arnold, H.*: Eine dünnschichtchromatographische Reinigungsmethode zur Bestimmung der Aflatoxine B₁, B₂, G₁ und G₂. *Fleischwirtschaft* **55**, 985 (1975).
22. *de Jongh, H., Vles, R. O. and van Pelt, J. G.*: Milk of mammals fed on aflatoxin-containing diet. *Nature* **202**, 466—467 (1964).
23. *Allcroft, R., Rogers, H., Lewis, G., Nabney, J. and Best, P. E.*: Metabolism of aflatoxin in sheep: Excretion of the milk toxin. *Nature* **209**, 154—155 (1966).
24. *Holzappel, C. W., Steyn, P. S. and Purchase, I. F. H.*: Isolation and structure of aflatoxins M₁ and M₂. *Tetrahedron Letters* **25**, 2799—2803 (1966).
25. *Campbell, T. P. and Hayes, J. R.*: The role of aflatoxin metabolism in its toxic lesion. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **35**, 199—222 (1976).
26. *Wogan, G. N. and Paglialunga, S.*: Carcinogenicity of synthetic aflatoxin M₁ in rats. *Food Cosmet. Toxicol.* **12**, 381—384 (1974).
27. *Sinnhuber, R. O., Lee, D. J., Wales, J. H., Landers M. K. and Keyl, A. C.*: Aflatoxin M₁, a potent liver carcinogen for rainbow trout. *Fed. Prod.* **29**, 568 (1970).
28. *Canton, J. H., Kroes, R., van Logten, M. J., van Schothorst, M., Stavenuiter, J. F. C. and Verhülsdonk, C. A. H.*: The carcinogenicity of aflatoxin M₁ in rainbow trout. *Food Cosmet. Toxicol.* **13**, 441—443 (1975).
29. *Purchase, I. F. H. and Vorster, L. J.*: Aflatoxin in commercial milk samples. *South Afr. med. J.* **42**, 219 (1968).
30. *Kiermeier, F., Weiss, G., Behringer, G., Miller, M. und Ranfft, K.*: Vorkommen und Gehalt an Aflatoxin M₁ in Molkerei-Anlieferungsmilch. *Z. Lebensm. Unters. -Forsch.* **163**, 171—174 (1977).
31. *Romer, Th. R.*: Determination of aflatoxins in mixed feeds. *J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists* **56**, 1111—1114 (1973).
32. *Kahlau, D. I. und Gedek, B. R.*: Nachweis von Aflatoxinen in Gegenwart von interferierenden Substanzen. *Zbl. Vet. Med. B* **23**, 230—242 (1976).
33. *Verordnung zur Aenderung der Verordnung über Analysemethoden für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln und Vormischungen*, in *Deut. Lebensm. Rundschau* **73**, 19—21 (1977).
34. *Strzelecki, E. L. and Gasiorowska, U. W.*: Aflatoxin B₁ in feedstuffs. *Zbl. Vet. Med. B* **21**, 395—400 (1974).
35. *Velasco, J. and Norris, K. H.*: Investigation of instrumental measurements to determine aflatoxin in florisil columns. *J. Am. Oil Chemists' Soc.* **50**, 385 (1973).
36. *Velasco, J.*: Detection of aflatoxin using small columns of florisil. *J. Am. Oil Chemists' Soc.* **49**, 141—142 (1972).
37. *Velasco, J.*: Fluorometric measurement of aflatoxin absorbed on florisil in minicolumns. *J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists* **58**, 757—763 (1975).
38. *Velasco, J.*: Modified ferric gel method for determining aflatoxin in cottonseed. *J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists* **55**, 1359—1360 (1972).
39. *Romer, Th. R.*: Screening method for the detection of aflatoxins in mixed feeds and other agricultural commodities with subsequent confirmation and quantitative measurement of aflatoxins in positive samples. *J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists* **58**, 500—506 (1975).

40. *Romer, Th. R. and Campbell, D. A.*: Collaborative study of a screening method for the detection of aflatoxins in mixed feeds, other agricultural products and foods. *J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists* **59**, 110—117 (1976).
41. *Stoloff, L., Beckwith, A. C. and Cushmac, M. E.*: TLC-spotting solvent for aflatoxins. *J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists* **51**, 65—67 (1968).
42. *Beljaars, P. R., Fabry, F. H. M., Pickott, M. M. A. and Peeters, M. J.*: Quantitative fluorodensitometric measurement of aflatoxin B₁ with a flying-spot-densitometer. *J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists* **55**, 1310—1315 (1972).
43. *Töth, L., Tauchmann, F. und Leistner, L.*: Quantitativer Nachweis der Aflatoxine durch photofluorometrische Bestimmung direkt von Dünnschichtplatten. *Fleischwirtschaft* **50**, 1235—1237 (1970).
44. *Peterson, R. E., Ciegler, A. and Hall, H. H.*: Densitometric measurement of aflatoxin. *J. Chromatog.* **27**, 304—307 (1967).
45. *Frank, H. K. und Eyrich, W.*: Ueber den Nachweis von Aflatoxinen und das Vorkommen Aflatoxin-vortäuschender Substanzen in Lebensmitteln. *Z. Lebensm. Untersuch. -Forsch.* **138**, 1—11 (1968).
46. *Schuller, P. L., Horwitz, W. and Stoloff, L.*: A review of sampling plans and collaboratively studied methods of analysis for aflatoxin. *J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists* **59**, 1315—1343 (1976).
47. *Di Prossimo, V.*: Collaborative study comparing two methods for the determination of aflatoxins in pistachio nuts. *J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists* **57**, 1114—1120 (1974).
48. *Strezleck, S. and Kogan, L.*: Note on thin-layer-chromatography of aflatoxin. *J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists* **49**, 33 (1966).
49. *Kiermeier, F.*: Ueber Schwierigkeiten bei der quantitativen Bestimmung der Aflatoxine in Lebensmitteln. *Z. Lebensm. Untersuch. -Forsch.* **148**, 331—341 (1972).
50. *Eppley, R. M., Stoloff, L. and Campbell, A. D.*: Collaborative study of «a versatile procedure for assay of aflatoxins in peanut products», including preparatory separation and confirmation of identity. *J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists* **51**, 67—73 (1968).
51. *Waltking, A. E.*: Collaborative study of three methods for determination of aflatoxins in peanuts and peanut products. *J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists* **53**, 104—113 (1970).
52. *Stack, M. E.*: Collaborative study of AOAC-methods I and III for the determination of aflatoxins in peanut butter. *J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists* **57**, 871—874 (1974).
53. *Pons jr., W. A.*: Collaborative study on the determination of aflatoxins in cottonseed products. *J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists* **52**, 61—72 (1969).
54. *Campbell, A. D. and Funkhauser, J. T.*: Collaborative study on the analysis of aflatoxins in peanut butter. *J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists* **49**, 730—739 (1966).
55. *Pons jr., W. A., Cuculla, A. F., Franz, A. G. and Goldblatt, L. A.*: Improved objective fluorodensitometric determination of aflatoxins in cottonseed products. *J. Am. Oil Chemists' Soc.* **45**, 694—699 (1968).
56. *Pons jr., W. A., Cuculla, A. F. and Franz jr., A. O.*: Rapid quantitative TLC method for determining aflatoxins in cottonseed products. *J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists* **55**, 768—774 (1972).
57. *Pons jr., W. A.*: Collaborative study of a rapid method for determining aflatoxins in cottonseed products. *J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists* **58**, 746—753 (1975).

58. *Baur, F. J. and Armstrong, J. C.*: Collaborative study of a modified method for the determination of aflatoxins in copra, copra meal, and coconut. *J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists* **54**, 874—878 (1971).
59. *Shotwell, O. L. and Stubblefield, R. D.*: Collaborative study of the determination of aflatoxin in corn and soy-beans. *J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists* **55**, 781—788 (1972).
60. *Scott, P. M. and Przybylski, W.*: Collaborative study of a method for the analysis of cocoa beans for aflatoxins. *J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists* **54**, 540—544 (1971).
61. *Scott, P. M.*: Note on analysis of aflatoxins in green coffee. *J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists* **51**, 609 (1968).
62. *Levi, C. P.*: Collaborative study on a method for detection of aflatoxin B₁ in green coffee beans. *J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists* **52**, 1300—1303 (1969).
63. *Andrellos, P. J. and Reid, G. R.*: Confirmatory tests for aflatoxin B₁. *J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists* **47**, 801—803 (1964).
64. *Pohland, A. E., Yin, L. and Dantzman, J. G.*: Rapid chemical confirmatory method for aflatoxin B₁. *J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists* **53**, 101—102 (1970).
65. *Przybylski, W.*: Formation of aflatoxin derivatives on thin layer chromatographic plates. *J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists* **58**, 163—164 (1975).
66. *Schuller, P. L., Ockhuizen, T., Werringloer, J. und Marquardt, P.*: Aflatoxin B₁ und Histamin in Wein. *Arzneimittelforsch.* **17**, 888—890 (1967).
67. *Stoloff, L.*: Rapid chemical confirmatory method for aflatoxin B₁. II. Collaborative study. *J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists* **53**, 102—104 (1970).
68. *Stoloff, L.*: Collaborative study of a method for the identification of aflatoxin B₁ by derivative formation. *J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists* **50**, 354—360 (1967).
69. *Stack, M. E. and Pohland, A. E.*: Collaborative study of a method for chemical confirmation of the identity of aflatoxin. *J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists* **58**, 110—113 (1975).
70. *Fritz, W., Engst, R. und Donath, R.*: Zur Problematik der Aflatoxinbestimmung. *Nahrung* **16**, 681—687 (1972).
71. *Bösenberg, H.*: Analytische Probleme beim Nachweis von Mykotoxinen. *Getreide, Mehl u. Brot* **27**, 94—97 (1973).
72. *Bösenberg, H.*: Untersuchungen über den Nachweis von Aflatoxinen. *Arzneimittelforsch.* **20**, 1521—1528 (1970).
73. *Verrett, M. J., Marliac, J.-P. and McLaughlin jr., J.*: Use of the chicken embryo in the assay of aflatoxin toxicity. *J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists* **47**, 1003—1006 (1964).
74. *Haddon, W. F., Masri, M. J., Randall, V. G., Elskén, R. H. and Meneghelli, B. J.*: Mass spectral confirmation of aflatoxins. *J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists* **60**, 107—113 (1977).
75. *Shotwell, O. L., Goulden, M. L. and Hesseltine, C. W.*: Aflatoxin M₁. Occurrence in stored and freshly harvested corn. *J. Agr. Food Chem.* **24**, 683—684 (1976).
76. *Mücke, W. und Kiermeier, F.*: Zur Herstellung von Aflatoxin M-Standards für analytische Untersuchungen. *Z. Lebensm. Untersuch. -Forsch.* **151**, 387—391 (1973).
77. *Stubblefield, R. D., Shannon, G. M. and Shotwell, O. L.*: Aflatoxin M₁ in milk: Evaluation of methods. *J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists* **56**, 1106—1110 (1973).
78. *Masri, M. S., Page, J. R. and Garcia, V. C.*: Modification of method for aflatoxins in milk. *J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists* **52**, 641—643 (1969).
79. *Purchase, I. F. H. and Steyn, P. S.*: Estimation of aflatoxin M in milk. *J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists* **50**, 363—367 (1967).

80. *Jacobson, W. C., Harmeyer, W. C. and Wiseman, H. G.*: Determination of aflatoxin B₁ and M₁ in milk. *J. Dairy Sci.* **54**, 21—24 (1971).
81. *Roberts, B. A. and Allcroft, R.*: A note on the semi-quantitative estimation of aflatoxin M₁ in liquid milk by TLC. *Food Cosmet. Toxicol.* **6**, 339—340 (1968).
82. *Fehr, P. M., Bernage, L. et Vassilopoulos, V.*: Effet de la consommation de tourteau d'arachide pollué par *A. flavus* chez le ruminant en lactation. *Lait* **48**, 377—391 (1971).
83. *Pons jr., W. A., Cucullu, A. F. and Lee, L. S.*: Method for the determination of aflatoxin M₁ in fluid milk and milk products. *J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists* **80**, 1431—1436 (1973).
84. *Bodine, A. B., Wayne Davis, R., Janzen, J. J. and Crawford, F. M.*: Comparison of two methods for analysis of aflatoxin M₁ in milk. *J. Dairy Sci.* **60**, 450—452 (1977).
85. *Tuinstra, L. G. M. Th. and Bronsgeest, J. M.*: Determination of aflatoxin M₁ in milk at the parts per trillion level. *J. Chromatog.* **111**, 448—451 (1975).
86. *Kiermeier, F. und Weiß, G.*: Zur Untersuchung von Milch und Milchprodukten auf die Aflatoxine B₁, B₂, G₁, G₂ und M₁. *Z. Lebensm. Untersuch. -Forsch.* **160**, 337—344 (1976).
87. *Schuller, P. L., Verhülsdonk, C. A. H. and Paulsch, W. E.*: Analysis of aflatoxin M₁ in liquid and powdered milk. *Pure Appl. Chem.* **35**, 291—296 (1973).
88. *Patterson, D. S. P. and Roberts, B. A.*: An improved semiquantitative method for the estimation of aflatoxin M₁ in liquid milk. *Food Cosmet. Toxicol.* **13**, 541—542 (1975).
89. *Frank, H. K.*: Aflatoxine in Lebensmitteln. *Arch. Lebensm.-Hyg.* **17**, 237—242 (1966).
90. *Trucksess, M. W.*: Derivatization procedure for identification of aflatoxin M₁ on TLC. *J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists* **59**, 722—723 (1976).
91. *Janicki, I. K., Szebiotka, J., Chelhowski, M., Kokorniak, B. and Godlweska, M.*: *Acta Aliment. Pol.* I (3—4), 207—219 (1975).
92. *Seiber, J. N. and Hsieh, D. P. H.*: Application of high-speed liquid chromatography to the analysis of aflatoxins. *J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists.* **56**, 827—830 (1973).
93. *Garner, R. C.*: Aflatoxin separation by high-pressure liquid chromatography. *J. Chromatog.* **103**, 186—188 (1975).
94. *Hsieh, D. P. H., Fitzell, D. L., Miller J. L. and Seiber, J. N.*: High pressure liquid chromatography of oxidative aflatoxin metabolites. *J. Chromatog.* **117**, 474—479 (1975).
95. *Pons jr., W. A.*: Resolution of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ by HPLC. *J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists* **59**, 101—105 (1976).
96. *Seitz, L. M.*: Comparison of methods for aflatoxin analysis by HPLC. *J. Chromatog.* **104**, 81—87 (1975).
97. *Zimmerli, B.*: Verbesserung der Nachweisgrenze von Aflatoxinen in der HPLC durch Verwendung eines kieselgelgefüllten Fluoreszenzdetektors. *J. Chromatog.* **131**, 458—463 (1977).
98. *Chelkowski, J.*: Spectral behaviour of aflatoxins in different solvents. *Photochem. Photobiol.* **20**, 279—280 (1974).
99. *van Duuren, B. L., Chan, T. L. and Irani, F. M.*: Luminescence characteristics of aflatoxins B₁ and G₁. *Anal. Chem.* **40**, 2024—2027 (1968).
100. *Panalaks, T. and Scott, P. M.*: Sensitive silicagel-packed flow-cell for fluorometric detection of aflatoxins by HPLC. *J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists* **60**, 583—589 (1977).
101. *Zimmerli, B.*: Beitrag zur Bestimmung von Aflatoxinen mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **68**, 36—45 (1977).

102. *Takahashi, D. M.*: Reversed-phase high-performance liquid-chromatographic analytical system for aflatoxins in wines with fluorescence detection. *J. Chromatog.* **131**, 147—156 (1977).
103. *Rao, G. H. R.* and *Anders, M. W.*: Aflatoxin detection by high-speed liquid chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatog.* **84**, 402—406 (1973).
104. *Langone, J. J.* and *Van Vunakis, H.*: Aflatoxin B₁: Specific antibodies and their use in radioimmunoassay. *J. Nat. Cancer Inst.* **56**, 591—595 (1976).
105. *Chu, F. S.* and *Ueno, I.*: Production of antibody against aflatoxin B₁. *Appl. Envir. Microbiol.* **33**, 1125—1128 (1977).
106. *Knutti, R.* und *Schlatter, Ch.*: Probleme der Bestimmung von Aflatoxin in Erdnüssen — Vorschlag für einen Probenahme- und Analysenplan für die Importkontrolle. *Mitt. Gebiete Lebens. Hyg.* **69**, 264—274 (1978).

Dr. J. Lüthy
Institut für Toxikologie der
Eidgenössischen Technischen Hochschule
und der Universität Zürich
Schorenstraße 16
CH-8603 Schwerzenbach