

Amtliche Methoden zur Bestimmung von Aflatoxin M in Milch und Milchpulver = Official methods of analysis for aflatoxin M in milk and [i.e. and] milk powder

Autor(en): [s.n.]

Objektyp: **Article**

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

Band (Jahr): **76 (1985)**

Heft 1

PDF erstellt am: **14.09.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-982358>

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.

Amtliche Methoden zur Bestimmung von Aflatoxin M₁ in Milch und Milchpulver

Official Methods of Analysis for Aflatoxin M₁ in Milk and Milk Powder

Arbeitsgruppe Toxine 2 der Eidgenössischen Lebensmittelbuch-Kommission

Einleitung

Aflatoxin M₁ wird in Kühen aus Aflatoxin B₁ gebildet und in der Milch ausgeschieden. Da Aflatoxin M₁ in hohem Verdacht steht, karzinogen zu sein (1), sind die Grenzwerte (in der Schweiz) entsprechend tief angesetzt. Für Konsummilch beträgt er 50 ng/kg, für Säuglingsmilch 10 ng/kg.

Die von der Lebensmittelbuch-Kommission gebildete Arbeitsgruppe für Toxine 2 kam im Laufe der Arbeiten zum Schluss, dass es ihr zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht möglich sei, für Milch- und Milchpulver einheitliche, statistisch überprüfbare Analysemethoden mit den geforderten Nachweisgrenzen zu entwickeln. Demgegenüber konnte belegt werden, dass es mit entsprechender Erfahrung möglich ist, bei freier Methodenwahl akzeptable Interlabor-Vergleichbarkeiten zu erzielen. Aus diesem Grunde werden im folgenden die gesamten Resultate der von der Arbeitsgruppe durchgeführten Ringversuche und die dabei zum Einsatz gelangenden Methoden im Detail beschrieben. Die Methoden wurden der Lebensmittelbuch-Kommission vorgelegt und von dieser im Sinne des Lebensmittelbuches amtlich empfohlen.

Ringversuche mit künstlich kontaminierter Milch

Erster Ringversuch

Probenvorbereitung und Versuchsanlage

0,5 l UHT-Milch wurden für jeden Teilnehmer in sterile Flaschen abgefüllt und mit einer Aflatoxin-M₁-Standardlösung kontaminiert. Der Aflatoxin-M₁-Gehalt der Standardlösung wurde spektrophotometrisch nach AOAC 26.008 ermittelt. Die Nennkonzentration der kontaminierten Proben betrug 50 ng/kg. Jeder

Teilnehmer erhielt gleichzeitig mit der Probe eine intakte Packung 0,5 l UHT-Milch derselben Abfüllung sowie ein Muster der verwendeten Aflatoxin-M₁-Standardlösung. Die ermittelten Werte waren mit Hilfe dieser Standardlösung zu berechnen (ohne Berücksichtigung einer Wiederfindungsrate!).

Resultate

Tabelle 1. Probe mit 50 ng/kg Nennkonzentration

Labor	Einzelwerte in ng/kg						\bar{x}	s	VK (%)
1	50	50	50	44	49	50	48,8	2,4	4,9
2	56		54	54			54,7	1,2	2,2
3	58		53	60			57,0	3,6	6,3
4	46		45	48			46,3	1,5	3,2
5	38		42	41			40,3	2,1	5,2
6	33		28	33			31,3	2,9	9,3
7	26		26	26			26,0	—	—
Mittelwerte aller Labors							43,5		
Standardabweichung aller Mittelwerte								11,6	
Variationskoeffizient der Mittelwerte									26,7

Unkontaminierte Probe:

2 Laboratorien fanden Werte von 12 ng/kg, die anderen durchwegs weniger als 10 ng/kg.

Zweiter Ringversuch

Probenvorbereitung und Versuchsanlage

Nach dem gleichen Verfahren wie im ersten Ringversuch wurden Muster mit Aflatoxin-M₁-Nennkonzentrationen von 0,10 und 50 ng/kg hergestellt und versandt. Wiederum wurde jedem Teilnehmer eine Aflatoxin-M₁-Standardlösung bekannter Konzentration zur Verfügung gestellt, welche zur Berechnung der Resultate diente. Die Wiederfindungsraten waren auch hier nicht zu berücksichtigen.

Resultate

Table 2. Probe mit 10 ng/kg Nennkonzentration

Labor	Einzelwerte in ng/kg						\bar{x}	s	VK (%)
1	12	11	12				12	0,6	5,0
2	10	9	11				10	1,0	10,0
3	12	10	11				11	1,0	9,1
4	8	7	7				7	0,6	8,6
5	13	10	12				12	1,5	12,5
6	13	6	6				8	4,0	50,0
7	8	8	8				8	—	—
8	14	14	12	13	14		13	0,9	6,9
9	10	10					10	—	—
10	7	5					6	—	—
11	22	20	23				22	1,5	6,8
Mittelwert der Labors 1–10							9,7		
Standardabweichung der Mittelwerte der Labors 1–10								2,4	
Variationskoeffizient der Mittelwerte der Labors 1–10									24,7

Table 3. Probe mit 50 ng/kg Nennkonzentration

Labor	Einzelwerte in ng/kg						\bar{x}	s	VK (%)
1	42	43	42				42	0,6	1,4
2	35	37	33				35	2,0	5,7
3	40	40	39				40	0,6	1,5
4	35	36	34				35	1,0	2,9
5	37	44	43				41	3,8	9,3
6	29	26	25				27	2,1	7,8
7	28	28	28				28	—	—
8	42	39	40	43	40	43	41	1,7	4,1
9	38	41					40	—	—
10	12	12	12	12	13	12	12	0,4	3,3
11	41	41	33				38	4,6	12,1
Mittelwert (ohne Labor 10)							36,7		
Standardabweichung der Mittelwerte (ohne Labor 10)								5,4	
Variationskoeffizient der Mittelwerte (ohne Labor 10)									14,7

Unkontaminierte Probe:

Aflatoxin M₁ war in keinem der Teilnehmerlabors nachweisbar.

Ringversuch mit natürlich kontaminiertem Milchpulver

Dieser Versuch wurde von der FECS¹-Arbeitsgruppe für Lebensmittelchemie organisiert; die Versuchsplanung, Herstellung der Milchpulverproben und die Resultate von 58 Versuchsteilnehmern sind veröffentlicht (2). Im folgenden werden nur die Resultate der Teilnehmer aus den Labors der Arbeitsgruppe dargestellt. Sämtliche Werte wurden mit der vom jeweiligen Teilnehmer ermittelten Wiederfindungsrate korrigiert.

Tabelle 4. Probe mit 100 ng/kg Nennkonzentration

Labor	Einzelwerte								\bar{x}	<i>s</i>	VK (%)
1	102**		113**		88**		106**		102	11	10,8
2	96		103		66				88	20	22,7
3	123		136						130	—	—
4	113		113		116				114	1,7	1,5
5	133	(99)*	58	(74)	101	(150)	109	(130)	107	31	29,0
6	104		104		112				107	4,6	4,3
7	113		109		110		110		111	1,7	1,5
Mittelwert									108,4		
Standardabweichung der Mittelwerte										12,7	
Variationskoeffizient der Mittelwerte											11,7

* Werte (): Auswertung des TFA-Derivates.

** Durchschnitt der für freies AFM₁ und derivatisiertes AFM₁ erhaltenen Werte.

Tabelle 5. Probe mit 500 ng/kg Nennkonzentration

Labor	Einzelwerte								\bar{x}	<i>s</i>	VK (%)		
1	467**		538**		525**		462**	473	493	36	7,3		
2	397		394		391				394	3,0	0,8		
3	548		505						527	—	—		
4	445		406		368				406	39	9,6		
5	473	(504)*	328	(488)	325	(470)	452	(490)	490	(460)	448	66	14,7
6	416		424		360				400	35	8,8		
7	331		298		306		339		319	20	6,3		
Mittelwert									426,7				
Standardabweichung der Mittelwerte										69,2			
Variationskoeffizient der Mittelwerte											16,2		

In der unkontaminierten Probe fanden zwei Teilnehmer Gehalte von 18 bzw. 67 ng/kg.

¹ Federation of European Chemical Societies

Verwendete Methoden

Reagenzien und Geräte

Sämtliche *Reagenzien* und *Lösungsmittel* weisen, wo nichts anderes vermerkt ist, handelsübliche Analysenqualität auf.

Alle Lösungsmittelgemische sind als Volumenteile angegeben.

Das verwendete *Wasser* muss destilliert oder von entsprechender Reinheit sein. Dünnschichtplatten: Kieselgel 60 auf Alufolie, ohne F (Merck, Art. 5553).

Extrelut[®]-Säulen (Merck Nr. 11737); Sep-Pak[®] C₁₈-Kartuschen (Waters).

Silicagel 60 (Merck Nr. 7754).

20-ml-Einmalspritzen.

HPLC-Ausrüstung mit Fluoreszenzdetektor, Säulen RP 18, RP 8.

Celite 545 (geglüht).

Faltenfilter (Schleicher & Schüll Nr. 595 1/2, \varnothing 15 cm).

Auftraggerät für die Dünnschichtchromatographie (z. B. Linomat III, Camag).

Gerät zur fluorodensitometrischen Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen.

Methode des Kantonalen Laboratoriums Zürich (3)

Prinzip

Milch bzw. rekonstituierte Milch wird einer reverse-phase Kieselgel-(C₁₈-)Filtration unterzogen. Zurückgehaltenes Aflatoxin M₁ wird in angereicherter Form eluiert, aus dem Eluat extrahiert und der Extrakt anschliessend dünn-schichtchromatographisch getrennt. Die Quantifizierung erfolgt densitometrisch.

Probenvorbereitung

Eine Sep-Pak-C₁₈-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) gespült. Aflatoxin M₁ wird anschliessend mit 4 ml Acetonitril/ Wasser (3+7) in ein verschliessbares 15-ml-Zentrifugenglas eluiert. Mit 4 ml Dichlormethan wird das Eluat 1 min lang

* Rekonstituierung von Milchpulver:

2,5 g Milchpulver werden in 17,5 ml entionisiertes Wasser (40 °C) portionenweise eingerührt und unter Rühren während 15–30 min bei 40 °C belassen. Anschliessend wird die resultierende, teilweise noch inhomogene Emulsion durch eine mit einer feinen Nadel (0,4 mm i. d.) versehene Spritze gepresst und dadurch homogenisiert. Unmittelbar darauf ist die Sep-Pak-Chromatographie durchzuführen.

Sollte sich Milchpulver *nicht* in Lösung bringen lassen (z. B. hochtemperatur-walzengetrocknete Milch), wird nach der Extraktionsmethode auf Seite 98 verfahren.

geschüttelt und die Emulsion zentrifugiert (3 min, 4000 U/min). Die organische Phase wird über wenig Watte in ein 10-ml-Spitzkölbchen pipettiert, die wässrige Phase noch einmal mit 2 ml Dichlormethan extrahiert und erneut zentrifugiert. Im Wasserstrahlvakuum werden die vereinigten organischen Phasen bei 40 °C bis zur Trockne eingedampft und der Rückstand sofort in 100 μ l Toluol/Acetonitril (9+1) aufgenommen.

Dünnschichtchromatographie

50 μ l des Extraktes (entsprechend 10 ml Milch) sowie Standardlösungen werden in 12 cm Höhe mit einer Bandbreite von 8 mm (Linomat) auf eine Kieselgelalufolie aufgetragen (Abb. 1).

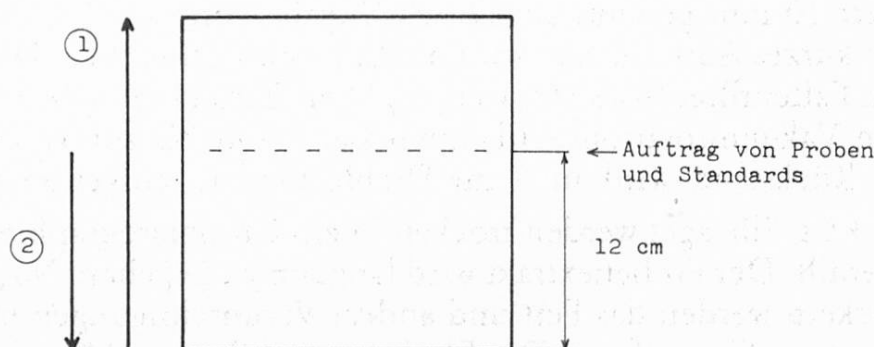


Abb. 1. Auftrags- und Entwicklungsschema für die Dünnschichtchromatographie

Die Platte wird in Diethylether (Richtung ①, ungesättigte Kammer, jedoch mit hoher (10 cm) Etherschicht) entwickelt. Nach kurzem Trocknen bei Raumtemperatur wird sie in Toluol/Ethylacetat/Ameisensäure (6+3+1), 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 des Standards in Richtung ① markiert. Sie wird parallel zur Auftragslinie entzweigeschnitten und in Chloroform/Aceton/Propanol-2 (87+10+3, ungesättigte Kammer) in Richtung ② entwickelt.

Die Quantifizierung erfolgt densitometrisch mit Fluoreszenzmessung (Anregung: 365 nm, Messung der Emission mit einem zwischen 400 und 500 nm durchlässigen Kantenfilter).

Bestätigung von Aflatoxin M_1

Nach der densitometrischen Auswertung werden die M_1 -Standards und die Flecken (bzw. Banden) mit gleichem R_f -Wert mit Bleistift markiert. 3–5 μ l Trifluoressigsäure werden strichförmig auf die markierten Flecken aufgetragen, die 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 (90+8+2+0,8, ungesättigte Kammer) entwickelt. Die densitometrische Messung wird analog der nicht derivatisierten Probe durchgeführt.

Prinzip

Milch bzw. Milcpulver wird mit Phosphorsäure und Aceton behandelt und anschliessend extrahiert. Der Extrakt wird an Kieselgel chromatographiert (Säule) und das aflatoxin-M₁-haltige Eluat dünn-schichtchromatographisch getrennt. Die Quantifizierung erfolgt densitometrisch.

Probenvorbereitung

- a) *Extraktion.* 50 g Milch bzw. 5–10 g Milcpulver (mit Wasser auf 50 g auffüllen) werden mit 1 ml Phosphorsäure (1n) und 50 ml Aceton in einer 500-ml-Plasmaflasche 10 min geschüttelt. Nach Zugabe von 100 ml Dichlormethan wird weitere 10 min geschüttelt. Durch Zugabe von ca. 25 g Celite 545 (geglüht) und kurzes Aufschütteln wird die Emulsion gebrochen. Nach Filtration über einen Faltenfilter (S+S 1/2) werden 90 ml Extrakt (30 g Milch bzw. 3–6 g Pulver) am Vakuumrotationsverdampfer bei 35–40 °C zur Trockne gebracht (Öl). Der Rückstand wird in 5 ml Dichlormethan aufgenommen.
- b) *Reinigung.* 1,5 g Silicagel werden trocken in ein Chromatographierohr (i. D. 10 mm) eingefüllt. Der Probenextrakt wird langsam aufgegeben. Nach vollständigem Einsickern werden das Fett und andere Verunreinigungen mit 20 ml Diethylether wasserfrei entfernt. Die Elution von Aflatoxin M₁ erfolgt mit 15 ml Chloroform/Aceton (4+1). Nach Einengen und Überspülen mit Dichlormethan in ein Schraubdeckelgläschen (ca. 7 ml Inhalt) wird der Extrakt im Stickstoffstrom zur Trockne gebracht und in 125 µl Benzol/Acetonitril (90+10) aufgenommen.

Dünnschichtchromatographie

50 µl Extrakt (max. 6 Proben) und 3 Standards (5, 10, 20 µl) einer 50 ng/ml Aflatoxin-M₁-Lösung werden auf der Höhe von 15 cm punktförmig auf eine Kieselgel-60-Alufolie mit Einmalmikropipetten aufgetragen. Die Platte wird in Chloroform/Aceton/Wasser (88+12+0,2) mit Filterpapiereinlage in Richtung ① entwickelt (Abb. 1).

Nach kurzem Trocknen wird die Folie auf der Höhe von 16–16,5 cm entzweigeschnitten und in Diethylether/Methanol/Wasser (94+4,5+1,5) in Richtung ② entwickelt. Nach dem Trocknen mit dem Fön wird die Platte wiederum ca. 1 cm unterhalb der Aflatoxin-M₁-Flecken entzweigeschnitten und weiter in Richtung ② mit Toluol/Ethylacetat/Ameisensäure (6+3+1) entwickelt. Anschliessend wird auf der getrockneten Platte die Fluoreszenz von Aflatoxin M₁ ausgemessen (CAMAG-Scanner mit Monochromator bei 366 nm, Hg-Lampe).

HPLC-Trennung (gemäss Vorschrift des Kantonalen Laboratoriums Waadt)

Der im Abschnitt Reinigung erhaltene getrocknete Extrakt wird in 10,0 ml Methanol/Wasser (20+80) aufgenommen. Davon gelangen 500 µl zur Injektion für die HPLC-Bestimmung.

HPLC-Bedingungen:

Säule: RP C₁₈, 5–10 µm, 25 cm ausgerüstet mit einer 5-cm-Vorsäule, gefüllt mit demselben Trennmaterial.

Elutionsmittel: Methanol/Wasser 48+52.

Durchflussgeschwindigkeit: 1,0 ml/min.

Fluoreszenzdetektor: Anregung 360 nm

Emission 418 nm

Zellvolumen 30 µl.

Retentionszeit von Aflatoxin M₁: 6,5 min.

Bestätigung: Derivatisierung mit Trifluoressigsäure (DC)

Unter der UV-Lampe werden die Aflatoxin-M₁-Standard- und -Probeflecken mit Bleistift fein markiert. Anschliessend wird je 1 µl Trifluoressigsäure (TFA) auf die Flecken aufgetragen und die Folie sofort mit einer Glasplatte abgedeckt und 10–15 min in den Trockenschrank (75–80 °C) gelegt. Nach kurzem Abblasen des überschüssigen TFA mit dem Fön wird die Platte in Diethylether, darauf 1–2 mal in Chloroform/Methanol/Essigsäure/Wasser (90+8+2+0,8) entwickelt. Die Quantifizierung erfolgt wie in Abschnitt Dünnschichtchromatographie.

Bestätigung: HPLC gemäss Vorschrift des Kantonalen Laboratoriums Waadt

Der im Abschnitt Reinigung erhaltene getrocknete Extrakt wird mit 30 µl Trifluoressigsäure versetzt. Das Probengläschen wird verschlossen, kurz geschüttelt und mindestens 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Darauf wird überschüssiges Reagenz im Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand in 10 ml Methanol/Wasser (20+80) aufgenommen. Die HPLC-Bedingungen sind gleich wie bei der HPLC-Trennung beschrieben; die Retentionszeit des TFA-Derivates beträgt 3,6 min.

Methode des Kantonalen Laboratoriums Bern (4)

Prinzip

Die Milchproteine werden durch Zugabe von Salzsäure und Methanol gefällt, durch Erwärmen wird die Koagulation beschleunigt. 20 ml Filtrat (entsprechend 15,4 ml Milch) werden auf eine Extrelutsäule pipettiert und anschliessend mit 200 ml Dichlormethan/Toluol (4+1) eluiert.

Das Eluat wird durch basisches und saures Ausschütteln gereinigt und anschliessend dünnschichtchromatographisch auf M₁ geprüft.

Die quantitative Bestimmung erfolgt durch Densitometrie des fluoreszierenden M₁.

Extraktion

Rekonstitution von Milchpulver:

26 g Milchpulver werden in 175 ml Wasser (50 °C) suspendiert (2–5 min Magnetrührer). 50 ml werden wie gewöhnliche Milch weiterverarbeitet.

50 ml Milch – 5 min vorgewärmt in Wasserbad von 50 °C – werden mit 12%iger Salzsäure auf $\text{pH} = 4,6 \pm 0,05$ eingestellt, mit 15 ml Methanol versetzt und während 15 min in ein Wasserbad von 50 °C gestellt.

Die noch warme Suspension wird durch ein Faltenfilter \varnothing 15 cm filtriert, wobei die ersten ca. 10 ml Filtrat zurück auf das Filter gegossen werden. 20 ml des kalten Filtrates werden auf eine Extrelut[®]-Säule pipettiert. Über und unter der Säule wird je ein 250-ml-Scheidetrichter angebracht. Der obere Scheidetrichter wird mit 200 ml Dichlormethan/Toluol (4+1) gefüllt.

Nach 15 min lässt man Elutionsmittel auf die Säule tropfen. Sobald Eluat aus der Säule in den unteren Scheidetrichter tropft, wird der obere Scheidetrichter mit einem Stopfen verschlossen und der Hahn voll geöffnet (Mariottisches Gefäß).

Die Durchflussgeschwindigkeit wird durch die unten angebrachte Originalkanüle geregelt. Elutionsdauer: 60–80 min. Das Eluat wird 2mal mit 15 ml 0,01 n Natronlauge und 1mal mit 15 ml 0,1 n Salzsäure ausgeschüttelt, über Natriumsulfat getrocknet, durch wenig Watte filtriert und am Rotationsverdampfer zur Trockne gebracht. Mit total ca. 2 ml Dichlormethan wird der Spitzkolben ausgespült und das Dichlormethan in einem 2,5-ml-Gewindefläschchen gesammelt. Mit Stickstoff wird anschliessend das Lösungsmittel entfernt.

Dünnschichtchromatographie

Das Auftragen der Milchextrakte erfolgt am besten mit Hilfe eines Linomats: Das Gewindefläschchen wird in 2 Portionen zu je ca. 40 μl Dichlormethan ausgespült und die Lösung strichförmig (8 mm) auf die DC-Platte aufgetragen. Auf eine Platte können 3mal je 10 μl Standard und 7 Probenextrakte aufgetragen werden (Standard: Verdünnung der Stammlösung mit CHCl_3 auf 0,077 ng M_1 /ml. Die Chromatographiewannen werden mit Filterpapier ausgekleidet.

Fliessmittel 1: Chloroform/Aceton (9+1)

Fliessmittel 2: Dichlormethan/Aceton (6+4)

Fliessmittel 3: Chloroform/Aceton/n-Pentanol (8+1+1)

Entwicklung:

2mal Fliessmittel 1

1mal Fliessmittel 2 oder 3.

Zwischen den Entwicklungen wird die Platte während 5 min mit dem warmen Heizlüfter (ca. 40 °C) auf der Rückseite erwärmt.

Fluoreszenzmessung:

Messanordnung: Probe/Monochromator

Lampe: Hg

Filter: 365 nm

Emission: 420 nm

Die Nachweisgrenze liegt bei 5 ng/kg.

Wiederfindungsrate bei 50 ng/kg: $78 \pm 4\%$.

Weitergehende Informationen und Abbildungen sind in (4) zu finden. Die Bestätigung von M_1 erfolgt gemäss folgendem Abschnitt.

Bestätigungsmethoden

Die M_1 -haltige Methode wird von der DC-Schicht abgehoben. Das Schichtmaterial wird mit 2 ml Dichlormethan/Aceton (6+4) direkt in ein silanisiertes Gewindefläschchen eluiert. Das Eluat wird vorsichtig mit einem schwachen Stickstoffstrom zur Trockne gebracht.

Der Nachweis von M_1 im Rückstand kann erfolgen durch

- HPLC oder
- Herstellung und Chromatographie des Acetylderivates (DC) oder
- Herstellung und Chromatographie des Trifluoracetylderivates (DC).

Vorsicht: – Adsorption von M_1 in reiner Form an Glasoberfläche!

- n-Pentanol des Fließmittels 3 (vgl. DC Seite 100) muss restlos entfernt werden!

HPLC-Bedingungen

Der Eluatrückstand wird in 50 μ l Methanol gelöst und mit 20 μ l Wasser verdünnt. Die ganze Lösung wird injiziert.

Säule: RP-8, 5 μ m (30 cm).
Elutionsmittel: Acetonitril/Wasser (1+3).
Durchflussgeschwindigkeit: 0,6 ml/min (ca. 160 bar).
Fluoreszenzdetektor: Anregung 360 nm.
Emission 415 nm.
Retentionszeit von M_1 : ca. 20 min.

Acetylierung in Lösung

Der Eluatrückstand wird mit 0,2 ml eines Gemisches aus Essigsäureanhydrid/Pyridin (7+3) versetzt und nach gutem Umschwenken 30 min bei Zimmertemperatur stehen gelassen.

Das überschüssige Reagenz wird mit einem schwachen N_2 -Strom vollständig entfernt. Vorsicht: Zu starkes und zu langes Begasen kann merkliche Verluste zur Folge haben. Mit 2 x 40 μ l Dichlormethan wird der Rückstand quantitativ auf eine DC-Platte aufgetragen. Die Chromatographiebedingungen sind gleich wie unter DC auf Seite 100 angegeben:

Rf-Werte	M_1	Acetyl- M_1
Im Fließmittel 1	0,05	0,25
Im Fließmittel 1 + 2	0,3	0,55

Trifluoracetylierung auf der Platte

Wie unter DC auf Seite 100 angegeben, wird der Eluatrückstand auf eine DC-Platte aufgetragen.

Die Auftragungsstellen werden mit je 5 μl Trifluoressigsäure überdeckt und mit einer Glasplatte zugedeckt. Nach 5 min Liegenlassen werden erneut 5 μl TFA aufgetragen und die Platte zugedeckt 20 min bei 100 °C in den Trockenschrank gelegt. Anschliessend wird die Deckplatte entfernt und die DC-Platte zur Entfernung der überschüssigen TFA während ca. 5 min mit dem kalten Heizlüfter angeblasen. Chromatographiert wird wie unter DC auf Seite 100 angegeben nacheinander in Fließmittel 1 und 2.

Rf-Wert M_1	0,3
Rf-Wert TFA-Derivat	0,15.

Bemerkungen

Aflatoxin- M_1 -Standardlösungen

Aflatoxin M_1 wird mittlerweile von diversen Chemikalienfirmen angeboten. Die Reinheit der neu erhaltenen Standards muss dünnschichtchromatographisch überprüft und deren Gehalt nach AOAC 26.008 bestimmt werden. Es wird auch dringend empfohlen, ältere, sich schon länger im Laboratorium befindliche Standards ebenso zu überprüfen.

Wiederfindungsraten der diversen Methoden

Obschon die Methoden in den Laboratorien, wo sie ausgearbeitet wurden, recht gut reproduzierbare Wiederfindungsraten zeigen, wird darauf hingewiesen, dass diese in jedem Laboratorium häufig durch Zugabe einer gemessenen Menge Aflatoxin M_1 zu Beginn der Analysen überprüft werden müssen.

Zusammenfassung

Die von der Eidg. Lebensmittelbuch-Kommission gebildete Arbeitsgruppe für Toxine 2 hat verschiedene Methoden zur Bestimmung von Aflatoxin M_1 in Milch und Milchpulver ausgearbeitet und damit im tiefen ng/kg-Bereich Ringversuche durchgeführt. Die gute Übereinstimmung der solchermaßen erhaltenen Resultate lässt es zu, alle in dieser Arbeit beschriebenen Methoden amtlich zu empfehlen.

Résumé

Plusieurs méthodes d'analyse de l'aflatoxine M₁ ont été élaborées et testées coopérativement pour le lait et la poudre de lait par le «groupe de travail toxines 2» (un groupe de la Commission fédérale du Manuel des denrées alimentaires). La comparaison des résultats permettait de reconnaître les méthodes décrites dans ce travail comme officielles en Suisse.

Summary

The «Working Group on Toxins 2» (a subgroup of the Federal Commission for the Swiss Food Manual) has developed a variety of methods for the analysis of aflatoxin M₁ in milk and milk powder. Several cooperative tests showed good results in the low ng/kg range. The methods presented in this paper have been given official status in Switzerland.

Literatur

1. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man, Vol. 10, Some naturally occurring substances. Int. Agency for Res. on Cancer, Lyon 1976.
2. Battaglia, R., van Egmond, U. P. and Schuller, P. L.: Proceeding of the IDF/FECS/AOAC Seminar on «Challenges to contemporary dairy analytical techniques» (March 1984, Reading). Special Publication der Royal Soc. Chem., London, p. 37–55.
3. Steiner, W. und Battaglia, R.: Eine rationelle Methode zur Bestimmung von Aflatoxin M₁ in Milch und Milchpulver im unteren ppt-Bereich. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 74, 140–146 (1983).
4. Gauch, R., Leuenberger, U. und Baumgartner, E.: Rapid and simple determination of aflatoxin M₁ in milk in the low parts per 10¹² range. J. Chromatogr. 178, 43–549 (1979).

Arbeitsgruppe Toxine 2

- * Dr. R. Battaglia, Kantonales Laboratorium Zürich (Präsident) (1; 2; 3)
- Dr. U. P. Buxtorf, Kantonales Laboratorium Basel-Stadt (1; 2; 3)
- Dr. A. Etournaud, Laboratoire cantonal Vaud (1; 2; 3)
- Dr. H. Guggisberg, Kantonales Laboratorium Thurgau (1; 2; 3)
- Dr. U. Leuenberger, Kantonales Laboratorium Bern (1; 2; 3)
- Dr. J. Lüthy, Institut für Toxikologie, Schwerzenbach (2)
- Dr. W. Steiner, Kantonales Laboratorium Zürich
- Dr. W. Stutz, Kantonales Laboratorium Basel-Land (2)
- Dr. A. Cominoli, Laboratoire cantonal Genève (2; 2; 3)
- C. Wyss, Nestec SA, La Tour-de-Peilz (1; 1; 2; 2; 3)

* Korrespondenzadresse: Postfach, CH-8030 Zürich

Anmerkung: Die Zahlen in Klammern geben die Teilnahme am entsprechenden Ringversuch (3 = mit natürlich kontaminiertem Milchpulver) an.