

Afdeling Contaminanten 1981-10-07

Verslag 81.83 pr.nr. 505.0420

Onderwerp: Het ontwikkelen van een snelle  
methode voor het bepalen van aflatoxine M<sub>I</sub>  
in melk.

Verzendlijst:

directeur, sektorhoofd (3x), direktie VKA, afd. Contaminanten (4x),  
Normalisatie (Humme), projektbeheer



Afdeling Contaminanten.

1981-10-07

VERSLAG 81.83

Pr.nr. 505.0420

Projekt: Ontwikkeling methoden voor het aantonen en bepalen van microbiële toxinen.

Onderwerp: Het ontwikkelen van een snelle methode voor het bepalen van aflatoxine M<sub>I</sub> in melk.

---

Doel:

Het ontwikkelen van een snelle methode voor het bepalen van aflatoxine M<sub>I</sub> in melk met als detectiegrens 0,005 µg/l.

Samenvatting/conclusie:

Er werd een methode ontwikkeld waarmee op snelle en eenvoudige wijze het gehalte aan aflatoxine M<sub>I</sub> in melk kan worden bepaald met een detectiegrens van 0,005 µg/l.

De recovery op een niveau van 0,05 µg/l bedraagt ca. 76%.

Vanwege de snelle en eenvoudige extractie en clean-up en mede doordat bij de vloeistofchromatografische scheiding elke tien minuten een monster kan worden geïnjecteerd is deze methode bruikbaar voor het analyseren van een groot aantal monsters.

Door gebruik te maken van twee-dimensionale dunnelaagchromatografie kunnen positieve monsters kwalitatief worden bevestigd met als detectiegrens 0,005 µg/l.

---

Verantwoordelijk: ir L.G.M.Th. Tuinstra

Samensteller: W. Haasnoot *W.H.*

### Inleiding:

In 1975 werd een methode voor het bepalen van het gehalte aan aflatoxine  $M_I$  in melk gepubliceerd (1).

Deze methode werd tot nu toe, binnen de afdeling Contaminanten, toegepast, indien monsters voor onderzoek werden aangeboden (intern voorschrift nr. F23).

Nadien zijn er vele publicaties beschreven, waarbij de vloeistofchromatografie zijn intrede maakte (4, 5, 8, 9, 10, 11) en nieuwe extractietechnieken, zoals m.b.v. Extrelut (3,2) of Sep-pak (5), werden toegepast.

De LAC heeft voor het gehalte aan aflatoxine  $M_I$  in melk een richtlijn vastgesteld van 0,05  $\mu\text{g}/\text{l}$  en de Zwitserse gezondheidsdienst heeft per 1 januari 1982 toleranties gesteld voor aflatoxinen in voedingsmiddelen waarbij melk 0,05  $\mu\text{g}/\text{l}$  en melk bestemd voor kinderen 0,01  $\mu\text{g}/\text{l}$  aan aflatoxine  $M_I$  mag bevatten.

Bovenstaande in ogenschouw nemend is een methode met een detectiegrens van 0,005  $\mu\text{g}/\text{l}$  gewenst.

De methode volgens eerstgenoemde publicatie (1) voldoet aan deze detectiegrens, maar is, vergeleken met de inmiddels verschenen methoden, bewerkelijk.

Naar aanleiding van bovenstaande werd gezocht naar een snelle methode voor het bepalen van aflatoxine  $M_I$  in melk met een detectiegrens van 0,005  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

### Uitgevoerd onderzoek:

Naar aanleiding van een tweetal publicaties (2,3) en een bezoek aan het RIV werd een extractie van aflatoxine  $M_I$  uit melk toegepast m.b.v. Extrelut.

Extrelut is een commercieel verkrijgbare extractiekolom welke een inert hydrofiele matrix bevat (Merck art. 117.37).

Op deze extractiekolom werd de maximale hoeveelheid melk (20 ml) gebracht. Vervolgens werd aflatoxine  $M_I$  geëlueerd met een mengsel van chloroform en aceton (3+1).

Het eluaat werd drooggedampt en overgebracht op een silicagelkolom (0,5 g) met 5 ml chloroform.

Nadat de kolom werd gereinigd met 1 ml hexaan en 5 ml acetonitril/ether/hexaan (2+3+5) werd aflatoxine M<sub>I</sub> geëluëerd met 5 ml chloroform/aceton (3+1).

Het eluens werd drooggedampt en het residu opgenomen in 50 µl chloroform, waarvan 20 µl op de dunnelaagplaat (kieselgel) werd gebracht. Met behulp van één dimensionale dunnelaagchromatografie met als loopvloeistof een mengsel van ether, methanol, hexaan en water (88/6/5/1) en de hiervoor beschreven extractie werd een detectiegrens verkregen van 0,025 µg/l, terwijl de recovery, op een niveau van 0,1 µg/l, ca. 70% bedroeg.

Aangezien de gewenste detectiegrens op 0,005 µg/l werd gesteld is de hiervoor beschreven methode niet geschikt.

Winterlin (5) verdunde 10 ml melk met 25 ml water en bracht dit mengsel over op een Sep-pak C18 cartridge. Na spoelen met 5 ml water en 20 ml 10% acetonitril in water werd aflatoxine M<sub>I</sub> geëluëerd met 4 ml 30% acetonitril in water.

Na indampen werd aflatoxine M<sub>I</sub> gescheiden van de matrix d.m.v. reversed-phase vloeistofchromatografie.

Deze methode is snel maar heeft een te hoge detectiegrens van 0,1 µg/l. Het Zuivelcontrole instituut te Leusden kwam, n.a.v. de IDF-questinaire 2081/E(6) omtrent de bepaling van aflatoxine M<sub>I</sub> in melk en kaas, met een variant op de door de IDF voorgestelde methode welke de detectiegrens zou verbeteren van 0,025 µg/l tot 0,01 µg/l.

Deze methode, welke gebruik maakt van de extractie zoals genoemd in de IDF-methode (Stubblefield, 7) en vervolgens een clean-up en twee-dimensionale dunnelaagchromatografie, zoals beschreven door Tuinstra (1), werd door ons nagewerkt.

De detectiegrens was 0,01 µg/kg met een recovery van ca. 80% op het 0,05 µg/kg niveau.

Een nadeel echter is de toegepaste twee-dimensionale dunnelaagchromatografie, welke vanwege het opbrengen van één monster per plaat een nadelige invloed heeft op de snelheid van de methode.

Om deze reden werd een ander detectiesysteem gezocht en wel met behulp van vloeistofchromatografie en fluorescentiedetectie.

Zo werd door ons in 1978 al gewerkt met een vloeistofchromatografische opstelling volgens Zimmerli (4) waarbij werd uitgegaan van een silica-gelkolom en een fluorescentiedetector met een met silicagel gevulde cel.

Deze methode (intern voorschrift nr. F43) heeft een detectiegrens van 0,005 µg/l (absolute detectiegrens 0,25 ng).

Een nadeel bij deze vorm van chromatografie is dat de retentietijd van aflatoxine M<sub>I</sub> groter wordt gedurende een aantal injecties en tevens dat de met silicagel gevulde cel vervuult en na een aantal injecties opnieuw moet worden gevuld.

Naar aanleiding van enige publicaties (5,8) werd recentelijk gewerkt met reversed-phase vloeistofchromatografie. Als kolomvulling werd Lichrosorb 5 RP18 gebruikt met als eluens een mengsel van acetonitril en water (25/75).

Met een Waters fluorescentiedetector (type 420) met 360 nm als excitatiegolflengte en een emissiegolflengte van > 420 nm, kon als absolute detectiegrens 0,1 ng M<sub>I</sub> worden waargenomen.

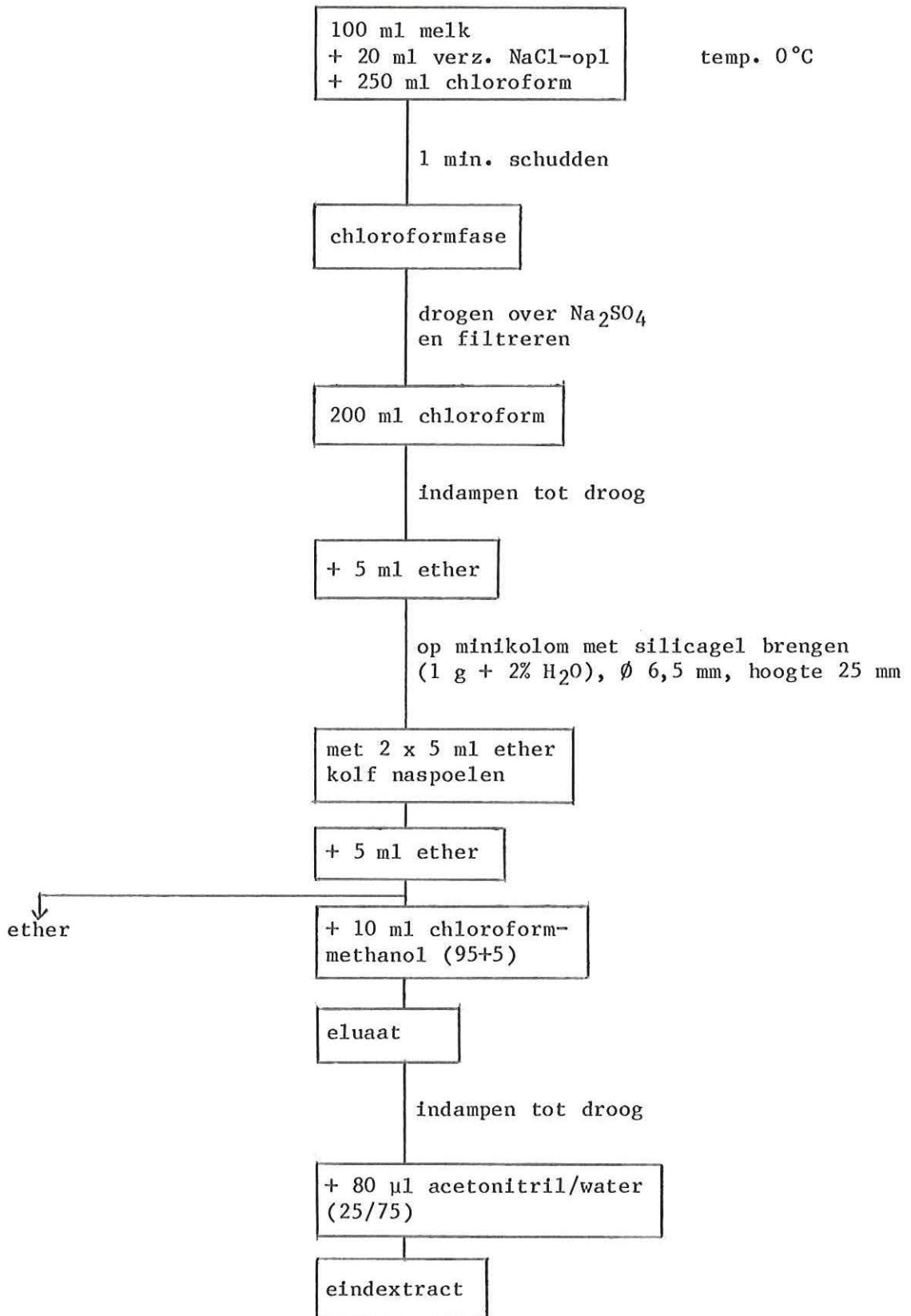
De retentietijd van aflatoxine M<sub>I</sub> was ca. 7,5 min.

Een voordeel van deze vorm van chromatografie is dat de retentietijd van aflatoxine M<sub>I</sub> constant blijft en een met silicagel gevulde cel overbodig is.

Door gebruik te maken van de extractie zoals die door de IDF werd voorgesteld en de clean-up volgens Tuinstra (1), (zie het hiervolgende schema), wordt een voldoende schoon extract verkregen om aflatoxine M<sub>I</sub> in melk te kunnen bepalen m.b.v. reversed phase vloeistofchromatografie en fluorescentiedetectie met als detectiegrens 0,005 µg/l (zie figuur 2).

Met behulp van deze methode kon om de tien minuten een monsterinjectie plaatsvinden en mede door de snelle extractie en clean-up is het mogelijk om een groot aantal monsters (20 à 30) per dag te analyseren op een uitzonderlijk laag niveau.

Schematische voorstelling van de RIKILT-methode voor het bepalen van aflatoxine M<sub>I</sub> in melk:



Bevestiging:

Na de vloeistofchromatografische scheiding en detectie blijft er 60  $\mu$ l monsterextract over.

Dit extract wordt drooggedampt en opgenomen in 50  $\mu$ l chloroform. Hier- van wordt 30  $\mu$ l, wat overeenkomt met 36 ml melk, op een dunnelaag- plaatje (DC-Alufolien Kieselgel 60, Merck 5553) gebracht van 5 x 6,5 cm (punt A, zie figuur 1A).

Het plaatje wordt in de eerste looprichting ontwikkeld met een mengsel van diethylether-methanol-water (94,5:4,5:1,5) in een verzadigde ont- wikkeltank.

De ontwikkeltijd is 5-7 minuten.

Na 10 minuten drogen bij kamertemperatuur wordt bij punt B 1 ng aflatoxine  $M_I$  standaard opgebracht en wordt het plaatje in de tweede loop- richting geëluëerd met een mengsel van chloroform-aceton-isopropanol (85:10:5) in een onverzadigde ontwikkeltank.

De ontwikkeltijd is ca. 15 minuten.

Na drogen bij kamertemperatuur wordt het plaatje onder U.V.-licht van 360 nm bekeken.

Bij positieve monsters  $> 0,005 \mu\text{g}/\text{l}$  worden twee blauw fluorescerende vlekjes waargenomen (fig. 1B). Na besproeien met een 50% zwavelzuurop- lossing verandert de fluorescentie van blauw naar geel. Een standaard aflatoxine  $M_I$  van 0,15 ng is nog goed te zien. Indien 36 ml melk op de plaat wordt gebracht is de detectiegrens  $0,004 \mu\text{g}/\text{l}$ .

fig. 1A

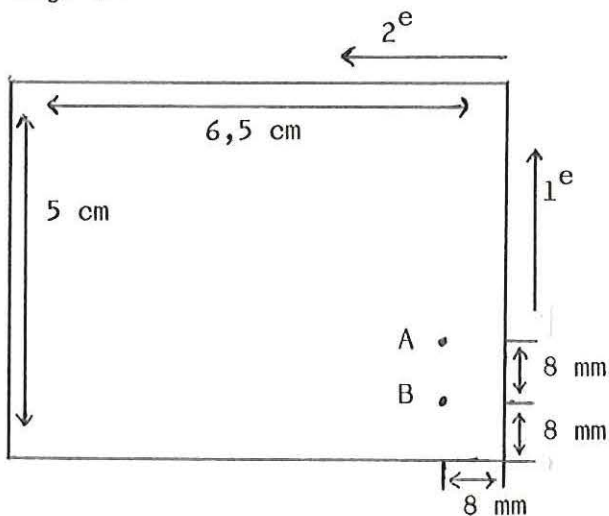
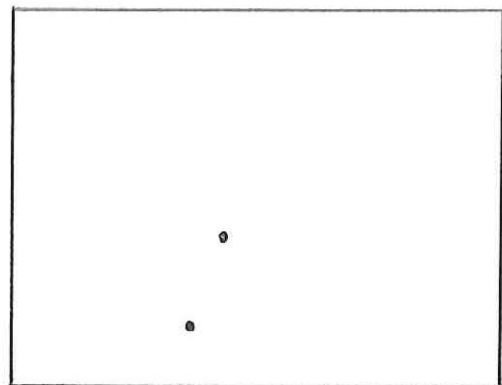


fig. 1B





Resultaten:

Ten behoeve van het testen van de ontwikkelde methode werden vier monsters gepasteuriseerde melk onderzocht. In de onderzochte monsters werden de hiervolgende gehalten gevonden:

<u>Fabrikant</u>	<u>Gehalte</u>
Melkunie	0,013 µg/l
Volnij	0,022 µg/l
Menken	0,020 µg/l
Coberco	0,010 µg/l

Deze resultaten werden kwalitatief bevestigd m.b.v. twee-dimensionale dunnelaagchromatografie.

Tevens werden zes recovery-proeven uitgevoerd op het 0,05 µg/l niveau en de hiervolgende percentages werden teruggevonden.

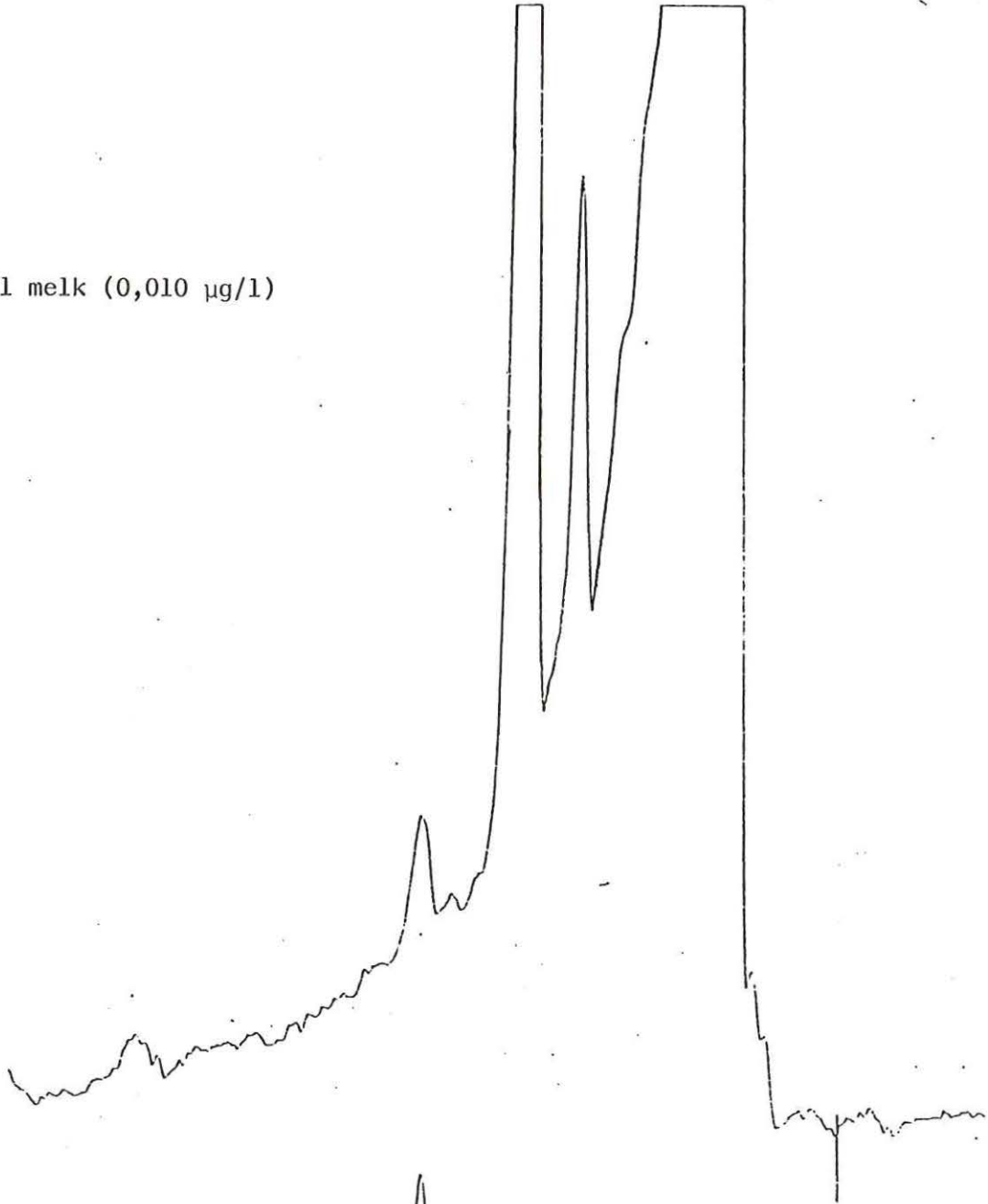
	<u>Recovery</u>
	73%
	70%
	79%
	75%
	76%
	<u>81%</u>
Gem.	76%

Literatuur:

1. Tuinstra L.G.M.Th. e.a.: J. of Chromatography, 111 (1975) 448-451.
2. Gauch R. e.a.: J. of Chromatography, 178 (1979) 543-549.
3. Fukayama M. e.a.: J. AOAC vol 63 no. 4 (1980) 927-930.
4. Zimmerli B.: J. of Chromatography, 131 (1977) 458-463.
5. Winterlin W. e.a.: Analytical Chemistry, vol 51 no. 11 (1979) 1873-1874
6. International Dairy Federation: Questionnaire 2081/E (1980).
7. Stubblefield R.D.: J. Am. Oil. Chem. Soc. 56, 800 (1979).
8. Stubblefield R.D.: J. AOAC vol 60 no. 4 (1977) 784-790.
9. Von Siegfried R.: Landwirtsch. Forschung 33, 4 (1980) 331-336.
10. Zimmerli B.: Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg., 70, 287-293 (1979).
11. Colley P.J.: Analytical Biochemistry 93, 409-418 (1979).

fig. 2: Injectie van 20 ml melk op een Lichrosorb RP18 kolom met als eluens acetonitril/water (25/75) en een fluorescentiedetector  $\lambda$  ex 360 nm en  $\lambda$  em >420 nm.

a) 20 ml melk (0,010  $\mu\text{g}/\text{l}$ )



b) 0,4 ng standaard

