

LUDWIK CZERWIECKI

OZNACZANIE WYBRANYCH MIKOTOKSYN W ŻYWNOSCI
 CZ. I. DOBÓR OPTYMALNYCH WARUNKÓW OZNACZANIA
 AFLATOKSYNY M₁ W MLEKU METODĄ WYSOKOSPRAWNEJ
 CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ

DETERMINATION OF SELECTED MYCOTOXINS IN FOOD
 PART I.: SELECTION OF OPTIMISED CONDITIONS FOR THE DETERMINATION
 OF AFLATOXIN M₁ IN MILK BY MEANS OF HIGH-PERFORMANCE LIQUID
 CHROMATOGRAPHY

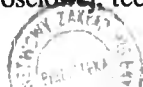
Zakład Analizy Żywności, Instytut Biotechnologii Przemysłu
 Rolno-Spożywczego
 02-532 Warszawa, ul. Rakowiecka 36
 Kierownik: prof. dr hab. B. Szteke

Określono optymalne warunki oznaczania aflatoksyny M₁ w mleku. Zbadano przebieg ekstrakcji, oczyszczania ekstraktów, tworzenia pochodnej acetalowej aflatoksyny z kwasem trifluoroctowym oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Średni odzysk metody w zależności od poziomu fortyfikacji wynosił 62-67%, granica oznaczalności 0,01 µg aflatoksyny M₁ w litrze mleka.

WSTĘP

Spośród poznanych metabolitów aflatoksyny B₁ powstających w organizmie zwierzęcym szczególnie miejsce zajmuje aflatoksyna M₁ czyli 4-hydroksy aflatoksyna B₁. Aflatoksyna M₁ posiada zbliżoną siłę działania toksycznego do aflatoksyny B₁, wykazując również właściwości nowotworowe [16]. Jest ona obecna m.in. w wydalinach zwierząt narażonych na aflatoksynę B₁ oraz, co jest szczególnie istotne, wykrywana jest także w mleku [11, 16]. Przechodzenie różnych mikotoksyn w postaci metabolitów z paszy do mleka i produktów zwierzęcych – „carry over”, jest poważnym problemem jakości higieniczno-zdrowotnej żywności i surowców przeznaczonych do jej produkcji [12, 21, 23].

Istnieje wiele metod wykrywania i oznaczania aflatoksyny M₁ w mleku, które są ustawicznie doskonalone pod względem dokładności, precyzji oraz wykrywalności i oznaczalności. Oprócz stosowanej do chwili obecnej chromatografii cienkowarstwowej (TLC) jako metody rozdziału i identyfikacji [4, 8, 13], coraz częściej wykorzystuje się technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) [3, 5, 9, 10, 18, 22]. Zdaniem wielu badaczy pozwala ona na uzyskanie bardziej powtarzalnych wyników; o wielkości błędu względnego oznaczenia decydują jednak przede wszystkim czynniki związane ze sposobem ekstrakcji i oczyszczania ekstraktów. Na uwagę zasługują również, szczególnie w analizie półilościowej, techniki immunoenzymatyczne [5, 7, 19].



8.697

Projekt nowego Zarządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej w sprawie wykazu substancji dodatkowych dozwolonych i zanieczyszczeń technicznych w środkach spożywczych i używkach określa maksymalne, dopuszczalne zawartości aflatoksyny M₁ w mleku i w modyfikowanych mieszankach mlecznych dla niemowląt i dzieci [17].

Toteż celem niniejszej pracy było opracowanie zoptymalizowanej, wiarygodnej metody oznaczania aflatoksyny M₁ w mleku płynnym techniką HPLC na podstawie dostępnego piśmiennictwa, jak również w oparciu o własne doświadczenia z tego zakresu.

Uwzględniono przy tym poszczególne etapy toku analizy, a więc: ekstrakcję toksyny z badanego materiału, oczyszczanie ekstraktów, warunki tworzenia odpowiednich pochodnych fluoryzujących oraz warunki wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

MATERIAŁY I METODYKA

Wyposażenie

Wykorzystano zestaw do wysokosprawnej chromatografii cieczowej firmy Milton Roy/LDC Analytical składający się z następujących elementów: pompy izokratycznej Constametric III, kolumny Techsphere 5 ODS 250 x 4,6 mm z przedkolumną C₁₈, detektora fluorymetrycznego Fluoro-Monitor III z filtrami 370/418–700 nm, zaworu dozującego Rheodyne 721 z pętlą o pojemności 20 μ l. Pracę zestawu kontrolowano za pomocą komputera z programem sterującym i integrującym Axxiom 727. Do rejestracji chromatogramów wykorzystano drukarkę Epson XL-400.

Stosowano ponadto: wyparkę próżniową Büchi, blok grzejny Pierce wraz z naczynkami reakcyjnymi poj. 5 ml, wytrząsarkę laboratoryjną Elpan 358S, łaźnię ultradźwiękową, Büchler, mikrostrzykawkę Hamilton poj. 100 μ l oraz typowe szkło laboratoryjne takie jak: kolby miarowe, kolby stożkowe pipety, rozdzielacze.

Odczynniki i materiały pomocnicze

1. chloroform cz.d.a., POCH Gliwice, dwukrotnie destylowany suszony wstępnie bezwodnym CaCl₂, 2. chlorek metylenu cz.d.a., POCH Gliwice dwukrotnie destylowany, 3. n-heksan cz., POCH Gliwice, 4. acetonitryl i metanol o czystości HPLC, BDH, 5. izopropanol cz.d.a., POCH Gliwice, destylowany z odzuceniem pierwszych i ostatnich 100 ml na każde 2 litry rozpuszczalnika, uprzednio ogrzewanego 2 godziny ze 100 g KOH i 15 g pyłu cynkowego, 6. woda do wysokosprawnej chromatografii cieczowej redestylowana znad 0,5 g KMnO₄ i 5 g NaOH dodanych na każde 2 litry wody, 7. kwas trifluorooctowy (TFA) cz.d.a., Merck, 8. chlorek sodowy cz.d.a., POCH Gliwice, 9. amoniak cz.d.a., POCH Gliwice, 10. celit 545, POCH Gliwice, 11. kolumny SPE C₁₈ 1000 mg, Baker, 12. kolumny SiOH 1000 mg, Baker, 13. wzorzec aflatoksyny M₁, Sigma oraz roztwory wzorcowe: roztwór podstawowy w chloroformie o stężeniu 1 μ g/ml i roztwory robocze w chloroformie, acetonitrylu oraz w wodzie o stężeniu 0,1 μ g/ml (stężenie roztworu podstawowego sprawdzono wg [12]), 14. sączki jakościowe z bibuły filtracyjnej, POCH, 15. azot sprężony z butli.

Metody badań

Badania na roztworach wzorcowych

Ustalenie warunków reakcji z kwasem trifluorooctowym (TFA)

W pierwszej fazie badań określono optymalne warunki przekształcania aflatoksyny M₁ w jej pochodną acetalową, aflatoksynę M_{2a}. Do naczynek reakcyjnych odmierzano po 50 μ l roztworu roboczego aflatoksyny w chloroformie. Po odparowaniu rozpuszczalnika w bloku grzejnym w strumieniu azotu, w temperaturze nie przekraczającej 60°C, do pozostałości dodawano kolejno 200 μ l n-heksanu i 50 μ l TFA. Zawartość, po dokładnym wymieszaniu, ogrzewano w bloku

grzejnym w temperaturach 60, 40, 30°C w czasie: 2, 4, 6, 15 i 20 minut. Po ochłodzeniu roztwory w naczynkach odparowywano do sucha w strumieniu azotu. Pozostałość po odparowaniu rozpuszczano w 200 μ l mieszaniny acetonitrylu z wodą (1+9) mieszając 30 sekund w łaźni ultradźwiękowej. Roztwory nanoszono na kolumnę chromatografu cieczonego.

Ustalenie warunków wysokosprawnej chromatografii cieczonej

Analizę chromatograficzną wzorców aflatoksyny M_1 po reakcji z TFA wykonywano na kolumnie chromatograficznej ODS. Jako fazy ruchome stosowano następujące kombinacje rozpuszczalników:

- acetonitryl, metanol, woda (17+17+66), (15+15+70), (10+10+80), (20+5+75), (13+10+77), (9+15+76),
- acetonitryl, izopropanol, metanol, woda (13+4+4+79),
- metanol, izopropanol, woda (18+7+75), (17+6+77).

Prędkość przepływu fazy ruchomej zmieniano w zakresie od 0,5 do 2,0 ml/min, długości fali wzbudzenia i emisji detektora fluorymetrycznego wynosiły odpowiednio 370/417–700nm.

Ustalenie warunków elucji aflatoksyny M_1 z kolumn SPE C_{18} i SiOH

Zbadano przydatność kolumn SPE oceniając stopień wyeluowania aflatoksyny M_1 . Kolumny typu C_{18} kondycjonowano w następujący sposób: kolumnę przemywano 20 ml metanolu, a następnie 26 ml wody, prędkość przepływu cieczy przy zastosowaniu podciśnienia wynosiła 1 ml/min. Następnie na kolumnę nanoszono 100 ml roztworu wzorcowego aflatoksyny w wodzie, prędkość przepływu ustalono na ok. 5 ml/min., eluat odrzucano. Kolumnę przemywano ponownie 20 ml wody (z prędkością j.w.), eluat odrzucano, kolumnę suszono ok. 6 min (podciśnienie) i przemywano 20 ml n-heksanu (wariant pierwszy), w warunkach jak poprzednio, odrzucając również tę frakcję. Po ponownym wysuszeniu kolumny (6 minut) aflatoksynę M_1 eluowano do naczynka reakcyjnego (prędkość przepływu 5 ml/min) 4 ml mieszaniny acetonu z chlorkiem metylenu (5+95). Rozpuszczalnik odparowywano w bloku grzejnym w strumieniu azotu, w temperaturze nie przekraczającej 60°C, do pozostałości dodawano kolejno 200 μ l n-heksanu i 50 μ l TFA. Zawartość naczynka, po dokładnym wymieszaniu, ogrzewano w bloku grzejnym 6 minut w temperaturze 60°C. Następnie postępowano zgodnie z opisem badań dotyczących warunków wysokosprawnej chromatografii cieczonej, przy czym stosowano układ rozwijający stanowiący mieszaninę metanolu, izopropanolu i wody (18+7+75).

W drugim wariancie elucji, na analogicznej kolumnie, po naniesieniu wodnego roztworu wzorca aflatoksyny M_1 , kolumnę przemywano kolejno: 20 ml wody, 20 ml mieszaniny amoniaku, acetonitrylu oraz wody (1+10+90), 20 ml kwasu octowego z acetonitrylem i wodą (1+10+99). Elucję aflatoksyny wykonywano jak w poprzedniej wersji – acetonem z dichlormetanem.

Kolumnę typu SiOH kondycjonowano 10 ml chloroformu przy prędkości przepływu 1ml/min. Następnie nanoszono 2 ml chloroformowego roztworu wzorcowego aflatoksyny M_1 , eluat chloroformowy odrzucano, a kolumnę przemywano kolejno: 1 ml chloroformu, 2 ml n-heksanu i 1 ml eteru etylowego oraz ponownie 1 ml n-heksanu. Przy wszystkich wymienionych manipulacjach (oprócz kondycjonowania) prędkość przepływu rozpuszczalnika wynosiła 5 ml/min. Eluaty odrzucano, a aflatoksynę wymywano 2 ml mieszaniny chloroformu z metanolem (9+1). Po odparowaniu rozpuszczalnika w warunkach jak opisano poprzednio, do pozostałości w naczynku reakcyjnym dodawano kolejno 200 μ l n-heksanu i 50 μ l TFA. Po dokładnym wymieszaniu, zawartość naczynka ogrzewano w bloku grzejnym 6 minut w temperaturach 60°C. Następnie postępowano zgodnie z opisem badań dotyczącym warunków wysokosprawnej chromatografii cieczonej.

Ustalenie warunków ekstrakcji aflatoksyny M₁ z próbek mleka, oczyszczania ekstraktów oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej

Ekstrakcja i oczyszczanie ekstraktów*: 50 ml mleka wytrząsano 30 minut na wytrząsarce mechanicznej z 250 ml chloroformu i 5 g celitu. Warstwę chloroformową pobierano pipetą, sączono przez sączek z bibuły i do dalszej analizy pobierano 130 ml klarownego ekstraktu. Ekstrakt chloroformowy odparowywano w wyparce próżniowej w 55°C, suchą pozostałość rozpuszczano w 100 ml wody wytrząsając na wytrząsarce przez 10 minut. Roztwór wodny sączono przez sączek karbowany z bibuły i наносzono na kolumnę SPE C₁₈ postępując zgodnie z procedurą opisaną dla roztworów wzorcowych (oba warianty). Eluat zawierający aflatoksynę przenoszono ilościowo 20 ml n-heksanu do rozdzielacza, do którego dodawano 45 ml wody i 4 ml nasyconego roztworu chlorku sodowego. Całość wytrząsano 1 minutę. Warstwę dolną, po przeniesieniu do następnego rozdzielacza, ekstrahowano dwukrotnie minutę dwiema kolejnymi porcjami, po 10 ml każda, n-heksanu. Po rozdzieleniu się faz, warstwę wodną przenoszono do następnego rozdzielacza, po czym dodawano 20 ml chloroformu. Zawartość rozdzielacza wytrząsano 3 minuty. Warstwę chloroformową przenoszono do kolby od wyparki, a pozostałą w rozdzielaczu warstwę wodną ekstrahowano 2-krotnie chloroformem (porcjami po 10 ml). Połączone ekstrakty chloroformowe odparowywano w wyparce próżniowej do sucha w 55°C. Pozostałość po odparowaniu przenoszono ilościowo chloroformem do naczynek reakcyjnych, rozpuszczalnik odparowywano w bloku grzejmym w 60°C w strumieniu azotu.

W przypadku kolumny SiOH ekstrakt chloroformowy (ekstrakcja wstępna) odparowywano w wyparce próżniowej w 55°C, suchą pozostałość przenoszono ilościowo do naczynek reakcyjnych chloroformem, ekstrakt rozpuszczano w 2 ml chloroformu i наносzono na kolumnę postępując zgodnie z procedurą opisaną dla roztworów wzorcowych. Następnie ekstrakty oczyszczano w rozdzielaczach n-heksanem analogicznie jak w przypadku ekstraktów z kolumny C₁₈.

Reakcja z TFA

Do pozostałości w naczynkach reakcyjnych dodawano 200 μl n-heksanu i 50 μl TFA. Zawartość naczynek mieszano 1 minutę na łaźni ultradźwiękowej, następnie ogrzewano 6 minut w 60°C w bloku grzejmym. Po schłodzeniu mieszaninę reakcyjną odparowywano w strumieniu azotu, a pozostałość rozpuszczano w 200 μl mieszaniny acetonitrylu z wodą (1+9) mieszając 30 sekund w łaźni ultradźwiękowej.

W analogiczny sposób wykonywano reakcję z TFA dla roztworów wzorcowych aflatoksyny M₁.

Wysokosprawna chromatografia cieczowa

Stosowano układy rozwijające wymienione w punkcie dotyczącym badań na roztworach wzorcowych. Równolegle chromatografowano roztwory standardowe po wykonaniu reakcji z TFA. Zawartość aflatoksyny obliczono za pomocą programu integrującego Axxiom na podstawie porównania powierzchni pików próbki i standardu; w przypadku próbek mleka zawartość toksyn wyrażano w μg/l.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

W badaniach nad doбором warunków reakcji aflatoksyny M₁ z TFA zamierzano pierwotnie wykorzystać metodykę opisaną w pracy *Takedy* [22]. Ponieważ w wersji

* W badaniach wstępnych stwierdzono, że bezpośrednie наносzenie próbki mleka na kolumnę (po rozcieńczeniu wodą w odpowiednim stosunku) nie pozwala na uzyskanie ekstraktów (eluatów) o odpowiedniej czystości. Również odbiałczanie próbek za pomocą siarczanu cynkowego w środowisku alkalicznym nie przyniosło oczekiwanych wyników.

oryginalnej nie uzyskano powtarzalnych wyników, postanowiono przede wszystkim zbadać przebieg reakcji, w zależności od czasu jej trwania, w różnych warunkach temperatury. Najlepszą powtarzalność V-7% oraz najwyższe odpowiedzi detektora otrzymano w temperaturze 60°C w czasie 6 minut. Zbliżone wyniki, jeśli chodzi o wielkość powierzchni pików uzyskano w tej samej temperaturze w czasie 15 min., przy znacznie jednak gorszej powtarzalności. W pozostałych warunkach obserwowano niski poziom odpowiedzi detektora oraz znaczny ich rozrzut. W tabeli I przedstawiono wpływ temperatury i czasu na przebieg reakcji aflatoksyny M₁ z TFA.

Tabela I. Wpływ temperatury i czasu na przebieg reakcji aflatoksyny M₁ z TFA (wielkości powierzchni pików aflatoksyny M₁ stanowią średnie z 16 równoległych pomiarów dla każdej z badanych temperatur)
Influence of temperature and time on derivatisation of aflatoxin M₁ with TFA

Temperatura	Powierzchnia pików	Czas reakcji (min.)	RSD% (wzgl. odchyl. standardowe)
60°C	200	2	80
	401	4	98
	1142	6	7
	955	15	29
	788	20	15
40°C	302	2	62
	720	4	47
	613	6	41
	859	15	34
	797	20	33
30°C	613	2	48
	518	4	32
	857	6	32
	766	15	30
	998	20	28

Jak wynika z danych w tabeli, reakcja z kwasem trifluorooctowym jest krytycznym etapem analizy, bowiem można uznać, że jedynie w temperaturze 60°C w czasie 6 minut zachodzi ilościowa przemiana aflatoksyny M₁ do jej formy acetalowej z dobrą powtarzalnością.

Podczas badania różnych sposobów ekstrakcji aflatoksyny M₁ i oczyszczania ekstraktów nie powiodła się próba zastosowania ekstrakcji w fazie stałej (SPE), bez odtłuszczenia za pomocą klasycznej ekstrakcji ciec-z-ciecz. Obecność tłuszczu w ekstraktach uniemożliwiała ilościową, a nawet w niektórych przypadkach jakościową interpretację chromatogramów (badania prowadzono na mleku pełnotłustym o zawartości tłuszczu 3,2%). Dodatkowe wymywanie zanieczyszczeń z kolumny SPE C₁₈ (wariant drugi) nie przyczyniło się również do poprawy stopnia czystości ekstraktów.

Próba polegająca na strącaniu białka za pomocą roztworów siarczanu cynku w alkalicznym środowisku wg *Chambon'a* i wsp. [2], przeprowadzona w badaniach wstępnych, nie powiodła się, ponieważ straty aflatoksyny sięgały 100%. Również zastosowanie kolumn SPE SiOH nie dawało pozytywnych rezultatów, ze względu na niewystarczający stopień oczyszczenia ekstraktów. Być może zastosowanie kombinacji kolumn SPE obu rodzajów przyniosłoby oczekiwany efekt, jednak wiązałyby się to z wysokimi kosztami analizy i znacznym wydłużeniem czasu jej trwania.

Na podstawie przeprowadzonych badań za niezbędne uznano oczyszczanie ekstraktów chloroformowych na kolumnie SPE C₁₈, a następnie ekstrakcję ciecz-ciecz n-heksanem i reekstrakcję aflatoksyny chloroformem.

W celu określenia najodpowiedniejszych warunków wysokosprawnej chromatografii cieczowej zbadano układy rozwijające na bazie wody z dodatkiem trzech modyfikatorów: acetonitrylu, izopropanolu oraz metanolu, w różnych kombinacjach i proporcjach. Określono zatem wpływ siły eluotropowej układów jak i rodzaju modyfikatorów na efekt rozdziału aflatoksyny M₁ (jako aflatoksyna M_{2a}) i substancji interferujących oraz na ich czasy retencji.

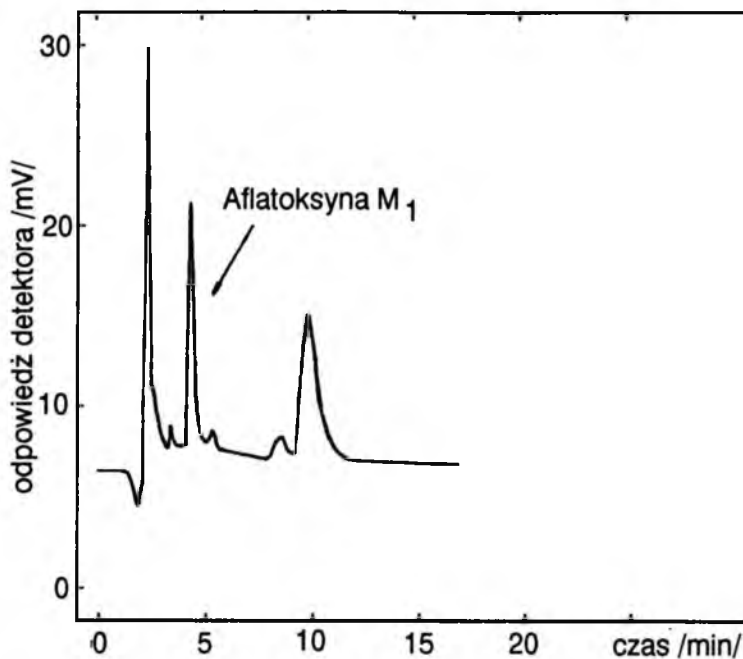
Najlepsze wyniki otrzymano w przypadku mieszaniny metanolu, izopropanolu i wody (18+7+75) o sile eluotropowej gEA 160, przy prędkości przepływu 0,9 ml/min. Współczynnik pojemnościowy k' w tych warunkach wynosił 2,27. Poprawne były również chromatogramy otrzymane za pomocą układu zawierającego wspomniane komponenty w proporcjach: (17+6+77) odpowiednio, o mniejszej sile eluotropowej gEA równej 146 ($k' = 3,42$). Uzyskane na chromatogramach piki aflatoksyny były jednak nieco rozmyte, a czasy retencji o około 25% dłuższe w porównaniu z pierwszym z wymienionych układów, ryc. 1, 2.

W przypadku układów złożonych z acetonitrylu, wody i metanolu o całkowitej sile eluotropowej gEA od 192 do 136, wymienionych w części doświadczalnej niniejszej pracy, rozdziały aflatoksyn i substancji balastowych były niezupełne ($R_s < 1$), podobnie jak po zastosowaniu mieszaniny acetonitrylu, izopropanolu, metanolu i wody o gEA 152. Świadczy to również o wpływie rodzaju modyfikatora na przebieg procesu chromatograficznego nie tylko w aspekcie zbliżonych właściwości eluotropowych fazy ruchomej. Zwiększenie prędkości przepływu powyżej 1ml/min, teoretycznie korzystne ze względu na możliwość skrócenia czasu analizy chromatograficznej, pogarszało istotnie rozdział aflatoksyny od substancji towarzyszących, obecnych w ekstraktach. Optymalna prędkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 0,9 ml/min.

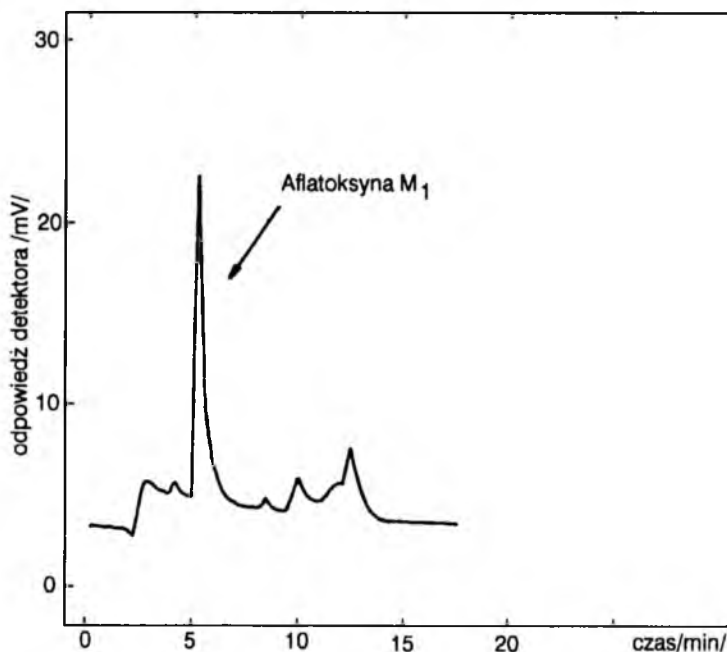
Na podstawie przeprowadzonych badań przyjęto następujący schemat oznaczania aflatoksyny M₁ w mleku (każdy z etapów szczegółowo opisano w poprzedniej części pracy): 1) ekstrakcja 50 ml próbki mleka chloroformem, 2) oczyszczanie ekstraktu chloroformowego na kolumnie SPE C₁₈ (wariant 1), 3) odłuszczenie n-heksanem, 4) reakcja z TFA w 60°C, 6 min, 5) chromatografia HPLC na kolumnie ODS z fazą ruchomą stanowiącą mieszaninę metanolu, izopropanolu i wody (18+7+75).

W celu określenia podstawowych parametrów statystycznych metody, próbki mleka płynnego fortyfikowano aflatoksyną M₁ na poziomie: 0,2, 0,1 i 0,05 $\mu\text{g/l}$ mleka.

Wartości średniego odzysku będącego miarą błędu bezwzględnego metody, odchylenie standardowe i przedział ufności średniego odzysku przedstawiono w tabeli II.



Ryc. 1. Chromatogram ekstraktu próbki mleka fortyfikowanego aflatoksyną M₁. Układ rozwijający: metanol, izopropanol, woda (18+7+75). Aflatoksyna jako pochodna M_{2a}



Ryc. 2. Chromatogram ekstraktu próbki mleka fortyfikowanego aflatoksyną M₁. Układ rozwijający: metanol, izopropanol, woda (17+6+77). Aflatoksyna jako pochodna M_{2a}

Tabela II. Odzyskiwalność i precyzja metody
Recovery and precision of the method

Poziom fortyfikacji $\mu\text{g/l}$	Średni odzysk w %	Przedział ufności średniego odzysku	SD $\mu\text{g/l}$	RSD%
0,2	61,6	57,8–65,4	0,013	10,8
0,1	62,1	58,5–65,9	0,006	9,4
0,05	66,6	64,3–68,9	0,002	6,2

Dane w kolumnach 2–5 obliczono dla $n = 12$,
 $\alpha = 0,05$ (poziom istotności),
 SD – odchylenie standardowe,
 RSD – względne odchylenie standardowe (współczynnik zmienności)

Określono również granicę wykrywalności metody (średnia wartość sygnału próbeki ślepej plus trzy odchylenia standardowe), która wynosiła 0,0025 μg aflatoksyny M_1 w litrze mleka. Jako granicę oznaczalności obrano 4-krotną wartość granicy wykrywalności; co stanowi 0,01 μg aflatoksyny M_1 /l mleka. Najwyższa dopuszczalna zawartość aflatoksyny w mleku płynnym zgodnie z projektem Zarządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej w sprawie wykazu substancji dodatkowych dozwolonych i zanieczyszczeń technicznych w środkach spożywczych i używkach wynosi 0,05 $\mu\text{g/l}$ mleka [17]. Dla porównania, najmniejszą ilość aflatoksyny M_1 , którą można jeszcze wykryć metodą chromatografii cienkowarstwowej wynosi 0,025 $\mu\text{g/l}$ mleka [13].

Pozostałe parametry analityczne takie jak: średni odzysk czy odchylenie standardowe są porównywalne do cytowanych przez innych autorów. I tak np. *Chang* i wsp. [3] w metodzie oznaczania aflatoksyny M_1 w mleku, z wykorzystaniem techniki HPLC- RP₁₈ i reakcji z TFA odzyskiwali 67% aflatoksyny dodanej do mleka. Zakres zbadanych stężeń wynosił 100 do 8000 ng/l. Współczynnik zmienności natomiast osiągał wartość 13–23%.

Rutynowa metoda HPTLC (porównywalna z HPLC) stosowana w Veterinäruntersuchungsamt w Hanowerze [1] charakteryzuje się średnim odzyskiem na poziomie 50% i granicą wykrywalności 0,05 μg aflatoksyny M_1 w litrze mleka. *Sheperd* i wsp. [20] oznaczając aflatoksynę M_1 w mleku za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej, po uprzedniej ekstrakcji i oczyszczeniu próbek na kolumnach SPE C₁₈, odzyskiwali 40 do 60% dodanej toksyny (poziomy fortyfikacji 16 i 160 ng/l mleka). Granica wykrywalności metody wynosiła 0,005 μg aflatoksyny/litr mleka. Natomiast jej odzysk z próbek mleka metodą zbliżoną do poprzednio omówionej, wg *Piva* i wsp. [15] wynosił 55–97%.

Wartość tego parametru, jak donosi *Takeda* [22], kształtowała się na poziomie 76–91%. Postępowanie analityczne proponowane przez autora obejmowało następujące etapy: ekstrakcję i oczyszczanie ekstraktów próbek mleka na kolumnach SPE C₁₈, reakcję z TFA, wysokosprawną chromatografię cieczą w fazach odwróconych. Metodę tę próbowano wykorzystać w pracy własnej, jednak ekstrakty zawierały tak znaczne ilości interferujących substancji, iż nie mogły być analizowane chromatograficznie. Również *Fremy* i wsp. [6], po ekstrakcji aflatoksyny chloroformem z próbek mleka, mleka w proszku oraz sera i oczyszczaniu ekstraktów na kolumnach SPE SiOH, odzyskiwali 61–100% dodanej toksyny.

WNIOSKI

1. Opisana metoda oznaczania aflatoksyny M_1 w mleku, dzięki bardzo dobrej wykrywalności może być stosowana do kontroli tego surowca na jej obecność.

2. Celowe jest wykorzystanie metody, po uprzednim przeprowadzeniu stosownych badań, do oznaczania aflatoksyny M_1 w mleku w proszku i w odżywkach dla dzieci.

L. Czerwiecki

DETERMINATION OF SELECTED MYCOTOXINS IN FOOD
PART I: SELECTION OF OPTIMISED CONDITIONS FOR THE DETERMINATION
OF AFLATOXIN M₁ IN MILK BY MEANS OF HIGH-PERFORMANCE LIQUID
CHROMATOGRAPHY

Summary

The aim of this study was to perform a optimized method for determination of aflatoxin M₁ in milk. The manner of extraction and clean-up of milk extracts as well conditions of reaction of aflatoxin M₁ with TFA and HPLC was described. The main steps of optimized method were: extraction of samples with chloroform, clean-up of extracts on SPE C₁₈ columns and by means of extraction with n-hexane, derivatisation of aflatoxin M₁ with TFA (60°C, 6 minutes) to acetal form – aflatoxin M_{2a} and determination of aflatoxin by means of the RP-HPLC technique. The mobile phase was a mixture of methanol, isopropanol and water (18+7+75). Fluorometric detection was made at 370/418–700 nm. The mean recovery of aflatoxin M₁ dependent on fortification level was 62–67%, limit of detection was 0,01 µg/l of milk.

PIŚMIENNICTWO

1. Aplikacja firmy Baker: Bestimmung von Aflatoxin M₁ in der Milch nach der Extraktion und Anreicherung mit Baker Einmaltrennsäulen und dem Baker-10 Extraktionssystem. Staatliches Veterinäruntersuchungsamt, Hannover.
2. Chambon P., Dano S.D., Chambon R., Geachan A.: Rapid determination of aflatoxins in milk and dairy products by high-performance liquid chromatography. *J. Chrom.*, 1983, 259, 372.
3. Chang H.L., de Vries J.W.: Rapid high pressure liquid chromatographic determination of aflatoxin M₁ in milk and nonfat dry milk. *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, 1983, 66, 913.
4. Czerwiecki L.: Mikotoksyny w żywności – wykrywanie i oznaczanie. Rozprawa habilitacyjna, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego, Warszawa, 1993.
5. Dragacci S., Gleizes E., Fremy J.M., Candlish A.G.: Use of immunoaffinity chromatography as a purification step for the determination of aflatoxin M₁ in cheeses. *Food Addit. Contam.*, 1995, 12, 59.
6. Fremy J.M., Bousier B.: Rapid determination of aflatoxin M₁ in dairy products by reversed-phase high performance liquid chromatography. *J. Chrom.*, 1981, 219, 156.
7. Fukal, Brezina P.: Verfolgung des Aflatoxin M₁ – Gehaltes in Milch für die Produktion von Säuglings- und Kindernahrung mittels Immunoassay. *Die Nahrung*, 1991, 35, 745.
8. Gajek O.: Występowanie aflatoksyn w paszach treściwych i w mleku. *Roczn. PZH*, 1982, 37, 415.
9. Gifford L.A., Wright C., Gilbert J.: Robotic analysis of aflatoxin M₁ in milk. *Food Addit. Contam.*, 1990, 7, 829.
10. Holcomb M., Wilson D.M., Trucksess M.W., Thompson H.C., Jr.: Determination of aflatoxins in food products by chromatography. *J. Chrom.*, 1992, 624, 341.
11. Hsieh D.P.: Mode of action of mycotoxins. W: *Mycotoxins in food*. Krogh P., ed., Academic Press, 1987, 149.
12. Kiermeier F., Kraus P.V.: Zum wahrscheinlichen Vorkommen von Sterigmatocystin in Milch und dessen Verhalten in Käse. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 1980, 170, 421.
13. Lemieszek-Chodorowska K.: Modyfikacja chromatograficznej metody wykrywania aflatoksyny M₁ w mleku. *Roczn. PZH*, 1979, 30, 141.
14. Official Methods of Analysis of AOAC International, 1995, 2, 4.
15. Piva A., Alazzi L., Curto O.: Aflatoxin M₁ occurrence in dairy products marketed in Italy. *Food Addit. Contam.*, 1987, 5, 133.

16. *Pohland A.E., Wood G.E.*: Occurrence of mycotoxins in food. W: *Mycotoxins in food*. Krogh P., ed., Academic Press, 1987, 35.
17. Projekt Zarządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej w sprawie wykazu substancji dodatkowych dozwolonych i zanieczyszczeń technicznych w środkach spożywczych i użytkach, 136.
18. *Saad A.M., Abdelgadir A.M., Moss M.O.*: Exposure of infants to aflatoxin M₁ from mothers breast milk in Abu Dhabi, UAE. *Food Addit. Contam.*, 1995, 12, 55.
19. *Scott P.M.*: Mycotoxin methodology. *Food Addit. Contam.*, 1995, 12, 395.
20. *Shepherd M.J., Holmes M., Gilbert*: Comparison and critical evaluation of six published extraction and clean-up procedures for aflatoxin M₁ in liquid milk. *J. Chrom.*, 1986, 354, 305.
21. *Swanson S.P., Dahlem A.M., Rood H.D.J., Cote L.M.*: Gas-chromatographic analysis of milk for deoxynivalenol and its metabolite DOM-1. *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, 1986, 69, 41.
22. *Takeda N.*: Determination of aflatoxin M₁ in milk by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chrom.*, 1984, 288, 484.
23. *Veldman A., Meijs J.A.C., Borggreve G.J., Heers van der Tol J.J.*: Carry-over of aflatoxin from cow's food to milk. *Anim. Prod.*, 1992, 55, 163.

Otrzymano: 1997.06.20