

CHROM. 9504

Note

Verbesserung der Nachweisgrenze von Aflatoxinen in der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie durch Verwendung eines kieselgefüllten Fluoreszenzdetektors

B. ZIMMERLI

Eidgenössisches Gesundheitsamt, Abteilung Lebensmittelkontrolle, Sektion Pestizidrückstände und Kontaminationen, Haslerstrasse 16, 3008 Bern (Schweiz)

(Eingegangen am 30. Juni 1976)

Aflatoxine sind Stoffwechselprodukte einiger Schimmelpilzarten wie z.B. *Aspergillus flavus*. Wegen ihrer stark kancerogenen Wirkung stellen sie eine potentielle Gefahr für die menschliche Gesundheit dar. Bei der Analyse dieser Substanzen mittels der Dünnschichtchromatographie (DC) wird deren intensive Fluoreszenz auf der DC-Platte zum Nachweis und zur Bestimmung herangezogen¹⁻³. In den bis jetzt publizierten Arbeiten über die Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) von Aflatoxinen wird daher neben den UV-Detektoren⁴⁻⁸ auch der Einsatz von Fluoreszenzdetektoren^{8,9} beschrieben. Allerdings werden dabei erhebliche Unterschiede in den Fluoreszenzsignalen der einzelnen Aflatoxine beobachtet⁸. Während bei der fluorodensitometrischen Auswertung von DC-Platten (Kieselgele) für die Aflatoxine B₁, G₁, B₂ und G₂ ein Signalverhältnis von 1:0.7:4:3 resultiert (Lit. 1), lässt sich aus den publizierten HPLC-Daten^{8,9} ein Verhältnis in der Grössenordnung von 1:300:2:300 schätzen. Es ist bekannt, dass das Fluoreszenzverhalten der Aflatoxine stark vom Lösungsmittel abhängt¹⁰⁻¹² und dass deren Emissionsmaxima im adsorbierten Zustand (Kieselgel), verglichen mit einer Chloroformlösung, um ca. 20 nm gegen Rot verschoben sind^{10,11}. Einige Autoren¹¹ vermuten auch, dass die Quantenausbeute der Fluoreszenz dieser Substanzen im adsorbierten Zustand grösser ist als in Lösung. Neben diesen Effekten werden die beobachtbaren Signalverhältnisse auch durch die spektralen Eigenschaften der verwendeten Apparatur (Primär- und Sekundärfilter, Photodetektor) beeinflusst. In einer kürzlich publizierten Arbeit¹³ wird der Einfluss von Adsorbentien auf das Fluoreszenzverhalten von stickstoffhaltigen Heterocyclen sowie von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen studiert und zur Empfindlichkeitserhöhung eines HPLC-Fluoreszenzdetektors angewendet. In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass durch die Füllung der Zelle eines kommerziellen Fluoreszenzdetektors mit geeigneten Adsorbentien auch für die Aflatoxine eine höhere Detektorempfindlichkeit erreicht werden kann.

EXPERIMENTELLES

Der verwendete Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatograph war aus folgenden Einzelteilen aufgebaut: Pumpe Modell 6000, Dosierschleife U6K und fertiggefüllte

Trennsäulen (30 cm × 4 mm I.D., Teilchengröße 10 µm) der Firma Waters Assoc. (Milford, Mass., U.S.A.); UV-Detektor LC-55 (Perkin-Elmer, Norwalk, Conn., U.S.A.); Fluoromonitor Modell 1209 (Laboratory Data Control, Riviera Beach, Fla., U.S.A.) mit folgenden spektralen Eigenschaften¹⁴: Primärfilter Corning 7/60 (Durchlässigkeit >55% bei 365 nm), Sekundärfilter (mit folgenden Durchlässigkeiten: 7% bei 360 nm, 2% bei 372–408 nm, 8% bei 413 nm, 52% bei 427 nm, 60% bei 430 nm und 80% bei 450 nm) und Photozelle (CdS) mit ungefähr konstanter Empfindlichkeit im Bereich von 400–480 nm (Maximum bei 520–700 nm). Der LDC-Fluoromonitor wurde entweder direkt an die Trennsäule oder an den Ausgang des UV-Detektors angeschlossen. Die spiralförmige, aus Kunststoff gefertigte, kommerzielle Zelle des Fluoromonitors (Volumen ca. 12 µl) wurde von der Einlassseite her mit Adsorbentien gefüllt. Aus Gründen der Druckstabilität der Zelle wurden nur Adsorbentien der Korngröße 0.1–0.2 mm verwendet. Die Referenzzelle enthielt in der Regel Luft. Zur Registrierung der Detektorsignale diente ein Zweikanalschreiber, Typ 3347, der Firma Yokogawa Electronic Works (Tokio, Japan). Die Peakflächen, als Mass für die Fluoreszenzsignale, wurden nach der Dreiecksmethode bestimmt: Fläche des Dreiecks, dessen Schenkel durch die Wendepunkte des Peaks gehen.

Die Aflatoxine B₁, B₂, G₁ und G₂ stammten von der Firma Makor Chemicals (Jerusalem, Israel) und wurden in der Schweiz von der Firma Senn Chemicals (Dielsdorf) geliefert. Aflatoxin M₁, gelöst in Chloroform, erhielten wir von Ir. H. P. van Egmond (Bilthoven, The Netherlands).

Die Stammlösungen wurden in Benzol–Acetonitril (98:2) resp. in Methanol hergestellt. Mittels der publizierten Extinktionskoeffizienten (Lit. 15 resp. Lit. 16) wurden die genauen Konzentrationen bestimmt. Zur Herstellung von Verdünnungen dienten Dichlormethan resp. Methanol, da diese auch als Elutionsmittel verwendet wurden. Alle verwendeten Lösungsmittel waren Produkte der Firma Merck (Darmstadt, B.R.D.) und wurden vor Gebrauch, z.T. über Natrium, destilliert.

RESULTATE UND DISKUSSION

In Tabelle I sind die vorwiegend verwendeten Trennsysteme zusammen mit den entsprechenden Massenverteilungsverhältnissen (k') der Aflatoxine B₁, B₂, G₁, G₂

TABELLE I

VERWENDETE TRENNSYSTEME UND MASSENVERTEILUNGSVERHÄLTNISSE (k') DER AFLATOXINE BEI 20° (UV-DETEKTOR)

Bezeichnung	Trennsystem		\dot{V}^* (ml/min)	h^{**} (µm)	k'				
	Stationäre Phase	Mobile Phase			B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	M ₁
I	µPorasil®	CH ₂ Cl ₂ (H ₂ O ges.)– CH ₃ OH (99.4:0.6)	1.05	43	1.77	2.26	2.03	2.64	17.20
II	µBondapak CN®	n-C ₆ H ₁₂ –THF (50:50)	1.05	73	2.58	2.94	4.88	5.70	2.80
III	µBondapak C ₁₈ ®	H ₂ O–CH ₃ OH (58:42)	0.36	228	5.54	4.07	3.39	2.48	2.16

* \dot{V} = Volumengeschwindigkeit.

** h = Mittlere theoretische Bodenhöhe.

TABELLE II

MESSUNGEN DER THEORETISCHEN BODENHÖHEN IM TRENNSYSTEM I

Aflatoxin	<i>h</i> (μm)	
	UV-Detektor	LDC-Fluormonitor
		Leere Zelle Gefüllte Zelle*
B ₁	49.2 \pm 1.3 (8)**	—*** 54.8 \pm 2.0 (10)
B ₂	42.0 \pm 1.0 (9)	— 55.1 \pm 0.7 (10)
G ₁	35.9 \pm 1.6 (9)	44.7 \pm 0.5 (11) 51.9 \pm 1.0 (10)
G ₂	42.8 \pm 0.9 (9)	46.8 \pm 0.5 (11) 56.5 \pm 2.4 (10)

* Mit Kieselgel 60, reinst, Merck Nr. 7754, Korngrösse 0.1–0.2 mm, gefüllt.

** Mittelwert \pm s/\sqrt{N} , in Klammern Anzahl Messungen (*N*).

*** —, nicht gemessen.

und M₁ zusammengestellt. Bei allen Versuchen betrug in den Trennsystemen I und II die Volumengeschwindigkeit 1.05 ml/min und im System III 0.36 ml/min. In Vorversuchen wurde, vor allem in den Trennsystemen I und II, der Einfluss verschiedener Kieselgele und Aluminiumoxide auf die Fluoreszenzsignale der Aflatoxine untersucht. Die stärksten Signale ergaben sich in den Trennsystemen I und II mit Kieselgel 60, reinst (Merck, Nr. 7754) und im Trennsystem III mit silanisiertem Kieselgel 60 (Merck, Nr. 7719). Mit diesen beiden Adsorbentien wurden die weiteren Untersuchungen durchgeführt. Die Verwendung stickstoffgespülter Elutionsmittel in den Trennsystemen I und II ergab weder mit der leeren noch mit der gefüllten Zelle eine Beeinflussung der Detektorsignale. Dies ist in Übereinstimmung mit Literaturangaben¹¹, nach denen die Fluoreszenz der Aflatoxine B₁ und G₁ in Methanol durch Sauerstoff nicht gelöscht wird. Messungen der theoretischen Bodenhöhen (*h*) im Trennsystem I ergaben, dass diese durch die Füllung der Fluoreszenzzelle um maximal 20% erhöht werden (Tabelle II).

Bei der Bestimmung der Detektorempfindlichkeit für die leere Zelle resultierten bei Dosierungen von 500 ng der schwach fluoreszierenden Aflatoxine B₁ und B₂ (Trenn-

TABELLE III

EINFLUSS VON ADSORBENTIEN AUF DIE EMPFINDLICHKEIT DES LDC-FLUOROMONITORS

Trennsystem	Füllung der Zelle	<i>a_i</i> [mV/($\mu\text{g}/\text{ml}$)]*				
		B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	M ₁
I	leer	<0.2	<0.2	170	160	<2
I	Kieselgel 60, reinst (Merck Nr. 7754)	400	1000	560	1970	3960
II	leer	<0.2	<0.2	11	16	<2
II	Kieselgel 60, reinst (Merck Nr. 7754)	190	200	550	610	130
III	leer	<13	370	<13	290	70
III	Kieselgel 60, silanisiert (Merck Nr. 7719)	160	640	170	1100	110

* $a_i = \dot{V} \cdot A/m$, wobei \dot{V} = Volumengeschwindigkeit in ml/sec, *A* = Peakfläche in mV·sec und *m* = Substanzmenge in μg .

systeme I und II) negative Signale. Dieser Effekt lässt sich mit dem geometrischen Aufbau des LDC-Fluoromonitors (180° Anordnung) und der Durchlässigkeit des Sekundärfilters im Wellenlängenbereich der Absorptionsmaxima der Aflatoxine erklären.

Die aus den gemessenen Peakflächen für einen konzentrationsabhängigen Detektor berechneten Empfindlichkeiten (a_i) sind in Tabelle III für die drei verschiedenen Trennsysteme und die zwei Kieselgele zusammengestellt. Für die leere Detektorzelle werden je nach Elutionsmittel unterschiedliche Empfindlichkeiten beobachtet: $G_1 \approx G_2 \gg B_1 \sim B_2 \sim M_1$ (in Dichlormethan) und $B_2 \approx G_2 > M_1 > B_1 \approx G_1$ (in Wasser-Methanol, 58:42). Mit Angaben aus der Literatur¹⁰ über die relativen Fluoreszenzintensitäten in Chloroform resp. Methanol besteht eine qualitative Übereinstimmung. Durch die Füllung der Fluoreszenzelle ergeben sich gegenüber der leeren Zelle scheinbare Verstärkungen der Fluoreszenzsignale um einen Faktor 1.6 (M_1 , System III) bis zu rund $5 \cdot 10^3$ (B_2 , System I). Für die Aflatoxine B_1 , G_1 , B_2 und G_2 wird mit dem kieselgelgefüllten Detektor im Trennsystem I ein Signalverhältnis von 1:1.4:2.5:4.9 erhalten, was in der gleichen Größenordnung liegt wie die bei der fluorimetrischen Auswertung der DC-Platten^{1,10,17} gefunden Verhältniszahlen. Einen Hinweis für die Deutung der beobachteten Effekte liefert die am Beispiel von Aflatoxin M_1 untersuchte Abhängigkeit der Detektorempfindlichkeit vom k' -Wert auf dem zur Detektorfüllung verwendeten Kieselgel (Merck Nr. 7754). Die k' -Werte wurden durch wechselnden Zusatz von Methanol zu Dichlormethan (Wasser-gesättigt) geändert und lagen im Bereich von 0.2–22. Die beobachtete Detektorempfindlichkeit nahm, innerhalb der Fehlergrenze, mit steigendem k' -Wert linear zu.

Fig. 1 zeigt zur Illustration die Chromatogramme von Standardlösungen der Aflatoxine B_1 , B_2 , G_1 und G_2 in den Trennsystemen I (modifiziert) und II. Der Ver-

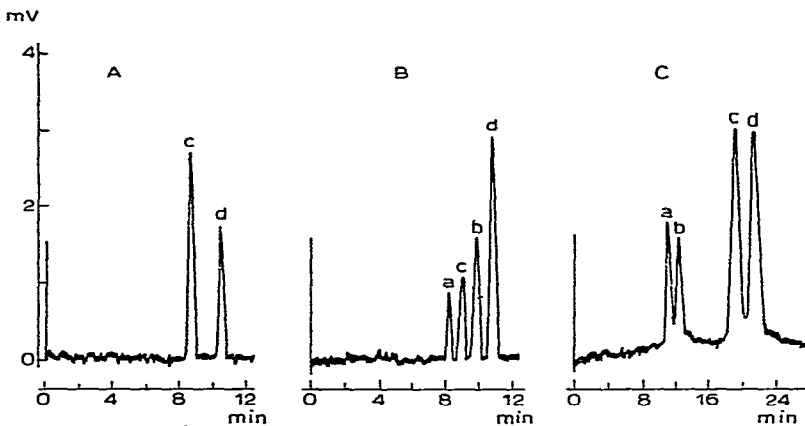


Fig. 1. Chromatogramme von Standardlösungen der Aflatoxine B_1 (a), B_2 (b), G_1 (c) und G_2 (d) im modifizierten Trennsystem I (A, B) und im Trennsystem II (C). Detektor, LDC-Fluoromonitor. A. Stationäre Phase, μ Porasil[®]; Mobile Phase, Dichlormethan (Wasser-gesättigt)-Methanol (99.2:0.8); Volumengeschwindigkeit, 1.05 ml/min; Temperatur, 20° ; leere Detektorzelle. Je 2.4 ng Aflatoxin B_1 , B_2 , G_1 und G_2 dosiert. B. Gleiches Trennsystem wie unter 1A; Detektorzelle jedoch mit Kieselgel 60, reinst (0.1–0.2 mm) gefüllt. Je 0.4 ng Aflatoxin B_1 , B_2 , G_1 und G_2 dosiert. C. Trennsystem II (vgl. Tabelle I); Detektorzelle mit Kieselgel 60, reinst (0.1–0.2 mm) gefüllt. Je 2.4 ng Aflatoxin B_1 , B_2 , G_1 und G_2 dosiert.

gleich der Chromatogramme A (leere Zelle) und B (kieselgelgefüllte Zelle) zeigt deutlich die Verstärkung der Fluoreszenzsignale der Aflatoxine B_1 und B_2 im modifizierten Trennsystem I. Das Detektorrauschen wurde durch die Füllung der Zelle nicht beeinflusst und betrug, unabhängig vom verwendeten Trennsystem, bei der Abschwächung $\times 2$ des Fluoromonitors 0.15 mV (Peak-zu-Peak). Im Trennsystem I lassen sich noch folgende Aflatoxinmengen sicher bestimmen: 120 pg B_1 , 80 pg B_2 , 120 pg G_1 und 40 pg G_2 . Im Umkehrphasensystem III liegen die entsprechenden Zahlen, zum Teil infolge der fünfmal schlechteren Bodenzahl der Trennsäule, ca. einen Faktor 4–10 höher. Bei der fluorometrischen Auswertung von DC-Platten wurden Nachweisgrenzen von 100–200 pg erhalten^{2,3,18}. Tiefere Werte, in der Größenordnung von 10 pg, wurden, bei theoretischen Bodenhöhen von 12 μm , mit einem Mikrodünnschichtverfahren¹⁷ erzielt. Mit dem hier verwendeten UV-Detektor (360 nm) resultierten im Trennsystem I Nachweisgrenzen von 1.5 ng pro Aflatoxin. Fig. 2 zeigt als Beispiel die Eichkurve für Aflatoxin G_2 im Bereich von 0.04–40 ng, aufgenommen im modifizierten Trennsystem I (0.8% statt 0.6% Methanol) und der mit Kieselgel (Merck Nr. 7754) gefüllten Fluoreszenzzelle. In der doppelt-logarithmischen Darstellung der Peakhöhen als Funktion der aufgegebenen Menge erhielten wir für die Steigung der Geraden den Wert 0.96 mit der Vertrauensgrenze ± 0.09 ($P = 95\%$, $N = 22$). Analoge Eichgeraden ergaben sich für die Aflatoxine B_1 , B_2 und G_1 . Die zehnmalige Aufgabe von 30 μl einer Standardlösung der Konzentration 50 pg/ μl ergab für die Peakhöhen

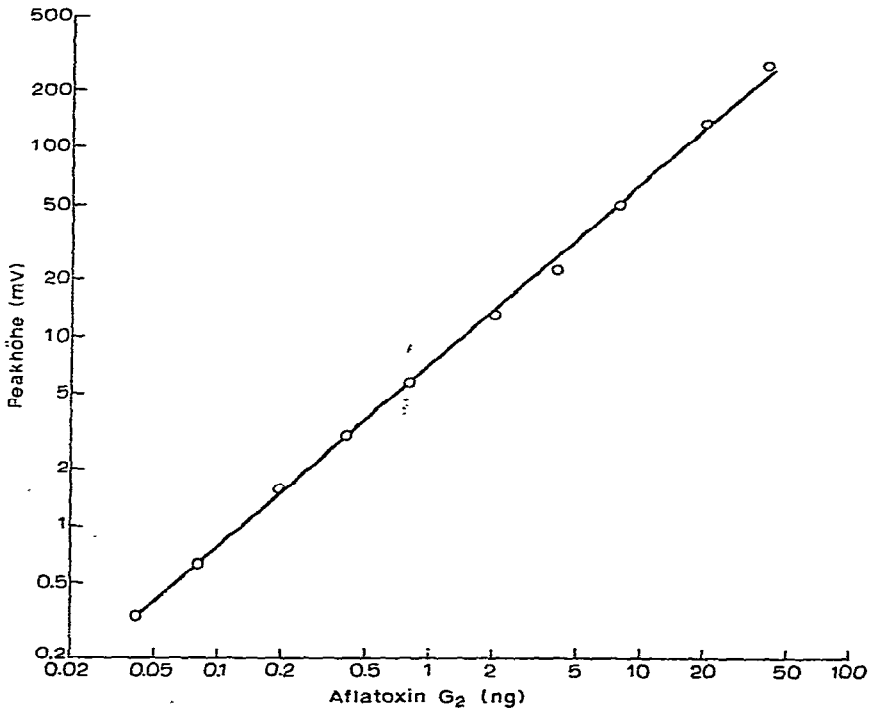


Fig. 2. Peakhöhe als Funktion der dosierten Menge Aflatoxin G_2 . Bedingungen: modifiziertes Trennsystem I (vergl. Fig. 1A); Zelle des LDC-Fluoromonitors mit Kieselgel 60, reinst (0.1–0.2 mm) gefüllt.

im gleichen System folgende Variationskoeffizienten: B_1 (1.8%), B_2 (1.9%), G_1 (1.6%), G_2 (1.0%). Im gleichen modifizierten Trennsystem I wurde auch der Einfluss der aufgegebenen Probevolumina auf die Auflösung (R) der Aflatoxine untersucht. Bis zu 200 μ l konnte für die Aflatoxinpaare B_1/G_1 ($R = 1.22$) und B_2/G_2 ($R = 1.59$) keine Reduktion der Auflösung festgestellt werden. Für Probevolumina von 300 μ l (Aflatoxine im Eluens gelöst) resultierte eine um 30% verminderte Auflösung.

In kürzlich durchgeführten Versuchen mit dem Labotron Filterfluorometer (50 μ l Durchflusszelle; Primärfilter UG-11 der Firma Schott, Jena, D.D.R.; Sekundärfilter Wratten 2A, 90° Anordnung, der Firma Kontron AG, Zürich, Schweiz) erhielten wir im Trennsystem I qualitativ gleiche Resultate wie mit dem LDC-Fluoromonitor. Das Detektorrauschen erhöhte sich allerdings durch die Füllung der Zelle von 0.04 auf 0.2 mV (Peak-zu-Peak). Mit der kieselgelgefüllten Zelle (Merck Nr. 7754) wurden für die Aflatoxine folgende Empfindlichkeiten a_i [mV/(μ g/ml)] ermittelt: B_1 400 (2), B_2 2080 (2), G_1 290 (310), G_2 2400 (350) und M_1 3480 (die Werte in Klammern gelten für die leere Zelle). Trotz des höheren Detektorrauschens ergeben sich mit der gefüllten Zelle für die Aflatoxine B_1 und B_2 um den Faktor 40 resp. 200 tiefere Nachweisgrenzen als mit der leeren Zelle.

Würde zur Analyse von Aflatoxinen von 50 g Probematerial ausgegangen, der gereinigte Extrakt auf 1 ml konzentriert und davon 200 μ l im Trennsystem I analysiert, so könnte bei Verwendung des kieselgelgefüllten LDC-Fluoromonitors mit einer Nachweisgrenze der Aflatoxine im Probematerial von rund 10 ppt ($1:10^{12}$) gerechnet werden.

DANK

Herrn Ir. H. P. van Egmond, Leiter der Abteilung Mykotoxinforschung, Rijksinstituut voor de Volksgezondheid, Bilthoven, danke ich für die Aflatoxin M_1 Standardlösung. Herrn W. Pfister von der Firma Kontron AG, Zürich, danke ich für die leihweise Überlassung des Labotron FFM-32 Filterfluorometers. Herrn Dr. B. Marek, Chef der Sektion Pestizidrückstände und Kontaminationen, danke ich für die stetige Förderung der vorliegenden Arbeit. Herrn O. Blaser danke ich für die geschickte und sorgfältige Durchführung der experimentellen Arbeiten.

LITERATUR

- 1 J. A. Robertson und W. A. Pons, Jr., *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 51 (1968) 1190.
- 2 W. A. Pons, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 54 (1971) 870.
- 3 P. R. Beljaars und F. H. M. Fabry, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 55 (1972) 775.
- 4 M. Manabe und S. Matsuura, *Agr. Biol. Chem.*, 35 (1971) 417.
- 5 J. N. Seiber und D. P. H. Hsieh, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 56 (1973) 827.
- 6 G. H. R. Rao und M. W. Anders, *J. Chromatogr.*, 84 (1973) 402.
- 7 R. C. Garner, *J. Chromatogr.*, 103 (1975) 186.
- 8 L. M. Seitz, *J. Chromatogr.*, 104 (1975) 81.
- 9 J. C. Steichen, *J. Chromatogr.*, 104 (1975) 39.
- 10 J. A. Robertson, W. A. Pons, Jr. und L. A. Goldblatt, *J. Agr. Food Chem.*, 15 (1967) 789.
- 11 B. L. van Duuren, T. L. Chan und F. M. Irani, *Anal. Chem.*, 40 (1968) 2024.
- 12 F. Kiermeier und S. Kroczeck, *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.*, 154 (1974) 288.
- 13 J. B. F. Lloyd, *Analyst (London)*, 100 (1975) 529.
- 14 P. Rohner, Laboratory Data Control, private Mitteilung, Dezember 1975.
- 15 J. V. Rodricks und L. Stoloff, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 53 (1970) 92.
- 16 J. V. Rodricks, L. Stoloff, W. A. Pons, Jr., J. A. Robertson und L. A. Goldblatt, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 53 (1970) 96.
- 17 J. Rippahn und H. Halpaap, *J. Chromatogr.*, 112 (1975) 81.
- 18 M. R. Berman und R. N. Zare, *Anal. Chem.*, 47 (1975) 1200.