

CHROM. 17,296

Note

Bestimmung von Aflatoxinen B₁, B₂, G₁, G₂ und M₁ durch Überdruck-Schicht-Chromatographie

H. GULYÁS

Labor MIM, Pf. 280, H-1445 Budapest (Ungarn)

(Eingegangen am 10. Oktober 1984)

Die Aflatoxine sind ausserordentlich gefährliche Verbindungen mit einem karzinogenen Charakter¹, deshalb muss man im Laufe ihrer Bestimmung und Untersuchung mit grossen Vorsicht arbeiten. Ähnlicherweise zu den Verbindungen, die auf die Wirkung von Luft und Wärme leicht zerstören, müssen sie auch vor diesen äusseren Wirkungen geschützt werden. Die Proben und die Standards sollen in einer dunklen, kühlen Stelle (verhältnismässig in einem Kühlschrank) aufbewahrt und ihre Trennung in einer dunklen Kammer durchgeführt werden. M₁ (Lit. 2) kommt hauptsächlich in Milch von verschiedenen Tieren vor. Bisher wurden die Aflatoxine B₁, B₂, G₁, G₂ durch mehrere Methoden in der Flüssigkeitschromatographie (HPLC^{3–5}, TLC^{6–8}, HPTLC⁹) untersucht. Im Vergleich zu diesen Methoden bietet die Überdruck-Schicht-Chromatographie [Over-pressured liquid chromatography (OPLC)] eine billige, rapide Trennmöglichkeit mit einem kleinen Lösungsmittelsbedarf. Die OPLC Technik bedeutet eigentlich eine planarisch geordnete Säulenchromatographie, wo die Schichtplatte einen trockenen Säule repräsentiert. In diesem Fall befindet sich die Schicht in einem unequilibrierten Zustand und der oben der Platte vorhandene Dampfraum ist infolge der Druckbelastung von 1,0 MPa bedeutungslos. Der Überdruck verwirklicht eine kurze Trennzeit und kleine, kompakte, schnell auswertbare Flecken.

EXPERIMENTELLER TEIL

Geräte

Die Aflatoxine B₁, B₂, G₁, G₂ und M₁ wurden in einem Adsorptionssystem, auf HPTLC Kieselgel₆₀ (Merck, Darmstadt, B.R.D.) getrennt. Die Probenauftragung erfolgte durch Linomat III (Camag, Schweiz) und mit Hilfe dieses Gerätes können die Proben und Standards im Band von 2 mm aufgetragen werden. Die Trennung wurde in der Chrompres-10 Überdruckkammer (Labor MIM, Budapest, Ungarn) durchgeführt. In dem mit Wasserdruck von 1,0 MPa geschlossenen System kommt der Eluent mit 0,5 MPa auf die Schichtplatte (20 × 20 cm). Der Eluent wird durch eine Mikropumpe, mit einer für jedes Trennsystem anderen, optimierten Flüssigkeitsgeschwindigkeit befördert. Im Laufe der Entwicklung des Chromatogrammes ist die Durchflussgeschwindigkeit konstant.

Die quantitative Auswertung erfolgt durch Densitometer (Typ. CS-920

TLC/HPTLC, Shimadzu, Japan) mit der Anregung von 365 nm Hg-Lampe, dann wird das Fluoreszenz-Emission mit dem Filter No. 3 gemessen.

*Probenaufbereitung*¹⁰

Erdnuss und Maismehl. Aus einem feingemahlten, homogenisierten Probenmaterial (50 g) werden die Aflatoxine mit Chloroform extrahiert. Die entstandene Suspension wird filtriert und aus dem Filtrat 50 ml auf einen Kieselgelsäule aufgeführt und nach dem Zugabe von Hexan-Diethylether (1:1, v/v) entfettet, zuletzt die adsorbierten Aflatoxine mit Chloroform-Methanol (97:3, v/v) eluiert. Nach der Rotationsverdampfung werden die Extrakten in 200 μ l Benzol-Acetonitril (98:2, v/v) aufgenommen, davon 10 μ l auf die HPTLC-Schicht aufgetragen werden.

Milchpulver. Das Aflatoxingehalt M_1 wird mit Aceton aus dem Milchpulver (5 g) extrahiert, dann mit $Pb(CH_3COO)_2$ auf einem Cellulose-Säule gereinigt. Nach der Verdampfung des Lösungsmittels werden die Extrakten in 100 μ l Chloroform aufgenommen und 10 μ l auf die HPTLC-Schicht aufgetragen.

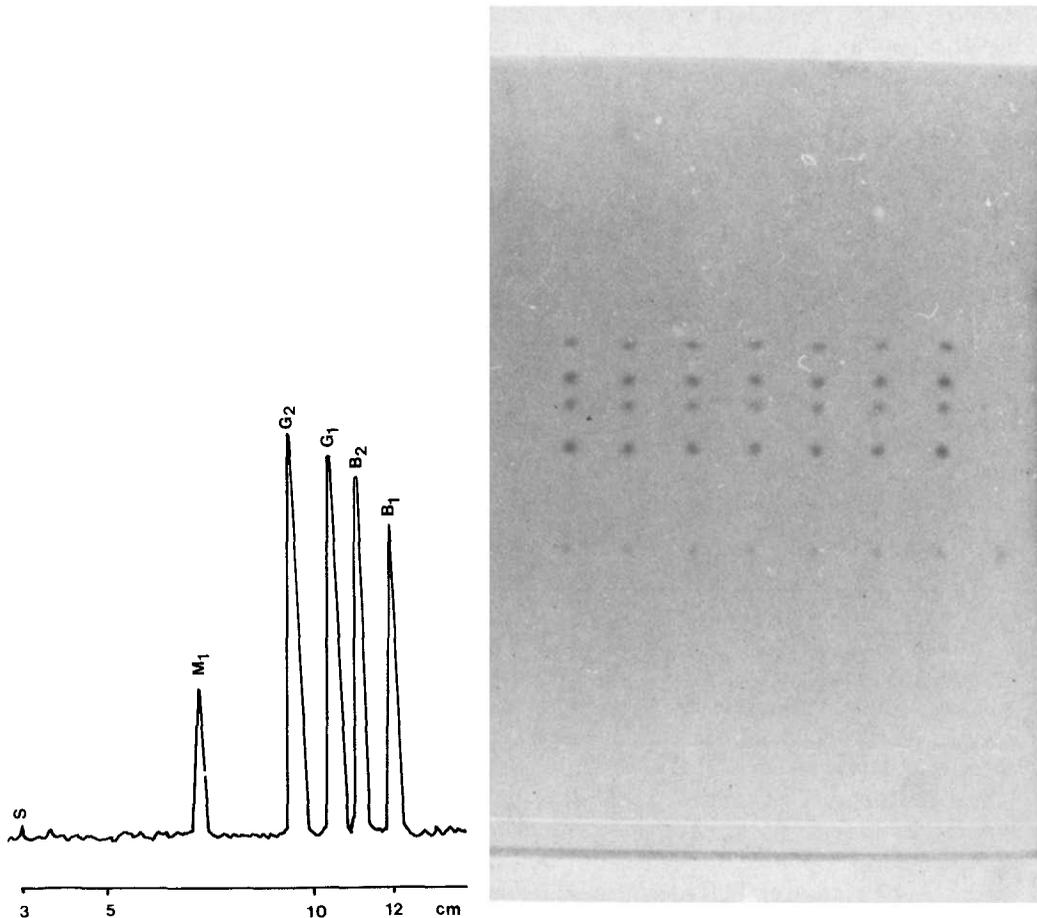


Fig. 1. Chromatographische Trennung von Aflatoxine und ihr Chromatogramm durch OPLC Technik. Bandauftragen: 2 ng.

Durchführung

Aus reinem Extrakt von Erdnuss, Maismehl und Milchpulver werden 10 μ l, daneben aus den Standards 1 ng, 2 ng, 4 ng auf die Platte aufgetragen. Die aufgetragenen Proben braucht man nicht zu trocknen, weil das leichtverdämpfliche Lösungsmittel, Benzol-Acetonitril (98:2 v/v) durch das N₂-Gasstrom schnell verdampft. Die nach der beschriebenen Methode vorbereitete Schichtplatte muss bis zu und nach der Trennung vor Licht geschützt und kühl aufbewahrt werden.

Da es sich um eine sehr winzige Probenmenge handelt, kann der zerstörende Effekt von Licht zu einem bedeutenden Fehler führen. Auf der HPTLC Kieselgel₆₀ wird Chloroform-Ethylacetat-Tetrahydrofuran (8:12:0,6, v/v/v) als Fließmittelgemisch verwendet. Die Laufstrecke beträgt 170 mm, d.h. die Trennung dauert so lange bis das Schichtende von dem auf der Startlinie aufgetragenen Indofenol-Na erreicht wird. Diese Zeit beträgt etwa 8 min. und die Eluentsgeschwindigkeit ist 0,58 ml/min. Diese kurze Trennzeit kann man in der TLC z.Z. nur mit der Chrompres-10 Kammer verwirklichen.

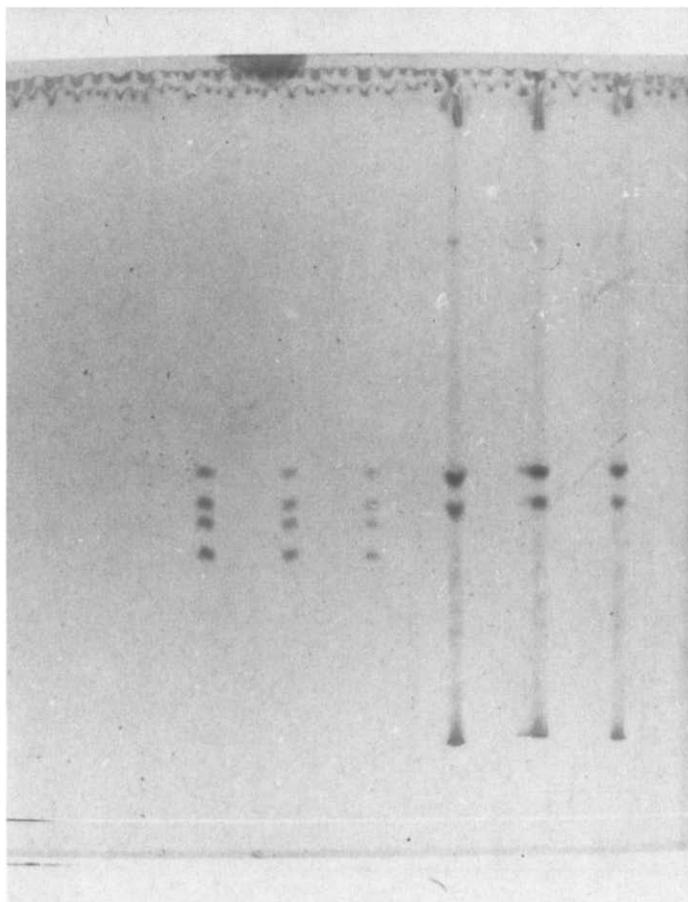
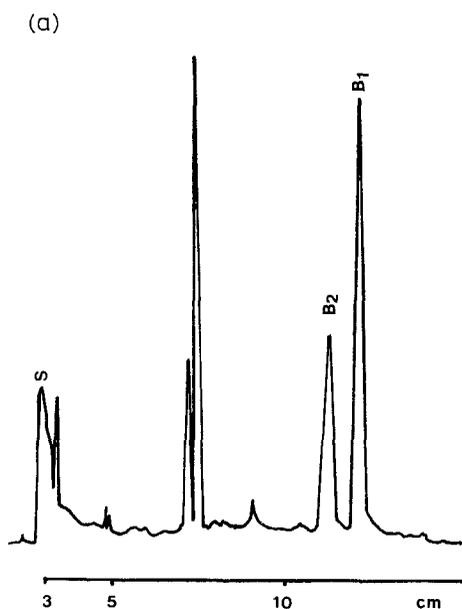


Fig. 2.

(Fortsetzung S. 108)

Im Fall der stark verschmutzten Proben ist es zweckmässig eine Vortrennung mit Hexan-Diethylether (1:1, v/v) für Entfettung zu verwenden. Die Eluentgeschwindigkeit ist ebenfalls 0,58 ml/min. Bei dem Eluentswechsel ist es nicht unbedingt wichtig, die Kammer zu öffnen, weil der Farbstoff (Indofenol-Na) das Ende der Trennung anzeigt. Sollte die Kammer nach der Vortrennung geöffnet werden, können schönere, kompaktere Flecken erhalten werden, d.h. lohnt es sich die Kammer zwischen der beiden Entwicklung zu öffnen.

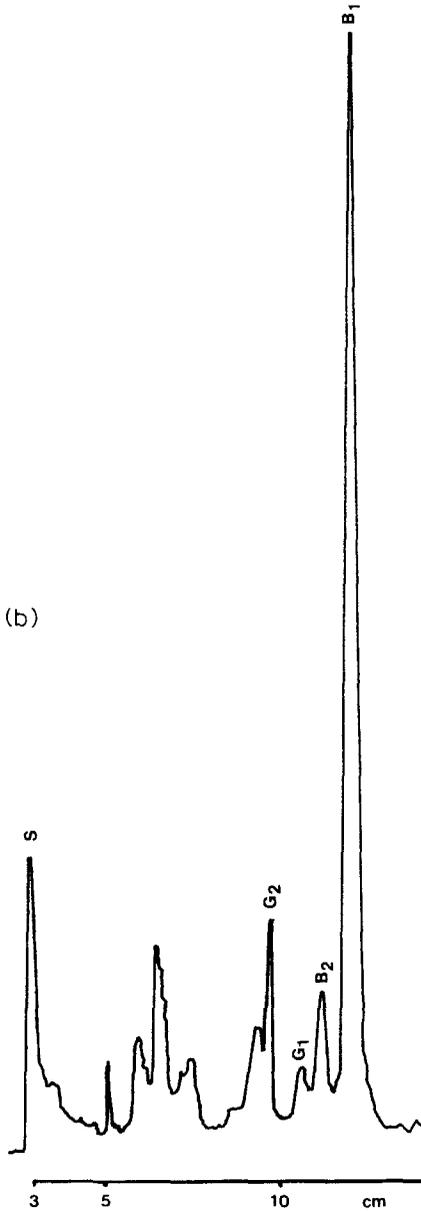
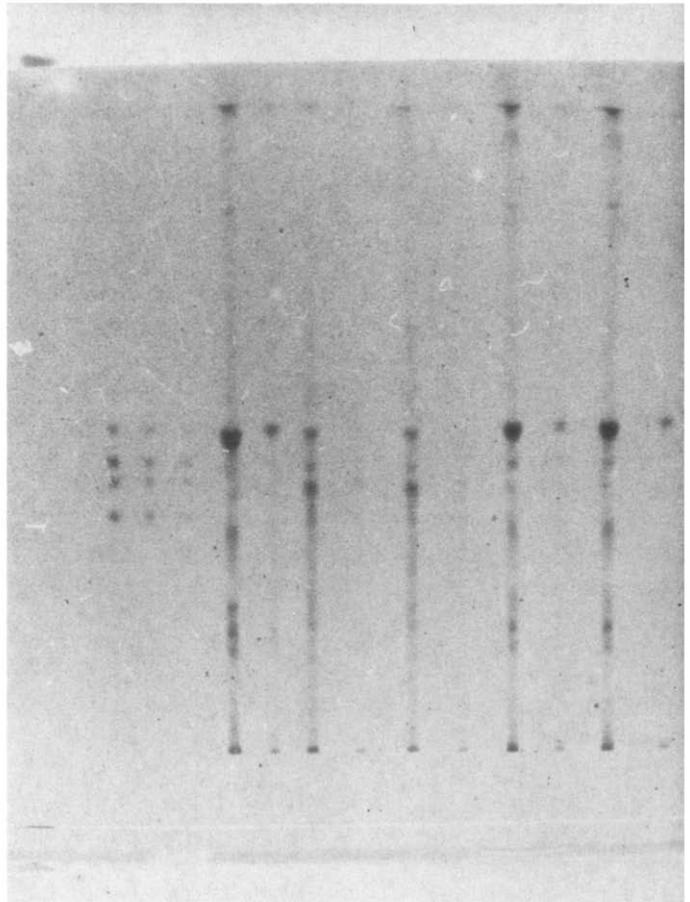


Fig. 2.



ERGEBNISSE

Bei der Trennung der durch eine Vortrennung mit Hexan-Diethylether (1:1, v/v) untersuchten Proben, verursachen die Fettverschmutzungen keine Störungen in der Auswertung, deshalb kann man eine genaue Bestimmung durchführen. Mit Hilfe der beschriebenen Methode kann man die auf den Organismus gefährliche Aflatoxine B_1 , B_2 , G_1 , G_2 und M_1 mit einer entsprechenden Genauigkeit bestimmen.

Fig. 1 stellt das Densitogramm und den Aufnahme eines Standardgemisches dar, in dem die Aflatoxine in Menge von 2 ng sind. Im untersuchten Erdnussextrakt kamen nur B_1 und B_2 (Fig. 2a) vor. In diesem Fall ist es in den Probenbanden eine ziemlich grosse Menge von stark absorbierenden Verschmutzungen zu beobachten. Die Fettverschmutzungen wurden durch die Vortrennung entsprechendweise eluiert, so könnten klare, gut auswertbare Chromatogramme erhalten werden. Ein Chromatogramm und ein Aufnahme des Maisextraktes sowie Milchpulverextraktes sind auf der Fig. 2b und c zu sehen.

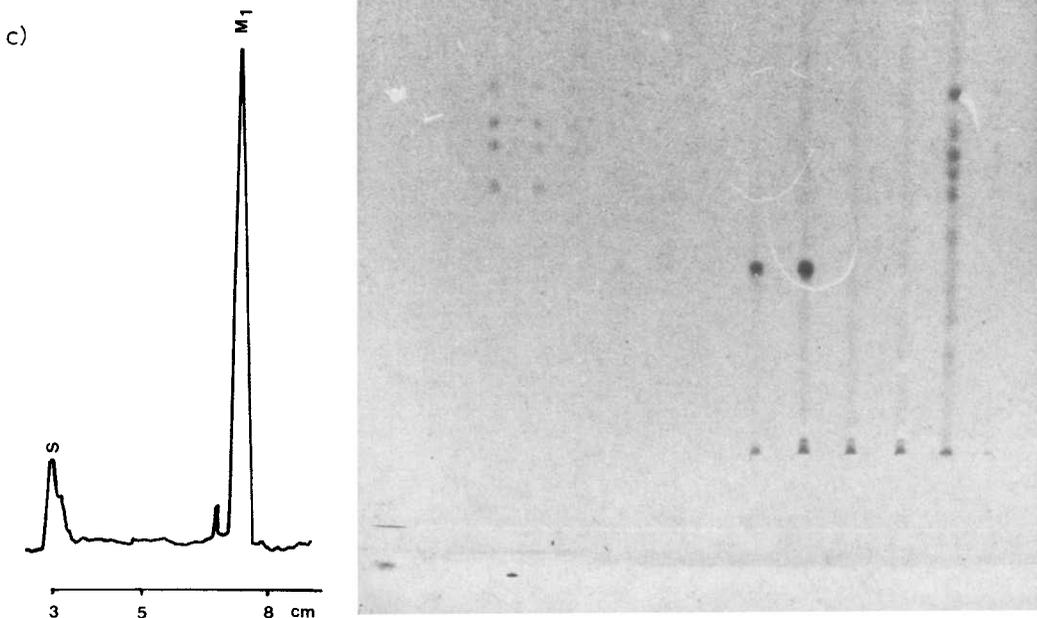


Fig. 2. Trennung der aufgearbeiteten Proben in der Chrompres-10 Kammer unter 1,0 MPa. (a) Erdnuss-extrakt; (b) Maismehlextrakt; (c) Extrakt aus Milchpulver.

Mit Hilfe der aus den Standardwerten gerechneten Eichkurven (Fig. 3) kann man die Menge der Aflatoxine bestimmen. Die Nachweisgrenze, bei der die einzelnen Komponenten gut auswertbar sind, liegt bei B_1 , B_2 , G_1 , G_2 0,25 ng/Fleck und bei M_1 0,5 ng/Fleck.

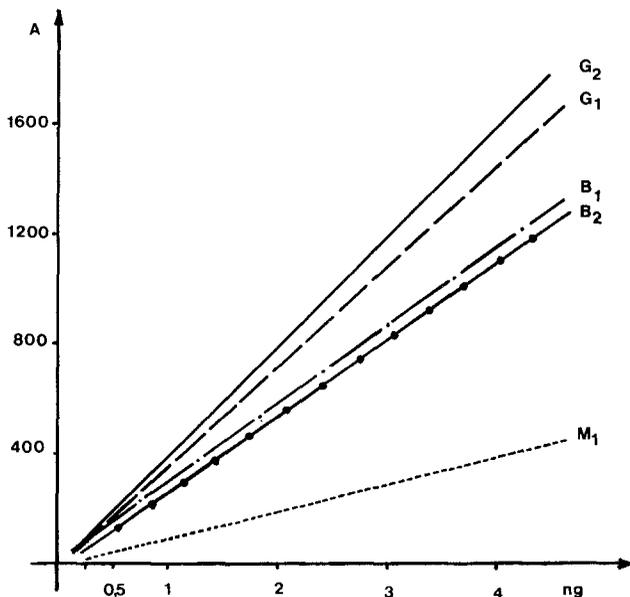


Fig. 3. Eichkurven der Aflatoxine B_1 , B_2 , G_1 , G_2 und M_1 . $n = 7$, je 2 ng von Aflatoxinen.

Von der Probenauftragung bis zur Auswertung braucht man für Untersuchung 6 min, wenn man auf die Platte 10 Proben untersucht und auch eine Vortrennung durchführt.

Die Reproduzierbarkeit der Aflatoxine B_1 , B_2 , G_1 , G_2 mit der OPLC Technik ist unter 5,5%, welcher besser ist, wie es aus der Angaben in der TLC Literatur¹¹ herauskommt. Die Reproduzierbarkeit von M_1 beläuft sich auf 7,3% (Tabelle I), bei R_F Werten ist sie unter 0,4%.

TABELLE I

DIE REPRODUZIERBARKEIT DER UNTERSUCHTEN STANDARDEN IN DER CHROM-PRES-10 KAMMER

$n = 7$. A = Peakareal in Integratoreinheit.

| | A | | | R_F | | |
|-------|-------|-------|-----------|-------|-------|-----------|
| | x | S | V_k (%) | x | S | V_k (%) |
| B_1 | 581,7 | 28,02 | 4,8 | 128,0 | 0,407 | 0,3 |
| B_2 | 554,1 | 30,62 | 5,5 | 118,5 | 0,527 | 0,4 |
| G_1 | 730,9 | 8,95 | 1,2 | 111,9 | 0,472 | 0,4 |
| G_2 | 808,4 | 20,61 | 2,5 | 101,2 | 0,423 | 0,4 |
| M_1 | 164,2 | 12,03 | 7,3 | 82,7 | 0,160 | 0,2 |

DANKSAGUNG

Ich danke Herrn E. Mincsovic für die wertvolle Anregung and Herrn Dr. E. Tyihák für die Durchsicht des Manuscriptes, sowie Herrn Sz. Koudela und Frau I. Gyalmos für die Überlassung der Probenmaterialien und Standardlösungen.

LITERATUR

- 1 H. J. Issaq und W. Cutchin, *J. Liquid Chromatogr.*, 4 (1981) 1087.
- 2 L. G. M. Th. Tuinstra und W. Haasnoot, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 312 (1982) 622.
- 3 W. A. Pons, Jr., *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 59 (1976) 101.
- 4 S. M. Lamplugh, *J. Chromatogr.*, 273 (1983) 442.
- 5 D. M. Takahashi, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 60 (1977) 799.
- 6 W. A. Pons, Jr. und A. O. Franz, Jr., *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 60 (1977) 89.
- 7 D. M. Wilson, W. H. Tabor und M. W. Trucksess, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 59 (1976) 125.
- 8 R. D. Stubblefield and O. L. Shotwell, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 60 (1977) 784.
- 9 R. Klaus, *J. Chromatogr.*, 283 (1984) 347.
- 10 W. Horwitz (Herausgeber), *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, AOAC, Washington, DC, 1980, 13. Ed.
- 11 H. Müller und V. Siepe, *Dtsch. Lebensm. Rundsch.*, 4 (1978) 133.