

# Otimização da determinação da aflatoxina M<sub>1</sub> em leite, utilizando coluna de imunoafinidade e cromatografia em camada delgada

## Performance of determination for Aflatoxin M<sub>1</sub> in milk by immunoaffinity column and thin layer chromatography

RIALA6/973

Luzia SHUNDO<sup>1\*</sup>, Valter RUVIERI<sup>1</sup>, Sandra A. NAVAS<sup>1</sup>, Myrna SABINO<sup>1</sup>\* Endereço para correspondência: <sup>1</sup> Instituto Adolfo Lutz – Av. Dr. Arnaldo, 355 – 01246-902 – São Paulo/SP, Brazil. - Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Química Biológica.

Recebido: 22/03/2004 – Aceito para publicação: 14/05/2004

### RESUMO

Um método utilizando coluna de imunoafinidade para limpeza e cromatografia em camada delgada, foi otimizado em nosso laboratório para determinar Aflatoxina M<sub>1</sub> em baixas concentrações no leite. Para a otimização do método, os parâmetros avaliados foram: recuperação, repetitividade, limite de detecção e limite de quantificação. Baseado em adição de padrão nas amostras, os valores das recuperações variaram de 85,83 e 73,86% em níveis de 0,01–0,5 µg/L, respectivamente, e o desvio padrão relativo para repetitividade variou de 7,73-2,08%. O limite de quantificação estabelecido neste método foi de 0,02 µg/L. Os resultados das amostras analisadas por este método tiveram boa correlação quando comparadas com a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Adicionalmente, o método AOAC também foi otimizado, resultando em um limite de detecção e quantificação de 0,2 e 0,3 µg/L, respectivamente, indicando baixa sensibilidade desse método. A utilização de coluna de imunoafinidade forneceu excelentes resultados na recuperação, sensibilidade e fácil operacionalidade.

**Palavras-Chave.** leite, aflatoxina M<sub>1</sub>, determinação, cromatografia em camada delgada, coluna de imunoafinidade.

### ABSTRACT

An immunoaffinity column for cleanup and a thin layer chromatographic method for determining low aflatoxin M<sub>1</sub> concentration in milk were performed in our laboratory. The parameters, such as recovery, repeatability, detection and quantification limit were evaluated to carry out this method. Based on spiked samples, the values of recoveries ranged from 85.83 to 73.86 % at levels of 0.01-0.5 µg/L, respectively, and the relative standard deviation for repeatability (RSDr) ranged from 7.73 to 2.08%. The quantification limit established in this method was 0,02 µg/L. The results of analysed samples by this method demonstrated satisfactory correlation when compared with HPLC. In addition, the AOAC method (1975) was also performed, resulting in detection and quantification limits of 0.2 and 0.3 µg/L, respectively, indicating low sensibility of this method. Immunoaffinity column cleanup gave excellent results for recovery, sensibility and sample throughput.

**Key Words.** milk, aflatoxin M<sub>1</sub>, determination, thin layer chromatography, immunoaffinity column.

### INTRODUÇÃO

A Aflatoxina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) é um produto hidroxilado da biotransformação da Aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), presente no leite de mamíferos que ingerem ração contaminada com esta micotoxina<sup>1,7</sup>.

Estudos sobre a toxicidade em animais de experimentação indicam que a AFM<sub>1</sub> é um carcinógeno hepático, com 2 - 10% da potência da AFB<sub>1</sub><sup>5,6,13,23</sup>. Os organismos mais jovens são mais

susceptíveis a esta toxina, e o leite e seus derivados são produtos muito consumidos pela população infantil. Sabe-se que a maior preocupação com a carcinogenicidade é a exposição crônica, pois é através da alta frequência de ingestão de alimentos contaminados com baixos teores de aflatoxina onde a população exposta é maior.

Os limites estabelecidos para AFM<sub>1</sub> em alimentos são da ordem de ng/L ou ng/g, níveis muito baixos que exigem métodos sensíveis e específicos<sup>14</sup>.

A disponibilidade de colunas de imunoafinidade permitiu melhorar a sensibilidade de métodos analíticos, resultando em um extrato límpido, sem interferentes<sup>4,11,20</sup>.

Este trabalho teve como objetivo avaliar e otimizar duas técnicas para determinar AFM<sub>1</sub> em amostras de leite, ambas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), uma utilizando Coluna de Imunoafinidade (CI)<sup>10</sup> e outra o método da AOAC (Association of Official Analytical Chemists)<sup>2</sup>, com pequenas modificações. Adicionalmente, algumas amostras foram submetidas a análise por CI/CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), para verificar a eficiência da técnica. Para otimização dos métodos descritos neste trabalho, foram avaliados e otimizados os parâmetros: Recuperação, Repetibilidade, Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).

Os critérios adotados como referência para a avaliação da recuperação e precisão foram os estabelecidos pelo CE (European Committee)<sup>3</sup> onde são considerados aceitáveis os seguintes valores: para a AFM<sub>1</sub> com concentração entre 0,01-0,5 µg/L, valores de porcentagem de recuperação entre 60-120%. Nas concentrações maiores que 0,05 µg/L, foram aceitos valores de porcentagem de recuperação entre 70-120%.

## MATERIAL E MÉTODO

### Preparo da solução padrão

O padrão de Aflatoxina M<sub>1</sub> (Sigma Chemical Co; St. Louis, MO, EUA) foi preparado segundo o descrito por Scott<sup>15</sup>, procedimento 970.44, 971.22, 973.37.

### Contaminação artificial das amostras de leite

Para o método CI/CCD, foram adicionadas quantidades de padrões em amostras de leite cru na qual não foi detectada AFM<sub>1</sub>, que corresponderam a concentrações finais de 0,01; 0,02; 0,03; 0,3 e 0,5 µg/L. Para o método AOAC/CCD, foram adicionadas quantidades de padrões que corresponderam a 0,2; 0,3; 0,5 µg/L. Para cada nível de concentração, foram realizadas no mínimo 5 repetições.

### Determinação de Aflatoxina M<sub>1</sub>

#### Método utilizando coluna de imunoafinidade

#### Extração

O método utilizado para AFM<sub>1</sub> foi baseado no procedimento descrito por IDF/IUPAC/IAEA<sup>10</sup> e Dragacci et al.<sup>8</sup>. Uma alíquota de 100 mL de leite foi centrifugada a 2000 x g por 15 minutos. Retirou-se a camada de gordura e o volume total foi passado pela coluna de imunoafinidade com fluxo de 2-3 mL por minuto. Após a passagem de todo o volume, a coluna foi lavada com 40 mL de água para retirada dos interferentes da coluna, seca para eliminação da água residual e eluída inicialmente com 2,5 mL de uma solução de acetonitrila/metanol (3:2, v/v) e em seguida com 2,5 mL de metanol, evaporando-se

até resíduo em corrente de N<sub>2</sub>.

#### Cromatografia em Camada Delgada

O resíduo foi redissolvido em 150 µL de uma solução de tolueno/acetonitrila (9:1, v/v). Uma alíquota de 50 µL do extrato da amostra foi aplicada em cromatofolha (silica gel 60), paralelamente com padrões em diferentes níveis de concentração. Desenvolveu-se o cromatograma até 10 cm a partir do ponto de aplicação, ao abrigo da luz. A fase móvel utilizada foi uma solução de clorofórmio, acetona e álcool isopropílico (87:10:3, v/v). A quantificação foi feita através de comparação visual da amostra com padrões de concentrações conhecidas e a confirmação por pulverização com ácido sulfúrico e derivação com TFA (Ácido Trifluoroacético) segundo o descrito por Scott<sup>15</sup>, procedimento 980.21E.

#### Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

O resíduo foi redissolvido em 500 µL da fase móvel que consistiu numa solução aquosa de ácido acético 2%:acetonitrila:metanol (40:35:25, v/v). Uma alíquota de 20 µL da amostra foi injetada no cromatógrafo líquido de alta eficiência para a separação da toxina e a quantificação foi efetuada utilizando detector de fluorescência<sup>12</sup>.

A fase móvel foi previamente filtrada em sistema Millipore à vácuo (membrana de 0,45 µm) e degaseificada. As condições cromatográficas utilizadas foram:

Excitação/emissão (λ): 360/430 nm

Tempo de corrida: 6 minutos.

Fluxo: 1 mL/min.

A confirmação da AFM<sub>1</sub> nas amostras de leite foi realizada através de derivação com TFA, segundo procedimento descrito por Scott<sup>15</sup>, procedimento 986.16E.

Neste trabalho, foi construída uma curva de calibração onde o volume de cada injeção de 20 µL correspondeu a 0,01; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,1; 0,2 ng. Foram realizados testes de recuperação com adição de padrão de AFM<sub>1</sub> no leite na qual não foi detectada AFM<sub>1</sub>, nas concentrações de 0,01; 0,02; 0,05 µg/L, por ocasião da análise das amostras.

#### Método da AOAC/CCD (1975)

O método utilizado para AFM<sub>1</sub> foi baseado no método da AOAC<sup>2</sup>. Em uma alíquota de 75 mL de leite foi adicionado 300 mL de metanol e agitou-se por 3 minutos. Adicionou-se 25g de celite e agitou-se por 30 minutos em agitador mecânico. Filtrou-se sob vácuo, lavando com 75 mL de metanol. Todo o volume recolhido foi transferido para um funil de separação, adicionando 225 mL de solução aquosa de cloreto de sódio 4%. A gordura e interferentes foram retirados empregando-se 3 porções de 100mL hexano. A fase metanólica foi extraída com 3 porções de 100 mL de clorofórmio. O extrato clorofórmico foi lavado com 300 mL de solução de cloreto de sódio 4%, recolheu-se novamente a fase clorofórmica e, em seguida foi filtrado em

papel de filtro contendo sulfato de sódio anidro. Evaporou-se o clorofórmio até resíduo e este foi redissolvido em 200 µL de uma solução de tolueno/acetoneitrila (9:1, v/v). Uma alíquota de 10 µl foi aplicada em cromatofolha para separação das amostras, paralelamente com padrões em diferentes níveis de concentração. A quantificação foi feita por comparação visual da amostra com padrões de concentrações conhecidas e a confirmação por pulverização com ácido sulfúrico e derivação com TFA, segundo o método descrito por Scott<sup>15</sup>, procedimento 980.21E.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Avaliação da recuperação

A recuperação e a repetitividade foram realizadas em amostras artificialmente contaminadas com AFM<sub>1</sub>, em diferentes níveis para cada método empregado, com no mínimo cinco repetições para cada nível de concentração. A Tabela 1 apresenta os níveis de concentração e os resultados da avaliação da recuperação (exatidão) da AFM<sub>1</sub> para o método CI/CCD e AOAC/CCD. A Tabela 2 apresenta a avaliação da repetitividade (precisão) e a Tabela 3 a avaliação dos limites de detecção e quantificação da AFM<sub>1</sub>.

Pelo método CI/CCD, os dados obtidos indicaram que a recuperação média variou de 85,83% a 73,86% para os níveis de 0,01 e 0,5 µg/L, respectivamente. O DPR foi maior no menor nível de concentração (7,73%) e menor no maior nível de concentração (2,08%). Estes resultados indicaram que, quanto mais próximo do limite de detecção, a diferença entre as determinações são maiores (Tabelas 1 e 2).

O LD e LQ foram estabelecidos baseando-se no CE<sup>3</sup>. Inicialmente, foi estabelecido o limite de detecção do método em 0,01 µg/L. Entretanto, por se tratar de uma quantificação visual, fatores como acuidade visual e experiência do analista podem interferir no resultado da análise. Assim, foi utilizado LQ de 0,02 µg/L, que coincide com o método original descrito pelo IDF/IUPAC/IAEA<sup>10</sup>. Com o LQ de 0,02 µg/L, a recuperação média foi de 85,16% e o DPR foi de 6,93%, valores dentro do limite de aceitabilidade do CE<sup>3</sup>.

Para CCD visual, este valor de 0,02 µg/L pode ser considerado baixo, quando comparado com dados da literatura. Entretanto, Tuinstra e Brongest<sup>22</sup>, utilizando CCD bidimensional modificado, obtiveram LD de, em média 0,02 µg/L, atingindo até 0,004 µg/L, dependendo da quantidade de toxina aplicada na placa. Na otimização do método CI/CCD conduzido neste trabalho, foi realizada uma modificação na quantidade da amostra aplicada na placa de CCD, aumentando o volume do mesmo. Observou-se também que neste método, quando comparado com outros que utilizam CI<sup>11,21</sup>, passa-se um volume maior de leite pela coluna. A maioria dos métodos preconiza volumes, em média, de 50 mL.

Segundo Shepherd et al.<sup>17</sup>, o LD depende principalmente do volume de leite passado pela coluna de imunoafinidade. Um

volume maior do que 1000 mL de leite pode ser utilizado, resultando em LD extremamente baixo, podendo atingir níveis abaixo de 50 pg/L (50 ppq) por CLAE<sup>11</sup>. Segundo estes autores, a utilização de coluna de imunoafinidade resulta em excelentes resultados de recuperação, sensibilidade e fácil operacionalidade. Sua efetividade foi demonstrada em análises com material de referência certificado BCR (Community Bureau of Reference) contaminados naturalmente com AFM<sub>1</sub>.

Pelo método da AOAC/CCD, a recuperação média variou

**Tabela 1.** Avaliação da recuperação (exatidão) da AFM<sub>1</sub>

Método	Concentração (µg/L)	Média Recuperação (µg/L)	Recuperação média (%)	Aceitabilidade
CI/CCD	0,01	0,0086	85,83	satisfatório*
	0,02	0,0170	85,16	satisfatório
	0,03	0,0257	85,80	satisfatório
	0,05	0,0404	80,83	satisfatório
	0,30	0,2800	80,00	satisfatório
	0,50	0,3693	73,86	satisfatório
AOAC/CCD	0,20	0,1350	67,40	satisfatório*
	0,30	0,2690	79,70	satisfatório
	0,50	0,4260	85,16	satisfatório

\* Não aplicado

CI - Coluna de Imunoafinidade

CCD - Cromatografia em Camada Delgada

**Tabela 2.** Avaliação da Repetitividade (precisão) da AFM<sub>1</sub>

Método	Concentração (µg/L)	DPR ** (%)	Aceitabilidade
CI/CCD	0,01	7,73	satisfatório*
	0,02	6,93	satisfatório
	0,03	6,00	satisfatório
	0,05	6,03	satisfatório
	0,30	4,44	satisfatório
	0,50	2,08	satisfatório
AOAC/CCD	0,20	6,15	satisfatório*
	0,30	7,30	satisfatório
	0,50	8,09	satisfatório

\* Não aplicado

\*\* DPR – Desvio Padrão Relativo

**Tabela 3.** Avaliação dos Limites de detecção e quantificação da AFM<sub>1</sub>

Parâmetro	Método	µg/L	Aceitabilidade
LD	CI/CCD	0,01	satisfatório*
	AOAC/CCD	0,20	satisfatório
LQ	CI/CCD	0,02	satisfatório
	AOAC/CCD	0,30	satisfatório

\* Não aplicado

de 67,40% a 85,16% para os níveis de 0,2 a 0,5 µg/L, respectivamente. O limite de detecção estabelecido foi de 0,2 µg/L, com recuperação de 67,40% e DPR de 6,15%. O limite de quantificação foi estabelecido em 0,3 µg/L, com recuperação 79,70% e DPR de 7,30%. Apesar de atender ao CE, foi utilizado 0,2 µg/L como LD, pois a placa apresentou interferentes dificultando a visualização. Stubblefield et al.<sup>18</sup>, estabeleceram um LD de 0,1 µg/L, valor este não obtido neste estudo, possivelmente devido ao menor volume de amostra aplicada na placa de CCD, que resultou numa melhor separação dos componentes da amostra, tendo em contrapartida, a perda de sensibilidade (Tabelas 1, 2 e 3)

A Figura 1 mostra os dados e a curva de calibração de AFM<sub>1</sub> obtidos por CLAE. O coeficiente de correlação foi de 0,99987, valor satisfatório para análise de micotoxinas. Testes

de recuperação apresentaram resultados de 86,1%, 83,7% e 84,5% nas concentrações de 0,01; 0,02 e 0,05 µg/L, respectivamente, por ocasião da análise das amostras. Este método é utilizado como rotina no Instituto Adolfo Lutz, tendo como LQ=0,01µg/L, pré-determinado por Navas<sup>12</sup>.

Um cromatograma de padrão de AFM<sub>1</sub> de 0,06ng/20µL está apresentado na Figura 2. A Figura 3 apresenta um cromatograma de amostra de leite naturalmente contaminado com AFM<sub>1</sub> a 0,03µg/L.

Algumas amostras analisadas por CI/CCD foram submetidas a análise por CLAE, com o objetivo de comparar a duas técnicas e avaliar a eficiência da CCD para determinação de AFM<sub>1</sub> em baixas concentrações, conforme mostra a Tabela 4.

O tratamento estatístico utilizado para comparar as duas técnicas (CCD e CLAE) foi o teste “t” de Student, pareado,

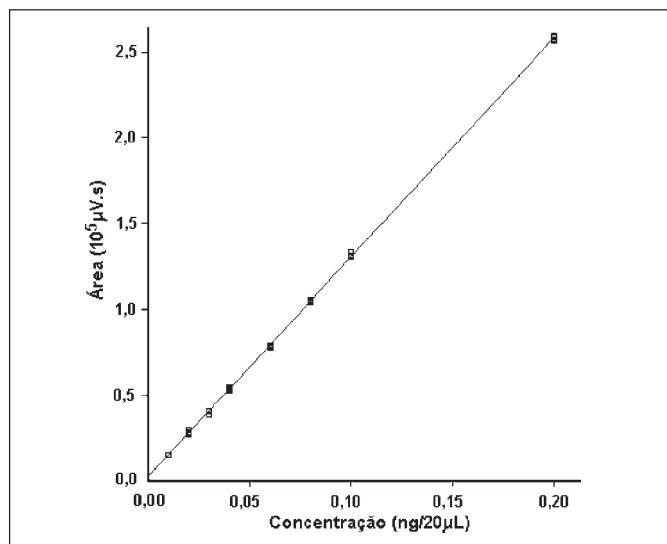


Figura 1. Curva de calibração de AFM<sub>1</sub>.

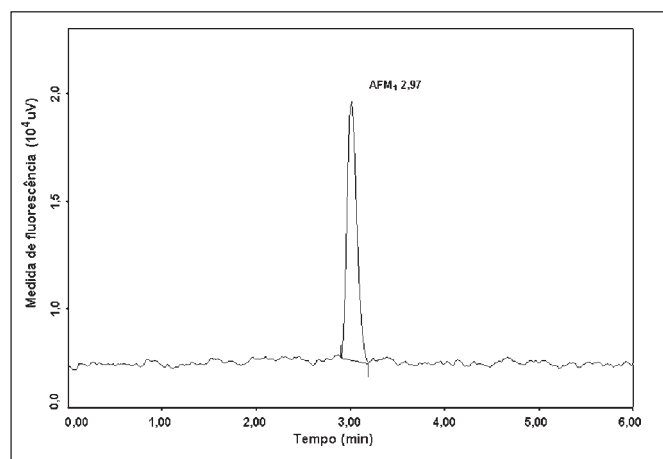


Figura 2. Cromatograma de padrão de AFM<sub>1</sub> de 0,06ng/20µL.

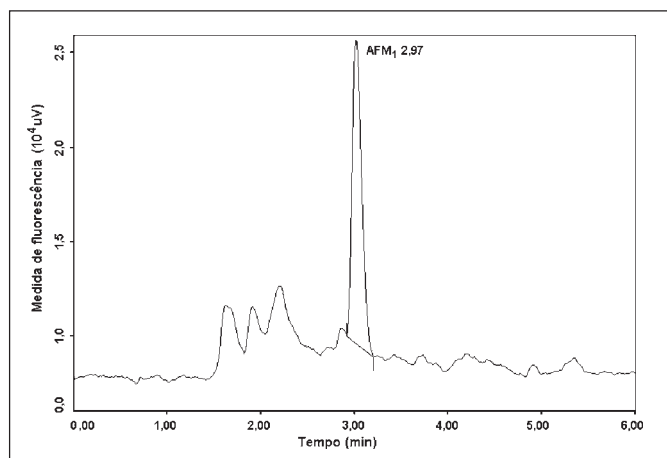


Figura 3. Cromatograma de amostra de leite naturalmente contaminado com 0,03 µg/L de AFM<sub>1</sub>.

Tabela 4. Resultados de análises de leite por CI/CCD e CI/CLAE\*.

Amostra	CCD (µg/L)	CLAE (µg/L)
1	0,012	0,014
2	0,035	0,034
3	0,014	0,013
4	0,030	0,031
5	0,146	0,136
6	0,051	0,056
7	0,234	0,231
8	0,263	0,278
9	0,077	0,073
10	0,085	0,092

\* p=0,6059

utilizando software Bioestat 3.0, obtendo-se um valor de  $p=0,6059$  ( $t_{\text{calculado}}=-0,5345$ ;  $t_{\text{tabelado}}=2,2622$ ;  $\alpha=0,05$ ) considerado como não significativo, ou seja, não houve diferença significativa entre os dois métodos.

O método empregado para determinação da AFM<sub>1</sub> por coluna de imunoafinidade mostrou-se específico, conforme descrito por vários autores<sup>4,9,16,20</sup>. O extrato da amostra apresentou-se límpido e quando aplicado em cromatografia em camada delgada, foi visualizada somente uma mancha correspondente à AFM<sub>1</sub>, sem nenhum outro interferente (Figura 5).

Pelo método da AOAC<sup>2</sup>, o extrato apresentou-se sujo na maioria das vezes e, quando aplicado em camada delgada, observou-se manchas com caudas e interferentes, destacando uma substância fluorescente verde azulada próxima ao R<sub>f</sub> da AFM<sub>1</sub> (Figura 4). Algumas vezes foi necessário utilizar uma segunda fase móvel (éter etílico:metanol:água, 95:4:1, v/v) para melhorar a separação e, em alguns casos, recorrer a cromatografia bidimensional. Sylos et al.<sup>19</sup>, em um estudo comparativo para determinação de aflatoxina M<sub>1</sub> apresentaram resultados semelhantes.

Apesar do avanço tecnológico e o advento de equipamentos sofisticados, este trabalho mostrou que a CCD é uma importante ferramenta que pode ser utilizada pelos laboratórios em análises rotineiras e de ocorrência de AFM<sub>1</sub>. O método CI/CCD mostrou-se específico, sensível e preciso, mesmo em baixas concentrações. Apresentou boas recuperações e fácil operacionalidade, não necessitando de equipamentos de alto custo, atendendo às legislações de diferentes países e, em

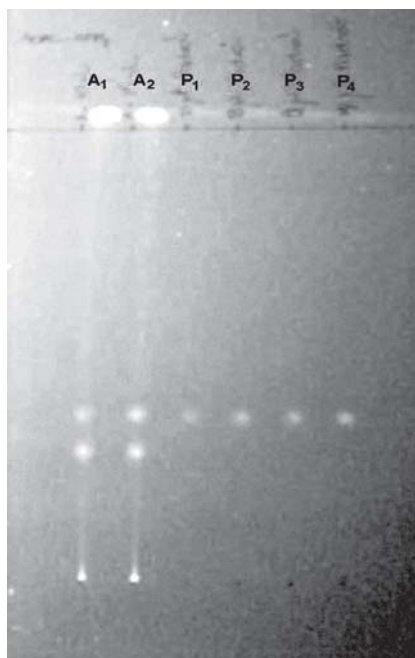
alguns casos, identificando resultados falso positivo de métodos instrumentais. A AOAC/IUPAC incentiva a validação de métodos analíticos para micotoxinas por CCD, principalmente nos países em desenvolvimento.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a José Guilherme P. Andrade (AM Brasil Científica) pela doação das colunas de imunoafinidade para análise de AFM<sub>1</sub> da marca R-Biopharm Rhône Ltd.

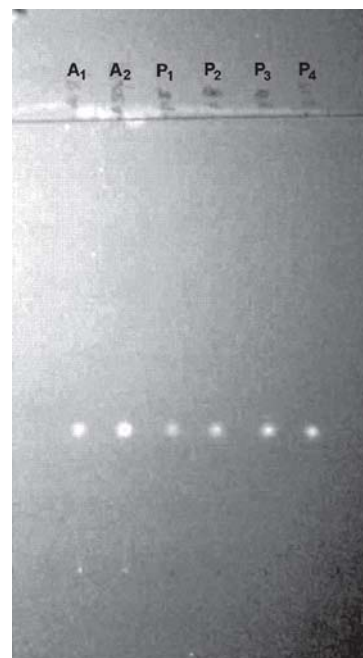
## REFERÊNCIAS

1. Allcroft, L. et al. Metabolism of aflatoxin in sheep: Excretion of the 'milk toxin'. **Nature**, 209: 154-5, 1966.
2. AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of AOAC**. 12th edition, Washington DC, 1975, chapter 26.
3. CE - European Committee - **Comission Directive 98/53/EC**. Laying down the sampling methods and the methods of analysis for the official control of the levels for certain contaminants in foodstuffs, annex II, JOL 201, 17, july, 1998, p.93-101.
4. Chu, F.S. Immunoassay for analysis of mycotoxins. **J. Food Prot.**, 47:562-9, 1984.
5. Cullen, J.M.; Ruebner, B.H.; Hsieh, D.S.P. Comparative hepatocarcinogenicity of aflatoxins B<sub>1</sub> and M<sub>1</sub> in the rat. **Food Chem. Toxicol.**, 22:1027-8, 1985.
6. Cullen, J.M. et al. Carcinogenicity of dietary aflatoxin M<sub>1</sub> in male Fischer rats compared to aflatoxin B<sub>1</sub>. **Cancer Res.**, 47:1913-17, 1987.
7. De Jongh, H.; Vles, R.O.; van Pelt, J.G. Milk of mammals fed an aflatoxin-containing diet. **Nature**, 202:466, 1964.



**Figura 4.** Placa CCD de amostras de leite e padrões de AFM<sub>1</sub>, pelo método AOAC/CCD

Legenda: A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>: Amostras de leite; P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> e P<sub>4</sub>: Padrões de AFM<sub>1</sub>



**Figura 5.** Placa CCD de amostras de leite e padrões de AFM<sub>1</sub>, pelo método CI/CCD



8. Dragacci, S.; Grosso, F.; Gilbert, J. Immunoaffinity Column Cleanup with Liquid Chromatography for Determination of Aflatoxin M<sub>1</sub> in Liquid Milk: Collaborative Study. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 84:2, 2001.
9. Hansen, T.J. Affinity Column Cleanup and Direct Fluorescence Measurement of Aflatoxin M<sub>1</sub> in Raw Milk. **J. Food Protec.**, 53(1):75-7, 1990.
10. IDF/IUPAC/IAEA (International Dairy Federation/International Union of Pure Applied Chemistry/International Atomic Energy Agency). Determination of the content of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk by immunoaffinity clean-up followed by thin layer chromatography. Validation of an IAC-TLC method for AFM<sub>1</sub>, may, 2001.(não publicado)
11. Mortimer, D.N.; Gilbert, J.; Shepherd, M.J. Rapid and highly sensitive analysis of aflatoxin M<sub>1</sub> in liquid and powdered milks using an affinity column cleanup. **J. Chromatogr.**, 407:393-7, 1987.
12. Navas, S.A. **Possível exposição de crianças as aflatoxinas M<sub>1</sub> e ocratoxina A através do leite materno, na cidade de São Paulo**, 2003. 79p. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade de Campinas.]
13. Pong, R.S.; Wogan, G.N. Toxicity and biochemical and fine structural effects of synthetic aflatoxin M<sub>1</sub> and B<sub>1</sub> in rat liver. **J. Natl. Cancer Inst.**, 47:585-90, 1971.
14. Scott, P.M. Methods for determination of AFM<sub>1</sub> in milk and milk products and milk products – a review of performance characteristics. **Food Addit. Contam.**, 6:283-305, 1989.
15. Scott, P.M. Natural Toxins. In **Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists**. 16th edition, Maryland, 1997, v. II.
16. Scott, P.M.; Trucksess, M.W. Application of Immunoaffinity Columns to Mycotoxin Analysis. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 80(5):941-9, 1997.
17. Shepherd, M.J.; Holmes, M.; Gilbert, J. Comparison and critical evaluation of six published extraction and clean-up procedures for Aflatoxin M<sub>1</sub>. **J. Chromatogr.**, 354:305-15, 1986.
18. Stubblefield, R.D.; Shotwell, O.D.; - Reverse phase analytical and preparative high liquid chromatography aflatoxins. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 60:784-90, 1977.
19. Sylos, C.M.; Rodriguez-Amaya, D.B.; Carvalho, P.R.N. Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and dairy products commercialized in Campinas, Brazil. **Food Addit. Contam.**, 13(2):169-72, 1996.
20. Trucksess, M.W.; Rapid analysis (Thin Layer Chromatographic and Immunochemical Methods) for Mycotoxins in Foods and Feeds. In: De Koe, W.J.; Samson, R.A.; van Egmond, H.P.; Gilbert, J.; Sabino, M. ed. **Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millenium**, Wageningen, The Netherlands, 2001, p.29-40.
21. Tuinstra, L.G.M.; Roos, A.H.; van Trijp, J.M.P. Liquid Chromatographic Determination of Aflatoxin M<sub>1</sub> in Milk Powder Using Immunoaffinity Columns for Cleanup: Interlaboratory Study. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 76(6):1248-54, 1993.
22. Tuinstra, L.M.G.; Brongeeest, J.M. Determination of aflatoxin M<sub>1</sub> in the milk at the parts per trillion level. **J. Chromatogr.**, 111:448-51, 1975.
23. Wogan, G.N.; Paglialunga, S. Carcinogenicity of synthetic aflatoxin M<sub>1</sub> in rats. **Food. Cosmet. Toxicol.**, Oxford, 12:38-4, 1974.