

SEPERAÇÃO E DETERMINAÇÃO DAS AFLATOXINAS M₁ E M₂ EM AMOSTRAS DE LEITE DE VACA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUÇÃO *

Myrna SABINO **
Adhemar PURCHIO ***
Maria Ângela P. ZORZETTO **

RIALA6/578

SABINO, M.; PURCHIO, A. & ZORZETTO, M.A.P. — Separação e determinação das aflatoxinas M₁ e M₂ em amostras de leite de vaca por cromatografia líquida de alta resolução. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):87-99, 1984.

RESUMO: Aflatoxinas B₁, M₁ e M₂ foram completamente separadas por cromatografia líquida de alta resolução em coluna de fase reversa (C18), tendo como fase móvel acetonitrila — água (35 + 65%) a um fluxo de 2,0 ml/min. Os compostos foram detectados por absorção no ultravioleta a 350 nm. Os picos e tempo de retenção tiveram boa reprodutibilidade. A recuperação de aflatoxina M₁ foi de 87,5% e a de M₂ foi de 102%. Os limites de detecção para aflatoxina M₁ e M₂ foram 0,2 ppb e 0,1 ppb respectivamente.

DESCRITORES: aflatoxinas M₁ e M₂ em leite de vaca, determinação; leite de vaca, determinação de aflatoxinas M₁ e M₂; cromatografia líquida de alta resolução.

INTRODUÇÃO

A aflatoxina M₁ é um metabolito tóxico encontrado no leite de vacas que consomem rações contaminadas por aflatoxina B₁. Métodos analíticos para determinação desta substância começaram a surgir no decorrer dos anos, de maneira gradual, mas apresentando técnicas de baixa reprodutibilidade.

Em 1973 PONS *et alii*¹³ reportaram um método para determinação quantitativa de aflatoxina M₁ em leite e seus derivados. STUBBLEFIELD & SHANNON²⁰ adaptaram este método para todos os produtos lácteos e o empregaram, em estudo colaborativo internacional para a "Association of Official Analytical Chemists. Este método foi adotado como oficial por esta entidade¹ e é extensivamente utilizado por analistas dos Estados Unidos.

No outono de 1977, no sudeste dos Estados Unidos, ocorreu uma alta incidência de aflatoxina B₁ em milho e, conseqüentemente, foi detectada a presença de altos níveis de aflatoxina M₁ no leite de vaca da região¹⁹. Este fato fez com que a "Food and Drug Administration" estabelecesse o limite de tolerância de 0,5 ppb de aflatoxina M₁ em leite de vaca.

Com o objetivo de obter métodos mais rápidos e sensíveis, diversos trabalhos foram realizados^{7, 18, 25}. O número de métodos para determinação de aflatoxina M₁ na literatura é abundante e em todos é utilizada a cromatografia em camada delgada^{1, 11, 15, 16, 18, 25}. A quantificação de aflatoxinas é estimada após separação das mesmas por cromatografia em camada delgada e a intensidade de fluorescência da mancha da aflatoxina M₁ extraída do leite de vaca é comparada com a de uma solução-padrão^{1, 8}.

* Realizado na Seção de Química Biológica do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

*** Do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, SP.

Outros métodos, como densitometria^{1, 8} ou espectrofotometria de fluorescência⁴ foram utilizados por alguns autores; esta última metodologia é, freqüentemente, prejudicada por materiais fluorescentes interferentes, que alteram a avaliação da aflatoxina M₁.

Cromatografia em camada delgada bidimensional tem sido empregada para identificação de baixos níveis de aflatoxina M₁, após tratamento com ácido trifluoracético^{23, 26}.

Pesquisas indicam que a concentração de aflatoxinas nos tecidos animais, e nos produtos derivados de animais que consumiram rações contaminadas é geralmente baixa (na ordem de ng/g). Entretanto, para o ser humano, nenhum nível ainda foi estabelecido⁵.

Existem métodos para determinação de aflatoxinas em tecidos e produtos animais baseados na extração destas com acetona aquosa^{13, 24}, ou metanol³, purificação do extrato por cromatografia em coluna (sílica gel ou alumina)⁸ e quantificação por cromatografia em camada delgada, geralmente bidimensional. Estes métodos, no entanto, são freqüentemente limitados pela baixa sensibilidade que apresentam.

Com o advento da cromatografia líquida de alta resolução (CLAR), esta técnica está ganhando espaço como análise instrumental. Esta ocorrência veio solucionar diversos problemas analíticos, resultando em maior velocidade de análise, maior resolução, maior sensibilidade.

Cromatografia líquida de alta resolução, em fase normal, tem sido desenvolvida¹⁷ e adaptada para determinação de aflatoxinas em vários produtos agrícolas^{12, 14}. A sensibilidade de detecção tem aumentado com o uso de fluorescência^{10, 12}, em colunas de fase reversa^{2, 27}.

Alguns autores destacam as vantagens da técnica de CLAR para aflatoxinas M₁ e M₂^{6, 21, 22, 27, 28}.

É conveniente ressaltar que, nos trabalhos encontrados na literatura para detecção de aflatoxina M₂, por CLAR, é utilizado detector de fluorescência^{2, 6, 22}. Apenas STUBBLEFIELD *et alii*²¹ estabeleceram uma técnica utilizando CLAR em fase reversa para determinar 6 aflatoxinas, onde 5 delas M₂, M₁, G₂, G₁ e B₁ foram completamente separadas, e uma aflatoxina, a B₂, foi satisfatoriamente resolvida em coluna C18. Os compostos foram detectados pela absorção na região do U.V., a 350 nm.

Pela ausência de trabalhos relativos à metodologia de CLAR, em nosso meio, propusemo-nos a realizar a padronização desta técnica, com vistas à detecção e quantificação das aflatoxinas M₁ e M₂ em leite de vaca naturalmente contaminado e em leite de vaca artificialmente contaminado.

MATERIAL E MÉTODO

Material

Foram utilizadas 10 amostras de leite cru, pasteurizado, isento de aflatoxinas.

Solventes

Metanol, acetonitrila (Lichrosolv), filtrados em membrana "Millipore", com porosidade de 1,0 μ (47 mm de diâmetro), ref. FALP 04700

Água desmineralizada e destilada, filtrada em filtro "Millipore", em membrana filtrante de 0,8 μ de poro (47 mm de diâmetro), ref. AAWP 04700.

Solução-padrão

Aflatoxina B₁, M₁, M₂ em benzeno — acetonitrila (98+2)

Fase móvel

Acetonitrila — água (35+65%), para produzir eluição e separação das aflatoxinas

Aparelho

Cromatógrafo automático líquido de alta resolução marca Hewlett Packard, com injetor automático (variável), mod. 1084 A, com sistema de gradiente, acoplado com detector variável, U.V.-visível-H.P., mod. 1030 B, com programador modelo 79850 A-LC, terminal HP, com frasco de 2 ml (HP)

Coluna

Lichrosorb RP 18-10 μ m, Hybar Ser-tigsaulle (Merck)

Método

O método básico para análise, bem como para determinar a concentração e pureza dos padrões das aflatoxinas M₁ e M₂ foi o descrito nas monografias da "Association of Official Analytical Chemists"¹.

Extração da toxina — Em um frasco Erlenmeyer de 500 ml foram colocados 75 ml de leite, que foi submetido ao seguinte tratamento: adição de 300 ml de metanol, agitação por 30 minutos; adição de 25 g de terra diatomácea, agitação por 30 minutos em agitador mecânico; filtração a vácuo em filtro contendo 1 cm de terra diatomácea; lavagem do Erlenmeyer e do filtrado com 75 ml de metanol; transferência do filtrado e do lavado para um funil de separação de 1.000 ml; adição de 225 ml de solução de cloreto de sódio a 4% e extração com 3 porções de 100 ml de hexano (agitação vigorosa para remover a gordura); descarte da fase

do hexano; extração com 3 porções de 100 ml de clorofórmio; centrifugação durante 10-15 minutos a 3.000 rpm, para quebrar a emulsão; mistura dos extratos clorofórmicos e lavagem com 300 ml de solução de cloreto de sódio a 4%; descarte da fase aquosa; evaporação do extrato clorofórmico em banho-maria até quase seca; transferência do resíduo quantitativamente com clorofórmio para um frasco de 4 ml; evaporação sob nitrogênio até resíduo. (Este resíduo foi guardado em geladeira até o momento de usar, sob proteção da luz.)

Cromatografia líquida de alta resolução — O resíduo obtido foi dissolvido e transferido para frasco do próprio aparelho com 2 ml de benzeno — acetonitrila (98+2). Esta solução foi injetada para identificar e quantificar as aflatoxinas. As aflatoxinas foram detectadas por absorção no U.V. a 350 nm, e quantificadas pela área dos picos obtidos comparada à área dos picos das soluções-padrão. Para calcular a concentração das aflatoxinas, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\frac{Ax \times Cs \times Vs \times SD}{As \times Vx \times W} = \mu\text{g/l de aflatoxi- na M}$$

Ax = área integrada da aflatoxina M_1 ou M_2 na amostra

Cs = concentração da aflatoxina M_1 ou M_2 padrão ($\mu\text{g/ml}$)

Vs = μl da solução-padrão injetados

SD = diluição final do extrato da amostra em μl

Vx = μl do extrato da amostra injetado

W = ml da amostra representada pelo volume do extrato utilizado para Cromatografia líquida de alta resolução

RESULTADOS

Com relação à CLAR, sob as condições descritas, conseguimos uma boa separação das aflatoxinas M_1 , M_2 e B_1 .

Várias tentativas foram feitas com sistemas de solventes de fase reversa. Inicialmente, tentamos um sistema de metanol-água, porém não conseguimos bons resultados. Quando testamos o sistema acetonitrila-água, observamos que a separação das aflatoxinas M e B_1 era melhor, mas o problema era a proporção de cada solvente. Estudos foram feitos e conseguimos bons resultados utilizando maior percentagem de água. O sistema acetonitrila-água (35 +

65%) foi o ideal. A primeira providência foi injetar soluções-padrão, separadamente, de cada uma das aflatoxinas para determinar o tempo de retenção (fig. 1, 2, 3)²⁰. Os tempos de retenção das toxinas foram excelentes e estão listados na tabela 1.

A separação das aflatoxinas B_1 , M_1 e M_2 padrão, demonstrada no gráfico (fig. 4), foi resolvida em 10 minutos com detector de absorção no U.V., a 350 nm.

Tanto a amostra como os padrões foram dissolvidos em benzeno — acetonitrila (98 + 2); o pico do solvente não interferiu no tempo de retenção de cada uma das aflatoxinas analisadas, como mostra a figura 5. Incluímos a aflatoxina B_1 , na hipótese de se poder utilizar esta metodologia em amostras que possam conter aflatoxina B_1 , além de M_1 .

Foi feito teste de recuperação de aflatoxina M_1 em leite isento de aflatoxinas, ao qual foi adicionada solução-padrão na concentração conhecida.

A recuperação da aflatoxina M_1 foi de 87,5% e está demonstrada na tabela 2 e fig. 6.

Os resultados de recuperação com vários níveis de aflatoxina M_2 estão na tabela 3. A recuperação de aflatoxina M_2 foi feita em uma amostra de leite pasteurizado, isento de aflatoxinas (fig. 7).

O limite de detecção do método é de 0,2 ppb de aflatoxina M_1 e 0,1 ppb de aflatoxina M_2 .

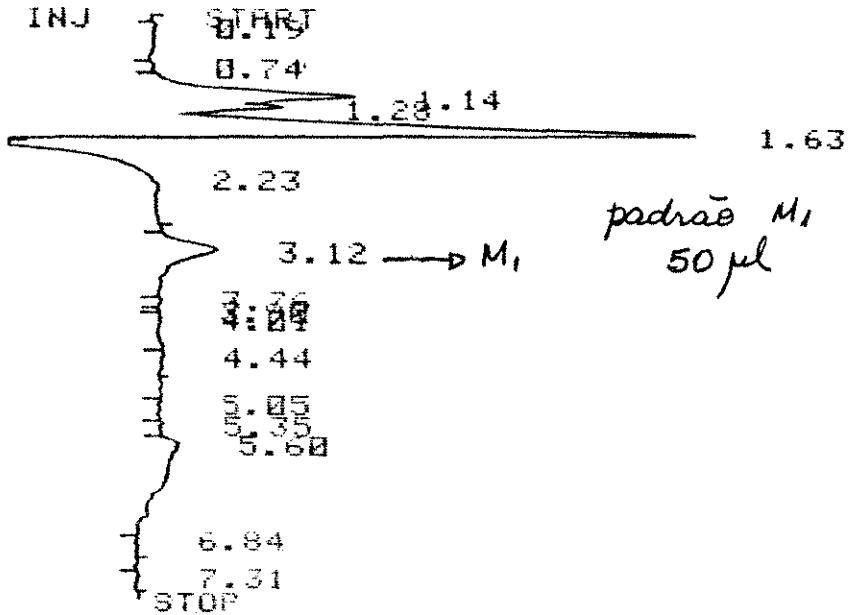
A precisão de resolução e quantificação por CLAR foi determinada por múltiplas injeções das soluções-padrão e extrato das amostras. O tempo de retenção e a área dos picos foram calculados por integração eletrônica.

CONCLUSÃO

Na literatura consultada, encontramos um único autor²¹ que descreve a utilização da absorção no U.V. com detector para aflatoxina M_1 ; os demais autores utilizam a fluorescência e afirmam ser esta mais sensível.

Não obtivemos problemas de interferência, pois outros picos existentes nas amostras não saem no mesmo tempo de retenção das aflatoxinas em estudo.

Muitos autores afirmam que a detecção por fluorescência é muito mais sensível do que por absorção no U.V.; talvez por isso não tenhamos encontrado trabalhos na literatura nos quais se utilizou este detector. Nossos resultados foram bons, reproduzíveis, porém não tão sensíveis como esperávamos.



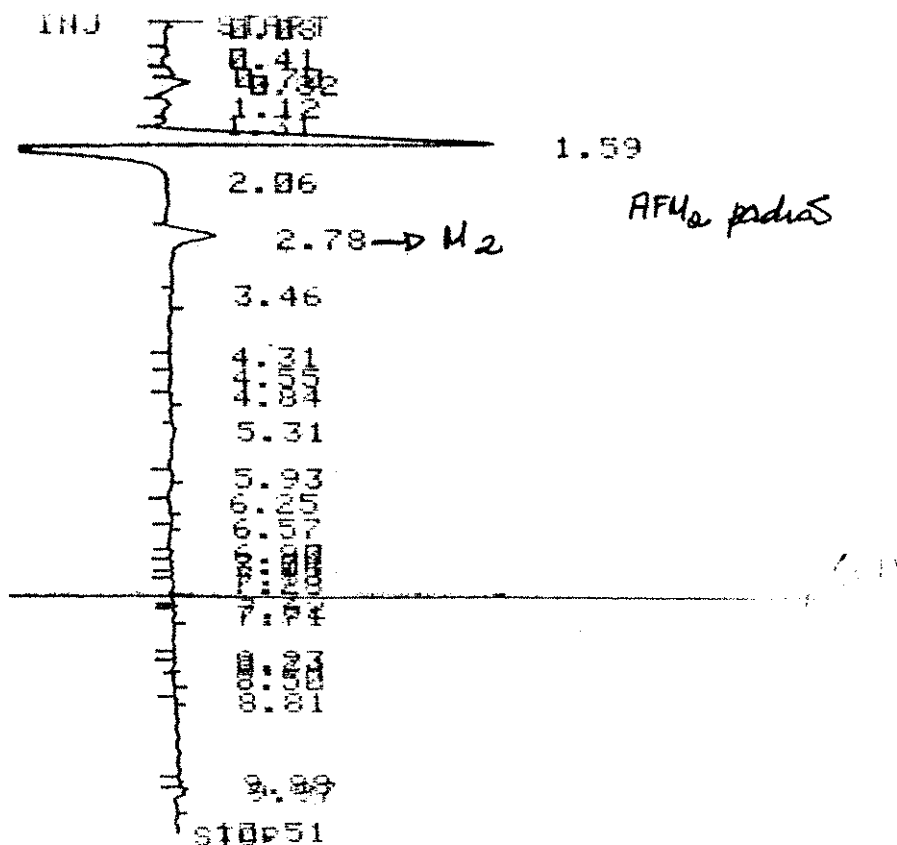
sp 1000H

AREA %

RT	AREA	AREA %
0.19	2164	5.561
0.74	1067	2.742
1.14	9810	25.229
1.28	3773	9.695
1.63	15780	40.499
2.23	2894	7.437
3.12	1377	3.538
5.68	2062	5.299

XF: 1.0000 E+ 0

FIGURA 1 — Tempo de retenção da aflatoxina M₁ padrão.



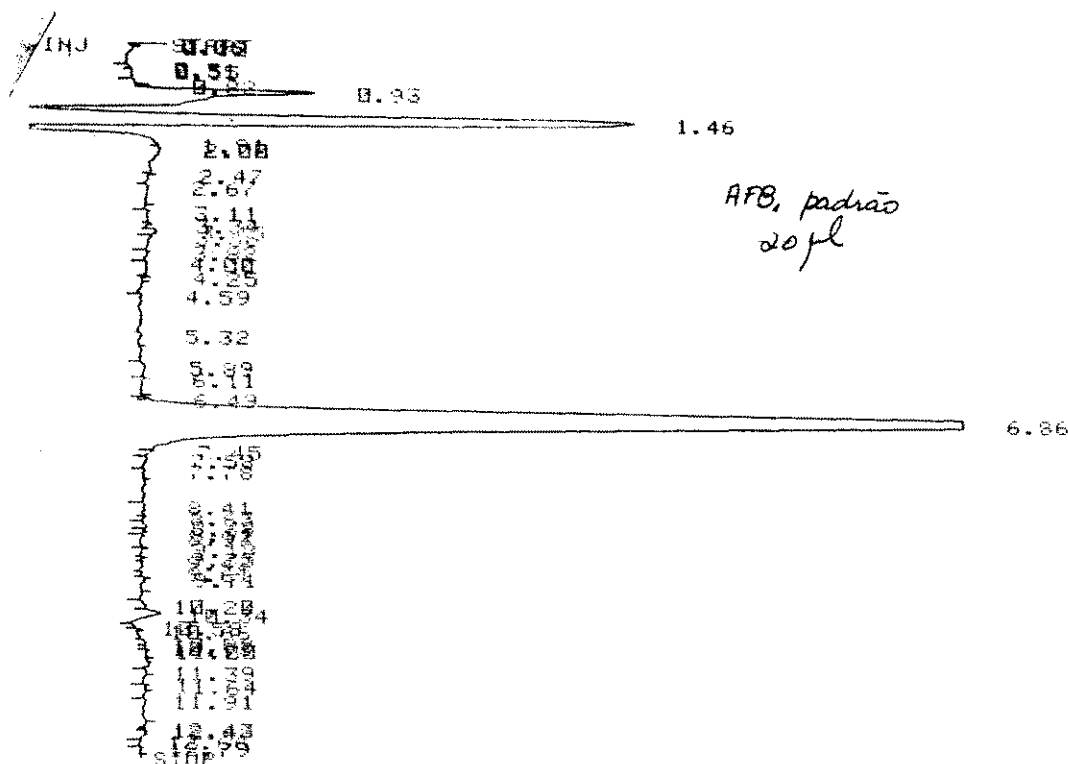
hp 1080A

AREA %

RT	AREA	AREA %
0.70	1000	3.032
0.82	2178	6.552
1.12	2720	8.182
1.31	2327	7.000
1.59	7998	24.059
2.06	12300	37.000
2.78	14712	14.174

XF: 1.0000 E+ 0

FIGURA 2 — Tempo de retenção da aflatoxina M₂ padrão.



hp 1000A

AREA %

RT	AREA	AREA %
0.12	1670	1.361
0.91	1211	0.987
0.55	2715	2.212
0.62	2982	2.364
0.93	15540	12.660
1.46	24498	19.951
1.91	11130	9.067
2.00	10250	8.350
2.47	4713	3.840
2.67	1264	1.030
6.86	46300	37.720
10.34	563	0.459

XF: 1.0000 E+ 0

FIGURA 3 — Tempo de retenção da aflatoxina B₁ padrão.

SABINO, M.; PURCHIO, A. & ZORZETTO, M.A.P. — Separação e determinação das aflatoxinas M_1 e M_2 em amostras de leite de vaca por cromatografia líquida de alta resolução. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):87-99, 1984.

TABELA 1

Tempo de retenção das aflatoxinas M_2 , M_1 e B_1

Aflatoxina	Tempo de retenção	
	(em minutos)	média (em minutos)
M_2	2 min 0,76 s 2 min 0,79 s 2 min 0,69 s 2 min 0,83 s 2 min 0,82 s 2 min 0,72 s 2 min 0,79 s 2 min 0,92 s 2 min 0,78 s 2 min 0,79 s 2 min 0,87 s	2 min 0,79 s
M_1	3 min 0,27 s 3 min 0,38 s 3 min 0,26 s 3 min 0,16 s 3 min 0,10 s 3 min 0,16 s 3 min 0,16 s 3 min 0,09 s 3 min 0,12 s 3 min 0,32 s 3 min 0,30 s 3 min 0,22 s 3 min 0,25 s 3 min 0,30 s	3 min 0,22 s
B_1	6 min 0,78 s 6 min 0,76 s 6 min 0,83 s 6 min 0,86 s 6 min 0,81 s 6 min 0,59 s	6 min 0,77 s

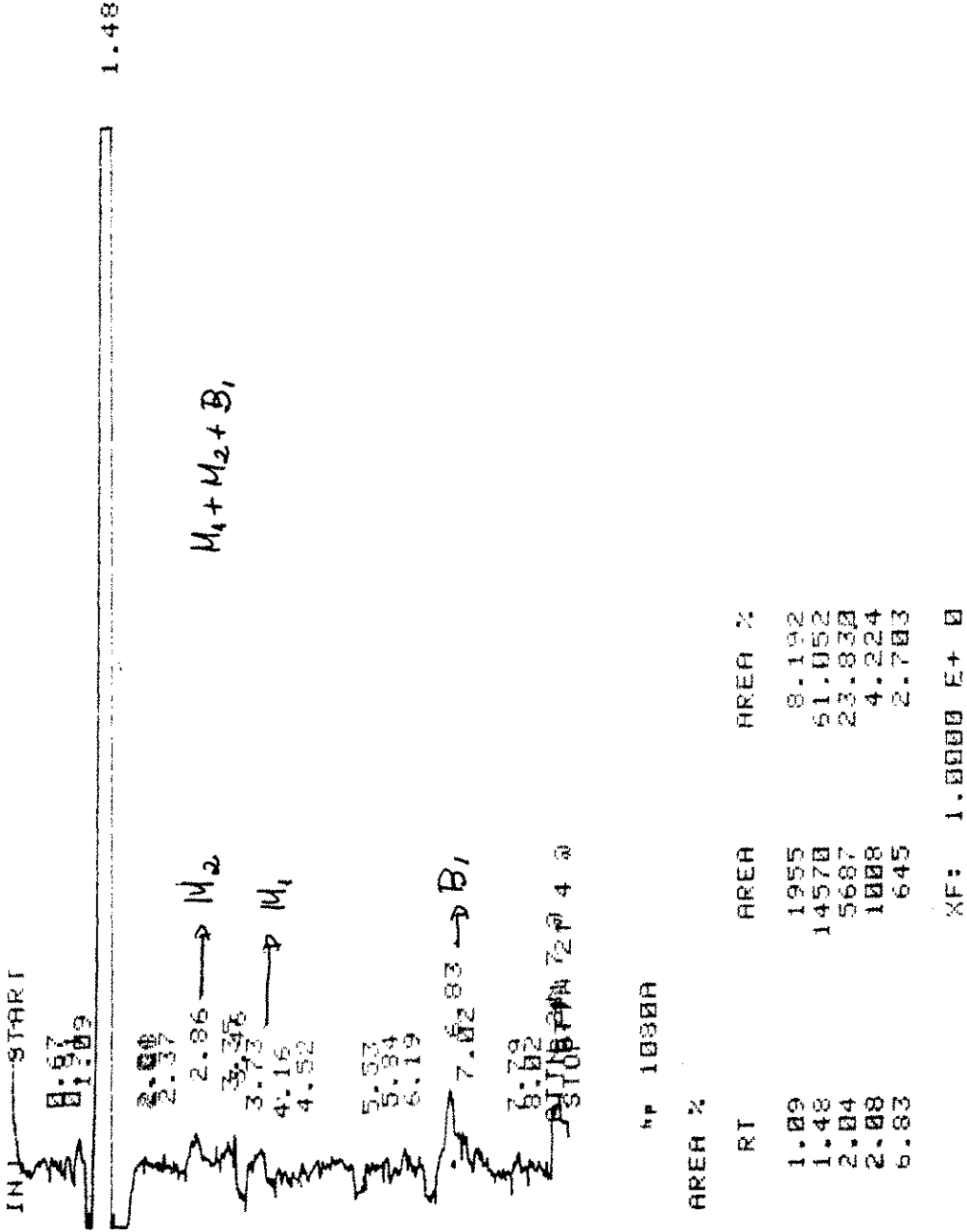


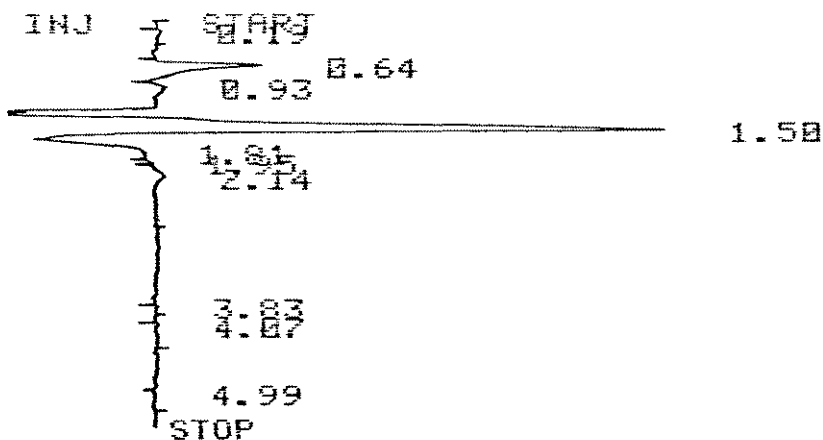
FIGURA 4 — Separação das aflatoxinas M₁, M₂ e B₁, por cromatografia líquida de alta resolução.


```

FLOW          2.00      2.01
%B            35.0      34.7
COLUMN P      109
MAX P         400
MIN P         0
S-TEMP A      30        30
S-TEMP B      25        29
OVEN TEMP     35        35
EXT SGHL
    
```

```

CHT SPD       1.00
ATTN 2†       4
ZERO          10.0
SLP SENS      0.05
AREA REJ      1000
OPTN          1
    
```



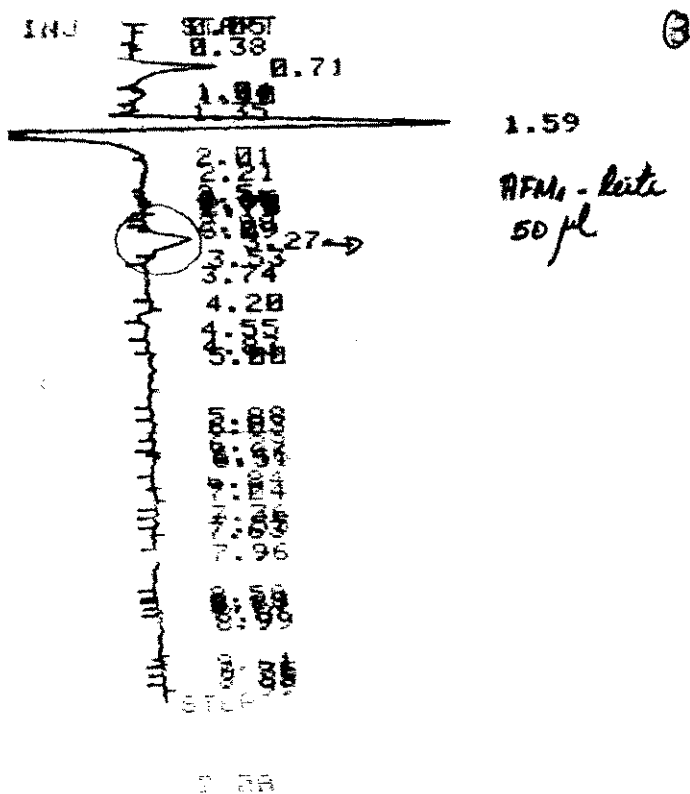
sp 1000A

AREA %

RT	AREA	AREA %
0.64	2578	10.845
0.93	6083	25.589
1.50	10070	45.726
1.81	1647	6.928
1.95	1022	4.299
2.14	1572	6.613

XF: 1.0000 E+ 0

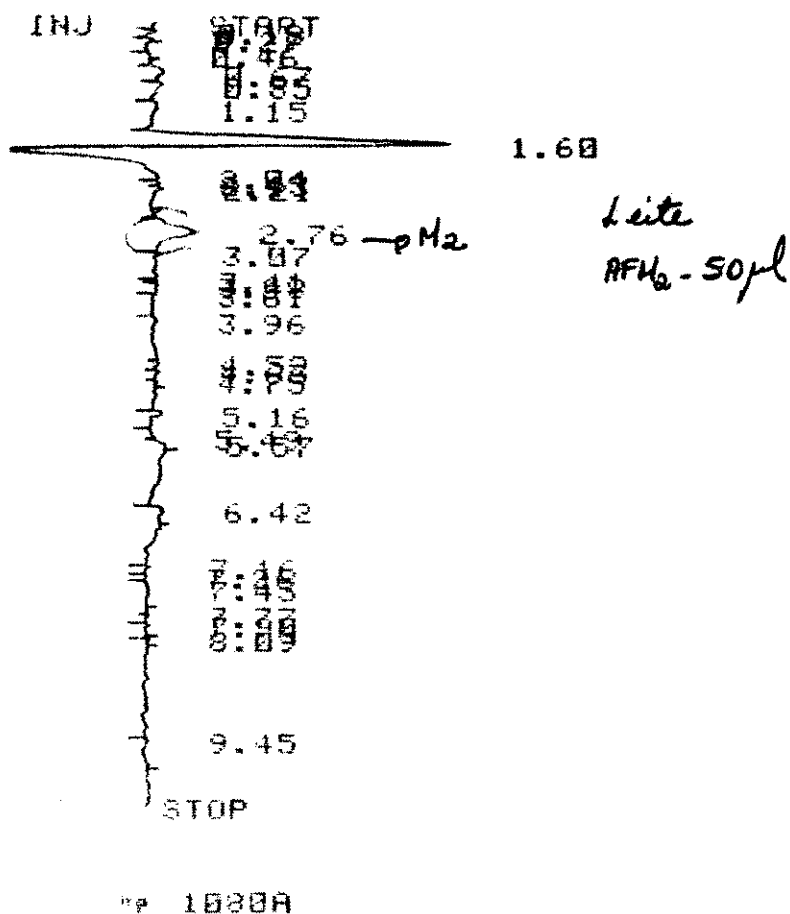
FIGURA 5 — Cromatograma do solvente benzeno-acetonitrila.



AREA %

RT	AREA	AREA %
0.05	15	0.042
0.38	20	0.056
0.71	3329	9.366
1.04	490	1.379
1.10	2923	8.224
1.35	2467	6.941
1.59	9690	27.826
2.01	6343	17.846
2.21	5829	16.400
2.56	340	0.957
2.65	269	0.757
2.70	203	0.571
2.75	135	0.380
2.98	19	0.053
3.00	28	0.079
3.27	1209	3.402
3.53	117	0.329
3.74	76	0.214
4.20	79	0.222

FIGURA 6 — Recuperação de aflatoxina M₁ adicionada ao leite cru, isento de aflatoxinas, por cromatografia líquida de alta resolução.



PT	AREA	AREA %
0.85	1362	7.601
1.15	3918	21.866
1.60	6826	38.096
2.04	3592	20.047
2.13	594	3.315
2.21	884	4.934
2.76	742	4.141

MF: 1.0000 E+ 0

FIGURA 7 — Recuperação de aflatoxina M₂ em amostra de leite de vaca, isento de aflatoxinas, por cromatografia líquida de alta resolução.

SABINO, M.; PURCHIO, A. & ZORZETTO, M.A.P. — Separação e determinação das aflatoxinas M_1 e M_2 em amostras de leite de vaca por cromatografia líquida de alta resolução. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):87-99, 1984.

TABELA 2

Recuperação da aflatoxina M_1 adicionada ao leite cru isento de aflatoxinas (0,22 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$)

Aflatoxina M_1		
Amostra n.º	Recuperação	
	($\mu\text{g}/100 \text{ ml}$)	%
1	0,19	86,36
2	0,18	81,80
3	0,21	95,40
Média	0,1933	87,85

TABELA 3

*Recuperação da aflatoxina M_2 adicionada, em várias concentrações, a leite pasteurizado isento de aflatoxinas**

Aflatoxina M_2		
Adicionada $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$	Recuperação	
	$\mu\text{g}/100$	%
0,01	0,0101	101
0,02	0,0216	108
0,02	0,0194	97
0,04	0,0380	95
0,04	0,0430	109

* Análise feita anteriormente por cromatografia em camada delgada, método da A.O.A.C.¹.

RIALA6/578

SABINO, M.; PURCHIO, A. & ZORZETTO, M.A.P. — Separation and determination of aflatoxins M_1 and M_2 in samples of cow milk by high-performance liquid chromatography. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):87-99, 1984.

ABSTRACT: Aflatoxins M_1 , M_2 , and B_1 were completely separated by high-performance liquid chromatography in reversed-phase C-18 columns by using acetonitrile-water (35% + 65%) as eluting solvent and a flow rate of 2.0 ml/minute. Compounds were detected by ultraviolet absorbance at 350 nm. Peak height and retention time were reproducible. M_1 was determined at levels of 0.2 ppb or higher and M_2 at 0.1 ppb or higher. Recovery of 87.5% was found for M_1 and of 102% for M_2 .

DESCRIPTORS: aflatoxins M_1 and M_2 in cow milk, determination; cow milk, determination of aflatoxin M_1 and M_2 ; high-performance liquid chromatography.

SABINO, M.; PURCHIO, A. & ZORZETTO, M.A.P. — Separação e determinação das aflatoxinas M_1 e M_2 em amostras de leite de vaca por cromatografia líquida de alta resolução. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):87-99, 1984.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS — *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 12nd ed. Washington, D.C., A.C.A.C., 1975. p. 476. [itens 26083-26087]
2. BEEBE, R.M. & TAKAHASHI, D.M. — Determination of aflatoxin M_1 by high pressure liquid chromatography using fluorescence detection. *J. agric. Food Chem.*, 28:481-2, 1980.
3. BROWN, N.L.; NESHEIM, S.; STACK, M.E. & WARE, G.M. — Method for the determination of aflatoxin in animal tissue. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 56:1437-9, 1973.
4. FUKAYAMA, M.; WINTERLIN, W. & HSIEH, D.P.H. — Rapid method for analysis of aflatoxin M_1 in dairy products. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 63:927-30, 1980.
5. GREGORY, J.F. & MANLEY, D. — High performance liquid chromatographic determination of aflatoxins in animal tissues and products. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 64:144-51, 1981.
6. HUNT, D.C.; BOURDON, A.T.; WILD, P.J. & CROSBY, N.T. — Use of high performance liquid chromatography combined with fluorescence detection for the identification and estimation of aflatoxins and ochratoxin in food. *J. Sci. Food Agric.*, 29:234-8, 1978.
7. KIERMEIER, F. — Aflatoxin residues in fluid milk. *Pure appl. Chem.*, 35:271-3, 1973.
8. MASRI, M.S. — Estimation partition and column chromatographic separation of aflatoxin B_1 and M_1 . *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 47:61-4, 1970.
9. MITCHELL, D.J.; SOMERS, E.; CAMPBELL, A.D. & SALWIN, H. — Report of Subcommittee C on Recommendations for Official Methods. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 57:431, 1974.
10. PANALAKS, T. & SCOTT, P.M. — Sensitive silica gel-packed flowcell for fluorometric detection of aflatoxins by high pressure liquid chromatography. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 60:583-9, 1977.
11. PATTERSON D.S.P.; GLANCY, E.M. & ROBERTS, B.A. — The estimation of aflatoxin M_1 in milk using a two-dimensional thin-layer chromatographic method suitable for survey work. *Food Cosmet. Toxicol.*, 16:49-50, 1978.
12. PONS, W.A., Jr. — High pressure liquid chromatographic determination of aflatoxins in corn. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 62:586-94, 1979.
13. PONS, W.A., Jr.; CUCULLU, A.F. & LEE, L.S. — Method for the determination of aflatoxin M_1 in fluid milk and milk products. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 56:1431-6, 1973.
14. PONS, W.A., Jr. & FRANZ, A.O., Jr. — High performance liquid chromatography of aflatoxins in cottonseed products. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 60:89-95, 1977.
15. PURCHASE, I.F.H. & STEYN, M. — Estimation of aflatoxin M_1 in milk. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 50:363-6, 1967.
16. ROBERTS, B.A. & ALLCROFT, R. — A note on the semi-quantitative estimation of aflatoxin M_1 in liquid milk by thin-layer chromatography. *Food Cosmet. Toxicol.*, 6:339, 1968.
17. SEIBER, J.N. & HSIEH, D.P.H. — Application of high-speed liquid chromatography to the analysis of aflatoxins. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 56:827-30, 1973.
18. SCHULLER, P.L.; VERHULSDONK, C.A.H. & PAULSCH, W.E. — Analysis of aflatoxin M_1 in liquid and powdered milk. *Pure appl. Chem.*, 35:291-6, 1973.
19. STUBBLEFIELD, R.D. — The rapid determination of aflatoxin M_1 in dairy products. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 56:800-2, 1979.
20. STUBBLEFIELD, R.D. & SHANNON, G.M. — Collaborative study of methods for the determination and chemical confirmation of aflatoxin M_1 in dairy products. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 57:852-7, 1974.
21. STUBBLEFIELD, R.D. & SHOTWELL, O.L. — Reverse phase analytical and preparative high pressure liquid chromatography of aflatoxins. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 60:784-790, 1977.
22. TAKAHASHI, D.M. & BEEBE, R.M. — Reversed phase high performance liquid chromatographic procedure for determining aflatoxins in foods and beverages using fluorescence detection. In: SYMPOSIUM ON THE ANALYSIS OF FOODS AND BEVERAGES BY HIGH-PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY, Honolulu, 1979. *Liquid chromatographic analysis of food and beverages*. Proceedings, edited by G. Charalambous, New York, Academic press, 1979. v. 1, p. 101.
23. TRUCKSESS, M.W. — Derivative procedure for identification of aflatoxin M_1 on a thin layer chromatogram. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 59:722-3, 1976.
24. TRUCKSESS, M.W. & STOLOFF, L. — Extraction, cleanup, and quantitative determination of aflatoxins B_1 and M_1 in beef liver. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 62:1080-2, 1979.

SABINO, M.; PURCHIO, A. & ZORZETTO, M.A.P. — Separação e determinação das aflatoxinas M₁ e M₂ em amostras de leite de vaca por cromatografia líquida de alta resolução. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):87-99, 1984.

25. TUINSTRAN, L.G.M. & BRONSQUEEST, M. — Determination of aflatoxin M₁ in milk at the parts per trillion level. *J. chromatogr.*, 111:448-451, 1975.
26. VAN EGMOND, H.P.; PAULSCH, W.E. & SCHULLER, P.L. — Confirmatory test for aflatoxin M₁ on a thin layer plate. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 61:809-12, 1978.
27. WINTERLIN, W.; HALL, G. & HSIEH, D.P.H. — On-column chromatographic extraction of aflatoxin M₁ from milk and determination by reversed phase high performance liquid chromatography. *Anal. Chem.*, 51:1873-4, 1979.
28. ZIMMERLI, B. — Verbesserung der Nachweisgrenze von Aflatoxinen in der Hochdruck-Flüssigkeits-chromatographie durch Verwendung eines kielselgefüllten fluoreinzendetektors. *J. chromatogr.*, 131:458-63, 1977.

Recebido para publicação em 8 de fevereiro de 1984.