

OLIMPIA GAJEK*

WYSTĘPOWANIE AFLATOKSYN W PASZACH TREŚCIWYCH I W MLEKU**

Z Portowej Stacji Sanitarno-Epidemiologicznej w Gdyni

Dyrektor: lek. med. T. Mikosz

i z Zakładu Bromatologii Instytutu Chemii i Analityki Akademii Medycznej
w Gdańsku

Kierownik: prof. dr Z. Ganowiak

Zbadano na zawartość aflatoksyny B_1 niektóre importowane pasze jak również mieszanki paszowe przygotowywane w kraju. Oprócz tego badano mleko na zawartość aflatoksyny M_1 .

Stwierdzono obecność aflatoksyny M_1 w mleku pochodzącym od krów karmionych paszą zanieczyszczoną aflatoksyną B_1 .

Aflatoksyny — substancje rakotwórcze, wytwarzane są przez różne gatunki grzybów toksynotwórczych, szczególnie przez liczne szczepy *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus*. Spośród poznanych aflatoksyn, najbardziej toksyczna jest aflatoksyna B_1 , która oprócz silnych właściwości kancerogennych wykazuje także działanie teratogenne i mutagenne [8, 13]. Działanie toksyczne aflatoksyny występuje tym wyraźniej im młodsze jest zwierzę. Obserwacje poczynione przez różnych autorów na różnych zwierzętach sprowadzają się do zgodnego wniosku, że czynnikiem ułatwiającym zmiany rakowe wątroby pod wpływem aflatoksyn, są niedobory białek [7, 12, 13]. Najnowsze prace podają również, że zwierzęta doświadczalne zakażone pasożytami (*Fasciola hepatica*) wykazują większą podatność na działanie aflatoksyny B_1 , niż zwierzęta nie zakażone [1].

W mleku krów oraz szczerów, a także w mleku, moczu i kale owiec karmionych paszą zawierającą aflatoksynę B_1 i B_2 wykryto ich metabolity, hydroksylowe pochodne — aflatoksynę M_1 i M_2 ; później wykryto ich obecność w mleku i moczu ludzkim. Aflatoksynę M_1 stwierdzono obok aflatoksyny B_1 również w nerkach i wątrobie krów mlecznych, karmionych paszą zanieczyszczoną aflatoksyną B_1 [2]. Wg Neumann'a i wsp. [6] aflatoksyna M_1 nie przechodzi do mleka na trzeci lub czwarty dzień, od zaprzestania podawania zwierzętom mlecznym paszy zanieczyszczonej aflatoksyną B_1 , a wg Nabney'a i wsp. [5] przestaje przechodzić dopiero po sześciu dniach.

Toksyczność ostra aflatoksyny M_1 w stosunku do kacząt jest tego samego rzędu jak aflatoksyny B_1 , a zmiany w wątrobie podobne; przy czym aflatoksyny M powodują poważniejsze uszkodzenia nerek [3].

W niniejszej pracy postanowiono sprawdzić poziom zanieczyszczenia aflatoksyną B_1 importowanych pasz, ze szczególnym zwróceniem uwagi na śrutę arachidową oraz mieszanek paszowych przygotowywanych w kraju jak również zbadać mleko na zawartość aflatoksyny M_1 .

* Praca wykonana pod kierunkiem doc. dr M. Nabrzyskiego.

** Praca wygłoszona na Konwersatorium Sekeji Bromatologicznej Komitetu Chemii Analitycznej PAN na temat „Wartość zdrowotna żywności”, 24.09.81 r. w Krakowie.

CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

Od marca 1980 r. pobierano losowo ze statków próbki paszy importowanej do kraju przez porty w Gdyni i Gdańsku, a od maja również próbki mieszanek paszowych i mleka. W okresie letnim zaniechano pobierania próbek mleka i mieszanek paszowych ze względu na zaprzestanie karmienia mieszankami treściwymi i wypas bydła na pastwiskach. Od marca 1981 r. kontynuowano pobieranie próbek mleka i mieszanek paszowych, którymi karmiono bydło mleczne.

Oprócz tego badano również mleko w proszku.

Zawartość aflatoksyny B₁ w śrutach importowanych i mieszankach paszowych oznaczano metodą chromatografii cienkowarstwowej wg normy branżowej [9]. Zasada oznaczenia polegała na wyekstrahowaniu aflatoksyn z badanego materiału chloroformem, oczyszczeniu ekstraktu na kolumnie chromatograficznej, wypełnionej żelazem krzemionkowym granulowanym (0,05—0,2 mm, do chromatografii kolumnowej) i bezwodnym siarczanem sodu oraz oznaczeniu zawartości aflatoksyny techniką chromatografii cienkowarstwowej.

Jeśli chodzi o mleko płynne i mleko w proszku to ekstrakcję i oczyszczenie wyciągu wykonywano metodą opisaną przez *Lemieszek-Chodorowską* [3] z tą różnicą, że nie sączono przez lejek z bezwodnym wysuszonym siarczanem sodu połączonych wyciągów chloroformowych, lecz wprowadzono własną modyfikację, polegającą na kolejnym sączeniu poszczególnych wyciągów chloroformowych. Taki sposób sprawia, że pierwsze ekstrakty, zawierające najwięcej aflatoksyny ewentualnie zaadsorbowanej na siarczanie sodu, były potem wymywane do przesączu przez następne porcje ekstraktów — co zapewniało lepszy odzysk. Przesącz odparowywano do sucha na cieplej łaźni wodnej pod azotem. Pozostałość rozpuszczano w 100 µl chloroformu.

Na płytce z żelazem krzemionkowym (grubość warstwy 0,25 mm) nanoszono 5—40 µl ekstraktu oraz wzorec aflatoksyny M₁* (0,1 µg/cm²) w ilości 2—20 µl. Chromatogram rozwijano dwukierunkowo, stosując rozpuszczalniki rozwijające wg *Patterson* i wsp. [10]. W pierwszym kierunku chromatogram rozwijano w mieszaninie rozpuszczalników: chloroform, aceton, izopropanol (80 : 15 : 5) i następnie, po wyschnięciu, rozwijano w drugim kierunku w mieszaninie: toluen, octan etylu, 90% kwas mrówkowy (60 : 30 : 10).

OMÓWIENIE WYNIKÓW

We wszystkich badanych partiach importowanej śruty arachidowej stwierdzono obecność aflatoksyny B₁ w ilości od 80 µg/kg do 2000 µg/kg. W 56% badanych mieszanek paszowych, którymi karmiono bydło mleczne (próbki pobierano niejednokrotnie z koryta), stwierdzono aflatoksynę B₁ w ilości od 10 µg/kg do 175 µg/kg. Wyniki przedstawiono w tabeli I.

Tabela I. Poziom aflatoksyny B₁ w śrutach poekstrakcyjnych importowanych i mieszankach paszowych dla bydła

Śruty i mieszanki paszowe	Liczba próbek		Zawartość aflatoksyny B ₁ w µg/kg*	
	zbadanych	zanieczyszczonych	zakres od — do	średnia
Śruta sojowa	1	0	nie wykryto	—
Śruta bawelniana	2	0	„	—
Śruta arachidowa	9	9	80—2000	798
Koncentrat Ko-Be	1	1	50	—
Koncentrat KBC	2	1	250	—
Mieszanka dla bydła	18	10	10—175	55

* Wynik jest średnią z dwóch równoległych oznaczeń.

* Wzorec otrzymano z Zakładu Badania Żywności i Przedmiotów Użytku PZH

W dziewięciu badanych próbkach mleka w proszku nie wykryto obecności aflatoksyn.

Jak wynika z tabeli II na 22 próbki mleka płynnego pobranego z gospodarstw uspołecznionych w 11 stwierdzono obecność aflatoksyny M_1 .

Tabela II. Procent próbek mleka zanieczyszczonego aflatoksyną M_1 w stosunku do ogólnej liczby zbadanych próbek i do liczby próbek pobranych z gospodarstw uspołecznionych

Liczba próbek	Zbadanych	Zanieczyszczonych
Ogółem	38	11
Mleko pobierane z gospodarstw uspołecznionych (PGR, SHR, Sp. Prod.)	22	11
Mleko ze sprzedaży rynkowej (głównie mleko butelkowe)	13	0
Mleko pobrane od rolników indywidualnych	3	0

Tabela III. Poziom aflatoksyny B_1 w paszy treściwej i aflatoksyny M_1 w mleku krów karmionych tą paszą

Data pobrania próby paszy i mleka	Rodzaj gospodarstwa uspołecznionego	Aflatoksyna B_1 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Aflatoksyna M_1 $\mu\text{g}/\text{l}^*$
11.V.1980 r.	SHR	nie wykryto	nie wykryto
11.V.1980 r.	"	"	"
11.V.1980 r.	"	175	0,250
20.V.1980 r.	"	—**	0,100
20.V.1980 r.	"	—	nie wykryto
14.III.1981 r.	"	nie wykryto	"
16.III.	PGR	—	0,010
20.III.	"	10	0,010
28.III.	"	2×40	0,050
16.IV.	"	20	0,050
22.IV.	"	20	0,050
25.IV.	"	—	nie wykryto
27.IV.	"	nie wykryto	"
6.V.	"	25	0,025
7.V.	"	—	0,025
16.V.	SHR	50	0,050
21.V.	PGR	nie wykryto	nie wykryto
22.V. (rano)	SHR	30	śląd
22.V. (wieczorem)	"	—	nie wykryto
22.V.	Sp.P.	150	0,250
24.V.	PGR	nie wykryto	nie wykryto
25.V.	"	"	"

* Wynik jest średnią z dwóch równoległych oznaczeń.

** Nie badano

Zawartość aflatoksyny B_1 w paszy i aflatoksyny M_1 w mleku płynnym przedstawiono w tabeli III. Widać tu zależność poziomu aflatoksyny M_1 w mleku od zawartości aflatoksyny B_1 w paszy. Jednakże w okresie wiosennym, kiedy zaczęto wypuszczać bydło na wypas zielony wówczas, mimo

wysokiego poziomu aflatoksyny B_1 w paszy treściwej, ilość jej metabolitu w mleku była niższa w stosunku do oczekiwanej — co należy tłumaczyć ograniczeniem lub zaprzestaniem podawania mieszanek. Trzeba również dodać, że śruta arachidowa, w której stwierdzono wysokie zawartości aflatoksyny B_1 (1750; 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) została wysłana do różnych mieszalni pasz w głębi kraju, natomiast na teren woj. gdańskiego trafiły partie paszy o znacznie niższej zawartości aflatoksyny. W ten sposób w niektórych rejonach kraju krowy mogły otrzymywać mieszanki paszowe z wyższą zawartością tej toksyny, co w konsekwencji mogło mieć wpływ na występowanie aflatoksyny M_1 w mleku.

Z przedstawionych powyżej rezultatów badań próbek paszy i mleka wynika, że istnieje duże niebezpieczeństwo zagrożenia — z powodu aflatoksyn — zdrowia rodzin pracowników zatrudnionych w gospodarstwach rolnych zwłaszcza uspołecznionych, w których z reguły w okresie zimowo-wiosennym karmi się bydło mleczne mieszankami treściwymi często zanieczyszczonymi aflatoksyną B_1 . Pracownicy tych gospodarstw kupują w miejscu pracy mleko na użytek własny. W tej sytuacji szczególnie zagrożone są dzieci oraz kobiety ciężarne. Takie samo zagrożenie może mieć miejsce w przypadku rodzin gospodarstw indywidualnych (większych producentów mleka), które stosują mieszanki paszowe przydzielane przez mleczarnie za pośrednictwem GS-ów.

W badaniach krajowych [3, 4] oraz własnych mleka pobieranego z handlu nie stwierdzono aflatoksyny M_1 . Należy to tłumaczyć tym, że w mleczarni następuje wymieszanie mleka pochodzącego od różnych dostawców, co powoduje znaczne rozcieńczenie mleka zanieczyszczonego aflatoksyną i trudność jej oznaczania.

W Szwajcarii, w wyniku zarządzeń ograniczających i kontroli koncentratów paszowych dla krów mlecznych, poziom aflatoksyny B_1 w paszach przemysłowych spadł z 45 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (średnia wyników) zimą 1976/77 do 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ w zimie 1977/78 i 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ w zimie 1978/79 r. Mleko w tych okresach zawierało odpowiednio 0,109; 0,044 i 0,010 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [14].

W Polsce nie ma normy, określającej dopuszczalne zawartości aflatoksyn w paszach. Istnieją jedynie wytyczne, w których określa się dopuszczalny procentowy udział śruty arachidowej porażonej aflatoksyną w zależności od jej stopnia porażenia i udziału innych surowców zawierających substancje toksyczne [11]. Przy czym stopień porażenia aflatoksyną B_1 do 90 $\mu\text{g}/\text{kg}$ jest tu określony jako bardzo niski, od 100 do 990 niski, od 1000 do 1990 średni, od 2000 do 4990 wysoki i powyżej 5000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bardzo wysoki.

Wydaje się, że przepisy te są zbyt tolerancyjne. Poza tym brak jest kontroli przez portową służbę weterynaryjną importowanych pasz w kierunku zawartości aflatoksyn.

WNIOSKI

1. Istnieje lokalne zagrożenie spożycia z mlekiem wykrywalnych poziomów aflatoksyny M_1 przez ludzi, w gospodarstwach rolnych stosujących mieszanki paszowe zawierające śrutę arachidową.

2. Konieczna jest stała kontrola Portowej Weterynaryjnej Inspekcji Sanitarnej każdej importowanej partii paszy na zawartość aflatoksyn, a szczególnie aflatoksyny B_1 . Wyniki tych badań winny być przekazywane wszystkim odbiorcom pasz w kraju.

O. Gaek

СОДЕРЖАНИЕ АФЛАТОКСИНОВ В КОНЦЕНТРИРОВАННЫХ КОРМАХ И В МОЛОКЕ

Резюме

Целью работы было исследование уровня афлатоксина В₁ в импортируемых кормах и комбикормах изготовленных в стране, а также молока в направлении содержания в нем афлатоксина М₁.

Определения в кормах проводили методом тонкослойной хроматографии, в соответствии со стандартом (9), а в молоке — методом тонкослойной хроматографии с применением двойного развития хроматограмм (3,10). В импортируемой постэкстракционной арахисовой дерти установили афлатоксин В₁ в количестве в среднем 798 мкг/кг (от 80 до 2000 мкг/кг).

В более чем половине исследуемых комбикормов установили афлатоксин В₁ в количестве от 10 до 175 мкг/кг, в среднем 55 мкг/кг.

Среди 22 проб молока, взятого в кооперативных хозяйствах, в 50% установили наличие афлатоксина М₁ в количестве от 0,010 до 0,250 мкг/л, в то время как в молоке рыночного происхождения наличия афлатоксина М₁ не установлено, вероятно вследствие перемешивания в молочном заводе молока, полученного от разных поставщиков.

Возможно, что повышенная возможность потребления людьми афлатоксина М₁ содержащегося в молоке встречается локально в хозяйствах, применяющих комбикормы содержащие арахисовую дерть.

O. Gajek

AFLATOXINS IN PROTEIN FOOD FOR ANIMALS AND MILK

Summary

The purpose of the study was determination of the levels of aflatoxin B₁ in the imported protein food for animals and food mixtures prepared in this country, and in milk, in which aflatoxin M₁ was sought for.

For the determinations of aflatoxin B₁ in animal food and mixtures thin layer chromatography was used according to standards [9], and the determinations in milk were done by the method of thin-layer chromatography with double development [3, 10]. Aflatoxin B₁ was demonstrated in imported postextraction arachid grounds in amounts from 80 to 2000 µg/kg, mean 798 µg/kg.

In 56% of the studied food mixtures aflatoxin B₁ was found in amounts from 10 to 175 µg/kg, mean 55 µg/kg. In 22 samples of milk from state-owned farms 50% were contaminated with aflatoxin M₁ in amounts from 0.010 to 0.250 µg/l. On the other hand, in the samples of milk taken from the market aflatoxin M₁ was not found, probably due to mixing of milk from various purveyors in the dairy. It seems that the risk of consuming milk with aflatoxin M₁ is greater when the milk is obtained from farms using food mixtures for animals containing ground arachids.

PIŚMIENICTWO

1. Gentile J.M., De Ruiter E.: Promutagen activation in parasiteinfected organismus: preliminary observations with *Fasciola hepatica* infected mice and aflatoxin B₁. *Toxicology Letters*, 1981, 8, 273. — 2. Hayes J.R., Polan C.E., Campbell T.C.: Bovine liver metabolism and tissue distribution of aflatoxin B₁. *J. Agric. Food Chem.* 1977, 25, 1189. — 3. Lemieszek-Chodorowska K.: Wykrywanie aflatoksyny M₁ w mleku. *Roczn. PZH*, 1974, 25, 489. — 4. Lemieszek-Chodorowska K.: Modyfikacja chromatograficznej metody wykrywania aflatoksyny M₁ w mleku. *Roczn. PZH*, 1979, 30, 141. — 5. Nabney J. i wsp.: Metabolism of aflatoxin in sheep. *Fd Cosmet. Toxicol.*, 1966, 4, 475. — 6. Neumann-Kleinpaul A., Terplan G.: Zum Vorkommen von Aflatoxin M₁ in Troekennlehmprodukten. *Arch. Hyg.*, 1972, 23, 128. — 7. Nikonorow M.: Toksykologia żywności. PZWL. Warszawa 1979, 272. — 8. Nikonorow M.: Zanieczyszczenia chemiczne i biologiczne żywności. W.N.T. Warszawa 1980, 127. — 9. Norma Branżowa BN-79/9160-13. Pasze. Oznaczenie aflatoksyn w paszach i ich komponentach. — 10. Patterson D.S.P. i wsp.: The estimation of Aflatoxin M₁ in milk using a twodimensional thin layer chromatographic method suitable for survey work. *Fd Cosmet. Toxicol.* 1978, 16, 49.

11. Receptury mieszanek i koncentratów paszowych. Zjednoczenie Przemysłu Paszowego „Bacutil”. W-wa 1980. — 12. *Temcharoen P.* i wsp.: Influence of dietary protein and vit. B₁₂ on the toxicity and carcinogenicity of aflatoxins in rat liver. *Cancer Research*, 1978, 38, 2185. — 13. *Zawirska B.*: Biologiczne aspekty zagrożenia zdrowia ludzkiego przez aflatoksyny. *Post. Hig. Med. Dośw.* 1975, 29, 7—14. *Zimmerli B., Blaser O.*: Vorkommen von Aflatoxin M in Milch. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* 1979, 70, 287.

Dn. 28 XI 1981 r.

81-338 Gdynia, ul. Chrzanowskiego 19.