

Pr.Nr. 8.444

Werknota 80.33

Onderwerp: Het gehalte aan ochratoxine A
in varkens- en pluimveevoeders.

1980-07-24

Verslag 80.33

1980-07-24.

Afdeling Contaminanten

Pr.Nr. 8.444.

Projekt: Het gehalte aan microbiële toxinen in landbouw en visserij-
produkten.

Onderwerp: Het gehalte aan ochratoxine A in varkens- en pluimveevoeders.

Doel:

Nagaan in hoeverre mengvoeder, in Nederland, besmet is met ochratoxine A, dit in verband met gevonden besmettingen in landen als onder andere Zweden, Denemarken en Canada.

Samenvatting:

Schimmels welke ochratoxine A produceren komen regelmatig voor op landbouwprodukten. In landen als onder andere: Zweden, Denemarken en Canada werd ochratoxine A aangetroffen in landbouwprodukten en tevens in varkens- en kippenieren.

Toxiciteitsproeven met behulp van ratten gaven een LD-50 waarde voor ochratoxine A van 22 mg/kg lichaamsgewicht, wat ongeveer drie maal de waarde is welke werd verkregen voor het aflatoxine B₁.

Bij korte - termijn - en subacute toxiciteitsproeven is gebleken dat ochratoxine A, bij lage concentraties in het voer, hoofdzakelijk toxisch is voor de nieren.

Om een inzicht te verkrijgen in hoeverre het Nederlandse veevoeder (mengvoeders) besmet is met ochratoxine A werden 42 veevoeders onderzocht.

Conclusie:

Van de 42 onderzochte veevoeders kon slechts in één monster ochratoxine A worden aangetoond met een gehalte van ca. 5 µg/kg. Hieruit kan geconcludeerd worden dat de besmetting van het Nederlandse veevoeder, met ochratoxine A laag is.

Verantwoordelijk: ir L.G.M.Th. Tuinstra.

Samensteller : W. Haasnoot.

Inleiding:

Schimmels komen zeer verbreid in de natuur voor, waardoor besmetting van landbouwprodukten, tijdens de oogst en/of het bewaren, regelmatig voorkomt.

De groei van schimmels is ongewenst aangezien bepaalde schimmelsoorten in staat zijn toxinen te vormen.

Ochratoxinen werden oorspronkelijk geïsoleerd uit stammen van *Aspergillus ochraceus*, maar er zijn nu zes *Penicillium* en zeven *Aspergillus* stammen bekend, die eveneens ochratoxinen kunnen produceren.

Vooraf de schimmels *P-viridicatum*, *P-palitans* en *P-cyclopium* moeten worden aangemerkt als grote ochratoxinen producenten. Deze schimmels komen veelvuldig voor op landbouwprodukten welke worden gebruikt voor menselijke consumptie en/of worden verwerkt in veevoeders (zie tabel 1). Ochratoxine A is aangetroffen in door natuurlijke besmetting aangetast voedsel en voedingsmiddelen (zie tabel 2), en ochratoxicose is geconstateerd bij varkens en pluimvee (1,2).

In Zweden en Denemarken werden in slachthuizen varkens- en kippenieren geselecteerd vanwege afwijkingen (kleur, consistentie, grootte of combinaties van deze) en onderzocht op aanwezigheid van ochratoxine A (1,2). In 25% van de onderzochte varkensnieren (n=129) werd ochratoxine A aangetroffen in gehalten welke varieerden van 2 tot 104 µg/kg en van de onderzochte kippenieren (n=14) bleek 35% ochratoxine A te bevatten variërend van 4 tot 29 µg/kg.

Toxiciteitsproeven met behulp van ratten gaven een LD₅₀ waarde voor ochratoxine A van 22 mg/kg, lichaamsgewicht, ongeveer drie maal de waarde verkregen voor aflatoxine B₁ (3).

De LD₅₀ waarden, verkregen met behulp van jonge hanen, was voor ochratoxine A 3,6 en voor ochratoxine B 54 mg/kg lichaamsgewicht.

Pathologische onderzoeken, na het toedienen van de letale dosis, gaven nierneecrose en vetafzetting op de lever te zien.

Bij korte - termijn - en subacute-toxiciteits proeven is gebleken dat ochratoxine A, bij lage concentraties (minimaal toegediend gehalte was 0,2 ppm) in het voer, hoofdzakelijk toxisch was voor de nieren (4).

Verdere waarnemingen omtrent de invloed van ochratoxine A bij varkens zijn depressies, verminderde eetlust, gewichtsverlies en diarree (5) en bij kippen, groeiafname en vermindering in eiproductie (6).

Bij overdrachtsproeven van ochratoxine A in voer naar dierlijk weefsel werd ochratoxine A gevonden in de nieren en in mindere mate in het vet, lever en spierweefsel.

Indien, nadat met ochratoxine A gecontamineerd voeder is toegediend, ochratoxine A vrij voeder wordt gegeven, verdwijnt het toxine binnen 2 weken uit het vet en spieren, uit de lever na 3 weken en uit de nieren na 4 weken (7).

Tolerantiewaarden omtrent ochratoxine A in veevoeder en voedingsmiddelen zijn niet vastgesteld.

Om een inzicht te verkrijgen in hoeverre het Nederlandse veevoeder besmet is met ochratoxine A werden 27 monsters varkensvoeder en 15 monsters pluimveevoeder onderzocht.

Monsternamen:

Van een door de Algemene Inspectiedienst ingezonden aantal monsters veevoeder, met het verzoek deze te onderzoeken op ongewenste stoffen als bedoeld in bijlage besluit V.V.R. Ongewenste stoffen en produkten 1975, werden 40 monsters eveneens onderzocht op aanwezigheid van ochratoxine A.

Omtrent aanwezigheid van schimmels werd niets vermeld.

Door de Stichting Gezondheidsdienst voor Dieren in Limburg werden 2 monsters biggenvoeder ingezonden waarin schimmels werden aangetoond (130.000 aspergillus-kolonies per gram). Dit veevoeder veroorzaakte slechte groei bij biggen.

Deze monsters werden onderzocht op aanwezigheid van ochratoxine A.

Alle 42 onderzochte monsters waren mengvoerders.

Methode van onderzoek:

Voor de bepaling van ochratoxine A in veevoeder werd een methode ontwikkeld welke is beschreven in Intern Voorschrift nr. F.50 (zie bijlage 1).

Ochratoxine A wordt uit veevoeder geëxtraheerd met een mengsel van chloroform en fosforzuur.

Na filtratie wordt een aliquot deel van het chloroformextract gezuiverd met behulp van een natriumbicarbonaat-celite kolom.

Na droogdampen van het eluaat en opnemen in een bekende hoeveelheid van een mengsel methanol/acetonitril volgt een scheiding door middel van vloeistofchromatografie.

Ochratoxine A wordt gedetecteerd met behulp van een fluorescentiedetector (zie figuur 1).

De detectiegrens voor ochratoxine A is ca. 5 µg/kg en de recovery, na toevoegen van een bekende hoeveelheid standaard, is 70% (n=14, s=9,7). Met behulp van twee-dimensionale dunnelaag chromatografie kunnen positieve resultaten zowel kwalitatief als semi-kwantitatief worden bevestigd met een detectiegrens van ca. 5 µg/kg.

Resultaten:

Van de 27 onderzochte varkensvoerders werd in één monster ochratoxine A gevonden met een gehalte van gemiddeld 5,2 µg/kg (zie tabel 3).

Van de 15 onderzochte pluimveevoerders werd bij één monster een gehalte van 24,5 µg/kg gevonden, maar bij heronderzoek van een duplo monster kon ochratoxine A niet worden aangetoond (gehalte <5 µg/kg), wat duidt op inhomogeniteit van het monster of contaminatie tijdens de analyse (zie tabel 4). Dit monster werd op de afdeling microbiologie eveneens onderzocht op aanwezigheid van schimmels.

In totaal werden 5 schimmelsoorten gevonden; welke in verband met de daaraan verbonden kosten, niet werden geïdentificeerd.

Conclusie:

Van de 42 onderzochte veevoerders kon slechts in één monster ochratoxine A worden aangetoond met een gehalte van ca 5 µg/kg.

Hieruit kan geconcludeerd worden dat de besmetting van de Nederlandse veevoerders (mengvoerders) met ochratoxine A zeer laag is.

Bij de onderzochte monsters kon visueel geen schimmel worden waargenomen.

Actiepunten:

- De kans van besmetting met ochratoxine A wordt groter bij zichtbaar aanwezigheid van schimmels.

Een volgend actiepoint zou kunnen zijn om ochratoxine A te bepalen in beschimmelde landbouwprodukten, waaronder kuilvoerders.

- Bij een oriënterend onderzoek naar potentieel-toxische schimmels afkomstig van beschimmelde Nederlandse kaas en enkele andere beschimmelde zuivelprodukten (8), kwam naar voren dat *Penicillium cyclopium* de meest geïsoleerde schimmelsoort van kaas was.

De gemeten wateractiviteit van enkele kaassoorten, die als een belangrijk factor voor de groei van schimmels geldt, varieerde van 0,90 tot 0,96 en vormt geen belemmering voor schimmelgroei.

Hieruit blijkt dat het zeer goed mogelijk is dat ochratoxine A voorkomt op kaas.

Een oriënterend onderzoek naar de aanwezigheid van dit toxine in commercieel verkrijgbare kaas lijkt op zijn plaats.

Tabel 1. Frequentie van isolaties van verschillende schimmelsoorten, afkomstig van geïmporteerd graan ¹⁾ (9).

	tarwe	mais	rijst	gerst	boekweit	rogge	haver
aantal monsters	33	14	7	6	6	3	3
<u>a. potentieel-toxische soorten:</u>							
<i>Absidia ramosa</i>				1	1		
<i>Absidia corymbifera</i>	1	1					
<i>Aspergillus amstelodami</i>	9	1		2		2	1
" <i>candidus</i>			1				
" <i>chevalieri</i>			1				
" <i>flavus</i>	1	1			1		
" <i>fumigatus</i>				1			
" <i>niger</i>		3				1	
" <i>ruber</i>	3	1	2		1	1	
<i>Cladosporium herbarum</i>							2
<i>Fusarium oxysporum</i>				1			
" <i>moniliforme</i>		6					
" <i>sambucinum</i>					1		
<i>Mucor circinelloides</i>	3	3			1		1
" <i>racemosus</i>	1					1	1
<i>Penicillium brevicompactum</i>	1						
" <i>citrinum</i>	1						
" <i>cyclopium</i>	13	6	1	3		2	
" <i>oxalicum</i>		3					
" <i>viridicatum</i>				1			
<i>Trichoderma viride</i>							1
<u>b. niet-toxische soorten</u>							
<i>Acremonium species</i>	1						
<i>Aspergillus repens</i>	11	5	3	1	1	2	1
<i>Aureobasidium spec.</i>	3	1			2		
<i>Botrytis cinerea</i>	6				1	1	
" <i>alii</i>	1						
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	3	1		1	3		

vervolg tabel 1

	tarwe	mais	rijst	gerst	boekweit	rogge	haver
<i>Cochliobolus carbonus</i>	1				1		
<i>Drechslera spec.</i>	1			2			
<i>Epicoccum purpurascens</i>	4	2	1	1	3		
<i>Geotrichum candidum</i>		1					
<i>Nigrospora oryzae</i>	2	2					
<i>Phoma spec.</i>			1		1		
<i>Rhizopus arrhizus</i>	9	3			1	2	2
<i>Ulocladium chartarum</i>	2						

c. geen indeling mogelijk

bij:

<i>Alternaria species</i>	26	3		6	3	2	1
<i>Mucor species</i>		4	1				
<i>Rhizopus species</i>	1	3					2
<i>Thrichoderma species</i>		1		1	1		

1) Uit alle monsters graan werden schimmels geïsoleerd

Tabel 2: Voórkomen van ochratoxinen.

Eénduidige produkten onderzocht op ochratoxinen met vermelding van:
aantal onderzochte monsters (n), percentage waarin ochratoxinen zijn
aangetroffen (%+), soort ochratoxine, gevonden gehalten en literatuur.

Produkt	n	%+	Soort	Gehalte in µg/kg op produktbasis	Literatuur	
Gerst	?	?	A	< 200	Nesheim 1971	✕
Graan	29	62	A	30-27.000	Harwig 1974	✕
Mais	166	1	A	?	Shotwell 1969	✕
Mais	164	0,5	A	110-150	Shotwell 1969	
Tarwe	4	100	A	?	Shotwell 1969	
Gerst, tarwe	33	58	A	9-27.520	Krogh 1973	✕
Groene koffie	9	23	A	?	Campbell 1969	✕
Groene koffie	335	1	A	30-230	Levi 1974	✕
Pinda's	?	1	A	4900	Scott 1972	(11)
Tarwe	95	7,5	A	30-6.000	Prior 1976	(12)
Hooi	1	100	A	30	Prior 1976	
Nieren (kippen)	14	36	A	4,3-29,2	Elling 1975	(2)
Nieren (varkens)	129	25	A	2-104	Rutqvist 1977	(1)
Mais	293	1	A	83-166	Shotwell 1970/71	✕

* Voor literatuuropgave - zie Overzicht mycotoxinen van PR-Beljaars (13).

Tabel 3: Varkensvoerders.

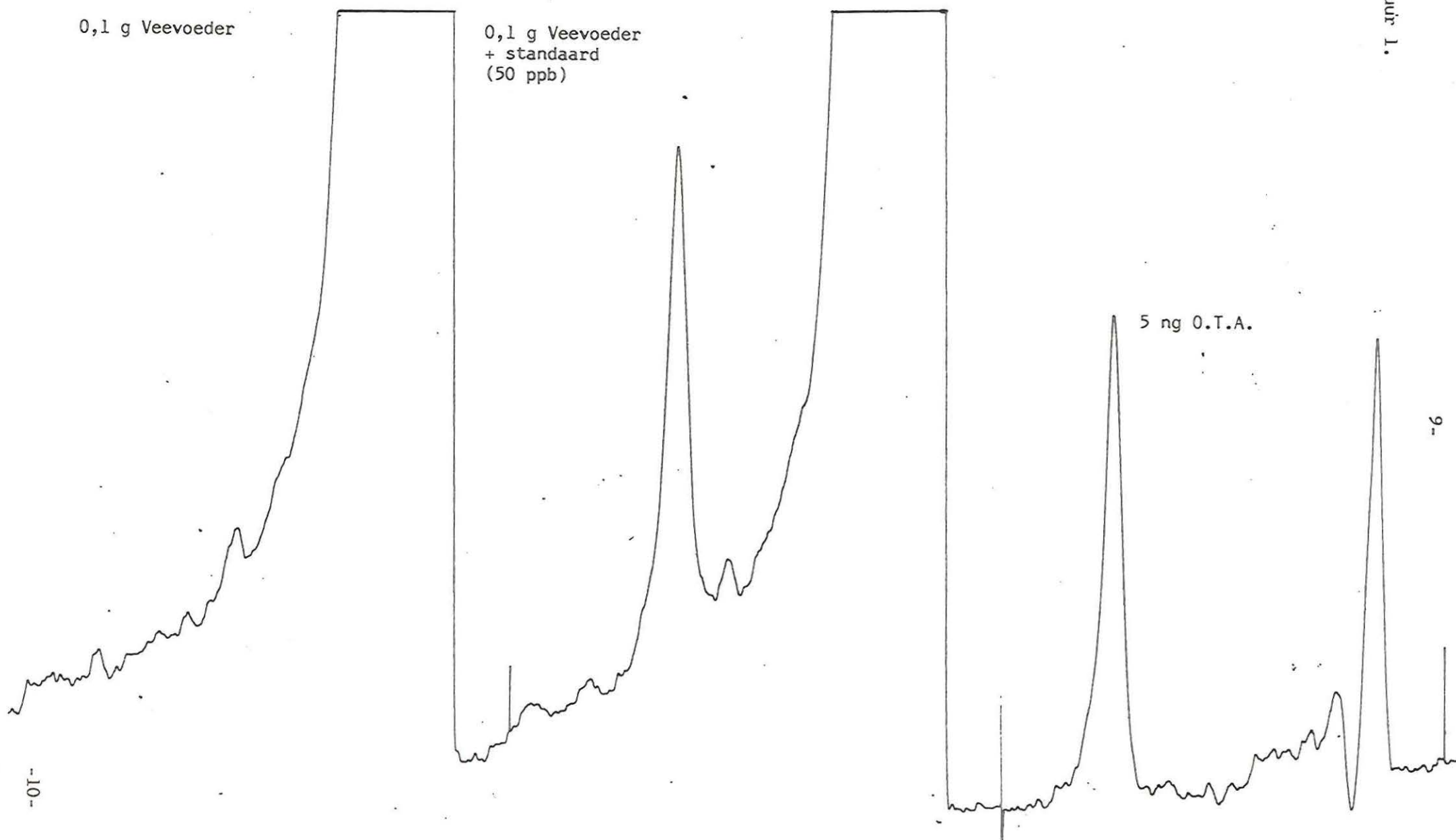
Monsternr.	Omschrijving	Gehalte ochratoxine A in µg/kg	
17839	volledig diervoeder voor biggen	<5	✱
17840	volledig diervoeder voor biggen	<5	✱
19106	volledig diervoeder voor biggen	<5	
19397	volledig diervoeder voor zeugen	<5	
19897	volledig diervoeder voor varkens	<5	
20062	volledig diervoeder voor biggen	<5	
21341	volledig diervoeder voor zeugen	<5	
21396	volledig diervoeder voor slachtvarkens	<5	
21398	volledig diervoeder voor babybiggen	<5	
21400	volledig diervoeder voor fokzeugen	<5	
21405	volledig diervoeder voor babybiggen	<5	
21531	volledig diervoeder voor babybiggen	<5	
21532	volledig diervoeder voor slachtvarkens	<5	
21533	volledig diervoeder voor fokzeugen	<5	
21700	volledig diervoeder voor biggen	<5	
21701	volledig diervoeder voor slachtvarkens	<5	
21807	volledig diervoeder voor babybiggen	<5	
22452	volledig diervoeder voor mestvarkens	<5	
22566	volledig diervoeder voor biggen	<5	
22723	volledig diervoeder voor slachtvarkens	<5	
23174	volledig diervoeder voor fokzeugen	<5	
23178	volledig diervoeder voor biggen	<5	
23177	volledig diervoeder voor slachtvarkens	<5	
23374	volledig diervoeder voor slachtvarkens	<5	
23375	volledig diervoeder voor biggen	4,9-5,4	
23434	volledig diervoeder voor mestvarkens	<5	
23440	volledig diervoeder voor biggen	<5	

✱ Ingezonden door de Stichting Gezondheidsdienst voor Dieren te Limburg.

Tabel 4: Pluimveevoeders.

Monsternr.	Omschrijving	Gehalte ochratoxine A in µg/kg
21173	legmeel	<5
21397	braadkuikenvoeder	<5
21402	mestkuikenkorrel	<5
21404	mestkuikenkorrel	<5
21806	volledig diervoeder voor slachtpluimvee	<5
21808	volledig diervoeder voor legpluimvee	24,5 duplo monster <5
21809	volledig diervoeder voor mestkippen	<5
23176	volledig diervoeder voor legkippen	<5
23185	volledig diervoeder voor legpluimvee	<5
23186	volledig diervoeder voor legpluimvee	<5
23187	volledig diervoeder voor legpluimvee	<5
23188	volledig diervoeder voor legpluimvee	<5
23189	volledig diervoeder voor legpluimvee	<5
23190	volledig diervoeder voor legpluimvee	<5
23442	volledig diervoeder voor kippen	<5

Figuur 1.



Literatuur:

- | | |
|---------------------|--|
| 1. L. Rutqvist e.a. | Zbl.Vet.Med.A, 24, 402-408 (1977) |
| 2. F. Elling e.a. | Acta path. microbiol. scand. Sect. A, 83:739-741, 1975 |
| 3. Purchase e.a. | Food Cosmet. Toxicol. 9 681-682 (1971) |
| 4. I.C. Munro e.a. | J.A.V.M.A., Vol. 163, No. 11 (1973) |
| 5. S.Z.S. Zech e.a. | Vet path 10: 347-364, 1973. |
| 6. L.T. Tucker e.a. | Poult. Sci 50: 1637, 1971. |
| 7. P. Krogh e.a. | Toxicology, 6 (1976) 235-242. |
| 8. M.D. Northolt | RIV Rapport nr. U 49/77 Zoön |
| 9. M.D. Northolt | RIV Rapport nr. U 50/77 Zoön |
| 10. M.D. Northolt | RIV Rapport nr. U 13/78 Zoön |
| 11. P.M. Scott e.a. | J. Agr. Food Chem., vol 20, no. 6, 1972 |
| 12. M.G. Prior | Can. J. comp. Med. vol 40, 75-79, 1976 |
| 13. P.R. Beljaars | Overzicht Mycotoxinen, Keuringsdienst van Waren; Maastricht (1975) |

Verzendlijst: Tuinstra,
Haasnoot,
Traag,
Roos,
Van Doesburgh,
Buizer,
Direktie V.K.A.
Circulatiemappen.

Intern Voorschrift nr. F50

1^e oplage (1980-06-26)

De bepaling van ochratoxine A in mengvoeders met behulp van vloeistof-chromatografie en fluorescentie-detectie.

1. Inleiding

Ochratoxine A is een mycotoxine dat wordt geproduceerd door schimmels van het geslacht *Aspergillus* en *Penicillium*, met als voornaamste producenten: *P. viridicatum*, *P. palitans* en *P. cyclopium*.

Deze schimmels zijn erg verbreid en komen voor op onder andere groenten en granen.

Ochratoxine A heeft een primair toxisch effect op de nieren.

Ochratoxicose is gekonstateerd bij varkens en pluimvee.

2. Principe

Ochratoxine A wordt uit veevoeder geëxtraheerd met een mengsel van chloroform en 0,1M fosforzuur.

Na filtratie wordt een aliquot deel van het chloroformextract gezuiverd m.b.v. een natriumbicarbonaat-celite kolom.

Na droogdampen van het eluaat en opnemen in een bekende hoeveelheid van een mengsel methanol/acetonitril volgt een scheiding door middel van vloeistofchromatografie.

Ochratoxine A wordt gedetecteerd m.b.v. fluorescentie-detectie.

De absolute detectiegrens is 0,5 µg. De detectiegrens voor ochratoxine A in veevoeder is 5 µg/kg en de recovery op een niveau van 50 µg/kg is ca. 70%.

Met behulp van twee-dimensionale dunnelaagchromatografie kunnen positieve resultaten zowel kwalitatief als semi-kwantitatief worden bevestigd met een detectiegrens van 5 µg/kg.

3. Reagentia

Alle reagentia dienen van een zodanige kwaliteit te zijn dat in het chromatogram geen storingen optreden welke kunnen interfereren met ochratoxine A.

Voer ter controle een blanco en een blanco + toevoeging uit.

- 3.1 Chloorbleekloog 1%, voor het reinigen van glaswerk
- 3.2 Chloroform
- 3.3 Fosforzuur (0,1M)
- 3.4 Hexaan
- 3.5 Mierezuur
- 3.6 Methanol
- 3.7 Acetonitril
- 3.8 IJsazijn
- 3.9 Aceton
- 3.10 Toluëen
- 3.11 Ethylacetaat
- 3.12 Ethanol
- 3.13 Natriumbicarbonaat-oplossing (1,25% in water)
- 3.14 Natriumbicarbonaat-oplossing: Weeg 12 g. Na HCO_3 af en los op in 200 ml water en voeg 40 ml ethanol toe.
- 3.15 Celite 545 (Johns Manville) zuurgewassen zoals beschreven in Intern voorschrift G 41.

Drenk 900 g. zuurgewassen Celite gedurende 1 nacht in methanol. Filtreer door een Whatman filter (no.1), m.b.v. een büchner trechter en was met 8 l. water. Droog de celite gedurende 12 uur bij 150°C .

- 3.16 Standaard-oplossing van ochratoxine A: De standaard is verkrijgbaar bij Makor-Chemicals L.T.D., P.O.B. 6570, Jerusalem, Israel in een hoeveelheid van 5 mg. Breng deze hoeveelheid kwantitatief over in een maatkolf van 100 ml m.b.v. methanol en vul aan tot 100 ml. (conc. 50 $\mu\text{g/ml}$). /

Bepaal spectrofotometrisch de concentratie van deze oplossing, door gebruik te maken van de methode beschreven in Official Methods of analysis (A.O.A.C.) 26.004-26.011, m.b.v. de volgende gegevens:

Molecuulgewicht Ochratoxine A = 403

Molaire extinctiecoëfficiënt = 5550 bij 333 nm

Bewaar deze oplossing koel en in het donker, goed afgesloten en in aluminiumfolie gewikkeld. Laat voor gebruik de maatkolf op kamertemperatuur komen. Maak van deze oplossing d.m.v. verdunnen met methanol de volgende standaard oplossingen:

0,05 - 0,1 - 0,2 en 0,3 $\mu\text{g/ml}$.

- 3.17 Diethylether

4. Toestellen, Glaswerk en Hulpmiddelen

- 4.1 Medicijnflesjes van 100 ml met schroefdop
- 4.2 Schudmachine
- 4.3 Gekalibreerde puntbuizen van 10 ml
- 4.4 Büchner trechter $\varnothing$ ca. 20 cm.
- 4.5 Droogstoof 150°C
- 4.6 Waterbad van ca. 40°C
- 4.7 Inert gas bijvoorbeeld stikstof
- 4.8 Filters: whatman no. 1 $\varnothing$ ca. 20 cm. en $\varnothing$ 9 cm.
- 4.9 Chromatografiekolommen met G1 glasfilter en voorzien van kraan
lengte ca. 40 cm en inw. diam. 20 mm.
- 4.10 Rotatievacuumverdamper
- 4.11 Balans tot op 2 decimalen nauwkeurig
- 4.12 Platbodempokken van 250 ml.
- 4.13 Maatcilinders van 25 ml. en 100 ml.
- 4.14 Pipetten van 10 ml.
- 4.15 Trechters $\varnothing$ ca. 6 cm.
- 4.16 Micro-injectiespuiten van 50 en 1000 μ l.
- 4.17 DC-Fertigplaten, kieselgel 60, Merck art. 5721
- 4.18 Ultravioletlamp voor straling met een golflengte van 360 nm.
- 4.19 Vloeistofchromatograaf (Waters of vergelijkbare apparatuur)
met Valco (7000 psi) injectiekraan.
injectievolumen: 20 μ l
kolom: 5 μ R.P.-18, lengte 15 cm, id. 4,6 mm en u.d. 6,4 mm.
eluens: acetonitril/water/ijsazijn (50/50/2)
flow: 1 ml/min.
detektor: Waters 420 Fluorescentie detector.
 λ ex, 360 nm en λ em. 425 nm
- 4.20 Chromatografie tank: voor TLC platen van 20 x 20 cm.
- 4.21 Densitometer: λ ex 390 nm en λ em 445 nm

5. Werkwijze

5.1 Extractie

Weeg af in een medicijnflesje, met schroefdop, van 100 ml
10 gram van het gemalen en gehomogeniseerde monster. Voeg
toe 5 ml 0,1 M fosforzuur en 50 ml. chloroform.
Schudt gedurende 30 min. in een schudapparaat,
Filtreer de chloroformfase over een hard filter (4.8) en
vang ca. 15 ml op in een maatcilinder van 25 ml.

5.2 Clean-up

5.2.1 Weeg 2 g. Celite (3.15) af in een bekglas van 50 ml, voeg 1 ml natriumbicarbonaat oplossing (3.13) toe en homogeniseer m.b.v. een roerstaaf.

Breng dit mengsel in een chromatografiekolom (4.9) en druk de Celite aan, m.b.v. een roerstaaf met een plat uiteinde, tot een kompakte laag ontstaat.

5.2.2 Pipetteer 10 ml van het filtraat, verkregen onder 5.1, in een platbodenkolf van 250 ml en voeg toe 40 ml chloroform en 40 ml hexaan.

Breng dit mengsel voorzichtig op de kolom en elueer met maximale snelheid tot het chloroform/hexaan mengsel vlak boven het kolom oppervlak is.

Elueer vervolgens met 75 ml chloroform. Verwijder deze twee fracties en elueer tenslotte de kolom met 75 ml chloroform/mierezuur mengsel (99/1). Vang deze fractie, die de ochratoxine A bevat, op in een rondbodenkolf van 250 ml.

5.2.3 Damp de chloroform/mierezuur fractie, direkt na het elueren, m.b.v. de vacuumrotatieverdämper (40°C) in tot ca. 1 ml.

Breng dit kwantitatief over in een puntbuis met ca. 5 ml chloroform.

Zet de puntbuis in een waterbad van 40°C en damp de chloroform volledig af onder een constante stikstofstroom. Breng met een micro-injectiespuit van 1 ml, 200 µl van een mengsel acetonitril/methanol (1/1) bij het residu en meng goed.

6. Hogedrukvløeistofchromatografie

Injecteer achtereenvolgens in de vloøistofchromatograaf (4.19) 20 µl van de standaardoplossingen 0,05 - 0,1 - 0,2 en 0,3 µg/ml.

Maak een ijklijn door van de pieken het oppervlak (mm²) te meten en uit te zetten op de y-as tegen de geïnjecteerde hoeveelheden in nanogrammen op de x-as.

Injecteer vervolgens 20 µl van de order 5.2.3 verkregen oplossing en meet van de piek, met gelijke retentietijd als ochratoxine A, het oppervlak (mm²). Indien het monsterextract een piek vertoont, met gelijke retentietijd als ochratoxine A, waarvan het oppervlak groter is als het oppervlak van de hoogste standaard, is het aan te bevelen het monsterextract zodanig te verdunnen dat het piekoppervlak binnen de ijklijn valt.

7. Berekening

Het gehalte in $\mu\text{g/kg}$ aan ochratoxine A wordt berekend met de volgende formule:

$$\frac{(Y-B)}{a} \times \frac{V1 \times V3}{V2 \times V_i \times g} = \mu\text{g/kg}$$

Waarin:

Y = oppervlakte van de piek in het monster (mm^2)

B = afsnede van de Y-as (mm^2)

a = richting coëfficiënt van de ijklijn (mm^2/ng)

V1 = volume chloroform gebruikt bij de extratie (ml)

V2 = volume chloroform, wat in bewerking is genomen (ml)

V3 = volume, waarin het eindextract zich bevindt (μl)

V_i = injectievolume van het monster (μl)

g = afgewogen hoeveelheid monster (g)

8. Bevestiging

Bij een positief resultaat volgens 6. is het aan te bevelen dit te bevestigen m.b.v. onderstaande dunnelaagchromatografische methode.

8.1. Het opbrengen

Trek op de dunnelaagplaten (4.17) met potlood lijnen zoals aangegeven in figuur 1 en breng op de plaatsen eveneens volgens figuur 1 de volgende oplossingen op.

A 20 μl monster extract = 0,2 g monster

B 10 μl standaardoplossing ochratoxine A (0,2 $\mu\text{g/ml}$) = 2 ng

C 10 μl standaardoplossing ochratoxine A (0,4 $\mu\text{g/ml}$) = 4 ng

D 20 μl standaardoplossing ochratoxine A (0,4 $\mu\text{g/ml}$) = 8 ng

E 20 μl standaardoplossing ochratoxine A (0,4 $\mu\text{g/ml}$) = 8 ng

Gebruik voor het opbrengen het automatische doseer apparaat, waarbij tijdens het opbrengen het oplosmiddel wordt afgedampt met een stroom stikstofgas.

Zorg ervoor dat de vlekken een diameter hebben van max. 5 mm.

8.2 Het ontwikkelen van het chromatogram

Ontwikkel de plaat in de eerste looprichting in een vers (dit is nog niet eerder gebruikt) mengsel van chloroform/ ijsazijn/diethylether (17/1/3) in een onverzadigde tank tot het vloeistoffront de eerste potloodlijn heeft bereikt.

Verwijder de plaat uit de tank en laat de loopvloeistof verdampen in het donker bij kamertemperatuur gedurende ca. 30 minuten.

Draai hierna de plaat 90° en ontwikkel, eveneens in een onverzadigde tank, in de 2^e looprichting in een mengsel van tolueen - ethylacetaat - mierenzuur (60 - 30 - 10) tot de potloodlijn.

Laat het ontwikkelde chromatogram tenminste 30 min. drogen bij kamertemperatuur.

8.3 Interpretatie van het chromatogram

Onderzoek het chromatogram met behulp van een U.V. lamp bij 360 nm.

Ochratoxine A fluoresceert blauw-groen. Trek een denkbeeldige lijn loodrecht op de tweede looprichting door de standaardvlek afkomstig van B en een andere lijn loodrecht op de eerste looprichting door de standaardvlek van E.

Rondom het snijpunt van deze twee denkbeeldige lijnen ligt het gebied waar de ochratoxine A vlek uit het monsterextract kan worden verwacht.

Door het chromatogram te besproeien met een natriumbicarbonaat-oplossing (3.14) verandert de fluorescentie van ochratoxine A van blauw-groen naar fel blauw, welke een grotere intensiteit bezit.

Onderzoek het chromatogram, na besproeien, binnen 3 uur vanwege het optreden van verliezen.

Op grond van identiek gedrag van de zuivere standaard en de Rf-waarden kan tot een bevestiging van de aanwezigheid van ochratoxine A in het extract worden geconcludeerd.

Een kwantitatieve bevestiging kan plaatsvinden door middel van een visuele schatting of densitometrische detectie (4.21) van de fluorescentie intensiteiten van de drie standaard ochratoxine A vlekken en de intensiteit van de ochratoxine A vlek uit het monster,

Paraaf scheikundige: ir L.H.M.Th. Tuinstra

Paraaf samensteller: W. Haasnoot

Figuur 1

