

Afd. Contaminanten 1982-12-08

VERSLAG 82.104 Pr.nr. 505.0420

Onderwerp: Het ontwikkelen van een
snelle methode voor het be-
palen van aflatoxine B₁ in
veevoeders

Verzendlijst: directeur, sektorhoofd (3x), direktie VKA, afd.
Contaminanten (4x), afd. Normalisatie (Humme),
Projektbeheer, Projektleider (Haasnoot), Tuinstra,
dhr. Mol (dir. VKA).

Project: Ontwikkeling methoden voor het aantonen en bepalen van
microbiële toxinen

Onderwerp: Het ontwikkelen van een snelle methode voor het bepalen van
aflatoxine B₁ in veevoeders

Doel:

Het ontwikkelen van een snelle methode voor het bepalen van aflatoxine B₁ in veevoeder met als detectiegrens 1 µg/kg of lager.

Samenvatting:

De in Nederland geldende tolerantie voor het gehalte aan aflatoxine B₁ in veevoeder, van 20 µg/kg kan leiden tot een aflatoxine M₁ gehalte in de melk van 0,16 µg/kg, terwijl voor melk een tolerantie van 0,05 µg/kg wordt voorgesteld.

Om aan dit gehalte te kunnen voldoen moet de tolerantie van aflatoxine B₁ in het veevoeder omlaag naar 5 µg/kg. Een vastgestelde tolerantie voor aflatoxine M₁ in melk heeft vermoedelijk tot gevolg dat de melkproducenten een meer uitgebreide controle wensen op aflatoxine B₁ in veevoeder. Een snelle methode voor het bepalen van aflatoxine B₁ in veevoeder, met als detectiegrens 1 µg/kg of lager, is dus gewenst.

Een methode voor het bepalen van aflatoxine B₁ in veevoeder tot op het 1 µg/kg niveau is reeds gepubliceerd (3) echter deze is dermate bewerkelijk dat hooguit zes monsters per dag kunnen worden geanalyseerd.

De tot heden binnen het RIKILT gebruikte snelle methode (5) heeft een detectiegrens van 5 µg/kg en in eerste instantie werd gezocht naar een eenvoudige uitbreiding van deze methode met als doel het verlagen van de detectiegrens.

Experimenten met gelpermeatie, Sep-pak en Etrelut konden echter niet leiden tot het verlagen van die detectiegrens.

Gezocht werd naar andere methoden en pre-column derivatiseren van aflatoxine B₁ met trifluorazijnzuur werd toegepast.

Dit resulteerde in een methode waarmee aflatoxine B₁ in veevoeder kon worden bepaald tot op het 1 à 2 µg/kg niveau. Ook deze methode bleek echter te bewerkelijk voor routinematige analyses.

Door toepassing van post-column derivatiseren van aflatoxine B₁ met jodium werd met behulp van reversed-phase HPLC de absolute detectiegrens voor aflatoxine B₁ verlaagd van 2,5 naar 0,05 ng. Door gebruik te maken van een clean-up met twee-dimensionale dunnelaagchromatografie werd een voldoende schoon extract verkregen om, in combinatie met HPLC en post-column derivatiseren, aflatoxine B₁ te kunnen bepalen tot op het 0,5 à 1 µg/kg niveau. De recovery op het 5 µg/kg niveau bleek $85 \pm 5\%$ (n = 10).

In 60% van de onderzochte monsters werd bij de HPLC een tweetal laat eluerende componenten waargenomen, waardoor de chromatografische analyse ca. 30 minuten duurde.

Door een eluenswisseling toe te passen kan deze analysetijd worden ingekort tot ca. 15 minuten.

Conclusie:

Er werd een methode ontwikkeld waarmee op snelle en eenvoudige wijze het gehalte aan aflatoxine B₁ in veevoeder kan worden bepaald met een detectiegrens van 0,5 - 1,0 µg/kg. De recovery op een niveau van 5 µg/kg bedraagt $85 \pm 5\%$ en met behulp van deze methode is het mogelijk om 15-20 monsters per dag te analyseren. Indien de vloeistofchromatografische injectie wordt geautomatiseerd kan dit aantal worden verhoogd tot ca. 40 monsters.

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

Samensteller: W. Haasnoot *WHS*

Projectleider: W. Haasnoot *WHS*

Inleiding:

In Nederland geldt een tolerantie voor het gehalte aan aflatoxine B₁ in veevoeder van 20 µg/kg (1).

Circa 1-2% van het aflatoxine B₁ kan in de vorm van aflatoxine M₁ via de koe in de melk worden uitgescheiden (2). Indien een koe 10 kg rundveevoeder per dag consumeert en deze 25 kg melk produceert, dan betekent dit, bij een aflatoxine B₁ gehalte in het voer van 20 µg/kg, dat in de melk een aflatoxine M₁ gehalte van ca. 0,16 µg/kg kan worden gevonden.

De Landbouw Advies Commissie heeft echter voor het gehalte aan aflatoxine M₁ in melk een richtlijn vastgesteld van maximaal 0,05 µg/l (zie ook de Nederlandse Staatscourant van 20-7-'82 nr. 136). Om aan dit gehalte te kunnen voldoen moet de tolerantie van aflatoxine B₁ in het voer omlaag naar 5 µg/kg.

Een vastgestelde tolerantie voor aflatoxine M₁ in melk heeft vermoedelijk tot gevolg dat de melkproducenten een meer uitgebreide controle wensen op aflatoxine B₁ in veevoerders.

Een snelle methode voor het bepalen van aflatoxine B₁ in veevoeder met als detectiegrens 1 µg/kg of lager is dus gewenst.

In 1975 werd een methode voor het bepalen van het gehalte aan aflatoxine B₁ in veevoerders gepubliceerd (3). Aflatoxine B₁ werd hierbij uit veevoeder geextraheerd met chloroform en het extract werd gezuiverd door middel van een vloeistof-vloeistofverdeling en kolomchromatografie. Het gezuiverde extract werd onderworpen aan twee-dimensionale dunnelaagchromatografie volgens de antidiagonale techniek (4) en aflatoxine B₁ werd visueel en/of densitometrisch bepaald.

Aflatoxine B₁ kan op deze wijze in veevoeder worden bepaald tot op het 1 µg/kg niveau. Deze methode is echter arbeidsintensief en voor de routinematige analyse van veel monsters niet geschikt.

Door elimineren van de zuiveringsstappen in bovengenoemde methode werd een veel snellere methode verkregen waarbij aflatoxine B₁ in veevoeder kan worden bepaald tot het niveau van 5 µg/kg (z.g. screeningsmethode) (5). Deze methode werd tot nu toe als intern voorschrift gebruikt bij de routinematige analyses, echter een verlaging van de detectiegrens is gezien bovengenoemde problematiek gewenst.

Uitgevoerd onderzoek:

1. Uitbreiding van intern voorschrift nr. F 21:

Allereerst werd gezocht naar een eenvoudige uitbreiding van het tot nu toe gebruikte interne voorschrift met als doel het verwijderen van interfererende componenten, waardoor meer monsterextract op de dunne-laagplaat kan worden gebracht, met als gevolg een lagere detectiegrens.

1.1 Gelpermeatie:

Aangezien op de afdeling Contaminanten een geautomatiseerd gelpermeatiesysteem aanwezig was, werd getracht hiervan gebruik te maken bij de opwerking van de veevoeders. Bij dit systeem werd gebruik gemaakt van een Bio-beads SX-3 kolom en een mengsel van tolueen en ethylacetaat (1/1) als elutievloeistof.

Een vergelijking tussen een monsterextract zonder en met het gebruik van gelpermeatiechromatografie gaf, bij een visuele beoordeling van de desbetreffende dunnelaagchromatogrammen, als resultaat dat rond de aflatoxine B₁ vlek overeenkomstige stoorvlekken aanwezig waren.

Alleen bij stoorvlekken met veel grotere of kleinere R_f-waarden dan die van aflatoxine B₁ kon verschil worden aangetoond.

Hieruit kon geconcludeerd worden dat het gebruikte gelpermeatiesysteem geen effect had als clean-up bij veevoeders.

1.2 Sep-pak clean-up:

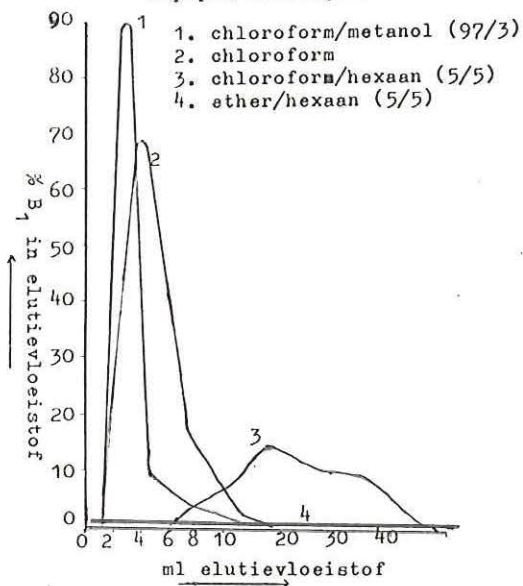
Een andere mogelijkheid was de toepassing van een kolom clean-up met behulp van Sep-pak.

1.2.1 Sep-pak silicagel:

Het elutiepatroon van aflatoxine B₁ op Sep-pak silicagel werd bepaald met vier elutievloeistoffen. In figuur 1 wordt dit patroon weergegeven. Gebruik makend van dit elutiepatroon werd aan 5 ml chloroform-extract van veevoeder 5 ml hexaan toegevoegd en dit mengsel werd over een Sep-pak kolom gebracht, waarbij aflatoxine B₁ achterbleef.

Vervolgens werd aflatoxine B₁ geelueerd met 5 ml chloroform/methanol (97/3).

figuur 1: elutiepatroon van aflatoxine B₁ op Sep-pak silicagel.



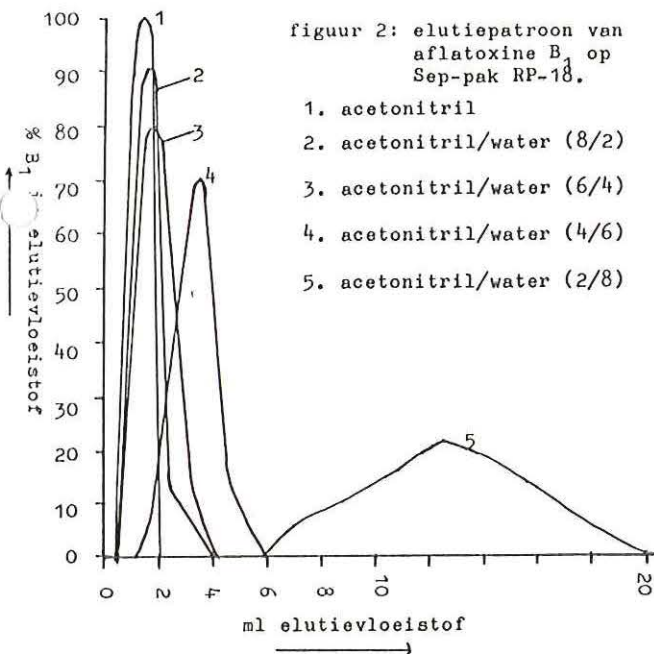
Een vergelijking tussen een monster-extract zonder en met deze kolom clean-up gaf, bij een visuele beoordeling van de desbetreffende dunnelaagchromatogrammen als resultaat dat vlak bij de aflatoxine B₁ vlek dezelfde stoornissen werden waargenomen en hieruit kon geconcludeerd worden dat deze clean-up geen effect had indien toegepast op veevoerders.

1.2.2 Sep-pak Reversed-phase (RP 18)

Het elutiepatroon van aflatoxine B₁ op Sep-pak RP 18 werd bepaald met mengsels van acetonitril en water in verschillende verhoudingen.

In figuur 2 wordt dit patroon weergegeven.

Getracht werd om een Sep-pak RP 18 clean-up te gebruiken na indampen van het chloroformextract van veevoeder.



figuur 2: elutiepatroon van aflatoxine B₁ op Sep-pak RP-18.

1. acetonitril
2. acetonitril/water (8/2)
3. acetonitril/water (6/4)
4. acetonitril/water (4/6)
5. acetonitril/water (2/8)

Hierbij werd gedacht aan het opnemen van het drooggedampte veevoeder-extract in acetonitril/water (2/8) en dit op de kolom te brengen, vervolgens na te spoelen met 2 ml van dit mengsel en hierna aflatoxine B₁ te elueren met 2 ml acetonitril. Echter na indampen van het veevoederextract en toevoegen van 4 ml acetonitril/water ontstond een zeer troebele oplossing, met als gevolg problemen bij het overbrengen op de kolom.

Geconcludeerd werd dat het veevoeder, na extractie met chloroform,

te veel in water onoplosbare stoffen bevatte om een Sep-pak RP 18 clean-up met succes te kunnen toepassen.

1.3 Extrelut:

Schweighardt (6) gebruikte bij de opwerking van diervoeders een met poreuse kieselgur gevulde kolom (Extrelut).

Na extractie van veevoeder met een mengsel van aceton en water (65/35) werd aan het extract een loodacetaatoplossing toegevoegd en na centrifugeren werd van het supernatant 20 ml op een extrelutkolom gebracht. Na 10 minuten werd geelueerd met een hexaan/ether mengsel, vervolgens met hexaan en uiteindelijk werd aflatoxine B₁ van de kolom geelueerd met een mengsel van chloroform/hexaan.

Deze methode werd nagewerkt en dunnelaagchromatografisch werd bekeken in hoeverre interfererende vlekken in het eindextract aanwezig waren. Het resultaat was dat dezelfde interfererende vlekken vlakbij aflatoxine B₁ aanwezig waren als bij voorgaande experimenten en tevens moet worden opgemerkt dat deze methode veel langduriger en bewerklijker is dan het door ons gebruikte interne voorschrift. Er werd geconcludeerd dat toepassing van extrelut geen verbetering geeft.

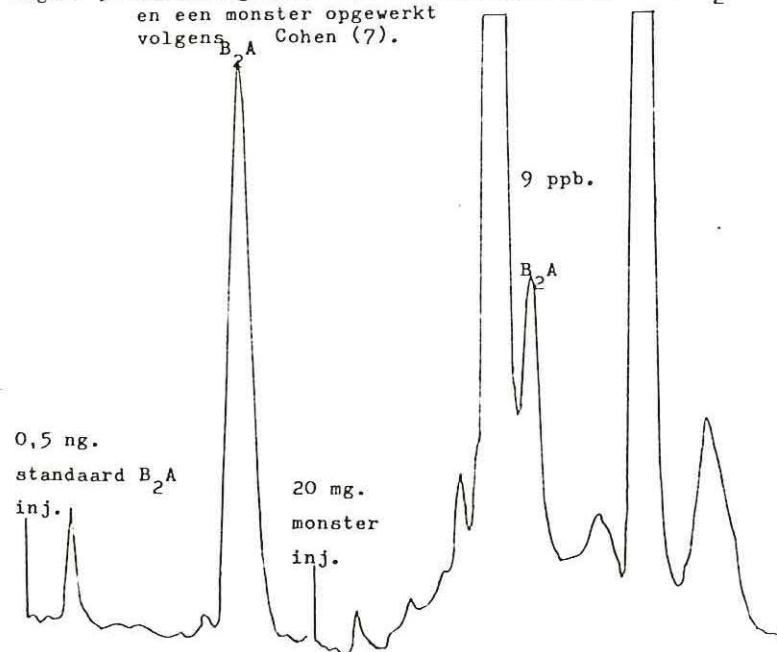
2. Nieuwe methoden:

Aangezien de hiervoor genoemde reinigingstechnieken weinig of geen verbetering opleverden bij de opwerking van veevoederextracten, werd in de literatuur gezocht naar methoden voor het bepalen van aflatoxine B₁ in veevoeder.

2.1 Pre-column derivatiseren met behulp van trifluorazijnzuur:

Cohen (7) bepaalde aflatoxinen in granen en diervoeders door deze te extraheren met een mengsel van acetonitril en water. Het extract werd

figuur 3: chromatogrammen van een standaard aflatoxine B₂A en een monster opgewerkt volgens Cohen (7).



02104.4

gezuiverd met behulp van een Sep-pak silicagel kolom en na reactie met trifluorazijnzuur werden de aflatoxinen gescheiden met behulp van reversed-phase HPLC. Aflatoxine B₁ werd als aflatoxine B₂A gedetecteerd met behulp van een fluorescentiedetector.

De detectiegrens van deze methode zou liggen op het 2,5 µg/kg niveau met recoveries variërend tussen 82 en 99%.

Deze methode werd nagewerkt en de chromatogrammen van een standaardoplossing van aflatoxine B₂A en van 20 mg mengvoeder, met een aflatoxine B₁ gehalte van ca. 10 µg/kg zijn weergegeven in figuur 3.

Zoals te zien in deze figuur was in het monsterextract een component aanwezig die vlak voor aflatoxine B₂A elueerde.

Dit maakt de methode ongeschikt voor het bepalen van aflatoxine B₁ in mengvoerders beneden het niveau van 5 µg/kg.

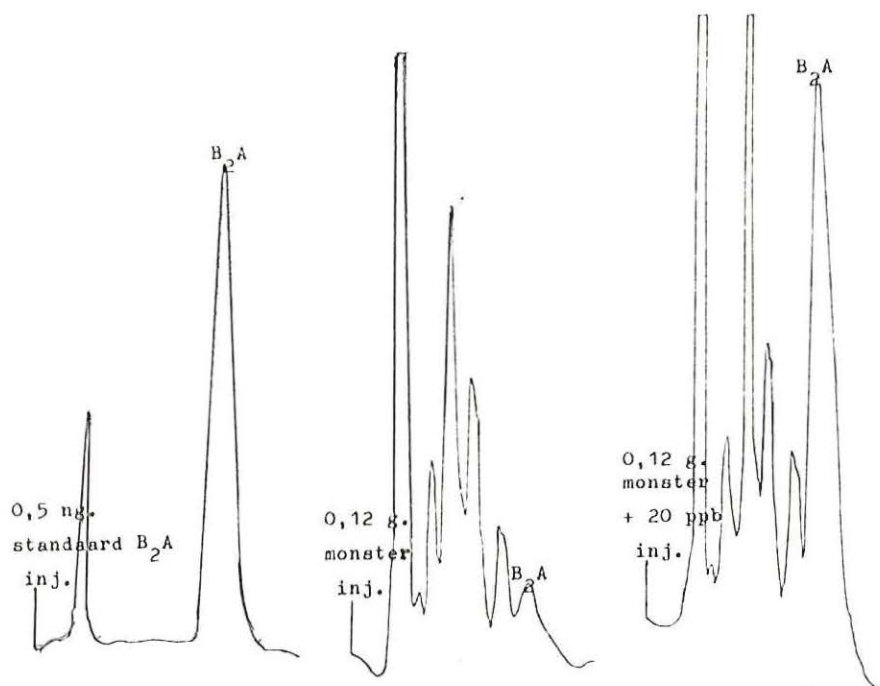
2.2 Via het Spelderholt werd een voorlopig intern voorschrift omtrent het bepalen van de aflatoxinen B₁, B₂, G₁ en G₂ in veevoeder verkregen. Hierbij werden de aflatoxinen uit het voer geëxtraheerd met een mengsel van aceton en water. Na filtreren van het extract werd water en een loodacetaatoplossing toegevoegd en na filtreren van deze oplossing werd geëxtraheerd met chloroform en een mengsel van chloroform en aceton. Na drogen en indampen van het chloroformextract werd een silicagel clean-up toegepast en het aflatoxine B₁ houdende eluaat werd drooggedampt, waarna trifluorazijnzuur werd toegevoegd.

Deze oplossing werd verdund met een mengsel van water en acetonitril en de aflatoxinen werden gescheiden met behulp van Reversed-phase HPLC en gedetecteerd met behulp van een fluorescentiedetector. Met deze methode zou aflatoxine B₁ in het voer kunnen worden bepaald tot het niveau beneden 1 µg/kg.

Deze methode werd nagewerkt met mengvoeder als matrix.

In figuur 4 zijn chromatogrammen weergegeven van een standaard aflatoxine B₂A, een monster (0,12 g) en een monster met toevoeging van aflatoxine B₁ op het niveau van 20 µg/kg.

figuur 4: chromatogrammen van een standaard aflatoxine B₂A en van een monster en een monster met toevoeging, opgewerkt met de methode van het Spelderholt.



In het monsterextract werd, op detectiegrensniveau, een piek op de aflatoxine B₂A plaats waargenomen welke overeenkomt met een aflatoxine B₁-gehalte van 2 µg/kg. De recovery op het niveau van 20 µg/kg bedroeg 77%.

Een nadeel was dat de aflatoxine B₂A piek vlak achter een interfererende component elueerde en de aflatoxine B₂A piek zelf zeer breed was. In vergelijking met chryseen ($k'=5$) werd op dezelfde kolom voor aflatoxine B₂A ($k'=3$) een ca. tien maal zo klein schotelgetal gevonden. Hieruit werd geconcludeerd dat Lichrosorb RP18 geen ideale kolomvulling was voor aflatoxine B₂A.

Op een Lichrosorb RP8 kolom werd eenzelfde verschijnsel waargenomen. Ondanks het feit van een brede aflatoxine B₂A piek moest worden geconcludeerd dat deze methode, vanwege een detectiegrens op 1 à 2 µg/kg niveau, de beste resultaten gaf.

Voor routinematige analyses van grote aantallen veevoeders is de methode echter vrij bewerkelijk en getracht werd om deze te vereenvoudigen door het inpassen van een Sep-pak silicagel clean-up.

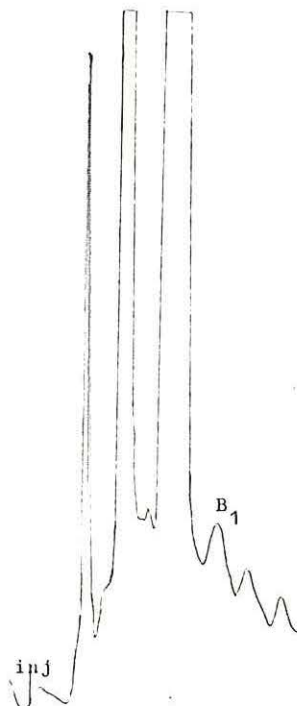
De extractie werd op gelijke wijze uitgevoerd als beschreven in het voorlopige interne voorschrift van het Spelderholt, echter na indampen van het chloroformextract werd het residu opgenomen in een mengsel van ether en hexaan (1/1) en op een Sep-pak kolom gebracht, vervolgens werd nagespoeld met dit mengsel en aflatoxine B₁ werd geelueerd met een mengsel van chloroform en methanol (97/3).

Na indampen van het eluaat en derivatiseren met trifluorazijnzuur werd weer op gelijke wijze gehandeld als bij de Spelderholt methode.

In figuur 5 wordt een chromatogram weergegeven welke werd verkregen na injectie van 0,11 g op deze wijze behandeld veevoeder (hetzelfde veevoeder als gebruikt bij figuur 4).

Het aflatoxine B₁ gehalte in dit monster was 2 µg/kg en wat opvalt is dat er voor aflatoxine B₂A een brede stoorpiek aanwezig was. Ondanks deze stoorpiek bleek het toch mogelijk om aflatoxine B₁ te kunnen bepalen tot op het 1 à 2 µg/kg niveau en deze clean-up werkt sneller dan die gebruikt door het Spelderholt, terwijl met een recoveryproef, op het 20 µg/kg niveau, een overeenkomstige waarde van ca. 80% werd verkregen.

figuur 5: chromatogram van 0,11 g
monster opgewerkt met methode
Spelderholt en Sep-pak silicagel
bij de clean-up.
gehalte B₁ 2ppb.

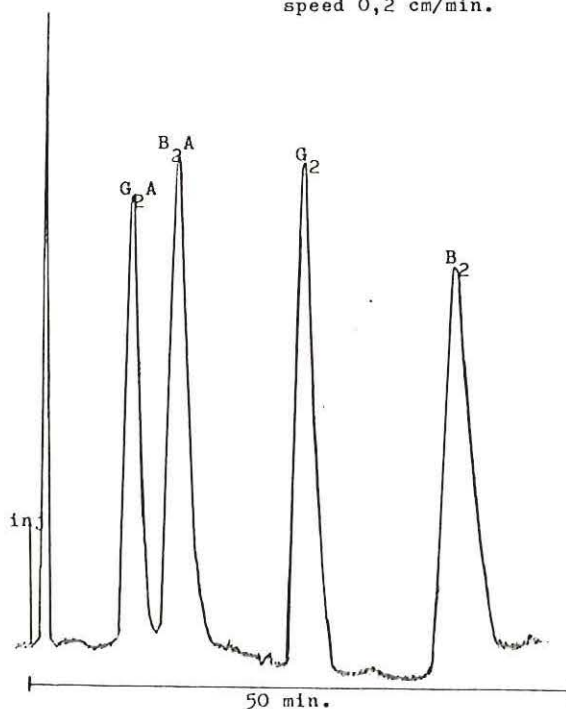


Vervolgens werd een standaardmengsel van de vier aflatoxinen gederiviseerd met trifluorazijnzuur en op hetzelfde HPLC systeem gescheiden. In figuur 6 wordt het verkregen chromatogram weergegeven.

De vier aflatoxinen zijn tot op de basislijn gescheiden en de aflatoxinen B₁, B₂, en G₂ kunnen in veevoeders worden bepaald tot op het 1 à 2 µg/kg niveau.

Het bepalen van aflatoxine G₁ in veevoeders geeft problemen omdat het gederivatiseerde produkt aflatoxine G₂A tussen een aantal interfererende componenten elueert.

figuur 6: chromatogram van een gederivatiseerde standaardoplossing van de aflatoxinen B₁, B₂, G₁ en G₂ (4 ng per aflatoxine).
Conditie: kolom: Lichrosorb 5 µm RP18
eluens: water/methanol/acetonitril
18 / 4 / 3
flow: 1 ml/min.
speed 0,2 cm/min.



2.3 Pre-column derivatiseren met jodium:

Davis (8) publiceerde een methode waarbij aflatoxine B₁ werd gederivatiseerd met een jodiumoplossing. Het gederivatiseerde aflatoxine B₁ werd vervolgens gechromatografeerd op een Bondapak RP18 kolom met een mengsel van methanol en water als mobiele fase.

De retentietijd van het gederivatiseerde aflatoxine B₁ is korter dan die van niet gederivatiseerde aflatoxine B₁ en in tabel 1 worden de retentietijden van de aflatoxinen op dit systeem weergegeven.

De fluorescentieintensiteit van aflatoxine B₁ nam met een factor 25 toe indien met jodium werd gederivatiseerd.

Een nadeel van het pre-column derivatiseren van aflatoxine B₁ met jodium was dat bij de hogedrukvlloeistofchromatografische scheiding meerdere gederivatiseerde componenten werden waargenomen en Davis adviseerde om deze methode te gebruiken als confirmatiemethode.

Tabel 1: Retentietijden van aflatoxinen en derivaten volgens Davis (8)

<u>aflatoxine</u>	<u>retentietijd in min</u>
B ₁	12
B ₂	11
G ₁	10
G ₂	9
I ₂ -B ₁	7,5
I ₂ -G ₁	6,0
B ₂ A	5,5

2.4 Post-column derivatiseren met jodium:

Thorpe (9) introduceerde op het internationale symposium voor mycotoxinen en phycotoxinen in Wenen een methode voor het bepalen van aflatoxinen in graan en pindakaas, waarbij gebruik werd gemaakt van HPLC met een fluorescentiedetector en post-column derivatisering met een verzadigde jodiumoplossing. Met behulp van dit systeem werden van de aflatoxinen B₁ en G₁ sterk fluorescerende jodiumderivaten gemaakt. Alvorens dit post-column systeem te gaan gebruiken bij de ontwikkeling van een methode voor het bepalen van aflatoxine B₁ in veevoeder werden een aantal statische experimenten uitgevoerd om het effect van temperatuur, concentratie reagens, concentratie aflatoxine B₁ enz. op de reactie te onderzoeken.

2.4.1 Statische experimenten:

In de publicaties van Thorpe (9) en Davis (8) werd een verzadigde waterige oplossing van jodium als reagens gebruikt.

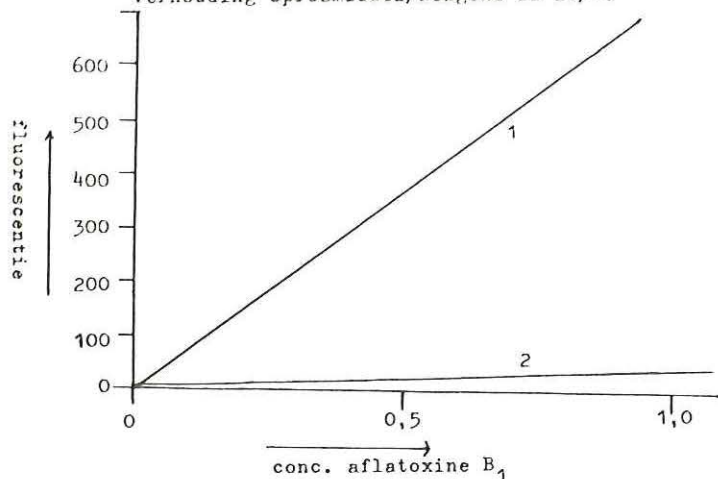
Aan 1 gram jodium werd 200 ml water toegevoegd en na 15 minuten mengen werd gefiltreerd. Dit reagens werd in de hiervolgende experimenten gebruikt.

2.4.1.1 Davis maakte een standaardoplossing van het jodiumderivaat van aflatoxine B_1 door 1 ml verzadigde waterige jodiumoplossing toe te voegen aan 20 ml waterig aflatoxine B_1 oplossing.

Vervolgens werd gedurende 15 seconden verwarmd in een kokend waterbad. Op gelijke wijze werd een gederivatiseerde standaardoplossing gemaakt en hiervan werden fluorescentiespectra opgenomen.

Het excitatiemaximum (364 nm) en het emissiemaximum (420 nm) van het jodiumderivaat zijn gelijk aan die van het niet gederivatiseerde aflatoxine B_1 . De fluorescentieintensiteit van de gederivatiseerde standaardoplossing bleek een factor 15 hoger dan die van niet gederivatiseerd aflatoxine B_1 .

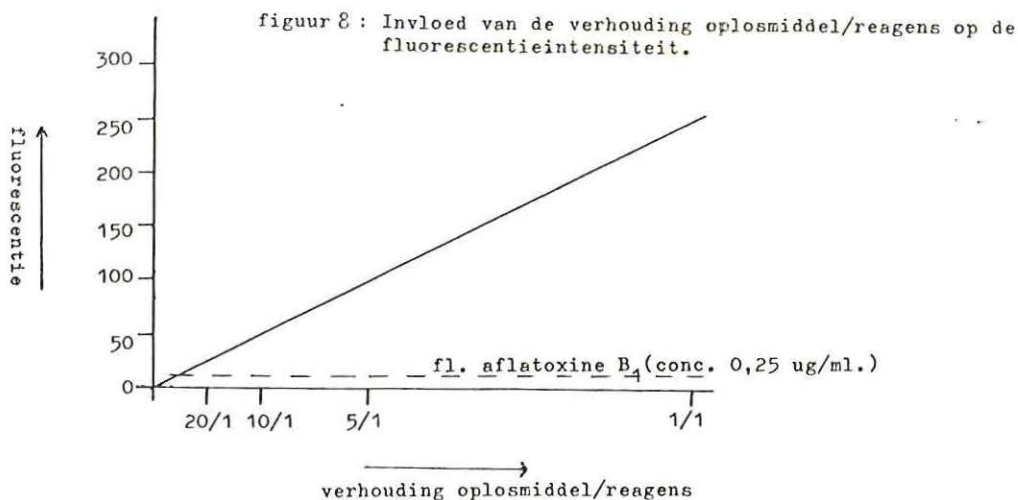
figuur 7: ijklijnen van gederivatiseerde aflatoxine B_1 (1) en van niet gederivatiseerde aflatoxine B_1 (2), opgelost in methanol/water (20/1). Verhouding oplosmiddel/reagens is 20/1.



2.1.4.2 Vervolgens werd een ijklijn van gederivatiseerde en van niet gederivatiseerde aflatoxine B_1 gemaakt en het resultaat is weergegeven in figuur 7. De fluorescentieintensiteit van het gederivatiseerde aflatoxine B_1 was lineair binnen het onderzochte concentratiegebied.

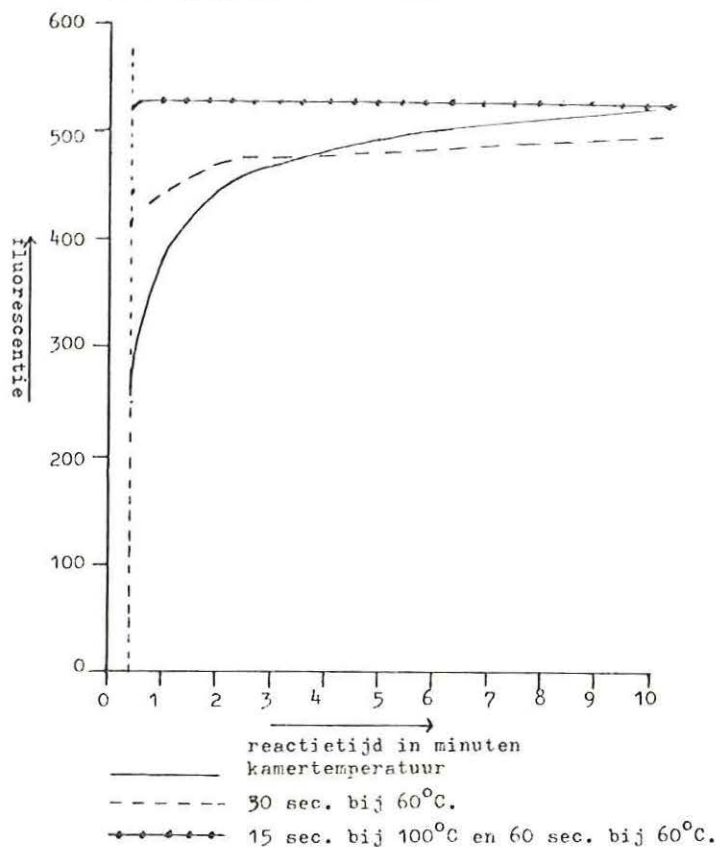
2.4.1.3 Om invloed van de jodiumconcentratie op de fluorescentieintensiteit te kunnen beoordelen werd aan een aflatoxine B_1 -oplossing verschillende hoeveelheden verzadigde jodium-oplossing toegevoegd, waarna de eindconcentratie van aflatoxine B_1 op 0,25 $\mu\text{g/ml}$ werd gebracht.

De verhouding oplosmiddel/reagens werd uitgezet tegen de fluorescentie (zie figuur 8) en hieruit is gebleken dat de fluorescentie toeneemt bij grotere jodiumconcentratie.



2.4.1.4 Vervolgens werd de invloed van de reactietemperatuur bekeken. Gelijk aan Davis (8) werd de reactie gedurende 15 seconden bij 100°C uitgevoerd en in figuur 9 is te zien dat nadien een constante fluorescentieintensiteit werd waargenomen. Indien de reactie bij kamertemperatuur wordt uitgevoerd en direkt de fluorescentieintensiteit wordt gemeten blijkt deze de helft van die van voorgaand experiment en loopt vervolgens op tot een maximale intensiteit die na 10 minuten is bereikt.

figuur 9: Invloed van reactietemperatuur op de fluorescentieintensiteit.



Een 0,5 minuut verwarmen bij 60°C geeft een iets lagere fluorescentieintensiteit maar indien gedurende 1 minuut bij 60°C wordt verwarmd wordt een gelijke fluorescentieintensiteit waargenomen als na 15 seconden bij 100°C te hebben verwarmd.

Voor een optimaal reactieverloop moet dus gedurende 15 seconden bij 100°C of gedurende 60 seconden bij 60°C worden verwarmd. De statische experimenten samenvattend kan gezegd worden dat indien de manier van Davis (8) (verhouding oplosmiddel/reagens 20/1) wordt toegepast de fluorescentieintensiteit met een factor 15 toeneemt.

Door de concentratie van het reagens te verhogen kan de toename van de fluorescentieintensiteit worden vergroot tot een factor van ca. 100. De optimale combinatie reactietijd en reactietemperatuur is 15 seconden bij 100°C of 60 seconden bij 60°C.

2.4.2 Experimenten met HPLC en post-column derivatiseren:

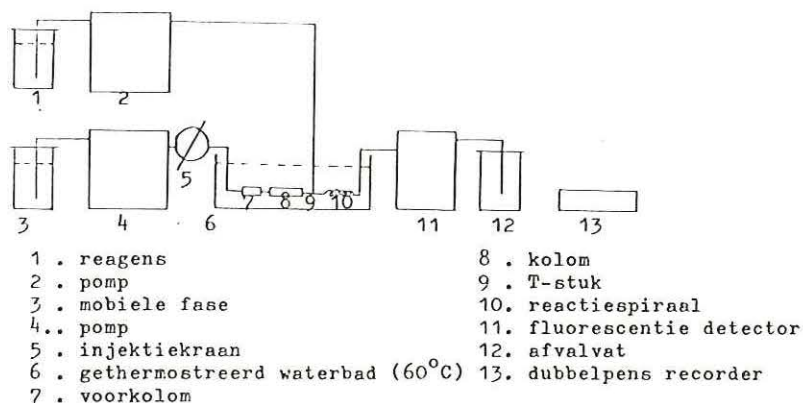
Thorpe (9) gebruikte als reactiespiraal een 3 meter lange teflon leiding met een inwendige diameter van 0,5 mm (volume 0,6 cm³).

Door een flow van de mobiele fase en het reagens van respectievelijk 0,29 en 0,11 ml/min te nemen werd een reactietijd van 1,5 minuut gecreëerd. De temperatuur van de kolom en reactiespiraal werd op 60°C gethermosteerd.

De gebruikte kolom was een Spherisorb ODS en als mobiele fase werd een mengsel van 0,01 M KH₂PO₄, acetonitril en methanol (60 : 22,5 : 17,5) gebruikt.

Een schema van de door ons gebruikte opstelling is weergegeven in onderstaande figuur. De condities waarbij de experimenten zijn uitgevoerd worden hieronder beschreven:

figuur 10: schematische voorstelling van de gebruikte opstelling bij HPLC met Post-column derivatisering.



kolom: Cptm microsphere C18
(lengte 10 cm, id = 4,6 mm)
eluens: acetonitril/water 3/7
flow: 0,5 ml/min
fluorescentiedetector: ex 360 nm en
em > 420 nm
stand: gain 32
ruisfilter: Spectrum 1021 cut off
freq 0,01 Gain 1.
reagens: verzadigde waterige jodium-
oplossing
spiraal: teflon - lengte 3 meter
id 0,5 cm

Het reagens werd met behulp van een T-stuk loodrecht op de mobiele fase toegevoegd.

In eerste instantie werd met de hierboven weergegeven opstelling en condities aflatoxine B₁ bij 20°C gechromatografeerd zonder gebruik te maken van een post-column derivatisering.

Onder dezelfde omstandigheden werden de aflatoxinen G₁, G₂ en B₂ geïnjecteerd.

De retentietijden en de absolute detectiegrenzen voor de vier aflatoxinen zijn:

	<u>retentietijd</u>	<u>absolute detectiegrens</u>
aflatoxine B ₁	6,8 min	2,5 ng
" B ₂	5,0 min	0,025 ng
" G ₁	5,4 min	2,5 ng
" G ₂	4,1 min	0,05 ng

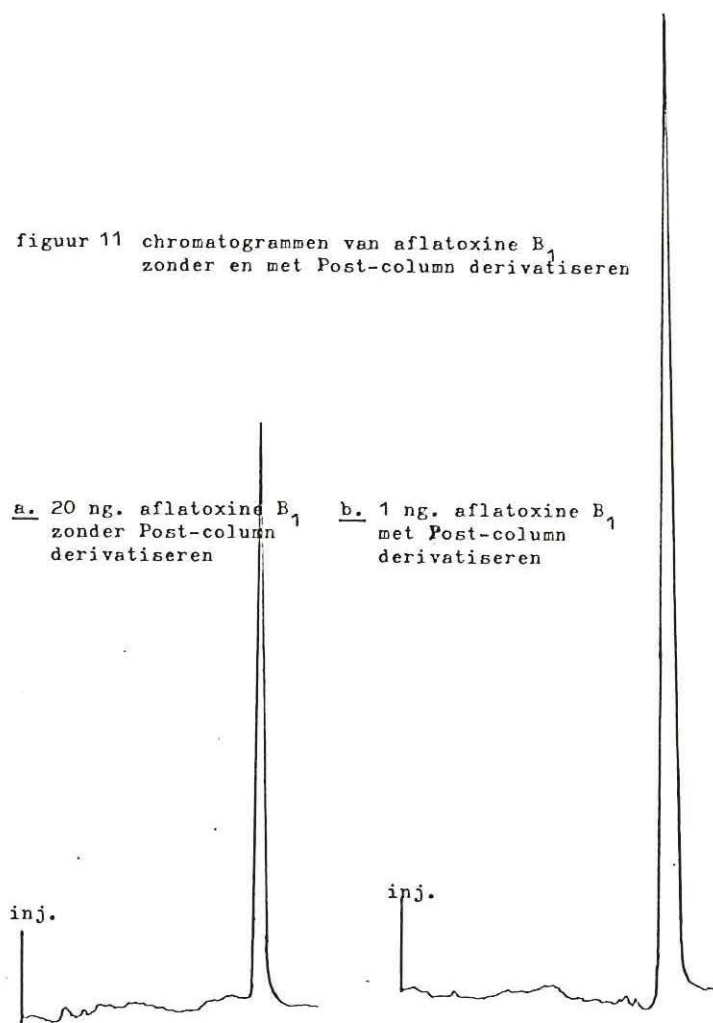
Vervolgens werd bij 60°C aflatoxine B₁ in het systeem gebracht en zowel zonder als met post-column derivatisering gedetecteerd.

Het resultaat is weergegeven in figuur 11.

De gevoeligheidswinst ten gevolge van het post-column derivatiseren bedroeg een factor 35, berekend op piekhoogte en een factor 50 berekend op piekoppervlakte. Deze gevoeligheidswinst is in overeenstemming met die welke Thorpe (9) vermeldde.

De absolute detectiegrens voor aflatoxine B₁ werd door middel van het post-column derivatiseren met jodium verlaagd van 2,5 ng naar 0,05 ng. Vervolgens werd bij gelijke flow van de mobiele fase (0,5 ml/min) de flow van het reagens gevarieerd. Bij toevoegen van meer reagens nam de piekhoogte van het gederivatiseerde B₁ af en een optimale piekhoogte werd verkregen bij een reagensflow van 0,3 ml/min.

figuur 11 chromatogrammen van aflatoxine B₁
zonder en met Post-column derivatiseren



2.5 Monstervoorbewerking:

Een absolute detectiegrens van 0,05 ng aflatoxine B₁ gaf een goede uitgangspositie voor het bepalen van aflatoxine B₁ in mengvoeder.

Voor het doen verkrijgen van een detectiegrens van 1 µg/kg was het noodzakelijk om 0,05 g monster te injecteren.

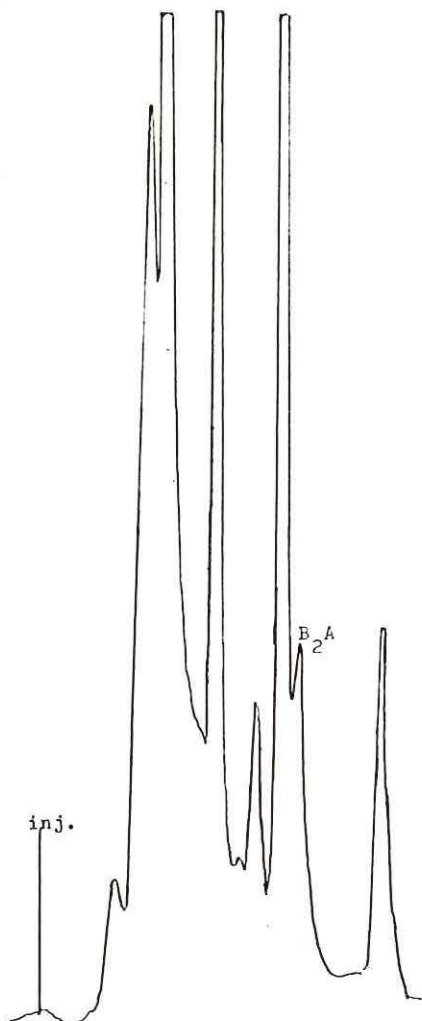
Het vinden van een snelle monstervoorbewerking, welke een voldoende schoon extract op zou leveren om 0,05 g monster te kunnen injecteren zonder last te hebben van interferenties op de aflatoxine B₁ plaats was het doel.

2.5.1 In eerste instantie werd een mengvoeder opgewerkt volgens het EEG-voorschrift (10).

Schema 1: schematische voorstelling van de monstervoorbewerking gebruikt naar aanleiding van het EEG voorschrift.

5 g monster
+ 2,5 g celite
+ 2,5 ml water
+ 25 ml chloroform
|
30 min schudden
en filtreren
|
5 ml chloroform
+ 10 ml hexaan
|
silicagel kolom (2 g)
|
elueren met 20 ml ether
|
B₁ elueren met
30 ml chloroform/methanol (97/3)
|
indampen en opnemen
in 1 ml acetonitril
|
20 µl injectie (0,02 g)

figuur 12: chromatogram van een monsterextract (0,02 g.), opgewerkt volgens EEG methode (mobile fase acetonitril/water 3/7)

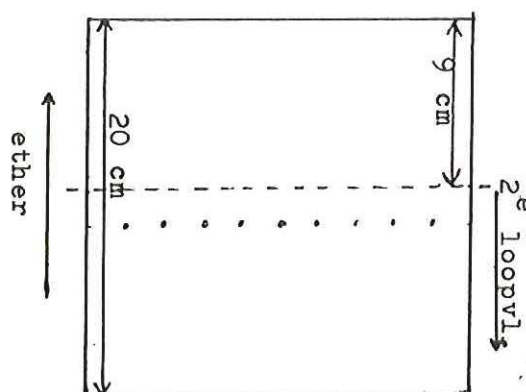


Na injectie van dit monsterextract in het HPLC-systeem met post-column derivatiseren werd een chromatogram verkregen zoals is weergegeven in figuur 12. Aflatoxine B_1 lag vlak achter een stoorpiek. Door het eluens te veranderen van acetonitril/water (3/7) naar een verhouding van 2/8 verschoof deze stoorpiek van vlak voor aflatoxine B_1 naar vlak erachter. Deze opwerking was dus niet geschikt voor het bepalen van aflatoxine B_1 in mengvoeders tot op het 1 $\mu\text{g/kg}$ niveau.

2.5.2 Gedacht werd om de methode volgens het intern voorschrift nr F 21 te gebruiken en na de tweedimensionale TLC aflatoxine B_1 van de plaat te extraheren.

Een nadeel was echter dat bij dit voorschrift per dunnelaagplaat slechts één monster kon worden opgebracht.

In een publicatie van de Bundesamt für Gesundheitswesen in Zwitserland (11) werd een methode weergegeven voor het bepalen van aflatoxine M_1 in melk waarbij gebruik werd gemaakt van twee-dimensionale dunnelaagchromatografie waarbij meerdere monsters op een plaat werden gebracht. De monsters en standaarden werden opgebracht zoals aangegeven in figuur 13.



figuur 13: tweedimensionale dunnelaagchromatografie volgens (11).

Na de eerste maal ontwikkelen met ether, waarbij de aflatoxinen niet elueren, werd op de stippellijn de plaat doorgeknipt en vervolgens in de tegenovergestelde richting geelueerd met een tweede loopvloeistof. Bij deze manier van chromatograferen kunnen op één TLC-plaat van 20 x 20 cm zes monsters en drie standaarden worden opgebracht. Deze techniek wordt toegepast bij de bepaling van aflatoxine B₁ in veevoeder.

De extractie zoals beschreven onder 2.5.1 werd gebruikt waarna 5 ml chloroformextract werd ingedampt tot 200 µl en hiervan werd 40 µl (= 0,2 g) op de dunnelaagplaat gebracht.

Voor dit experiment werden Alufolien kieselgelplaten gebruikt.

Ook hier werd als eerste loopvloeistof ether gebruikt, waarbij aflatoxine B₁ op de plaats bleef waar het was opgebracht.

De plaat werd na de eerste maal ontwikkelen afgeknipt, zoals eerder beschreven en in de tegenovergestelde richting geelueerd met een mengsel van chloroform, aceton en water (88/12/0,2).

Na elutie werd aan de hand van de opgebrachte standaarden de aflatoxine B₁ vlek uit het monster gelocaliseerd.

Het stukje dunnelaagplaat waarop aflatoxine B₁ aanwezig was werd uitgeknipt en de silicagel werd met behulp van een scalpel afgekrabd.

De silicagel werd via een trechter in een pasteurpipet gebracht waarin een prop glaswol was aangebracht. Aflatoxine B₁ werd van de silicagel geelueerd met een mengsel van dichloormethaan en aceton (6/4).

Vervolgens werd het eluaat ingedampt en het residu opgenomen in 100 µl methanol, waarvan 20 µl (0,04 g) werd geïnjecteerd in een vloeistofchromatograaf met post-column derivatisatie.

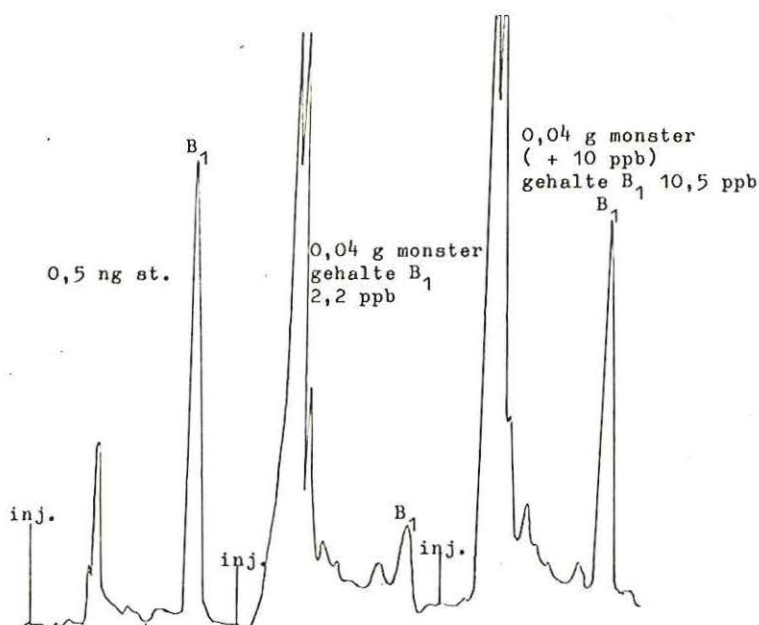
De standaard aflatoxine B₁ welke bij de HPLC moest worden gebruikt werd in methanol opgelost omdat het in dit oplosmiddel meer stabiel was dan in acetonitril.

Een 20 µl injectie van deze standaardoplossing (0,5 ng) gaf een gemiddelde piekhoogte van 11,4 cm. De ruis bedroeg 0,3 cm en de absolute detectiegrens voor aflatoxine B₁ was dus 0,04 ng.

Volgens bovenstaande wijze werd een monster veevoeder en dit monster met toevoeging van aflatoxine B₁ (in viervoud), op het 10 µg/kg niveau, onderzocht.

In figuur 14 worden chromatogrammen van een standaard, een monster en een monster met toevoeging weergegeven.

figuur 14: chromatogrammen van een standaard aflatoxine B₁,
een monster en een monster met toevoeging (10 ppb),
met 2-dim. TLC als clean-up.



Het aflatoxine B₁ gehalte in het monster bedroeg 2,2 µg/kg en de gehalten in de monsters met toevoeging waren resp.:

10,1 µg/kg

10,5 "

11,0 "

9,6 "

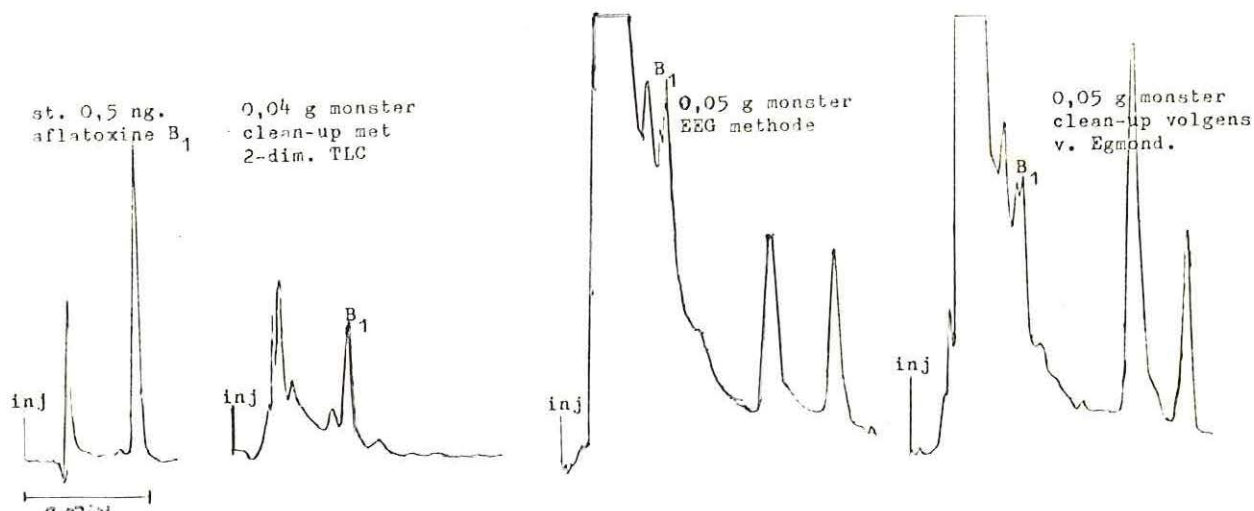
Het gemiddelde aflatoxine B₁ gehalte in de monsters met toevoeging bedroeg $10,3 \pm 0,7$ µg/kg.

Hieruit bleek dat het resultaat een spreiding vertoonde die kleiner was dan 10% en de recovery bedroeg $81 \pm 7\%$. De detectiegrens was 1 µg/kg.

Het voordeel van een twee-dimensionale dunnelaagchromatografische clean-up wordt nogmaals bewezen door een op deze wijze opgewerkt mengvoeder te vergelijken met de opwerking volgens het EEG-voorschrift en met de clean-up welke Van Egmond (12) en Stubblefield (13) gebruikten bij hun methoden voor het bepalen van aflatoxine B₁ in resp. levensmiddelen en lever.

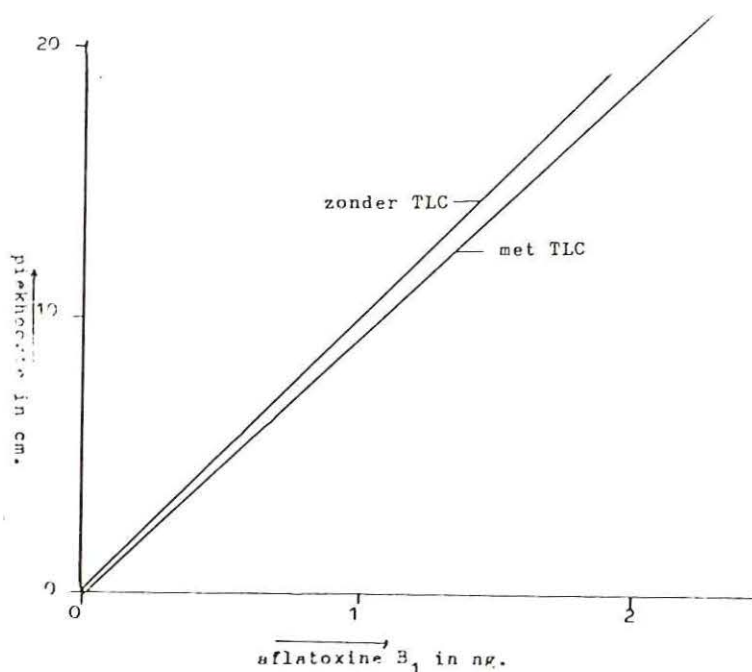
Bij laatstgenoemde methode werd het chloroformextract gezuiverd op een silicagelkolom met als elutievloeistoffen: chloroform/hexaan (1/1), tolueen/ijsazijn (9/1), hexaan, acetonitril/ether/hexaan (5/30/65) en aflatoxine B₁ werd geelueerd met een mengsel van chloroform en aceton (4/1). In figuur 15 worden de chromatogrammen weergegeven die werden verkregen met behulp van bovenstaande methoden en hieruit blijkt dat de twee-dimensionale dunnelaagchromatografische clean-up het beste resultaat gaf omdat hierbij aflatoxine B₁ volledig gescheiden is van interfererende componenten uit de matrix.

figuur 15: chromatogrammen verkregen na opwerking van een mengvoeder m.b.v. 2-dim. TLC, EEG methode en clean-up volgens v. Egmond en reversed phase HPLC met Post-column derivatiseren met jodium.



In het voorgaande experiment werd na de twee-dimensionale TLC clean-up het stukje dunnelaagplaat, waarop aflatoxine B₁ aanwezig was, uitgeknipt en de silicagel werd met behulp van een scalpel afgekrabd. Dit afkrabben werkte voldoende nauwkeurig maar is bewerkelijk. Gedacht werd om het stukje dunnelaagplaat te extraheren met een mengsel van dichloormethaan en aceton (6/4).

figuur 16: ijklijnen van standaard aflatoxine B₁ met en zonder twee-dim. TLC clean-up.



Het stukje dunnelaagplaat (2 x 1 cm) werd in een cultuurbuis gebracht en vervolgens werd 4 ml dichloormethaan/aceton toegevoegd en na 1 min mengen met behulp van een vortex mixer werd de extractievloeistof gefiltreerd in een tweede cultuurbuis. Bij deze filtratie werd gebruik gemaakt van een trechter waar in de hals een prop glaswol stevig was aangebracht. Het stevig aanbrengen van het glaswol is belangrijk omdat geen silicagel, afkomstig van de dunnelaagplaat, in het filtraat terecht mag komen. De eerste cultuurbuis werd nagespoeld met resp. 2 en 1 ml dichloormethaan/aceton en dit werd eveneens gefiltreerd in de tweede cultuurbuis. De extractievloeistof werd drooggedampt in een waterbad van 50°C en onder een constante stikstofstroom en het residu werd opgelost in 100 µl methanol.

Deze mate van extractie werd in eerste instantie gecontroleerd door verschillende hoeveelheden aflatoxine B₁ op de dunnelaagplaat te brengen (van 0,3 tot 4 ng) en deze vervolgens op bovenstaande wijze te extraheren. Na de vloeistofchromatografische scheiding worden de piekhoogten van deze standaarden vergeleken met de HPLC standaarden en op deze wijze worden twee ijklijnen verkregen (zie figuur 16).

Hieruit is gebleken dat de recovery bij het extraheren van aflatoxine B₁ van de dunnelaagplaat $88 \pm 5\%$ bedroeg.

Wat opviel tijdens het onderzoek van een aantal monsters was dat in ca. 60% van die monsters een tweetal, op het HPLC systeem, laat eluerende componenten werd waargenomen.

Na interpretatie van de samenstelling van de onderzochte monsters werd geconcludeerd dat deze componenten aanwezig waren indien citruspulp was verwerkt.

Deze componenten beïnvloeden het bepalen van aflatoxine B₁ niet, maar zorgen voor een chromatografische analyseduur van ca. 30 minuten, terwijl aflatoxine B₁ na ca. 9 minuten van de kolom komt.

Gedacht werd om bij de dunnelaagchromatografische clean-up andere loopvloeistoffen te gebruiken bij de tweede maal ontwikkelen.

Onderstaande loopvloeistoffen werden toegepast:

- a. chloroform/aceton (9/1)
- b. chloroform/aceton (95/5)
- c. chloroform/aceton (97,5/2,5)
- d. chloroform/methanol (95/5)
- e. chloroform/methanol (97,5/2,5)
- f. dichloormethaan/aceton (8/2)
- g. dichloormethaan/aceton (9/1)
- i. dichloormethaan/aceton (95/5)
- j. ether/methanol/water (97/2,25/0,75)
- k. ether/methanol (97/3)
- l. tolueen/ethylacetaat/mierenzuur (5/4/1).

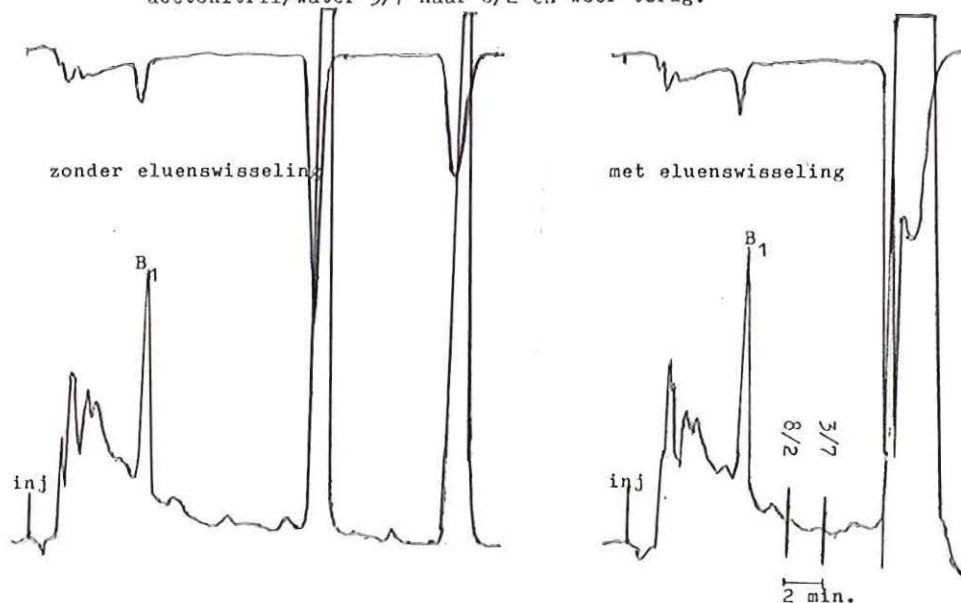
Alleen bij de laatste loopvloeistof werd voor aflatoxine B₁ een andere (lagere) R_f-waarde gevonden dan voor de interfererende citruspulpvlekken. Na elutie van aflatoxine B₁ van de dunnelaagplaat werd bij de HPLC inderdaad waargenomen dat de laat eluerende componenten waren verdwenen, echter rondom aflatoxine B₁ werden nu meer interfererende pieken waargenomen.

Besloten werd om de loopvloeistof chloroform/aceton/water (88/12/0,2) te handhaven.

De analysetijd bij de vloeistofchromatografie duurde, vanwege die twee laat eluerende componenten, ca. 30 minuten. Door, nadat aflatoxine B₁ van de kolom is gekomen, het eluens gedurende twee minuten om te zetten naar acetonitril/water (8/2), kan de analysetijd worden ingekort tot ca. 20 minuten (zie figuur 17).

De basislijn blijft, nadat van eluens is gewisseld, nog ca. 5 minuten onveranderd. Dit geeft de mogelijkheid om eerder van eluens te wisselen en wel 7 minuten na injectie. De analysetijd zou hierdoor kunnen worden ingekort tot ca. 15 minuten.

figuur 17: chromatogrammen van een monster mangvoeder
zonder en met eluenswisseling van
acetonitril/water 3/7 naar 8/2 en weer terug.



Om de reproduceerbaarheid van de methode te toetsen werd een monster in drievoud onderzocht. Het aflatoxine B_1 gehalte in dit monster was:
1,9 $\mu\text{g/kg}$
2,4 $\mu\text{g/kg}$
2,3 $\mu\text{g/kg}$.

Met hetzelfde monster werden recoveryproeven op het niveau van 5 $\mu\text{g/kg}$ uitgevoerd en aflatoxine B_1 werd voor $85 \pm 5\%$ teruggevonden.

Vervolgens werden een aantal monsters onderzocht volgens het interne voorschrift nr. F 21 en volgens de in deze verslagperiode ontwikkelde methode.

De verkregen aflatoxine B_1 gehalten volgens beide methoden zijn in tabel 2 weergegeven.

Tabel 2: Vergelijking van de aflatoxine B₁ gehalten, in mengvoeders, verkregen volgens intern voorschrift nr F 21 en met de nieuw ontwikkelde methode

Monsternummer	aflatoxine B ₁ gehalte in µg/kg	
	intern voorschrift nr. F 21	nieuwe methode
17482	< 5	3,8/4,5
25110	9	8,4
25598	< 5	3,8
25597	10	8,8
25667	6	4,4
24671	< 5	1,8
25877	< 5	3,0
25944	< 5	5,8
26785	< 5	4,9
26373	9	7,9
26372	9	6,1
26076	10	10,4
25875	< 5	0,8
26783	< 5	1,9
25874	< 5	3,3
26153	< 5	4,7
26154	11	9,0

Literatuur:

1. Bijlage bij de Verordening Vvr ongewenste stoffen en produkten (1975).
2. Patterson D.S.P., Glancy E.M., Roberts B.A.: Fed. Cosmet. Toxicol. 18 (1980) 35.
3. Tuinstra L.G.M.Th., Verhülsonk C.A.H., Bronsgeest J.M., Paulsch W.E.: Neth. J. Agric. Sci. 23 (1975) 10.
4. Beljaars P.R., Verhülsonk C.A.H., Paulsch W.E., Liem D.H.: J. Am. Ass. Off. Agric. Chem. 56 (1973) 1444.
5. RIKILT intern voorschrift nr. F 21: "Veevoeder: semi-kwantitatieve bepaling van het gehalte aan aflatoxine B₁".
6. Schweighardt H., Böhm, J., Liebetseder J.: Nutrition 2, 1 (1978) 3.
7. Cohen, H., Lapointe M.: J.AOAC, 64 (1981) 1372.
8. Davis N.D., Diener U.L.: J.AOAC, 63 (1980) 107.
9. Thorpe C.W., Ware G.M., Pohland A.E.: publicatie van het international IUPAC symposium on mycotoxins and phycotoxins in Wenen (1982) 52.
10. Bijlage bij EEG publicatie nr. L 102 (1976).
11. Publicatie van Bundesamt für Gesundheitswesen in Zwitserland, deel 2.
12. Egmond H.P., Deyll W.E., Paulsch W.E., Schuller P.C.: De Ware(n) Chemicus 3/4 (1980) 106.
13. Stubblefield R.D.: J. Am. Oil Chem. Soc. 56 (1979) 800.