Afdeling Contaminanten 1983-03-21

VERSLAG: 83.28 Pr.nr.: 404.0440
505.0420

Onderwerp: Het zearalenongehalte in graanprodukten en veevoeders.

Bijlage: Intern voorschrift F 71

Verzendlijst: direkteur, direktie VKA, sektorhoofd (2x), afdeling Contaminanten (12x), afdeling Normalisatie (Humme), projektbeheer, bibliotheek (5x).

8328

Afdeling Contaminanten. Datum: 1983-03-21

VERSLAG 83.28 Pr.nr. 404.0440
505.0420

Projekten: Inventariserend onderzoek naar het voorkomen van microbiele toxinen.
Ontwikkeling methoden voor het aantonen en bepalen van microbiele toxinen.

Onderwerp: Het zearalenongehalte in graanprodukten en veevoeders.

Bijlage: Intern voorschrift F 71.

Doel:
Het ontwikkelen van methoden om zearalenon te bepalen en te bevestigen in graanprodukten en veevoeders en met behulp van deze methoden nagaan in hoeverre graanprodukten en veevoeders besmet zijn met zearalenon. Aan de hand van de resultaten en gegevens uit de literatuur nagaan wat de consequenties kunnen zijn voor mens en dier.

Samenvatting:
Zearalenon werd aangetoond in graanprodukten in de meeste delen van de wereld. Dit mycotoxine veroorzaakt estrogene effekten, vooral bij varkens. Er is geen tolerantiegrens voor zearalenon vastgesteld, maar Marasas e.a. (10) menen dat in voedsel 500 µg/kg een biologisch significante grens is, vooral in voedsel wat bestemd is voor fokdieren (fokvarkens).
In de literatuur zijn een aantal experimenten beschreven waarin gekeken is naar de overdracht van zearalenon naar de melk, de resultaten waren niet eenduidig, maar er bleek wel overdracht plaats te vinden.
Een methode om zearalenon uit graanprodukten te extraheren bevat een extraktie met chloroform en fosforzuur, een zuivering met behulp van zuurbase extraktie en een scheiding door middel van HPLC met fluorescentiedetektie. Gebruik makend van deze methode kan zearalenon bepaald worden in graanprodukten (detektiegrens 5 µg/kg) en in veevoeders (detektiegrens 10 µg/kg).

De recovery bedraagt gemiddeld 71% op niveaus van 25-150 ppb. Bevestiging kan plaatsvinden met behulp van dunnelaag chromatografie (absolute detektiegrens ca. 50 ng) en met behulp van GC/MS (absolute detektiegrens ca. 0,25 ng). Om een inzicht te verkrijgen in hoeverre graanprodukten uit verschillende landen en veevoeders uit Nederland besmet zijn met zearalenon werden diverse graan- en veevoedermonsters onderzocht.

Conclusie:

De beschreven methoden zijn goed bruikbaar voor de bepaling en kwalitatieve bevestiging van zearalenon in graanprodukten en veevoeders. In de produkten maisvoermeel, maisglutenmeel, maisglutenvoer, rijstafval, tarwe, mais en mengvoeder werd zearalenon (> 5 µg/kg) aangetoond. De gevonden gehalten liggen echter ver beneden de door Marasas e.a. (10) genoemde grens van 500 µg zearalenon per kg voedsel. Aanwezigheid van hogere zearalenongehalten in graanprodukten en veevoeders is echter niet uitgesloten (1), daarom worden een aantal aktiepunten voorgesteld. Eén van die punten is dat een uitgebreider onderzoek naar dosis-effekt relaties zeer wenselijk zou zijn, evenals een uitgebreider onderzoek naar de overdracht van zearalenon uit het voedsel naar melk en weefsels.
Consequenties van zearalenon consumptie voor de mens zijn ook nog niet bekend.

Verantwoordelijk: ir L.G.M.Th. Tuinstra
Samensteller: N. Duijnhouwer
Projektleider: W. Haasnoot

Inleiding

Diverse schimmelsoorten zijn in staat mycotoxinen te produceren, één daarvan is Fusarium. Een mycotoxine wat voornamelijk door Fusarium roseum (Gibberella zeae) maar ook door bijvoorbeeld F. culmorum en F. moniliforme geproduceerd wordt is zearalenon.

De schimmel Fusarium roseum wordt gevonden op granen en is zowel een "veld"schimmel als een "bewaar"schimmel. Zearalenon werd aangetoond in graanprodukten in de meeste delen van de wereld, gehalten varieerden van 0 tot 600 mg/kg. In veevoeders werden gehalten gevonden tussen 0,06 en 2900 mg/kg (1).

De optimale produktie van zearalenon vindt in de meeste gevallen plaats bij 10-14°C (2).

Zearalenon veroorzaakt estrogene effekten, vooral bij varkens. Deze zijn veel gevoeliger voor het mycotoxine dan bijvoorbeeld pluimvee. Veevoeder met 25, 50 en 100 mg/kg zearalenon veroorzaakte bij varkens afwijkingen in de voortplanting, verminderde vruchtbaarheid of onvruchtbaarheid, schijnzwangerschap, kleinere worpen, misvormingen en jeugdhyperestrogenisme. Verder traden er epitheelveranderingen op in baarmoeder, baarmoederhals, vagina en borstklieren. Als gevolg van zearalenontoediening werden vaginale verzakkingen, opzwelling van de vulva, opzwelling van de anus, anale verzakkingen, het uitteren van de eierstokken en abnormale follikelaktiviteit waargenomen. Bij mannelijke varkens trad uittering van de testes op, evenals zwelling van de voorhuid en vergroting van de borstklieren (3, 4). Wanneer 6 weken oude biggen 8 dagen lang 1 mg zearalenon per dag toegediend kregen, trad zwelling van de vulva op en werden histologische veranderingen in de geslachtsorganen waargenomen (5). Uitgaande van een mengvoederopname van 800 g per dag, komt toediening van 1 mg zearalenon per dag overeen met een concentratie van 1,25 ppm zearalenon in het mengvoeder. Vrouwelijke ratten werden gevoerd met voedsel waaraan 250 µg zearalenon per gram was toegevoegd. De dieren aten minder, groeiden minder, de voedselconversie was lager en er werd een vergroting van lever en nieren, uitgedrukt in percentage van het lichaamsgewicht, waargenomen (6). In rattenembryo's werd de botvorming vertraagd na toediening van 1, 5 en 10 mg zearalenon per kg lichaamsgewicht per dag aan de moeder gedurende tien dagen (7).

Op kippen en kalkoenen bleek zearalenon nauwelijks effekt te hebben, een verlaging van het serumcholesterolgehalte werd in het ene experiment wel en in het andere experiment niet gevonden (8, 9).
Remming van de spermiogenese trad op bij varkens, kalkoenen en kalveren na zearalenontoediening.
Voor ratten ligt de orale LD 50 boven 10.000 mg/kg, voor muizen boven 20.000 mg/kg. Deze doses veroorzaakten lichte irritaties en hypo-aktiviteit.
Er is geen tolerantiegrens voor zearalenon vastgesteld, maar Marasas e.a. (10) vermelden dat in voeder 500 µg/kg een biologisch significante grens is, vooral in voeder wat bestemd is voor fokdieren en dan in het bijzonder voor varkens.
Wat de overdracht van zearalenon naar organen en melk betreft: Shreeve e.a. (11) vonden geen residuen in spieren, lever, nieren, serum, urine en melk van koeien die gedurende 7 weken 10 kg voer, met daarin 385-1925 µg zearalenon per kg, per dag kregen.
Hagler e.a. (12) gaven 5 g zearalenon via het voedsel aan een melkkoe van 450 kg. Aangenomen dat een koe 10 kg krachtvoer per dag krijgt, komt dit overeen met een zearalenongehalte van 500 mg/kg in het krachtvoer.
Na 4 en 5 dagen werden sporen zearalenon en β-zearalenol in de melk gevonden (er werden geen kwantitatieve gegevens verstrekt).
Een lacterend schaap kreeg 1,8 g zearalenon toegediend in de slokdarm. Er van uitgaand dat een schaap 2 kg droge stof per dag eet, is dit in overeenstemming met een zearalenongehalte van 900 mg/kg in het voer op basis van het droge stof gehalte. Na 1, 2 en 3 dagen werden zearalenon en β-zearalenol in de melk gevonden in concentraties van 0,001-0,002 ppm. Een lam wat gevoed werd met deze melk, vertoonde na 10 dagen hyperestrogene effekten. Zearalenongehalten van 500 mg/kg of meer zijn echter zeer sporadisch in graanprodukten of veevoeders gevonden.
In een ander experiment werd aan twee zeugen, gedurende 9 dagen, voer gegeven wat 40 mg zearalenon per kg bevatte. In de melk werd na 42 uur zearalenon, β-zearalenol en α-zearalenol waargenomen. De hoogste concentratie zearalenol die gevonden werd bedroeg 0,575-0,790 ppm. De verhouding zearalenon:β-zearalenol:α-zearalenol was 0,5-1,3:82,0-86,1:13,4-16,7. Zearalenon en β-zearalenol bezitten ongeveer dezelfde estrogene aktiviteit, de estrogene werking van α-zearalenol is drie à vier keer zo groot (13).

Mirocha e.a. (14) onderzochten de melk van een koe nadat deze gedurende 7 dagen ca. 8 kg mais, met daarin 25 mg/kg zearalenon, per dag geconsumeerd had. De koe gaf ca. 8 liter melk per dag. Er werd 0,48 ppm zearalenon in de melk gevonden, 0,50 ppm α-zearalenol en 0,37 ppm β-zearalenol. Wanneer aan de koe 4 kg mais met een zearalenongehalte van 250 mg/kg per dag gegeven werd, kon na 1 dag 45 ppb zearalenon, 50 ppb α-zearalenol en 64 ppb β-zearalenol aangetoond worden in de melk en na 2 dagen 104 ppb zearalenon, 89 ppb α-zearalenol en 147 ppb β-zearalenol.
Aan de hand van deze cijfers kan men concluderen dat er bij een zearalenongehalte in het veevoer op een niveau van 25 ppm minimaal 5,4% van het opgenomen zearalenon overgedragen wordt aan de melk.
Mirocha e.a. tonen met deze laatste experimenten aan dat er zearalenon in melk voor kan komen, wanneer koeien met zearalenon besmet voer krijgen. De resultaten van de diverse overdrachtsexperimenten zijn echter niet eenduidig en er zal onderzoek gedaan moeten worden met als direkt doel het overdrachtspercentage van zearalenon uit voer naar melk vast te stellen.
Om een inzicht te verkrijgen in hoeverre graanprodukten uit verschillende landen en veevoeders uit Nederland besmet zijn met zearalenon, werden diverse graan- en veevoedermonsters onderzocht op het vóórkomen van dit mycotoxine.
Voor het bepalen van zearalenon in diverse produkten zijn verschillende methoden beschreven. HPLC (High Performance Liquid Chromatography) leek de meest geschikte methode, daar voor de bepaling met behulp van gaschromatografie derivatiseringsreakties uitgevoerd moeten worden die de methode meer complex maken. De gevoeligheid is in beide gevallen ongeveer gelijk.
Zowel UV- als fluorescentiedetektie leken geschikt voor het waarnemen van zearalenon, waarbij de gevoeligheid in beide gevallen ca. 1 ng is. Fluorescentiedetektie heeft de voorkeur, omdat hierbij minder interfererende componenten worden waargenomen dan bij UV-detektie.
Het meest gevoelig en selektief is gaschromatografie gekoppeld met massaspectrometrie (GC/MS), deze methode kan als bevestigingsmethode gebruikt worden. Een eenvoudige bevestigingsmethode is die met behulp van dunnelaagchromatografie (1).

De onderzochte monsters

De onderzochte graanprodukten kunnen onderverdeeld worden in mais, maisgries, maisvoermeel, maisglutenmeel, maisglutenvoer, tarwe, gerst, gort, havermout, havermoutafval, soyameel en rijstafval.
Maisvoermeel is mais waaraan olie onttrokken is. Maisglutenmeel en maisglutenvoer zijn bijprodukten bij de zetmeelbereiding, het eerste bevat veel meer eiwit dan het laatste.
De tarwemonsters werden verkregen van de Keuringsdienst van Waren te Rotterdam.
De andere monsters waren afkomstig van de Douane, van de Centrale Landbouworganisatie (CLO) en van de Afnemerscontrole op veevoeder (ACV).

Methode van onderzoek

Voor de bepaling van zearalenon in graanprodukten en veevoeders werd een methode ontwikkeld welke is beschreven in Intern Voorschrift Nr. F 71 (zie bijlage 1).
Zearalenon wordt uit graanprodukten en veevoeders geëxtraheerd met chloroform en fosforzuur. Na filtratie wordt een aliquot van het chloroformextrakt gezuiverd met behulp van een zuurbase extraktie.
Vervolgens wordt het extrakt, na droogdampen, opgenomen in een bekende hoeveelheid methanol en volgt een scheiding door middel van vloeistofchromatografie. Zearalenon wordt gedetekteerd met behulp van een fluorescentiedetektor. Er bestaat een lineair verband tussen de zearalenonconcentratie en het verkregen signaal (concentraties:0,25, 0,50, 1,0, en 1,5 ng/µl, zie figuur 1).
De absolute detektiegrens is 1 ng. De detektiegrens voor zearalenon in graanprodukten is ca. 5 µg/kg en in veevoeders ca. 10 µg/kg.
De recovery op niveau's van 20-150 µg/kg is gemiddeld 71% (n = 27, s = 11,5, zie tabel 1).
Bevestiging van een positief resultaat kan plaatsvinden met behulp van twee-dimensionale dunnelaagchromatografie (absolute detektiegrens ca. 50 ng) en/of met behulp van GC/MS van de uitgevangen zearalenonfraktie (absolute detektiegrens ca. 0,25 ng).
De beide bevestigingsmethoden zijn kwalitatief, voor een kwantitatieve bevestiging zal meer onderzoek verricht moeten worden.

Resultaten

In de onderstaande tabel staan de zearalenongehalten vermeld die in de verschillende produkten gevonden werden. Voor een uitgebreid overzicht van de gehalten in de afzonderlijke monsters wordt verwezen naar tabel 2 in de bijlagen. De zearalenongehalten zijn niet gecorrigeerd voor de recovery.

	aantal monst.	aantal positieve monst.(> 5 µg/kg)	gemiddeld zearalenon gehalte	zearalenon-gehalte range
mais	12	4	20,5 µg/kg	6- 43 µg/kg
maisgries	1	1	7 µg/kg	
maisvoermeel	11	11	74 µg/kg	11-170 µg/kg
maisglutenmeel	6	6	113 µg/kg	32-142 µg/kg
maisglutenvoer	17	17	74 µg/kg	7-133 µg/kg
tarwe	4	2	6,5 µg/kg	6- 7 µg/kg
gerst	3	0	-	
gort	1	0	-	
soyameel	2	0	-	
havermout	1	0	-	
havermoutafval	1	1	9 µg/kg	
rijstafval	3	3	80 µg/kg	10-120 µg/kg
maiskuilvoer	4	0	-	
mengvoeder	6	6	12,5 µg/kg	8- 18 µg/kg

In alle monsters van de produkten maisvoermeel, maisglutenmeel, maisglutenvoer, rijstafval en mengvoeder werd meer dan 5 µg/kg zearalenon aangetoond.

Zie figuur 2 voor de chromatogrammen van een aantal monsters.

De extrakten van de produkten maisvoermeel, maisglutenmeel en maisglutenvoer bevatten veel laat eluerende componenten. Maisextrakt bevat deze componenten in mindere mate. Tarwe-, gerst-, gort-, soya-, havermout- en rijstafvalextrakten bevatten stoffen met retentietijden die erg dicht bij de retentietijd van zearalenon komen.

Ook in mengvoederextrakten zijn storende componenten aanwezig, in verband hiermee is de detektiegrens in veevoeder hoger dan in graanprodukten.

Met behulp van dunnelaagchromatografie werden de positieve resultaten van een aantal monsters kwalitatief bevestigd (zie tabel 2).
In tabel 2 zijn eveneens de monsters vermeld welke kwalitatief bevestigd werden door middel van GC/MS (zie ook figuren 3 en 4).

Voor de bevestiging met behulp van GC/MS moet een uitgevangen zearalenonfraktie worden uitgeschud met chloroform, drooggedampt en gederivatiseerd met BSTFA/1% TMCS.
Bij het uitvangen van zearalenon (standaardoplossing) na HPLC trad een verlies van 10-15% op en bij het uitschudden met chloroform nog eens 10-20% (enkelvoudig experiment).

Conclusie

In alle monsters van de produkten maisvoermeel, maisglutenmeel, maisglutenvoer, rijstafval en mengvoeder werd zearalenon (> 5 µg/kg) aangetoond. Ook in mais en tarwe komt zearalenon voor.
De gevonden gehalten liggen echter ver beneden de door Marasas e.a. (10) genoemde grens van 500 µg zearalenon per kg voedsel. Dit wil niet zeggen dat de aanwezigheid van hogere zearalenongehalten in graanprodukten en veevoeders uitgesloten kan worden (1). Het toxicologisch onderzoek naar dosis-effekt relaties zal verder uitgebreid moeten worden, evenals het onderzoek naar overdrachtspercentages van zearalenon uit de voeding naar melk en weefsels.

Aktiepunten

- Weliswaar zijn de zearalenongehalten in de onderzochte monsters niet zo hoog, maar men moet er op bedacht zijn dat veel hogere gehalten voor kunnen komen. Zeker wanneer granen sterk beschimmeld zijn en er buitentemperaturen heersen van 10-14°C zal de kans op zearalenonbesmetting groot zijn.
  Het lijkt dus zinvol om graanprodukten zo nu en dan te controleren op zearalenon.
- In 1980/1981 bestond 57% van het in Nederland verbruikte voedergraan uit mais. De invoer van voeder- en industriegranen bestond voor 80% uit mais. Veruit het grootste deel van de geimporteerde mais komt uit de USA (15).

Het is dus niet alleen van belang Nederlandse graanprodukten te onderzoeken, maar ook geimporteerde graanprodukten, waarbij dan met name gedacht wordt aan mais uit de USA.

- Een uitbreiding van het toxicologisch onderzoek op het gebied van zearalenon zou wenselijk zijn. Het is bekend dat dit mycotoxine estrogene effekten veroorzaakt, vooral bij varkens, maar een goede dosis-effekt relatie is niet onderzocht.
  Evenmin is bekend wat voor consequenties consumptie van zearalenon kan hebben voor de mens. Deze kan zearalenon opnemen met graanprodukten (hierbij moet ook gedacht worden aan maisbier, wat gedronken wordt in Afrika) en eventueel met melk en melkprodukten.
  Ook de overdracht van zearalenon uit het voedsel naar melk en weefsels zal verder onderzocht moeten worden.
- In verband met de bepaling van het zearalenongehalte door middel van HPLC wordt het volgende aangeraden: Om minder last te hebben van de laat eluerende componenten uit de extrakten van bepaalde produkten zou een vloeistofchromatografisch systeem met mogelijkheden voor hardcut en backflush gebruikt moeten worden.

Literatuur

1. W. Haasnoot. RIKILT verslag nr. 81.17 (1981).
2. C.J. Mirocha e.a. J. Food Prot., vol. 42, no. 10, 821,-824 (1979).
3. K. Chang e.a. Am. J. Vet. Res., vol. 40, no. 9, 1260-1267 (1979).
4. E.R. Farnworth e.a. Abstract 64.
5. P.M Scott e.a. J.A.O.A.C., vol. 61, no. 3, 593-599 (1978).
6. L.J. James e.a. J. Anim. Sci., vol. 55, no. 1, 110-118 (1982).
7. J.A. Ruddick e.a. Bull. Environm. Contam. Toxicol., vol. 15. no. 6, 678-681 (1976).
8. N.K. Allen e.a. Poult Sci., vol. 60, 124-131 (1981).
9. M.S. Chi e.a. Poult. Sci., vol. 59, 531-536 (1980).
10. W.F.O. Marasas e.a. J. Agric. Food Chem., vol 27, no. 5, 1108-1112 (1979).
11. B.J. Shreeve e.a. Fd. Cosmet. Toxicol., vol. 17, 151-152 (1979).
12. W.M. Hagler e.a. Acta. vet. hung., vol. 28, no. 2, 209-216 (1980).
13. M. Palyusik e.a. Acta. vet. hung., vol. 28, no. 2, 217-222 (1980).
14. C.J. Mirocha e.a. Fd. Cosmet. Toxicol., vol. 19, 25-30 (1981).
15. Jaarverslag van het Produktschap voor Veevoeder 1981.

Tabel 1. Recoverypercentages van zearalenon, toevoegingen op verschillende niveau's

Hoeveelheid toegevoegd zearalenon in µg/kg	Recovery in %	Oorspronk. hoeveelheid zearalenon in het produkt µg/kg	Soort produkt
20	57	< 5	mais
20	90	< 5	mais
20	90	< 5	mais
25	68	21	maisvoermeel
25	68	21	maisvoermeel
40	78	< 5	mais
50	90	< 5	mais
50	68	< 5	mais
50	68	< 5	mais
50	69	< 5	gerst
50	66	< 5	gerst
50	60	< 5	tarwe
50	50	< 5	tarwe
50	84	< 5	mais
50	76	< 5	mais
50	69	10	mais
50	77	10	mais
50	64	10	mais
50	56	74	maisglutenvoer
50	66	74	maisglutenvoer
100	89	< 5	mais
150	68	< 5	kuilvoer
150	68	< 5	kuilvoer
150	84	18	veevoeder
150	86	18	veevoeder
150	62	42	maisglutenvoer
150	60	42	maisglutenvoer

Tabel 2. Zearalenongehalten in graanprodukten en veevoeders

Monster nummer	Omschrijving	Land van herkomst	Gehalte zearalenon in µg/kg
11105	mais		43[1)]
13603	mais		10
17078	mais		< 5
17083	mais		23
17084	mais		< 5
20443	mais		< 5
25637	mais		< 5
25643	mais		< 5
26800	mais	USA	6[2)]
29231	mais		< 5
30357	mais	Frankrijk	< 5
30468	mais		< 5
26801	maisgries	Duitsland	7
27053	maisvoermeel	USA	170[2)]
27417	maisvoermeel	USA	155[2)]
28923	maisvoermeel	USA	21
30122	maisvoermeel	Zuid Afrika	11
30123	maisvoermeel	USA	72[1)]
30124	maisvoermeel	USA	21
30351	maisvoermeel	USA	46
31339	maisvoermeel	USA	163[1)]
31341	maisvoermeel	USA	18
31342	maisvoermeel	USA	21
31345	maisvoermeel	USA	114[2)]
29249	maisglutenmeel	Nederland	127[1)]
29250	maisglutenmeel	Nederland	142
29251	maisglutenmeel	Nederland	117[1)]
30115	maisglutenmeel	Nederland	121[1)]
30116	maisglutenmeel	Nederland	139
33912	maisglutenmeel	Nederland	32

Vervolg tabel 2. Zearalenongehalten in graanprodukten en veevoeders

Monster nummer	Omschrijving	Land van herkomst	Gehalte zearalenon in µg/kg
25031	maisglutenvoer	Frankrijk	96
25396	maisglutenvoer	Nederland	113[2)]
26914	maisglutenvoer	USA	42
27055	maisglutenvoer	USA	133[1)]
27410	maisglutenvoer	USA	76
28056	maisglutenvoer	België	41
28523	maisglutenvoer	België	49
28905	maisglutenvoer	USA	145
30837	maisglutenvoer	USA	74
30938	maisglutenvoer	USA	120[1)]
31021	maisglutenvoer	USA	86
31340	maisglutenvoer	USA	81
31343	maisglutenvoer	USA	52
31344	maisglutenvoer	Frankrijk	104[2)]
33909	maisglutenvoer	België	24
33910	maisglutenvoer	USA	21
33911	maisglutenvoer	Argentinië	7
2093	tarwe		7
2098	tarwe		6
2343	tarwe		< 5
11843	tarwe		< 5
32913	gerst		< 5
34105	gerst		< 5
34106	gerst		< 5
13186	gort		< 5
29254	soya		< 5
30129	soya		< 5
22175	havermoutafval		9
25569	havermout		< 5
24281	rijstafval		120
31361	rijstafval		10

Vervolg tabel 2. Zearalenongehalten in graanprodukten en veevoeders

Monster nummer	Omschrijving	Land van herkomst	Gehalte zearalenon in µg/kg
34132	rijstafval		111
14506	kuilvoer		< 5
14514	kuilvoer		< 5
14515	kuilvoer		< 5
14547	kuilvoer		< 5
14242	mengvoeder		8
14243	mengvoeder		11
14244	mengvoeder		13
14245	mengvoeder		13[1)]
14751	mengvoeder		18[2)]
16075	mengvoeder		12

1) bevestigd met dunnelaagchromatografie

2) bevestigd met GC/MS

INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT NR. F 71

1e oplage (1983-03-15)

DE BEPALING VAN ZEARALENON IN GRAANPRODUKTEN EN VEEVOEDERS MET BEHULP VAN VLOEISTOFCHROMATOGRAFIE EN FLUORESCENTIE-DETEKTIE

Verzendlijst: Normalisatie/harmonisatie, projektleider, afdeling Contaminanten (4x), bibliotheek (5x).

INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT NR. F 71
1e oplage (1983-03-15)

De bepaling van zearalenon in graanprodukten en veevoeders met behulp van vloeistofchromatografie en fluorescentie-detektie

---

1. Inleiding

Zearalenon is een mycotoxine dat geproduceerd wordt door schimmels van het geslacht Fusarium. De voornaamste producenten zijn Fusarium roseum (Gibberella Zeae), F.culmorum en F.moniliforme.
Zearalenon is in de meeste delen van de wereld waar mais of andere granen groeien gevonden.
Dit mycotoxine veroorzaakt estrogene effekten; met name varkens zijn, in tegenstelling tot pluimvee, gevoelig voor zearalenontoediening.

2. Principe

Zearalenon wordt uit het graanprodukt of veevoeder geëxtraheerd met een mengsel van chloroform en 0,1 M fosforzuur.
Na filtratie wordt een aliquot van het chloroformextrakt gezuiverd met behulp van een zuur-base extraktie, drooggedampt en opgenomen in methanol, waarna 10 µl wordt geinjekteerd in de vloeistofchromatograaf welke uitgerust is met een fluorescentiedetektor.
De absolute detektiegrens is 1 ng. De detektiegrens voor zearalenon in graanprodukten is ca. 5 µg/kg en in veevoeders ca. 10 µg/kg.
De recovery op een niveau van 20-150 µg/kg bedraagt ca. 70%.
Bevestiging vindt plaats met behulp van twee-dimensionale dunnelaagchromatografie (absolute detektiegrens ca. 50 ng) en/of m.b.v. GC-MS van de uitgevangen zearalenonfraktie (absolute detektiegrens ca. 0,25 ng).

3. Reagentia

Alle reagentia dienen van een zodanige kwaliteit te zijn dat in het chromatogram geen storingen optreden welke kunnen interfereren met zearalenon.
Voer ter controle een experiment uit met een blanco (alleen reagentia) en een blanco + toevoeging.

3.1 Chloroform.

3.2 2M fosforzuur.

3.3 0,1 M fosforzuur.

3.4 1 M natriumhydroxide-oplossing.

3.5 Phenolftaleine-oplossing (2% in ethanol).

3.6 Natriumsulfaat, watervrij.

3.7 Methanol.

3.8 Acetonitril.

3.9 IJsazijn.

3.10 Aceton.

3.11 Hexaan.

3.12 Diethylether.

3.13 50% zwavelzuuroplossing.

3.14 99% N.O. bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (BSTFA) + 1% trimethylchlorosilaan (TMCS).

3.15 Standaardoplossing van zearalenon:
De standaard is verkrijgbaar bij Makor-Chemicals L.T.D., P.O.B. 6570, Jerusalem, Israël.
Breng 25 mg kwantitatief over in een maatkolf van 250 ml met behulp van methanol en vul aan tot 250 ml met methanol (concentratie 100 µg/ml).

Bepaal spectrofotometrisch de concentratie van deze oplossing door gebruik te maken van de methode beschreven in Official Methods of Analysis (AOAC) 26.004-26.011, met behulp van de volgende gegevens:
molecuulgewicht zearalenon = 318
molaire extinktie coëfficiënt: 6000 ± 5% bij 314 nm
13900 ± 5% bij 274 nm
30000 ± 5% bij 236 nm.
Bewaar deze oplossing koel en in het donker, in een goed afgesloten en in aluminiumfolie gewikkeld glazen vat.
Laat voor gebruik de oplossing op kamertemperatuur komen.
Maak van deze oplossing door middel van verdunnen met methanol, de volgende standaardoplossingen:
0,25-0,50-1,00 en 1,50 µg/ml.

4. Toestellen, glaswerk en hulpmiddelen

4.1 medicijnflessen van 100 ml met schroefdop.

4.2 Bovenweger.

4.3 Schudmachine.

4.4 Maatcylinders van 25 ml.

4.5 Trechters.

4.6 Filters Whatman no. 540.

4.7 Centrifugebuizen van 100 ml.

4.8 Doseerpipetten van 100 µl en 500 µl.

4.9 Ultra-turrax.

4.10 Centrifuge.

4.11 Scheitrechers van 250 ml.

4.12 Rondbodemkolven van 250 ml.

4.13 Vouwfilters.

4.14 Rotatievacuumverdamper.

4.15 Kultuurbuizen met een inhoud van ca. 10 ml.

4.16 Waterbad van 40°C.

4.17 Inert gas bijvoorbeeld stikstof.

4.18 Vloeistofchromatograaf (ACS 750/03 of vergelijkbare apparatuur) met valco (7000 psi) injektiekraan
Injektievolume: 10 µl.
Kolom: Lichrosorb RP 18 (5 µm) lengte 15 cm,
i.d. 4,6 mm en u.d. 6,4 mm.
Eluens: acetonitril/water/ijsazijn (50/50/2).
Flow: 1 ml/min.
Detektor: Perkin-Elmer LS-4 fluorescentiespectrometer
λ ex 272 nm en λem 465 nm (Fix.Scl.12,5; resp. 4).
Dubbelpens recorder: 5 en 10 mV.

4.19 Injektiespuiten van 10, 20 en 50 µl.

4.20 Chromatografietank voor TLC platen van 20 x 20 cm.

4.21 DC-Fertigplatten, kieselgel 60, Merck art. 5721.

4.22 Ultravioletlampen voor straling met een golflengte van 254 nm en 365 nm.

4.23 Monsterflesjes van 2 ml met schroefdop.

4.24 Vortexmixer.

4.25 Verwarmingsblok van 60°C.

4.26 Massaspectrometer Finnigan 4000 GC-MS-DS.

4.27 Repeating dispenser met een naaldvolume van 50 µl.

4.28 Droogstoof 120°C.

5. Werkwijze

5.1 Extraktie

Weeg 10 gram van het gemalen en gehomogeniseerde monster af in een medicijnflesje van 100 ml met schroefdop.
Voeg 5 ml 0,1 M fosforzuur en 50 ml chloroform toe en schud gedurende 30 minuten in een schudapparaat.
Filtreer het geheel over een hard filter (4.6) en vang 25 ml op in een maatcylinder.

5.2 Clean-up

Breng de inhoud van de maatcylinder over in een centrifugebuis.
Voeg 10 ml 1 n NaOH toe. Spoel de maatcylinder met 5 ml 1 n NaOH en breng dit eveneens in de centrifugebuis.
Macereer de twee vloeistoflagen met behulp van de ultra-turrax gedurende 1 minuut. Spoel de ultra-turrax na met ca. 5 ml 1 n NaOH en breng dit in de centrifugebuis.
Centrifugeer gedurende ca. 7 minuten bij ca. 3000 r.p.m. Pipetteer de bovenste (waterige) laag af en breng deze over in een erlenmeyer van 100 ml. Voeg nogmaals 15 ml 1 n NaOH bij de chloroform in de centrifugebuis, herhaal het macereren, afspoelen van de utra-turrax met 5 ml 1 n NaOH en het centrifugeren. Pipetteer wederom de bovenste laag af en breng deze in de erlenmeyer. Extraheer een derde maal met 10 ml 1 n NaOH en voeg na macereren en centrifugeren de bovenste laag eveneens toe aan de oplossing in de erlenmeyer.

Voeg aan de verzamelde NaOH-frakties twee druppels phenolftaleine oplossing toe en pipetteer 2 M fosforzuur bij de loog totdat er kleuromslag plaatsvindt (van rood naar kleurloos).
Breng deze oplossing over in een scheitrechter van 250 ml en spoel de erlenmeyer na met 25 ml chloroform. Breng de chloroform in de scheitrechter en schud gedurende 30 seconden.
Filtreer de chloroform (onderste laag) over natriumsulfaat en vang de chloroform op in een rondbodemkolf.
Herhaal de extraktie met 25 ml chloroform twee maal en spoel de Na_2SO_4 na met chloroform.
Damp de verzamelde chloroformfrakties in tot droog gebruik makend van een roterende vacuumverdamper bij een temp. van 40°C en breng het residu over in een kultuurbuisje met behulp van ca. 5 ml chloroform.
Damp deze chloroform in tot droog in een waterbad van 40°C onder stikstoftoevoer en neem het residu op in methanol.
Het residu van graanprodukten wordt opgenomen in 100 µl en het residu van veevoeders in 250 µl methanol.

5.3. Vloestofchromatografie
Injekteer achtereenvolgens in de vloeistofchromatograaf 10 µl van de standaardoplossingen 0,25; 0,50; 1,00 en 1,50 µg/ml.
Maak een ijklijn door van de pieken het oppervlak te meten en uit te zetten op de y-as tegen de geinjekteerde hoeveelheden zearalenon in nanogrammen op de x-as.
Injekteer vervolgens 10 µl van de onder 5.2 verkregen oplossing en bepaal van de piek met dezelfde retentietijd als zearalenon het oppervlak.
Indien het monsterextrakt een piek vertoont, met dezelfde retentietijd als zearalenon, waarvan het oppervlak veel groter is dan het oppervlak van de hoogste standaard, moet het monsterextrakt verdund worden, zodanig dat het piekoppervlak binnen de ijklijn komt te vallen.

6. Berekening
Het gehalte x aan zearalenon in µg/kg monster wordt berekend met de volgende formule:

$$\frac{(y-b)}{a} \times \frac{V1}{V2} \times \frac{V3}{V4} \times \frac{1}{g} = x \text{ µg/kg}$$

waarin:

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

b = afsnede van de y-as (mm^2)

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

V1 = volume chloroform gebruikt bij de extraktie (ml)

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

V3 = volume methanol waarin het eindextrakt zich bevindt (µl)

V4 = injektievolume van het monsterextrakt (µl)

g = afgewogen hoeveelheid monster.

7. Bevestiging m.b.v. dunnelaagchromatografie

Bij een positief-resultaat volgens 5.3 is het aan te bevelen dit resultaat te bevestigen met behulp van de volgende dunnelaagchromatografische methode. De absolute detektiegrens is echter ca. 50 ng zodat het monster meer dan 10 ng zearalenon per gram moet bevatten om deze bevestigingsmethode te kunnen gebruiken.

7.1 Het opbrengen

Trek op de dunnelaagplaat met potlood 2 lijnen zoals aangegeven in figuur 1 en breng op de plaatsen, eveneens volgens figuur 1, op:

A en B: 2 µl standaardoplossing zearalenon (100 ng/µl) = 200 ng

C : het monsterextrakt, dit dient ingedampt te worden tot droog, daarna opgenomen te worden in chloroform en het hele extrakt wordt op de plaat gebracht.

Gebruik voor het opbrengen een repeating dispenser, waarbij tijdens het opbrengen het oplosmiddel wordt afgedampt met een stroom stikstofgas.

Zorg ervoor dat de diameter van de vlekken zo klein mogelijk is.

7.2 Het ontwikkelen

Ontwikkel de plaat in de eerste looprichting in een nog niet eerder gebruikt mengsel van chloroform/aceton (9/1) in een onverzadigde tank tot het vloeistoffront de potloodlijn heeft bereikt.

Verwijder de plaat uit de tank en laat de loopvloeistof verdampen bij kamertemperatuur gedurende ca. 15 minuten.

Draai de plaat 90°C en ontwikkel de plaat, eveneens in een onverzadigde tank, in de 2e looprichting met een mengsel van hexaan/diethylether/ijsazijn (65/25/10) tot de potloodlijn.

Laat de plaat drogen bij kamertemperatuur tot er geen ijsazijnlucht meer waarneembaar is.

7.3 Interpretatie van het chromatogram

Bekijk het chromatogram onder een UV-lamp bij een golflengte van 254 nm. Zearalenon fluoresceert groen-blauw. Trek een denkbeeldige lijn loodrecht op de tweede looprichting door de standaardvlek afkomstig van A en een andere lijn loodrecht op de eerste looprichting door de standaardvlek van B.

Rondom het snijpunt van deze denkbeeldige lijnen ligt het gebied waar de zearalenonvlek uit het monsterextrakt kan worden verwacht.

Bespuit de plaat met een 50% zwavelzuuroplossing en verwarm deze gedurende 10 minuten bij 120°C.

Na afkoelen moet de plaat direkt worden bekeken onder een UV-lamp bij een golflengte van 365 nm. Zearalenon fluoresceert nu geel.

8. Bevestiging met behulp van GC/MS

Indien een positief resultaat gevonden wordt volgens 5.3 is het ook mogelijk dit resultaat te bevestigen met behulp van GC/MS. Daartoe moet minimaal 10 ng zearalenon na de HPLC uitgevangen worden.

8.1 Het uitvangen van de zearalenonfraktie

De retentietijd van zearalenon wordt bepaald door middel van een standaardoplossing. Daarna wordt het monsterextrakt geinjekteerd en een halve minuut voor de retentietijd wordt begonnen met het opvangen van het eluens. Een fraktie van 2 ml wordt uitgevangen.

8.2 De derivatisering

De uitgevangen fraktie wordt uitgeschud met 0,5 ml chloroform. De onderste laag (de chloroform, acetonitrillaag) wordt overgebracht in een monsterflesje. Deze procedure wordt eenmaal herhaald en de verzamelde chloroform, acetonitrilfrakties worden ingedampt tot droog onder stikstoftoevoer.

Aan het residu wordt 100 µl BSTFA (99%) + TMCS (1%) toegevoegd. Het monsterflesje wordt afgesloten en gedurende één uur in een verwarmingsblok met een temperatuur van 60°C geplaatst. Na afkoelen kan het monsterextrakt direkt geinjekteerd worden.

50 µl van een standaardoplossing van 1 ng/µl wordt eveneens droogge-dampt, aan het residu wordt 100 µl BSTFA (99%) + TMCS (1%) toegevoegd en de standaard wordt gedurende één uur gederivatiseerd bij 60°C in het verwarmingsblok.

8.3 GC/MS

De scheiding vindt plaats op een "fused silica" capillaire kolom ge-coat met een polaire fase.
De aanwezigheid van zearalenon kan éénduidig aangetoond worden aan de hand van het "multiple ion detection (MID) spectrum.

8.3.1 Condities voor de gaschromatografie

Kolom : fused silica
Lengte : 25 m
ø i.d. : 0,2 mm
Fase : CP-Sil-19-CB (of gelijkwaardig)
Filmdikte: 0,1-0,4 µm.

Draaggas : helium, lineaire gassnelheid 20-30 cm/s
Split : 20 ml/min, geopend 3 minuten na injektie
Septum spoelgas: 3 ml/min, geopend 3 minuten na injektie.

Temperatuur
Injektor : 230°C
Oven programma : 80-260°C
Programmeersnelheid: 15°/min
Initial hold : 4 minuten
Final hold : 30 minuten.

Interface GC/MS:
Door de fused silica kolom direkt door te voeren tot aan de bron is een direkte koppeling gerealiseerd.
Temperatuur interface oven 240°C.

8.3.2 Instelling Quadrupool: EI-MID (electroninpact-multiple ion detection)

Met behulp van "MID" kunnen voor zearalenon, specifieke massa's gemeten worden.
De quadrupool wordt hiertoe ingesteld op de massa's 260 (80%), 305 (80%), 333 (100%), 447 (25%) en 462 (40%) m/z.
De meettijd is maximaal 0,05 sec per dalton.

8.3.3. Instelling van de bron
Electronenenergie: 70 eV
Emissie stroomsterkte: 300 µA
Temperatuur: 250°C
Hoogvacuum: beter dan 8 x 10^{-7} Torr.

Electron multiplicator:
Voltage 1400-1800 Volt.

8.4 Criteria voor de identificatie
De gaschromatografische retentietijd van het uitgevangen zearalenon moet gelijk (± 5 seconden) zijn aan de gaschromatografische retentietijd van de zearalenonstandaard.
Bovendien moeten de belangrijkste fragmentionen van de zearalenonpiek uit het monster met dezelfde retentietijd als de standaard-zearalenonpiek, een intensiteitsverhouding (± 10%) hebben die overeenkomt met de overeenstemmende ionen van de standaard.
Wanneer aan deze criteria voldaan is kan men vaststellen dat het onderzochte monster inderdaad zearalenon bevat.

Verantwoordelijk: ir L.G.M.Th. Tuinstra
Samenstellers: N. Duijnhouwer, W. Traag en W. Haasnoot

Figuur 1.

