

Afdeling Organische Contaminanten/

Bestrijdingsmiddelen 1984-01-26

RAPPORT 84.9 pr.nr. 505.0421

De bepaling van aflatoxine B₁ in grond-
stoffen en mengvoeder d.m.v. de officiële
EEG-methode.

Verzendlijst: directeur, sektorhoofd (3x), afd. OCON (4x), afd.
Normalisatie/harmonisatie (Humme), Projektbeheer,
Projektleider (Traag).

RAPPORT 84.9

Datum: 1984-01-26

Pr.nr. 505.0421

Projekt:

Onderwerp: De bepaling van aflatoxine B₁ in grondstoffen en mengvoeder d.m.v. de officiële EEG-methode.

Doel:

Nagaan in hoeverre de detectiegrens van de officiële EEG-methode voor de bepaling van aflatoxine B₁ verlaagd kan worden van 10 naar ca. 2 µg/kg i.v.m. de nieuwe EEG-tolerantie per 1984-01-01 voor aflatoxine B₁ in aanvullende diervoeders voor melkvee.

Samenvatting/Conclusie:

Een drietal wijzigingen wordt kort toegelicht te weten:

- a) verbetering van de scheiding bij de twee dimensionale dunnelaag-chromatografische bepaling, ook in het geval dat citrus in het veevoeder aanwezig is,
- b) verbetering van de detectiegrens door toepassing van betere UV-lampen,
- c) meer veevoederextract opbrengen op de dunnelaagplaat.

Door deze wijzigingen bleek het mogelijk voor aanvullende diervoeders voor melkvee de detectiegrens te verlagen van 10 tot ca. 2 µg/kg.

Bevestiging wordt verkregen door een HPLC-scheiding met post-column derivatisering toe te passen.

Verantwoordelijk: ir L.G.M.Th. Tuinstra *86*

Medewerkers/samenstellers: L.G.M.Th. Tuinstra, R.J. van Mazijk, *R*

Th.C.H. van Neer en A.H. Roos *11)*

Projektleider: W.A. Traag *W*

Inleiding

Tot en met 31 december 1983 gold binnen de EEG een aflatoxine B₁ tolerantie van 20 µg/kg voor aanvullende diervoeders voor melkvee (Richtlijn 74/63/EEG van de Raad van 17 december 1973).

Om dit te controleren bestond er een officiële methode (Zevende Richtlijn van de commissie van 1 maart 1976 (76/372/EEG)).

Hierin werd onderscheid gemaakt tussen methoden voor grondstoffen en enkelvoudige diervoeders (methode A) en mengvoeders (methode B). Aan gezien dit laatste produkt in de Nederlandse situatie het meest interessant is zal hieronder alleen m.b.t. volledige mengvoeders gerapporteerd worden.

De officiële EEG-methode heeft een aantal nadelen. De detectiegrens (twee-dimensionale dunnelaagchromatografie) ligt ongeveer bij 10 µg/kg; indien citrus als grondstof gebruikt werd is de methode niet bruikbaar (zie onder); bevestiging van de identificatie van aflatoxine B₁ moet geschieden of door bespuiten van de dunnelaagplaat met zwavelzuur of door het omzetten van aflatoxine B₁ in B₂a (het aflatoxine B₁-hemiaceetaal) gevolgd door dunnelaagchromatografie (DLC); de methode is zeer tijdrovend.

Vanwege de storende invloed van uit citrus afkomstige componenten werd door ons in 1975 reeds aangegeven (1) hoe door verandering van de eluens samenstelling bij de dunnelaagchromatografische analyse een scheiding verkregen kan worden tussen de interfererende componenten en aflatoxine B₁.

Vanaf 1 januari 1984 geldt binnen de EEG voor aanvullende diervoeders voor melkvee een aflatoxine B₁ tolerantie van 10 µg/kg (Derde Richtlijn van de commissie van 28 juli 1983 houdende wijziging van de bijlage bij Richtlijn 74/63/EEG).

Gezien de detectiegrens van 10 µg/kg van de officiële EEG-methode is duidelijk dat deze methode niet meer geschikt is.

Bij een tolerantie van 10 µg/kg behoort o.i. een methode die ongeveer een 5 maal lagere detectiegrens kan bereiken.

Onzerzijds werd dan ook een methode ontwikkeld (2), gebaseerd op HPLC met post-column derivatisering, welke een detectiegrens voor aflatoxine B₁ heeft van ca. 1 µg/kg, relatief weinig tijd vergt (± 20 monsters/dag) en geen last heeft van componenten uit citrus afkomstig.

Deze methode werd in 1983 gebruikt als screeningsmethode voordat monsters met de officiële EEG-methode werden onderzocht.

Van Duitse zijde is een methode gepubliceerd (3) gebaseerd op gelpermeatiechromatografie in combinatie met DLC die ook een lage detectiegrens heeft ($< 1 \mu\text{g/kg}$).

Ook door derivatiseren van aflatoxine B_1 kan een lage detectiegrens verkregen worden (4).

Vooraf bij het vaststellen van overschrijdingen van toleranties is het wenselijk via een alternatieve methode tot een bevestiging van de bevindingen te komen.

Om op korte termijn een oplossing te vinden werd nagegaan in hoeverre de EEG-methode aangepast zou kunnen worden opdat enerzijds een detectiegrens in de orde van $2 \mu\text{g/kg}$ bereikt zou worden en anderzijds geen last ondervonden werd van storende componenten uit citrus.

Experimenten

Om een verbetering van de detectiegrens te verkrijgen moet allereerst de scheiding verbeteren en daarna nagegaan worden welke veranderingen in de bestaande tekst aangebracht moeten worden om te komen tot het opbrengen van meer extrakt op de DLC-plaat. De absolute detectiegrens kan misschien door betere UV lampen te gebruiken ook verbeterd worden.

A. Scheiding

Hierbij werd gebruik gemaakt van de vroegere (1) resultaten.

Goede scheidingen werden toen verkregen door in een onverzadigde tank eerst te elueren met chloroform/aceton (9:1 v/v) en na droging in de tweede richting met tolueen/ethylacetaat/mierenzuur (5:4:1 v/v/v) wederom in een onverzadigde tank.

Erg belangrijk is dat tanks gebruikt worden van goede kwaliteit, dus vlakke bodem en goed afsluitbaar (b.v. Camag tanks).

Desalniettemin blijft dan toch het probleem dat na ontwikkelen aflatoxine B_1 zich niet precies bevindt op de plaats waar men het zou verwachten (zoals ook al aangegeven in het officiële EEG-voorschrift). Een verbetering kan verkregen worden door gebruik te maken van zgn. dubbeltrog tanks van Camag. De plaat wordt in de ene trog geplaatst terwijl in de andere trog zich reeds het eluens bevindt.

Hierdoor kan de plaat gedurende ± 10 min via de dampfase in evenwicht komen met het eluens. Pas dan vindt ontwikkeling plaats door het eluens van de ene trog naar de andere te laten lopen. Vergelijk foto 1 (opwerking en DLC conform EEG-voorschrift) met foto 2 (gemodificeerde methode).

Dikwijls (zie foto 2) wordt aflatoxine B_1 nu gevonden op de plaats waar denkbeeldige lijnen getrokken door de aflatoxine B_1 standaard en loodrecht op de richtingen van het ontwikkelen, zich snijden.

Aangezien bovengenoemde eluens vloeistoffen in voornoemde ontwikkel-tanks ook bij andere mengvoeders die geen citruspulp bevatten tot goede resultaten leidt werd dit systeem opgenomen in het bijgevoegde herziene voorschrift.

B. UV detectie

In het officiële EEG-voorschrift is de laagst zichtbare hoeveelheid aflatoxine B_1 1 ng.

De laatste jaren zijn er enkele nieuwe ontwikkelingen geweest die het mogelijk maken de absolute detectiegrens te verlagen.

Bij gebruik van glazen DLC platen kan niet alleen van boven maar ook via de onderkant UV licht ingestraald worden waardoor op 30 cm afstand nog 0,5 ng aflatoxine B_1 zichtbaar is en zelfs d.m.v. een Polaroid camera gefotografeerd kan worden (kleur).

De volgende opstelling wordt gebruikt. Een transilluminator (BLAK-RAY C 62 long wave 366 nm, Ultra Violet Products Inc. in Nederland vertegenwoordigd door Ahrin) zorgt voor de bestraling via de onderzijde van de plaat. Bovenop de transilluminator is een Chromato-Vue Cabinet geplaatst (Ultra Violet Products Inc. type C 71).

Dit cabinet is door Ahrin zodanig gemodificeerd, dat er een Polaroid camera permanent opgeplaatst is (combinatie van close-up camera CU-5 met de achterwand van een SX 70 geschikt voor Polaroid 600 foto's; fotografeerbaar gebied 20 x 20 cm).

Van belangrijke monsters kan een kleuren foto gemaakt worden van de volledige plaat.

C. Aanpassing hoeveelheid monsterextract

Na de extractie en de kolomzuivering wordt het extract in het oorspronkelijke EEG-voorschrift ingedampt tot 2,0 ml waarvan dan 20 μ l op de DLC plaat gebracht wordt.

Wanneer dit extrakt echter tot 1,0 ml wordt geconcentreerd kan bij gelijkblijvende opbrengvolume van 20 µl dus 2 x zoveel extrakt op de plaat gebracht worden, waarbij de detektiegrens in principe met een gelijke faktor verbetert.

Niet alleen wordt hierdoor dus 2 x zoveel aflatoxine B₁ opgebracht, maar ook 2 x zoveel meer geextraheerde andere stoffen. Deze laatste kunnen het opbrengen van 20 µl extrakt op de plaat bemoeilijken. Het is nu zaak dat de opgebrachte vlek een kleine diameter behoudt (< 5 mm). Bij een grote hoeveelheid aan meegeextraheerde componenten verdampst het oplosmiddel moeilijker en de vlek heeft neiging uit te vloeien. Dit moet voorkomen worden. Bij de tot nu toe door ons onderzochte monsters mengvoeders is dat meestal gelukt (zie foto 3).

Conclusie

Door de officiële EEG-methode op een drietal punten te wijzigen nl. a) andere eluensmiddelen bij de twee dimensionale DLC, b) betere UV lampen en c) verdubbeling van de opgebrachte hoeveelheid monsterextrakt bleek het mogelijk voor aanvullende diervoeders voor melkvee de detektiegrens te verlagen van 10 tot ca. 2 µg/kg.

Literatuur

1. L.G.M.Th. Tuinstra, C.A.H. Verhülndonk, J.M. Bronsgeest, W.E. Paulsch: Neth. J. Agric. Sci. 23 (1975) 10-17.
2. L.G.M.Th. Tuinstra, W. Haasnoot: J. Chrom. 282 (1983) 457-462.
3. H. Nijhuis, A. Blüthgen, W. Heeschen: Milchwissenschaft 37 (1982) 449.
4. H. Cohen, M. Lapointe: J.Assoc. Off. Anal. Chem. 64 (1981) 1372-1376.

Foto 1

Extrakt van gecontamineerd veevoeder waarin citruspulp is verwerkt.

Opwerking en DLC conform EEG-voorschrift.

1 = aflatoxine B₁; 2 = citrusvlek.

Foto 2

Zelfde monsters als foto 1. Eluenssamenstelling conform voorgestelde analysemethode (= gemodificeerde EEG-methode) (zie bijlage).

1 = aflatoxine B₁; 2 = citrusvlek.

Foto 3

Veevoederextract waarin citruspulp verwerkt is. Aflatoxine concentratie $\pm 2,5 \mu\text{g/kg}$. Opwerking en DLC volgens voorgestelde analysemethode (= gemodificeerde EEG-methode) (zie bijlage).

1 = aflatoxine B₁; 2 = citrusrvlek.

Alleen voor intern gebruik

INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT NR. F 76

1e oplage (1984-01-31)

BEPALING VAN AFLATOXINE B₁ IN GRONDSTOFFEN EN MENGVOEDERS DOOR MIDDEL
VAN TWEEDIMENSIONALE DUNNELAAGCHROMATOGRAFIE

Bepaling van aflatoxine B₁ in grondstoffen en mengvoeders door middel van tweedimensionale dunnelaagchromatografie

1. Doel en toepassingsgebied

Met behulp van deze methode is het mogelijk het aflatoxine B₁ gehalte te bepalen in grondstoffen en mengvoeders. De ondergrens van de bepaling ligt bij 0,002 mg/kg (2 ppb). Het terugvindingspercentage bedraagt tenminste 70%.

2. Principe

Het monster wordt onderworpen aan een extractie met chloroform. Het extrakt wordt gefiltreerd en een aliquot wordt door middel van chromatografie op een kolom van silicagel gezuiverd. Het eluaat wordt ingedampt en het residu wordt in een bepaalde hoeveelheid chloroform opgelost. Een aliquot van deze oplossing wordt aan tweedimensionale dunnelaagchromatografie onderworpen. De hoeveelheid aflatoxine B₁ wordt onder UV-licht of visueel of fluorodensitometrisch bepaald door vergelijking met bekende hoeveelheden aflatoxine B₁ standaard. De identiteit van de uit het diervoeder geëxtraheerde aflatoxine B₁ moet met behulp van de aangegeven methode worden bevestigd.

3. Reagentia

Noot: Alle reagentia dienen, voor zover niet anders vermeld, van analytische zuivere kwaliteit zijn.

3.1 Aceton.

3.2 Chloroform, gestabiliseerd met 0,5-1,0% ethanol 96% (v/v).

3.3 n-Hexaan.

3.4 Methanol.

3.5 Diethylether, vrij van water en peroxyden.

3.6 Ethylacetaat.

3.7 Mierenzuur.

3.8 Toluëen.

3.9 Mengsel van chloroform (3.2) en methanol (3.4): 97/3 (v/v).

3.10 Silicagel voor kolomchromatografie, korrelgrootte 0,05-0,20 mm.

3.11 Glaswol.

3.12 Natriumsulfaat, vrij van water, korrels.

3.13 Inert gas, b.v. stikstof.

3.14 Zoutzuur 1 N.

3.15 Diatomeeënaarde (Hyflosupercel), met zuur gewassen.

3.16 Leopvloeistoffen.

3.16.1 Mengsel van chloroform (3.2) en aceton (3.1) 9:1 (v/v), onverzadigde ontwikkelbak of ontwikkelbak met voorconditionering (Camag dubbeltrog tank).

3.16.2 Mengsel van toluëen (3.8), ethylacetaat (3.6) en mierenzuur (3.7) 5:4:1 (v/v/v), onverzadigde ontwikkelbak of ontwikkelbak met voorconditionering (Camag dubbeltrog tank).

3.17 Standaardoplossing aflatoxine B₁ 10 µg/ml in chloroform (3.2) verdund en gecontroleerd zoals aangegeven onder punt 7.

3.18 Werkoplossing aflatoxine B₁ 0,1 µg/ml in chloroform (3.2).

3.19 Petroleumether (kookpunt 40-60°C).

4. Apparatuur

4.1 Meng- en maalapparaat.

4.2 Schudmachine.

4.3 Vouwfilters, Schleicher en Schüll nr 588, of gelijkwaardig, diameter 24 cm.

4.4 Chromatografiekolommen, van glas (binnendiameter 22 mm, lengte 300 mm), met teflonkraan en reservoir van 250 ml.

4.5 Rotatievacuümverdamper met rondbodemkolf van 500 ml.

4.6 Konische kolven van 500 ml met ingeslepen stop.

4.7 Uitrusting voor dunnelaagchromatografie.

4.8 DC-Fertigplatten, kiezelgel 60, Merck art 5721.

4.9 Een UV-cabinet (New Chromato-Vue Cabinet type C 71- 365 nm) geplaatst op een Transilluminator (Long Wave type C 62 - 366 nm). De stralingsintensiteit moet voldoende zijn om een aflatoxine B₁ vlek van 0,5 ng op een plaat voor dunnelaagchromatografie nog duidelijk zichtbaar te maken.

4.10 Reageerbuisjes van 10 ml, met maatverdeling, voorzien van polyethyleen stop.

4.11 UV-spectrofotometer.

4.12 Fluorodensitometer (facultatief).

5. Uitvoering

5.1 Voorbereiding van het monster.

5.1.1 Maal het monster zodanig dat het door een zeef met mazen van 1 mm (overeenkomstig ISO-aanbeveling R 565) gaat.

5.1.2 Monsters met een vetgehalte van meer dan 5% moeten eerst met petroleumether (3.19) (kookpunt 40-60°C) worden ontvet nadat zij op de in punt 5.1.1 aangegeven wijze werden voorbereid. In dergelijke gevallen moeten de analyseresultaten worden uitgedrukt op basis van het gewicht van het niet-ontvette monster.

5.2 Extraktie

Breng van het gemalen en gehomogeniseerde monster 50,0 g over in een konische kolf van 500 ml (4.6) en voeg 25 g diatomeeënaarde (3.15), 25 ml water en 250 ml chloroform (3.2) toe. Sluit de kolf af en schud daarna gedurende 30 minuten met behulp van de schudmachine (4.2). Filtreer vervolgens door een vouwfilter (4.3), verwijder de eerste 10 ml van het filtraat en vang de volgende 50 ml op.

5.2.1 Terugvindingsexperiment

Volg de onder 5.2 beschreven werkwijze onder toevoeging van 2 µg aflatoxine B₁ (40 ppb niveau) aan een monster dat geen aflatoxine bevat. Het terugvindingspercentage moet tenminste 70% bedragen.

5.3 Kolonzuivering

Breng onder in de chromatografiekolom (4.4) een prop glaswol (3.11) aan, vul de kolom tot ongeveer 2/3 met chloroform (3.2), voeg daarna 5 g natriumsulfaat (3.12) toe, waarbij erop moet worden gelet dat het bovenoppervlak van de natriumsulfaatlaag een vlakke basis vormt. Voeg 10 g silicagel (3.10) in kleine porties toe. Roer na iedere toevoeging voorzichtig om, om luchtballen te verwijderen. Laat de silicagel 15 minuten inklinken en voeg vervolgens voorzichtig 15 g natriumsulfaat (3.12) toe. Laat daarna de vloeistof aflopen tot juist boven de natriumsulfaatlaag.

Meng de 50 ml van het onder 5.2 verkregen filtraat met 100 ml n-hexaan (3.3). Breng het mengsel kwantitatief op de kolom en laat de vloeistof doorlopen tot juist boven de natriumsulfaatlaag. Verwijder de doorgelopen vloeistof. Voeg daarna 300 ml diethylether (3.5) toe en laat de vloeistof weer doorlopen tot boven de natriumsulfaatlaag. De doorloop-snelheid moet 8 tot 12 ml/minuut bedragen. Zorg ervoor dat de kolom niet droogloopt. Verwijder de doorgelopen vloeistof. Elueer vervolgens met 150 ml van het mengsel van chloroform en methanol (3.9) en vang daarbij het gehele eluaat op. Damp het eluaat in de rotatievacuümver-damper (4.5) onder een inerte gasstroom (3.13) en bij een temperatuur van hoogstens 45°C tot bijna geheel droog in. Breng het residu kwan-titatief met chloroform (3.2) over in een reageerbuisje van 10,0 ml (4.10). Concentreer de oplossing onder een inerte gasstroom (3.13) en breng vervolgens met chloroform (3.2) het volume op 1,0 ml.

5.4 Tweedimensionale dunnelaagchromatografie

5.4.1 Opbrengen van oplossingen (als aangegeven in figuur 1).

Trek op een plaat (4.8) twee lijnen evenwijdig aan twee aanliggende zijden (op een afstand van respectievelijk 5 en 6 cm van deze zijden), die de migratie van de loopvloeistoffen moeten afbakenen. Breng met behulp van capillaire pipetten of microsputjes op de plaat de hier-onder aangegeven oplossing op:

- in punt A 20 µl van het onder 5.3 verkregen gezuiverde extract van het monster;
- in punt B 10 µl van de standaardoplossing (3.18);
- in punt C 5 µl van de standaardoplossing (3.18);
- in punt D 10 µl van de standaardoplossing (3.18);
- in punt E 20 µl van de standaardoplossing (3.18).

Droog met behulp van een zwakke stroom lucht of inert gas (3.13).

De verkregen vlekken moeten een diameter van ongeveer 5 mm hebben.

5.4.2 Ontwikkeling (als aangegeven in figuur 1).

Ontwikkel het chromatogram in richting 1 met behulp van de loopvloeistof (3.16.1) in het donker, totdat het vloeistoffront de grenslijn bereikt. Neem de plaat uit de ontwikkelbak en laat deze minstens 15 minuten in het donker en bij omgevingstemperatuur drogen.

Ontwikkel vervolgens het chromatogram in richting II met behulp van de loopvloeistof (3.16.2) in het donker, totdat het front van de loopvloeistof de grenslijn bereikt. Neem de plaat uit de ontwikkelbak en laat deze in het donker bij omgevingstemperatuur drogen.

5.4.3 Beoordelen van het chromatogram.

Bekijk het chromatogram onder UV-licht. Bepaal de plaats van de vlekken met blauwe fluorescentie B, C, D en E van aflatoxine B_1 afkomstig van de standaardoplossing en trek twee denkbeeldige lijnen door deze vlekken loodrecht op de richtingen van het ontwikkelen. Het snijpunt P van deze lijnen is de plaat waar men de aflatoxine B_1 vlek ongeveer kan verwachten, afkomstig van het in A opgebrachte extrakt van het monster (fig. 1). Bepaal de hoeveelheid aflatoxine B_1 van het extrakt van het monster zoals aangegeven in 5.5.

5.5 Kwantitatieve bepaling

Voer de bepaling ofwel visueel ofwel fluorodensitometrisch uit op de wijze die hierna is beschreven.

5.5.1 Visuele bepaling

Bepaal de hoeveelheid aflatoxine B_1 in het extrakt door de intensiteit van de fluorescentie van de vlek in het extrakt met een van de vlekken C, D en E van de standaardoplossing te vergelijken. Interpoleer indien nodig. Verdun indien de fluorescentie-intensiteit van 20 μ l extrakt sterker is dan die van 20 μ l standaardoplossing het extrakt 10 of 100 maal met chloroform (3.2) alvorens het extrakt aan een nieuwe dunne-laagchromatografische scheiding te onderwerpen.

5.5.2 Bepaling door fluorodensitometrie.

Meet de fluorescentie-intensiteit van de aflatoxine B_1 vlekken met behulp van een fluorodensitometer bij een golflengte van 365 nm voor de extinctie en bij een golflengte van 443 nm voor de emissie. Bepaal de hoeveelheid aflatoxine B_1 van de extraktvlekken door de fluorescentie-intensiteiten van deze vlekken te vergelijken met die van de vlekken C, D en E van de standaardoplossing.

5.6 Bevestiging van de identiteit van aflatoxine B₁.

Screeningsmethode via HPLC na post-column derivatisering.

(J. Chrom. 282 (1983) 457-462).

6. Berekening van de resultaten

6.1 Visuele meting

Het gehalte aan aflatoxine B₁ van het monster in µg/kg (ppb) wordt berekend met behulp van de volgende formule:

$$\frac{S \cdot Y \cdot V}{W \cdot X}$$

waarin:

Y en X = volumina in microliter uitgedrukt van de aflatoxine B₁ standaardoplossing (3.18) resp. van het extrakt waarvan de fluorescentie-intensiteiten gelijk zijn;

S = concentratie in microgram aflatoxine B₁ per ml in de standaardoplossing (3.18);

V = eindvolume van het extrakt in microliter, met inachtneming van een eventueel gemaakte verdunning;

W = massa van het monster in gram, overeenkomend met de voor de kolomzuivering gebruikte hoeveelheid extrakt.

6.2 Het meten door middel van fluorodensitometrie

Het gehalte aan aflatoxine B₁ van het monster in µg/kg (ppb) wordt berekend met behulp van de volgende formule:

$$\frac{S \cdot V}{W \cdot Y}$$

waarin:

Y = volume van het op de plaat opgebrachte extrakt in microliter (20 µl);

S = het aantal nanogram aflatoxine B₁ in de extraktvlek (rekening houdend met het volume Y) afgeleid uit de metingen;

V = eindvolume van het extrakt in microliter, met inachtneming van een eventueel gemaakte verdunning;

W = massa van het monster in gram, overeenkomend met de voor de kolomzuivering gebruikte hoeveelheid extrakt.

7. Bereiding en controle van de standaardoplossing (3.18)

7.1 Bepaling van de aflatoxine B₁ concentratie

Meet het absorptiespectrum van de aflatoxine B₁ standaardoplossing (3.17) in chloroform (3.2) tussen 330 en 370 nm met een spectrofotometer (4.11). Bepaal de optische dichtheid (A) bij 363 nm. Bereken de aflatoxine B₁ concentratie in microgram per ml oplossing met behulp van de volgende formule:

$$\frac{312 \cdot A \cdot 1000}{22300}$$

7.2 Verdunningsvoorschrift voor de aflatoxine B₁ standaard (3.17)

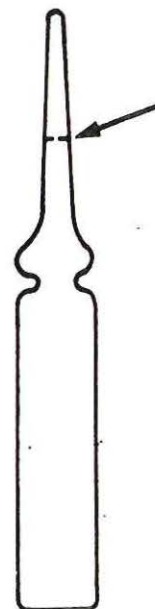
Kras de ampul op de aangegeven plaats in met een glasmalesje en breek de top van de ampul voorzichtig af. (Opbreken van de ampul ter plaatse van de nek bemoeilijkt het uitgieten in een maatkolfje.)

Breng de inhoud van de ampul kwantitatief over in een maatkolf van 50 ml en vul aan tot de streep met chloroform (3.2), gestabiliseerd met 0,5-1% ethanol 96%. Weeg de kolf met inhoud en noteer dit gewicht op de kolf. Deze (1:20) verdunning (0,5 µg/ml) is tenminste 4 maanden houdbaar, mits koel (ca. 4°C) en in het donker bewaard.

Ontwikkel daartoe de maatkolf (ook de stop) met Al-folie en bewaar het geheel in de koelkast (ca. 4°C).

Bereid een (1:100) werkverduunning (0,1 µg/ml) (3.18) als volgt:

Breng de maatkolf met de (1:20) verdunning op kamertemperatuur. Verwijder, ter voorkoming van condensvorming op de kolf en nabij de stop, eerst daarna de Al-folie. Breng 2,0 ml van de kamertemperatuur gebrachte (1:20) verdunning in een maatkolfje of gecalibreerd puntbuisje van 10 ml en vul aan tot de maatstreep met chloroform (3.2). Weeg de kolf of het buisje met inhoud en noteer dit gewicht op de kolf of het buisje. Ontwikkel de maatkolf of het buisje (ook de stop) met Al-folie. Deze (1:100) werkverduunning is buiten de koelkast 14 dagen houdbaar, mits in het donker bewaard. Bij regelmatig gebruik wordt aanbevolen de (1:100) werkverduunning niet in de koelkast te bewaren om condensvorming nabij de stop ten gevolge van temperatuurwisselingen te voorkomen. Controleer door middel van wegen van de (1:20) en de (1:100) verdunning of er verdampen van het oplosmiddel tijdens het bewaren heeft plaatsgevonden en breng zonodig weer op oorspronkelijk gewicht met chloroform.



8. Herhaalbaarheid

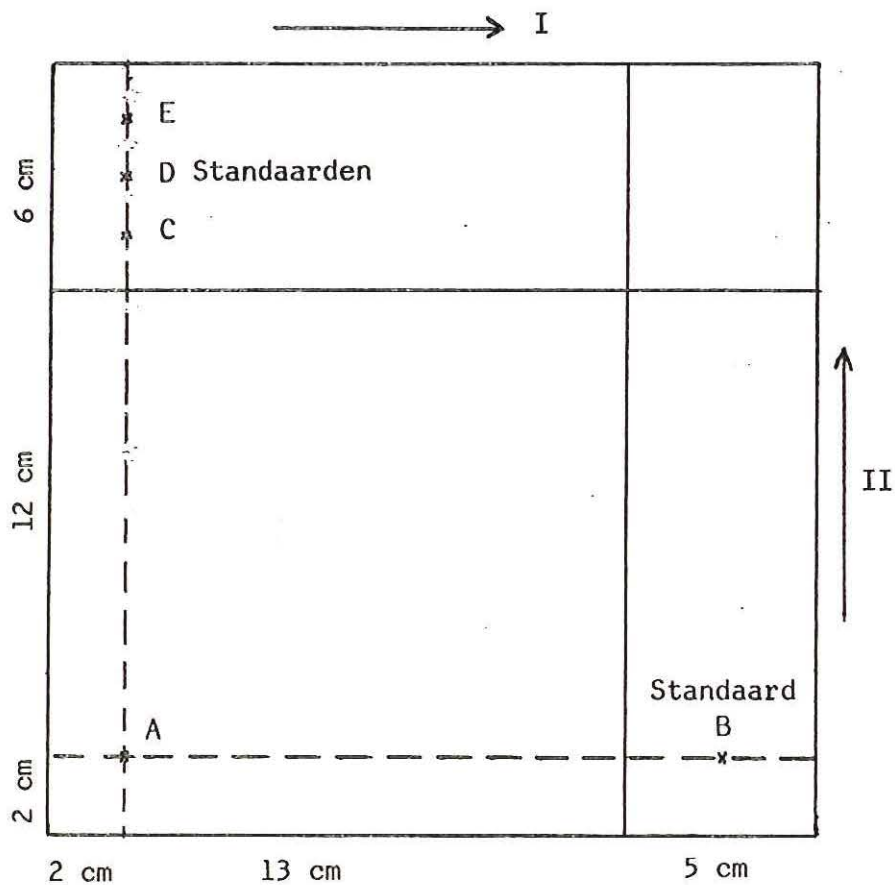
Het verschil tussen de resultaten van twee door dezelfde analist aan hetzelfde monster uitgevoerde parallelbepalingen zou niet meer mogen bedragen dan:

- bij een gehalte tussen 10 en 20 $\mu\text{g/kg}$, 25% van de gemeten hoogste waarde;
- tussen 20 en 50 $\mu\text{g/kg}$, niet meer dan 5 $\mu\text{g/kg}$;
- boven 50 $\mu\text{g/kg}$, niet meer dan 10% van de hoogste waarde.

9. Reproduceerbaarheid

Het verschil tussen de resultaten van twee laboratoria, gemeten aan hetzelfde monster, mag niet meer bedragen dan:

- in het gebied van 10-20 $\mu\text{g/kg}$, 50% van de hoogste gemeten waarde;
- tussen 20 en 50 $\mu\text{g/kg}$, niet meer dan 10 $\mu\text{g/kg}$;
- boven 50 $\mu\text{g/kg}$, niet meer dan 20% van de hoogste waarde.



Figuur 1