Project 404.0440
Inventariserend onderzoek naar het voorkomen van mycotoxinen
(A.H. Roos)

RAPPORT 88.27 APRIL 1988

ONDERZOEK NAAR AFLATOXINE B1 IN MENGVOEDERS EN GRONDSTOFFEN. JAAROVERZICHT 1987

A.H. Roos en ir L.G.M.Th. Tuinstra

Afdeling: Organische Contaminanten

Medewerkers: R.J. van Mazijk, W.A. Traag en J.M.P. van Trijp

Goedgekeurd door: dr F. Huf

Rijks- Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT)
Bornsesteeg 45, 6708 PD WAGENINGEN
Postadres: Postbus 230, 6700 AE WAGENINGEN
Telefoon 08370-19110
Telex 75180 RIKIL
Telefax 08370-17717

VERZENDLIJST

INTERN

directeur
sectorhoofden
coördinator dierlijke produkten
projectleider
afd. Organische Contaminanten (4x)
projectbeheer
bibliotheek
circulatie

EXTERN

Algemene Inspectie Dienst, Kerkrade (E.P. Valent, J.E. Boswijk)
directie Voedings- en Kwaliteitsaangelegenheden
directie Veehouderij en Zuivel
directie Landbouwkundig Onderzoek
LAC - Stuurgroep Zuivelverontreiniging (15x)
LAC - Werkgroep Mycotoxinen (15x)
Directeur vor de Rundvee-, Schapen- en Paardenhouderij, Lelystad
CAD Voedervoorziening, Lelystad
CAD Rundveeverbetering, Arnhem
CMMB Wageningen
AGRALIN, PUDOC
Ware(n)-Chemicus

ABSTRACT

ONDERZOEK NAAR AFLATOXINE B1 IN MENGVOEDERS EN GRONDSTOFFEN.
JAAROVERZICHT 1987.

ANALYSIS OF AFLATOXIN B1 IN DUTCH FEEDING STUFFS AND INGREDIENTS.
ANNUAL REPORT 1987.

A.H. Roos and L.G.M.Th. Tuinstra

State Institute for Quality Control of Agricultural Products (RIKILT)
P.O. Box 230, 6700 AE WAGENINGEN, The Netherlands.

Report 88.27 April 1988
3 tables, 6 references, 2 figures

Results of routine analysis of aflatoxin B1 in Dutch cattle feed and groundnuts, based on solid phase extraction in combination with an HPLC system provided with a post column reaction (bromine) and fluorescence detection, are reported.
In cattle feed (n= 164) a median of 0,004 mg/kg aflatoxin B1 was found. The results are ranging from lower than 0,002 mg/kg to 0,055 mg/kg. Exceeding of the tolerance (0,010 mg/kg), using the official EC-method, was observed in 5 samples of cattle feed.
The median of the groundnuts (n= 156) was 0,15 mg/kg aflatoxin B1 and the range was from lower than 0,01 mg/kg to 0,8 mg/kg. Exceedings of the tolerance (1,0 mg/kg) were not observed.
The contamination in groundnuts depends strongly on the country of origin. Samples from USA, Argentine and Senegal are low contaminated (in general below 0,1 mg/kg). Samples from Soudan are in general above 0,2 mg/kg aflatoxin B1.

Keywords: Aflatoxin B1, cattle feed, groundnuts.

INHOUDSOPGAVE	blz.
ABSTRACT	I
SAMENVATTING	III
1 INLEIDING	1
2 MATERIAAL EN METHODE	2
2.1 Monstername en monstermateriaal	2
2.2 Methoden van onderzoek	2
2.2.1 HPLC screeningsmethode	2
2.2.2 EEG bevestigingsmethode	2
3 RESULTATEN EN DISCUSSIE	3
3.1 Rundveevoeders	3
3.2 Grondnoten	4
3.3 Overige veevoeders en grondstoffen	5
4 CONCLUSIE	6
LITERATUUR	7

BIJLAGE

A FREQUENTIEVERDELING AFLATOXINE B1 IN GRONDNOTEN EN RUNDVEEVOEDERS

SAMENVATTING

Het rapport geeft een overzicht van de resultaten van het onderzoek naar aflatoxine B1 in rundveevoeders (n= 164), grondnoten (n= 156), varkensvoeder (n= 8), een legpluimveevoeder, een kokos/soyapalmpit-mengsel en een maismonster in 1987.
Overschrijdingen van het maximum toelaatbare gehalte voor aflatoxine B1 in rundveevoeders (0,010 mg/kg bij een vochtgehalte van 12%) werden met de officiële EEG-methode aangetoond in 5 van de geanalyseerde monsters (n= 164).
De mediaan bedroeg 0,004 en de range < 0,002 - 0,055 mg/kg aflatoxine B1 en is vergelijkbaar met die van de voorgaande verslagperiode (1986).
In grondnotenschroot bedroeg de mediaanbesmetting 0,15 mg/kg aflatoxine B1 op produkt. Overschrijding van de norm (1,0 mg/kg op produkt) werden niet aangetoond. De besmetting in grondnotenschroot wordt sterk bepaald door het land van herkomst. Een relatief lage besmetting wordt in het algemeen gemeten in partijen afkomstig uit de USA, Argentinië en Senegal (< 0,1 mg/kg). In partijen afkomstig uit Soedan ligt in 82% van de monsters het gehalte boven de in de EEG voor grondstoffen voorgestelde norm van 0,2 mg/kg aflatoxine B1 op produkt.

1 INLEIDING

De aanwezigheid van mycotoxinen, met name aflatoxine B1 in veevoeders en veevoedergrondstoffen kan ernstige gevolgen hebben voor de zuivelindustrie. Binnen Europa zijn of worden ontwerpnormen voor melk (produkten) en zuigelingenvoeding voor aflatoxine M1 voorgesteld. Met name in het winterhalfjaar worden in Nederland incidenteel door het Zuivelcontrole instituut te Leusden overschrijdingen gemeten voor aflatoxine M1, waarvoor door de LAC-werkgroep mycotoxinen een ontwerpnorm van 0,05 ug/kg in melk is voorgesteld. Bij export van zuigelingenvoeding zal in veel landen de daar voorgestelde norm van 0,01 ug/kg overschreden kunnen worden.

Ter bewaking van de kwaliteit van de Nederlandse zuivelprodukten wordt in het kader van de Verordening Vvr Ongewenste Stoffen en Produkten 1975 en het Besluit Vvr Ongewenste Stoffen en Produkten 1975 een controle op aflatoxine B1 uitgevoerd in mengvoeders en grondstoffen.

In dit verslag worden ter ondersteuning van het beleid de resultaten van het aflatoxine B1 onderzoek voor de LAC Stuurgroep Zuivelverontreiniging en voor de LAC-werkgroep Mycotoxinen samengevat. De resultaten van het in 1987 aan de mengvoeders en grondstoffen uitgevoerde onderzoek zijn getoetst aan de volgende normen.

Produkt	Aflatoxine B1 (mg/kg bij een vochtgehalte van 12%)
Enkelvoudige diervoeders	0,050
Volledige diervoeders voor runderen, schapen en geiten (met uitzondering van melkvee, kalveren en lammeren)	0,050
Volledige diervoeders voor varkens en pluimvee (met uitzondering van jonge dieren)	0,020
Andere volledige diervoeders (o.a. mestpluimveevoeders)	0,010
Aanvullende diervoeders voor melkvee	0,010

Voor grondnoten geldt een norm van 1,0 mg/kg aflatoxine B1 op produkt.

2 MATERIAAL EN METHODE

2.1 Monstername en monstermateriaal

De monstername werd verzorgd door de Algemene Inspectiedienst en de Dienst Invoerrechten en Accijnzen in het kader van de controle op de Verordening Vvr Ongewenste Stoffen en Produkten 1975 en het Besluit Vvr Ongewenste Stoffen en Produkten 1975.
Door de Algemene Inspectiedienst werden voor onderzoek op aflatoxine B1 164 monsters rundveevoeder, 8 monsters varkensvoeder, 1 monster legpluimveevoeder, 11 monsters grondnoten, 1 monster mais en 1 grondstoffenmengsel aangeboden voor onderzoek op aflatoxine B1.
Door de Dienst Invoerrechten en Accijnzen werden voor onderzoek op aflatoxine B1 145 monsters grondnoten aangeboden.

2.2 Methoden van onderzoek

2.2.1 HPLC screeningsmethode

Een aliquot van het gehomogeniseerde gemalen produkt werd geëxtraheerd met chloroform. Na filtratie en zuivering over een Florisil cartridge en een C18 cartridge (van Egmond) werd een HPLC-scheiding op een C18 reversed-phase kolom uitgevoerd, gevolgd door post-column derivatisering met on-line gegenereerd broom voorafgaande aan de detektie met de fluorescentiedetektor (Kok). In elke serie monsters werden recovery-experimenten uitgevoerd en werden ter controle check-samples meegeanalyseerd. Bij overschrijding van de tolerantie werd de officiële analysemethode conform EEG richtlijn 76/372 gevolgd.

2.2.2 EEG bevestigingsmethode

Een aliquot van het gehomogeniseerde gemalen produkt werd geëxtraheerd met chloroform. Na filtratie en zuivering over een silicagelkolom werd het eluaat ingedampt en opgenomen in chloroform. Na tweedimensionale dunnelaagchromatografie werd de aflatoxine B1 door vergelijking met een standaardreeks densitometrisch bepaald.
Bij elke serie monsters werd een recovery experiment aan een monster en een blanco bepaling uitgevoerd.

3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

3.1 Rundveevoeders

In tabel 1 zijn de aflatoxine B1 resultaten verkregen met de HPLC screeningsmethode in rundveevoeders in 1987 per maand en over de totale verslagperiode samengevat.

Tabel 1: Het aflatoxine B1 gehalte van rundveevoeders in 1987 (mg/kg, bij een vochtgehalte van 12%) (HPLC-screeningsmethode)

Maand	Mediaan (mg/kg)	Max. gehalte (mg/kg)	Aantal monsters > 0,010 mg/kg	Aantal monsters (n)
Januari	0,005	0,015	3	14
Februari	0,003	0,026	4	21
Maart	0,004	0,011	1	8
April	0,002	0,022	1	19
Mei	0,002	0,013	1	10
Juni	<0,002	0,055	1	10
Juli	0,003	0,007	0	8
Augustus	0,003	0,018	3	13
September	0,007	0,011	1	8
Oktober	0,004	0,015	1	21
November	0,007	0,016	2	19
December	0,006	0,019	4	13
Totaal	0,004	0,055	20	164

De mediaan van de aflatoxine B1 besmetting van de rundveevoeders bedroeg in 1987 0,004 mg/kg bij een vochtgehalte van 12% en is vergelijkbaar met de mediaan in 1986 (Roos). In vergelijking met de voorgaande verslagperiode is er sprake van een duidelijke toename van de besmetting in de stalperiode. De frequentieverdeling van de aflatoxine B1 besmetting in rundveevoeders is grafisch weergegeven in bijlage A. In 20 monsters werd m.b.v. de HPLC-screeningsmethode in een enkelvoudige analyse een aflatoxine B1 gehalte groter dan 0,010 mg/kg bij een vochtgehalte van 12% aangetoond.

Op basis van de onzekerheid in de analysemethode is er eerst sprake van een overschrijding van de norm als er met de EEG-bevestigingsmethode door 2 analisten een gehalte groter dan 0,015 mg/kg wordt aangetoond. In 1987 werd aldus na heranalyse met de EEG-methode in 5 van de 20 monsters, met een screeningsresultaat groter dan 0,010 mg/kg aflatoxine B1 bij een vochtgehalte van 12%, een overschrijding vastgesteld. Met behulp van de HPLC-screeningsmethode zouden bij dezelfde grens (0,015 mg/kg) als bij de EEG-methode 7 overschrijdingen zijn aangetoond.

De recovery van aflatoxine B1 toegevoegd aan rundveevoeders op het 0,040 mg/kg niveau bedroeg met de HPLC screeningsmethode gemiddeld 87%, range 62-104%. De variatiecoëfficient voor de herhaalbaarheid bedroeg 12% (n= 23). De herhaalbaarheid van de screeningsmethode met een check-sample rundveevoeder dat van nature was besmet met aflatoxine bedroeg 13% (n= 7).

In recovery-experimenten uitgevoerd met de EEG-bevestigingsmethode aan rundveevoeders op het 0,040 mg/kg niveau bedroeg de recovery gemiddeld 84%, range 74-100%. De variatiecoëfficient voor de herhaalbaarheid bedroeg 14% (n= 6).

3.2 Grondnoten

In tabel 2 wordt een overzicht gegeven van de mediaan, range en het aantal monsters grondnoten naar herkomst. De frequentieverdeling van de aflatoxine B1 besmetting van grondnotenmonsters is grafisch weergegeven in bijlage A.

Tabel 2: Overzicht van het aflatoxine B1 gehalte naar herkomst in grondnotenschroot in 1987 (mg/kg op produkt)

Herkomst	Mediaan (mg/kg)	Range (mg/kg)	Aantal monsters
Argentinië	0,07	< 0,01-0,32	37
USA	0,11	< 0,01-0,28	10
Senegal	0,02	0,01-0,18	24
Soedan	0,32	0,04-0,77	63
Brazilië	0,06	0,04-0,08	8
Panama	< 0,01	< 0,01	1
Onbekend	0,02	< 0,01-0,54	13
Totaal	0,15	< 0,01-0,77	156

Evenals bij de rundveevoeders is er bij de grondnoten sprake van een toename van de aflatoxine B1 besmetting. De mediaan van de aflatoxine B1 besmetting bedroeg in 1987 0,15 mg/kg en in 1986 slechts 0,02 mg/kg. Bepalend voor deze toename is vooral de stijging van het aantal monsters afkomstig uit Soedan.
Overschrijdingen van het maximum toegestane gehalte van 1,0 mg/kg aflatoxine B1 werden niet aangetoond.
De aflatoxine B1 besmetting van partijen grondnoten afkomstig uit de USA, Argentinië en Senegal is in het algemeen laag, terwijl in partijen uit Soedan een veel hogere besmetting wordt gemeten.
Als de verkregen resultaten getoetst worden aan de in de EEG voor grondnoten, kokos, palmpit, katoenzaad, babassu en mais voorgestelde norm van 0,2 mg/kg aflatoxine B1 voldoet 37% van de monsters niet aan deze norm. Het betreft voornamelijk monsters afkomstig uit Soedan (n= 52). In 82% van de uit Soedan afkomstige monsters ligt het gehalte boven de 0,2 mg/kg aflatoxine B1 op produkt.

3.3 Overige veevoeders en veevoedergrondstoffen

In tabel 3 wordt een overzicht gegeven van de mediaan, range en het aantal monsters van de overige geanalyseerde veevoeders en grondstoffen.

Tabel 3: Overzicht van het aflatoxine B1 gehalte van varkensvoeder, pluimveevoeder, mais en een veevoedergrondstof (m.u.v. grondnoten) in 1987.

Produkt	Mediaan (mg/kg)	Range (mg/kg)	Aantal monsters
varkensvoeder	< 0,002	< 0,002-0,020	8
legpluimveevoeder		< 0,002	1
mais		< 0,002	1
kokos/soja/pampit		0,004	1

4 CONCLUSIES

De mediaanbesmetting van het aflatoxine B1 gehalte in rundveevoeders (0,004 mg/kg, bij een vochtgehalte van 12%) is in 1987 vergelijkbaar met de mediaan in de voorgaande verslagperiode (1986). In de stalperiode wordt een duidelijke toename van de aflatoxine B1 besmetting in de rundveevoeders waargenomen. Met behulp van de HPLC screeningsmethode werd in 20 van de geanalyseerde monsters rundveevoeder (n= 164) een gehalte groter dan het maximum toelaatbare gehalte, zijnde 0,010 mg/kg aflatoxine B1 bij een vochtgehalte van 12%, aangetoond. Na bevestiging m.b.v. de EEG-methode werd in 5 monsters een overschrijding vastgesteld.

In grondnoten wordt een mediaanbesmetting van 0,15 mg/kg aflatoxine B1 op produkt gemeten. Hier is sprake van een sterke toename van de besmetting. In 1986 bedraag de mediaan nog 0,02 mg/kg op produkt. De mediaanbesmetting in de partijen grondnoten wordt sterk bepaald door het land van herkomst. In het algemeen wordt een lage besmetting gemeten in partijen afkomstig uit de USA, Argentinië en Senegal, terwijl in partijen uit Soedan een veel hogere besmetting wordt gemeten. Overschrijdingen van het maximum toelaatbare gehalte werden niet aangetoond.

In partijen afkomstig uit Soedan ligt in 80% van de monsters het gehalte boven de in de EEG voor grondstoffen voorgestelde norm van 0,2 mg/kg aflatoxine B1 op produkt.

LITERATUUR

Besluit Vvr Ongewenste Stoffen en Produkten 1975. Produktschap voor Veevoeder, 's-Gravenhage, 1987.

EEG-richtlijn 76/372, Bepaling van aflatoxine B1, Publikatieblad van de Europese Gemeenschappen Nr. L 102/8-18 (15.4.76).

Egmond H.P. van, E.A. Sizoo en W.E. Paulsch. Evalution of new methods of analysis for the determination of aflatoxin B1 in feedingstuffs, Bilthoven 1985, RIVM-report no. 842066001.

Kok W.Th., Th.C.H. van Neer, W.A. Traag en L.G.M.Th. Tuinstra. Determination of aflatoxins in cattle feed by liquid chromatography and post-column derivatization with electrochemically generated bromine, Journal of Chromatography, 367 (1986) 231-236.

Tuinstra L.G.M.Th., A.H. Roos. Het gehalte aan aflatoxine B1 in mengvoeders en grondstoffen in 1986, Wageningen 1987, RIKILT rapport 87.29a.

Verordening Vvr Ongewenste Stoffen en Produkten 1975, Produktschap voor Veevoeder, 's-Gravenhage, 1986.