

Stofnaam	Aflatoxine B1
Type methode	HPLC met joodderivatisering
Te onderzoeken in	Mengvoeders; diervoedergrondstoffen en enkelvoudige diervoeders
Minimum bepaalbaarheidsgrens	0,001 mg/kg
Herhaalbaarheid	$r = 0,37 + 0,19 w_a$ ( $w_a \leq 15 \mu\text{g/kg}$ ) waarin: $w_a$ = gemiddelde van de twee enkelvoudige beproevingsresultaten, in $\mu\text{g/kg}$ $r$ = de herhaalbaarheidslimiet, in $\mu\text{g/kg}$
Reproduceerbaarheid	$R = 0,67 + 0,33 w_a$ ( $w_a \leq 15 \mu\text{g/kg}$ ) waarin: $w_a$ = gemiddelde van de twee enkelvoudige beproevingsresultaten, in $\mu\text{g/kg}$ $R$ = de reproduceerbaarheidslimiet, in $\mu\text{g/kg}$
Categorie	A
Titel	B. Bepaling van aflatoxine B1 met hogedrukvlloeistofchromatografie. Richtlijn 92/95/EEG van de Commissie van 9 november 1992 tot wijziging van Zevende Richtlijn 76/372/EEG houdende vaststelling van gemeenschappelijke analysemethoden voor de officiële controle van diervoeders. Publicatieblad van de EG 13-11-1992; Nr L 327/55-62

## **BEPALING VAN AFLATOXINE B<sub>1</sub> MET HOGEDRUKVLOEISTOFCHROMATOGRAFIE (met jodiumderivatisering)**

### **1. Doel en toepassingsgebied**

Met behulp van deze methode is het mogelijk het gehalte aan aflatoxine B<sub>1</sub> te bepalen in diervoeders, inclusief die welke citruspulp bevatten. De onderste bepalingsgrens is 0,001 mg/kg (1 ppb).

### **2. Principe**

Het monster wordt met chloroform geëxtraheerd. Het extract wordt gefiltreerd en een gedeelte van het filtraat wordt achtereenvolgens met een Florisil-patroon en een C<sub>18</sub>-patroon gezuiverd. De uiteindelijke scheiding en bepaling worden uitgevoerd met hogedrukvlloeistofchromatografie (HPLC) met een reversed phase C<sub>18</sub>-kolom, gevolgd door derivatisering met jodium en fluorescentiedetectie.

N.B.: Mycotoxinen zijn uiterst giftige verbindingen. Handelingen dienen in een zuurkast te worden uitgevoerd. Speciale voorzorgsmaatregelen dienen te worden genomen wanneer aflatoxinen in vast vorm zijn, vanwege hun elektrostatische karakter waardoor zij zich gemakkelijk in werkruimten verspreiden.

### **3. Reagentia**

3.1 Chloroform, gestabiliseerd met 0,5 tot 1,0% (m/m) etahnol. Zie opmerking 10.2.

3.2 Methanol, HPLC-kwaliteit voor bereiding van 3.6.

3.3 Aceton.

3.4 Acetonitril, HPLC-kwaliteit.

3.5 Elutiemiddelen.

Bereid deze één dag voor gebruik, of verwijder de lucht er ultrasoon uit.

3.5.1 Mengsel van aceton (3.3) en water, 98 + 2 (v + v).

3.5.2 Mengsel van water en methanol (3.2), 80 + 20 (v + v).

3.5.3 Mengsel van water en aceton (3.3), 85 + 15 (v + v).

3.6 Mobiele fase voor HPLC.

Mengsel van water, methanol (3.2) en acetonitril (3.4), 130 + 70 + 40 (v + v + v).

N.B.: Zonodig wordt de samenstelling van de mobiele fase aangepast aan het gebruikte type HPLC-kolom.

3.7 Verzadigde oplossing van jodium en water. Voeg 2 g jodium toe aan 400 ml water.

Meng gedurende tenminste 90 minuten en filtreer door een membraanfilter (4.15). Scherm deze oplossing af tegen licht om ontleding te voorkomen.

- 3.8 Celite 545, met zuur gewassen, of gelijkwaardig materiaal.
- 3.9 Florisil-patroon (Waters SEP-PAK) of gelijkwaardig materiaal.
- 3.10 C<sub>18</sub>-patroon (Waters SEP-PAK) of gelijkwaardig materiaal.
- 3.11 Inert gas, bijvoorbeeld stikstof.
- 3.12 Aflatoxine B<sub>1</sub>, standaardoplossing in chloroform, concentratie □g/ml. Controleer de concentratie van de oplossing als volgt: neem het absorptiespectrum van de oplossing op tussen 330 en 370 nm met een spectrofotometer (4.23). Meet de absorptie (A) bij het maximum dicht bij 363 nm. Bereken de concentratie aflatoxine B<sub>1</sub> in microgram per milliliter oplossing met de formule:

$$\text{Concentratie } (\mu\text{g/ml}) = \frac{312 \times A \times 1000}{22300} = 13,991 \times A$$

3.12.1 Aflatoxine B<sub>1</sub>, voorraadstandaardoplossing in chloroform:

Breng 2,5 ml standaardoplossing (3.12) kwantitatief over in een maatkolf van 50 ml en vul aan tot de maatschep met chloroform (3.1). Bewaar deze oplossing goed afgesloten, in aluminiumfolie gewikkeld en op een koele (4°C) en donkere plaats.

3.13 Aflatoxine B<sub>1</sub>, ijkoplossingen voor HPLC.

N.B.: Gebruik voor de bereiding van deze oplossingen met zuur gewassen glaswerk (zie bij 4, Apparatuur).

3.13.1 Ijkoplossing, 4 ng/ml:

Laat de maatkolf met de voorraad-standaardoplossing (3.12.1) in enkele uren in aluminiumfolie tot kamertemperatuur opwarmen. Breng 400 µl van de voorraadstandaardoplossing (200 ng aflatoxine B<sub>1</sub>) over in een maatkolf van 50 ml en damp dit droog met een stroom inert gas (3.11).

Los het verkregen residu op in ongeveer 20 ml water/acetone (3.5.3), vul de oplossing aan tot de maatstreep met het water/acetone-mengsel en meng goed.

3.13.2 Ijkoplossing, 3 ng/ml:

Breng 7,5 ml van de ijkoplossing van 4 ng/ml (3.13.1) kwantitatief over in een maatkolf van 10 ml, vul aan tot de maatstreep met water/acetone (3.5.3) en meng goed.

3.13.3 Ijkoplossing, 2 ng/ml, tevens referentiestandaard:

Breng 25 ml van de ijkoplossing van 4 ng/ml (3.13.1) kwantitatief over in een maatkolf van 50 ml, vul aan tot de maatstreep met het water/acetone-mengsel

(3.5.3) en meng goed.

Deze oplossing wordt ook gebruikt voor herhaalde injectie tijdens HPLC-bepalingen (5.5) en wordt hierna aangeduid als referentiestandaard.

#### 3.13.4 Ijkoplossing, 1 ng/ml:

Breng 2,5 ml van de ijkoplossing van 4 ng/ml (3.13.1) kwantitatief over in een maatkolf van 10 ml, vul aan tot de maatstreep met het water/aceton-mengsel (3.5.3) en meng goed.

#### 3.14 Ampul welke een mengsel van aflatoxinen B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> en G<sub>2</sub> in concentraties van respectievelijk circa, 1, 0,5, 1 en 0,5 µg/ml in ml chloroform bevat.

##### 3.14.1 Testoplossing voor HPLC:

Breng de inhoud van de ampul (3.14) over in een glazen buis met glazen stop of in een flesje met schroefdop. Breng 40 µl van deze oplossing over in een glazen buis met glazen stop (4.22) (met zuur gewassen). Damp de chloroform droog met een stikstofstroom en los het residu op in 10 ml water/aceton-mengsel (3.5.3).

#### 3.15 Reagentia voor bevestigingstest (6)

##### 3.15.1 Verzadigde oplossing van natriumchloride in water

##### 3.15.2 Natriumsulfaat, watervrij, in korrels

## 4. Apparatuur

### *Opgelet:*

Het gebruik van niet met zuur gewassen glaswerk voor oplossingen van aflatoxine in water kan leiden tot verlies van aflatoxine. Bijzondere aandacht dient te worden besteed aan nieuw glaswerk en wegwerpglaswerk, zoals flesjes voor monsterwisselaars en pasteurpipetten. Glaswerk dat met oplossingen van aflatoxine in aanraking komt, moet daarom enkele uren in verdund zuur (bijvoorbeeld zwavelzuur, 2 mol/l) worden gelegd en daarna ter verwijdering van zurresten grondig met gedestilleerd water worden gespoeld (bij voorbeeld drie maal, controleren met pH-papier). In de praktijk is deze behandeling nodig voor de rondbodemkolf (4.4), de maatkolven en maatcilinders, de voor ijkoplossingen en extracten gebruikte flesjes en buizen (vooral voor flesjes voor monsterwisselaars) en de pasteurpipetten voor zover deze worden gebruikt voor het overbrengen van ijkoplossingen of extracten.

#### 4.1 Maal- en mengtoestel

#### 4.2 Zeef met openingen van 1,0 mm (ISO R 565)

#### 4.3 Schudmachine

#### 4.4 Rotatievacuümverdamer, voorzien van een rondbodemkolf van 150-250 ml

- 4.5 Hogedrukvlloeistofchromatograaf; injector met injectielus geschikt voor injectie van 250  $\mu$ l. Zie de instructies van de fabrikant voor de gedeeltelijke of volledige vulling van de injectielus.
- 4.6 Analytische HPLC-kolom: C<sub>18</sub>-vulling van 3  $\mu$ m of 5  $\mu$ m deeltjes.
- 4.7 Pulsvrije pomp voor de toevoer van het jodiumreagens na de kolom.
- 4.8 T-stuk zonder dood volume (Valco), roestvrij staal (1/16" x 0,75 mm).
- 4.9 Spiraalvormig reactiekanaal; teflon of roestvrij staal. In combinatie met 5 $\mu$ m of 3 $\mu$ m HPLC-kolommen komen afmetingen van 3.000 x 0,5 mm tot 5.000 x 0,5 mm in aanmerking.
- 4.10 Gethermostateerd waterbad, ingesteld op 60°C, waarmee een temperatuurregeling van beter dan 0,1°C mogelijk is.
- 4.11 Fluorescentiedetector met excitatie- en emissiegolflengten van respectievelijk 365 en 435 nm (voor een filterinstrument: emissiegolflengte > 400 nm). Detectie van ten minste 0,05 ng aflatoxine B<sub>1</sub> moet mogelijk zijn. Het kan nodig zijn enige tegendruk toe te passen (bijvoorbeeld in de vorm van een restrictor of een spiraal van teflon of roestvrij staal aan de uitgang van de detector), om luchtbelllen in de doorstroomcel tegen te gaan.
- 4.12 Recorder
- 4.13 Elektronische integrator (facultatief).
- 4.14 Vouwfilters, doorsnede 24 cm, Macherey-Nagel 617 1/4 of gelijkwaardig.
- 4.15 Membraanfilter met poriegrootte van 0,45  $\mu$ m, Millipore H.A.W.P. 04700 of gelijkwaardig.
- 4.16 Erlenmeyerkolf van 500 ml met glazen stolp.
- 4.17 Glazen kolom (inwendige doorsnede ongeveer 1 cm, lengte ongeveer 30 cm) voorzien van een Luer-uiteinde.
- 4.18 Luer-nylon kraan, chloroformbestendig (bijvoorbeeld Bio-rad 7328017, Analytichem A1 6078, J.T. Baker 4514 of gelijkwaardig).
- 4.19 Chemisch inerte injectiespuit, 10 ml, met Luer-verbinding.
- 4.20 Injectiespuit, geschikt voor HPLC-injectie van 250  $\mu$ l (zie 4.5).
- 4.21 Microspuit van 100  $\mu$ l voor de bereiding van de ijkoplossingen (nauwkeurigheid binnen 2%, te controleren door wegen).
- 4.22 Glazen buizen, geijkt op 10 ml, met glazen stop.
- 4.23 Spectrofotometer, geschikt voor UV-meting.

4.24 Apparatuur voor bevestigingstest (6).

4.24.1 Scheitrechter van 100 ml, met teflonkraan met zuur gespoeld.

4.24.2 Verwarmingsblok, 40-50°C.

## 5. Werkwijze

### 5.1 *Monsterbereiding*

Maal het monster zo fijn dat het door de zeef (4.2) gaat.

### 5.2 *Testmonster*

Weeg 50,0 g van het bereide monster af in de erlenmeyer (4.16).

### 5.3 *Extractie*

Voeg aan het testmonster (5.2) 25 g Celite (3.8), 250 ml chloroform (3.1) en 25 ml water toe. Sluit de erlenmeyer af en schud 30 minuten op de schudmachine (4.3). Filtreer het mengsel door een vouwfilter (4.14) en vang 50 ml van het filtraat op. Neem, indien nodig, een hoeveelheid van het filtraat en verdun dit tot 50 ml met chloroform, zodanig dat de concentratie aan aflatoxine B<sub>1</sub> niet hoger is dan 4 ng/ml.

5.4 *Opzuivering* (de opzuivering dient zonder noemenswaardige onderbrekingen te worden uitgevoerd).

#### *Opgelet:*

- Zorg dat in de onderzoekruimte geen daglicht wordt toegelaten. Dit kan worden bereikt door een van de volgende maatregelen:
  1. UV-absorberende folie op de ramen, in combinatie met gedempt licht (geen direct zonlicht);
  2. gordijnen of jaloezieën in combinatie met kunstlicht (TL-buizen zijn aanvaardbaar).
- Aflatoxine-bevattende oplossingen moeten zoveel mogelijk beschermd worden tegen licht (donker bewaren, aluminiumfolie gebruiken).

#### 5.4.1 Zuivering met Florisil-SEP-PAK

##### 5.4.1.1 Voorbereiding patroon en koppeling aan kolom

Sluit aan het korte uiteinde van een Florisil-patroon (3.9) een kraan aan (zie figuur 1). Spoel de patroon en verwijder de lucht eruit door van 10 ml chloroform (3.1) met een injectiespuit (4.19) 8 ml snel via de kraan door de patroon te leiden. Verbind het lange uiteinde van de patroon met een glazen kolom (4.17) en leid de overblijvende 2 ml chloroform door de patroon in de kolom. Sluit de kraan en verwijder de injectiespuit.

##### 5.4.1.2 Zuivering

Breng het bij 5.3 verzamelde filtraat in de kolom en laat het filtraat met behulp van de zwaartekracht door de patroon elueren. Spoel met 5 ml chloroform (3.1) en vervolgens met 20 ml methanol (3.2). Verwerp de eluaten. Voorkomen met worden dat de patroon bij deze handelingen droog komt te staan. Elueer het aflatoxine B<sub>1</sub> met 40 ml aceton/water (3.5.1) en vang het gehele eluaat op in de rondbodemkolf van de rotatievacuümverdamer (4.4). Damp het eluaat in aan de rotatievacuümverdamer bij 40-50°C tot geen aceton meer wordt afgedestilleerd

**(N.B.:** Op dit punt blijft er ongeveer 0,5 ml vloeistof in de kolf over; proefondervindelijk is gebleken dat verder indampen geen kwaad kan en dat wanneer er 0,5 ml vloeistof over is, er geen noemenswaardige hoeveelheid aceton meer is; acetonresten kunnen leiden tot een verlies aan aflatoxine B<sub>1</sub> in de C<sub>18</sub>-patroon). Voeg aan het residu 1 ml methanol (3.2) toe, zwenk de kolf rond zodat op de wand van de kolf aanwezige aflatoxine B<sub>1</sub> wordt opgelost, voeg 4 ml water toe en meng. Koppel de patroon af en verwijder deze. Spoel de glazen kolom met water en bewaar deze voor de C<sub>18</sub>-zuivering.

## 5.4.2 Zuivering met C<sub>18</sub>-SEP-PAK

### 5.4.2.1 Voorbereiding patroon en koppeling aan kolom

Sluit aan het korte uiteinde van een C<sub>18</sub>-patroon (3.10) een kraan (4.18) aan (zie figuur 1). Spoel de patroon en verwijder eventuele lucht door met een spuit (4.19) 10 ml methanol (3.2) snel via de kraan door de patroon te leiden (luchtbellen in de patroon zijn zichtbaar als lichtvlekjes tegen een grijze achtergrond). Neem 10 ml water en leid 8 ml door de patroon (bij de overgang van methanol naar water oppassen voor de vorming van luchtbellen). Verbind het lange uiteinde van de patroon met een glazen kolom (4.17) en leid de overblijvende 2 ml water door de patroon in de kolom. Sluit de kraan en verwijder de spuit.

### 5.4.2.2 Zuivering

Breng het bij 5.4.1.2 verzamelde extract kwantitatief over in de kolom (4.17), spoel de kolf tweemaal met 5 ml water/methanol-mengsel en laat de vloeistof door middel van de zwaartekracht door de patroon elueren. Voorkomen moet worden dat de patroon bij deze handelingen droog komt te staan. (Indien zich in de vernauwing van de patroon luchtbellen vormen, wordt de doorstroming gestopt en wordt tegen de bovenzijde van de kolom getikt, zodat de bellen verdwijnen, waarna de doorstroming wordt hervat). Elueer met 25 ml water/methanol-mengsel (3.5.2). Verwerp de eluaten. Elueer het aflatoxine B<sub>1</sub> met 50 ml water/aceton-mengsel (3.5.3) en vang het gehele eluaat op in een maatkolf van 50 ml. Vul aan tot de maatstreep met water en meng: de verkregen monsteroplossing wordt gebruikt voor de chromatografie (5.5).

*Opgelet:* Filtreren van het uiteindelijke extract voor de HPLC-stap is meestal niet nodig. Wordt filtreren wel nodig geacht, dan dienen geen cellulosefilters te worden gebruikt, daar deze tot een verlies aan aflatoxine B<sub>1</sub> kunnen leiden. Teflon filters (4.15) zijn wel bruikbaar.

## 5.5 Hogedrukvlloeistofchromatografie

(Zie figuur 2 voor de opstelling van de apparatuur). De instrumenten moeten de gelegenheid hebben om op temperatuur te komen en stabiel te worden.

*Opmerking 1:*

De voor de HPLC-mobiele fase en het reagens na de kolom vermelde stroomsnelheden zijn slechts indicatief. Zo nodig worden deze aan de aard en de afmetingen van de HPLC-kolom aangepast.

*Opmerking 2:*

De piekuitlagen van aflatoxinen zijn afhankelijk van de temperatuur en daarom moet voor eventueel verloop worden gecompenseerd (zie figuur 3). Door injectie van een vaste hoeveelheid referentiestandaard aflatoxine B<sub>1</sub> (3.13.3) met regelmatige tussenpozen (elke derde injectie) kunnen de piekuitslagen voor aflatoxine B<sub>1</sub> tussen deze referentiestandaarden aan de hand van de gemiddelde uitslag worden gecorrigeerd, mits het verschil tussen de uitslagen van opeenvolgende referentiestandaarden klein is (< 10%). Daarom moeten injecties zonder onderbrekingen plaatshebben. Indien een onderbreking nodig is, dienen de laatste injectie voor de onderbreking en de eerste na de onderbreking injecties van de referentiestandaard (3.13.3) te zijn. Aangezien de ijklijn recht is en door de oorsprong gaat, worden de hoeveelheden aflatoxine B<sub>1</sub> in het monster rechtstreeks aan de hand van de naastliggende referentiestandaarden bepaald.

#### 5.5.1 Instelling van de HPLC-pomp

Stel de HPLC-pomp (4.5) zo in dat voor een HPLC-kolom van 5 µm respectievelijk 3 µm (4.6) de stroomsnelheid van de mobiele fase (3.6) 0,5 respectievelijk 0,3 ml/min. bedraagt.

#### 5.5.2 Instelling van de pomp na de kolom

Stel de pomp (4.7) zo in dat de jodiumoplossing (3.7) een stroomsnelheid van 0,2-0,4 ml/min. heeft. Als vuistregel dienen bij stroomsnelheden van de mobiele fase van 0,5 respectievelijk 0,3 ml/min. stroomsnelheden na de kolom van ongeveer 0,4 respectievelijk 0,2 ml/min. te worden gekozen.

#### 5.5.3 Fluorescentiedetector

Stel de fluorescentiedetector (4.11) in op een excitatiegolflengte van 365 nm en een emissiegolflengte van 435 nm (filterinstrument: > 400 nm). Stel de verzwakker van de detector zo in dat voor 1 ng aflatoxine B<sub>1</sub> de recorder ongeveer 80% van de volledige uitslag geeft.

#### 5.5.4 Injector

Injecteer van alle oplossingen hoeveelheden van 250 µl volgens de aanwijzingen van de fabrikant van de injector.

#### 5.5.5 Controle op de chromatografische scheiding

Injecteer de testoplossing voor HPLC (3.14.1). De dalen dienen een afstand tot de basislijn te hebben van minder dan 5% van de som van de hoogten van de aangrenzende pieken.

#### 5.5.6 Controle op de stabiliteit van het systeem

Injecteer voorafgaande aan een reeks analyses herhaaldelijk de referentiestandaard (3.13.3) totdat stabiele piekuitslagen worden verkregen. (**N.B.:** De piekuitslagen voor aflatoxine B<sub>1</sub> van twee opeenvolgende injecties mogen niet meer dan 6% van elkaar verschillen). Controleer onmiddellijk daarna de lineariteit (5.5.7).

#### 5.5.7 Controle op de lineariteit

Injecteer de ijkoplossingen van aflatoxine B<sub>1</sub> (3.13.1 tot en met 3.13.4). Als derde injectie wordt telkens de referentiestandaard (3.13.3) gebruikt ter correctie van het verloop in piekrespons. (**N.B.:** De piekuitslagen van de referentiestandaard mogen niet meer dan 10% verschil geven in 90 minuten). Corrigeer voor verloop met de formule bij punt 7. De ijklijn moet recht zijn en door de oorsprong lopen, binnen tweemaal de standaardfout voor de geschatte Y-waarde. De gevonden waarden mogen niet meer dan 3% van de nominale waarden afwijken. Zo niet, dan worden eerst de oorzaken van de problemen opgespoord en verholpen.

#### 5.5.8 Injectie van de monsterextracten

Injecteer de gezuiverde monsterextracten (5.4.2.2). Injecteer na twee monsterextracten telkens weer de referentiestandaard (3.13.3), dus: referentiestandaard, extract, extract, referentiestandaard, extract, extract, referentiestandaard, enz.

## 6. Bevestigingstest

### 6.1 *Verdere behandeling van het extract (5.4.2.2)*

Voeg aan het bij 5.4.2.2 verkregen extract 5 ml natriumchlorideoplossing (3.15.1) toe. Extraheer het mengsel in een scheidrecter (4.24.1) driemaal telkens een minuut met 2 ml chloroform (3.1). Giet de verzamelde chloroformextracten over ongeveer 1 g natriumsulfaat (3.15.2) in een reageerbuis van 10 ml. Hiervoor kan een trechtertje (doorsnede 4 cm) met een propje watten in de vernauwing worden gebruikt, waarop zich ongeveer 1 g natriumsulfaat (3.15.2) bevindt.

Was het natriumsulfaat met een paar ml chloroform en vang dit op in dezelfde reageerbuis. Damp het chloroformextract droog in dezelfde reageerbuis met behulp van het verwarmingsblok (4.24.2) en los het residu weer op in 1 ml chloroform.

### 6.2 *Bereiding van het derivaat en dunnelaagchromatografie*

Zie Richtlijn 76/372/EEG van de Raad van 1 maart 1976, bijlage, methode A, onder 5.6.2.

## 7. Berekening van de resultaten

Bereken het in het monster aanwezige gehalte aan aflatoxine B<sub>1</sub> in µg/kg met behulp van de formule:

$$\text{gehalte aan aflatoxine B}_1 \text{ in } \mu\text{g/kg} = \frac{m \times V_{\text{ext}}}{V_m \times M \times \frac{V_f}{V_c}}$$

waarin:

m = hoeveelheid aflatoxine B<sub>1</sub> in ng volgens de B<sub>1</sub>-piek van het monster, die als volgt wordt berekend:

$$m = \frac{P(\text{monster})}{P(\text{st}_1) + P(\text{st}_2)} \times 2r(\text{st})$$

P(monster)	=	piekoppervlak voor aflatoxine P <sub>1</sub> in het monster
P(st <sub>1</sub> )	=	piekoppervlak voor aflatoxine B <sub>1</sub> in voorafgaande referentiestandaard (3.13.3)
P(st <sub>2</sub> )	=	piekoppervlak voor aflatoxine B <sub>1</sub> in eerstvolgende referentiestandaard (3.13.3)
r(st)	=	ingespoten hoeveelheid aflatoxine B <sub>1</sub> in de referentiestandaard <u>(3.13.3) in ng</u>
V <sub>m</sub>	=	volume van het ingespoten monsterextract in ml
V <sub>ext</sub>	=	eindvolume van het monsterextract in ml, rekening houdend met eventuele verdunning (zie 5.3)
M	=	massa van het monster in g
V <sub>1</sub>	=	volume van het in de Florisil-patroon overgebrachte filtraat (5.4.1.2) in ml
V <sub>c</sub>	=	volume van de voor de monsterextractie gebruikte chloroform in ml

Indien het protocol van de hier beschreven methode wordt gevolgd, kan de formule als volgt worden vereenvoudigd:

$$\text{gehalte aan aflatoxine B}_1 \text{ in } \mu\text{g/kg} = 20 \times m$$

- 7.1 De resultaten kunnen ook worden berekend door middel van metingen van de piekhoogten.

## 8. Herhaalbaarheid

Zie bij 10.1 (opmerkingen).

## 9. Reproduceerbaarheid

Zie bij 10.1.

## 10. Opmerkingen

### 10.1 *Precisie*

Een internationaal uitgevoerd ringonderzoek<sup>1</sup> op diervoeders leverde voor de herhaalbaarheid en de reproduceerbaarheid de in tabel 1 weergegeven resultaten. Onder herhaalbaarheid (*r*) wordt hier verstaan de grootste verhouding die met een waarschijnlijkheid van 95% bij vergelijking van twee uitkomsten van hetzelfde monster in hetzelfde laboratorium onder overeenkomstige omstandigheden niet significant is. Het begrip reproduceerbaarheid (*R*) is overeenkomstig gedefinieerd voor de vergelijking van twee laboratoria volgens ISO 3534-1977, 2.35<sup>2</sup> en Beschikking nr 610/89/EEG van de Commissie van 14 november 1989<sup>3</sup>. In tabel 1 zijn *r* en *R* ook vermeld als variatiecoëfficiënten.

---

<sup>1</sup> Egmond, H.P. van, Heisterkamp, S.H. and Paulsch, W.E. (1991). Food Additives and Contaminants 8, 17-29

<sup>2</sup> ISO 3534-1977

<sup>3</sup> PB nr L 351 van 2.12 1989, blz. 39

**Tabel 1**  
**Herhaalbaarheid (r) en reproduceerbaarheid (R), uitgedrukt als verhoudingen en**  
**overeenkomstige variatiecoëfficiënten**

(15 laboratoria)

Gehalte	r	R	CV <sub>r</sub> (°)	CV <sub>R</sub>
(µg/kg)			(%)	(%)
8 & 14	1,4	1,7	11	18

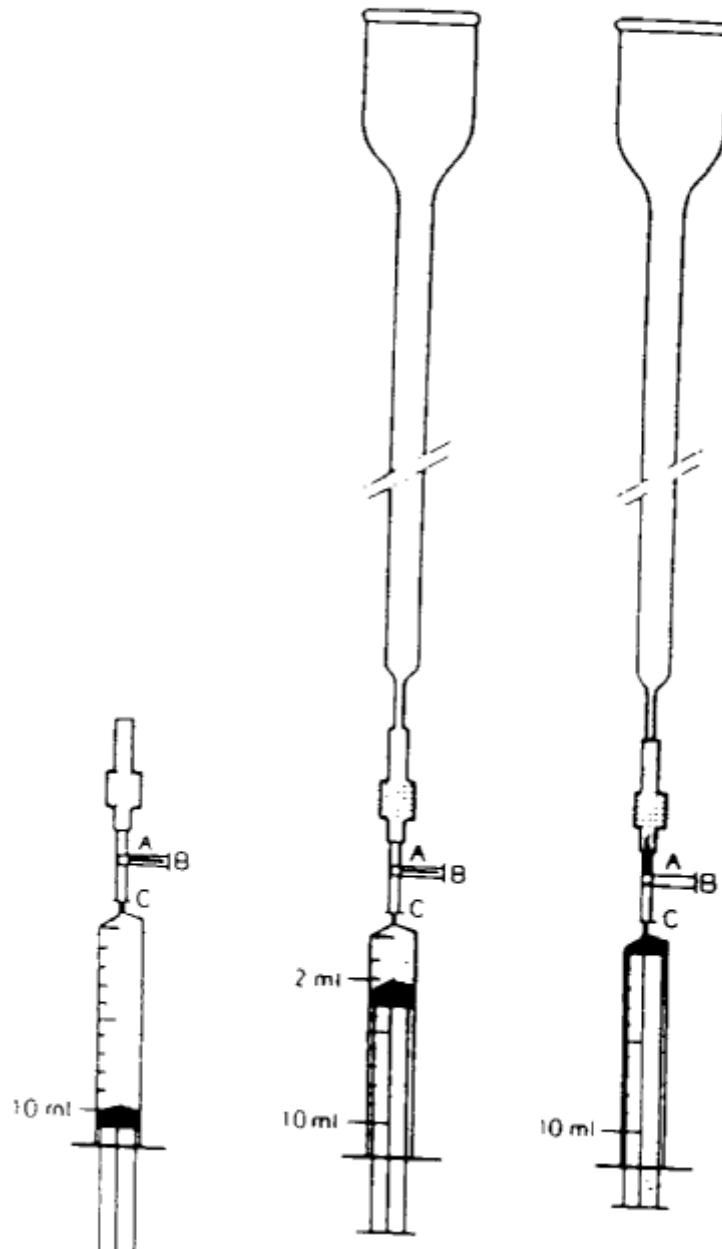
(°) CV = variatiecoëfficiënt

#### 10.2 *Stabilisatie van chloroform (3.1)*

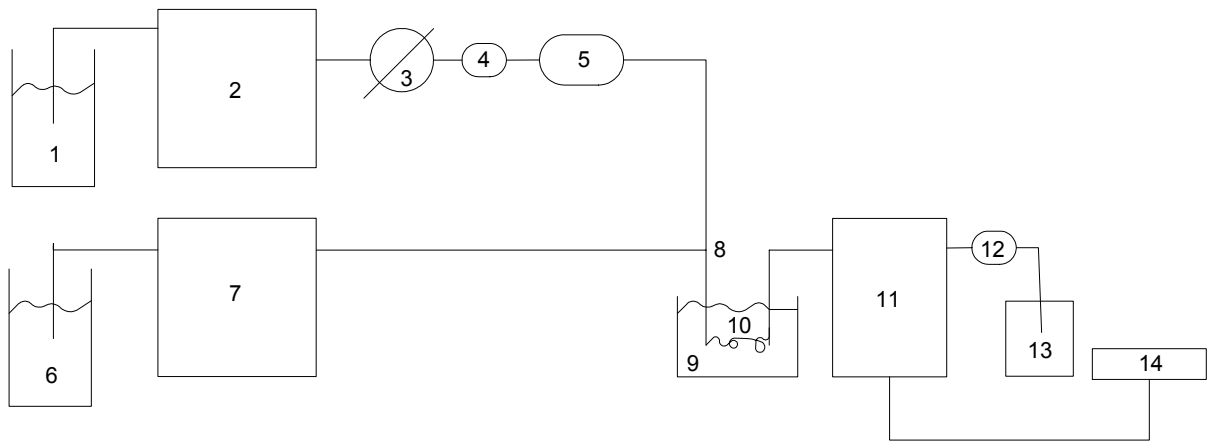
De absorptie-eigenschappen van de Florisil-patroon kunnen zich wijzigen, als de chloroform gestabiliseerd wordt met andere middelen dan ethanol. Dit moet geverifieerd worden volgens 10.3, indien de aangeduide chloroform niet beschikbaar is.

#### 10.3 *Nauwkeurigheid*

De juiste uitvoering van de methode wordt gecontroleerd door herhalingsbepalingen en gecertificeerde referentiematerialen. Indien die niet beschikbaar zijn, dient de methode gecontroleerd te worden met terugvindingsproeven aan blanco-monsters met toevoeging. Het gemiddelde terugvindingspercentage moet meer dan 80% en minder dan 110% van de werkelijke waarde zijn.

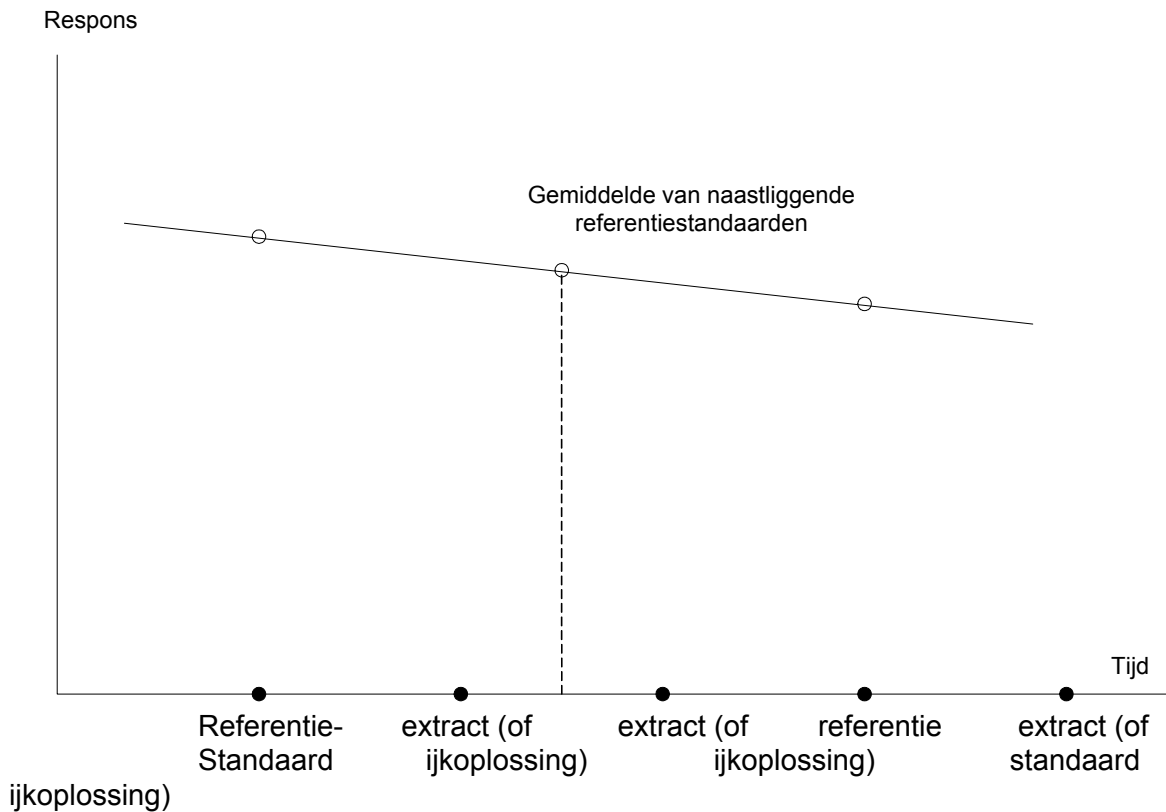


*Figuur 1: Combinatie van kolom en patroon*



- |                           |                           |
|---------------------------|---------------------------|
| 1. Mobile fase            | 8. T-stuk                 |
| 2. Pomp                   | 9. Getermostateerd bad    |
| 3. Injectiekraan          | 10. Reactorspiraal        |
| 4. Voorkolom              | 11. Fluorescentiedetector |
| 5. Analytische HPLC-kolom | 12. Restrictor            |
| 6. Jodiumoplossing        | 13. Opvangvat             |
| 7. Reagenspomp            | 14. Recorder/ integrator  |

*Figuur 2: Stroomschema van het LC-systeem met derivatisering met jodium na de kolom*



*Figuur 3: Compensatie voor verloop in piekuitslag voor aflatoxine B door regelmatige inspectie van referentiestandaard (3133)*