

Stofnaam	Aflatoxine B1
Type methode	HPLC met broomderivatisering
Te onderzoeken in	Mengvoeders; diervoedergrondstoffen en enkelvoudige diervoeders
Minimum bepaalbaarheidsgrens	0,001 mg/kg
Herhaalbaarheid	10 % bij 0,005 mg/kg en meer
Reproduceerbaarheid	20 % bij 0,005 mg/kg en meer
Categorie	A
Titel	Veevoeders - Bepaling van het gehalte aan aflatoxine B1 - High Performance Liquid Chromatography - Postcolumn derivatisering - Fluorescentiedetectie. RIKILT Wageningen (1992). RSV nr A0452 Uitgiftedatum 7-9-1994; Editie nr. 2
EEG-methode	Betreft een gelijkwaardige methode als methode OSP-1a (EEG-methode), echter de methode past broomderivatisering toe i.p.v. jodiumderivatisering.

## **1 Doel en toepassingsgebied**

### **1.1 Toelichting**

De methode is geschikt voor samengestelde veevoeders. Voor confirmatie van een overschrijding wordt N-RSV 0265 toegepast. De recovery op het 0,02 mg/kg niveau ligt in de range 80 - 110%.

### **1.2 Aantoonbaarheidsgrens**

De aantoonbaarheidsgrens voor aflatoxine B<sub>1</sub> bedraagt 0,0005 mg/kg op produkt. Dit komt overeen met 0,025 ng absoluut.

### **1.3 Bepaalbaarheidsgrens**

De bepaalbaarheidsgrens voor aflatoxine B<sub>1</sub> bedraagt 0,001 mg/kg op produkt. Dit komt overeen met 0,050 ng absoluut.

## **2 Definitie**

nvt

## **3 Beginsel**

Aflatoxine B<sub>1</sub> wordt geëxtraheerd met chloroform. Een aliquot van het chloroform-extract wordt gefiltreerd. Het filtraat ondergaat een clean up met behulp van achtereenvolgens solid phase Florisil- en solid phase C18 kolommetjes. Een aliquot van het eindextract ondergaat een vloeistofchromatografische scheiding met behulp van reversed phase. Na de HPLC scheiding vindt een post column derivatisering plaats met broom. Het reactieproduct wordt vervolgens gemeten met behulp van fluorescentiedetectie.

## **4 Precisie**

### **4.1 Herhaalbaarheid**

De herhaalbaarheid uitgedrukt als de variatiecoëfficiënt bepaald op het tolerantieniveau (0,01 mg/kg aflatoxine B<sub>1</sub> voor rundveevoeders) bedraagt 10%.

### **4.2 Reproduceerbaarheid**

De reproduceerbaarheid uitgedrukt als de variatiecoëfficiënt bepaald op het tolerantieniveau (0,01 mg/kg aflatoxine B<sub>1</sub> voor rundveevoeders) bedraagt 20%.

## **5 Reagentia en hulpstoffen**

De gebruikte reagentia moeten van een zodanige kwaliteit zijn, dat bij een blanco bepaling volgens dit voorschrift geen interferenties optreden met de te bepalen component. Het vermelden van handelsnamen houdt geen aanbeveling in, maar dient uitsluitend ter identificatie.

### **5.1 "Milli Q" - water (water gezuiverd via een Milli Q systeem, Waters, Etten-Leur). Specifieke weerstand > 10 MΩ.cm.**

- 5.2 Chloroform p.a., gestabiliseerd met 0,5 - 1,0% ethanol (v/v)
- 5.3 Aceton p.a.
- 5.4 Acetonitril p.a.
- 5.5 Methanol p.a.
- 5.6 Celite 545 (Johns Mansville), zuurgewassen (Boom, Meppel, #53999)
- 5.7 Kaliumbromide p.a.
- 5.8 Salpeterzuur p.a. (65%)
- 5.9 Chloorbleekloog oplossing (huishoudkwaliteit), werkzame hoeveelheid chloor: 10 g/100 ml
- 5.10 Zwavelzuur p.a. (95-97%) s.m. 1,84
- 5.11 Florisil cartridge, Sep-pak Waters #51960
- 5.12 C18 cartridge, Sep-pak Waters #51910
- 5.13 Standaardoplossing aflatoxine B<sub>1</sub> in chloroform, 10 µg/ml (RIVM, Bilthoven)  
Volume ampul 2,5 ml, bewaar in de koelkast (< 7°C).
- 5.14 Standaardoplossing aflatoxine B<sub>1</sub>  
Breng de inhoud van de ampul (5.13) over in een buis met schroefdop. Omwikkel de buis met aluminiumfolie. De oplossing wordt in de koelkast bewaard bij een temperatuur < 7°C.  
Laat voor het gebruik van deze standaardoplossing het geheel op kamertemperatuur komen. Dit voorkomt condensvorming in de buis. Ter controle van de concentratie van het aflatoxine B<sub>1</sub> gehalte dient het gehalte bij elke serie monsters te worden bepaald.  
Vul een kwartscuvet met chloroform, meet de extinctie bij 363 nm en stel deze op nul. Verwijder de chloroform uit de cuvet en droog deze. Vul nu de cuvet met de standaardoplossing aflatoxine B<sub>1</sub> en meet de extinctie bij 363 nm.  
Bereken de aflatoxine B<sub>1</sub> concentratie in de standaard met behulp van onderstaande formule:

$$\frac{312 \times E \times 1000}{22300} = \mu\text{g/ml}$$

312 = molecuulgewicht van aflatoxine B<sub>1</sub>  
E = gemeten extinctie, gecorrigeerd voor de blanco  
22300 = molaire extinctiecoëfficiënt

Noteer het gevonden gehalte in drie significante cijfers en gebruik dit cijfer bij het berekenen van de ijklijn. Het gehalte moet liggen tussen de 9,5 en 10,5 µg/ml. Is dit niet het geval dan moet een nieuwe standaard gemaakt worden.

- 5.15 Chloorbleekloog, 1%  
Verdun 10 ml chloorbleekloogoplossing (5.9) met 990 ml water/aceton (95/5) tot 1000 ml.
- 5.16 Water/aceton, 95/5 (v/v)
- 5.17 Water/aceton, 85/15 (v/v)
- 5.18 Water/aceton, 2/98 (v/v)
- 5.19 Water/methanol, 80/20 (v/v)
- 5.20 Zwavelzuur, 2 M  
Neem 895 ml water en voeg voorzichtig 105 ml geconcentreerd zwavelzuur toe en meng. Beperk de warmteontwikkeling!
- 5.21 HPLC eluens  
Water/methanol/acetonitril, 130/70/40 (v/v/v) + 1 mM KBr + 1mM HNO<sub>3</sub>. Voeg achtereenvolgens bij elkaar: 1300 ml water, 700 ml methanol en 400 ml acetonitril en meng. Los in dit mengsel op: 286 mg KBr en 152 µl geconcentreerd salpeterzuur, homogeniseer. Ontlucht het eluens door gedurende een kwartier helium door te leiden.
- 5.22 Referentiemonster veevoeder  
Selecteer zoveel monsters veevoeder als nodig is om ca. 2 kg referentiemonster te maken. Zorg dat het gehalte tussen 0,005 en 0,015 mg/kg ligt. Analyseer het referentiemonster in vijfvoud.
- 5.23 Blanco veevoeder  
Selecteer een aantal monsters veevoeder met een gehalte kleiner dan 0,001 mg aflatoxine B<sub>1</sub> per kg. Homogeniseer de monsters en analyseer in vijfvoud.

## **6 Apparatuur**

- 6.1 Platbodemkolven 100 ml
- 6.2 Bovenweger, nauwkeurigheid 0,01 g
- 6.3 UV spectrofotometer
- 6.4 Injectiespuit 250 µl en 10 ml  
(Chloroformbestendig)
- 6.5 Volpipet 25 ml
- 6.6 Medicijnfles 100 ml en 500 ml
- 6.7 Schudapparaat
- 6.8 Vouwfilters, Schleicher & Schull, 595 1/2

- 6.9 Monsterflesjes voor de automatische monsterwisselaar, zuurgespoeld  
Dompel de flesjes gedurende 1 nacht onder in een oplossing van 2 M zwavelzuur. Spoel vervolgens met kraanwater onmiddellijk gevolgd door 3x spoelen met gedemineraliseerd of Milli Q-water. Controleer met pH indicatiepapier of er geen zuurresten zijn achtergebleven. Eventuele restanten alsnog wegspoelen met demiwater. Droog de flesjes in een stoof bij 100°C.
- 6.10 Kok's Broom Apparaat (KOBRA), Lamers-Pleuger
- 6.11 Power Supply, 0-20 V DC
- 6.12 Draaispoelvoltmeter, bereik 0-10 V DC, impedantie >50 k Ohm
- 6.13 Weerstand 100 k Ohm
- 6.14 Glazen kolommen  
Diameter (intern) 1,5 cm, 50 cm lang (Biorad # 737-1550)
- 6.15 Driewegkraan voor 6.14 (Biorad # 732-8103)
- 6.16 Vloeistofchromatografisch systeem, bestaande uit een HPLC-pomp, reversed phase kolom, automatische monstereinjector, postcolumnderivatiseringsapparatuur, fluorescentiedetector en een recorder.  
Onderstaande combinatie van apparatuur is toegepast. Gegevens zijn advies-waarden. Gewijzigde omstandigheden kunnen het noodzakelijk maken dat er andere instellingen gekozen moeten worden, een en ander is ter beoordeling van de analist.  
In bijlage I is de opbouw schematisch weergegeven.
- 6.16.1 HPLC-pomp, debiet 0,5 ml/min
- 6.16.2 Kolom: cartridge kit Chrompack, 2x10x0,3 cm chromspher C18, 5 µm, voorzien van een C18 guard kolom.
- 6.16.3 Automatische monsterwisselaar, injectievolume 250 µl
- 6.16.4 KOBRA, spanning over de KOBRA: 1,5 - 2,5V
- 6.16.5 Powersupply 10V DC
- 6.16.6  
LS-4 fluorescentiedetector Perkin Elmer  
\_ex : 369 nm  
\_em : 422 nm  
spleetbreedten maximaal  
fixscale: 1.000  
recordscale : 5  
responsefactor: 4 (default)
- 6.16.7 recorder: 10 mV  
papiersnelheid : 5 mm/min

6.17 Rotatiefilmverdamper met waterbad (40°C)

## 7 Werkwijze

### 7.1 Algemeen

Voer bij elke serie monsters de volgende bepalingen uit: een blanco chemicaliën, een blanco veevoeder met toevoeging van aflatoxine B<sub>1</sub> (niveau 0,020 mg/kg) en een referentiemonster veevoeder.

Het schema van de analyse is weergegeven in bijlage II.

### 7.2 Voorzorgsmaatregelen

Vanwege de carcinogeniteit van aflatoxine B<sub>1</sub> en de gevoeligheid van oplossingen voor fotolyse zijn tijdens de analyse adequate voorzorgsmaatregelen geboden. Het is noodzakelijk dat personeel dat belast is met de hier beschreven analyse tijdens de werkzaamheden handschoenen draagt.

Voer de werkzaamheden met geconcentreerde oplossingen, organische oplosmiddelen, zuren en chloorbleekloog in een afzuigkast uit. Daarnaast is het vereist dat tijdens het werk UV-licht zoveel mogelijk wordt buitengesloten. Glaswerk dat in aanraking is geweest met een oplossing van aflatoxine B<sub>1</sub> moet, voordat het gereinigd wordt, een nacht weken in een oplossing met chloorbleekloog (5.15) om het aflatoxine B<sub>1</sub> te vernietigen.

### 7.3 Voorbehandeling van het laboratoriummonster

Het monster wordt in de monsterkamer gemalen tot op 1 mm. Vervolgens wordt het monster gehomogeniseerd door uitkruisen.

### 7.4 Analyseportie

20,0 g

### 7.5 Monstervoorbereiding

De gehele opwerking moet bij voorkeur zonder onderbrekingen uitgevoerd worden. Weeg 20,0 g van het analysemonster, het referentiemonster (5.22) en blanco veevoeder (5.23) af in een medicijnfles van 500 ml. Voer tevens een blanco bepaling uit met alleen chemicaliën. Voeg aan de blanco veevoeder 40 µl standaardoplossing (5.14) toe met behulp van de injectiespuit (20 µg/kg niveau). Voeg achtereenvolgens toe: 10 g Celite, 100 ml chloroform, 10 ml water (5.1). Sluit de medicijnfles en schud gedurende minimaal 30 minuten in een schudapparaat. Filtreer de massa over een vouwfilter. Dek tussen het periodieke opgieten, bij traag filtrerende monsters, de trechter af met een horlogeglas teneinde het verdampen van chloroform te beperken. Filtreer totdat 25 ml filtraat is verkregen.

### 7.6 Clean-up

#### 7.6.1 Florisil clean-up

Bevestig een driewegkraantje aan de lange steel van een florisil Sep-pak cartridge. Vul een injectiespuit met chloroform en bevestig aan de korte steel van de cartridge. Spuit ca. 8 ml chloroform door de cartridge en verwerp het eluaat. Bevestig het kraantje aan een glazen kolom en injecteer het restant chloroform in de kolom. Sluit het kraantje en

verwijder de injectiespuit. Giet het filtraat van punt 7.5 in de kolom. Spoel na met ca. 5 ml chloroform. Open het kraantje en elueer. Verwerp het eluaat. Laat de cartridge niet drooglopen. Elueer met 20 ml methanol, verwerp het eluaat. Elueer het aflatoxine B<sub>1</sub> met 50 ml water/aceton (2/98). Vang het eluaat op in een 100 ml platbodempol. Verwijder de Florisil cartridge. Damp in met behulp van een roterende filmverdamer tot ca. 0,5 ml.

Voeg achtereenvolgens 1 ml methanol en 4 ml water toe aan het residu.

**Opmerking:**

Controleer bij elke nieuwe batch florisilkolommen aan de hand van een blanco veevoeder met toevoeging of de elutie van aflatoxine B<sub>1</sub> van de florisil kolom volledig is met 50 ml water/aceton (2/98). Pas zonodig het elutievolume

7.6.2 C18 clean-up

Vul een injectiespuit met ca. 10 ml methanol en spuit de methanol door een C18 Sep-pak cartridge. Verwerp de methanol. Bevestig een driewegkraantje aan de lange steel van de cartridge. Vul een injectiespuit met ca. 10 ml water en bevestig aan de korte steel van de cartridge. Duw ca. 8 ml water door de cartridge en verwerp het eluaat. Bevestig het kraantje aan een glazen kolom en injecteer het restant water in de kolom. Sluit het kraantje en verwijder de injectiespuit.

Giet het residu van punt 7.6.1 in de kolom. Spoel na met 2 x 5 ml water/methanol (80/20). Open het kraantje en elueer. Verwerp het eluaat. Laat de cartridge niet drooglopen. Elueer met 25 ml water/methanol (80/20), verwerp het eluaat. Elueer het aflatoxine B<sub>1</sub> met 50 ml water/aceton (85/15). Vang het eluaat op in een 100 ml medicijnflesje. Sluit het medicijnflesje en homogeniseer. Een aliquot wordt geïnjecteerd in de HPLC-opstelling.

7.7 Ijkreeks

Breng van de standaardoplossing aflatoxine B<sub>1</sub> (5.14) m.b.v. de injectiespuit resp. 50 µl; 50 µl en 100 µl in maatkolven van resp. 500 ml; 250 ml en 250 ml. Damp de chloroform af onder een stikstofstroom. Vul aan met water/aceton (85/15) en homogeniseer. Deze oplossingen bevatten resp. 0,001 µg; 0,002 µg en 0,004 µg aflatoxine B<sub>1</sub>/ml.

De ijkreeks komt volgens de werkwijze beschreven in punt 7 in veevoeders overeen met een gehalte van resp. 0,005; 0,010 en 0,020 mg/kg aflatoxine B<sub>1</sub>.

7.8 HPLC analyse (bijlage III)

Stabiliseer gedurende circa 30 minuten de opstelling (HPLC-pomp, KOBRA, kolom en fluorescentiedetector voordat de eerste injectie uitgevoerd wordt. Injecteer 250 µl van de ijkreeks, gevolgd door de monsters. Indien de serie groter is dan tien monsters, dient deze reeks afgesloten te worden met de ijkreeks.

## 8 Resultaten

### 8.1 IJklijn [1]

Stel een ijklijn op volgens model:  $y = bx$  (1)

Bereken b als volgt:

$$b = \frac{\sum_{i=1}^N y_i/x_i}{N} \quad (2)$$

y = respons ijkpunt

x = massa ijkpunt in  $\mu\text{g/ml}$  (7.7) \* bepaalde aflatoxine B<sub>1</sub> concentratie (5.14)/5

b = richtingscoëfficiënt

N = totaal aantal ijkpunten

Controleer de lineariteit van de ijklijn door %  $y_i/x_i$  als volgt te berekenen:

$$\frac{\sum_{i=1}^N (y_i/x_i)}{N} * 100\% = \% y_i/x_i$$

Bepaal of de berekende %  $y_i/x_i$  binnen  $100 \pm 5\%$  valt. Elimineer elk punt dat buiten deze band valt. Indien meer dan een punt geëlimineerd wordt, is de ijklijn niet lineair. De ijklijn moet dan opnieuw geanalyseerd worden. Indien slechts een punt geëlimineerd wordt, is de ijklijn toch bruikbaar en behoeft niet opnieuw de ijkreeks geïnjecteerd te worden.

### 8.2 Berekening

Het gehalte aan aflatoxine B<sub>1</sub> in mg/kg in de monsters wordt als volgt berekend:

$$\text{Gehalte aflatoxine B}_1 = \frac{Y}{b} \times \frac{V}{a}$$

Y = respons

b = richtingscoëfficiënt ijklijn (8.1)

V = volume eindextract (7.6.2) (=50 ml)

a = aantal g monsters in eindextract (= 10 g)

### 8.3 Criteria

#### 8.3.1 Recovery blanco veevoeder met toevoeging

Indien de recovery van de blanco veevoeder met toevoeging zich bevindt tussen 80-110% dan wordt het resultaat van de monsters als zodanig, dus zonder correctie voor de recovery gerapporteerd. Zodra de recovery buiten deze range valt, moeten alle analyses opnieuw gedaan worden.

### 8.3.2 Gehalte referentiemonster

De gegevens van het referentiemonster worden verwerkt in een plot. Het resultaat wordt als volgt beoordeeld:

- resultaat ligt tussen  $x \pm 2s$ : resultaat wordt geaccepteerd
- resultaat ligt tussen  $x > \pm 2s \leq \pm 3s$ : oorzaak opsporen en elimineren
- resultaat wijkt meer dan  $\pm 3s$  af van  $x$ : oorzaak opsporen en elimineren, vervolgens alle monsters opnieuw analyseren.

De standaardafwijking (s) wordt als volgt berekend:

$$s = \frac{VC * x}{100}$$

VC = variatiecoëfficiënt = 10% (4.1)

x = gemiddelde aflatoxine B<sub>1</sub> gehalte referentiemonster (5.22)

### 8.3.3 Respons van de aflatoxine B<sub>1</sub> standaard (1 ng/ml)

Het verloop van de respons van de aflatoxinestandaarden in de ijkreeks wordt gevolgd door de respons (oppervlak) van de 1 ng/ml standaard grafisch uit te zetten. Indien meer dan éénmaal achtereen in de respons een grotere afwijking wordt geconstateerd dan 10% van het voorgaande gemiddelde dient de oorzaak hiervan opgespoord te worden.

## 9 Registratie

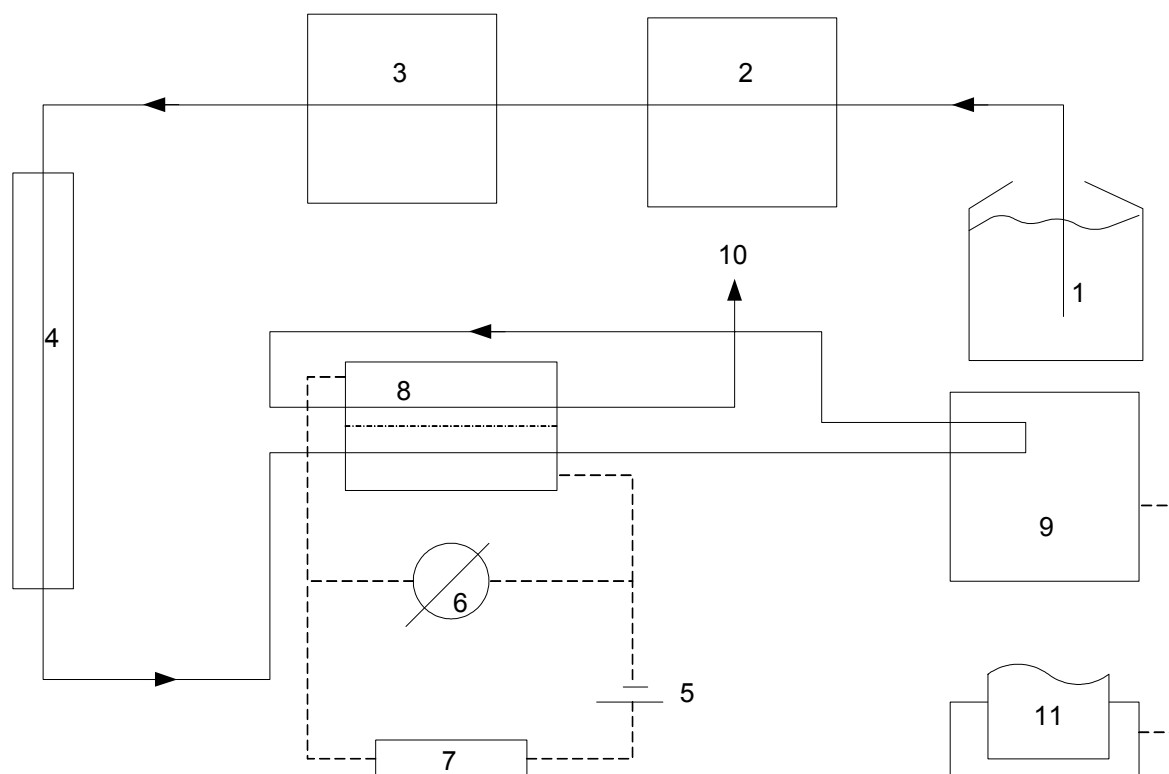
Bundel per serie alle chromatogrammen en analysegegevens.

-----

### Literatuur

- 1 Van Trijp, J.M.P. en A.H. Roos  
Model voor het berekenen van ijklijnen  
RIKILT rapport 91-02, januari 1991, Wageningen
- 2 Traag, W.A. en Th.C.H. van Neer  
De bepaling van aflatoxine B<sub>1</sub> in grondstoffen voor veevoerders met behulp van vloeistofchromatografie en postcolumn derivatisering  
RIKILT-DLO rapport 85.19, april 1985, Wageningen
- 3 Traag, W.A., J.M.P. van Trijp, L.G.M.Th. Tuinstra and W.Th. Kok  
Sample clean-up and post-column derivatization for the determination of aflatoxin B<sub>1</sub> in feedstuffs by liquid chromatography  
J. Chrom., 369 (1987) 389-394
- 4 Paulsch, Walter E., Eric a. Sizoo and Hans P. van Egmond  
Liquid Chromatographic Determination of Aflatoxins in Feedstuffs Containing Citrus Pulp  
J. Assoc. Anal. Chem., 71 (1988) 957-961

## Bijlage I

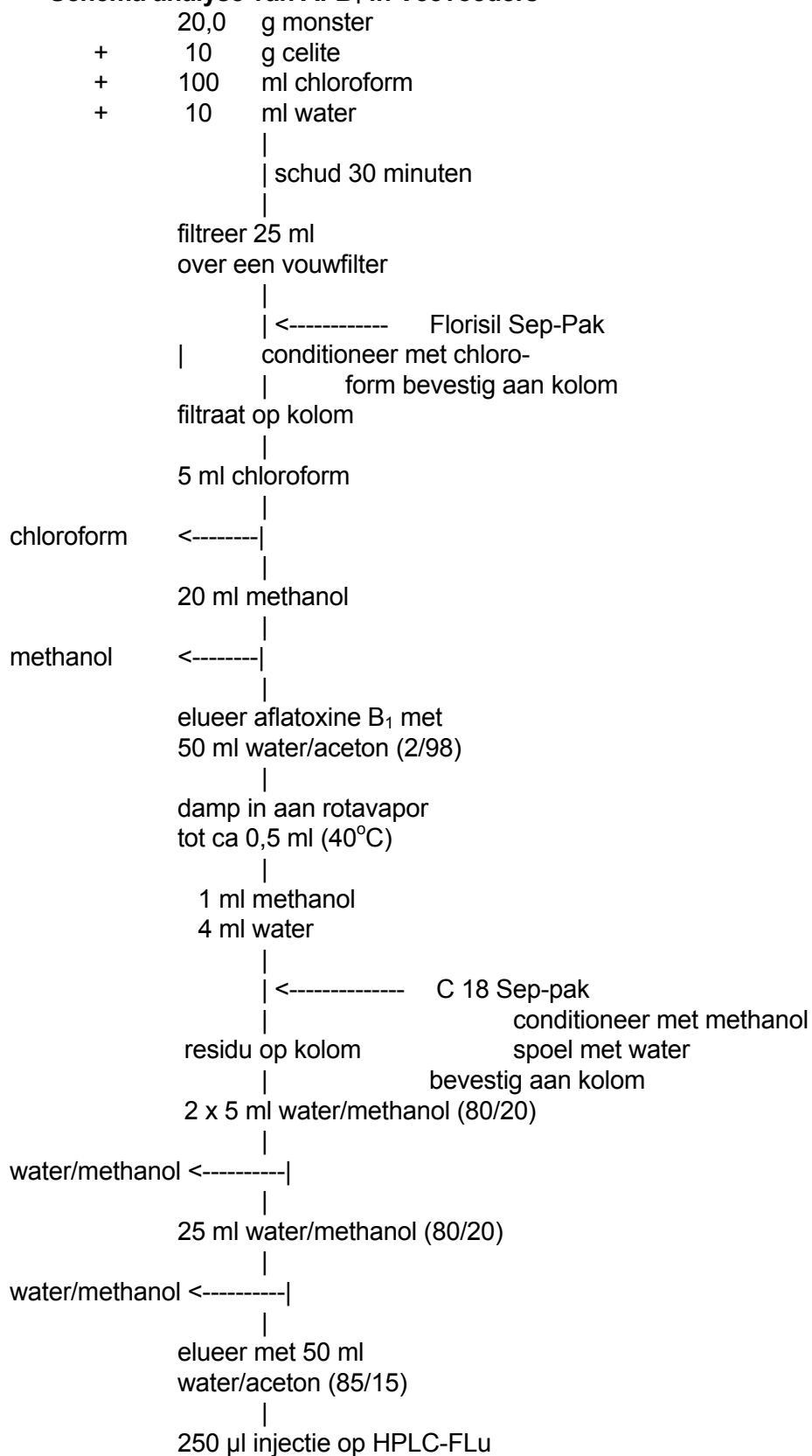


*Figuur 1:*

1. Eluens
2. HPLC-pomp
3. Automatische monsterwisselaar
4. Reversed phase column
5. Voeding, 10V D.C.
6. Voltmeter
7. Weerstand, 100  $\Omega$
8. Electronische derivatiseringcel (KOBRA)
9. Fluorescentie detector
10. Waste
11. Recorder/ integrator

**Bijlage II bij RSV A0452**

**Schema analyse van AFB<sub>1</sub> in Veevoeders**



Lijst: A0542/II

Datum: 1992-01-16

**Bijlage III bij RSV A0452****POSITIETABEL HPLC**

RUN	MONSTER	RUN	MONSTER	RUN	MONSTER
1		17		33	
2		18		34	
3		19		35	
4		20		36	
5		21		37	
6		22		38	
7		23		39	
8		24		40	
9		25		41	
10		26		42	
11		27		43	
12		28		44	
13		29		45	
14		30		46	
15		31		47	
16		32		48	

Onderwerp :  
Datum :  
Project nr. :