

Project 404.0400

Onderzoek naar het voorkomen, gehalte en stapeling van diverse organische contaminanten en (myco)toxinen in landbouw- en visserijproducten.  
Projectleider: ir L.G.M.Th. Tuinstra

Rapport 90.16                      April 1990

Onderzoek naar aflatoxine B<sub>1</sub> in  
mengvoeders en grondstoffen  
Jaaroverzicht 1989

J.M.P. van Trijp

Afdeling Organische Contaminanten

Medewerkers: R.J. van Mazijk en A.H. Roos

Goedgekeurd door: ir L.G.M.Th. Tuinstra

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

Copyright 1990, Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten.

Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bronvermelding.

#### VERZENDLIJST

##### INTERN:

directeur  
sectorhoofden  
coördinator dierlijke produkten  
projectleider  
afd. Organische Contaminanten (5x)  
drs W.J.H.J. de Jong  
H.J. Keukens  
programmabeheer en informatieverzorging  
bibliotheek  
circulatie

##### EXTERN:

Dienst Landbouwkundig Onderzoek  
Directie Wetenschap en Technologie  
Directie Veterinaire Dienst  
Directie Voedings- en Kwaliteitsaangelegenheden  
Directie Veehouderij en Zuivel  
Algemene Inspectiedienst, Kerkrade  
Laboratorium Ministerie van Financiën, Amsterdam  
LAC - Stuurgroep Zuivelverontreiniging (15x)  
LAC - Werkgroep Mycotoxinen (15x)  
Werkgroep Residuen in Voedingsmiddelen  
Directeur Proefstation voor de Rundvee-, Schapen- en Paardenhouderij,  
Lelystad  
Informatie en Kenniscentrum (IKC) Veehouderij, Lelystad  
De Ware(n)-Chemicus  
Agralin

ABSTRACT

Onderzoek naar aflatoxine B<sub>1</sub> in mengvoeders en grondstoffen. Jaaroverzicht 1989.

Analysis of aflatoxin B<sub>1</sub> in animal feeding stuffs and ingredients. Annual report 1989 (In Dutch).

Report 90.16                      April 1990

J.M.P. van Trijp, A.H. Roos, R.J. van Mazijk and L.G.M.Th. Tuinstra

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

3 tables, 1 annexe, 6 references

This report contains results of routine analysis of aflatoxin B<sub>1</sub> in Dutch cattle feed, groundnuts and palmkernelexpeller.

The results are based on a method consisting of a solid phase extraction in combination with an HPLC system provided with a post column reaction system (with bromine) and fluorescence detection. In cattle feed (n=287) a median value of 0.006 mg/kg was established. The results range from 0.001 mg/kg till 0.050 mg/kg. In the course of 1989, the results showed a tendency to a lower aflatoxin B<sub>1</sub> contamination level. Exceeding of the tolerance (0.010 mg/kg), using the official EC method, was observed in thirteen samples of cattle feed. For ingredients, a median value of 0.026 mg/kg was observed for groundnuts (n=46). The highest analysed values were obtained from samples of Soudanese origin (median 0.093 mg/kg). This median is a far lower value than the one found in 1988. Three Soudanese samples gave an aflatoxin B<sub>1</sub> value which was over the tolerance level of 0.2 mg/kg. The median value for palmkernelexpeller was found to be <0.005 mg/kg (n=18). The period over which this report extends for the raw materials, are the months January uptill July inclusive.

Keywords: aflatoxin B<sub>1</sub>, cattle feed, groundnuts.

( )

( )

INHOUD	<u>blz</u>
ABSTRACT	1
SAMENVATTING	5
1 INLEIDING	7
2 MATERIAAL EN METHODE	8
2.1 Monstername en monstermateriaal	8
2.2 Methoden van onderzoek	9
2.2.1 HPLC screeningsmethode	9
2.2.2 EEG bevestigingsmethode	9
3 RESULTATEN EN DISCUSSIE	10
3.1 Rundveevoeders	10
3.2 Grondnoten	12
3.3 Overige veevoeders en grondstoffen	13
4 CONCLUSIE	13
LITERATUUR	14
BIJLAGEN	
A FREQUENTIEVERDELING AFLATOXINE B <sub>1</sub> IN RUNDVEEVOEDERS	

( )

( )

## SAMENVATTING

Het rapport geeft een overzicht van de resultaten, welke zijn verkregen bij het onderzoek van monsters rundveevoeder (n=287), grondnotenschroot (n=46) en een aantal diverse grondstoffen (n=30) naar het gehalte aan aflatoxine B<sub>1</sub>.

De resultaten zijn verkregen met behulp van een methode gebaseerd op solid phase extractie als clean up, gevolgd door een HPLC-analyse waarbij een post-column derivatisering met broom plaatsvindt. Detectie van het derivaat gebeurt door middel van fluorescentie. Overschrijdingen van het maximum toelaatbaar gehalte voor aflatoxine B<sub>1</sub> in rundveevoeders (0,010 mg/kg bij een vochtgehalte van 12%), werden met de officiële EG-methode vastgesteld in dertien monsters rundveevoeder. De mediaan in rundveevoeders (n=287) bedroeg 0,006 mg/kg en de range <0,001-0,050 mg/kg. In de loop van 1989 werd een dalende trend waargenomen in het gehalte aan aflatoxine B<sub>1</sub> in rundveevoeders.

In grondnotenschroot bedroeg de mediaanbesmetting 0,026 mg/kg aflatoxine B<sub>1</sub> op produkt (range <0,005-0,40 mg/kg (n=46)). Deze mediaan is sterk verlaagd ten opzichte van 1988 (factor 5). De hoogste waarden werden gemeten in monsters afkomstig uit Soedan (mediaan 0,093 mg/kg). Een overschrijding van de norm voor grondnoten (0,2 mg/kg) werd in drie monsters van Soedanese afkomst geconstateerd.

Voor palmpitschilfers werd een mediaanwaarde berekend van < 0,005 mg/kg (n=18).

Het rapport heeft, voor wat betreft de grondstoffen, betrekking op de maanden januari t/m juli 1989. Na deze periode zijn de analyses in grondstoffen overgenomen door het laboratorium van het Comité van Graanhandelaren te Europoort-Rotterdam.

( )

( )



## 1 INLEIDING

De aanwezigheid van mycotoxinen, met name aflatoxine B<sub>1</sub> in veevoeders en veevoedergrondstoffen, kan ernstige gevolgen hebben voor de zuivelindustrie. Binnen Europa zijn of worden ontwerpnormen voor melk(produkten) en zuigelingenvoeding voor aflatoxine M<sub>1</sub> voorgesteld. De norm voor aflatoxine M<sub>1</sub> vastgelegd in het Algemeen Besluit (Warenwet) is medio 1988 van kracht geworden (Staatscourant nr. 340, 1988). Voor melk en uit of met melk bereide produkten is de norm 0,05 µg aflatoxine M<sub>1</sub> per kg berekend op melkbasis. Voor boter geldt als maximum 0,02 µg/kg en voor kaas 0,3 µg/kg.

Met name in de winterperiode worden in Nederland door het Zuivelcontrole Instituut te Leusden en het Boter- en Kaascontrolestation Friesland verhoogde gehalten van aflatoxine M<sub>1</sub> in de melk respectievelijk kaas gevonden.

Bij export van zuigelingenvoeding naar Zwitserland kan de daar voorgestelde norm van 0,01 µg/kg overschreden worden. Ook in Duitsland is een discussie gaande om de norm op 0,01 µg/kg vast te stellen voor melk respectievelijk zuigelingenvoeding.

Ter bewaking van de kwaliteit van de Nederlandse zuivelprodukten wordt in het kader van de Verordening Vvr Ongewenste Stoffen en Produkten 1988 en het Besluit Vvr Ongewenste stoffen en Produkten 1988 een controle op aflatoxine B<sub>1</sub> uitgevoerd in mengvoeders en grondstoffen.

In dit verslag worden ter ondersteuning van het beleid, de resultaten van het aflatoxine B<sub>1</sub> onderzoek voor de LAC Stuurgroep Zuivelverontreiniging en voor de LAC-werkgroep Mycotoxinen samengevat. De resultaten van het in 1989 aan de mengvoeders en grondstoffen uitgevoerde onderzoek zijn getoetst aan de volgende normen:

Produkt	Aflatoxine B <sub>1</sub> (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 runderen schapen en geiten (met uitzondering van de aanvullende diervoeders voor melkvee, kalveren en lammeren)	0,050
Aanvullende diervoeders voor varkens en pluimvee (met uitzondering van jonge dieren)	0,030
Andere aanvullende diervoeders (o.a. melkvee)	0,010

Voor grondnoten, kopra, palmnoten en palmpitten, katoenzaad, babassu, mais en daarvan afgeleide produkten geldt een norm van 0,2 mg/kg aflatoxine B<sub>1</sub>, bij een vochtgehalte van 12%.

## 2 MATERIAAL EN METHODEN

### 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 1988 en het Besluit Vvr Ongewenste Stoffen en Produkten 1988.

Door de Algemene Inspectiedienst (AID) werden voor onderzoek op aflatoxine B<sub>1</sub> in totaal 300 monsters aangeboden. Het aanbod was als volgt onderverdeeld.

287 monsters rundveevoeder, drie monsters maisgluten, zes monsters grondnoten, één monster kokosschroot, één monster kokospellets, één monster palmpitschilfers en één monster soya-eiwit.

Door de Dienst Invoerrechten en Accijnzen werden voor onderzoek op aflatoxine B<sub>1</sub> 54 monsters aangeboden.

Vanaf juli 1989 is het onderzoek van aflatoxine B<sub>1</sub> in grondstoffen overgenomen door het Laboratorium van het Comité van Graanhandelaren te Europoort Rotterdam. De borging wordt verzorgd door het Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten, Wageningen.

## 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 1985) werd een HPLC-scheiding op een C18 reversed-phase kolom uitgevoerd, gevolgd door post-column derivatisering met on-line gegenereerd broom voorafgaande aan de detectie met de fluorescentiedetector (Kok 1986). In elke serie monsters werden recoveryexperimenten uitgevoerd en werden ter controle check-samples mee geanalyseerd. Bij overschrijding van de tolerantie werd de officiële analysemethode conform EG richtlijn 76/372 (1976) gevolgd.

### 2.2.2 EG bevestigingsmethode (EG richtlijn 76/372)

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 B<sub>1</sub> 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 B<sub>1</sub> resultaten verkregen met de HPLC screeningsmethode in rundveevoeders in 1989 per maand en over de totale verslagperiode samengevat.

Tabel 1 Mediaan, maximum gehalte en verdeling van aflatoxine B<sub>1</sub> gehalte in rundveevoeders in 1989 (mg/kg), bij een vochtgehalte van 12%) (HPLC screeningsmethode)

Maand	Mediaan mg/kg	Max. gehalte mg/kg	Aantal monsters (mg/kg)			Aantal Monsters
			≥0,005	≥0,007	>0,010	
Januari	0,005	0,011	10	6	3	18
Februari	0,007	0,012	9	6	1	11
Maart	0,006	0,050	51	33	15	75
April	0,006	0,017	27	16	4	40
Mei	0,007	0,024	20	18	9	32
Juni	0,007	0,019	15	9	3	17
Juli	0,006	0,008	9	4	0	15
Augustus	0,003	0,007	3	0	0	15
September	0,003	0,006	2	0	0	22
Oktober	0,002	0,011	5	5	1	21
November	0,002	0,010	1	1	0	10
December	0,003	0,013	2	1	1	11
Totaal	0,006	0,050	154	99	37	287

De mediaan van de aflatoxine B<sub>1</sub> besmetting van de rundveevoeders bedroeg in 1989 0,006 mg/kg bij een vochtgehalte van 12%. Deze waarde is licht verhoogd ten opzichte van de mediaan over 1988 (0,004 mg/kg, Roos 1989).



Indien het verloop van de mediaan vergeleken wordt met het verloop over 1988, dan valt op dat er geen toename van de aflatoxine B<sub>1</sub> besmetting is bij het ingaan van de stalperiode. Eenzelfde trend is ook waargenomen door de Stichting Centraal Orgaan Zuivelcontrole (COZ) te Leusden voor het gehalte aan aflatoxine M1 in de melk.

In bijlage A is grafisch de besmetting van rundveevoeders met aflatoxine B<sub>1</sub> weergegeven. Met de HPLC screeningsmethode zijn in een eenvoudige analyse over 1989 de volgende resultaten behaald (resumé).

- 37 monsters bevatten een gehalte groter dan 0,010 mg/kg aflatoxine B<sub>1</sub>, bij een vochtgehalte van 12%
- 99 monsters bevatten een gehalte groter dan 0,007 mg/kg aflatoxine B<sub>1</sub>, bij een vochtgehalte van 12%;
- 154 monsters bevatten een gehalte groter dan 0,005 mg/kg aflatoxine B<sub>1</sub> bij een vochtgehalte van 12%.

Op basis van onzekerheid in de analysemethode is er eerst sprake van een overschrijding van de norm als er met de EG-bevestigingsmethode door twee analisten een gehalte groter dan 0,015 mg/kg wordt aangetoond. In 1989 werd na heranalyse met de EG methode in dertien van de 37 monsters een overschrijding vastgesteld. Met behulp van de HPLC-screeningsmethode zouden bij dezelfde grens (0,015 mg/kg) als bij de EG methode veertien overschrijdingen zijn aangetoond.

De recovery van aflatoxine B<sub>1</sub>, toegevoegd aan rundveevoeders op het 0,040 mg/kg niveau, bedroeg met de HPLC screeningsmethode gemiddeld 91%, range 83-104%. De variatiecoëfficiënt voor de herhaalbaarheid van deze recoverytest bedroeg 6,8% (n=16).

De herhaalbaarheid van de screeningsmethode met controlemonsters die van nature besmet waren op het 0,008 mg/kg respectievelijk 0,012 mg/kg niveau bedroeg 7,5% (n=12) resp. 9,3% (n=12).

In recoveryexperimenten, uitgevoerd met de EG bevestigingsmethode aan rundveevoeders op het 0,040 mg/kg niveau, bedroeg de recovery gemiddeld 87%, range 79-98%. De variatiecoëfficiënt voor de herhaalbaarheid van deze recoverytest bedroeg 6,9% (n=13).

### 3.2 Grondnoten

Omdat in de loop van 1989 de controle op aflatoxine B<sub>1</sub> in grondstoffen is overgenomen door het Laboratorium van het Comité van Graanhandelaars te Rotterdam, zijn slechts monsters geanalyseerd over de periode januari-juli 1989.

Over het geheel genomen is de besmetting van produkten uit andere landen dan Soedan, laag. Ook is bij grondnoten duidelijk de trend zichtbaar dat het aflatoxine B<sub>1</sub> gehalte lager is in 1989 dan in 1988.

In tabel 2 wordt een overzicht gegeven van de mediaanrange en het aantal monsters grondnoten naar herkomst.

Vergeleken met 1988 is de besmetting met aflatoxine B<sub>1</sub> duidelijk minder in 1989 (januari-juli).

Mediaan 1988 = 0,12 mg/kg, mediaan 1989 = 0,026 mg/kg.

Overschrijdingen van het maximum toegestaan gehalte van 0,2 mg/kg werden aangetroffen in drie monsters grondnoten uit Soedan. Buiten de al genoemde monster uit Soedan werden bij de produkten uit de overige landen geen overschrijdingen van de norm geconstateerd.

Tabel 2 Overzicht van het aflatoxine B<sub>1</sub> gehalte naar herkomst in grondnotenschroot over de maanden januari t/m augustus 1989 (mg/kg op produkt)

Herkomst	Mediaan (mg/kg)	Range (mg/kg)	Aantal monsters
Senegal	0,039	0,010-0,085	17
Filippijnen	<0,005	<0,005	2
Indonesië	<0,005	<0,005	1
Argentinië	<0,005	<0,005-0,013	17
Soedan	0,093	0,071-0,36	7
India	0,043	0,043-0,050	2
Totaal	0,026	<0,005-0,36	46

### 3.3 Overige veevoedergrondstoffen en veevoerders

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

In vier monsters grondnoten (pinda's) werd het maximum toelaatbare gehalte aan aflatoxine B<sub>1</sub> overschreden.

Tabel 3 Overzicht van het aflatoxine B<sub>1</sub> gehalte van overige grondstoffen in januari-juli 1989

Produkt	Mediaan (mg/kg)	Range (mg/kg)	Aantal monsters
Maisglutenvoer	0,056	0,010-0,110	4
Palmpitschilfers	<0,005	<0,005	18
Soya-eiwit	<0,005	<0,005	1
Grondnoten (=pinda's)	0,33	0,33-0,40	4
Kokosschroot	0,031	0,027-0,036	3

### 4 CONCLUSIES

De mediaanbesmetting van het aflatoxine B<sub>1</sub> gehalte in rundveevoeders (n=287) over 1989, (0,006 mg/kg) ligt op een hoger niveau dan de mediaanbesmetting over 1988 (0,004 mg/kg), met behulp van de HPLC screeningsmethode werd in 37 van de 287 geanalyseerde monsters rundveevoeders een gehalte groter dan 0,010 mg/kg aflatoxine B<sub>1</sub> aangetroffen bij een vochtgehalte van 12%. Dit gehalte is het maximum toelaatbaar gehalte dat een rundveevoeder mag bevatten.

Na bevestiging met behulp van de EG-methode werd in dertien monsters een overschrijding vastgesteld.

In de loop van 1989 werd een dalende trend waargenomen in het gehalte aan aflatoxine B<sub>1</sub> in rundveevoeders.



In grondnotenschroot (n=46) werd over de periode januari-juli 1989 een mediaan besmetting van 0,026 mg/kg aflatoxine B<sub>1</sub> op produkt gemeten. Dit is een aanzienlijke verlaging ten opzichte van 1988.

De hoogste gehalten werden gemeten in monsters afkomstig uit Soedan (mediaan 0,093 mg/kg). In drie monsters werd het maximumgehalte van 0,2 mg/kg overschreden. De overige landen hadden een lagere besmettingsgraad. De mediaan voor palmpitschilfers bedroeg < 0,005 mg/kg (n=18).

#### LITERATUUR

Besluit Vvr Ongewenste Stoffen en Produkten 1988. Produktschap voor Veevoeder, 's-Gravenhage, 1988.

EG-richtlijn 76/372, Bepaling van aflatoxine B<sub>1</sub>, Publikatieblad van de Europese Gemeenschappen Nr. L 102/8-18 (15.4.76).

Egmond H.P. van, E.A. Sizoo en W.E. Paulsch. Evaluation of new methods of analysis for the determination of aflatoxin B<sub>1</sub> 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.

Roos A.H., Onderzoek naar aflatoxine B<sub>1</sub> in mengvoerders en grondstoffen, Jaaroverzicht 1988, Wageningen 1989, RIKILT rapport 89.31

Verordening Vvr Ongewenste Stoffen en Produkten 1988, Produktschap voor Veevoeder, 's-Gravenhage, 1988.



# Frequentieverdeling aflatoxine B1 in rundveevoeders (n=287)

■ aantal  
monsters

