

**BESCHIKKING**  
**van het Comité van Ministers van de Benelux Economische Unie**  
**betreffende de toepassing van Benelux-referentiemethoden van onderzoek**  
**inzake aflatoxine in grondnoten en de daaruit bereide produkten**

**M (77) 5**

Het Comité van Ministers van de Benelux Economische Unie,

Gelet op artikel 1 b van het Protocol van 29 april 1969, inzake de afschaffing van controles en formaliteiten aan de binnengrenzen van Benelux en inzake de opheffing van de belemmeringen van het vrije verkeer,

Overwegende dat de aflatoxinen die door de schimmel *Aspergillus flavus* worden geproduceerd zeer carcinogeen zijn en derhalve in de drie landen verboden zijn,

Overwegende dat aflatoxine zich kan ontwikkelen in voedingswaren die onder ongunstige omstandigheden zijn opgeslagen,

Overwegende dat een aantal van de betrokken voedingswaren onderwerp uitmaken van intensief intra-Benelux-handelsverkeer,

Constateerende, dat de wetgevingen der drie landen inzake grondnoten en de daaruit bereide produkten geen belemmering opleveren van het vrije intra-Beneluxverkeer in deze produkten,

Overwegende dat geschillen, voortvloeiende uit het toepassen van verschillende analysemethoden of uit het gebruik van verschillende normen, dienen te worden vermeden,

Overwegende, dat het in het bijzonder voor de harmonisatie van het voedingsmiddelentoezicht vereist is, dat gelijke of gelijkwaardige methoden worden toegepast, dezelfde termen worden gebezigd en gelijke of gelijkwaardige normen worden aangelegd,

Heeft het volgende beslist :

*Enig artikel*

1. De Regeringen van de drie Beneluxlanden nemen de nodige maatregelen opdat de bepalingen van het aan deze Beschikking gehechte Reglement als enige referentiemethode op 1 oktober 1977 worden aanvaard.
2. Uiterlijk 6 maanden na afloop van de in het eerste lid genoemde termijn brengt ieder der drie Regeringen verslag uit aan het Comité van Ministers over de maatregelen die zijn getroffen ter uitvoering van onderhavige Beschikking. Bij dit verslag zal de tekst van de nationale uitvoeringsmaatregelen worden gevoegd.

GEDAAN te Brussel, op 2 juni 1977.

De Voorzitter van het Comité van Ministers,

R. VAN ELSLANDE

## REGLEMENT

betreffende de toepassing van Benelux-referentiemethoden van onderzoek  
inzake aflatoxine in grondnoten en de daaruit bereide produkten  
M (77) 5 Bijlage

### AFLATOXINE

#### 1. Doel

Deze methode beschrijft de bepaling van aflatoxine B<sub>1</sub> in grondnoten (*Arachis hypogaea*) en daaruit bereide produkten.

#### 2. Toepassingsgebied

De beschreven methode van onderzoek is toepasbaar op grondnoten en daaruit bereide produkten.

#### 3. Definitie

Onder de « aantoonbare » hoeveelheid aflatoxine B<sub>1</sub> wordt in dit voorschrift verstaan, die hoeveelheid aflatoxine, waarvan de fluorescentie intensiteit overeenkomt met die van tenminste 2,5 nanogram (ng) aflatoxine B<sub>1</sub>-standaard.

#### 4. Beginsel

Aflatoxine B<sub>1</sub> wordt uit de waar geëxtraheerd met een mengsel van methanol en water. Na centrifugeren van het extract wordt een aliquot deel uitgeschud met chloroform, waarbij de aflatoxinen in de chloroformlaag overgaan. Na afdampen van het oplosmiddel wordt het residu opgenomen in een bekende hoeveelheid chloroform. Een aliquot deel van deze oplossing wordt onderworpen aan een tweedimensionale dunnelaagchromatografische scheiding. Door vergelijking van eventueel aanwezige B<sub>1</sub>-vlekken van het monster met eveneens opgebrachte B<sub>1</sub>-standaardvlekken in het chromatogram wordt het gehalte visueel geschat.

#### 5. Reagentia

Alle reagentia dienen analytisch zuiver te zijn.

##### 5.1. Aceton.

##### 5.2. Chloroform : gestabiliseerd met 0,5 - 1 % ethanol 96 %.

Bewaar deze op een koele, donkere plaats.

Controleer voor IEDERE bepaling de deugdelijkheid op de volgende wijze :

- 1) Schud in een reageerbuis 5 ml chloroform met twee druppels van een kaliumjodideoplossing n en 1 ml zetmeeloplossing 0,5 %. Na scheiding der lagen mag de bovenste laag niet blauw gekleurd zijn (vrij chloor afwezig).

- 2) Schud 20 ml chloroform gedurende 10 sec. met 20 ml water en filtreer de waterige laag. Het filtraat moet neutraal reageren (pH 6.0 - 8.0).
  - 3) Los 50 mg benzidine \*) op in 10 ml chloroform. Bewaar de oplossing in een gesloten vat buiten invloed van het licht. De oplossing moet na 15 min. helder zijn en niet anders dan lichtgeel gekleurd zijn (fosgeen afwezig).
- 5.3. Petroleumether; kooktraject 28 - 40° C; minder dan 0,1 % aromaten uitgedrukt als benzeen (transmissie groter dan 2 %, indien gemeten in 1 cm kwarts kuvetten bij 254 nm).
  - 5.4. Methanol.
  - 5.5. Diethylether : peroxyde vrij.
  - 5.6. Verdund zwavelzuur : meng 1 volume geconcentreerd zwavelzuur 96 % met 1 volume gedestilleerd water.
  - 5.7. Natriumsulfaat, watervrij.
  - 5.8. Inert gas, bijvoorbeeld stikstof.
  - 5.9. Aflatoxine B<sub>1</sub>-standaardoplossing (R.I.V. - Postbus 1 te Bilthoven), bevattende 20,0 µg B<sub>1</sub>/ml chloroform.  
*Voorschrift verdunning en bewaring*  
Breng de inhoud van de ampul (2,5 ml) kwantitatief over in een maatkolf van 100 ml en vul aan met chloroform.  
(Bij bewaren in een koele, donkere ruimte is zowel de oorspronkelijke oplossing, als een met gestabiliseerde chloroform 1 tot 40 verdunde oplossing gedurende 2 maanden houdbaar).  
Verdun vervolgens 2 ml van deze oplossing (1 : 40) in een maatkolf van 10 ml met chloroform. (Deze verdunde oplossing (1 : 200) is ten hoogste 14 dagen houdbaar en bevat 0,1 µg aflatoxine B<sub>1</sub> per ml).
  - 5.10. Kwalitatieve aflatoxine-standaardoplossing (R.I.V. - Postbus 1 te Bilthoven) bevattende de aflatoxinen B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> en G<sub>2</sub>. Gebruik deze oplossing in de door het R.I.V. gegeven concentratie. (Bewaar deze oplossing in een koele, donkere ruimte).
  - 5.11. Silica gel G.  
Zowel vers (zie 7.2.1.) als fabriekmatig bereide Silica gel G - platen kunnen gebruikt worden. Beproof de bruikbaarheid van deze dunne laag platen op de volgende wijze.  
Breng op de plaat voor dunnelaagchromatografie 10 µl kwalitatieve aflatoxine standaardoplossing in punt A.  
Breng vervolgens in de punten B, C en D de voorgeschreven hoeveelheid aflatoxine standaardoplossing op, zoals beschreven is onder 7.2.2. (zie figuur 1). Ontwikkel de plaat tweedimensionaal onder gebruikmaking van de onder 7.2.3. beschreven methode. Interpreteer het chromatogram volgens 7.2.4.

\*) Benzidine wordt verdacht van carcinogenerwerking. Het afwegen en de verdere behandelingen dienen met de nodige voorzorgen te geschieden.

Ga na of een volledige scheiding is verkregen tussen de aflatoxinen B<sub>1</sub> en B<sub>2</sub> en of de R<sub>f</sub>-waarden voor de aflatoxine B<sub>1</sub>-standaardvlekken in de chloroform-aceton looprichting liggen tussen 0,50 en 0,80.

Indien aan één van beide genoemde criteria niet is voldaan, moeten nieuwe platen voor dunnelaag chromatografie worden gemaakt met nieuw silica gel of een andere batch kant en klaar platen worden genomen. Deze platen dienen op dezelfde wijze als hierboven omschreven te worden beproefd.

Dit moet zolang worden herhaald totdat een plaat is verkregen, die aan de bovenstaande eisen voldoet.

5.12. Zoutzuur ; 1 N

## 6. Toestellen en hulpmiddelen

- 6.1. Homogenisator - Ultra Turrax of Waring Blendor.
- 6.2. Rotatie vacuüm verdamper.
- 6.3. Centrifugo - 2.500 tot 3.500 rpm.
- 6.4. Gebruikelijke laboratorium uitrusting voor dunnelaagchromatografie.
- 6.5. Ultraviolet lamp voor straling met een golflengte van ongeveer 360 nm en een zodanige intensiteit, dat op 10 cm afstand een vlek van 2,5 ng aflatoxine B<sub>1</sub> op de dunnelaag plaat nog duidelijk zichtbaar is.
- 6.6. Bekerglazen van 250 ml.
- 6.7. Maat cylinders van 25,50 en 100 ml.
- 6.8. Centrifuge buizen (glas of plastic) van 250 ml.
- 6.9. Scheitrechters van 250 ml.
- 6.10. Maatkolven van 100 en 10 ml.
- 6.11. Konische kolven van 300 ml met slijpstuk.
- 6.12. Gekalibreerde buisjes van ca. 10 ml met slijpstuk of teflonsluiting.
- 6.13. Steekpipet.

## 7. Werkwijze

### 7.1. *Extraktie*

- 7.1.1. Weeg van het gemalen en gehomogeniseerde uitgangsprodukt 50,0 gram af in een bekersglas van 250 ml of in een beker van een Waring Blendor. (Damp produkten, zoals pinda sauzen, waaraan water is toegevoegd zover mogelijk in op een waterbad). Voeg toe m.b.v. maatcylinders 100 ml methanol en 10 ml gedestilleerd water. Homogeniseer het mengsel gedurende 2 minuten met een Ultra Turrax of Waring Blendor.

- 7.1.2. Voeg hierna eveneens m.b.v. een maatcilinder 30 ml gedestilleerd water toe en homogeniseer opnieuw volledig. Breng de gehomogeniseerde massa over in een centrifugebuis, sluit goed af ter voorkoming van verdamping van het oplosmiddel en centrifugeer gedurende 5 minuten bij een snelheid van 2.500 tot 3.500 rpm.
- 7.1.3. Meet m.b.v. een maatcilinder 70 ml van het heldere extract af. (Let op, dat geen olie bolletjes werden meegenomen). Breng deze hoeveelheid over in een scheidtrechter van 250 ml en voeg 50 ml petroleum ether toe. Schud dit mengsel gedurende 1 minuut en verwijder na het scheiden der lagen de petroleum ether laag (bovenste laag).
- 7.1.4. Voeg hierna met een maatcilinder achtereenvolgens toe, 20 ml gedestilleerd water en 90 ml chloroform. Schud gedurende tenminste 1 minuut.  
Laat het mengsel na het schudden zo lang staan, tot een scherpe scheiding tussen de ontstane twee lagen verkregen is en beide lagen helder zijn.  
Tap de chloroformlaag (onderste laag) af en droog deze op water-vrij natriumsulfaat gedurende enige minuten.
- 7.1.5. Damp het chloroformextract in tot droog m.b.v. een rotatie vacuüm-verdamper onder uitsluiting van lucht. Bewaar (indien noodzakelijk) het ingedampde extract in een donkere ruimte tot vlak voor het dunnelaag chromatografische onderzoek. Neem het ingedampde extract op in een overmaat chloroform en breng deze oplossing over in een glazen buisje van 10 ml als bedoeld in 6.12. Damp deze oplossing in tot een eind volume van 1 ml onder uitsluiting van lucht.

## 7.2. Chromatografie

### 7.2.1. Bereiding platen voor dunnelaag chromatografie

Weeg voor de bereiding van 5 platen, 30 gram adsorbens (5.11.) af in een konische kolf van 300 ml (6.11.).

Voeg toe 60 ml gedestilleerd water, plaats de stop op de kolf en homogeniseer door schudden gedurende 1 minuut. Strijk de suspensie uit op de glazen platen van 200 x 200 mm met behulp van een uitstrijkapparaat (6.4.) ingesteld op een laagdikte van 0,25 mm. Laat de platen drogen aan de lucht en activeer ze vlak voor het gebruik gedurende 1 uur bij 110° C in een droogstoof. Bewaar de platen in een exsiccator boven silica gel.

### 7.2.2. Het opbrengen van de vlekken

Trek op een plaat voor dunnelaag chromatografie strepen in de laag, zoals weergegeven is in de bijgaande tekening (zie figuur 1). Breng op de in figuur 1 aangegeven plaatsen A, B, C en D gelegen op de startlijnen (d.i. een denkbeeldige lijn getrokken op 2 cm evenwijdig aan de onderrand van de plaat) met behulp van micro-pipetten de volgende oplossingen op :

A : 20  $\mu$ l van het monsterextract verkregen onder 7.1.5.

B : 25  $\mu$ l standaard aflatoxine B<sub>1</sub>-oplossing (1 : 200).

C : 25  $\mu$ l standaard aflatoxine B<sub>1</sub>-oplossing (1 : 200).

D : 10  $\mu$ l kwalitatieve aflatoxine standaardoplossing.

Verdamp het oplosmiddel gedurende het opbrengen met een stroom inert gas. Zorg ervoor dat de startvlekken van gelijke grootte zijn en een diameter hebben van ca. 5 mm.

#### 7.2.3. *Het ontwikkelen van het chromatogram*

Ontwikkel de plaat in de eerste looprchting in een verzadigde ontwikkel-tank opgesteld in het donker en gevuld tot een hoogte van ca. 1 cm met verse (d.i. nog niet eerder gebruikte) elueervloeistof, bestaande uit een mengsel van diethylether — methanol — water 94 : 4,5 : 1,5 v/v.

Elueer totdat het gehele vloeistoffront de streep in de dunnelaag plaat bereikt heeft.

Verwijder de plaat uit de tank en verdamp de loopvloeistof in het donker bij kamertemperatuur gedurende tenminste 15 minuten. Draai hierna de plaat 90° en ontwikkel de plaat in de tweede looprchting in een niet verzadigde ontwikkel-tank opgesteld in het donker en gevuld op de wijze als hierboven weergegeven met een mengsel van chloroform — aceton 90 : 10 v/v. Ontwikkel de plaat totdat het gehele vloeistoffront de streep in de dunnelaag bereikt heeft.

#### 7.2.4. *Interpretatie van het chromatogram*

Onderzoek het aldus verkregen tweedimensionale dunnelaag chromatogram, na verdampen van de ontwikkelvloeistof, in ultraviolet licht van 360 nm op 10 cm afstand van de lichtbron (Aflatoxine B<sub>1</sub>-vlekken fluoresceren blauw).

Ga na of een volledige scheiding is verkregen tussen de aflatoxinen B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> en G<sub>2</sub> in de chloroform — aceton looprchting afkomstig van D.

Lokaliseer de plaats van de twee standaard B<sub>1</sub>-vlekken resp. B en C en trek twee denkbeeldige lijnen door deze vlekken loodrecht op de richting van ontwikkeling (zie figuur 2). Rondom het snijpunt P van deze twee denkbeeldige lijnen ligt het gebied waar aflatoxine B<sub>1</sub> uit het monsterextract verwacht kan worden. In de praktijk ligt deze aflatoxine B<sub>1</sub>-vlek in het gebied rondom Q onder een hoek van  $\pm 120^\circ$  begrensd door twee denkbeeldige lijnen getrokken vanuit de standaardvlekken B en C (zie figuur 2). Het extract is in beide looprchtingen goed gescheiden, indien het gebied rondom P en Q vrij is van achtergrondstoring. Vergelijk de waargenomen intensiteiten van de fluorescenties van de twee standaard B<sub>1</sub>-vlekken met de intensiteit van de aflatoxine B<sub>1</sub>-vlek afkomstig van het extract verkregen uit het monster. Indien de waargenomen fluorescentie intensiteit van de aflatoxine B<sub>1</sub>-vlek uit het monsterextract gelijk of groter is dan fluorescentie intensiteiten van de standaard B<sub>1</sub>-vlekken afkomstig van

25  $\mu$ l standaardoplossing (1 : 200) (resp. vlekken C en B), dan wordt de aanwezigheid van de aflatoxine B<sub>1</sub> in het uitgangsmateriaal « aantoonbaar » geacht. De localisatie van de aflatoxine B<sub>1</sub>-vlek in het tweedimensionale chromatogram kan vergemakkelijkt worden door op een nieuwe plaat in punt A (zie figuur 1) achtereenvolgens op te brengen : 20  $\mu$ l monsterextract verkregen onder 7.1.5. en 25  $\mu$ l standaard aflatoxine B<sub>1</sub>-oplossing (1 : 200).

### 7.3. Bevestigingsreactie voor aflatoxine B<sub>1</sub>

Bevestig de identiteit van aflatoxine B<sub>1</sub> in het extract, door middel van de hierna beschreven techniek.

#### 7.3.1. Tweedimensionale chromatografie met vorming van het aflatoxine B<sub>1</sub>-hemiacetaal (aflatoxine B<sub>2a</sub>)

De hierna beschreven verrichtingen moeten worden uitgevoerd als aangegeven in figuur 3.

7.3.1.1. Trek op een plaat (5.11.) twee lijnen evenwijdig aan twee aanliggende zijden (op een afstand van 6 cm van deze zijden) die de migratie van de loopvloeistoffen moeten afbakenen. Breng met behulp van capillaire pipetten of microsputjes op een plaat de hieronder aangegeven oplossing op :

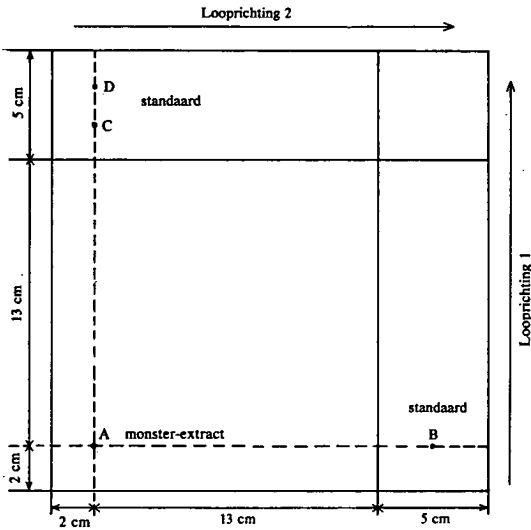
- in punt A : een hoeveelheid gezuiverd extract van het monster dat onder 7.1.5. is verkregen en dat ongeveer 2,5 nanogram aflatoxine B<sub>1</sub> bevat.
- in de punten B en C : 25  $\mu$ l van de standaardoplossing (5.9.).

7.3.1.2. Ontwikkel het chromatogram in richting I met behulp van de loopvloeistof chloroform-aceton = 9 : 1 (v/v) (laag van 1 cm in een onverzadigde ontwikkelbak) in het donker totdat het vloeistoffront de grenslijn bereikt. Neem de plaat uit de ontwikkelbad en laat deze 5 minuten in het donker en bij omgevingstemperatuur drogen. Verstuijf vervolgens zoutzuur 1 N (5.12.) op een strook van 2,5 cm breed waarin de punten A en B zijn gelegen (in figuur 3 met arcering aangegeven) totdat deze donker wordt en bescherm de rest van de plaat met een glasplaat. Laat gedurende 10 minuten in het donker reageren en droog met een luchtstroom bij omgevingstemperatuur. Ontwikkel vervolgens het chromatogram in richting II met behulp van de loopvloeistof chloroform-aceton = 9 : 1 (v/v) (laag van 1 cm in een onverzadigde ontwikkelbak) eveneens in het donker, totdat het front van de loopvloeistof de grenslijn bereikt. Neem de plaat uit de ontwikkelbad en laat deze bij omgevingstemperatuur drogen.

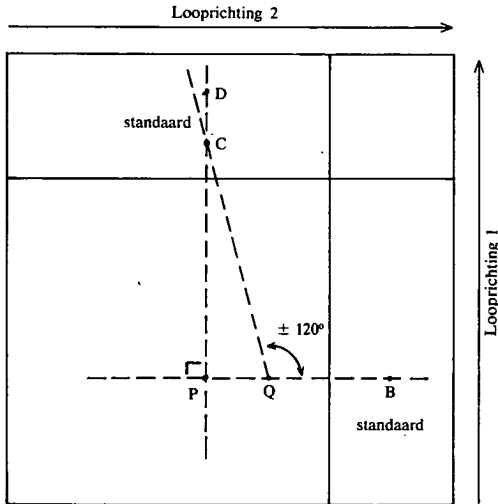
7.3.1.3. Bekijk het chromatogram onder UV-licht (6.5.) en ga de hierna aangegeven bijzonderheden of kenmerken na :

- a) Een blauwe fluorescerende aflatoxine B<sub>1</sub>-vlek wordt zichtbaar, afkomstig van de in punt C opgebrachte standaardoplossing (migratie in richting I).
- b) Een blauwe fluorescerende vlek van aflatoxine B<sub>1</sub> (welke niet met het zoutzuur heeft gereageerd) wordt zichtbaar alsmede een intensere blauwe fluorescerende vlek van aflatoxine B<sub>1</sub>-hemiacetaal, beide afkomstig van de in punt B opgebrachte standaardoplossing (migratie in richting II).
- c) Vlekken zoals die welke onder b) zijn aangegeven, afkomstig van het in punt A opgebracht extract van het monster worden zichtbaar. De plaats van deze vlekken wordt bepaald door de migratie-afstand van aflatoxine B<sub>1</sub> van punt A af in richting I (dezelfde afstand als die welke door de in punt C opgebrachte standaardoplossing is afgelegd) en door de migratie-afstanden die in richting II zijn afgelegd door aflatoxine B<sub>1</sub> (welke niet met het zoutzuur heeft gereageerd) en door aflatoxine B<sub>1</sub>-hemiacetaal (zelfde afstanden als die welke door de in punt B opgebrachte standaardoplossing zijn afgelegd). De fluorescentie-intensiteiten van de hemiacetaalvlekken afkomstig van het extract en van de in punt B opgebrachte standaardoplossing moeten redelijk overeenstemmen.

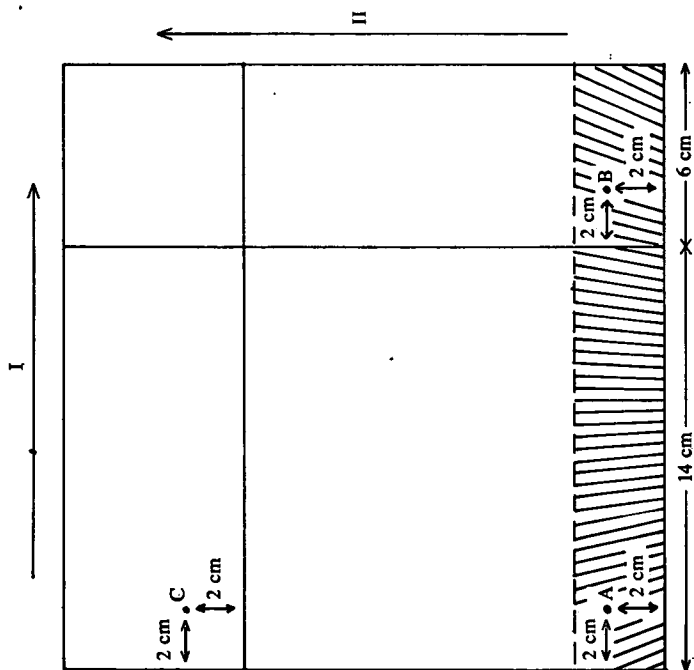




**Figuur 1 :** Schematische weergave van de indeling van de dunnelaagplaat voor twee-dimensionale chromatografie.  
Loopmiddel 1 : diethylether : methanol : water . (94 : 4,5 : 1,5).  
Loopmiddel 2 : chloroform : aceton . (90 : 10).



**Figuur 2 :** Localisering van aflatoxine B<sub>1</sub> in het monsterextract na twee-dimensionale dunnelaagchromatografie.



**Figuur 3 :** Schematische weergave voor de indeling van de plaat ten behoeve van de tweedimensionale chromatografie met vorming van het aflatoxine B<sub>1</sub>-hemiacetaal.