Dit document vormt slechts een documentatiehulpmiddel en verschijnt buiten de verantwoordelijkheid van de instellingen

►**B**

ZEVENDE RICHTLIJN VAN DE COMMISSIE

van 1 maart 1976

houdende vaststelling van gemeenschappelijke analysemethoden voor de officiële controle van diervoeders

(76/372/EEG)

(PB L 102 van 15.4.1976, blz. 8)

Gewijzigd bij:

		Publicatieblad		
		nr.	blz.	datum
►**M1**	Richtlijn 81/680/EEG van de Commissie van 30 juli 1981	L 246	32	29.8.1981
►**M2**	Richtlijn 92/95/EEG van de Commissie van 9 november 1992	L 327	54	13.11.1992
►**M3**	Richtlijn 94/14/EG van de Commissie van 29 maart 1994	L 94	30	13.4.1994

▼B

ZEVENDE RICHTLIJN VAN DE COMMISSIE

van 1 maart 1976

houdende vaststelling van gemeenschappelijke analysemethoden voor de officiële controle van diervoeders

(76/372/EEG)

DE COMMISSIE VAN DE EUROPESE GEMEENSCHAPPEN,

Gelet op het Verdrag tot oprichting van de Europese Economische Gemeenschap,

Gelet op de richtlijn van de Raad van 20 juli 1970 betreffende de invoering van gemeenschappelijke bemonsterings- en analysemethoden voor de officiële controle van veevoeders [1], laatstelijk gewijzigd bij de Toetredingsakte [2], inzonderheid op artikel 2,

Overwegende dat bovenbedoelde richtlijn bepaalt dat de officiële controle van diervoeders, welke ertoe strekt na te gaan of aan de op grond van de wettelijke of bestuursrechtelijke bepalingen inzake de kwaliteit en de samenstelling van diervoeders gestelde eisen is voldaan, geschiedt volgens communautaire bemonsterings- en analysemethoden;

Overwegende dat bij de E.E.G.-Richtlijnen 71/250, 71/393, 72/199, 73/46, 74/203 en 75/84 van de Commissie van 15 juni 1971 [3], 18 november 1971 [4], 27 april 1972 [5], 5 december 1972 [6], 25 maart 1974 [7] en 20 december 1974 [8] reeds een zeker aantal gemeenschappelijke analysemethoden is vastgesteld; dat het gezien de vorderingen welke de werkzaamheden sindsdien hebben gemaakt, dienstig is een zevende reeks methoden vast te stellen;

Overwegende dat de in deze richtlijn vervatte maatregelen in overeenstemming zijn met het advies van het Permanent Comité voor diervoeders,

HEEFT DE VOLGENDE RICHTLIJN VASTGESTELD:

Artikel 1

De Lid-Staten schrijven voor dat de analysen voor de officiële controle van diervoeders ten aanzien van hun gehalte aan aflatoxine B_1 geschieden volgens de in de bijlage bij deze richtlijn omschreven methoden.

▼M1

▼B

Artikel 2

De Lid-Staten doen uiterlijk op 1 oktober 1976 de nodige wettelijke of bestuursrechtelijke bepalingen in werking treden, die nodig zijn om aan deze richtlijn te voldoen en stellen de Commissie daarvan onverwijld in kennis.

Artikel 3

Deze richtlijn is gericht tot de Lid-Staten.

---

(1) PB nr. L 170 van 3. 8. 1970, blz. 2.
(2) PB nr. L 73 van 27. 3. 1972, blz. 14.
(3) PB nr. L 155 van 12. 7. 1971, blz. 13.
(4) PB nr. L 279 van 20. 12. 1971, blz. 7.
(5) PB nr. L 123 van 29. 5. 1972, blz. 6.
(6) PB nr. L 83 van 30. 3. 1973, blz. 21.
(7) PB nr. L 108 van 22. 4. 1974, blz. 7.
(8) PB nr. L 32 van 5. 2. 1975, blz. 26.

▼B

BIJLAGE

BEPALING VAN AFLATOXINE B_1

A. METHODE DOOR MIDDEL VAN EENDIMENSIONALE UNNELAAG-CHROMATOGRAFIE

▼M2

1. **Doel en toepassingsgebied**

Met behulp van deze methode is het mogelijk het gehalte aan aflatoxine B_1 te bepalen in enkelvoudige diervoeders en grondstoffen. Deze methode is niet bruikbaar in aanwezigheid van citruspulp. De ondergrens van de bepaling ligt bij 0,01 mg/kg (10 ppb).

Indien de aanwezigheid van bepaalde stoffen de bepaling stoort, moet de analyse opnieuw worden verricht, maar dan volgens methode B (hogedrukvloeistofchromatografie).

▼B

2. **Principe**

Het monster wordt onderworpen aan een extractie met chloroform. Het extract wordt gefiltreerd en een evenmatig deel wordt door middel van chromatografie op een kolom van silicagel gezuiverd. Het eluaat wordt ingedampt en het residu wordt in een bepaalde hoeveelheid chloroform of benzeen-acetonitrilmengsel opgelost. Een evenmatig deel van deze oplossing wordt aan dunnelaagchromatografie onderworpen. De hoeveelheid aflatoxine B_1 wordt onder UV-licht of visueel of fluorodensitometrisch bepaald door vergelijking met bekende hoeveelheden aflatoxine-B_1-standaard. De identiteit van de uit het diervoeder geëxtraheerde aflatoxine B_1 moet met behulp van de aangegeven methode worden bevestigd.

3. **Reagentia**

Noot: Alle reagentia dienen, voor zover niet anders vermeld, van analytisch zuivere kwaliteit te zijn.

3.1. Aceton

3.2. Chloroform, gestabiliseerd met 0,5 — 1,0 % ethanol 96 % (v/v).

3.3. n-Hexaan

3.4. Methanol

3.5. Diëthylether, vrij van water en peroxyden.

3.6. Mengsel van benzeen en acetonitril 98/2 (v/v).

3.7. Mengsel van chloroform (3.2) en methanol (3.4) 97/3 (v/v).

3.8. Silicagel voor kolomchromatografie, korrelgrootte 0,05 — 0,20 mm.

3.9. Watten, hydrofiel en met chloroform ontvet, of glaswol.

3.10. Natriumsulfaat, vrij van water, korrels.

3.11. Inert gas, b.v. stikstof.

3.12. Zoutzuur, 1 N.

3.13. Zwavelzuur 50 % (v/v).

3.14. Diatomeeënaarde (Hyflosupercel), met zuur gewassen.

3.15. Silicagel G-HR of gelijkwaardig voor dunnelaagchromatografie.

3.16. Standaardoplossing, bevattende ongeveer 0,1 µg aflatoxine B_1 per ml in chloroform (3.2) of in het mengsel van benzeen en acetonitril (3.6), bereid en gecontroleerd zoals aangegeven onder punt 7.

3.17. Kwalitatieve standaardoplossing, bevattende ongeveer 0,1 µg aflatoxine B_1 en B_2 per ml in chloroform (3.2) of in het mengsel van benzeen en acetonitril (3.6). Deze concentraties zijn als richtsnoer gegeven. Zij moeten zodanig worden gekozen, dat voor beide aflatoxinen dezelfde fluorescentie-intensiteit wordt verkregen.

3.18. Loopvloeistoffen:

▼B

3.18.1. Mengsel van chloroform (3.2) en aceton (3.1): 9/1 (v/v), onverzadigde ontwikkelbak;

3.18.2. Mengsel van diëthylether (3.5), methanol (3.4) en water: 96/3/1 (v/v/v), onverzadigde ontwikkelbak;

3.18.3. Mengsel van diëthylether (3.5), methanol (3.4) en water: 94/4,5/1,5 (v/v/v), verzadigde ontwikkelbak;

3.18.4. Mengsel van chloroform (3.2) en methanol (3.4): 94/6 (v/v), verzadigde ontwikkelbak;

3.18.5. Mengsel van chloroform (3.2) en methanol (3.4): 97/3 (v/v), verzadigde ontwikkelbak.

4. **Apparatuur**

4.1. Meng- en maalapparaat.

4.2. Schudmachine of magnetische roerder.

4.3. Vouwfilters, Schleicher & Schül nr. 588, of gelijkwaardig, diameter 24 cm.

4.4. Chromatografiekolommen, van glas (binnendiameter 22 mm, lengte 300 mm), met teflonkraan en reservoir van 250 ml.

4.5. Rotatievacuümverdamper met rondbodemkolf van 500 ml.

4.6. Konische kolven van 500 ml met ingeslepen stop.

4.7. Uitrusting voor dunnelaagchromatografie.

4.8. Glazen platen voor dunnelaagchromatografie van 200 × 200 mm, als volgt gemaakt (de aangegeven hoeveelheden zijn voldoende voor vijf platen): Breng 30 g silicagel G-HR (3.15) in een konische kolf. Voeg 60 ml water toe en schud gedurende één minuut. Breng de suspensie in een uniforme laag van 0,25 mm dikte op de platen aan. Laat de platen drogen aan de lucht en bewaar'ze daarna in de exsiccator over silicagel. Activeer ze vóór gebruik, door deze gedurende één uur in de droogstoof bij 110 ºC te plaatsen.

Er kan gebruik gemaakt worden van kant-en-klaar-platen indien daarbij een zelfde resultaat wordt verkregen als bij de platen die op de hierboven beschreven wijze zijn gemaakt.

4.9. Lamp voor langgolvig Ultraviolet licht 360 nm. De stralingsintensiteit moet voldoende zijn en een aflatoxine-B_1-vlek van 1,0 ng op een plaat voor dunnelaagchromatografie op een afstand van 10 cm van de lamp nog duidelijk zichtbaar te maken.

4.10. Reageerbuisjes van 10 ml, met maatverdeling, voorzien van polyethyleen stop.

4.11. UV-spectrofotometer.

4.12. Fluorodensitometer (facultatief).

5. **Uitvoering**

5.1. *Voorbereiding van het monster (zie opmerkingen in deel C, punt 1)*

Maal het monster zodanig dat het door een zeef met mazen van 1 mm (overeenkomstig ISO-aanbeveling R 565) gaat.

5.2. *Extractie*

Breng van het gemalen en gehomogeniseerde monster 50,0 g over in een konische kolf van 500 ml (4.6) en voeg 25 g diatomeeënaarde (3.14), 25 ml water en 250 ml chloroform (3.2) toe. Sluit de kolf af en schud, resp. roer daarna gedurende 30 minuten met behulp van de schudmachine of de roerder (4.2). Filtreer vervolgens door een vouwfilter (4.3), verwijder de eerste 10 ml van het filtraat en vang de volgende 50 ml op.

5.3. *Kolomzuivering*

Breng onder in de chromatografiekolom (4.4) een prop watten of glaswol (3.9) aan, vul de kolom tot ongeveer 2/3 met chloroform (3.2), voeg daarna 5 g natriumsulfaat (3.10) toe, waarbij erop moet worden gelet dat het bovenoppervlak van de natriumsulfaatlaag een vlakke basis vormt. Voeg 10 g silicagel (3.8) in kleine porties toe. Roer na iedere toevoeging voorzichtig om, om luchtbellen te verwijderen. Laat de silicagel 15 minuten inklinken en

▼B

voeg vervolgens voorzichtig 15 g natriumsulfaat (3.10) toe. Laat daarna de vloeistof aflopen tot juist boven de natriumsulfaatlaag.

Meng de 50 ml van het onder 5.2 verkregen filtraat met 100 ml n-hexaan (3.3). Breng het mengsel kwantitatief op de kolom en laat de vloeistof doorlopen tot juist boven de natriumsulfaatlaag. Verwijder de doorgelopen vloeistof. Voeg daarna 100 ml diëthylether (3.5) toe en laat de vloeistof weer doorlopen tot boven de natriumsulfaatlaag. De doorloopsnelheid moet 8 tot 12 ml/minuut bedragen. Zorg ervoor dat de kolom niet droogloopt. Verwijder de doorgelopen vloeistof. Elueer vervolgens met 150 ml van het mengsel van chloroform en methanol (3.7) en vang daarbij het gehele eluaat op. Damp het eluaat in de rotatievacuümverdamper (4.5) onder een inerte gasstroom (3.11) en bij een temperatuur van hoogstens 50 ºC tot bijna geheel droog in. Breng het residu kwantitatief met chloroform (3.2) of het mengsel van benzeen en acetonitril (3.6) over in een reageerbuisje van 10,0 ml (4.10). Concentreer de oplossing onder een inerte gasstroom (3.11) en breng vervolgens met chloroform (3.2) of het mengsel van benzeen en acetonitril (3.6) het volume op 2,0 ml.

5.4. *Dunnelaagchromatografie*

Breng op een plaat voor dunnelaagchromatografie (4.8) op 2 cm van de onderrand naast elkaar op onderlinge afstanden van 2 cm de volgende hoeveelheden standaardoplossing en extract puntvormig op:

— 10, 15, 20, 30 en 40 µl aflatoxine-B_1-standaardoplossing (3.16);
— 10 µl van het onder 5.3 verkregen extract en 20 µl standaardoplossing (3.16) op één standpunt.
— 10 en 20 µl van het onder 5.3 verkregen extract.

Ontwikkel het chromatogram in het donker met een van de loopvloeistoffen (3.18).

Breng met het oog op het kiezen van een geschikte loopvloeistof vooraf 25 µl van de kwalitatieve standaardoplossing (3.17) op een van de platen op en ga na of na de ontwikkeling een volledige scheiding van aflatoxine B_1 en B_2 is bereikt.

Laat de loopvloeistoffen in het donker verdampen en bekijk daarna de plaat onder UV-licht op een afstand van 10 cm van de lamp (4.9). De aflatoxine B_1-vlekken fluoresceren blauw.

5.5. *Kwantitatieve bepaling*

Voer de bepaling ofwel visueel ofwel fluorodensitometrisch uit.

5.5.1. Visuele bepaling

Bepaal de hoeveelheid aflatoxine B_1 in het extract door de intensiteit van de fluorescentie van de vlek van het extract met een van de vlekken van de standaardoplossing te vergelijken. Interpoleer indien nodig. De fluorescentie van de vlek verkregen door het over elkaar aanbrengen van extract en standaardoplossing moet sterker zijn dan die van 10 µl van het extract en er mag slechts één vlek zichtbaar zijn. Verdun, indien de fluorescentie-intensiteit van 10 µl extract sterker is dan die van 40 µl standaardoplossing, het extract 10 of 100 maal met chloroform (3.2) of het mengsel van benzeen en acetonitril (3.6) alvorens het extract aan een nieuwe dunnelaagchromatographische scheiding te onderwerpen.

5.5.2. Bepaling door fluorodensitometrie

Meet de fluorescentie-intensiteit van de aflatoxine-B_1-vlekken met behulp van een fluorodensitometer bij een golflengte van 365 nm voor de extinctie en bij een golflengte van 443 nm voor de emissie. Bepaal de hoeveelheid aflatoxine B_1 in de extractvlekken door de fluorescentie-intensiteiten van de vlekken van het extract en van de standaardoplossing onderling te vergelijken.

5.6. *Bevestiging van de identiteit van aflatoxine B_1*

Bevestig de identiteit van aflatoxine B_1 in het extract, door middel van de hierna beschreven technieken:

5.6.1. Behandeling met zwavelzuur

Verstuif zwavelzuur (3.13) over het overeenkomstig 5.4 verkregen chromatogram. De fluorescentie van de aflatoxine-B_1-vlek onder UV-licht moet zijn veranderd van blauw naar geel.

▼B

5.6.2. Tweedimensionale chromatografie met vorming van aflatoxine B_1-hemiacetaal (aflatoxine B_2a)

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

5.6.2.1. Opbrengen van de oplossingen

Trek op een plaat (4.8) 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 microspuitjes op een plaat de hieronder aangegeven oplossingen op:

— *in punt A:* een hoeveelheid gezuiverd extract van het monster dat onder 5.3 is verkregen en dat ongeveer 2,5 nanogram aflatoxine B_1 bevat;

— *in de punten B en C:* 25 µl van de standaardoplossing (3.16).

5.6.2.2. Ontwikkeling

Ontwikkel het chromatogram in richting I met behulp van de loopvloeistof (3.18.1) (laag van 1 cm in een onverzadigde ontwikkelbak) in het donker totdat het vloeistoffront de grenslijn bereikt. Neem de plaat uit de ontwikkelbak en laat deze 5 minuten in het donker en bij omgevingstemperatuur drogen. Verstuif vervolgens zoutzuur (3.12) op een strook van 2,5 cm breed waarin de punten A en B zijn gelegen (in fig. 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 (3.18.1) (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 ontwikkelbak en laat deze bij omgevingstemperatuur drogen.

5.6.2.3. Beoordelen van het chromatogram

Bekijk het chromatogram onder UV-licht (4.9) en ga de hierna aangegeven bijzonderheden of kenmerken na:

a) Een blauwe fluorescerende aflatoxine-B_1-vlek wordt zichtbaar, afkomstig van de in punt C opgebrachte standaardoplossing (migratie in richting I).

b) Een blauwe fluorescerende vlek van aflatoxine B_1 (welke niet met het zoutzuur heeft gereageerd) wordt zichtbaar alsmede een intensere blauwe fluorescerende vlek van aflatoxine B_1-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 opgebrachte extract van het monster worden zichtbaar. De plaats van deze vlekken wordt bepaald door de migratieafstand van aflatoxine B_1 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_1 (welke niet met het zoutzuur heeft gereageerd) en door aflatoxine B_1-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.

6. Berekening van de resultaten

6.1. *Visuele meting*

Het gehalte aan aflatoxine B_1 van het monster in µg/kg (ppb) wordt berekend met behulp van de volgende formule:

$$\frac{S \cdot Y \cdot V}{W \cdot X}$$

▼B

waarin:

Y en X = volumina in microliter uitgedrukt van de aflatoxine-B_1-standaardoplossing (3.16), resp. van het extract waarvan de fluorescentie-intensiteiten gelijk zijn;

S = concentratie in microgram aflatoxine B_1 per ml in de standaardoplossing (3.16);

V = eindvolume van het extract in microliter, met inachtneming van een eventueel gemaakte verdunning;

W = massa van het monster in gram, overeenkomend met de voor de kolomzuivering gebruikte hoeveelheid extract.

6.2. *Het meten door middel van fluorodensitometrie*

Het gehalte aan aflatoxine B_1 van het monster in µg/kg (ppb) wordt berekend met behulp van de volgende formule:

$$\frac{S \cdot V}{W \cdot Y}$$

waarin:

Y = volume van het op de plaat opgebrachte extract in microliter (10 of 20 µl);

S = het aantal nanogram aflatoxine B_1 in de extractvlek (rekening houdend met het volume Y) afgeleid uit de metingen;

V = eindvolume van het extract in microliter, met inachtneming van een eventueel gemaakte verdunning;

W = massa van het monster in gram, overeenkomend met de voor de kolomzuivering gebruikte hoeveelheid extract.

7. **Bereiding en controle van de standaardoplossing (3.16)**

7.1. *Bepaling van de aflatoxine-B_1-concentratie*

Bereid een aflatoxine-B_1-standaardoplossing in chloroform (3.2) of in het mengsel van benzeen en acetonitril (3.6) met een concentratie van 8 tot 10 µg per ml. Meet het absorptiespectrum tussen 330 en 370 nm met een spectrofotometer (4.11).

Bepaal de optische dichtheid (A) bij 363 nm wanneer chloroform als oplosmiddel is gebruikt en bij 348 nm wanneer het mengsel benzeen-acetonitril als oplosmiddel is gebruikt.

Bereken de aflatoxine-B_1-concentratie in microgram per ml oplossing met behulp van de volgende formules:

$\frac{312 \cdot A \cdot 1000}{20600}$ voor de oplossing in chloroform

$\frac{312 \cdot A \cdot 1000}{19800}$ voor de oplossing in het mengsel van benzeen en acetonitril.

Voer de, voor het bereiden van een standaard-werkoplossing met een aflatoxine-B_1-concentratie van ongeveer 0,1 µg per ml, noodzakelijke verdunningen uit onder het uitsluiten van daglicht. Deze oplossing blijft twee weken stabiel indien zij in de koelkast wordt bewaard bij 4 ºC.

7.2. *Controle op de chromatografische zuiverheid*

Breng op een plaat voor dunnelaagchromatografie (4.8) 5 µl op van de standaardoplossing, die 8 tot 10 µg aflatoxine B_1 per ml bevat (zie 7.1). Ontwikkel het chromatogram volgens 5.4. Onder UV-licht mag slechts één vlek zichtbaar zijn; er mag geen fluorescentie worden waargenomen daar waar de stof oorspronkelijk werd opgebracht.

▼B

8. **Herhaalbaarheid**

Het verschil tussen de resultaten van twee door dezelfde analist aan hetzelfde monster uitgevoerde parallelle bepalingen zou niet meer mogen bedragen dan:

25 % van de hoogste waarde bij aflatoxine-B_1-gehalten van 10 tot en met 20 µg/kg,

5 µg in absolute waarde bij gehalten van 20 tot en met 50 µg/kg,

10 % van de hoogste waarde bij gehalten van meer dan 50 µg/kg.

9. **Reproduceerbaarheid**

Zie opmerkingen in deel C, punt 2,

▼M2

B. BEPALING VAN AFLATOXINE B_1 MET HOGEDRUKVLOEISTOF-CHROMATOGRAFIE

1. **Doel en toepassingsgebied**

Met behulp van deze methode is het mogelijk het gehalte aan aflatoxine B_1 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_{18}-patroon gezuiverd. De uiteindelijke scheiding en bepaling worden uitgevoerd met hogedrukvloeistofchromatografie (HPLC) met een reversed phase C_{18}-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 vaste 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) ethanol. 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.: Zonoig wordt de samenstelling van de mobiele fase aangepast aan het gebruikte type HPLC-kolom.

3.7. Verzadigde oplossing van jodium in water. Voeg 2 g jodium toe aan 400 ml water. Meng gedurende ten minste 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_{18}-patroon (Waters SEP-PAK), of gelijkwaardig materiaal.

▼M2

3.11. Inert gas, bij voorbeeld stikstof.

3.12. Aflatoxine B_1, standaardoplossing in chloroform, concentratie 10 µg/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_1 in microgram per milliliter oplossing met de formule:

$$\text{Concentratie } (\grave{e}\text{mg/ml}) = \frac{312 \times A \times 1\,000}{22\,300} = 13,991 \times A$$

3.12.1. Aflatoxine B_1, voorraadstandaardoplossing in chloroform

Breng 2,5 ml standaardoplossing (3.12) kwantitatief over in een maatkolf van 50 ml en vul aan tot de maatstreep 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_1, 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 voorraadstandaardoplossing (3.12.1) in enkele uren in aluminiumfolie tot kamertemperatuur opwarmen. Breng 400 µl van de voorraadstandaardoplossing (200 ng aflatoxine B_1) 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/aceton (3.5.3), vul de oplossing aan tot de maatstreep met het water/aceton-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/aceton (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/aceton-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_1, B_2, G_1 en G_2 in concentraties van respectievelijk circa 1, 0,5, 1 en 0,5 µg/ml in 1 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

▼M2

aanraking komt, moet daarom enkele uren in verdund zuur (bij voorbeeld zwavelzuur, 2 mol/l) worden gelegd en daarna ter verwijdering van zuurresten 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. Rotatievacuümverdamper, voorzien van een rondbodemkolf van 150-250 ml.

4.5. Hogedrukvloeistofchromatograaf; injector met injectielus geschikt voor injectie van 250 µl. Zie de instructies van de fabrikant voor de gedeeltelijke of volledige vulling van de injectielus.

4.6. Analytische HPLC-kolom: C_{18}-vulling van 3 µm of 5 µm 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″ × 0,75 mm).

4.9. Spiraalvormig reactiekanaal; teflon of roestvrij staal. In combinatie met 5 µm of 3 µm HPLC-kolommen komen afmetingen van 3 000 × 0,5 mm tot 5 000 × 0,5 mm in aanmerking.

4.10. Gethermostateerd waterbad, ingesteld op 60 ºC, waarmee een temperatuurregeling van beter dan 0,1 ºC mogelijk is.

4.11. Fluorescentiedetector met excitatie- en emissiegolflengten van respectievelijk 365 nm en 435 nm (voor een filterinstrument: emissiegolflengte > 400 nm). Detectie van ten minste 0,05 ng aflatoxine B_1 moet mogelijk zijn. Het kan nodig zijn enige tegendruk toe te passen (bij voorbeeld in de vorm van een restrictor of een spiraal van teflon of roestvrij staal aan de uitgang van de detector), om luchtbellen 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 µm, Millipore H.A.W.P. 04700 of gelijkwaardig.

4.16. Erlenmeyerkolf van 500 ml met glazen stop.

4.17. Glazen kolom (inwendige doorsnede ongeveer 1 cm, lengte ongeveer 30 cm) voorzien van een Luer-uiteinde.

4.18. Luer nylon kraan, chloroformbestendig (bij voorbeeld 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 µl (zie 4.5).

4.21. Microspuit van 100 µl 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 ºC.

▼M2

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_1 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 moet worden dat de patroon bij deze handelingen droog komt te staan. Elueer het aflatoxine B_1 met 40 ml aceton/water (3.5.1) en vang het gehele eluaat op in de rondbodemkolf van de rotatievacuümverdamper (4.4). Damp het eluaat in aan de rotatievacuümverdamper bij 40-50 ºC 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_1 in de C_{18}-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_1 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_{18}-zuivering.

5.4.2. Zuivering met C_{18}-SEP-PAK

5.4.2.1. Voorbereiding patroon en koppeling aan kolom

Sluit aan het korte uiteinde van een C_{18}-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.

▼M2

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 (3.5.2) 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 zachtjes 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_1 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_1 kunnen leiden. Teflon filters (4.15) zijn wel bruikbaar.

5.5. *Hogedrukvloeistofchromatografie*

(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 piekuitslagen 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_1 (3.13.3) met regelmatige tussenpozen (elke derde injectie) kunnen de piekuitslagen voor aflatoxine B_1 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_1 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_1 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.

▼M2

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_1 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_1 (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. Als aan deze eisen is voldaan, wordt dadelijk verdergegaan. 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, enzovoort.

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 scheitrechter (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_1 in µg/kg met behulp van de formule:

$$\text{gehalte aan aflatoxine } B_1 \text{ in èmg/kg} = \frac{m \times V_{ext}}{V_m \times M \times \frac{V_f}{V_c}}$$

waarin:

m = hoeveelheid aflatoxine B_1 in ng volgens de B_1-piek van het monster, die als volgt wordt berekend:

$$m = \frac{P(\text{monster})}{P(st_1) + P(st_2)} \times 2\ r(st)$$

P(monster) = piekoppervlak voor aflatoxine P_1 in het monster

▼**M2**

$P(st_1)$ = piekoppervlak voor aflatoxine B_1 in voorafgaande referentiestandaard (3.13.3)

$P(st_2)$ = piekoppervlak voor aflatoxine B_1 in eerstvolgende referentiestandaard (3.13.3)

r(st) = ingespoten hoeveelheid aflatoxine B_1 in de referentiestandaard (3.13.3) in ng

V_m = volume van het ingespoten monsterextract in ml

V_{ext} = eindvolume van het monsterextract in ml, rekening houdend met eventuele verdunning (zie 5.3)

M = massa van het monster in g

V_f = volume van het in de Florisil-patroon overgebrachte filtraat (5.4.1.2) in ml

V_c = 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:

gehalte aan aflatoxine B_1 in µg/kg = 20 × 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 ([1]) 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 ([2]) en Beschikking nr. 610/89/EEG van de Commissie van 14 november 1989 ([3]). In tabel 1 zijn r en R ook vermeld als variatiecoëfficiënten.

Tabel 1

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

(15 laboratoria)

Gehalte	r	R	CV_r (*)	CV_R (*)
(µg/kg)			(%)	(%)
8 & 14	1,4	1,7	11	18

(*) CV = variatiecoëfficiënt.

10.2. *Stabilisatie van chloroform (3.1)*

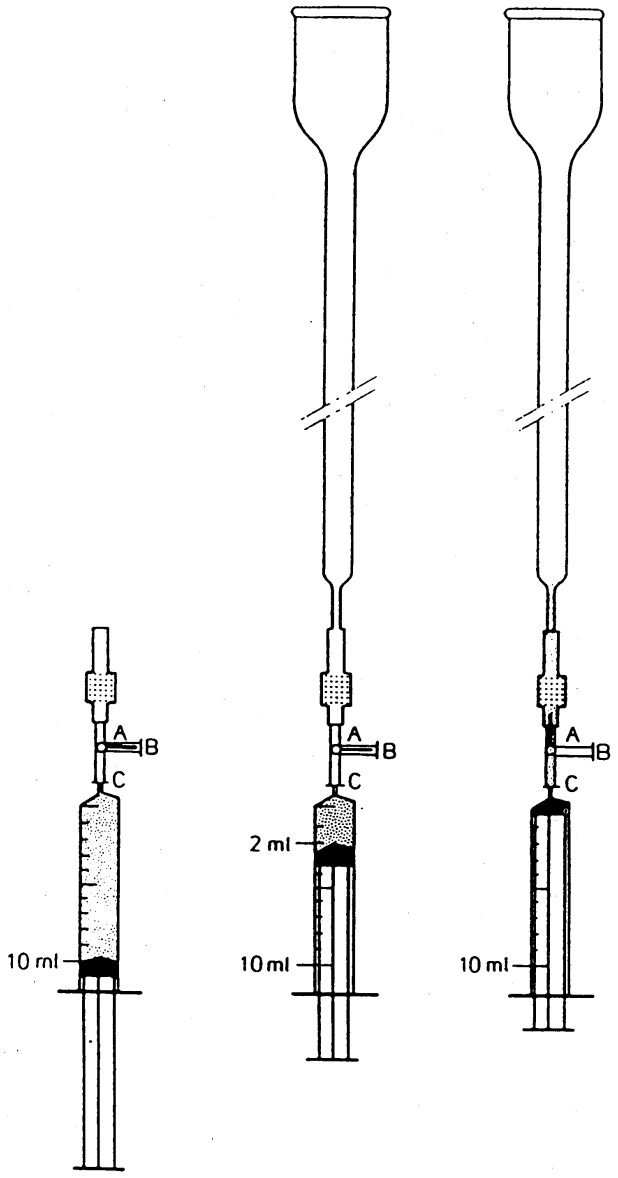
De adsorptie-eigenschappen van de Florisil-patroon kunnen zich wijzigen, als de chloroform gestabiliseerd wordt met andere middelen dan ethanol. Dit moet geverifieerd worden volgens 10.3, indien de aangeduide chloroform niet beschikbaar is.

([1]) Egmond, H.P. van, Heisterkamp, S.H. and Paulsch, W.E. (1991). Food Additives and Contaminants 8, 17-29.
([2]) ISO 3534-1977.
([3]) PB nr. L 351 van 2. 12. 1989, blz. 39.

▼**M2**

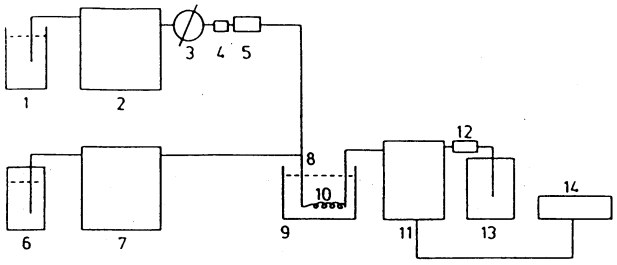
10.3. *Nauwkeurigheid*

De juiste uitvoering van de methode wordt gecontroleerd door herhalingsbepalingen op 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.



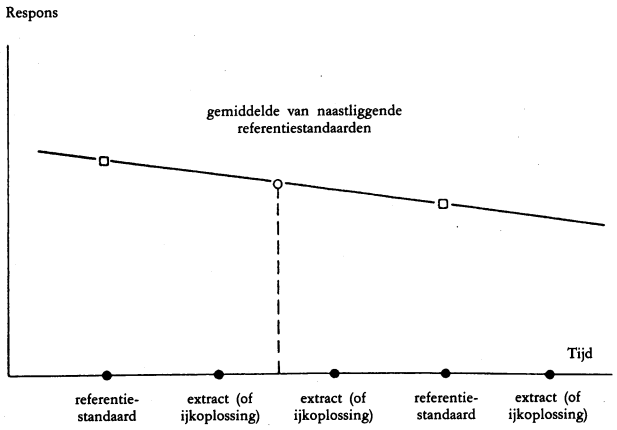
Figuur 1: Combinatie van kolom en patroon

▼**M2**



1. Mobiele fase
2. Pomp
3. Injectiekraan
4. Voorkolom
5. Analytische HPLC-kolom
6. Jodiumoplossing
7. Reagenspomp
8. T-stuk
9. Gethermostateerd bad
10. Reactorspiraal
11. Fluorescentiedetector
12. Restrictor
13. Opvangvat
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_1 door regelmatige injectie van referentiestandaard (3.13.3)

▼**M3**

C. OPMERKINGEN IN VERBAND MET DE METHODEN A EN B

1. **Ontvetten**

Monsters met een vetgehalte van meer dan 5 % moeten met petroleumether (kookpunt 40-60 ºC) worden ontvet nadat zij op de in punt 5.1 aangegeven wijze zijn bereid. In dergelijke gevallen moeten de analyseresultaten worden uitgedrukt op basis van het gewicht van het niet-ontvette monster.

2. **Reproduceerbaarheid van de resultaten voor methode A**

De reproduceerbaarheid van de resultaten, zijnde de variatie tussen de resultaten van twee of meer laboratoria op hetzelfde monster, werd vastgesteld op:

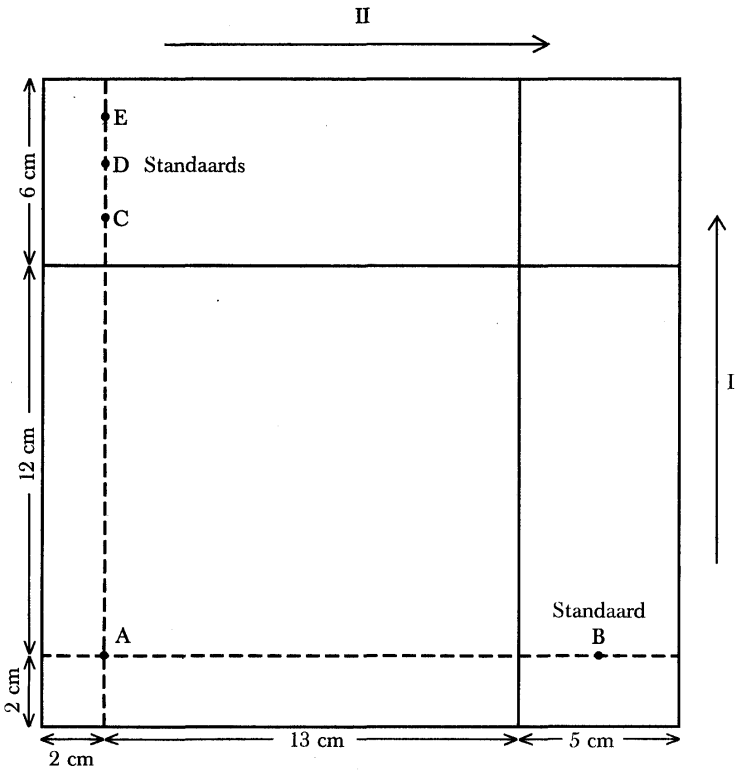
± 50 % van gemiddelde waarde in aflatoxine B_1 bij gemiddelde waarden van 10 tot en met 20µg/kg;

± 10 µg/kg van de gemiddelde waarde bij gemiddelde waarden hoger dan 20 en tot en met 50 µg/kg;

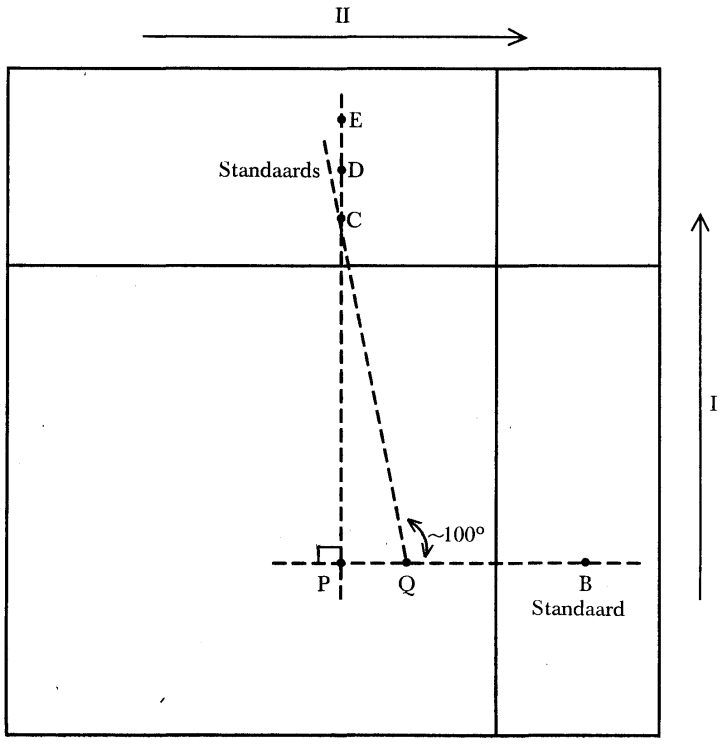
± 20 % van de gemiddelde waarde bij gemiddelde waarden van meer dan 50 µg/kg.

▼B

BIJLAGE

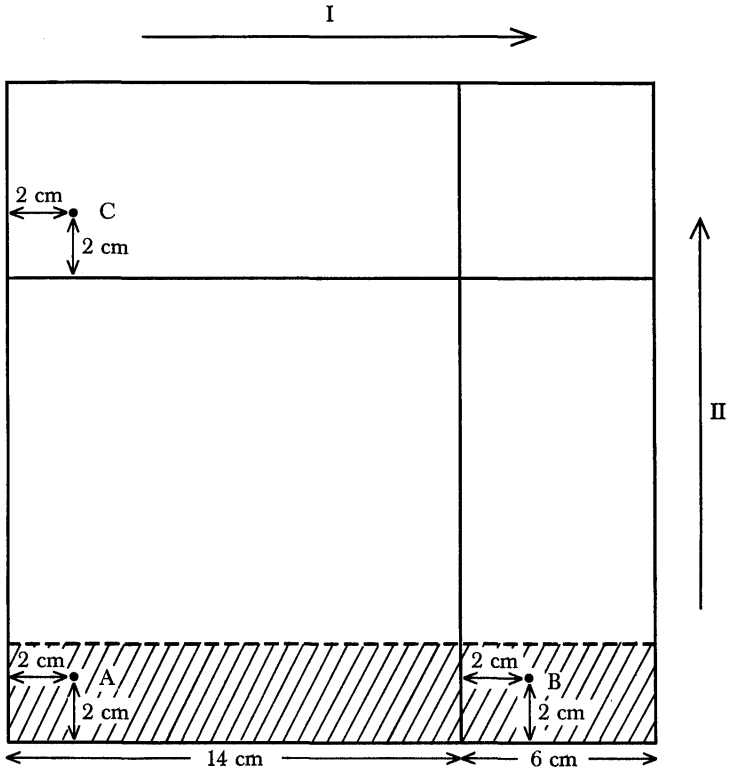


Figuur 1



Figuur 2

▼B



Figuur 3