Dette dokument er et dokumentationsredskab, og institutionerne påtager sig intet ansvar herfor

►**B**

KOMMISSIONENS SYVENDE DIREKTIV

af 1. marts 1976

om fastsættelse af fællesskabsanalysemetoder til den officielle kontrol med foderstoffer

(76/372/EØF)

(EFT L 102 af 15.4.1976, s. 8)

Ændret ved:

		Tidende		
		nr.	side	dato
►**M1**	Kommissionens direktiv 81/680/EØF af 30. juli 1981	L 246	32	29.8.1981
►**M2**	Kommissionens direktiv 92/95/EØF af 9. november 1992	L 327	54	13.11.1992
►**M3**	Kommissionens direktiv 94/14/EF af 29. marts 1994	L 94	30	13.4.1994

▼B

KOMMISSIONENS SYVENDE DIREKTIV

af 1. marts 1976

om fastsættelse af fællesskabsanalysemetoder til den officielle kontrol med foderstoffer

(76/372/EØF)

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE FÆLLESSKABER HAR —

under henvisning til traktaten om oprettelse af Det europæiske økonomiske Fællesskab,

under henvisning til Rådets direktiv af 20. juli 1970 om indførelse af fællesskabsprøveudtagningsmåder og -analysemetoder for så vidt angår den officielle kontrol med foderstoffer [1], senest ændret ved tiltrædelsesakten [2], særlig artikel 2, og

ud fra følgende betragtninger:

Ved ovennævnte direktiv er det fastsat, at den officielle kontrol med foderstoffer til konstatering af, om de betingelser, der er fastsat på grundlag af administrativt eller ved lov fastsatte bestemmelser om foderstoffernes beskaffenhed og sammensætning, er opfyldt, skal foretages efter fællesskabsprøveudtagningsmåder og -analysemetoder;

der er allerede ved Kommissionens direktiver 71/250/EØF af 15. juni 1971 [3], 71/393/EØF af 18. november 1971 [4], 72/199/EØF af 27. april 1972 [5], 73/46/EØF af 5. december 1972 [6], 74/203/EØF af 25. marts 1974 [7] og 75/84/EØF af 20. december 1974 [8] fastsat en række fællesskabsanalysemetoder; i betragtning af den hastighed, hvormed arbejdet siden da er skredet frem, bør der fastsættes en syvende serie af metoder;

de i dette direktiv fastsatte foranstaltninger er i overensstemmelse med udtalelse fra Den stående Foderstofkomité —

UDSTEDT FØLGENDE DIREKTIV:

Artikel 1

Medlemsstaterne foreskriver, at analyserne i forbindelse med den officielle kontrol af foderstoffer for så vidt angår deres indhold af Aflatoxin B_1 skal foretages efter de metoder, der er beskrevet i bilaget til dette direktiv.

▼M1

▼B

Artikel 2

Medlemsstaterne sætter senest den 1. oktober 1976 de nødvendige administrativt eller ved lov fastsatte bestemmelser i kraft for at efterkomme bestemmelserne i dette direktiv. De underretter omgående Kommissionen herom.

Artikel 3

Dette direktiv er rettet til medlemsstaterne.

---

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

▼B

BILAG

BESTEMMELSE AF AFLATOXIN B_1

A. FREMGANGSMÅDE VED ENDIMENSIONAL TYNDTLAGSKROMATOGRAFI

▼M2

1. **Formål og anvendelsesområde**

Metoden gør det muligt at bestemme indholdet af aflatoksin B_1 i råvarer og ublandede foderstoffer. Denne metode kan ikke anvendes ved tilstedeværelse af citruskvas. Den mindste mængde, der kan bestemmes, er 0,01 mg/kg (10 ppb).

Ved tilstedeværelse af interfererende stoffer, som generer bestemmelserne, må analysen gentages efter metode B (højtryksvæskekromatografi).

▼B

2. **Princip**

Prøven ekstraheres med chloroform. Ekstrakten filtreres og en alikvot del af ekstrakten renses ved søjlekromatografi på kiselgel. Eluatet inddampes, og inddampningsresten opløses i en bestemt mængde chloroform eller i en blanding af benzen og acetonitril. En alikvot del af denne opløsning tyndtlagskromatograferes. Mængden af aflatoxin B_1 bestemmes under UV bestråling af kromatogrammet, enten visuelt eller ved fluorodensitometri, ved sammenligning med kendte mængder af aflatoxin B_1 standard. Identiteten af det ekstraherede aflatoxin B_1 i foderstoffet skal bekræftes ved hjælp af de anførte fremgangsmåder.

3. **Reagenser**

NB.: Alle reagenserne skal være af »analyse« kvalitet, medmindre andet er angivet.

3.1. Acetone.

3.2. Chloroform, stabiliseret med 0,5 til 1,0 % 96 % ethanol (v/v).

3.3. n-Hexan.

3.4. Methanol.

3.5. Vandfri diethylether, peroxidfrit.

3.6. Blanding af benzen og acetonitril: 98/2 (v/v).

3.7. Blanding af chloroform (3.2) og methanol (3.4): 97/3 (v/v).

3.8. Kiselgel til søjlekromatografi kornstørrelse: 0,05 til 0,20 mm.

3.9. Hygroskopisk bomuld, forinden affedtet med chloroform, eller glasuld.

3.10. Natriumsulfat, vandfrit, granuleret.

3.11. Inaktiv luftart, f.eks. kvælstof.

3.12. 1 N saltsyre.

3.13. 50 % (v/v) svovlsyre.

3.14. Diatoméjord (Hyflosupercel), vasket i syre.

3.15. Kiselgel G-HR eller tilsvarende til tyndtlagskromatografi.

3.16. Standardopløsning af ca. 0,1 µg aflatoxin B_1 pr. ml. i chloroform (3.2) eller i benzen acetonitril-blandingen (3.6), tilberedt og kontrolleret som angivet under punkt 7.

3.17. Kvalitativ standardopløsning af ca. 0,1 µg aflatoxin B_1 og B_2 pr. ml i chloroform (3.2) eller i benzen/acetonitril-blandingen (3.6). Disse koncentrationer er kun vejledende. De skal afpasses, så der opnås den samme fluorescensintensitet for begge aflatoxinerne.

3.18. Udviklingsvæsker:

3.18.1. Chloroform (3.2)/acetone (3.1): 9/1 (v/v), umættet kar;

▼B

3.18.2. Diethylether (3.5)/methanol (3.4)/vand: 96/3/1 (v/v), umættet kar,

3.18.3. Diethylether (3.5)/methanol (3.4)/vand: 94/4,5/1,5 (v/v), mættet kar;

3.18.4. Chloroform (3.2)/methanol (3.4): 94/6 (v/v), mættet kar;

3.18.5. Chloroform (3.2)/methanol (3.4): 97/3 (v/v), mættet kar.

4. **Apparatur**

4.1. Kværn.

4.2. Rysteapparat eller magnetomrører.

4.3. Foldefiltre, Schleicher og Schüll nr. 588 eller tilsvarende, diameter: 24 cm.

4.4. Kromatografisøjle af glas (indvendig diameter: 22 mm, længde: 300 mm), med teflonhane og 250 ml beholder.

4.5. Rotationsfordamper med 500 ml rundbundet kolbe.

4.6. 500 ml koniske kolber med slib og glasprop.

4.7. Tyndtlagskromatografiudstyr.

4.8. Glasplader til tyndtlagskromatografi, 200 × 200 mm, behandlet som beskrevet nedenfor (de angivne mængder er passende til at dække fem plader): 30 g G-HR kiselgel (3.15) hældes i en konisk kolbe; der tilsættes 60 ml destilleret vand, sættes prop i og rystes i et minut. Suspensionen stryges ud på pladerne, så der fremkommer et ensartet lag på 0,25 mm's tykkelse. Pladerne tørres i luften og opbevares dernæst i en ekssikkator, forsynet med kiselgel. Pladerne aktiveres på anvendelsestidspunktet ved anbringelse i et varmeskab ved 110 ºC i en time. Fabriksfremstillede færdigplader er egnede i det omfang de giver lignende resultater som de plader, der er behandlet på den ovenfor beskrevne måde.

4.9. Lang-bølget UV-lampe (360 nm). Fluorecensintensiteten skal gøre det muligt helt klart at skelne en plet på 1,0 ng aflatoxin B_1 på en plade til tyndtlagskromatografi i en afstand af 10 cm fra lampen.

4.10. 10 ml måleglas med polyethylenpropper.

4.11. UV-spektrofotometer.

4.12. Fluorodensitometer (eventuelt).

5. **Fremgangsmåde**

5.1. *Tilberedning af prøven (se bemærkninger, afsnit C, punkt 1).*

Prøven findeles således, at den kan passere igennem en sigte med en maskevidde på 1 mm (som anbefalet af ISO E 565).

5.2. *Ekstraktion*

50,0 g af den findelte og homogeniserede prøve overføres til en 500 ml konisk kolbe (4.6). 25 g diatoméjord (3.14), 25 ml vand og 250 ml chloroform (3.2) tilsættes.

Kolben tilproppes og rystes eller omrøres i 30 minutter ved hjælp af apparaturet (4.2) og indholdet filtreres gennem et foldefilter (4.3). De første 10 ml af filtratet kasseres, dernæst opsamles 50 ml.

5.3. *Oprensning på søjle*

Bunden af et kromatografirør (4.4) forsynes med en prop af vat eller glasuld (3.9), røret fyldes to tredjedele op med chloroform (3.2), og der tilsættes 5 g natriumsulfat (3.10).

Sørg for, at natriumsulfatlagets øvre overflade er plan, tilsæt dernæst 10 g kiselgel (3.8) i små portioner. Efter hver tilsætning røres omhyggeligt for at fjerne luftblærer. Efter henstand i 15 minutter, tilsættes forsigtigt 15 g natriumsulfat (3.10). Lad det ovenstående chloroform løbe ud således at overfladen står umiddelbart over natriumsulfatlaget.

De 50 ml ekstrakt, som blev opsamlet under 5.2, blandes med 100 ml n-Hexan (3.3), og blandingen overføres kvantitativt til søjlen. Lad væsken synke, indtil væskeniveauet når natriumsulfatlagets overflade og fjern den gennemløbne væske. Dernæst tilsættes 100 ml diethylether (3.5), der elueres indtil væskeniveauet atter når natriumsulfatlagets overflade. Under disse operationer skal gennemløbshastigheden holdes på 8 til 12 ml i minuttet, og søjlen

▼B

må ikke løbe tør. Den gennemløbne væske kasseres. Derefter elueres med 150 ml af chloroform/methanol-blandingen (3.7), og hele eluatet opsamles.

Eluatet inddampes til næsten tørhed ved gennemblæsning af inaktiv luft (3.11) og ved en temperatur på under 50 ºC ved hjælp af rotationsfordamperen (4.5). Inddampningsresten overføres kvantitativt med chloroform (3.2) eller benzen/acetonitril-blandingen til et 10 ml måleglas (4.10). Opløsningen inddampes ved gennemblæsning af inaktiv luft (3.11) og rumfanget justeres til 2,0 ml med chloroform (3.2) eller benzen/acetonitril-blandingen (3.6).

5.4. *Tyndtlagskromatografi*

De nedenfor angivne rumfang af standardopløsningen og af ekstrakten påsættes som pletter på en plade til tyndtlagskromatografi (4.8), 2 cm fra den underste kant med en indbyrdes afstand på 2 cm:

— 10, 15, 20, 30 og 40 µl af aflatoxin B_1 tandardopløsning (3.16);

— 10 µl af ekstrakten fra punkt 5.3 og, *oven i dette*, 20 µl af standardopløsning (3.16);

— 10 og 20 µl af ekstrakten fra punkt 5.3.

Kromatogrammet udvikles i dæmpet belysning ved hjælp af en af væskerne (3.18). Valget af udviklingsvæske skal finde sted forinden ved at anbringe 25 µl af den kvalitative standardopløsning (3.17) på pladen og ved at sikre sig, at aflatoxinerne B_1 og B_2 adskilles fuldstændigt under kromatograferingen.

Opløsningsmidlerne afdampes i dæmpet belysning, og der bestråles med UV-lys, idet pladen anbringes 10 cm fra lampen (4.9). Aflatoxin B_1-pletterne fluorescerer blåt.

5.5. *Kvantitative bestemmelser*

Bestemmelserne foretages enten visuelt eller ved hjælp af fluorodensitometri, som angivet nedenfor.

5.5.1. Visuel måling

Mængden af aflatoxin B_1 i ekstrakten bestemmes ved at sammenligne fluorescensintensiteten fra pletterne fra ekstrakten med intensiteten fra pletterne fra standardopløsningen. Der interpoleres om nødvendigt. Den fluorescens, som fremkommer ved at anbringe ekstrakten oven i standardopløsningen, skal være kraftigere end den, som udsendes fra de 10 µl ekstrakt, og der må kun kunne opfattes en plet. Hvis fluorescens-intensiteten fra de 10 µl ekstrakt er kraftigere end den, som de 40 µl standardopløsning giver, fortyndes ekstrakten 10 eller 100 gange med chloroform (3.2) eller med benzen/acetonitril-blandingen (3.6), inden den igen tyndtlagskromatograferes.

5.5.2. Målinger ved hjælp af fluorodensitometri

Fluorescensintensiteten fra aflatoxin B_1-pletterne måles med et fluorodensitometer (4.12), idet der benyttes en excitationsbølgelængde på 365 nm og en emissionsbølgelængde på 443 nm. Mængden af aflatoxin B_1 i de afsatte ekstrakter bestemmes ved at sammenligne ekstraktpletternes fluorescensintensitet med standardopløsningens.

5.6. *Verificering af identiteten af aflatoxin B_1*

Identiteten af det aflatoxin B_1, som findes i ekstrakten, verificeres ved de nedenfor angivne fremgangsmåder.

5.6.1 Behandling med svovlsyre

Påsprøjt forstøvet svovlsyre (3.13) på kromatogrammet fra punkt 5.4. Under UV-bestråling skal fluorescensen fra aflatoxin B_1-pletterne efter påsprøjtningen skifte fra blåt til gult.

5.6.2. Todimensionelt kromatografi der omfatter dannelse af aflatoxin B_1-hemiacetal (aflatoxin B_{2a})

NB: De nedenfor beskrevne arbejdsoperationer skal foretages i overensstemmelse med skemaet i fig. 3.

5.6.2.1. Anbringelse af opløsningerne

På en plade (4.8) trækkes to rette linier parallelt med to hosliggende sider (i en afstand af 6 cm fra disse sider), med det formål at afgrænse opløsningsmidlernes bevægelse. Ved hjælp af kapillar-

▼B

pipetter eller mikrosprøjter anbringes de nedenfor angivne opløsninger på pladen.

— *I punkt A:* et rumfang renset ekstrakt fra punkt 5.3 indeholdende ca. 2,5 ng aflatoxin B_1;

— *I punkterne B og C:* 25 µl af standardopløsning (3.16).

5.6.2.2. Kromatografering

Kromatogrammet udvikles i retning I ved hjælp af væsken (3.18.1) (1 cm tykt lag i umættet kar), i dæmpet belysning, indtil væskefronten når grænselinjen.

Pladen fjernes fra karret og tørres i fem minutter ved stuetemperatur i dæmpet belysning. Dernæst sprøjtes med forstøvet saltsyre (3.12) på et 2,5 cm bredt stykke af pladen, som dækker punkterne A og B (angivet ved det skraverede felt på fig. 3), indtil mørkfarvning, idet resten af pladen beskyttes med en tynd glasplade. Efter 10 minutters indvirkning i mørke, tørres i en luftstrøm ved stuetemperatur.

Derefter udvikles kromatogrammet i retning II ved hjælp af væsken (3.18.1) (1 cm tykt lag i umættet kar), i dæmpet belysning, indtil væskefronten når grænselinjen. Pladen fjernes fra karret og tørres ved stuetemperatur.

5.6.2.3. Fortolkning af kromatogrammet

Kromatogrammet undersøges ved UV lys (4.9), og de nedenfor angivne iagttagelser kontrolleres:

a) forekomst af en fluorescerende blå plet af aflatoxin B_1, som hidrører fra den i C anbragte standardopløsning (bevægelse i retning I);

b) forekomst af en fluorescerende blå plet af aflatoxin B_1 (som ikke har reageret med saltsyren) og af en mere intens fluorescerende blå plet af aflatoxin B_1-hemiacetal, som hidrører fra den i B anbragte standardopløsning (bevægelse i retning II);

c) forekomst af pletter, som ligner de under punkt b) beskrevne, hidrørende fra det i A anbragte ekstrakt. Disse pletters beliggenhed defineres ved B_1-aflatoxinets tilbagelagte afstand fra punkt A i retning I (samme afstand, som er tilbagelagt af den i C anbragte standardopløsning) fulgt af den afstand, som er tilbagelagt i retning II af B_1-aflatoxinet (som ikke har reageret med saltsyren) og af aflatoxin B_1-hemiacetalet (samme afstand som den, den i B anbragte standardopløsning har tilbagelagt); fluorescensintensiteten fra de hemiacetalpletter, som hidrører fra ekstrakten og fra den i B anbragte standardopløsning, bør stemme overens.

6. Beregning af resultater

6.1. *På grundlag af visuel måling*

Aflatoxin B_1-indholdet i prøvematerialet i µg/kg (ppb) beregnes efter formlen:

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

hvor:

Y og X er indholdet udtrykt i µl af henholdsvis standardopløsningen af aflatoxin B_1 (3.16) og af ekstrakten, som giver en tilsvarende fluorescensintensitet;

S = koncentrationen i µg af aflatoxin B_1 pr. ml standardopløsning (3.16);

V = ekstraktens slutvolumen i µl, under hensyntagen til eventuelle fortyndinger;

W = prøvens vægt i g svarende til rumfanget af den ekstrakt, som blev oprenset på søjle.

6.2. *På grundlag af fluorodensitometrisk måling*

Aflatoxin B_1-indholdet i µg pr. kg af prøven (ppb) beregnes efter formlen:

▼B

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

hvor:

Y = volumen i µl af den på pladen anbragte ekstrakt (10 eller 20 µl);

S = mængden i ng af aflatoxin B_1 fra den anbragte ekstrakt (under hensyntagen til volumen Y), udledt af bestemmelserne;

V = ekstraktens slutvolumen i µl, under hensyntagen til eventuelle fortyndinger;

W = prøvens vægt i g svarende til rumfanget af den ekstrakt, som blev oprenset på søjle.

7. **Tilberedning af og kontrol med standardopløsning (3.16)**

7.1. *Bestemmelse af aflatoxin B_1 koncentration*

Der tilberedes en standardopløsning af aflatoxin B_1 i chloroform (3.2) eller i benzen/acetonitrilblandingen (3.6) med en koncentration på 8 til 10 µg pr. ml. Absorptions spekret bestemmes mellem 330 og 370 nm ved hjælp af spektrofotometret (4.11).

Lysabsorptionen (A) måles ved 363 nm for chloroformopløsningens vedkommende; ved 348 nm for benzen/acetonitril-blandingen vedkommende.

Aflatoxin B_1-koncentrationen i µg/ml opløsning beregnes ud fra nedenstående formler:

$\frac{312 \cdot A \cdot 1000}{20\,600}$ for chloroform-opløsningen

$\frac{312 \cdot A \cdot 1000}{19\,800}$ for opløsningen i benzen/acetonitril-blandingen.

I dæmpet belysning tilberedes passende fortyndinger til en rbejdsstandardopløsning med en aflatoxin B_1 koncentration på ca 0,1 µg/ml. Ved opbevaring i køleskab ved 4 ºC er denne opløsning holdbar i to uger.

7.2. *Kontrol af den kromatografiske renhed*

På en plade (4.8) anbringes 5 µl af standardopløsningen med 8 — 10 µg aflatoxin B_1 pr. ml (jf. 7.1). Kromatogrammet udvikles som beskrevet under punkt 5.4. Fluorescensen må ved UV-lys kun give anledning til opfattelse af en enkelt plet, og der må ikke opfattes nogen fluorescens i den oprindeligt afsatte prøves område.

8. **Repeterbarhed**

Forskellen mellem resultaterne af to sideløbende bestemmelser udført af den samme person på den samme prøve bør ikke overstige:

— 25 % af det højeste resultat for et aflatoxinindhold på mellem 10 og 20 µg/kg,

— 5 µg i absolut værdi for et indhold på mellem 20 og 50 µg/kg,

— 10 % af det højeste resultat for et indhold på over 50 µg/kg.

9. **Reproducerbarhed**

Se bemærkninger, afsnit C, punkt 2,

▼M2

B. BESTEMMELSE AF AFLATOKSIN B_1. HPLC-METODE

1. **Formål og anvendelsesområde**

I dette forslag beskrives en metode til bestemmelse af aflatoksin B_1 i foderstoffer (også med indhold af citruskvas). Den mindste mængde, der kan bestemmes er 0,001 mg/kg (1 ppb).

▼M2

2. **Princip**

Metoden er baseret på separation ved højtryksvæskekromatografi (HPLC) med fluoressenspåvisning. Prøven ekstraheres med kloroform. Ekstraktet filtreres, og en aliquot del renses over en Florisilkolonne og derefter over en C_{18}-kolonne. Den endelige separation og bestemmelse foretages på en omvendt-fase-C_{18} HPLC-søjle efterfulgt af post column derivatisering med jod i vand samt fluoressensmåling.

Bemærk: Mykotoksiner er meget giftige stoffer. Arbejdet skal udføres i stinkskab. Speciel forsigtighed skal udvises når toksinerne er i tør form på grund af deres tendens til at spredes elektrostatisk på arbejdspladsen.

3. **Reagenser**

3.1. Kloroform, stabiliseret med 0,5-1.0 % (w/w) ethanol. Se bemærkning 10.2.

3.2. Methanol, HPLC-kvalitet til fremstilling af 3.6.

3.3. Acetone.

3.4. Acetonitril, HPLC-kvalitet.

3.5. Elueringsmidler: tilbered et døgn før brug eller fjern luften i opløsningen ved hjælp af ultralyd.

3.5.1. Blanding af acetone (3.3) og vand (98 + 2) (v + v).

3.5.2. Blanding af vand og methanol (3.2) (80 + 20) (v + v).

3.5.3. Blanding af vand og acetone (3.3) (85 + 15) (v + v).

3.6. Mobile fase til HPLC.

Blanding af vand, methanol (3.2) og acetonitril (3.4) (130 + 70 + 40) (v + v + v).

NB: Det kan være nødvendigt at ændre blandingsforholdet for væskerne til den mobile fase afhængig af den benyttede HPLC-søjle.

3.7. Mættet jodopløsning i vand. Tilsæt 2 g jod til 400 ml vand. Bland i mindst 90 minutter og filtrer gennem et membranfilter (4.15). Den mættede opløsning beskyttes mod lys for at undgå fotokemisk nedbrydning.

3.8. Syrevasket celite 545 eller tilsvarende materiale.

3.9. Florisil-kolonne (Waters SEP-PAK) eller tilsvarende materiale.

3.10. C_{18}-kolonne (Waters SEP-PAK) eller tilsvarende materiale.

3.11. Inaktiv luft, f.eks. kvælstof, kloroform.

3.12. Aflatoksin B_1-standardopløsning, koncentration 10 µg/ml.

Koncentrationen kontrolleres som følger: ovennævnte opløsnings absorptionsspektrum bestemmes mellem 330 og 370 nm ved hjælp af spektrofotometret (4.23). Absorbansen (A) måles ved 363 nm. Koncentrationen af aflatoksin B_1 beregnes 1 µg pr. ml opløsning efter formlen:

$$\text{Koncentration } (\grave{e}\text{mg/ml}) = \frac{312 \times A \times 1000}{22\,300} = 13,991 \times A$$

3.12.1. Aflatoksin B_1 stamopløsning i kloroform.

Overfør 2,5 ml af aflatoksin B_1 standardopløsningen (3.12) kvantitativt til en 50 ml målekolbe og fyld op til mærket med kloroform. Denne stamopløsning (0,5 µg/ml) opbevares køligt 40 ºC) i mørke, tæt tillukket og omviklet med aluminiumsfolie.

3.13. Aflatoksin B_1-kalibreringsopløsninger til HPLC.

NB: Der benyttes syrevaskede glasvarer til fremstillingen af disse opløsninger (jf. 4 — apparatur).

3.13.1. Kalibreringsopløsning 4 ng/ml.

Målekolben i alufolien med stamopløsningen (3.12.1) henstår til opvarmning til stuetemperatur (nogle få timer). Overfør 400 µl

▼M2

stamopløsning til en 50 ml målekolbe og inddamp til tørhed i en strøm af inaktiv luft (3.11). Opløs resten i ca. 20 ml vand/acetoneblanding (3.5.3); fyld op til mærket med vand/acetoneblanding (3.5.3) og bland godt.

3.13.2. Kalibreringsopløsning 3 ng/ml.

Fortynd 7,5 ml af kalibreringsopløsningen 4 ng/ml (3.13.1) til 10 ml med vand/acetoneblanding (3.5.3) og bland godt.

3.13.3. Kalibreringsopløsning 2 ng/ml.

Fortynd 25 ml af kalibreringsopløsningen 4 ng/ml (3.13.1) til 50 ml med vand/acetoneblanding (3.5.3) og bland godt. Denne opløsning benyttes også til gentagen injektion ved HPLC-bestemmelsen og er i det følgende benævnt referenceopløsninger.

3.13.4. Kalibreringsopløsning 1 ng/ml.

Fortynd 2,5 ml af kalibreringsopløsningen 4 ng/ml (3.12.1) til 10 ml med vand/acetoneblanding (3.4.3) og blandt godt.

3.14. Ampul med en blanding af aflatoksin B_1, B_2, G_1 i G_2 koncentrationer på henholdsvis ca. 1, 0,5, 1 en 0,5 µg/ml i 1 ml kloroform.

3.14.1. Testopløsning til HPLC.

Overfør ampullens indhold (3.14) til et reagensglas med slib og glasprop eller et glas med skruelåg. Overfør 40 µl af denne opløsning til et reagensglas med slib og glasprop (syrevasket) (4.22). Inddamp kloroformen med inaktiv luft og opløs i 10 ml vand/acetoneblanding (3.5.3).

3.15. Reagenser til verificering (6).

3.15.1. Mættet NaCl-opløsning i vand.

3.15.2. Natriumsulfat, vandfri, granuleret.

4. **Apparatur**

Advarsel: Anvendelse af glasvarer, der ikke er vasket med syre, til vandige aflatoksinopløsninger kan forårsage tab af aflatoksin. Der må udvises særlig omhu med nye glasvarer og engangsglasvarer såsom glas til autosampler og Pasteur-pipetter. Laboratorieglasvarer, der kommer i kontakt med vandige opløsninger af aflatoksin, bør derfor henstå i fortyndet syre (f.eks. svovlsyre, c = 2 mol/l) i flere timer og derefter grundigt skylles med destilleret vand, så alle spor af syre fjernes (f. eks. tre gange; det kontrolleres med pH-papir). Denne behandling er i praksis nødvendig for rundbundede kolber (4.4), målekolber, målecylindre, flasker eller reagensglas, der bruges til kalibreringsopløsninger og slutekstrakter (især glas til autosampler) og Pasteur-pipetter, hvis de bruges til overførsel af kalibreringsopløsninger eller ekstrakter.

4.1. Kværn.

4.2. Sigte med maskevidde 1,0 mm (ISO R 565).

4.3. Mekanisk rysteapparat.

4.4. Vakuumrotationsfordamper med en 150 ml rundbundet kolbe (150-250 ml).

4.5. Højtryksvæskekromatograf, injektor med loop til injektion af 250 µl. Se fabrikantes instruktion for delvis eller fuldstændig loopfyldning.

4.6. HPLC-analysesøjle: 3 µm eller 5 µm C_{18}-søjlemateriale.

4.7. Pulseringsfri pumpe til eftersøjle-jodreagens, f.eks. HPLC-pumpe eller en pumpe, der er specielt konstrueret til dette formål.

4.8. Dødvolumenfrit T-stykke (Valco), af rustfrit stål (1/16″ × 0,75 mm).

4.9. Spiralreaktionskolonne af teflon eller rustfrit stål. Dimensioner på 3 000 × 0,5 mm til 5 000 × 0,5 mm er erfaringsvis velegnede i forbindelse med 5 µm eller 3 µm HPLC-søjler.

4.10. Termostatstyret vandbad indstillet på 60 ºC. Temperaturen skal kunne reguleres med under 0,1 ºC nøjagtighed.

4.11. Fluoressensdetektor med ca. 365 nm excitations bølgelængde og ca. 435 nm emissionsbølgelængde (for filterinstrument: emissionsbølgelængde: > 400 nm). Påvisning af mindst 0,05 ng aflatoksin B_1 skal være mulig. Undertiden kan et vist modtryk være ønskeligt

▼M2

(f.eks. restriktor eller spole af teflon eller rustfri stålkolonne forbundet med detektorens udgang) for at forhindre luftbobler i gennemløbskuvetten.

4.12. Skriver.

4.13. Integrator (eventuelt).

4.14. Foldefilter. Macherey-Nagel 617 ¼, diameter 24 cm eller tilsvarende filter.

4.15. Membranfilter med porestørrelse på 0,45 µm, Millipore HAWP 04700 eller lignende.

4.16. 500 ml konisk kolbe med slib og glasprop.

4.17. Glassøjle (indvendig diameter ca. 1,0 cm, længde ca. 30 cm) med Luer-endestykke.

4.18. Kloroformresistent Luer-hane af nylon (f.eks. Bio-Rad 7328017, Analytichem A1 6078 eller J.T. Baker 4514 eller lignende).

4.19. Kemisk resistent sprøjte, 10 ml Luer-forbindelse.

4.20. Sprøjte til påsætning af 250 µl (se 4.5).

4.21. 100 µl mikrosprøjte (det kontrolleres ved vejning, af nøjagtigheden er inden for 2 %).

4.22. 10 ml målereagensglas med slib og glasprop.

4.23. Spektrofotometer til måling i spektrets UV-område.

4.24. Udstyr til verificering (6).

4.24.1. Syrevasket 100 ml skilletragt med teflonhane.

4.24.2. Varmeblok 40-50 ºC.

5. **Fremgangsmåde**

5.1. *Fremstilling af prøven*

Prøven formales, så den passerer fuldstændigt gennem sigten (4.2).

5.2. *Analyseprøven*

50,0 g af den fremstillede prøve afvejes i kolben (4.16).

5.3. *Ekstraktion*

Tilsæt 25 g Celite (3.8), 250 ml kloroform (3.1) og 25 ml vand til analyseprøven (5.2). Tilluk og ryst i 30 minutter på et mekanisk rysteapparat (4.3). Filtrer gennem et foldefilter (4.14) og opsaml 50 ml af filtratet. Med hensyn til prøver, der kræver fortynding, udtages en aliquot del af filtratet, der fortyndes til 50 ml med kloroform, så koncentrationen af aflatoksin B_1 ikke er større end 4 ng/ml.

5.4. *Oprensning*

Processen bør foretages uden nævneværdige afbrydelser.

Bemærk:

— det laboratorium, hvor analysen foretages, skal være beskyttet mod dagslys; det kan ske ved:

  1) UV-absorberende folie på vinduerne kombineret med dæmpet belysning (ikke direkte sollys!)

  2) gardiner eller persienner i forbindelse med kunstigt belysning (lysstofrør kan benyttes)

— aflatoksinholdige opløsninger skal i videst muligt omfang beskyttes mod lys (opbevaring i mørke og brug af alufolie).

5.4.1. Florisil SEP-PAK oprensning

5.4.1.1. Forberedelse af kombinationen søjle og kolonne

Der anbringes en hane (4.18) på den korte ende af Florisil-kolonnen (3.9) (se fig. 1). Vask kolonnen og fjern luften således: 8 ml ud af 10 ml kloroform presses via hanen gennem kolonnen med en sprøjte (4.19). Den lange ende af kolonnen forbindes med en glassøjle (4.17), og de resterende 2 ml kloroform presses gennem kolonnen op i søjlen. Hanen lukkes og sprøjten fjernes.

▼**M2**

5.4.1.2. Oprensning

Det i 5.3 opsamlede filtrat påsættes søjle/kolonnekombinationen ved hjælp af tyngdekraften. Der skylles med 5 ml kloroform (3.1) og derefter med 20 ml methanol (3.2). Eluaterne kasseres. Det må under dette arbejde sikres, at søjle/kolonnekombinationen ikke løber tør. Eluer aflatoksin B_1 med 40 ml af acetone/vandblandingen (3.5.1) og opsaml hele eluatet i den rundbundede (150 ml) kolbe til rotationsfordamperen (4.4). Eluatet koncentreres på rotationsfordamperen ved 40-50 ºC, indtil der ikke længere destilleres acetone (*NB:* ca. 0,5 ml af væsken er på dette punkt tilbage i kolben. Forsøg har vist, at videre fordampning ikke er skadelig, og at når der er 0,5 ml væske tilbage, er der ingen signifikant acetonemængde tilbage. Acetonerester kan medføre tab af aflatoksin B_1 på C_{18}-kolonne.) Der tilsættes 1 ml methanol (3.2), og kolben skylles, så aflatoksin B_1 bliver opløst på siderne, hvorefter der tilsættes 4 ml H_2O. Kolonnen aftages og kasseres. Glassøjlen skylles med vand og gemmes til C_{18}-oprensningsprocessen.

5.4.2. C_{18}-SEP-PAK oprensning

5.4.2.1. Forberedelse af kombinationen søjle og SEP-PAK kolonne

Der anbringes en stophane (4.18) på den korte end af C_{18}-kolonnen (3.10) (se fig. 1). Skyl kolonnen og fjern luft således: 10 ml methanol (3.2) presses hurtigt via hanen gennem kolonnen med en sprøjte (4.19) (luftbobler i patronen er synlige som lyse pletter på en ellers grålig baggrund). Fra sprøjten med 10 ml vand presses 8 ml heraf via hanen op gennem kolonnen (luftindtrængning i kolonnen skal undgås ved overgangen fra methanol til vand). Den lange ende af kolonnen forbindes med en glassøjle, og de resterende 2 ml vand presses op i søjlen gennem kolonnen. Hanen lukkes og sprøjten fjernes.

5.4.2.2. Oprensning

Det i 5.4.1.2 opsamlede ekstrakt overføres kvantitativt til søjlen (4.17) idet kolben skylles to gange med 5 ml vand/methanolblanding (3.5.2) og væsken elueres ved hjælp af tyngdekraften. Det må under dette arbejde sikres, at søjle/kolonnekombinationen ikke løber tør. (Hvis der opstår luftbobler i forsnævringen ved kolonnen, afbrydes elueringen, og der bankes let på toppen af glassøjlen for at fjerne luftboblerne, hvorefter oprensningen fortsættes.) Der elueres med 25 ml vand/methanolblanding. Eluaterne kasseres. Aflatoksin B_1 elueres med 50 ml vand/acetoneblanding (3.5.3), og hele eluatet opsamles i en 50 ml målekolbe. Der fyldes op med vand til 50 ml og blandes. Den herved opnåede opløsning benyttes til kromatografi (5.5).

Bemærk: Det er normalt ikke nødvendigt at filtrere det endelige ekstrakt inden HPLC. Hvis det findes nøvendigt, må der ikke benyttes cellulosefiltre, da de kan medføre tab af aflatoksin B_1. Teflonfiltre kan bruges.

5.5. *Højtryksvæskekromatografi (HPLC)*

(Med hensyn til opstilling af udstyret henvises til fig. 2.) Der skal beregnes tilstrækkelig tid til, at instrumenterne bliver opvarmet og stabiliseret.

Bem. 1:

Flow-hastighederne for HPLC-væskerne og post column reagenser er kun vejledende. Det kan være nødvendigt at justere dem alt efter HPLC-søjlens type og størrelse.

Bem. 2:

Aflatoksins topareal er temperaturafhængig, og der må derfor korrigeres for afvigelser (se fig. 3). Ved injektion af en bestemt mængde aflatoksin B_1-referenceopløsning (3.12.3) med regelmæssige intervaller (f.eks. ved hver tredje injektion) kan topværdierne for aflatoksin B_1 mellem disse referenceopløsninger korrigeres ved hjælp af middelværdien, forudsat at forskellen mellem reaktionerne mellem to på hinanden følgende injektioner er meget lille (< 10 %). Injektionerne skal derfor foretages kontinuerligt. Hvis en afbrydelse er nødvendig, er det den sidste injektion før stoppet og den første injektion efter stoppet, der er referenceopløsning (3.13.3). Da kalibreringskurven er lineær og passerer gennem nulpunktet, bestemmes aflatoksin B_1-mængden i prøveekstrakterne direkte ved reference til de nærmestliggende standardopløsninger.

▼M2

5.5.1. Indstilling af HPLC-pumpe

HPLC-pumpen (4.5) indstilles, så den giver et flow på 0,5 eller 0,3 ml/min. til henholdsvis en 5 µm eller en 3 µm HPLC-søjle (4.6); idet den mobile fase (3.6) benyttes.

5.5.2. Indstilling af post column pumpen

Pumpen (4.7) indstilles til at give et flow på 0,2-0,4 ml/min. af den jodmættede vandopløsning (3.7). Som en grov retningslinje kan der tilrådes flow på ca. 0,4 eller 0,2 ml/min. i kombinationer med flow på henholdsvis 0,5 og 0,3 ml/min. af den mobile fase (3.6).

5.5.3. Fluoressensdetektor

Fluoressensdetektoren (4.11) indstilles til excitationsbølgelængden 365 nm og emissionsbølgelængden 435 nm (filterinstrument: > 400 nm). Attenueringen indstilles således, at 1 ng aflatoksin B_1 giver ca. 80 % af fuldt udslag på skriveren.

5.5.4. Prøvepåsætter

Der påsættes mængder på 250 µl af alle opløsninger. Følg brugsanvisningen til injektoren.

5.5.5. Kontrol af den kromatografiske separation

Der påsættes en kromatografisk testopløsning (3.14.1). Dalene skal være mindre end 5 % af summen af tophøjderne i de nærmestliggende topområder.

5.5.6. Kontrol af apparaturets stabilitet

Inden hver analyserække påsættes referenceopløsningen (3.13.3) gentagne gange, indtil der er opnået stabile toparealer. (*NB:* arealerne af aflatoksin B_1 toppene i på hinanden følgende injektioner bør ikke afvige indbyrdes med mere end 6 %.) Derefter fortsættes straks med kontrol af lineariteten.

5.5.7. Kontrol af lineariteten

Der påsættes aflatoksin B_1-kalibreringsopløsninger (3.13.1 til 3.13.4). For hver tredje injektion anvendes referenceopløsningen (3.13.3) til korrektion af ændringer i reaktion (*NB:* Arealerne af toppene af referenceopløsning må højst afvige med 10 % i løbet af 90 minutter). Der korrigeres for afvigelser efter formlen i punkt 7. Kalibreringskurven bør være lineær og passere gennem nulpunktet med en afvigelse på højst to gange standardafvigelse på Y-værdien. De fundne værdier skal afvige med under 3 % fra de nominelle værdier. Hvis disse krav er opfyldt, fortsættes der umiddelbart. I modsat fald identificeres og korrigeres fejlkilderne først.

5.5.8. Injektion af prøveekstrakter

De oprensede prøveekstrakter (5.4.2.2) påsættes. Hver gang der påsættes to prøveekstrakter, påsættes der referenceopløsning (3.12.3), dvs.: referenceopløsning, ekstrakt, ekstrakt, referenceopløsning, ekstrakt, ekstrakt, referenceopløsning osv.

6. **Verificering og identitet**

6.1. *Behandling af ekstraktet (5.4.2.2)*

Der tilsættes 5 ml NaCl-opløsning (3.15.1) til slutekstraktet fra 5.4.2.2. Der ekstraheres tre gange i 1 minut med 2 ml kloroform (3.1) med brug af skilletragten (4.24.1). Det opsamlede kloroformekstrakt hældes igennem ca. 1 g natriumsulfat (3.15.2) over i et 10 ml reagensglas. Der kan bruges en lille tragt (diameter 4 cm) med lidt bomuld i forsnævringen, der dækkes med ca. 1 g natriumsulfat (3.14.2).

Natriumsulfatlaget vaskes med nogle få ml kloroform og opsamles i reagensglasset. Kloroformekstraktet inddampes til tørhed i reagensglasset ved brug af varmeblokken (4.24.2) og opløses derefter igen i 1 ml kloroform.

6.2. *Fremstilling af derivater og tyndtlagskromatografi*

Jf. Rådets direktiv 76/372/EØF, bilaget, metode A, punkt 5.6.2.

▼M2

7. **Beregning af resultater**

Prøvens indhold af aflatoksin B_1 µg/kg beregnes efter nedenstående formel:

$$\text{Indhold af } B_1 \text{ i èmg/kg} = \frac{m \times V_{ext}}{V_m \times M \times \frac{V_f}{V_c}}$$

hvor:

m = mængden af aflatoksin B_1 i ng som B_1-top i prøven beregnet som følger:

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

P(prøve) = toparealet for aflatoksin B_1 i prøven

$P(st_1)$ = toparealet for aflatoksin B_1 i den forudgående påsætning af referenceopløsning (3.13.3)

$P(st_2)$ = toparealet for aflatoksin B_1 i den efterfølgende påsætning af referenceopløsning (3.13.3)

r(st) = den påsatte mængde referenceopløsning B_1 (3.13.3) i ng

V_m = mængden af den påsatte prøveekstrakt i ml; der tages høje for eventuel fortynding under 5.3

V_{ext} = den endelige mængde prøveekstrakt i ml

M = prøvens vægt i g

V_f = mængden af filtrat i ml overført til Florisil-kolonnen (5.4.1.2)

V_c = mængden af kloroform i ml, der er anvendt til ekstrahering af prøven.

Hvis proceduren i denne forskrift følges, kan formlen forkortes til:

Indhold af aflatoksin B_1 i µg/kg = 20 × m

7.1. Resultaterne kan også beregnes ved måling af tophøjderne.

8. **Reperterbarhed**

Jf. punkt 10.1 (bemærkninger).

9. **Reproducerbarhed**

Jf. punkt 10.1.

10. **Bemærkninger**

10.1. *Præcision*

En sammenlignende undersøgelse ([1]) af foderblandinger gennemført på internationalt plan gav de i tabel 1 anførte resultater for repeterbarhed og reproducerbarhed. Begrebet reperterbarhed (r), som det er anvendt her, defineres som det største forhold mellem to aflæsninger af samme prøve udført på samme laboratorium under samme betingelser, som ikke er signifikant på 95 % sandsynlighedsniveau. Begrebet reproducerbarhed (R) defineres på tilsvarende måde, når der er to forskellige laboratorier der sammenlignes, ifølge ISO 3534 - 1977, 2.35 ([2]) og Kommissionens beslutning 89/610/EØF ([3]). I tabel 1 er r og R også angivet som variationskoefficienter.

([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]) EFT nr. L L 351 af 2. 12. 1989, s. 39.

▼**M2**

Tabel 1

Reperterbarhed (r) og reproducerbarhed (R) udtrykt som forholdstal og de tilsvarende variationskoefficienter

(15 laboratorier).

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

(*) CV = variationskoefficient.

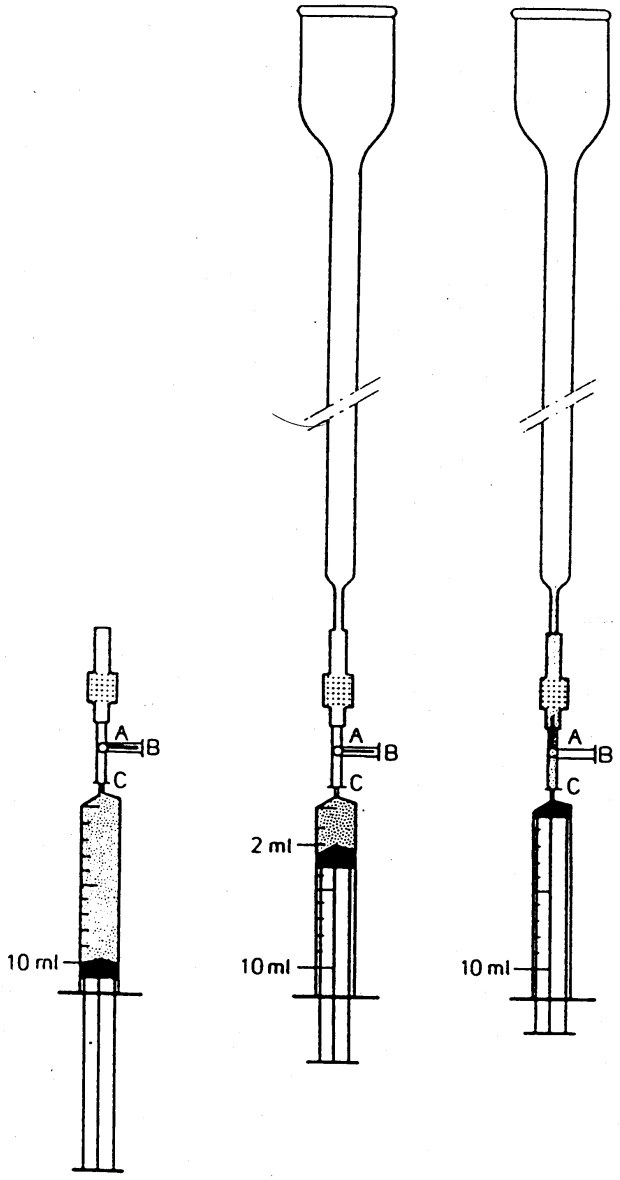
10.2. *Stabilisering af kloroform*

Absorptionsevnen af florisilkolonnen kan ændres, hvis der bruges anden stabilisator end ethanol til kloroform. Dette skal kontrolleres i henhold til 10.3, hvis den foreskrevne kloroform ikke kan skaffes.

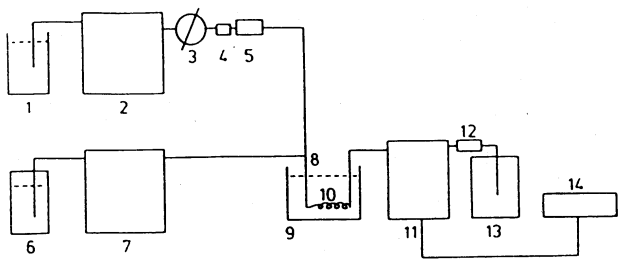
10.3. *Nøjagtighed*

Det efterprøves, om metoden udføres rigtigt, ved gentagne målinger på certificeret referencemateriale. Hvis sådant materiale ikke forefindes, bør metodens effektivitet afprøves ved genfindingsforsøg på blindprøver. Middelværdien må ikke afvige fra den sande værdi med fra under 20 % til over 10 %.

▼M2



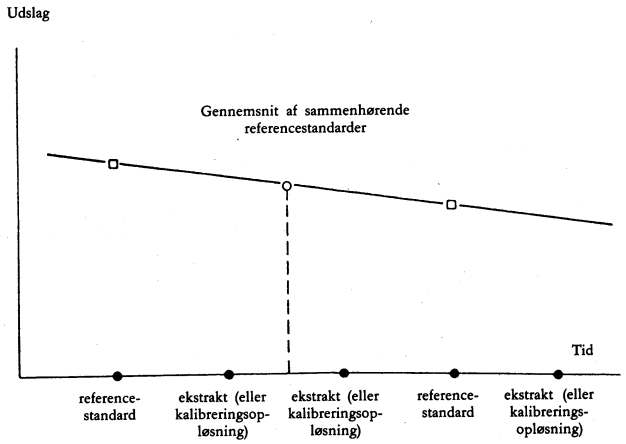
Figur 1: Kombination af søjle og kolonne



1. Mobil fase
2. Pumpe
3. Prøvepåsætter
4. Forkolonne
5. HPLC-kolonne
6. Mættet jodopløsning
7. Pumpe til jodreagens
8. T-stykke
9. Termostatstyret bad
10. Spiralkolonne
11. Fluoressensdetektor
12. Restriktor
13. Spild
14. Skriver henholdsvis integrator

Figur 2: Flowdiagram for HPLC-systemet til post column derivatisering med jod

▼**M2**



Figur 3: Kompensation for ændring for afvigelse i aflatoksin B_1-udslag ved påsætning af referenceopløsning med regelmæssige intervaller (3.13.3).

▼**M3**

C. BEMÆRKNINGER VEDRØRENDE FREMGANGSMÅDE A OG B

1. **Affedtning**

Prøver, der indeholder mere end 5 % fedt, skal affedtes med let petroleum (kogepunkt 40 til 60º C) efter den under 5.1 angivne tilberedning.

I så fald skal analyseresultaterne udtrykkes som vægten af den ikke-affedtede prøve.

2. **Reproducerbarhed af resultaterne efter metode A**

Resultaternes reproducerbarhed, dvs. variationer mellem resultater opnået af to eller flere laboratorier på den samme prøve, skønnes at være:

± 50 % af gennemsnittet for gennemsnitværdier af aflatoxin B_1 mellem 10 og 20 µg/kg

± 10 µg/kg af gennemsnittet for gennemsnitsværdier større end 20 og op til 50 µg/kg

± 20 % af gennemsnittet for gennemsnitsværdier og 50 µg/kg.

▼B

BILAG

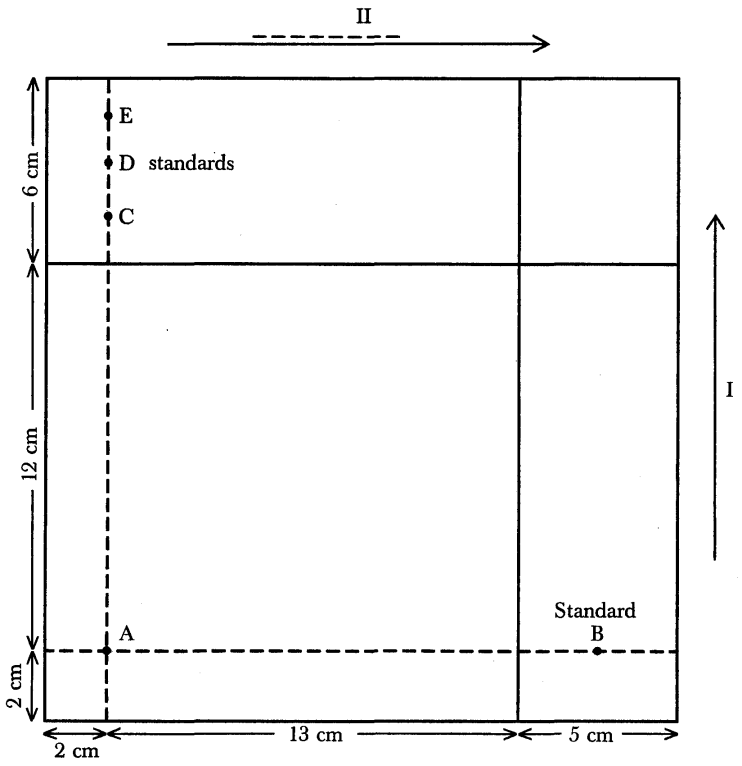


Fig. 1

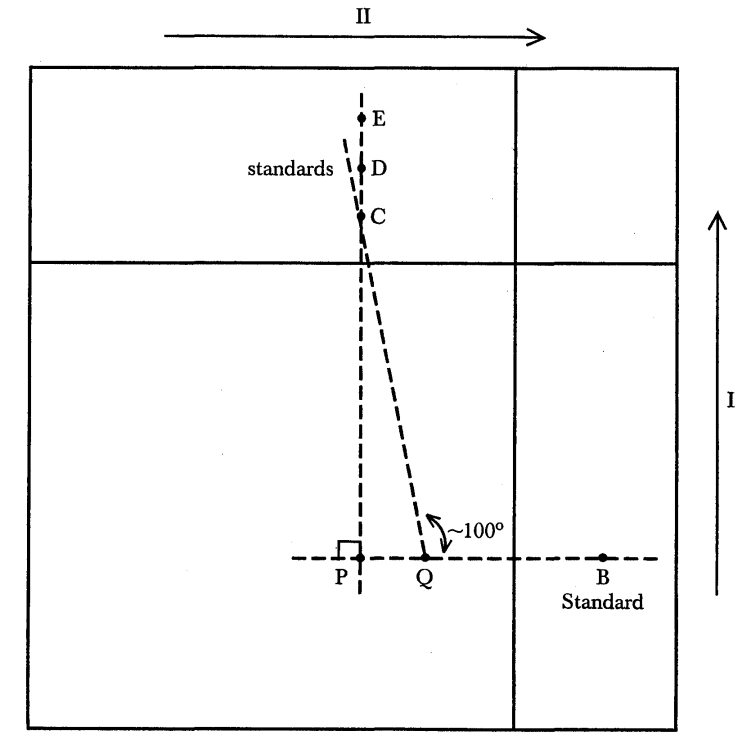


Fig. 2

▼B

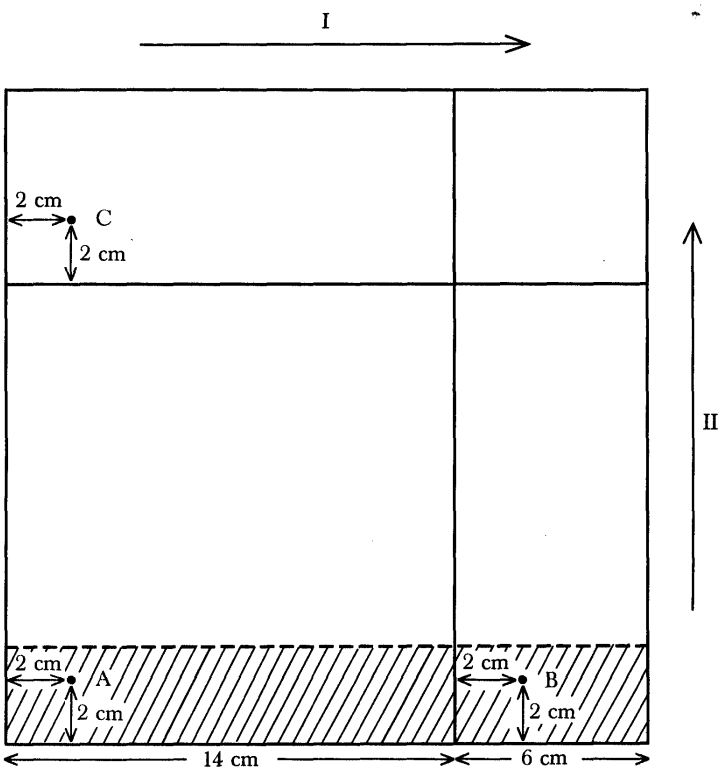


Fig. 3