Dieses Dokument ist lediglich eine Dokumentationsquelle, für deren Richtigkeit die Organe der Gemeinschaften keine Gewähr übernehmen

►**B**

SIEBTE RICHTLINIE DER KOMMISSION

vom 1. März 1976

zur Festlegung gemeinschaftlicher Analysemethoden für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln

(76/372/EWG)

(ABl. L 102 vom 15.4.1976, S. 8)

Geändert durch:

		Amtsblatt		
		Nr.	Seite	Datum
►**M1**	Richtlinie 81/680/EWG der Kommission vom 30. Juli 1981	L 246	32	29.8.1981
►**M2**	Richtlinie 92/95/EWG der Kommission vom 9. November 1992	L 327	54	13.11.1992
►**M3**	Richtlinie 94/14/EG der Kommission vom 29. März 1994	L 94	30	13.4.1994

▼B

SIEBTE RICHTLINIE DER KOMMISSION

vom 1. März 1976

zur Festlegung gemeinschaftlicher Analysemethoden für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln

(76/372/EWG)

DIE KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN —

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen Wirtschaftsgemeinschaft,

gestützt auf die Richtlinie des Rates vom 20. Juli 1970 über die Einführung gemeinschaftlicher Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln [1], zuletzt geändert durch die Beitrittsakte [2], insbesondere auf Artikel 2,

in Erwägung nachstehender Gründe:

Die obengenannte Richtlinie bestimmt, daß die amtlichen Untersuchungen von Futtermitteln zur Feststellung, ob die auf Grund der Rechts- oder Verwaltungsvorschriften festgelegten Anforderungen hinsichtlich Beschaffenheit und Zusammensetzung der Futtermittel erfüllt sind, nach gemeinschaftlichen Probenahmeverfahren und Analysemethoden durchgeführt werden.

Die Richtlinien 71/250/EWG, 71/393/EWG, 72/199/EWG, 73/46/EWG, 74/203/EWG und 75/84/EWG der Kommission vom 15. Juni 1971 [3], vom 18. November 1971 [4], vom 27. April 1972 [5], vom 5. Dezember 1972 [6], vom 25. März 1974 [7] und vom 20. Dezember 1974 [8] haben bereits eine Reihe von Analysemethoden festgelegt. Der Stand der seitdem durchgeführten Arbeiten ermöglicht es nunmehr, eine siebente Reihe von Analysemethoden festzulegen.

Die in dieser Richtlinie vorgesehenen Maßnahmen entsprechen der Stellungnahme des Ständigen Futtermittelausschusses —

HAT FOLGENDE RICHTLINIE ERLASSEN:

Artikel 1

Die Mitgliedstaaten schreiben vor, daß die Analysen für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln auf ihren Gehalt an Aflatoxin B_1 nach den in der Anlage zu dieser Richtlinie beschriebenen Methoden durchgeführt werden.

▼M1

▼B

Artikel 2

Die Mitgliedstaaten setzen spätestens zum 1. Oktober 1976 die erforderlichen Rechts- oder Verwaltungsvorschriften in Kraft, um den Bestimmungen dieser Richtlinie nachzukommen. Sie setzen die Kommission unverzüglich hiervon in Kenntnis.

Artikel 3

Diese Richtlinie ist an alle Mitgliedstaaten gerichtet.

---

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

▼B

ANLAGE

BESTIMMUNG VON AFLATOXIN B_1

A. METHODE MIT EINDIMENSIONALER DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE

▼M2

1. **Zweck und Anwendungsbereich**

Die Methode erlaubt die Bestimmung des Gehalts an Aflatoxin B_1 in Rohstoffen und Einzelfuttermitteln. Diese Methode kann nicht angewendet werden, wenn Citrustrester vorhanden ist. Die untere Grenze der Bestimmbarkeit beträgt 0,01 mg/kg (10 ppb).

Wenn Störsubstanzen vorhanden sind, welche die Auswertung erschweren, muß die Analyse nach der Methode B (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) wiederholt werden.

▼B

2. **Prinzip**

Die Probe wird mit Chloroform extrahiert. Der Extrakt wird filtriert und ein aliquoter Teil durch Chromatographie an einer Kieselgelsäule gereinigt. Das Eluat wird eingedampft und der Rückstand in einer definierten Menge Chloroform oder Benzol-Acetonitrilgemisch gelöst. Ein aliquoter Teil dieser Lösung wird dünnschichtchromatographisch untersucht. Die Aflatoxin-B_1-Menge wird im UV-Licht visuell oder fluorodensitometrisch im Vergleich zu bekannten Mengen Aflatoxin-B_1-Standard ermittelt. Die Identität von Aflatoxin B_1 im Futtermittelextrakt muß durch das angegebene Verfahren bestätigt werden.

3. **Reagenzien**

Anmerkung: Wenn nichts anderes angegeben ist, sind Reagenzien von „p.a."-Qualität zu verwenden.

3.1. Aceton

3.2. Chloroform, mit 0,5 bis 1,0 % Äthanol 96 % ig (V/V) stabilisiert

3.3. n-Hexan

3.4. Methanol

3.5. Diäthyläther, wasserfrei, peroxidfrei

3.6. Benzol-Acetonitril-Gemisch 98:2 (V/V)

3.7. Mischung aus Chloroform (3.2) und Methanol (3.4) 97:3 (V/V)

3.8. Kieselgel für Säulenchromatographie, 0,05 bis 0,20 mm Teilchengröße

3.9. Watte, hydrophil und mit Chloroform entfettet, oder Glaswolle

3.10. Natriumsulfat, wasserfrei, gekörnt

3.11. Inertgas, z.B. Stickstoff

3.12. 1 N-Salzsäure

3.13. Schwefelsäure 50 % (V/V)

3.14. Kieselgur (Hyflosupercel), mit Säure gewaschen

3.15. Kieselgel G-HR oder gleichwertiges für Dünnschichtchromatographie

3.16. Standardlösung mit etwa 0,1 µg Aflatoxin B_1 je ml in Chloroform (3.2) oder in Benzol-Acetonitril-Gemisch (3.6), hergestellt und kontrolliert nach Punkt 7.

3.17. Qualitative Standardlösung mit etwa 0,1 µg Aflatoxin B_1 und B_2 je ml in Chloroform (3.2) oder Benzol-Acetonitril-Gemisch (3.6). Diese Konzentrationen sind als Anhaltspunkte gegeben. Sie sind, entsprechend dem unterschiedlichen Fluoreszenzvermögen, so zu wählen, daß sich für beide Aflatoxine dieselbe Fluoreszenzintensität ergibt.

3.18. Fließmittel:

▼B

3.18.1. Mischung aus Chloroform (3.2) und Aceton (3.1) 9:1 (V/V). Trennkammer mit nicht gesättigter Atmosphäre

3.18.2. Mischung aus Diäthyläther (3.5), Methanol (3.4) und Wasser 96:3:1 (V/V/V). Trennkammer mit nicht gesättigter Atmosphäre

3.18.3. Mischung aus Diäthyläther (3.5), Methanol (3.4) und Wasser 94:4,5:1,5 (V/V/V). Trennkammer mit gesättigter Atmosphäre

3.18.4. Mischung aus Chloroform (3.2) und Methanol (3.4) 94:6 (V/V). Trennkammer mit gesättigter Atmosphäre.

3.18.5. Mischung aus Chloroform (3.2) und Methanol (3.4) 97:3 (V/V). Trennkammer mit gesättigter Atmosphäre

4. **Geräte**

4.1. Mahl- und Mischgerät

4.2. Schüttelmaschine oder Magnetrührer

4.3. Faltenfilter, Schleicher & Schüll Nr. 588 oder gleichwertige Filter, Durchmesser 24 cm

4.4. Chromatographierohr aus Glas, (innerer Durchmesser 22 mm, Länge 300 mm), mit Teflonhahn und 250-ml-Vorratsbehälter

4.5. Vacuumrotationsverdampfer mit 500-ml-Rundkolben

4.6. 500-ml-Erlenmeyerkolben mit Schliffstopfen

4.7. Ausrüstung für Dünnschicht-Chromatographie

4.8. Glasplatten für Dünnschicht-Chromatographie, 200 × 200 mm. Sie werden wie folgt vorbereitet (die angegebenen Mengen reichen für fünf Platten): 30 g Kieselgel G-HR (3.15) werden in einem Erlenmeyerkolben mit 60 ml destilliertem Wasser versetzt, der Kolben wird verschlossen und eine Minute geschüttelt. Die Suspension wird in einer einheitlichen Schichtdicke von 0,25 mm auf die Platten aufgetragen. Man läßt die Platten an der Luft trocknen und bewahrt sie dann im Exsikkator über Kieselgel als Trocknungsmittel auf. Vor Verwendung werden sie eine Stunde im Trockenschrank bei 110 ºC aktiviert.

Fertigplatten können verwendet werden, sofern sie einen ähnlichen Trenneffekt ergeben wie die in der oben beschriebenen Weise hergestellten.

4.9. Analysenlampe für langwelligen UV-Bereich (360 nm). Die Lichtintensität muß ausreichen, um einen Aflatoxin-B_1-Fleck von 1,0 ng auf einer Dünnschichtplatte in 10 cm Entfernung von der Lampe noch deutlich zu erkennen.

4.10. 10-ml-Reagenzgläser, graduiert, mit Schliff und Polyäthylenstopfen

4.11. UV-Spektralphotometer

4.12. Fluorodensitometer (wahlweise)

5. **Ausführung**

5.1. *Vorbereitung der Probe (siehe unter Bemerkungen, Teil C, Punkt 1)*

Die Probe wird gemahlen, so daß sie vollständig durch ein 1-mm-Sieb (gem. ISO-Empfehlung R 565) hindurchgeht.

5.2. *Extraktion*

50,0 g der gemahlenen und homogenisierten Probe werden in einen 500 ml-Erlenmeyerkolben (4.6) eingewogen, man fügt 25 g Kieselgur (3.14), 25 ml Wasser und 250 ml Chloroform (3.2) hinzu. Der Kolben wird verschlossen und 30 Minuten mit dem Gerät (4.2) geschüttelt bzw. gerührt. Anschließend filtriert man durch ein Faltenfilter (4.3), die ersten 10 ml des Filtrats werden verworfen, die nächsten 50 ml aufgefangen.

5.3. *Säulenchromatographische Reinigung*

Das untere Ende des Chromatographie-Rohrs (4.4) wird mit einem Watte- oder Glaswollepfropfen (3.9) versehen, das Rohr zu etwa zwei Dritteln mit Chloroform (3.2) gefüllt, dann fügt man 5 g Natriumsulfat (3.10) hinzu, wobei darauf zu achten ist, daß die Natriumsulfatschicht eine ebene Fläche bildet. Anschließend gibt man 10 g Kieselgel (3.8) in kleinen Portionen hinzu. Nach jeder

▼B

Zugabe ist vorsichtig zu rühren, um Luftblasen zu entfernen. Man läßt das Kieselgel 15 Minuten absetzen und fügt dann vorsichtig 15 g Natriumsulfat (3.10) hinzu. Man läßt dann die Flüssigkeit bis unmittelbar an die Oberfläche des Natriumsulfats ablaufen.

50 ml des nach 5.2 erhaltenen Filtrats werden mit 100 ml n-Hexan (3.3) gemischt. Man gibt die Mischung quantitativ auf die. Säule und läßt die Flüssigkeit bis zur Oberfläche des Natriumsulfats einsickern. Anschließend fügt man 100 ml Diäthyläther (3.5) hinzu und läßt die Flüssigkeit wieder bis zur Oberfläche des Natriumsulfats einsickern. Die Durchflußgeschwindigkeit soll 8 bis 12 ml/Minute betragen, ein Trockenlaufen der Säule ist zu vermeiden. Der Durchlauf wird verworfen. Man eluiert danach mit 150 ml Chloroform-Methanol-Gemisch (3.7), wobei das gesamte Eluat aufgefangen wird.

Das Eluat wird im Vakuumrotationsverdampfer (4.5) bei einer Temperatur von weniger als 50º C unter einem inerten Gasstrom (3.11) bis fast zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird mit Chloroform (3.2) oder Benzol-Acetonitril-Gemisch (3.6) quantitativ in ein 10-ml-Reagenzglas (4.10) überführt, die Lösung im inerten Gasstrom (3.11) eingeengt und anschließend mit Chloroform (3.2) oder Benzol-Acetonitril-Gemisch (3.6) auf ein Volumen von 2,0 ml aufgefüllt.

5.4. *Dünnschicht-Chromatographie*

Auf einer Dünnschicht-Platte (4.8) werden 2 cm vom unteren Rand entfernt nebeneinander im Abstand von 2 cm folgende Mengen der Standardlösung und des Extraktes punktförmig aufgetragen:

— 10, 15, 20, 30 und 40 µl der Aflatoxin-B_1-Standardlösung (3.16);

— 10 µl des nach 5.3 gewonnenen Extrakts und 20 µl der Standardlösung (3.16) *übereinander auf denselben Punkt;*

— 10 und 20 µl des nach 5.3 gewonnenen Extrakts.

Die Platte wird vor Licht geschützt, mit einem der Fließmittel (3.18) entwickelt. Zur Auswahl eines geeigneten Fließmittels trägt man vorher 25 µl der qualitativen Standardlösung (3.17) auf eine der Platten auf und prüft, ob bei der Entwicklung eine vollständige Trennung der Aflatoxine B_1 und B_2 erreicht wird.

Man läßt das Fließmittel im Dunkeln verdampfen und betrachtet dann die Platte im UV-Licht in 10 cm Abstand von der Lampe (4.9). Die Flecke von Aflatoxin B_1 weisen eine blaue Fluoreszenz auf.

5.5. *Quantitative Bestimmung*

Die Bestimmung ist entweder visuell oder durch Fluorodensitometrie, wie nachstehend beschrieben, vorzunehmen.

5.5.1. Visuelle Bestimmung

Die im Extrakt enthaltene Menge Aflatoxin B_1 wird bestimmt, indem man die Fluoreszenzintensität der Flecke des Extrakts mit denen der Standardlösung vergleicht. Falls erforderlich, ist zu interpolieren. Die durch Übereinanderauftragen von Extrakt und Standardlösung erzielte Fluoreszenzintensität muß stärker sein als die von 10 µl des Extrakts und es darf nur ein einziger Fleck erkennbar sein. Ist die Fluoreszenz-Intensität von 10 µl Extrakt stärker als die von 40-µl-Standardlösung, so ist der Extrakt auf das 10- oder 100fache mit Chloroform (3.2) oder Benzol-Acetonitril-Gemisch (3.6) zu verdünnen und erneut in der beschriebenen Weise auf eine Dünnschichtplatte aufzutragen.

5.5.2. Durch Fluorodensitometrische Messung

Die Fluoreszenzintensität der Aflatoxin-B_1-Flecke wird mit Hilfe des Fluorodensitometers (4.12) bei 443 nm gemessen bei einer Anregung mit 365 nm. Durch Vergleich der Fluoreszenzintensitäten von Extrakt- und Standardflecken bestimmt man die in den Extrakt-Flecken enthaltene Menge von Aflatoxin B_1.

5.6. *Identifizierung von Aflatoxin B_1*

Die Identifizierung von Aflatoxin B_1 im Extrakt erfolgt durch nachstehend beschriebene Verfahren.

▼B

5.6.1. Behandlung mit Schwefelsäure

Das nach 5.4 erhaltene Chromatogramm wird mit Schwefelsäure (3.13) besprüht. Die Fluoreszenz der Aflatoxin-B_1-Flecke muß im UV-Licht von blau nach gelb umschlagen.

5.6.2. Zweidimensionale Chromatographie mit Bildung von Aflatoxin B_1-hemiacetal (Aflatoxin B_{2a})

Anmerkung: Die nachfolgend beschriebenen Arbeitsgänge müssen genau nach der in Abbildung 3 wiedergegebenen Skizze durchgeführt werden.

5.6.2.1. Auftragen der Lösungen

In eine Platte (4.8) werden, parallel zu zwei angrenzenden Seiten (jeweils 6 cm vom Rand entfernt), zwei gerade Linien als Bregrenzung für die Lösungsmittelfronten geritzt. Auf die Platte trägt man mit Hilfe einer Kapillarpipette oder einer Mikrolitерspritze folgende Lösungen auf

— *bei Punkt A:* Ein Volumen des nach 5.3 erhaltenen gereinigten Probenextraktes, das etwa 2,5 Nanogramm Aflatoxin B_1 enthält;

— *bei Punkt B und C:* Jeweils 25 µl der Standardlösung (3.16).

5.6.2.2. Entwicklung

Das Chromatogramm wird mit dem Fließmittel (3.18.1) (1-cm-Schicht in einer Trennkammer mit nicht gesättigter Atmosphäre) im Dunkeln in Richtung I entwickelt bis die Lösungsmittelfront die Begrenzungslinie erreicht. Man nimmt danach die Platte aus der Trennkammer und läßt sie im Dunkeln fünf Minuten bei Raumtemperatur trocknen. Während man den Rest der Platte mit einer Glasscheibe abdeckt, besprüht man einen 2,5 cm breiten Streifen (schraffierte Fläche in der Abbildung 3), der die Punkte A und B überdeckt, mit Salzsäure (3.12), bis eine Dunkelfärbung auftritt. Man läßt 10 Minuten im Dunkeln reagieren und trocknet die Platte dann in einem Luftstrom bei Raumtemperatur.

Anschließend entwickelt man das Chromatogramm mit dem Fließmittel (3.18.1) (1-cm-Schicht in einer Trennkammer mit ungesättigter Atmosphäre) in Richtung II, bis die Lösungsmittelfront die Begrenzungslinie erreicht. Man nimmt die Platte aus der Trennkammer und läßt sie bei Raumtemperatur trocknen.

5.6.2.3. Interpretation des Chromatogramms

Man betrachtet das Chromatogramm unter UV-Licht (4.9) und prüft auf nachfolgende Merkmale:

a) Vorhandensein eines blau fluoreszierenden Flecks von Aflatoxin B_1, von der bei C aufgetragenen Standardlösung stammend (gewandert in Richtung I).

b) Vorhandensein eines blau fluoreszierenden Flecks von Aflatoxin B_1 (nicht mit Salzsäure umgesetzt) und eines intensiven blau fluoreszierenden Flecks von Aflatoxin B_1-hemiacetal beide von der bei B aufgetragenen Standardlösung stammend und in Richtung II gewandert.

c) Vorhandensein ähnlicher Flecke, wie unter b) beschrieben, die von dem bei A aufgetragenen Probenextrakt stammen. Die Lage dieser Flecke ergibt sich erstens aus der Laufstrecke des Aflatoxins B_1 von Punkt A in Richtung I (dieselbe Strekke, die der bei C aufgetragene Standard zurückgelegt hat) und zweitens aus der Laufstrecke von dort in Richtung II des nicht umgesetzten Aflatoxins B_1 und des Aflatoxin B_1-hemiacetals (dieselben Strecken, die von dem bei B aufgetragenen Standard zurückgelegt wurden). Die Fluoreszenz-Intensitäten der beiden, von dem Extrakt und der bei B aufgetragenen Standardlösung stammenden Halbacetalflecke sollten dabei einander entsprechen.

6. Berechnung der Ergebnisse

6.1. *Visuelle Messung*

Der Aflatoxin-B_1-Gehalt der Probe in Mikrogramm pro kg (ppb) wird nach folgender Formel berechnet:

▼B

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

Hierbei sind:

Y und X die Mengen — in Mikroliter — der Aflatoxin-B_1-Standardlösung (3.16) bzw. des Extrakts, deren Fluoreszenz-Intensität identisch ist.

S = Konzentration in Mikrogramm Aflatoxin B_1 je ml der Standardlösung (3.16);

V = Endvolumen des Extrakts in Mikroliter, unter Berücksichtigung etwaiger Verdünnung;

W = Gewicht der Probe in Gramm, bezogen auf die für die säulenchromatographische Reinigung verwendete Extraktmenge.

6.2. *Messungen durch Fluorodensitometrie*

Der Gehalt an Aflatoxin B_1 der Probe in Mikrogramm pro kg (ppb) wird nach folgender Formel berechnet:

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

Hierbei sind:

Y = Volumen des auf die Platte aufgetragenen Extrakts in Mikroliter (10 oder 20 µl);

S = Aflatoxin-B_1-Gehalt des Extraktflecks in Nanogramm, den man aus der Messung erhält (bezogen auf das angewendete Volumen Y);

V = Endvolumen des Extrakts in Mikroliter, unter Berücksichtigung etwaiger Verdünnung;

W = Gewicht der Probe in Gramm, bezogen auf die für die säulenchromatographische Reinigung verwendete Extraktmenge.

7. **Herstellung und Kontrolle der Standardlösung (3.16)**

7.1. *Bestimmung der Aflatoxin-B_1-Konzentration*

Eine Aflatoxin-B_1-Standardlösung wird in Chloroform (3.2) oder Benzol-Acetonitril-Gemisch (3.6) mit einer Konzentration von 8 bis 10 µg je ml hergestellt. Das Absorptionsspektrum wird zwischen 330 und 370 nm mit einem Spektralphotometer (4.11) gemessen.

Die Extinktion (A) ist im Fall einer Chloroformlösung bei 363 nm, im Fall einer Lösung in Benzol-Acetonitril-Gemisch bei 348 nm zu messen.

Die Aflatoxin-B_1-Konzentration in Mikrogramm je ml Lösung wird nach folgenden Formeln berechnet:

$\frac{312 \cdot A \cdot 1000}{20\,600}$ bei der Chloroformlösung;

$\frac{312 \cdot A \cdot 1000}{19\,800}$ bei der Lösung im Benzol-Acetonitril-Gemisch.

Die zur Herstellung einer Standardarbeitslösung mit einer Aflatoxin-B_1-Konzentration von etwa 0,1 µg je ml erforderlichen Verdünnungen werden im Dunkeln vorgenommen. Diese Lösung ist, bei 4° C im Kühlschrank aufbewahrt, zwei Wochen haltbar.

7.2. *Kontrolle der chromatographischen Reinheit*

Auf einer Dünnschichtplatte (4.8) werden 5 µl der Aflatoxin-B_1-Standardlösung, die 8—10 µg Aflatoxin B_1 je ml enthält (siehe 7.1) aufgetragen. Das Chromatogramm wird nach 5.4 entwickelt. Im UV-Licht darf nur ein einziger Fleck erkennbar sein; außerdem darf an der Stelle der ursprünglichen Auftragung keine Fluoreszenz wahrnehmbar sein.

▼B

8. **Wiederholbarkeit**

Der Unterschied zwischen den Ergebnissen zweier Parallelbestimmungen eines Analytikers sollte in derselben Probe bei Gehalten von

— 10 bis 20 µg/kg Aflatoxin B_1 25 v.H. des höheren Resultats,

— mehr als 20 bis 50 µg/kg Aflatoxin B_1 5 µg/kg absolut,

— mehr als 50 µg/kg Aflatoxin B_1 10 v.H. des höheren Resultats

nicht überschreiten.

9. **Vergleichbarkeit**

Siehe unter Bemerkungen, Teil C, Punkt 2,

▼M2

B. BESTIMMUNG VON AFLATOXIN B_1 DURCH HOCHLEISTUNGS-FLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE

1. **Zweck und Anwendungsbereich**

Die Methode dient der Bestimmung von Aflatoxin B_1 in Futtermitteln, einschließlich solchen, die Citrustrester enthalten. Die untere Grenze der Bestimmbarkeit beträgt 0,001 mg/kg (1 ppb).

2. **Prinzip**

Die Probe wird mit Chloroform extrahiert. Der Extrakt wird filtriert und ein allquoter Teil über eine Florisil-Kartusche und anschließend über eine C_{18}-Kartusche gereinigt. Die endgültige Trennung und Bestimmung erfolgen mit einer C_{18}-Umkehrphasen-HPLC-Säule und anschließender Nachsäulenderivatisierung mit Jod in Wasser sowie Fluoreszenzdetektion.

Anmerkung: Mykotoxine sind äußerst toxische Substanzen. Alle Arbeiten sollten in einem dafür vorgesehenen Abzug durchgeführt werden. Besondere Vorsichtsmaßnahmen sollten getroffen werden, wenn die Toxine in fester Form vorliegen, wegen ihrer elektrostatischen Eigenschaft und der daraus resultierenden Tendenz, sich auf Arbeitsflächen zu verteilen.

3. **Reagenzien**

3.1. Chloroform, stabilisiert mit 0,5 bis 1,0 % Ethanol (m/m). Siehe Bemerkung 10.2.

3.2. Methanol, für die HPLC zur Herstellung von 3.6.

3.3. Aceton.

3.4. Acetonitril für die HPLC.

3.5. Elutionsmittel: Sie werden einen Tag vor der Verwendung bereitet, oder die Luft in den Lösemitteln wird mit Hilfe von Ultraschall entfernt.

3.5.1. Mischung aus Aceton (3.3) und Wasser, 98 + 2 (V + V).

3.5.2. Mischung aus Wasser und Methanol (3.2), 80 + 20 (V + V).

3.5.3. Mischung aus Wasser und Aceton (3.3), 85 + 15 (V + V).

3.6. Mobile Phase für die HPLC.

Mischung aus Wasser, Methanol (3.2) und Acetonitril (3.4), 130 + 70 + 40 (V + V + V).

N.B.: Gegebenenfalls muß das Mischungsverhältnis der mobilen Phase der Charakteristik der verwendeten HPLC-Säule angepaßt werden.

3.7. Gesättigte Jodlösung: 2 g Jod werden in 400 ml Wasser gegeben, mindestens 90 Minuten gemischt und durch ein Membranfilter (4.15) filtriert. Die gesättigte Lösung ist vor Licht zu schützen, um einen fotochemischen Abbau zu verhindern.

3.8. Celite 545, mit Säure gewaschen, oder gleichwertiges Material.

3.9. Florisil-Kartusche (Waters SEP-PAK) oder gleichwertiges Material.

3.10. C_{18}-Kartusche (Waters SEP-PAK) oder gleichwertiges Material.

3.11. Inertgas, z. B. Stickstoff.

▼M2

3.12. Aflatoxin-B_1-Standardlösung in Chloroform, Konzentration 10 µg/ml.

Die Konzentration der Lösung wird folgendermaßen überprüft: Bestimmung des Absorptionsspektrums der Lösung zwischen 330 und 370 nm mit Hilfe des Spektralphotometers (4.23). Messung der Extinktion (E) bei 363 nm. Berechnung der Konzentration von Aflatoxin B_1 in 1 µg/ml mit der Formel:

$$\text{Konzentration } (\text{èmg/ml}) = \frac{312 \times E \times 1\,000}{22\,300} = 13,991 \times E$$

3.12.1. Aflatoxin-B_1-Stammlösung in Chloroform.

2,5 ml der Aflatoxin-B_1-Standardlösung (3.12) werden in einen 50-ml-Meßkolben überführt und der Kolben mit Chloroform (3.1) zur Marke aufgefüllt. Diese Stammlösung wird kühl (4 ºC), dunkel, dicht verschlossen und mit Alufolie umwickelt aufbewahrt.

3.13. Aflatoxin-B_1-Eichlösungen für die HPLC.

Anmerkung: Für die Herstellung dieser Lösungen sind säuregewaschene Glasgeräte zu verwenden (siehe 4, Geräte).

3.13.1. Eichlösung, 4 ng/ml.

Man läßt den mit Alufolie umwickelten Kolben mit der Stammlösung (3.12.1) auf Raumtemperatur erwärmen (einige Stunden). 400 µl der Stammlösung (200 ng Aflatoxin B_1) werden in einen 50-ml-Meßkolben überführt und in einem Strom von Inertgas (3.11) zur Trockne eingedampft. Der erhaltene Rückstand wird in ca. 20 ml Wasser-Aceton-Gemisch (3.5.3) gelöst, bis zur Marke mit Wasser-Aceton-Gemisch (3.5.3) aufgefüllt und gut durchmischt.

3.13.2. Eichlösung, 3 ng/ml.

7,5 ml der Eichlösung (3.13.1) werden quantitativ in einen 10-ml-Meßkolben überführt. Es wird mit Wasser-Aceton-Gemisch (3.5.3) zur Marke aufgefüllt und der Kolbeninhalt gut durchmischt.

3.13.3. Eichlösung, 2 ng/ml.

25 ml der Eichlösung (3.13.1) werden quantitativ in einen 50-ml-Meßkolben überführt. Es wird mit Wasser-Aceton-Gemisch (3.5.3) zur Marke aufgefüllt, und der Kolbeninhalt wird gut durchmischt.

Diese Lösung gilt auch als Bezugsstandard, der für die wiederholte Einspritzung während der HPLC-Bestimmung (5.5) verwendet wird.

3.13.4. Eichlösung, 1 ng/ml.

2,5 ml Eichlösung (3.13.1) werden quantitativ in einen 10-ml-Meßkolben überführt. Es wird mit Wasser-Aceton-Gemisch (3.5.3) zur Marke aufgefüllt und der Kolbeninhalt gut durchmischt.

3.14. Ampulle mit einer Mischung der Aflatoxine B_1, B_2, G_1 und G_2 in Konzentrationen von ca. 1; 0,5; 1 bzw. 0,5 µg/ml in 1 ml Chloroform.

3.14.1. Testlösung für die HPLC.

Der Inhalt der Ampulle (3.14) wird in ein Reagenzglas mit Schliffstopfen oder Schraubverschluß überführt. 40 µl dieser Lösung werden in einen 10-ml-Meßkolben oder in ein Reagenzglas mit Schliffstopfen (mit Säure gewaschen) (4.22) überführt. Nach Abdampfen des Chloroforms im Inertgasstrom (3.11) wird der Rückstand in 10 ml Wasser-Aceton-Gemisch (3.5.3) gelöst.

3.15. Reagenzien für die Identitätsbestätigung (6).

3.15.1. Gesättigte Natriumchloridlösung.

3.15.2. Natriumsulfat, wasserfrei, gekörnt.

4. **Geräte**

Achtung: Die Verwendung von Glasgeräten, die nicht mit Säure gewaschen wurden, kann bei wäßrigen Aflatoxinlösungen zu Verlusten führen. Besondere Sorgfalt ist bei neuen Glasgeräten und Einweg-Glasgeräten wie Ampullen für automatische Probengeber und Pasteurpipetten geboten. Daher müssen Laborgeräte aus Glas,

▼M2

die mit wäßrigen Aflatoxinlösungen in Berührung kommen, mehrere Stunden in verdünnter Säure (z. B. Schwefelsäure, c = 2 mol/l) liegen und dann zur Beseitigung sämtlicher Säurereste sorgfältig mit destilliertem Wasser gespült werden (z. B. dreimal, mit pH-Papier prüfen). In der Praxis ist diese Behandlung erforderlich bei Rundkolben (4.4), Meßkolben, Meßzylindern, Reagenzgläsern oder Gefäßen, die für Eichlösungen und Endextrakte verwendet werden (insbesondere bei Ampullen für automatische Probengeber) sowie für Pasteurpipetten, die zur Überführung von Eichlösungen und Extrakten benutzt werden.

4.1. Mahl- und Mischgerät.

4.2. Sieb mit einer Maschenweite von 1,0 mm (ISO R 565).

4.3. Schüttelmaschine.

4.4. Vakuumrotationsverdampfer mit 150- bis 250-ml-Rundkolben.

4.5. Hochleistungs-Flüssigkeitschromatograph, Injektor mit Probenschleife, geeignet für die Injektion von 250 µl. Die Angaben des Herstellers für teilweise oder vollständige Schleifenfüllung sind zu beachten.

4.6. HPLC-Trennsäule: C_{18}-Füllmaterial, Teilchengröße 3 µm oder 5 µm.

4.7. Pulsationsfreie Pumpe für das Nachsäulen-Jodreagenz.

4.8. Totvolumenfreies T-Stück (Valco) aus Edelstahl, (1/16″ × 0,75 mm).

4.9. Spiralreaktionsrohr aus Teflon oder Edelstahl. Abmessungen von 3 000 × 0,5 mm bis 5 000 × 0,5 mm sind in Verbindung mit 5 µm oder 3 µm HPLC-Säulen erwiesenermaßen geeignet.

4.10. Thermostatgesteuertes, auf 60 ºC eingestelltes Wasserbad, Temperaturregelung genauer als 0,1 ºC.

4.11. Fluoreszenzdetektor mit 365 nm Anregungs- und 435 nm Emissionswellenlänge (bei Filtergeräten: Emissionswellenlänge > 400 nm).

Ein Nachweis von mindestens 0,05 ng Aflatoxin B_1 sollte möglich sein. Unter Umständen kann ein Gegendruck erforderlich sein (z. B. Restriktor bzw. Teflon- oder Edelstahlrohr ausreichender Länge am Detektorauslaß), um Luftblasen in der Durchflußzelle zu vermeiden.

4.12. Schreiber.

4.13. Elektronischer Integrator (wahlweise).

4.14. Faltenfilter, Durchmesser 24 cm, Macherey-Nagel 617 1/4, oder gleichwertiges Filter.

4.15. Membran-Filter mit einer Porengröße von 0,45 µm, Millipore (H.A.W.P. 04700) oder gleichwertiges Filter.

4.16. 500-ml-Erlenmeyerkolben mit Schliffstopfen.

4.17. Glassäule, Innendurchmesser ca. 1 cm, Länge ca. 30 cm, mit Luer-Endstück.

4.18. Chloroformbeständiger Luer-Absperrhahn aus Nylon (z. B. BIO-RAD 7328017; Analytichem A1 6078; J. T. Baker 4514).

4.19. Chemisch inerte Spritze, 10 ml, mit Luer-Anschluß.

4.20. Spritze geeignet für Injektionen von 250 µl (siehe 4.5).

4.21. 100-µl-Spritze für die Herstellung der Eichlösungen. Durch Wägung ist zu überprüfen, daß die Genauigkeit innerhalb von 2 % liegt.

4.22. 10-ml-Reagenzgläser, graduiert, mit Schliffstopfen.

4.23. UV-Spektralphotometer.

4.24. Geräte für die Identitätsbestätigung (6).

4.24.1. Mit Säure gespülter 100-ml-Scheidetrichter mit Teflon-Absperrhahn.

4.24.2. Heizblock, 40-50 ºC.

▼M2

5. **Ausführung**

5.1. *Vorbereitung der Probe*

Die Probe wird gemahlen, so daß sie vollständig durch das Sieb (4.2) hindurchgeht.

5.2. *Untersuchungsprobe*

50 g der vorbereiteten Probe werden in einen Erlenmeyerkolben (4.16) eingewogen.

5.3. *Extraktion*

Zu der Untersuchungsprobe (5.2) werden 25 g Celite (3.8), 250 ml Chloroform (3.1) und 25 ml Wasser gegeben. Der Kolben wird verschlossen, und es wird 30 Minuten mit einer Schüttelmaschine (4.3) gemischt. Anschließend wird durch ein Faltenfilter (4.14) filtriert, und 50 ml des Filtrats werden aufgefangen. Erforderlichenfalls wird ein aliquoter Teil des Filtrats mit Chloroform auf 50 ml verdünnt, so daß die Konzentration von Aflatoxin B_1 nicht größer als 4 ng/ml ist.

5.4. *Reinigung*

Die Reinigung sollte ohne nennenswerte Unterbrechungen durchgeführt werden.

Achtung:

— Das Labor, in dem die Analysen durchgeführt werden, ist vor Tageslicht zu schützen. Dies kann durch folgende Maßnahmen erreicht werden:

1) UV-absorbierende Folie an den Fenstern in Verbindung mit gedämpftem Licht (keine direkte Sonneneinstrahlung!);

2) Vorhänge oder Jalousien und künstliches Licht (Leuchtstoffröhren können verwendet werden).

Aflatoxinhaltige Lösungen müssen so gut wie möglich vor Licht geschützt werden (Aufbewahrung im Dunkeln, Verwendung von Alufolie).

5.4.1. Florisil-SEP-PAK-Reinigung

5.4.1.1. Vorbereitung der Säulen-Kartuschen-Kombination.

Am kürzeren Ende der Florisil-Kartusche (3.9) wird ein Absperrhahn (4.18) angebracht (siehe Abbildung 1). Die Kartusche wird gewaschen und die Luft entfernt, indem von 10 ml Chloroform (3.1) 8 ml mit einer Spritze (4.19) über den Absperrhahn schnell durch die Kartusche hineingedrückt werden. Das längere Ende der Kartusche wird mit einer Glassäule (4.17) verbunden und die verbleibenden 2 ml Chloroform durch die Kartusche in die Glassäule gedrückt. Der Absperrhahn wird geschlossen und die Spritze entfernt.

5.4.1.2. Reinigung.

Das unter 5.3 gewonnene Filtrat wird in die Säulen-Kartuschen-Kombination gegeben, und man läßt es durch Schwerkraft ablaufen. Es wird mit 5 ml Chloroform (3.1) und anschließend mit 20 ml Methanol (3.2) gespült. Die Eluate werfen verworfen. Dabei ist ein Trockenlaufen der Säulen-Kartuschen-Kombination zu vermeiden. Das Aflatoxin B_1 wird mit 40 ml Aceton-Wasser-Gemisch (3.5.1) eluiert und das gesamte Eluat im Rundkolben des Vakuum-Rotationsverdampfers (4.4) aufgefangen. Das Eluat wird am Vakuum-Rotationsverdampfer bei 40-50 ºC eingeengt, bis kein Aceton mehr übergeht. (*Anmerkung:* etwa 0,5 ml der Flüssigkeit verbleiben dabei im Kolben. Versuche haben ergeben, daß ein weiteres Abdampfen sich nicht nachteilig auswirkt und daß die verbleibenden 0,5 ml Flüssigkeit keine nennenswerte Acetonmenge enthalten. Acetonreste können zu Verlusten von Aflatoxin B_1 in der C_{18}-Kartusche führen.)

Nach Zugabe von 1 ml Methanol (3.2) wird der Kolben geschwenkt, um das Aflatoxin B_1 an den Gefäßwänden zu lösen. Anschließend werden 4 ml Wasser zugegeben, und der Kolbeninhalt wird durchmischt. Die Kartusche wird abgenommen und verworfen. Die Glassäule wird mit Wasser gespült und für den Reinigungsschnitt mit C_{18} bereitgehalten.

▼M2

5.4.2. C_{18}-SEP-PAK-Reinigung

5.4.2.1. Vorbereitung der Säule-Kartuschen-Kombination.

Das kürzere Ende einer C_{18}-Kartusche (3.10) wird mit einem Absperrhahn (4.18) versehen (siehe Abbildung 1). Die Kartusche wird vorbereitet und die Luft entfernt, indem mit einer Spritze (4.19) 10 ml Methanol (3.2) schnell über den Absperrhahn durch die Kartusche gedrückt werden. (Luftblasen in der Kartusche sind als helle Flecken vor dem ansonsten gräulichen Hintergrund erkennbar). Von 10 ml Wasser werden 8 ml durch die Kartusche gedrückt. (Beim Übergang von Methanol auf Wasser ist das Eindringen von Luft in die Kartusche zu vermeiden.) Das längere Ende der Kartusche wird mit einer Glassäule (4.17) verbunden und die restlichen 2 ml durch die Kartusche in die Glassäule gedrückt. Der Absperrhahn wird geschlossen und die Spritze entfernt.

5.4.2.2. Reinigung.

Der unter 5.4.1.2 erhaltene Exrakt wird quantitativ in die Glassäule (4.17) überführt. Der Kolben wird zweimal mit 5 ml Wasser-Methanol-Gemisch (3.5.2) gespült, und es wird durch Schwerkraft ablaufen gelassen. Während dieses Arbeitsgangs ist ein Trockenlaufen der Säulen-Kartuschen-Kombination zu vermeiden. (Wenn sich in der Verengung nahe der Kartusche Luftblasen bilden, wird der Fluß unterbrochen, und die Luftblasen werden durch leichtes Klopfen an das obere Ende der Glassäule entfernt.) Anschließend wird mit 25 ml Wasser-Methanol-Gemisch (3.5.2) eluiert, und das Eluat wird verworfen. Das Aflatoxin B_1 wird mit 50 ml Wasser-Aceton-Gemisch (3.5.3) eluiert und das gesamte Eluat in einem 50-ml-Meßkolben aufgefangen. Der Kolben wird mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt und der Kolbeninhalt gut durchmischt. Die so erhaltene Lösung wird für die HPLC (5.5) verwendet.

Achtung: Eine Filtration des Endextrakts vor der HPLC ist normalerweise nicht erforderlich. Wird dies für notwendig gehalten, dürfen keine Cellulosefilter verwendet werden, da diese zu Aflatoxin-B_1-Verlusten führen können. Teflonfilter können verwendet werden.

5.5. *Hochleistungsflüssigkeitschromatographie*

(Aufbau der Anlage siehe Abbildung 2.) Es ist genügend Zeit zur Konditionierung und Stabilisierung der Geräte vorzusehen.

Anmerkung 1:

Die Flußraten für die mobile Phase und das Nachsäulenreagenz sind nur Anhaltspunkte. Sie sind der Art und Dimension der HPLC-Säule entsprechend anzupassen.

Anmerkung 2:

Der Detektorresponse des Aflatoxins B_1 ist temperaturabhängig, daher sollten Korrekturen für die Abweichungen vorgenommen werden (siehe Abbildung 3). Durch Einspritzung einer bestimmten Menge des Aflatoxin-B_1-Bezugsstandards (3.13.3) in regelmäßigen Abständen (z. B. jede dritte Einspritzung) können die Aflatoxin-B_1-Peakwerte zwischen diesen Bezugsstandards mit Hilfe des mittleren Responses korrigiert werden. Voraussetzung ist, daß der Unterschied der Response aufeinanderfolgenden Bezugsstandards sehr klein (10 %) ist. Daher müssen die Einspritzungen ohne Unterbrechung erfolgen. Ist eine Unterbrechung notwendig, muß die letzte Einspritzung vor der Unterbrechung und die erste danach mit dem Bezugsstandard (3.13.3) durchgeführt werden. Da die Eichkurve linear ist und durch den Nullpunkt verläuft, werden die Aflatoxin-B_1-Mengen in den Probenextrakten unmittelbar mit Hilfe der benachbarten Standards bestimmt.

5.5.1. Einstellung der HPLC-Pumpe

Die HPLC-Pumpe (4.5) wird so eingestellt, daß sich bei Verwendung der mobilen Phase (3.6) eine Flußrate von 0,5 bzw. 0,3 ml/min für die 5-µm- bzw. 3-µm-HPLC-Säule (4.6) ergibt.

5.5.2. Einstellung der Nachsäulenpumpe

Die Pumpe (4.7) wird so eingestellt, daß sich eine Flußrate von 0,2 bis 0,4 ml/min der gesättigten Jod-Wasser-Lösung (3.7) ergibt. Als grober Anhaltspunkt können Flußraten von ca. 0,4 bzw. 0,2 ml/min bei Flußraten von 0,5 bzw. 0,3 ml/min der mobilen Phase (3.6) empfohlen werden.

▼M2

5.5.3. Fluoreszenzdetektor

Der Fluoreszenzdetektor (4.11) wird auf eine Anregungswellenlänge von 365 nm und eine Emissionswellenlänge von 435 nm (Filterinstrument: > 400 nm) eingestellt. Die Detektorabschwächung wird so eingestellt, daß 1 ng Aflatoxin B_1 ca 80 % Vollausschlag des Schreibers ergibt.

5.5.4. Injektor

Von allen Lösungen werden Volumina von 250 µl gemäß den Herstellerangaben eingespritzt.

5.5.5. Überprüfung der chromatographischen Trennung

Die Testlösung für die Chromatographie (3.14.1) wird eingespritzt. Der Abstand der Täler sollte weniger als 5 % der Summe der Peakhöhlen der benachbarten Peaks betragen.

5.5.6. Überprüfung der Systemstabilität

Vor jeder Analysenreihe wird der Bezugsstandard (3.13.3) wiederholt eingespritzt, bis konstante Peakflächen erhalten werden.

Anmerkung:

Die Peakflächen von Aflatoxin B_1 sollten bei aufeinanderfolgenden Einspritzungen um nicht mehr als 6 % voneinander abweichen. Es ist unverzüglich mit der Überprüfung der Linearität (5.5.7) fortzufahren.

5.5.7. Überprüfung der Linearität

Die Aflatoxin-B_1-Eichlösungen (3.13.1 bis 3.13.4) werden eingespritzt. Für jede dritte Einspritzung ist der Bezugsstandard 3.13.3 zu verwenden, um Responseabweichungen zu korrigieren (*Anmerkung:* Die Peak-Response für diesen Bezugsstandard dürfen nicht mehr als 10 % innerhalb von 90 Minuten voneinander abweichen.) Die Abweichungen werden gemäß der Formel in Punkt 7 korrigiert. Die Eichkurve sollte linear sein und innerhalb des zweifachen Standardfehlers des y-Wertes durch den Nullpunkt verlaufen. Die ermittelten Werte dürfen nicht mehr als 3 % von den Nennwerten abweichen. Sind diese Anforderungen erfüllt, ist unverzüglich mit Punkt 5.5.8 fortzufahren; wenn nicht, sind vorher die Fehlerquellen festzustellen und zu beseitigen.

5.5.8. Einspritzung der Probenextrakte

Die gereinigten Probenextrakte (5.4.2.2) werden eingespritzt. Nach je zwei Probenextrakten ist die Einspritzung des Bezugsstandards (3.13.3) zu wiederholen, also: Bezugsstandard, Extrakt Extrakt, Bezugsstandard, Ektrakt, Ektrakt, Bezugsstandard usw.

6. **Identitätsbestätigung**

6.1. *Weitere Behandlung des Extraktes (5.4.2.2)*

Dem nach 5.4.2.2 gewonnen Endextrakt werden 5 ml Natriumchloridlösung (3.15.1) zugesetzt. Man schüttelt in einem Scheidetricher (4.24.1) dreimal mit je 2 ml Chloroform (3.1) jeweils eine Minute. Die vereinigten Chloroformextrakte werden über ca. 1 g Natriumsulfat (3.15.2) in ein 10-ml-Reagenzglas gegossen. Es kann ein kleiner Trichter (Durchmesser 4 cm) verwendet werden, in dessen Auslauf sich ein Wattepfropf, der mit 1 g Natriumsulfat (3.15.2) bedeckt ist, befindet.

Die Natriumsulfatschicht wird mit einigen ml Chloroform ausgewaschen und die Waschlösung im gleichen Reagenzglas aufgefangen. Der Chloroformextrakt wird in diesem Reagenzglas in einem Heizblock (4.24.2) zur Trockne eingedampft und erneut in 1 ml Chloroform gelöst.

6.2. *Herstellung der Derivate und Dünnschichtchromatographie*

Vergleiche Richtlinie 76/372/EWG des Rates, Anhang, Methode A unter Punkt 5.6.2.

7. **Berechnung der Ergebnisse**

Der Aflatoxin-B_1-Gehalt der Probe (µg/kg) wird mit folgender Formel berechnet:

▼**M2**

$$\text{Aflatoxin-B}_1\text{-Gehalt in èmg/kg} = \frac{m \times V_{ext}}{V_m \times M \times \frac{V_f}{V_c}}$$

Hierbei sind:

m = die Menge an Aflatoxin B_1 in ng, dargestellt durch den B_1-Peak der Probe, die folgendermaßen berechnet wird:

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

P(Probe) = Peakfläche des Aflatoxins B_1 der Probe

$P(st_1)$ = Peakfläche des Aflatoxins B_1 bei der vorangegangenen Einspritzung des Bezugsstandards (3.13.3)

$P(st_2)$ = Peakfläche des Aflatoxins B_1 bei der nachfolgenden Einspritzung des Bezugsstandards (3.13.3)

r(st) = eingespritzte Menge Aflatoxin B_1 im Bezugsstandard (3.13.3) in ng

V_m = Volumen des eingespritzten Probenextrakts in ml

V_{ext} = Endvolumen des Probenextrakts in ml, unter Berücksichtigung der Verdünnung (5.3)

M = Probeneinwaage in g

V_f = Volumen des auf die Florisilkartusche (5.4.1.2) gegebenen Filtrats in ml

V_c = Volumen des zur Extraktion der Probe verwendeten Chloroforms in ml

Wird dem in diesem Protokoll angegebenen Verfahren gefolgt, kann die Formel folgendermaßen verkürzt werden:

Aflatoxin-B_1-Gehalt in µg/kg = 20 × m

7.1. Die Ergebnisse können auch durch Messung der Peak-Höhen ermittelt werden.

8. **Wiederholbarkeit**

Siehe 10.1 (Bemerkungen).

9. **Vergleichbarkeit**

Siehe 10.1 (Bemerkungen).

10. **Bemerkungen**

10.1. *Reproduzierbarkeit*

Eine auf internationaler Ebene durchgeführte Ringuntersuchung [1] an Mischfuttermitteln ergab hinsichtlich der Wiederholbarkeit und Vergleichbarkeit die in Tabelle 1 aufgeführten Ergebnisse. Der hier verwendete Begriff Wiederholbarkeit (r) bezeichnet das größte Verhältnis, das bei 95%iger Wahrscheinlichkeit im Vergleich von 2 Ergebnissen der gleichen Probe und unter gleichen Laborbedingungen nicht signifikant ist. Der Begriff Vergleichbarkeit (R) ist ähnlich definiert für den Vergleich zweier verschiedener Laboratorien. Gemäß ISO 3534 — 1977, Ziffer 2.35 [2] und der Entscheidung 89/610/EWG der Kommission [3] sind in Tabelle 1 r und R auch als Variationskoeffizienten angegeben.

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

▼**M2**

Tabelle 1

Wiederholbarkeit (r) und Vergleichbarkeit (R), ausgedrückt als Verhältniszahlen und als Variationskoeffizienten

(15 Laboratorien)

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

(*) CV = Variationskoeffizient.

10.2. *Stabilisierung des Chloroforms (3.1)*

Die Absorptionseigenschaften der Florisilkartusche (3.9) können sich verändern, wenn ein anderer Stabilisator als Ethanol verwendet wird. Dieses sollte gemäß Punkt 10.3 überprüft werden für den Fall, daß das beschriebene Chloroform nicht erhältlich ist.

10.3. *Richtigkeit*

Die korrekte Durchführung des Verfahrens ist zu überprüfen, indem wiederholte Bestimmungen an zertifizierten Referenzmaterialien durchgeführt werden. Sind diese nicht verfügbar, sollte die Leistungsfähigkeit des Verfahrens durch Wiederfindungsversuche an dotierten Blindproben überprüft werden. Die Abweichung des Mittelwerts vom Sollwert, ausgedrückt in Prozenten des Sollwerts, soll einen Rahmen von −20 bis + 10 % nicht überschreiten.

▼M2

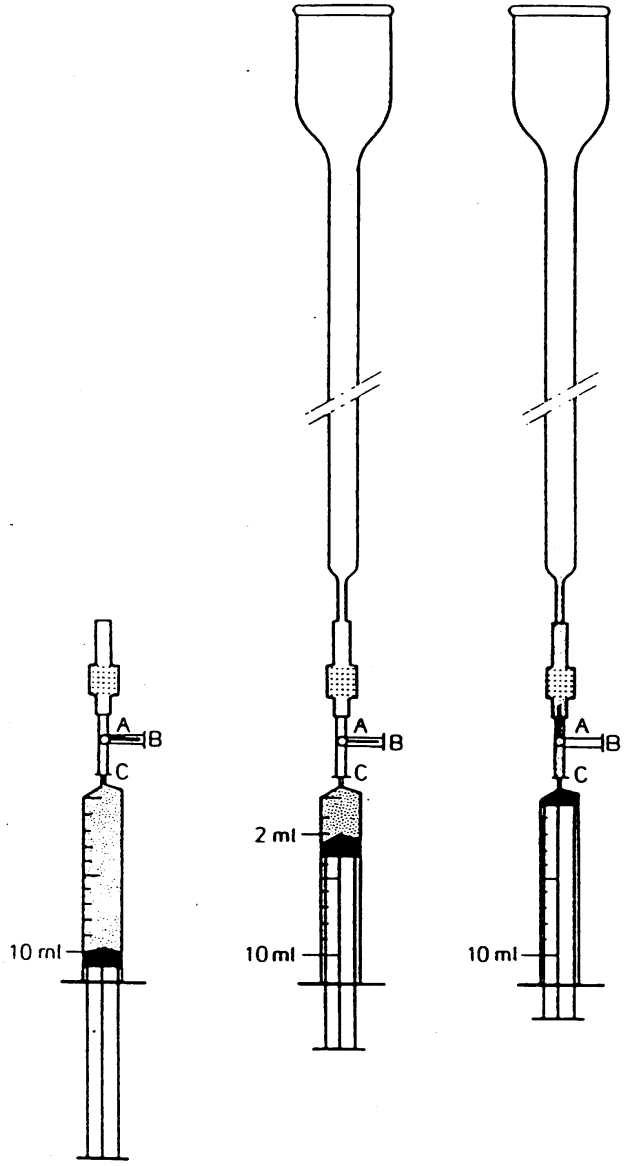
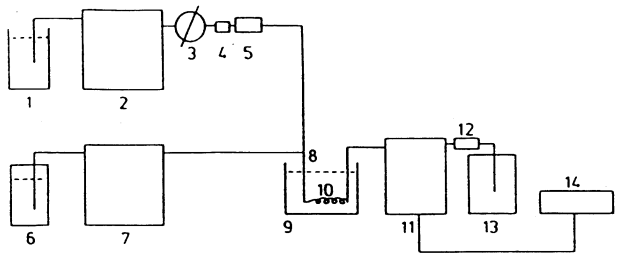


Abbildung 1: Säulen-Kartuschen-Kombination



1. Mobile Phase
2. Pumpe
3. Injektor
4. Vorsäule
5. HPLC-Analysesäule
6. Gesättigte Jodlösung
7. Reagenzienpumpe
8. T-Stück
9. Thermostatgesteuertes Bad
10. Spiralreaktionsrohr
11. Fluoreszenzdetektor
12. Restriktor
13. Auffangbehälter
14. Schreiber bzw. Integrator

Abbildung 2: Flußschema des LC-Systems mit Einrichtung zur Nachsäulenderivatisierung mit Jod

▼**M2**

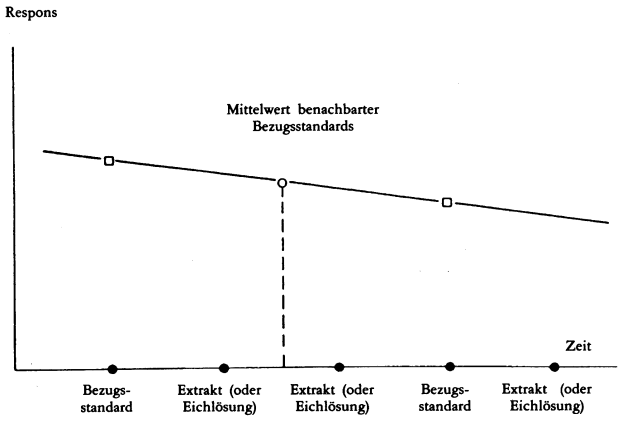


Abbildung 3: Korrektur der Abweichung des Aflatoxin-B_1-Responses durch Einspritzung des Bezugsstandards (3.13.3) in regelmäßigen Abständen

▼**M3**

C. BEMERKUNGEN BETREFFEND METHODE A UND B

1. **Entfettung**

Proben mit mehr als 5 v. H. Fett sind nach der unter 5.1 beschriebenen Vorbereitung mit Petrolether (Kp 40 - 60 ºC) zu entfetten.

In diesem Fall sind die Ergebnisse auf das Gewicht der nicht entfetteten Originalprobe zu beziehen.

2. **Vergleichbarkeit der Ergebnisse der Methode A**

Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse, das heißt die Abweichung zwischen den von zwei oder mehr Laboratorien für die gleiche Probe erhaltenen Ergebnissen, wurde wie folgt bewertet:

± 50 v. H. des Mittelwertes der Ergebnisse bei Mittelwerten an Aflatoxin B_1 von 10 bis 20 µg/kg;

± 10 µg/kg vom Mittelwert bei Mittelwerten von mehr als 20 bis 50 µg/kg;

± 20 v. H. des Mittelwertes bei Mittelwerten von mehr als 50 µg/kg.

▼B

ANLAGE

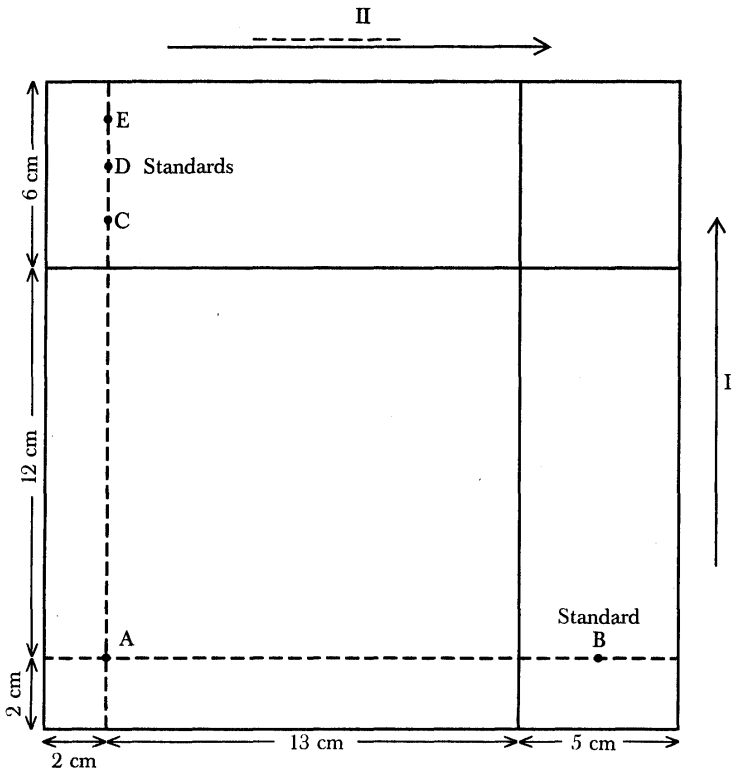


Abbildung 1

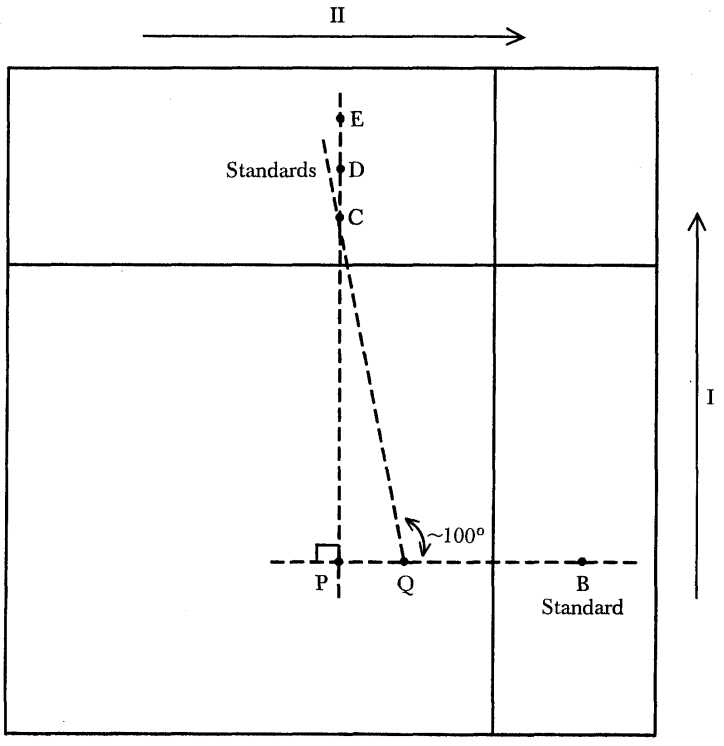


Abbildung 2

▼B

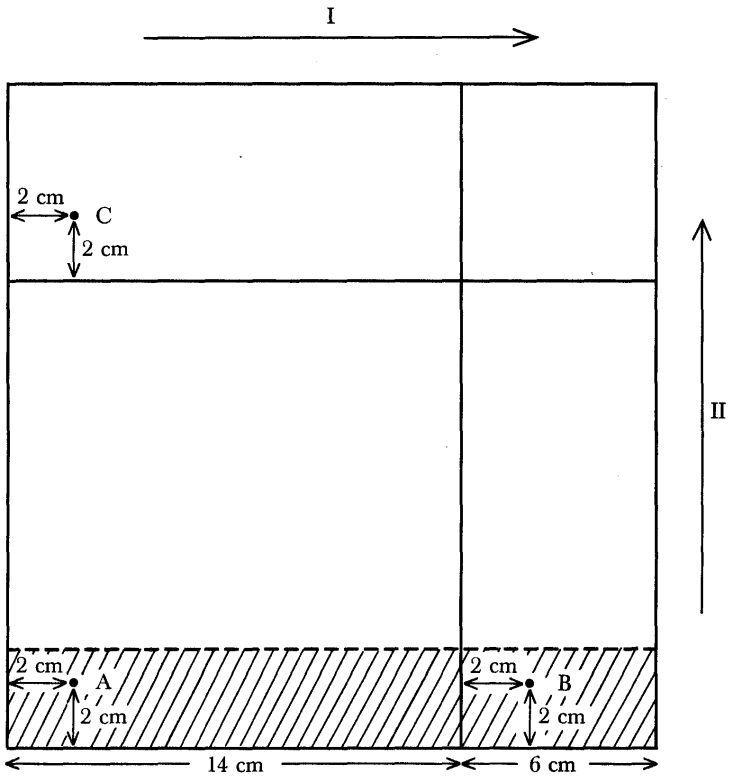


Abbildung 3