**Tämä asiakirja on ainoastaan dokumentointitarkoituksiin. Toimielimet eivät vastaa sen sisällöstä.**

►**B**

# SEITSEMÄS KOMISSION DIREKTIIVI, annettu 1 päivänä maaliskuuta 1976, yhteisön määritysmenetelmistä rehujen virallista tarkastusta varten

(76/372/ETY)

(EYVL L 102, 15.4.1976, s. 8)

Muutettu:

| | | virallinen lehti | | |
|---|---|---|---|---|
| | | N:o | sivu | päivämäärä |
| ►**M1** | Komission direktiivi 81/680/ETY, annettu 30 päivänä heinäkuuta 1981 | L 246 | 32 | 29.8.1981 |
| ►**M2** | Komission direktiivi 92/95/ETY, annettu 9 päivänä marraskuuta 1992 | L 327 | 54 | 13.11.1992 |
| ►**M3** | Commission Directive 94/14/EC of 29 March 1994 (*) | L 94 | 30 | 13.4.1994 |

(*) Tätä asiakirjaa ei ole julkaistu suomenkielisenä.

▼B

**SEITSEMÄS KOMISSION DIREKTIIVI,**

**annettu 1 päivänä maaliskuuta 1976,**

**yhteisön määritysmenetelmistä rehujen virallista tarkastusta varten**

(76/372/ETY)

EUROOPAN YHTEISÖJEN KOMISSIO, joka

ottaa huomioon Euroopan talousyhteisön perustamissopimuksen,

ottaa huomioon yhteisön näytteenotto- ja määritysmenetelmistä rehujen virallista tarkastusta varten 20 päivänä heinäkuuta 1970 annetun neuvoston direktiivin ([1]), sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna liittymisasiakirjalla ([2]), ja erityisesti sen 2 artiklan,

sekä katsoo, että

mainitussa direktiivissä säädetään rehujen virallisen tarkastuksen suorittamisesta yhteisön näytteenotto- ja määritysmenetelmiä käyttäen sen todentamiseksi, että lakien, asetusten ja hallinnollisten määräysten rehujen laatua ja koostumusta koskevat vaatimukset tulevat täytetyksi,

useita yhteisön määritysmenetelmiä on jo vahvistettu 15 päivänä kesäkuuta 1971 annetulla komission direktiivillä 71/250/ETY ([3]), 18 päivänä marraskuuta 1971 annetulla komission direktiivillä 71/393/ETY ([4]), 27 päivänä huhtikuuta 1972 annetulla komission direktiivillä 72/199/ETY ([5]), 5 päivänä joulukuuta 1972 annetulla komission direktiivillä 73/46/ETY ([6]), 25 päivänä maaliskuuta 1974 annetulla komission direktiivillä 74/203/ETY ([7]) ja 20 päivänä joulukuuta 1974 annetulla komission direktiivillä 75/84/ETY ([8]); työ on tämän jälkeen edistynyt siinä määrin, että olisi hyväksyttävä seitsemäs ryhmä menetelmiä, ja

tässä direktiivissä säädetyt toimenpiteet ovat pysyvän rehukomitean lausunnon mukaiset,

ON ANTANUT TÄMÄN DIREKTIIVIN:

*1 artikla*

Jäsenvaltioiden on vaadittava, että rehujen virallisessa tarkastuksessa aflatoksiini $B_1$ -pitoisuuden määritykset suoritetaan tämän direktiivin liitteessä esitettyjen menetelmien mukaisesti.

▼M1

---

▼B

*2 artikla*

Jäsenvaltioiden on saatettava tämän direktiivin noudattamisen edellyttämät lait, asetukset ja hallinnolliset määräykset voimaan viimeistään 1 päivänä lokakuuta 1976. Niiden on ilmoitettava tästä komissiolle viipymättä.

*3 artikla*

Tämä direktiivi on osoitettu kaikille jäsenvaltioille.

---

([1]) EYVL N:o L 170, 3.8.1970, s. 2
([2]) EYVL N:o L 73, 27.3.1972, s. 14
([3]) EYVL N:o L 155, 12.7.1971, s. 13
([4]) EYVL N:o L 279, 20.12.1971, s. 7
([5]) EYVL N:o L 123, 29.5.1972, s. 6
([6]) EYVL N:o L 83, 30.3.1973, s. 21
([7]) EYVL N:o L 108, 22.4.1974, s. 7
([8]) EYVL N:o L 32, 5.2.1975, s. 26

▼B

*LIITE*

## AFLATOKSIINI $B_1$:N MÄÄRITYS

A. YKSISUUNTAINEN OHUTLEVYKROMATOGRAFINEN MENETELMÄ

▼M2

1 **Tarkoitus ja soveltamisala**

Menetelmällä on mahdollista määrittää raaka-aineiden ja suoraan käytettävien rehujen aflatoksiini $B_1$-pitoisuus. Tätä menetelmää ei voida soveltaa sitrushedelmämassaa sisältäviin näytteisiin. Määrityksen alaraja on 0,01 mg/kg (10 ppb).

Jos häiritsevät aineet haittaavat määritystä, se on aloitettava alusta käyttäen B menetelmää (suuren erotuskyvyn nestekromatografia).

▼B

2 **Periaate**

Näyte uutetaan kloroformilla. Uute suodatetaan, saadusta nesteestä otetaan erä, joka puhdistetaan silikageelipylväällä. Eluaatti haihdutetaan ja jäännös liuotetaan uudelleen tiettyyn tilavuuteen kloroformia tai bentseenin ja asetonitriilin seosta. Tästä liuoksesta otetulle erälle tehdään ohutlevykromatografinen (TLC) ajo. Aflatoksiini $B_1$:n määrä todetaan kromatogrammista UV-valon avulla joko visuaalisesti tai fluorodensitometrisesti vertaamalla tunnettuihin määriin aflatoksiini $B_1$-standardia. Rehuista uutetun aflatoksiini $B_1$:n tunnistus on varmennettava esitetyllä tavalla.

3 **Reagenssit**

*Huom:* Ellei toisin mainita, kaikkien reagenssien on oltava laatuluokaltaan ”analyysilaatua”.

3.1 Asetoni.

3.2 Kloroformi, stabiloitu 0,5-1,0 % etanolilla (96 % v/v).

3.3 n-Heksaani.

3.4 Metanoli.

3.5 Vedetön dietyylieetteri, peroksidivapaa.

3.6 Bentseeni-asetonitriiliseos: 98/2 (v/v).

3.7 Kloroformi (3.2)-metanoli (3.4) -seos: 97/3 (v/v).

3.8 Pylväskromatografiaan tarkoitettu silikageeli, partikkelikoko 0,05-0,20 mm.

3.9 Absorboivaa puuvillaa, josta rasva on poistettu etukäteen kloroformilla, tai lasivillaa.

3.10 Vedetön, rakeinen natriumsulfaatti.

3.11 Inertti kaasu, esim. typpi.

3.12 1 N kloorivetyhappo.

3.13 50 % (v/v) rikkihappo.

3.14 Happopestyä piimaata (hyflosupercel).

3.15 Silikageeli G-HR tai tätä vastaava, TLC:tä varten.

3.16 Standardiliuos, jossa on noin 0,1 µg/ml aflatoksiini $B_1$:tä kloroformissa (3.2) tai bentseeni/asetonitriili-seoksessa (3.6). Valmistettu ja tarkistettu 7 kohdassa esitetyllä tavalla.

3.17 Kvalitatiivisiin määrityksiin tarvittava standardiliuos, jossa on noin 0,1 µg/ml aflatoksiini $B_1$:tä ja $B_2$:ta kloroformissa (3.2) tai bentseeni/asetonitriili-seoksessa (3.6). Nämä konsentraatiot ovat ohjeellisia. Ne on valittava sellaisiksi, että molemmista aflatoksiineista saatavan fluoresenssin voimakkuus on samanlainen.

3.18 Ajoliuokset

3.18.1 Kloroformi (3.2)/asetoni (3.1): 9/1 (v/v), kyllästymätön kammio;

▼B

3.18.2 Dietyylieetteri (3.5)/metanoli (3.4)/vesi: 96/3/1 (v/v), kyllästymätön kammio;

3.18.3 Dietyylieetteri (3.5)/metanoli (3.4)/vesi: 94/4,5/1,5 (v/v/v), kylläinen kammio;

3.18.4 Kloroformi (3.2)/metanoli (3.4): 94/6 (v/v), kylläinen kammio;

3.18.5 Kloroformi (3.2)/metanoli (3.4): 97/3 (v/v), kylläinen kammio.

4 **Välineistö**

4.1 Jauhatuslaite.

4.2 Ravistelija tai magneettisekoittaja.

4.3 Laskostettuja suodatinpapereita, Schleicher ja Schüll N:o 588 tai vastaava, läpimitta 24 cm.

4.4 Lasinen kromatografiaputki (sisäläpimitta: 22 mm, pituus: 300 mm), jossa on PTFE-hana ja 250 ml:n säiliö.

4.5 Tyhjiöpyöröhaihdutin ja 500 ml:n pyöreäpohjainen pullo.

4.6 500 ml:n hiostulpallisia erlenmayerkolveja.

4.7 TLC-laite.

4.8 Lasisia TLC-levyjä, 200 × 200 mm, jotka on käsitelty seuraavasti (annetut määrät riittävät viiteen levyyn). Punnitaan 30 g silikageeli G-HR:ää (3.15) erlenmayerkolviin. Lisätään 60 ml vettä, suljetaan tulpalla ja ravistellaan minuutin ajan. Suspensio levitetään levyille 0,25 mm paksuksi yhtenäiseksi kerrokseksi. Annetaan kuivua ilmassa ja säilytetään silikageeliä sisältävässä eksikaattorissa. Levyt aktivoidaan käyttöön otettaessa pitämällä niitä lämpökaapissa 110 ºC:ssa tunnin ajan.

Valmiina hankittavat levyt ovat myös käyttökelpoisia, mikäli niillä saadaan samanlaisia tuloksia kuin tässä esitetyllä tavalla tehdyillä levyillä.

4.9 Pitkäaallonpituuksinen (360 nm) UV-lamppu. Säteilyn voimakkuuden tulee olla sellainen, että sillä on mahdollista havaita 1 ng:n suuruinen aflatoksiini $B_1$-täplä TLC-levyllä 10 cm:n etäisyydellä lampusta.

4.10 Polyetyleenitulpallisia asteikolla varustettuja 10 ml:n putkia.

4.11 UV-spektrofotometri.

4.12 Fluorodensitometri (vaihtoehtoinen).

5 **Suoritus**

5.1 *Näytteen esikäsittely* (ks. ”huomautukset”, C osa, 1 kohta).

Näyte jauhetaan niin, että se kokonaisuudessaan läpäisee 1 mm:n seulan (ISO R 565 suosituksen mukainen).

5.2 *Uutto*

Punnitaan 50 g jauhettua ja homogenoitua näytettä 500 ml:n erlenmayerkolviin (4.6). Lisätään 25 g piimaata (3.14), 25 ml vettä ja 250 ml kloroformia (3.2). Kolvi suljetaan, ravistetaan tai sekoitetaan 30 minuuttia laitteessa (4.2) ja suodatetaan laskostetun suodatinpaperin läpi (4.3). Ensimmäiset 10 ml suodoksesta heitetään pois ja sen jälkeen otetaan talteen 50 ml:n suuruinen erä.

5.3 *Puhdistus pylväässä*

Kromatografiaputken (4.4) alapäähän asetetaan puuvilla- tai lasivillatuppo (3.9), putki täytetään kahdella kolmanneksella tilavuudestaan kloroformilla (3.2) ja lisätään 5 g natriumsulfaattia (3.10).

Tarkistetaan, että natriumsulfaattikerroksen yläpinta on tasainen, jonka jälkeen lisätään pieninä erinä 10 g silikageeliä (3.8). Kunkin lisäyksen jälkeen sekoitetaan varovasti ilmakuplien poistamiseksi. Annetaan seistä 15 minuuttia ja tämän jälkeen lisätään varovasti 15 g natriumsulfaattia (3.10). Nesteen annetaan laskea, kunnes se on juuri natriumsulfaattikerroksen yläpinnan yläpuolella.

Sekoitetaan keskenään 5.2 kohdassa talteen otettua uutetta 50 ml ja 100 ml n-heksaania (3.3) ja seos siirretään kvantitatiivisesti pylvääseen. Nesteen annetaan laskea, kunnes se on juuri

▼B

natriumsulfaattikerroksen yläpuolella. Tämä pesuliuos heitetään pois. Tämän jälkeen lisätään 100 ml dietyylieetteriä (3.5) ja sen annetaan taas laskeutua natriumsulfaattikerroksen yläpintaan. Näiden toimenpiteiden aikana on huolehdittava siitä, että virtausnopeus on 8-12 ml minuutissa ja että pylväs ei pääse kuivumaan. Ulostullut neste heitetään pois. Tämän jälkeen eluoidaan 150 ml:lla kloroformi/metanoli-seosta (3.7) ja koko eluaatti kerätään talteen.

Viimeksi mainittu erä haihdutetaan miltei kuivaksi inertin kaasun (3.11) alla pyöröhaihduttimessa (4.5), jossa lämpötila ei ylitä 50 ºC. Jäännös siirretään kvantitatiivisesti kloroformilla (3.2) tai bentseeni-asetonitriili-seoksella (3.6) 10 ml:n asteikolla varustettuun putkeen (4.10). Liuos väkevöidään johtamalla sen pintaan inerttiä kaasua (3.11), minkä jälkeen tilavuus säädetään 2 ml:ksi kloroformilla (3.2) tai bentseeni-asetonitriili-seoksella (3.6).

5.4 *Ohutlevykromatografia*

TLC-levylle (4.8) pipetoidaan täplinä 2 cm:n etäisyydelle alareunasta ja 2 cm:n välein jäljempänä esitetyt määrät standardiliuosta ja uutetta:

— 10, 15, 20, 30 ja 40 µl aflatoksiini $B_1$-standardiliuosta (3.16);

— 10 µl 5.3 kohdassa saatua uutetta ja tähän samaan kohtaan 20 µl standardiliuosta (3.16);

— 10 ja 20 µl 5.3 kohdassa saatua uutetta.

Kromatogrammi kehitetään pimeässä yhdellä ajoliuoksista (3.18). Ajoliuoksien valinta on tehtävä etukäteen pipetoimalla levylle 25 µl kvalitatiivista standardiliuosta (3.17) ja tarkistamalla, että aflatoksiini $B_1$ ja $B_2$ ovat kromatogrammin kehityksen jälkeen erottuneet toisistaan täydellisesti.

Liuottimien annetaan haihtua pimeässä ja levyä valaistaan tämän jälkeen UV-valolla siten, että se on 10 cm:n etäisyydellä lampusta (4.9). Aflatoksiini $B_1$ -täplät fluoresoivat sinisinä.

5.5 *Kvantitatiiviset määritykset*

Määritetään joko visuaalisesti tai fluorodensitometrisesti jäljempänä kuvatulla tavalla.

5.5.1 Visuaaliset mittaukset

Uutteessa olevan aflatoksiini $B_1$:n määrä määritetään etsimällä standardiliuoksen täplistä se täplä, joka vastaa uutteesta saatujen täplien fluoresenssin voimakkuutta. Tarvittaessa interpoloidaan. Uutteeseen lisätyn standardiliuoksen täplän fluoresenssin on oltava voimakkaampi kuin 10 µl:sta uutetta saatu fluoresenssi eikä tällöin saa esiintyä useampia kuin yksi havaittava täplä. Mikäli 10 µl:sta uutetta saatu fluoresenssin voimakkuus on suurempi kuin 40 µl:sta standardiliuosta saatu voimakkuus, uute laimennetaan 10- tai 100-kertaisesti kloroformilla (3.2) tai bentseeni/asetonitriili-seoksella (3.6), jonka jälkeen tälle suoritetaan uusi ohutlevykromatografinen ajo.

5.5.2 Fluorodensitometriset mittaukset

Aflatoksiini $B_1$ -täplien fluoresenssin voimakkuus mitataan fluorodensitometrillä (4.12) käyttäen viritysaallonpituutena 365 nm ja emissioaallonpituutena 443 nm. Aflatoksiini $B_1$:n määrä uutteen täplissä määritetään vertaamalla niiden fluoresenssin voimakkuuksia aflatoksiini $B_1$ -standardin täplien voimakkuuksiin.

5.6 *Aflatoksiini $B_1$:n tunnistamisen varmistus*

Aflatoksiini $B_1$:n tunnistaminen varmistetaan seuraavassa esitetyllä tavalla.

5.6.1 Rikkihappokäsittely

Ruiskutetaan rikkihappoa (3.13) 5.4 kohdan mukaisesti saadulle kromatogrammille. Aflatoksiini $B_1$:n täplien fluoresenssin täytyy muuttua UV-valossa sinisestä keltaiseksi.

5.6.2 Aflatoksiini $B_1$ -hemiasetaalin (aflatoksiini $B_{2a}$) muodostumisen sisältävä kaksisuuntainen kromatografia

*Huom.:* Seuraavassa esitetyt toimenpiteet on suoritettava noudattaen huolellisesti kuvassa 3 esitettyä kaaviota.

5.6.2.1 Liuosten pipetointi

▼B

Levylle (4.8) tehdään liuotinrintamien liikkumisen rajoittamiseksi kaksi vierekkäisten sivujen suuntaista suoraa uraa (6 cm sisäänpäin kummaltakin sivulta). Levylle pipetoidaan kapillaaripipettejä tai mikroruiskuja käyttäen täpliksi seuraavat liuokset:

— *pisteeseen A:* erä 5.3 kohdassa saadun näytteen puhdistettua uutetta, joka sisältää noin 2,5 ng aflatoksiini $B_1$:tä;

— *pisteisiin B ja C:* 25 µl standardiliuosta (3.16).

5.6.2.2 Kehitys

Kromatogrammi kehitetään suuntaan I pimeässä käyttäen kehitykseen ajoliuosta (3.18.1) (1 cm:n kerros kyllästämättömässä kammiossa), kunnes liuotinrintama saavuttaa liuotinta rajoittavan uran.

Levy otetaan kammiosta ja annetaan kuivua pimeässä huoneenlämmössä viiden minuutin ajan. Ruiskutetaan kloorivetyhappoa (3.12) pisteet A ja B peittävää 2,5 cm leveää vyöhykettä myöten (osoitettu viivoituksella kuvassa 3), kunnes se tummenee, muu osa levystä suojataan lasilevyllä. Annetaan reagoida 10 minuuttia pimeässä ja kuivataan ilmavirralla huoneenlämmössä.

Kromatogrammi kehitetään seuraavaksi pimeässä suuntaan II, käyttäen ajoliuosta (3.18.1) (1 cm:n kerros kyllästämättömässä kammiossa) kunnes liuotinrintama saavuttaa liuotinta rajoittavan uran. Levy poistetaan kammiosta ja sen annetaan kuivua huoneenlämmössä.

5.6.2.3 Kromatogrammin tulkinta

Kromatogrammia tarkastellaan UV-valossa (4.9) ja siitä tarkistetaan seuraavat piirteet:

a) C kohtaan pipetoidusta standardiliuoksesta peräisin oleva aflatoksiini $B_1$:n sinisen fluoresoivan täplän esiintyminen (liikkumissuuntaan I).

b) Reagoimattoman (kloorivetyhapon kanssa) aflatoksiini $B_1$:n sinisen fluoresoivan täplän esiintyminen ja aflatoksiini $B_1$ -hemiasetaalin voimakkaamman sinisen fluoresoivan täplän esiintyminen, jotka molemmat ovat peräisin B kohtaan pipetoidusta standardiliuoksesta (liikkumissuuntaan II).

c) b kohdassa kuvattuja täpliä vastaavien täplien esiintyminen, jotka ovat peräisin A kohtaan pipetoidusta näytteestä. Näiden täplien asema määritetään ensin aflatoksiini $B_1$:n etäisyydestä A kohdasta liikkumissuunnassa I (sama kuin C kohtaan pipetoidun standardin matka), ja tämän jälkeen aflatoksiini $B_1$ -hemiasetaalin liikkumisetäisyydet tästä liikkumissuunnassa II (sama kuin B kohtaan pipetoidun standardin liikkumamatka). Uutteesta ja B kohtaan pipetoidusta standardista peräisin olevien hemiasetaalitäplien fluoresenssivoimakkuuksien tulisi olla toisiaan vastaavia.

## 6 Tulosten laskeminen

6.1 *Visuaalisista mittauksista*

Aflatoksiini $B_1$:n pitoisuus ilmoitettuna µg/kg näytettä (ppb) saadaan kaavasta:

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

jossa:

Y on aflatoksiini $B_1$:n standardiliuoksen (3.16) ja X on vastaavasti samanlaisen fluoresenssivoimakkuuden omaavan uutteen tilavuus mikrolitroina;

S = aflatoksiini $B_1$ -pitoisuus standardiliuoksessa (3.16) mikrogrammoina millilitraa kohti;

V = uutteen lopputilavuus mikrolitroina ottaen huomioon kaikki tarpeelliset laimennukset;

W = pylväässä puhdistetun uutteen tilavuutta vastaava näytteen paino grammoina.

▼B

6.2 *Fluorodensitometrisistä mittauksista*

Aflatoksiini $B_1$:n pitoisuus mikrogrammoina/kg näytettä saadaan kaavasta:

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

jossa:

Y = levylle täpläksi pipetoidun uutteen tilavuus mikrolitroina (10 tai 20 mikrolitraa);

S = uutetäplässä olevan aflatoksiini $B_1$:n määrä nanogrammoina (suhteessa Y arvoon), joka on saatu mittauksista;

V = uutteen lopputilavuus mikrolitroina, ottaen huomioon kaikki tarpeelliset laimennukset;

W = pylväässä puhdistetun uutteen tilavuutta vastaava näytteen paino grammoina.

7 **Standardiliuoksen (3.16) valmistus ja testaus**

7.1 *Aflatoksiini $B_1$ -pitoisuuden määritys*

Aflatoksiini $B_1$ -standardiliuos tehdään pitoisuudeltaan 8-10 µg/ml ja se valmistetaan kloroformiin (3.2) tai bentseeni/asetonitriili-seokseen (3.6). Absorptiospektri välillä 330-370 nm määritetään spektrofotometrin avulla (4.11).

Absorbanssi (A) mitataan 363 nm:ssa kloroformiliuoksilla tai 348 nm:ssa bentseeni/asetonitriili-seoksilla.

Aflatoksiini $B_1$:n konsentraatio mikrogrammoina millilitrassa liuosta lasketaan seuraavista kaavoista:

$\frac{312 \cdot A \cdot 1000}{20600}$ kloroformiliuoksilla;

$\frac{312 \cdot A \cdot 1000}{19800}$ bentseeni/asetonitriili-seoksilla.

Valmistetaan päivänvalolta suojattuna sopiva laimennus käyttöstandardiliuokseksi, jonka aflatoksiini $B_1$ -konsentraatio on noin 0,1 µg/ml. Jääkaapissa 4 ºC:ssa säilytettynä tämä liuos säilyy kaksi viikkoa.

7.2 *Kromatografisen puhtauden testaus*

Levylle (4.8) pipetoidaan täpläksi 5 µl aflatoksiini $B_1$ -standardiliuosta, jonka pitoisuus on 8-10 µg/ml (ks. 7.1). Kromatogrammi kehitetään 5.4 kohdassa esitetyllä tavalla. Kromatogrammissa tulisi UV-valossa näkyä ainoastaan yksi täplä eikä näytteen alkuperäisellä pipetointivyöhykkeellä saa olla havaittavissa lainkaan fluoresenssia.

8 **Toistettavuus**

Saman henkilön samasta näytteestä tekemien kahden rinnakkaisen määrityksen tulosten välinen ero ei saa ylittää:

— 25 %, suurempaan tulokseen verrattuna, suuruudeltaan välillä 10-20 µg/kg olevilla aflatoksiini $B_1$ -pitoisuuksilla;

— 5 µg, absoluuttisena arvona annettuna, välillä 20-50 µg/kg olevilla aflatoksiini $B_1$ -pitoisuuksilla;

— 10 %, suurempaan arvoon verrattuna, yli 50 µg/kg olevilla pitoisuuksilla.

9 **Verrattavuus**

Ks. kohta ”Huomautukset”, C osa, 2 kohta.

▼M2

B. AFLATOKSIINI $B_1$:N MÄÄRITYS: SUUREN EROTUSKYVYN NESTEKROMATOGRAFINEN MENETELMÄ

1 **Tarkoitus ja soveltamisala**

Menetelmällä on mahdollista määrittää aflatoksiini $B_1$-pitoisuus rehuissa, mukaan lukien sitrushedelmämassaa sisältävät rehut. Määrityksen alaraja on 0,001 mg/kg (1 ppb).

2 **Periaate**

Näyte uutetaan kloroformilla. Uute suodatetaan ja tästä otetaan erä, joka puhdistetaan ensin Florisil-patruunalla ja tämän jälkeen $C_{18}$-patruunalla. Lopullinen erotus ja määritys suoritetaan suuren erotuskyvyn nestekromatografialla (HPLC) käyttäen $C_{18}$-käänteisfaasikolonnia ja tämän jälkeen kolonnin jälkeisten jodijohdannaisten valmistus mahdollistaa toteamisen fluoresenssilla.

*Huomautus:*

Mykotoksiinit ovat erittäin myrkyllisiä aineita. Niiden käsittely on suoritettava vetokaapissa. Erityisiin varotoimiin on ryhdyttävä niiden ollessa kuivassa muodossa, sillä ne ovat sähköstaattisia ja niillä on taipumus tämän vuoksi levitä työpinnoille.

3 **Reagenssit**

3.1 Kloroformi, stabiloitu 0,5-1,0 % (w/w) etanolilla. Ks. 10.2. huomautus.

3.2 Metanoli, HPLC-laatua, 3.6 seoksen valmistamiseen.

3.3 Asetoni.

3.4 Asetonitriili, HPLC-laatua.

3.5 Eluointiliuottimet: Valmistetaan käyttöä edeltävänä päivänä tai poistetaan ilma ultraäänikammiossa.

3.5.1 Asetoni (3.3)/vesi -seos, 98 + 2 (v + v).

3.5.2 Vesi/metanoli -seos (3.2), 80 + 20 (v + v).

3.5.3 Vesi/asetoni -seos (3.3), 85 + 15 (v + v).

3.6 Liikkuva faasi HPLC:a varten.

Liikkuva faasi koostuu vedestä, metanolista (3.2) ja asetonitriilistä (3.4), 130 + 70 + 40 (v + v + v).

*HUOMAUTUS:* Liikkuvan faasin koostumusta voidaan muuttaa käytetyn HPLC-kolonnin erityisominaisuuksien mukaisesti.

3.7 Kylläinen jodiliuos. Lisätään 2 g jodia 400 ml:aan vettä. Sekoitetaan vähintään 90 minuuttia ja suodatetaan kalvosuodattimen (4.15) läpi. Kylläinen liuos on suojattava valolta valohajoamisen estämiseksi.

3.8 Hapolla pesty Celite 545 tai vastaava tuote.

3.9 Florisil-patruuna (Waters SEP-PAK tai vastaava tuote).

3.10 $C_{18}$-patruuna (Waters SEP-PAK tai vastaava tuote).

3.11 Inertti kaasu, esim. typpi.

3.12 Aflatoksiini $B_1$ -standardiliuos kloroformissa, pitoisuus 10 µg/ml. Liuoksen pitoisuus tarkistetaan seuraavasti: määritetään liuoksen absorptiospektri välillä 330-370 nm spektrofotometriä (4.23) käyttäen. Mitataan absorbanssi (A) 363 nm:ä lähellä olevan enimmäisabsorption kohdalta. Lasketaan liuoksen aflatoksiini $B_1$ -pitoisuus mikrogrammoina millilitrassa liuosta kaavalla:

$$\text{pitoisuus } (\mu g/ml) = \frac{312 \times A \times 1000}{22300} = 13,991 \times A$$

3.1.2.1 Aflatoksiini $B_1$:n standardikantaliuos kloroformissa.

Siirretään kvantitatiivisesti 2,5 ml aflatoksiini $B_1$ -standardiliuosta (3.12) 50 ml:n mittapulloon ja täytetään merkkiin asti kloroformilla (3.1) Tämä liuos säilytetään alumiinifolioon käärityssä hyvin suljetussa pullossa viileässä (4 ºC) ja pimeässä.

3.13 Aflatoksiini $B_1$:n HPLC-standardiliuokset.

▼M2

*HUOMAUTUS:* Näiden liuosten valmistamiseen on käytettävä hapolla pestyjä lasiastioita (ks. 4 kohta, välineistö).

3.13.1 Standardiliuos 4 ng/ml.

Annetaan standardikantaliuosta (3.12.1) sisältävän mittapullon lämmetä alumiinifolioon käärittynä huoneenlämpöiseksi (muutaman tunnin ajan). Siirretään 400 µl standardikantaliuosta (200 ng aflatoksiini $B_1$:tä) 50 ml:n mittapulloon ja haihdutetaan liuos kuivaksi inertissä kaasuvirrassa (3.11). Liuotetaan saatu jäännös noin 20 ml:aan vesi/asetoni -seosta (3.5.3), täytetään pullon merkkiin asti vesi/asetoni -seoksella ja sekoitetaan hyvin.

3.13.2 Standardiliuos 3 ng/ml.

Siirretään kvantitatiivisesti 7,5 ml standardiliuosta (3.13.1) 10 ml:n mittapulloon, täytetään merkkiin asti vesi/asetoni -seoksella (3.5.3) ja sekoitetaan hyvin.

3.13.3 Standardiliuos 2 ng/ml.

Siirretään kvantitatiivisesti 25 ml standardiliuosta (3.13.1) 50 ml:n mittapulloon, täytetään merkkiin asti vesi/asetoni -seoksella (3.5.3) ja sekoitetaan hyvin.

Tätä liuosta käytetään myös standardiliuoksena HPLC-ajon (5.5) injektointien toistoihin.

3.13.4 Standardiliuos 1 ng/ml.

Siirretään kvantitatiivisesti 2,5 ml standardiliuosta (3.13.1) 10 ml:n mittapulloon, täytetään merkkiin asti vesi/asetoni -seoksella (3.5.3) ja sekoitetaan hyvin.

3.14 Ampulli, joka sisältää 1 ml:n seosta, joka koostuu kloroformissa olevista aflatoksiineista $B_1$, $B_2$, $G_1$ ja $G_2$, joiden pitoisuudet ovat vastaavasti noin 1, 0,5, 1 ja 0,5 µg/ml.

3.14.1 Kromatografisen erottumisen koeliuos.

Siirretään ampullin (3.14) sisältö lasitulpalla varustettuun koeputkeen tai pieneen kierrekorkilliseen pulloon. Siirretään 40 µl tätä liuosta lasitulpalliseen koeputkeen (happopesty) (4.22). Haihdutetaan kloroformi inertissä kaasuvirrassa (3.11) ja liuotetaan uudelleen 10 ml:aan vesi/asetoni -seosta (3.5.3).

3.15 Varmistuskokeen (6) reagenssit.

3.15.1 Kylläinen natriumkloridiliuos.

3.15.2 Vedetön, rakeinen natriumsulfaatti.

4 **Välineistö**

*Varoitus:* Hapolla pesemätön lasitavara voi aiheuttaa hävikkiä vesipitoisissa aflatoksiiniliuoksissa. On huolehdittava erityisesti uuden lasitavaran ja kertakäyttöisen lasitavaran, kuten automaattisen injektorin pullojen ja Pasteur-pipettien käsittelystä. Tämän vuoksi vesipitoisten aflatoksiini $B_1$-liuosten kanssa kosketukseen joutuvat lasitavarat on upotettava laimeaan happoon (esimerkiksi rikkihappo, 2 mol/l) usean tunnin ajaksi ja huuhdeltava tämän jälkeen hyvin tislatulla vedellä kaiken jäljellä olevan hapon poistamiseksi (esimerkiksi kolme kertaa, tarkastus pH-paperilla). Tämä käsittely on käytännössä suoritettava pyöreäpohjaiselle keittopullolle (4.4), mittapulloille, mittalaseille, pulloille tai putkille, joita käytetään standardiliuoksia ja lopullisia uutteita varten (erityisesti automaattisen injektorin pulloille), ja Pasteur-pipeteille, jos niitä käytetään standardiliuosten tai uutteiden siirtoon.

4.1 Jauhatus-sekoituslaite.

4.2 Seula, jonka silmäkoko on 1,0 mm (ISO R 565).

4.3 Mekaaninen ravistelija.

4.4 Pyöröhaihdutin ja 150-250 ml:n pyöreäpohjaisia keittopulloja.

4.5 Suuren erotuskyvyn nestekromatografi, jonka injektorissa on 250 µl:n injektioon soveltuva silmukka. Silmukan osittainen tai täydellinen täyttö on selitetty valmistajan toimittamissa ohjeissa.

4.6 HPLC-kolonni, joka on täytetty 3 µm:n tai 5 µm:n $C_{18}$-hiukkasilla.

4.7 Pulssiton pumppu kolonnin jälkeisen jodireagenssin annosteluun.

▼M2

4.8 Ruostumattomasta teräksestä valmistettu T-yhde (1/16” × 0,75 mm), jossa ei ole kuollutta tilavuutta.

4.9 Reaktiokierukka, teflonia tai ruostumatonta terästä. Kooltaan 3 000 × 0,5 mm − 5 000 × 0,5 mm olevia kierukoita voidaan käyttää 5 µm:n tai 3 µm:n HPLC-kolonnien kanssa.

4.10 Termostaattisesti säädeltävä 60 ºC:seen säädetty vesihaude, jonka lämpötilan säädettävyys on vähintään 0,1 ºC.

4.11 Fluoresenssidetektori, jossa eksitaatioaallonpituutena on 365 nm ja emissioaallopituutena 435 nm (suodatinlaitteissa emissioaallonpituus > 400 nm). Vähintään 0,05 ng aflatoksiini $B_1$:tä on oltava mahdollista havaita. Läpivirtauskyvettiin muodostuvien ilmakuplien poistamiseksi on suositeltavaa muodostaa tietty vastapaine (esimerkiksi käyttäen paineensäädintä tai teflonista tai ruostumattomasta teräksestä valmistettua detektorin ulostuloaukkoon yhdistettyä kierukkaa).

4.12 Piirturi.

4.13 Elektroninen integraattori (vaihtoehtoinen laite).

4.14 Halkaisijaltaan 24 cm oleva laskostettu suodatinpaperi, Macherey-Nagel 617 1/4 tai vastaava.

4.15 Huokoisuudeltaan 0,45 µm oleva kalvosuodatin, Millipore HAWP 04700 tai vastaava.

4.16 Vetoisuudeltaan 500 ml oleva tulpallinen erlenmeyerkolvi.

4.17 Luer-liittimellä varustettu lasikolonni (sisähalkaisija noin 1 cm, pituus noin 30 cm).

4.18 Kloroformia kestävä Luer-liittimellä varustettu hana (esim. Bio-rad 7328017, Analytichem A1 6078, J. T. Baker 4514 tai vastaava).

4.19 Vetoisuudeltaan 10 ml oleva kemikaaleja kestävä Luer-liittimellä varustettu ruisku.

4.20 Vetoisuudeltaan 250 µl oleva HPLC-injektointiin sopiva ruisku (ks. 4.5).

4.21 Vetoisuudeltaan 100 µl oleva mikroruisku standardiliuosten valmistamiseen (tarkastetaan punnitsemalla, että tarkkuus on 2 %:n rajoissa).

4.22 Tulpalla ja 10 ml:n asteikolla varustettuja koeputkia.

4.23 Spektrofotometri, jota voidaan käyttää absorptiospektrin UV-alueella.

4.24 Varmistuskokeeseen (6) tarvittava välineistö.

4.24.1 Hapolla huuhdeltu 100 ml:n erotussuppilo, jossa teflonhana.

4.24.2 Lämpöblokki, 40-50 ºC.

5 **Menettely**

5.1 *Näytteen esikäsittely*

Näyte jauhetaan siten, että se läpäisee seulan (4.2.).

5.2 *Näytteenotto*

Punnitaan 50,0 g tällä tavoin esikäsiteltyä näytettä erlenmeyerkolviin (4.16).

5.3 *Uutto*

Lisätään näytteeseen (5.2) 25 g Celiteä (3.8), 250 ml kloroformia (3.1) ja 25 ml vettä. Suljetaan pullo ja ravistellaan 30 minuuttia mekaanisella ravistelijalla (4.3). Suodatetaan laskostetun suodatinpaperin (4.14) läpi. Kerätään 50 ml suodosta. Tarvittaessa otetaan suodoksesta osanäyte, joka laimennetaan 50 ml:ksi kloroformilla siten, että aflatoksiini $B_1$ -pitoisuus ei ylitä 4 ng/ml.

▼M2

5.4 *Puhdistus* (toimenpiteet on tehtävä ilman merkittäviä keskeytyksiä)

Varoitus:

— laboratorio, jossa määritykset suoritetaan, on suojattava päivänvalolta. Tämä voidaan toteuttaa käyttäen:

1) ikkunoissa UV-säteilyä absorboivaa kalvoa sekä himmentämällä valoa (ei suoraa auringonvaloa);

2) verhoja tai pimennyskaihtimia sekä keinovaloa (fluoresoivat loisteputket ovat hyväksyttäviä);

— Aflatoksiinia sisältävät liuokset on suojattava valolta mahdollisimman hyvin (ne on säilytettävä pimeässä ja peitettävä alumiinifoliolla).

5.4.1 Florisil SEP-PAK -puhdistus

5.4.1.1 Kolonni-patruuna-yhdistelmän esikäsittely

Liitetään hana (4.18) Florisil-patruunan (3.9) lyhyempään liitososaan (ks. kuva 1). Pestään patruuna ja poistetaan ilma käyttäen 10 ml kloroformia (3.1) josta 8 ml painetaan nopeasti ruiskulla (4.19) hanan kautta patruunan läpi. Patruunan pidempi liitososa kiinnitetään lasikolonniin (4.17) ja jäljellä oleva 2 ml:n erä kloroformia johdetaan patruunan läpi kolonniin. Suljetaan hana. Poistetaan ruisku.

5.4.1.2 Puhdistus

Kohdassa 5.3. kerätty suodos johdetaan kolonni-patruuna -yhdistelmään ja annetaan imeytyä painovoiman avulla. Huuhdellaan 5 ml:lla kloroformia (3.1) ja tämän jälkeen 20 ml:lla metanolia (3.2). Heitetään eluaatit pois. Näiden toimenpiteiden aikana on huolehdittava siitä, että kolonni -patruuna -yhdistelmä ei pääse kuivumaan. Aflatoksiini $B_1$ eluoidaan 40 ml:lla asetoni/vesi -seosta (3.5.1) ja koko eluaatti kerätään talteen pyöröhaihduttajan (4.4) pyöreäpohjaiseen keittopulloon. Väkevöidään eluaatti pyöröhaihduttajassa 40-50 ºC:n lämpötilassa kunnes asetonia ei enää tislaudu. (*Huomautus:* Tässä vaiheessa nestettä jää pulloon noin 0,5 ml. Kokemus on osoittanut, että lisähaihdutus ei ole haitaksi ja että jos nestettä jää 0,5 ml, asetonia ei ole enää merkittäviä määriä jäljellä. Asetonijäämät voivat aiheuttaa aflatoksiini $B_1$:n hävikkiä $C_{18}$-patruunalla). Lisätään 1 ml metanolia (3.2), ravistellaan pulloa aflatoksiini $B_1$:n liuottamiseksi, lisätään 4 ml vettä ja sekoitetaan. Irrotetaan patruuna ja heitetään se pois. Huuhdellaan lasikolonni vedellä ja säästetään se $C_{18}$-puhdistusta varten.

5.4.2 $C_{18}$-SEP-PAK -puhdistus

5.4.2.1. Kolonni-patruuna-yhdistelmän esikäsittely.

Liitetään hana (4.18) $C_{18}$-patruunan lyhyempään liitososaan (3.10) (ks. kuva 1). Huuhdellaan patruuna ja poistetaan ilma painaen 10 ml metanolia (3.2) nopeasti ruiskulla (4.19) hanan kautta patruunaan (patruunassa olevat ilmakuplat näkyvät vaaleina laikkuina harmahtavaa taustaa vasten). Otetaan 10 ml vettä ja injektoidaan 8 ml:n erä patruunan läpi (siirryttäessä metanolista veteen on vältettävä ilman pääsyä patruunaan). Patruunan pidempi liitososa kiinnitetään lasikolonniin (4.17) ja jäljellä oleva 2 ml vettä johdetaan patruunan läpi kolonniin. Suljetaan hana. Poistetaan ruisku.

5.4.2.2 Puhdistus

Siirretään kohdassa 5.4.1.2. kerätty uute kvantitatiivisesti kolonniin (4.17), huuhdellaan pullo kaksi kertaa 5 ml:lla vesi/metanoli -seosta (3.5.2) ja annetaan sen imeytyä painovoiman avulla. Näiden toimenpiteiden aikana on huolehdittava siitä, että kolonni-patruuna -yhdistelmä ei pääse kuivumaan. (Jos patruunan viereiseen kavennukseen kehittyy ilmakuplia, virtaus on pysäytettävä ja lasikolonnin yläosaa on naputeltava kevyesti ilmakuplien poistamiseksi. Tämän jälkeen jatketaan suoritusta). Eluoidaan 25 ml:lla vesi/metanoli -seosta. Heitetään eluaatit pois. Aflatoksiini $B_1$ eluoidaan 50 ml:lla vesi/asetoni -seosta (3.5.3) ja koko eluaatti kerätään talteen 50 ml:n mittapulloon. Täytetään merkkiin asti vedellä ja sekoitetaan: tällä tavoin saatu koeliuos käytetään kromatografiaan (5.5).

*Varoitus:* Lopullisen uutteen suodatus ennen injektointia HPLC:in ei yleensä ole tarpeen. Jos tämä katsotaan tarpeelliseksi, on vältettävä selluloosasuodattimia, koska ne voivat johtaa aflatoksiini $B_1$:n hävikkiin. Teflonsuodattimet ovat hyväksyttäviä.

▼M2

5.5 *Suuren erotuskyvyn nestekromatografia*

(Laitteiston kokoonpano esitetään kuvassa 2). Laitteiden käyttökuntoon saattamiselle ja stabiloitumiselle on varattava riittävästi aikaa.

*Huomautus 1*

Liikkuvan faasin ja kolonnin jälkeisen reagenssin virtausnopeudet ovat vain ohjeellisia. Niitä voidaan muuttaa HPLC-kolonnin erityisominaisuuksien mukaisesti.

*Huomautus 2*

Aflatoksiini $B_1$:n vaste riippuu lämpötilasta. Tämän vuoksi on tehtävä ryömintää korjaava kompensointi (ks. kuva 3). Injektoimalla määrätty määrä standardiliuosta (3.13.3) säännöllisin välein (esimerkiksi joka kolmas injektio) näiden referenssistandardien väliset aflatoksiini $B_1$:n piikkien arvot voidaan korjata käyttäen vasteiden keskiarvoa. Peräkkäisten standardiliuosten välisten erojen on oltava hyvin pieniä (< 10 %). Tämän vuoksi injektiot on tehtävä keskeytyksettä. Jos keskeyttäminen on tarpeen, keskeytystä edeltävän viimeisen injektion ja keskeytyksen jälkeisen ensimmäisen injektion on oltava standardiliuoksen (3.13.3) injektointeja. Koska kalibrointikäyrä on lineaarinen ja kulkee origon kautta, näytteiden aflatoksiini $B_1$:n määrät määritetään suoraan niitä lähimpänä olevia standardiliuoksia käyttäen.

5.5.1 HPLC-pumpun säätäminen

HPLC-pumpun (4.5) virtausnopeus säädetään 5 µm:n tai 3 µm:n HPLC-kolonnille (4.6) vastaavasti arvoon 0,5 tai 0,3 ml/min liikkuvaa faasia (3.6) käytettäessä.

5.5.2 Kolonnin jälkeisen pumpun säätäminen

Pumpun (4.7) virtausnopeudeksi säädetään 0,2-0,4 ml/min jodilla kyllästettyä vesiliuosta (3.7) käytettäessä. Ohjeelliset virtausnopeudet: suuruudeltaan noin 0,4 tai 0,2 ml/min olevat virtausnopeudet ovat suositeltavia käytettäessä liikkuvalla faasilla (3.6) näitä vastaavina nopeuksina 0,5 ja 0,3 ml/min.

5.5.3 Fluoresenssidetektori

Säädetään fluoresenssidetektorin (4.11) eksitaatioaallonpituus 365 nm:iin ja emissioaallonpituus 435 nm:iin (suodatinlaite > 400 nm). Säädetään detektorin herkkyys siten, että piirturin poikkeamaksi saadaan noin 80 % täydestä asteikosta 1 ng:lla aflatoksiini $B_1$:tä.

5.5.4 Injektori

Kaikkia liuoksia injektoidaan 250 µl injektorin valmistajan ohjeiden mukaisesti.

5.5.5 Kromatografisen erottumisen tarkistus

Injektoidaan kromatografisen erottumisen koeliuos (3.14.1). Piikkien välisten käännepisteiden korkeuden on oltava alle 5 % viereisten piikkien korkeuksien summasta.

5.5.6 Järjestelmän stabiilisuuden tarkistus

Ennen kutakin määrityssarjaa injektoidaan referenssistandardia (3.13.3) useita kertoja kunnes piikkien pinta-alat eivät muutu (*Huomautus:* Kahden peräkkäisen injektion aflatoksiini $B_1$ -piikit eivät saa poiketa toisistaan yli 6 %). Suoritusta jatketaan välittömästi lineaarisuuden tarkistuksella (5.5.7).

5.5.7 Lineaarisuuden tarkistus

Injektoidaan aflatoksiini $B_1$ -standardiliuoksia (3.13.1-3.13.4). Käytetään joka kolmantena injektiona referenssistandardia (3.13.3) vasteissa esiintyvän ryöminnän korjaamiseksi (*Huomautus:* Referenssistandardien piikkien vasteet eivät saa poiketa toisistaan yli 10 %:a 90 minuutin aikana). Ryömintä korjataan 7 kohdassa esitetyn kaavan mukaisesti. Kalibrointikäyrän on oltava lineaarinen ja kuljettava origon kautta Y-estimaatin kaksinkertaisen keskivirheen rajoissa. Havaitut arvot eivät saa poiketa yli 3 %:a nimellisarvoista. Jos nämä edellytykset täyttyvät, suoritusta jatketaan keskeytyksettä. Jos näin ei ole, on selvitettävä ongelman syy ja tehtävä tarpeelliset korjaukset ennen suorituksen jatkamista.

5.5.8 Näyteuutteiden injektio

▼M2

Injektoidaan puhdistetut uutteet (5.4.2.2.). Joka toisen näyteuuteinjektion jälkeen injektoidaan uudelleen referenssistandardia (3.13.3) käyttäen seuraavaa jaksotusta: referenssistandardi, uute, uute, referenssistandardi, uute, uute, referenssistandardi jne.

6 **Varmistuskoe**

6.1 *Uutteen (5.4.2.2) jatkokäsittely*

Lisätään 5 ml natriumkloridiliuosta (3.15.1) 5.4.2.2. kohdassa saatuun lopulliseen uutteeseen. Uutetaan erotussuppilossa (4.24.1) kolme kertaa minuutin ajan käyttäen 2 ml kloroformia (3.1).

Suodatetaan saatu kloroformiuute noin 1 g:n suuruisen natriumsulfaatti (3.15.2) -kerroksen läpi 10 ml:n koeputkeen. Tähän voidaan käyttää pientä halkaisijaltaan 4 cm olevaa suppiloa, jonka kaulaan on asetettu lasivillatuppo ja tämän päälle noin 1 g natriumsulfaattia (3.15.2).

Natriumsulfaattikerros pestään muutamalla millilitralla kloroformia ja pesunesteet kerätään samaan koeputkeen. Kloroformiuute haihdutetaan kuivaksi samassa koeputkessa käyttäen lämpöblokkia (4.24.2) ja jäännös liuotetaan uudelleen 1 ml:aan kloroformia.

6.2 *Johdannaisen valmistaminen ja ohutlevykromatografia*

Ks. neuvoston direktiivi 76/372/ETY, liite, A menetelmä, 5.6.2. kohta.

7 **Tulosten laskeminen**

Näytteessä olevan aflatoksiini $B_1$:n pitoisuus lasketaan käyttäen kaavaa:

$$\text{aflatoksiini } B_1 \text{ : n pitoisuus } (\mu g/kg) = \frac{m \times V_{uute}}{V_m \times M \times \frac{V_s}{V_k}}$$

jossa:

m = näytteen alfatoksiini $B_1$:n piikkiä vastaava aflatoksiini $B_1$:n määrä nanogrammoina laskettuna seuraavasti:

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

P(näyte) = näytteen aflatoksiini $B_1$:n piikin pinta-ala

$P(st_1)$ = näytteen injektointia edeltävän referenssistandardin (3.13.3) aflatoksiini $B_1$:n piikin pinta-ala

$P(st_2)$ = näytteen injektointia seuraavan referenssistandardin (3.13.3) aflatoksiini $B_1$:n piikin pinta-ala

r(st) = injektoidun referenssistandardin (3.13.3) aflatoksiini $B_1$:n määrä nanogrammoina

$V_m$ = injektoidun näyteuutteen tilavuus millilitroina

$V_{uute}$ = näyteuutteen lopullinen tilavuus millilitroina ottaen huomioon kaikki suoritetut laimennukset (5.3)

M = näytteen massa grammoina

$V_s$ = Florisil-patruunaan (5.4.1.2) siirretyn suodoksen tilavuus millilitroina

$V_k$ = näytteen uuttamiseen käytetyn kloroformin tilavuus millilitroina

Jos määritys suoritetaan tämän ohjeen mukaisesti, kaava supistuu muotoon:

aflatoksiini $B_1$:n pitoisuus (μg/kg) = 20 × m.

7.1 Laskutoimitukset voidaan suorittaa myös käyttäen piikkien korkeuksia.

8 **Toistettavuus**

Ks. 10.1 kohta.

▼M2

9 **Uusittavuus**

Ks. 10.1 kohta.

10 **Huomautukset**

10.1 *Toistotarkkuus*

Kansainvälisellä tasolla rehuseoksista suoritetussa yhteistutkimuksessa [1] saatiin seuraavat taulukossa 1 esitetyt toistettavuus- ja uusittavuustulokset. Tässä käytetty ilmaisu toistettavuus (r) määritellään suurimmaksi lukusuhteeksi, joka ei ole merkitsevä 95 % todennäköisyydellä verrattaessa samasta näytteestä samassa laboratoriossa ja samanlaisissa koeolosuhteissa saatua kahta tulosta toisiinsa. Ilmaisu uusittavuus (R) määritellään samoin verrattaessa kahdessa eri laboratoriossa saatuja tuloksia. Standardin ISO 3534-1977 2.35 kohdan [2] ja komission päätöksen 89/610/ETY [3] mukaisesti r ja R esitetään taulukossa 1 myös variaatiokertoimina.

*Taulukko 1*

**Toistettavuus (r) ja uusittavuus (R) ilmoitettuna ja variaatiokertoimina**

(15 laboratoriota)

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

(*) CV = variaatiokerroin

10.2 *Kloroformin (3.1) stabilointi*

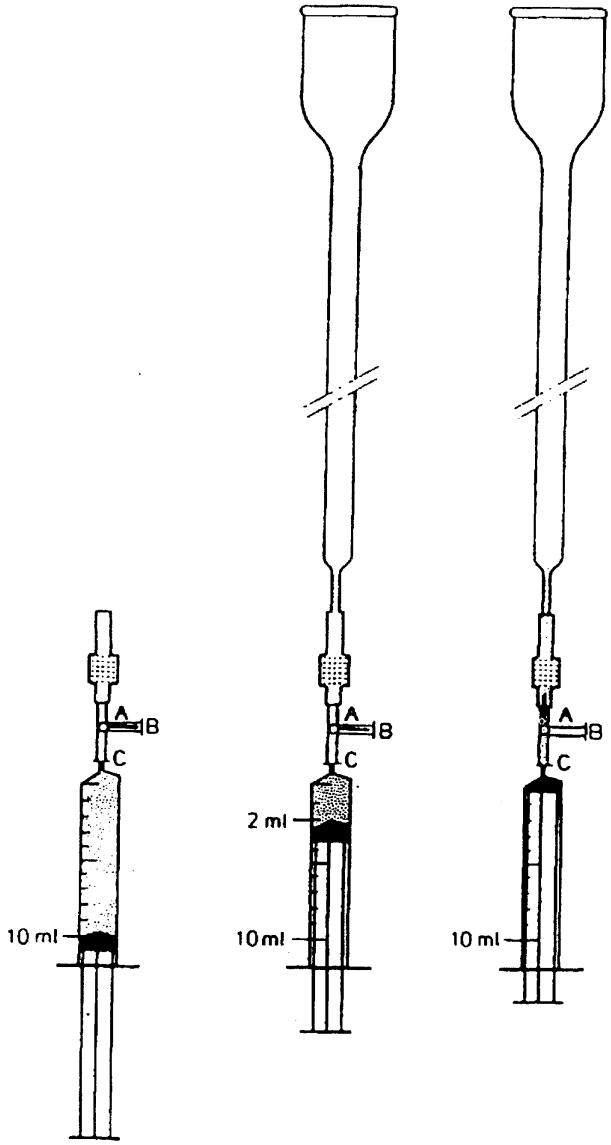
Florisil-patruunan adsorption erityisominaisuuksia voidaan muuttaa, jos käytetään muita stabilointiaineita kuin etanolia. Tämä on varmistettava 10.3 kohdan mukaiseksi, jos kuvattua kloroformia ei ole saatavissa.

10.3 *Tarkkuus*

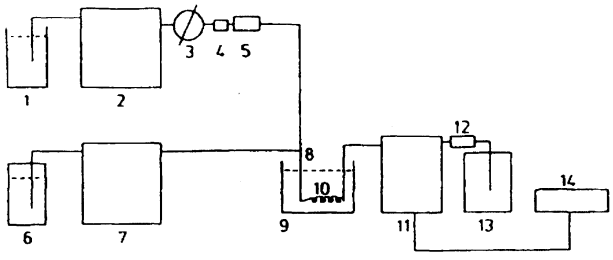
Menetelmän oikea soveltaminen on varmistettava suorittamalla kaksoismittaukset varmistetuilla referenssiaineilla. Jos niitä ei ole saatavissa, menetelmän toimivuus on varmistettava takaisinsaantokokeilla, joissa nollanäytteisiin on lisätty tutkittavaa yhdistettä. Keskiarvon ja todellisen arvon välinen poikkeama, ilmoitettuna prosentteina todellisesta arvosta, ei saa olla rajojen −20 % ja + 10 % ulkopuolella.

(1) Van Egmond, H. P., Heisterkamp, S. H. ja Paulsch, W. E. (1991). *Food Additives and Contaminants* 8, 17-29
(2) ISO 3534-1977
(3) EYVL N:o L 351, 2.12.1989, s. 39

▼**M2**



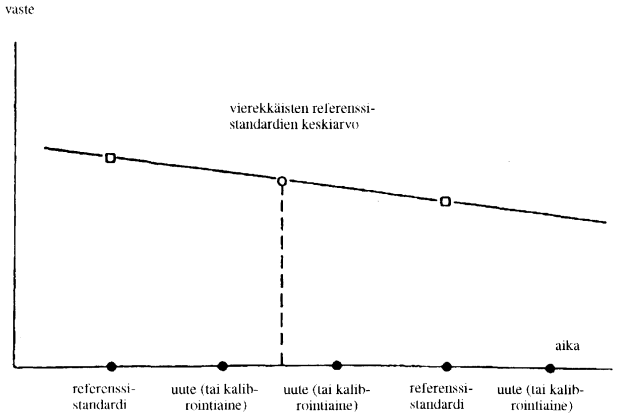

*Kuva 1: Kolonni-patrunna -yhdistelmä*




1. Liikkuva faasi
2. Pumppu
3. Injektioventtiili
4. Esikolonni
5. HPLC-kolonni
6. Kylläinen jodiliuos
7. kolonnin jälkeinen reagenssipumppu
8. T-yhde
9. Termostoitu haude
10. reaktiokierukka
11. Fluoresenssidetektori
12. Paineensäädin
13. Jätesäiliö
14. Piirturi/integraattori

*Kuva 2: Kolonnin jälkeisten jodijohdannaisten valmistuksen sisältävän nestekromatografialaitteiston kaavio*

▼M2




*Kuva 3: Aflatoksiini B1:n vasteen ryömintäkompensointi säännöllisin välein injektoidulla standardiliuoksella (3.13.3)*

▼M3

C. OBSERVATIONS CONCERNING METHODS A AND B

1 **Defatting**

Samples containing more than 5 % fats must be defatted with light petroleum (bp 40 to 60 ºC) after the preparations indicated in 5.1.

In such cases, the analytical results must be expressed in terms of the weight of the non-defatted sample.

2 **Reproducibility of the results for Method A**

The reproducibility of the results, i.e. the variation between the results obtained by two or more laboratories on the same sample has been estimated at:

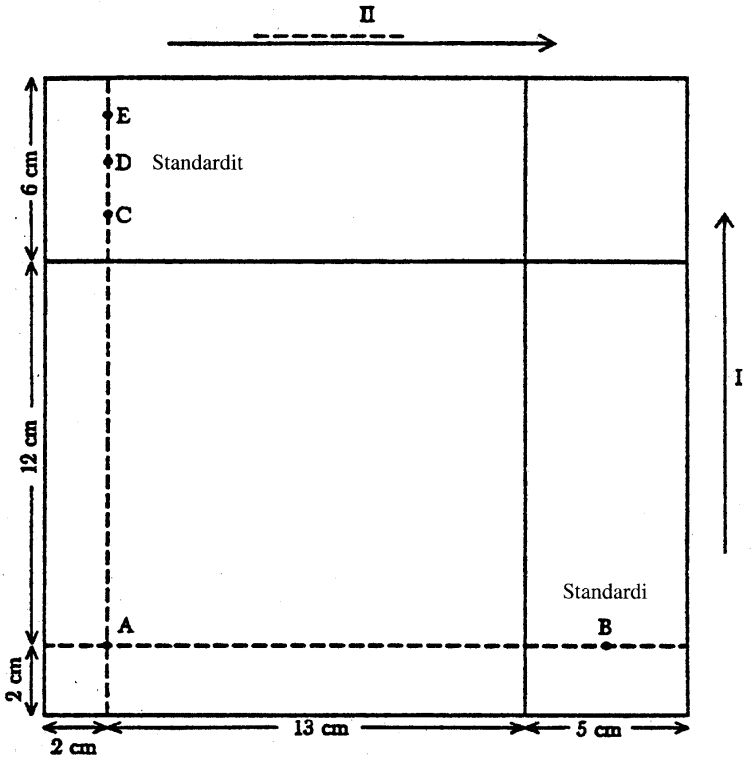
± 50 % of the mean value for mean values of aflatoxin B, from 10 and up to 20 µg/kg;

± 10 µg/kg on the mean value for mean values greater than 20 and up to 50 µg/kg;

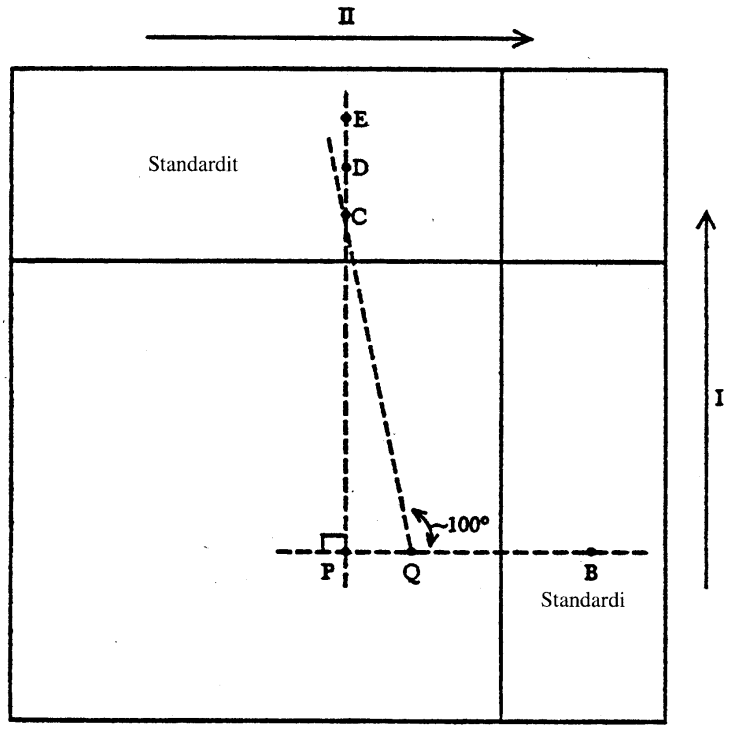
± 20 % of the mean value for mean values above 50 µg/kg.

▼B

*LIITE*

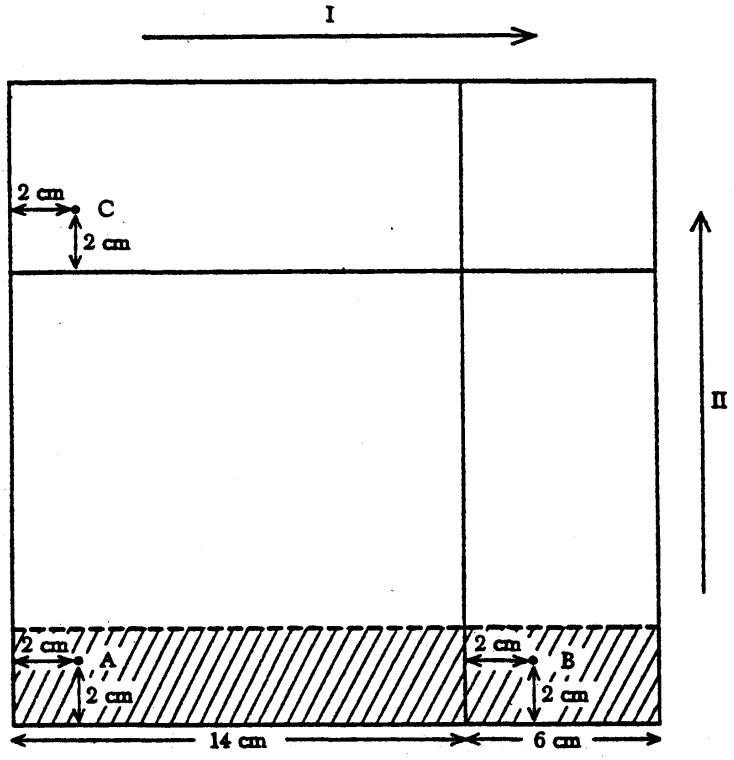



*Kuva 1*




*Kuva 2*

▼B




*Kuva 3*