Detta dokument är endast avsett som dokumentationshjälpmedel och institutionerna ansvarar inte för innehållet

►**B**

KOMMISSIONENS SJUNDE DIREKTIV
av den 1 mars 1976
om gemenskapsmetoder för analys vid den officiella foderkontrollen

(76/372/EEG)

(EGT L 102, 15.4.1976, s. 8)

Ändrat genom:

		Officiella tidningen		
		nr	sida	datum
►**M1**	Kommissionens direktiv 81/680/EEG av den 30 juli 1981	L 246	32	29.8.1981
►**M2**	Kommissionens direktiv 92/95/EEG av den 9 november 1992	L 327	54	13.11.1992
►**M3**	Commission Directive 94/14/EC of 29 March 1994 (*)	L 94	30	13.4.1994

(*) Denna rättsakt finns inte publicerad på svenska.

▼B

KOMMISSIONENS SJUNDE DIREKTIV

av den 1 mars 1976

om gemenskapsmetoder för analys vid den officiella foderkontrollen

(76/372/EEG)

EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS KOMMISSION HAR ANTAGIT DETTA DIREKTIV

med beaktande av Fördraget om upprättandet av Europeiska ekonomiska gemenskapen,

med beaktande av rådets direktiv av den 20 juli 1970 om införande av gemenskapsmetoder för provtagning och analys vid den officiella foderkontrollen ([1]), senast ändrat genom anslutningsakten ([2]), särskilt artikel 2 i denna, och

med beaktande av följande:

I det ovan nämnda direktivet krävs att den officiella foderkontrollen skall utföras med användning av gemenskapsmetoder för provtagning och analys i syfte att kontrollera att fodret motsvarar de krav som framgår av bestämmelser i lagar och andra författningar beträffande foders kvalitet och sammansättning.

I kommissionens direktiv 71/250/EEG av den 15 juni 1971 ([3]), 71/393/EEG av den 18 november 1971 ([4]), 72/199/EEG av den 27 april 1972 ([5]), 73/46/EEG av den 5 december 1972 ([6]), 74/203/EEG av den 25 mars 1974 ([7]) och 75/84/EEG av den 20 december 1974 ([8]) har redan ett antal gemenskapsmetoder för analys fastställts. Mot bakgrund av den utveckling som därefter skett på området är det lämpligt att nu anta en sjunde metodsamling.

De åtgärder som beslutas om i detta direktiv är förenliga med Ständiga foderkommitténs yttrande.

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

Artikel 1

Medlemsstaterna skall kräva att analyser vid den officiella foderkontrollen skall utföras med de metoder som beskrivs i bilagan till detta direktiv då det gäller halter av aflatoxin B_1.

▼M1

▼B

Artikel 2

Medlemsstaterna skall senast den 1 oktober 1976 sätta i kraft de lagar och andra författningar som är nödvändiga för att följa detta direktiv. De skall genast underrätta kommissionen om detta.

Artikel 3

Detta direktiv riktar sig till medlemsstaterna.

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

▼B

BILAGA

BESTÄMNING AV AFLATOXIN B_1

METOD A: ENDIMENSIONELL TUNNSKIKTSKROMATOGRAFI

▼M2

1. **Syfte och användningsområde**

Denna metod gör det möjligt att bestämma halten av aflatoxin B_1 i råvaror och oblandade foder. Metoden kan inte användas i närvaro av citruspulpa. Den minsta mängd som kan bestämmas är 0,01 mg/kg (10 ppb).

I närvaro av störande substanser måste analysen upprepas med metod B (HPLC-metod, vätskekromatografi).

▼B

2. **Princip**

Provet extraheras med kloroform. Extraktet filteras och en del av filtratet renas genom kolonnkromatografi på kiselgel. Eluatet indunstas och återstoden löses på nytt upp i en bestämd mängd kloroform eller blandning av bensen och acetonitril. En del av denna lösning undergår tunnskiktskromatografi (TK). Mängden aflatoxin B_1 bestäms under UV-bestrålning av kromatogrammet, antingen visuellt eller genom fluorodensitometri, under jämförelse med kända kvantiteter standardaflatoxin B_1. Identiteten hos det aflatoxin B_1 som extraheras ur fodret måste bekräftas med den metod som anges nedan.

3. **Reagens**

OBS! Samtliga reagens måste vara av ”analytisk kvalitet”, om inte annat anges.

3.1 Aceton.

3.2 Kloroform, stabiliserad med 0,5-1,0 % 96-procentig etanol (volymprocent).

3.3 N-hexan.

3.4 Metanol.

3.5 Vattenfri dietyleter, peroxidfri.

3.6 Blandning av bensen och acetonitril: 98/2 (volym/volym).

3.7 Blandning av kloroform (3.2) och metanol (3.4): 97/3 (volym/volym).

3.8 Kiselgel för kolonnkromatografi, partikelstorlek 0,05-0,20 mm.

3.9 Absorberande bomull, som avfettats med kloroform, eller glasull.

3.10 Natriumsulfat, vattenfri, i granulatform.

3.11 Inert gas, t.ex. kväve.

3.12 Saltsyra 1 M.

3.13 50-procentig svavelsyra (volymprocent).

3.14 Kiselgur (hyflosupercel), syratvättad.

3.15 Kiselgel G-HR eller motsvarande, för TK.

3.16 Standardlösning av cirka 0,1 µg aflatoxin B_1 per ml i kloroform (3.2) eller i blandningen av bensen och acetonitril (3.6). Lösningen skall beredas och kontrolleras enligt anvisningarna i punkt 7.

3.17 Standardlösning för kvalitativa prov med ett innehåll av cirka 0,1 µg aflatoxin B_1 och B_2 per ml i kloroform (3.2) eller blandningen av bensen och acetonitril (3.6). Dessa halter anges som riktvärde. De måste justeras så att båda aflatoxinerna får samma fluorescensintensitet.

3.18 Framkallningslösningar:

3.18.1 Kloroform (3.2)/aceton (3.1): 9/1 (volymprocent), omättad vanna.

▼B

3.18.2 Dietyleter (3.5)/metanol (3.4)/vatten: 96/3/1 (volym/volym/volym), omättad vanna.

3.18.3 Dietyleter (3.5)/metanol (3.4)/vatten: 96/4,5/1,5 (volym/volym/volym), mättad vanna.

3.18.4 Kloroform (3.2)/ metanol (3.4): 94/6 (volym/volym), mättad vanna.

3.18.5 Kloroform (3.2)/ metanol (3.4): 97/3 (volym/volym), mättad vanna.

4. **Utrustning**

4.1 Mixerkvarn.

4.2 Skakapparat eller magnetisk omrörare.

4.3 Veckfilterpapper, Schleicher och Schüll nr 588 eller motsvarande, diameter: 24 cm.

4.4 Glasrör för kromatografi (inre diameter: 22 mm, längd: 300 mm), med kran av polytetrafluoretylen och en 250 ml behållare.

4.5 Vakuumrotationsindunstare med 500 ml rundbottnad kolv.

4.6 500 ml koniska kolvar med proppar av matterat glas.

4.7 TK-utrustning.

4.8 Glasplattor för TK, 200 × 200 mm, behandlade på följande sätt (de angivna kvantiteterna räcker för att täcka fem plattor): Lägg 30 g kiselgel G-HR (3.15) i en konisk kolv. Tillsätt 60 ml vatten, tillslut och skaka om under en minut. Bred ut ett jämnt, 0,25 mm tjockt lager av suspensionen på plattorna. Låt lufttorka och förvara därefter plattorna i en exsickator som innehåller kiselgel. Aktivera plattorna innan de skall användas genom att sätta dem i ugnen vid 110 ºC under en timme.

Färdigtillverkade plattor är lämpliga om de ger liknande resultat som plattor vilka behandlats på här angivet sätt.

4.9 Långvågslampa för UV-ljus (360 nm). Bestrålningsintensiteten måste vara sådan att det är möjligt att klart urskilja en fläck av 1 ng aflatoxin B_1 på en TK-platta på ett avstånd av 10 cm från lampan.

4.10 10 ml mätcylindrar med proppar av polyetylen.

4.11 UV-spektralfotometer.

4.12 Fluorodensitometer (ej obligatoriskt).

5. **Utförande**

5.1 *Preparering av provet (se Anmärkningar, del C, punkt 1)*

Mal provet så att det i sin helhet passerar genom ett såll med 1 mm maskor (enligt ISO R 565).

5.2 *Extraktion*

Placera 50 g av det malda och homogeniserade provet i en 500 ml konisk kolv (4.6). Tillsätt 25 g kiselgur (3.14), 25 ml vatten och 250 ml kloroform (3.2). Tillslut kolven, skaka eller rör om under 30 minuter med apparat (4.2) och filtrera genom veckfilterpapper (4.3). Avlägsna de första tio millilitrarna av filtratet och samla därefter in 50 ml.

5.3 *Rengöring i kolonn*

Sätt en propp av bomull eller glasull (3.9) i nedre ändan av ett kromatografirör (4.4), fyll röret till två tredjedelar med kloroform (3.2) och tillsätt 5 g natriumsulfat (3.10).

Kontrollera att natriumsulfatskiktet upptill har en plan yta och tillsätt därefter 10 g kiselgel (3.8) i småportioner. Rör om noggrant efter varje tillsats så att alla luftbubblor avlägsnas. Låt stå under 15 minuter och tillsätt därefter försiktigt 15 g natriumsulfat (3.10). Låt vätskan sjunka tills den är precis ovanför natriumsulfatskiktets toppyta.

Blanda de 50 ml extrakt som insamlats enligt 5.2 med 100 ml n-hexan (3.3) och överför hela blandningen utan förlust till kolonnen. Låt vätskan sjunka tills den är precis ovanför natriumsulfatskiktets toppyta. Avlägsna denna uppslamning. Tillsätt därefter 100 ml dietyleter (3.5) och låt också detta sjunka till natriumsulfatskiktets

▼B

toppyta. Se under dessa moment till att flödeshastigheten är 8-12 ml/minut och att kolonnen inte tillåts torka. Avlägsna den vätska som avskiljs. Eluera därefter med 150 ml kloroform/metanolblandning (3.7) och samla in hela eluatet.

Indunsta eluatet tills det är nästan torrt med rotationsindunstaren (4.5) vid högst 50 ºC i en ström inert gas (3.11). Överför hela återstoden utan förlust i kloroform (3.2) eller en blandning av bensen/acetonitril (3.6) till en 10 ml mätcylinder (4.10). Koncentrera lösningen i en ström inert gas (3.11) och justera därefter volymen till 2 ml med kloroform (3.2) eller blandningen av bensen och acetonitril (3.6).

5.4 *Tunnskiktskromatografi*

Placera fläckvis följande volymer av standardlösningen och extraktet på en TK-platta (4.8) 2 cm från nedre kanten och med 2 cm mellanrum:

— 10, 15, 20, 30 och 40 µl standardlösning av aflatoxin B_1 (3.16),

— 10 µl av det extrakt som erhållits enligt 5.3 och *ovanpå detta* 20 µl standardlösning (3.16),

— 10 och 20 µl av det extrakt som erhållits enligt 5.3.

Framkalla kromatogrammet i mörker med någon av framkallningslösningarna (3.18). Valet av lösning måste ske i förväg genom att man placerar 25 µl av den kvalitativa standardlösningen (3.17) på plattan och kontrollerar att aflatoxin B_1 och B_2 är fullständigt separerade efter framkallning.

Låt lösningarna indunsta i mörker och bestråla därefter med UV-ljus med plattan 10 cm från lampan (4.9). Fläckarna av aflatoxin B_1 ger en blå fluorescens.

5.5 *Kvantitativa bestämningar*

Bestäm antingen visuellt eller genom fluorodensitometri enligt följande anvisningar:

5.5.1 Visuell mätning

Bestäm mängden aflatoxin B_1 i extraktet genom att jämföra fluorescensintensiteten hos extraktfläckarna med standardlösningsfläckarnas. Interpolera om så är nödvändigt. Den fluorescens som uppnås då extrakt och standardlösning lagts på varandra måste vara intensivare än vad 10 µl av extraktet ger och det får inte finnas mer än en synlig fläck. Om 10 µl av extraktet ger större fluorescensintensitet än 40 µl standardlösning skall extraktet spädas 10 eller 100 gånger med kloroform (3.2) eller bensen/acetonitrilblandning (3.6) innan det på nytt genomgår tunnskiktskromatografi.

5.5.2 Mätning med fluorodensitometri

Mät fluorescensintensiteten hos aflatoxin B_1-fläckarna med fluorodensitometern (4.12) exciteringsvåglängden 365 nm och emissionsvåglängden 443 nm. Bestäm mängden aflatoxin B_1 i fläckarna med extrakt genom att jämföra deras fluorescensintensitet med den hos fläckarna med standardaflatoxin B_1.

5.6 *Bekräftelse av identiteten hos aflatoxin B_1*

Bekräfta identiteten hos det aflatoxin B_1 som förekommer i extraktet med de processer som anges nedan.

5.6.1 Behandling med svavelsyra

Spruta svavelsyra (3.13) på det kromatogram som erhållits enligt 5.4. Fluorescensen hos fläckarna med aflatoxin B_1 måste övergå från blått till gult under UV-bestrålning.

5.6.2 Två dimensionell kromatografi med bildande av aflatoxin B_1-halvacetal (aflatoxin B_{1a})

OBS! Under de nedan beskrivna momenten måste diagrammet i figur 3 följas noggrant.

5.6.2.1 Applicering av lösningarna

Ritsa två räta linjer på plattan (4.8) parallellt med två angränsande sidor (6 cm in från vardera sidan) för att begränsa lösningsmedels-

▼B

fronternas migrering. Anbringa fläckar av följande lösningar på plattan med kapillärpipetter eller mikrosprutor:

— *på punkt A:* en volym renat extrakt (enligt 5.3) av provet som innehåller cirka 2,5 ng aflatoxin B_1,

— *på punkt B och C:* 25 µl standardlösning (3.16).

5.6.2.2 Framkallning

Framkalla kromatogrammet i mörker i riktning I med framkallningslösningen (3.18.1) (1 cm skikt i omättad vanna) tills lösningens front når gränslinjen för lösningen.

Avlägsna plattan från vannan och låt den torka i mörker vid omgivande temperatur under fem minuter. Spruta därefter saltsyra (3.12) längs en 2,5 cm hög remsa som täcker punkterna A och B (det skuggade området i figur 3) tills den mörknar och skydda samtidigt resten av plattan med en glasskiva. Låt reaktionen fortgå i mörker under 10 minuter och torka med en luftström vid omgivande temperatur.

Framkalla därefter kromatogrammet i mörker i riktning II med framkallningslösningen (3.18.1) (1 cm skikt i omättad vanna) tills lösningens front når gränslinjen för lösningen. Avlägsna plattan från vannan och låt den torka vid omgivande temperatur.

5.6.2.3 Tolkning av kromatogrammet

Granska kromatogrammet i UV-ljus (4.9) och kontrollera förekomsten av följande:

a) En blå fluorescerande fläck aflatoxin B_1 framträder som kommer från den standardlösning som applicerats på punkt C (migrering i riktning I).

b) En blå fluorescerande fläck aflatoxin B_1 som inte reagerat med saltsyran framträder samtidigt med en intensivare blå fluorescerande fläck aflatoxin B_1-halvacetal och båda fläckarna kommer från den standardlösning som applicerats på punkt C (migrering i riktning II).

c) Fläckar framträder som motsvarar dem som beskrivits i punkt b och som kommer från provextraktet som applicerats på punkt A. Dessa fläckars position definieras först genom migreringssträckan för aflatoxin B_1 från punkt A i riktning I (samma som för standardlösningen som applicerats på punkt C) och därefter genom migreringssträckorna för aflatoxin B_1-halvacetal därifrån i riktning II (samma som för standardlösningen som applicerats på punkt B). Fluorescensintensiteterna hos halvacetalfläckarna från extraktet respektive den standardlösning som applicerats på punkt B skall motsvara varandra.

6. Resultatberäkning

6.1 *Med visuell mätning*

Halten aflatoxin B_1 i mikrogram per kg av provet (ppb) erhålls med formeln:

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

där

Y och X är de volymer i mikroliter av standardlösningen aflatoxin B_1 (3.16) resp. extraktet som har liknande fluorescensintensitet,

S = standardlösningens (3.16) aflatoxin B_1-koncentration i mikrogram per ml,

V = extraktets slutliga volym i mikroliter, justerat efter eventuella utspädningar som visat sig nödvändiga,

W = vikt i gram av det prov som motsvarar den volym av extraktet som genomgått rengöring i kolonn.

6.2 *Med fluorodensitometrisk mätning*

Halten aflatoxin B_1 i mikrogram per kg av provet erhålls med formeln:

▼B

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

där

Y = volymen i mikroliter av det extrakt som har applicerats på plattan (10 eller 20 µl),

S = den mängd aflatoxin B_1 i nanogram i extraktfläcken (i proportion till värdet av Y), som framgår av beräkningarna,

V = extraktets slutliga volym i mikroliter, justerat efter eventuella utspädningar som visat sig nödvändiga,

W = vikt i gram av det prov som motsvarar den volym av extraktet som genomgått rengöring i kolonn.

7. **Preparering och test av standardlösningen (3.16)**

7.1 *Bestämning av aflatoxin B_1-koncentrationen*

Bered en standardlösning av aflatoxin B_1 i kloroform (3.2) eller bensen-acetonitrilblandning (3.6) med en koncentration av 8-10 µg/ml. Bestäm absorptionsspektrum mellan 330 och 370 nm med spektralfotometern (4.11).

Mät den optiska densiteten (A) vid 363 nm för kloroformlösning och vid 348 nm för lösning med bensen-acetonitrilblandning.

Beräkna aflatoxin B_1-koncentrationen i mikrogram per ml lösning med följande formler:

$\frac{312 \cdot A \cdot 1000}{20600}$ för kloroformlösning,

$\frac{312 \cdot A \cdot 1000}{19800}$ för lösning med bensen-acetonitriblblandning.

Späd i skydd för dagsljus så att en arbetsstandardlösning med en aflatoxin B_1-koncentration av cirka 0,1 µg/ml erhålls. Denna lösning är hållbar i två veckor om den förvaras i kylskåp vid 4 ºC.

7.2 *Test av kromatografisk renhet*

Applicera på en platta (4.8) en fläck av 5 µl standardlösning av aflatoxin B_1 som innehåller 8-10 µg/ml (7.1). Framkalla kromatogrammet enligt anvisningarna i 5.4. I UV-ljus skall kromatogrammet endast uppvisa en fläck och ingen fluorescens skall kunna iakttas i det område där lösningen applicerades.

8. **Repeterbarhet**

Skillnaden mellan resultaten av två parallella bestämningar som utförts på samma prov av samma analytiker får inte överstiga:

— 25 % av det högre resultatet för aflatoxin B_1-halter från 10 till och med 20 µg/kg,

— 5 µg, absolutvärde, för halter på över 20 och högst 50 µg/kg,

— 10 % av det högre resultatet för halter över 50 µg/kg.

9. **Reproducerbarhet**

Se Anmärkningar, del C, punkt 2.

▼M2

B. BESTÄMNING AV AFLATOXIN B_1. HPLC-METOD (vätskekromatografi).

1. **Syfte och användningsområde**

Denna metod är avsedd för bestämning av aflatoxin B_1 i djurfoder, inklusive djurfoder som innehåller citruspulpa. Den minsta mängd som kan bestämmas är 0,001 mg/kg (1 ppb).

2. **Princip**

Provet extraheras med kloroform. Extraktet filtreras och ett delprov renas på en Florisil-kolonn och därefter på en C_{18}-kolonn. Den slutliga separeringen och bestämningen görs med vätskekromatografi (HPLC), med användning av en omvänd-fas C_{18}-kolonn för HPLC

▼M2

och därpå följande derivatisering med jod i vatten samt fluorescensdetektering.

Obs: Mykotoxiner är mycket giftiga ämnen. De bör hanteras i ett speciellt dragskåp. Särskilda försiktighetsåtgärder bör vidtas när gifterna befinner sig i torrt tillstånd, eftersom de är elektrostatiska och har en tendens att spridas på arbetsplatsen.

3. **Reagens**

3.1 Kloroform, stabiliserad med 0,5-1,0 % (m/m) etanol. Se anmärkning 10.2.

3.2 Metanol, HPLC-kvalitet för beredning av 3.6.

3.3 Aceton.

3.4 Acetonitril, HPLC-kvalitet.

3.5 Elueringsmedel: Bered dagen före användningen eller avlägsna luften i lösningsmedlen med hjälp av ultraljud.

3.5.1 Aceton (3.3)/vatten, 98 + 2 (v + v).

3.5.2 Vatten/metanol (3.2), 80 + 20 (v + v).

3.5.3 Vatten/aceton (3.3), 85 + 15 (v + v).

3.6 Rörlig fas för HPLC.

Den rörliga fasen består av vatten, metanol (3.2) och acetonitril (3.4), 130 + 70 + 40 (v + v + v).

OBS: Den rörliga fasens sammansättning kan eventuellt behöva anpassas, beroende på vilken typ av HPLC-kolonn som används.

3.7 Mättad jodlösning. Tillsätt 2 g jod till 400 ml vatten. Blanda under minst 90 min. och filtrera sedan genom ett membranfilter (4.15). Den mättade lösningen skyddas mot ljus för att förhindra fotokemisk nedbrytning.

3.8 Syratvättad Celite 545, eller motsvarande.

3.9 Florisil-kolonn (Waters SEP-PAK), eller motsvarande.

3.10 C_{18}-kolonn (Waters SEP-PAK), eller motsvarande.

3.11 Inert gas, t. ex. kväve.

3.12 Aflatoxin B_1, standardlösning i kloroform, koncentration 10µg/ml. Kontrollera lösningens koncentration på följande sätt: Bestäm lösningens absorptionsspektrum till mellan 330 och 370 nm med hjälp av en spektrofotometer (4.23). Mät absorbansen (A) vid maximum nära 363 nm. Beräkna koncentrationen av aflatoxin B_1 i µg per ml lösning med formeln:

$$\text{Koncentration } (\text{èmg/ml}) = \frac{312 \times A \times 1000}{22300} = 13,991 \times A$$

3.12.1 Aflatoxin B_1, stamlösning i kloroform.

Överför 2,5 ml aflatoxin B_1, standardlösning (3.12), till en 50 ml mätkolv och fyll upp till märket med kloroform (3.1). Förvara lösningen svalt (4 ºC), mörkt, väl tillsluten och invirad i luminiumfolie.

3.13 Aflatoxin B_1 kalibreringslösningar för HPLC.

OBS: Använd syratvättade glaskärl vid beredning av lösningarna.(Se punkt 4, Utrustning).

3.13.1 Kalibreringslösning 4 ng/ml.

Låt mätkolven med stamlösning (3.12.1) värmas till rumstemperatur i aluminiumfolien (några timmar). Överför 400 µl av stamlösningen (200 ng aflatoxin B_1) till en 50 ml mätkolv och indunsta till torrhet i en ström av inert gas (3.11). Lös upp återstoden i ca 20 ml vatten/aceton (3.5.3), fyll upp till märket med vatten/aceton och blanda väl.

3.13.2 Kalibreringslösning 3 ng/ml.

▼M2

Överför 7,5 ml av kalibreringslösningen (3.13.1) till en 10 ml mätkolv, fyll upp till märket med vatten/aceton (3.5.3) och blanda väl.

3.13.3 Kalibreringslösning 2 ng/ml.

Överför 25 ml av kalibreringslösningen (3.13.1) till en 50 ml mätkolv, fyll upp till märket med vatten/aceton (3.5.3) och blanda väl.

Denna lösning kallas också referenslösning och används vid upprepad insprutning under HPLC (5.5).

3.13.4 Kalibreringslösning 1 ng/ml.

Överför 2,5 ml av kalibreringslösningen (3.13.1) till en 10 ml mätkolv, fyll upp till märket med vatten/aceton (3.5.3) och blanda väl.

3.14 Ampull med en blandning av aflatoxinerna B_1, B_2, G_1 och G_2 i koncentrationer på respektive ca 1, 0,5, 1 och 0,5 µg/ml i 1 ml kloroform.

3.14.1 Kromatografisk testlösning.

Överför ampullens innehåll (3.14) till ett provrör med glaspropp eller flaska med skruvlock. Överför 40 µl av lösningen till ett provrör med glaspropp (syratvättat) (4.22). Låt kloroformen avdunsta i en ström av inert gas (3.11) och lös åter upp i 10 ml vatten/aceton (3.5.3).

3.15 Reagens till kontrolltest (6).

3.15.1 Mättad natriumkloridlösning.

3.15.2 Vattenfritt granulerat natriumsulfat.

4. **Utrustning**

Varning! Om de glaskärl som används till vattenhaltiga aflatoxinlösningar inte är syratvättade kan detta leda till förluster. Nya glaskärl och glaskärl för engångsbruk bör hanteras särskilt försiktigt, t. ex småflaskor för provväxlare och Pasteurpipetter. Laboratorieglas som kommer i kontakt med vattenhaltiga aflatoxinlösningar bör därför läggas i blöt i utspädd syra (t. ex. svavelsyra = 2 mol/l) under flera timmar och därefter sköljas väl med destillerat vatten för att få bort all syra (t. ex. tre gånger, kontrollera med lackmuspapper). I praktiken krävs sådan behandling för den rundbottnade kolven (4.4), mätkolvar, mätglas, flaskor eller provrör som används till kalibreringslösningar och slutliga extrakt (särskilt småflaskor för provväxlare) och Pasteurpipetter, om sådana används för att överföra kalibreringslösningar eller extrakt.

4.1. Kvarn.

4.2. Såll med maskstorlek 1,0 mm, (ISO R 565).

4.3. Mekanisk skak.

4.4. Roterande vakuumtork, med rundbottnad kolv, 150-250 ml.

4.5. Utrustning för HPLC vätskekromatografi, injektor med en loop lämpad för insprutning av 250 µl. Se tillverkarens instruktioner för hur loopen skall fyllas, helt eller delvis.

4.6. HPLC-analyskolonn packad med C_{18}-partiklar på 3 µm eller 5 µm.

4.7. Pulsfri pump för tillförsel av jodreagens efter kromatografering på kolonn.

4.8. Valco's dödvolymskoppling (T-modell), rostfritt stål (1/16″ × 0,75 mm).

4.9. Spiralformad reaktionsslinga i teflon eller rostfritt stål. Dimensioner på 3 000 × 0,5 mm till 5 000 × 0,5 mm har visat sig passa till 5 µm eller 3 µm HPLC-kolonner.

4.10. Vattenbad med termostatkontroll, inställt på 60 ºC. Temperaturvariationen skall kunna hållas under 0,1 ºC.

4.11. Fluorescensdetektor, med 365 nm exciteringsvåglängd och 435 nm emissionsvåglängd. (För filterinstrument: emissionsvåglängd > 400 nm). Det skall vara möjligt att påvisa minst 0,05 ng aflatoxin B_1. Det kan vara lämpligt att använda ett visst mottryck (t. ex.

▼M2

tryckrestriktor, dvs. en spiral av teflon eller rostfritt stål förbunden med detektorns utgång), för att få bort luftbubblor i flödescellen.

4.12. Skrivare.

4.13. Elektronisk integrator (valfritt).

4.14. Veckat pappersfilter, 24 cm i diameter, Macherey-Nagel 617¼ eller motsvarande.

4.15. Membranfilter med en porositet på 0,45 µm, Millipore HAWP 04700 eller motsvarande.

4.16. 500 ml konisk kolv, med glaspropp.

4.17. Glaskolonn (inre diameter ca 1 cm, längd ca 30 cm), utrustad med Lueranpassad spets.

4.18. Kloroformresistent Lueranpassad kran (t. ex. Bio-rad 7328017, Analytichem A1 6078, J. T. Baker 4514 eller motsvarande).

4.19. Kemiskt resistent spruta, 10 ml, med Luerfattning.

4.20. Spruta för HPLC-insprutning av 250 µl (se 4.5).

4.21. 100 µl mikrospruta för beredning av kalibreringslösningar. (Kontrollera genom vägning att noggrannheten ligger inom 2 %.)

4.22. 10 ml graderade mätkolvar med glaspropp.

4.23. Spektrofotometer för mätning inom spektrats UV-område.

4.24. Utrustning för kontrolltest (6).

4.24.1. Syratvättad 100 ml separertratt med teflonkran.

4.24.2. Värmeenhet, 40-50 ºC.

5. **Utförande**

5.1. *Provberedning*

Mal provet så att det går igenom sållet (4.2.).

5.2. *Analysprov*

Väg upp 50 g av det preparerade provet i den koniska kolven (4.16).

5.3. *Extraktion*

Tillsätt 25 g Celite (3.8), 250 ml kloroform (3.1) och 25 ml vatten till analysprovet (5.2). Tillslut kolven och skaka under 30 min på en mekanisk skak (4.3). Filtrera genom ett veckat filter (4.14). Samla upp 50 ml av filtratet. Tag vid behov ett delprov av filtratet och späd med kloroform till 50 ml så att koncentrationen av aflatoxin B_1 inte överstiger 4 ng/ml.

5.4. *Rening (Reningen bör utföras utan betydande avbrott).*

Varning!

— Laboratoriet där analyserna utförs skall omsorgsfullt skyddas mot dagsljus. Detta kan ske med hjälp av:

  1) UV-absorberade beläggning på fönsterrutorna och dämpat ljus (ej direkt solljus).

  2) Gardiner eller persienner och artificiellt ljus (lysrör kan accepteras).

— Lösningar som innehåller aflatoxin skall i möjligaste mån skyddas mot ljus (förvara mörkt, använd aluminiumfolie).

5.4.1. Rening på Florisil SEP-PAK

5.4.1.1. Preparering av kolonnuppställningen

Montera en kran (4.18) på den korta delen av Florisil-kolonnen (3.9) (se bild 1). Tvätta kolonnen och avlägsna luften genom att ta 10 ml kloroform (3.1) och låta 8 ml gå genom kranen och snabbt passera kolonnen med hjälp av en spruta (4.19). Anslut Florisil-kolonnens långa del till en glaskolonn (4.17) och låt resterande 2 ml kloroform passera genom kolonnen till glaskolonnen. Stäng kranen. Ta bort sprutan.

5.4.1.2. Rening

▼M2

Filtratet som samlats upp i 5.3 placeras på kolonnuppställningen och får rinna ut med hjälp av tyngdkraften. Skölj med 5 ml kloroform (3.1) och därefter med 20 ml metanol (3.2). Kassera elueringsvätskorna. Se till att kolonnuppställningen inte blir torr under processen. Eluera aflatoxin B_1 med 40 ml aceton/vatten (3.5.1) och samla upp allt eluat i den rundbottnade kolven på den roterande torken (4.4). Koncentrera eluatet på den roterande torken vid 40-50 ºC tills destillationen av aceton avstannat. (*OBS:* Ca 0,5 ml vätska finns då kvar i kolven. Försök har visat att ytterligare avdunstning inte är skadlig och att det inte finns kvar någon signifikant mängd aceton när 0,5 ml vätska återstår. Rester av aceton kan leda till förluster av aflatoxin B_1 på C_{18}-kolonnen). Tillsätt 1 ml metanol (3.2), snurra kolven så att aflatoxin B_1 löses upp på kolvens sidor, tillsätt 4 ml vatten och blanda. Tag bort Florisilkolonnen och kassera den. Skölj glaskolonnen med vatten och spara den för C_{18}-reningen.

5.4.2. Rening på C_{18} SEP-PAK

5.4.2.1. Preparering av kolonnuppställningen

Montera en kran (4.18) på den korta delen av C_{18}-kolonnen (3.10) (se bild 1). Preparera kolonnen och avlägsna eventuell luft genom att med hjälp av en spruta (4.19) låta 10 ml metanol (3.2) gå genom kranen och snabbt passera kolven. (Luftbubblor i kolonnen syns som ljusa fläckar mot en i övrigt gråaktig bakgrund). Ta 10 ml vatten och låt 8 ml passera genom kolonnen. (Undvik att få in luft i kolonnen vid bytet från metanol till vatten). Anslut C_{18}-kolonnens långa del till en glaskolonn (4.17) och låt resterande 2 ml vatten passera genom C_{18}-kolonnen till glaskolonnen. Stäng kranen. Ta bort sprutan.

5.4.2.2. Rening

Överför extraktet som samlats upp i 5.4.1.2 till glaskolonnen (4.17), skölj kolven två gånger med 5 ml vatten/metanol (3.5.2) och låt rinna ut med hjälp av tyngdkraften. Se till att kolonnuppställningen inte blir torr under processen. (Om det bildas luftbubblor i den smala delen nära C_{18}-kolonnen — stoppa flödet och slå lätt på övre delen av glaskolonnen så att luftbubblorna försvinner. Fortsätt sedan.) Eluera med 25 ml vatten/metanol. Kassera eluatet. Eluera aflatoxin B_1 med 50 ml vatten/aceton (3.5.3) och samla upp allt eluat i en 50 ml mätkolv. Fyll med vatten till märket och blanda. Den provlösning som då erhålls används för kromatografi (5.5).

Varning! Filtrering av det slutliga extraktet före HPLC är normalt inte nödvändig. Om filtrering anses nödvändig får cellulosafilter inte användas eftersom de kan medföra förluster av aflatoxin B_1. Teflonfilter kan accepteras.

5.5. *HPLC, vätskekromatografi*

(Se bild 2 för montering av utrustningen). Anslå tillräcklig tid för konditionering och stabilisering av instrumenten.

Anmärkning 1:

De flöden som anges för den rörliga fasen och för reagens efter kromatografering på kolonn är enbart vägledande. De kan behöva anpassas beroende på HPLC-kolonnens särskilda egenskaper.

Anmärkning 2:

Detektorvärdena för aflatoxin B_1 är beroende av temperaturen och bör därför korrigeras för avvikelser (se bild 3). Genom att spruta in en bestämd mängd aflatoxin B_1-referenslösning (3.13.3) med jämna mellanrum (dvs. var tredje insprutning), kan toppvärdena för aflatoxin B^1 mellan referenslösningarna korrigeras genom användning av medelvärdet, förutsatt att skillnaden mellan värdena från de på varandra följande referenslösningarna är mycket liten (< 10 %). Insprutningarna skall därför göras fortlöpande. Om det är nödvändigt att göra avbrott skall den sista insprutningen före avbrottet och den första insprutningen efter avbrottet bestå av referenslösningen (3.13.3). Eftersom kalibreringskurvan är lineär och går genom origo bestäms mängderna aflatoxin B_1 direkt med hänvisning till de närgränsande referenslösningarna.

5.5.1. Inställning av HPLC-pump

Ställ in HPLC-pumpen (4.5) så att flödet blir 0,5 eller 0,3 ml/min för en 5µm eller en 3 µm HPLC-kolonn (4.6) vid användning av den rörliga fasen (3.6).

▼M2

5.5.2. Inställning av derivatiseringspump

Ställ in pumpen (4.7) på ett flöde av 0,2-0,4 ml/min av den jodmättade vattenlösningen (3.7). Som riktmärke kan anges: Flöden på ca 0,4 eller 0,2 ml/min kan rekommenderas tillsammans med 0,5 och 0,3 ml/min flöde av den rörliga fasen (3.6).

5.5.3. Fluorescensdetektor

Ställ in fluorescensdetektorn (4.11) på excitationsvåglängd = 365 nm och emissionsvåglängd = 435 nm (filterinstrument: > 400 nm). Justera detektorkänsligheten så att 1 ng aflatoxin B_1 ger ca 80 % av fullt utslag på skrivaren.

5.5.4. Injektor

Alla lösningar sprutas in i mängder på 250 µl och enligt tillverkarens anvisningar.

5.5.5. Kontroll av den kromatografiska separationen

Spruta in den kromatografiska testlösningen (3.14.1). Lägsta höjden mellan två toppar skall vara lägre än 5 % av summan för de angränsande topparnas höjder.

5.5.6. Kontroll av systemets stabilitet

Spruta in referenslösning (3.13.3) före varje analysserie tills stabila toppytor ernås (*OBS:* Toppvärdena för aflatoxin B_1 mellan på varandra följande insprutningar får inte variera med mer än 6 %). Fortsätt omedelbart med kontroll av linearitetet (5.5.7).

5.5.7. Kontroll av linearitetet

Spruta in aflatoxin B_1, kalibreringslösningar (3.13.1-3.13.4). Använd referenslösningen (3.13.3) vid var tredje insprutning för korrigering av avvikelser i värdena. (*OBS!* Toppvärdena för referenslösningen får inte avvika med mer än 10 % under 90 minuter). Korrigera för avvikelse enligt formeln i 7. Kalibreringskurvan bör vara en rät linje genom origo (avvikelser från O i intercept får inte överstiga ± 1 standardavvikelse i Y). De erhållna värdena får inte avvika med mer än 3 % från de nominella värdena. Om dessa krav är uppfyllda, fortsätt omedelbart. I motsatt fall skall felkällorna dessförinnan identifieras och korrigeras.

5.5.8. Insprutning av provextrakt

Spruta in de renade provextrakten (5.4.2.2). Referenslösning (3.13.3) skall alltid sprutas in efter två insprutningar av provextrakt, enligt följande: referenslösning, extrakt, extrakt, referenslösning, extrakt, extrakt, referenslösning osv.

6. **Kontrolltest**

6.1. *Behandling av extraktet (5.4.2.2)*

Tillsätt 5 ml natriumkloridlösning (3.15.1) till det slutliga extrakt som erhållits i 5.4.2.2. Extrahera tre gånger med 2 ml kloroform (3.1) under en minut i separertratt (4.24.1).

Häll de uppsamlade kloroformextrakten över ca 1 g natriumsulfat (3.15.2) i ett 10 ml provrör. En liten tratt (4 cm i diameter) kan användas med en bomullspropp i den avsmalnande delen, täckt med ca 1 g natriumsulfat (3.15.2).

Tvätta natriumsulfatskiktet med några ml kloroform som samlas upp i samma provrör. Låt kloroformextraktet avdunsta till torrhet i samma provrör med hjälp av värmeenheten (4.24.2) och lös därefter upp det på nytt i 1 ml kloroform.

6.2. *Förberedelser för derivatisering och tunnskiktskromatografi:*

Se bilagan till rådets direktiv 76/372/EEG metod A, punkt 5.6.2.

7. **Resultatberäkning**

Beräkna innehållet av aflatoxin B_1 (µg/kg) i provet med hjälp av formeln:

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

▼M2

där:

m = mängden aflatoxin B_1 i ng återgiven som B_1-toppvärde, beräknat på följande sätt:

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

P(prov) = aflatoxin B_1, toppyta i provet

$P(st_1)$ = aflatoxin B_1, toppyta från föregående insprutning av referenslösning (3.13.3)

$P(st_2)$ = aflatoxin B_1, toppyta från efterföljande insprutning av referenslösning (3.13.3)

r(st) = insprutad mängd av aflatoxin B_1 i referenslösningen (3.13.3), i ng

V_m = volym insprutat provextrakt, i ml

V_{ext} = slutlig volym provextrakt, i ml, med hänsyn tagen till eventuell utspädning (5.3)

M = provets massa i g

V_f = volym filtrat som överförts till Florisil-kolonn (5.4.1.2), i ml

V_c = volym kloroform som använts för extraktion av provet, i ml

Om ovan beskrivna tillvägagångssätt används kan formeln förkortas till:

aflatoxin B_1, innehåll i µg/kg = 20 × m.

7.1 Resultaten kan också beräknas genom mätning av toppvärdena.

8. **Repeterbarhet**

Se 10.1.

9. **Reproducerbarhet**

Se 10.1.

10. **Anmärkningar**

10.1 *Precision*

En jämförande studie [1] som genomförts på internationell nivå på blandade foder gav de resultat för repeterbarhet och reproducerbarhet som anges i tabell 1. Termen repeterbarhet (r), så som den används här, definieras som det största förhållande mellan två avläsningar av samma prov i samma laboratorium under likartade förhållanden, som inte är signifikant vid en sannolikhetsnivå på 95 %. Termen reproducerbarhet (R) definieras på motsvarande sätt vid jämförelse av två olika laboratorier. I enlighet med ISO 3534-1977, 2.35 [2] och kommissionens beslut 89/610/EEG [3], anges r och R i tabell 1 också som variationskoefficienter.

Tabell 1

Repeterbarhet (r) och reproducerbarhet (R) uttryckta som förhållanden och motsvarande variationskoefficienter

(15 laboratorier)

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

(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) EGT nr L 351, 2.12.1989, s. 39.

▼**M2**

(*) CV = variationskoefficient

10.2 *Stabilisering av kloroform (3.1)*

Florisil-kolonnens absorptionsförmåga får ändras om andra stabilisatorer än etanol används. Detta bör kontrolleras enligt 10.3 om den typ av kloroform som beskrivs inte går att anskaffa.

10.3 *Noggrannhet*

Att metoden tillämpas korrekt skall kontrolleras genom upprepade mätningar på certifierat referensmaterial. Om sådant inte kan anskaffas skall metodens effektivitet prövas genom utbytesförsök på spikade blankprov. Medelvärdet får inte avvika från det verkliga värdet med mer än −20 till + 10 %.

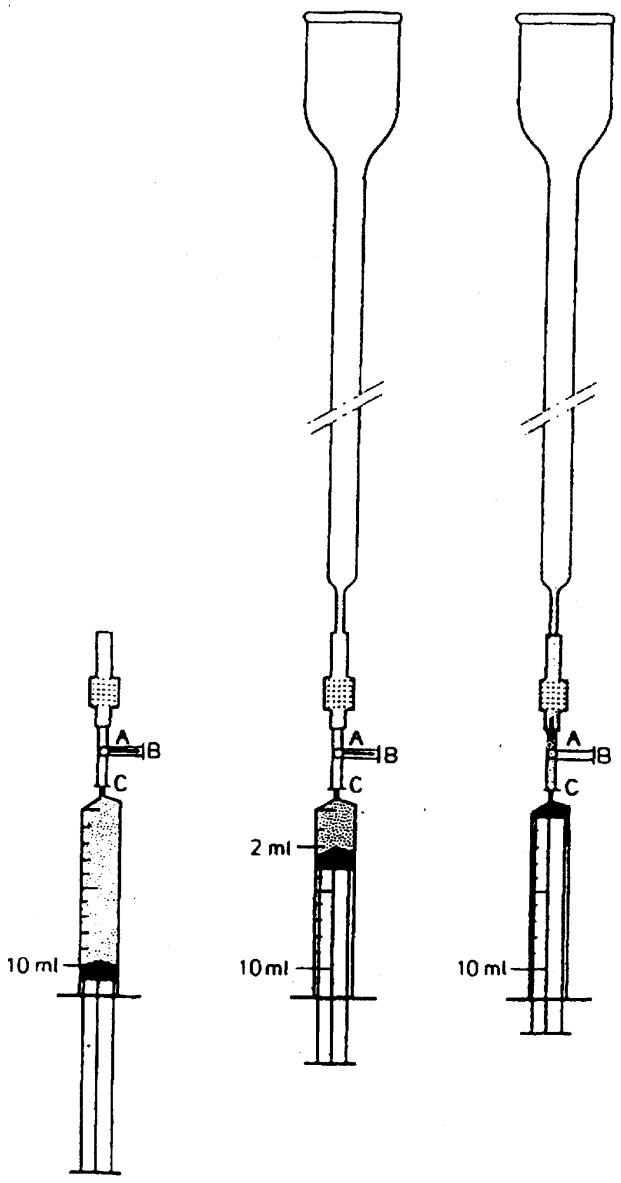
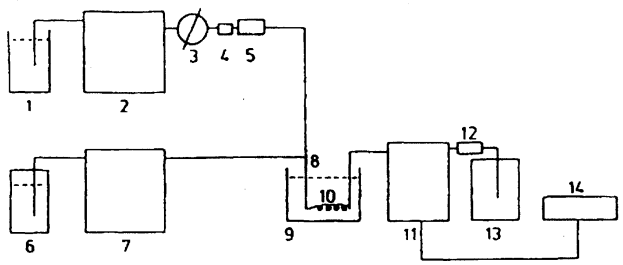


Bild 1: Kolonnuppställning

▼M2



1. Rörlig fas
2. pump
3. Insprutningsventil
4. Förkolonn
5. HPLC-analyskolonn
6. Mättad jodlösning
7. Reagenspump
8. T-koppling
9. termostatreglerat bad
10. Spiralformad reaktiosslinga
11. Fluorescensdetektor
12. Tryckrestriktor
13. Avfall
14. Skrivare/integrator

Bild 2: Flödesdiagram för LC-systemet med post-kolonn derivatisering med jod

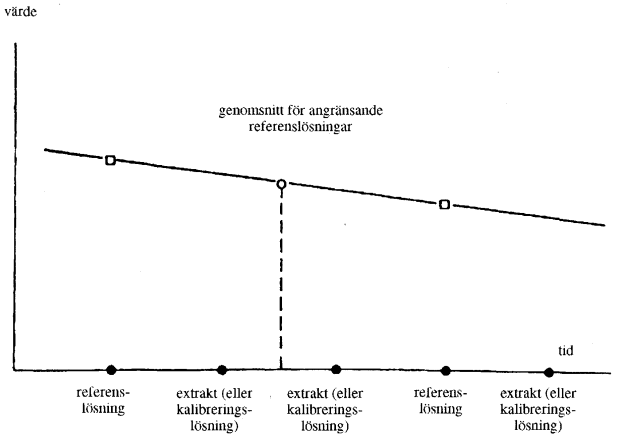


Bild 3: kompensation för avvikelse i värde för aflatoxin B1 genom insprutning av referenslösning (3.13.3) med jämna mellanrum.

▼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:

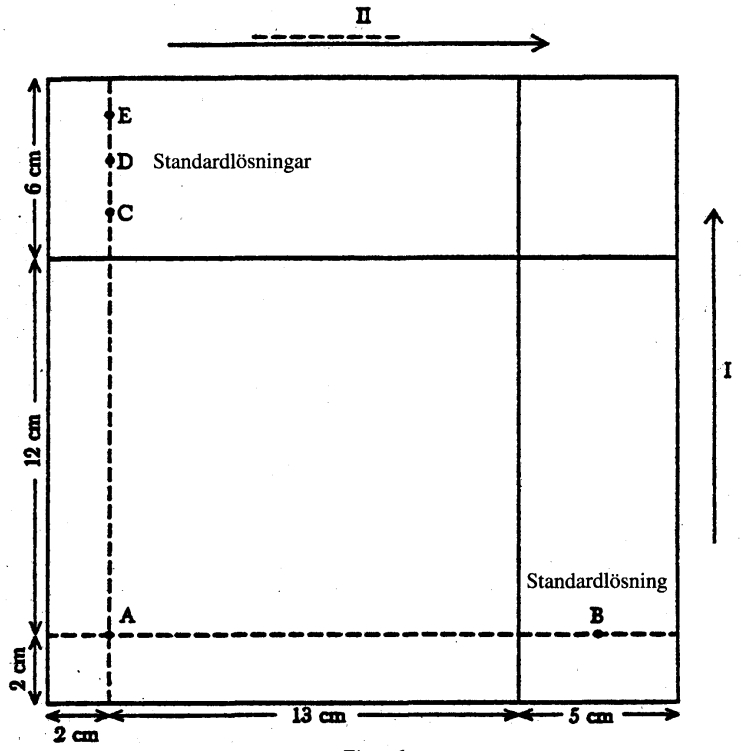
± 50 % of the mean value for mean values of aflatoxin B, from 10 and up to 20 µg/kg;

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

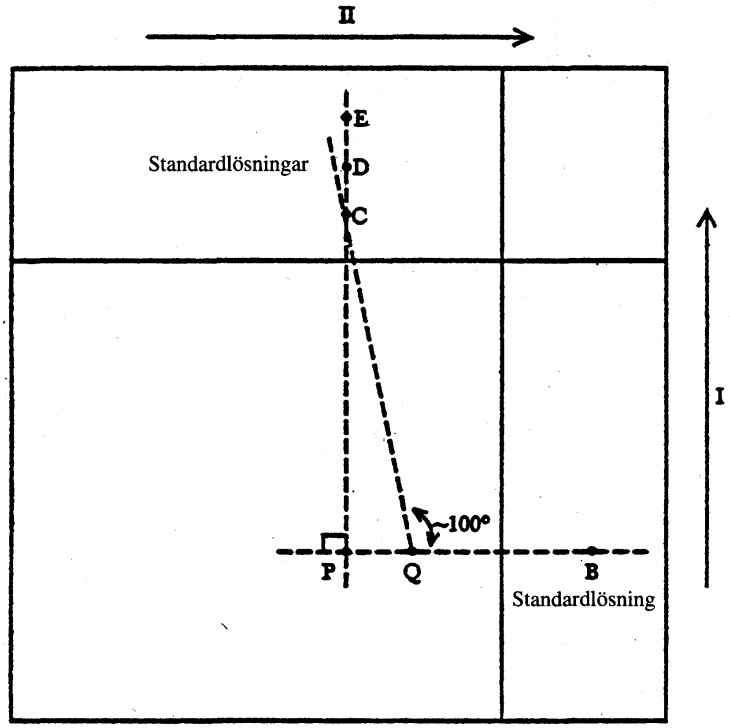
± 20 % of the mean value for mean values above 50 µg/kg.

▼B

TILLÄGG TILL BILAGAN

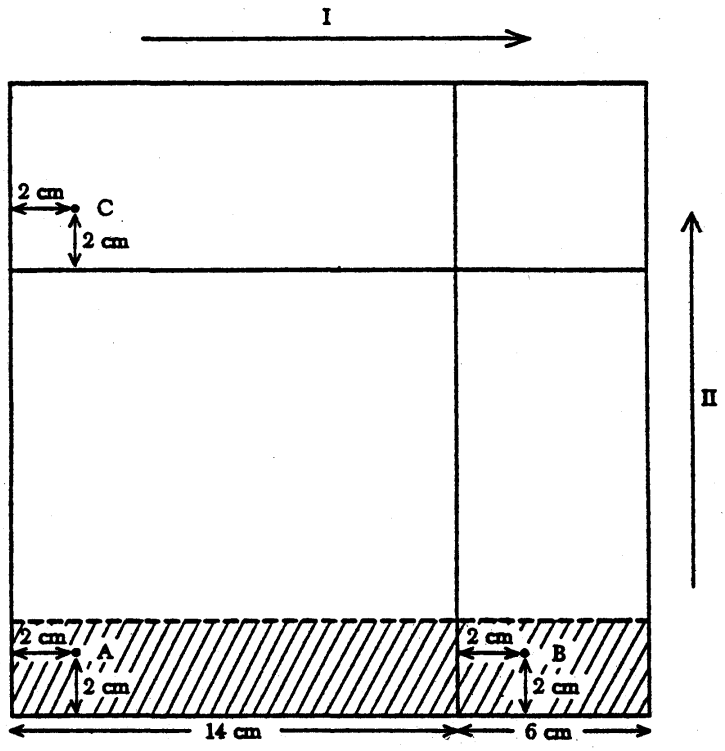


Figur 1



Figur 2

▼B



Figur 3