376L0372

N:o L 102/8 *EUROOPAN YHTEISÖJEN VIRALLINEN LEHTI* 15.4.76

# 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.

Tämän direktiivin liitteessä esitettyihin menetelmiin on sovellettava 15 päivänä kesäkuuta 1971 annetun ensimmäisen komission direktiivin 71/250/ETY liitteessä olevan 1 osan (Johdanto) yleisiä määräyksiä, lukuun ottamatta näytteen esikäsittelyä koskevia määräyksiä.

*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.

Tehty Brysselissä 1 päivänä maaliskuuta 1976.

*Komission puolesta*

P. J. LARDINOIS

*Komission jäsen*

---

([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

*LIITE*

## AFLATOKSIINI $B_1$:N MÄÄRITYS

### A. YKSISUUNTAINEN OHUTLEVYKROMATOGRAFINEN MENETELMÄ

1 **Tarkoitus ja soveltamisala**

Menetelmällä on mahdollista määrittää aflatoksiini $B_1$ -pitoisuus seuraavissa rehuissa: maapähkinä, kopra, pellavansiemen, soija, seesami, biassavapalmun pähkinä ja maissinalkioöljykakut, viljat ja viljatuotteet, hernejauho, perunapulppa ja tärkkelys. Määrityksen alaraja on 0,01 mg/kg (10 ppb).

Mikäli häiritsevät aineet haittaavat määritystä, se on aloitettava alusta käyttäen B-menetelmää (kaksisuuntainen ohutlevykromatografia).

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 $\mu$g/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;

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 °C: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 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 °C. 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

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.

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 °C: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.

B. KAKSISUUNTAINEN OHUTLEVYKROMATOGRAFINEN MENETELMÄ

1 **Tarkoitus ja soveltamisala**

Menetelmällä on mahdollista määrittää aflatoksiini $B_1$ -pitoisuus rehuissa, jotka eivät kuulu menetelmän A käyttöalueeseen. Määrityksen alaraja on 0,01 mg/kg (10 ppb). Menetelmää ei voida soveltaa elintarvikkeisiin, jotka sisältävät sitrushedelmämassaa.

2 **Periaate**

Näyte uutetaan kloroformilla. Uute suodatetaan ja tästä otetaan erä, joka puhdistetaan silikageelipylväällä. Eluaatti haihdutetaan ja jäännös liuotetaan uudelleen tiettyyn tilavuuteen kloroformia tai bentseenin ja asetonitriilin seosta. Osalle liuosta tehdään kaksisuuntainen ohutlevykromatografinen (TLC) ajo. Aflatoksiini $B_1$:n määrä määritetään kromatogrammista UV-valossa arvioimalla joko visuaalisesti tai fluorodensitometriaa käyttäen vertaamalla tunnettuihin aflatoksiini $B_1$ -standardeihin. Rehuista uutetun aflatoksiini $B_1$:n tunnistus on tehtävä esitetyllä tavalla.

3 **Reagenssit**

*Huom*: Jollei toisin mainita, kaikkien reagenssien on oltava laatuluokaltaan "analyysilaatua".

3.1 Asetoni.

3.2 Kloroformi, stabiloitu 0,5–1 % 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 on rasva poistettu etukäteen kloroformilla, tai lasivillaa.

3.10 Vedetön ja rakeinen natriumsulfaatti.

3.11 Inertti kaasu, esim. typpi.

3.12 1 N kloorivetyhappo.

3.13 Happopestyä piimaata (hyflosupercel).

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

3.15 Ajoliuokset:

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

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

3.16 Standardiliuos, jossa on noin 0,1 $\mu$g/ml aflatoksiini $B_1$:tä, kloroformissa (3.2) tai bentseeni/asetonitriiliseoksessa (3.6). Valmistettu ja tarkistettu A menetelmän 7 kohdassa esitetyllä tavalla.

4 **Välineistö**

Ks. A menetelmän 4 kohta.

5 **Menettely**

5.1 *Näytteen valmistus*

5.2 *Uutto*

5.3 *Puhdistus pylväässä*

} Katso A menetelmän 5.1, 5.2 ja 5.3 kohta

5.4 *Kaksisuuntainen TLC*

5.4.1 Liuosten pipetointi levylle (noudatetaan kuvassa 1 olevaa kaaviota)

Levylle (4.8) vedetään kaksi vierekkäisten sivujen suuntaista suoraa uraa (5 ja 6 cm:n etäisyydelle sivulta) liuotinrintamien kulkeutumisen rajoittamiseksi. Levylle pipetoidaan täpliksi kapillaaripipettejä tai mikroruiskuja käyttäen liuokset seuraavasti:

— *pisteeseen A* 20 µl näytteestä 5.3 kohdan mukaisesti saatua puhdistettua uutetta

— *pisteeseen B* 20 µl standardiliuosta (3.16)

— *pisteeseen C* 10 µl standardiliuosta (3.16)

— *pisteeseen D* 20 µl standardiliuosta (3.16)

— *pisteeseen E* 40 µl standardiliuosta (3.16).

Kuivataan hitaassa ilmavirrassa tai inertin kaasun (3.11) virrassa. Saatujen täplien läpimitan on oltava noin 5 mm.

5.4.2 Kehitys (noudatetaan kuvassa 1 esitettyä kaaviota)

Kromatogrammi kehitetään pimeässä suuntaan I käyttäen ajoliuosta (3.15.1) (1 cm:n syvyinen kerros kylläisessä säiliössä), kunnes liuotinrintama saavuttaa liuottimen kulkua rajoittavan viivan. Levy otetaan pois säiliöstä ja sen annetaan kuivua pimeässä ja huoneenlämmössä 15 minuutin ajan.

Kromatogrammi kehitetään tämän jälkeen pimeässä suuntaan II käyttäen ajoliuosta (3.15.2) (1 cm:n syvyinen kerros kyllästämättömässä säiliössä), kunnes liuotinrintama saavuttaa liuottimen kulkua rajoittavan uran. Levy otetaan pois kammiosta ja sen annetaan kuivua pimeässä ja huoneenlämmössä.

5.4.3 Kromatogrammin tulkinta (noudatetaan kuvassa 2 esitettyä kaaviota)

Kromatogrammi valaistaan UV-valolla asettamalla levy 10 cm:n etäisyydelle lampusta (4.9). Paikannetaan standardiliuoksesta peräisin olevan aflatoksiini $B_1$:n siniset fluoresoivat täplät B, C, D ja E. Projisioidaan kaksi näiden pisteiden kautta kulkevaa kuviteltua viivaa, jotka ovat kohtisuorassa kehityksen liikkumissuuntaa vastaan. Näiden viivojen leikkauskohta P on paikka, jossa A-kohtaan (kuva 1) pipetoidusta näytteestä peräisin olevan aflatoksiini $B_1$:n täplän tulisi löytyä. Aflatoksiini $B_1$:n täplän todellinen paikka voi olla pisteessä Q, joka on kahden sellaisen kuvitellun viivan leikkauspiste, jotka muodostavat keskenään noin 100°:n kulman ja jotka kulkevat pisteiden B ja C kautta. Näytteestä saadussa uutteessa olevan aflatoksiini $B_1$:n määrä määritetään 5.5 kohdassa esitetyllä tavalla.

5.4.4 Täydentävä kromatografia

Uuteen levyyn (4.8) tehdään kaksi suoraa uraa, jotka ovat yhdensuuntaiset kahden vierekkäisen sivun kanssa kuvassa 1 esitetyllä tavalla, ja pisteeseen A (katso kuva 1) pipetoidaan 20 µl näytteestä 5.3 kohdassa saatua puhdistettua uutetta ja sen päälle 20 µl standardiliuosta (3.16). Kehitetään 5.4.2 kohdassa esitetyllä tavalla. Kromatogrammia valaistaan UV-valolla (4.9) ja todetaan, että:

— uutteesta ja standardiliuoksesta peräisin olevat aflatoksiini $B_1$ -täplät menevät päällekkäin,

— tämän täplän fluoresenssi on voimakkaampaa kuin ensimmäisessä levyssä kohtaan Q kehittynyt fluoresenssi.

5.5 *Kvantitatiiviset määritykset*

Määritys suoritetaan joko visuaalisesti tai fluorodensitometrisesti jäljempänä esitetyn mukaisesti.

5.5.1 Visuaaliset mittaukset

Uutteessa olevan aflatoksiini $B_1$:n määrä määritetään etsimällä uutteen täplää vastaava fluoresenssivoimakkuus standardiliuoksen täplistä C, D ja E. Tarvittaessa interpoloidaan. Mikäli 20 µl:n erästä uutetta saatu fluoresenssin voimakkuus on suurempi kuin 40 µl:n erästä standardiliuosta saatu voimakkuus, uute laimennetaan 10- tai 100-kertaisesti klorofor-

milla (3.2) tai bentseeni/asetonitriili-seoksella (3.6) ennen sille suoritettavaa uutta levykromatografiaa.

5.5.2 Fluorodensitometriset mittaukset

Aflatoksiini $B_1$ -täplien fluoresenssin voimakkuus mitataan fluorodensitometrillä (4.12) käyttäen viritysaallonpituutta 365 nm ja emissioaallonpituutta 443 nm.

Uutetäplässä olevan aflatoksiini $B_1$:n määrä määritetään vertaamalla sen fluoresenssin voimakkuutta standardiliuoksen täplien C, D ja E voimakkuuksiin.

5.6 *Aflatoksiini $B_1$:n tunnistamisen varmistus*

Ks. A menetelmän 5.6 kohta

6 **Tulosten laskeminen**

Ks. A menetelmän 6 kohta.

7 **Toistettavuus**

Ks. A menetelmän 8 kohta.

8 **Uusittavuus**

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

## C. A JA B MENETELMÄÄ KOSKEVAT HUOMAUTUKSET

1 **Rasvanpoisto**

Näytteille, jotka sisältävät yli 5 % rasvaa, on tehtävä rasvanpoisto petrolieetterillä (kp. 40–60 °C) 5.1 kohdassa kuvatun näytteen esikäsittelyn jälkeen.

2 **Tulosten verrattavuus**

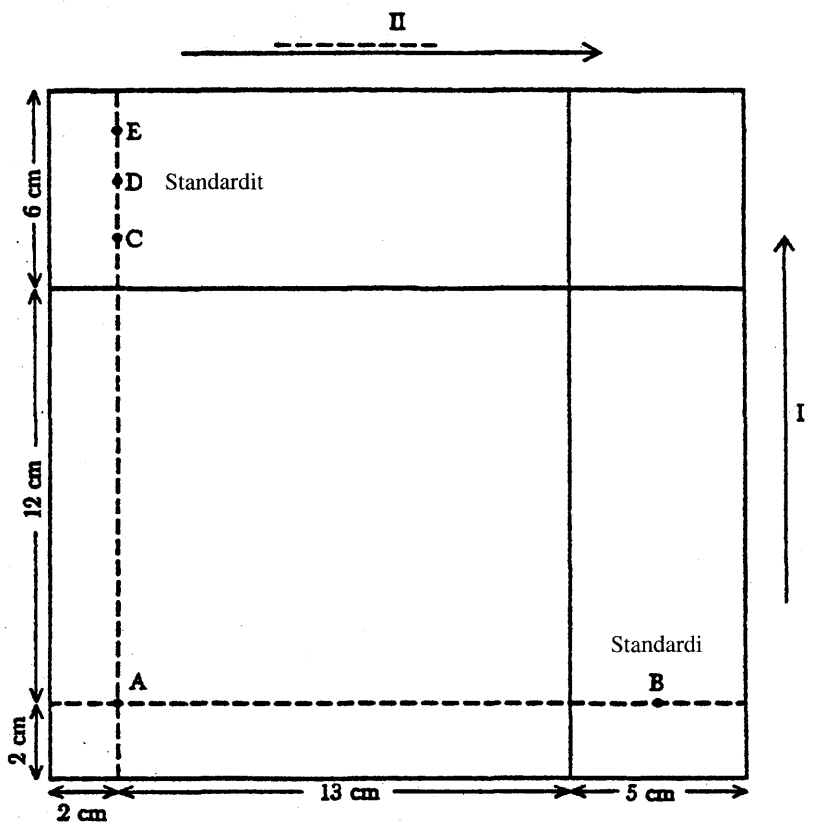
Tulosten verrattavuuden, ts. samasta näytteestä kahden tai useamman laboratorion saamien tulosten vaihtelun on arvioitu olevan:

± 50 % keskiarvosta välillä 10–20 µg/kg olevilla aflatoksiini $B_1$:n keskiarvoilla;

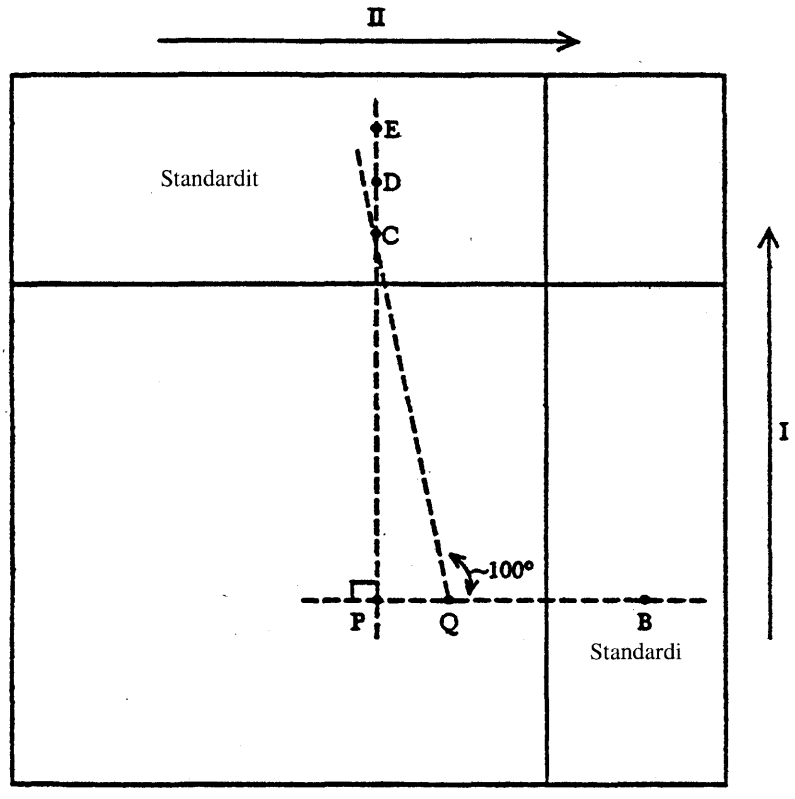
± 10 µg/kg keskiarvosta välillä 20–50 µg/kg olevilla keskiarvoilla;

± 20 % keskiarvosta yli 50 µg/kg olevilla keskiarvoilla.

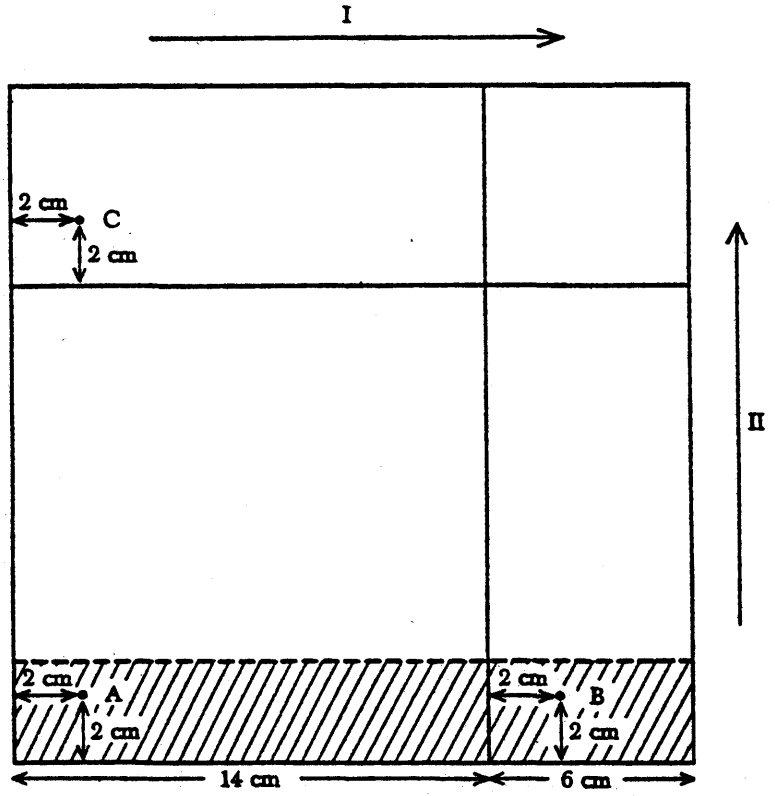
*LIITE*




*Kuva 1*




*Kuva 2*




*Kuva 3*