376L0372

Nr L 102/8 *EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS OFFICIELLA TIDNING* 15.4.76

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.

De allmänna bestämmelser som anges i del 1 (Inledning) av bilagan till kommissionens första direktiv 71/250/EEG av den 15 juni 1971, med undantag av det avsnitt som behandlar prepareringen av analysprovet, skall tillämpas på de metoder som beskrivs i bilagan till detta direktiv.

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.

Utfärdat i Bryssel den 1 mars 1976.

På kommissionens vägnar

P. J. LARDINOIS

Ledamot av kommissionen

---

(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.

BILAGA

BESTÄMNING AV AFLATOXIN B_1

METOD A: ENDIMENSIONELL TUNNSKIKTSKROMATOGRAFI

1. **Syfte och räckvidd**

Med denna metod är det möjligt att bestämma halten aflatoxin B_1 i följande foder: jordnötter, kopra, linfrö, soja, sesam, babassu- och majsoljekakor, spannmål och kvarnprodukter, ärtmjöl, potatismos och stärkelse. Lägsta gräns för bestämningen är 0,01 mg/kg (10 ppb).

Om bestämningen förhindras genom närvaron av störande substanser är det nödvändigt att påbörja en ny analys med metod B (tvådimensionell tunnskiktskromatografi).

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.

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 °C 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 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 °C 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 lösningsmedelsfronternas 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:

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

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 °C.

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.

METOD B: TVÅDIMENSIONELL TUNNSKIKTSKROMATOGRAFI

1. **Syfte och räckvidd**

Med denna metod är det möjligt att bestämma halten aflatoxin B_1 i foder för vilka metod A inte är avsedd. Lägsta gräns för bestämningen är 0,01 mg/kg (10 ppb). Metoden kan inte användas på foder som innehåller fruktkött av citrus.

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 bensen-acetonitrilblandning. En del av denna lösning undergår tvådimensionell 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 (volym/volym).

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 Kiselgur (hyflosupercel), syratvättad.

3.14 Kiselgel G-HR eller motsvarande, för TK.

3.15 Framkallningslösningar:

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

3.15.2 Kloroform (3.2)/aceton (3.1): 9/1 (volym/volym), omättad vanna.

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

4. **Utrustning**

Se Metod A, punkt 4.

5. **Utförande**

5.1 *Preparering av provet*

5.2 *Extraktion*

5.3 *Rengöring i kolonn*

} Se metod A, punkterna 5.1, 5.2 och 5.3.

5.4 *Tvådimensionell TK*

5.4.1 Applicering av lösningarna (följ diagrammet i figur 1)

Ritsa två räta linjer på en platta (4.8) parallellt med två angränsande sidor (5 resp. 6 cm in från vardera sidan) för att begränsa lösningsmedelsfronternas migrering. Anbringa fläckar av följande lösningar på plattan med kapillärpipetter eller mikrosprutor:

— *på punkt A,* 20 µl renat extrakt (enligt 5.3) av provet,

— *på punkt B,* 20 µl standardlösning (3.16),

— *på punkt C,* 10 µl standardlösning (3.16),

— *på punkt D,* 20 µl standardlösning (3.16),

— *på punkt E,* 40 µl standardlösning (3.16).

Torka i en långsam ström av luft eller inert gas (3.11). De fläckar som erhålls måste vara cirka 5 mm i diameter.

5.4.2 Framkallning (följ diagrammet i figur 1)

Framkalla kromatogrammet i mörker i riktning I med framkallningslösningen (3.15.1) (1 cm skikt i mättad vanna) tills lösningens front når gränslinjen för lösningen. Avlägsna plattan från vannan och låt den torka i mörker vid omgivande temperatur under 15 minuter.

Framkalla därefter kromatogrammet i mörker i riktning II med framkallningslösningen (3.15.2) (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.

5.4.3 Tolkning av kromatogrammet (följ diagrammet i figur 2)

Bestråla kromatogrammet med UV-ljus med plattan 10 cm från lampan (4.9). Bestäm läget för de blå fluorescerande fläckarna B, C, D och E av aflatoxin B_1 från standardlösningen. Konstruera två tänkta linjer som passerar genom dessa fläckar i rät vinkel mot framkallningsriktningarna. Vid skärningspunkten, P, mellan dessa linjer kan man förvänta sig att finna fläcken av det aflatoxin B_1 som kommer från det provextrakt som applicerats vid A (figur 1). Aflatoxin B_1-fläckens läge kan dock även vara en punkt Q i skärningspunkten mellan två tänkta linjer som bildar en vinkel av cirka 100° och passerar genom punkterna B resp. C. Bestäm mängden aflatoxin B_1 i provextraktet enligt anvisningarna i 5.5.

5.4.4 Kompletterande kromatografi

Ritsa på en ny platta (4.8) två räta linjer som är parallella med två angränsande sidor, enligt diagrammet i figur 1, och applicera på punkt A (se figur 1) 20 µl av det renade provextrakt som erhållits enligt 5.3 samt, ovanpå detta, 20 µl standardlösning (3.16). Framkalla enligt anvisningarna i 5.4.2. Bestråla kromatogrammet med UV-ljus (4.9) och kontrollera att:

— Aflatoxin B_1-fläckarna från extraktet resp. standardlösningen bildar två skikt med samma läge.

— Denna fläck har en intensivare fluorescens än den aflatoxin B_1-fläck som framkallades på punkten Q på den första plattan.

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 fläcken av extraktet med fläckarna C, D och E med standardlösning. Interpolera om så är nödvändigt. Om 20 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 fläcken av extraktet genom att jämföra dess fluorescensintensitet med den hos fläckarna C, D och E med standardlösning.

5.6 *Bekräftelse av identiteten hos aflatoxin B_1*

Se Metod A, punkt 5.6.

6. **Resultatberäkning**

Se Metod A, punkt 6.

7. **Repeterbarhet**

Se Metod A, punkt 8.

8. **Reproducerbarhet**

Se Anmärkningar, del C, punkt 2.

C. ANMÄRKNINGAR BETRÄFFANDE METODERNA A OCH B

1. **Avfettning**

Prover som innehåller mer än 5 % fetter måste avfettas med petroleumeter (kokpunkt: 40–60 °C) efter den beredning som beskrivs i 5.1.

I sådana fall måste analysresultaten uttryckas i det ej avfettade provets vikt.

2. **Reproducerbarhet för resultaten**

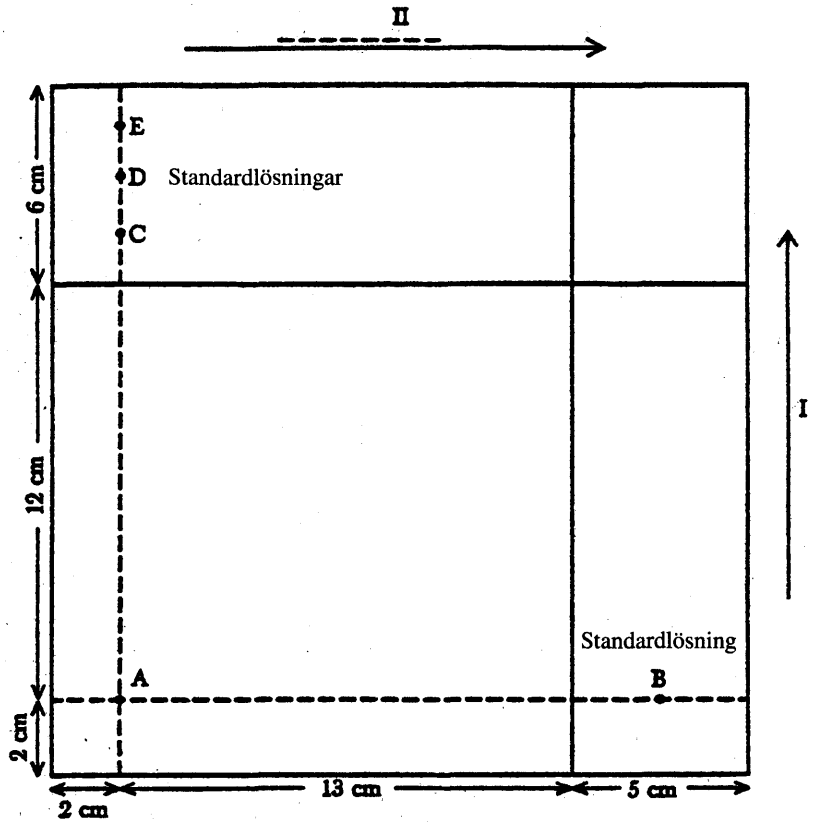
Reproducerbarheten för resultaten, d.v.s. variationen mellan de resultat som erhålls av två eller flera laboratorier för samma prov har uppskattats till:

50 % av medelvärdet för medelvärden av aflatoxin B_1 från 10 till och med 20 µg/kg,

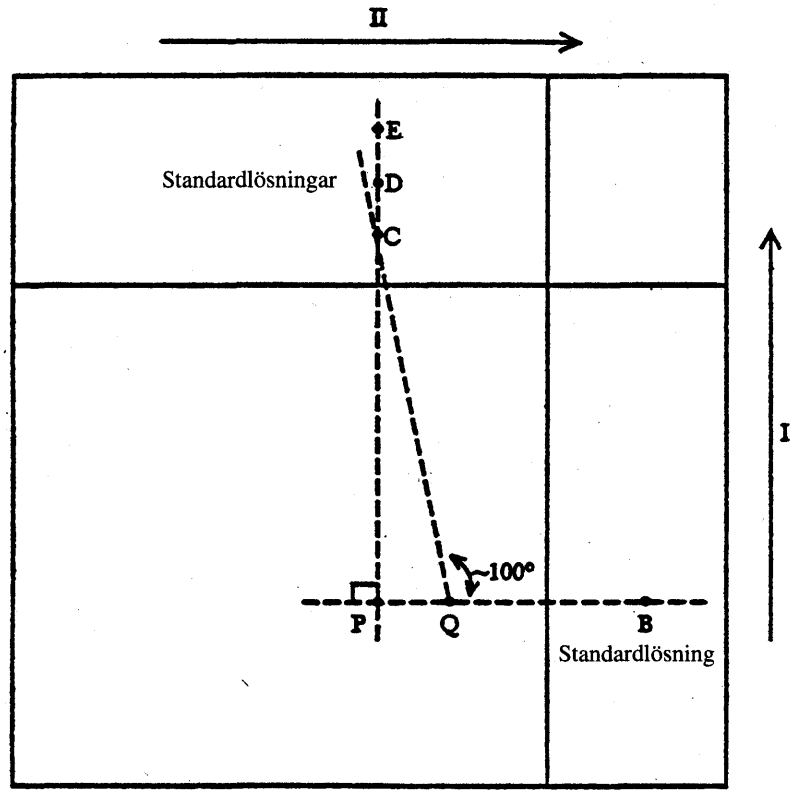
10 µg/kg på medelvärdet för medelvärden från mer än 20 till och med 50 µg/kg,

20 % av medelvärdet för medelvärden över 50 µg/kg.

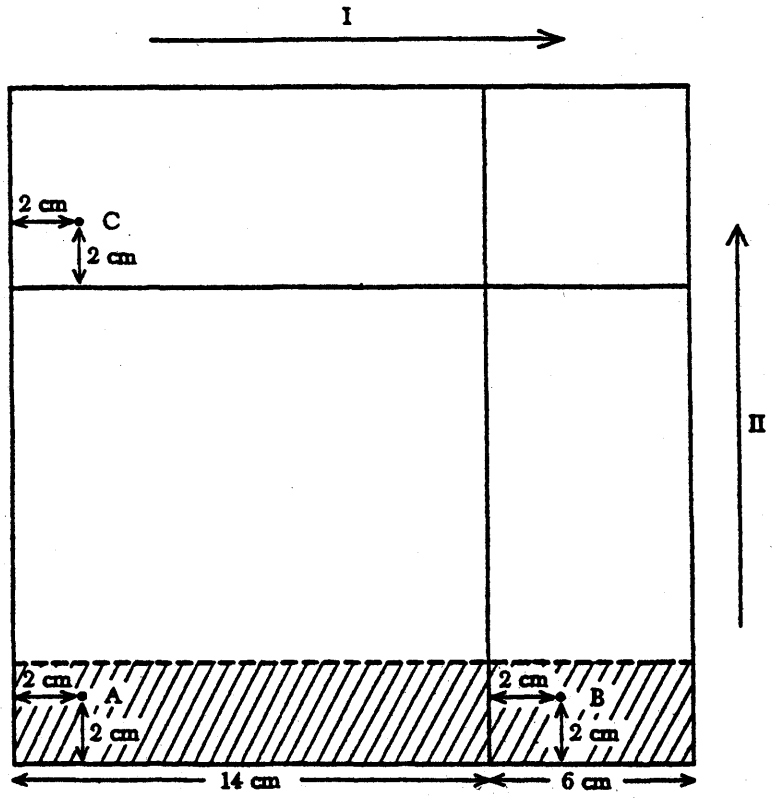
TILLÄGG TILL BILAGAN



Figur 1



Figur 2



Figur 3