ZEVENDE RICHTLIJN VAN DE COMMISSIE

van 1 maart 1976

houdende vaststelling van gemeenschappelijke analysemethoden voor de officiële controle van diervoeders

(76/372/EEG)

DE COMMISSIE VAN DE EUROPESE GEMEENSCHAPPEN,

Gelet op het Verdrag tot oprichting van de Europese Economische Gemeenschap,

Gelet op de richtlijn van de Raad van 20 juli 1970 betreffende de invoering van gemeenschappelijke bemonsterings- en analysemethoden voor de officiële controle van veevoeders (1), laatstelijk gewijzigd bij de Toetredingsakte (2), inzonderheid op artikel 2,

Overwegende dat bovenbedoelde richtlijn bepaalt dat de officiële controle van diervoeders, welke ertoe strekt na te gaan of aan de op grond van de wettelijke of bestuursrechtelijke bepalingen inzake de kwaliteit en de samenstelling van diervoeders gestelde eisen is voldaan, geschiedt volgens communautaire bemonsterings- en analysemethoden;

Overwegende dat bij de E.E.G.-Richtlijnen 71/250, 71/393, 72/199, 73/46, 74/203 en 75/84 van de Commissie van 15 juni 1971 (3), 18 november 1971 (4), 27 april 1972 (5), 5 december 1972 (6), 25 maart 1974 (7) en 20 december 1974 (8) reeds een zeker aantal gemeenschappelijke analysemethoden is vastgesteld; dat het gezien de vorderingen welke de werkzaamheden sindsdien hebben gemaakt, dienstig is een zevende reeks methoden vast te stellen;

Overwegende dat de in deze richtlijn vervatte maatregelen in overeenstemming zijn met het advies van het Permanent Comité voor diervoeders,

HEEFT DE VOLGENDE RICHTLIJN VASTGESTELD:

Artikel 1

De Lid-Staten schrijven voor dat de analysen voor de officiële controle van diervoeders ten aanzien van hun gehalte aan aflatoxine B_1 geschieden volgens de in de bijlage bij deze richtlijn omschreven methoden.

De algemene bepalingen van deel 1 (Inleiding) van de bijlage van de Eerste Richtlijn 71/250/EEG van de Commissie van 15 juni 1971, met uitzondering van het gedeelte betreffende de voorbereiding van het analysemonster, zijn toepasselijk op de in de bijlage van deze richtlijn beschreven methoden.

Artikel 2

De Lid-Staten doen uiterlijk op 1 oktober 1976 de nodige wettelijke of bestuursrechtelijke bepalingen in werking treden, die nodig zijn om aan deze richtlijn te voldoen en stellen de Commissie daarvan onverwijld in kennis.

Artikel 3

Deze richtlijn is gericht tot de Lid-Staten.

Gedaan te Brussel, 1 maart 1976.

Voor de Commissie

P. J. LARDINOIS

Lid van de Commissie

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

BIJLAGE

BEPALING VAN AFLATOXINE B_1

A. METHODE DOOR MIDDEL VAN EENDIMENSIONALE DUNNELAAGCHROMATOGRAFIE

1. **Doel en toepassingsgebied**

Met behulp van deze methode is het mogelijk het gehalte aan aflatoxine B_1 te bepalen in de volgende diervoeders: grondnoten-, kopra-, lijn-, soja-, sesam-, babassu- en maïskiem-koek, granen en graanprodukten, erwtenmeel, aardappelpulp en aardappelmeel. De ondergrens van de bepaling ligt bij 0,01 mg/kg (10 ppb).

Indien de aanwezigheid van bepaalde stoffen de bepaling stoort, moet de analyse opnieuw worden verricht maar dan volgens methode B (door middel van tweedimensionale dunnelaagchromatografie).

2. **Principe**

Het monster wordt onderworpen aan een extractie met chloroform. Het extract wordt gefiltreerd en een evenmatig deel wordt door middel van chromatografie op een kolom van silicagel gezuiverd. Het eluaat wordt ingedampt en het residu wordt in een bepaalde hoeveelheid chloroform of benzeen-acetonitrilmengsel opgelost. Een evenmatig deel van deze oplossing wordt aan dunnelaagchromatografie onderworpen. De hoeveelheid aflatoxine B_1 wordt onder UV-licht of visueel of fluorodensitometrisch bepaald door vergelijking met bekende hoeveelheden aflatoxine-B_1-standaard. De identiteit van de uit het diervoeder geëxtraheerde aflatoxine B_1 moet met behulp van de aangegeven methode worden bevestigd.

3. **Reagentia**

Noot: Alle reagentia dienen, voor zover niet anders vermeld, van analytisch zuivere kwaliteit te zijn.

3.1. Aceton

3.2. Chloroform, gestabiliseerd met 0,5 — 1,0 % ethanol 96 % (v/v).

3.3. n-Hexaan

3.4. Methanol

3.5. Diëthylether, vrij van water en peroxyden.

3.6. Mengsel van benzeen en acetonitril 98/2 (v/v).

3.7. Mengsel van chloroform (3.2) en methanol (3.4) 97/3 (v/v).

3.8. Silicagel voor kolomchromatografie, korrelgrootte 0,05 — 0,20 mm.

3.9. Watten, hydrofiel en met chloroform ontvet, of glaswol.

3.10. Natriumsulfaat, vrij van water, korrels.

3.11. Inert gas, b.v. stikstof.

3.12. Zoutzuur, 1 N.

3.13. Zwavelzuur 50 % (v/v).

3.14. Diatomeeënaarde (Hyflosupercel), met zuur gewassen.

3.15. Silicagel G-HR of gelijkwaardig voor dunnelaagchromatografie.

3.16. Standaardoplossing, bevattende ongeveer 0,1 μg aflatoxine B_1 per ml in chloroform (3.2) of in het mengsel van benzeen en acetonitril (3.6), bereid en gecontroleerd zoals aangegeven onder punt 7.

3.17. Kwalitatieve standaardoplossing, bevattende ongeveer 0,1 μg aflatoxine B_1 en B_2 per ml in chloroform (3.2) of in het mengsel van benzeen en acetonitril (3.6). Deze concentraties zijn als richtsnoer gegeven. Zij moeten zodanig worden gekozen, dat voor beide aflatoxinen dezelfde fluorescentie-intensiteit wordt verkregen.

3.18. Loopvloeistoffen:

3.18.1. Mengsel van chloroform (3.2) en aceton (3.1): 9/1 (v/v), onverzadigde ontwikkelbak;

3.18.2. Mengsel van diëthylether (3.5), methanol (3.4) en water: 96/3/1 (v/v/v), onverzadigde ontwikkelbak;

3.18.3. Mengsel van diëthylether (3.5), methanol (3.4) en water: 94/4,5/1,5 (v/v/v), verzadigde ontwikkelbak;

3.18.4. Mengsel van chloroform (3.2) en methanol (3.4): 94/6 (v/v), verzadigde ontwikkelbak;

3.18.5. Mengsel van chloroform (3.2) en methanol (3.4): 97/3 (v/v), verzadigde ontwikkelbak.

4. Apparatuur

4.1. Meng- en maalapparaat.

4.2. Schudmachine of magnetische roerder.

4.3. Vouwfilters, Schleicher & Schül nr. 588, of gelijkwaardig, diameter 24 cm.

4.4. Chromatografiekolommen, van glas (binnendiameter 22 mm, lengte 300 mm), met teflonkraan en reservoir van 250 ml.

4.5. Rotatievacuümverdamper met rondbodemkolf van 500 ml.

4.6. Konische kolven van 500 ml met ingeslepen stop.

4.7. Uitrusting voor dunnelaagchromatografie.

4.8. Glazen platen voor dunnelaagchromatografie van 200 × 200 mm, als volgt gemaakt (de aangegeven hoeveelheden zijn voldoende voor vijf platen): Breng 30 g silicagel G-HR (3.15) in een konische kolf. Voeg 60 ml water toe en schud gedurende één minuut. Breng de suspensie in een uniforme laag van 0,25 mm dikte op de platen aan. Laat de platen drogen aan de lucht en bewaar ze daarna in de exsiccator over silicagel. Activeer ze vóór gebruik, door deze gedurende één uur in de droogstoof bij 110 °C te plaatsen.

Er kan gebruik gemaakt worden van kant-en-klaar-platen indien daarbij een zelfde resultaat wordt verkregen als bij de platen die op de hierboven beschreven wijze zijn gemaakt.

4.9. Lamp voor langgolvig Ultraviolet licht 360 nm. De stralingsintensiteit moet voldoende zijn en een aflatoxine-B_1-vlek van 1,0 ng op een plaat voor dunnelaagchromatografie op een afstand van 10 cm van de lamp nog duidelijk zichtbaar te maken.

4.10. Reageerbuisjes van 10 ml, met maatverdeling, voorzien van polyethyleen stop.

4.11. UV-spectrofotometer.

4.12. Fluorodensitometer (facultatief).

5. Uitvoering

5.1. *Voorbereiding van het monster* (zie opmerkingen in deel C, punt 1)

Maal het monster zodanig dat het door een zeef met mazen van 1 mm (overeenkomstig ISO-aanbeveling R 565) gaat.

5.2. *Extractie*

Breng van het gemalen en gehomogeniseerde monster 50,0 g over in een konische kolf van 500 ml (4.6) en voeg 25 g diatomeeënaarde (3.14), 25 ml water en 250 ml chloroform (3.2) toe. Sluit de kolf af en schud, resp. roer daarna gedurende 30 minuten met behulp van de schudmachine of de roerder (4.2). Filtreer vervolgens door een vouwfilter (4.3), verwijder de eerste 10 ml van het filtraat en vang de volgende 50 ml op.

5.3. *Kolomzuivering*

Breng onder in de chromatografiekolom (4.4) een prop watten of glaswol (3.9) aan, vul de kolom tot ongeveer 2/3 met chloroform (3.2), voeg daarna 5 g natriumsulfaat (3.10) toe, waarbij erop moet worden gelet dat het bovenoppervlak van de natriumsulfaatlaag een vlakke basis vormt. Voeg 10 g silicagel (3.8) in kleine porties toe. Roer na iedere toevoeging voorzichtig om, om luchtbellen te verwijderen. Laat de silicagel 15 minuten inklinken en voeg vervolgens voorzichtig 15 g natriumsulfaat (3.10) toe. Laat daarna de vloeistof aflopen tot juist boven de natriumsulfaatlaag.

Meng de 50 ml van het onder 5.2 verkregen filtraat met 100 ml n-hexaan (3.3). Breng het mengsel kwantitatief op de kolom en laat de vloeistof doorlopen tot juist boven de natriumsulfaatlaag. Verwijder de doorgelopen vloeistof. Voeg daarna 100 ml diëthylether (3.5) toe en laat de vloeistof weer doorlopen tot boven de natriumsulfaatlaag. De doorloopsnelheid moet 8 tot 12 ml/minuut bedragen. Zorg ervoor dat de kolom niet droogloopt. Verwijder de doorgelopen vloeistof. Elueer vervolgens met 150 ml van het mengsel van chloroform en methanol (3.7) en vang daarbij het gehele eluaat op. Damp het eluaat in de rotatievacuümverdamper (4.5) onder een inerte gasstroom (3.11) en bij een temperatuur van hoogstens 50 °C tot bijna geheel droog in. Breng het residu kwantitatief met chloroform (3.2) of het mengsel van benzeen en acetonitril (3.6) over in een reageerbuisje van 10,0 ml (4.10). Concentreer de oplossing onder een inerte gasstroom (3.11) en breng vervolgens met chloroform (3.2) of het mengsel van benzeen en acetonitril (3.6) het volume op 2,0 ml.

5.4. *Dunnelaagchromatografie*

Breng op een plaat voor dunnelaagchromatografie (4.8) op 2 cm van de onderrand naast elkaar op onderlinge afstanden van 2 cm de volgende hoeveelheden standaardoplossing en extract puntvormig op:

— 10, 15, 20, 30 en 40 μl aflatoxine-B_1-standaardoplossing (3.16);

— 10 μl van het onder 5.3 verkregen extract en 20 μl standaardoplossing (3.16) op één standpunt.

— 10 en 20 μl van het onder 5.3 verkregen extract.

Ontwikkel het chromatogram in het donker met een van de loopvloeistoffen (3.18).

Breng met het oog op het kiezen van een geschikte loopvloeistof vooraf 25 μl van de kwalitatieve standaardoplossing (3.17) op een van de platen op en ga na of na de ontwikkeling een volledige scheiding van aflatoxine B_1 en B_2 is bereikt.

Laat de loopvloeistoffen in het donker verdampen en bekijk daarna de plaat onder UV-licht op een afstand van 10 cm van de lamp (4.9). De aflatoxine B_1-vlekken fluoresceren blauw.

5.5. *Kwantitatieve bepaling*

Voer de bepaling ofwel visueel ofwel fluorodensitometrisch uit.

5.5.1. Visuele bepaling

Bepaal de hoeveelheid aflatoxine B_1 in het extract door de intensiteit van de fluorescentie van de vlek van het extract met een van de vlekken van de standaardoplossing te vergelijken. Interpoleer indien nodig. De fluorescentie van de vlek verkregen door het over elkaar aanbrengen van extract en standaardoplossing moet sterker zijn dan die van 10 μl van het extract en er mag slechts één vlek zichtbaar zijn. Verdun, indien de fluorescentie-intensiteit van 10 μl extract sterker is dan die van 40 μl standaardoplossing, het extract 10 of 100 maal met chloroform (3.2) of het mengsel van benzeen en acetonitril (3.6) alvorens het extract aan een nieuwe dunnelaagchromatographische scheiding te onderwerpen.

5.5.2. Bepaling door fluorodensitometrie

Meet de fluorescentie-intensiteit van de aflatoxine-B_1-vlekken met behulp van een fluorodensitometer bij een golflengte van 365 nm voor de extinctie en bij een golflengte van 443 nm voor de emissie. Bepaal de hoeveelheid aflatoxine B_1 in de extractvlekken door de fluorescentie-intensiteiten van de vlekken van het extract en van de standaardoplossing onderling te vergelijken.

5.6. *Bevestiging van de identiteit van aflatoxine B_1*

Bevestig de identiteit van aflatoxine B_1 in het extract, door middel van de hierna beschreven technieken:

5.6.1. Behandeling met zwavelzuur

Verstuif zwavelzuur (3.13) over het overeenkomstig 5.4 verkregen chromatogram. De fluorescentie van de aflatoxine-B_1-vlek onder UV-licht moet zijn veranderd van blauw naar geel.

5.6.2. Tweedimensionale chromatografie met vorming van aflatoxine B_1-hemiacetaal (aflatoxine B_2a)

Noot: De hierna beschreven verrichtingen moeten worden uitgevoerd als aangegeven in figuur 3.

5.6.2.1. Opbrengen van de oplossingen

Trek op een plaat (4.8) twee lijnen evenwijdig aan twee aanliggende zijden (op een afstand van 6 cm van deze zijden) die de migratie van de loopvloeistoffen moeten afbakenen. Breng met behulp van capillaire pipetten of microspuitjes op een plaat de hieronder aangegeven oplossingen op:

— *in punt A:* een hoeveelheid gezuiverd extract van het monster dat onder 5.3 is verkregen en dat ongeveer 2,5 nanogram aflatoxine B_1 bevat;

— *in de punten B en C:* 25 μl van de standaardoplossing (3.16).

5.6.2.2. Ontwikkeling

Ontwikkel het chromatogram in richting I met behulp van de loopvloeistof (3.18.1) (laag van 1 cm in een onverzadigde ontwikkelbak) in het donker totdat het vloeistoffront de grenslijn bereikt. Neem de plaat uit de ontwikkelbak en laat deze 5 minuten in het donker en bij omgevingstemperatuur drogen. Verstuif vervolgens zoutzuur (3.12) op een strook van 2,5 cm breed waarin de punten A en B zijn gelegen (in fig. 3 met arcering aangegeven) totdat deze donker wordt en bescherm de rest van de plaat met een glasplaat. Laat gedurende 10 minuten in het donker reageren en droog met een luchtstroom bij omgevingstemperatuur. Ontwikkel vervolgens het chromatogram in richting II met behulp van de loopvloeistof (3.18.1) (laag van 1 cm in een onverzadigde ontwikkelbak) eveneens in het donker, totdat het front van de loopvloeistof de grenslijn bereikt. Neem de plaat uit de ontwikkelbak en laat deze bij omgevingstemperatuur drogen.

5.6.2.3. Beoordelen van het chromatogram

Bekijk het chromatogram onder UV-licht (4.9) en ga de hierna aangegeven bijzonderheden of kenmerken na:

a) Een blauwe fluorescerende aflatoxine-B_1-vlek wordt zichtbaar, afkomstig van de in punt C opgebrachte standaardoplossing (migratie in richting I).

b) Een blauwe fluorescerende vlek van aflatoxine B_1 (welke niet met het zoutzuur heeft gereageerd) wordt zichtbaar alsmede een intensere blauwe fluorescerende vlek van aflatoxine B_1-hemiacetaal, beide afkomstig van de in punt B opgebrachte standaardoplossing (migratie in richting II).

c) Vlekken zoals die welke onder b) zijn aangegeven, afkomstig van het in punt A opgebrachte extract van het monster worden zichtbaar. De plaats van deze vlekken wordt bepaald door de migratieafstand van aflatoxine B_1 van punt A af in richting I (dezelfde afstand als die welke door de in punt C opgebrachte standaardoplossing is afgelegd) en door de migratie-afstanden die in richting II zijn afgelegd door aflatoxine B_1 (welke niet met het zoutzuur heeft gereageerd) en door aflatoxine B_1-hemiacetaal (zelfde afstanden als die welke door de in punt B opgebrachte standaardoplossing zijn afgelegd). De fluorescentie-intensiteiten van de hemiacetaalvlekken afkomstig van het extract en van de in punt B opgebrachte standaardoplossing moeten redelijk overeenstemmen.

6. Berekening van de resultaten

6.1. *Visuele meting*

Het gehalte aan aflatoxine B_1 van het monster in μg/kg (ppb) wordt berekend met behulp van de volgende formule:

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

waarin:

Y en X = volumina in microliter uitgedrukt van de aflatoxine-B_1-standaardoplossing (3.16), resp. van het extract waarvan de fluorescentie-intensiteiten gelijk zijn;

S = concentratie in microgram aflatoxine B_1 per ml in de standaardoplossing (3.16);

V = eindvolume van het extract in microliter, met inachtneming van een eventueel gemaakte verdunning;

W = massa van het monster in gram, overeenkomend met de voor de kolomzuivering gebruikte hoeveelheid extract.

6.2. *Het meten door middel van fluorodensitometrie*

Het gehalte aan aflatoxine B_1 van het monster in μg/kg (ppb) wordt berekend met behulp van de volgende formule:

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

waarin:

Y = volume van het op de plaat opgebrachte extract in microliter (10 of 20 μl);

S = het aantal nanogram aflatoxine B_1 in de extractvlek (rekening houdend met het volume Y) afgeleid uit de metingen;

V = eindvolume van het extract in microliter, met inachtneming van een eventueel gemaakte verdunning;

W = massa van het monster in gram, overeenkomend met de voor de kolomzuivering gebruikte hoeveelheid extract.

7. **Bereiding en controle van de standaardoplossing (3.16)**

7.1. *Bepaling van de aflatoxine-B_1-concentratie*

Bereid een aflatoxine-B_1-standaardoplossing in chloroform (3.2) of in het mengsel van benzeen en acetonitril (3.6) met een concentratie van 8 tot 10 μg per ml. Meet het absorptiespectrum tussen 330 en 370 nm met een spectrofotometer (4.11).

Bepaal de optische dichtheid (A) bij 363 nm wanneer chloroform als oplosmiddel is gebruikt en bij 348 nm wanneer het mengsel benzeen-acetonitril als oplosmiddel is gebruikt.

Bereken de aflatoxine-B_1-concentratie in microgram per ml oplossing met behulp van de volgende formules:

$\frac{312 \cdot A \cdot 1000}{20600}$ voor de oplossing in chloroform

$\frac{312 \cdot A \cdot 1000}{19800}$ voor de oplossing in het mengsel van benzeen en acetonitril.

Voer de, voor het bereiden van een standaard-werkoplossing met een aflatoxine-B_1-concentratie van ongeveer 0,1 μg per ml, noodzakelijke verdunningen uit onder het uitsluiten van daglicht. Deze oplossing blijft twee weken stabiel indien zij in de koelkast wordt bewaard bij 4 °C.

7.2. *Controle op de chromatografische zuiverheid*

Breng op een plaat voor dunnelaagchromatografie (4.8) 5 μl op van de standaardoplossing, die 8 tot 10 μg aflatoxine B_1 per ml bevat (zie 7.1). Ontwikkel het chromatogram volgens 5.4. Onder UV-licht mag slechts één vlek zichtbaar zijn; er mag geen fluorescentie worden waargenomen daar waar de stof oorspronkelijk werd opgebracht.

8. **Herhaalbaarheid**

Het verschil tussen de resultaten van twee door dezelfde analist aan hetzelfde monster uitgevoerde parallelle bepalingen zou niet meer mogen bedragen dan:

25 % van de hoogste waarde bij aflatoxine-B_1-gehalten van 10 tot en met 20 μg/kg,
5 μg in absolute waarde bij gehalten van 20 tot en met 50 μg/kg,
10 % van de hoogste waarde bij gehalten van meer dan 50 μg/kg.

9. **Reproduceerbaarheid**

Zie opmerkingen in deel C, punt 2.

B. METHODE DOOR MIDDEL VAN TWEEDIMENSIONALE DUNNELAAGCHROMATOGRAFIE

1. Doel en toepassingsgebied

Met behulp van deze methode is het mogelijk het aflatoxine-B_1-gehalte te bepalen in diervoeders die niet binnen het toepassingsgebied van methode A vallen. De ondergrens van de bepaling ligt bij 0,01 mg/kg (10 ppb). De methode is niet toepasbaar op voeders welke citruspersresten bevatten.

2. Principe

Het monster wordt onderworpen aan een extractie met chloroform. Het extract wordt gefiltreerd en een evenmatig deel wordt door middel van chromatografie op een kolom van silicagel gezuiverd. Het eluaat wordt ingedampt en het residu wordt in een bepaalde hoeveelheid chloroform of benzeen-acetonitrilmengsel opgelost. Een evenmatig deel van deze oplossing wordt aan tweedimensionale dunnelaagchromatografie onderworpen. De hoeveelheid aflatoxine B_1 wordt onder UV-licht of visueel of fluorodensitometrisch bepaald door vergelijking met bekende hoeveelheden aflatoxine-B_1-standaard. De identiteit van de uit het diervoeder geëxtraheerde aflatoxine B_1 moet met behulp van de aangegeven methode worden bevestigd.

3. Reagentia

Noot: Alle reagentia dienen, voor zover niet anders vermeld, van analytisch zuivere kwaliteit te zijn.

3.1. Aceton.

3.2. Chloroform, gestabiliseerd met 0,5 — 1,0 % ethanol 96 % (v/v).

3.3. n-Hexaan.

3.4. Methanol.

3.5. Diëthylether, vrij van water en peroxyden.

3.6. Mengsel van benzeen en acetonitril: 98/2 (v/v).

3.7. Mengsel van chloroform (3.2) en methanol (3.4): 97/3 (v/v).

3.8. Silicagel voor kolomchromatografie, korrelgrootte 0,05 — 0,20 mm.

3.9. Watten, hydrofiel en met chloroform ontvet, of glaswol.

3.10. Natriumsulfaat, vrij van water, korrels.

3.11. Inert gas, b.v. stikstof.

3.12. Zoutzuur 1 N.

3.13. Diatomeeënaarde (Hyflosupercel), met zuur gewassen.

3.14. Silicagel G-HR of gelijkwaardig voor dunnelaagchromatografie.

3.15. Loopvloeistoffen.

3.15.1. Mengsel van diëthylether (3.5), methanol (3.4), en water: 94/4,5/1,5 (v/v/v), verzadigde ontwikkelbak.

3.15.2. Mengsel van chloroform (3.2) en aceton (3.1): 9/1 (v/v), onverzadigde ontwikkelbak.

3.16. Standaardoplossing bevattende ongeveer 0,1 μg aflatoxine B_1 per ml in chloroform (3.2) of in het mengsel van benzeen en acetonitril (3.6), bereid en gecontroleerd zoals aangegeven onder punt 7 van methode A.

4. Apparatuur

Zie punt 4 van methode A.

5. **Uitvoering**

5.1. *Voorbereiding van het monster*
5.2. *Extractie*
5.3. *Kolomzuivering*

} zie de punten 5.1, 5.2 en 5.3 van methode A

5.4. *Tweedimensionale dunnelaagchromatografie*

5.4.1. Opbrengen van oplossingen (als aangegeven in figuur 1)

Trek op een plaat (4.8) twee lijnen evenwijdig aan twee aanliggende zijden (op een afstand van respectievelijk 5 en 6 cm van deze zijden), die de migratie van de loopvloeistoffen moeten afbakenen. Breng met behulp van capillaire pipetten of microspuitjes op de plaat de hieronder aangegeven oplossing op:

— *in punt A* 20 µl van het onder 5.3 verkregen gezuiverde extract van het monster;
— *in punt B* 20 µl van de standaardoplossing (3.16);
— *in punt C* 10 µl van de standaardoplossing (3.16);
— *in punt D* 20 µl van de standaardoplossing (3.16);
— *in punt E* 40 µl van de standaardoplossing (3.16).

Droog met behulp van een zwakke stroom lucht of inert gas (3.11).
De verkregen vlekken moeten een diameter van ongeveer 5 mm hebben.

5.4.2. Ontwikkeling (als aangegeven in figuur 1)

Ontwikkel het chromatogram in richting I met behulp van de loopvloeistof (3.15.1) (laag van 1 cm in een verzadigde ontwikkelbak) in het donker, totdat het vloeistoffront de grenslijn bereikt. Neem de plaat uit de ontwikkelbak en laat deze minstens 15 minuten in het donker en bij omgevingstemperatuur drogen. Ontwikkel vervolgens het chromatogram in richting II met behulp van de loopvloeistof (3.15.2) (laag van 1 cm in een onverzadigde ontwikkelbak) in het donker, totdat het front van de loopvloeistof de grenslijn bereikt. Neem de plaat uit de ontwikkelbak en laat deze in het donker bij omgevingstemperatuur drogen.

5.4.3. Beoordelen van het chromatogram (zie figuur 2)

Bekijk het chromatogram onder UV-licht op een afstand van 10 cm van de lamp (4.9). Bepaal de plaats van de vlekken met blauwe fluorescentie B, C, D en E van aflatoxine B_1 afkomstig van de standaardoplossing en trek twee denkbeeldige lijnen door deze vlekken loodrecht op de richtingen van het ontwikkelen. Het snijpunt P van deze lijnen is de plaats waar men de aflatoxine-B_1-vlek zou verwachten, afkomstig van het in A opgebrachte extract van het monster (fig. 1). Deze vlek kan zich echter in werkelijkheid bevinden in punt Q gelegen op het snijpunt van twee denkbeeldige lijnen die onderling een hoek van ongeveer 100° vormen en respectievelijk door de vlekken B en C gaan. Bepaal de hoeveelheid aflatoxine B_1 van het extract van het monster zoals aangegeven in 5.5.

5.4.4. Aanvullende chromatografie

Trek op een nieuwe plaat (4.8) twee lijnen evenwijdig aan twee aanliggende zijden, zoals aangegeven in fig. 1. Breng in punt A (zie fig. 1) 20 µl van het onder 5.3 gezuiverde extract van het monster en op dezelfde plaats 20 µl van de standaardoplossing (3.16) op Ontwikkel zoals aangegeven in 5.4.2. Bekijk het chromatogram onder UV-licht (4.9) en ga na of:

— de aflatoxine-B_1-vlekken van het extract en de standaardoplossing samenvallen,
— de fluorescentie van deze vlek intenser is dan die van de aflatoxine-B_1-vlek in punt Q van de eerste plaat.

5.5. *Kwantitatieve bepaling*

Voer de bepaling ofwel visueel ofwel fluorodensitometrisch uit op de wijze die hierna is beschreven:

5.5.1. Visuele bepaling

Bepaal de hoeveelheid aflatoxine B_1 in het extract door de intensiteit van de fluorescentie van de vlek in het extract met een van de vlekken C, D en E van de standaardoplossing te vergelijken. Interpoleer indien nodig. Verdun indien de fluorescentieintensiteit van 20 µl extract sterker is dan die van 40 µl standaardoplossing het

extract 10 of 100 maal met chloroform (3.2) of het mengsel van benzeen en acetonitril (3.6) alvorens het extract aan een nieuwe dunnelaagchromatografische scheiding te onderwerpen.

5.5.2. Bepaling door fluorodensitometrie

Meet de fluorescentie-intensiteit van de aflatoxine-B_1-vlekken met behulp van een fluorodensitometer bij een golflengte van 365 nm voor de extinctie en bij een golflengte van 443 nm voor de emissie. Bepaal de hoeveelheid aflatoxine B_1 van de extractvlekken door de fluorescentie-intensiteiten van deze vlekken te vergelijken met die van de vlekken C, D en E van de standaardoplossing.

5.6. *Bevestiging van de identiteit van aflatoxine B_1*

Zie punt 5.6 van methode A.

6. **Berekening van de resultaten**

Zie punt 6 van methode A.

7. **Herhaalbaarheid**

Zie punt 8 van methode A.

8. **Reproduceerbaarheid**

Zie opmerkingen in deel C, punt 2.

C. OPMERKINGEN IN VERBAND MET DE METHODEN A EN B

1. **Ontvetten**

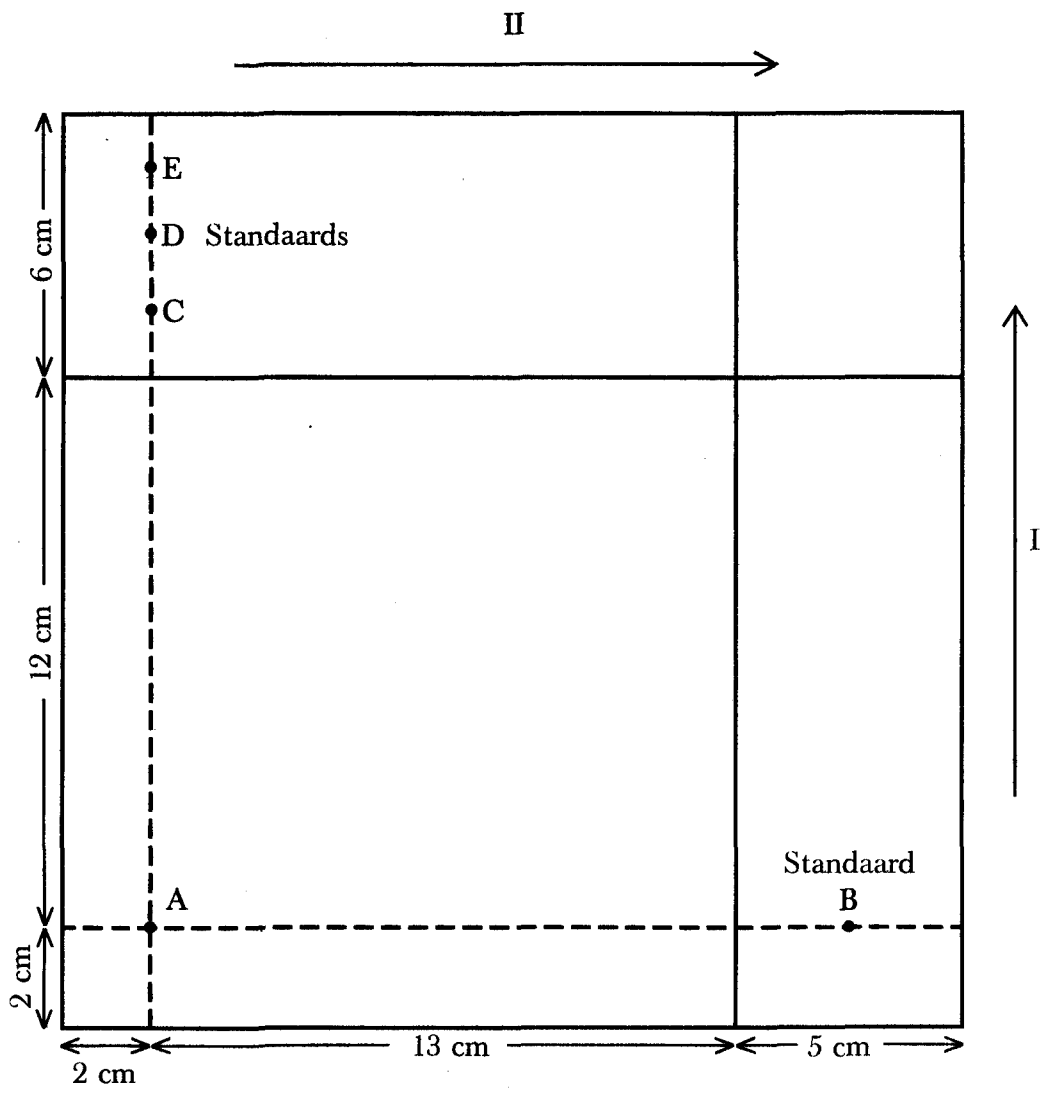
Monsters met een vetgehalte van meer dan 5 % moeten met petroleumether (kookpunt 40-60 °C worden ontvet nadat zij op de in punt 5.1 aangegeven wijze werden voorbereid. In dergelijke gevallen moeten de analyseresultaten worden uitgedrukt op basis van het gewicht van het niet-ontvette monster.

2. **Reproduceerbaarheid van de resultaten**

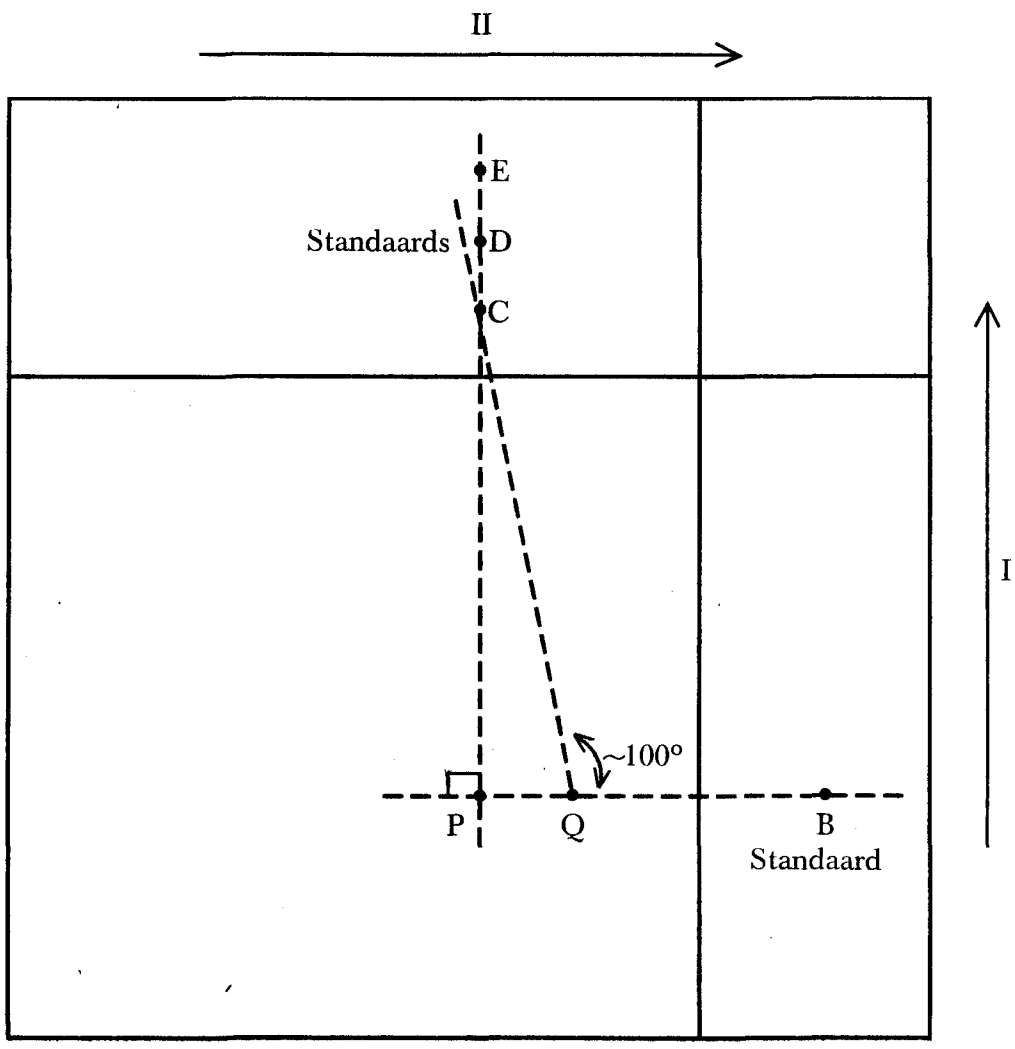
De reproduceerbaarheid van de resultaten, zijnde de variatie tussen de resultaten verkregen door twee of meer laboratoria gemeten aan hetzelfde monster werd geschat op:

- ± 50 % van de gemiddelde waarde in aflatoxine B_1 bij gemiddelde waarden van 10 tot en met 20 µg/kg;
- ± 10 µg/kg van de gemiddelde waarde bij gemiddelde waarden groter dan 20 en tot en met 50 µg/kg;
- ± 20 % van de gemiddelde waarde bij gemiddelde waarden van meer dan 50 µg/kg.

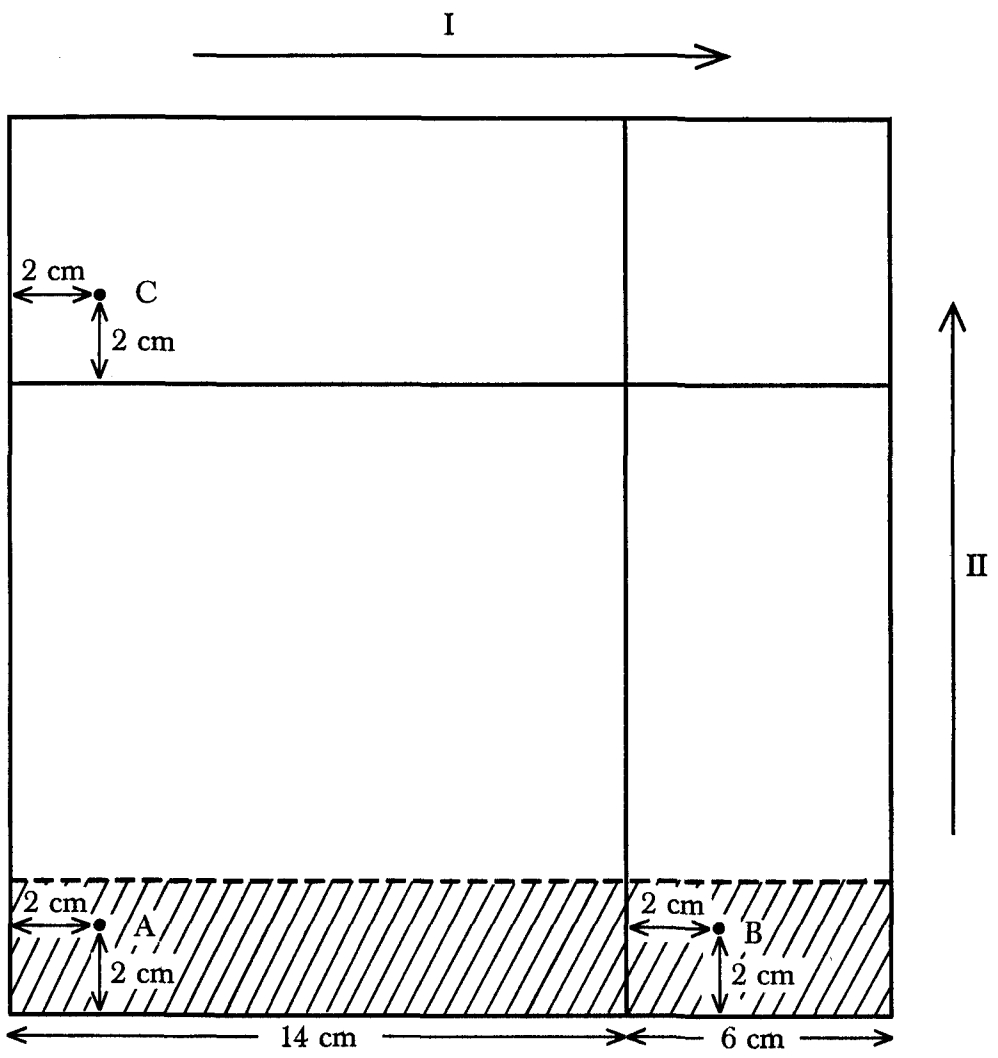
BIJLAGE



Figuur 1



Figuur 2



Figuur 3