KOMMISSIONENS SYVENDE DIREKTIV

af 1. marts 1976

om fastsættelse af fællesskabsanalysemetoder til den officielle kontrol med foderstoffer

(76/372/EØF)

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE FÆLLESSKABER HAR —

under henvisning til traktaten om oprettelse af Det europæiske økonomiske Fællesskab,

under henvisning til Rådets direktiv af 20. juli 1970 om indførelse af fællesskabsprøveudtagningsmåder og -analysemetoder for så vidt angår den officielle kontrol med foderstoffer (1), senest ændret ved tiltrædelsesakten (2), særlig artikel 2, og

ud fra følgende betragtninger:

Ved ovennævnte direktiv er det fastsat, at den officielle kontrol med foderstoffer til konstatering af, om de betingelser, der er fastsat på grundlag af administrativt eller ved lov fastsatte bestemmelser om foderstoffernes beskaffenhed og sammensætning, er opfyldt, skal foretages efter fællesskabsprøveudtagningsmåder og -analysemetoder;

der er allerede ved Kommissionens direktiver 71/250/EØF af 15. juni 1971 (3), 71/393/EØF af 18. november 1971 (4), 72/199/EØF af 27. april 1972 (5), 73/46/EØF af 5. december 1972 (6), 74/203/EØF af 25. marts 1974 (7) og 75/84/EØF af 20. december 1974 (8) fastsat en række fællesskabsanalysemetoder; i betragtning af den hastighed, hvormed arbejdet siden da er skredet frem, bør der fastsættes en syvende serie af metoder;

de i dette direktiv fastsatte foranstaltninger er i overensstemmelse med udtalelse fra Den stående Foderstofkomité —

UDSTEDT FØLGENDE DIREKTIV:

« *Artikel 1*

Medlemsstaterne foreskriver, at analyserne i forbindelse med den officielle kontrol af foderstoffer for så vidt angår deres indhold af Aflatoxin B_1 skal foretages efter de metoder, der er beskrevet i bilaget til dette direktiv.

De almindelige bestemmelser i første del (indledning) af bilaget til Kommissionens første direktiv 71/250/EØF af 15. juni 1971, finder med undtagelse af den del, der vedrører tilberedelsen af analyseprøven, anvendelse på de metoder, der er beskrevet i bilaget til dette direktiv.

Artikel 2

Medlemsstaterne sætter senest den 1. oktober 1976 de nødvendige administrativt eller ved lov fastsatte bestemmelser i kraft for at efterkomme bestemmelserne i dette direktiv. De underretter omgående Kommissionen herom.

Artikel 3

Dette direktiv er rettet til medlemsstaterne.

Udfærdiget i Bruxelles, den 1. marts 1976.

På Kommissionens vegne

P. J. LARDINOIS

Medlem af Kommissionen

---

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

BILAG

BESTEMMELSE AF AFLATOXIN B_1

A. FREMGANGSMÅDE VED ENDIMENSIONAL TYNDTLAGSKROMATOGRAFI

1. **Formål og anvendelsesområde**

Metoden gør det muligt at bestemme indholdet af aflatoxin B_1 i følgende foderstoffer: jordnødkage/skrå, kokoskage/skrå, hørfrøkage/skrå, sojakage/skrå, sesamkage, babassukage og majskimkage, korn og kornprodukter, formalede ærter, kartoffelpulp og -stivelse, tapiokamel og tørret sukkerroeaffald. Den mindste mængde der kan bestemmes, er 0,01 mg/kg (10 ppm).

Ved tilstedeværelse af interfererende stoffer, som forstyrrer bestemmelserne, må analysen udføres efter fremgangsmåden under B (ved todimensional tyndtlagskromatografi).

2. **Princip**

Prøven ekstraheres med chloroform. Ekstrakten filtreres og en alikvot del af ekstrakten renses ved søjlekromatografi på kiselgel. Eluatet inddampes, og inddampningsresten opløses i en bestemt mængde chloroform eller i en blanding af benzen og acetonitril. En alikvot del af denne opløsning tyndtlagskromatograferes. Mængden af aflatoxin B_1 bestemmes under UV bestråling af kromatogrammet, enten visuelt eller ved fluorodensitometri, ved sammenligning med kendte mængder af aflatoxin B_1 standard. Identiteten af det ekstraherede aflatoxin B_1 i foderstoffet skal bekræftes ved hjælp af de anførte fremgangsmåder.

3. **Reagenser**

NB.: Alle reagenserne skal være af »analyse« kvalitet, medmindre andet er angivet.

3.1. Acetone.

3.2. Chloroform, stabiliseret med 0,5 til 1,0 % 96 % ethanol (v/v).

3.3. n-Hexan.

3.4. Methanol.

3.5. Vandfri diethylether, peroxidfrit.

3.6. Blanding af benzen og acetonitril: 98/2 (v/v).

3.7. Blanding af chloroform (3.2) og methanol (3.4): 97/3 (v/v).

3.8. Kiselgel til søjlekromatografi kornstørrelse: 0,05 til 0,20 mm.

3.9. Hygroskopisk bomuld, forinden affedtet med chloroform, eller glasuld.

3.10. Natriumsulfat, vandfrit, granuleret.

3.11. Inaktiv luftart, f.eks. kvælstof.

3.12. 1 N saltsyre.

3.13. 50 % (v/v) svovlsyre.

3.14. Diatoméjord (Hyflosupercel), vasket i syre.

3.15. Kiselgel G-HR eller tilsvarende til tyndtlagskromatografi.

3.16. Standardopløsning af ca. 0,1 μg aflatoxin B_1 pr. ml. i chloroform (3.2) eller i benzen acetonitril-blandingen (3.6), tilberedt og kontrolleret som angivet under punkt 7.

3.17. Kvalitativ standardopløsning af ca. 0,1 µg aflatoxin B_1 og B_2 pr. ml i chloroform (3.2) eller i benzen/acetonitril-blandingen (3.6). Disse koncentrationer er kun vejledende. De skal afpasses, så der opnås den samme fluorescensintensitet for begge aflatoxinerne.

3.18. Udviklingsvæsker:

3.18.1. Chloroform (3.2)/acetone (3.1): 9/1 (v/v), umættet kar;

3.18.2. Diethylether (3.5)/methanol (3.4)/vand: 96/3/1 (v/v), umættet kar,

3.18.3. Diethylether (3.5)/methanol (3.4)/vand: 94/4,5/1,5 (v/v), mættet kar;

3.18.4. Chloroform (3.2)/methanol (3.4): 94/6 (v/v), mættet kar;

3.18.5. Chloroform (3.2)/methanol (3.4): 97/3 (v/v), mættet kar.

4. Apparatur

4.1. Kværn.

4.2. Rysteapparat eller magnetomrører.

4.3. Foldefiltre, Schleicher og Schüll nr. 588 eller tilsvarende, diameter: 24 cm.

4.4. Kromatografisøjle af glas (indvendig diameter: 22 mm, længde: 300 mm), med teflonhane og 250 ml beholder.

4.5. Rotationsfordamper med 500 ml rundbundet kolbe.

4.6. 500 ml koniske kolber med slib og glasprop.

4.7. Tyndtlagskromatografiudstyr.

4.8. Glasplader til tyndtlagskromatografi, 200×200 mm, behandlet som beskrevet nedenfor (de angivne mængder er passende til at dække fem plader): 30 g G-HR kiselgel (3.15) hældes i en konisk kolbe; der tilsættes 60 ml destilleret vand, sættes prop i og rystes i et minut. Suspensionen stryges ud på pladerne, så der fremkommer et ensartet lag på 0,25 mm's tykkelse. Pladerne tørres i luften og opbevares dernæst i en ekssikkator, forsynet med kiselgel. Pladerne aktiveres på anvendelsestidspunktet ved anbringelse i et varmeskab ved 110 °C i en time. Fabriksfremstillede færdigplader er egnede i det omfang de giver lignende resultater som de plader, der er behandlet på den ovenfor beskrevne måde.

4.9. Lang-bølget UV-lampe (360 nm). Fluorecensintensiteten skal gøre det muligt helt klart at skelne en plet på 1,0 ng aflatoxin B_1 på en plade til tyndtlagskromatografi i en afstand af 10 cm fra lampen.

4.10. 10 ml måleglas med polyethylenpropper.

4.11. UV-spektrofotometer.

4.12. Fluorodensitometer (eventuelt).

5. Fremgangsmåde

5.1. *Tilberedning af prøven* (se bemærkninger, afsnit C, punkt 1).

Prøven findeles således, at den kan passere igennem en sigte med en maskevidde på 1 mm (som anbefalet af ISO E 565).

5.2. *Ekstraktion*

50,0 g af den findelte og homogeniserede prøve overføres til en 500 ml konisk kolbe (4.6). 25 g diatoméjord (3.14), 25 ml vand og 250 ml chloroform (3.2) tilsættes.

Kolben tilproppes og rystes eller omrøres i 30 minutter ved hjælp af apparaturet (4.2) og indholdet filtreres gennem et foldefilter (4.3). De første 10 ml af filtratet kasseres, dernæst opsamles 50 ml.

5.3. *Oprensning på søjle*

Bunden af et kromatografirør (4.4) forsynes med en prop af vat eller glasuld (3.9), røret fyldes to tredjedele op med chloroform (3.2), og der tilsættes 5 g natriumsulfat (3.10).

Sørg for, at natriumsulfatlagets øvre overflade er plan, tilsæt dernæst 10 g kiselgel (3.8) i små portioner. Efter hver tilsætning røres omhyggeligt for at fjerne luftblærer. Efter henstand i 15 minutter, tilsættes forsigtigt 15 g natriumsulfat (3.10). Lad det ovenstående chloroform løbe ud således at overfladen står umiddelbart over natriumsulfatlaget.

De 50 ml ekstrakt, som blev opsamlet under 5.2, blandes med 100 ml n-Hexan (3.3), og blandingen overføres kvantitativt til søjlen. Lad væsken synke, indtil væskeniveauet når natriumsulfatlagets overflade og fjern den gennemløbne væske. Dernæst tilsættes 100 ml diethylether (3.5), der elueres indtil væskeniveauet atter når natriumsulfatlagets overflade. Under disse operationer skal gennemløbshastigheden holdes på 8 til 12 ml i minuttet, og søjlen må ikke løbe tør. Den gennemløbne væske kasseres. Derefter elueres med 150 ml af chloroform/methanol-blandingen (3.7), og hele eluatet opsamles.

Eluatet inddampes til næsten tørhed ved gennemblæsning af inaktiv luft (3.11) og ved en temperatur på under 50 °C ved hjælp af rotationsfordamperen (4.5). Inddampningsresten overføres kvantitativt med chloroform (3.2) eller benzen/acetonitril-blandingen til et 10 ml måleglas (4.10). Opløsningen inddampes ved gennemblæsning af inaktiv luft (3.11) og rumfanget justeres til 2,0 ml med chloroform (3.2) eller benzen/acetonitril-blandingen (3.6).

5.4. *Tyndtlagskromatografi*

De nedenfor angivne rumfang af standardopløsningen og af ekstrakten påsættes som pletter på en plade til tyndtlagskromatografi (4.8), 2 cm fra den underste kant med en indbyrdes afstand på 2 cm:

— 10, 15, 20, 30 og 40 µl af aflatoxin B_1 standardopløsning (3.16);

— 10 µl af ekstrakten fra punkt 5.3 og, *oven i dette*, 20 µl af standardopløsning (3.16);

— 10 og 20 µl af ekstrakten fra punkt 5.3.

Kromatogrammet udvikles i dæmpet belysning ved hjælp af en af væskerne (3.18). Valget af udviklingsvæske skal finde sted forinden ved at anbringe 25 µl af den kvalitative standardopløsning (3.17) på pladen og ved at sikre sig, at aflatoxinerne B_1 og B_2 adskilles fuldstændigt under kromatograferingen.

Opløsningsmidlerne afdampes i dæmpet belysning, og der bestråles med UV-lys, idet pladen anbringes 10 cm fra lampen (4.9). Aflatoxin B_1-pletterne fluorescerer blåt.

5.5. *Kvantitative bestemmelser*

Bestemmelserne foretages enten visuelt eller ved hjælp af fluorodensitometri, som angivet nedenfor.

5.5.1. Visuel måling

Mængden af aflatoxin B_1 i ekstrakten bestemmes ved at sammenligne fluorescensintensiteten fra pletterne fra ekstrakten med intensiteten fra pletterne fra standardopløsningen. Der interpoleres om nødvendigt. Den fluorescens, som fremkommer ved at anbringe ekstrakten oven i standardopløsningen, skal være kraftigere end den, som udsendes fra de 10 µl ekstrakt, og der må kun kunne opfattes en plet. Hvis fluorescens-intensiteten fra de 10 µl ekstrakt er kraftigere end den, som de 40 µl standardopløsning giver, fortyndes ekstrakten 10 eller 100 gange med chloroform (3.2) eller med benzen/acetonitril-blandingen (3.6), inden den igen tyndtlagskromatograferes.

5.5.2. Målinger ved hjælp af fluorodensitometri

Fluorescensintensiteten fra aflatoxin B_1-pletterne måles med et fluorodensitometer (4.12), idet der benyttes en excitationsbølgelængde på 365 nm og en emissionsbølgelængde på 443 nm. Mængden af aflatoxin B_1 i de afsatte ekstrakter bestemmes ved at sammenligne ekstraktpletternes fluorescensintensitet med standardopløsningens.

5.6. *Verificering af identiteten af aflatoxin B_1*

Identiteten af det aflatoxin B_1, som findes i ekstrakten, verificeres ved de nedenfor angivne fremgangsmåder.

5.6.1 Behandling med svovlsyre

Påsprøjt forstøvet svovlsyre (3.13) på kromatogrammet fra punkt 5.4. Under UV-bestråling skal fluorescensen fra aflatoxin B_1-pletterne efter påsprøjtningen skifte fra blåt til gult.

5.6.2. Todimensionelt kromatografi der omfatter dannelse af aflatoxin B_1-hemiacetal (aflatoxin B_{2a})

NB: De nedenfor beskrevne arbejdsoperationer skal foretages i overensstemmelse med skemaet i fig. 3.

5.6.2.1. Anbringelse af opløsningerne

På en plade (4.8) trækkes to rette linier parallelt med to hosliggende sider (i en afstand af 6 cm fra disse sider), med det formål at afgrænse opløsningsmidlernes bevægelse. Ved hjælp af kapillarpipetter eller mikrosprøjter anbringes de nedenfor angivne opløsninger på pladen.

— *I punkt A:* et rumfang renset ekstrakt fra punkt 5.3 indeholdende ca. 2,5 ng aflatoxin B_1;

— *I punkterne B og C:* 25 µl af standardopløsning (3.16).

5.6.2.2. Kromatografering

Kromatogrammet udvikles i retning I ved hjælp af væsken (3.18.1) (1 cm tykt lag i umættet kar), i dæmpet belysning, indtil væskefronten når grænselinjen.

Pladen fjernes fra karret og tørres i fem minutter ved stuetemperatur i dæmpet belysning. Dernæst sprøjtes med forstøvet saltsyre (3.12) på et 2,5 cm bredt stykke af pladen, som dækker punkterne A og B (angivet ved det skraverede felt på fig. 3), indtil mørkfarvning, idet resten af pladen beskyttes med en tynd glasplade. Efter 10 minutters indvirkning i mørke, tørres i en luftstrøm ved stuetemperatur.

Derefter udvikles kromatogrammet i retning II ved hjælp af væsken (3.18.1) (1 cm tykt lag i umættet kar), i dæmpet belysning, indtil væskefronten når grænselinjen. Pladen fjernes fra karret og tørres ved stuetemperatur.

5.6.2.3. Fortolkning af kromatogrammet

Kromatogrammet undersøges ved UV lys (4.9), og de nedenfor angivne iagttagelser kontrolleres:

a) forekomst af en fluorescerende blå plet af aflatoxin B_1, som hidrører fra den i C anbragte standardopløsning (bevægelse i retning I);

b) forekomst af en fluorescerende blå plet af aflatoxin B_1 (som ikke har reageret med saltsyren) og af en mere intens fluorescerende blå plet af aflatoxin B_1-hemiacetal, som hidrører fra den i B anbragte standardopløsning (bevægelse i retning II);

c) forekomst af pletter, som ligner de under punkt b) beskrevne, hidrørende fra det i A anbragte ekstrakt. Disse pletters beliggenhed defineres ved B_1-aflatoxinets tilbagelagte afstand fra punkt A i retning I (samme afstand, som er tilbagelagt af den i C anbragte standardopløsning) fulgt af den afstand, som er tilbagelagt i retning II af B_1-aflatoxinet (som ikke har reageret med saltsyren) og af aflatoxin B_1-hemiacetalet (samme afstand som den, den i B anbragte standardopløsning har tilbagelagt); fluorescensintensiteten fra de hemiacetalpletter, som hidrører fra ekstrakten og fra den i B anbragte standardopløsning, bør stemme overens.

6. Beregning af resultater

6.1. *På grundlag af visuel måling*

Aflatoxin B_1-indholdet i prøvematerialet i µg/kg (ppb) beregnes efter formlen:

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

hvor:

Y og X er indholdet udtrykt i µl af henholdsvis standardopløsningen af aflatoxin B_1 (3.16) og af ekstrakten, som giver en tilsvarende fluorescensintensitet;

S = koncentrationen i µg af aflatoxin B_1 pr. ml standardopløsning (3.16);

V = ekstraktens slutvolumen i μl, under hensyntagen til eventuelle fortyndinger;

W = prøvens vægt i g svarende til rumfanget af den ekstrakt, som blev oprenset på søjle.

6.2. *På grundlag af fluorodensitometrisk måling*

Aflatoxin B_1-indholdet i μg pr. kg af prøven (ppb) beregnes efter formlen:

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

hvor:

Y = volumen i μl af den på pladen anbragte ekstrakt (10 eller 20 μl);

S = mængden i ng af aflatoxin B_1 fra den anbragte ekstrakt (under hensyntagen til volumen Y), udledt af bestemmelserne;

V = ekstraktens slutvolumen i μl, under hensyntagen til eventuelle fortyndinger;

W = prøvens vægt i g svarende til rumfanget af den ekstrakt, som blev oprenset på søjle.

7. Tilberedning af og kontrol med standardopløsning (3.16)

7.1. *Bestemmelse af aflatoxin B_1 koncentration*

Der tilberedes en standardopløsning af aflatoxin B_1 i chloroform (3.2) eller i benzen/acetonitrilblandingen (3.6) med en koncentration på 8 til 10 μg pr. ml. Absorptions spekret bestemmes mellem 330 og 370 nm ved hjælp af spektrofotometret (4.11).

Lysabsorptionen (A) måles ved 363 nm for chloroformopløsningens vedkommende; ved 348 nm for benzen/acetonitril-blandingen vedkommende.

Aflatoxin B_1-koncentrationen i μg/ml opløsning beregnes ud fra nedenstående formler:

$\frac{312 \cdot A \cdot 1000}{20\,600}$ for chloroform-opløsningen

$\frac{312 \cdot A \cdot 1000}{19\,800}$ for opløsningen i benzen/acetonitril-blandingen.

I dæmpet belysning tilberedes passende fortyndinger til en arbejdsstandardopløsning med en aflatoxin B_1 koncentration på ca 0,1 μg/ml. Ved opbevaring i køleskab ved 4 °C er denne opløsning holdbar i to uger.

7.2. *Kontrol af den kromatografiske renhed*

På en plade (4.8) anbringes 5 μl af standardopløsningen med 8 — 10 μg aflatoxin B_1 pr. ml (jf. 7.1). Kromatogrammet udvikles som beskrevet under punkt 5.4. Fluorescensen må ved UV-lys kun give anledning til opfattelse af en enkelt plet, og der må ikke opfattes nogen fluorescens i den oprindeligt afsatte prøves område.

8. Repeterbarhed

Forskellen mellem resultaterne af to sideløbende bestemmelser udført af den samme person på den samme prøve bør ikke overstige:

— 25 % af det højeste resultat for et aflatoxinindhold på mellem 10 og 20 μg/kg,

— 5 μg i absolut værdi for et indhold på mellem 20 og 50 μg/kg,

— 10 % af det højeste resultat for et indhold på over 50 μg/kg.

9. Reproducerbarhed

Se bemærkninger, afsnit C, punkt 2.

B. FREMGANGSMÅDE VED TODIMENSIONAL TYNDTLAGSKROMATOGRAFI

1. Formål og anvendelsesområde

Metoden gør det muligt at bestemme indholdet af aflatoxin B_1 i foderstoffer som ikke kan bestemmes under metode A. Den mindste mængde, der kan bestemmes, er 0,01 mg/kg (10 ppb). Metoden kan ikke anvendes til foderstoffer, der indeholder citruspulp.

2. Princip

Prøven ekstraheres med chloroform. Ekstrakten filtreres, en alikvot del af ekstrakten oprenses ved søjlekromatografi på kiselgel. Eluatet inddampes, og inddampningsresten opløses i en bestemt mængde chloroform eller i en blanding af benzen og acetonitril. En alikvot del af denne opløsning tyndtlagskromatograferes todimensionalt. Mængden af aflatoxin B_1 bestemmes under UV-bestråling af kromatogrammet enten visuelt eller ved fluorodensitometri, ved sammenligning med kendte mængder aflatoxin B_1 standard. Identiteten af det ekstraherede aflatoxin B_1 af foderstoffet skal verificeres.

3. Reagenser

NB: Alle reagenserne skal være af »analyse« kvalitet, medmindre andet er angivet.

3.1. Acetone.

3.2. Chloroform, stabiliseret med 0,5 til 1,0 % 96 % (v/v) ethanol.

3.3. n-Hexan.

3.4. Methanol.

3.5. Vandfri diethylether, peroxidfrit.

3.6. Blanding af benzen og acetonitril: 98/2 (v/v).

3.7. Blanding af chloroform (3.2) og methanol (3.4): 97/3 (v/v).

3.8. Kiselgel, til søjlekromatografi, kornstørrelse: 0,05 til 0,20 mm.

3.9. Hygroskopisk bomuld, forinden affedtet med chloroform, eller glasuld.

3.10. Natriumsulfat, vandfrit, granuleret.

3.11. Inaktiv luftart, f.eks. kvælstof.

3.12. 1 N saltsyre.

3.13. Diatoméjord (Hyflosupercel), vasket i syre.

3.14. Kiselgel G-HR eller tilsvarende til tyndtlagskromatografi.

3.15. Udviklingsvæsker.

3.15.1. Diethylether (3.5)/methanol (3.4)/vand: 94/4,5/1,5 (v/v) mættet kar.

3.15.2. Chloroform (3,2)/acetone (3.1): 9/1 (v/v) umættet kar.

3.16. Standardopløsning af ca. 0,1 μg aflatoxin B_1 pr. ml i chloroform (3.2) eller i benzen/acetonitril-blanding (3.6), tilberedt og kontrolleret som angivet under punkt 7 i metode A.

4. Apparatur

Se punkt 4 under fremgangsmåde A.

5. **Fremgangsmåde**

5.1. *Tilberedning af prøven*
5.2. *Ekstraktion*
5.3. *Oprensning på søjle*

} Se punkterne 5.1, 5.2 og 5.3 under fremgangsmåde A.

5.4. *Todimensionel tyndtlagskromatografi*

5.4.1. Anbringelse af opløsningerne (følg skemaet på (fig. 1)

På en plade (4.8) trækkes to rette linjer parallelt med to hosliggende sider (med en afstand på henholdsvis 5 og 6 cm fra disse sider), med det formål at afgrænse opløsningsmidlernes bevægelse. Ved hjælp af kapillarpipetter eller mikrosprøjter placeres de nedenfor angivne opløsninger på pladen:

— *i punkt A:* 20 µl oprenset ekstrakt fra punkt 5.3,
— *i punkt B:* 20 µl af standardopløsning (3.16),
— *i punkt C:* 10 µl af standardopløsning (3.16),
— *i punkt D:* 20 µl af standardopløsning (3.16),
— *i punkt E:* 40 µl af standardopløsning (3.16).

Tør pletterne ved hjælp af en svag luftstrøm (3.11). De påsatte pletter skal have en diameter på ca. 5 mm.

5.4.2. Kromatografering (skemaet på fig. 1 følges)

Kromatogrammet udvikles i retning I ved hjælp af væsken (3.15.1) (1 cm tykt lag i mættet kar), i dæmpet belysning, indtil væskefronten når grænselinien. Pladen fjernes fra karret og tørres i mindst 15 minutter ved stuetemperatur og i dæmpet belysning.

Dernæst udvikles kromatogrammet i retning II ved hjælp af væsken (3.15.2) (1 cm tykt lag i umættet kar) i dæmpet belysning indtil væskefronten når grænselinien. Pladen fjernes fra karret og tørres ved stuetemperatur og i dæmpet belysning.

5 4.3. Fortolkning af kromatogrammet (skemaet på fig. 2 følges)

Kromatogrammet bestråles med UV-lys, idet pladen anbringes 10 cm fra lampen (4.9). Placeringen af de blå fluorescenspletter fra aflatoxin B_1 i B, C, D og E, hidrørende fra standardopløsningen, lokaliseres og der trækkes to imaginære linjer igennem disse pletter vinkelret på udviklingsretningerne. Skæringspunktet P for disse rette linjer er det sted, hvor man skulle vente at finde den aflatoxin B_1-plet, som hidrører fra den i A (fig. 1) anbragte ekstrakt. Ikke desto mindre kan denne plet befinde sig i et punkt Q, beliggende i skæringspunktet for to imaginære rette linjer, som med hinanden danner en vinkel på ca. 100 °, og som går gennem pletterne i henholdsvis B og C. Mængden af aflatoxin B_1 i ekstrakten fra prøven bestemmes som givet under punkt 5.5.

5.4.4. Supplerende kromatografi

På en ny plade (4.8) trækkes to rette linjer parallelt med to hosliggende sider, som angivet i skemaet på fig. 1, og i punkt A (se fig. 1) anbringes 20 µl af den under 5.3 fremkomne rensede ekstrakt fra prøven, og oven i denne anbringes 20 µl af standardopløsning (3.16). Kromatogrammet udvikles som angivet under 5.4.2 og bestråles med UV lys (4.9), hvorefter det kontrolleres at

— aflatoxin B_1-pletterne fra ekstrakten og fra standardopløsningen falder sammen,
— fluorescensen fra denne plet er mere intens end fluorescensen fra den aflatoxin B_1-plet, som blev udviklet i punkt Q på den første plade.

5.5. *Kvantitative bestemmelser*

Bestemmelserne foretages enten visuelt eller ved hjælp af fluorodensitometri, som angivet nedenfor.

5.5.1. Visuel måling

Mængden af aflatoxin B_1 i ekstrakten bestemmes ved at sammenligne fluorescensintensiteten fra pletten fra ekstrakten med intensiteten fra pletterne C, D og E fra standardopløsningen. Der interpoleres om nødvendigt. Hvis fluorescensinten-

siteten fra de 20 µl ekstrakt er stærkere end intensiteten fra de 40 µl standardopløsning, fortyndes ekstrakten 10 eller 100 gange med chloroform (3.2) eller med benzen/acetonitril-blandingen (3.6), inden den på ny tyndtlagskromatograferes.

5.5.2. Målinger ved hjælp af fluorodensitometri

Intensiteten af fluorescensen fra aflatoxin B_1-pletterne måles ved hjælp af fluorodensitometri (4.12), idet der benyttes en excitationsbølgelængde på 365 nm og en emissionsbølgelængde på 443 nm. Mængden af aflatoxin B_1 i den afsatte ekstrakt bestemmes ved at sammenligne pletternes fluorescensintensitet med pletterne C, D og E fra standardopløsningen.

5.6. *Bekræftelse af indentiteten af aflatoxin* B_1

Se metode A under punkt 5.6.

6. **Beregning**

Se punkt 6 under metode A.

7. **Repterbarhed**

Se punkt 8 under metode A.

8. **Reproducerbarhed**

Se Bemærkninger, afsnit C, punkt 2.

C. BEMÆRKNINGER VEDRØRENDE FREMGANGSMÅDE A OG B

1. **Affedtning**

Prøver, der indeholder mere end 5 % fedt bør affedtes med petroleumsbengin (kogepunkt 40—60° C) efter den under 5.1 angivne tilberedning. I så fald skal analyseresultaterne sammenholdes med vægten af den ikke-affedtede prøve.

2. **Resultaternes reproducerbarhed**

Resultaternes reproducerbarhed, dvs. variationer mellem resultater opnået af to eller flere laboratorier på den samme prøve, er bestemt til at være:

± 50 % af gennemsnit for gennemsnitsværdier af aflatoxin B_1 mellem 10 og 20 µg/kg;

± 10 µg/kg af gennemsnit for gennemsnitsværdier større end 20 og op til 50 µg/kg;

± 20 % af gennemsnit for gennemsnitsværdier over 50 µg/kg.

BILAG

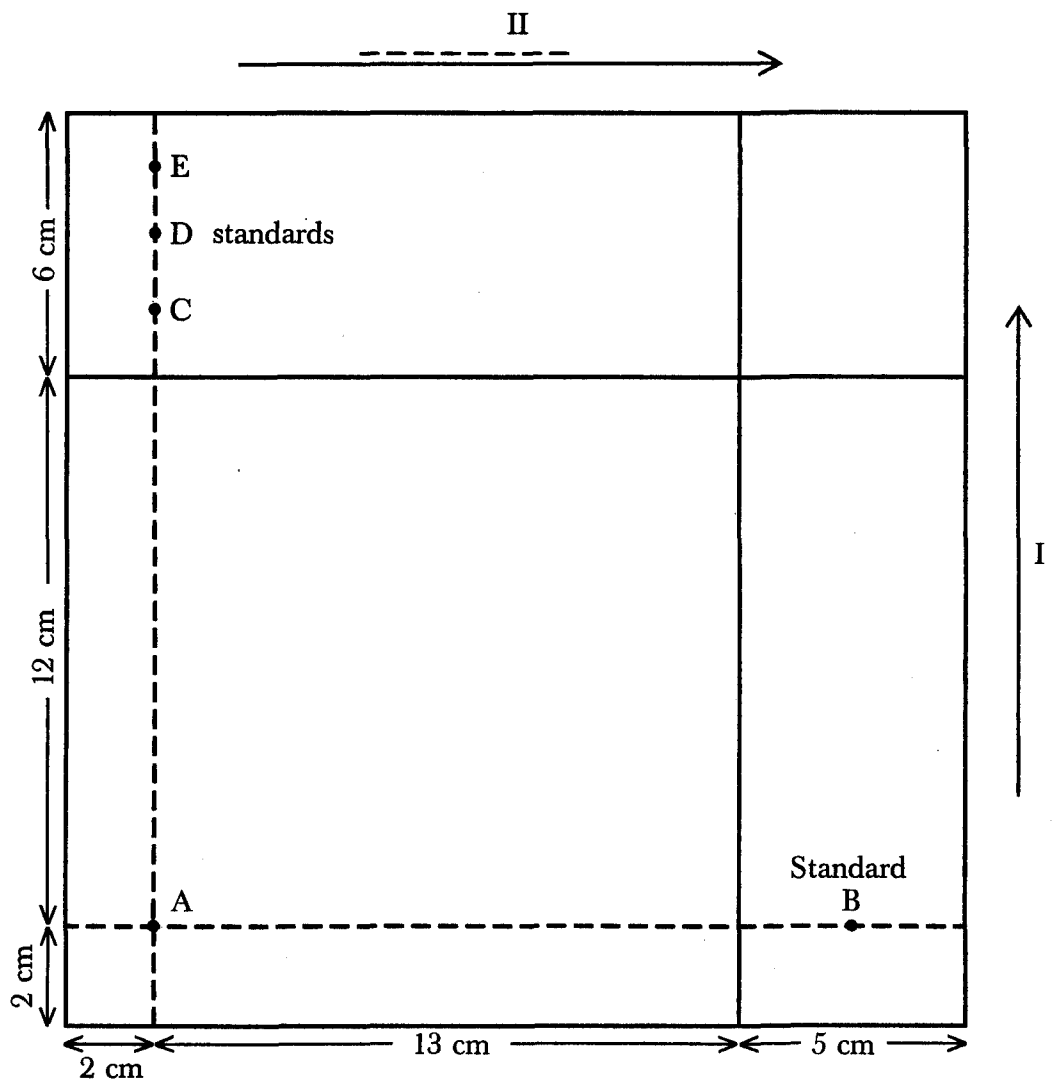

Fig. 1

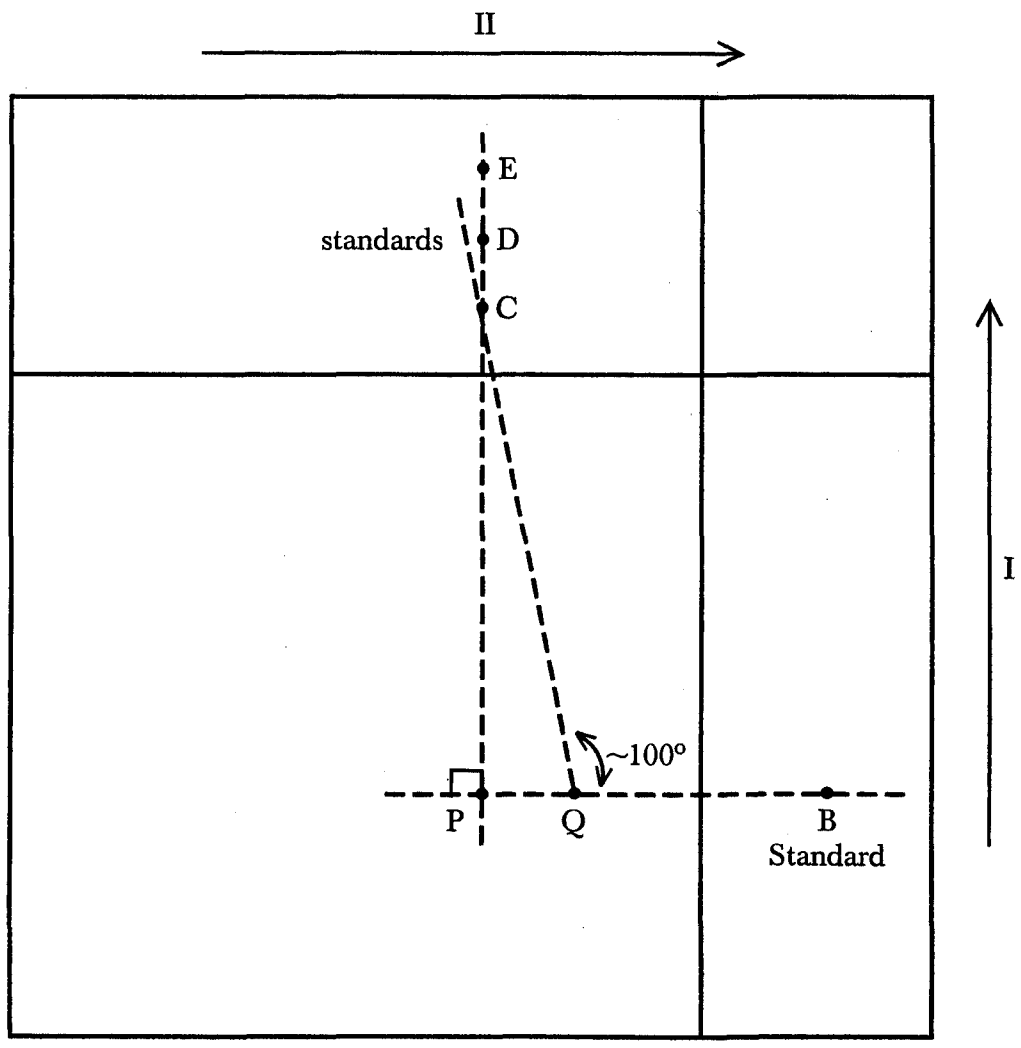

Fig. 2

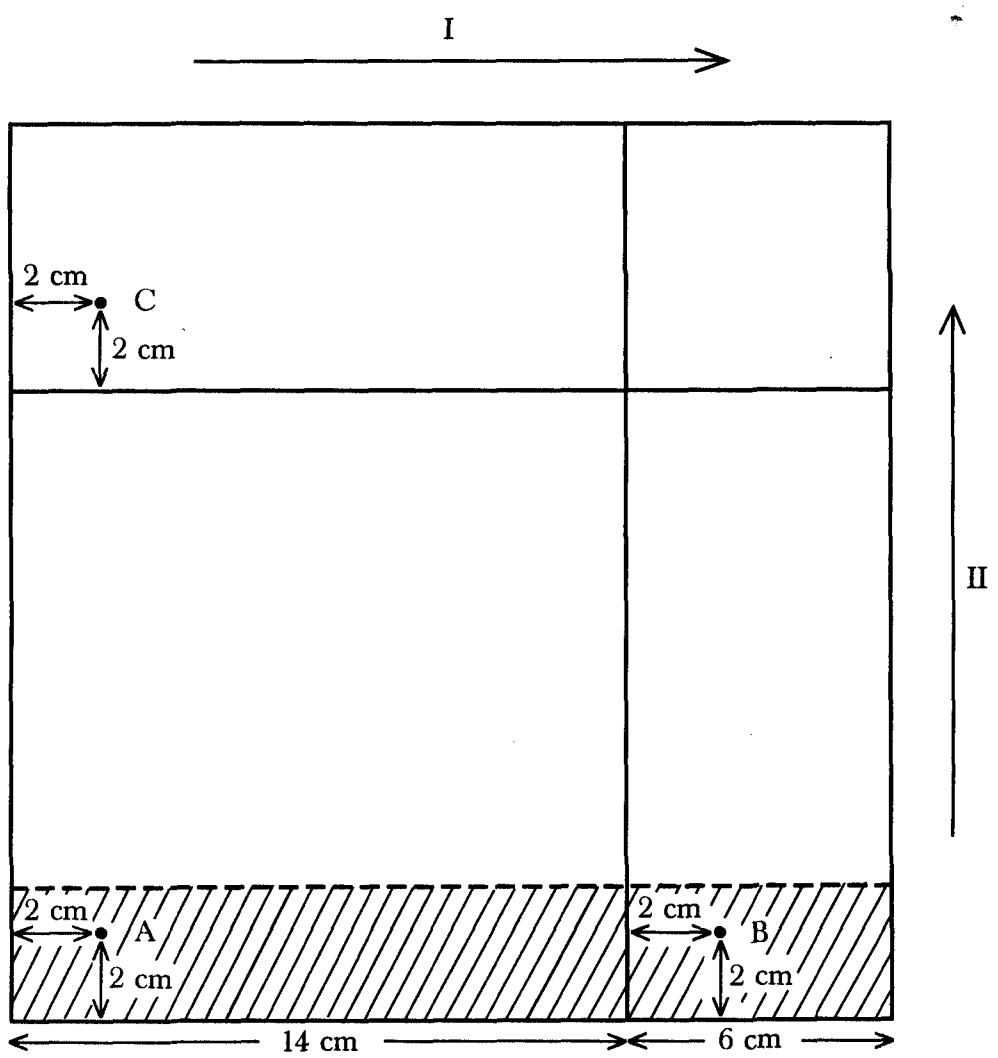

Fig. 3