

SIEBTE RICHTLINIE DER KOMMISSION

vom 1. März 1976

zur Festlegung gemeinschaftlicher Analysemethoden für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln

(76/372/EWG)

DIE KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN —

HAT FOLGENDE RICHTLINIE ERLASSEN:

Artikel 1

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen Wirtschaftsgemeinschaft,

gestützt auf die Richtlinie des Rates vom 20. Juli 1970 über die Einführung gemeinschaftlicher Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln ⁽¹⁾, zuletzt geändert durch die Beitrittsakte ⁽²⁾, insbesondere auf Artikel 2,

in Erwägung nachstehender Gründe:

Die obengenannte Richtlinie bestimmt, daß die amtlichen Untersuchungen von Futtermitteln zur Feststellung, ob die auf Grund der Rechts- oder Verwaltungsvorschriften festgelegten Anforderungen hinsichtlich Beschaffenheit und Zusammensetzung der Futtermittel erfüllt sind, nach gemeinschaftlichen Probenahmeverfahren und Analysemethoden durchgeführt werden.

Die Richtlinien 71/250/EWG, 71/393/EWG, 72/199/EWG, 73/46/EWG, 74/203/EWG und 75/84/EWG der Kommission vom 15. Juni 1971 ⁽³⁾, vom 18. November 1971 ⁽⁴⁾, vom 27. April 1972 ⁽⁵⁾, vom 5. Dezember 1972 ⁽⁶⁾, vom 25. März 1974 ⁽⁷⁾ und vom 20. Dezember 1974 ⁽⁸⁾ haben bereits eine Reihe von Analysemethoden festgelegt. Der Stand der seitdem durchgeführten Arbeiten ermöglicht es nunmehr, eine siebente Reihe von Analysemethoden festzulegen.

Die in dieser Richtlinie vorgesehenen Maßnahmen entsprechen der Stellungnahme des Ständigen Futtermittelausschusses —

Die Mitgliedstaaten schreiben vor, daß die Analysen für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln auf ihren Gehalt an Aflatoxin B₁ nach den in der Anlage zu dieser Richtlinie beschriebenen Methoden durchgeführt werden.

Die allgemeinen Bestimmungen des Teils 1 (Einführung) der Anlage zur Ersten Richtlinie 71/250/EWG der Kommission vom 15. Juni 1971, mit Ausnahme des die Vorbereitung der Analyseprobe betreffenden Teils, finden auf die in der Anlage zu dieser Richtlinie beschriebenen Methoden Anwendung.

Artikel 2

Die Mitgliedstaaten setzen spätestens zum 1. Oktober 1976 die erforderlichen Rechts- oder Verwaltungsvorschriften in Kraft, um den Bestimmungen dieser Richtlinie nachzukommen. Sie setzen die Kommission unverzüglich hiervon in Kenntnis.

Artikel 3

Diese Richtlinie ist an alle Mitgliedstaaten gerichtet.

Brüssel, den 1. März 1976

Für die Kommission

P. J. LARDINOIS

Mitglied der Kommission

⁽¹⁾ ABl. Nr. L 170 vom 3. 8. 1970, S. 2.

⁽²⁾ ABl. Nr. L 73 vom 27. 3. 1972, S. 14.

⁽³⁾ ABl. Nr. L 155 vom 12. 7. 1971, S. 13.

⁽⁴⁾ ABl. Nr. L 279 vom 20. 12. 1971, S. 7.

⁽⁵⁾ ABl. Nr. L 123 vom 29. 5. 1972, S. 6.

⁽⁶⁾ ABl. Nr. L 83 vom 30. 3. 1973, S. 21.

⁽⁷⁾ ABl. Nr. L 108 vom 22. 4. 1974, S. 7.

⁽⁸⁾ ABl. Nr. L 32 vom 5. 2. 1975, S. 26.

ANLAGE

BESTIMMUNG VON AFLATOXIN B₁

A. METHODE MIT EINDIMENSIONALER DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE

1. Zweck- und Anwendungsbereich

Die Methode erlaubt die Bestimmung des Gehaltes an Aflatoxin B₁ in folgenden Futtermitteln: Erdnuß-, Kokos-, Lein-, Soja-, Sesam-, Babassu- und Maiskeimkuchen, Getreide und Getreideerzeugnisse, Erbsenmehl, Kartoffelschlempe, getr., und Kartoffelstärke. Die untere Grenze der Bestimmbarkeit beträgt 0,01 mg/kg (10 ppb).

Wenn Störsubstanzen vorhanden sind, welche die Auswertung erschweren, muß die Analyse nach der Methode B (zweidimensionale Dünnschichtchromatographie) wiederholt werden.

2. Prinzip

Die Probe wird mit Chloroform extrahiert. Der Extrakt wird filtriert und ein aliquoter Teil durch Chromatographie an einer Kieselgelsäule gereinigt. Das Eluat wird eingedampft und der Rückstand in einer definierten Menge Chloroform oder Benzol-Acetonitrilgemisch gelöst. Ein aliquoter Teil dieser Lösung wird dünnschichtchromatographisch untersucht. Die Aflatoxin-B₁-Menge wird im UV-Licht visuell oder fluorodensitometrisch im Vergleich zu bekannten Mengen Aflatoxin-B₁-Standard ermittelt. Die Identität von Aflatoxin B₁ im Futtermittlextrakt muß durch das angegebene Verfahren bestätigt werden.

3. Reagenzien

Anmerkung: Wenn nichts anderes angegeben ist, sind Reagenzien von „p.a.“-Qualität zu verwenden.

- 3.1. Aceton
- 3.2. Chloroform, mit 0,5 bis 1,0 % Äthanol 96 % ig (V/V) stabilisiert
- 3.3. n-Hexan
- 3.4. Methanol
- 3.5. Diäthyläther, wasserfrei, peroxidfrei
- 3.6. Benzol-Acetonitril-Gemisch 98:2 (V/V)
- 3.7. Mischung aus Chloroform (3.2) und Methanol (3.4) 97:3 (V/V)
- 3.8. Kieselgel für Säulenchromatographie, 0,05 bis 0,20 mm Teilchengröße
- 3.9. Watte, hydrophil und mit Chloroform entfettet, oder Glaswolle
- 3.10. Natriumsulfat, wasserfrei, gekörnt
- 3.11. Inertgas, z.B. Stickstoff
- 3.12. 1 N-Salzsäure
- 3.13. Schwefelsäure 50 % (V/V)
- 3.14. Kieselgur (Hyflosupercel), mit Säure gewaschen
- 3.15. Kieselgel G-HR oder gleichwertiges für Dünnschichtchromatographie
- 3.16. Standardlösung mit etwa 0,1 µg Aflatoxin B₁ je ml in Chloroform (3.2) oder in Benzol-Acetonitril-Gemisch (3.6), hergestellt und kontrolliert nach Punkt 7.

- 3.17. Qualitative Standardlösung mit etwa 0,1 µg Aflatoxin B₁ und B₂ je ml in Chloroform (3.2) oder Benzol-Acetonitril-Gemisch (3.6). Diese Konzentrationen sind als Anhaltspunkte gegeben. Sie sind, entsprechend dem unterschiedlichen Fluoreszenzvermögen, so zu wählen, daß sich für beide Aflatoxine dieselbe Fluoreszenzintensität ergibt.
- 3.18. Fließmittel:
- 3.18.1. Mischung aus Chloroform (3.2) und Aceton (3.1) 9:1 (V/V). Trennkammer mit nicht gesättigter Atmosphäre
- 3.18.2. Mischung aus Diäthyläther (3.5), Methanol (3.4) und Wasser 96:3:1 (V/V/V). Trennkammer mit nicht gesättigter Atmosphäre
- 3.18.3. Mischung aus Diäthyläther (3.5), Methanol (3.4) und Wasser 94:4,5:1,5 (V/V/V). Trennkammer mit gesättigter Atmosphäre
- 3.18.4. Mischung aus Chloroform (3.2) und Methanol (3.4) 94:6 (V/V). Trennkammer mit gesättigter Atmosphäre.
- 3.18.5. Mischung aus Chloroform (3.2) und Methanol (3.4) 97:3 (V/V). Trennkammer mit gesättigter Atmosphäre
4. **Geräte**
- 4.1. Mahl- und Mischgerät
- 4.2. Schüttelmaschine oder Magnetrührer
- 4.3. Faltenfilter, Schleicher & Schüll Nr. 588 oder gleichwertige Filter, Durchmesser 24 cm
- 4.4. Chromatographierohr aus Glas, (innerer Durchmesser 22 mm, Länge 300 mm), mit Teflonhahn und 250-ml-Vorratsbehälter
- 4.5. Vacuumrotationsverdampfer mit 500-ml-Rundkolben
- 4.6. 500-ml-Erlenmeyerkolben mit Schliffstopfen
- 4.7. Ausrüstung für Dünnschicht-Chromatographie
- 4.8. Glasplatten für Dünnschicht-Chromatographie, 200 × 200 mm. Sie werden wie folgt vorbereitet (die angegebenen Mengen reichen für fünf Platten): 30 g Kieselgel G-HR (3.15) werden in einem Erlenmeyerkolben mit 60 ml destilliertem Wasser versetzt, der Kolben wird verschlossen und eine Minute geschüttelt. Die Suspension wird in einer einheitlichen Schichtdicke von 0,25 mm auf die Platten aufgetragen. Man läßt die Platten an der Luft trocknen und bewahrt sie dann im Exsikkator über Kieselgel als Trocknungsmittel auf. Vor Verwendung werden sie eine Stunde im Trockenschrank bei 110 °C aktiviert.
- Fertigplatten können verwendet werden, sofern sie einen ähnlichen Trenneffekt ergeben wie die in der oben beschriebenen Weise hergestellten.
- 4.9. Analysenlampe für langwelligen UV-Bereich (360 nm). Die Lichtintensität muß ausreichen, um einen Aflatoxin-B₁-Fleck von 1,0 ng auf einer Dünnschichtplatte in 10 cm Entfernung von der Lampe noch deutlich zu erkennen.
- 4.10. 10-ml-Reagenzgläser, graduert, mit Schliff und Polyäthylenstopfen
- 4.11. UV-Spektralphotometer
- 4.12. Fluorodensitometer (wahlweise)
5. **Ausführung**
- 5.1. *Vorbereitung der Probe* (siehe unter Bemerkungen, Teil C, Punkt 1)
- Die Probe wird gemahlen, so daß sie vollständig durch ein 1-mm-Sieb (gem. ISO-Empfehlung R 565) hindurchgeht.
- 5.2. *Extraktion*
- 50,0 g der gemahlenen und homogenisierten Probe werden in einen 500 ml-Erlenmeyerkolben (4.6) eingewogen, man fügt 25 g Kieselgur (3.14), 25 ml Wasser und 250 ml Chloroform (3.2) hinzu. Der Kolben wird verschlossen und 30 Minuten mit dem Gerät (4.2) geschüttelt bzw. gerührt. Anschließend filtriert man durch ein Faltenfilter (4.3), die ersten 10 ml des Filtrats werden verworfen, die nächsten 50 ml aufgefangen.

5.3. Säulenchromatographische Reinigung

Das untere Ende des Chromatographie-Rohrs (4.4) wird mit einem Watte- oder Glaswollepfropfen (3.9) versehen, das Rohr zu etwa zwei Dritteln mit Chloroform (3.2) gefüllt, dann fügt man 5 g Natriumsulfat (3.10) hinzu, wobei darauf zu achten ist, daß die Natriumsulfatschicht eine ebene Fläche bildet. Anschließend gibt man 10 g Kieselgel (3.8) in kleinen Portionen hinzu. Nach jeder Zugabe ist vorsichtig zu rühren, um Luftblasen zu entfernen. Man läßt das Kieselgel 15 Minuten absetzen und fügt dann vorsichtig 15 g Natriumsulfat (3.10) hinzu. Man läßt dann die Flüssigkeit bis unmittelbar an die Oberfläche des Natriumsulfats ablaufen.

50 ml des nach 5.2 erhaltenen Filtrats werden mit 100 ml n-Hexan (3.3) gemischt. Man gibt die Mischung quantitativ auf die Säule und läßt die Flüssigkeit bis zur Oberfläche des Natriumsulfats einsickern. Anschließend fügt man 100 ml Diäthyläther (3.5) hinzu und läßt die Flüssigkeit wieder bis zur Oberfläche des Natriumsulfats einsickern. Die Durchflußgeschwindigkeit soll 8 bis 12 ml/Minute betragen, ein Trockenlaufen der Säule ist zu vermeiden. Der Durchlauf wird verworfen. Man eluiert danach mit 150 ml Chloroform-Methanol-Gemisch (3.7), wobei das gesamte Eluat aufgefangen wird.

Das Eluat wird im Vakuumrotationsverdampfer (4.5) bei einer Temperatur von weniger als 50° C unter einem inerten Gasstrom (3.11) bis fast zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird mit Chloroform (3.2) oder Benzol-Acetonitril-Gemisch (3.6) quantitativ in ein 10-ml-Reagenzglas (4.10) überführt, die Lösung im inerten Gasstrom (3.11) eingeeengt und anschließend mit Chloroform (3.2) oder Benzol-Acetonitril-Gemisch (3.6) auf ein Volumen von 2,0 ml aufgefüllt.

5.4. Dünnschicht-Chromatographie

Auf einer Dünnschicht-Platte (4.8) werden 2 cm vom unteren Rand entfernt nebeneinander im Abstand von 2 cm folgende Mengen der Standardlösung und des Extraktes punktförmig aufgetragen:

- 10, 15, 20, 30 und 40 µl der Aflatoxin-B₁-Standardlösung (3.16);
- 10 µl des nach 5.3 gewonnenen Extrakts und 20 µl der Standardlösung (3.16) übereinander auf denselben Punkt;
- 10 und 20 µl des nach 5.3 gewonnenen Extrakts.

Die Platte wird vor Licht geschützt, mit einem der Fließmittel (3.18) entwickelt. Zur Auswahl eines geeigneten Fließmittels trägt man vorher 25 µl der qualitativen Standardlösung (3.17) auf eine der Platten auf und prüft, ob bei der Entwicklung eine vollständige Trennung der Aflatoxine B₁ und B₂ erreicht wird.

Man läßt das Fließmittel im Dunkeln verdampfen und betrachtet dann die Platte im UV-Licht in 10 cm Abstand von der Lampe (4.9). Die Flecke von Aflatoxin B₁ weisen eine blaue Fluoreszenz auf.

5.5. Quantitative Bestimmung

Die Bestimmung ist entweder visuell oder durch Fluorodensitometrie, wie nachstehend beschrieben, vorzunehmen.

5.5.1. Visuelle Bestimmung

Die im Extrakt enthaltene Menge Aflatoxin B₁ wird bestimmt, indem man die Fluoreszenzintensität der Flecke des Extrakts mit denen der Standardlösung vergleicht. Falls erforderlich, ist zu interpolieren. Die durch Übereinanderauftragen von Extrakt und Standardlösung erzielte Fluoreszenzintensität muß stärker sein als die von 10 µl des Extrakts und es darf nur ein einziger Fleck erkennbar sein. Ist die Fluoreszenz-Intensität von 10 µl Extrakt stärker als die von 40-µl-Standardlösung, so ist der Extrakt auf das 10- oder 100fache mit Chloroform (3.2) oder Benzol-Acetonitril-Gemisch (3.6) zu verdünnen und erneut in der beschriebenen Weise auf eine Dünnschichtplatte aufzutragen.

5.5.2. Durch Fluorodensitometrische Messung

Die Fluoreszenzintensität der Aflatoxin-B₁-Flecke wird mit Hilfe des Fluorodensitometers (4.12) bei 443 nm gemessen bei einer Anregung mit 365 nm. Durch Vergleich der Fluoreszenzintensitäten von Extrakt- und Standardflecken bestimmt man die in den Extrakt-Flecken enthaltene Menge von Aflatoxin B₁.

5.6. Identifizierung von Aflatoxin B₁

Die Identifizierung von Aflatoxin B₁ im Extrakt erfolgt durch nachstehend beschriebene Verfahren.

5.6.1. Behandlung mit Schwefelsäure

Das nach 5.4 erhaltene Chromatogramm wird mit Schwefelsäure (3.13) besprüht. Die Fluoreszenz der Aflatoxin-B₁-Flecke muß im UV-Licht von blau nach gelb umschlagen.

5.6.2. Zweidimensionale Chromatographie mit Bildung von Aflatoxin B₁-hemiacetal (Aflatoxin B_{2a})

Anmerkung: Die nachfolgend beschriebenen Arbeitsgänge müssen genau nach der in Abbildung 3 wiedergegebenen Skizze durchgeführt werden.

5.6.2.1. Auftragen der Lösungen

In eine Platte (4.8) werden, parallel zu zwei angrenzenden Seiten (jeweils 6 cm vom Rand entfernt), zwei gerade Linien als Begrenzung für die Lösungsmittelfronten geritzt. Auf die Platte trägt man mit Hilfe einer Kapillarpipette oder einer Mikroliterspritze folgende Lösungen auf

- bei Punkt A: Ein Volumen des nach 5.3 erhaltenen gereinigten Probenextraktes, das etwa 2,5 Nanogramm Aflatoxin B₁ enthält;
- bei Punkt B und C: Jeweils 25 µl der Standardlösung (3.16).

5.6.2.2. Entwicklung

Das Chromatogramm wird mit dem Fließmittel (3.18.1) (1-cm-Schicht in einer Trennkammer mit nicht gesättigter Atmosphäre) im Dunkeln in Richtung I entwickelt bis die Lösungsmittelfront die Begrenzungslinie erreicht. Man nimmt danach die Platte aus der Trennkammer und läßt sie im Dunkeln fünf Minuten bei Raumtemperatur trocknen. Während man den Rest der Platte mit einer Glasscheibe abdeckt, besprüht man einen 2,5 cm breiten Streifen (schraffierte Fläche in der Abbildung 3), der die Punkte A und B überdeckt, mit Salzsäure (3.12), bis eine Dunkelfärbung auftritt. Man läßt 10 Minuten im Dunkeln reagieren und trocknet die Platte dann in einem Luftstrom bei Raumtemperatur.

Anschließend entwickelt man das Chromatogramm mit dem Fließmittel (3.18.1) (1-cm-Schicht in einer Trennkammer mit ungesättigter Atmosphäre) in Richtung II, bis die Lösungsmittelfront die Begrenzungslinie erreicht. Man nimmt die Platte aus der Trennkammer und läßt sie bei Raumtemperatur trocknen.

5.6.2.3. Interpretation des Chromatogramms

Man betrachtet das Chromatogramm unter UV-Licht (4.9) und prüft auf nachfolgende Merkmale:

- a) Vorhandensein eines blau fluoreszierenden Flecks von Aflatoxin B₁, von der bei C aufgetragenen Standardlösung stammend (gewandert in Richtung I).
- b) Vorhandensein eines blau fluoreszierenden Flecks von Aflatoxin B₁ (nicht mit Salzsäure umgesetzt) und eines intensiven blau fluoreszierenden Flecks von Aflatoxin B₁-hemiacetal beide von der bei B aufgetragenen Standardlösung stammend und in Richtung II gewandert.
- c) Vorhandensein ähnlicher Flecke, wie unter b) beschrieben, die von dem bei A aufgetragenen Probenextrakt stammen. Die Lage dieser Flecke ergibt sich erstens aus der Laufstrecke des Aflatoxins B₁ von Punkt A in Richtung I (dieselbe Strecke, die der bei C aufgetragene Standard zurückgelegt hat) und zweitens aus der Laufstrecke von dort in Richtung II des nicht umgesetzten Aflatoxins B₁ und des Aflatoxin B₁-hemiacetals (dieselben Strecken, die von dem bei B aufgetragenen Standard zurückgelegt wurden). Die Fluoreszenz-Intensitäten der beiden, von dem Extrakt und der bei B aufgetragenen Standardlösung stammenden Hemiacetalflecke sollten dabei einander entsprechen.

6. Berechnung der Ergebnisse

6.1. Visuelle Messung

Der Aflatoxin-B₁-Gehalt der Probe in Mikrogramm pro kg (ppb) wird nach folgender Formel berechnet:

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

Hierbei sind:

Y und X die Mengen — in Mikroliter — der Aflatoxin-B₁-Standardlösung (3.16) bzw. des Extrakts, deren Fluoreszenz-Intensität identisch ist.

S = Konzentration in Mikrogramm Aflatoxin B₁ je ml der Standardlösung (3.16);

V = Endvolumen des Extrakts in Mikroliter, unter Berücksichtigung etwaiger Verdünnung;

W = Gewicht der Probe in Gramm, bezogen auf die für die säulenchromatographische Reinigung verwendete Extraktmenge.

6.2. *Messungen durch Fluorodensitometrie*

Der Gehalt an Aflatoxin B₁ der Probe in Mikrogramm pro kg (ppb) wird nach folgender Formel berechnet:

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

Hierbei sind:

Y = Volumen des auf die Platte aufgetragenen Extrakts in Mikroliter (10 oder 20 µl);

S = Aflatoxin-B₁-Gehalt des Extraktflecks in Nanogramm, den man aus der Messung erhält (bezogen auf das angewendete Volumen Y);

V = Endvolumen des Extrakts in Mikroliter, unter Berücksichtigung etwaiger Verdünnung;

W = Gewicht der Probe in Gramm, bezogen auf die für die säulenchromatographische Reinigung verwendete Extraktmenge.

7. **Herstellung und Kontrolle der Standardlösung (3.16)**

7.1. *Bestimmung der Aflatoxin-B₁-Konzentration*

Eine Aflatoxin-B₁-Standardlösung wird in Chloroform (3.2) oder Benzol-Acetonitril-Gemisch (3.6) mit einer Konzentration von 8 bis 10 µg je ml hergestellt. Das Absorptionsspektrum wird zwischen 330 und 370 nm mit einem Spektralphotometer (4.11) gemessen.

Die Extinktion (A) ist im Fall einer Chloroformlösung bei 363 nm, im Fall einer Lösung in Benzol-Acetonitril-Gemisch bei 348 nm zu messen.

Die Aflatoxin-B₁-Konzentration in Mikrogramm je ml Lösung wird nach folgenden Formeln berechnet:

$$\frac{312 \cdot A \cdot 1000}{20\,600} \quad \text{bei der Chloroformlösung;}$$

$$\frac{312 \cdot A \cdot 1000}{19\,800} \quad \text{bei der Lösung im Benzol-Acetonitril-Gemisch.}$$

Die zur Herstellung einer Standardarbeitslösung mit einer Aflatoxin-B₁-Konzentration von etwa 0,1 µg je ml erforderlichen Verdünnungen werden im Dunkeln vorgenommen. Diese Lösung ist, bei 4° C im Kühlschrank aufbewahrt, zwei Wochen haltbar.

7.2. *Kontrolle der chromatographischen Reinheit*

Auf einer Dünnschichtplatte (4.8) werden 5 µl der Aflatoxin-B₁-Standardlösung, die 8—10 µg Aflatoxin B₁ je ml enthält (siehe 7.1) aufgetragen. Das Chromatogramm wird nach 5.4 entwickelt. Im UV-Licht darf nur ein einziger Fleck erkennbar sein; außerdem darf an der Stelle der ursprünglichen Auftragung keine Fluoreszenz wahrnehmbar sein.

8. **Wiederholbarkeit**

Der Unterschied zwischen den Ergebnissen zweier Parallelbestimmungen eines Analytikers sollte in derselben Probe bei Gehalten von

- 10 bis 20 µg/kg Aflatoxin B₁ 25 v.H. des höheren Resultats,
 - mehr als 20 bis 50 µg/kg Aflatoxin B₁ 5 µg/kg absolut,
 - mehr als 50 µg/kg Aflatoxin B₁ 10 v.H. des höheren Resultats
- nicht überschreiten.

9. **Vergleichbarkeit**

Siehe unter Bemerkungen, Teil C, Punkt 2,

B. METHODE MIT ZWEIDIMENSIONALER DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE

1. Zweck und Anwendungsbereich

Die Methode erlaubt die Bestimmung des Gehaltes an Aflatoxin B₁ in Futtermitteln, sofern diese nicht unter den Anwendungsbereich der Methode A fallen. Die untere Grenze der Bestimmbarkeit beträgt 0,01 mg/kg (10 ppb). Die Methode ist nicht anwendbar bei Futtermitteln, die Citrus-Trester enthalten.

2. Prinzip

Die Probe wird mit Chloroform extrahiert. Der Extrakt wird filtriert und ein aliquoter Teil durch Chromatographie an einer Kieselgelsäule gereinigt. Das Eluat wird eingedampft und der Rückstand in einer definierten Menge Chloroform oder Benzol-Acetonitril-Gemisch gelöst. Ein aliquoter Teil dieser Lösung wird der zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie unterworfen. Die Aflatoxin-B₁-Menge wird im UV-Licht visuell oder fluorodensitometrisch im Vergleich zu bekannten Mengen Aflatoxin-B₁-Standard ermittelt. Die Identität von Aflatoxin B₁ im Futtermittelextrakt muß durch das angegebene Verfahren bestätigt werden.

3. Reagenzien

Anmerkung: Wenn nichts anderes angegeben ist, sind Reagenzien von „p.a.“-Qualität zu verwenden.

- 3.1. Aceton
- 3.2. Chloroform, mit 0,5 bis 1,0 % Äthanol 96 % ig (V/V) stabilisiert
- 3.3. n-Hexan
- 3.4. Methanol
- 3.5. Diäthyläther, wasserfrei, peroxidfrei
- 3.6. Benzol-Acetonitril-Gemisch 98:2 (V/V)
- 3.7. Mischung aus Chloroform (3.2) und Methanol (3.4) 97:3 (V/V)
- 3.8. Kieselgel für Säulenchromatographie, 0,05 bis 0,20 mm Teilchengröße
- 3.9. Watte, hydrophil und mit Chloroform entfettet, oder Glaswolle
- 3.10. Natriumsulfat, wasserfrei, gekörnt
- 3.11. Inertgas, z.B. Stickstoff
- 3.12. 1 N-Salzsäure
- 3.13. Kieselgur (Hyflosupercel), mit Säure gewaschen
- 3.14. Kieselgel G-HR oder gleichwertiges für Dünnschichtchromatographie
- 3.15. Fließmittel:
 - 3.15.1 Mischung aus Diäthyläther (3.5), Methanol (3.4) und Wasser 94:4, 5:1,5 (V/V/V). Trennkammer mit gesättigter Atmosphäre.
 - 3.15.2 Mischung aus Chloroform (3.2) und Aceton (3.1) 9:1 (V/V). Trennkammer mit nicht gesättigter Atmosphäre.
- 3.16. Standardlösung mit etwa 0,1 µg Aflatoxin B₁ je ml in Chloroform (3.2) oder in Benzol-Acetonitril-Gemisch (3.6), hergestellt und kontrolliert nach Punkt 7 der Methode A.

4. Geräte

Siehe unter Punkt 4 der Methode A.

5. Ausführung**5.1. Vorbereitung der Probe****5.2. Extraktion****5.3. Säulenchromatographische Reinigung**

} werden ausgeführt wie in den
Punkten 5.1, 5.2 und 5.3 der
Methode A beschrieben

5.4. Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie**5.4.1. Auftragen der Lösungen (siehe Skizze in Abbildung 1)**

In eine Platte (4.8) werden parallel zu zwei benachbarten Seiten (in einem Abstand von 5 und 6 cm von der jeweiligen Kante) zwei gerade Linien geritzt als Begrenzung für die Lösungsmittelfronten. Auf die Platte werden mit Hilfe einer Kapillarpipette oder einer Mikroliterspritze folgende Lösungen aufgetragen:

- Bei Punkt A: 20 µl des nach 5.3 erhaltenen gereinigten Probenextraktes
- bei Punkt B: 20 µl der Standardlösung (3.16)
- bei Punkt C: 10 µl der Standardlösung (3.16)
- bei Punkt D: 20 µl der Standardlösung (3.16)
- bei Punkt E: 40 µl der Standardlösung (3.16)

Man trocknet in einem schwachen Strom von Inertgas (3.11). Die erhaltenen Flecke sollten einen Durchmesser von etwa 5 mm aufweisen.

5.4.2. Entwicklung (siehe Skizze in Abbildung 1)

Das Chromatogramm wird mit dem Fließmittel (3.15.1) (1-cm-Schicht in einer Trennkammer mit gesättigter Atmosphäre) im Dunkeln in Richtung I entwickelt, bis die Lösungsmittelfront die Begrenzungslinie erreicht hat. Man nimmt danach die Platte aus der Trennkammer und läßt sie 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln trocknen.

Anschließend entwickelt man das Chromatogramm unter Verwendung des Fließmittels (3.15.2) (1-cm-Schicht in einer Trennkammer mit nicht gesättigter Atmosphäre) im Dunkeln in Richtung II, bis die Lösungsmittelfront die Begrenzungslinie erreicht hat. Man entfernt die Platte aus der Trennkammer und läßt sie bei Raumtemperatur im Dunkeln trocknen.

5.4.3. Auswertung des Chromatogramms (siehe Skizze in Abbildung 2)

Man betrachtet das Chromatogramm unter UV-Licht, wobei die Platte 10 cm von der Lampe (4.9) entfernt sein soll, und bestimmt die Lage der von den Standardlösungen stammenden blau fluoreszierenden Flecke B, C, D und E von Aflatoxin B₁. Man zieht senkrecht zur jeweiligen Laufrichtung durch diese Punkte zwei gedachte Geraden. Der Schnittpunkt P dieser Geraden ergibt den Ort, an dem der aus dem bei A (Abbildung 1) aufgetragenen Probenextrakt stammende Aflatoxin-B₁-Fleck zu erwarten ist. Tatsächlich findet sich der Aflatoxin-B₁-Fleck jedoch meist beim Punkt Q, dem Schnittpunkt zweier gedachter Geraden, die einen Winkel von etwa 100° bilden und durch die Punkte B bzw. C gehen. Man bestimmt die im Probenextrakt enthaltene Menge Aflatoxin B₁ wie unter 5.5 beschrieben.

5.4.4. Ergänzende Chromatographie

In eine neue Platte (4.8) ritzt man parallel zu zwei benachbarten Seiten zwei gerade Linien, wie in der Skizze der Abbildung 1 gezeigt wird und trägt auf Punkt A (siehe Abbildung 1) übereinander 20 µl des nach 5.3 erhaltenen gereinigten Probenextraktes und 20 µl Standardlösung (3.16) auf. Man entwickelt das Chromatogramm wie unter 5.4.2 beschrieben. Man betrachtet das Chromatogramm im UV-Licht (4.9) und prüft, ob

- sich die Aflatoxin-B₁-Flecke von Extrakt und Standardlösung überlagern und
- die Fluoreszenz dieses Flecks eine höhere Intensität aufweist, als der Aflatoxin-B₁-Fleck bei Punkt Q der ersten Platte.

5.5. Quantitative Bestimmung

Die Bestimmung ist entweder visuell oder durch Fluorodensitometrie, wie nachstehend beschrieben, vorzunehmen.

5.5.1. Visuelle Bestimmung

Die im Extrakt enthaltene Menge Aflatoxin B₁ wird bestimmt durch Vergleich der Fluoreszenzintensität des vom Extrakt stammenden Flecks mit derjenigen der Flecke

C, D und E der Standardlösung. Falls erforderlich, ist zu interpolieren. Ist die Fluoreszenzintensität von 20 μ l Extrakt stärker als die von 40 μ l Standardlösung, so ist der Extrakt auf das 10- oder 100-fache mit Chloroform (3.2) oder Benzol-Acetonitril-Gemisch (3.6) zu verdünnen und erneut in der beschriebenen Weise auf eine Dünnschichtplatte aufzutragen.

5.5.2. Durch fluorodensitometrische Messung

Die Fluoreszenzintensität der Aflatoxin-B₁-Flecke wird mit Hilfe des Fluorodensitometers (4.12) bei 443 nm gemessen bei einer Anregung mit 365 nm. Die Aflatoxinmenge ergibt sich aus dem Vergleich der Fluoreszenzintensität des Probenflecks mit derjenigen der Standardflecke C, D und E.

5.6. Identifizierung von Aflatoxin B₁

Siehe unter Punkt 5.6 der Methode A.

6. Berechnung der Ergebnisse

Siehe unter Punkt 6 der Methode A.

7. Wiederholbarkeit

Siehe unter Punkt 8 der Methode A.

8. Vergleichbarkeit

Siehe unter Bemerkungen, Teil C, Punkt 2

C. BEMERKUNGEN BETREFFEND METHODE A UND B

1. Entfettung

Proben mit mehr als 5 v.H. Fett sind nach der unter 5.1 beschriebenen Vorbereitung mit Petroläther (Kp 40—60° C) zu entfetten. In diesem Fall sind die Ergebnisse auf das Gewicht der nicht entfetteten Originalprobe zu beziehen.

2. Vergleichbarkeit der Ergebnisse

Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse, das heißt die Abweichung zwischen den von 2 oder mehr Laboratorien bei derselben Probe erhaltenen Ergebnisse, wurde wie folgt bewertet:

± 50 v.H. des Mittelwertes der Ergebnisse bei Mittelwerten an Aflatoxin B₁ von 10 bis 20 μ g/kg;

± 10 μ g/kg vom Mittelwert bei Mittelwerten von mehr als 20 bis 50 μ g/kg;

± 20 v.H. des Mittelwertes bei Mittelwerten von mehr als 50 μ g/kg.

ANLAGE

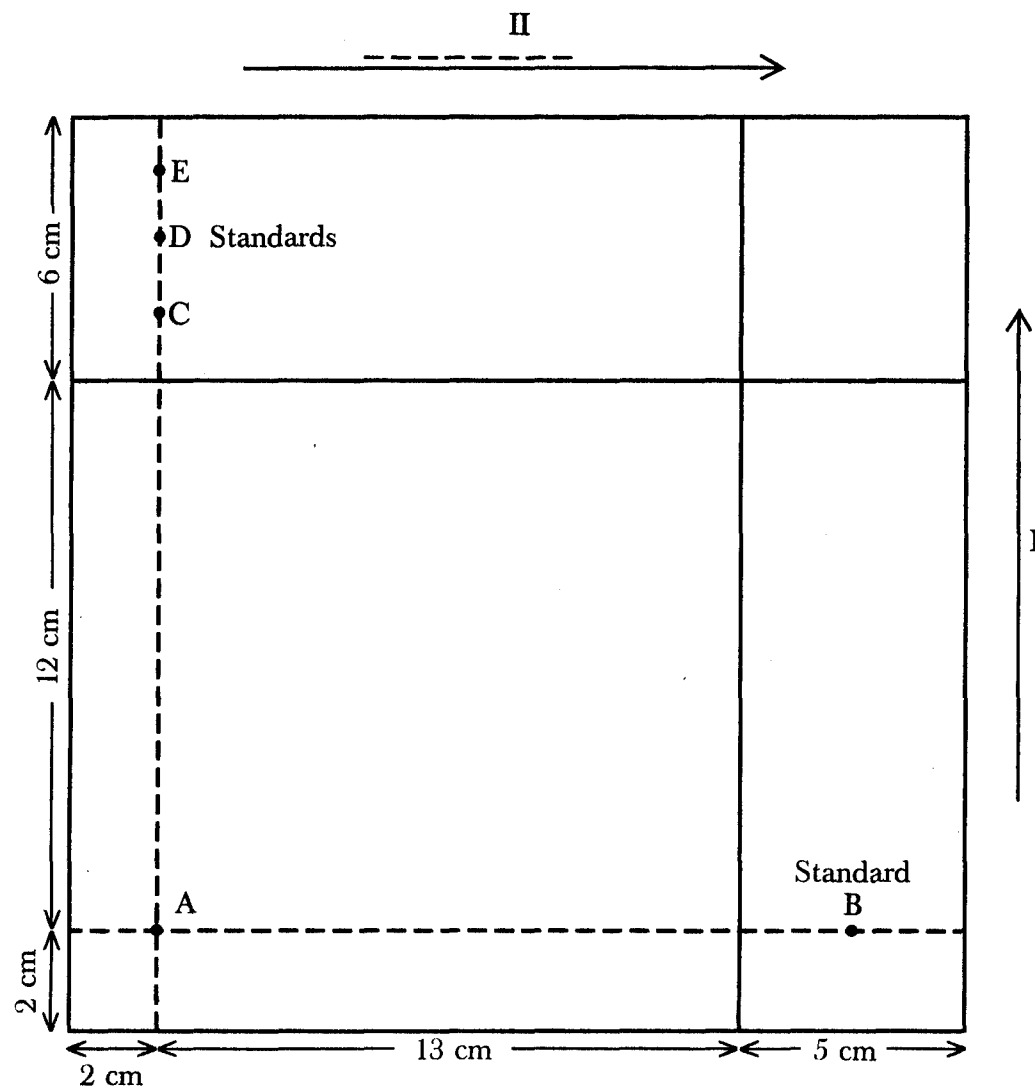


Abbildung 1

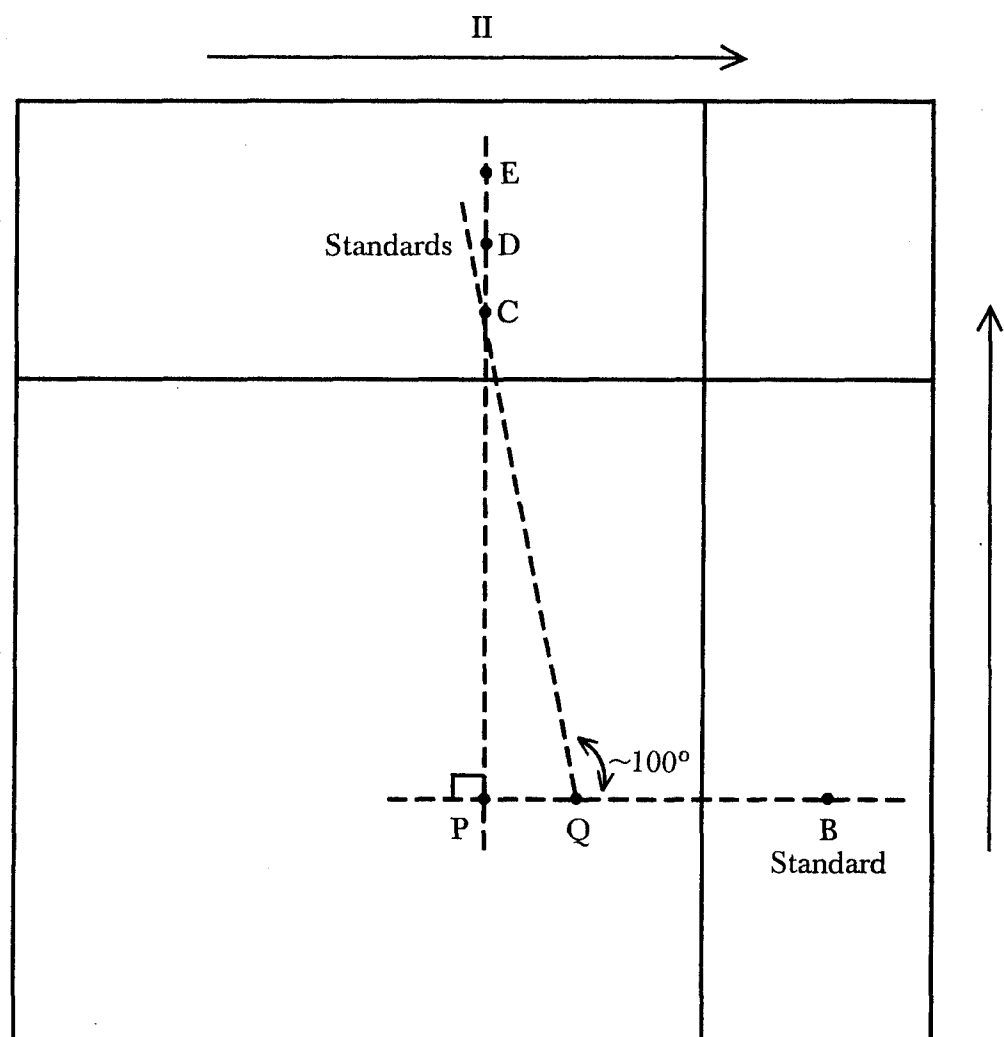
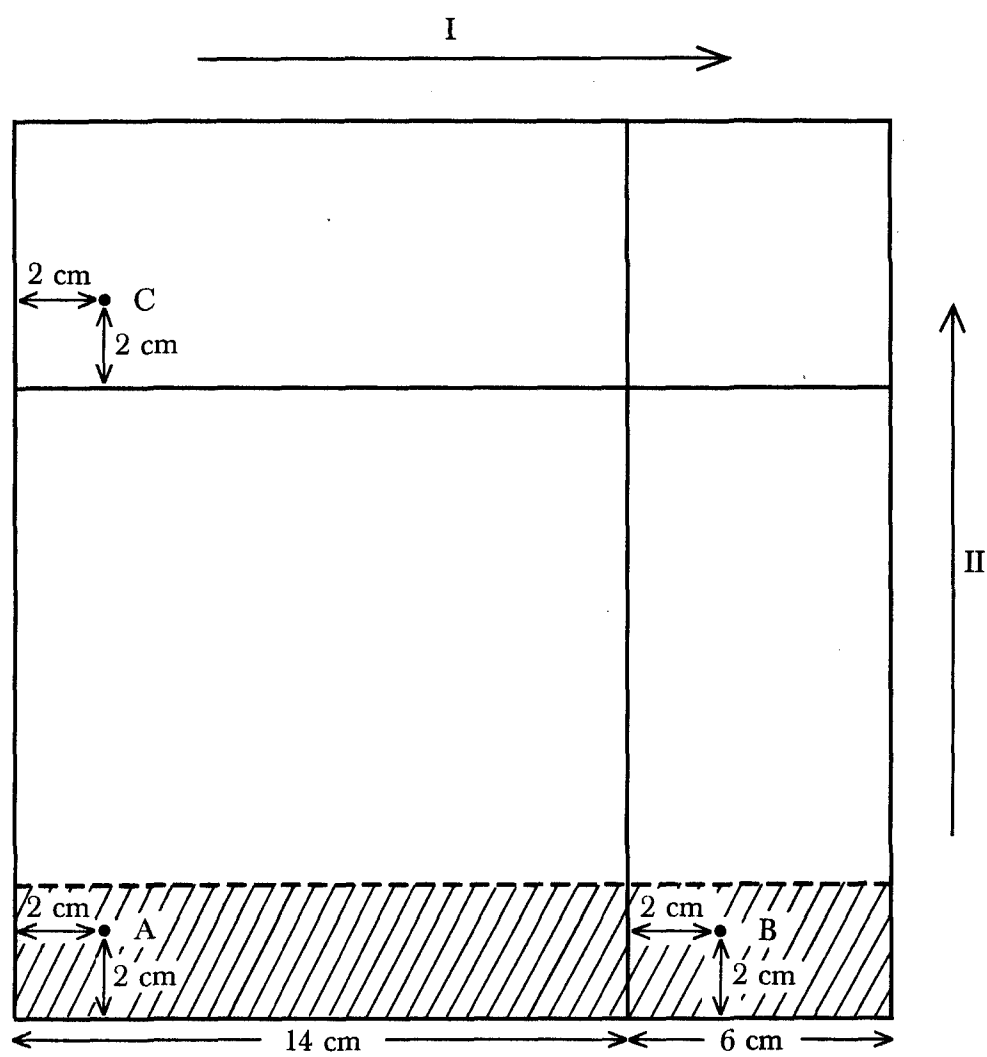


Abbildung 2

*Abbildung 3*