Този документ е средство за документиране и не обвързва институциите

►**B**

СЕДМА ДИРЕКТИВА НА КОМИСИЯТА

от 1 март 1976 година

относно установяване на общностни методи за анализ за целите на официалния контрол на храните за животни

(76/372/ЕИО)

(ОВ L 102, 15.4.1976, стр. 8)

Изменена с

		Официален вестник		
		№	страница	дата
►**M1**	Директива на Комисията от 30 юли 1981 година	L 246	32	29.8.1981
►**M2**	Директива 92/95/ЕИО на Комисията от 9 ноември 1992 година	L 327	54	13.11.1992
►**M3**	Директива 94/14/ЕО на Комисията от 29 март 1994 година	L 94	30	13.4.1994

▼B

СЕДМА ДИРЕКТИВА НА КОМИСИЯТА

от 1 март 1976 година

относно установяване на общностни методи за анализ за целите на официалния контрол на храните за животни

(76/372/ЕИО)

КОМИСИЯТА НА ЕВРОПЕЙСКИТЕ ОБЩНОСТИ,

като взе предвид Договора за създаване на Европейската икономическа общност,

като взе предвид Директивата на Съвета от 20 юли 1970 г. относно въвеждането на общностни методи за вземане на проби и анализ за целите на официалния контрол на храните за животни ([1]), последно изменена с Акта за присъединяване ([2]), и по-специално член 2 от нея,

като има предвид, че въпросната директива изисква да се извършва официален контрол на храните за животни, като се използват методи на Общността за взимане на проби и анализ с цел проверка на съответствието с изискванията, възникващи от законовите, подзаконовите или административните разпоредби, свързани с качеството и състава на храните за животни;

като има предвид че с Директиви 71/250/ЕИО от 15 юни 1971 г. ([3]), 71/393/ЕИО от 18 ноември 1971 г. ([4]), 72/199/ЕИО от 27 април 1972 г. ([5]), 73/46/ЕИО от 5 декември 1972 г. ([6]), 74/203/ЕИО от 25 март 1974 г. ([7]) и 75/84/ЕИО от 20 декември 1974 г. ([8]) вече са въведени редица методи на Общността за анализ; като има предвид, че напредъкът на работата оттогава прави желателно приемането на седма група методи;

като има предвид, че мерките, предвидени в настоящата директива, са в съответствие със становището на Постоянния комитет по храните за животни,

ПРИЕ НАСТОЯЩАТА ДИРЕКТИВА:

Член 1

Държавите-членки изискват анализът за официалния контрол на храните за животни по отношение на тяхното съдържание на афлатоксин B1 да се извършва в съответствие с методите, описани в приложението към настоящата директива.

▼M1

_____

▼B

Член 2

Държавите-членки въвеждат в сила законовитете, подзаконовите или административните разпоредби, необходими, за да се съобразят с настоящата директива, най-късно до 1 октомври 1976 г. Те незабавно информират Комисията за това.

_____

([1]) ОВ L 170, 3.8.1970 г., стр. 2.
([2]) ОВ L 73, 27.3.1972 г., стр. 14.
([3]) ОВ L 155, 12.7.1971 г., стр. 13.
([4]) ОВ L 279, 20.12.1971 г., стр. 7.
([5]) ОВ L 123, 29.5.1972 г., стр. 6.
([6]) ОВ L 83, 30.3.1973 г., стр. 21.
([7]) ОВ L 108, 22.4.1974 г., стр. 7.
([8]) ОВ L 32, 5.2.1975 г., стр. 26.

▼B

Член 3

Адресати на настоящата директива са държавите-членки.

▼B

ПРИЛОЖЕНИЕ

ОПРЕДЕЛЯНЕ НА АФЛАТОКСИН B_1

А. МЕТОД НА ЕДНОИЗМЕРНА ТЪНКОСЛОЙНА ХРОМАТОГРАФИЯ

▼M2

1. **Цел и обхват**

Методът позволява определяне на количеството афлатоксин B_1 в изходни материали и прости храни за животни. Този метод е неприложим в присъствието на пулп от цитрусови плодове. Долната граница на определение е 0,01 mg/kg (10 ppb).

В присъствието на пречещи субстанции е необходимо да се повтори анализа при използване на метод Б (високопроизводителна течна хроматография).

▼B

2. **Принцип**

Пробата се подлага на екстрахиране с хлороформ. Екстрактът се филтрува, взима се аликвотна част и се пречиства чрез колонна хроматография върху силикагел. Извлекът се изпарява и остатъкът се разтваря повторно в определен обем хлороформ или смес от бензол и ацетонитрил. Аликвотна част от този разтвор се подлага на тънкослойна хроматография (ТСХ). Количеството афлатоксин B1 се определя с ултравиолетово облъчване на хроматограмата визуално или чрез флуороденситометрия, чрез сравняване с познати количества стандартен афлатоксин B1. Идентичността на екстрахирания от храната афлатоксин B1 трябва да бъде потвърдена по посочената процедура.

3. **Реактиви**

NB Всички реактиви трябва да са с чистота за анализ A.R., освен когато е посочено друго.

3.1. Ацетон.

3.2. Хлороформ, стабилизиран с 0,5 до 1,0 % 96 % етанол (о/о).

3.3. Нормален хексан.

3.4. Метанол.

3.5. Безводен диетилов етер, свободен от прекиси.

3.6. Смес на бензол и ацетонитрил: 98/2 (о/о).

3.7. Смес на хлороформ (3.2) и метанол (3.4): 97/3 (о/о).

3.8. Силикагел, за колонна хроматография с размер на частиците 0,05 до 0,20 mm.

3.9. Абсорбент памучна вата, предварително обезмаслена с хлороформ, или стъклена вълна.

3.10. Натриев сулфат, безводен, на гранули.

3.11. Инертен газ, например азот.

3.12. 1N солна киселина.

3.13. 50 % (о/о) сярна киселина.

3.14. Кизелгур (хиплосуперсел), промит в киселина.

3.15. Силикагел G-HR или равностоен на него, за ТСХ.

3.16. Стандартен разтвор с около 0,1 µg Афлатоксин B1 на милилитър в хлороформ (3.2) или смес бензин/ацетонитрил (3.6), приготвен и проверен както е посочено в раздел 7.

3.17. Стандартен разтвор за качествен анализ, съдържащ около 0,1 µg афлатоксин B_1 и B_2 на милилитър в хлороформ (3.2) или смес бензол/ацетонитрил (3.6). Тези концентрации са дадени като насока. Те трябва да се уточнят, така че да се получи еднакъв интензитет на флуоресценция и за двата афлатоксина.

▼B

3.18. Разтворители за проявяване:

3.18.1. Хлороформ (3.2) / ацетон (3.1): 9/1 (o/o), ненаситена вана.

3.18.2. Диетилов етер (3.5) / метанол (3.4) /вода: 96/3/1 (o/o/o), ненаситена вана.

3.18.3. Диетилов етер (3.5) / метанол (3.4) /вода: 94/4.5/1.5 (o/o/o), наситена вана.

3.18.4. Хлороформ (3.2) / метанол (3.4): 94/6 (o/o), наситена вана.

3.18.5. Хлороформ (3.2) / метанол (3.4): 97/3 (o/o), наситена вана.

4. **Апаратура**

4.1. Мелница миксер.

4.2. Апарат за бълникане (шейкър) или магнитна бъркалка.

4.3. Нагъната филтърна хартия, Schlieicher and Schuell N 588, или равностойна, диаметър: 24 cm.

4.4. Стъклена тръба за хроматография (вътрешен диаметър: 22 mm, дължина: 300 mm) с кран и 250-милилитров резервоар.

4.5. Ротационен вакуум изпарител, с 500-милилитрова облодънна колба.

4.6. 500-милилитрови конусни колби със стъклени запушалки с шлиф.

4.7. Апарат за ТСХ.

4.8. Стъклени блюда за ТСЛ, 200 × 200 mm, приготвени, както следва (посочените количества са достатъчни за пет блюда). Поставят се 30 g силикагел G-HR (3.15) в конусна колба. Добавят се 60 ml вода, запушва се и се бълника една минута. Разстила се суспензията върху блюдата, така че да се получи равномерен слой с дебелина 0,25 mm. Оставя се да изсъхне на въздух и след това в ексикатор със силикагел. В момента на ползване се активират блюдата, като се държат в сушилня при 110 °C в продължение на един час.

Готови за ползване блюда са подходящи, ако дават резултати, сходни с тези, които се получават при използването на блюдата, приготвени по описания по-горе начин.

4.9. Ултравиолетова лампа с голяма дължина на вълната (360 nm). Интензитетът на облъчване трябва да позволява петно 1 ng афлатоксин B_1 да може ясно да се разграничава върху ТСХ блюдото на разстояние 10 cm от лампата.

4.10. 10-милилитрови градуирани епруветки с полиетиленови запушалки.

4.11. Ултравиолетов спектрофотометър.

4.12. Флуороденситометър (по избор).

5. **Процедура**

5.1. *Приготвяне на пробата (виж при „Наблюдения“, част B, точка 1)*

Смелете пробата така, че цялата да преминава през сито меш 1 mm (съгласно препоръка ISO R 565).

5.2. *Екстрахиране*

Поставя се 50 g смляна, хомогенизирана проба в 500 ml конусна колба (4.6). Добавя се 25 g кизелгур (3.14), 25 ml вода и 250 ml хлороформ (3.2). Запушва се колбата, разклаща се или се бърка 30 минути с апарата (4.2) и се филтрира през нагъната филтърна хартия (4.3). Изхвърлят се първите 10 ml от филтрата и после се събират 50 ml.

▼B

5.3. *Колонно очистване*

Запушалка от памучна вата или стъклена вълна (3.9) се вкарва в долния край на хроматографската тръба (4.4), напълнват се две трети от тръбата с хлороформ (3.2) и се добавя 5 g натриев сулфат (3.10)

Проверява се горната повърхност на пласта от натриев сулфат да е равна, след това се добавят 10 g силикагел (3.8) на малки порции. Разбърква се добре след всяко прибавяне, за да избегнете образуване на мехурчета. Изчакаква се да престои 15 минути и след това внимателно се добавя 15 g натриев сулфат (3.10) Оставя се течността да спадне точно до над горната повърхност на слоя натриев сулфат.

Смесват се 50 ml екстракт, събран в (5.2) с 100 ml нормален хексан (3.3) и сместа се прехвърля количествено в колоната. Изчаква се течността да спадне точно до над горната повърхност на слоя натриев сулфат. Изхвърлят се тези промивни води. След това се добавя 100 ml диетилов етер (3.5) и отново се изчаква да спадне до над горната повърхност на слоя натриев сулфат. При тези операции се следи дебитът да е 8—12 ml в минута и колоната да не изсъхва. Изхвърля се течността, която изтича. След това се елуира с 150 ml смес хлороформ/метанол (3.7) и се събира целият елуат.

Изпарява се последния почти до сухо при температура, не по-висока от 50 °C и в поток инертен газ (3.11) с ротационния изпарител (4.5). Количествено се прехвърля остатъка, като се използва хлороформ (3.2) или смес бензол/ацетонитрил (3.6) в 10 ml градуирана епруветка (4.10). Концентрира се разтворът в поток от инертен газ (3.11) и след това се наглася обемът до 2 ml с хлороформ (3.2) или смес бензол/ацетонитрил (3.6).

5.4. *Тънкослойна хроматография*

Капва се върху ТСХ блюдото (4.8) на 2 cm от долния ръб и на разстояния от 2 cm обемите стандартен разтвор и екстракт, посочени по-долу:

— 10, 15, 20, 30 и 40 μg от стандартния разтвор на афлатоксин B_1 (3.16);

— 10 μg от екстракта, получен в 5.3, и на същото място отгоре 20 μg от стандартния разтвор (3.16);

— 10 и 20 μg от екстракта, получен в 5.3.

Проявява се хроматограмата на тъмно с един от проявителите разтвори (3.18). Изборът на разтворител трябва да е направен предварително чрез нанасяне на 25 μg от качествения стандартен разтвор (3.17) върху блюдото и след проверка дали афлатоксин B_1 и B_2 са напълно разделени един от друг.

Оставят се разтворителите да се изпарят на тъмно и след това се облъчва с ултравиолетова светлина, като се поставя блюдото на 10 cm от лампата (4.9). Петната афлатоксин B_1 дават синя флуоресценция.

5.5. *Количествени определения*

Определя се или визуално, или чрез флуороденситометрия, както е посочено по-долу.

5.5.1. Визуални измервания

Определя се количеството афлатоксин B_1 в екстракта, като се сравни интензитета на флуоресценция на петната с екстракт с този на петната със стандартен разтвор и се намира на кое съответства. Интерполира се, ако се налага. Флуоресценцията, получена чрез наслагване на екстракта върху стандартния разтвор, трябва да е по-интензивна от тази на 10 μg екстракта и трябва да има не повече от едно видимо петно. Ако интензитетът на флуоресценция, дадена от 10 μg екстракта, е по-голям от този на 40 μg стандартен разтвор, екстрактът се разрежда 10 или 100 пъти с хлороформ (3.2) или смес бензол/ацетонитрил (3.6), преди да се подложи отново на тънкослойна хроматография.

▼B

5.5.2. Измерване чрез флуороденситометрия

Измерва се интензитетът на флуоресценция на петната афлатоксин B_1 с флуороденситометъра (4.12) при дължина на вълната на възбуждане 365 nm и дължина на вълната на излъчване 443 nm. Определя се количеството афлатоксин B_1 в петната екстракт чрез сравняване на интензитета на флуоресценцията им с този на петната стандартен афлатоксин B_1.

5.6. *Потвърждаване идентичността на афлатоксин B_1*

Потвърждава се идентичността на афлатоксин B_1 в екстракта, както е посочено по-долу.

5.6.1. Обработка със сярна киселина

Напръсква се със сярна киселина (3.13) върху хроматограмата, получена в 5.4. Флуоресценцията на петната афлатоксин B_1 трябва да се превърне от синя в жълта при ултравиолетово облъчване.

5.6.2. Двудименсионална хроматография, свързана с образуване на афлатоксин B_1-полуацетал (афлатоксин B_{2a})

NB Описаните по-долу операции трябва да се извършват, като се спазва точно схемата на фигура 3.

5.6.2.1. Нанасяне на разтворите

Маркират се две прави линии върху блюдото (4.8), успоредни на две съседни страни (на 6 cm от всяка страна), за да се ограничи миграцията на фронтовете разтворител. Капват се следните разтвори върху блюдото с капилярни пипети или микроспринцовки:

— върху точка A: обем от пречистен екстракт от пробата, получен в 5.3, съдържащ около 2,5 nm афлатоксин B1;

— върху точки B и C: 25 μg от стандартния разтвор (3.16).

5.6.2.2. Проявяване

Проявява се хроматограмата в направление I на тъмно, като се използва проявителят разтворител (3.18.1) (1 cm слой в ненаситена вана), докато фронтът на разтворителя стигне до ограничителната линия разтворител.

Изважда се блюдото от ваната и се оставя да изсъхне на тъмно при стайна температура в продължение на пет минути. След това се напръсква със сярна киселина (3.12) по дължината на ивица 2,5 cm височина, покривайки точки A и B (показани със защрихованата площ на фиг. 3), докато потъмнее, като се защити останалата част от блюдото със стъкло. Оставя се да взаимодейства 10 минути на тъмно и се изсушава в поток от въздух при стайна температура.

След това се проявява хроматограмата в направление II на тъмно, като се използва проявителят разтвор (3.18.1) (1 cm слой в ненаситена вана), докато фронтът на разтворителя достигне ограничителната линия разтворител. Изважда се блюдото от ваната и се оставя да изсъхне при стайна температура.

5.6.2.3 Интерпретация на хроматограмите

Изследва се хроматограмата под ултравиолетова светлина (4.9) и се проверява за следните характеристики:

а) Поява на синьо флуоресцентно петно от афлатоксин B_1 с източник стандартния разтвор, нанесен във B (миграция в направление I).

б) Поява на синьо флуоресцентно петно на нереагирал (със солната киселина) афлатоксин B_1 и по-интензивно синьо флуоресцентно петно на афлатоксин B_1-полуацетал, като и двете са с източник стандартния разтвор, нанесен в B (миграция в направление II).

в) Поява на петна, отговарящи на тези, описани в буква б), с източник екстракта от пробата, нанесен в A. Положението

▼B

на тези петна се определя първо чрез миграционното отстояние на афлатоксин B1 от точка A в направление I (същото, като изминатото от стандарта, нанесен във B) и след това чрез миграционните отстояния от там в направление II на афлатоксин B1-полуацетала (същите като тези, изминати от стандарта, нанесен в Б). Интензитетите на флуоресценция на петната полуацетал с източник екстракта и от стандарта, нанесен в Б трябва да съвпадат.

6. **Изчисляване на резултатите**

6.1. *От визуалните измервания*

Съдържанието в микрограмове на kg проба (PPB) се определя по формулата:

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

където:

Y и X са съответно обемите в микролитри на стандартния разтвор на (3.16) и на екстракта, който има подобна интензивност на флуоресценция;

S = концентрацията в микрограми на афлатоксин B_1 на милилитър в стандартния разтвор на (3.16);

V = крайния обем на екстракта в микролитри, който отчита всеки разтвор, който е бил необходим;

W = теглото в грамове на пробата, която съответства на обема на екстракта, подложен на колонно почистване.

6.2. *От флуороденситометричните измервания*

Съдържанието афлатоксин B_1 в микрограмове на kg проба (PPB) се дава по формулата

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

където:

Y = обемът в микролитри на екстракта, който е напръскан по блюдото (10 ml или 20 ml);

S = количество в нанограми на афлатоксин B_1 на петното от екстракт (пропорционално на взетата стойност Y), получено от измерванията;

V = крайния обем на екстракта в микролитри, който отчита всеки разтвор, който е бил необходим;

W= теглото в грамове на пробата, която съответства на обема на екстракта, подложен на колонно почистване.

7. **Приготвяне и анализ на стандартен разтвор (3.16)**

7.1. *Определяне на концентрацията афлатоксин B_1*

Приготвя се стандартен разтвор на афлатоксин B_1 в хлороформ (3.2) или в смес бензол/ацетонитрил (3.6) с концентрация 8 до 10 µg/ml. Определя се абсорбционния спектър между 330 и 370 nm с помощта на спектрофотометър (4.11).

Измерва се оптичната плътност (A) при 363 nm за хлороформен разтвор или при 348 nm за разтвора бензол/ацетонитрил.

Изчислява се концентрацията в микрограмове афлатоксин B_1 на 1 ml разтвор по следната формула:

▼B

$\frac{312 \cdot A \cdot 1000}{20600}$ за хлороформен разтвор;

$\frac{312 \cdot A \cdot 1000}{19800}$ за разтвора на смесбензол/ацетонитрил.

Разрежда се според необходимостта, далеч от дневна светлина, за да се получи работен стандартен разтвор с концентрация афлатоксин B_1 приблизително 0,1 μg/ml. Когато се държи в хладилник при 4 °C, този разтвор е стабилен две седмици.

7.2. *Проверка на хроматографска чистота*

Капва се върху блюдо (4.8) 5 μl от стандартния разтвор афлатоксин B_1, съдържащ от 8 до 10 μg/ml (7.1). Проявява се хроматограмата, както е посочено в 5.4. В ултравиолетова светлина хроматограмата трябва да показва само едно петно и в първоначалната зона на нанасяне не трябва да се забелязва никаква флуоресценция.

8. **Повторяемост**

Разликата между резултатите на две паралелни определения, извършени с една и съща проба от един и същ аналитик, не трябва да бъдат повече от:

— 25 % по отношение най-високия резултат за съдържания афлатоксин B_1 от 10 и до 20 μg/kg;

— 5 μg, в абсолютна стойност, за съдържания по-големи от 20 и до 50 μg/kg;

— 10 % по отношение най-високата стойност за съдържания над 50 μg/kg.

9. **Възпроизводимост**

Виж „Наблюдения“, част B, точка 2

▼M2

Б. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА АФЛАТОКСИН B_1. МЕТОД НА ВИСОКОПРОИЗВОДИТЕЛНА ТЕЧНА ХРОМАТОГРАФИЯ

1. **Цел и обхват.**

Това е метод за определяне на афлатоксин B_1 в храни за животни, включително такива, съдържащи пулп от цитрусови плодове. Долната граница на определение е 0,001 mg/kg (1 ppb).

2. **Принцип.**

Пробата се екстрахира с хлороформ. Екстрактът се филтрува и аликвотна част се пречиства върху Флорисилова гилза, последвана от C_{18} гилза. Окончателното разделяне и определяне се постига чрез високопроизводителна течна хроматография (ВПТХ), като се използва C_{18} колона с обратна фаза, последвана от следколонно дериватизиране с йод във вода и определяне на флуоресценцията.

Забележка: Микотоксините са изключително токсични субстанции. Манипулациите трябва да се извършват в специална камина. Специални предпазни мерки трябва да бъдат взети в случаите, когато токсините са под формата на сухо вещество поради тяхната електростатичност, в резултат на което съществува тенденция от разпръскването им в работната среда.

3. **Реактиви**

3.1. Хлороформ, стабилизиран с 0,5 до 1,0 % етанол от масата. Виж изследване 10.2.

3.2. ВПТХ степен на метанола, престация на 3.6.

▼**M2**

3.3. Ацетон.

3.4. ВПТХ степен на ацетонитрил.

3.5. Елюиращи разтворители: подгответе един ден преди употреба или чрез ултразвук добавете въздух в разтворителя.

3.5.1. Смес от ацетон (3.3) и вода, 98 + 2 (v + v)

3.5.2. Смес от вода и метанол (3.2), 80 + 20 (v + v)

3.5.3. Смес от вода и ацетон (3.3), 85 + 15 (v + v)

3.6. Мобилна фаза за ВПТХ

Смес от вода, метанол (3.2) и ацетонитрил (3.4), 130 + 70 + 40 (v + v + v).

Забележка: Съставът на разтвора в мобилна фаза може да се нуждае от допълване, в зависимост от характеристиките на използваната колона за ВПТХ.

3.7. Наситен йоден разтвор: добавете 2 g йод към 400 ml вода. Бъркайте в продължение на най-малко 90 min. и прецедете през мембранен филтър (4.15). Защитете наситения разтвор от светлина, за да предотвратите фоторазпадането.

3.8. Разредена киселина на Целит 545 или еквивалент.

3.9. Флуросилова гилза (Waters SEP-PAK) или еквивалент.

3.10. C_{18} гилза (Waters SEP-PAK) или еквивалент.

3.11. Инертен газ, например азот.

3.12. Афлатоксин B_1, стандартен разтвор в хлороформ, концентрация 10 μg/ml. Проверете концентрацията на разтвора, както средва: определете абсорбиращия обхват на разтвора между 330 и 370 nm чрез спектрофотометър (4.23). Измерете абсорбацията (A) при максимум около 363 nm. Изчислете концентрацията на Афлатоксин B_1 в микрограма на милилитър от разтвора чрез формулата:

$$\text{Концентрация}(\mu g/ml) = \frac{312 \times A \times 1000}{22300} = 13,991 \times A$$

3.12.1. Афлатоксин B_1 изходен стандартен разтвор в хлороформ.

Прехвърлете количествено 2,5 ml стандартен разтвор на афлатоксин B_1 (3.12) в 50 ml мерителна колба и допълнете до марката с хлороформ (3.1). Съхранявайте този разтвор на студено (4 °C) и тъмно, добре запушен и завит в алуминиево фолио.

3.13. Калибриращи разтвори афлатоксин B_1 за ВПТХ.

Забележка: използвайте измита в киселина стъклария за приготвянето на тези разтвори (вж. 4, апаратура).

3.13.1. Калибриращ разтвор 4 ng/ml.

Оставете мерителната колба с изходния разтвор (3.12.1) да се затопли до стайна температура в алуминиевото фолио (няколко часа). Прехвърлете 400 μl от изходния разтвор (200 ng афлатоксин B_1) в мерителна колба с обем 50 ml и изпарявайте разтвора до достигане на състояние на инертен газ (3.11).

Разтворете получения остатък в приблизително 20 ml вода (ацетонова смес (3.5.3), допълнете с вода/ацетонова смес до марката и разбъркайте добре.

3.13.2. Калибриращ разтвор 3 ng/ml.

Прехвърлете количествено 7,5 ml от калибриращия разтвор (3.13.1) в мерителна колба с обем 10 ml, допълнете до марката с вода/ацетонова смес (3.5.3) и разбъркайте добре.

3.13.3. Калибриращ разтвор 2 ng/ml.

▼M2

Прехвърлете количествено 25 ml от калибриращия разтвор (3.13.1) в мерителна колба с обем 50 ml, допълнете до марката с вода/ацетонова смес (3.5.3) и разбъркайте добре.

Този разтвор се използва също като стандартен еталон, който се използва за стандратно впръскване при ВПТХ (5.5).

3.13.4. Калибриращ разтвор 1 ng/ml.

Прехвърлете количествено 2,5 ml от калибриращия разтвор (3.13.1) в мерителна колба с обем 10 ml, допълнете до марката с вода/ацетонова смес (3.5.3) и разбъркайте добре.

3.14. Ампула, съдържаща смес от концентрации на афлатоксини B_1, B_2, G_1 и G_2, приблизително 1, 0,5, 1 и 0,5 µg/ml, съответно в 1 ml хлороформ.

3.14.1. Разтвор за хроматографски тест.

Прехвърлете съдържанието на ампулата (3.14) в запушена със стъклена запушалка епруветка или в стъкленица, запушена с винтова капачка Прехвърлете 40 µl от този разтвор в запушената със стъклена запушалка епруветка (измита с киселина) (4.22). Изпарете хлороформа до струя от инертен газ (3.11) и разтворете отново в 10 ml вода/ацетонова смес (3.5.3).

3.15. Реактиви за потвърждаващ тест (6).

3.15.1. Наситен разтвор на натриев хлорид.

3.15.2. Гранулиран безводен разтвор на натриев сулфат.

4. **Апаратура**

Предупреждение: Използването на неизмита с киселина стъклария за водни разтвори на афлатоксини може да предизвика загуби. По-специално внимание следва да се обърне на новата стъклария и стъкларията за еднократна употреба, като автоматично вземащи проба ампули и Пастьорови пипети. Поради това лабораторна стъклария, влизаща в контакт с водни разтвори на афлатоксини следва да бъде накисната в разредена киселина (например сярна киселина = 2 мол/л) за няколко часа, след това да се изплакне добре с дестилирана вода, за да се премахнат всички остатъци то киселина (например три пъти, проверка с лакмус за pH). В практиката тази обработка е необходима за облодъните колби (4.4), мерителните колби, градуирани епруветки, стъкленици или епруветки, използвани за калибрирани разтвори и крайни екстракти (по-специално, стъкленици за автодегустация) и Пастьорови пипети, ако се използват за прехвърляне на калибрирани разтвори или екстракти.

4.1. Мелница-миксер

4.2. Сито с размер на отворите 1,0 mm, (ISO R 565).

4.3. Механичен шейкър (механичен апарат за бълникане).

4.4. Ротационен вакуум изпарител, оборудван с облодънна колба с обем от 150 до 250 ml.

4.5. Висококачествен течен хроматограф, впръсквател с извод, удобен за впръскване на 250 ml. Виж инструкциите на производителя за частично или пълно съответствие на извода.

4.6. Аналитична колона за ВПТХ: 3 µm или 5µm C_{18} уплътнител.

4.7. Помпа без пулсации за подаване на йодния следколонен реагент

4.8. Valco нулев мъртъв обем Tee, неръждаема стомана (1/16″ × 0,75 mm).

4.9. Реакционен змиевик; тефлон или неръждаема стомана. Установено е, че размери от 3 000 × 0,5 mm до 5 000 × 0,5 mm са в подходяща комбинация с 5 µm или 3 µm ВПТХ колони.

4.10. Термостатично регулирана водна баня, достигаща до 60 °C, с възможност за температурно регулиране по-добро от 0,1 °C.

▼**M2**

4.11. Флуоресциращ детектор, който се намагнетизира при 365 nm и излъчване с дължина на вълната от 435 nm. (За филтриращ инструмент: излъчвана дължина на вълната > 400 nm). Ще бъде възможно засичането на най-малко 0,05 ng афлатоксин B_1. Може да се окаже подходящо и упражняване на противоналягане (например ограничител, тефлонова намотка или намотка от неръждаема стомана, свързана с изхода на детектора), за ограничаване на въздушните мехурчета във входната клетка.

4.12. Записващо лентово устройство.

4.13. Електронен интегратор (по избор).

4.14. Нагъната филтърна хартия с диаметър: 24 cm, Macherey-Nagel 617 1/4 или еквивалент

4.15. Мембранен филтър с размер на отворите 0,45 μm, Millipore HAWP 04700 или еквивалент.

4.16. Конична колба със стъклена запушалка с обем 500 ml.

4.17. Стъклена колона (вътрешен диаметър приблизително 1 cm, дължина приблизително 30 cm), оборудвана с накрайник Luer.

4.18. Спирателен кран за ограничаване достъпа на хлороформ на Luer (например Bio-Rad 7328017, Analytichem A1 6078, J.T. Baker 4514 или еквивалент).

4.19. Химически резистентна спринцовка, 10 ml свръзка Luer.

4.20. Помпа, подходяща за ВПТХ впръскване от 250 μl (виж 4.5.).

4.21. 100 μl микропомпа за подготовка на калибриращи разтвори (проверете дали точността е в рамките на 2 % при претегляне).

4.22. 10 ml калибровани епруветки със стъклени запушалки.

4.23. Спектрофотометър, подходящ за извършване на измервания в ултравиолетовата област на спектъра.

4.24. Оборудване за потвърждаващ тест (6).

4.24.1. Изплакната в киселина 100 ml разделителна фуния с тефлонов спирателен кран.

4.24.2. Загряващ блок, 40 до 50 °C.

5. **Процедура**

5.1. *Подготовка на пробата.*

Смелете пробата така че тя да преминава през ситото (4.2).

5.2. *Количество за теста.*

Претеглете 50 g от приготвената проба за теста в конична колба (4.16).

5.3. *Извличане.*

Добавете 25 g целит (3.8), 250 ml хлороформ (3.1) и 25 ml вода към количеството, подготвено за теста (5.2). Запушете колбата и разклащайте в продължение на 30 минути в механичен шейкър (4.3). Филтрирайте през нагъната филтърна хартия (4.14). Вземете 50 ml от филтрата. Ако е необходимо, вземете аликвотно количество от филтрата и разредете до 50 ml с хлороформ така че концентрацията на афлатоксин B_1 да не е по-голяма от 4 ng/ml.

5.4. *Пречистване* (процедурата следва да се извърши без съществени прекъсвания).

Предупреждение:

— защитете лабораторията, където се извършват анализите, съответно от дневна светлина. Това може да се постигне ефективно чрез използване на:

i) Ултравиолетово абсорбиращо фолио върху прозорци в комбинация с убита светлина (не директна слънчева светлина);

▼M2

ii) Завеси или транспаранти в комбинация с изкуствена светлина (флуоросцентни лампи са приемливи).

— Афлатоксин, съдържащ разтвори, следва да бъде предпазен от светлина дотолкова, доколкото е възможно (пазете на тъмно, използвайте алуминиево фолио).

5.4.1. Флорисил SEP-PAK пречистване

5.4.1.1. Подготовка на системата колона-гилза.

Закрепете спирателния кран (4.18) към по-късия край на Флорисиловата гилза (3.9) (виж фигура 1). Промийте гилзата и продължете, като вземете 10 ml хлороформ (3.1) и прекарайте 8 ml чрез спирателния кран бързо през гилзата, като използвате спринцовка (4.19). Закрепете по-дългия край на гилзата към стъклена колона (4.17) и прекарайте останалите 2 ml хлороформ през гилзата в колоната. Затворете спирателния кран. Отстранете спринцовката.

5.4.1.2. Пречистване

Добавете филтрата, събран в 5.3 в системата колона-гилза и подсушете чрез утаяване. Изплакнете с 5 ml хлороформ (3.1), след това с 20 ml етанол (3.2). Почистете елюатите. По време на тези действия се уверете, че системата колона-гилза не изсъхва.

Елюирайте афлатоксин B_1 с 40 ml ацетоново-водна смес (3.5.1) и приберете всичкия елюат в облодънната колба на ротационния изпарител (4.4). Сгъстявайте елюата в ротационния изпарител при 40 °C до 50 °C, докато спре да се отделя ацетон. (Забележка: приблизително 0,5 ml от течността остава в колбата в този случай. Експерименти показват, че по-нататъшно изпаряване не е безопасно и че когато остане 0,5 ml от течността, няма значително количество ацетон. Остатъците от ацетон могат да доведат до загуби на афлатоксин B_1 при C_{18} гилзата). Добавете 1 ml метанол (3.2), завъртете колбата, за да се отложи афлатоксин B_1 по стените на колбата, добавете 4 ml вода и разбъркайте. Разглобете и отстранете гилзата. Изплакнете стъклената колона с вода и продължете с C_{18} пречистването.

5.4.2. C_{18} SEP-PAK пречистване

5.4.2.1. Приготвяне на системата колона-гилза.

Закрепете спирателния кран (4.18) към по-късия край на C_{18} гилзата (3.10) (виж фигура 1). Заредете гилзата и отстранете всичкия въздух, като прокарате 10 ml метанол (3.2) посредством спирателния кран бързо през гилзата със спринцовка (4.19) (Въздушните балончета в гилзата са видими като светли петна върху останалия сивкав фон). Вземете 10 ml вода и прекарайте 8 ml през гилзата (Избягвайте внасянето на въздух в гилзата при преминаването от метанол към вода). Закрепете по-дългия край на гилзата към стъклена колона (4.17) и прекарайте останалите 2 ml вода през гилзата в колоната. Затворете спирателния кран. Отстранете спринцовката.

5.4.2.2. Пречистване

Прехвърлете събрания при 5.4.1.2 екстракт количествено в стъклената колона (4.17), изплакнете колбата двукратно с 5 ml вода/метанолова смес (3.5.2) и подсушете чрез утаяване. По време на тези действия се уверете, че системата колона-гилза не изсъхва. (Когато се появяват въздушни мехурчета в конструкцията близо до гилзата, спрете притока и запушете върха на стъклената колона, за да отстраните въздушните балончета. След това продължете). Елюирайте с 25 ml вода/метанолова смес. Отстранете елюата. Елюирайте афлатоксина B_1 с 50 ml вода/ацетонова смес (3.5.3) и съберете целия елюат в мерителна колба с обем 50 ml. Допълнете до марката с вода и разбъркайте: полученият тестов разтвор се използва за хроматограия (5.5).

Предупреждение: Филтрирането на окончателния екстракт преди ВПТХ обикновено не е необходимо. Ако се приеме, че е необходимо, целулозните филтри не бива да бъдат използвани, тъй

▼M2

като те могат да доведат до загуби на афлатоксин B_1. Тефлонови филтри са приемливи.

5.5. *Високопроизводителна течна хроматография*

(Виж фигура 2 за оборудването). Осигурете достатъчно време за осигуряване на условия и стабилизиране на инструментите.

Забележка 1:

Дебитът, даван за мобилната фаза и след-колонния реактив са само като указание. Те може да не се регулират в зависимост от характеристиките на ВПТХ колоната.

Забележка 2:

Индикаторът, характеризиращ афлатоксин B_1, зависи от температурата, следователно следва да се извърши компенсиране за дрейфа (виж фигура 3). Чрез инжектиране на определено количество афлатоксин B_1, еталонен разтвор (3.13.3), на редовни интервали (например всяко трето инжектиране), пиковите стойности на афлатоксин B_1 между тези еталонни разтвори могат да бъдат коригирани, като се използват средни стойности, чрез които се осигурява така че разликата между характеристиките на последователните еталонни разтвори е много малка (< 10 %). Следователно инжектиранията трябва да се извършват без прекъсвания. Ако е необходимо прекъсване, последното инжектиране преди прекъсването и първото инжектиране след прекъсването трябва да бъдат еталонни (3.13.3). Тъй като калибриращата крива е линеарна и преминава през началото, количествата афлатоксин B1 в мострите на екстрактите се определят директно чрез съотношението им с най-близките стандарти.

5.5.1. ВПТХ помпени инсталации

Пригответе ВПТХ помпата (4.5) така че да предизвиква струя от 0,5 или 0,3 мл/мин за 5 μm или 3 μm ВПТХ колона (4.6), използвана респективно в мобилната фаза (3.6).

5.5.2. Следколонни помпени инсталации

Пригответе помпата (4.7) така че да предизвиква струя от 0,2 до 0,4 ml/min наситен йоден воден разтвор (3.7). Като приблизително ръководство: Струи от приблизително 0,4 или 0,2 ml/min са препоръчителни в комбинация със струи от 0,5 и 0,3 ml/min при съответната мобилна фаза (3.6).

5.5.3. Флуоресцентен детектор

Пригответе флуоресцентния детектор (4.11) за намагнетизиране = 365 nm и излъчване = 435 nm (филтриращ инструмент; > 400 nm). Регулирайте детектора така че да получава от писеца за 1 ng афлатоксин B_1 приблизително 80 % от пълната скала на пречупване.

5.5.4. Впръсквател

За всички разтвори инжектирайте количество от 250 μl, като следвате инструкциите на производителя на впръсквателя.

5.5.5. Проверка на хроматографското разлагане

Инжектирайте хроматографския пробен разтвор (3.14.1). Падините трябва да са по-малко от 5 % от сумата на пиковите височини на съседните пикове.

5.5.6. Проверете стабилността на системата.

Преди всяка серия анализи инжектирайте съответно еталонен разтвор (3.13.3) до постигане на стабилни пикови площи (*Забележка*: Пиковите характеристики за афлатоксин B_1 между две последователни инжектирания не трябва да се различават с повече от 6 %). Продължете незабавно с проверката на линейността (5.5.7).

5.5.7. Проверка на линейността.

Инжектирайте афлатоксин B_1 калибриращи разтвори (3.13.1 до 3.13.4). На всяко трето инжектиране използвайте еталонен

▼M2

разтвор (3.13.3), за да коригирате дрейфа в характеристиката (*Забележка*: Пиковите характеристики за този еталонен разтвор не трябва да се различават с повече от 10 % на 90 min). Коригирайте дрейфа в съответствие с формулата в 7. Калибриращата графика трябва да бъде линеарна и да минава през началото, в рамките на две стандартни грешки от Y-еталона. Получените стойности не бива да се различават с повече от 3 % от номиналната стойност. Ако тези изисквания са изпълнени, продължете без прекъсване. Ако не, открийте и коригирайте източниците на проблеми преди да продължите.

5.5.8. Инжектиране на пробен екстракт

Инжектирайте пречистения пробен екстракт (5.4.2.2). След всеки два пробни екстракта повторете инжектирането с еталонен разтвор (3.13.3), с следната последователност: еталонен разтвор, екстракт, екстракт, еталонен разтвор, екстракт, екстракт, еталонен разтвор и т.н.

6. **Потвърждаващ тест**

6.1. *По-нататъшна обработка на екстракта (5.4.2.2)*

Добавете 5 ml разтвор на натриев хлорид (3.15.1) към окончателния екстракт, получен при 5.4.2.2. Извличайте три пъти, всеки път по 2 ml хлороформ (3.1) за една минута в разделяща фуния (4.24.1). Изсипете комбинирания екстракт от хлороформ върху приблизително 1 g натриев сулфат (3.15.2) в епруветка с обем 10 ml. Малка фуния (диаметър: 4 cm) може да се използва заедно с парче медицински памук за уплътняване, покрит с приблизително 1 g натриев сулфат.

Напоете пласта от натриев сулфат с няколко ml хлороформ и поставете полученото вещество в същата епруветка. Изпарявайте екстракта от хлороформ до изсушаване в същата епруветка, като използвате загряващ блок (4.24.2) и разтворете отново в 1 ml хлороформ.

6.2. *Подготовка за вторична и тънкослойна хроматография.*

Виж приложението към Директива 76/372/ЕИО на Съвета, Метод А, точка 5.6.2.

7. **Изчисляване на резултатите**

Изчислете съдържанието на афлатоксин B_1 (μm/kg), който се съдържа в пробата, като използвате формулата:

$$\text{Съдържание на афлатоксин } B_1 \text{ вμg/kg} = \frac{m \times V_{ext}}{V_m \times M \times \frac{V_f}{V_c}}$$

където:

m = количество афлатоксин B_1 в ng, представено чрез B_1 пика на пробата, изчислено, както следва

$$m = \frac{P(\text{проба})}{P(st_1) + P(st_2)} \times 2\ r(st)$$

P (проба) = пикова площ на афлатоксин B_1 за пробата

$P(st_1)$ = пикова площ афлатоксин B_1, идващ от предходното инжектиране на еталонен разтвор (3.13.3)

$P(st_2)$ = пикова площ на афлатоксин B_1, идващ от следващото инжектиране на еталонен разтвор (3.13.3)

r(st) = инжектирано количество афлатоксин B_1 в еталонния разтвор (3.13.3) в ng

V_m = обем на инжектирания пробен екстракт в ml

V_{ext} = краен обем пробен екстракт в ml, отчитащ всяко направено разреждане (5.3)

▼M2

M = маса на пробата в грамове

V_f = обем филтрат, прехвърлен към гилзата Флорисил (5.4.1.2) в ml

V_c = обем хлороформ, използван за екстрахирането на пробата в ml.

Ако процедурата се спазва както в този протокол, формулата се свежда до:

афлатоксин B_1 съдържание в μg/кg = 20 × m.

7.1. Изчисления на резултатите могат също да се извършат чрез измерване на пиковите височини.

8. **Повторяемост:**

Виж под 10.1.

9. **Възпроизводимост:**

Виж под 10.1.

10. **Наблюдения**

10.1. *Точност*

Съвместно проучване ([1]), засягащо международното равнище на смесените хранителни добавки даде резултатите за повторяемостта и възпроизводимостта, показани в Таблица 1. Терминът повторяемост (r), използван тук, се определя като най-голямото съотношение, което е незначително при 95 % вероятно ниво за сравнение между две разчитания на една и съща проба в една и съща лаборатория при подобни условия. Терминът възпроизводимост (R) се определя по подобен начин за сравнението между две различни лаборатории. В съответствие с ISO 3534 — 1977, 2.35 ([2]) и Решение 89/610/ЕИО на Комисията ([3]), r и R също са показани в таблица 1 в случаите при коефициенти на отклонение.

Таблица 1

Повторяемост (r) и възпроизводимост (R), изразени като съотношение и съответни коефициенти на отклонение

(15 лаборатории)

Ниво	r	R	CV_r (*)	CV_R
(μg/kg)			(%)	(%)
8 и 14	1,4	1,7	11	18

(*) CV= коефициент на отклонение

10.2. *Стабилизация на хлороформ (3.1)*

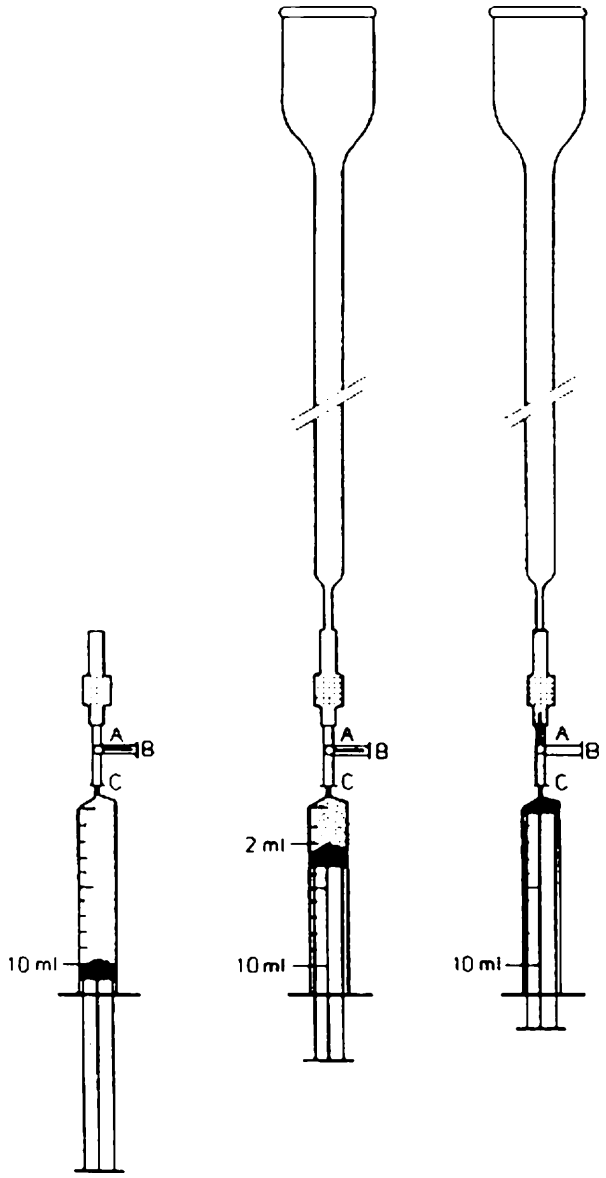
Адсорбционните характеристики на Флорисиловата гилза могат да бъдат променени, ако се използват стабилизатори, различни от етанол. Това следва да бъде проверено в съответствие с 10.3, където описаният хлороформ не е в наличност.

10.3. *Точност*

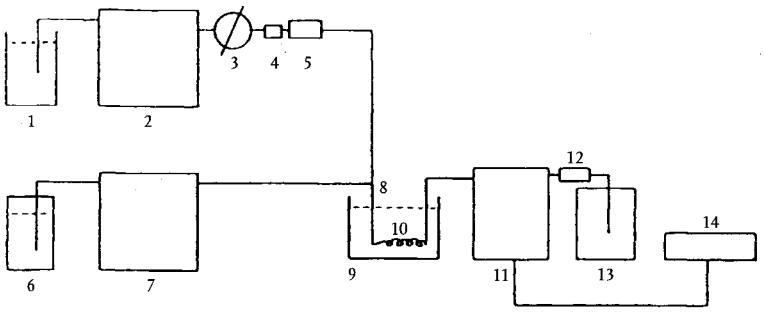
Правилното прилагане на метода се проверява чрез извършване на съвсем същите измервания върху сертифицирани еталонни материали. Ако това не е възможно, прилагането на метода следва да бъде проверено чрез съответни опити, извършени върху подсилени чисти проби. Отклонението от средните нива на действителните стойности, изразени като процент от действителната стойност, не следва да се намират извън границите – 20 до + 10 %.

([1]) Egmond, H.P. van, Heisterkamp, S.H. и Paulsch, W.E. (1991). *Добавки към храни и примеси* 8, 17-29.
([2]) ISO 3534-1977.
([3]) ОВ L 351, 2.12.1989 г., стр. 39.

▼**M2**



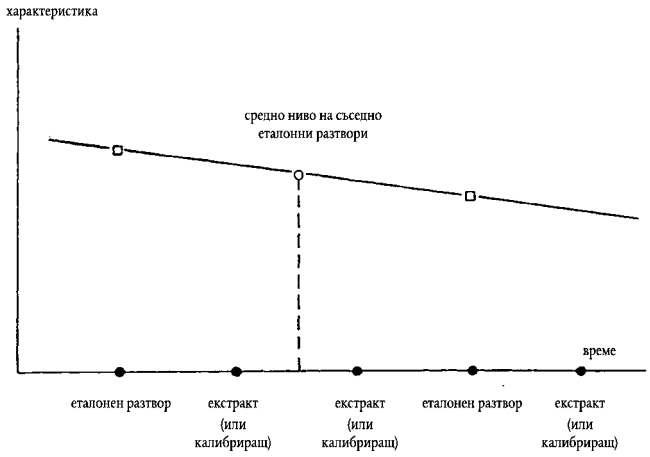
Фигура 1: Система колона-гилза



1. Мобилна фаза
2. Помпа
3. Инжекционен клапан
4. Предпазна колона
5. ВПТХ колона за анализ
6. Наситен йоден разтвор
7. Помпа за реактив
8. Т-връзка
9. Вана с термостатичен контрол
10. Реакционен змиевик
11. Флуоресцентен детектор
12. Ограничител
13. Отпадък
14. Записващо лентово устройство/интегратор.

Фигура 2: Технологична схема на системата за течна хроматография с последваща колона за йодна дериватизация

▼**M2**



Фигура 3: Компенсация на дрейфа в характеристика на афлатоксин B_1 чрез инжектиране на еталонен разтвор (3.13.3) на редовни интервали

▼**M3**

В. НАБЛЮДЕНИЯ ПО ОТНОШЕНИЕ МЕТОДИ А И Б

1. **Изчистване от мазнини**

Проби, съдържащи повече от 5 % мазнини, трябва да бъдат обезмаслени с петролеев етер (т.к. от 40 до 60 °C) след приготвянето им по 5.1.

В такива случаи резултатите от анализа трябва да се изразят чрез теглото на необезмаслената проба.

2. **Възпроизводимост на резултатите**

Възпроизводимостта на резултатите, т.е. разликите в резултатите, получени от две или повече лаборатории с една и съща проба, е била изчислена, както следва:

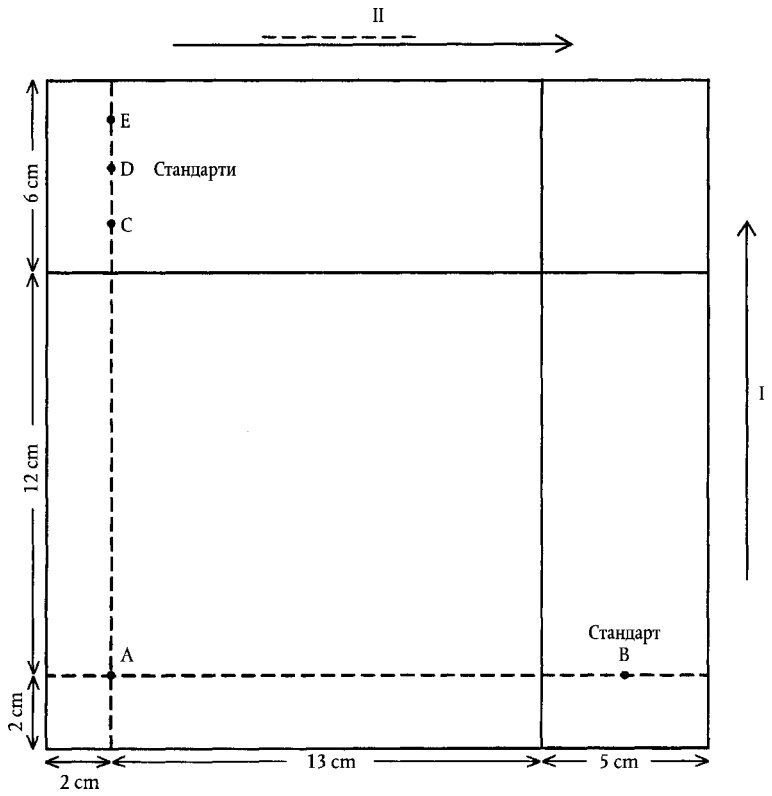
— около 50 % от средната стойност на резултатите за средните стойности на афлатоксин B, от 10 до 20 μг/кг,

— около 10 μг/кг от средната стойност за средните стойности от 20 до 50 μг/кг,

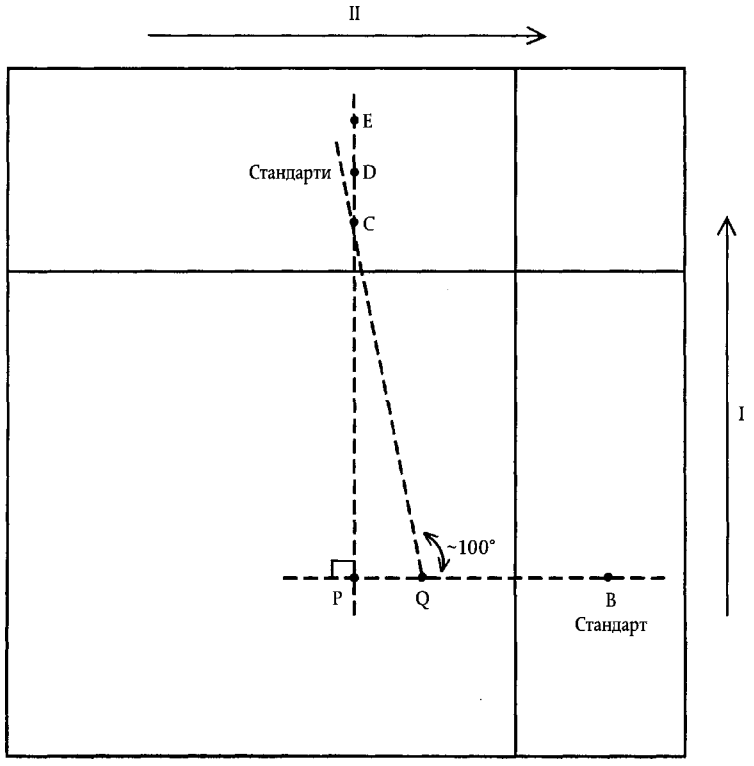
— около 20 % от средната стойност за средните стойности над 50μг/кг.

▼B

Допълнение към приложението

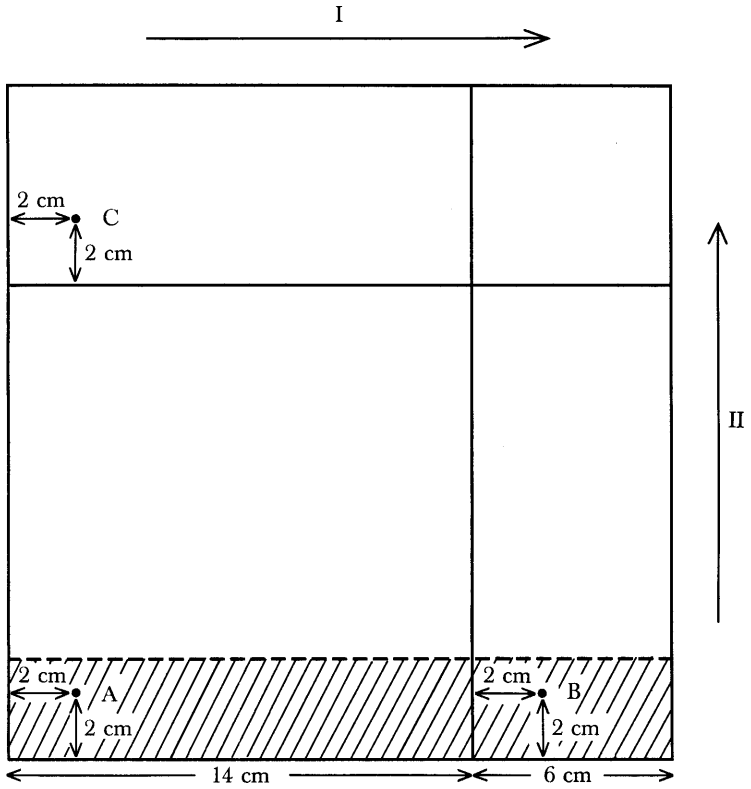


Фигура 1



Фигура 2

▼B



Фигура 3