Tento dokument je třeba brát jako dokumentační nástroj a instituce nenesou jakoukoli odpovědnost za jeho obsah

►**B**

SEDMÁ SMĚRNICE KOMISE

ze dne 1. března 1976,

kterou se stanoví analytické metody Společenství pro úřední kontrolu krmiv

(76/372/EHS)

(Úř. věst. L 102 , 15.4.1976, s. 8)

Ve znění:

		Úřední věstník		
		Č.	Strana	Datum
►**M1**	Směrnice Komise ze dne 30. července 1981,	L 246	32	29.8.1981
►**M2**	Směrnice Komise 92/95/EHS ze dne 9. listopadu 1992,	L 327	54	13.11.1992
►**M3**	Směrnice Komise 94/14/ES ze dne 29. března 1994,	L 94	30	13.4.1994

▼B

SEDMÁ SMĚRNICE KOMISE

ze dne 1. března 1976,

kterou se stanoví analytické metody Společenství pro úřední kontrolu krmiv

(76/372/EHS)

KOMISE EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ,

s ohledem na Smlouvu o založení Evropského hospodářského společenství,

s ohledem na směrnici Rady za dne 20. července 1970 o zavedení metod odběru vzorků a analytických metod Společenství pro úřední kontrolu krmiv ([1]), naposledy pozměněnou aktem o přistoupení ([2]), a zejména na článek 2 uvedené směrnice,

vzhledem k tomu, že uvedená směrnice stanoví, že úřední kontroly krmiv, jejichž cílem je ověřit dodržování požadavků stanovených právními a správními předpisy a týkajících se jakosti a složení krmiv, se provádějí podle metod odběru vzorků a analytických metod Společenství;

vzhledem k tomu, že směrnice Komise 71/250/EHS ze dne 15. července 1971 ([3]), 71/393/EHS ze dne 18. listopadu 1971 ([4]), 72/199/EHS ze dne 27. dubna 1972 ([5]), 73/46/EHS ze dne 5. prosince 1972 ([6]), 74/203/EHS ze dne 25. března 1974 ([7]) a 75/84/EHS ze dne 20. prosince 1974 ([8]) již stanovily řadu analytických metod Společenství; že s ohledem na stav doposud provedených prací je však nutné stanovit sedmou sérii analytických metod;

vzhledem k tomu, že opatření této směrnice jsou v souladu se stanoviskem Stálého výboru pro krmiva,

PŘIJALA TUTO SMĚRNICI:

Článek 1

Členské státy stanoví, že analýzy pro úřední kontroly krmiv, pokud jde o obsah aflatoxinu B_1, se provádějí podle metod popsaných v příloze této směrnice.

▼M1

▼B

Článek 2

Členské státy uvedou v účinnost právní a správní předpisy nezbytné pro dosažení souladu s touto směrnicí nejpozději do 1. října 1976. Neprodleně o nich informují Komisi.

Článek 3

Tato směrnice je určena členským státům.

([1]) Úř. věst. L 170, 3.8.1971, s. 2.
([2]) Úř. věst. L 73, 27.3.1971, s. 14.
([3]) Úř. věst. L 155, 12.7.1971, s. 13.
([4]) Úř. věst. L 279, 20.12.1971, s. 7.
([5]) Úř. věst. L 123, 29.5.1972, s. 6.
([6]) Úř. věst. L 83, 30.3.1973, s. 21.
([7]) Úř. věst. L 108, 22.4.1974, s. 7.
([8]) Úř. věst. L 32, 5.2.1975, s. 26.

▼B

PŘÍLOHA

STANOVENÍ AFLATOXINU B_1

A. METODA JEDNOROZMĚRNÉ TENKOVRSTVÉ CHROMATOGRAFIE

▼M2

1. **Účel a oblast použití**

Tato metoda umožňuje stanovit obsah aflatoxinu B1 v těchto surovinách a krmných surovinách. Tuto metodu nelze použít, je-li přítomna citrusová pulpa. Dolní mezní hodnota stanovitelnosti je 0,01 mg/kg (10 ppb).

Pokud jsou přítomny rušivé látky, je nutné analýzu opakovat podle metody B (vysokoúčinné kapalinové chromatografie).

▼B

2. **Princip**

Vzorek se extrahuje chloroformem. Extrakt se filtruje a jeho alikvotní část se odebere a přečistí kolonovou chromatografií na silikagelu. Eluát se odpaří a reziduum se rozpustí ve stanoveném objemu chloroformu nebo ve směsi benzenu a acetonitrilu. Alikvotní část tohoto roztoku se podrobí tenkovrstvé chromatografii. Množství aflatoxinu B_1 se stanoví z chromatogramu pod UV světlem buď vizuálně nebo fluorimetricky srovnáním se známými množstvími standardu aflatoxinu B_1. Identita aflatoxinu B_1 extrahovaného z krmiv musí být potvrzena stanoveným postupem.

3. **Činidla**

Poznámka: Pokud není stanoveno jinak, všechna činidla musí být čistoty „p. a“.

3.1 Aceton.

3.2 Chloroform stabilizovaný 0,5 až 1,0 procentem 96 % (V/V) ethanolu.

3.3 N–hexan.

3.4 Methanol.

3.5 Diethylether, bezvodý, neobsahující peroxidy.

3.6 Směs benzenu a acetonitrilu: 98/2 (V/V).

3.7 Směs chloroformu (3.2) a methanolu (3.4): 97/3 (V/V).

3.8 Silikagel pro kolonovou chromatografii, velikost částic 0,05 až 0,20 mm.

3.9 Absorbent – vata, předem odtučněná chloroformem, nebo skelná vata.

3.10 Síran sodný, bezvodý, granulovaný.

3.11 Inertní plyn, např. dusík.

3.12 Kyselina chlorovodíková 1 N.

3.13 50 % (V/V) kyselina sírová.

3.14 Křemelina (hyflosupercel), promytá kyselinou.

3.15 Silikagel G–HR nebo ekvivalent, pro tenkovrstvou chromatografii.

3.16 Standardní roztok obsahující asi 0,1 µg aflatoxinu B_1 na 1 ml chloroformu (3.2) nebo směsi benzenu a acetonitrilu (3.6), připravený a zkontrolovaný, jak je uvedeno v bodu 7.

3.17 Standardní roztok pro testování jakosti obsahující asi 0,1 µg aflatoxinu B_1 a B_2 na 1 ml chloroformu (3.2) nebo směsi benzenu a acetonitrilu (3.6). Tyto koncentrace jsou orientační. Musí být upraveny tak, aby se získala stejná intenzita fluorescence u obou aflatoxinů.

3.18 *Vyvíjecí rozpouštědla:*

3.18.1 Chloroform (3.2)/aceton (3.1): 9/1 (V/V), chromatografický tank s nenasycenou atmosférou;

3.18.2 Diethylether (3.5)/methanol (3.4)/voda: 96/3/1 (V/V), chromatografický tank s nenasycenou atmosférou;

▼B

3.18.3 Diethylether (3.5)/methanol (3.4)/voda: 94/4.5/1.5 (V/V), chromatografický tank s nasycenou atmosférou;

3.18.4 Chloroform (3.2)/methanol (3.4): 94/6 (V/V), chromatografický tank s nasycenou atmosférou;

3.18.5 Chloroform (3.2)/methanol (3.4): 97/3 (V/V), chromatografický tank s nasycenou atmosférou.

4. **Přístroje**

4.1 Drtič – mixer.

4.2 Třepačka nebo magnetická míchačka.

4.3 Skládané filtrační papíry, Schleicher a Schüll č. 588 nebo ekvivalentní, průměr 24 cm.

4.4 Skleněná chromatografická trubice (vnitřní průměr 22 mm, délka 300 mm) s teflonovým kohoutem a 250 µl zásobníkem.

4.5 Rotační vakuová odparka, s baňkou o objemu 500 ml a kulatým dnem.

4.6 Erlenmeyerovy baňky o objemu 500 ml, se zábrusovými zátkami.

4.7 Zařízení pro tenkovrstvou chromatografii.

4.8 Skleněné desky pro tenkovrstvou chromatografii, 200 x 200 mm, se připraví takto (uvedená množství stačí pro pět desek): dát 30 g silikagelu G-HR (3.15) do Erlenmeyerovy baňky, přidat 60 ml vody, zazátkovat a protřepávat 1 minutu. Rozprostřít suspenzi na desky takovým způsobem, aby se vytvořila stejnoměrná vrstva o tloušťce 0,25 mm. Nechat uschnout na vzduchu a poté uchovat v desikátoru obsahujícím silikagel. Před použitím aktivovat desky jednu hodinu v sušárně při 110 °C.

Desky připravené k použití jsou vyhovující, pokud vykazují podobné výsledky jako desky připravené podle uvedeného postupu.

4.9 UV lampa dlouhovlnná (360 mm). Intenzita záření musí být dostatečná, aby skvrna 1 ng aflatoxinu B_1 na desce pro tenkovrstvou chromatografii byla na vzdálenost 10 cm od lampy ještě jasně rozeznatelná.

4.10 Odměrné zkumavky o objemu 10 ml, s polyethylenovými zátkami.

4.11 UV spektrofotometr.

4.12 Fluorimetr (volitelný).

5. **Postup**

5.1 *Příprava vzorku (*viz „Poznámky“, část C bod 1)

Rozmělnit vzorek takovým způsobem, aby celý prošel sítem s oky o velikosti 1 mm (v souladu s doporučením ISO R 565).

5.2 *Extrakce*

Do Erlenmeyerovy baňky o objemu 500 ml dát 50 g rozemletého a homogenizovaného vzorku. Přidat 25 g křemeliny (3.14), 25 ml vody a 250 ml chloroformu (3.2). Zazátkovat, protřepávat nebo promíchávat 30 minut třepačkou (4.2) a přefiltrovat přes skládaný filtrační papír (4.3). Odstranit prvních 10 ml filtrátu, poté sebrat 50 ml.

5.3 *Přečištění na koloně*

Do spodní části chromatografické trubice (4.4) vložit zátku z vaty nebo ze skelné vaty (3.9), naplnit trubici se do dvou třetin chloroformem (3.2), a poté přidat 5 g síranu sodného (3.10).

Ověřit, že horní povrch vrstvy síranu sodného je zcela rovný, a poté přidat po malých dávkách 10 g silikagelu (3.8). Po každém přidání opatrně zamíchat, aby se odstranily vzduchové bubliny. Nechat 15 minut stát, a poté opatrně přidat 15 g síranu sodného (3.10). Nechat kapalinu klesnout až k hornímu povrchu vrstvy síranu sodného.

Smíchat 50 ml extraktu získaného podle bodu (5.2) se 100 ml n-hexanu (3.3) a směs kvantitativně přelít do kolony. Nechat kapalinu klesnout až k hornímu povrchu vrstvy síranu sodného. Přidat 100 ml diethyletheru (3.5) a znovu nechat kapalinu klesnou až k hornímu povrchu vrstvy síranu sodného. Během tohoto postupu dbát na to, aby rychlost průtoku byla 8 až 12 ml za minutu a aby kolona nevyschla. Odstranit vytečenou kapalinu. Poté eluovat 150 ml směsi chloroformu a methanolu (3.7) a sebrat celý eluát.

▼B

Odpařit eluát do sucha pod proudem inertního plynu (3.11) v rotační vakuové odparce (4.5) při teplotě nižší než 50 °C. Reziduum kvantitativně převést za použití chloroformu (3.2) nebo směsi benzenu a acetonitrilu (3.6) do odměrné zkumavky o objemu 10 ml (4.10). Koncentrovat roztok pod proudem inertního plynu (3.11), a poté doplnit objem na 2 ml za použití chloroformu (3.2) nebo směsi benzenu a acetonitrilu (3.6).

5.4 *Tenkovrstvá chromatografie*

Na desku pro tenkovrstvou chromatografii (4.8) nanést 2 cm od spodní hrany a v odstupech po 2 cm tyto objemy standardních roztoků a extraktu:

— 10, 15, 20, 30 a 40 µl standardního roztoku alfatoxinu B_1 (3.16),

— 10 µl extraktu získaného podle bodu 5.3 a k tomu 20 µl standardního roztoku (3.16),

— 10 a 20 µl extraktu získaného podle bodu 5.3.

Chromatogram se vyvíjí ve tmě za použití jednoho z vyvíjecích rozpouštědel (3.18). Výběr rozpouštědla se musí provést předem nanesením 25 µl jakostního standardního roztoku (3.1) na desku a musí se ověřit, zda jsou aflatoxiny B_1 a B_2 při vyvíjení zcela odděleny.

Nechat rozpouštědla odpařit ve tmě a poté ozářit desku UV paprsky ze vzdálenosti 10 cm od lampy (4.9). Skvrny aflatoxinu B_1 modře fluoreskují.

5.5 *Kvantitativní stanovení*

Stanovení se provádí buď vizuálně nebo fluorimetricky podle těchto pokynů:

5.5.1 Vizuální měření

Množství aflatoxinu B_1 v extraktu se stanoví porovnáním intenzity fluorescence skvrn extraktu s intenzitou fluorescence skvrn standardního roztoku. V případě potřeby se interpoluje. Fluorescence získaná překrytím extraktu přes standardní roztok musí být silnější než fluorescence 10 ml extraktu a nesmí být viditelná více než jedna skvrna. Pokud je intenzita fluorescence 10 µl extraktu silnější než intenzita fluorescence 40 µl standardního roztoku, rozředit extrakt 10 krát nebo 100 krát chloroformem (3.2) nebo směsí benzenu a acetonitrilu (3.6) a poté znovu podrobit tenkovrstvé chromatografii.

5.5.2 Fluorimetrické měření

Intenzita fluorescence skvrn aflatoxinu B_1 se měří fluorimetrem (4.12) při excitační vlnové délce 365 nm a emisní délce 443 nm. Množství aflatoxinu B_1 ve skvrnách extraktu se stanoví porovnáním jejich intenzit fluorescence s intenzitami skvrn standardního roztoku aflatoxinu B_1.

5.6 *Potvrzení identity aflatoxinu B_1*

Potvrzení identity aflatoxinu B_1 v extraktu se provede takto:

5.6.1 Ošetření kyselinou sírovou

Na chromatogram získaný podle bodu 5.4 nastříkat kyselinu sírovou (3.13). Fluorescence skvrn aflatoxinu B_1 se musí pod UV zářením změnit z modré na žlutou.

5.6.2 Dvourozměrná chromatografie zahrnující tvorbu aflatoxinu B_1 - hemiacetalu (aflatoxin B_{2a})

Poznámky:

Níže popsané pracovní postupy se musí provádět přesně podle schématu uvedeném na obrázku 3.

5.6.2.1 Nanesení roztoků

Narýsovat na desku (4.8) dvě přímky rovnoběžné se dvěma přilehlými stranami (6 cm od každé strany), určené k vymezení migrace čel rozpouštědel. Nanést na desku pomocí kapilárních pipet nebo injekčních mikrostříkaček tyto roztoky:

— *v bodu A:* objem vyčištěného extraktu vzorku získaného podle bodu 5.3, který obsahuje asi 2,5 nm aflatoxinu B_1,

— *v bodech B a C*: 25 µl standardního roztoku (3.16).

▼B

5.6.2.2 Vyvíjení

Chromatogram se vyvíjí za použití vyvíjecího rozpouštědla (3.18.1) [vrstva o tloušťce 1 cm v chromatografickém tanku s nenasycenou atmosférou] ve tmě ve směru I, dokud čelo rozpouštědla nedosáhne k vymezující linii.

Vyjmout desku z tanku a nechat oschnout pět minut ve tmě a při pokojové teplotě. Poté stříkat kyselinu chlorovodíkovou (3.12) na pásek o šířce 2,5 cm, který pokrývá body A a B (na obrázku 3 vyznačeno šrafovaně), dokud pásek neztmavne, přičemž zbytek desky je chráněn skelným papírem. Nechat působit 10 minut ve tmě, a poté vysušit desku proudem vzduchu při pokojové teplotě.

Poté se chromatogram vyvíjí za použití vyvíjecího rozpouštědla (3.18.1) [vrstva o tloušťce 1 cm v chromatografickém tanku s nenasycenou atmosférou] ve tmě ve směru II, dokud čelo rozpouštědla nedosáhne k vymezující linii. Vyjmout desku z chromatického tanku a nechat oschnout pět minut ve tmě a při pokojové teplotě.

5.6.2.3 Interpretace chromatogramu

Pozorovat chromatogram pod UV světlem (4.9) a ověřit tyto znaky:

a) Objevení se modré fluoreskující skvrny aflatoxinu B_1 pocházející ze standardního roztoku naneseného v bodu C (migrace ve směru I).

b) Objevení se modré fluoreskující skvrny aflatoxinu B_1 (který nereagoval s kyselinou chlorovodíkovou) a intenzivnější modré fluoreskující skvrny aflatoxinu B_1 – hemiacetalu, přičemž obě skvrny pocházejí ze standardního roztoku naneseného v bodu B (migrace ve směru II).

c) Objevení se podobných skvrn, jaké jsou popsány v bodu b), pocházejících ze vzorku extraktu naneseného v bodu A. Poloha těchto skvrn vychází jednak z migrační vzdáleností aflatoxinu B_1 od bodu A ve směru I (stejná vzdálenost jako u standardního vzorku naneseného v bodu C) a dále migrační vzdálenost aflatoxinu B_1 – hemiacetalu od bodu A ve směru II (stejná vzdálenost jako u standardního vzorku naneseného v bodu B). Fluorescenční intenzity skvrn hemiacetalu pocházejících z extraktu a ze standardního vzorku naneseného v bodu B by si měly odpovídat.

6. Výpočet výsledků

6.1 *Na základě vizuálních měření*

Obsah aflatoxinu B_1 v mikrogramech na 1 kg vzorku (ppb) se vypočítá pomocí vzorce:

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

kde:

X a Y jsou příslušné objemy standardního roztoku aflatoxinu B_1 v mikrolitrech (3.16) a extraktu, který má stejnou intenzitu fluorescence;

S = koncentrace, v mikrogramech na 1 ml, aflatoxinu B_1 ve standardním roztoku (3.16);

V = konečný objem extraktu v mikrolitrech, s ohledem na případná ředění;

W = hmotnost zkušebního vzorku v gramech, s ohledem na objem extraktu použitý pro pročištění na koloně.

6.2 *Na základě fluorimetrického měření*

Obsah aflatoxinu B_1 v mikrogramech na 1 kg vzorku (ppb) se vypočítá pomocí vzorce:

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

kde:

Y = objem extraktu, v mikrolitrech, naneseného na desku (10 µl nebo 20 µl);

▼B

S = množství aflatoxinu B_1, v nanogramech, ve skvrně extraktu (poměrně k použité hodnotě Y) odvozené z měření;

V = konečný objem extraktu v mikrolitrech, s ohledem na případná ředění;

W = hmotnost zkušebního vzorku v gramech, s ohledem na objem extraktu použitý pro pročištění na koloně.

7. **Příprava a testování standardního roztoku (3.16)**

7.1 *Stanovení koncentrace aflatoxinu B_1*

Připravit standardní roztok aflatoxinu B_1 v chloroformu (3.2) nebo směsi benzenu a acetonitrilu (3.6), jehož koncentrace je od 8 do 10 µg/ml. Stanovit absorpční spektrum mezi 330 a 370 nm za použití spektrofotometru (4.11).

Změřit optickou hustotu (A) při 363 nm v případě chloroformového roztoku nebo při 348 nm v případě roztoku směsi benzenu a acetonitrilu.

Vypočítat koncentraci aflatoxinu B_1 v mikrogramech na 1 ml roztoku pomocí tohoto vzorce:

$\frac{312 \cdot A \cdot 1\,000}{20\,600}$ pro chloroformový roztok;

$\frac{312 \cdot A \cdot 1\,000}{19\,800}$ pro roztok ve směsi benzenu a acetonitrilu..

Ve tmě provést příslušná ředění s cílem získat standardní pracovní roztok, jehož koncentrace aflatoxinu B_1 je asi 0,1 µg/ml. Pokud se roztok skladuje v chladničce při 4 °C, je stálý po dobu dvou týdnů.

7.2 *Testování chromatografické čistoty*

Nanést na desku (4.8) 5 µl standardního roztoku obsahujícího 8 až 10 µl aflatoxinu B_1 na 1 ml (7.1). Vyvinout chromatogram, jak je uvedeno v bodu 5.4. Při UV světle by měla být viditelná pouze jedna skvrna a v místě původního nanesení by neměla být znatelná žádná fluorescence.

8. **Opakovatelnost**

Rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení, které u jednoho vzorku provedl stejný analytik, nesmí překročit:

— 25 % nejvyššího výsledku pro obsahy aflatoxinu B_1 od 10 do 20 µg/kg,

— 5 µg absolutní hodnoty pro obsahy od 20 do 50 µg/kg,

— 10 % nejvyššího výsledku pro obsahy vyšší než 50 µg/kg.

9. **Reprodukovatelnost**

Viz „Poznámky“, část C bod 2.

▼M2

B. STANOVENÍ AFLATOXINU B1 METODOU VYSOKOÚČINNÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE

1. **Účel a rozsah**

Tato metoda slouží ke stanovení aflatoxinu B1 v krmivech včetně takových, která obsahují citrusovou pulpu. Dolní mezní hodnota stanovitelnosti je 0,001 mg/kg (1 ppb).

2. **Princip**

Vzorek se extrahuje chloroformem. Extrakt se filtruje a jeho alikvotní část se čistí na patroně s Florsilem a následně na patroně s C18. Konečného rozdělení a stanovení se dosáhne vysokoúčinnou kapalinou chromatografií (HPLC) s použitím kolony s reverzní fází C18 a s následnou postkolonovou derivatizací vodným roztokem jódu a fluorescenční detekcí.

▼M2

Poznámka:

Mykotoxiny jsou mimořádně toxické látky. Manipulace s nimi by se měla provádět v určených digestořích. Zvláštní opatření je třeba přijmout v případě, kdy toxiny jsou v suchém stavu, protože jsou elektrostatické a mohou se rozptylovat do pracovního prostředí.

3. **Činidla**

3.1. Chloroform, stabilizovaný 0,5–1,0 % ethanolu (hmotnostně). Viz poznámku 10.2.

3.2. Methanol, čistoty HPLC, pro přípravu podle bodu 3.6.

3.3. Aceton

3.4. Acetonitril, čistoty HPLC

3.5. Eluční roztoky – připravují se jeden den před použitím nebo se z nich odstraní vzduch ultrazvukem.

3.5.1. Směs acetonu (3.3) a vody 98 + 2 (v/v)

3.5.2. Směs vody a methanolu (3.2), 80 + 20 (v/v)

3.5.3. Směs vody a acetonu (3.3), 85 + 15 (v/v)

3.6. Mobilní fáze pro HPLC

Směs vody, methanolu (3.2) a acetonitrilu (3.4), 130 + 70 + 40 (v/v/v).

Poznámka: Složení mobilní fáze může být potřeba upravit v závislosti na vlastnostech použité kolony HPLC.

3.7. Nasycený roztok jódu: Do 400 ml vody se přidá 2 g jódu. Míchá se nejméně 90 minut a potom se přefiltruje přes membránový filtr (4.15). Připravený roztok se musí chránit před světlem, aby nedocházelo k fotodegradaci.

3.8. Kyselinou promytý Celit 545 nebo ekvivalentní

3.9. Florisilová patrona (Waters SEP-PAK) nebo ekvivalent

3.10. Patrona s C18 (Waters SEP-PAK) nebo ekvivalent

3.11. Inertní plyn, např. dusík

3.12. Aflatoxin B1, standardní roztok v chloroformu, koncentrace 10 μg/ml Koncentrace roztoku se zkontroluje takto: na spektrofotometru (4.23) se stanoví absorpční spektrum při 330 až 370 nm. Změří se absorbance (A) maxima v oblasti kolem 363 nm. Vypočítá se koncentrace aflatoxinu B1 (X) v mikrogramech na mililitr roztoku podle tohoto vzorce:

$$\text{Koncentrace } (\mu g/ml) = \frac{312 \times A \times 1000}{22\,300} = 13{,}991 \times A$$

3.12.1. Aflatoxin B1, zásobní standardní roztok v chloroformu

Do 50 ml odměrné baňky se kvantitativně převede 2,5 ml standardního roztoku aflatoxinu B1 (3.12) a doplní se po značku chloroformem (3.1). Roztok se skladuje v chladu (4 °C) a temnu v dobře uzavřené nádobě, obalené fólií z hliníku.

3.13. Aflatoxin B1, kalibrační roztoky pro HPLC

Poznámka:

Na přípravu těchto roztoků se používá sklo předem umyté v kyselině (viz odstavec 4, Přístroje)

3.13.1. Kalibrační roztok 4 ng/ml

Odměrná baňka se standardním zásobním roztokem (3.12.1) zabalená ve fólii z hliníku se nechá zahřát na pokojovou teplotu (několik hodin). Do 50 ml odměrné baňky se kvantitativně převede 400 μl standardního zásobního roztoku (200 ng aflatoxinu B1) a rozpouštědlo se odpaří do sucha v proudu inertního plynu.

Zbytek po odpaření se rozpustí v asi 20 ml směsi voda-aceton (3.5.3), doplní se touto směsí po značku a dobře se promíchá.

3.13.2. Kalibrační roztok 3 ng/ml

▼M2

Do 10 ml odměrné baňky se kvantitativně převede 7,5 ml kalibračního roztoku (3.13.1), doplní se směsí voda-aceton (3.5.3) po značku a dobře se promíchá.

3.13.3. Kalibrační roztok 2 ng/ml.

Do 50 ml odměrné baňky se kvantitativně převede 25 ml kalibračního roztoku (3.13.1), doplní se směsí voda-aceton (3.5.3) po značku a dobře se promíchá.

Tímto roztokem se použije jako referenční standard používaný pro opakovaný nástřik během HPLC (5.5.)

3.13.4. Kalibrační roztok 1 ng/ml

Do 10 ml odměrné baňky se kvantitativně převede 2,5 ml kalibračního roztoku (3.13.1), doplní se směsí voda-aceton (3.5.3) po značku a dobře se promíchá.

3.14. Ampule obsahující směs aflatoxinů B1, B2, G1 a G2 v koncentracích přibližně 1, 0,5, 1 a 0,5 μg/ml, v 1 ml chloroformu

3.14.1. Roztok pro chromatografický test

Obsah ampule (3.14) se kvantitativně převede do zkumavky se skleněnou zátkou nebo do lahvičky se šroubovacím uzávěrem. Potom se 40 μl tohoto roztoku kvantitativně převede do zkumavky předem vymyté v kyselině, která má skleněnou zátku (4.22). Chloroform se odpaří v proudu inertního plynu (3.11) a zbytek po odpaření se rozpustí v 10 ml směsi voda-aceton (3.5.3).

3.15. Činidla pro potvrzující test (6)

3.15.1. Chlorid sodný, nasycený roztok

3.15.2. Síran sodný, bezvodý, granulovaný

4. **Přístroje a pomůcky**

Upozornění: Používání skla pro vodné roztoky aflatoxinů, které nebylo umyto v kyselině, může způsobit ztráty. Zvláštní péče musí být věnována novému sklu a sklu na jedno použití, jako jsou např. lahvičky do autosampleru a Pasteurovy pipety. Z tohoto důvodu se laboratorní sklo, které přichází do styku s vodnými roztoky aflatoxinů, ponoří na několik hodin do zředěné kyseliny (např. kyseliny sírové o koncentraci 2 mol/l), potom se dobře opláchne destilovanou vodou, aby se odstranily veškeré zbytky kyseliny (např. třikrát a kontroluje se pH papírkem). V praxi je tento postup nezbytný pro baňky s kulatým dnem (4.4), odměrné baňky, odměrné válce, lahvičky nebo zkumavky používané na kalibrační roztoky a konečné extrakty (zejména lahvičky do autosampleru) a Pasteurovy pipety, pokud se používají pro přelití kalibračních roztoků nebo extraktů.

4.1. Drtič – mixér.

4.2. Síto s oky o velikosti 1,0 mm (ISO R 565)

4.3. Mechanická třepačka

4.4. Rotační vakuová odparka sabaňka s kulatým dnem o objemu 150 až 250 ml

4.5. Vysokoúčinný kapalinový chromatograf, vstřikovací systém se smyčkou vhodnou pro nástřik 250 ml. Viz návod k použití od výrobce pro částečnou nebo úplnou náplň smyčky.

4.6. Analytická kolona pro HPLC: náplň C18 3 μm nebo 5 μm

4.7. Bezpulzní čerpadlo pro jodové postkolonové činidlo

4.8. T-spojka s nulovým mrtvým objemem Valco, korozivzdorná ocel, (1/16 × 0,75 mm)

4.9. Spirálová reakční smyčka; z teflonu nebo korozivzdorné oceli. Rozměry 3000×0,5 mm až 5000×0,5 mm jsou vhodné v kombinaci s HPLC kolonami s náplní 3 μm nebo 5 μm.

4.10. Termostatem řízená vodní lázeň nastavená na 60 °C, schopná regulace teploty v rozmezí ± 0,1 °C.

4.11. Fluorescenční detektor s excitační vlnovou délkou 365 nm a emisní vlnovou délkou 435 nm. (Pro detektory s filtry: emisní vlnová délka >400 nm). Detektor musí být schopný detekce nejméně 0,05 ng aflato-

▼M2

xinu B1. Doporučuje se určitý zpětný tlak (např. restriktor, teflonová nebo nerezová smyčka připojená k výstupu detektoru), aby se potlačily vzduchové bubliny v průtočné kyvetě.

4.12. Zapisovač

4.13. Elektronický integrátor (nepovinné)

4.14. Skládaný filtrační papír o průměru 24 cm, Macherey-Nagel 617 ¼ nebo ekvivalent

4.15. Membránový filtr s póry 0,45 μm, Millipore HAWP 04700 nebo ekvivalent

4.16. Erlenmayerova baňka o objemu 500 ml se zábrusovou zátkou

4.17. Skleněná kolona (vnitřní průměr přibližně 1 cm, délka přibližně 30 cm) se zakončením Luer

4.18. Chloroformu odolný uzavírací kohout Luer (např. Bio-Rad 7328017, Analytichem A1 6078, J.T. Baker 4514) nebo ekvivalent

4.19. Chemicky odolné injekční stříkačky, 10 ml Luer konektor

4.20. Injekční stříkačky vhodné pro dávkování 250 μl do přístroje HPLC (4.5)

4.21. Injekční mikrostříkačky 100 μl na přípravu kalibračních roztoků (zajistí se, aby přesnost byla nejméně 2 % hmotnostní)

4.22. Kalibrované zkumavky o obsahu 10 ml se zábrusovými zátkami

4.23. Spektrofotometr vhodný pro měření v UV oblasti spektra

4.24. Vybavení pro potvrzovací test (6)

4.24.1. Kyselinou vypláchnutá dělicí nálevka o objemu 100 ml s teflonovým uzavíracím kohoutem

4.24.2. Tepelný blok, 40–50 °C

5. **Postup**

5.1. *Příprava vzorku*

Vzorek se rozmělní takovým způsobem, aby prošel sítem (4.2).

5.2. *Zkušební dávka*

Do Erlenmayerovy baňky se naváží 50 g připraveného zkušební vzorku (4.16).

5.3. *Extrakce*

Ke zkušební navážce (5.2) v Erlenmayerově baňce se přidá 25 g Celitu (3.8), 250 ml chloroformu (3.1) a 25 ml vody. Baňka se zazátkuje a třepe se 30 minut na mechanické třepačce (4.3). Přefiltruje se přes skládaný filtrační papír (4.14) a jímá se 50 ml filtrátu. Je-li to nezbytné, odebere se alikvotní část filtrátu a rozředí se do 50 ml chloroformem (3.1), aby koncentrace aflatoxinu B1 nebyla vyšší než 4 ng/ml.

5.4. *Pročištění (postup se musí provést bez významných přerušení)*

Upozornění:

— laboratoř, kde se provádí analýzy, se náležitě chrání před denním světlem. Účinně se toho dosáhne použitím např.:

(i) fólií absorbující UV záření na oknech v kombinaci s tlumeným světlem (ne přímé sluneční světlo),

(ii) záclonami nebo roletami v kombinaci s umělým osvětlením (vhodné jsou zářivky).

— Roztoky obsahující aflatoxiny se musí co nejvíce chránit před světlem (uchovávat v temnu, chránit fólií z hliníku).

5.4.1. Čištění Florisilem SEP-PAK

5.4.1.1. Příprava spojení kolony a patrony

Uzavírací kohout (4.18) se spojí s kratší stopkou Florisilové patrony (3.9) (viz obr. 1). Patrona se promyje a odstraní se z ní vzduch 10 ml chloroformu (3.1) tak, že se 8 ml pomocí injekční stříkačky (4.19) protlačí rychle patronou přes uzavírací kohout. Delší stopka patrony se

▼M2

připojí ke skleněné koloně (4.17) a zbývající 2 ml chloroformu se protlačí přes patronu do kolony. Uzavírací kohout se uzavře. Injekční stříkačka se odpojí.

5.4.1.2. Čištění

Filtrát, který se získá podle odstavce 5.3. se přidá na spojenou kolonu a patronu a nechá se stéci. Kolona s patronou se propláchne 5 ml chloroformu (3.1) a poté 20 ml methanolu (3.2) a spojené eluáty se odstraní. Během těchto úkonů se zajistí, aby kolona s patronou nevyschla.

Aflatoxin B1 se eluuje 40 ml směsi aceton-voda (3.5.1) a celý eluát se jímá do odpařovací baňky rotační odparky (4.4). Na rotační odparce při teplotě 40–50 °C se koncentruje eluát, než se dokončí destilace acetonu. (Pozn.: V baňce zůstane asi 0,5 ml kapaliny. Testy ukázaly, že další odpařování není škodlivé a že pokud zbude asi 0,5 ml kapaliny, již tam není významné množství acetonu. Zbytky acetonu by mohly vést ke ztrátám aflatoxinu B1 na patronce s náplní C18.) Přidá se 1 ml methanolu (3.2), intenzivním mícháním se rozpustí aflatoxin B1 na stěnách baňky, přidají se 4 ml vody a promíchá se. Patrona se sejme a oddělí od kolony. Skleněná kolona se opláchne vodou a použije se pro čištění s C18.

5.4.2. Čištění přes patronu s C18 SEP-PAK

5.4.2.1. Příprava spojení kolony a patrony

Uzavírací kohout (4.18) se spojí s kratší stopkou patrony s C18 (3.10) (viz obr. 1). Patrona se zaplní a odstraní se z ní vzduch rychlým protlačením 10 ml methanolu (3.2) pomocí injekční stříkačky (4.19) přes uzavírací kohout. (Bubliny vzduchu jsou v patroně viditelné jako světlé skvrny na jinak šedavém pozadí.) Nanese se 10 ml vody a 8 ml se nechá volně protéct přes patronu. (Při přechodu methanolu na vodu je třeba vyhnout se pronikání vzduchu do patrony.) Delší stopka patrony se připojí ke skleněné koloně (4.17) a zbývající 2 ml vody se protlačí přes patronu v koloně. Uzavírací kohout se uzavře. Injekční stříkačka se odpojí.

5.4.2.2. Čištění

Extrakt, který se získá podle odstavce 5.4.1.2, se kvantitativně převede do skleněné kolony (4.17), přičemž odpařovací baňka se dvakrát vypláchne 5 ml směsi voda-methanol (3.5.2), a nechá se stéci. Během těchto úkonů se zajistí, aby kolona s patronou nevyschla. (Pokud se vytvoří vzduchové bubliny v zúžení blízko patrony, zastaví se průtok a poklepáváním na skleněnou kolonu se vzduchové bubliny odstraní. Poté se pokračuje.) Kolona s patronou se dále promyjí 25 ml směsi voda-methanol (3.5.2), eluát se vylije. Aflatoxin B1 se eluuje 50 ml směsi voda-aceton (3.5.3.) a celý eluát se jímá do 50 ml odměrné baňky. Baňka se doplní vodou po značku a promíchá se. Výsledný roztok se použije k chromatografii.

Upozornění: *Obvykle není filtrace kone*čného extraktu před HPLC nutná. Pokud je považována za nutnou, nesmí se používat celulózový filtr, protože by to mohlo vést ke ztrátám aflatoxinu B1. Vhodný je teflonový filtr.

5.5. *Vysokoúčinná kapalinová chromatografie*

(viz obrázek 2 pro sestavení zařízení.) Poskytne se dostatek času pro kondicionování a stabilizování přístrojů.

Poznámka 1:

Rychlost průtoku mobilní fáze a postkolonového činidla je pouze informativní. Může se upravit podle vlastností kolony HPLC.

Poznámka 2:

Odezva detektoru na aflatoxin B1 závisí na teplotě, proto je třeba vyrovnat posun (viz obr. 3). Pravidelným (např. každý třetí vstřik) nástřikem stanoveného množství referenčního standardu aflatoxinu B1 (3.13.3) lze napravit vrcholové hodnoty aflatoxinu B1 mezi těmito referenčními standardy použitím střední hodnoty odezvy za předpokladu, že rozdíl mezi dvěma odezvami po sobě následujících referenčních standardů je velmi malý (<10 %). Proto je nutné provádět nástřik bez přerušení. Pokud je nutné přerušení, poslední a první nástřik před přerušením musí být referenční standard (3.13.3). Protože kalibrační křivka je lineární a prochází počátkem, je možné přímo stanovit obsah aflatoxinu B1 v extraktu vzorku s ohledem na přilehlý standard.

▼M2

5.5.1. Nastavení čerpadla HPLC

Čerpadlo přístroje HPLC (4.5) se nastaví tak, aby průtok mobilní fáze (3.6) pro HPLC kolonu (4.6) s náplní 5 μm byl 0,5 ml/min a s náplní 3 μm byl 0,3 ml/min.

5.5.2. Nastavení postkolonového čerpadla

Čerpadlo (4.7) se nastaví tak, aby průtok nasyceného vodného roztoku jódu (3.7) byl 0,2 až 0,4 ml/min. Jako hrubé vodítko: průtok nastavený na 0,4 ml/min je žádoucí v kombinaci s průtokem mobilní fáze (3.6) 0,5 ml/min a průtok 0,2 ml/min pro průtok mobilní fáze 0,3 ml/min.

5.5.3. Fluorescenční detektor

Fluorescenční detektor (4.11) se nastaví na excitační vlnovou délku 365 nm a emisní délku 435 nm (přístroje s filtry > 400 nm). Citlivost detektoru pro 1 ng aflatoxinu B1 se nastaví asi na 80 % celkového rozsahu stupnice pera.

5.5.4. Vstřikovací systém

Pro všechny roztoky se nastřikuje množství 250 μl podle návodu k použití od výrobce vstřikovacího systému.

5.5.5. Kontrola chromatografické separace

Provede se nástřik roztoku pro chromatografický test (3.14.1). Sedla by měla být méně než 5 % součtu výšek píků přilehlých píků.

5.5.6. Kontrola stability systému

Před každým souborem analýz se opakovaně nastřikuje referenční standard (3.13.3), dokud se nezískají stabilní plochy píků. (Pozn.: Odezva aflatoxinu B1 mezi po sobě následujícími vstřiky se nesmí lišit o více než 6 %). Po kontrole stability systému se bezodkladně provede kontrola linearity (5.5.7).

5.5.7. Kontrola linearity

Provede se nástřik kalibračních roztoků aflatoxinu B1 (3.13.1 až 3.13.4). Po každém třetím nástřiku se dávkuje referenční standard (3.13.3) pro nápravu posunu v odezvě. (Pozn.: Rozdíl mezi odezvami referenčních standardů se v průběhu 90 minut nesmí lišit o více než 10 %). Posun se napraví podle vzorce v odstavci 7. Kalibrační graf by měl být lineární a procházet počátkem v rozsahu dvojnásobné směrodatné chyby odhadu Y. Zjištěné hodnoty se nesmí lišit o více než 3 % nominální hodnoty. Pokud jsou splněny tyto podmínky, pokračuje se bezodkladně. Pokud tomu tak není, než se pokračuje, musí se určit a napravit zdroje problému.

5.5.8. Nástřik extraktu vzorku

Provede se nástřik přečištěného extraktu (5.4.2.2). Vždy po dvou vzorcích se provede nástřik referenčního standardu (3.13.3) podle následujícího pořadí: referenční standard – extrakt – extrakt – referenční standard – extrakt – extrakt – referenční standard atd.

6. **Potvrzující test**

6.1. *Další postup s extraktem*

Ke konečnému extraktu získanému podle odstavce 5.4.2.2 se přidá 5 ml roztoku chloridu sodného (3.15.1). Extrahují se třikrát 2 ml chloroformu (3.1) v dělicí nálevce (4.24.1) po dobu 1 minuty. Spojené chloroformové extrakty se převedou přes asi 1 g síranu sodného (3.15.2) do 10 ml zkumavky. Může být použita např. malá dělicí nálevka (o průměru 4 cm) s kouskem vaty v zúžení, pokrytým síranem sodným.

Vrstva síranu sodného se propláchne několika ml chloroformu a eluát se jímá do stejné zkumavky. Chloroformový extrakt se odpaří do sucha v té samé zkumavce za použití tepelného bloku (4.24.2) a znovu se rozpustí v 1 ml chloroformu.

6.2. *Příprava derivátů a chromatografie na tenké vrstvě*

Viz metoda A v příloze směrnice Rady 76/372/EHS bod 5.6.2.

▼M2

7. **Výpočet výsledků**

Obsah aflatoxinu B1 (μg/kg) vzorku se vypočte podle následujícího vzorce:

$$\text{aflatoxin B1 } (\mu g/kg) = \frac{m \times V_{ext}}{V_m \times M \times \frac{V_f}{V_c}}$$

kde:

m = množství aflatoxinu B1 v ng, vypočtené z píku aflatoxinu B1 ve vzorku vypočtené takto:

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

$P_{(vs)}$ = plocha píku aflatoxinu B1 ve vzorku

$P(st_1)$ = plocha píku aflatoxinu B1 získaná předchozím nástřikem referenčního standardu (3.13.3)

$P(st_2)$ = plocha píku aflatoxinu B1 získaná následným nástřikem referenčního standardu (3.13.3)

r(st) = množství aflatoxinu B1 ve vstřiku referenčního standardu (3.13.3) v ng

V_m = objem nástřiku extraktu vzorku v mililitrech

V_k = konečný objem extraktu vzorku v mililitrech (po všech zředěních, která byla provedena podle odstavce 5.3)

M = hmotnost vzorku v gramech

V_f = objem filtrátu převedeného na patronu s Florisilem (5.4.1.2) v mililitrech

V_c = objem chloroformu použitého k extrakci vzorku v mililitrech

Pokud je dodržen postup, změní se vzorec takto:

aflatoxin B1 (μg/kg) = 20 × m

7.1. Výpočty výsledků mohou být také provedeny z výšek píků.

8. **Opakovatelnost**

Viz odstavec 10.1.

9. **Reprodukovatelnost**

Viz odstavec 10.1.

10. **Poznámky**

10.1. *Přesnost*

Na mezinárodní úrovni byla provedena společná studie ([1]) pro krmné směsi, jejíž výsledky opakovatelnosti a reprodukovatelnosti jsou uvedeny v tabulce 1. Výraz opakovatelnost (r) je zde definován jako největší poměr, který není významný na úrovni pravděpodobnosti 95 % pro porovnání dvou měřených údajů stejného vzorku v téže laboratoři a za podobných podmínek. Výraz reprodukovatelnost (R) je zde definován podobně pro porovnání dvou různých laboratoří. V souladu s normou ISO ([2]) a s rozhodnutím Komise 89/610/EHS ([3]) jsou hodnoty r a R v tabulce uváděny také v podobě variačního koeficientu.

([1]) Egmond, H. P. van, Heisterkamp, S. H. a Paulsch, W. E. (1991). Food Additives and Contaminants 8, 17-29.
([2]) ISO 3534–1977.
([3]) Úř. věst. L 351, 2.12. 1989, s. 39.

▼**M2**

Tabulka 1

Opakovatelnost (r) a reprodukovatelnost (R) vyjádřené jako poměr odpovídajících variačních koeficientů

(15 laboratoří)

Koncentrace	r	R	CVr (*)	CVR
(μg/kg)			(%)	(%)
8 a 14	1,4	1,7	11	18

(*) CV = variační koeficient

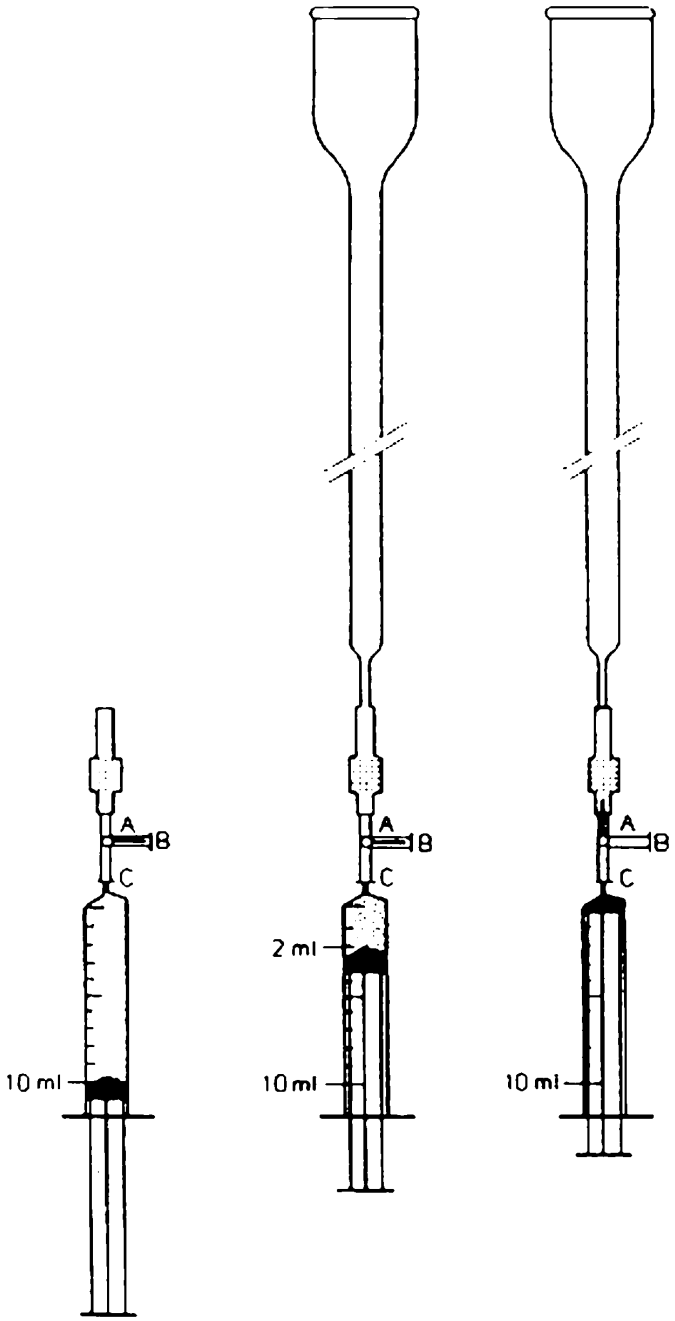
10.2. *Stabilizace chloroformu (3.1)*

Pokud se ke stabilizaci chloroformu používá jiný stabilizátor než ethanol, může docházet ke změně adsorpční charakteristiky florisilové patrony. Pokud není popsaný chloroform dostupný, musí se to ověřit v souladu s odstavcem 10.3.

10.3. *Správnost*

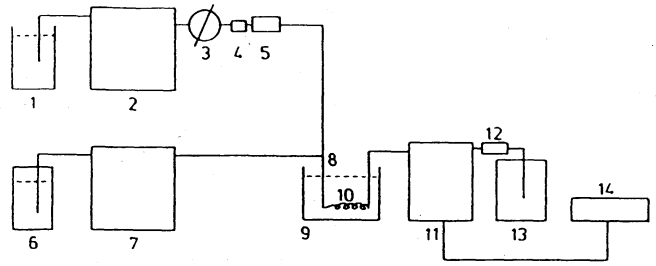
Správné použití metody se ověřuje opakovanými měřeními schválených referenčních materiálů. Pokud nejsou k dispozici, provedení metody se ověřuje testem výtěžnosti na fortifikovaných slepých vzorcích. Standardní odchylka od skutečné hodnoty vyjádřená v % skutečné hodnoty musí být v rozmezí –20 až +10 %.

▼**M2**



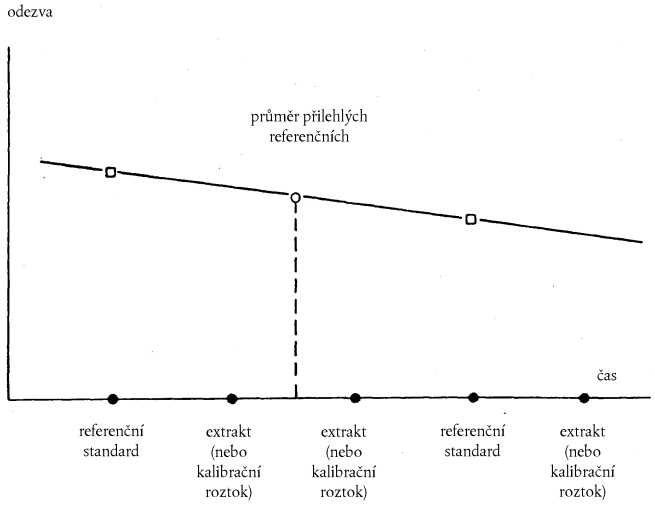
Obr. 1: Propojení kolony a patrony

▼**M2**



1. Mobilní fáze
2. Čerpadlo
3. Vstřikovací ventil
4. Ochranná kolona
5. Analytická kolona HPLC
6. Nasycený roztok jódu
7. Čerpadlo činidla
8. T-spojka
9. Termostatem řízená lázeň
10. Spirálová reakční smyčka
11. Fluorescenční detektor
12. Restriktor
13. Odpad
14. Zapisovač

Obr. 2: Zpracovatelské schéma systému HPLC s postkolonovou derivatizací jódem



Obr. 3: Kompenzace posunu odezvy aflatoxinu B1 pravidelným nástřikem referenčního standardu (3.13.3)

▼**M3**

C. POZNÁMKY TÝKAJÍCÍ SE METOD A A B

1. **Odtučnění**

   Vzorky obsahující více než 5 % tuků musí být odtučněny petroletherem (bod varu 40 – 60 °C) po přípravách uvedených v 5.1.

   V takových případech musí být výsledky analýzy vyjádřeny na hmotnost původního neodtučněného vzorku.

2. **Reprodukovatelnost výsledků u metody A**

   Reprodukovatelnost výsledků, tj. odchylky mezi výsledky získanými dvěma nebo více laboratořemi u téhož vzorku, byla vyhodnocena takto:

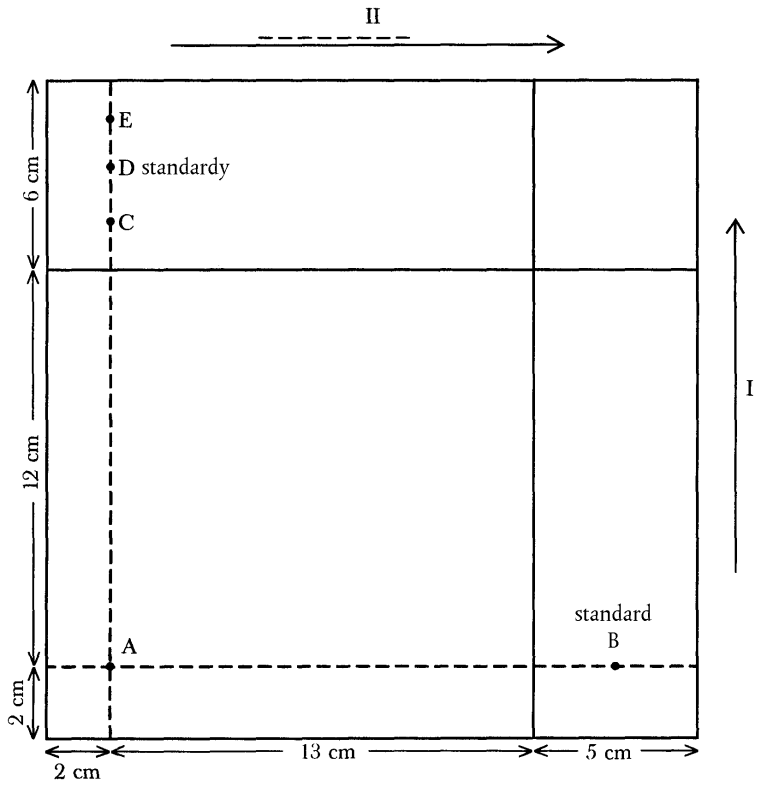
   ± 50 % střední hodnoty výsledků pro střední hodnoty aflatoxinu B_1, od 10 do 20 µg/kg;

   ± 10 µg/kg na základě střední hodnoty pro střední hodnoty od 20 do 50 µg/kg;

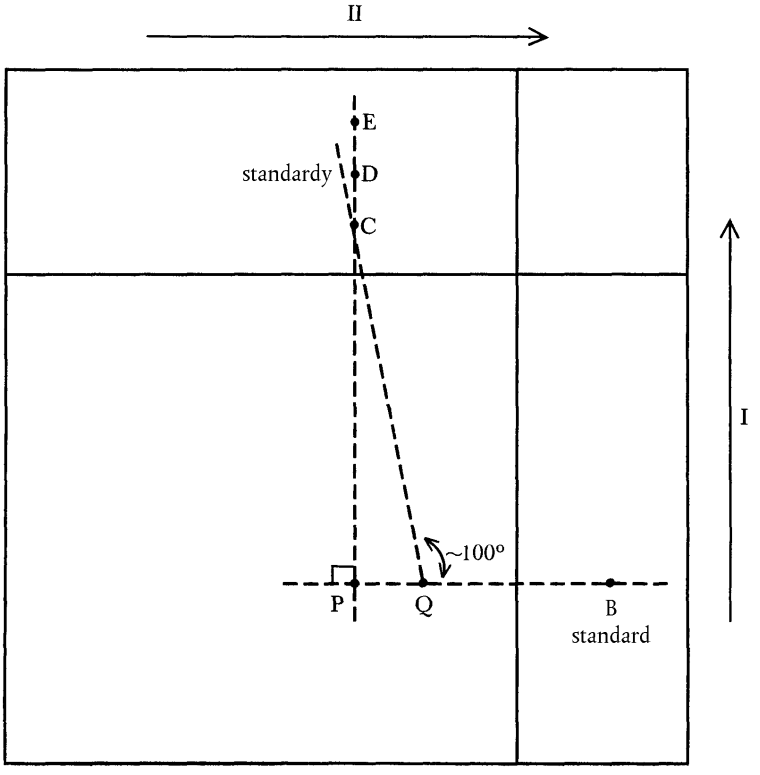
   ± 20 % střední hodnoty pro střední hodnoty nad 50 µg/kg.

▼B

Dodatek k příloze

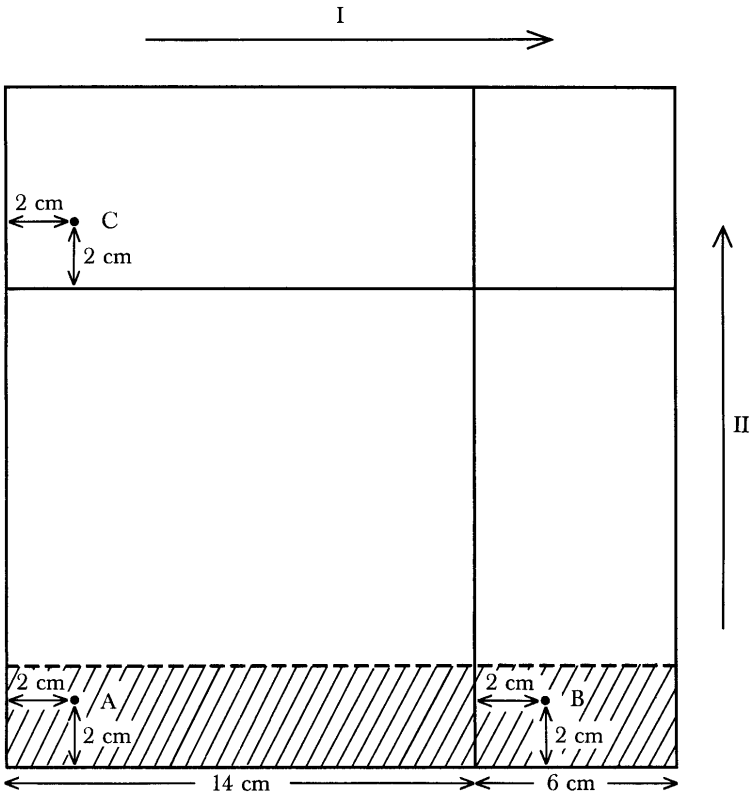


Obrázek 1



Obrázek 2

▼**B**



Obrázek 3