Acest document reprezintă un instrument de documentare, iar instituțiile nu își asumă responsabilitatea pentru conținutul său.

►**B**

A ȘAPTEA DIRECTIVĂ A COMISIEI

din 1 martie 1976

de stabilire a metodelor comunitare de analiză pentru controlul oficial al furajelor

(76/372/CEE)

(JO L 102, 15.4.1976, p. 8)

Astfel cum a fost modificată prin:

		Jurnalul Oficial		
		NR.	Pagina	Data
►**M1**	Directiva Comisiei din 30 iulie 1981	L 246	32	29.8.1981
►**M2**	Directiva 92/95/CEE a Comisiei din 9 noiembrie 1992	L 327	54	13.11.1992
►**M3**	Directiva 94/14/CE a Comisiei din 29 martie 1994	L 94	30	13.4.1994

▼B

A ȘAPTEA DIRECTIVĂ A COMISIEI

din 1 martie 1976

de stabilire a metodelor comunitare de analiză pentru controlul oficial al furajelor

(76/372/CEE)

COMISIA COMUNITĂȚILOR EUROPENE,

având în vedere Tratatul de instituire a Comunității Economice Europene,

având în vedere Directiva Consiliului din 20 iulie 1970 cu privire la introducerea modalităților de prelevare a probelor și a metodelor comunitare de analiză pentru controlul oficial al furajelor ([1]), modificată ultima dată de actul de aderare ([2]), în special articolul 2,

întrucât prezenta directivă impune efectuarea controlului oficial al furajelor cu ajutorul modalităților de prelevare de probe și a metodelor comunitare de analiză în scopul verificării aducerii la îndeplinire a cerințelor care decurg din dispozițiilor stabilite prin lege, regulament sau acțiune administrativă privind calitatea și compoziția furajelor;

întrucât Directivele 71/250/CEE din 15 iunie 1971 ([3]), 71/393/CEE din 18 noiembrie 1971 ([4]), 72/199/CEE din 27 aprilie 1972 ([5]), 73/46/CEE din 5 decembrie 1972 ([6]), 74/203/CEE din 25 martie 1974 ([7]) și 75/84/CEE din 20 decembrie 1974 ale Comisiei ([8]) au stabilit deja un număr de metode comunitare de analiză; întrucât progresul înregistrat până acum recomandă adoptarea unui al șaptelea set de metode;

întrucât măsurile prevăzute în prezenta directivă sunt conforme cu avizul Comitetului permanent pentru furaje,

ADOPTĂ PREZENTA DIRECTIVĂ:

Articolul 1

Statele membre solicită ca analizele pentru controlul oficial al furajelor, referitoare la conținutul de aflatoxină B_1, să se efectueze în conformitate cu metodele descrise în anexa la prezenta directivă.

▼M1

———————

▼B

Articolul 2

Statele membre pun în aplicare actele cu putere de lege și actele administrative necesare pentru a se conforma prezentei directive până la 1 octombrie 1976. Ele notifică de îndată Comisia cu privire la aceasta.

Articolul 3

Prezenta directivă se adresează statelor membre.

———————

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

▼B

ANEXĂ

DETERMINAREA AFLATOXINEI B_1

A. METODA CROMATOGRAFIEI UNIDIMENSIONALE ÎN STRAT SUBȚIRE

▼M2

1. **Obiectiv și domeniu de aplicare**

Metoda permite determinarea nivelului de aflatoxină B_1 din materiile prime și furajele simple. Această metodă nu se poate aplica în prezența pulpei de citrice. Limita inferioară de determinare este de 0,01 mg/kg (10 ppb).

În prezența substanțelor interferente, este necesar să se repete analiza folosind metoda B (cromatografie lichidă de înaltă performanță).

▼B

2. **Principiu**

Proba este supusă extracției cu cloroform. Extractul este filtrat iar o parte alicotă este prelevată și purificată prin cromatografie în coloană, pe gel de siliciu. Eluatul este evaporat și reziduul redizolvat într-un volum specific de cloroform sau de amestec de benzen și acetonitril. O parte alicotă din soluție este supusă cromatografiei în strat subțire (TLC). Cantitatea de aflatoxină B_1 este determinată în urma iradierii cu UV a cromatogramei, fie vizual, fie prin fluorodensitometrie, prin comparație cu cantități cunoscute de aflatoxină B_1 standard. Identitatea aflatoxinei B_1 extrase din furaje trebuie confirmată prin procedura indicată.

3. **Reactivi**

NB: Toți reactivii trebuie să aibă calitatea de „reactiv analitic”, dacă nu este specificat altfel.

3.1. Acetonă.

3.2. Cloroform, stabilizat cu 0,5 până la 1,0 % etanol 96 % (v/v).

3.3. N-hexan.

3.4. Metanol.

3.5. Eter etilic anhidru, liber de peroxizi.

3.6. Amestec de benzen și acetonitril: 98/2 (v/v).

3.7. Amestec de cloroform (3.2) și metanol (3.4): 97/3 (v/v).

3.8. Gel de siliciu pentru cromatografie în coloană, dimensiunea particulelor 0,05 până la 0,20 mm.

3.9. Vată absorbantă degresată în prealabil cu cloroform sau vată de sticlă.

3.10. Sulfat de sodiu anhidru, granular.

3.11. Gaz inert, de exemplu azot.

3.12. Acid clorhidric 1 N.

3.13. Acid sulfuric 50 % (v/v).

3.14. Kieselguhr (hyflosupercel), spălat în acid.

3.15. Gel de siliciu G-HR sau un echivalent, pentru TLC.

3.16. Soluție standard cu aproximativ 0,1 µg/ml aflatoxină B_1 în cloroform (3.2) sau amestec de benzen/acetonitril (3.6), preparat și verificat conform indicațiilor din secțiunea 7.

3.17. Soluție standard pentru teste calitative, conținând aproximativ 0,1 µg/ml aflatoxină B_1 și B_2 în cloroform (3.2) sau amestec de benzen/acetonitril (3.6). Aceste concentrații sunt orientative. Ele se vor ajusta astfel încât să se obțină aceeași intensitate a fluorescenței pentru ambele aflatoxine.

3.18. Solvenți de developare:

▼B

3.18.1. Cloroform (3.2)/acetonă (3.1): 9/1 (v/v), rezervor nesaturat;

3.18.2. Eter etilic (3.5)/metanol (3.4)/apă: 96/3/1 (v/v/v), rezervor nesaturat;

3.18.3. Eter etilic (3.5)/metanol (3.4)/apă: 94/4,5/1,5 (v/v/v), rezervor saturat;

3.18.4. Cloroform (3.2)/metanol (3.4): 94/6 (v/v), rezervor saturat;

3.18.5. Cloroform (3.2)/metanol (3.4): 97/3 (v/v), rezervor saturat.

4. **Aparatură**

4.1. Mixer cu mecanism de mărunțire.

4.2. Agitator sau amestecător magnetic.

4.3. Hârtie de filtru plisată, Schleicher și Schüll nr. 588 sau un echivalent, diametru: 24 cm.

4.4. Tuburi cromatografice din sticlă (diametru intern: 22 mm, lungime: 300 mm), cu robinet PTFE și rezervor de 250 ml.

4.5. Evaporator rotativ cu vid, cu balon cu fund rotund de 500 ml.

4.6. Vase conice de 500 ml, cu dopuri din sticlă șlefuită.

4.7. Aparat TLC.

4.8. Plăci de sticlă pentru TLC, 200 × 200 mm, pregătite după cum urmează (cantitățile indicate sunt suficiente pentru a acoperi cinci plăci). Se pun 30 g gel de siliciu G-HR (3.15) într-un vas conic. Se adaugă 60 ml apă, se pune dopul și se agită timp de un minut. Se întinde suspensia pe plăci astfel încât să se obțină un strat uniform de 0,25 mm grosime. Se lasă să se usuce la aer și apoi se pune într-un desicator ce conține gel de siliciu. În momentul folosirii, plăcile se activează prin menținerea în cuptor la 110 °C timp de o oră.

Plăcile gata preparate sunt corespunzătoare dacă rezultatele obținute sunt similare cu cele obținute cu plăcile preparate după cum este indicat anterior.

4.9. Lampă UV cu lungimi mari de undă (360 nm). Intensitatea iradierii trebuie să permită distingerea clară a unui spot de 1 ng de aflatoxină B_1 pe o placă TLC, la o distanță de 10 cm de lampă.

4.10. Eprubete gradate de 10 ml prevăzute cu dopuri de polietilenă.

4.11. Spectrofotometru UV.

4.12. Fluorodensimetru (opțional).

5. **Procedură**

5.1. *Prepararea probei* (a se vedea „Observații”, partea C, punctul 1).

Se mărunțește proba astfel încât să poată trece în întregime printr-o sită cu ochi de 1 mm (în conformitate cu recomandarea ISO R 565).

5.2. *Extracția*

Se pun 50 g de probă mărunțită omogenizată într-un vas conic de 500 ml (4.6). Se adaugă 25 g de Kieselguhr (3.14), 25 ml apă și 250 ml cloroform (3.2). Se pune dopul, se agită sau se amestecă timp de 30 minute cu aparatul (4.2.) și se filtrează printr-o hârtie de filtru plisată (4.3). Se îndepărtează primii 10 ml ai filtratului și apoi se colectează 50 ml.

5.3. *Curățarea coloanei*

Se introduce un tampon de vată sau de vată de sticlă (3.9) la capătul inferior al tubului cromatografic (4.4), se umplu două treimi ale tubului cu cloroform (3.2) și se adaugă 5 g sulfat de sodiu (3.10).

Se verifică dacă suprafața superioară a stratului de sulfat de sodiu este netedă, apoi se adaugă 10 g gel de siliciu (3.8) în cantități mici. Se amestecă cu grijă după fiecare adăugare pentru a elimina bulele de aer. Se lasă deoparte timp de 15 minute, apoi se adaugă cu grijă 15 g de sulfat de sodiu (3.10). Se lasă lichidul să se scurgă până când ajunge chiar deasupra suprafeței superioare a stratului de sulfat de sodiu.

▼B

Se amestecă cei 50 ml de extract obținut la 5.2 cu 100 ml de n-hexan (3.3) și se transferă amestecul în coloană. Se lasă lichidul să se scurgă până când ajunge exact deasupra stratului superior de sulfat de sodiu. Se elimină soluția astfel obținută. Apoi se adaugă 100 ml eter etilic (3.5) și iar se lasă să se scurgă până la nivelul suprafeței superioare a stratului de sulfat de sodiu. În timpul acestor operații se urmărește ca debitul să fie de 8-12 ml pe minut și se evită uscarea coloanei. Se îndepărtează lichidul care se scurge. Apoi se eluează cu 150 ml din amestecul cloroform/metanol (3.7) și se colectează întregul eluat.

Acesta se evaporă aproape până la uscare la o temperatură care să nu depășească 50 °C, sub un curent de gaz inert (3.11), în evaporatorul rotativ (4.5). Se transferă reziduul, folosindu-se cloroform (3.2) sau amestec benzen/acetonitril (3.6), într-o eprubetă gradată de 10 ml (4.10). Se concentrează soluția sub un curent de gaz inert (3.11) și apoi se ajustează volumul până la 2 ml cu cloroform (3.2) sau cu amestec benzen/acetonitril (3.6).

5.4. *Cromatografia în strat subțire*

Se pun pe placa TLC (4.8), la 2 cm de marginea inferioară și la intervale de câte 2 cm, volumele din soluția standard și din extract indicate în continuare:

— 10, 15, 20, 30 și 40 µl din soluția standard de aflatoxină B_1 (3.16);

— 10 µl din extractul obținut la 5.3 și, *suprapus în același punct,* 20 µl din soluția standard (3.16);

— 10 și 20 µl din extractul obținut la 5.3.

Se developează cromatograma la întuneric folosind unul din solvenții de developare (3.18). Alegerea acestuia trebuie făcută în prealabil, prin depunerea a 25 µl din soluția standard calitativă (3.17) pe placă și verificarea separării complete la developare a aflatoxinelor B_1 și B_2.

Se lasă solvenții să se evapore la întuneric, apoi se iradiază cu UV, punându-se placa la 10 cm de lampă (4.9). Spoturile de aflatoxină B_1 dau o fluorescență albastră.

5.5. *Determinări cantitative*

Se realizează fie vizual, fie prin fluorodensitometrie, în conformitate cu indicațiile menționate în continuare.

5.5.1. Măsurători vizuale

Se determină cantitatea de aflatoxină B_1 din extract prin compararea intensității fluorescenței spoturilor de extract cu cea a spoturilor de soluție standard. Dacă este necesar se interpolează. Fluorescența obținută prin suprapunerea extractului pe soluția standard trebuie să fie mai intensă decât cea a 10 µl din extract și trebuie să existe mai mult de un spot vizibil. Dacă intensitatea fluorescenței dată de cei 10 µl de extract este mai mare decât cea dată de 40 µl de soluție standard, se diluează extractul de 10 sau 100 de ori cu cloroform (3.2) sau cu amestec benzen/acetonitril (3.6) înainte de a-l supune din nou cromatografiei în strat subțire.

5.5.2. Măsurători prin fluorodensitometrie

Se măsoară intensitatea fluorescenței spoturilor de aflatoxină B_1 cu ajutorul fluorodensitometrului (4.12) la o lungime de undă de sensibilizare de 365 nm și la o lungime de undă de emisie de 443 nm. Se determină cantitatea de aflatoxină B_1 din spoturile de extract prin compararea intensității fluorescenței lor cu cea a spoturilor de aflatoxină B_1 standard.

5.6. *Confirmarea identității aflatoxinei B_1*

Se confirmă identitatea aflatoxinei B_1 din extract prin procesele arătate în continuare.

5.6.1. Tratarea cu acid sulfuric

Se pulverizează acid sulfuric (3.13) pe cromatograma obținută la 5.4. Fluorescența spoturilor de aflatoxină B_1 trebuie să se schimbe din albastru în galben în urma iradierii cu UV.

▼B

5.6.2. Cromatografie bidimensională implicând formarea hemiacetalului de aflatoxină B_1 (aflatoxină B_{2a})

NB: Operațiile descrise în continuare trebuie efectuate urmărindu-se cu atenție diagrama din figura 3.

5.6.2.1. Aplicarea soluțiilor

Se trasează două linii drepte pe placa TLC (4.8), paralele cu cele două margini apropiate (la 6 cm de fiecare margine) pentru a limita migrarea fronturilor de solvent. Se pun pe placă spoturi din următoarele soluții folosindu-se pipete capilare sau microseringi:

— *în punctul A:* un volum din extractul de eșantion purificat obținut la 5.3, care conține aproximativ 2,5 nm de aflatoxină B_1;

— *în punctele B și C:* 25 µl din soluția standard (3.16).

5.6.2.2. Developare

Se developează cromatograma în direcția I, la întuneric, folosindu-se solvent de developare (3.18.1) (strat de 1 cm într-un rezervor nesaturat) până când frontul de solvent ajunge la linia de limitare a acestuia.

Se îndepărtează placa din rezervor și se lasă să se usuce la întuneric, la temperatura camerei, timp de 5 minute. Apoi se pulverizează acid clorhidric (3.12) de-a lungul unei benzi de 2,5 cm înălțime, acoperind, până la închiderea culorii, punctele A și B (indicate în figura 3 prin zona haşurată), protejând restul plăcii cu un strat de sticlă. Se lasă să reacționeze timp de 10 minute la întuneric și se usucă cu un curent de aer la temperatura camerei.

În continuare, se developează cromatograma în direcția II, la întuneric, folosindu-se solvent de developare (3.18.1) (strat de 1 cm într-un rezervor nesaturat) până când frontul de solvent ajunge la linia de limitare a acestuia. Se scoate placa din rezervor și se lasă la uscat la temperatura camerei.

5.6.2.3. Interpretarea cromatogramei

Se examinează cromatograma în lumină UV (4.9) și se verifică următoarele.

(a) Apariția unui spot fluorescent albastru de aflatoxină B_1, provenită din soluția standard aplicată în punctul C (migrare în direcția I).

(b) Apariția unui spot fluorescent albastru de aflatoxină B_1 care nu a reacționat (cu acidul clorhidric) și a unui spot fluorescent albastru mai intens de hemiacetal de aflatoxină B_1, ambele provenite din soluția standard aplicată în punctul B (migrare în direcția II).

(c) Apariția unor spoturi similare celor de la punctul (b), provenite din extractul de eșantion aplicat în punctul A. Poziția acestor spoturi se definește mai întâi prin distanța de migrare a aflatoxinei B_1 din punctul A în direcția I (aceeași cu distanța parcursă de soluția standard aplicată în punctul C, și apoi prin distanțele de migrare de acolo în direcția II a aflatoxinei B_1-hemiacetal (aceleași cu distanțele parcurse de soluția standard aplicată în punctul B. Intensitățile fluorescenței spoturilor de hemiacetal provenite din extract și din soluția standard aplicată în B trebuie să fie aceleași.

6. **Calcularea rezultatelor**

6.1. *Pe baza măsurătorilor vizuale*

Conținutul de aflatoxină B_1 în micrograme per kg de probă (ppb) este dat de formula:

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

unde:

Y și X reprezintă volumele în microlitri din soluția standard de aflatoxină B_1 (3.16), respectiv din extract, având o intensitate a fluorescenței similară;

▼B

S = concentrația în micrograme de aflatoxină B_1 pe ml de soluție standard (3.16);

V = volumul final de extract, în microlitri, care permite orice diluție necesară;

W = greutatea în grame a eșantionului, corespunzătoare volumului de extract supus procesului de curățare a coloanei.

6.2. *Pe baza măsurătorilor fluorodensimetrice*

Conținutul în micrograme de aflatoxină B_1 pe kg de eșantion este dat de formula:

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

unde:

Y = volumul, în microlitri, de extract aplicat pe placă (10 sau 20 µl);

S = cantitatea, în nanograme, de aflatoxină B_1 din spotul de extract (proporțională cu valoarea Y), obținută în urma măsurătorilor;

V = volumul final de extract, în microlitri, care permite orice diluție necesară;

W = greutatea, în grame, a eșantionului, corespunzătoare volumului de extract implicat în procesul de curățare a coloanei.

7. **Prepararea și testarea soluției standard (3.16)**

7.1. *Determinarea concentrației de aflatoxină* B_1

Se prepară o soluție standard de aflatoxină B_1 în cloroform (3.2) sau în amestec benzen/acetonitril (3.6), cu concentrația de 8-10 µg/ml. Se determină spectrul de absorbție între 330 și 370 nm cu ajutorul spectrofotometrului (4.11).

Se măsoară densitatea optică (A) la 363 nm în cazul soluției cu cloroform sau la 348 nm în cazul soluției din amestecul de benzen/acetonitril.

Se calculează concentrația în micrograme de aflatoxină B_1 pe ml de soluție din formulele menționate în continuare:

$\frac{312 \cdot A \cdot 1000}{20600}$ pentru soluția cu cloroform;

$\frac{312 \cdot A \cdot 1000}{19800}$ pentru soluția din amestecul de benzen/acetonitril.

Se diluează corespunzător, fără expunere la lumina soarelui, pentru a obține o soluție standard de lucru, cu concentrația de aflatoxină B_1 de aproximativ 0,1 µg/ml. Dacă se păstrează la frigider la 4 °C, această soluție rămâne stabilă timp de două săptămâni.

7.2. *Testarea purității cromatografice*

Se pun pe placa TLC (4.8) 5 µl din soluția standard de aflatoxină B_1, conținând 8-10 µg/ml (7.1). Se developează cromatograma conform indicațiilor de la 5.4. În lumină UV, cromatograma ar trebui să prezinte un singur spot, fără ca vreo fluorescență să fie detectabilă la nivelul zonei originale de depunere.

8. **Repetabilitate**

Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele efectuate pe aceeași probă, de către același analist, nu trebuie să depășească:

— 25 %, raportat la cel mai mare conținut de aflatoxină B_1, între 10 și 20 µg/kg;

▼B

— 5 µg, în valoare absolută, pentru un conținut de peste 20 și până la 50 µg/kg;

— 10 %, raportat la cea mai mare valoare pentru un conținut peste 50 µg/kg.

9. **Reproductibilitate**

A se vedea la „Observații”, partea C, punctul 2.

▼M2

B. DETERMINAREA AFLATOXINEI B_1. METODA CROMATOGRAFIEI LICHIDE DE ÎNALTĂ PERFORMANȚĂ

1. **Obiectiv și domeniu de aplicare**

Prezenta metodă permite determinarea aflatoxinei B_1 din furaje, inclusiv din cele care conțin pulpă de citrice. Limita inferioară de determinare este de 0,001 mg/kg (1 ppb).

2. **Principiu**

Eșantionul se extrage cu cloroform. Se filtrează extrasul, iar o parte alicotă se purifică pe un cartuș de Florisil, apoi pe un cartuș C_{18}. Separarea finală și determinarea se realizează prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (CLIP), folosind o coloană C_{18} în fază inversă, urmată de derivatizare postcoloană cu iod în apă și detecție fluorimetrică.

Notă: Micotoxinele sunt substanțe extrem de toxice. Acestea trebuie manipulate sub o hotă ventilată. Trebuie să se ia măsuri speciale de precauție atunci când toxinele sunt în stare uscată, din cauza naturii lor electrostatice și, ca urmare, a tendinței de a se dispersa în zonele de lucru.

3. **Reactivi**

3.1. Cloroform, stabilizat cu 0,5-1,0 % etanol, în masă. A se vedea observația de la punctul 10.2.

3.2. Metanol, calitate CLIP pentru prepararea 3.6.

3.3. Acetonă.

3.4. Acetonitril, calitate CLIP.

3.5. Solvenți de eluare: se prepară cu o zi înainte de utilizare sau se elimină aerul din solvenți cu ajutorul ultrasunetelor.

3.5.1. Amestec de acetonă (3.3) și apă, 98 + 2 (v + v).

3.5.2. Amestec de apă și metanol (3.2), 80 + 20 (v + v).

3.5.3. Amestec de apă și acetonă (3.3), 85 + 15 (v + v).

3.6. Fază mobilă pentru CLIP.

Amestec de apă, metanol (3.2) și acetonitril (3.4), 130 + 70 + 40 (v + v + v).

N.B. Compoziția solventului de fază mobilă poate fi modificată, în funcție de caracteristicile coloanei CLIP folosite.

3.7. Soluție de iod saturată: se adaugă 2 g de iod la 400 ml apă. Se amestecă cel puțin 90 minute și se filtrează printr-o membrană filtrantă (4.15). Se protejează soluția saturată de lumină pentru a evita fotodegradarea.

3.8. Celite 545 spălat cu acid, sau echivalent.

3.9. Cartuș de Florisil (Waters SEP-PAK), sau echivalent.

3.10. Cartuș C_{18} (Waters SEP-PAK), sau echivalent.

3.11. Gaz inert, de exemplu azot.

3.12. Soluție etalon de aflatoxină B_1 în cloroform, concentrație 10 µg/ml. Se verifică concentrația soluției după cum urmează: se determină spectrul de absorbție al soluției între 330 și 370 nm cu ajutorul

▼M2

spectrofotometrului (4.23). Se măsoară absorbanța (A) la valoarea maximă aproape de 363 nm. Se calculează concentrația de aflatoxină B_1 în micrograme per mililitru de soluție conform formulei:

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

3.12.1. Soluția mamă a soluției etalon de aflatoxină B_1 în cloroform.

Se transferă cantitativ 2,5 ml de soluție etalon de aflatoxină B_1 (3.12) într-un balon cotat de 50 ml și se completează până la nivel cu cloroform (3.1). Se păstrează această soluție la rece (4 °C) și la întuneric, bine sigilată și învelită în folie de aluminiu.

3.13. Soluții de aflatoxină B_1 pentru etalonare prin CLIP.

N.B. Se folosește sticlărie spălată cu acid pentru prepararea acestor soluții (a se vedea punctul 4, Aparatură).

3.13.1. Soluție de etalonare 4 ng/ml.

Se lasă balonul cotat cu soluția mamă (3.12.1) să revină la temperatura camerei în folia de aluminiu (timp de câteva ore). Se transferă 400 µl din soluția mamă (200 ng de aflatoxină B_1) într-un balon cotat de 50 ml și se evaporă soluția până la uscare sub un curent de gaz inert (3.11).

Se dizolvă reziduul obținut în aproximativ 20 ml de amestec de apă/acetonă (3.5.3), se completează până la nivel cu amestec de apă/acetonă și se amestecă bine.

3.13.2. Soluție de etalonare 3 ng/ml.

Se transferă cantitativ 7,5 ml de soluție de etalonare (3.13.1) într-un balon cotat de 10 ml, se completează până la nivel cu amestec de apă/acetonă (3.5.3) și se amestecă bine.

3.13.3. Soluție de etalonare 2 ng/ml.

Se transferă cantitativ 25 ml de soluție de etalonare (3.13.1) într-un balon cotat de 50 ml, se completează până la nivel cu amestec de apă/acetonă (3.5.3) și se amestecă bine.

Această soluție este, de asemenea, un etalon de referință, folosit pentru injecția repetitivă în timpul CLIP (5.5).

3.13.4. Soluție de etalonare 1 ng/ml.

Se transferă cantitativ 2,5 ml de soluție de etalonare (3.13.1) într-un balon cotat de 10 ml, se completează până la nivel cu amestec de apă/acetonă (3.5.3) și se amestecă bine.

3.14. Flacon conținân un amestec de aflatoxine B_1, B_2, G_1 și G_2 în concentrații de aproximativ 1, 0,5, 1 și respectiv 0,5 µg/ml, în 1 ml de cloroform.

3.14.1. Soluție de test prin cromatografie.

Se transferă conținutul flaconului (3.14) într-o eprubetă de sticlă cu dop sau într-un flacon cu dop cu șurub. Se transferă 40 µl din această soluție într-o eprubetă de sticlă cu dop (spălată cu acid) (4.22). Se evaporă cloroformul sub un curent de gaz inert (3.11) și se redizolvă în 10 ml de amestec de apă și acetonă (3.5.3).

3.15. Reactivi pentru testul de confirmare (6).

3.15.1. Soluție de clorură de sodiu saturată.

3.15.2. Sulfat de sodiu, anhidru, granulat.

4. **Aparatură**

Atenție: Utilizarea sticlăriei nespălate cu acid pentru soluțiile apoase de aflatoxină poate cauza pierderi. Trebuie să se acorde o atenție specială la folosirea sticlăriei noi și a sticlăriei de unică folosință, cum ar fi flaconul cu injecție automată și pipetele Pasteur. Prin urmare, sticlăria de laborator care intră în contact cu soluțiile apoase de aflatoxine trebuie înmuiate în acid diluat (de exemplu acid sulfuric = 2 mol/l) timp de câteva ore, apoi clătite bine cu apă

▼M2

distilată pentru a îndepărta orice urme de acid (de exemplu de trei ori, se verifică cu hârtie pH). În practică, acest tratament este necesar pentru balonul cu fund rotund (4.4), baloanele cotate, cilindrii gradați, flacoanele sau eprubetele folosite pentru soluțiile de etalonare și extractele finale (în special flacoanele cu injecție automată) și pipetele Pasteur, dacă acestea sunt folosite pentru transferarea soluțiilor de etalonare sau a extractelor.

4.1. Râșniță-mixer.

4.2. Sită cu ochi de 1,0 mm (ISO R 565).

4.3. Agitator mecanic.

4.4. Evaporator rotativ cu vid, prevăzut cu un balon cu fund rotund de 150-250 ml.

4.5. Cromatografie lichidă de înaltă performanță, injector cu buclă adecvat pentru injectarea a 250 ml. A se vedea instrucțiunile producătorului pentru umplerea parțială sau completă a buclei.

4.6. Coloană analitică CLIP: umplută cu particule de 3 μm sau 5 μm C_{18}.

4.7. Pompă fără puls de dozare a reactivului postcoloană cu iod.

4.8. Racord în T fără volum mort, din oțel inoxidabil (1/16″ × 0,75 mm).

4.9. Spirală de reacție, din teflon sau oțel inoxidabil. Dimensiunile 3 000 × 0,5 mm până la 5 000 × 0,5 mm sunt adecvate în combinație cu coloane CLIP de 5 μm sau 3 μm.

4.10. Baie controlată termostatic, reglată la 60 °C, care permite o reglare a temperaturii cu o finețe de cel puțin 0,1 °C.

4.11. Detector fluorimetric, cu excitație la lungimi de undă de 365 nm și emisie la lungimi de undă de 435 nm. (Pentru aparatul cu filtru: lungimea de undă de emisie >400 nm). Este posibilă o detecție de cel puțin 0,05 ng de aflatoxină B_1. Se recomandă o anumită contrapresiune (de exemplu prin regulator de presiune sau prin spirală din teflon sau din oțel inoxidabil conectată la ieșirea detectorului), pentru a elimina bulele de aer din celula de măsurare.

4.12. Înregistrator.

4.13. Integrator electronic (opțional).

4.14. Hârtie de filtru încrețită cu diametru de 24 cm, Macherey-Nagel 617 ¼ sau echivalent.

4.15. Membrană filtrantă cu porozitate de 0,45 μm, Millipore HAWP 04700 sau echivalent.

4.16. Balon conic de sticlă de 500 ml cu dop.

4.17. Coloană de sticlă (diametru interior de aproximativ 1 cm, lungime de aproximativ 30 cm) prevăzută cu vârf Luer.

4.18. Robinet cu vârf Luer rezistent la cloroform (de exemplu Bio-rad 7328017, Analytichem A1 6078, J.T. Baker 4514 sau echivalent).

4.19. Seringă de 10 ml cu conector Luer, rezistentă la produse chimice.

4.20. Seringă de 250 ml pentru injecție CLIP (a se vedea 4.5).

4.21. Microseringă de 100 μl pentru prepararea soluțiilor de etalonare (se verifică prin cântărire ca marja de eroare să nu depășească 2 %).

4.22. Eprubete gradate din sticlă de 10 ml cu dop.

4.23. Spectrofotometru, pentru efectuarea de măsurători în regiunea UV a spectrului.

4.24. Echipament pentru testul de confirmare (6).

4.24.1. Pâlnie de separare de 100 ml cu robinet de teflon, clătită cu acid.

4.24.2. Bloc de încălzire la 40-50 °C.

▼M2

5. **Procedură**

5.1. *Prepararea eşantionului.*

Se macină eşantionul astfel încât să treacă prin sită (4.2).

5.2. *Eşantion de testare.*

Se cântăreşte 50 g din eşantionul preparat pentru testare într-un balon conic (4.16).

5.3. *Extracţie.*

Se adăugă 25 g de Celite (3.8), 250 ml de cloroform (3.1) şi 25 ml de apă la eşantionul de testare (5.2). Se astupă balonul şi se agită timp de 30 minute pe un agitator mecanic (4.3). Se filtrează printr-o hârtie de filtru încreţită (4.14). Se prelevează 50 ml din filtrat. După caz, se ia o parte alicotă din filtrat şi se diluează până la 50 ml cu cloroform, astfel încât concentraţia de aflatoxină B_1 să nu fie mai mare de 4 ng/ml.

5.4. *Purificare (procedura trebuie efectuată fără întreruperi semnificative).*

Atenţie:

— se protejează în mod adecvat laboratorul în care se efectuează analizele de lumina zilei. Acest lucru se poate realiza în mod eficient utilizând:

(i) Folie care absoarbe UV la ferestre în combinaţie cu lumină atenuată (fără lumină solară directă);

(ii) Draperii sau jaluzele în combinaţie cu lumină artificială (se pot accepta tuburi fluorescente);

— soluţiile care conţin aflatoxine trebuie protejate de lumină cât de mult posibil (prin păstrare la întuneric, prin utilizarea foliilor de aluminiu).

5.4.1. Purificare cu SEP-PAK Florisil

5.4.1.1. Prepararea ansamblului coloană-cartuş

Se montează un robinet (4.18) la tija mai scurtă a cartuşului de Florisil (3.9) (vezi figura 1). Se spală cartuşul şi se îndepărtează aerul luând 10 ml de cloroform (3.1) şi lăsând să treacă 8 ml prin robinet în mod rapid în cartuş utilizând o seringă (4.19). Se conectează tija mai lungă a cartuşului la o coloană de sticlă (4.17) şi se introduce restul de 2 ml de cloroform prin cartuş în coloană. Se închide robinetul. Se îndepărtează seringa.

5.4.1.2. Purificare

Se adăugă filtratul colectat la 5.3 în ansamblul coloană-cartuş şi se evacuează prin gravitaţie. Se clăteşte cu 5 ml de cloroform (3.1), iar apoi cu 20 ml de metanol (3.2). Se îndepărtează eluaţii. În timpul acestor operaţiuni, se iau măsuri pentru a preveni uscarea ansamblului coloană-cartuş.

Se eluează aflatoxină B_1 cu 40 ml de amestec acetonă-apă (3.5.1) şi se colectează întregul eluat în balonul cu fund rotund al evaporatorului rotativ (4.4). Se concentrează eluatul cu ajutorul evaporatorului rotativ la 40-50 °C până când se încheie distilarea acetonei. (*N.B.* în acest stadiu, o cantitate de aproximativ 0,5 ml de lichid rămâne în balon. Experimentele au arătat că evaporarea ulterioară nu este dăunătoare şi că, atunci când rămân 0,5 ml de lichid, nu mai există o cantitate semnificativă de acetonă. Reziduurile de acetonă pot duce la pierderi de aflatoxină B_1 pe cartuşul C_{18}). Se adaugă 1 ml de metanol (3.2), se agită balonul pentru a dizolva aflatoxină B_1 pe pereţii balonului, se adaugă 4 ml apă şi se amestecă. Se deconectează şi se îndepărtează cartuşul. Se clăteşte coloana de sticlă cu apă şi se păstrează pentru etapa de purificare cu C_{18}.

▼M2

5.4.2. Purificare cu SEP-PAK C_{18}

5.4.2.1. Prepararea ansamblului coloană-cartuș.

Se montează un robinet (4.18) la tija mai scurtă a cartușului C_{18} (3.10) (a se vedea figura 1). Se amorsează cartușul și se îndepărtează aerul lăsând să treacă 10 ml de metanol (3.2) prin robinet în mod rapid în cartuș utilizând o seringă (4.19) (Bulele de aer din cartuș sunt vizibile ca puncte luminoase pe un fond gri). Se iau 10 ml de apă și se lasă să treacă 8 ml prin cartuș (se evită introducerea de aer în cartuș la trecerea de la metanol la apă). Se conectează tija mai lungă a cartușului la o coloană de sticlă (4.17) și se introduce restul de 2 ml de apă prin cartuș în coloană. Se închide robinetul. Se îndepărtează seringa.

5.4.2.2. Purificare

Se transferă cantitativ în coloana de sticlă (4.17) extrasul colectat la 5.4.1.2, clătind balonul de două ori cu 5 ml de amestec apă/metanol (3.5.2) și se evacuează prin gravitație. În timpul acestor operațiuni, se iau măsuri pentru a preveni uscarea ansamblului coloană-cartuș. (Când se formează bule de aer în partea îngustă de lângă cartuș, se oprește fluxul și se lovește ușor partea superioară a coloanei de sticlă pentru a îndepărta bulele de aer. Apoi se continuă). Se eluează cu 25 ml de amestec apă/metanol. Se elimină eluatul. Se eluează aflatoxina B_1 cu 50 ml de amestec apă/acetonă (3.5.3) și se colectează întregul eluat într-un balon cotat de 50 ml. Se completează până la nivel cu apă și se amestecă: soluția de testare astfel obținută este folosită pentru cromatografie (5.5).

Atenție: Filtrarea extractului final înainte de CLIP nu este necesară în general. Dacă se consideră că este necesară, nu se utilizează filtre de celuloză, întrucât pot duce la pierderi de aflatoxină B_1. Se pot accepta filtrele de teflon.

5.5. *Cromatografie lichidă de înaltă performanță*

(A se vedea figura 2 pentru montarea echipamentului). Se acordă un timp suficient pentru condiționarea și stabilizarea instrumentelor.

Nota 1:

Debitele indicate pentru faza mobilă și pentru reactivul postcoloană sunt doar orientative. Ele pot fi modificate în funcție de caracteristicile coloanei CLIP.

Nota 2:

Răspunsul detectorului la aflatoxină B_1 depinde de temperatură, prin urmare abaterile trebuie compensate (a se vedea figura 3). Prin injectarea unei cantități fixe de etalon de referință aflatoxină B_1 (3.13.3) la intervale regulate (adică la fiecare a treia injectare), valorile maxime ale aflatoxinei B_1 obținute între aceste etaloane de referință pot fi corectate folosind răspunsul mediu, cu condiția ca diferența dintre răspunsurile etaloanelor de referință consecutive să fie foarte mică (< 10 %). Prin urmare, injectările trebuie să fie efectuate fără întrerupere. Dacă este necesară o întrerupere, ultima injectare înainte de întrerupere și prima injectare după întrerupere trebuie să reprezinte etalonul de referință (3.13.3). Întrucât curba de calibrare este liniară și trece prin origine, cantitățile de aflatoxină B_1 din extractele de eșantion sunt determinate direct prin raportare la etaloanele apropiate.

5.5.1. Reglarea pompei CLIP

Se reglează pompa CLIP (4.5) pentru a genera un flux de 0,5 sau 0,3 ml/min pentru o coloană CLIP de 5 μm sau respectiv de 3 μm (4.6) folosind faza mobilă (3.6).

5.5.2. Reglarea pompei postcoloană

Se reglează pompa (4.7) pentru a genera un flux de 0,2-0,4 ml/min de soluție apoasă saturată în iod (3.7). Cu titlu orientativ: fluxurile de aproximativ 0,4 sau 0,2 ml/min sunt recomandate în combinație cu fluxuri de 0,5 și respectiv 0,3 ml/min ale fazei mobile (3.6).

▼M2

5.5.3. Detectorul fluorimetric

Se reglează detectorul fluorimetric (4.11) la o lungime de undă de excitație = 365 nm și la o lungime de undă de emisie = 435 nm (pentru aparat cu filtru: >400 nm). Se ajustează atenuarea detectorului pentru a obține aproximativ 80 % din deviația la scară completă a acului de înregistrare pentru 1 ng de aflatoxină B_1.

5.5.4. Injectorul

Pentru toate soluțiile, se injectează cantități de 250 µl urmând instrucțiunile producătorului injectorului.

5.5.5. Verificarea separării cromatografice

Se injectează soluția de test prin cromatografie (3.14.1). Înălțimea punctului de inflexiune trebuie să fie mai mică de 5 % din suma înălțimilor maximelor alăturate.

5.5.6. Verificarea stabilității sistemului

Înaintea fiecărei serii de analize, se injectează de mai multe ori etalonul de referință (3.13.3) până se obțin suprafețe stabile ale maximelor (*N.B.* Răspunsurile maxime pentru aflatoxină B_1 între injectările consecutive nu trebuie să varieze cu mai mult de 6 %). Se efectuează fără întârziere verificarea liniarității (5.5.7).

5.5.7. Verificarea liniarității

Se injectează soluțiile de etalonare de aflatoxină B_1 (3.13.1-3.13.4). La fiecare a treia injectare, se folosește etalonul de referință (3.13.3), pentru corectarea abaterii în răspuns (*N.B.* Răspunsurile maxime pentru acest etalon de referință nu trebuie să difere cu mai mult de 10 % în 90 de minute). Se corectează abaterea conform formulei descrise la punctul 7. Graficul de calibrare trebuie să fie liniar și să treacă prin origine, în cadrul unui interval de două ori mai mare decât eroarea standard a Y estimat. Valorile obținute nu trebuie să difere cu mai mult de 3 % de valorile nominale. Dacă sunt îndeplinite aceste cerințe, se continuă fără întârziere. Dacă nu, se identifică și se corectează cauzele problemei înainte de a continua.

5.5.8. Injectarea extractelor de eșantion

Se injectează extractele purificate de eșantion (5.4.2.2). După fiecare două extracte de eșantion, se repetă injectarea etalonului de referință (3.13.3) conform următoarei secvențe: etalon de referință, extract, extract, etalon de referință, extract, extract, etalon de referință etc.

6. **Test de confirmare**

6.1. *Tratarea ulterioară a extractului (5.4.2.2)*

Se adăugă 5 ml de soluție de clorură de sodiu (3.15.1) la extractul final obținut la 5.4.2.2. Se extrage de trei ori cu câte 2 ml de cloroform (3.1) timp de un minut, în pâlnia de separare (4.24.1). Se toarnă extractele combinate de cloroform peste aproximativ 1 g de sulfat de sodiu (3.15.2) într-o eprubetă de 10 ml. O pâlnie mică (diametru de 4 cm) poate fi folosită cu o bucată de vată în orificiu, acoperită de aproximativ 1 g de sulfat de sodiu.

Se spală stratul de sulfat de sodiu cu câțiva ml de cloroform și se colectează soluția de spălare în aceeași eprubetă. Se evaporă extrasul de cloroform până la uscare în aceeași eprubetă folosind blocul de încălzire (4.24.2) și se redizolvă în 1 ml de cloroform.

6.2. *Prepararea derivaților și cromatografia pe strat subțire*

A se vedea metoda A punctul 5.6.2 din anexa la Directiva 76/372/CEE a Consiliului.

7. **Calcularea rezultatelor**

Se calculează conținutul de aflatoxină B_1 (µg/kg) prezentă în eșantion utilizând formula:

▼M2

$$\text{conținut de aflatoxină } B_1 \text{ în } (\mu g/kg) = \frac{m \times V_{e\,x\,t}}{V_m \times M \times \frac{V_f}{V_c}}$$

unde:

m = cantitatea de aflatoxină B_1, în ng, reprezentată de maximul B_1 al eșantionului, calculată după cum urmează:

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

P (eșantion) = suprafața valorilor maxime ale aflatoxinei B_1 pentru eșantion

$P(st_1)$ = suprafața valorilor maxime ale aflatoxinei B_1 rezultată din injectarea anterioară a etalonului de referință (3.13.3)

$P(st_2)$ = suprafața valorilor maxime ale aflatoxinei B_1 rezultată din următoarea injectare a etalonului de referință (3.13.3)

r(st) = cantitatea injectată de aflatoxină B_1 în etalonul de referință (3.13.3), în ng

V_m = volumul de extract de eșantion injectat, în ml

V_{ext} = volumul final de extract de eșantion, în ml, ținând seama de orice diluție efectuată (5.3)

M = masa eșantionului, în g

V_f = volumul de filtrat transferat în cartușul de Florisil (5.4.1.2), în ml

V_c = volumul de cloroform folosit pentru extracția eșantionului, în ml

Dacă procedura este urmată conform prezentului protocol, formula se reduce la:

conținut de aflatoxină B_1 în µg/kg = 20 × m.

7.1. Calcularea rezultatelor se poate realiza, de asemenea, prin măsurarea înălțimii maximelor.

8. **Repetabilitate:**

A se vedea punctul 10.1.

9. **Reproductibilitate:**

A se vedea punctul 10.1.

10. **Observații**

10.1. *Precizie*

Un studiu colaborativ ([1]), efectuat la nivel internațional pe furajele compuse, a dus la rezultatele privind repetabilitatea și reproductibilitatea prezentate în tabelul 1. Termenul de repetabilitate (r) utilizat în acest caz se definește ca raportul cel mai mare care nu este semnificativ la nivelul de probabilitate de 95 %, pentru compararea a două rezultate ale analizei aceluiași eșantion în același laborator în condiții similare. Termenul de reproductibilitate (R) se definește, în mod similar, pentru compararea rezultatelor obținute de două laboratoare diferite. În conformitate cu ISO 3534-1977, 2.35 ([2]) și cu Decizia

([1]) Egmond, H.P. van, Heisterkamp, S.H. și Paulsch, W.E. (1991). *Food Additives and Contaminants* 8, 17-29.
([2]) ISO 3534-1977.

▼**M2**

89/610/CEE a Comisiei ([1]), parametrii r și R sunt indicați în tabelul 1 și în coeficienți de variație.

Tabelul 1

Repetabilitatea (r) și reproductibilitatea (R) exprimate în raporturi și în coeficienți de variație

(15 laboratoare)

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

(*) CV= coeficient de variație

10.2. *Stabilizarea cloroformului (3.1)*

Caracteristicile de absorbție ale cartușului de Florisil pot fi modificate dacă sunt folosiți alți stabilizatori decât etanolul. Acest lucru trebuie verificat în conformitate cu punctul 10.3 atunci când cloroformul descris nu este disponibil.

10.3. *Precizie*

Aplicările corecte ale metodei trebuie verificate prin efectuarea de măsurări duble asupra materialelor de referință certificate. Dacă aceste măsurări nu sunt disponibile, aplicarea metodei trebuie verificată prin experimente de recuperare efectuate asupra eșantioanelor fără aflatoxină B_1 contaminate artificial. Abaterea mediei de la valoarea reală, exprimată ca procent din valoarea reală, nu trebuie să se situeze în afara limitelor de - 20 % și + 10 %.

([1]) JO L 351, 2.12.1989, p. 39.

▼**M2**

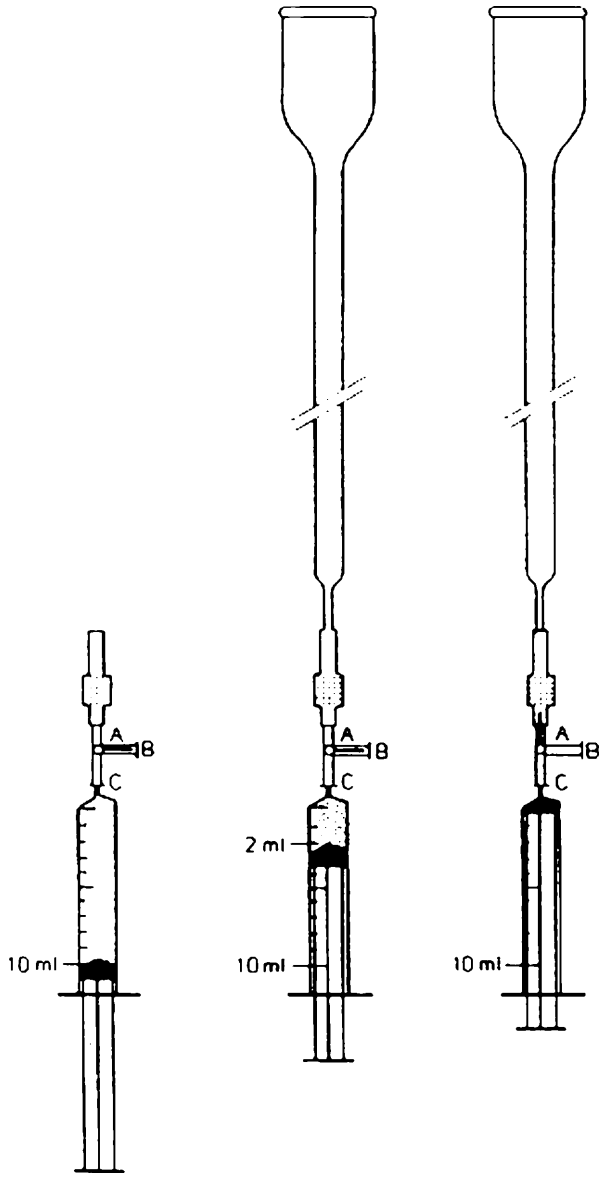
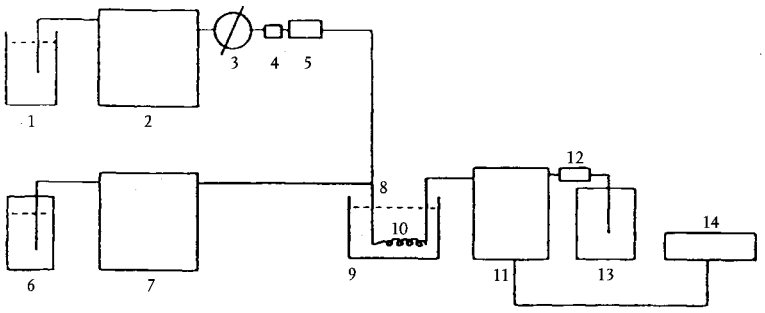


Figura 1: Ansamblu coloană-cartuș



1. Fază mobilă
2. Pompă
3. Supapă de injecție
4. Precoloană
5. Coloană analitică CLIP
6. Soluție de iod saturată
7. Pompă cu reactiv
8. Racord în T
9. Baie controlată termostatic
10. Spirală de reacție
11. Detector fluorimetric
12. Regulator de presiune
13. Deșeuri
14. Înregistrator/integrator

Figura 2: Diagrama fluxului sistemului CL cu derivatizare post-coloană cu iod

▼M2

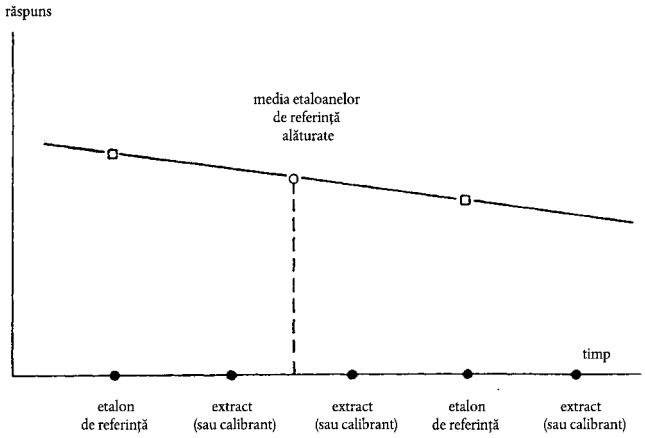


Figura 3: Compensarea abaterii răspunsului aflatoxinei B_1 prin injectarea etalonului de referință (3.13.3) la intervale regulate

▼M3

C. OBSERVAțII PRIVIND METODELE A şI B

1. **Degresare**

Probele care conțin peste 5 % grăsimi trebuie degresate cu eter de petrol (punct de fierbere 40-60 °C) după efectuarea pregătirilor prevăzute la punctul 5.1.

În astfel de cazuri, rezultatele analitice trebuie exprimate în greutatea probei nedegresate.

2. **Reproductibilitatea rezultatelor pentru metoda A**

Reproductibilitatea rezultatelor, adică variația între rezultatele obținute de două sau mai multe laboratoare pe aceeași probă, s-a estimat la:

± 50 % din valoarea medie pentru valorile medii de aflatoxină B_1 cuprinse între 10 și 20 μg/kg;

± 10 μg/kg față de valoarea medie pentru valorile medii cuprinse între 20 și 50 μg/kg;

± 20 % din valoarea medie pentru valorile medii de peste 50 μg/kg.

▼B

Apendice la anexă

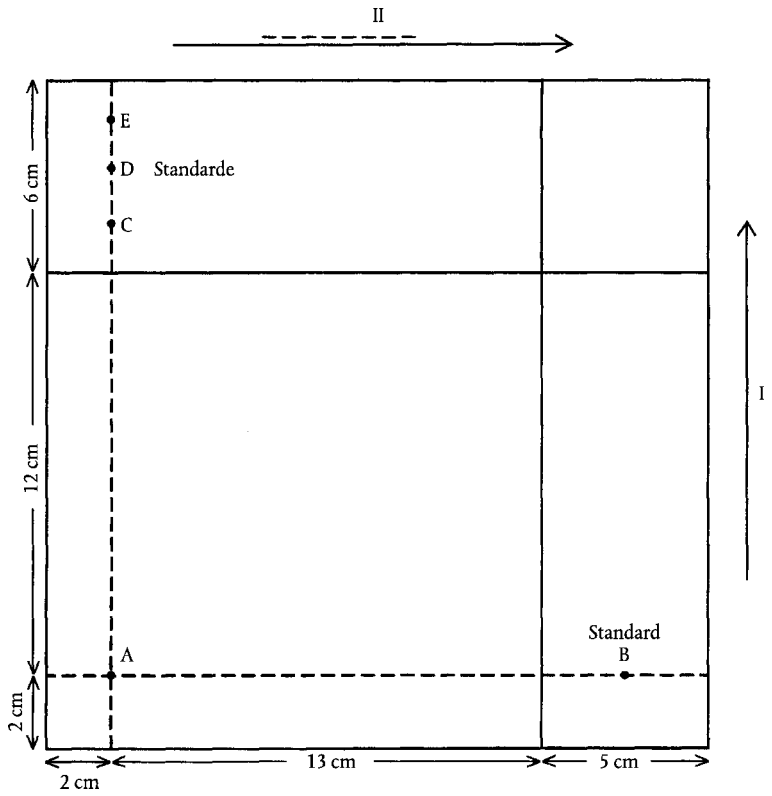


Figura 1

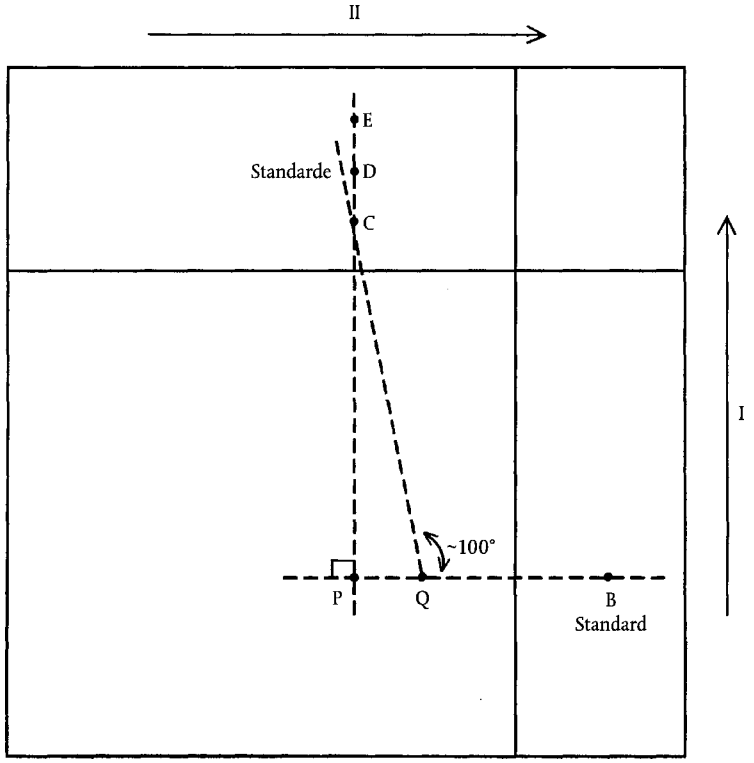


Figura 2

▼B

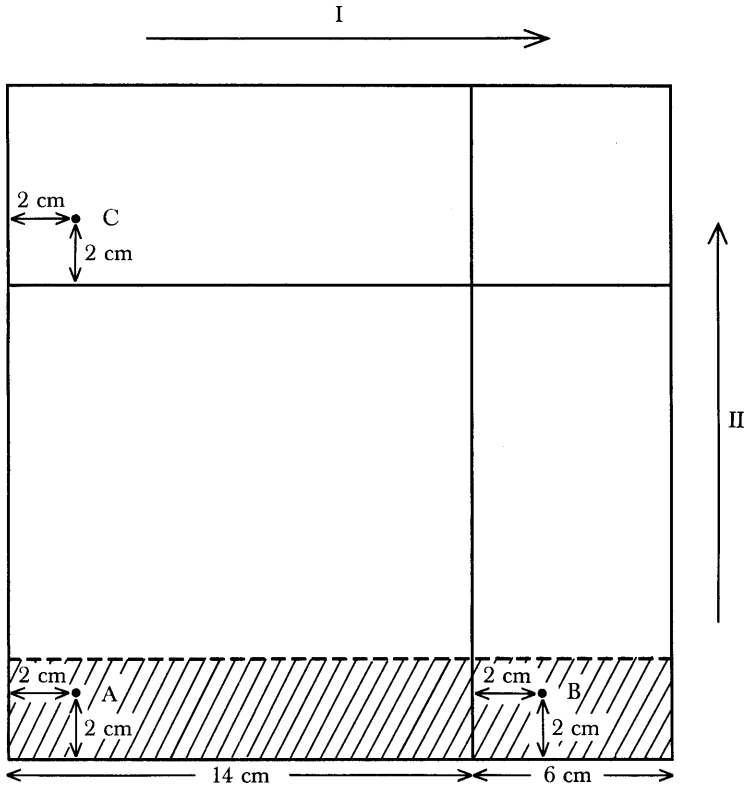


Figura 3