SETTIMA DIRETTIVA DELLA COMMISSIONE

del 1° marzo 1976

che fissa i metodi d'analisi comunitari per i controlli ufficiali degli alimenti per gli animali

(76/372/CEE)

LA COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

visto il trattato che istituisce la Comunità economica europea,

vista la direttiva del Consiglio, del 20 luglio 1970, concernente l'introduzione di modi di prelevamento dei campioni e di metodi d'analisi comunitari per il controllo ufficiale degli alimenti per gli animali (1), modificata da ultimo dall'atto di adesione (2), in particolare l'articolo 2,

considerando che la suddetta direttiva prevede che i controlli ufficiali degli alimenti per gli animali destinati a constatare l'osservanza delle condizioni prescritte in virtù delle disposizioni legislative, regolamentari o amministrative concernenti le qualità e la composizione degli alimenti per gli animali, siano effettuati secondo i modi di prelevamento di campioni ed i metodi di analisi comunitari ;

considerando che le direttive 71/250/CEE, 71/393/CEE, 72/199/CEE, 73/46/CEE, 74/203/CEE e 75/84/CEE della Commissione, rispettivamente del 15 giugno 1971 (3), del 18 novembre 1971 (4), del 27 aprile 1972 (5), del 5 dicembre 1972 (6), del 25 marzo 1974 (7) e del 20 dicembre 1974 (8), hanno già fissato un certo numero di metodi di analisi comunitari ; che, tenuto conto dello stato d'avanzamento dei lavori sin qui effettuati, è necessario adottare una settima serie di metodi ;

considerando che le misure previste dalla presente direttiva sono conformi al parere del comitato permanente per gli alimenti per gli animali,

HA ADOTTATO LA PRESENTE DIRETTIVA :

Articolo 1

Gli Stati membri prescrivono che le analisi per i controlli ufficiali degli alimenti per gli animali, per quanto riguarda il loro contenuto in aflatossina B_1 siano effettuate secondo i metodi descritti nell'allegato della presente direttiva.

Le disposizioni generali di cui alla prima parte (introduzione) dell'allegato della prima direttiva 71/250/CEE della Commissione, del 15 giugno 1971, eccetto la parte relativa alla preparazione del campione da analizzare, si applicano ai metodi descritti nell'allegato della presente direttiva.

Articolo 2

Gli Stati membri provvedono all'entrata in vigore, non oltre il 1° ottobre 1976, delle disposizioni legislative, regolamentari e amministrative necessarie per conformarsi alle disposizioni della presente direttiva e ne informano immediatamente la Commissione.

Articolo 3

Gli Stati membri sono destinatari della presente direttiva.

Fatto a Bruxelles, il 1° marzo 1976.

Per la Commissione

P. J. LARDINOIS

Membro della Commissione

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

ALLEGATO

DETERMINAZIONE DELL'AFLATOSSINA B_1

A. METODO PER CROMATOGRAFIA MONODIMENSIONALE SU STRATO SOTTILE

1. **Scopo e campo di applicazione**

Il metodo consente di determinare il contenuto di aflatossina B_1 dei seguenti alimenti: panelli di arachidi, di copra, di lino, di soia, di sesamo, di babassu e di germi di granturco, cereali e prodotti a base di cereali, farina di piselli, polpa e fecola di patate. Il limite inferiore di determinazione è di 0,01 mg/kg (10 ppb)

In presenza di sostanze interferenti che intralciano le determinazioni, occorre ricominciare l'analisi secondo il metodo B (cromatografia bidimensionale su strato sottile)

2. **Principio**

Il campione è sottoposto ad estrazione con cloroformio. L'estratto viene filtrato e un'aliquota viene prelevata e purificata mediante cromatografia su colonna di gel di silice. L'eluato viene evaporato e il residuo ripreso con un volume determinato di cloroformio o di una miscela di benzene e acetonitrile. Un'aliquota della soluzione è sottoposta a cromatografia su strato sottile. La quantità di aflatossina B_1 è determinata sotto irradiazione UV del cromatogramma, sia visualmente sia mediante fluorodensitometria, in rapporto a quantità note di aflatossina B_1.

L'identità dell'aflatossina B_1 estratta dall'alimento deve essere confermata con i procedimenti indicati

3. **Reattivi**

Nota: Tutti i reattivi, in mancanza di altre indicazioni, devono essere del tipo « per analisi »

3.1. Acetone

3.2. Cloroformio, stabilizzato con 0,5 — 1,0 % di etanolo al 96 % (v/v)

3.3. n-Esano

3.4. Metanolo

3.5. Etere dietilico anidro, esente da perossidi

3.6. Miscela di benzene e acetonitrile: 98/2 (v/v)

3.7. Miscela di cloroformio (3.2) e di metanolo (3.4): 97/3 (v/v)

3.8. Gel di silice, per cromatografia su colonna, granulometria: 0,05/0,20 mm

3.9. Cotone idrofilo, preventivamente sgrassato col cloroformio, o lana di vetro

3.10. Solfato di sodio, anidro, granulato

3.11. Gas inerte, ad esempio azoto

3.12. Acido cloridrico 1 N

3.13. Acido solforico al 50 % (v/v)

3.14. Terra di diatomee (Hiflosupercel), lavata con acido

3.15. Gel di silice G-HR o equivalente, per cromatografia su strato sottile

3.16. Soluzione campione a 0,1 μg circa di aflatossina B_1 per ml nel cloroformio (3.2) o nella miscela benzene/acetonitrile (3.6), preparata e controllata come indicato al punto 7

3.17. Soluzione campione qualitativa a 0,1 μg circa di aflatossine B_1 e B_2 per ml nel cloroformio (3.2) o nella miscela benzene/acetonitrile (3.6). Tali concentrazioni sono riferite a titolo indicativo. Devono essere adattate in modo da ottenere la stessa intensità di fluorescenza per le due aflatossine

3.18. Solventi di sviluppo:

3.18.1. Cloroformio (3.2)/acetone (3.1): 9/1 (v/v), vaschetta non saturata

3.18.2. Etere dietilico (3.5)/metanolo (3.4)/acqua: 96/3/1/ (v/v/v), vaschetta non saturata

3.18.3. Etere dietilico (3.5)/metanolo (3.4)/acqua: 94/4,5/1,5 (v/v/v), vaschetta saturata

3.18.4. Cloroformio (3.2)/metanolo (3.4): 94/6/(v/v), vaschetta saturata

3.18.5. Cloroformio (3.2)/metanolo (3.4): 97/3 (v/v), vaschetta saturata

4. Apparecchiatura

4.1. Tritatore mescolatore

4.2. Scuotitore o agitatore magnetico

4.3. Filtri a pieghe, Schleicher e Schül, n. 588 o equivalente, diametro 24 cm.

4.4. Colonne per cromatografia, in vetro (diametro interno: 22 mm, lunghezza: 300 mm), con rubinetto di teflon e serbatoio da 250 ml

4.5. Evaporatore rotante sotto vuoto, provvisto di pallone a fondo rotondo da 500 ml

4.6. Beute da 500 ml, a tappo smerigliato

4.7. Apparecchiatura per cromatografia su strato sottile

4.8. Lastre di vetro per cromatografia su strato sottile, 200 × 200 mm, preparate come segue (le quantità indicate sono sufficienti per ricoprire cinque lastre): introdurre 30 g di gel di silice G-HR (3.15) in una beuta, aggiungere 60 ml di acqua, tappare e agitare per un minuto. Stendere la sospensione sulle lastre in modo da ottenere uno strato uniforme di 0,25 mm di spessore. Lasciar asciugare all'aria e conservare in seguito in essiccatoio munito di gel di silice. Al momento dell'uso, attivare le lastre ponendole per un'ora nella stufa a 110 °C

Le lastre in commercio pronte per l'uso possono essere impiegate se danno risultati simili a quelli delle lastre preparate come sopra indicato

4.9. Lampada UV a onde lunghe (360 mm). L'intensità di irradiazione deve consentire di distinguere nettamente una macchia di 1,0 ng di aflatossina B_1 su una lastra per cromatografia su strato sottile, ad una distanza di 10 cm dalla lampada

4.10. Cilindri graduati da 10,0 ml con tappi in polietilene

4.11. Spettrofotometro UV

4.12. Fluorodensitometro (eventualmente)

5. Modo di operare

5.1. *Preparazione dal campione* (vedi note, parte C, punto 1)

Macinare il campione in modo che passi integralmente attraverso un setaccio a maglie di 1 mm (conforme alla raccomandazione ISO R 565)

5.2. *Estrazione*

Introdurre 50,0 g del campione macinato e omogeneizzato in una beuta da 500 ml (4.6). Aggiungere 25 g di terra di diatomee (3.14), 25 ml di acqua e 250 ml di cloroformio (3.2). Tappare la beuta, scuotere o agitare per 30 minuti con l'apposito apparecchio (4.2) e filtrare con filtro a pieghe (4.3). Eliminare i primi 10 ml di filtrato e raccogliere quindi 50 ml

5.3. *Purificazione su colonna*

Munire di un tampone di cotone o di lana di vetro (3.9) l'estremità inferiore di una colonna per cromatografia (4.4), riempire di cloroformio (3.2) i due terzi della colonna e aggiungere 5 g di solfato di sodio (3.10)

Controllare che la superficie superiore dello strato di solfato di sodio sia piana, quindi aggiungere un poco alla volta 10 g di gel di silice (3.8). Scuotere la colonna con precauzione dopo ogni aggiunta per eliminare le bolle d'aria. Lasciar depositare per 15 minuti e aggiungere quindi con precauzione 15 g di solfato di sodio (3.10). Lasciare scendere il liquido fino a vicinanza immediata della superficie superiore dello strato di solfato di sodio

Mescolare i 50 ml di estratto raccolti al punto 5.2 con 100 ml di n-esano (3.3) e travasare quantitativamente la miscela nella colonna. Lasciare scendere il liquido sino alla superficie superiore dello strato di solfato di sodio. Eliminare il liquido defluito. Aggiungere quindi 100 ml di etere dietilico (3.5) e lasciare nuovamente scendere il liquido sino alla superficie superiore dello strato di solfato di sodio. Durante queste operazioni, controllare che i liquidi defluiscano ad un ritmo di 8/12 ml al minuto e che la colonna non rimanga asciutta. Eliminare i liquidi defluiti. Eluire quindi con 150 ml della miscela cloroformio/metanolo (3.7) e raccogliere tutto l'eluato

Evaporare l'eluato quasi a secco, in corrente di gas inerte (3.11) e ad una temperatura non superiore a 50 °C, con l'evaporatore rotante sotto vuoto (4.5). Portare quantitativamente il residuo, usando il cloroformio (3.2) o la miscela benzene/acetonitrile (3.6), in un cilindro graduato da 10,0 ml (4.10). Concentrare la soluzione in corrente di gas inerte (3.11) e portare quindi il volume a 2,0 ml con cloroformio (3.2) o con la miscela benzene/acetonitrile (3.6)

5.4. *Cromatografia su strato sottile*

Deporre sotto forma di punti su una lastra per cromatografia su strato sottile (4.8), a 2 cm dal bordo inferiore e ad intervalli di 2 cm, i volumi sotto indicati della soluzione campione e dell'estratto:

— 10, 15, 20, 30 e 40 μl della soluzione campione di aflatossina B_1 (3.16)
— 10 μl dell'estratto ottenuto al punto 5.3 e, *in sovrapposizione sullo stesso punto,* 20 μl della soluzione campione (3.16)
— 10 e 20 μl dell'estratto ottenuto al punto 5.3

Sviluppare il cromatogramma al riparo dalla luce, impiegando uno dei solventi di sviluppo (3.18). La scelta del solvente deve essere stabilita preventivamente, deponendo sulla lastra 25 μl della soluzione campione qualitativa (3.17) e accertando che, all'atto dello sviluppo, le aflatossine B_1 e B_2 siano completamente separate

Lasciar evaporare i solventi al riparo dalla luce ed irradiare quindi con la luce UV, collocando la lastra a 10 cm della lampada (4.9). Le macchie di aflatossina B_1 danno una fluorescenza blu

5.5. *Determinazioni quantitative*

Procedere alle determinazioni, sia visualmente sia mediante fluorodensitometria, come sotto indicato

5.5.1. Misurazioni visuali

Determinare la quantità di aflatossina B_1 dell'estratto confrontando l'intensità di fluorescenza delle macchie dell'estratto con quella delle macchie della soluzione campione. Interpolare se necessario. La fluorescenza ottenuta con la sovrapposizione dell'estratto della soluzione campione deve essere più forte di quella dei 10μl di estratto e deve dar luogo alla percezione di una sola macchia. Se l'intensità di fluorescenza data dai 10 μl di estratto è più forte di quella dei 40 μl di soluzione campione, diluire l'estratto 10 o 100 volte con cloroformio (3.2) o con la miscela benzene/acetonitrile (3.6) prima di sottoporlo ad una nuova cromatografia su strato sottile

5.5.2. Misurazioni mediante fluorodensitometria

Misurare l'intensità di fluorescenza delle macchie di aflatossina B_1 con il fluorodensitometro (4.12), utilizzando una lunghezza d'onda di eccitazione di 365 nm ed una lunghezza d'onda di emissione di 443 nm. Determinare la quantità di aflatossina B_1 dei depositi dell'estratto confrontando le intensità di fluorescenza delle macchie dell'estratto e della soluzione campione

5.6. *Conferma dell'identità dell'aflatossina B_1*

Confermare l'identità dell'aflatossina B_1 dell'estratto con i seguenti procedimenti:

5.6.1. Trattamento con acido solforico

Polverizzare acido solforico (3.13) sul cromatogramma ottenuto al punto 5.4. La fluorescenza delle macchie di aflatossina B_1 deve volgere dal blu al giallo sotto irradiazione UV

5.6.2. Cromatografia bidimensionale implicante la formazione di aflatossina B_1-emiacetale (aflatossina B_{2a})

NB: Le operazioni sotto descritte devono essere effettuate seguendo lo schema riprodotto nella figura 3

5.6.2.1. Applicazione delle soluzioni

Tracciare su una lastra (4.8) due rette parallele a due lati contigui (a distanza di 6 cm da tali lati), destinate a delimitare la migrazione dei fronti dei solventi. Deporre sulla lastra, con pipette capillari o con microsiringhe, le soluzioni sotto indicate:

— *nel punto A:* un volume di estratto purificato del campione ottenuto al punto 5.3, contenente circa 2,5 nanogrammi di aflatossina B_1

— *nei punti B e C:* 25 µl della soluzione campione (3.16)

5.6.2.2. Sviluppo

Sviluppare il cromatogramma nella direzione I usando il solvente di sviluppo (3.18.1) (strato di 1 cm in vaschetta non saturata), al riparo dalla luce, finché il fronte del solvente non raggiunga la linea di delimitazione. Ritirare la lastra dalla vaschetta e lasciarla asciugare per 5 minuti al riparo dalla luce e a temperatura ambiente. Polverizzare quindi acido cloridrico (3.12) su una striscia di 2,5 cm di altezza che copra i punti A e B (tratteggiata nella figura 3) sino ad imbrunimento, proteggendo il resto della lastra con un vetro. Lasciar reagire per 10 minuti allo scuro ed asciugare con una corrente d'aria a temperatura ambiente

Sviluppare quindi il cromatogramma nella direzione II usando il solvente di sviluppo (3.18.1) (strato di 1 cm in vaschetta non saturata), al riparo dalla luce, finché il fronte del solvente non raggiunga la linea di delimitazione. Ritirare la lastra dalla vaschetta e lasciarla asciugare a temperatura ambiente

5.6.2.3. Interpretazione del cromatogramma

Esaminare il cromatogramma sotto la lampada UV (4.9) e verificare le osservazion[1] seguenti:

a) Apparizione di una macchia fluorescente blu di aflatossina B_1 proveniente dalla soluzione campione deposta nel punto C (migrazione nella direzione I)

b) Apparizione di una macchia fluorescente blu di aflatossina B_1 (che non ha reagito con l'acido cloridrico) e di una macchia fluorescente blu più intensa di aflatossina B_1-emiacetale proveniente dalla soluzione campione deposta nel punto B (migrazione nella direzione II)

c) Apparizione di macchie simili a quelle descritte al punto b), provenienti dall'estratto di campione deposto nel punto A. La posizione di tali macchie è definita dalla distanza di migrazione dell'aflatossina B_1 a partire dal punto A nella direzione I (distanza uguale a quella percorsa dalla soluzione campione deposta nel punto C), seguita dalle distanze di migrazione percorse nella direzione II dall'aflatossina B_1 (che non ha reagito con l'acido cloridrico) e dall'aflatossina B_1-emiacetale (distanze uguali a quelle percorse dalla soluzione campione deposta nel punto B). Le intensità di fluorescenza delle macchie di emiacetale proveniente dall'estratto e della soluzione campione deposta nel punto B dovrebbero corrispondere

6. Calcolo dei risultati

6.1. *Partendo da misurazioni visuali*

Il contenuto in microgrammi di aflatossina B_1 per kg di campione (ppb) è dato dalla formula

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

dove:

Y e X sono rispettivamente i volumi in microlitri della soluzione campione di aflatossina B_1 (3.16) e dell'estratto, aventi analoga intensità di fluorescenza;

S = concentrazione in microgrammi di aflatossina B_1 per ml della soluzione campione (3.16)

V = volume finale dell'estratto in microlitri, tenuto conto delle eventuali diluizioni

W = peso in grammi della quantità di sostanza sottoposta ad analisi, corrispondente al volume di estratto sottoposto a purificazione su colonna

6.2. *partendo da misurazioni fluorodensitometriche*

Il contenuto in microgrammi di aflatossina B_1 per kg di campione (ppb) è dato dalla formula

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

dove:

Y = volume in microlitri dell'estratto deposto sulla lastra (10 o 20 μl)

S = quantità in nanogrammi d'aflatossina B_1 del deposito dell'estratto (tenuto conto del volume Y), dedotta dalle determinazioni

V = volume finale dell'estratto in microlitri, tenuto conto delle eventuali diluizioni

W = peso in grammi della quantità di sostanza sottoposta ad analisi, corrispondente al volume di estratto sottoposto a purificazione su colonna

7. **Preparazione e controllo della soluzione campione** (3.16)

7.1. *Determinazione della concentrazione in aflatossina* B_1

Preparare una soluzione campione di aflatossina B_1 nel cloroformio (3.2) o nella miscela benzene/acetonitrile (3.6), con concentrazione di 8/10 μg per ml. Determinare lo spettro di assorbimento tra 330 e 370 nm mediante lo spettrofotometro (4.11)

Rilevare la densità ottica (A) a 363 nm nel caso di soluzione cloroformica; a 348 nm nel caso di soluzione nella miscela benzene/acetonitrile

Calcolare la concentrazione in microgrammi di aflatossina B_1 per ml di soluzione, partendo dalle seguenti formule:

$\frac{3.12 \cdot A \cdot 1000}{20\,600}$ per la soluzione cloroformica

$\frac{3.12 \cdot A \cdot 1000}{19\,800}$ per la soluzione nella miscela benzene/acetonitrile

Effettuare al riparo dalla luce le opportune diluizioni per ottenere una soluzione campione di lavoro con concentrazione in aflatossina B_1 di circa 0,1 μg per ml. Conservata nel refrigeratore a 4 °C, questa soluzione rimane stabile per due settimane

7.1. *Controllo della purezza cromatografica*

Deporre su una lastra (4.8) 5μl della soluzione campione a 8 — 10μg di aflatossina B_1 per ml (7.1). Sviluppare il cromatogramma come indicato al punto 5.4. Sotto la luce UV, la fluorescenza deve dar luogo alla percezione di una sola macchia e non deve percepirsi alcuna fluorescenza nella zona del deposito originale

8. **Ripetibilità**

La differenza tra i risultati di due determinazioni effettuate in parallelo sullo stesso campione dallo stesso analista non dovrebbe superare:

— 25 % del risultato più elevato per i contenuti in aflatossina B_1 da 10 a 20 μg/kg

— 5 μg, in valore assoluto, per i contenuti superiori a 20 e compresi fino a 50 μg/kg

— 10 % del risultato più elevato per i contenuti superiori a 50 μg/kg

9. **Riproducibilità**

Vedi note, parte C, punto 2.

B. METODO PER CROMATOGRAFIA BIDIMENSIONALE SU STRATO SOTTILE

1. Scopo e campo d'applicazione

Il metodo consente di determinare il contenuto di aflatossina B_1 degli alimenti per gli animali non rientranti nel campo d'applicazione del metodo A. Il limite inferiore di determinazione è di 0,01 mg/kg (10 ppb). Questo metodo non si applica agli alimenti contenenti polpe di agrumi

2. Principio

Il campione è sottoposto ad estrazione con cloroformio. L'estratto viene filtrato; un'aliquota viene prelevata e purificata mediante cromatografia su colonna di gel di silice. L'eluato viene evaporato o il residuo è ripreso con un volume determinato di cloroformio o di una miscela di benzene e acetonitrile. Un'aliquota della soluzione è sottoposta a cromatografia bidimensionale su strato sottile. La quantità di aflatossina B_1 è determinata sotto irradiazione UV del cromatogramma, sia visualmente sia mediante fluorodensitometria, in rapporto a quantità note di aflatossina B_1.

L'identità dell'aflatossina B_1 estratta dall'alimento deve essere confermata con il procedimento indicato.

3. Reattivi

NB: Tutti i reattivi, in mancanza di altre indicazioni, devono essere del tipo « per analisi »

3.1. Acetone

3.2. Cloroformio, stabilizzato con 0,5/1,0 % di etanolo al 96 % (v/v)

3.3. n-Esano

3.4. Metanolo

3.5. Etere dietilico anidro, esente da perossidi

3.6. Miscela di benzene e acetonitrile: 98/2 (v/v)

3.7. Miscela di cloroformio (3.2) e di metanolo (3.4): 97/3 (v/v)

3.8. Gel di silice, per cromatografia su colonna, granulometria: 0,05/0,20 mm.

3.9. Cotone idrofilo, preventivamente sgrassato con cloroformio, o lana di vetro

3.10. Solfato di sodio, anidro, granulato

3.11. Gas inerte, ad esempio azoto

3.12. Acido cloridrico 1 N

3.13. Terra di diatomee (Hiflosupercel), lavata con acido

3.14. Gel di silice G/HR o equivalente, per cromatografia su strato sottile

3.15. Solventi di sviluppo:

3.15.1. Etere dietilico (3.5)/metanolo (3.4)/acqua: 94/4,5/1,5 (v/v/v) vaschetta saturata

3.15.2. Cloroformio (3.2)/acetone (3.1): 9/1 (v/v), vaschetta non saturata

3.16. Soluzione campione a 0,1 μg circa di aflatossina B_1 per ml nel cloroformio (3.2) o nella miscela benzene/acetonitrile (3.6), preparata e controllata come indicato al punto 7 del metodo A

4. Apparecchiatura

Vedi punto 4 del metodo A

5. **Modo di operare**

5.1. *Preparazione del campione*
5.2. *Estrazione*
5.3. *Purificazione su colonna*

} vedi punti 5.1, 5.2 e 5.3 del metodo A

5.4. *Cromatografia bidimensionale su strato sottile*

5.4.1. Applicazione delle soluzioni (seguire lo schema riprodotto nella figura 1)
Tracciare su una lastra (4.8) due rette parallele a due lati contigui (a distanza di rispettivamente 5 e 6 cm da tali lati), destinate a delimitare la migrazione dei fronti dei solventi. Deporre sulla lastra, con pipette capillari o con microsiringhe, le soluzioni sottoindicate:

— *nel punto A,* 20 µl dell'estratto purificato del campione, ottenuto al punto 5.3
— *nel punto B,* 20 µl della soluzione campione (3.16)
— *nel punto C,* 10 µl della soluzione campione (3.16)
— *nel punto D,* 20 µl della soluzione campione (3.16)
— *nel punto E,* 40 µl della soluzione campione (3.16)

Asciugare in leggera corrente d'aria o di gas inerte (3.11). Le macchie ottenute devono avere un diametro di circa 5 mm

5.4.2. Sviluppo (seguire lo schema riprodotto nella figura 1)

Sviluppare il cromatogramma nella direzione I usando il solvente di sviluppo (3.15.1) (strato di 1 cm in vaschetta saturata), al riparo dalla luce, finché il fronte del solvente non raggiunga la linea di delimitazione. Ritirare la lastra dalla vaschetta e lasciar asciugare per 15 minuti al riparo dalla luce e a temperatura ambiente

Sviluppare quindi il cromatogramma nella direzione II usando il solvente di sviluppo (3.15.2) (strato di 1 cm in vaschetta non saturata), al riparo dalla luce, finché il fronte del solvente non raggiunga la linea di delimitazione. Ritirare la lastra dalla vaschetta e lasciar asciugare a temperatura ambiente

5.4.3. Interpretazione del cromatogramma (seguire lo schema riprodotto nella figura 2)

Irradiare il cromatogramma con luce UV collocando la lastra a 10 cm dalla lampada (4.9). Localizzare la posizione delle macchie di fluorescenza blu B, C, D ed E di aflatossina B_1 provenienti dalla soluzione campione e tracciare due rette immaginarie passanti per tali macchie e perpendicolari alle direzioni di sviluppo. Il punto d'intersezione B di tali rette rappresenta la posizione nella quale si dovrebbe trovare la macchia di aflatossina B_1 proveniente dall'estratto del campione deposto nel punto A (figura 1). La posizione effettiva di questa macchia può comunque trovarsi in un punto Q situato all'intersezione di due rette immaginarie formanti tra loro un angolo di circa 100° e passanti rispettivamente per le macchie B e C. Determinare la quantità di aflatossina B_1 dell'estratto del campione come indicato al punto 5.5

5.4.4. Cromatografia complementare

Tracciare su una nuova lastra (4.8) due rette parallele e due lati contigui, come indicato nello schema riprodotto nella figura 1, a deporre nel punto A (figura 1) 20 µl dell'estratto purificato del campione ottenuto al punto 5.3 e, *in sovrapposizione,* 20 µl della soluzione campione (3.16). Sviluppare come indicato al punto 5.4.2. Irradiare il cromatogramma con la luce UV (4.9) e verificare che

— le macchie di aflatossina B_1 dell'estratto e della soluzione campione si sovrappongano
— la fluorescenza di questa macchia sia più intensa di quella della macchia di aflatossina B_1 sviluppata nel punto Q della prima lastra

5.5. *Determinazioni quantitative*

Procedere alle determinazioni sia visualmente sia mediante fluorodensitometria come sotto indicato

5.5.1. Misurazioni visuali

Determinare la quantità di aflatossina B_1 dell'estratto confrontando l'intensità di fluorescenza della macchia dell'estratto con quella delle macchie C, D ed E della

soluzione campione. Interpolare se necessario. Se l'intensità di fluorescenza data dai 20 μl di estratto è più forte di quella dei 40 μl di soluzione campione, diluire l'estratto 10 o 100 volte con cloroformio (3.2) o con la miscela di benzene/acetonitrile (3.6) prima di sottoporlo ad una nuova cromatografia su strato sottile

5.5.2. Misurazioni mediante fluorodensitometria

Misurare l'intensità di fluorescenza delle macchie di aflatossina B_1 con il fluorodensitometro (4.12), utilizzando una lunghezza d'onda di eccitazione di 365 nm e una lunghezza d'onda di emissione di 443 nm

Determinare la quantità di aflatossina B_1 del deposito dell'estratto confrontando le intensità di fluorescenza delle macchie dell'estratto con quelle delle macchie C, D ed E della soluzione campione

5.6. *Conferma dell'identità dell'aflatossina* B_1

Vedi punto 5.6 del metodo A

6. **Calcolo dei risultati**

Vedi punto 6 del metodo A

7. **Ripetibilità**

Vedi punto 8 del metodo A

8. **Riproducibilità**

Vedi note, parte C, punto 2

C. NOTE SUI METODI A E B

1. **Sgrassatura**

I campioni contenenti più del 5% di sostanze grasse devono essere sgrassati con etere di petrolio (p.e. 40 — 60°) dopo la preparazione del campione indicata al punto 5.1. In questi casi, i risultati devono essere riferiti al peso del campione non sgrassato

2. **Riproducibilità dei risultati**

La riproducibilità dei risultati, cioè la variazione tra i risultati ottenuti da due o più laboratori relativi allo stesso campione, è stata valutata a:

± 50% del valore medio dei risultati per i valori medi in aflatossina B_1 da 10 a 20 μg/kg

± 10 μg/kg del valore medio per i valori medi superiori a 20 e compresi fino a 50 μg/kg

± 20% del valore medio per i valori medi superiori a 50 μg/kg

ALLEGATO

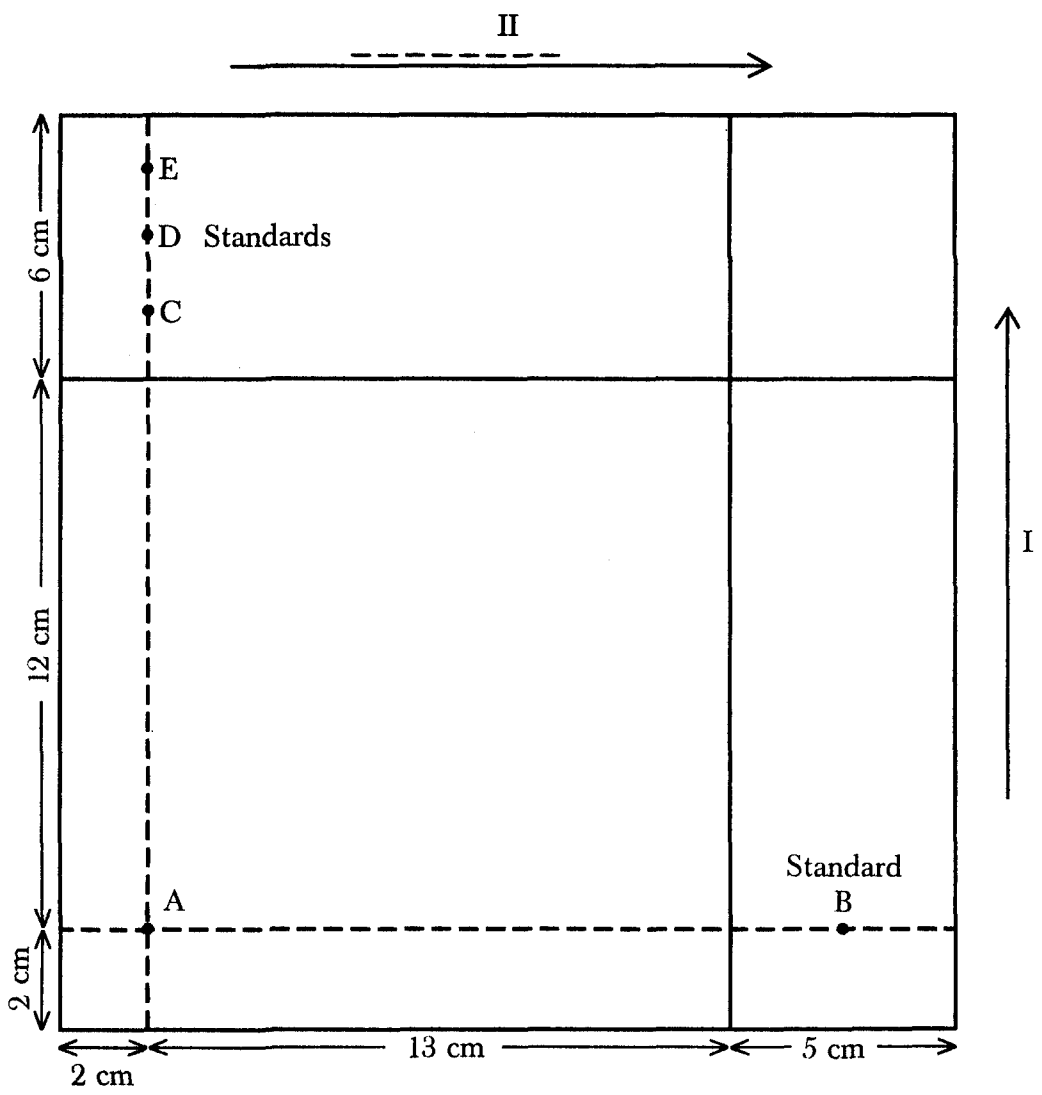

Figura 1

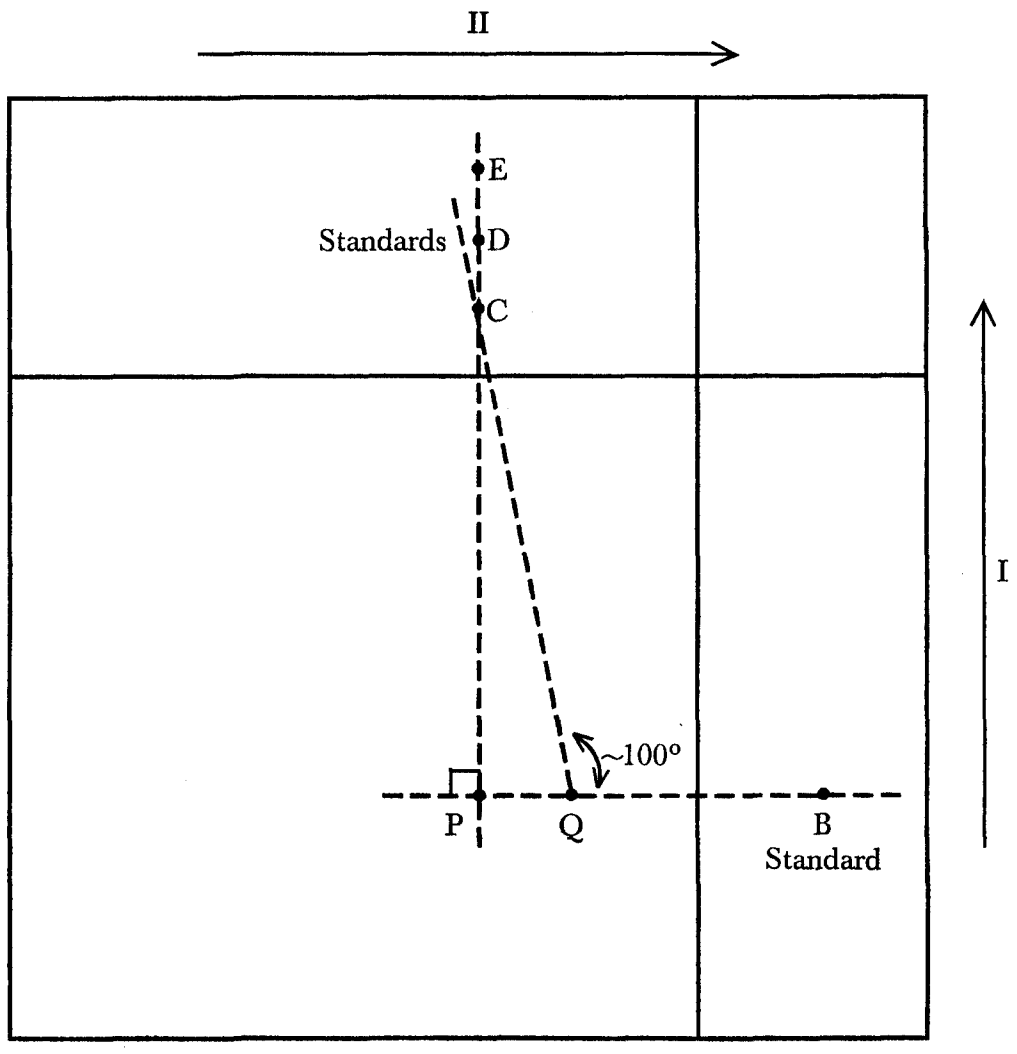

Figura 2

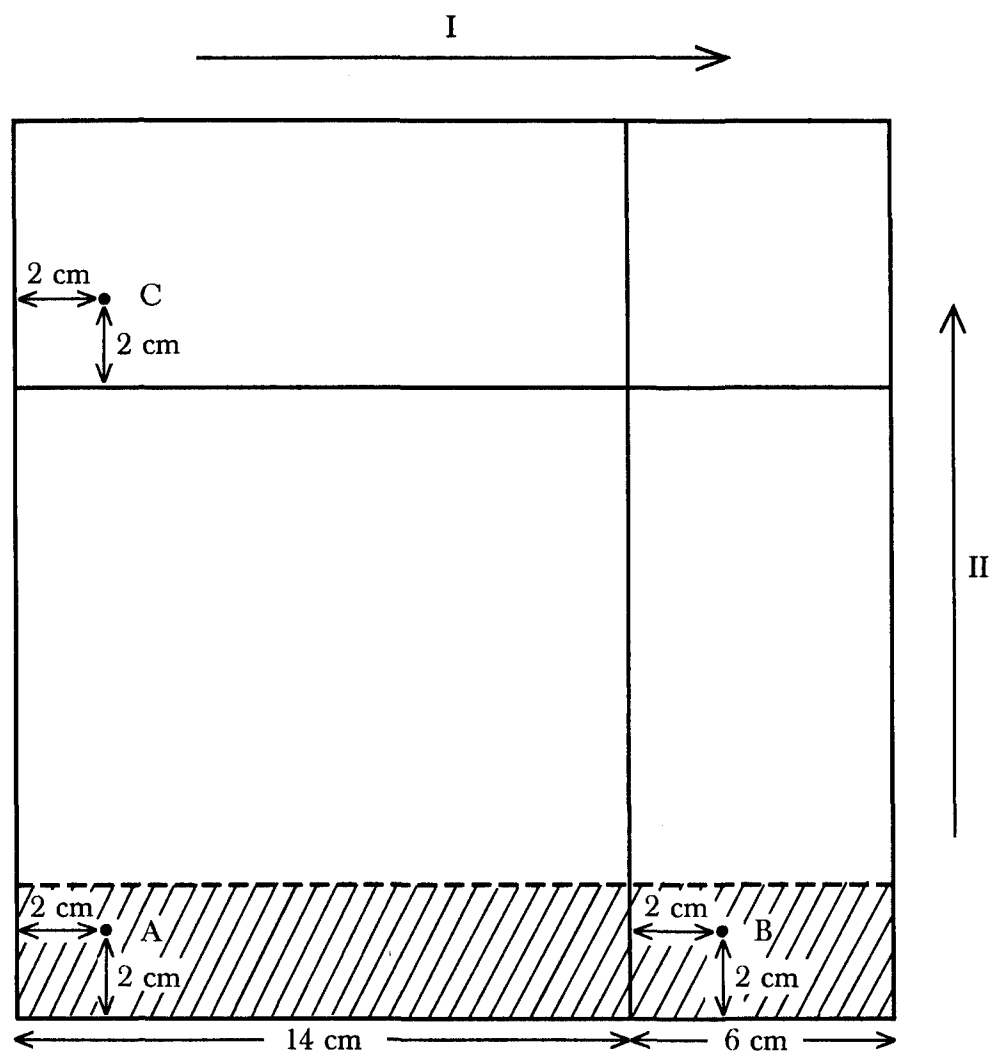

Figura 3