376L0372

Nº L 102/8 Diario Oficial de las Comunidades Europeas 15. 4. 76

SÉPTIMA DIRECTIVA DE LA COMISIÓN

de 1 de marzo de 1976

sobre determinación de métodos de análisis comunitarios para el control oficial de la alimentación animal

(76/372/CEE)

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Económica Europea,

Vista la Directiva del Consejo, de 20 de julio de 1970, referente a la introducción de modos de tomas de muestras y de métodos de análisis comunitarios para el control oficial de la alimentación animal (1), modificada en último lugar por el Acta de adhesión (2) y, en particular, su artículo 2,

Considerando que la Directiva arriba contemplada prevé que los controles oficiales de la alimentación animal dirigidos a comprobar que se respetan las condiciones prescritas en virtud de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas referentes a la calidad y a la composición de la alimentación animal, se llevan a cabo según los modos de tomas de muestras y los métodos de análisis comunitarios,

Considerando que las Directivas 71/250/CEE, 71/393/CEE, 72/199/CEE, 73/46/CEE, 74/203/CEE y 75/84/CEE de la Comisión, de 15 de junio de 1971 (3), 18 de noviembre de 1971 (4), 27 de abril de 1972 (5), 5 de diciembre de 1972 (6), 25 de marzo de 1974 (7) y 20 de diciembre de 1974 (8), establecieron ya un determinado número de métodos de análisis comunitarios; que habida cuenta del avanzado estado de los trabajos llevados a cabo desde entonces,conviene adoptar una séptima serie de métodos,

Considerando que las medidas previstas en la presente Directiva concuerdan con el dictamen del Comité permanente de la alimentación animal.

HA ADOPTADO LA PRESENTE DIRECTIVA:

Artículo 1

Los Estados miembros dispondrán que los análisis para los controles oficiales de alimentación animal, en lo referente a su contenido en aflatoxina B_1 se llevarán a cabo según los métodos descritos en el Anexo de la presente Directiva.

Las disposiciones generales que figuren en la parte I (introducción) del Anexo de la primera Directiva 71/250/CEE de la Comisión, de 15 de junio de 1971, excepto la parte referente a la preparación de la muestra que debe analizarse, serán aplicables a los métodos descritos en el Anexo de la presente Directiva.

Artículo 2

Los Estados miembros aplicarán, a más tardar, el 1 de octubre de 1976, las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas necesarias para cumplir la presente Directiva e informarán de ello inmediatamente a la Comisión.

Artículo 3

Los destinatarios de la presente Directiva serán los Estados miembros.

Hecho en Bruselas, el 1 de marzo de 1976.

Por la Comisión

P. J. LARDINOIS

Miembro de la Comisión

(1) DO nº L 170 de 3. 8. 1970, p. 2.
(2) DO nº L 73 de 27. 3. 1972, p. 14.
(3) DO nº L 155 de 12. 7. 1971, p. 13.
(4) DO nº L 279 de 20. 12. 1971, p. 7.
(5) DO nº L 123 de 29. 5. 1972, p. 6.
(6) DO nº L 83 de 30. 3. 1973, p. 21.
(7) DO nº L 108 de 22. 4. 1974, p. 7.
(8) DO nº L 32 de 5. 2. 1975, p. 26.

ANEXO

DOSIFICACIÓN DE LA AFLATOXINA B_1

A. MÉTODO POR CROMATOGRAFÍA MONODIMENSIONAL EN CAPA FINA

1. **Objeto y ámbito de aplicación**

El método permite determinar el contenido de aflatoxina B_1 de los alimentos siguientes: tortas de cacahuetes, de copra, de lino, de soja, de sésamo de babasú y de gérmenes de maíz, cereales y derivados, harina de guisantes, pulpa y fécula de patatas. El límite inferior de la dosificación es de O,01 mg/kg (10 ppb).

En presencia de sustancias interferentes que obstaculicen las determinaciones, conviene recomenzar el análisis según el método B (por cromatografía bidimensional en capa fina).

2. **Principio**

La muestra se somete a la extracción mediante cloroformo. Se filtra el extracto y se toma del mismo una parte alicuota que es purificada mediante cromatografía en columna de gel de sílice. El eluido se evapora y el residuo se vuelve a tomar mediante un volumen determinado de cloroformo o de una mezcla de benceno y acetonitrilo. Una parte alicuota de dicha solución se somete a la cromatografía en capa fina. La cantidad de aflatoxina B_1 se determina bajo irradiación ultravioleta del cromatograma bien sea visualmente, o a través de fluordensitometría, mediante comparación con cantidades conocidas de aflatoxina B_1-tipo. La identidad de la aflatoxina B_1 extraida del alimento debe confirmarse mediante los procedimientos indicados.

3. **Reactivos**

NB: Todos los reactivos deben ser de calidad «para el análisis» en la medida en que no se ha dado ninguna otra indicación.

3.1. Acetona.

3.2. Cloroformo, estabilizado por del 0,5 al 1,0 por ciento de etanol de 96° (v/v).

3.3. n-Hexano.

3.4. Metanol.

3.5. Eter dietílico anhídrido, exento de peróxidos.

3.6. Mezcla de benceno y de acetonitrilo: 98/2 (v/v).

3.7. Mezcla de cloroformo (3.2) y de metanol (3.4): 97/3 (v/v).

3.8. Gel de sílice, para cromatografía en columna, granulometría: de 0,05 a 0,20 mm.

3.9. Algodón hidrófilo, previamente desengrasado mediante cloroformo, o lana de vidrio.

3.10. Sulfato de sodio, anhidro, granulado.

3.11. Gas inerte, por ejemplo: ázoe.

3.12. Acido clorhídrico 1 N.

3.13. Acidó sulfúrico al 50 por ciento (v/v).

3.14. Tierra de diatomeas (Hiflosupercel) lavada con ácido.

3.15. Gel de sílice G-HR o equivalente, para cromatografía en capa fina.

3.16. Solución tipo de 0,1 µgr. aproximadamente de aflatoxina B_1 por milímetro en el cloroformo (3.2) o en la mezcla de benceno/acetonitrilo (3.6), preparada y controlada como se indica en el punto 7.

3.17. Solución tipo cualitativa de 0,1 µgr. aproximadamente de aflatoxina B_1 y B_2 por ml en el cloroformo (3.2) o en la mezcla benceno/acetonitrilo (3.6). Estas concentraciones se dan a título indicativo y deben ajustarse con objeto de obtener la misma intensidad de fluorescencia para las dos aflatoxinas.

3.18. Disolventes de revelado:

3.18.1. Cloroformo (3.2)/acetona (3.1): 9/1 (v/v), cubeta no saturada;

3.18.2. Eter dietílico (3.5)/metanol (3.4)/agua: 96/3/1 (v/v/v), cubeta no saturada;

3.18.3. Eter dietílico (3.5)/metanol (3.4)/agua: 94/4,5/1,5 (v/v/v), cubeta saturada;

3.18.4. Cloroformo (3.2)/metanol (3.4): 94/6 (v/v), cubeta saturada;

3.18.5 Cloroformo (3.2)/metanol (3.4): 97/3 (v/v), cubeta saturada.

4. **Equipo**

4.1. Triturador-mezclador.

4.2. Aparato para agitar o agitador magnético.

4.3. Filtros plegados, Schleicher y Schüll n° 588 o equivalente, diámetro: 24 cm.

4.4. Tubos para cromatografía, de cristal (diámetro interior: 22 mm, longitud 300 mm), con grifo de teflón y depósito de 250 ml.

4.5. Aparato rotativo de evaporación en vacío, con matraz de 500 ml.

4.6. Frascos cónicos de 500 ml, con tapón esmerilado.

4.7. Equipo para cromatografía en capa fina.

4.8. Placas de vidrio para cromatografía en capa fina, 200 × 200 mm, preparadas de la siguiente manera (con las cantidades indicadas se pueden recubrir cinco placas): introducir 30 grs. de gel de sílice G-HR (3.15) en un frasco cónico, añadir 60 ml de agua, tapar y agitar durante un minuto. Extender la suspensión en las placas con objeto de obtener una capa uniforme de 0,25 mm de espesor. Dejar secar al aire y conservar después en un desecador provisto de gel de sílice. En el momento de su utilización, activar las placas manteniéndolas durante una hora en la estufa a 110 n° C.

Las placas ya listas para su utilización son prácticas en la medida en que dan resultados parecidos a los de las placas preparadas según se ha indicado más arriba.

4.9. Lámpara ultravioleta de ondas largas (360 nm). La intensidad de irradiación debe permitir distinguir, incluso con claridad, una mancha de 1,0 ngr. de aflatoxina B1 en una placa para cromatografía en capa fina, a una distancia de 10 cm de la lámpara.

4.10. Tubos de 10 ml, graduados, con tapones de polietileno.

4.11. Espectrofotómetro ultravioleta.

4.12. Fluordensitómetro (eventualmente).

5. **Modo de operar**

5.1. *Preparación de la muestra* (ver las observaciones del punto 1 de la parte C)

Triturar la muestra de manera que pase completamentte a través de un tamiz de mallas del mm (conforme a la recomendación ISO R 565).

5.2. *Extracción*

Introducir 50,0 g de la muestra molida y homogeneizada en un frasco cónico de 500 ml (4.6). Añadir 25 g de tierra de diatomeas (3.14), 25 ml de agua y 250 ml de cloroformo (3.2). Tapar el frasco, sacudir o agitar durante 30 minutos con ayuda del aparato (4.2) y filtrar mediante el filtro plegado (4.3). Eliminar los 10 primeros ml del resultado de la filtración y recoger a continuación 50 ml.

5.3. *Purificación en columna*

Proveer la extremidad inferior de un tubo para cromatografía (4.4) de un tapón de algodón o de lana de vidrio (3.9), llenar los dos tercios del tubo de cloroformo (3.2) y añadir 5 g de sulfato de sodio (3.10).

Comprobar que la superificie superior de la capa de sulfato de sodio está plana; añadir a continuación, en pequeñas porciones, 10 g de gel de sílice (3.8). Remover con precaución después de cada adición con el fin de eliminar las burbujas de aire. Dejar que se pose durante 15 minutos y añadir seguidamente, con precaución, 15 g de sulfato de sodio (3.10). Dejar descender el líquido hasta la proximidad inmediata de la superficie superior de la capa de sulfato de sodio.

Mezclar los 50 ml de extracto recogidos en 5.2 con 100 ml de n-hexano (3.3) y transvasar cuantitativamente la mezcla en la columna. Dejar descender el líquido hasta la superficie superior de la capa de sulfato de sodio. Eliminar el líquido derramado. Añadir a continuación 100 ml de éter dietílico (3.5) y dejar descender de nuevo el líquido hasta la superficie superior de la capa de sulfato de sodio. Durante estas operaciones, procurar que el líquido derramado sea de 8 a 12 ml por minuto y que la columna no se vacíe. Eliminar los líquidos derramados. Eluir después mediante 150 ml de la mezcla cloroformo/metanol (3.7) y recoger la totalidad del eluido.

Evaporar éste casi hasta vaciarlo, bajo una corriente de gas inerte (3.11) y a una temperatura que no supere los 50 n°C, mediante el aparato rotativo de evaporación en vacío (4.5). Introducir cuantitativamente el residuo por medio de cloroformo (3.2) o de la mezcla benceno/-acetonitrilo (3.6) en un tubo de 10 ml (4.10). Concentrar la solución bajo una corriente de gas inerte (3.11) y llevar después el volumen a 2,0 ml por medio de cloroformo (3.2) o de la mezcla benceno/acetonitrilo (3.6).

5.4. *Cromatografía en capa fina*

Depositar puntualmente en una placa para cromatografía en capa fina (4.8), a 2 cm del borde inferior y a intervalos de 2 cm, los volúmenes de la solución tipo y del extracto indicados a continuación:

— 10, 15, 20, 30 y 40 µl de la solución tipo de aflatoxina B_1 (3.16);

— 10 µl del extracto obtenido en 5.3 y, en superposición en el mismo punto, 20 µl de la solución tipo (3.16);

— 10 y 20 µl del extracto obtenido en 5.3.

Revelar el cromatograma fuera del alcance de la luz, con ayuda de uno de los disolventes de revelado (3.18). La elección del disolvente debe determinarse previamente depositando en la placa 25 µl de la solución tipo cualitativa (3.17) y asegurándose de que, durante el revelado, las aflatoxinas B_1 y B_2 están completamente separadas.

Dejar evaporar los disolventes fuera del alcance de la luz e irradiar a continuación mediante luz ultravioleta, colocando la placa a 10 cm de la lámpara (4.9). Las manchas de aflatoxina B_1 dan una fluorescencia azul.

5.5. *Determinaciones cuantitativas*

Proceder a las determinaciones bien sea visualmente, o mediante fluordensitometría según se indica en lo sucesivo:

5.5.1. Medidas visuales

Determinar la cantidad de aflatoxina B_1 del extracto comparando la intensidad de fluorescencia de las manchas del extracto con la de las manchas de la solución tipo. Interpolar si es necesario. La fluorescencia obtenida por superposición del extracto a la solución tipo deber ser más fuerte que la de los 10 µl de extracto y únicamente debe dar lugar a la percepción de una sóla mancha. Si la intensidad de fluorescencia dada por los 10 µl de extracto es más fuerte que la de los 40 µl de solución tipo, diluir el extracto 10 o 100 veces mediante cloroformo (3.2) o mediante la mezcla de benceno/acetonitrilo (3.6) antes de someterlo a una nueva cromatografía en capa fina.

5.5.2. Medidas por fluordensitometría

Medir la intensidad de fluorescencia de las manchas de aflatoxina B_1 en el fluordensitómetro (4.12) utilizando una longitud de onda de excitación de 365 nm y una longitud de onda de emisión de 443 nm. Determinar la cantidad de aflatoxina B_1 de los depósitos del extracto y de la solución tipo.

5.6. *Confirmación de la identidad de aflatoxina B_1*

Confirmar la identidad de la aflatoxina B_1 del extracto mediante los siguientes procedimientos:

5.6.1. Tratamiento por ácido sulfúrico.

Pulverizar ácido sulfúrico (3.13) sobre el cromatograma obtenido en 5.4. La fluorescencia de las manchas de aflatoxina B_1 debe virar del azul al amarillo bajo irradiación ultavioleta.

5.6.2. Cromatografía bidimensional que implique la formación de aflatoxina B_1 — semiacetal (aflatoxina B_{2a})

NB: Las operaciones descritas en lo sucesivo deben llevarse a cabo siguiendo el esquema que aparece en la figura 3.

5.6.2.1. Aplicación de las soluciones

Trazar en una placa (4.8) dos rectas paralelas a dos lados contiguos (distantes 6 cm de esos lados), destinadas a delimitar el desplazamiento de los frentes de disolventes. Depositar en una placa, con ayuda de pipetas capilares o de microjeringas, las soluciones indicadas en lo sucesivo:

— *en el punto A:* un volumen de extracto purificado de la muestra obtenida en 5.3, que contenga 2,5 nanogramos aproximadamente de aflatoxina B_1;

— *en los puntos B y C:* 25 µl de la solución tipo (3.16).

5.6.2.2. Revelado

Revelar el cromatograma en la dirección I con ayuda del disolvente de revelado (3.18.1) [capa de 1 cm en una cubeta no saturada], fuera del alcance de la luz, hasta que el frente de disolvente alcance la línea de delimitación. Retirar la placa de la cubeta y dejar secar durante cinco minutos fuera del alcance de la luz y a la temperatura ambiente. Pulverizar a continuación ácido clorhídrico (3.12) en una banda de 2,5 cm de altura que abarque los puntos A y B (indicada con trazos rayados en la figura 3), hasta su oscurecimiento, protegiendo el resto de la placa mediante una hoja de vidrio. Dejar reaccionar durante diez minutos en la obscuridad y secar con ayuda de una corriente de aire a la temperatura ambiente.

Revelar a continuación el cromatograma en la dirección II con ayuda del disolvente de revelado (3.18.1) [capa de 1 cm en una cubeta no saturada], fuera del alcance de la luz, hasta que el frente del disolvente alcance la línea de delimitación. Retirar la placa de la cubeta y dejar secar a la temperatura ambiente.

5.6.2.3. Interpretación del cromatograma

Examinar el cromatograma con luz ultravioleta (4.9) y comprobar las observaciones indicadas en lo sucesivo:

a) Aparición de una mancha fluorescente azul de aflatoxina B_1 procedente de la solución tipo depositada en C (desplazamiento en la dirección I).

b) Aparición de una mancha fluorescente azul de aflatoxina B_1 (que no ha reaccionado con el ácido clorhídrico) y de una mancha fluorescente azul más intensa de aflatoxina B_1 — semiacetal, procedente de la solución tipo depositada en B (desplazamiento en la dirección II).

c) Aparición de manchas similares a las indicadas en la letra b), procedentes del extracto de la muestra depositado en A. El emplazamiento de estas manchas está definido por la distancia de desplazamiento de la aflatoxina B_1 a partir del punto A en la dirección I (la misma distancia que la recorrida por la solución tipo depositada en C) seguida de las distancias de desplazamiento recorridas en la dirección II por la aflatoxina B_1 (que no ha reaccionado con el ácido clorhídrico) y por la aflatoxina B_1 — semiacetal (las mismas distancias que las recorridas por la solución tipo depositada en B). Las intensidades de fluorescencia de las manchas de semiacetal procedentes del extracto y de la solución tipo deberían corresponderse.

6. Cálculo de resultados

6.1. *A partir de medidas visuales*

El contenido en microgramos de aflatoxina B_1 por kilogramo de muestra (ppb) viene dado por la fórmula

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

en la cual:

X e Y son respectivamente los volúmenes en microlitros de solución tipo de aflatoxina B_1 (3.16) y del extracto, que tienen una intensidad de fluorescencia semejante;

S = concentración en microgramos de aflatoxina B_1 por ml de la solución tipo (3.16);

V = volumen final del extracto en microlitros, habida cuenta de las eventuales diluciones;

W = peso en gramos de la toma de prueba correspondiente al volumen de extracto sometido a la purificación en columna.

6.2. *A partir de medidas fluordensitométricas*

El contenido en microgramos de aflatoxina B_1 por kilogramo de muestra (ppb) viene dado por la fórmula

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

en la cual:

Y = volumen en microlitros del extracto depositado en la placa (10 o 20 µl);

S = cantidad en nanogramos de aflatoxina B_1 del depósito del extracto (habida cuenta del volumen Y), deducida de las determinaciones;

V = volumen final del extracto en microlitros, habida cuenta de las eventuales diluciones;

W = peso en gramos de la toma de prueba, correspondiente al volumen de extracto sometido a la purificación en columna.

7. **Preparación y control de la solución tipo (3.16)**

7.1. *Determinación de la concentración en aflatoxina B_1*

Preparar una solución tipo de aflatoxina B_1 en el cloroformo (3.2) o en la mezcla benceno/-acetonitrilo (3.6) cuya concentración es de 8 a 10 µgrs por milílitro. Determinar el espectro de absorción entre 330 y 370 nm con ayuda de un espectrofotómetro (4.11).

Elevar la densidad óptica (A) a 363 nm en el caso de la solución clorofórmica y a 348 nm en el caso de la solución en la mezcla benceno/acetonitrilo.

Calcular la concentración de microgramos de aflatoxina B_1 por milílitro de solución a partir de las siguientes fórmulas:

$\frac{312 \cdot A \cdot 1000}{20600}$ para la solución clorofórmica;

$\frac{312 \cdot A \cdot 1000}{19800}$ para la solución en la mezcla benceno/acetonitrilo.

Fuera del alcance de la luz, efectuar las diluciones convenientes para obtener una solución tipo de trabajo cuya concentración en aflatoxina B_1 es de 0,1 µg aproximadamente por milílitro. Conservada en el refrigerador, dicha solución permanece estable durante dos semanas.

7.2. *Control de la pureza cromatográfica*

Depositar en una placa (4.8) 5 µl de la solución tipo en 8-10 µg de aflatoxina B_1 por milílitro (ver 7.1). Revelar el cromatograma según se ha indicado en 5.4. Con la luz ultravioleta, la fluorescencia sólo debe dar lugar a la percepción de una sola mancha y no debe percibirse ninguna fluorescencia en la zona del depósito de origen.

8. **Repetibilidad**

La diferencia entre los resultados de las dos determinaciones paralelas efectuadas en la misma muestra por el mismo analista no debería superar:

— el 25 por ciento del resultado más elevado para los contenidos en aflatoxina B_1 de 10 a 20 µg/kg,

— 5 µg, en valor absoluto, para los contenidos de 20 a 50 µg/kg,

— el 10 por ciento del resultado más elevado para los contenidos superiores a 50 µg/kg.

9. **Reproductibilidad**

Ver las observaciones del punto 2 de la parte C.

B. MÉTODO POR CROMATOGRAFÍA BIDIMENSIONAL EN CAPA FINA

1. **Objeto y ámbito de aplicación**

El método permite determinar el contenido en aflatoxina B_1 de la alimentación animal que no entra dentro del ámbito de aplicación del método A. El límite inferior de la dosificación es de 0,01 mg/kg (10 ppb). El método no se aplica a alimentos que contengan pulpas de agrios.

2. **Principio**

La muestra se somete a la extracción mediante cloroformo. Se filtra el extracto y se toma del mismo una parte alicuota que es purificada mediante cromatografía en columna de gel de sílice. El eluido evapora y el residuo se vuelve a tomar mediante un volumen determinado de cloroformo o de una mezcla de benceno y acetonitrilo. Una parte alicuota de dicha solución se somete a la cromatografía bidimensional en capa fina. La cantidad de aflatoxina B_1 se determina bajo irradiación ultravioleta del cromatograma, bien sea visualmente, o a través de fluordensitometría, mediante comparación con cantidades conocidas de aflatoxina B_1 extraida del alimento debe confirmarse mediante el procedimiento indicado.

3. **Reactivos**

NB: Todos los reactivos deben ser de calidad «para el análisis» en la medida en que no se ha dado ninguna otra indicación.

3.1. Acetona.

3.2. Cloroformo, estabilizado por del 0,5 al 1,0 por ciento de etanol de 96° (v/V).

3.3. n-Hexano.

3.4. Metanol.

3.5. Eter dietílico anhídrido, exento de peróxidos.

3.6. Mezcla de benceno y de acetonitrilo: 98/2 (v/v).

3.7. Mezcla de cloroformo (3.2) y de metanol (3.4): 97/3 (v/v).

3.8. Gel de sílice, para cromatografía en columna, granulometría: de 0,05 a 0,20 mm.

3.9. Algodón hidrófilo, previamente extraído mediante el cloroformo, o lana de vidrio.

3.10. Sulfato de sodio, anhídrido, granulado.

3.11. Gas inerte, por ejemplo: ázoe.

3.12. Acido clorhídrico 1 N.

3.13. Tierra de diatomeas (Hiflosupercel) lavada con ácido.

3.14. Gel de sílice G-HR o equivalente, para cromatografía en capa fina.

3.15. Disolventes de revelado.

3.15.1. Eter dietílico (3.5)/metanol (3.4)/agua: 94/4,5/1,5 (v/v/v), cubeta saturada.

3.15.2. Cloroformo (3.2)/acetona (3.1): 9/1 (v/v) cubeta no saturada.

3.16. Solución tipo de 0,1 µgr. approximadamente de aflotoxina B_1 por milímetro en el cloroformo (3.2) o en la mezcla benceno/acetonitrilo(3.6), preparada y controlada como se indica en el punto 7 del método A.

4. **Equipo**

Ver punto 4 del método A.

5. **Modo de operar**

5.1. *Preparación de la muestra*

5.2. *Extracción*

5.3. *Purificación en columna*

ver puntos 5.1, 5.2 y 5.3 del método A.

5.4. *Cromatografiá bidimensional en capa fina.*

5.4.1. Aplicación de las soluciones (seguir el esquema que aparece en la figura 1)

Trazar en una placa (4.8) dos rectas paralelas a dos lados contiguos (a 5 y 6 cm de distancia respectivamente de estos lados), destinadas a delimitar el desplazamiento de los frentes de disolventes. Depositar en la placa con ayuda de pipetas capilares o de microjeringas las soluciones indicadas en lo sucesivo:

— *en el punto A,* 20 µl del extracto purificado de la muestra, obtenido en 5.3,

— *en el punto B,* 20 µl de la solución tipo (3.16),

— *en el punto C,* 10 µl de la solución tipo (3.16),

— *en el punto D,* 20 µl de la solución tipo (3.16),

— *en el punto E,* 40 µl de la solución tipo (3.16).

Secar con ayuda de una ligera corriente de aire o con gas inerte (3.11). Las manchas obtenidas deben tener un diámetro de alrededor de 5 mm.

5.4.2. Revelado (seguir el esquema que aparece en la figura 1).

Revelar el cromatograma en la dirección I con ayuda del disolvente de revelado (3.15.1) [capa de 1 cm en una cubeta saturada], fuera del alcance de la luz, hasta que el frente del disolvente alcance la línea de delimitación. Retirar la placa de la cubeta y dejar secar, al menos durante quince minutos, fuera del alcance de la luz y a temperatura ambiente.

Revelar a continuación el cromatograma en la dirección II con ayuda del disolvente de revelado (3.15.2) [capa de 1 cm en una cubeta no saturada], fuera del alcance de la luz, hasta que el frente del disolvente alcance la línea de delimitación. Reitrar la placa de la cubeta y dejar secar, fuera del alcance de la luz y a temperatura ambiente.

5.4.3. Interpretación del cromatograma (seguir el esquema que aparece en la figura 2)

Irradiar el cromatograma mediante luz ultravioleta colocando la placa a 10 cm de la lámpara (4.9). Localizar el emplazamiento de las manchas de fluorescencia azul B, C, D y E de aflatoxina B_1 procedentes de la solución tipo y trazar dos rectas imaginarias que pasen por estas manchas y perpendiculares a las direcciones de revelado. El punto de intersección P de estas rectas es el emplazamiento en donde debería encontrarse la mancha de aflatoxina B_1 procedente del extracto de la muestra depositado en A (figura 1). No obstante, el emplazamiento en donde debería encontrarse la mancha de aflatoxina B_1 procedente del extracto de la muestra depositado en A (figura 1). No obstante, el emplazamiento real de esta mancha puede encontrarse en un punto Q situado en la intersección de dos rectas imaginarias que formen entre sí un ángulo de aproximadamente 100 grados y que pase respectivamente por las manchas B y C. Determinar la cantidad de aflatoxina B_1 del extracto de la muestra según se indica en 5.5.

5.4.4. Cromatografía complementaria

Trazar en una nueva placa (4.8) dos rectas paralelas a dos lados contiguos, según se indica en el esquema de la figura 1, y depositar en el punto A (ver figura 1) 20 µl del extracto purificado de la muestra obtenida en 5.3 y, en superposición, 20 µl de la solución tipo (3.16). Revelar según se indica en 5.4.2. Irradiar el cromatograma mediante luz ultravioleta (4.9) y comprobar que:

— las manchas de aflatoxina B_1 del extracto y de la solución tipo se superponen,

— la fluorescencia de esta mancha es más intensa que la de la mancha de aflatoxina B_1 revelada en el punto Q de la primera placa.

— la fluorescencia de esta mancha es más intensa que la de la mancha de aflatoxina B_1 revelada en el punto Q de la primera placa.

5.5. *Determinaciones cuantitativas*

Proceder a las determinaciones, bien sea visualmente o mediante fluordensitometría, según se indica en lo sucesivo:

5.5.1. Medidas visuales

Determinar la cantidad de aflatoxina B_1 del extracto comparando la intensidad de fluorescencia de la mancha del extracto con la de las manchas C, D y E de la solución tipo. Interpolar si es necesario. Si la intensidad de la fluorescencia dada por los 20 µl del extracto

es más fuerte que la de los 40 µl de solución tipo, diluir el extracto 10 o 100 vecez mediante cloroformo (3.2) o mediante la mezcla de benceno/acetonitrilo (3.6) antes de someterlo a una nueva cromatografía en capa fina.

5.5.2. Medidas por fluordensitometría

Medir la intensidad de fluorescencia de las manchas de aflatoxina B_1 con el fluordensitómetro (4.12) utilizando una longitud de onda de excitación de 365 nm y una longitud de emisión de 443 nm.

Determinar la cantidad de aflatoxina B_1 del depósito del extracto comparando la intensidad de fluorescencia de la mancha del extracto con la de las manchas C, D y E de la colución tipo.

5.6. *Confirmación de la identidad de la aflatoxina B_1*

Ver punto 5.6 del método A.

6. **Cálculo de los resultados**

Ver punto 6 del método A.

7. **Repetibilidad**

Ver punto B del método A.

8. **Reproductibilidad**

Ver las observaciones del punto 2 de la parte C.

C. OBSERVACIONES REFERENTES A LOS MÉTODOS A Y B

1. **Desengrasado**

Las muestras que contengan más del 5 por ciento de materias grasas deben desengrasarse mediante éter de petróleo (éb. 40-60°C) tras la preparación indicada en 5.1. En dichos casos, los resultados del análisis deben atribuirse al peso de la muestra no desengrasada.

2. **Reproductibilidad de los resultados**

La reproductibilidad de los resultados, es decir la variación entre los resultados obtenidos por dos o más laboratorios sobre la misma muestra, se ha calculado en:

- ± 50 por ciento del valor medio de los resultados para los valores medios en aflatoxina B_1 de 10 a 20 µg/kg,
- ± 10 µg/kg a partir del valor medio para los valores medios de 20 a 50 µg/kg,
- ± 20 por ciento del valor medio para los valores medios superiores a 50 µg/kg.

ANEXO

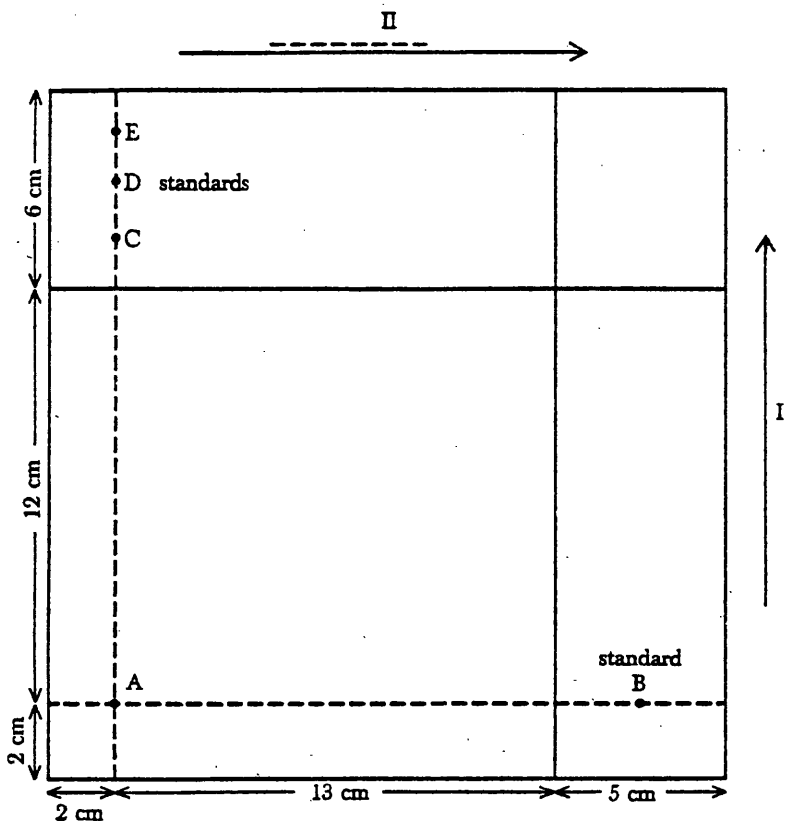


Figura 1

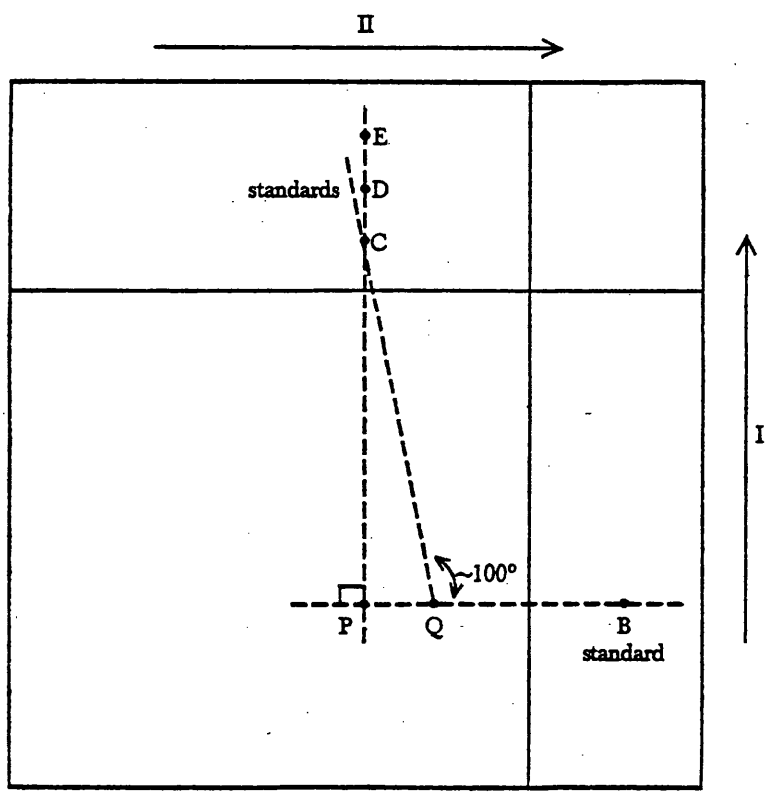


Figura 2

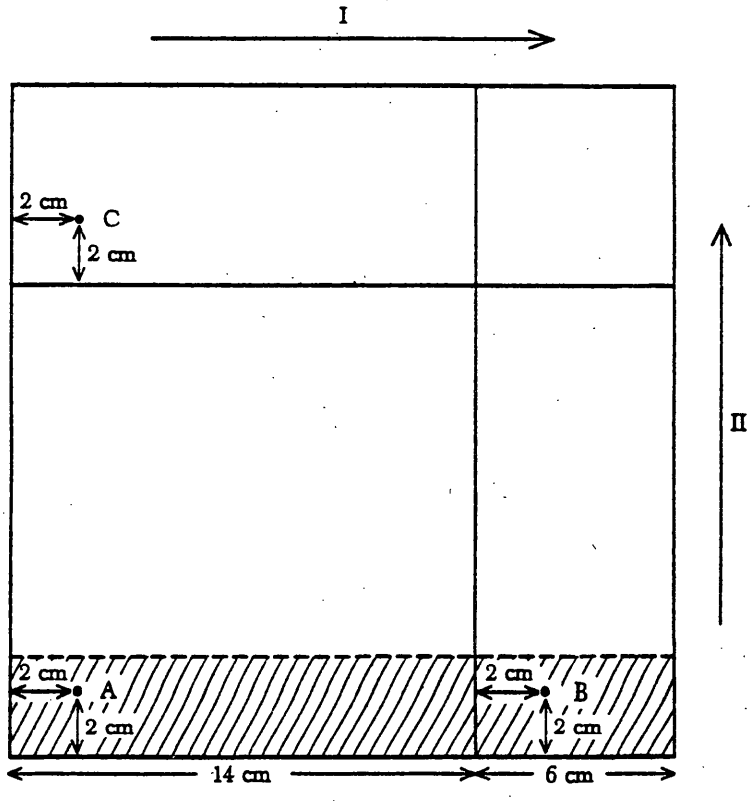


Figura 3