31976L0372

SEITSMES KOMISJONI DIREKTIIV,

1. märts 1976,

millega kehtestatakse ühenduse analüüsimeetodid söötade ametlikuks kontrollimiseks

(76/372/EMÜ)

EUROOPA ÜHENDUSTE KOMISJON,

võttes arvesse Euroopa Majandusühenduse asutamislepingut,

võttes arvesse nõukogu 20. juuli 1970. aasta direktiivi 70/373/EMÜ söötade ametlikuks kontrollimiseks ettenähtud ühenduse proovivõtu- ja analüüsimeetodite kehtestamise kohta, ([1]) viimati muudetud ühinemisaktiga, ([2]) eriti selle artiklit 2,

ning arvestades, et:

kõnealuse direktiiviga nähakse ette, et söötade ametlik kontrollimine söötade kvaliteeti ja koostist reguleerivate õigusaktide nõuetele vastavuse kindlakstegemiseks peab toimuma ühenduse proovivõtu- ja analüüsimeetodite abil;

komisjoni 15. juuni 1971. aasta direktiivis 71/250/EMÜ, ([3]) 18. novembri 1971. aasta direktiivis 71/393/EMÜ, ([4]) 27. aprilli 1972. aasta direktiivis 72/199/EMÜ, ([5]) 5. detsembri 1972. aasta direktiivis 73/46/EMÜ, ([6]) 25. märtsi 1974. aasta direktiivis 74/203/EMÜ ([7]) ja 20. detsembri 1974. aasta direktiivis 75/84/EMÜ ([8]) on juba kehtestatud hulk ühenduse analüüsimeetodeid; silmas pidades edusamme pärast kõnealuse direktiivi vastuvõtmist tehtud töös, on soovitatav võtta vastu seitsmes rühm meetodeid;

käesoleva direktiiviga ettenähtud meetmed on kooskõlas alalise söödakomitee arvamusega,

ON VASTU VÕTNUD KÄESOLEVA DIREKTIIVI:

Artikkel 1

Liikmesriigid sätestavad, et söötade ametliku kontrolli raames ettenähtud analüüsid aflatoksiin B_1 sisalduse määramiseks tehakse käesoleva direktiivi lisas kirjeldatud meetodite kohaselt.

Käesoleva direktiivi lisas kirjeldatud meetodite suhtes kohaldatakse komisjoni 15. juuni 1971. aasta esimese direktiivi 71/250/EMÜ lisa I 1. osa (Sissejuhatus) üldsätteid, v.a analüüsitava proovi ettevalmistamist käsitlevaid sätteid.

Artikkel 2

Liikmesriigid jõustavad käesoleva direktiivi järgimiseks vajalikud õigusnormid hiljemalt 1. oktoobril 1976. Nad teatavad sellest viivitamata komisjonile.

Artikkel 3

Käesolev direktiiv on adresseeritud liikmesriikidele.

Brüssel, 1. märts 1976

Komisjoni nimel

komisjoni liige

P. J. LARDINOIS

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

LISA

AFLATOKSIIN B_1 MÄÄRAMINE

A. ÜHEMÕÕTMELINE PLANAARKROMATOGRAAFILINE MEETOD

1. **Eesmärk ja rakendusala**

Meetod võimaldab määrata aflatoksiin B_1 taset järgmistes söötades: maapähkli-, kopra-, linaseemne-, soja-, seesami-, babassupalmi- ja maisiidukoogis, teraviljas, teraviljasaadustes, hernejahus, kartulipulbis ja tärklises. Määramise alampiir on 0,01 mg/kg (10 miljardikku).

Kui määramist takistavad segavad ained, tuleb B-meetodil (kahemõõtmeline planaarkromatograafiline meetod) teha uus analüüs.

2. **Põhimõte**

Proov ekstraheeritakse kloroformiga. Ekstrakt filtreeritakse ja võetakse alikvoot, mis puhastatakse silikageeli kolonnkromatograafia abil. Eluaat aurutatakse ja jääk lahustatakse kindlaksmääratud kloroformikoguses või benseeni ja atsetonitriili segus. Selle lahuse alikvoodile tehakse planaarkromatograafia (TLC). Aflatoksiin B_1 kogus määratakse kromatogrammi UV-kiirguses visuaalselt või fluorodensitomeetriliselt, teadaolevate standardaflatoksiin B_1 kogustega võrdlemise teel. Söödast ekstraheeritud aflatoksiin B_1 identsus tuleb määrata osutatud korras.

3. **Reaktiivid**

NB: Kui ei ole sätestatud teisiti, peab kõikide reaktiivide kvaliteeditähistus olema "analüütiliselt puhas reaktiiv".

3.1. Atsetoon.

3.2. Kloroform, stabiliseeritud 0,5–1,0 protsendiga 96 % etanoolist (V/V).

3.3. N-heksaan.

3.4. Metanool.

3.5. Veevaba dietüüleeter, peroksiidivaba.

3.6. Benseeni ja atsetonitriili segu: 98/2 (V/V).

3.7. Kloroformi (3.2) ja metanooli (3.4) segu: 97/3 (V/V).

3.8. Silikageel, kolonnkromatograafia jaoks, osakeste suurus 0,05–0,20 mm.

3.9. Absorbeeriv vatt, eelnevalt kloroformiga rasvatustatud, või klaasvatt.

3.10. Naatriumsulfaat, veevaba, graanulites.

3.11. Inertgaas, näiteks lämmastik.

3.12. 1 N soolhape.

3.13. 50 % (V/V) väävelhape.

3.14. Kobediatomiit, happes pestud.

3.15. Silikageel G-HR või samaväärne TLC jaoks.

3.16. Standardlahus, milles on umbes 0,1 µg aflatoksiin B_1 ml kohta kloroformis (3.2) või benseeni/atsetonitriili segu (3.6) ja mis on valmistatud ja kontrollitud vastavalt 7. osale.

3.17. Standardlahus kvalitatiivsete testide läbiviimiseks, mis sisaldab 0,1 µg aflatoksiin B_1 ml kohta ja B_2 kloroformis (3.2) või benseeni/atsetonitriili segu (3.6). Need kontsentratsioonid on antud juhistena. Neid tuleb mõlema aflatoksiini puhul sama fluorestsentsi intensiivsuse saamiseks kohandada.

3.18. Ilmutuslahused:

3.18.1. Kloroform (3.2)/atsetoon (3.1): 9/1 (V/V), küllastamata ilmutusnõu;

3.18.2. Dietüüleeter (3.5)/metanool (3.4)/vesi: 96/3/1 (V/V/V), küllastamata ilmutusnõu;

3.18.3. Dietüüleeter (3.5)/metanool (3.4)/vesi: 94/4,5/1,5 (V/V/V), küllastatud ilmutusnõu;

3.18.4. Kloroform (3.2)/metanool (3.4): 94/6 (V/V), küllastatud ilmutusnõu;

3.18.5. Kloroform (3.2)/metanool (3.4): 97/3 (V/V), küllastatud ilmutusnõu.

4. **Seadmed**

4.1. Jahvatusmasin.

4.2. Loksuti või magnetsegur.

4.3. Kurdfilterpaberid Schleicher ja Schüll nr 588 või samaväärsed, läbimõõt: 24 cm.

4.4. Klaastoru kromatograafia jaoks (siseläbimõõt: 22 mm, pikkus: 300 mm), teflonkraani ja 250 ml reservuaariga.

4.5. Vaakumpöördaurusti 500 ml ümarkolviga.

4.6. 500 ml lihvkorgiga Erlenmeyeri kolvid.

4.7. TLC-seadmed.

4.8. Klaasplaadid TLC jaoks, 200 × 200 mm, järgmiselt ette valmistatud (esitatud kogused katavad 5 plaati). 30 g silikageeli G-HR (3.15) pannakse Erlenmeyeri kolbi. Lisatakse 60 ml vett, suletakse korgiga ja loksutatakse üks minut. Suspensioon kantakse plaatidele ühtlase 0,25 mm kihina. Jäetakse õhu kätte kuivama ja seejärel hoitakse silikageeli sisaldavas eksikaatoris. Kasutamisel plaadid aktiveeritakse, hoides neid kuivatuskapis 110 °C juures tund aega.

Valmis plaadid on sobivad, kui nad annavad samasuguseid tulemusi kui eespool osutatud ettevalmistatud plaadid.

4.9. Pikklaine (360 nm) UV-lamp. Kiirituse intensiivsus peab võimaldama 1 ng aflatoksiin B_1 täpi selget eraldamist TLC-plaadil lambist 10 cm kaugusel.

4.10. 10 ml büretid polüetüleenkorkidega.

4.11. UV-spektrofotomeeter.

4.12. Fluorodensitomeeter (ei ole kohustuslik).

5. **Menetlus**

5.1. *Proovi ettevalmistamine* (vt "Märkused", C osa punkt 1).

Proov jahvatatakse nii, et kõik selle osakesed mahuvad läbi 1 mm avadega sõela (kooskõlas soovitusega ISO R 565).

5.2. *Ekstraheerimine*

50 g jahvatatud homogeenitud proovi pannakse 500 ml Erlenmeyeri kolbi. Lisatakse 25 g kobediatomiiti (3.14), 25 ml vett ja 250 ml kloroformi (3.2). Kolb suletakse, loksutatakse või segatakse 30 minutit seadme (4.2) abil ja filtreeritakse läbi kurdfilterpaberi (4.3). Filtraadi esimesed 10 ml praagitakse välja ja võetakse järgmised 50 ml.

5.3. *Kolonni puhastamine*

Kromatograafiatoru (4.4) madalamasse otsa pannakse vati- või klaasvillatropid (3.9), kaks kolmandikku torust täidetakse kloroformiga (3.2) ja lisatakse 5 g naatriumsulfaati (3.10).

Kontrollitakse, kas naatriumsulfaadikihi pind on tasane, siis lisatakse väikeste koguste kaupa 10 g silikageeli (3.8). Pärast iga koguse lisamist segatakse, et eemaldada õhumullid. Jäetakse 15 minutiks seisma ja siis lisatakse ettevaatlikult 15 g naatriumsulfaati (3.10). Vedelikul lastakse alla vajuda, kuni see on vahetult naatriumsulfaadikihi pinna kohal.

50 ml punktis 5.2 kogutud ekstrakti segatakse 100 ml N-heksaaniga (3.3) ja segu kantakse kvantitatiivselt kolonni. Vedelikul lastakse alla vajuda, kuni see on vahetult naatriumsulfaadikihi pinna kohal. See segu visatakse minema. Siis lisatakse 100 ml dietüüleetrit (3.5) ja lastakse sellel vajuda naatriumsulfaadikihi pinnale. Nende toimingute ajal tuleks jälgida, et voolukiirus on 8–12 ml/min ja et kolonn ei jookse tühjaks. Väljatulnud vedelik visatakse ära. Siis elueeritakse 150 ml kloroformi/metanooli seguga (3.7) ja kogutakse kogu eluaat.

Eluaat aurustatakse temperatuuril kuni 50 °C inertgaasi (3.11) all vaakumpöördaurustis (4.5) peaaegu kuivaks. Jääk kantakse kvantitatiivselt kloroformi (3.2) või benseeni ja atsetonitriili segu (3.6) kasutades 10 ml büretti (4.10). Lahus kontsentreeritakse inertgaasi (3.11) abil ja siis kohandatakse kloroformi (3.2) või benseeni/atsetonitriili segu (3.6) kasutades selle maht 2 milliliitrini.

5.4. *Planaarkromatograafia*

TLC-plaadile (4.8) kantakse 2 cm alumisest servast ja 2 cm intervallidega standardlahuse ja ekstrakti allpool toodud mahuga tilgad:

— 10, 15, 20, 30 ja 40 µl aflatoksiin B_1-standardlahust (3.16);

— 10 µl punktis 5.3 saadud ekstrakti ja *samasse kohta* 20 µl standardlahust (3.16);

— 10 ja 20 µl punktis 5.3 saadud ekstrakti.

Kromatogramm ilmutatakse pimedas ühega ilmutuslahustest (3.18). Ilmutuslahus tuleb valida varem, pannes 25 µl kvalitatiivset standardlahust (3.17) plaadile ja kontrollides, kas aflatoksiin B_1 ja B_2 on pärast ilmutamist täielikult eraldunud.

Lahustil lastakse pimedas aurustuda ja siis kiiritatakse seda UV-valgusega, asetades plaadi lambist (4.9) 10 cm kaugusele. Aflatoksiin B_1 täpid annavad sinise fluorestsentsi.

5.5. *Kvantitatiivsed määramised*

Määratakse kas visuaalselt või fluorodensitomeetriliselt allpool esitatud viisil.

5.5.1. Visuaalsed mõõtmised

Ekstraktis aflatoksiin B_1 koguse määramiseks otsitakse standardlahuse tilkadest see, millel on ekstrakti tilkadega võrdne fluorestsentsi intensiivsus. Vajadusel see interpoleeritakse. Ekstrakti lisatud standardlahuse fluorestsents peab olema intensiivsem kui 10 µl ekstraktil ja selles tohib olla ainult üks nähtav täpp. Kui 10 µl ekstrakti fluorestsentsi intensiivsus on suurem kui 40 µl standardlahusel, lahjendatakse ekstrakti enne uut planaarkromatograafiat 10 või 100 korda kloroformi (3.2) või benseeni/atsetonitriili seguga (3.6).

5.5.2. Fluorodensitomeetrilised mõõtmised

Aflatoksiin B_1 tilkade fluorestsentsi intensiivsust mõõdetakse fluorodensitomeetriga (4.12) kiirguslainepikkusel 365 nm ja ergastuslainepikkusel 443 nm. Aflatoksiin B_1 koguse mõõtmiseks ekstrakti tilkades võrreldakse nende fluorestsentsi intensiivsust aflatoksiin B_1 standardlahuse tilkade omaga.

5.6. *Aflatoksiin B_1 määramise kinnitus*

Aflatoksiin B_1 määramist ekstraktis kinnitatakse allpool esitatud menetluste abil.

5.6.1. Töötlemine väävelhappega

Väävelhapet (3.13) pritsitakse punktis 5.4 saadud kromatogrammile. Aflatoksiin B_1 tilkade fluorestsents peab UV-kiirguses muutuma sinisest kollaseks.

5.6.2. Kahemõõtmeline planaarkromatograafia, mis hõlmab aflatoksiin B_1-poolatsetaali (aflatoksiin B_{2a}) moodustumist

NB: Alljärgnevate toimingute puhul tuleb täpselt järgida joonisel 3 toodud skeemi.

5.6.2.1. Lahuste plaadile kandmine

Plaadile (4.8) tõmmatakse selle kahe kõrvutise küljega paralleelselt lahusti frondi liikumise piiramiseks kaks sirget joont (6 cm mõlemast küljest). Kapillaarpipeti või mikrosüstlaga kantakse plaadile järgmiste lahuste tilgad:

— *punkti A*: proovi puhastatud ekstrakti, mis on saadud 5.3 läbiviimisel ja mis sisaldab umbes 2,5 nm aflatoksiin B_1,

— *punktidesse B ja C*: 25 µl standardlahust (3.16).

5.6.2.2. Ilmutamine

Kromatogramm ilmutatakse pimedas suunas I, kasutades selleks ilmutuslahust (3.18.1) (1 cm kiht küllastamata ilmutusnõus) kuni see jõuab lahust piirava jooneni.

Plaat võetakse ilmutusnõust ja sellel lastakse pimedas ümbritseva õhu temperatuuril viis minutit kuivada. Ülejäänud plaati klaasplaadiga kattes pihustatakse soolhappega (3.12) 2,5 cm laiust punkte A ja B katvat riba (joonisel tähistatud viirutatud joonega), kuni see tumeneb. Lastakse 10 minutit pimedas reageerida ja kuivatatakse õhuvooluga ümbritseva õhu temperatuuril.

Järgmisena ilmutatakse pimedas kromatogrammi suunas II, kasutades selleks ilmutuslahust (3.18.1) (1 cm kiht küllastamata ilmutusnõus), kuni see jõuab lahust piirava jooneni. Plaat võetakse ilmutusnõust ja sellel lastakse ümbritseva õhu temperatuuril kuivada.

5.6.2.3. Kromatogrammi tõlgendus

Kromatogrammi vaadeldakse UV-valguses (4.9) ja kontrollitakse järgmiseid omadusi:

a) Aflatoksiin B_1 sinise fluorestsentsiga tilga esinemine punktis C plaadile kantud standardlahuses (liikumine suunas I).

b) Aflatoksiin B_1 (soolhappega) reageerimata sinise fluorestsentsiga tilga ja veelgi intensiivsema aflatoksiin B_1-poolatsetaali sinise fluorestsentsiga tilga esinemine punktis B plaadile kantud standardlahuses (liikumine suunas II).

c) Punktis b kirjeldatud tilkadega samaväärsete tilkade esinemine punktis A plaadile kantud prooviekstraktis. Nende tilkade asukoht määratakse kõigepealt aflatoksiin B_1 liikumisvahemaa põhjal punktist A liikumissuunaga I (sama mis punktis C standardlahuse liikumine) ja siis aflatoksiin B_1-poolatsetaali liikumisvahemaa põhjal liikumissuunaga II (sama mis punktis B standardlahuse liikumine). Ekstraktist pärineva ja punktis B plaadile kantud standardlahuse poolatsetaali täppide fluorestsentsi intensiivsus peaksid olema võrdsed.

6. **Tulemuste arvutamine**

6.1. *Visuaalsete mõõtmiste põhjal*

Aflatoksiin B_1 sisaldus mikrogrammides ühe kg proovi kohta (miljardik osadena) on väljendatud valemiga:

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

kus:

Y on aflatoksiin B_1 standardlahuse (3.16) ja X samaväärse fluorestsentsi intensiivsusega ekstrakti maht mikroliitrites;

S = aflatoksiin B_1 kontsentratsioon standardlahuses (3.16) mikrogrammides ml kohta;

V = ekstrakti lõppmaht mikroliitrites kõiki vajalikke lahjendamisi arvesse võttes;

W = proovi mass grammides, mis vastab kolonnis puhastatud ekstrakti massile.

6.2. *Fluorodensitomeetriliste mõõtmiste põhjal*

Aflatoksiin B_1 sisaldus mikrogrammides kg kohta on väljendatud valemiga:

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

kus:

Y = plaadile kantud ekstrakti mass mikroliitrites (10 või 20 µl);

S = mõõtmistel saadud aflatoksiin B_1 kogus nanogrammides ekstrakti tilgas (võrdeline võetud Y väärtusega);

V = ekstrakti lõppmaht mikroliitrites kõiki vajalikke lahjendamisi arvesse võttes;

W = proovi mass grammides, mis vastab kollonnis puhastatud ekstrakti massile.

7. Standardlahuse (3.16) valmistamine ja kontrollimine

7.1 *Aflatoksiin B_1 konsentratsiooni määramine*

Aflatoksiin B_1 standardlahus kontsentratsiooniga 8–10 µg/ml valmistatakse kloroformi (3.2) või benseeni/atsetonitriili segus (3.6). Imendumisspekter 330 ja 370 nm vahel määratakse spektrofotomeetriga (4.11).

Optiline tihedus (A) mõõdetakse kloroformilahuse puhul 363 nm juures või benseeni/atsetonitriili segu lahuse puhul 348 nm juures.

Aflatoksiin B_1 kontsentratsioon mikrogrammides ml lahuse kohta arvutatakse alljärgneva valemiga:

$\frac{312 \cdot A \cdot 1\,000}{20\,600}$ kloroformilahuse puhul;

$\frac{312 \cdot A \cdot 1\,000}{19\,800}$ benseeni/atsetonitriilisegu lahuse puhul.

Lahjendatakse vastavalt vajadusele, mitte päevavalguses, et saada kasutusvalmis standardlahus aflatoksiin B_1 kontsentratsiooniga umbes 0,1 µg ml kohta. Külmikus temperatuuril 4 °C hoidmise korral on see lahus stabiilne kaks nädalat.

7.2 *Kromatograafilise puhtuse kontrollimine*

Plaadile (4.8) kantakse 5 µl aflatoksiin B_1 standardlahust kontsentratsiooniga 8–10 µg/ml (7.1). Kromatogramm ilmutatakse punktis 5.4 kirjeldatud viisil. UV-valguses peaks kromatogramm näitama ainult ühte tilka ja algses settepiirkonnas ei tohi olla fluorestsentsi.

8. Korratavus

Sama analüüsija poolt sama prooviga tehtud kahe paralleelse määramise tulemuste erinevus ei tohiks ületada:

— 25 % kõrgeimast tulemusest, kui aflatoksiin B_1 sisaldus on 10–20 µg/kg,

— 5 µg absoluutväärtusest, kui sisaldus on 20–50 µg/kg,

— 10 % suurimast väärtusest, kui aflatoksiin B_1 sisaldus on üle 50 µg/kg.

9. Reprodutseeritavus

Vt "Märkused", C osa punkt 2.

B. KAHEMÕÕTMELINE PLANAARKROMATOGRAAFILINE MEETOD

1. **Eesmärk ja rakendusala**

Meetod võimaldab määrata aflatoksiin B_1 taset järgmistes söötades, mis ei kuulu meetodi A rakendusalasse. Määramise alampiir on 0,01 mg/kg (10 miljardikku). Meetodit ei kohaldata söötade suhtes, mis sisaldavad tsitruspulpi.

2. **Põhimõte**

Proov ekstraheeritakse kloroformiga. Ekstrakt filtreeritakse ja võetakse alikvoot, mis puhastatakse silikageeli kolonnkromatograafia abil. Eluaat aurutatakse ja jääk lahustatakse kindlaksmääratud kloroformikoguses või benseeni ja atsetonitriili segus. Selle lahuse alikvoodile tehakse kahemõõtmeline planaarkromatograafia (TLC). Aflatoksiin B_1 kogus määratakse kromatogrammi UV-kiirguses visuaalselt või fluorodensitomeetriliselt, teadaolevate aflatoksiin B_1 standardlahuste võrdlemise teel. Söödast ekstraheeritud aflatoksiin B_1 identsus tuleb kindlaks määrata ettenähtud korras.

3. **Reaktiivid**

NB: Kui ei ole sätestatud teisiti, peab kõikide reaktiivide kvaliteedimärgistus olema “analüütiliselt puhas reaktiiv”.

3.1. Atsetoon.

3.2. Kloroform, stabiliseeritud 0,5–1 protsendiga 96 % etanoolist (V/V).

3.3. N-heksaan.

3.4. Metanool.

3.5. Veevaba dietüüleeter, peroksiidivaba.

3.6. Benseeni ja atsetonitriili segu: 98/2 (V/V).

3.7. Kloroformi (3.2) ja metanooli (3.4) segu: 97/3 (V/V).

3.8. Silikageel kolonnkromatograafiaks, osakeste suurus 0,05–0,20 mm.

3.9. Absorbeeriv vatt, eelnevalt kloroformiga rasvatustatud, või klaasvatt.

3.10. Naatriumsulfaat, veevaba, graanulites.

3.11. Inertgaas, näiteks lämmastik.

3.12. 1 N-soolhape.

3.13. Kobediatomiit, (hyflosupercel), happes pestud.

3.14. Silikageel G-HR või samaväärne TLC jaoks.

3.15. Ilmutuslahused.

3.15.1. Dietüüleeter (3.5)/metanool(3.4)/vesi: 94/4.5/1.5 (V/V/V), küllastatud ilmutusnõu.

3.15.2. Kloroform (3.2)/atsetoon (3.1): 9/1 (V/V), küllastamata ilmutusnõu.

3.16. Standardlahus, mis sisaldab 0,1 µg/ml aflatoksiin B_1 kloroformis (3.2) või benseeni/atsetonitriili segus (3.6), valmistatud ja kontrollitud A meetodi 7. punktis kirjeldatud viisil.

4. **Seadmed**

Vt meetodi A punkt 4.

5. **Menetlus**

5.1. *Proovi ettevalmistamine*
5.2. *Ekstraheerimine*
5.3. *Kolonni puhastamine*
} Vt meetodi A punktid 5.1, 5.2 ja 5.3.

5.4. *Planaarkromatograafia*

5.4.1. Lahuste plaadile kandmine (järgida skeemi joonisel 1)

Plaadi (4.8) kahe kõrvutise küljega paralleelselt tõmmatakse lahusti frondi liikumise piiramiseks kaks sirget joont (vastavalt 5 ja 6 cm mõlemast küljest). Kapillaarpipettide või mikrosüstaldega kantakse plaadile järgmiste lahuste tilgad:

— *punkti A* 20 µl puhastatud prooviekstrakti, mis on saadud 5.3 tulemusel,

— *punkti B* 20 µl standardlahust (3.16),

— *punkti C* 10 µl standardlahust (3.16),

— *punkti D* 20 µl standardlahust (3.16),

— *punkti E* 40 µl standardlahust (3.16).

Kuivatatakse aeglase õhuvoolu või inertgaasiga (3.11). Saadud tilkade läbimõõt peab olema umbes 5 mm.

5.4.2. Ilmutamine (jälgitakse skeemi joonisel 1)

Kromatogramm ilmutatakse pimedas suunas II, kasutades selleks ilmutuslahust (3,15.1) (1 cm kiht küllastatud ilmutusnõus), kuni see jõuab lahust piirava jooneni. Plaat võetakse ilmutusnõust ja sellel lastakse pimedas ümbritseva õhu temperatuuril viisteist minutit kuivada.

Järgmisena ilmutatakse kromatogrammi pimedas suunas II, kasutades selleks ilmutuslahust (3.15.2) (1 cm kiht küllastamata ilmutusnõus), kuni see jõuab lahust piirava jooneni. Plaat võetakse ilmutusnõust ja sellel lastakse pimedas ümbritseva õhu temperatuuril kuivada.

5.4.3. Kromatogrammi tõlgendamine (järgida skeemi joonisel 2)

Kromatogrammi kiiritatakse UV-valgusega, pannes plaadi 10 cm kaugusele (4.9). Määratakse aflatoksiin B_1 siniste fluorestseerivate tilkade B, C, D ja E asukohad standardlahuses. Läbi nende tilkade tõmmatakse kaks mõttelist joont ilmutamissuundadega täisnurga all. Nende joonte ristumispunkt on koht, kus võib leida punktis A (joonis 1) plaadile kantud prooviekstraktist pärineva aflatoksiin B_1 täpi. Aflatoksiin B_1 tegelik asukoht võib siiski olla punktis Q kahe mõttelise sirgjoone ristumispunktis, mis moodustavad nende vahel umbes 100° nurga ja mis läbivad vastavalt punkte B ja C. Prooviekstrakti aflatoksiin B_1 kogus määratakse punktis 5.5 kirjeldatud viisil.

5.4.4. Täiendav kromatograafia

Plaadi (4.8) kahe kõrvutise küljega paralleelselt tõmmatakse kaks sirgjoont vastavalt joonise 1 skeemile ja punkti A (vt joonis 1) kantakse 20 µl punktis 5.3 saadud puhastatud prooviekstrakti ja selle peale 20 µl standardlahust (3.16). Ilmutatakse punktis 5.4.2 kirjeldatud viisil. Kromatogrammi kiiritatakse UV-valguses (4.9) ja kontrollitakse, et:

— ekstrakti ja standardlahuse aflatoksiin B_1 tilgad on üksteise peal,

— selle tilga fluorestsents on intensiivsem kui esimese plaadi punktis Q ilmutatud aflatoksiin B_1 tilk.

5.5. *Kvantitatiivsed määramised*

Määratakse kas visuaalselt või fluorodensitomeetria abil nagu allpool näidatud.

5.5.1. Visuaalsed mõõtmised

Aflatoksiin B_1 koguse määramiseks ekstraktis otsitakse standardlahuse tilkadest see, millel on standardlahuse tilkadega C, D ja E võrdne fluorestsentsi intensiivsus. Vajadusel see interpoleeritakse. Kui 20 µl ekstrakti fluorestsentsi intensiivsus on suurem kui 40 µl standardlahusel, lahjendatakse ekstrakti enne uut planaarkromatograafiat 10 või 100 korda kloroformi (3.2) või benseeni/atsetonitriili seguga (3.6).

5.5.2. Mõõtmised fluorodensitomeetria abil

Aflatoksiin B_1 tilkade fluorestsentsi intensiivsust mõõdetakse fluorodensitomeetriga (4.12) kiirguslainepikkusel 365 nm ja ergastuslainepikkusel 443 nm.

Aflatoksiin B_1 koguse mõõtmiseks ekstrakti tilgas võrreldakse selle fluorestsentsi intensiivsust standardlahuse tilkade C, D ja E omaga.

5.6. *Aflatoksiin B_1 identsuse määramine*

Vt meetodi A punkt 5.6.

6. **Tulemuste arvutamine**

Vt meetodi A punkt 6.

7. **Korratavus**

Vt meetodi A punkt 8.

8. **Reprodutseeritavus**

Vt "Märkused", C osa punkt 2.

C. MÄRKUSED MEETODITE A JA B KOHTA

1. **Rasvatustamine**

Üle 5 % rasva sisaldavad proovid tuleb pärast punktis 5.1 osutatud ettevalmistust petrooleetriga (bp 40–60 °C) rasvatustada.

Sellistel juhtudel tuleb analüüsitulemusi väljendada rasvatustamata proovi kaalu põhjal.

2. **Tulemuste reprodutseeritavus**

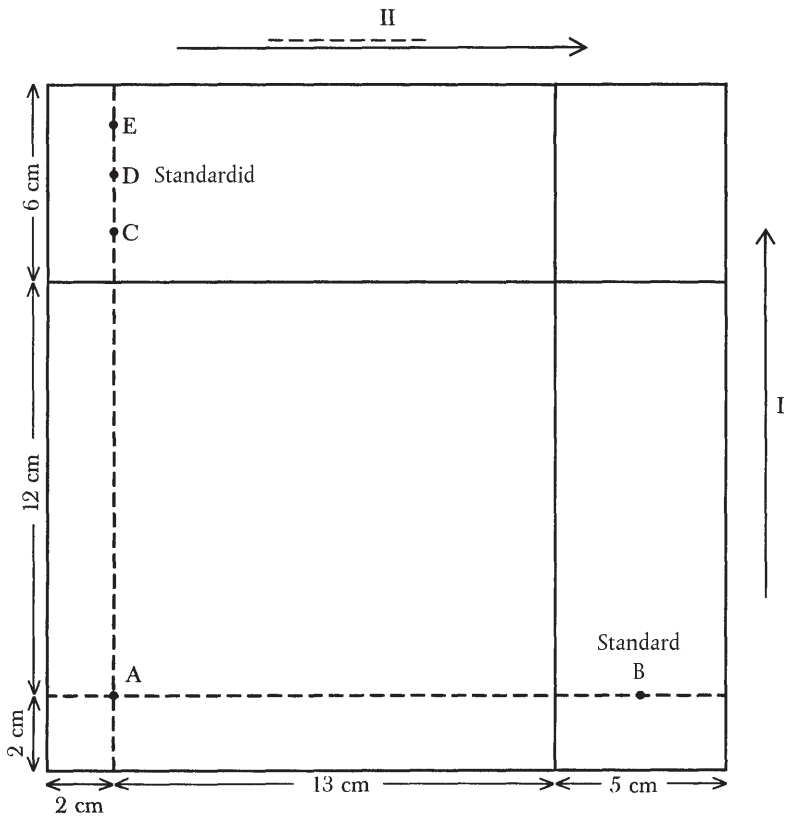
Tulemuste reprodutseeritavus, st kahe või enama laboratooriumi poolt saadud proovi tulemuste erinevus on:

±50 % 10–20 µg/kg aflatoksiin B_1 keskväärtuste keskväärtusest;

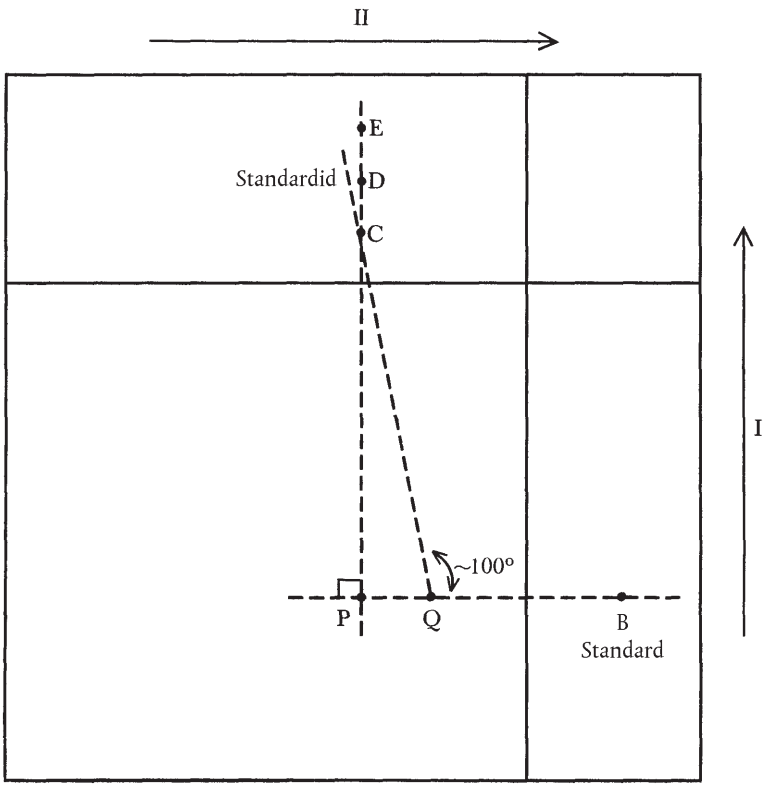
±10 µg/kg keskväärtuste keskväärtusest, mis on 20–50 µg/kg;

±20 % keskväärtustest üle 50 µg/kg olevate keskväärtuste puhul.

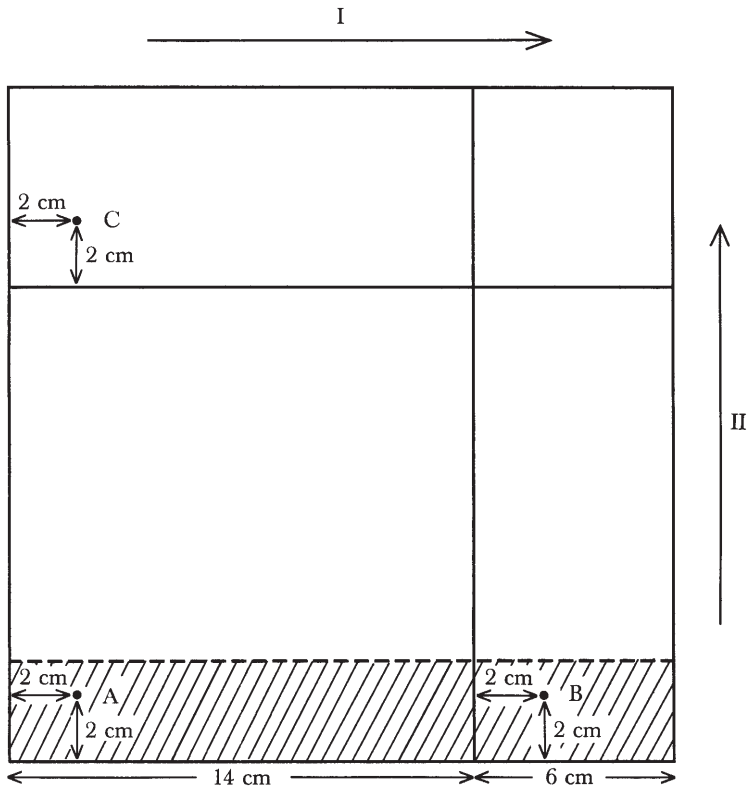
Lisa liide



Joonis 1



Joonis 2



Joonis 3