31976L0372

L 102/8 *EUROPOS BENDRIJŲ OFICIALUSIS LEIDINYS* 1976 4 15

SEPTINTOJI KOMISIJOS DIREKTYVA

1976 m. kovo 1 d.

nustatanti oficialiai pašarų kontrolei taikytinus Bendrijos analizės metodus

(76/372/EEB)

EUROPOS BENDRIJŲ KOMISIJA,

atsižvelgdama į Europos ekonominės bendrijos steigimo sutartį,

atsižvelgdama į 1970 m. liepos 20 d. Tarybos direktyvą dėl Bendrijos mėginių paėmimo ir analizės metodų, taikomų oficialiai pašarų kontrolei, įvedimo ([1]), su paskutiniais pakeitimais, padarytais Prisijungimo aktu ([2]) ir ypač į jos 2 straipsnį,

kadangi ta direktyva reikalauja, kad siekiant patikrinti, kaip laikomasi įstatymais ir kitais teisės aktais patvirtintų nuostatų dėl pašarų kokybės ir sudėties reikalavimų, oficialios pašarų kontrolės atlikimui būtų taikomi Bendrijos mėginių paėmimo ir analizės metodai;

kadangi 1971 m. birželio 15 d. Komisijos direktyva 71/250/EEB ([3]), 1971 m. lapkričio 18 d. Komisijos direktyva 71/393/EEB ([4]), 1972 m. balandžio 27 d. Komisijos direktyva 72/199/EEB ([5]), 1972 m. gruodžio 5 d. Komisijos direktyva 73/46/EEB ([6]), 1974 m. kovo 25 d. Komisijos direktyva 74/203/EEB ([7]) ir 1974 m. gruodžio 20 d. Komisijos direktyva 75/84/EEB ([8]) jau nustatė keletą analizės metodų, taikomų Bendrijoje; atsižvelgiant į nuo to laiko padarytą pažangą, tikslinga priimti septintą metodų rinkinį;

kadangi priemonės, numatytos šioje direktyvoje, atitinka Pašarų nuolatinio komiteto nuomonę,

PRIĖMĖ ŠIĄ DIREKTYVĄ:

1 straipsnis

Valstybės narės reikalauja, kad, oficialiai tikrinant pašarus, aflatoksinui B_1 pašaruose nustatyti būtų taikomi šios direktyvos priede aprašyti analizės metodai.

Šios direktyvos priede aprašytiems metodams taikomos bendrosios nuostatos, išdėstytos 1971 m. birželio 15 d. Pirmosios komisijos direktyvos 71/250/EEB priedo 1 dalyje (Įžangoje), išskyrus dalį, nagrinėjančią analizei skirto mėginio paruošimą.

2 straipsnis

Valstybės narės ne vėliau kaip iki 1976 m. spalio 1 d. priima įstatymus ir kitus teisės aktus, kurie įgyvendina šią direktyvą. Apie tai jos nedelsdamos praneša Komisijai.

3 straipsnis

Ši direktyva skirta valstybėms narėms.

Priimta Briuselyje, 1976 m. kovo 1 d.

Tarybos vardu

P. J. LARDINOIS

Komisijos narys

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

PRIEDAS

AFLATOKSINO B_1 NUSTATYMAS

A. VIENMATĖS PLONASLUOKSNĖS CHROMATOGRAFIJOS METODAS

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Šiuo metodu nustatomas aflatoksino B_1 kiekis šiuose pašaruose: žemės riešutų, kopros, linų sėmenų, sojos, sezamo, *Orbignia martiana* palmės ir kukurūzų daigų išspaudose, grūduose ir grūdiniuose produktuose, žirnių miltuose, bulvių išspaudose ir krakmole. Nustatymo riba – 0,01 mg/kg (10 milijardųjų dalių).

Jei trukdančių medžiagų buvimas apsunkina nustatymą, analizę būtina pradėti iš naujo, taikant B metodą (dvimatės plonasluoksnės chromatografijos metodą).

2. **Metodo esmė**

Mėginys ekstrahuojamas chloroformu. Ekstraktas filtruojamas, alikvotinė filtrato dalis gryninama, taikant kolonėlinę chromatografiją su silikageliu. Eliuatas išgarinamas, likutis ištirpinamas tam tikrame chloroformo arba benzeno ir acetonitrilo mišinio tūryje. Su alikvotine šio tirpalo dalimi atliekama plonasluoksnė chromatografija (PSCh). Chromatogramą apšvietus UV spinduliais, aflatoksino B_1 kiekis nustatomas vizualiai arba fluorodensitometru, fluorescencijos intensyvumą lyginant su žinomo kiekio etaloninio aflatoksino B_1 fluorescencija. Iš pašarų ekstrahuoto aflatoksino B1 identiškumas turi būti patvirtintas pagal pateikiamą procedūrą.

3. **Reagentai**

NB. Visi reagentai turi būti analiziškai gryni, jei nenurodyta kitaip.

3.1. Acetonas.

3.2. Chloroformas, stabilizuotas 0,5–1,0 % etanolio 96 % (v/v) tirpalu.

3.3. *n*-heksanas.

3.4. Metanolis.

3.5. Bevandenis dietileteris, neturintis peroksidų.

3.6. Benzeno ir acetonitrilo mišinys: 98/2 (v/v).

3.7. Chloroformo (3.2) ir metanolio (3.4) mišinys: 97/3 (v/v).

3.8. Silikagelis chromatografijai kolonėlėje, dalelių dydis 0,05–0,20 mm.

3.9. Higroskopinė vata, prieš tai nuriebalinta chloroformu, arba stiklo vata.

3.10. Natrio sulfatas, bevandenis, granuliuotas.

3.11. Inertinės dujos, pvz., azotas.

3.12. Druskos rūgšties 1 N tirpalas.

3.13. Sieros rūgšties 50 % (v/v) tirpalas.

3.14. Diatomitas (arba Hyflo Super Cel), išplautas rūgštyje.

3.15. Silikagelis G-HR arba panašus, skirtas plonasluoksnei chromatografijai (PSCh).

3.16. Standartinis apie 0,1 µg/ml aflatoksino tirpalas chloroforme (3.2) arba benzeno/acetonitrilo mišinyje (3.6), paruoštas ir patikrintas, kaip nurodyta 7 punkte.

3.17. Kokybiniam patikrinimui naudojamas standartinis tirpalas chloroforme (3.2) arba benzeno/acetonitrilo mišinyje (3.6), kuriame aflatoksino B_1 ir B_2 koncentracija būtų maždaug 0,1 µg/ml. Šios koncentracijos yra tik orientacinės. Jos turi būti parenkamos taip, kad abiem aflatoksinams būtų gaunamas toks pats fluorescencijos intensyvumas.

3.18. Tirpiklių sistemos atskyrimui:

3.18.1. chloroformas (3.2)/acetonas (3.1): 9/1 (v/v), chromatografinė kamera neprisotinama tirpiklių garais;

3.18.2. dietileteris (3.5)/metanolis (3.4)/vanduo: 96/3/1 (v/v/v), chromatografinė kamera neprisotinama tirpiklių garais;

3.18.3. dietileteris (3.5)/metanolis (3.4)/vanduo: 94/4,5/1,5 (v/v/v), chromatografinė kamera prisotinama tirpiklių garais;

3.18.4. chloroformas (3.2)/metanolis (3.4): 94/6 (v/v), chromatografinė kamera prisotinama tirpiklių garais;

3.18.5. chloroformas (3.2)/metanolis (3.4): 97/3 (v/v), chromatografinė kamera prisotinama tirpiklių garais.

4. **Įranga**

4.1. Laboratorinis malūnas.

4.2. Purtyklė arba magnetinis maišiklis.

4.3. Klostuotas filtro popierius, *Schleicher und Schüll*, Nr. 588 arba panašus, 24 cm skersmens.

4.4. Stiklinis vamzdis chromatografijai (vidinis skersmuo 22 mm, ilgis 300 mm) su PTFE čiaupu ir 250 ml tūrio talpa.

4.5. Sukamasis vakuuminis garintuvas su 500 ml tūrio apvaliadugne kolba.

4.6. 500 ml tūrio konusinės kolbos su šlifo kamščiais.

4.7. Įtaisas plonasluoksnei chromatografijai.

4.8. Stiklinės plokštelės plonasluoksnei chromatografijai atlikti, matmenys 200 mm × 200 mm, paruošiamos tokiu būdu (nurodyto kiekio užtenka padengti penkioms plokštelėms). Į konusinę kolbą įberiama 30 g silikagelio G-HR (3.15). Įpilama 60 ml vandens, kolba užkemšama ir kratoma vieną minutę. Suspensija paskleidžiama ant plokštelių, kad susidarytų vienodo 0,25 mm storio sluoksnis.

Plokštelės paliekamos džiūti ore, po to dedamos į eksikatorių su silikageliu. Prieš pat naudojimą plokštelės aktyvuojamos, laikant džiovinimo spintoje vieną valandą 110 °C temperatūroje. Tinka gatavos plokštelės, jei su jomis gaunami tokie patys rezultatai kaip su paruoštomis nurodytu būdu.

4.9. Ilgųjų bangų (360 nm) UV lempa. Spinduliavimo intensyvumas turi būti toks, kad plonasluoksnės chromatografijos plokštelėje 10 cm atstumu nuo lempos būtų matoma dėmė, palikta 1 ng aflatoksino B_1.

4.10. 10 ml tūrio graduoti mėgintuvėliai su polietileniniais kamščiais.

4.11. UV spektrofotometras.

4.12. Fluordensitometras (nebūtinas).

5. **Darbo procedūra**

5.1. *Mėginio paruošimas (žr. skyrių „Pastabos“, C dalis, 1 punktas)*

Mėginys sumalamas taip, kad jis visas persisijotų per sietą su 1 mm skersmens akutėmis. (pagal ISO R 565 rekomendaciją).

5.2. *Ekstrahavimas*

Į konusinę 500 ml talpos (4.6) kolbą dedama 50 g sumalto homogenizuoto mėginio. Įberiama 25 g diatomito (3.14), įpilama 25 ml vandens ir 250 ml chloroformo (3.2). Kolba užkemšama, 30 minučių kratoma arba maišoma ant purtyklės (4.2), turinys filtruojamas per klostuotą filtro popierių (4.3). Pirmieji 10 ml filtrato išpilami, po to surenkama 50 ml.

5.3. *Gryninimas kolonėlėje*

Į chromatografijai skirto vamzdžio (4.4) apačią įkišamas vatos arba stiklo vatos kamštis (3.9), du trečdaliai kolonėlės užpildoma chloroformu (3.2) ir įdedama 5 g natrio sulfato (3.10).

Patikrinama, ar viršutinis natrio sulfato sluoksnio paviršius yra lygus, mažomis dalimis įberiama 10 g silikagelio (3.8). Po kiekvienos įbertos silikagelio dalies vamzdis oro burbuliukams pašalinti atsargiai papurtomas. Paliekama stovėti 15 minučių ir atsargiai įdedama 15 g natrio sulfato (3.10). Skysčio išleidžiama tiek, kad jo būtų tik truputį virš natrio sulfato sluoksnio viršaus.

Pagal 5.2 punktą surinkto 50 ml ekstrakto sumaišoma su 100 ml *n*-heksano (3.3) ir mišinys kiekybiškai supilamas į kolonėlę. Skysčio išleidžiama tiek, kad jo liktų truputį virš natrio sulfato sluoksnio viršaus. Šis praplovimo skystis išpilamas. Toliau įpilama 100 ml dietileterio (3.5) ir vėl skystis išleidžiamas, kol jo lygis pasiekia natrio sulfato sluoksnio viršų. Šių veiksmų metu reikia žiūrėti, kad debitas būtų 8–12 ml per minutę ir kad skystis iš kolonėlės neištekėtų visas. Ištekantis skystis išpilamas. Toliau plaunama 150 ml chloroformo/metanolio mišiniu (3.7), visas eluatas surenkamas.

Pastarasis sukamajame vakuuminiame garintuve (4.5) inertinių dujų (3.11) aplinkoje išgarinamas beveik iki sauso likučio, temperatūrai neleidžiant pakilti virš 50 °C. Naudojant chloroformą (3.2) arba benzeno ir acetonitrilo mišinį (3.6), likutis kiekybiškai supilamas į 10 ml graduotą mėgintuvėlį (4.10). Tirpalas inertinių dujų (3.11) srovėje koncentruojamas ir chloroformu (3.2) arba benzeno ir acetonitrilo mišiniu (3.6) praskiedžiamas iki 2 ml.

5.4. *Plonasluoksnė chromatografija*

Ant plonasluoksnei chromatografijai skirtos plokštelės (4.8) 2 cm atstumu nuo apatinio krašto ir 2 cm tarpais užlašinami žemiau nurodyti standartinio tirpalo ir ekstrakto tūriai:

— 10, 15, 20, 30 ir 40 µl standartinio aflatoksino B_1 tirpalo (3.16),

— 10 µl pagal 5.3 punktą gauto ekstrakto ir *toje pačioje vietoje ant viršaus* 20 µl standartinio tirpalo (3.16),

— 10 ir 20 µl pagal 5.3 punktą gauto ekstrakto.

Chromatografuojama tamsoje viena iš tirpiklių sistemų (3.18). Tirpiklių sistema pasirenkama iš anksto, ant plokštelės užlašinant 25 µl kokybiniam patikrinimui naudojamo standartinio tirpalo (3.17). Tikrinama, ar po chromatografavimo aflatoksinas B_1 ir B_2 yra visiškai atsiskyrę.

Tirpikliai išgarinami tamsoje, po to plokštelė apšviečiama UV lempa (4.9), esančia 10 cm atstumu. Aflatoksino B_1 dėmės fluorescuoja žydra spalva.

5.5. *Kiekybiniai nustatymai*

Nustatoma vizualiai arba fluordensitometru, kaip nurodyta toliau.

5.5.1. Vizualūs matavimai

Aflatoksino B_1 kiekis ekstrakte nustatomas lyginant ekstrakto dėmių fluorescencijos intensyvumą su vienos iš standartinių tirpalų dėmių fluorescencijos intensyvumu. Prireikus daroma interpoliacija. Fluorescencija dėmės, kuri buvo gauta ant ekstrakto viršaus užlašinant standartinio tirpalo, turi būti intensyvesnė negu dėmės su 10 µl ekstrakto fluorescencija ir turi būti ne daugiau kaip viena matoma dėmė. Jei dėmės su 10 µl ekstrakto fluorescencijos intensyvumas yra didesnis nei dėmės su 40 µl etaloninio tirpalo, ekstraktas, prieš jį iš naujo chromatografuojant plonasluoksnės chromatografijos metodu, 10 arba 100 kartų praskiedžiamas chloroformu (3.2) arba benzeno ir acetonitrilo mišiniu (3.6).

5.5.2. Matavimai fluordensitometru

Aflatoksino B_1 dėmių fluorescencijos intensyvumas matuojamas fluorodensitometru (4.12), esant 365 nm sužadinimo bangos ilgiui ir 443 nm emisijos bangos ilgiui. Aflatoksino B_1 kiekis ekstrakto dėmėse nustatomas palyginant jų fluorescencijos intensyvumą su standartinių tirpalų dėmių fluorescencijos intensyvumu.

5.6. *Aflatoksino B_1 tapatumo patvirtinimas*

Aflatoksino B_1 buvimas ekstrakte patvirtinamas toliau nurodytais metodais.

5.6.1. Poveikis sieros rūgštimi

Pagal 5.4 punktą gauta chromatograma apipurškiama sieros rūgšties tirpalu (3.13). Ultravioletinėje šviesoje aflatoksino B_1 fluorescencija iš žydros turi pasikeisti į geltoną.

5.6.2. Dvimatė chromatografija, apimanti susidariusio aflatoksino B_1 hemiacetalio (aflatoksino B_{2a}) atskyrimą

NB. Toliau aprašomi veiksmai turi būti atliekami tiksliai pagal 3 paveiksle pavaizduotą brėžinį.

5.6.2.1. Tirpalų panaudojimas

Plokštelėje (4.8) tirpiklio sklidimui apriboti braukiamos dvi tiesės, lygiagrečios gretimiems kraštams (6 cm nuo atitinkamo krašto). Kapiliarine pipete ar mikrošvirkštu užlašinami tokie tirpalai:

— *A taške*: toks išgryninto mėginio ekstrakto (5.3) tūris, kuriame būtų apie 2,5 ng aflatoksino B_1,

— *B ir C taškuose*: 25 µl standartinio tirpalo (3.16).

5.6.2.2. Atskyrimas

Chromatografuojama tamsoje I kryptimi, su tirpiklių sistema (3.18.1) (1 cm storio sluoksnis kamera tirpiklio garais neprisotinama), kol tirpiklio frontas pasiekia tirpiklio kilimą ribojančią liniją.

Plokštelė išimama iš chromatografinės kameros, penkioms minutėms kambario temperatūroje paliekama džiūti tamsoje. Toliau druskos rūgštimi (3.12) apipurškiama 2,5 cm aukščio juosta, dengianti taškus A ir B, kol patamsės (3 paveiksle parodyta užbrūkšniuotu plotu). Likusi plokštelės dalis apsaugoma stikline plokštele. Paliekama tamsoje reaguoti 10 minučių, po to, kambario temperatūroje džiovinama oro srove.

Po to, chromatografuojama tamsoje II kryptimi, su tirpiklių sistema (3.18.1) (1 cm storio sluoksnis kamera tirpiklio garais neprisotinama), kol tirpiklio frontas pasieks tirpiklio kilimą ribojančią liniją. Plokštelė išimama iš chromatografinės kameros ir džiovinama kambario temperatūroje.

5.6.2.3. Chromatogramos aiškinimas

Chromatograma analizuojama UV šviesoje (4.9) ir ieškoma toliau aprašytų požymių.

a) Žydros aflatoksino B_1 fluorescencijos dėmės, atsirandančios dėl C taške užlašinto standartinio tirpalo (migracija I kryptimi).

b) Žydros nereagavusio (su druskos rūgštimi) aflatoksino B_1 dėmės ir intensyvesnės žydros aflatoksino B_1 hemiacetalio fluorescencijos dėmės, atsirandančių dėl B taške užlašinto standartinio tirpalo (migracija II kryptimi).

c) Dėmių, atsirandančių dėl A taške užlašinto mėginio ekstrakto, kurios atitiktų aprašytąsias (b) punkte. Šių dėmių padėtį apsprendžia pirmiausia aflatoksino B_1 migracijos atstumas iš A taško I kryptimi (kaip standartinio tirpalo, užlašinto C taške) bei aflatoksino B_1 hemiacetalio migracijos atstumai nuo šios vietos II kryptimi (kaip ir standartinio tirpalo, užlašinto B taške). Hemiacetalio dėmių, gautų iš ekstrakto, ir iš B taške užlašinto standartinio tirpalo, fluorescencijos intensyvumas turi sutapti.

6. **Rezultatų apskaičiavimas**

6.1. *Pagal vizualinius matavimus*

Aflatoksino B_1 kiekis mikrogramais viename kg mėginio (milijardosios dalys) apskaičiuojamas pagal formulę:

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

kurioje:

Y ir X yra atitinkamai aflatoksino B_1 standartinio tirpalo (3.16) ir ekstrakto, turinčio panašų fluorescencijos intensyvumą, tūriai µl;

S = aflatoksino B_1 standartinio tirpalo (3.16) koncentracija µg/ml;

V = ekstrakto galutinis tūris µl, atsižvelgiant į visus darytus būtinus praskiedimus;

W = mėginio masė g, atitinkanti kolonėlėje gryninto ekstrakto tūrį.

6.2. *Matuojant fluordensitometru*

Aflatoksino B_1 kiekis mikrogramais viename kg mėginio apskaičiuojamas pagal formulę:

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

kurioje:

Y = ant plokštelės užlašinto ekstrakto tūris (10 arba 20 µl);

S = aflatoksino B_1 kiekis ng ekstrakto dėmėje (proporcingas paimtam tūriui Y), nustatytas pagal matavimus;

V = ekstrakto galutinis tūris µl, atsižvelgiant į visus darytus būtinus praskiedimus;

W = mėginio masė g, atitinkanti kolonėlėje gryninto ekstrakto tūrį.

7. Standartinio tirpalo (3.16) paruošimas ir tikrinimas

7.1. *Aflatoksino B_1 koncentracijos nustatymas*

Paruošiamas chloroforme (3.2) arba benzeno ir acetonitrilo mišinyje (3.6) pradinis standartinis aflatoksino B_1 tirpalas, kurio koncentracija 8–10 µg/ml. Spektrofotometru (4.11) nustatomas absorbcijos spektras 330–370 nm bangų ilgių intervale.

Tirpalo chloroforme optinis tankis (A) matuojamas esant bangos ilgiui 363 nm; jei tirpalas ruošiamas benzeno ir acetonitrilo mišinyje, matuojama esant 348 nm bangos ilgiui.

Aflatoksino B1 koncentracija mikrogramais viename tirpalo ml apskaičiuojama pagal žemiau pateikiamas formules:

$\frac{312 \cdot A \cdot 1\,000}{20600}$, tirpalo chloroforme atveju;

$\frac{312 \cdot A \cdot 1\,000}{19800}$, tirpalo benzeno ir acetonitrilo mišinyje atveju.

Darbiniam etaloniniam tirpalui, kuriame aflatoksino B_1 koncentracija būtų maždaug 0,1 µg/ml, gauti šis tirpalas tamsoje kiek reikia praskiedžiamas. Laikomas šaldytuve 4 °C temperatūroje, tirpalas patvarus dvi savaites.

7.2. *Chromatografinio grynumo tikrinimas*

Ant plokštelės (4.8) užlašinama 5 µl etaloninio tirpalo, kuriame yra 8–10 µg/ml aflatoksino B_1 (7.1). Chromatografuojama, kaip nurodyta 5.4 punkte. UV šviesoje chromatogramoje turi matytis tik viena dėmė ir neturi būti matoma jokių fluorescencijos požymių lašo pradinio uždėjimo vietoje.

8. Pakartojamumas

Skirtumas tarp dviejų rezultatų, gautų tam pačiam analitikui atliekant du lygiagrečius matavimus su tuo pačiu mėginiu, turi neviršyti:

— 25 % didžiausios vertės, kai aflatoksino B_1 kiekis 10–20 µg/kg,

— 5 µg, absoliučia verte, esant kiekiams 20–50 µg/kg,

— 10 % didžiausios vertės, kai aflatoksino B_1 daugiau kaip 50 µg/kg.

9. Atkartojamumas

Žr. C skyriaus „Pastabos“ 2 punktą.

B. DVIMATĖS PLONASLUOKSNĖS CHROMATOGRAFIJOS METODAS

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Šiuo metodu nustatomas aflatoksino B_1 kiekis pašaruose, kuriuose jo negalima nustatyti A metodu. Apatinė nustatymo riba 0,01 mg/kg (10 milijardųjų dalių). Metodas netaikytinas pašarams, kuriuose yra citrusinių išspaudų.

2. **Metodo esmė**

Mėginys ekstrahuojamas chloroformu. Ekstraktas filtruojamas, alikvotinė filtrato dalis gryninama, taikant kolonėlinę chromatografiją su silikageliu. Eliuatas išgarinamas, likutis ištirpinamas tiksliame chloroformo arba benzeno ir acetonitrilo mišinio tūryje. Su alikvotine šio tirpalo dalimi atliekama dvimatė plonasluoksnė chromatografija. Chromatogramą apšvietus UV spinduliais, aflatoksino B_1 kiekis nustatomas vizualiai arba fluordensimetru, fluorescencijos intensyvumą lyginant su žinomo kiekio standartinio aflatoksino B_1 fluorescencija. Iš pašarų ekstrahuoto aflatoksino B_1 identiškumas turi būti patvirtintas pagal nurodytą metodiką.

3. **Reagentai**

NB. Visi reagentai turi būti analiziškai gryni, jei nenurodyta kitaip.

3.1. Acetonas.

3.2. Chloroformas, stabilizuotas 0,5–1,0 % etanolio 96 % (v/v) tirpalu.

3.3. *n*-heksanas.

3.4. Metanolis.

3.5. Bevandenis dietileteris, neturintis peroksidų.

3.6. Benzeno ir acetonitrilo mišinys: 98/2 (v/v).

3.7. Chloroformo (3.2) ir metanolio (3.4) mišinys: 97/3 (v/v).

3.8. Silikagelis kolonėlinei chromatografijai, dalelių dydis 0,05–0,20 mm.

3.9. Higroskopinė vata, prieš tai nuriebalinta chloroformu, arba stiklo vata.

3.10. Natrio sulfatas, bevandenis, granuliuotas.

3.11. Inertinės dujos, pvz., azotas.

3.12. Druskos rūgšties 1 N tirpalas.

3.13. Diatomitas (arba *Hyflo Super Cel*), išplautas rūgštyje.

3.14. Silikagelis G-HR arba panašus, skirtas plonasluoksnei chromatografijai.

3.15. Tirpiklių sistemos atskyrimui:

3.15.1. Dietileteris (3.5)/metanolis (3.4)/vanduo: 94/4,5/1,5 (v/v/v), chromatografinė kamera prisotinama tirpiklių garais;

3.15.2. Chloroformas (3.2)/acetonas (3.1): 9/1 (v/v), chromatografinė kamera neprisotinama tirpiklių garais.

3.16. Standartinis tirpalas chloroforme (3.2) arba benzeno ir acetonitrilo mišinyje (3.6), kuriame aflatoksino B1 koncentracija būtų maždaug 0,1 µg/ml. Paruoštas ir patikrintas, kaip nurodyta A metodo 7 skyriuje.

4. **Įranga**

Žr. A metodo 4 skyrių.

5. **Darbo procedūra**

5.1. Mėginio paruošimas
5.2. Ekstrahavimas
5.3. Gryninimas kolonėlėje
} žr. A metodo 5.1, 5.2 ir 5.3 punktus.

5.4. *Dvimatė plonasluoksnė chromatografija*

5.4.1. Tirpalų užlašinimas (daroma pagal 1 paveikslo brėžinį)

Plokštelėje (4.8) tirpiklio sklidimui apriboti įbrėžiamos dvi tiesės, lygiagrečios gretimiems kraštams (5 ir 6 cm nuo atitinkamo krašto). Kapiliarinėmis pipetėmis ar mikrošvirkštais užlašinami tokie tirpalai:

— *A taške*: 20 µl mėginio ekstrakto, išgryninto pagal 5.3 punktą,

— *B taške*: 20 µl standartinio tirpalo (3.16),

— *C taške*: 10 µl standartinio tirpalo (3.16),

— *D taške*: 20 µl standartinio tirpalo (3.16),

— *E taške*: 40 µl standartinio tirpalo (3.16).

Džiovinama nestipriame oro arba inertinių dujų (3.11) sraute. Gautų dėmių skersmuo turi būti maždaug 5 mm skersmens.

5.4.2. Atskyrimas (daroma pagal 1 paveikslo brėžinį)

Chromatografuojama tamsoje I kryptimi, su tirpiklių sistema (3.15.1) (1 cm storio sluoksnis, kamera prisotinama tirpiklio garų), kol tirpiklis pasiekia jam užbrėžtą ribą. Plokštelė išimama iš indo, paliekama 15 minučių džiūti tamsioje vietoje kambario temperatūroje.

Chromatografuojama tamsoje II kryptimi, su tirpiklių sistema (3.15.2) (1 cm storio sluoksnis, kamera tirpiklio garų neprisotinama), kol tirpiklis pasiekia jam užbrėžtą ribą. Plokštelė išimama iš indo ir tamsioje vietoje džiovinama kambario temperatūroje.

5.4.3. Chromatogramos interpretavimas (daroma pagal 2 paveikslo brėžinį)

Chromatograma analizuojama UV šviesoje, padėjus plokštelę 10 cm atstumu nuo UV lempos (4.9). Nustatoma aflatoksino B_1 standartinio tirpalo paliktų B, C, D ir E dėmių vieta. Nubrėžiamos dvi įsivaizduojamos tiesės, einančios per šias dėmes statmenai chromatografavimo kryptims. Šių tiesių susikirtimo P taškas yra vieta, kurioje tikimasi rasti aflatoksino B_1 dėmę, atsiradusią dėl A taške užlašinto bandinio ekstrakto (1 paveikslas). Tačiau tikroji aflatoksino B_1 dėmės padėtis gali būti Q taške, kur susikerta dvi įsivaizduojamos tiesės, sudarančios tarp savęs maždaug 100° kampą ir einančios atitinkamai per B ir C dėmes. Aflatoksino B_1 kiekis bandinio ekstrakte nustatomas kaip nurodyta 5.5 punkte.

5.4.4. Papildomas chromatografavimas

Naujoje plokštelėje (4.8) įbrėžiamos dvi tiesės lygiagrečios gretimiems kraštams, kaip parodyta 1 paveikslo brėžinyje. A taške (žr. 1 paveikslą) užlašinama 20 µl pagal 5.3 punktą išgryninto mėginio ekstrakto ir ant jo viršaus užlašinama 20 µl standartinio tirpalo (3.16). Ryškinama, kaip nurodyta 5.4.2 punkte. Chromatograma apšviečiama UV lempa (4.9) ir žiūrima, ar:

— aflatoksino B_1 ekstrakto ir standartinio tirpalo dėmės užkloja viena kitą,

— šios dėmės fluorescencija intensyvesnė, negu aflatoksino B_1 dėmės, atsiradusios pirmosios plokštelės Q taške.

5.5. *Kiekybiniai nustatymai*

Nustatoma vizualiai arba fluordensitometru, kaip nurodyta toliau.

5.5.1. Vizualiniai matavimai

Aflatoksino B_1 kiekis ekstrakte nustatomas lyginant ekstrakto dėmių fluorescencijos intensyvumą su standartinių tirpalų C, D ir E dėmių fluorescencijos intensyvumais. Prireikus atliekama interpoliacija. Jei dėmės, kuri buvo gauta su 20 µl ekstrakto, fluorescencijos intensyvumas yra didesnis negu dėmės su 40 µl etaloninio tirpalo, ekstraktas 10 arba 100 kartų praskiedžiamas chloroformu (3.2) arba benzeno ir acetonitrilo mišiniu (3.6) ir iš naujo chromatografuojamas.

5.5.2. Matavimai fluordensitometru

Aflatoksino B_1 dėmių fluorescencijos intensyvumas matuojamas fluordensitometru (4.12), esant 365 nm sužadinimo bangos ilgiui ir 443 nm spinduliavimo bangos ilgiui.

Aflatoksino B_1 kiekis ekstrakto dėmėse nustatomas lyginant jų fluorescencijos intensyvumą su standartinių tirpalų C, D ir E dėmių fluorescencijos intensyvumais.

5.6. *Aflatoksino B_1 tapatumo patvirtinimas*

Žr. A metodo 5.6 punktą.

6. **Rezultatų apskaičiavimas**

Žr. A metodo 6 punktą.

7. **Pakartojamumas**

Žr. A metodo 8 punktą.

8. **Atkartojamumas**

Žr. C skyriaus „Pastabos“ 2 punktą.

C. A IR B METODAMS TAIKOMOS PASTABOS

1. **Nuriebalinimas**

Mėginiai, kuriuose yra daugiau kaip 5 % riebalų, po paruošimo pagal 5.1 punktą turi būti nuriebalinti petrolio eteriu (virimo temperatūra ne didesnė kaip 40 °C).

Tokiais atvejais analizės rezultatai turi būti apskaičiuojami nenuriebalinto mėginio masei.

2. **Rezultatų atkartojamumas**

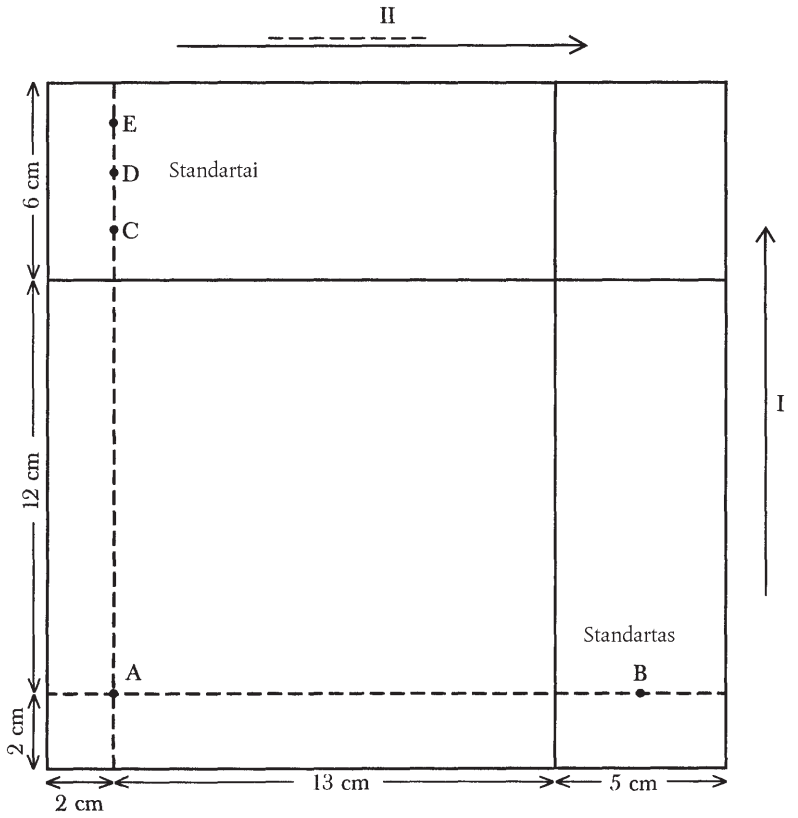
Rezultatų atkartojamumas, t. y. nuokrypis tarp to paties mėginio tyrimo rezultatų, gautų dviejose ar daugiau laboratorijų turėtų būti:

± 50 % vidurkio vertės, kai aflatoksino B_1 vidurkio vertė 10–20 µg/kg;

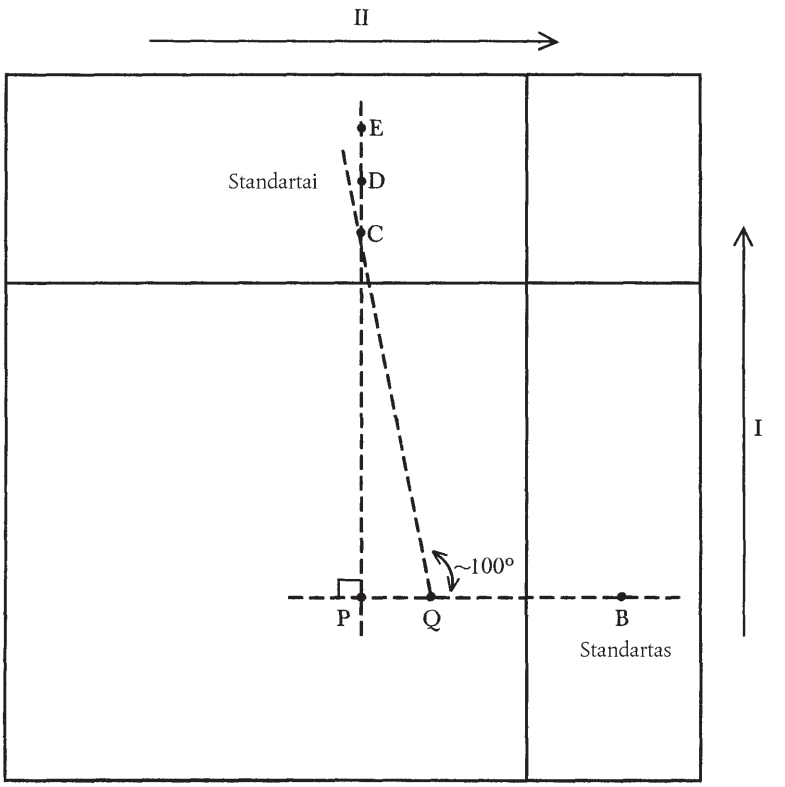
± 10 µg/kg nuo vidurkio vertės, kai vidurkio vertė 20–50 µg/kg;

± 20 % vidurkio vertės, kai vidurkio vertė didesnė kaip 50 µg/kg.

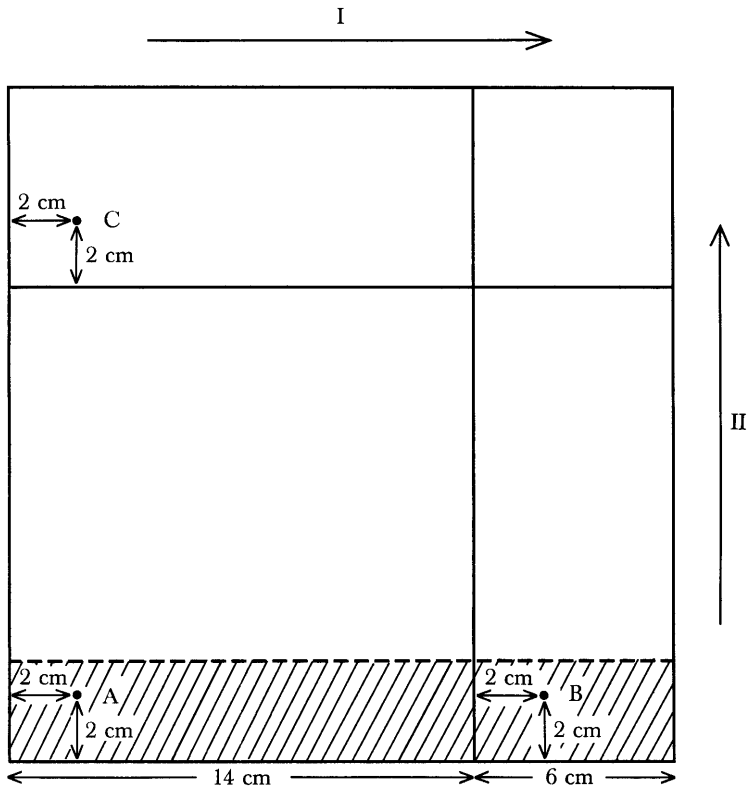
Priedo papildymas



1 paveikslas



2 paveikslas



3 paveikslas