31976L0372



# KOMISIJAS SEPTĪTĀ DIREKTĪVA

## (1976. gada 1. marts),

## ar ko nosaka Kopienas analīžu metodes barības oficiālajai kontrolei

(76/372/EEK)

EIROPAS KOPIENU KOMISIJA,

ņemot vērā Eiropas Ekonomikas kopienas dibināšanas līgumu,

ņemot vērā Padomes 1970. gada 20. jūlija Direktīvu par paraugu ņemšanas un analīžu Kopienas metožu ieviešanu barības oficiālajai kontrolei ([1]), kurā jaunākie grozījumi izdarīti ar Pievienošanās aktu ([2]), un jo īpaši tās 2. pantu,

tā kā minētajā direktīvā ir prasīts veikt oficiālu barības kontroli, izmantojot paraugu ņemšanas un analīžu Kopienas metodes, lai pārbaudītu atbilstību prasībām, kas normatīvo un administratīvo aktu noteikumos paredzētas attiecībā uz barības kvalitāti un sastāvu;

tā kā ar Komisijas 1971. gada 15. jūnija Direktīvu 71/250/EEK ([3]), 1971. gada 18. novembra Direktīvu 71/393/EEK ([4]), 1972. gada 27. aprīļa Direktīvu 72/199/EEK ([5]), 1972. gada 5. decembra Direktīvu 73/46/EEK ([6]), 1974. gada 25. marta Direktīvu 74/203/EEK ([7]) un 1974. gada 20. decembra Direktīvu 75/84/EEK ([8]) jau ir noteiktas vairākas Kopienas analīžu metodes;

tā kā šajā direktīvā paredzētie pasākumi ir saskaņā ar Barības pastāvīgās komitejas sniegto atzinumu,

IR PIEŅĒMUSI ŠO DIREKTĪVU.

*1. pants*

Dalībvalstis prasa, lai analīzes, ar ko barības oficiālās kontroles nolūkā nosaka aflatoksīna $B_1$ saturu, izdara saskaņā ar šīs direktīvas pielikumā aprakstītajām metodēm.

Vispārīgos noteikumus, kas izklāstīti 1971. gada 15. jūnija Pirmās direktīvas 71/250/EEK pielikuma 1. daļā "Ievads", izņemot to daļu, kas attiecas uz analizējamā parauga sagatavošanu, piemēro šīs direktīvas pielikumā aprakstītajām metodēm.

*2. pants*

Dalībvalstīs ne vēlāk kā līdz 1976. gada 1. oktobrim stājas spēkā normatīvie un administratīvie akti, kas vajadzīgi, lai nodrošinātu atbilstību šai direktīvai. Dalībvalstis par to tūlīt informē Komisiju.

*3. pants*

Šī direktīva ir adresēta dalībvalstīm.

Briselē, 1976. gada 1. martā

*Komisijas vārdā –*
*Komisijas loceklis*
P. J. LARDINOIS

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

*PIELIKUMS*

## AFLATOKSĪNA $B_1$ NOTEIKŠANA

A. VIENDIMENSIJAS PLĀNSLĀŅU HROMATOGRĀFIJAS METODE

1. **Mērķis un piemērošanas joma**

Ar šo metodi var noteikt aflatoksīna $B_1$ saturu šādā barībā: zemesriekstos, koprā, linsēklās, sojā, sezamā, babasū palmā, kukurūzas dīgļu eļļas raušos, labībā un labības produktos, zirņu miltos, kartupeļu mīkstumā un kartupeļu cietē. Zemākā noteikšanas robeža ir 0,01 mg/kg (10 ppb).

Ja traucējošu vielu klātbūtne apgrūtina noteikšanu, analīze jāatkārto, izmantojot B metodi (divdimensiju plānslāņu hromatogrāfija).

2. **Princips**

Paraugu ekstrahē ar hloroformu. Ekstraktu izfiltrē, ņem alikvotu daļu un attīra kolonnas hromatogrāfijā ar silikagelu. Eluātu ietvaicē un atlikumu no jauna izšķīdina noteiktā daudzumā hloroforma vai benzola un acetonitrila maisījuma. Alikvotu šā šķīduma daļu lieto plānslāņu hromatogrāfijā. Apstarojot hromatogrammu ar UV gaismu, aflatoksīna daudzumu nosaka vizuāli vai fluordensitometrijā, salīdzinot ar aflatoksīna $B_1$ standartiem, kuros aflatoksīna daudzums ir zināms. No barības ekstrahētā aflatoksīna $B_1$ identitāte jāapstiprina saskaņā ar norādīto procedūru.

3. **Reaģenti**

NB: Ja nav citu norādījumu, visiem reaģentiem jābūt "analītiska reaģenta" kvalitātei.

3.1. Acetons.

3.2. Hloroforms, kas stabilizēts ar 0, 5–1,0 % 96 % etanola (V/V).

3.3. N-heksāns.

3.4. Metilspirts.

3.5. Bezūdens dietilēteris, kas nesatur peroksīdus.

3.6. Benzola un acetonitrila maisījums: 98/2 (V/V).

3.7. Hloroforma (3.2.) un metilspirta (3.4.) maisījums: 97/3 (V/V).

3.8. Kolonnas hromatogrāfijai – silikagels, kura daļiņu lielums ir 0,05–0,20 mm.

3.9. Absorbējoša kokvilnas vate, kas iepriekš attaukota ar hloroformu, vai stikla vate.

3.10. Granulēts bezūdens nātrija sulfāts.

3.11. Inerta gāze, piemēram, slāpeklis.

3.12. 1 N sālsskābe.

3.13. 50 % (V/V) sērskābe.

3.14. Kizelgūrs (diatomīts), kas mazgāts skābē.

3.15. Silikagels G-HR vai līdzvērtīgs – plānslāņu hromatogrāfijai.

3.16. Standartšķīdums ar apmēram 0,1 µg aflatoksīna $B_1$ uz ml hloroforma (3.2.) vai benzola/acetonitrila maisījuma (3.6.), ko gatavo un pārbauda, kā norādīts 7. iedaļā.

3.17. Kvalitatīvai pārbaudei paredzēts standartšķīdums, kas satur apmēram 0,1 µg aflatoksīna $B_1$ un $B_2$ uz ml hloroforma (3.2.) vai benzola/acetonitrila maisījuma (3.6.). Šīs koncentrācijas ir orientējošas. Tās jāprecizē, lai abiem aflatoksīniem nodrošinātu vienādu fluorescences intensitāti.

3.18. Attīstītāji:

3.18.1. Hloroforms (3.2.)/acetons (3.1.): 9/1 (V/V), nepiesātināta kamera.

3.18.2. Dietilēteris (3.5.)/metilspirts (3.4.)/ūdens: 96/3/1 (V/V/V), nepiesātināta kamera.

3.18.3. Dietilēteris (3.5.)/metilspirts(3.4.)/ūdens: 94/4,5/1,5 (V/V/V), piesātināta kamera.

3.18.4. Hloroforms (3.2.)/metilspirts (3.4.): 94/6 (V/V), piesātināta kamera.

3.18.5. Hloroforms (3.2.)/metilspirts (3.4.): 97/3 (V/V), piesātināta kamera.

4. **Aparatūra**

4.1. Smalcinātājs – maisītājs.

4.2. Kratītājs vai magnētiskais maisītājs.

4.3. Šleihera un Šīla kroku filtri Nr. 588 vai līdzvērtīgi ar 24 cm diametru.

4.4. Hromatogrāfijas stikla caurule, kuras iekšējais diametrs ir 22 mm un garums 300 mm, ar politetrafluoretilēna (PTFE) krānu un 250 ml rezervuāru.

4.5. Rotācijas ietvaicētājs ar 500 ml apaļkolbu.

4.6. 500 ml koniskās kolbas ar šlifa aizbāžņiem.

4.7. Plānslāņu hromatogrāfijas iekārta.

4.8. Stikla plates plānslāņu hromatogrāfijai, 200 x 200 mm, sagatavotas kā norādīts tālāk tekstā (norādītie daudzumi ir pietiekami piecu plašu sagatavošanai). 30 g silikagela G-HR (3.15.) liek koniskā kolbā. Pievieno 60 ml ūdens, aiztaisa un krata vienu minūti. Suspensiju klāj uz platēm tā, lai izveidojas viendabīgs 0,25 mm slānis. Ļauj nožūt un liek eksikatorā ar silikagelu. Lietošanas laikā plates aktivē, turot vienu stundu žāvēšanas skapī 110 °C temperatūrā.

Var izmantot gatavas plates, ja tās dod līdzīgus rezultātus tiem, ko iegūst ar platēm, kuras gatavo, kā aprakstīts iepriekš.

4.9. UV lampa ar lielu viļņu garumu (360 nm). Gaismas intensitātei jānodrošina 1 ng aflatoksīna $B_1$ plankuma skaidra izšķiršana uz plānslāņu hromatogrāfijas plates 10 cm attālumā no lampas.

4.10. Graduētas 10 ml mēģenes ar polietilēna aizbāžņiem.

4.11. UV spektrofotometrs.

4.12. Fluordensitometrs (vēlams).

5. **Procedūra**

5.1. *Parauga sagatavošana* (sk. "Piezīmes" C daļas 1. punktā)

Samaļ paraugu tā, lai tas viss iet caur sietu ar 1 mm acu izmēru (saskaņā ar ISO R 565 ieteikumiem).

5.2. *Ekstrakcija*

50 g samalta un homogenizēta parauga liek koniskā 500 ml kolbā (4.6.). Pievieno 25 g kizelgūra (3.14.), 25 ml ūdens un 250 ml hloroforma (3.2.). Aiztaisa kolbu, krata vai maisa 30 minūtes ar aparātu (4.2.) un izfiltrē caur kroku filtru (4.3.). Izmet pirmos 10 ml filtrāta un savāc 50 ml.

5.3. *Kolonnas tīrīšana*

Hromatogrāfijas caurules (4.4.) apakšgalā ieliek kokvilnas vai stikla vates tamponu (3.9.), divas trešdaļas caurules piepilda ar hloroformu (3.2.) un pievieno 5 g nātrija sulfāta (3.10.).

Pārbauda, vai nātrija sulfāta slāņa augšējā virsma ir līdzena, un mazās porcijās pievieno 10 g silikagela (3.8.). Pēc katras porcijas pievienošanas labi samaisa, lai neveidojas gaisa burbuļi. Ļauj nostāties 15 minūtes un tad uzmanīgi pievieno 15 g nātrija sulfāta (3.10.). Ļauj šķidrumam tecēt uz leju, līdz tas ir nedaudz virs nātrija sulfāta slāņa augšējās virsmas.

Sajauc 50 ml ekstrakta, kas savākts, kā aprakstīts 5.2., ar 100 ml n-heksāna (3.3.), un maisījumu kvantitatīvi pārnes uz kolonnu. Ļauj šķidrumam tecēt uz leju, līdz tas ir nedaudz virs nātrija sulfāta slāņa augšējās virsmas. Šīs saskalas nolej. Tad pievieno 100 ml dietilētera (3.5.) un vēlreiz ļauj tecēt līdz nātrija sulfāta slāņa augšējai virsmai. Veicot šīs darbības, jāraugās, lai tecēšanas ātrums ir no 8 līdz 12 ml minūtē un lai kolonna neiztek sausa. Nolej iztekošo šķidrumu. Pēc tam eluē ar 150 ml hloroforma/metilspirta maisījuma (3.7.) un savāc visu eluātu.

Pēdējo ar rotācijas ietvaicētāju (4.5.) gandrīz līdz sausam stāvoklim ietvaicē inertas gāzes plūsmā (3.11.) temperatūrā, kas nepārsniedz 50 °C. Atlikumu, izmantojot hloroforma (3.2.) vai benzola un acetonitrila maisījumu (3.6.), kvantitatīvi pārnes uz graduētu 10 ml mēģeni (4.10.). Šķīdumu koncentrē inertas gāzes (3.11.) plūsmā un pēc tam papildina tilpumu līdz 2 ml ar hloroformu (3.2.) vai benzola un acetonitrila maisījumu (3.6.).

5.4. *Plānslāņu hromatogrāfija*

Uz plānslāņu hromatogrāfijas plates 2 cm no apakšējās malas ar 2 cm atstarpēm (4.8.) pārnes turpmāk norādītos standartšķīduma un ekstrakta tilpumus:

— 10, 15, 20, 30 un 40 µl aflatoksīna $B_1$ standartšķīduma (3.16.),

— 10 µl ekstrakta, ko iegūst, kā aprakstīts 5.3. punktā, un uzliek virsū tajā pašā vietā, 20 µl standartšķīduma (3.16.),

— 10 un 20 µl ekstrakta, ko iegūst, kā aprakstīts 5.3. punktā.

Hromatogrammu attīsta tumsā ar vienu no attīstītājiem (3.18.). Attīstītājs jāizvēlas iepriekš, liekot 25 µl kvalitatīvā standartšķīduma (3.17.) uz plates un pārbaudot, vai pēc attīstīšanas aflatoksīns $B_1$ ir pilnīgi atdalījies no $B_2$.

Ļauj attīstītājiem iztvaikot tumsā un pēc tam apstaro ar UV gaismu, liekot plati 10 cm attālumā no lampas (4.9.). Aflatoksīna $B_1$ plankumi fluorescē zili.

5.5. *Kvantitatīva noteikšana*

Nosaka vizuāli vai fluordensitometrijā, kā norādīts turpmāk.

5.5.1. Vizuālie mērījumi

Aflatoksīna $B_1$ daudzumu ekstraktā nosaka, salīdzinot ekstrakta plankumu fluorescences intensitāti ar standartšķīduma plankumu fluorescences intensitāti. Vajadzības gadījumā interpolē. Fluorescencei, kas rodas, ekstraktu uzliekot uz standartšķīduma, jābūt intensīvākai par 10 µl ekstrakta fluorescenci un nedrīkst būt vairāk par vienu redzamu plankumu. Ja 10 µl ekstrakta fluorescence ir intensīvāka par 40 µl standartšķīduma fluorescenci, ekstraktu pirms atkārtotas plānslāņu hromatogrāfijas atšķaida 10 vai 100 reižu ar hloroformu (3.2.) vai benzola un acetonitrila maisījumu (3.6.).

5.5.2. Fluordensitometrijas mērījumi

Aflatoksīna $B_1$ plankumu fluorescences intensitāti mēra ar fluordensitometru (4.12.) 365 nm garuma indukcijas viļņos un 443 nm garuma emisijas viļņos. Aflatoksīna $B_1$ daudzumu ekstrakta plankumos nosaka, salīdzinot to fluorescences intensitāti ar aflatoksīna $B_1$ standarta plankumu fluorescences intensitāti.

5.6. *Aflatoksīna $B_1$ identitātes apstiprināšana*

Aflatoksīna $B_1$ identitāti ekstraktā apstiprina turpmāk norādītajās procedūrās.

5.6.1. Apstrāde ar sērskābi

Saskaņā ar 5.4. iegūto hromatogrammu apsmidzina ar sērskābi (3.13.). Aflatoksīna $B_1$ plankumu zilajai fluorescencei jākļūst dzeltenai, apstarojot ar UV gaismu.

5.6.2. Divdimensiju hromatogrāfija ar aflatoksīna $B_1$ pusacetāla (aflatoksīna $B_{2a}$) veidošanos

NB: Turpmāk aprakstītās darbības jāveic, precīzi ievērojot diagrammu 3. attēlā.

5.6.2.1. Šķīdumu lietojums

Uz plates (4.8.) novelk divas taisnas līnijas, kas ir paralēlas divām blakuspusēm (6 cm uz iekšu no katras puses), lai ierobežotu šķīdinātāja frontu pārvietošanos. Ar kapilārpipetēm vai mikropipetēm uz plates uzpilina šādus šķīdumus:

— *punktā A*: tilpumu attīrīta parauga ekstrakta, kas iegūts, kā aprakstīts 5.3. punktā, un satur apmēram 2,5 nm aflatoksīna $B_1$,

— *punktā B un C*: 25 µl standartšķīduma (3.16.).

5.6.2.2. Attīstīšana

Hromatogrammu attīsta tumsā virzienā I ar attīstītāju (3.18.1.) (1 cm slānis nepiesātinātā kamerā), līdz šķīdinātāju fronte sasniedz šķīdinātāja robežlīniju.

Izņem plati no kameras un piecas minūtes ļauj žūt tumsā apkārtējās vides temperatūrā. Tad 2,5 cm augstā joslā izsmidzina sālsskābi (3.12.), noklājot punktus A un B, kas 3. attēlā parādīti iezīmētajā rajonā, līdz tā kļūst tumša, bet plates atlikušo daļu aizsedz ar stikla plāksni. Ļauj reaģēt tumsā 10 minūtes, žāvē ar gaisa plūsmu apkārtējās vides temperatūrā.

Pēc tam hromatogrammu attīsta tumsā virzienā II ar attīstītāju (3.18.1.) (1 cm slānis nepiesātinātā kamerā), līdz šķīdinātāju fronte sasniedz šķīdinātāja robežlīniju. Izņem plati no kameras un ļauj žūt apkārtējās vides temperatūrā.

5.6.2.3. Hromatogrammas interpretācija.

Hromatogrammu apskata UV gaismā (4.9.) un pārbauda, vai tai ir šādas iezīmes:

a) zils fluorescents aflatoksīna $B_1$ plankums, kas radies no standartšķīduma C punktā (pārvietošanās virzienā I);

b) zils fluorescents (ar sālsskābi) nereaģējuša aflatoksīna $B_1$ plankums un intensīvāk zils fluorescents aflatoksīna $B_1$-pusacetāla plankums, kuri abi radušies no standartšķīduma punktā B (pārvietošanās virziens II);

c) plankumi, kas atbilst b) punktā aprakstītajiem; radušies no parauga ekstrakta punktā A. Šo plankumu atrašanās vietu nosaka, pirmkārt, aflatoksīna $B_1$ pārvietošanās attālums no punkta A virzienā I (vienāds ar punktā C uzpilinātā standarta pārvietošanās attālumu) un, otrkārt, aflatoksīna $B_1$-pusacetāla pārvietošanās attālumi no tā virzienā II (vienādi ar punktā B uzpilinātā standarta pārvietošanās attālumu). To pusacetāla plankumu fluorescences intensitātei, kas radušies no ekstrakta un no standartšķīduma, kas uzpilināts punktā B, būtu jāsakrīt.

## 6. **Rezultātu aprēķināšana**

6.1. *Pēc vizuālajiem mērījumiem*

Saturu mikrogramos aflatoksīna $B_1$ uz kg parauga (ppb) aprēķina pēc formulas:

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

kur:

Y un X ir attiecīgi aflatoksīna $B_1$ standartšķīduma (3.16.) un ekstrakta ar līdzīgu fluorescences intensitāti tilpums mikrolitros,

S = koncentrācija mikrogramos aflatoksīna $B_1$ uz ml standartšķīduma (3.16.),

V = ekstrakta galīgais tilpums mikrolitros, no kura var sagatavot jebkuru vajadzīgo atšķaidījumu,

W = parauga svars gramos, kas atbilst kolonnas tīrīšanas ekstrakta tilpumam.

6.2. *Pēc fluordensitometrijas mērījumiem*

Saturu mikrogramos aflatoksīna $B_1$ uz kg parauga aprēķina pēc formulas:

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

kur:

Y = uz plates uzpilinātā ekstrakta tilpums mikrolitros (10 vai 20 µl),

S = aflatoksīna $B_1$ daudzums nanogramos ekstrakta plankumā (proporcionāls attiecīgajai Y vērtībai), ko izsecina no mērījumiem,

V = ekstrakta galīgais tilpums mikrolitros, no kura var sagatavot jebkuru vajadzīgo atšķaidījumu,

W = parauga svars gramos, kas atbilst kolonnas tīrīšanas ekstrakta tilpumam.

7. **Standartšķīduma (3.16.) gatavošana un pārbaude**

7.1 *Aflatoksīna $B_1$ koncentrācijas noteikšana*

Sagatavo aflatoksīna $B_1$ standartšķīdumu hloroformā (3.2.) vai benzola un acetonitrila maisījumā (3.6.) ar koncentrāciju no 8 līdz 10 µg/ml. Ar spektrofotometru (4.11.) nosaka absorbcijas spektru no 330 līdz 370 nm.

Izmēra optisko blīvumu (A) 363 nm līmenī hloroforma šķīdumā; vai 348 nm līmenī benzola un acetonitrila maisījuma šķīdumā.

Aprēķina aflatoksīna $B_1$ koncentrāciju mikrogramos uz ml šķīduma pēc formulām:

$\frac{312 \cdot A \cdot 1\,000}{20600}$ hloroforma šķīdumā,

$\frac{312 \cdot A \cdot 1\,000}{19800}$ benzola un acetonitrila maisījuma šķīdumā.

Pēc vajadzības, sargājot no dienasgaismas, atšķaida, lai iegūtu darba standartšķīdumu ar aflatoksīna $B_1$ koncentrāciju apmēram 0,1 µg/ml. Glabājot ledusskapī 4 °C temperatūrā, šis šķīdums ir stabils divas nedēļas.

7.2 *Hromatogrāfiskās tīrības pārbaude*

Uzpilina uz plates (4.8.) 5 µl aflatoksīna $B_1$ standartšķīduma, kas satur no 8 līdz 10 µg/ml (7.1.). Hromatogrammu attīsta, kā norādīts 5.4. punktā. UV gaismā hromatogrammā vajadzētu būt redzamam tikai vienam plankumam, un sākumpunktā nedrīkst būt uztverama fluorescence.

8. **Atkārtojamība**

No viena parauga viena analītiķa divās paralēlās noteikšanās iegūto rezultātu atšķirība nedrīkst pārsniegt:

— 25 % no lielākā rezultāta, ja aflatoksīna $B_1$ saturs ir no 10 līdz 20 µg/kg,

— 5 µg pēc absolūtā lieluma, ja saturs ir lielāks par 20 un mazāks par 50 µg/kg,

— 10 % no lielākā rezultāta, ja saturs pārsniedz 50 µg/kg.

9. **Reproducējamība**

Sk. "Piezīmes" C daļas 2. punktā.

B. DIVDIMENSIJU PLĀNSLĀŅU HROMATOGRĀFIJAS METODE

1. **Mērķis un piemērošanas joma**

Ar šo metodi var noteikt aflatoksīna $B_1$ līmeni barībā, uz ko neattiecas A metodes piemērošanas joma. Zemākā noteikšanas robeža ir 0,01 mg/kg (10 ppb). Metode nav piemērojama barībai, kas satur citrusaugļu mīkstumu.

2. **Princips**

Paraugu ekstrahē ar hloroformu. Ekstraktu izfiltrē, ņem alikvotu daļu un attīra kolonnas hromatogrāfijā ar silikagelu. Eluātu ietvaicē un atlikumu no jauna izšķīdina noteiktā daudzumā hloroforma vai benzola un acetonitrila maisījuma. Alikvotu šā šķīduma daļu lieto divdimensiju plānslāņu hromatogrāfijā. Apstarojot hromatogrammu ar UV gaismu, aflatoksīna $B_1$ daudzumu nosaka vizuāli vai fluordensitometrijā, salīdzinot ar aflatoksīna $B_1$ standartiem, kuros aflatoksīna daudzums ir zināms. No barības ekstrahētā aflatoksīna $B_1$ identitāte jāapstiprina saskaņā ar norādīto procedūru.

3. **Reaģenti**

NB: Ja nav citu norādījumu, visiem reaģentiem jābūt "analītiska reaģenta" kvalitātei.

3.1. Acetons.

3.2. Hloroforms, kas stabilizēts ar 0,5–1,0 % 96 % etanola (V/V).

3.3. N-heksāns.

3.4. Metilspirts.

3.5. Bezūdens dietilēteris, kas nesatur peroksīdus.

3.6. Benzola un acetonitrila maisījums: 98/2 (V/V).

3.7. Hloroforma (3.2.) un metilspirta (3.4.) maisījums: 97/3 (V/V).

3.8. Kolonnas hromatogrāfijai – silikagels, kura daļiņu lielums ir 0,05–0,20 mm.

3.9. Absorbējoša kokvilnas vate, kas iepriekš attaukota ar hloroformu, vai stikla vate.

3.10. Granulēts bezūdens nātrija sulfāts.

3.11. Inerta gāze, piemēram, slāpeklis.

3.12. 1 N sālsskābe.

3.13. Kizelgūrs (diatomīts), kas mazgāts skābē.

3.14. Silikagels G-HR vai līdzvērtīgs – plānslāņu hromatogrāfijai.

3.15. Attīstītāji.

3.15.1. Dietilēteris (3.5.)/metilspirts (3.4.)/ūdens: 94/4,5/1,5 (V/V/V), piesātināta kamera.

3.15.2. Hloroforms (3.2.)/acetons (3.1.): 9/1 (V/V), nepiesātināta kamera.

3.16. Standartšķīdums ar apmēram 0,1 µg aflatoksīna $B_1$ uz ml hloroforma (3.2.) vai benzola un acetonitrila maisījuma (3.6.), ko gatavo un pārbauda, kā aprakstīts A metodes 7. punktā.

4. **Iekārta**

Sk. A metodes 4. punktā.

5. **Procedūra**

5.1. *Parauga sagatavošana*
5.2. *Ekstrakcija*
5.3. *Kolonnas tīrīšana*
} Sk. A metodes 5.1., 5.2. un 5.3. punktu.

5.4. *Divdimensiju plānslāņu hromatogrāfija*

5.4.1. Šķīdumu lietojums (sk. diagrammu 1. attēlā)

Uz plates (4.8.) novelk divas taisnas līnijas, kas ir paralēlas divām blakuspusēm (5 un 6 cm uz iekšu no katras puses), lai ierobežotu šķīdinātāja frontu pārvietošanos. Ar kapilārpipetēm vai mikropipetēm uz plates uzpilina šādus šķīdumus:

— *punktā A* – 20 µl attīrīta parauga ekstrakta, ko iegūst saskaņā ar 5.3. punktu,

— *punktā B* – 20 µl standartšķīduma (3.16.),

— *punktā C* – 10 µl standartšķīduma (3.16.),

— *punktā D* – 20 µl standartšķīduma (3.16.),

— *punktā E* – 40 µl standartšķīduma (3.16.).

Žāvē lēnā gaisa vai inertas gāzes (3.11.) plūsmā. Iegūto plankumu diametram jābūt apmēram 5 mm.

5.4.2. Attīstīšana (sk. diagrammu 1. attēlā)

Hromatogrammu attīsta tumsā virzienā I ar attīstītāju (3.15.1.) (1 cm slānis piesātinātā kamerā), līdz šķīdinātāju fronte sasniedz šķīdinātāja robežlīniju. Izņem plati no kameras un 15 minūtes ļauj žūt tumsā apkārtējās vides temperatūrā.

Pēc tam hromatogrammu attīsta tumsā virzienā II ar attīstītāju (3.15.2.) (1 cm slānis nepiesātinātā kamerā), līdz šķīdinātāju fronte sasniedz šķīdinātāja robežlīniju. Izņem plati no kameras un ļauj žūt apkārtējās vides temperatūrā.

5.4.3. Homatogrammas interpretācija (sk. diagrammu 2. attēlā)

Apstaro hromatogrammu ar UV gaismu, noliekot plati 10 cm attālumā no lampas (4.9.). Nosaka zilo fluorescento aflatoksīna $B_1$ plankumu B,C, D un E novietojumu. Caur šiem plankumiem taisnā leņķī pret attīstīšanas virzieniem projicē divas iedomātas līnijas. Šo līniju krustojumā P ir prognozējams aflatoksīna $B_1$ plankums, kas radies no punktā A (1. attēlā) uzpilinātā parauga ekstrakta. Tomēr faktiski aflatoksīna $B_1$ plankums var būt punktā Q, kur krustojas divas taisnas, iedomātas līnijas, kas ir apmēram 100° leņķī viena pret otru un attiecīgi projicētas caur plankumu B un C. Aflatoksīna $B_1$ daudzumu parauga ekstraktā nosaka, kā aprakstīts 5.5. punktā.

5.4.4. Papildhromatogrāfija

Uz jaunas plates (4.8.) novelk divas taisnas līnijas, kas ir paralēlas divām blakuspusēm, kā parādīts diagrammā 1. attēlā, un punktā A (sk. 1. attēlu) uzpilina 20 µl attīrītā ekstrakta, kas iegūts, kā aprakstīts 5.3. punktā, un uzpilina tam virsū 20 µl standartšķīduma (3.16.). Attīsta, kā norādīts 5.4.2. punktā. Hromatogrammu apstaro ar UV gaismu (4.9.) un pārbauda, vai:

— aflatoksīna $B_1$ plankumi, kas radušies no ekstrakta un standarta, ir uzlikti virsū,

— šis plankums fluorescē intensīvāk nekā aflatoksīna $B_1$ plankums punktā Q uz pirmās plates.

5.5. *Kvantitatīva noteikšana*

Nosaka vizuāli vai fluordensitometrijā, kā norādīts tālāk tekstā.

5.5.1. Vizuāli mērījumi

Aflatoksīna $B_1$ daudzumu ekstraktā nosaka, salīdzinot ekstrakta plankuma fluorescences intensitāti ar standartšķīduma plankumu C, D un E fluorescences intensitāti. Vajadzības gadījumā interpolē. Ja 20 µl ekstrakta fluorescence ir intensīvāka par 40 µl standartšķīduma fluorescenci, ekstraktu pirms atkārtotas plānslāņu hromatogrāfijas atšķaida 10 vai 100 reižu ar hloroformu (3.2.) vai benzola un acetonitrila maisījumu (3.6.).

5.5.2. Fluordensitometrijas mērījumi

Aflatoksīna $B_1$ plankumu fluorescences intensitāti mēra ar fluordensitometru (4.12.) 365 nm garuma indukcijas viļņos un 443 nm garuma emisijas viļņos.

Aflatoksīna $B_1$ daudzumu ekstrakta plankumā nosaka, salīdzinot ekstrakta plankuma fluorescences intensitāti ar standartšķīduma plankumu C, D un E fluorescences intensitāti.

5.6. *Aflatoksīna $B_1$ identitātes apstiprināšana*

Sk. A metodes 5.6. punktu.

6. **Rezultātu aprēķināšana**

Sk. A metodes 6. punktu.

7. **Atkārtojamība**

Sk. A metodes 8. punktu.

8. **Reproducējamība**

Sk. "Piezīmes" C daļas 2. punktu.

C. PIEZĪMES PAR A UN B METODI

1. **Attaukošana**

Paraugi, kas satur vairāk par 5 % tauku, pēc sagatavošanas, kas aprakstīta 5.1. punktā, jāattauko ar petrolēteri (v. t. 40–60 °C).

Tādos gadījumos analītiskie rezultāti jāizsaka neattaukotā parauga svara izteiksmē.

2. **Rezultātu reproducējamība**

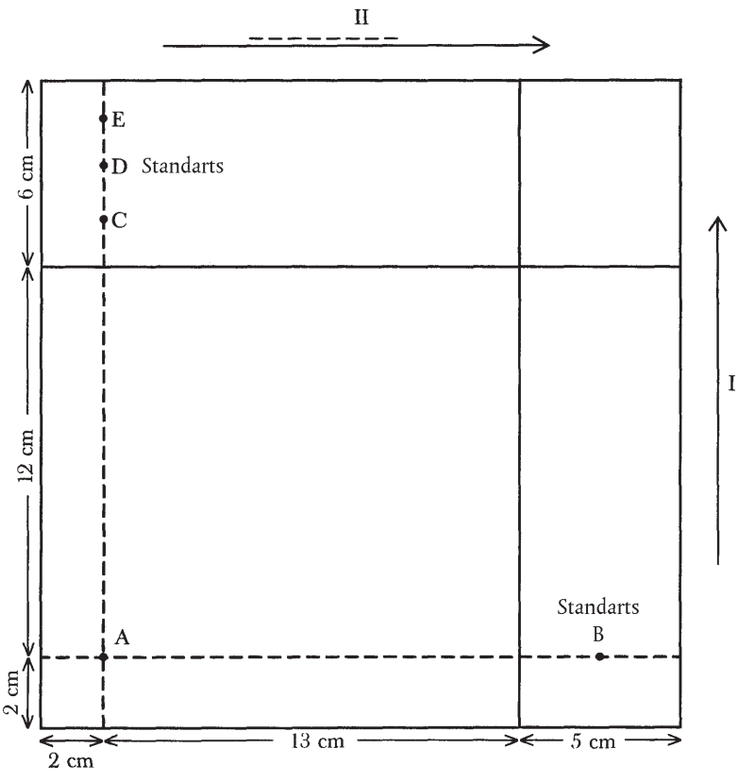
Rezultātu reproducējamība, t. i., no viena un tā paša parauga divās vai vairākās laboratorijās iegūto rezultātu atšķirība ir novērtēta šādi:

± 50 % no vidējā lieluma, ja ir no 10 līdz 20 µg/kg,

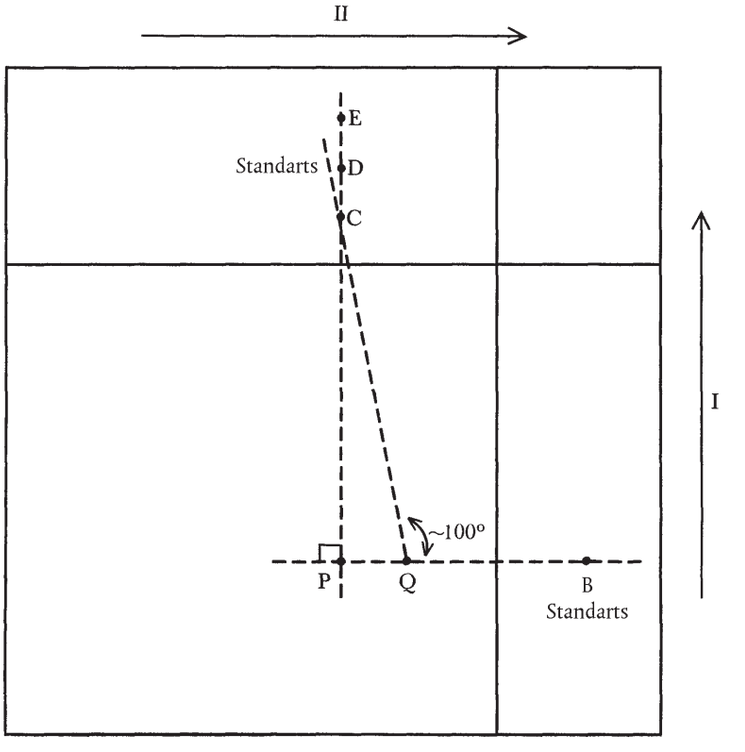
± 10 µg/kg no vidējā lieluma, ja vidējais lielums pārsniedz 20 un ir mazāks par 50 µg/kg,

± 20 % no vidējā lieluma, ja vidējais lielums pārsniedz 50 µg/kg.

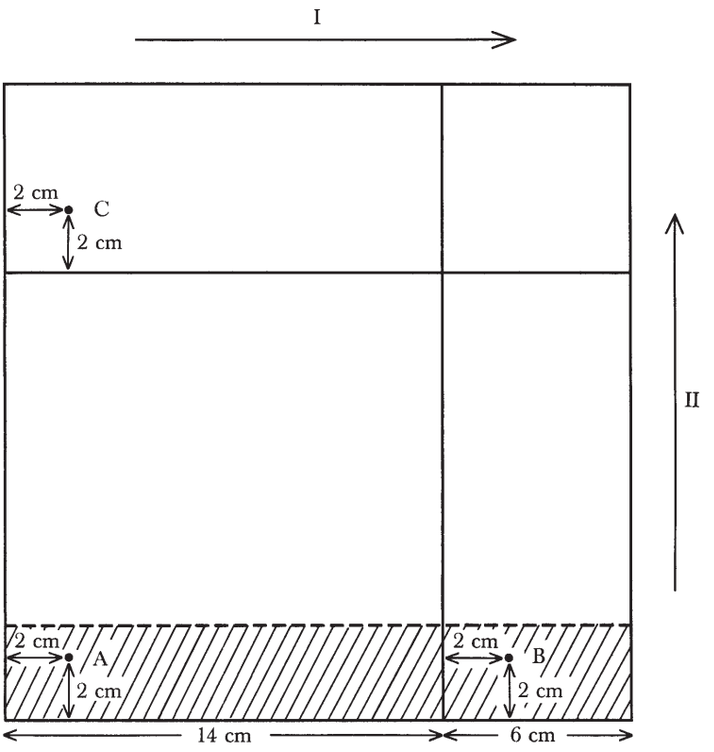
*Pielikuma papildinājums*




1. zīmējums




2. zīmējums




3. zīmējums