31976L0372

L 102/8 *DZIENNIK URZĘDOWY WSPÓLNOT EUROPEJSKICH* 15.4.1976

SIÓDMA DYREKTYWA KOMISJI

z dnia 1 marca 1976 r.

ustanawiająca wspólnotowe metody analizy do celów urzędowej kontroli pasz

(76/372/EWG)

KOMISJA WSPÓLNOT EUROPEJSKICH,

uwzględniając Traktat ustanawiający Europejską Wspólnotę Gospodarczą,

uwzględniając dyrektywę Rady z dnia 20 lipca 1970 r. w sprawie wprowadzenia wspólnotowych metod pobierania próbek i dokonywania analiz do celów urzędowej kontroli pasz ([1]), ostatnio zmienioną Aktem Przystąpienia ([2]), w szczególności jego art. 2,

a także mając na uwadze, co następuje:

dyrektywa wymaga, aby urzędowa kontrola pasz była przeprowadzana przy zastosowaniu wspólnotowych metod pobierania próbek i analiz w celu sprawdzenia zgodności z wymaganiami wynikającymi z przepisów ustawowych, wykonawczych i administracyjnych dotyczących jakości i składu pasz;

dyrektywy Komisji 71/250/EWG z dnia 15 czerwca 1971 r. ([3]), 71/393/EWG z dnia 18 listopada 1971 r. ([4]), 72/199/EWG z dnia 27 kwietnia 1972 r. ([5]), 73/46/EWG z dnia 5 grudnia 1972 r. ([6]), 74/203/EWG z dnia 25 marca 1974 r. ([7]) i 75/84/EWG z dnia 20 grudnia 1974 r. ([8]) ustanowiły już szereg wspólnotowych metod analizy; postęp prac od tamtego czasu wskazuje na celowość przyjęcia siódmego zestawu metod;

środki przewidziane w niniejszej dyrektywie są zgodne z opinią Stałego Komitetu ds. Pasz,

PRZYJMUJE NINIEJSZĄ DYREKTYWĘ:

Artykuł 1

Państwa Członkowskie wymagają, aby analizy do celów urzędowych kontroli pasz w odniesieniu do zawartości aflatoksyny B_1 w paszach były przeprowadzane przy użyciu metod opisanych w Załączniku do niniejszej dyrektywy.

Ogólne przepisy, określone w części I (Wstęp) Załącznika do pierwszej dyrektywy Komisji 71/250/EWG z dnia 15 czerwca 1971 r., z wyjątkiem części opisującej przygotowanie próbki do analizy, mają zastosowanie do metod opisanych w Załączniku do niniejszej dyrektywy.

Artykuł 2

Państwa Członkowskie wprowadzą w życie, najpóźniej do dnia 1 października 1976 r., przepisy ustawowe, wykonawcze i administracyjne niezbędne do wykonania niniejszej dyrektywy i niezwłocznie powiadomią o tym Komisję.

Artykuł 3

Niniejsza dyrektywa skierowana jest do Państw Członkowskich.

Sporządzono w Brukseli, dnia 1 marca 1976 r.

W imieniu Komisji

P. J. LARDINOIS

Członek Komisji

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

ZAŁĄCZNIK

OKREŚLENIE ZAWARTOŚCI AFLATOKSYNY B_1

A. METODA JEDNOKIERUNKOWA CHROMATOGRAFII CIENKOWARSTWOWEJ

1. **Cel i zakres metody**

Metoda ta umożliwia określenie zawartości aflatoksyny B_1 w następujących paszach: orzechach ziemnych, koprze, siemieniu lnianym, soi, sezamie indyjskim, makuchach z palmy babbasu i kiełkach kukurydzy, roślinach zbożowych i produktach zbożowych, mączce grochowej, pulpie ziemniaczanej i skrobi. Dolna granica oznaczania wynosi 0,01 mg/kg (10 ppb).

Jeśli obecność substancji interferencyjnych uniemożliwia określenie, analizę trzeba rozpocząć od nowa, stosując metodę B (dwukierunkowa chromatografia cienkowarstwowa).

2. **Zasada**

Próbka jest ekstrahowana chloroformem. Ekstrakt jest filtrowany, pobierana jest odpowiednia porcja filtratu i oczyszczana metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym. Eluat jest odparowywany, a pozostałość rozpuszczana ponownie w określonej objętości chloroformu lub mieszaniny benzenu i acetonitrylu. Odpowiednia porcja tego roztworu jest poddawana chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Zawartość aflatoksyny B_1 określana jest metodą wizualną lub fluorodensytometryczną, po naświetleniu chromatogramu promieniami ultrafioletowymi, przez porównanie ze znanymi ilościami wzorcowej aflatoksyny B_1. Identyczność aflatoksyny B_1 ekstrahowanej z paszy musi zostać potwierdzona wskazaną procedurą.

3. **Odczynniki**

Notabene: Wszystkie odczynniki muszą być „odczynnikami o czystości analitycznej", chyba że określono inaczej.

3.1. Aceton.

3.2. Chloroform, stabilizowany 96-procentowym etanolem (v/v) w ilości 0,5–1,0 %.

3.3. N-heksan.

3.4. Metanol.

3.5. Bezwodny eter etylu wolny od peroksydów.

3.6. Mieszanina benzenu i acetonitrylu w stosunku 98:2 (v/v).

3.7. Mieszanina chloroformu (ppkt 3.2) i metanolu (ppkt 3.4) w stosunku 97:3 (v/v).

3.8. Żel krzemionkowy do chromatografii kolumnowej; wielkość cząstek 0,05–0,20 mm.

3.9. Wata absorpcyjna odtłuszczona chloroformem lub wata szklana.

3.10. Bezwodny, granulowany siarczan sodu.

3.11. Gaz obojętny, np. azot.

3.12. 1 N kwas solny.

3.13. 50 % (v/v) kwas siarkowy.

3.14. Ziemia okrzemkowa wymyta w kwasie.

3.15. Żel krzemionkowy G-HR lub równoważny do chromatografii cienkowarstwowej.

3.16. Roztwór wzorcowy, zawierający około 0,1 µg aflatoksyny B_1 na 1,0 ml chloroformu (ppkt 3.2) lub mieszaniny benzenu i acetonitrylu (ppkt 3.6), sporządzony i sprawdzony zgodnie z sekcją 7.

3.17. Roztwór wzorcowy do badania jakościowego, zawierający około 0,1 µg aflatoksyny B_1 i B_2 na 1,0 ml chloroformu (ppkt 3.2) lub mieszaniny benzenu i acetonitrylu (ppkt 3.6). Powyższe stężenia podane są orientacyjnie. Należy je dobrać tak, aby uzyskać to samo natężenie fluorescencji dla obydwu aflatoksyn.

3.18. Rozpuszczalniki wywołujące:

3.18.1. Chloroform (ppkt 3.2) i aceton (ppkt 3.1) w stosunku 9:1 (v/v), zbiornik nienasycony;

3.18.2. Eter etylu (ppkt 3.5), metanol (ppkt 3.4) i woda w stosunku 96:3:1 (v/v/v), zbiornik nienasycony;

3.18.3. Eter etylu (ppkt 3.5), metanol (ppkt 3.4) i woda w stosunku 94:4,5:1,5 (v/v/v), zbiornik nasycony;

3.18.4. Chloroform (ppkt 3.2) i metanol (ppkt 3.4) w stosunku 96:4 (v/v), zbiornik nasycony;

3.18.5. Chloroform (ppkt 3.2) i metanol (ppkt 3.4) w stosunku 97:3 (v/v), zbiornik nasycony;

4. **Aparatura**

4.1. Młynek-mieszarka.

4.2. Wytrząsarka lub mieszadło magnetyczne.

4.3. Bibuły do filtra harmonijkowego Schleicher i Schüll nr 588 lub równoważne, o średnicy 24 cm.

4.4. Rurka szklana (o średnicy wewn. 22 mm i długości 300 mm) do chromatografii z korkiem z politetrafluoroetylenu i 250-mililitrowym zbiornikiem.

4.5. Obrotowa parownica próżniowa z okrągłodenną kolbą o pojemności 500 ml.

4.6. Kolby stożkowe o pojemności 500 ml ze szlifowanymi korkami szklanymi.

4.7. Aparatura do chromatografii cienkowarstwowej.

4.8. Płytki szklane 200 × 200 mm do chromatografii cienkowarstwowej przygotowane w następujący sposób (podane ilości wystarczają do pokrycia 5 płytek): umieścić 30 g żelu krzemionkowego G-HR (ppkt 3.15) w stożkowej kolbie. Dodać 60 ml wody, kolbę zatkać i przez minutę wytrząsać. Rozprowadzić zawiesinę na płytkach tak, aby uzyskać równomierną warstwę o grubości 0,25 mm. Pozostawić do wyschnięcia na powietrzu, a następnie przechowywać w eksykatorze z żelem krzemionkowym. Bezpośrednio przed użyciem aktywować płytki, trzymając je w piecu w temperaturze 110 °C przez godzinę.

Płytki nadają się do użycia, jeśli dają wyniki podobne do wyników uzyskanych z płytek przygotowanych w opisany wyżej sposób.

4.9. Lampa UV o długości fali 360 nm. Natężenie napromieniania musi umożliwiać wyraźne odróżnianie na płytce TLC plamki aflatoksyny B_1 o masie 1 ng z odległości 10 cm od lampy.

4.10. Probówki miarowe o pojemności 10 ml z korkami z polietylenu.

4.11. Spektrofotometr UV.

4.12. Fluorodensytometr (nieobowiązkowo).

5. **Procedura**

5.1. *Przygotowanie próbki (patrz „Uwagi", część C pkt 1)*

Zemleć próbkę tak, aby w całości przechodziła przez sito o wielkości oczka 1 mm (zgodnie z zaleceniem ISO R 565).

5.2. *Ekstrakcja*

Umieścić 50 g zmielonej, jednolitej próbki w stożkowej kolbie o pojemności 500 ml (ppkt 4.6). Dodać 25 g ziemi okrzemkowej (ppkt 3.14), 25 ml wody i 250 ml chloroformu (ppkt 3.2). Zatkać kolbę, wstrząsać lub mieszać przez 30 minut przy użyciu urządzenia (ppkt 4.2) i przefiltrować przez bibułowy filtr harmonijkowy (pakt 4.3). Odrzucić pierwsze 10 ml filtratu, a następnie zebrać 50 ml.

5.3. *Oczyszczanie na kolumnie*

Do dolnego końca rurki chromatograficznej (ppkt 4.4) włożyć korek z waty lub wełny szklanej (ppkt 3.9), napełnić dwie trzecie rurki chloroformem (ppkt 3.2) i dodać 5 g siarczanu sodu (ppkt 3.10).

Sprawdzić, czy górna powierzchnia warstwy siarczanu sodu jest płaska, następnie dodać w małych porcjach 10 g żelu krzemionkowego (ppkt 3.8). Po każdej porcji dodania starannie zamieszać, aby usunąć bąbelki powietrza. Pozostawić na 15 minut do odstania, a następnie ostrożnie dodać 15 g siarczanu sodu (ppkt 3.10). Pozwolić cieczy opaść tak, aby znajdowała się dokładnie nad górną powierzchnią warstwy siarczanu sodu.

Wymieszać 50 ml ekstraktu, zebranego w ppkt 5.2, ze 100 ml pakt-heksanu (ppkt 3.3) i ilościowo przenieść mieszaninę na kolumnę. Pozwolić cieczy opaść tak, aby znajdowała się dokładnie nad górną powierzchnią warstwy siarczanu sodu. Zlać popłuczyny. Następnie dodać 100 ml eteru etylu (ppkt 3.5) i ponownie pozwolić cieczy opaść do górnej powierzchni warstwy siarczanu sodu. Podczas tych czynności pilnować, żeby tempo przepływu wynosiło 8–12 ml/min. i żeby kolumna nie pracowała na sucho. Zlewać ciecz wypływającą. Następnie wymyć kolumnę 150 ml mieszaniny chloroformu z metanolem (ppkt 3.7) i zebrać całość eluatu.

Odparować eluat prawie do suchości w wyparce obrotowej (ppkt 4.5), w temperaturze nieprzekraczającej 50 °C i w strumieniu gazu obojętnego (pakt 3.11). Pozostałość przenieść ilościowo, przy pomocy chloroformu (ppkt 3.2) lub mieszaniny chloroformu z acetonitrylem (ppkt 3.6), do 10-mililitrowej probówki miarowej (ppkt 4.10). Zagęścić roztwór pod strumieniem gazu obojętnego (ppkt 3.11), a następnie uzupełnić objętość do 2 ml chloroformem (ppkt 3.2) lub mieszaniną chloroformu z acetonitrylem (ppkt 3.6).

5.4. *Chromatografia cienkowarstwowa*

Nanieść punktowo na płytkę TLC (ppkt 4.8), w odległości 2 cm od dolnej krawędzi, w odstępach 2 cm, podane poniżej objętości roztworu wzorcowego i ekstraktu:

— 10, 15, 20, 30 i 40 µl wzorcowego roztworu aflatoksyny B_1 (ppkt 3.16),

— 10 µl ekstraktu uzyskanego w ppkt 5.3, i *nakładanego na ten sam punkt*, 20 µl roztworu wzorcowego (ppkt 3.16),

— 10 i 20 µl ekstraktu uzyskanego w ppkt 5.3.

Wywołać chromatogram w ciemności jednym z rozpuszczalników wywołujących (ppkt 3.18). Wyboru rozpuszczalnika należy dokonać wcześniej, nanosząc na płytkę 25 µl jakościowego roztworu wzorcowego (ppkt 3.17) i sprawdzając, czy aflatoksyny B_1 i B_2 są całkowicie oddzielone po wywołaniu.

Odczekać, aż rozpuszczalniki odparują w ciemności, a następnie naświetlić płytkę promieniami ultrafioletowymi, umieszczając ją w odległości 10 cm od lampy (ppkt 4.9). Miejsca z aflatoksyną B_1 świecą na niebiesko.

5.5. *Określenia ilościowe*

Określić wizualnie lub metodą fluorodensytometryczną w opisany poniżej sposób.

5.5.1. Pomiary wizualne

Określić ilość aflatoksyny B_1 w ekstrakcie, porównując natężenie fluorescencji plamki ekstraktu z natężeniem fluorescencji plamki roztworu wzorcowego. W razie potrzeby interpolować. Fluorescencja uzyskana w wyniku nałożenia ekstraktu na roztwór wzorcowy musi być intensywniejsza niż pochodząca od 10 µl ekstraktu i nie może być widoczna więcej niż jedna plamka. Jeśli natężenie fluorescencji wywołane przez 10 µl ekstraktu jest większe niż wywołane przez 40 µl roztworu wzorcowego, należy rozcieńczyć ekstrakt dziesięciokrotnie lub stukrotnie chloroformem (ppkt 3.2) lub mieszaniną benzenu i acetonitrylu (ppkt 3.6) przed ponownym poddaniem go chromatografii cienkowarstwowej.

5.5.2. Pomiary metodą fluorodensytometryczną

Zmierzyć natężenie fluorescencji plamki aflatoksyny B_1 fluorodensytometrem (ppkt 4.12) przy długości fali wzbudzenia 365 nm i długości fali emisji 443 nm. Określić ilość aflatoksyny B_1 w plamkach ekstraktu, porównując natężenie fluorescencji plamki ekstraktu z natężeniem fluorescencji plamki wzorcowej aflatoksyny B_1.

5.6. *Potwierdzenie identyczności aflatoksyny B_1*

Potwierdzić identyczność aflatoksyny B_1 w ekstrakcie, przeprowadzając opisane poniżej procesy.

5.6.1. Obróbka kwasem siarkowym

Rozpylić kwas siarkowy (ppkt 3.13) na chromatogram uzyskany w ppkt 5.4. Fluorescencja plamek aflatoksyny B_1 musi się zmienić z niebieskiej na żółtą pod wpływem napromieniania ultrafioletem.

5.6.2. Dwukierunkowa chromatografia z utworzeniem aflatoksyny B_1-półacetalu (aflatoksyny B_{2a})

Notabene: Poniższe operacje należy wykonać, przestrzegając dokładnie schematu na rysunku 3.

5.6.2.1. Nanoszenie roztworów

Zarysować dwie linie proste na płytce (ppkt 4.8) równolegle do dwóch sąsiednich krawędzi (w odległości 6 cm od każdej krawędzi), aby ograniczyć migrację czołowych części rozpuszczalnika. Pipetami kapilarnymi lub mikrostrzykawkami nanieść punktowo na płytkę następujące roztwory:

— *w pkt. A*: objętość oczyszczonego ekstraktu próbki, uzyskanego w ppkt 5.3, zawierającą około 2,5 nm aflatoksyny B_1,

— *w pkt. B i C*: 25 µl roztworu wzorcowego (ppkt 3.16).

5.6.2.2. Wywoływanie

Wywoływać w ciemności chromatogram w kierunku I, stosując rozpuszczalnik wywołujący (ppkt 3.18.1) (1-centymetrowa warstwa w zbiorniku nienasyconym), dopóki czoło rozpuszczalnika nie osiągnie linii granicznej.

Wyjąć płytkę ze zbiornika i pozostawić w ciemności do wyschnięcia na pięć minut, w temperaturze otoczenia. Następnie rozpylić na płytkę kwas solny (pakt 3.12) wzdłuż pasa o wysokości 2,5 cm pokrywającego pkt A i B (zakreskowany obszar na rysunek 3), dopóki nie ściemnieje, zakrywając pozostałą część płytki szklaną szybką. Odczekać 10 minut na przereagowanie kwasu w ciemności i wysuszyć płytkę w strumieniu powietrza, w temperaturze otoczenia.

Następnie wywoływać w ciemności chromatogram w kierunku II, stosując rozpuszczalnik wywołujący (ppkt 3.18.1) (1-centymetrowa warstwa w zbiorniku nienasyconym), dopóki czoło rozpuszczalnika nie osiągnie linii granicznej. Wyjąć płytkę ze zbiornika i pozostawić w ciemności do wyschnięcia, w temperaturze otoczenia.

5.6.2.3. Interpretacja chromatogramu

Zbadać chromatogram w świetle ultrafioletowym (ppkt 4.9) i sprawdzić pod kątem następujących właściwości:

a) Pojawienie się niebieskiej fluoryzującej plamki aflatoksyny B_1 pochodzącej z roztworu wzorcowego nałożonego w pkt C (migracja w kierunku I).

b) Pojawienie się niebieskiej fluoryzującej plamki nieprzereagowanej (z kwasem solnym) aflatoksyny B_1 i intensywniej fluoryzującej na niebiesko plamki aflatoksyny B_1-półacetalu pochodzących z roztworu wzorcowego, nałożonego w pkt B (migracja w kierunku II).

c) Pojawienie się plamek odpowiadających plamkom opisanym w lit. b) pochodzących z roztworu wzorcowego, nałożonego w pkt A. Położenie tych plamek jest określone najpierw przez odległość migracji aflatoksyny B_1 od pkt A w kierunku I (taka sama, jak odległość przebyta przez wzorzec nałożony w pkt C), a następnie przez odległości migracji aflatoksyny B_1-półacetalu stamtąd w kierunku II (takie same, jak odległości przebyte przez wzorzec nałożony w pkt B). Natężenia fluorescencji plamek półacetalu pochodzących z ekstraktu i z roztworu wzorcowego nałożonego w pkt B powinny pasować do siebie.

6. **Obliczanie wyników**

6.1. *Z pomiarów wizualnych*

Zawartość aflatoksyny B_1 w µg na kg próbki (ppb) jest wyrażona wzorem:

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

gdzie:

Y i X są odpowiednio objętościami w µl wzorcowego roztworu aflatoksyny B_1 (3.16) i ekstraktu o podobnym natężeniu fluorescencji;

S = stężenie wyrażone w µg aflatoksyny B_1 na ml roztworu wzorcowego (ppkt 3.16);

V = końcowa objętość ekstraktu w µl, umożliwiająca ewentualne niezbędne rozcieńczenie;

W = masa próbki w g odpowiadająca objętości ekstraktu poddanego oczyszczeniu na kolumnie.

6.2. *Z pomiarów metodą fluorodensytometryczną*

Zawartość aflatoksyny B_1 w µg na kg próbki jest wyrażona wzorem:

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

gdzie:

Y = objętość ekstraktu naniesionego na płytkę, w µl (10 lub 20 µl);

S = ilość aflatoksyny B_1 w ng w plamce ekstraktu (proporcjonalna do pobranej wartości Y);

V = końcowa objętość ekstraktu w µl, umożliwiająca ewentualne niezbędne rozcieńczenie;

W = masa próbki w g odpowiadająca objętości ekstraktu poddanego oczyszczeniu na kolumnie.

7. Sporządzanie i sprawdzanie roztworu wzorcowego (ppkt 3.16)

7.1 *Określenie stężenia aflatoksyny B_1*

Sporządzić wzorcowy roztwór aflatoksyny B_1 w chloroformie (ppkt 3.2) lub mieszaninie benzenu i acetonitrylu (ppkt 3.6) o stężeniu 8–10 µg/ml. Za pomocą spektrofotometru (ppkt 4.11) określić widmo absorpcyjne w zakresie długości fali 330–370 nm.

Zmierzyć gęstość optyczną (A) przy długości fali 363 nm w przypadku roztworu chloroformu lub 348 nm w przypadku roztworu w mieszaninie benzenu i acetonitrylu.

Z poniższych wzorów obliczyć stężenie aflatoksyny B_1 wyrażone w µg na ml roztworu:

$\frac{312 \cdot A \cdot 1000}{20600}$ dla roztworu chloroformu;

$\frac{312 \cdot A \cdot 1000}{19800}$ dla roztworu w mieszaninie benzenu i acetonitrylu.

Rozcieńczyć odpowiednio, z dala od światła dziennego, aby uzyskać roboczy roztwór wzorcowy o stężeniu aflatoksyny B_1 około 0,1 µg/ml. Trwałość roztworu wynosi dwa tygodnie, pod warunkiem że jest przechowywany w lodówce w temperaturze 4 °C.

7.2 *Sprawdzanie czystości chromatograficznej*

Nanieść punktowo na płytkę (ppkt 4.8) 5 µl wzorcowego roztworu aflatoksyny B_1 zawierającego 8–10 µg/ml (ppkt 7.1). Wywołać chromatogram zgodnie z ppkt 5.4. W świetle ultrafioletowym na chromatogramie powinna być widoczna tylko jedna plamka i nie powinna być widoczna żadna fluorescencja w pierwotnej strefie naniesienia.

8. Powtarzalność

Różnica między wynikami dwóch równoległych określeń przeprowadzonych na tej samej próbce, przez tę samą osobę, nie powinna przekraczać:

— 25 % największego uzyskanego pomiaru dla zawartości aflatoksyny B_1 10-20 µg/kg,

— 5 µg wartości bezwzględnej dla zawartości aflatoksyny B_1 20-50 µg/kg,

— 10 % największego uzyskanego pomiaru dla zawartości aflatoksyny B_1 powyżej 50 µg/kg.

9. Odtwarzalność

Patrz „Uwagi", część C pkt 2.

B. METODA KIERUNKOWEJ CHROMATOGRAFII CIENKOWARSTWOWEJ

1. **Cel i zakres metody**

Metoda ta umożliwia określenie zawartości aflatoksyny B_1 w paszach nieobjętych zakresem metody A. Dolna granica oznaczania wynosi 0,01 mg/kg (10 ppb). Metody tej nie stosuje się do pasz zawierających pulpę z owoców cytrusowych.

2. **Zasada**

Próbka jest ekstrahowana chloroformem. Ekstrakt jest filtrowany, pobierana jest odpowiednia porcja filtratu i oczyszczana metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym. Eluat jest odparowywany, a pozostałość rozpuszczana ponownie w określonej objętości chloroformu lub mieszaniny benzenu i acetonitrylu. Odpowiednia porcja tego roztworu jest poddawana dwukierunkowej chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Zawartość aflatoksyny B_1 określana jest metodą wizualną lub fluorodensytometryczną, po napromienieniu chromatogramu ultrafioletem, poprzez porównanie ze znanymi ilościami wzorcowej aflatoksyny B_1. Identyczność aflatoksyny B_1 ekstrahowanej z paszy musi zostać potwierdzona wskazaną procedurą.

3. **Odczynniki**

Notabene: Wszystkie odczynniki muszą być „odczynnikami o czystości analitycznej", chyba że określono inaczej.

3.1. Aceton.

3.2. Chloroform, stabilizowany 96-procentowym etanolem (v/v) w ilości 0,5–1,0 %.

3.3. N-heksan.

3.4. Metanol.

3.5. Bezwodny eter etylu wolny od peroksydów.

3.6. Mieszanina benzenu i acetonitrylu w stosunku 98:2 (v/v).

3.7. Mieszanina chloroformu (ppkt 3.2) i metanolu (ppkt 3.4) w stosunku 97:3 (v/v).

3.8. Żel krzemionkowy do chromatografii kolumnowej; wielkość cząstek 0,05–0,20 mm.

3.9. Wata absorpcyjna odtłuszczona chloroformem lub wata szklana.

3.10. Bezwodny, granulowany siarczan sodu.

3.11. Gaz obojętny, np. azot.

3.12. 1 N kwas solny.

3.13. Ziemia okrzemkowa wymyta w kwasie.

3.14. Żel krzemionkowy G-HR lub równoważny do chromatografii cienkowarstwowej.

3.15. Rozpuszczalniki wywołujące.

3.15.1. Eter etylu (ppkt 3.5), metanol (ppkt 3.4) i woda w stosunku 94:4,5:1,5 (v/v/v), zbiornik nasycony.

3.15.2. Chloroform (ppkt 3.2), aceton (ppkt 3.1) w stosunku 9:1 (v/v), zbiornik nienasycony.

3.16. Roztwór wzorcowy, zawierający około 0,1 µg aflatoksyny B_1 na 1,0 ml chloroformu (ppkt 3.2) lub mieszaniny benzenu i acetonitrylu (ppkt 3.6), sporządzony i sprawdzony zgodnie z pkt 7 metody A.

4. **Aparatura**

Patrz pkt 4 metody A.

5. **Procedura**

5.1. *Przygotowanie próbki*
5.2. *Ekstrakcja*
5.3. *Oczyszczanie na kolumnie*

} ppkt 5.1–5.3 są identyczne jak w metodzie A.

5.4. *Dwukierunkowa chromatografia cienkowarstwowa*

5.4.1. Nanoszenie roztworów (postępować zgodnie ze schematem na rysunku 1)

Zarysować dwie linie proste na płytce (ppkt 4.8) równolegle do dwóch sąsiednich krawędzi (odpowiednio w odległości 5 i 6 cm od każdej krawędzi), aby ograniczyć migrację czołowych części rozpuszczalnika. Pipetami kapilarnymi lub mikrostrzykawkami nanieść punktowo na płytkę następujące roztwory:

— *w pkt A*: 20 µl oczyszczonego ekstraktu próbki, uzyskanego w ppkt 5.3,

— *w pkt B*: 20 µl roztworu wzorcowego (ppkt 3.16),

— *w pkt C*: 10 µl roztworu wzorcowego (ppkt 3.16),

— *w pkt D*: 20 µl roztworu wzorcowego (ppkt 3.16),

— *w pkt E*: 40 µl roztworu wzorcowego (ppkt 3.16).

Wysuszyć w łagodnym strumieniu powietrza lub gazu obojętnego (ppkt 3.11). Średnice uzyskanych plamek muszą wynosić około 5 mm.

5.4.2. Wywoływanie (postępować zgodnie ze schematem na rysunku 1)

Wywoływać w ciemności chromatogram w kierunku I, stosując rozpuszczalnik wywołujący (ppkt 3.15.1) (1-centymetrowa warstwa w zbiorniku nasyconym), dopóki czoło rozpuszczalnika nie osiągnie linii granicznej. Wyjąć płytkę ze zbiornika i pozostawić w ciemności do wyschnięcia na 15 minut, w temperaturze otoczenia.

Następnie wywoływać w ciemności chromatogram w kierunku II, stosując rozpuszczalnik wywołujący (ppkt 3.15.2) (1-centymetrowa warstwa w zbiorniku nienasyconym), dopóki czoło rozpuszczalnika nie osiągnie linii granicznej. Wyjąć płytkę ze zbiornika i pozostawić w ciemności do wyschnięcia, w temperaturze otoczenia.

5.4.3. Interpretacja chromatogramu (postępować zgodnie ze schematem na rysunku 2)

Naświetlić chromatogram światłem ultrafioletowym, umieszczając płytkę w odległości 10 cm od lampy (ppkt 4.9). Zlokalizować położenie niebieskich fluoryzujących plamek B, C, D i E aflatoksyny B_1 pochodzącej z roztworu standardowego. Przeprowadzić dwie wyobrażalne linie przechodzące przez powyższe punkty, pod kątami prostymi do kierunków wywoływania. Punkt przecięcia P tych linii oznacza miejsce, w którym należy się spodziewać plamki aflatoksyny B_1, pochodzącej z ekstraktu próbki naniesionego w pkt A (rys. 1). Jednakże rzeczywistym położeniem plamki aflatoksyny B_1 może być punkt Q, leżący na przecięciu dwóch wyobrażalnych linii prostych, tworzących między sobą kąt około 100° i przechodzących odpowiednio przez pkt B i C. Określić ilość aflatoksyny B_1 w ekstrakcie próbki zgodnie z ppkt 5.5.

5.4.4. Chromatografia uzupełniająca

Zarysować dwie linie proste na nowej płytce (ppkt 4.8) równolegle do dwóch sąsiednich krawędzi, zgodnie ze schematem na rysunku 1, i nanieść w pkt A (patrz rysunek 1) 20 µl oczyszczonego ekstraktu próbki, uzyskanego w ppkt 5.3, i nałożyć w to samo miejsce 20 µl roztworu wzorcowego (ppkt 3.16). Chromatogram wywołać zgodnie z ppkt 5.4.2. Napromienić chromatogram światłem ultrafioletowym (ppkt 4.9) i sprawdzić, czy:

— plamki aflatoksyny B_1 z ekstraktu i roztworu wzorcowego nakładają się,

— punkt ten fluoryzuje intensywniej niż plamka aflatoksyny B_1 wywołana w punkcie Q na pierwszej płytce.

5.5. *Określenia ilościowe*

Określić wizualnie lub metodą fluorodensytometryczną w opisany poniżej sposób.

5.5.1. Pomiary wizualne przez dopasowanie

Określić ilość aflatoksyny B_1 w ekstrakcie, porównując natężenie fluorescencji plamek ekstraktu z natężeniem fluorescencji plam roztworu wzorcowego w pkt C, D i E. W razie potrzeby interpolować. Jeśli natężenie fluorescencji wywołane przez 20 µl ekstraktu jest większe niż wywołane przez 40 µl roztworu wzorcowego, należy rozcieńczyć ekstrakt dziesięciokrotnie lub stukrotnie chloroformem (ppkt 3.2) lub mieszaniną benzenu i acetonitrylu (ppkt 3.6) przed ponownym poddaniem go chromatografii cienkowarstwowej.

5.5.2. Pomiary fluorodensytometryczne

Zmierzyć natężenie fluorescencji plamek aflatoksyny B_1 fluorodensytometrem (ppkt 4.12) przy długości fali wzbudzenia 365 nm i długości fali emisji 443 nm.

Określić ilość aflatoksyny B_1 w plamce ekstraktu, porównując natężenie fluorescencji plamki ekstraktu z natężeniem fluorescencji plamek C, D i E roztworu wzorcowego.

5.6. *Potwierdzenie identyczności aflatoksyny B_1*

Patrz metoda A ppkt 5.6.

6. **Obliczanie wyników**

Patrz metoda A pkt 6.

7. **Powtarzalność**

Patrz metoda A pkt 8.

8. **Odtwarzalność**

Patrz „Uwagi", część C pkt 2.

C. UWAGI DOTYCZĄCE METOD A I B

1. **Odtłuszczanie**

Próbki zawierające ponad 5 % tłuszczów muszą zostać odtłuszczone lekką ropą naftową (temp. wrzenia 40–60 °C) po przygotowaniu zgodnie z ppkt 5.1.

W takich przypadkach uzyskane wyniki należy przedstawić w odniesieniu do masy nieodtłuszczonej próbki.

2. **Odtwarzalność wyników**

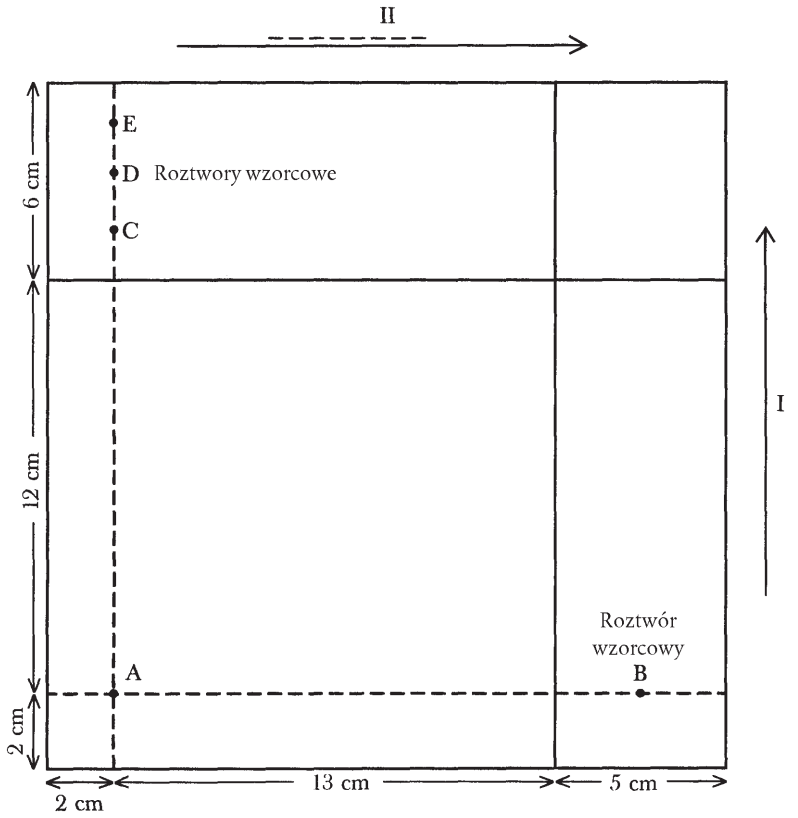
Odtwarzalność wyników, tj. różnica między wynikami uzyskanymi na tej samej próbce przez dwa laboratoria lub ich większą liczbę, została oszacowana na:

± 50 % średniej wartości wyniku dla średniej zawartości aflatoksyny B_1 10–20 µg/kg;

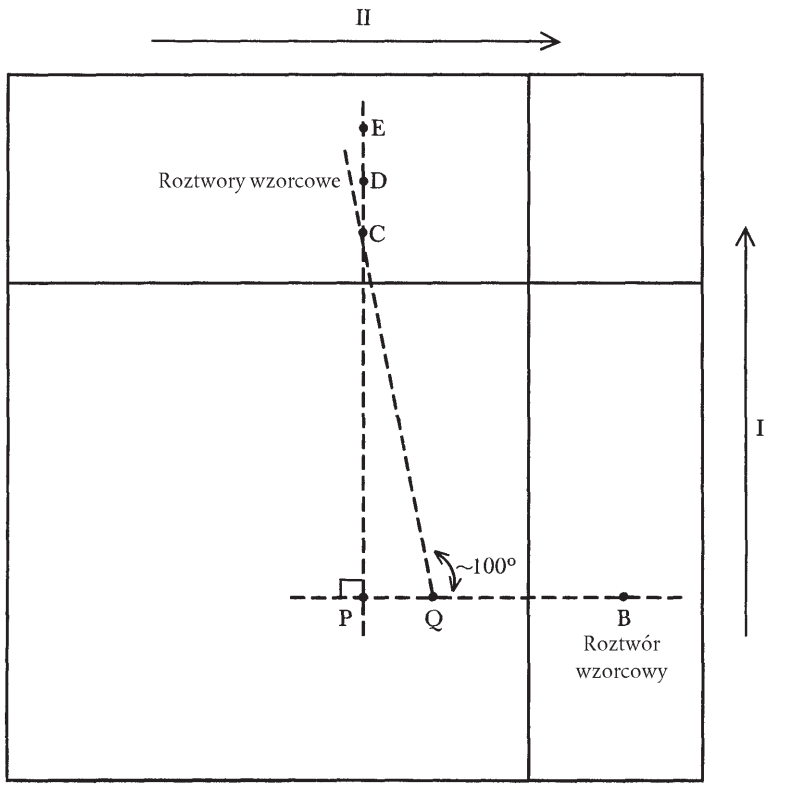
± 10 µg/kg dla średniej zawartości aflatoksyny B_1 20–50 µg/kg;

± 20 % średniej wartości wyniku dla średniej zawartości aflatoksyny B_1 10–20 µg/kg.

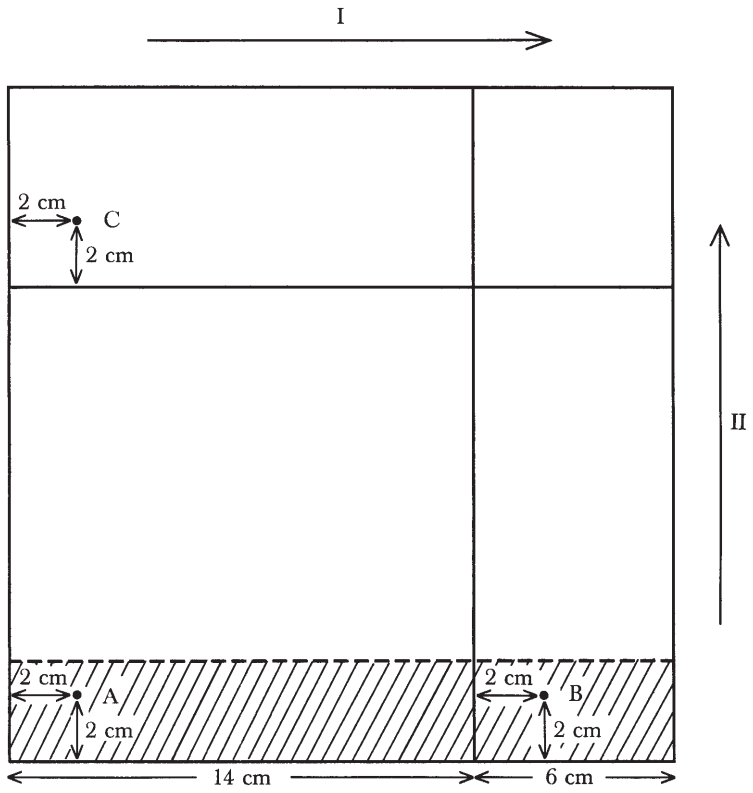
Dodatek do Załącznika



Rys. 1



Rys. 2



Rys. 3