31976L0372

SIEDMA SMERNICA KOMISIE
z 1. marca 1976,
ktorá ustanovuje analytické metódy spoločenstva na úradnú kontrolu krmív

(76/372/EHS)

KOMISIA EURÓPSKYCH SPOLOČENSTIEV,

so zreteľom na Zmluvu o založení Európskeho hospodárskeho spoločenstva,

so zreteľom na smernicu Rady z 20. júla 1970 o zavedení metód vzorkovania a analýz na úradnú kontrolu krmív v spoločenstve ([1]), naposledy zmenenú a doplnenú Aktom o pristúpení ([2]), a najmä na jej článok 2,

keďže táto smernica vyžaduje, aby sa úradné kontroly krmív vykonávali s použitím metód vzorkovania a analytických metód spoločenstva na kontrolu dodržiavania požiadaviek vyplývajúcich z ustanovení daných zákonmi, inými právnymi predpismi a správnymi opatreniami týkajúcimi sa kvality a zloženia krmív;

keďže smernice Komisie 71/250/EHS z 15. júna 1971 ([3]), 71/393/EHS z 18. novembra 1971 ([4]), 72/199/EHS z 27. apríla 1972 ([5]), 73/46/EHS z 5. decembra 1972 ([6]), 74/203/EHS z 25. marca 1974 ([7]) a 75/84/EHS z 20. decembra 1974 ([8]) už ustanovili určitý počet analytických metód spoločenstva; keďže vzhľadom na pokrok dosiahnutý odvtedy je vhodné schváliť siedmy súbor metód;

keďže opatrenia uvedené v tejto smernici sú v súlade so stanoviskom Stáleho výboru pre krmivá,

PRIJALA TÚTO SMERNICU:

Článok 1

Členské štáty vyžadujú, aby sa analýzy na úradné kontroly krmív, pokiaľ ide o obsah aflatoxínu B_1 v nich, vykonávali v súlade s metódami opísanými v prílohe k tejto smernici.

Všeobecné ustanovenia uvedené v časti 1 (Úvod) prílohy k Prvej smernici Komisie 71/250/EHS z 15. júna 1971, okrem časti zaoberajúcej sa prípravou vzorky, ktorá sa bude analyzovať, sú použiteľné na metódy opísané v prílohe k tejto smernici.

Článok 2

Členské štáty uvedú do účinnosti najneskôr do 1. októbra 1976 zákony, iné právne predpisy a správne opatrenia nevyhnutné na dosiahnutie súladu s touto smernicou. Bezodkladne o tom informujú Komisiu.

Článok 3

Táto smernica je adresovaná členským štátom.

V Bruseli 1. marca 1976

Za Komisiu

P. J. LARDINOIS

člen Komisie

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

PRÍLOHA

STANOVENIE AFLATOXÍNU B_1

A. JEDNOROZMERNÁ CHROMATOGRAFICKÁ METÓDA NA TENKEJ VRSTVE

1. **Účel a oblasť**

Táto metóda umožňuje stanoviť obsah aflatoxínu B_1 v nasledujúcich krmivách: podzemnica olejná, kopra, ľanové semeno, sója, sezam, olejnaté výlisky z babassovej palmy a z kukuričných klíčkov, obilniny a výrobky z obilnín, hrachová múčka, zemiaková dužina a škrob. Spodná medza stanoviteľnosti je 0,01 mg/kg (10 ppb).

Ak prítomnosť interferujúcich látok bráni stanoveniu, analýzu treba zopakovať od začiatku použitím metódy B (dvojrozmerná chromatografia na tenkej vrstve).

2. **Podstata metódy**

Vzorka sa extrahuje chloroformom. Extrakt sa prefiltruje, odoberie sa alikvotná časť a vyčistí sa stĺpcovou chromatografiou na silikagéli. Eluát sa odparí a zvyšok sa znovu rozpustí v známom objeme chloroformu alebo v zmesi benzénu a acetonitrilu. Alikvotná časť tohto roztoku sa podrobí chromatografii na tenkej vrstve (TLC). Množstvo aflatoxínu B_1 sa stanoví po ožiarení chromatogramu ultrafialovým svetlom buď vizuálne, alebo fluorodenzitometricky, porovnaním so známymi množstvami štandardu aflatoxínu B_1. Identita aflatoxínu B_1 vyextrahovaného z krmiva sa musí potvrdiť uvedeným postupom.

3. **Chemikálie**

Poznámka: Všetky chemikálie musia byť „čistoty p. a.“, pokiaľ nie je uvedené inak.

3.1. Acetón.

3.2. Chloroform stabilizovaný prídavkom 0,5 až 1,0 % 96 % etanolu (v/v).

3.3. N – hexán.

3.4. Metanol.

3.5. Bezvodý dietyléter, neobsahujúci peroxidy.

3.6. Zmes benzénu a acetonitrilu: 98/2 (v/v).

3.7. Zmes chloroformu (3.2) a metanolu (3.4): 97/3 (v/v).

3.8. Silikagél na stĺpcovú chromatografiu, veľkosť častíc 0,05 – 0,20 mm.

3.9. Absorbent – vata, vopred odmastená chloroformom, alebo sklená vata.

3.10. Síran sodný, bezvodý, granulovaný.

3.11. Inertný plyn, napr. dusík.

3.12. 1 N kyselina chlorovodíková.

3.13. 50 % (v/v) kyselina sírová.

3.14. Kremelina (hyflosupercel) premytá v kyseline.

3.15. Silikagél G-HR alebo ekvivalentný, na chromatografiu na tenkej vrstve (TLC).

3.16. Štandardný roztok obsahujúci približne 0,1 µg aflatoxínu B_1 na 1ml v chloroforme (3.2) alebo v zmesi benzén/acetonitril (3.6), pripravený a skontrolovaný spôsobom uvedeným v oddiele 7.

3.17. Štandardný roztok na kvalitatívne testovanie, obsahujúci približne 0,1 µg aflatoxínu B_1 a B_2 na 1ml v chloroforme (3.2) alebo v zmesi benzén/acetonitril (3.6). Tieto koncentrácie sú na usmernenie. Musia sa upraviť tak, aby sa dosiahla rovnaká intenzita fluorescencie pre obidva aflatoxíny.

3.18. Vyvíjacie činidlá:

3.18.1. chloroform (3.2)/acetón (3.1): 9/1 (v/v), nenasýtená kyveta;

3.18.2. dietyléter (3.5)/metanol (3.4)/voda: 96/3/1 (v/v/v), nenasýtená kyveta;

3.18.3. dietyléter (3.5)/metanol (3.4)/voda: 94/4,5/1,5 (v/v/v), nasýtená kyveta;

3.18.4. chloroform (3.2)/metanol(3.4): 94/6 (v/v), nasýtená kyveta;

3.18.5. chloroform (3.2)/metanol (3.4): 97/3 (v/v), nasýtená kyveta;

4. **Prístroje**

4.1. Mlynček-mixér.

4.2. Trepačka alebo magnetická miešačka.

4.3. Skladané filtračné papiere, Schleicher and Schull č. 588, alebo ekvivalentné s priemerom 24 cm.

4.4. Sklená trubica na chromatografiu (vnútorný priemer: 22 mm, dĺžka: 300 mm) s PTFE kohútom a 250 ml zásobníkom.

4.5. Rotačný vákuový odparovač s 500 ml bankou s guľatým dnom.

4.6. 500 ml Erlenmeyerove banky so zábrusovými zátkami.

4.7. Vybavenie na chromatografiu na tenkej vrstve (TLC).

4.8. Sklené platne na TLC, 200 x 200 mm, pripravené nasledujúcim spôsobom (uvedené množstvá stačia na pokrytie piatich platní). Vložte do Erlenmeyerovej banky 30 g silikagélu G-HR (3.15). Pridajte 60 ml vody, zazátkujte a pretrepávajte jednu minútu. Suspenziu natrite na platňu, tak aby sa dosiahla vrstva s rovnomernou hrúbkou 0,25 mm. Nechajte vysušiť na vzduchu a potom skladujte v exsikátore obsahujúcom silikagél. Pred použitím platne aktivujte v sušiarni jednu hodinu pri teplote 110 C.

Kúpené platne sú vhodné vtedy, ak poskytujú výsledky podobné výsledkom získaným na platniach pripravených vyššie uvedeným spôsobom.

4.9. Ultrafialová lampa s dlhou vlnovou dĺžkou (360 nm). Intenzita žiarenia musí byť taká, aby bola škvrna aflatoxínu B_1 s koncentráciou 1 ng zreteľne rozlíšiteľná na TLC platni vo vzdialenosti 10 cm od lampy.

4.10. 10 ml odmerné skúmavky s polyetylénovými zátkami.

4.11. UV spektrofotometer.

4.12. Fluorodenzitometer (ľubovoľný).

5. **Postup**

5.1. *Príprava vzorky (pozri „Poznámky", časť C, bod 1).*

Vzorku zomeľte tak, aby v celom množstve prešla sitom s veľkosťou ôk 1 mm (v súlade s odporúčaniami ISO R 565).

5.2. *Extrakcia*

Vložte 50 g pomletej, zhomogenizovanej vzorky do 500 ml Erlenmeyerovej banky (4.6). Pridajte 25 g kremeliny (3.14), 25 ml vody a 250 ml chloroformu (3.2). Banku uzatvorte, pretrepávajte alebo miešajte 30 minút pomocou prístroja (4.2) a prefiltrujte cez skladaný filtračný papier (4.3). Prvých 10 ml filtrátu odstráňte a potom zachyťte 50 ml.

5.3. *Čistenie na kolóne*

Vložte do spodnej časti chromatografickej trubice (4.4) zátku z vaty alebo zo sklenej vaty (3.9), trubicu do dvoch tretín naplňte chloroformom (3.2) a pridajte 5 g síranu sodného (3.10).

Skontrolujte, či je horný povrch vrstvy síranu sodného rovný, potom pridajte 10 g silikagélu (3.8) po malých množstvách. Po každom pridaní opatrne premiešajte, aby ste odstránili vzduchové bubliny. Nechajte stáť 15 minút a potom opatrne pridajte 15 g síranu sodného (3.10). Nechajte tekutinu klesnúť tak, aby sa nachádzala tesne nad horným povrchom vrstvy síranu sodného.

Zmiešajte 50 ml extraktu zachyteného podľa bodu 5.2 so 100 ml n-hexánu (3.3) a zmes kvantitatívne preneste na kolónu. Nechajte tekutinu klesnúť tak, aby sa tekutina nachádzala tesne nad horným povrchom vrstvy síranu sodného. Túto premývaciu kvapalinu odstráňte. Potom pridajte 100 ml dietyléteru (3.5) a znovu ho vypustite až po horný povrch vrstvy síranu sodného. Počas týchto postupov dbajte na to, aby bol prietok 8 – 12 ml za minútu a aby kolóna nevyschla. Vytekajúcu kvapalinu odstráňte. Potom premyte pomocou 150 ml zmesi chloroform/metanol (3.7) a celý objem eluátu zachyťte.

Eluát odparte takmer dosucha pri teplote najviac 50 C v rotačnom odparovači (4.5) prúdom inertného plynu (3.11). Zvyšok kvantitatívne preneste použitím chloroformu (3.2) alebo zmesi benzén-acetonitril (3.6) do 10 ml odmernej skúmavky (4.10). Zvýšte koncentráciu roztoku v prúde inertného plynu (3.11) a objem doplňte na 2 ml chloroformom (3.2) alebo zmesou benzén/acetonitril (3.6).

5.4. *Chromatografia na tenkej vrstve*

Na TLC platňu (4.8) naneste 2 cm od spodného okraja a vo vzdialenostiach 2 cm od seba nižšie uvedené objemy štandardného roztoku a extraktu:

— 10, 15, 20, 30 a 40 µl štandardného roztoku aflatoxínu B_1 (3.16),

— 10 µl extraktu získaného podľa bodu 5.3 a na to *isté miesto* 20 µl štandardného roztoku (3.16),

— 10 a 20 µl extraktu získaného podľa bodu 5.3.Chromatogram nechajte vyvíjať v tme jedným z vyvíjacích činidiel (3.18). Výber činidla sa musí vykonať vopred nanesením 25 µl štandardného roztoku na kvalitatívne testovanie (3.17) na platňu a kontrolou, či sú po vyvíjaní aflatoxíny B_1 a B_2 úplne oddelené.

Nechajte činidlá odpariť v tme a potom platňu ožiarte UV svetlom tak, že ju umiestnite 10 cm od lampy (4.9). Škvrny aflatoxínu B_1 dávajú modrú fluorescenciu.

5.5. *Kvantitatívne stanovenia*

Stanovte buď vizuálne, alebo fluorodenzitometricky, ako je uvedené ďalej.

5.5.1. Vizuálne stanovenia

Stanovte množstvo aflatoxínu B_1 v extrakte porovnaním intenzity fluorescencie škvŕn extraktu s intenzitou škvŕn štandardného roztoku. Podľa potreby interpolujte. Fluorescencia dosiahnutá navrstvením extraktu na štandardný roztok musí byť intenzívnejšia ako fluorescencia 10 µl extraktu a nesmie tam byť viac ako jedna viditeľná škvrna. Ak bude intenzita fluorescencie, ktorú dáva 10 µl extraktu, väčšia ako intenzita 40 µl štandardného roztoku, zrieďte extrakt predtým, ako ho znovu podrobíte chromatografii, na tenkej vrstve 10- alebo 100-násobne chloroformom (3.2) alebo zmesou benzén/acetonitril (3.6).

5.5.2. Merania fluorodenzitometrom

Zmerajte intenzitu fluorescencie škvŕn aflatoxínu B_1 fluorodenzitometrom (4.12) pri excitačnej vlnovej dĺžke 365 nm a emisnej vlnovej dĺžke 443 nm. Stanovte množstvo aflatoxínu B_1 v škvrnách extraktu porovnaním ich intenzít fluorescencie s intenzitou fluorescencie škvŕn štandardu aflatoxínu B_1

5.6. *Potvrdenie identity aflatoxínu B_1*

Identitu aflatoxínu B_1 v extrakte potvrďte nižšie uvedenými postupmi.

5.6.1. Pôsobenie kyselinou sírovou

Nastriekajte kyselinu sírovú (3.13) na chromatogram získaný v bode 5.4. Fluorescencia škvŕn aflatoxínu B_1 sa musí pri ožiarení UV svetlom zmeniť z modrej na žltú.

5.6.2. Dvojrozmerná chromatografia s tvorbou aflatoxín B_1 – hemiacetalu (alfatoxín B_{2a})

Poznámka: Pri nižšie uvedených postupoch sa musí dôsledne dodržať diagram uvedený na obrázku 3.

5.6.2.1. Nanášanie roztokov

Vyryte dve rovné čiary na platňu (4.8) rovnobežne s priľahlými stranami (6 cm od každej strany), tak aby sa obmedzila migrácia čiel vyvíjacieho činidla. Pomocou kapilárnych pipiet alebo injekčných mikrostriekačiek naneste na platňu nasledujúce roztoky:

— *do bodu A*: objem vyčisteného extraktu vzorky, získaného podľa bodu 5.3, ktorý obsahuje približne 2,5 nm aflatoxínu B_1,

— *do bodov B a C*: 25 µl štandardného roztoku (3.16).5.6.2.2. Vyvíjanie

Chromatrogram nechajte vyvíjať v smere I v tme s vyvíjacím činidlom (3.18.1) (1 cm vrstva v nenasýtenej kyvete) dovtedy, kým čelo činidla nedosiahne medznú čiaru činidla.

Vyberte platňu z nádoby a nechajte schnúť v tme pri laboratórnej teplote päť minút. Potom striekajte kyselinu chlorovodíkovú (3.12) v páse s výškou 2,5 cm, ktorý pokrýva body A a B (vyznačené na obr. 3 vyšrafovanou plochou) dovtedy, kým nestmavne, pričom zvyšok platne chráňte sklenou tabuľou. Nechajte reagovať 10 minút v tme a vysušte prúdom vzduchu pri laboratórnej teplote.

Potom chromatogram nechajte vyvíjať v smere II v tme s vyvíjacím činidlom (3.18.1) (1 cm vrstva v nenasýtenej kyvete) dovtedy, kým čelo vyvíjacieho činidla nedosiahne medznú čiaru činidla. Vyberte platňu z kyvety a nechajte vyschnúť pri laboratórnej teplote.

5.6.2.3. Interpretácia chromatogramu

Preskúmajte chromatogram pod UV svetlom (4.9) a skontrolujte nasledujúce charakteristické znaky.

a) Vznik modrej fluoreskujúcej škvrny aflatoxínu B_1 pochádzajúcej zo štandardného roztoku naneseného v bode C (migrácia v smere I).

b) Vznik modrej fluoreskujúcej škvrny nezreagovaného (s kyselinou chlorovodíkovou) aflatoxínu B_1 a intenzívnejšie modrofluoreskujúca škvrna aflatoxín B_1 – hemiacetálu, pričom obidve pochádzajú zo štandardného roztoku naneseného v bode B (migrácia v smere II).

c) Vznik škvŕn podobajúcich sa škvrnám opísaným v b), ktoré pochádzajú z extraktu vzorky naneseného v bode A. Poloha týchto škvŕn je definovaná v prvom rade migračnou vzdialenosťou aflatoxínu B_1 z bodu A v smere I (rovnaká ako tá, ktorú prešiel štandard nanesený v bode C) a následne migračnými vzdialenosťami v smere II aflatoxínu B_1 – hemiacetálu z tohto miesta (rovnaká ako tá, ktorú prešiel štandard nanesený v bode B). Intenzita fluorescencie škvŕn hemiacetálu pochádzajúceho z extraktu a zo štandardu naneseného v bode B by mala byť rovnaká.

6. **Výpočet výsledkov**

6.1. *Z vizuálnych stanovení*

Obsah aflatoxínu B_1 v mikrogramoch na kg vzorky (ppb) je daný vzorcom:

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

v ktorom:

Y a X sú objemy v mikrolitroch štandardného roztoku aflatoxínu B_1 (3.16) a extraktu, ktoré majú podobnú intenzitu fluorescencie;

S = koncentrácia aflatoxínu B_1 v mikrogramoch na 1 ml v štandardnom roztoku (3.16);

V = konečný objem extraktu v mikrolitroch, s prihliadnutím na všetky riedenia, ktoré boli vykonané;

W = hmotnosť vzorky v gramoch, zodpovedajúca objemu extraktu prečisteného na kolóne.

6.2. *Z fluorodenzitometrických meraní*

Obsah aflatoxínu B_1 v mikrogramoch na kg vzorky (ppb) je daný vzorcom:

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

v ktorom:

Y = objem extraktu v mikrolitroch, nanesený na platňu (10 alebo 20 µl);

S = množstvo aflatoxínu B_1 v nanogramoch vo škvrne extraktu (proporcionálne k danej hodnote Y), vypočítané z meraní;

V = konečný objem extraktu v mikrolitroch, s prihliadnutím na všetky riedenia, ktoré boli vykonané;

W = hmotnosť vzorky v gramoch, zodpovedajúca objemu extraktu prečisteného na kolóne.

7. **Príprava a skúšanie štandardného roztoku (3.16)**

7.1 *Stanovenie koncentrácie aflatoxínu B_1*

Pripravte štandardný roztok aflatoxínu B_1 v chloroforme (3.2) alebo v zmesi benzén/acetonitril (3.6) s koncentráciou 8 až 10 µg/ml. Pomocou spektrofotometra (4.11) stanovte absorpčné spektrum medzi 330 a 370 nm.

Zmerajte absorbanciu (A) pri 363 nm v chloroformovom roztoku; alebo pri 348 nm v roztoku v zmesi benzén/acetonitril.

Vypočítajte koncentráciu aflatoxínu B_1 v mikrogramoch na ml roztoku z nasledujúcich vzorcov:

$\frac{312 \cdot A \cdot 1\,000}{20\,600}$ ak ide o chloroformový roztok;

$\frac{312 \cdot A \cdot 1\,000}{19\,800}$ ak ide o roztok zmesi benzén/acetonitril.

Ak je to vhodné, zrieďte mimo pôsobenia denného svetla, tak aby ste získali pracovný štandardný roztok s koncentráciou aflatoxínu B_1 približne 0,1 µg/ml. Ak sa roztok uchováva v chladničke pri teplote 4 °C, je stály dva týždne.

7.2 *Skúšanie chromatografickej čistoty*

Naneste na platňu (4.8) 5 µl štandardného roztoku aflatoxínu B_1 obsahujúceho 8 až 10 µg/ml aflatoxínu B_1 (7.1). Chromatogram nechajte vyvíjať spôsobom uvedeným v bode 5.4. V UV svetle sa môže na chromatograme objaviť len jedna škvrna a v pôvodne nanesenej zóne nesmie byť žiadna fluorescencia.

8. **Opakovateľnosť**

Rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelných stanovení vykonaných v tej istej vzorke tým istým pracovníkom nesmie presiahnuť:

— 25 % z vyššej hodnoty pre obsahy aflatoxínu B_1 od 10 do 20 µg/kg,

— 5 µg, v absolútnej hodnote pre obsahy vyššie ako 20 a do 50 µg/kg,

— 10 % z vyššej hodnoty pre obsahy nad 50 µg/kg.

9. **Reprodukovateľnosť**

Pozri „Poznámky“, bod 2 časti C.

B. DVOJROZMERNÁ CHROMATOGRAFICKÁ METÓDA NA TENKEJ VRSTVE

1. **Účel a oblasť**

Táto metóda umožňuje stanoviť hladinu aflatoxínu B_1 v krmivách, na ktoré sa nevzťahuje metóda A. Dolná medza stanoviteľnosti je 0,01 mg/kg (10 ppb). Metóda nie je použiteľná na krmivá obsahujúce citrusovú dužinu.

2. **Podstata metódy**

Vzorka sa extrahuje chloroformom. Extrakt sa prefiltruje, odoberie sa alikvotná časť a vyčistí sa stĺpcovou chromatografiou na silikagéli. Eluát sa odparí a zvyšok sa znovu rozpustí v presnom objeme chloroformu alebo v zmesi benzénu a acetonitrilu. Alikvotná časť tohto roztoku sa podrobí dvojrozmernej chromatografii na tenkej vrstve (TLC). Množstvo aflatoxínu B_1 sa stanoví po ožiarení chromatogramu ultrafialovým svetlom buď vizuálne, alebo fluorodenzitometricky, porovnaním so známymi množstvami štandardu aflatoxínu B_1 Identita aflatoxínu B_1 vyextrahovaného z krmiva sa musí potvrdiť uvedeným postupom.

3. **Chemikálie**

Poznámka: Všetky chemikálie musia byť „čistoty p. a.“, pokiaľ nie je uvedené inak.

3.1. Acetón.

3.2. Chloroform, stabilizovaný prídavkom 0,5 až 1,0 % 96 % etanolu (v/v).

3.3. N – hexán.

3.4. Metanol.

3.5. Bezvodý dietyléter, neobsahujúci peroxidy.

3.6. Zmes benzénu a acetonitrilu: 98/2 (v/v).

3.7. Zmes chloroformu (3.2) a metanolu (3.4): 97/3 (v/v).

3.8. Silikagél na stĺpcovú chromatografiu, veľkosť častíc 0,05 – 0,20 mm.

3.9. Absorbent – vata, vopred odmastená chloroformom, alebo sklená vata.

3.10. Síran sodný, bezvodý, granulovaný.

3.11. Inertný plyn, napr. dusík.

3.12. 1 N kyselina chlorovodíková.

3.13. Kremelina (hyflosupercel) premytá kyselinou.

3.14. Silikagél G-HR alebo ekvivalentný, na chromatografiu na tenkej vrstve (TLC).

3.15. Vyvíjacie činidlá:

3.15.1. dietyléter (3.5)/metanol (3.4)/voda: 94/4,5/1,5 (v/v/v), nasýtená kyveta.

3.15.2. chloroform (3.2)/acetón (3.1): 9/1 (v/v), nenasýtená kyveta.

3.16. Štandardný roztok obsahujúci približne 0,1 µg aflatoxínu B_1 na 1 ml v chloroforme (3.2) alebo v zmesi benzén/acetonitril (3.6), pripravený a skontrolovaný spôsobom uvedeným v bode 7 metódy A.

4. **Prístroje**

Pozri bod 4 metódy A

5. **Postup**

5.1. *Príprava vzorky*
5.2. *Extrakcia*
5.3. *Čistenie na kolóne*
} pozri v bodoch 5.1, 5.2 a 5.3 metódy A

5.4. *Dvojrozmerná chromatografia na tenkej vrstve*

5.4.1. Nanášanie roztokov (riaďte sa diagramom uvedeným na obr. 1)

Vyryte dve rovné čiary na platňu (4.8) rovnobežne s priľahlými stranami (5 a 6 cm od každej strany), tak aby sa obmedzila migrácia čiel vyvíjacieho činidla. Pomocou kapilárnych pipiet alebo injekčných mikrostriekačiek naneste na platňu nasledujúce roztoky:

— *do bodu A*, 20 µl prečisteného extraktu vzorky získaného podľa bodu 5.3,

— *do bodu B*, 20 µl štandardného roztoku (3.16),

— *do bodu C*, 10 µl štandardného roztoku (3.16),

— *do bodu D*, 20 µl štandardného roztoku (3.16),

— *do bodu E*, 40 µl štandardného roztoku (3.16).

Vysušte v pomalom prúde vzduchu alebo inertného plynu (3.11). Získané škvrny musia mať priemer približne 5 mm.

5.4.2. Vyvíjanie (riaďte sa diagramom uvedeným na obr. 1)

Chromatrogram nechajte vyvíjať v smere I v tme s vyvíjacím činidlom (3.15.1) (1 cm vrstva v nasýtenej kyvete) dovtedy, kým čelo vyvíjacieho činidla nedosiahne medznú čiaru činidla. Vyberte platňu z kyvety a nechajte schnúť v tme pri laboratórnej teplote 15 minút.

Chromatrogram nechajte potom vyvíjať v smere II v tme s vyvíjacím činidlom (3.15.2) (1 cm vrstva v nenasýtenej kyvete) dovtedy, kým čelo činidla nedosiahne medznú čiaru činidla. Vyberte platňu z kyvety a nechajte schnúť pri laboratórnej teplote v tme.

5.4.3. Interpretácia chromatogramu (riaďte sa diagramom uvedeným na obr. 2)

Ožiarte chromatogram UV svetlom tak, že ho umiestnite do vzdialenosti 10 cm od lampy (4.9). Určite polohu modrofluoreskujúcich škvŕn B, C, D a E aflatoxínu B_1 zo štandardného roztoku. Vyneste dve imaginárne čiary prechádzajúce cez tieto škvrny v pravých uhloch k smerom vyvíjania. Priesečník P týchto čiar je miestom, v ktorom by sa podľa očakávania mala nachádzať škvrna aflatoxínu B_1, pochádzajúca z extraktu vzorky naneseného v bode A (obrázok 1). Skutočné miesto výskytu škvrny aflatoxínu B_1 sa však môže nachádzať v bode Q v priesečníku dvoch imaginárnych priamok zvierajúcich medzi sebou uhol približne 100 a prechádzajúcich cez škvrny B a C. Stanovte množstvo aflatoxínu B_1 v extrakte vzorky spôsobom uvedeným v bode 5.5.

5.4.4. Prídavná chromatografia

Vyryte dve rovné čiary na novú platňu (4.8) rovnobežne s priľahlými stranami, tak ako je uvedené na obr. 1, naneste v bode A (pozri obrázok 1) 20 µl prečisteného extraktu vzorky, získaného v bode 5.3, a naneste naň 20 µl štandardného roztoku (3.16). Nechajte vyvíjať spôsobom uvedeným v bode 5.4.2. Chromatogram ožiarte UV svetlom (4.9) a skontrolujte, či:

— sú škvrny aflatoxínu B_1 pochádzajúceho z extraktu a zo štandardného roztoku navrstvené na sebe,

— fluorescencia tejto škvrny je intenzívnejšia ako fluorescencia škvrny aflatoxínu B_1 v bode Q na prvej platni.

5.5. *Kvantitatívne stanovenia*

Stanovte vizuálne alebo fluorodenzitometricky, tak ako je uvedené ďalej.

5.5.1. Vizuálne merania

Stanovte množstvo aflatoxínu B_1 v extrakte porovnávaním intenzity fluorescencie škvŕn extraktu s intenzitou škvŕn štandardného roztoku v bodoch C, D a E. Podľa potreby interpolujte. Ak intenzita fluorescencie vyžarovanej z 20 µl extraktu bude väčšia ako zo 40 µl štandardného roztoku, zrieďte extrakt predtým, ako ho znovu podrobíte chromatografii na tenkej vrstve, 10- alebo 100-násobne chloroformom (3.2) alebo zmesou benzén/acetonitril (3.6).

5.5.2. Merania fluorodenzitometrom

Zmerajte intenzitu fluorescencie škvŕn aflatoxínu B_1 fluorodenzitometrom (4.12) pri excitačnej vlnovej dĺžke 365 nm a pri emisnej vlnovej dĺžke 443 nm.

Stanovte množstvo alfatoxínu B_1 v škvrne extraktu porovnaním intenzity jej fluorescencie s intenzitami štandardného roztoku vo škvrnách C, D a E.

5.6. *Potvrdenie identity aflatoxínu B_1*

Pozri bod 5.6 metódy A.

6. **Výpočet výsledkov**

Pozri bod 6 metódy A.

7. **Opakovateľnosť**

Pozri bod 8 metódy A.

8. **Reprodukovateľnosť**

Pozri pod „Poznámky“, bod 2 časti C.

C. POZNÁMKY TÝKAJÚCE SA METÓD A A B

1. **Odtučnenie**

Vzorky obsahujúce viac ako 5 % tuku sa musia odtučniť petroléterom (bod varu 40 až 60 °C) po príprave uvedenej v 5.1.

V takýchto prípadoch sa analytické výsledky musia vyjadriť v hmotnosti neodtučnenej vzorky.

2. **Reprodukovateľnosť výsledkov**

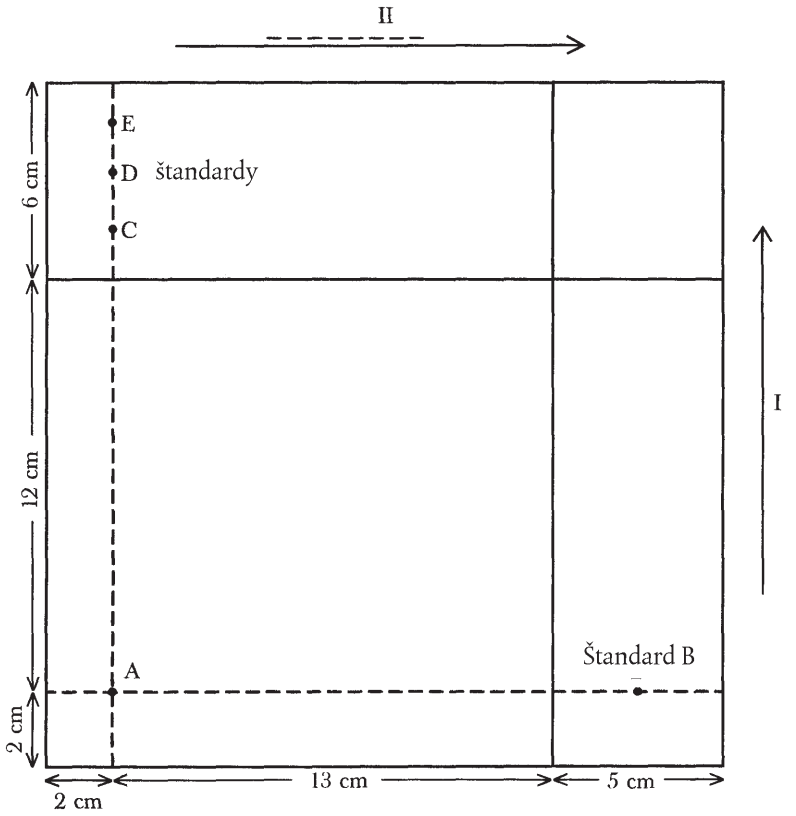
Reprodukovateľnosť výsledkov, t. j. odchýlka medzi výsledkami získanými v dvoch alebo viacerých laboratóriách z tej istej vzorky, bola odhadnutá:

± 50 % z priemernej hodnoty pre priemerné hodnoty aflatoxínu B_1 od 10 do 20 µg/kg;

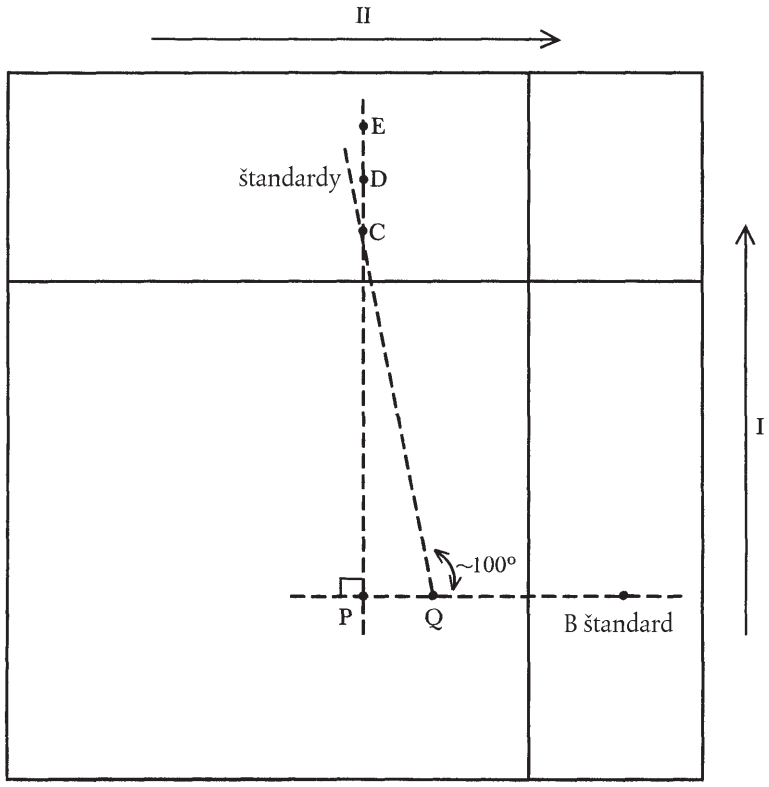
± 10 µg/kg od priemernej hodnoty pre priemerné hodnoty vyššie ako 20 až do 50µg/kg;

± 20 % z priemernej hodnoty pre priemerné hodnoty vyššie ako 50 µg/kg.

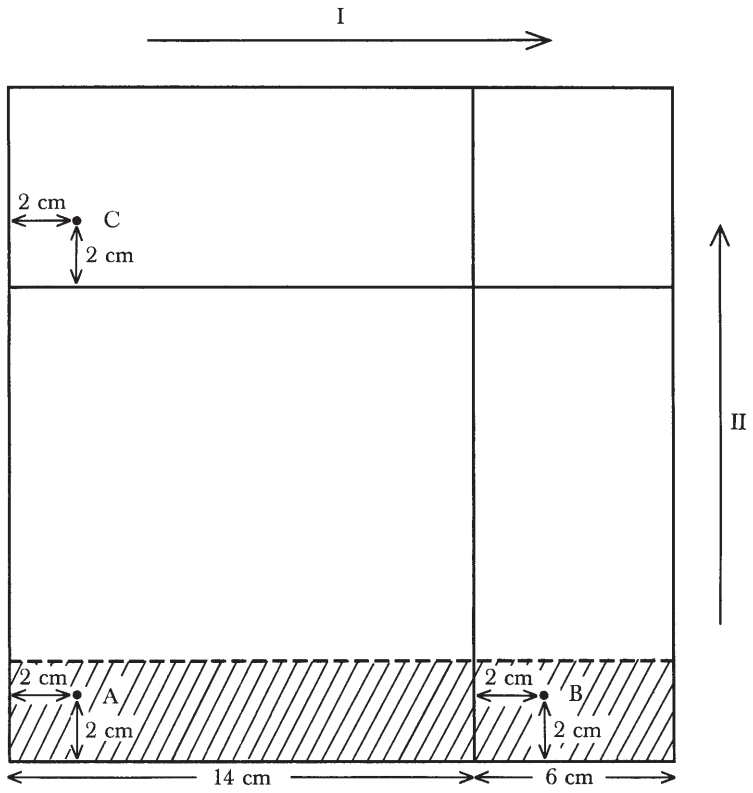
Dodatok k prílohe



Obrázok 1



Obrázok 2



Obrázok 3