31976L0372

SEDMA DIREKTIVA KOMISIJE
z dne 1. marca 1976
o določitvi analitskih metod Skupnosti za uradni nadzor krme

(76/372/EGS)

KOMISIJA EVROPSKIH SKUPNOSTI JE

ob upoštevanju Pogodbe o ustanovitvi Evropske gospodarske skupnosti,

ob upoštevanju Direktive Sveta z dne 20. julija 1970 o uvedbi metod vzorčenja in analiz Skupnosti za uradni nadzor krme ([1]), kakor je bila nazadnje spremenjena z Aktom o pristopu ([2]), in zlasti člena 2 Direktive,

ker navedena direktiva zahteva, da se uradni nadzor krme izvaja z uporabo metod vzorčenja in analiz Skupnosti z namenom preverjanja izpolnjevanja zahtev, določenih z zakoni in drugimi predpisi v zvezi s kakovostjo in sestavo krme;

ker so direktive Komisije 71/250/EGS z dne 15. junija 1971 ([3]), 71/393/EGS z dne 18. novembra 1971 ([4]), 72/199/EGS z dne 27. aprila 1972 ([5]), 73/46/EGS z dne 5. decembra 1972 ([6]), 74/203/EGS z dne 25. marca 1974 ([7]) in 75/84/EGS z dne 20. decembra 1974 ([8]) že določile številne analitske metode Skupnosti; ker je zaradi napredka dela odtlej priporočljivo sprejeti sedmi sklop metod;

ker so ukrepi, predvideni s to direktivo, v skladu z mnenjem Stalnega odbora za krmo,

SPREJELA NASLEDNJO DIREKTIVO:

Člen 1

Države članice zahtevajo, da se analize za uradni nadzor vsebnosti aflatoksina B_1 v krmi izvaja skladno z metodo, opisano v Prilogi k tej direktivi.

Splošne določbe, navedene v delu I (Uvod) Priloge k Prvi direktivi Komisije 71/250/EGS z dne 15. junija 1971, z izjemo dela, ki obravnava pripravo vzorca za analizo, se uporabljajo za metode, opisane v Prilogi k tej direktivi.

Člen 2

Države članice sprejmejo zakone in druge predpise, potrebne za uskladitev s to direktivo, najpozneje do 1. oktobra 1976. O tem takoj obvestijo Komisijo.

Člen 3

Ta direktiva je naslovljena na države članice.

V Bruslju, 1. marca 1976

Za Komisijo

P. J. LARDINOIS

Član Komisije

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

PRILOGA

DOLOČANJE AFLATOKSINA B_1

A. ENODIMENZIONALNA TANKOPLASTNA KROMATOGRAFSKA METODA

1. **Namen in področje uporabe**

S to metodo je mogoče določiti vsebnost aflatoksina B_1 v naslednjih krmilih: pogačah iz zemeljskih oreškov, kopre, lanenega semena, soje, sezama, palme babassu in olja koruznih kalčkov, v žitih in žitnih proizvodih, grahovi moki, krompirjevi kaši in škrobu. Spodnja meja določevanja je 0,01 mg/kg (10 ppb).

Če prisotnost motečih snovi ovira določanje, je treba analizo ponoviti z uporabo metode B (dvodimenzionalna tankoplastna kromatografija).

2. **Princip**

Vzorec se ekstrahira s kloroformom. Ekstrakt se filtrira in ustrezen alikvot prečisti s kolonsko kromatografijo na silikagelu. Eluat se upari in ostanek raztopi v določenem volumnu kloroforma ali mešanici benzena in acetonitrila. Alikvot se kromatografira na tankoplastni kromatografiji (TLC). Količina aflatoksina B_1 se določi z opazovanjem kromatograma pod UV-svetlobo, vizualno ali s fluorodensitometrijo, s primerjavo z znanimi količinami standardnega aflatoksina B_1. Identiteta aflatoksina B_1, ekstrahiranega iz krmila, mora biti potrjena z opisanim postopkom.

3. **Reagenti**

Opomba: Vsi reagenti morajo biti kakovosti „analitskega reagenta“, če ni navedeno drugače.

3.1 Aceton.

3.2 Kloroform, stabiliziran z 0,5 do 1,0 % 96-odstotnega etanola (v/v).

3.3 N-heksan.

3.4 Metanol.

3.5 Brezvodni dietileter, brez peroksidov.

3.6 Mešanica benzena in acetonitrila: 98/2 (v/v).

3.7 Mešanica kloroforma (3.2) in metanola (3.4): 97/3 (v/v).

3.8 Silikagel za kolonsko kromatografijo, velikost delcev od 0,05 do 0,20 mm.

3.9 Hidrofilna vata, predhodno razmaščena s kloroformom, ali steklena volna.

3.10 Natrijev sulfat, brezvoden, v zrnu.

3.11 3.11. Inertni plin, npr. dušik.

3.12 1 N klorovodikova kislina.

3.13 50-odstotna (v/v) žveplova (VI) kislina.

3.14 Kiselgur (hyflosupercel), opran v kislini.

3.15 Silikagel G-HR ali enakovreden, za TLC.

3.16 Standardna raztopina s približno 0,1 µg aflatoksina B_1 na ml v kloroformu (3.2) ali mešanici benzen/acetonitril (3.6), pripravljena in preverjena, kakor je navedeno v oddelku 7.

3.17 Standardna raztopina za kvalitativen preskus s približno 0,1 µg aflatoksina B_1 in B_2 na ml v kloroformu (3.2) ali mešanici benzen/acetonitril (3.6). Te koncentracije so navedene kot vodilo. Njihovo razmerje mora biti tako, da je intenziteta fluorescence za oba aflatoksina enaka.

3.18 Topila za razvijanje:

3.18.1 Kloroform (3.2)/aceton (3.1): 9/1 (v/v), nenasičena kad;

3.18.2 Dietileter (3.5)/metanol (3.4)/voda: 96/3/1 (v/v/v), nenasičena kad;

3.18.3 Dietileter (3.5)/metanol (3.4)/voda: 94/4.5/1.5 (v/v/v), nasičena kad;

3.18.4 Kloroform (3.2)/metanol (3.4): 94/6 (v/v), nasičena kad;

3.18.5 Kloroform (3.2)/metanol (3.4): 97/3 (v/v), nasičena kad.

4. **Oprema**

4.1 Drobilni mešalnik.

4.2 Naprava za stresanje ali magnetno mešalo.

4.3 Nagubani filtri, Schleicher in Schüll št. 588 ali enakovredni, premer: 24 cm.

4.4 Steklena cev za kromatografijo (notranji premer: 22 mm, dolžina: 300 mm) s teflonskim petelinčkom in 250-mililitrskim napajalnikom.

4.5 Rotacijski vakuumski uparjalnik s 500-mililitrsko bučko z okroglim dnom.

4.6 4.6 500-mililitrske erlenmajerice z brusom.

4.7 Aparatura za TLC.

4.8 Steklene plošče za TLC, 200 × 200 mm, pripravljene, kakor sledi (navedene količine zadostujejo za premaz petih plošč). V erlenmajerico se prenese 30 g silikagela G-HR (3.15). Doda se 60 ml vode, zamaši in stresa eno minuto. Suspenzija se porazdeli po ploščah tako, da se dobi enakomerna plast, debela 0,25 mm. Pusti se, da se posuši na zraku, in nato se shrani v eksikator s silikagelom. Pred uporabo se plošče aktivirajo tako, da se eno uro sušijo v sušilniku pri temperaturi 110 °C.

Plošče, pripravljene za uporabo, so primerne, če dajo podobne rezultate, kakor se dobijo s ploščami, pripravljenimi, kakor je navedeno zgoraj.

4.9 Dolgovalovna (360 nm) UV-svetilka. Intenziteta sevanja mora omogočiti, da se madež 1 mg aflatoksina B_1 še vedno jasno razloči na plošči TLC z razdalje 10 cm od svetilke.

4.10 10-mililitrske graduirane epruvete s polietilenskimi zamaški.

4.11 UV-spektrofotometer.

4.12 Fluorodensitometer (neobvezno).

5. **Postopek**

5.1 *Priprava vzorca (glej „Opombe“, del C, točka 1).*

Vzorec se zdrobi tako, da v celoti preide skozi sito z velikostjo odprtin 1 mm (skladno s priporočilom ISO R 565).

5.2 *Ekstrakcija*

50 g zdrobljenega, homogeniziranega vzorca se prenese v 500-mililitrsko erlenmajerico (4.6). Doda se 25 g kiselgurja (3.14), 25 ml vode in 250 ml kloroforma (3.2). Erlenmajerica se zamaši, stresa ali meša 30 minut z napravo (4.2) in filtrira skozi naguban filter (4.3). Prvih 10 ml filtrata se zavrže in nato zbere 50 ml.

5.3 *Čiščenje kolon*

Spodnji del kromatografske cevi (4.4) se zamaši z vato ali stekleno volno (3.9), dve tretjini cevi se napolnita s kloroformom (3.2) in doda se 5 g natrijevega sulfata (3.10).

Preveri se, da je zgornja površina plasti natrijevega sulfata ravna, nato se v majhnih porcijah doda 10 g silikagela (3.8). Po vsakem dodajanju se pazljivo premeša, da se odstranijo zračni mehurčki. Pusti se stati 15 minut in nato se pazljivo doda 15 g natrijevega sulfata (3.10). Pusti se, da tekočina upade, dokler ni tik nad zgornjo površino plasti natrijevega sulfata.

50 ml ekstrakta, dobljenega v 5.2, se zmeša s 100 ml n-heksana (3.3) in mešanica se kvantitativno prenese v kolono. Pusti se, da tekočina upade, dokler ni tik nad zgornjo površino plasti natrijevega sulfata. Izpiralna tekočina se zavrže. Nato se doda 100 ml dietiletra (3.5) in ponovno pusti, da upade do zgornje površine plasti natrijevega sulfata. Med temi postopki se pazi, da je hitrost pretoka od 8 do 12 ml na minuto in da se kolona ne osuši. Tekočina, ki izteka, se zavrže. Nato se eluira s 150 ml mešanice kloroforma/metanola (3.7) in zbere ves eluat.

Eluat se upari skoraj do suhega pri temperaturi, ki ne presega 50 °C, pod tokom inertnega plina (3.11) v rotacijskem uparjalniku (4.5). Kvantitativno se ostanek z uporabo kloroforma (3.2) ali mešanici benzen/acetonitril (3.6) prenese v 10-mililitrsko graduirano epruveto (4.10). Raztopina se koncentrira pod tokom inertnega plina (3.11) ter nato se dopolni volumen do 2 ml s kloroformom (3.2) ali mešanico benzen/acetonitril (3.6).

5.4 *Tankoplastna kromatografija*

Na TLC-ploščo (4.8), 2 cm od spodnjega roba in v razdaljah 2 cm, se nanesejo volumni standardne raztopine in ekstrakta, navedeni spodaj:

— 10, 15, 20, 30 in 40 µl standardne raztopine aflatoksina B_1 (3.16),

— 10 µl ekstrakta, dobljenega v 5.3, in, *naneseno na isto točko*, 20 µl standardne raztopine (3.16),

— 10 in 20 µl ekstrakta, dobljenega v 5.3.Kromatogram se razvije v temi z enim od topil za razvijanje (3.18). Topilo je treba izbrati vnaprej, tako da se nanese 25 µl kvalitativne standardne raztopine (3.17) na ploščo in preveri, da sta, kadar sta razvita, aflatoksina B_1 in B_2 popolnoma ločena.

Pusti se, da topila izhlapijo v temi, in nato se plošča osvetli z UV-svetlobo, tako da se postavi 10 cm od svetilke (4.9). Madeži aflatoksina B_1 oddajajo modro fluorescenco.

5.5 *Kvantitativno določanje*

Določi se vizualno ali s fluorodensitometrijo, kakor je navedeno spodaj.

5.5.1 Vizualne meritve

Količina aflatoksina B_1 v ekstraktu se določi s primerjanjem intenzitete fluorescence madežev ekstrakta s fluorescenco madežev standardne raztopine. Po potrebi se interpolira. Fluorescenca, dobljena z nanosom ekstrakta na standardno raztopino, mora biti intenzivnejša od fluorescence 10 µl ekstrakta in viden sme biti samo en madež. Če je intenziteta fluorescence, ki jo povzroči 10 µl ekstrakta, večja od intenzitete 40 µl standardne raztopine, se ekstrakt 10- ali 100-krat razredči s kloroformom (3.2) ali mešanico benzen/acetonitril (3.6), preden se ponovno izpostavi tankoplastni kromatografiji.

5.5.2 Meritve s fluorodensitometrijo

Intenziteta fluorescence madežev aflatoksina B_1 se meri s fluorodensitometrom (4.12) pri valovni dolžini vzbujanja 365 nm in valovni dolžini emisije 443 nm. Količina aflatoksina B_1 v madežih ekstrakta se določi s primerjanjem intenzitete njihove fluorescence s fluorescenco madežev standardnega aflatoksina B_1.

5.6 *Potrditev identitete aflatoksina B_1*

Identiteta aflatoksina B1 v ekstraktu se potrdi s postopki, navedenimi spodaj.

5.6.1 Obdelava z žveplovo (VI) kislino

Žveplova (VI) kislina (3.13) se razprši na kromatogram, dobljen v 5.4. Fluorescenca madežev aflatoksina B_1 se mora pod UV-žarki iz modre spremeniti v rumeno.

5.6.2 Dvodimenzionalna kromatografija, ki vključuje nastanek aflatoksina B_1-hemiacetala (aflatoksina B_{2a})

Opomba: Pri izvajanju spodaj navedenih postopkov je treba natančno upoštevati diagram na sliki 3.

5.6.2.1 Nanašanje raztopin

Na ploščo (4.8) se vzporedno z robovi (6 cm navznoter od vsake strani) vrežeta dve ravni črti, da se omeji potovanje fronte topil. Na ploščo se s kapilarnimi pipetami ali mikrobrizgalkami naneseta naslednji raztopini:

— *na točko A*: volumen prečiščenega ekstrakta vzorca, dobljenega v 5.3, ki vsebuje približno 2,5 nm aflatoksina B_1,

— *na točki B in C*: 25 µl standardne raztopine (3.16).5.6.2.2 Razvijanje

Kromatogram se razvije v smeri I, v temi, z uporabo topila za razvijanje (3.18.1) (1-centimetrska plast v nenasičeni kadi), dokler fronta topila ne doseže mejne črte topila.

Plošča se odstrani iz kadi in pusti, da se pet minut suši v temi pri sobni temperaturi. Nato se klorovodikova kislina (3.12) razprši po 2,5 cm visokem pasu, ki zajema točki A in B (prikazano s šrafiranim območjem na sliki 3), dokler ne potemni, pri tem pa se preostanek plošče zaščiti s stekleno ploščo. Pusti se 10 minut, da reagira v temi, in posuši v toku zraka pri sobni temperaturi.

Nato se kromatogram razvije v smeri II, v temi, z uporabo topila za razvijanje (3.18.1) (1-centimetrska plast v nenasičeni kadi), dokler fronta topila ne doseže mejne črte topila. Plošča se odstrani iz kadi in pusti, da se posuši pri sobni temperaturi.

5.6.2.3 Interpretacija kromatograma

Kromatogram se opazuje pod UV-svetlobo (4.9) in preverijo se naslednje značilnosti.

(a) Pojav modrega fluorescentnega madeža aflatoksina B_1, ki izhaja iz standardne raztopine, nanesene na C (potovanje v smeri I).

(b) Pojav modrega fluorescentnega madeža nereagiranega (s klorovodikovo kislino) aflatoksina B_1 in intenzivnejše modrega fluorescentnega madeža aflatoksina B_1-hemiacetala, ki oba izhajata iz standardne raztopine, nanesene na B (potovanje v smeri II).

(c) Pojav madežev, ki ustrezajo madežem, opisanim v (b); izhajajo iz vzorca ekstrakta, nanesenega na A. Položaj teh madežev je opredeljen najprej s potovalno razdaljo aflatoksina B_1 iz A v smeri I (enaka, kakor jo je prepotoval standard, nanesen na C) ter nato s potovalnimi razdaljami aflatoksina B_1-hemiacetala od tam v smeri II (enake, kakor jih je prepotoval standard, nanesen na B). Intenziteti fluorescence madežev hemiacetala, ki izhajajo iz ekstrakta in iz standarda, nanesenega na B, bi morali sovpadati.

6. **Izračun rezultatov**

6.1 *Iz vizualnih meritev*

Vsebnost aflatoksina B_1 v mikrogramih na kg vzorca (ppb) se izračuna z enačbo:

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

pri čemer je:

Y in X = volumna, v mikrolitrih, standardne raztopine aflatoksina B_1 (3.16) in ekstrakta, ki ima podobno intenziteto fluorescence;

S = koncentracija, v mikrogramih, aflatoksina B_1 na ml, v standardni raztopini (3.16);

V = končni volumen ekstrakta, v mikrolitrih, ob upoštevanju potrebnih razredčitev;

W = masa, v gramih, vzorca, ki ustreza volumnu ekstrakta, prečiščenega na kolonah.

6.2 *Iz fluorodensitometričnih meritev*

Vsebnost aflatoksina B_1 v mikrogramih na kg vzorca se izračuna z enačbo:

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

pri čemer je:

Y = volumen, v mikrolitrih, ekstrakta, nanesenega na ploščo (10 ali 20 µl);

S = količina, v nanogramih, aflatoksina B_1 v madežu ekstrakta (proporcionalna vrednosti vzetega Y), ki izhaja iz meritev;

V = končni volumen ekstrakta, v mikrolitrih, ob upoštevanju potrebnih razredčitev;

W = masa, v gramih, vzorca, ki ustreza volumnu ekstrakta, prečiščenega v koloni.

7. **Priprava in preskušanje standardne raztopine (3.16)**

7.1 *Določitev koncentracije aflatoksina B_1*

Pripravi se standardna raztopina aflatoksina B_1 v kloroformu (3.2) ali mešanici benzen/acetonitril (3.6) s koncentracijo od 8 do 10 µg/ml. S spektrofotometrom (4.11) se določi absorpcijski spekter med 330 in 370 nm.

Izmeri se optična gostota (A) pri 363 nm, če je bila uporabljena raztopina kloroforma; oziroma pri 348 nm, če je raztapljanje potekalo v mešanici benzen/acetonitril.

Koncentracija v mikrogramih aflatoksina B_1 na ml raztopine se izračuna s spodaj navedenimi enačbami:

$\frac{312 \cdot A \cdot 1\,000}{20\,600}$ za raztopino kloroforma;

$\frac{312 \cdot A \cdot 1\,000}{19\,800}$ za raztopino v mešanici benzen/acetonitril.

Razredči se po potrebi, zaščiteno pred dnevno svetlobo, da se dobi delovna standardna raztopina s koncentracijo aflatoksina B_1 približno 0,1 µg/ml. Če se hrani v hladilniku pri 4 °C, je raztopina stabilna dva tedna.

7.2 *Preskušanje kromatografske čistosti*

Na ploščo (4.8) se nanese 5 µl standardne raztopine aflatoksina B_1, ki vsebuje od 8 do 10 µg/ml (7.1). Razvije se kromatogram, kakor je navedeno v 5.4. Na UV-svetlobi bi kromatogram moral prikazovati samo en madež in na območju začetnega nanosa ne sme biti zaznavne fluorescence.

8. **Ponovljivost**

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določitev, ki jih na istem vzorcu izvaja isti analitik, ne sme biti večja od:

— 25 % glede na največjo vrednost, za vsebnosti aflatoksina B_1 od 10 do 20 µg/kg,

— 5 µg, v absolutni vrednosti, za vsebnosti med 20 in do 50 µg/kg,

— 10 % glede na največjo vrednost, za vsebnosti nad 50 µg/kg.

9. **Obnovljivost**

Glej „Opombe“, del C, točka 2.

B. DVODIMENZIONALNA TANKOPLASTNA KROMATOGRAFSKA METODA

1. **Namen in področje uporabe**

Metoda omogoča določitev vsebnosti aflatoksina B_1 v krmilih, ki jih ne zajema metoda A. Spodnja meja določitve je 0,01 mg/kg (10 ppb). Metoda ni uporabna za krmila, ki vsebujejo pulpo agrumov.

2. **Princip**

Vzorec se ekstrahira s kloroformom. Ekstrakt se filtrira in ustrezen alikvot se loči s kolonsko kromatografijo na silikagelu. Eluat se upari in ostanek se ponovno raztopi v določenem volumnu kloroforma ali mešanici benzena in acetonitrila. Alikvot te raztopine se kromatografira z dvodimenzionalno tankoplastno kromatografijo (TLC). Količina aflatoksina B_1 se določi z opazovanjem kromatograma pod UV-svetlobo, vizualno ali s fluorodensitometrijo, s primerjavo z znanimi količinami standardnega aflatoksina B_1. Identiteta aflatoksina B_1, ekstrahiranega iz krme, mora biti potrjena z navedenim postopkom.

3. **Reagenti**

Opomba: Vsi reagenti morajo biti kakovosti „analitskega reagenta“, če ni navedeno drugače.

3.1 Aceton.

3.2 Kloroform, stabiliziran z 0,5 do 1 % 96-odstotnega etanola (v/v).

3.3 N-heksan.

3.4 Metanol.

3.5 Brezvodni dietileter, brez peroksidov.

3.6 Mešanica benzena in acetonitrila: 98/2 (v/v).

3.7 3.7. Mešanica kloroforma (3.2) in metanola (3.4): 97/3 (v/v).

3.8 Silikagel za kolonsko kromatografijo, velikost delcev od 0,05 do 0,20 mm.

3.9 Hidrofilna vata, predhodno razmaščena s kloroformom, ali steklena volna.

3.10 Natrijev sulfat, brezvoden, v zrnu.

3.11 Inertni plin, npr. dušik.

3.12 1 n-klorovodikova kislina.

3.13 Kiselgur (hyflosupercel), izpran v kislini.

3.14 Silikagel G-HR ali enakovreden, za TLC.

3.15 Topila za razvijanje:

3.15.1 Dietileter (3.5)/metanol (3.4)/voda: 94/4.5/1.5 (v/v/v), nasičena kad.

3.15.2 Kloroform (3.2)/aceton (3.1):9/1 (v/v), nenasičena kad.

3.16 Standardna raztopina s približno 0,1 µg aflatoksina B_1 na ml v kloroformu (3.2) ali mešanici benzen/acetonitril (3.6), pripravljena in preverjena, kakor je navedeno v točki 7 metode A.

4. **Oprema**

Glej točko 4 metode A.

5. **Postopek**

5.1	Priprava vzorca	Glej točke 5.1, 5.2 in 5.3 metode A.
5.2	Ekstrakcija	
5.3	Čiščenje kolon	

5.4 *Dvodimenzionalni TLC*

5.4.1 Nanašanje raztopin (glej diagram na sliki 1)

Na ploščo (4.8) se vzporedno z robovi (5 oziroma 6 cm od vsake strani) vrežeta dve ravni črti, da se omeji potovanje fronte topil. Na ploščo se s kapilarnimi pipetami ali mikrobrizgalkami nanesejo naslednje raztopine:

— *na točko A*, 20 µl prečiščenega ekstrakta vzorca, dobljenega v 5.3,

— *na točko B*, 20 µl standardne raztopine (3.16),

— *na točko C*, 10 µl standardne raztopine (3.16),

— *na točko D*, 20 µl standardne raztopine (3.16),

— *na točko E*, 40 µl standardne raztopine (3.16).

Suši se v počasnem toku zraka ali inertnega plina (3.11). Dobljeni madeži morajo imeti premer približno 5 mm.

5.4.2 Razvijanje (glej diagram na sliki 1)

Kromatogram se razvije v smeri I, v temi, z uporabo topila za razvijanje (3,15.1) (1-centimetrska cm plast v nasičeni kadi), dokler fronta topila ne doseže mejne črte za topilo. Plošča se vzame iz kadi in pusti, da se petnajst minut suši v temi pri sobni temperaturi.

Nato se kromatogram razvije v smeri II, v temi, z uporabo topila za razvijanje (3.15.2) (1-centimetrska plast v nenasičeni kadi), dokler fronta topila ne doseže mejne črte za topilo. Plošča se vzame iz kadi in pusti, da se posuši v temi pri sobni temperaturi.

5.4.3 Interpretacija kromatograma (glej diagram na sliki 2)

Kromatogram se osvetli z UV-žarki, tako da se plošča postavi 10 cm od (4.9). Označi se položaj modrih fluorescentnih madežev B, C, D in E aflatoksina B_1 iz standardne raztopine. Začrtata se dve namišljeni črti, ki potekata skozi te madeže in sta pravokotni na smeri razvijanja. Presečišče P teh črt je mesto, kjer se pričakuje madež aflatoksina B_1, ki izvira iz ekstrakta vzorca, nanesenega na A (slika 1). Vendar je dejansko mesto madeža aflatoksina B_1 lahko na točki Q na presečišču dveh namišljenih ravnih črt, ki med seboj tvorita kot približno 100° in potekata skozi madež B ali C. Količina aflatoksina B_1 v ekstraktu vzorca se določi, kakor je navedeno v 5.5.

5.4.4 Dopolnilna kromatografija

Na novo ploščo (4.8) se vzporedno z obema robovoma vrežeta dve ravni črti, kakor kaže diagram na sliki 1, in na A (glej sliko 1) se nanese 20 µl prečiščenega ekstrakta vzorca, dobljenega v 5.3, in prek njega se nanese 20 µl standardne raztopine (3.16). Razvije se, kakor je navedeno v 5.4.2. Kromatogram se osvetli z UV-svetlobo (4.9) in preveri, da:

— sta madeža aflatoksina B_1 iz ekstrakta in standardne raztopine nanesena drug vrh drugega,

— je fluorescenca tega madeža intenzivnejša od fluorescence madeža aflatoksina B_1, razvitega v Q na prvi plošči.

5.5 *Kvantitativno določanje*

Bodisi vizualno bodisi s fluorodensitometrijo se določi, kakor je navedeno spodaj.

5.5.1 Vizualne meritve

Količina aflatoksina B_1 v ekstraktu se določi s primerjanjem intenzitete fluorescence madeža ekstrakta s fluorescenco madežev standardne raztopine C, D, in E. Po potrebi se interpolira. Če je intenziteta fluorescence 20 µl ekstrakta večja od intenzitete 40 µl standardne raztopine, se ekstrakt 10- ali 100-krat razredči s kloroformom (3.2) ali mešanico benzen/acetonitril (3.6), preden se ponovno izpostavi tankoplastni kromatografiji.

5.5.2 Meritve s fluorodensitometrijo

Intenziteta fluorescence madežev aflatoksina B_1 se meri s fluorodensitometrom (4.12) pri valovni dolžini vzbujanja 365 nm in valovni dolžini emisije 443 nm.

Količina aflatoksina B_1 v madežu ekstrakta se določi s primerjanjem intenzitet fluorescence madeža ekstrakta s fluorescenco madežev standardne raztopine C, D, in E.

5.6 *Potrditev identitete aflatoksina B_1*

Glej točko 5.6 metode A.

6. **Izračun rezultatov**

Glej točko 6 metode A.

7. **Ponovljivost**

Glej točko 8 metode A.

8. **Obnovljivost**

Glej „Opombe“, del C, točka 2.

C. OPOMBE V ZVEZI Z METODAMA A IN B

1. **Razmaščevanje**

Vzorce, ki vsebujejo več kot 5 % maščob, je treba razmastiti s petrolejem (vrelišče 40 do 60 °C) potem, ko si bili pripravljeni, kakor je navedeno v 5.1.

V takih primerih morajo biti rezultati analize izraženi glede na maso nerazmaščenega vzorca.

2. **Obnovljivost rezultatov**

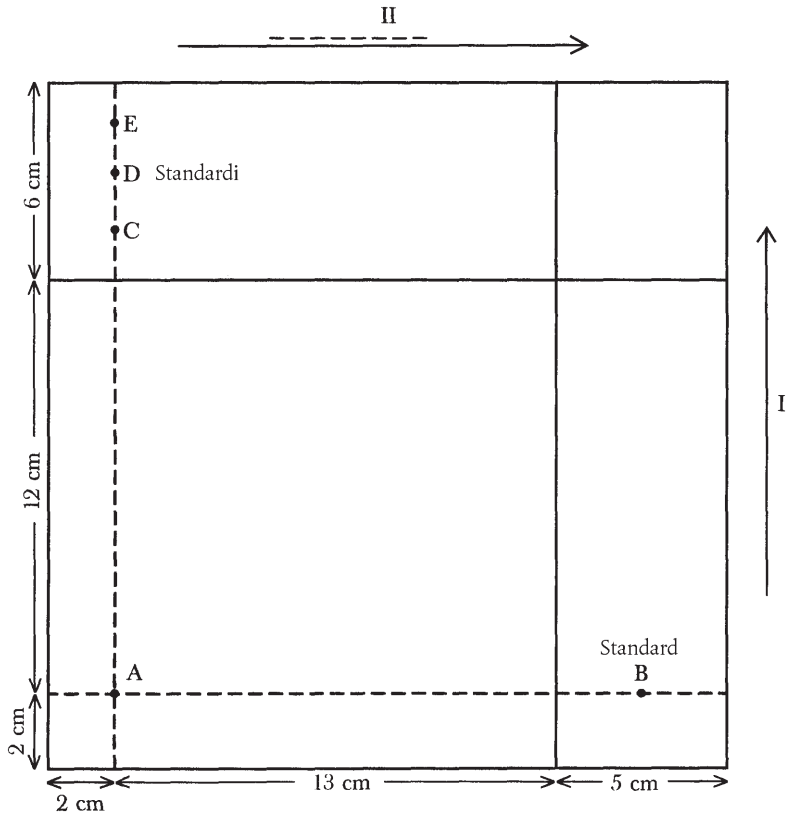
Obnovljivost rezultatov, tj. odstopanje med rezultati, dobljenimi v dveh ali več laboratorijih na istem vzorcu, je bila ocenjena pri:

± 50 % od srednje vrednosti za srednje vrednosti aflatoksina B_1 od 10 do 20 µg/kg;

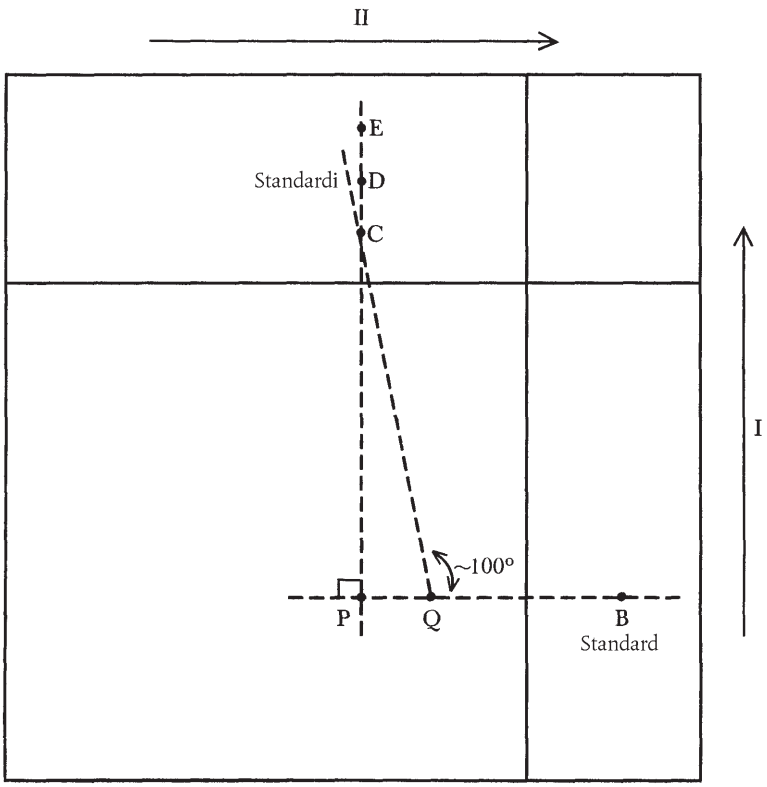
± 10 µg/kg k srednji vrednosti za srednje vrednosti med 20 in 50 µg/kg;

± 20 % od srednje vrednosti za srednje vrednosti nad 50 µg/kg.

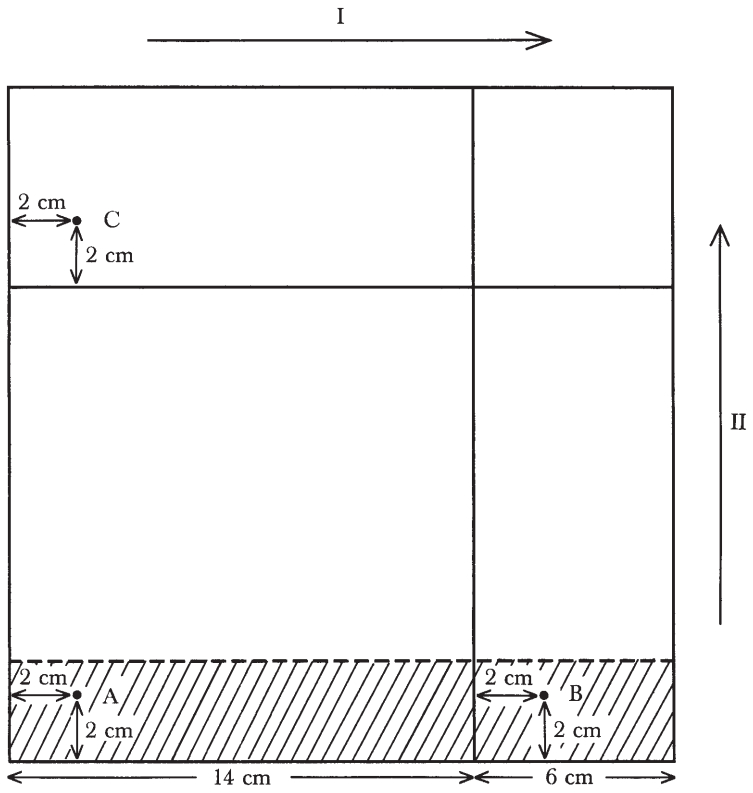
Dodatek k Prilogi



Slika 1



Slika 2



Slika 3