31976L0372

15.4.1976 ОФИЦИАЛЕН ВЕСТНИК НА ЕВРОПЕЙСКИТЕ ОБЩНОСТИ L 102/8

СЕДМА ДИРЕКТИВА НА КОМИСИЯТА
от 1 март 1976 година
относно установяване на общностни методи за анализ за целите на официалния контрол на храните за животни

(76/372/ЕИО)

КОМИСИЯТА НА ЕВРОПЕЙСКИТЕ ОБЩНОСТИ,

като взе предвид Договора за създаване на Европейската икономическа общност,

като взе предвид Директивата на Съвета от 20 юли 1970 г. относно въвеждането на общностни методи за вземане на проби и анализ за целите на официалния контрол на храните за животни ([1]), последно изменена с Акта за присъединяване ([2]), и по-специално член 2 от нея,

като има предвид, че въпросната директива изисква да се извършва официален контрол на храните за животни, като се използват методи на Общността за взимане на проби и анализ с цел проверка на съответствието с изискванията, възникващи от законовите, подзаконовите или административните разпоредби, свързани с качеството и състава на храните за животни;

като има предвид че с Директиви 71/250/ЕИО от 15 юни 1971 г. ([3]), 71/393/ЕИО от 18 ноември 1971 г. ([4]), 72/199/ЕИО от 27 април 1972 г. ([5]), 73/46/ЕИО от 5 декември 1972 г. ([6]), 74/203/ЕИО от 25 март 1974 г. ([7]) и 75/84/ЕИО от 20 декември 1974 г. ([8]) вече са въведени редица методи на Общността за анализ; като има предвид, че напредъкът на работата оттогава прави желателно приемането на седма група методи;

като има предвид, че мерките, предвидени в настоящата директива, са в съответствие със становището на Постоянния комитет по храните за животни,

ПРИЕ НАСТОЯЩАТА ДИРЕКТИВА:

Член 1

Държавите-членки изискват анализът за официалния контрол на храните за животни по отношение на тяхното съдържание на афлатоксин B1 да се извършва в съответствие с методите, описани в приложението към настоящата директива.

Общите разпоредби, посочени в част I (Въведение) от приложението към Първа директива 71/250/ЕИО на Комисията от 15 юни 1971 г., с изключение на частта за приготвяне на пробата за анализ, се прилагат за методите, описани в приложението към настоящата директива.

Член 2

Държавите-членки въвеждат в сила законовитете, подзаконовите или административните разпоредби, необходими, за да се съобразят с настоящата директива, най-късно до 1 октомври 1976 г. Те незабавно информират Комисията за това.

Член 3

Адресати на настоящата директива са държавите-членки.

Съставено в Брюксел на 1 март 1976 година.

За Комисията

P. J. LARDINOIS

Член на Комисията

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

ПРИЛОЖЕНИЕ

ОПРЕДЕЛЯНЕ НА АФЛАТОКСИН B_1

А. МЕТОД НА ЕДНОИЗМЕРНА ТЪНКОСЛОЙНА ХРОМАТОГРАФИЯ

1. **Цел и обхват**

Този метод позволява определяне на количеството афлатоксин B1 в следните храни за животни: фъстъци, копра, ленено семе, соя, сусам, кюспе от бабасу, палмово и царевично масло, зърнени култури и зърнени храни, грахово брашно, картофен пулп и нишесте. Долната граница на определяне е 0,01 mg/kg (10 ppb).

При наличие на пречещи субстанции, които затрудняват определянето, е необходимо да се започне анализът отново, като се използва метод Б (двуизмерна тънкослойна хроматография).

2. **Принцип**

Пробата се подлага на екстрахиране с хлороформ. Екстрактът се филтрува, взима се аликвотна част и се пречиства чрез колонна хроматография върху силикагел. Извлекът се изпарява и остатъкът се разтваря повторно в определен обем хлороформ или смес от бензол и ацетонитрил. Аликвотна част от този разтвор се подлага на тънкослойна хроматография (ТСХ). Количеството афлатоксин B1 се определя с ултравиолетово облъчване на хроматограмата визуално или чрез флуороденситометрия, чрез сравняване с познати количества стандартен афлатоксин B1. Идентичността на екстрахирания от храната афлатоксин B1 трябва да бъде потвърдена по посочената процедура.

3. **Реактиви**

NB Всички реактиви трябва да са с чистота за анализ A.R., освен когато е посочено друго.

3.1. Ацетон.

3.2. Хлороформ, стабилизиран с 0,5 до 1,0 % 96 % етанол (о/о).

3.3. Нормален хексан.

3.4. Метанол.

3.5. Безводен диетилов етер, свободен от прекиси.

3.6. Смес на бензол и ацетонитрил: 98/2 (о/о).

3.7. Смес на хлороформ (3.2) и метанол (3.4): 97/3 (о/о).

3.8. Силикагел, за колонна хроматография с размер на частиците 0,05 до 0,20 mm.

3.9. Абсорбент памучна вата, предварително обезмаслена с хлороформ, или стъклена вълна.

3.10. Натриев сулфат, безводен, на гранули.

3.11. Инертен газ, например азот.

3.12. 1N солна киселина.

3.13. 50 % (о/о) сярна киселина.

3.14. Кизелгур (хиплосуперсел), промит в киселина.

3.15. Силикагел G-HR или равностоен на него, за ТСХ.

3.16. Стандартен разтвор с около 0,1 µg Афлатоксин B1 на милилитър в хлороформ (3.2) или смес бензин/ацетонитрил (3.6), приготвен и проверен както е посочено в раздел 7.

3.17. Стандартен разтвор за качествен анализ, съдържащ около 0,1 μg афлатоксин B_1 и B_2 на милилитър в хлороформ (3.2) или смес бензол/ацетонитрил (3.6). Тези концентрации са дадени като насока. Те трябва да се уточнят, така че да се получи еднакъв интензитет на флуоресценция и за двата афлатоксина.

3.18. Разтворители за проявяване:

3.18.1. Хлороформ (3.2) / ацетон (3.1): 9/1 (о/о), ненаситена вана.

3.18.2. Диетилов етер (3.5) / метанол (3.4) /вода: 96/3/1 (о/о/о), ненаситена вана.

3.18.3. Диетилов етер (3.5) / метанол (3.4) /вода: 94/4.5/1.5 (о/о/о), наситена вана.

3.18.4. Хлороформ (3.2) / метанол (3.4): 94/6 (о/о), наситена вана.

3.18.5. Хлороформ (3.2) / метанол (3.4): 97/3 (о/о), наситена вана.

4. **Апаратура**

4.1. Мелница миксер.

4.2. Апарат за бълникане (шейкър) или магнитна бъркалка.

4.3. Нагъната филтърна хартия, Schlieicher and Schuell N 588, или равностойна, диаметър: 24 cm.

4.4. Стъклена тръба за хроматография (вътрешен диаметър: 22 mm, дължина: 300 mm) с кран и 250-милилитров резервоар.

4.5. Ротационен вакуум изпарител, с 500-милилитрова облодънна колба.

4.6. 500-милилитрови конусни колби със стъклени запушалки с шлиф.

4.7. Апарат за ТСХ.

4.8. Стъклени блюда за ТСЛ, 200 × 200 mm, приготвени, както следва (посочените количества са достатъчни за пет блюда). Поставят се 30 g силикагел G-HR (3.15) в конусна колба. Добавят се 60 ml вода, запушва се и се бълника една минута. Разстила се суспензията върху блюдата, така че да се получи равномерен слой с дебелина 0,25 mm. Оставя се да изсъхне на въздух и след това в ексикатор със силикагел. В момента на ползване се активират блюдата, като се държат в сушилня при 110 °C в продължение на един час.

Готови за ползване блюда са подходящи, ако дават резултати, сходни с тези, които се получават при използването на блюдата, приготвени по описания по-горе начин.

4.9. Ултравиолетова лампа с голяма дължина на вълната (360 nm). Интензитетът на облъчване трябва да позволява петно 1 ng афлатоксин B_1 да може ясно да се разграничава върху ТСХ блюдото на разстояние 10 cm от лампата.

4.10. 10-милилитрови градуирани епруветки с полиетиленови запушалки.

4.11. Ултравиолетов спектрофотометър.

4.12. Флуороденситометър (по избор).

5. **Процедура**

5.1. *Приготвяне на пробата (виж при „Наблюдения“, част B, точка 1)*

Смелете пробата така, че цялата да преминава през сито меш 1 mm (съгласно препоръка ISO R 565).

5.2. *Екстрахиране*

Поставя се 50 g смляна, хомогенизирана проба в 500 ml конусна колба (4.6). Добавя се 25 g кизелгур (3.14), 25 ml вода и 250 ml хлороформ (3.2). Запушва се колбата, разклаща се или се бърка 30 минути с апарата (4.2) и се филтрира през нагъната филтърна хартия (4.3). Изхвърлят се първите 10 ml от филтрата и после се събират 50 ml.

5.3. *Колонно очистване*

Запушалка от памучна вата или стъклена вълна (3.9) се вкарва в долния край на хроматографската тръба (4.4), напълнват се две трети от тръбата с хлороформ (3.2) и се добавя 5 g натриев сулфат (3.10)

Проверява се горната повърхност на пласта от натриев сулфат да е равна, след това се добавят 10 g силикагел (3.8) на малки порции. Разбърква се добре след всяко прибавяне, за да избегнете образуване на мехурчета. Изчакаква се да престои 15 минути и след това внимателно се добавя 15 g натриев сулфат (3.10) Оставя се течността да спадне точно до над горната повърхност на слоя натриев сулфат.

Смесват се 50 ml екстракт, събран в (5.2) с 100 ml нормален хексан (3.3) и сместа се прехвърля количествено в колоната. Изчаква се течността да спадне точно до над горната повърхност на слоя натриев сулфат. Изхвърлят се тези промивни води. След това се добавя 100 ml диетилов етер (3.5) и отново се изчаква да спадне до над горната повърхност на слоя натриев сулфат. При тези операции се следи дебитът да е 8—12 ml в минута и колоната да не изсъхва. Изхвърля се течността, която изтича. След това се елуира с 150 ml смес хлороформ/метанол (3.7) и се събира целият елуат.

Изпарява се последния почти до сухо при температура, не по-висока от 50 °C и в поток инертен газ (3.11) с ротационния изпарител (4.5). Количествено се прехвърля остатъка, като се използва хлороформ (3.2) или смес бензол/ацетонитрил (3.6) в 10 ml градуирана епруветка (4.10). Концентрира се разтворът в поток от инертен газ (3.11) и след това се наглася обемът до 2 ml с хлороформ (3.2) или смес бензол/ацетонитрил (3.6).

5.4. *Тънкослойна хроматография*

Капва се върху ТСХ блюдото (4.8) на 2 cm от долния ръб и на разстояния от 2 cm обемите стандартен разтвор и екстракт, посочени по-долу:

— 10, 15, 20, 30 и 40 μg от стандартния разтвор на афлатоксин B_1 (3.16);

— 10 μg от екстракта, получен в 5.3, и на същото място отгоре 20 μg от стандартния разтвор (3.16);

— 10 и 20 μg от екстракта, получен в 5.3.

Проявява се хроматограмата на тъмно с един от проявителите разтвори (3.18). Изборът на разтворител трябва да е направен предварително чрез нанасяне на 25 μg от качествения стандартен разтвор (3.17) върху блюдото и след проверка дали афлатоксин B_1 и B_2 са напълно разделени един от друг.

Оставят се разтворителите да се изпарят на тъмно и след това се облъчва с ултравиолетова светлина, като се поставя блюдото на 10 cm от лампата (4.9). Петната афлатоксин B_1 дават синя флуоресценция.

5.5. *Количествени определения*

Определя се или визуално, или чрез флуороденситометрия, както е посочено по-долу.

5.5.1. Визуални измервания

Определя се количеството афлатоксин B_1 в екстракта, като се сравни интензитета на флуоресценция на петната с екстракт с този на петната със стандартен разтвор и се намира на кое съответства. Интерполира се, ако се налага. Флуоресценцията, получена чрез наслагване на екстракта върху стандартния разтвор, трябва да е по-интензивна от тази на 10 μg екстракта и трябва да има не повече от едно видимо петно. Ако интензитетът на флуоресценция, дадена от 10 μg екстракта, е по-голям от този на 40 μg стандартен разтвор, екстрактът се разрежда 10 или 100 пъти с хлороформ (3.2) или смес бензол/ацетонитрил (3.6), преди да се подложи отново на тънкослойна хроматография.

5.5.2. Измерване чрез флуороденситометрия

Измерва се интензитетът на флуоресценция на петната афлатоксин B_1 с флуороденситометъра (4.12) при дължина на вълната на възбуждане 365 nm и дължина на вълната на излъчване 443 nm. Определя се количеството афлатоксин B_1 в петната екстракт чрез сравняване на интензитета на флуоресценцията им с този на петната стандартен афлатоксин B_1.

5.6. *Потвърждаване идентичността на афлатоксин B_1*

Потвърждава се идентичността на афлатоксин B_1 в екстракта, както е посочено по-долу.

5.6.1. Обработка със сярна киселина

Напръсква се със сярна киселина (3.13) върху хроматограмата, получена в 5.4. Флуоресценцията на петната афлатоксин B_1 трябва да се превърне от синя в жълта при ултравиолетово облъчване.

5.6.2. Двудименсионална хроматография, свързана с образуване на афлатоксин B_1-полуацетал (афлатоксин B_{2a})

NB Описаните по-долу операции трябва да се извършват, като се спазва точно схемата на фигура 3.

5.6.2.1. Нанасяне на разтворите

Маркират се две прави линии върху блюдото (4.8), успоредни на две съседни страни (на 6 cm от всяка страна), за да се ограничи миграцията на фронтовете разтворител. Капват се следните разтвори върху блюдото с капилярни пипети или микроспринцовки:

— върху точка A: обем от пречистен екстракт от пробата, получен в 5.3, съдържащ около 2,5 nm афлатоксин B1;

— върху точки B и C: 25 µg от стандартния разтвор (3.16).

5.6.2.2. Проявяване

Проявява се хроматограмата в направление I на тъмно, като се използва проявителят разтворител (3.18.1) (1 cm слой в ненаситена вана), докато фронтът на разтворителя стигне до ограничителната линия разтворител.

Изважда се блюдото от ваната и се оставя да изсъхне на тъмно при стайна температура в продължение на пет минути. След това се напръсква със сярна киселина (3.12) по дължината на ивица 2,5 cm височина, покривайки точки A и B (показани със защрихованата площ на фиг. 3), докато потъмнее, като се защити останалата част от блюдото със стъкло. Оставя се да взаимодейства 10 минути на тъмно и се изсушава в поток от въздух при стайна температура.

След това се проявява хроматограмата в направление II на тъмно, като се използва проявителят разтвор (3.18.1) (1 cm слой в ненаситена вана), докато фронтът на разтворителя достигне ограничителната линия разтворител. Изважда се блюдото от ваната и се оставя да изсъхне при стайна температура.

5.6.2.3 Интерпретация на хроматограмите

Изследва се хроматограмата под ултравиолетова светлина (4.9) и се проверява за следните характеристики:

а) Поява на синьо флуоресцентно петно от афлатоксин B_1 с източник стандартния разтвор, нанесен във B (миграция в направление I).

б) Поява на синьо флуоресцентно петно на нереагирал (със солната киселина) афлатоксин B_1 и по-интензивно синьо флуоресцентно петно на афлатоксин B_1-полуацетал, като и двете са с източник стандартния разтвор, нанесен в B (миграция в направление II).

в) Поява на петна, отговарящи на тези, описани в буква б), с източник екстракта от пробата, нанесен в A. Положението на тези петна се определя първо чрез миграционното отстояние на афлатоксин B1 от точка A в направление I (същото, като изминатото от стандарта, нанесен във B) и след това чрез миграционните отстояния от там в направление II на афлатоксин B1-полуацетала (същите като тези, изминати от стандарта, нанесен в Б). Интензитетите на флуоресценция на петната полуацетал с източник екстракта и от стандарта, нанесен в Б трябва да съвпадат.

6. **Изчисляване на резултатите**

6.1. *От визуалните изпервания*

Съдържанието в микрограмове на kg проба (PPB) се определя по формулата:

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

където:

Y и X са съответно обемите в микролитри на стандартния разтвор на (3.16) и на екстракта, който има подобна интензивност на флуоресценция;

S = концентрацията в микрограми на афлатоксин B_1 на милилитър в стандартния разтвор на (3.16);

V крайния обем на екстракта в микролитри, който отчита всеки разтвор, който е бил необходим;

Wтеглото в грамове на пробата, която съответства на обема на екстракта, подложен на колонно почистване.

6.2. *От флуороденситометричните изпервания*

Съдържанието афлатоксин B_1 в микрограмове на kg проба (PPB) се дава по формулата

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

където:

Y = обемът в микролитри на екстракта, който е напръскан по блюдото (10 ml или 20 ml);

S = количество в нанограми на афлатоксин B_1 на петното от екстракт (пропорционално на взетата стойност Y), получено от измерванията;

V = крайния обем на екстракта в микролитри, който отчита всеки разтвор, който е бил необходим;

W = теглото в грамове на пробата, която съответства на обема на екстракта, подложен на колонно почистване.

7. **Приготвяне и анализ на стандартен разтвор (3.16)**

7.1. *Определяне на концентрацията афлатоксин B_1*

Приготвя се стандартен разтвор на афлатоксин B_1 в хлороформ (3.2) или в смес бензол/ацетонитрил (3.6) с концентрация 8 до 10 µg/ml. Определя се абсорбционния спектър между 330 и 370 nm с помощта на спектрофотометър (4.11).

Измерва се оптичната плътност (A) при 363 nm за хлороформен разтвор или при 348 nm за разтвора бензол/ацетонитрил.

Изчислява се концентрацията в микрограмове афлатоксин B_1 на 1 ml разтвор по следната формула:

$\frac{312 \cdot A \cdot 1000}{20600}$ за хлороформен разтвор;

$\frac{312 \cdot A \cdot 1000}{19800}$ за разтвора на смес бензол/ацетонитрил.

Разрежда се според необходимостта, далеч от дневна светлина, за да се получи работен стандартен разтвор с концентрация афлатоксин B_1 приблизително 0,1 µg/ml. Когато се държи в хладилник при 4 °C, този разтвор е стабилен две седмици.

7.2. *Проверка на хроматографска чистота*

Капва се върху блюдо (4.8) 5 µl от стандартния разтвор афлатоксин B_1, съдържащ от 8 до 10 µg/ml (7.1). Проявява се хроматограмата, както е посочено в 5.4. В ултравиолетова светлина хроматограмата трябва да показва само едно петно и в първоначалната зона на нанасяне не трябва да се забелязва никаква флуоресценция.

8. **Повторяемост**

Разликата между резултатите на две паралелни определения, извършени с една и съща проба от един и същ аналитик, не трябва да бъдат повече от:

— 25 % по отношение най-високия резултат за съдържания афлатоксин B_1 от 10 и до 20 µg/kg;

— 5 µg, в абсолютна стойност, за съдържания по-големи от 20 и до 50 µg/kg;

— 10 % по отношение най-високата стойност за съдържания над 50 µg/kg.

9. **Възпроизводимост**

Виж „Наблюдения“, част B, точка 2

Б. ДВУДИЗМЕРНА ТЪНКОСЛОЙНА ХРОМАТОГРАФИЯ

1. **Цел и обхват**

Този метод позволява определяне количеството афлатоксин B_1 в храни за животни, които не попадат в обхвата на метод А. Долната граница на определение е 0,01 μg/kg (10 ppb). Методът е неприложим към храни, съдържащи пулп от цитрусови плодове.

2. **Принцип**

Пробата се подлага на екстрахиране с хлороформ. Екстрактът се филтрува, взима се аликвотна част и се пречиства чрез колонна хроматография върху силикагел. Извлекът се изпарява и остатъкът се разтваря повторно в определен обем хлороформ, или смес от бензол и ацетонитрил. Аликвотна част от този разтвор се подлага на тънкослойна хроматография (ТСХ). Количеството афлатоксин B_1 се определя с ултравиолетово облъчване на хроматограмата или визуално, или чрез флуороденситометрия, чрез сравняване с познати количества стандартен афлатоксин B_1. Идентичността на екстрахирания от храната афлатоксин B_1 трябва да бъде потвърдена по посочената процедура.

3. **Реактиви**

NB Всички реактиви трябва да са с чистота за анализ A.R., освен когато е посочено друго.

3.1. Ацетон

3.2. Хлороформ, стабилизиран с 0,5 до 1,0 % 96 % етанол (о/о)

3.3. Нормален хексан

3.4. Метанол

3.5. Безводен диетилов етер, свободен от прекиси

3.6. Смес на бензол и ацетонитрил: 98/2 (о/о)

3.7. Смес на хлороформ (3.2) и метанол (3.4): 97/3 (о/о)

3.8. Силикагел, за колонна хроматография с размер на частиците 0,05—0,20 mm

3.9. Абсорбент памучна вата, предварително обезмаслена с хлороформ, или стъклена вълна

3.10. Натриев сулфат, безводен, на гранули

3.11. Инертен газ, например азот

3.12. 1N солна киселина

3.13. Кизелгур (хифлосуперсел), промит в киселина

3.14. Силикагел G-HR или равностоен на него, за ТСХ

3.15. Проявители разтворители

3.15.1. Диетилов етер (3.5) / метанол (3.4) / вода: 94/4.5/1.5 (о/о/о), наситена вана.

3.15.2. Хлороформ (3.2) / ацетон (3.1): 9/1 (о/о), ненаситена вана.

3.16. Стандартен разтвор с около 0,1 μg афлатоксин B_1 на милилитър в хлороформ (3.2) или смес бензин/ацетонитрил (3.6), приготвен и проверен, както е посочено в точка 7 от метод А.

4. **Апаратура**

Виж точка 4 от метод А.

5. **Процедура**

5.1. *Приготвяне на пробата*
5.2. *Екстрахиране*
5.3. *Колонно очистване*
} виж точки 5.1, 5.2 и 5.3 от метод A

5.4. *Двуизмерна TCX*

5.4.1. Нанасяне на разтворите (да се спазва схемата от фиг.1)

Маркират се две прави линии върху едно блюдо (4.8), успоредни на две съседни страни (на 5 и 6 cm от всяка страна съответно), за да се ограничи миграцията на фронтовете на разтворителя. Капват се следните разтвори върху блюдото, като се използват капилярни пипети или микроспринцовки:

— върху точка A, 20 μg от пречистения екстракт от пробата, получен в 5.3;

— върху точка B, 20 μg от стандартния разтвор (3.16);

— върху точка C, 10 μg от стандартния разтвор (3.16)

— върху точка D, 20 μg от стандартния разтвор (3.16)

— върху точка E, 40 μg от стандартния разтвор (3.16)

Изсушава се в бавен поток въздух или инертен газ (3.11). Получените петна трябва да са с диаметър около 5 mm.

5.4.2. Проявяване (да се спазва схемата от фиг.1)

Проявява се хроматограмата в направление I на тъмно, като се използва проявителя разтворител (3.15.1) (1 cm слой в наситена вана), докато фронтът на разтворителя достигне ограничителната линия на разтворителя. Изважда се блюдото от ваната и се оставя да изсъхне на тъмно при стайна температура за 15 минути.

След това хроматограмата се проявява в направление II на тъмно, като се използва проявителя разтворител (3.15.2) (1 cm слой в ненаситена вана), докато фронтът на разтворителя достигне ограничителната линия на разтворителя. Изважда се блюдото от ваната и се оставя да изсъхне на тъмно при стайна температура.

5.4.3. Интерпретация на хроматограмите (да се спазва схемата на фиг.2)

Облъчва се хроматограмата с ултравиолетова светлина, като се постави блюдото на 10 cm от (4.9). Локализира се положението на сините флуоресцентни петна B, C и D и E на афлатоксин B_1 от стандартния разтвор. Прекарват се две въображаеми линии през тези петна и под прави ъгли към направленията на проявяване. Пресечницата P на тези линии е мястото, където се очаква да се открие петното афлатоксин B_1 с източник екстракта на пробата, нанесен в A (фиг. 1). Действителното местоположение на петното афлатоксин B_1 обаче може да бъде в точка Q в пресечницата на две въображаеми прави линии, образуващи ъгъл приблизително 100° между тях и преминаващи през петната B и C съответно. Определя се количеството афлатоксин B_1 в екстракта от пробата, както е посочено в 5.5.

5.4.4. Допълнителна хроматография

Маркират се две прави линии върху едно ново блюдо (4.8), успоредни на две съседни страни, както е посочено на схемата на фиг. 1, и върху точка A (виж фиг. 1) се нанасят 20 μg от пречистения екстрат от пробата, получен в 5.3, и върху тях — 20 μg от стандартния разтвор (3.16). Проявява се, както е посочено в 5.4.2. Облъчва се хроматограмата с ултравиолетова светлина (4.9) и се проверява дали:

— петната афлатоксин B_1 от екстракта и от стандартния разтвор са насложени едно върху друго,

— флуоресценцията на това петно е по-интензивна от тази на петното афлатоксин B_1, проявено в точка Q върху първото блюдо.

5.5. *Качествени определения*

Определя се или визуално, или чрез флуороденситометрия, както е посочено по-долу.

5.5.1. Визуални измервания

Определя се количеството афлатоксин B_1 в екстракта, като се сравнят интензитета на флуоресценция на петната с екстракт с този на петната C, D и E със стандартен разтвор и намерите на кое съответства. Интерполира се, ако се налага. Флуоресценцията, получена чрез наслагване на екстракта върху стандартния разтвор трябва да е по-интензивна от тази на 10 μg екстракта и трябва да има не повече

от едно видимо петно. Ако интензитетът на флуоресценция, дадена от 10 μg екстракта е по-голям от този на 40 μg стандартен разтвор, екстрактът се разрежда 10 или 100 пъти с хлороформ (3.2) или смес бензол/ацетонитрил (3.6), преди да се подложи отново на тънкослойна хроматография.

5.5.2. Измерване чрез флуороденситометрия

Измерва се интензитетът на флуоресценция на петната афлатоксин B_1 с флуороденситометъра (4.12) при дължина на вълната на възбуждане 365 nm и дължина на вълната на излъчване 443 nm.

Определя се количеството афлатоксин B_1 в петното екстракт, като се сравнява неговия интензитет на флуоресценция с този на петна C, D и E от стандартния разтвор.

5.6. *Потвърждаване идентичността на афлатоксин B1*

Виж точка 5.6 от метод A

6. **Изчисляване на резултатите**

Виж точка 6 от метод A

7. **Повтаряемост**

Виж точка 8 от метод A

8. **Възпроизводимост**

Виж „Наблюдения“, част B, точка 2

B. НАБЛЮДЕНИЯ ПО ОТНОШЕНИЕ МЕТОДИ А И Б

1. **Обезмасляване**

Проби, съдържащи повече от 5 % мазнини, трябва да бъдат обезмаслени с петролеев етер (т.к. 40—60 °C) след приготвянето им съгласно точка 5.1.

В такива случаи резултатите от анализа трябва да се изразят чрез теглото на необезмаслената проба.

2. **Възпроизводимост на резултатите**

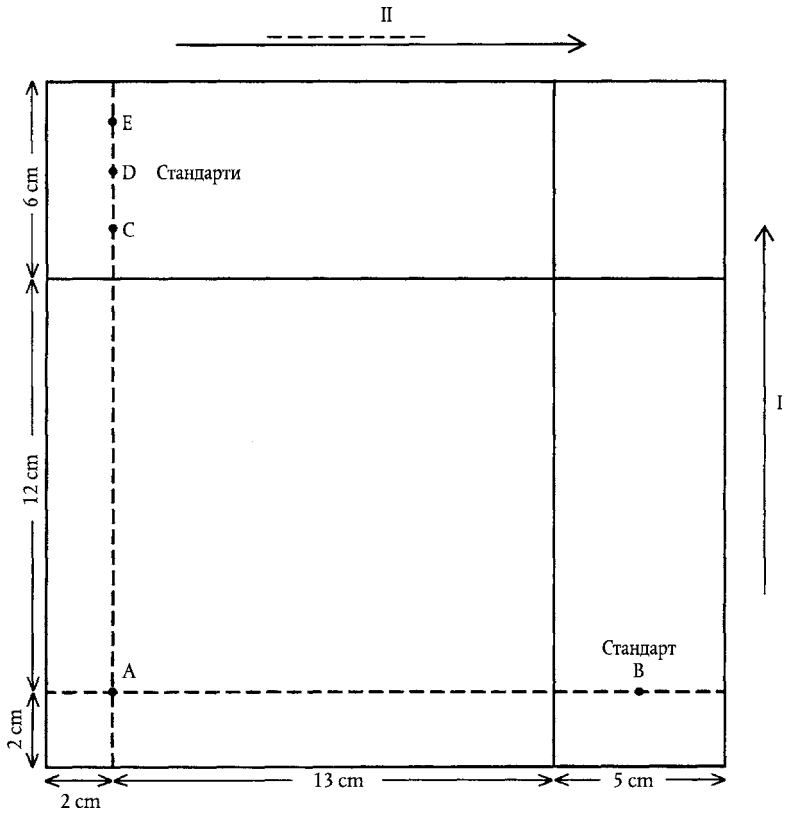
Възпроизводимостта на резултатите, т.е. разликите в резултатите, получени от две или повече лаборатории с една и съща проба, е била изчислена, както следва:

± 50 % от средната стойност за средни стойности афлатоксин B_1 от 10 и до 20 μg/kg;

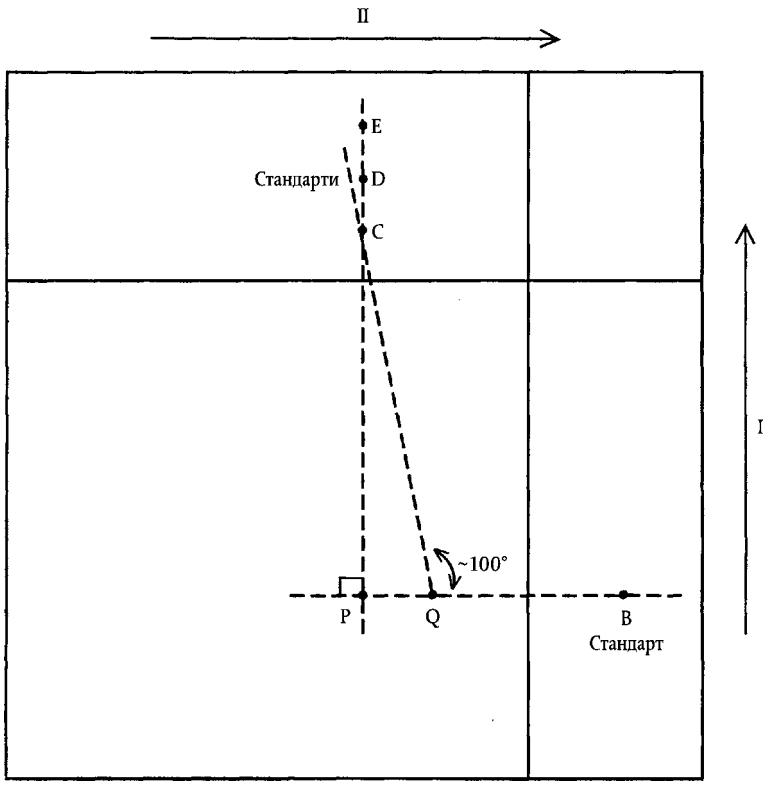
± 10 μg/kg върху средната стойност за средни стойности по-високи от 20 и до 50 μg/kg;

± 20 % средната стойност за средни стойности над 50 μg/kg.

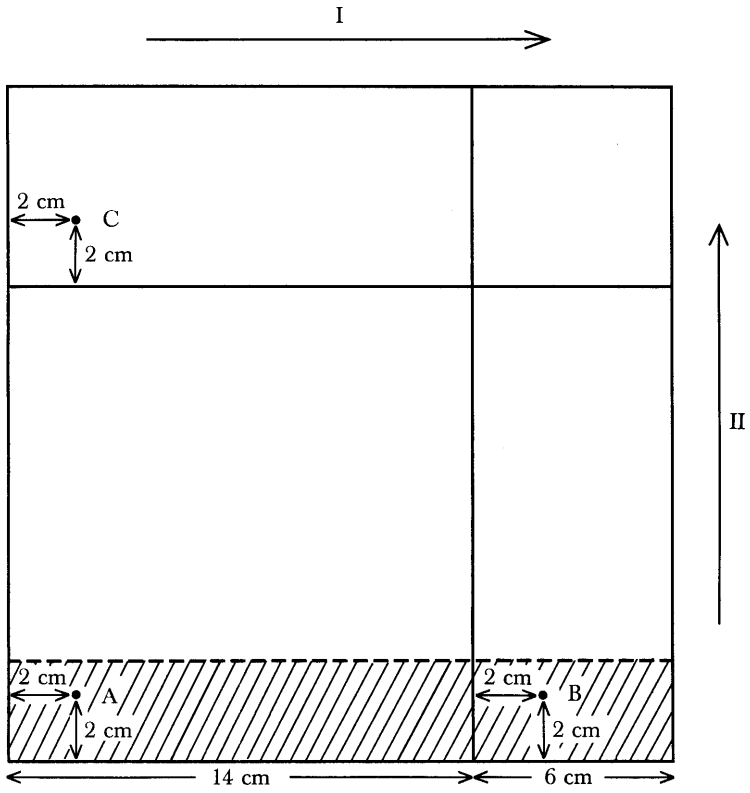
Допълнение към приложението



Фигура 1



Фигура 2



Фигура 3