31976L0372

A ȘAPTEA DIRECTIVĂ A COMISIEI din 1 martie 1976 de stabilire a metodelor comunitare de analiză pentru controlul oficial al furajelor

(76/372/CEE)

COMISIA COMUNITĂȚILOR EUROPENE,

având în vedere Tratatul de instituire a Comunității Economice Europene,

având în vedere Directiva Consiliului din 20 iulie 1970 cu privire la introducerea modalităților de prelevare a probelor și a metodelor comunitare de analiză pentru controlul oficial al furajelor ([1]), modificată ultima dată de actul de aderare ([2]), în special articolul 2,

întrucât prezenta directivă impune efectuarea controlului oficial al furajelor cu ajutorul modalităților de prelevare de probe și a metodelor comunitare de analiză în scopul verificării aducerii la îndeplinire a cerințelor care decurg din dispozițiilor stabilite prin lege, regulament sau acțiune administrativă privind calitatea și compoziția furajelor;

întrucât Directivele 71/250/CEE din 15 iunie 1971 ([3]), 71/393/CEE din 18 noiembrie 1971 ([4]), 72/199/CEE din 27 aprilie 1972 ([5]), 73/46/CEE din 5 decembrie 1972 ([6]), 74/203/CEE din 25 martie 1974 ([7]) și 75/84/CEE din 20 decembrie 1974 ale Comisiei ([8]) au stabilit deja un număr de metode comunitare de analiză; întrucât progresul înregistrat până acum recomandă adoptarea unui al șaptelea set de metode;

întrucât măsurile prevăzute în prezenta directivă sunt conforme cu avizul Comitetului permanent pentru furaje,

ADOPTĂ PREZENTA DIRECTIVĂ:

Articolul 1

Statele membre solicită ca analizele pentru controlul oficial al furajelor, referitoare la conținutul de aflatoxină B_1, să se efectueze în conformitate cu metodele descrise în anexa la prezenta directivă.

Dispozițiile generale stabilite în partea 1 (Introducere) a anexei la prima Directivă 71/250/CEE a Comisiei din 15 iunie 1971, cu excepția părții referitoare la prepararea probelor pentru analize, se aplică metodelor descrise în anexa la prezenta directivă.

Articolul 2

Statele membre pun în aplicare actele cu putere de lege și actele administrative necesare pentru a se conforma prezentei directive până la 1 octombrie 1976. Ele notifică de îndată Comisia cu privire la aceasta.

Articolul 3

Prezenta directivă se adresează statelor membre.

Adoptată la Bruxelles, 1 martie 1976.

Pentru Comisie

P. J. LARDINOIS

Membru al Comisiei

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

ANEXĂ

DETERMINAREA AFLATOXINEI B_1

A. METODA CROMATOGRAFIEI UNIDIMENSIONALE ÎN STRAT SUBȚIRE

1. **Obiectiv și domeniu de aplicare**

Această metodă permite determinarea nivelului de aflatoxină B_1 în următoarele furaje: turte cu ulei de arahide, copra, in, soia, susan, palmier babassu, porumb, precum și cereale și produse cerealiere, făină de mazăre, pulpă de cartofi și amidon. Limita inferioară a determinării este de 0,01 mg/kg (10 ppb).

Dacă prezența anumitor substanțe de interferență împiedică determinarea, este necesară reînceperea analizei folosind metoda B (cromatografia bidimensională în strat subțire).

2. **Principiu**

Proba este supusă extracției cu cloroform. Extractul este filtrat iar o parte alicotă este prelevată și purificată prin cromatografie în coloană, pe gel de siliciu. Eluatul este evaporat și reziduul redizolvat într-un volum specific de cloroform sau de amestec de benzen și acetonitril. O parte alicotă din soluție este supusă cromatografiei în strat subțire (TLC). Cantitatea de aflatoxină B_1 este determinată în urma iradierii cu UV a cromatogramei, fie vizual, fie prin fluorodensitometrie, prin comparație cu cantități cunoscute de aflatoxină B_1 standard. Identitatea aflatoxinei B_1 extrase din furaje trebuie confirmată prin procedura indicată.

3. **Reactivi**

NB: Toți reactivii trebuie să aibă calitatea de „reactiv analitic”, dacă nu este specificat altfel.

3.1. Acetonă.

3.2. Cloroform, stabilizat cu 0,5 până la 1,0 % etanol 96 % (v/v).

3.3. N-hexan.

3.4. Metanol.

3.5. Eter etilic anhidru, liber de peroxizi.

3.6. Amestec de benzen și acetonitril: 98/2 (v/v).

3.7. Amestec de cloroform (3.2) și metanol (3.4): 97/3 (v/v).

3.8. Gel de siliciu pentru cromatografie în coloană, dimensiunea particulelor 0,05 până la 0,20 mm.

3.9. Vată absorbantă degresată în prealabil cu cloroform sau vată de sticlă.

3.10. Sulfat de sodiu anhidru, granular.

3.11. Gaz inert, de exemplu azot.

3.12. Acid clorhidric 1 N.

3.13. Acid sulfuric 50 % (v/v).

3.14. Kieselguhr (hyflosupercel), spălat în acid.

3.15. Gel de siliciu G-HR sau un echivalent, pentru TLC.

3.16. Soluție standard cu aproximativ 0,1 µg/ml aflatoxină B_1 în cloroform (3.2) sau amestec de benzen/acetonitril (3.6), preparat și verificat conform indicațiilor din secțiunea 7.

3.17. Soluție standard pentru teste calitative, conținând aproximativ 0,1 µg/ml aflatoxină B_1 și B_2 în cloroform (3.2) sau amestec de benzen/acetonitril (3.6). Aceste concentrații sunt orientative. Ele se vor ajusta astfel încât să se obțină aceeași intensitate a fluorescenței pentru ambele aflatoxine.

3.18. Solvenți de developare:

3.18.1. Cloroform (3.2)/acetonă (3.1): 9/1 (v/v), rezervor nesaturat;

3.18.2. Eter etilic (3.5)/metanol (3.4)/apă: 96/3/1 (v/v/v), rezervor nesaturat;

3.18.3. Eter etilic (3.5)/metanol (3.4)/apă: 94/4,5/1,5 (v/v/v), rezervor saturat;

3.18.4. Cloroform (3.2)/metanol (3.4): 94/6 (v/v), rezervor saturat;

3.18.5. Cloroform (3.2)/metanol (3.4): 97/3 (v/v), rezervor saturat.

4. **Aparatură**

4.1. Mixer cu mecanism de mărunțire.

4.2. Agitator sau amestecător magnetic.

4.3. Hârtie de filtru plisată, Schleicher și Schüll nr. 588 sau un echivalent, diametru: 24 cm.

4.4. Tuburi cromatografice din sticlă (diametru intern: 22 mm, lungime: 300 mm), cu robinet PTFE și rezervor de 250 ml.

4.5. Evaporator rotativ cu vid, cu balon cu fund rotund de 500 ml.

4.6. Vase conice de 500 ml, cu dopuri din sticlă șlefuită.

4.7. Aparat TLC.

4.8. Plăci de sticlă pentru TLC, 200 × 200 mm, pregătite după cum urmează (cantitățile indicate sunt suficiente pentru a acoperi cinci plăci). Se pun 30 g gel de siliciu G-HR (3.15) într-un vas conic. Se adaugă 60 ml apă, se pune dopul și se agită timp de un minut. Se întinde suspensia pe plăci astfel încât să se obțină un strat uniform de 0,25 mm grosime. Se lasă să se usuce la aer și apoi se pune într-un desicator ce conține gel de siliciu. În momentul folosirii, plăcile se activează prin menținerea în cuptor la 110 °C timp de o oră.

Plăcile gata preparate sunt corespunzătoare dacă rezultatele obținute sunt similare cu cele obținute cu plăcile preparate după cum este indicat anterior.

4.9. Lampă UV cu lungimi mari de undă (360 nm). Intensitatea iradierii trebuie să permită distingerea clară a unui spot de 1 ng de aflatoxină B_1 pe o placă TLC, la o distanță de 10 cm de lampă.

4.10. Eprubete gradate de 10 ml prevăzute cu dopuri de polietilenă.

4.11. Spectrofotometru UV.

4.12. Fluorodensimetru (opțional).

5. **Procedură**

5.1. *Prepararea probei* (a se vedea „Observații”, partea C, punctul 1).

Se mărunțește proba astfel încât să poată trece în întregime printr-o sită cu ochi de 1 mm (în conformitate cu recomandarea ISO R 565).

5.2. *Extracția*

Se pun 50 g de probă mărunțită omogenizată într-un vas conic de 500 ml (4.6). Se adaugă 25 g de Kieselguhr (3.14), 25 ml apă și 250 ml cloroform (3.2). Se pune dopul, se agită sau se amestecă timp de 30 minute cu aparatul (4.2.) și se filtrează printr-o hârtie de filtru plisată (4.3). Se îndepărtează primii 10 ml ai filtratului și apoi se colectează 50 ml.

5.3. *Curățarea coloanei*

Se introduce un tampon de vată sau de vată de sticlă (3.9) la capătul inferior al tubului cromatografic (4.4), se umplu două treimi ale tubului cu cloroform (3.2) și se adaugă 5 g sulfat de sodiu (3.10).

Se verifică dacă suprafața superioară a stratului de sulfat de sodiu este netedă, apoi se adaugă 10 g gel de siliciu (3.8) în cantități mici. Se amestecă cu grijă după fiecare adăugare pentru a elimina bulele de aer. Se lasă deoparte timp de 15 minute, apoi se adaugă cu grijă 15 g de sulfat de sodiu (3.10). Se lasă lichidul să se scurgă până când ajunge chiar deasupra suprafeței superioare a stratului de sulfat de sodiu.

Se amestecă cei 50 ml de extract obținut la 5.2 cu 100 ml de n-hexan (3.3) și se transferă amestecul în coloană. Se lasă lichidul să se scurgă până când ajunge exact deasupra stratului superior de sulfat de sodiu. Se elimină soluția astfel obținută. Apoi se adaugă 100 ml eter etilic (3.5) și iar se lasă să se scurgă până la nivelul suprafeței superioare a stratului de sulfat de sodiu. În timpul acestor operații se urmărește ca debitul să fie de 8-12 ml pe minut și se evită uscarea coloanei. Se îndepărtează lichidul care se scurge. Apoi se eluează cu 150 ml din amestecul cloroform/metanol (3.7) și se colectează întregul eluat.

Acesta se evaporă aproape până la uscare la o temperatură care să nu depășească 50 °C, sub un curent de gaz inert (3.11), în evaporatorul rotativ (4.5). Se transferă reziduul, folosindu-se cloroform (3.2) sau amestec benzen/acetonitril (3.6), într-o eprubetă gradată de 10 ml (4.10). Se concentrează soluția sub un curent de gaz inert (3.11) și apoi se ajustează volumul până la 2 ml cu cloroform (3.2) sau cu amestec benzen/acetonitril (3.6).

5.4. *Cromatografia în strat subțire*

Se pun pe placa TLC (4.8), la 2 cm de marginea inferioară și la intervale de câte 2 cm, volumele din soluția standard și din extract indicate în continuare:

— 10, 15, 20, 30 și 40 µl din soluția standard de aflatoxină B_1 (3.16);

— 10 µl din extractul obținut la 5.3 și, *suprapus în același punct,* 20 µl din soluția standard (3.16);

— 10 și 20 µl din extractul obținut la 5.3.

Se developează cromatograma la întuneric folosind unul din solvenții de developare (3.18). Alegerea acestuia trebuie făcută în prealabil, prin depunerea a 25 µl din soluția standard calitativă (3.17) pe placă și verificarea separării complete la developare a aflatoxinelor B_1 și B_2.

Se lasă solvenții să se evapore la întuneric, apoi se iradiază cu UV, punându-se placa la 10 cm de lampă (4.9). Spoturile de aflatoxină B_1 dau o fluorescență albastră.

5.5. *Determinări cantitative*

Se realizează fie vizual, fie prin fluorodensitometrie, în conformitate cu indicațiile menționate în continuare.

5.5.1. Măsurători vizuale

Se determină cantitatea de aflatoxină B_1 din extract prin compararea intensității fluorescenței spoturilor de extract cu cea a spoturilor de soluție standard. Dacă este necesar se interpolează. Fluorescența obținută prin suprapunerea extractului pe soluția standard trebuie să fie mai intensă decât cea a 10 µl din extract și trebuie să existe mai mult de un spot vizibil. Dacă intensitatea fluorescenței dată de cei 10 µl de extract este mai mare decât cea dată de 40 µl de soluție standard, se diluează extractul de 10 sau 100 de ori cu cloroform (3.2) sau cu amestec benzen/acetonitril (3.6) înainte de a-l supune din nou cromatografiei în strat subțire.

5.5.2. Măsurători prin fluorodensitometrie

Se măsoară intensitatea fluorescenței spoturilor de aflatoxină B_1 cu ajutorul fluorodensitometrului (4.12) la o lungime de undă de sensibilizare de 365 nm și la o lungime de undă de emisie de 443 nm. Se determină cantitatea de aflatoxină B_1 din spoturile de extract prin compararea intensității fluorescenței lor cu cea a spoturilor de aflatoxină B_1 standard.

5.6. *Confirmarea identității aflatoxinei B_1*

Se confirmă identitatea aflatoxinei B_1 din extract prin procesele arătate în continuare.

5.6.1. Tratarea cu acid sulfuric

Se pulverizează acid sulfuric (3.13) pe cromatograma obținută la 5.4. Fluorescența spoturilor de aflatoxină B_1 trebuie să se schimbe din albastru în galben în urma iradierii cu UV.

5.6.2. Cromatografie bidimensională implicând formarea hemiacetalului de aflatoxină B_1 (aflatoxină B_{2a})

NB: Operațiile descrise în continuare trebuie efectuate urmărindu-se cu atenție diagrama din figura 3.

5.6.2.1. Aplicarea soluțiilor

Se trasează două linii drepte pe placa TLC (4.8), paralele cu cele două margini apropiate (la 6 cm de fiecare margine) pentru a limita migrarea fronturilor de solvent. Se pun pe placă spoturi din următoarele soluții folosindu-se pipete capilare sau microseringi:

— *în punctul A:* un volum din extractul de eșantion purificat obținut la 5.3, care conține aproximativ 2,5 nm de aflatoxină B_1;

— *în punctele B și C:* 25 µl din soluția standard (3.16).

5.6.2.2. Developare

Se developează cromatograma în direcția I, la întuneric, folosindu-se solvent de developare (3.18.1) (strat de 1 cm într-un rezervor nesaturat) până când frontul de solvent ajunge la linia de limitare a acestuia.

Se îndepărtează placa din rezervor și se lasă să se usuce la întuneric, la temperatura camerei, timp de 5 minute. Apoi se pulverizează acid clorhidric (3.12) de-a lungul unei benzi de 2,5 cm înălțime, acoperind, până la închiderea culorii, punctele A și B (indicate în figura 3 prin zona hașurată), protejând restul plăcii cu un strat de sticlă. Se lasă să reacționeze timp de 10 minute la întuneric și se usucă cu un curent de aer la temperatura camerei.

În continuare, se developează cromatograma în direcția II, la întuneric, folosindu-se solvent de developare (3.18.1) (strat de 1 cm într-un rezervor nesaturat) până când frontul de solvent ajunge la linia de limitare a acestuia. Se scoate placa din rezervor și se lasă la uscat la temperatura camerei.

5.6.2.3. Interpretarea cromatogramei

Se examinează cromatograma în lumină UV (4.9) și se verifică următoarele.

(a) Apariția unui spot fluorescent albastru de aflatoxină B_1, provenită din soluția standard aplicată în punctul C (migrare în direcția I).

(b) Apariția unui spot fluorescent albastru de aflatoxină B_1 care nu a reacționat (cu acidul clorhidric) și a unui spot fluorescent albastru mai intens de hemiacetal de aflatoxină B_1, ambele provenite din soluția standard aplicată în punctul B (migrare în direcția II).

(c) Apariția unor spoturi similare celor de la punctul (b), provenite din extractul de eșantion aplicat în punctul A. Poziția acestor spoturi se definește mai întâi prin distanța de migrare a aflatoxinei B_1 din punctul A în direcția I (aceeași cu distanța parcursă de soluția standard aplicată în punctul C, și apoi prin distanțele de migrare de acolo în direcția II a aflatoxinei B_1-hemiacetal (aceleași cu distanțele parcurse de soluția standard aplicată în punctul B. Intensitățile fluorescenței spoturilor de hemiacetal provenite din extract și din soluția standard aplicată în B trebuie să fie aceleași.

6. **Calcularea rezultatelor**

6.1. *Pe baza măsurătorilor vizuale*

Conținutul de aflatoxină B_1 în micrograme per kg de probă (ppb) este dat de formula:

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

unde:

Y și X reprezintă volumele în microlitri din soluția standard de aflatoxină B_1 (3.16), respectiv din extract, având o intensitate a fluorescenței similară;

S = concentrația în micrograme de aflatoxină B_1 pe ml de soluție standard (3.16);

V = volumul final de extract, în microlitri, care permite orice diluție necesară;

W = greutatea în grame a eșantionului, corespunzătoare volumului de extract supus procesului de curățare a coloanei.

6.2. *Pe baza măsurătorilor fluorodensimetrice*

Conținutul în micrograme de aflatoxină B_1 pe kg de eșantion este dat de formula:

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

unde:

Y = volumul, în microlitri, de extract aplicat pe placă (10 sau 20 µl);

S = cantitatea, în nanograme, de aflatoxină B_1 din spotul de extract (proporțională cu valoarea Y), obținută în urma măsurătorilor;

V = volumul final de extract, în microlitri, care permite orice diluție necesară;

W = greutatea, în grame, a eșantionului, corespunzătoare volumului de extract implicat în procesul de curățare a coloanei.

7. **Prepararea și testarea soluției standard (3.16)**

7.1. *Determinarea concentrației de aflatoxină* B_1

Se prepară o soluție standard de aflatoxină B_1 în cloroform (3.2) sau în amestec benzen/acetonitril (3.6), cu concentrația de 8-10 µg/ml. Se determină spectrul de absorbție între 330 și 370 nm cu ajutorul spectrofotometrului (4.11).

Se măsoară densitatea optică (A) la 363 nm în cazul soluției cu cloroform sau la 348 nm în cazul soluției din amestecul de benzen/acetonitril.

Se calculează concentrația în micrograme de aflatoxină B_1 pe ml de soluție din formulele menționate în continuare:

$\frac{312 \cdot A \cdot 1000}{20600}$ pentru soluția cu cloroform;

$\frac{312 \cdot A \cdot 1000}{19800}$ pentru soluția din amestecul de benzen/acetonitril.

Se diluează corespunzător, fără expunere la lumina soarelui, pentru a obține o soluție standard de lucru, cu concentrația de aflatoxină B_1 de aproximativ 0,1 µg/ml. Dacă se păstrează la frigider la 4 °C, această soluție rămâne stabilă timp de două săptămâni.

7.2. *Testarea purității cromatografice*

Se pun pe placa TLC (4.8) 5 µl din soluția standard de aflatoxină B_1, conținând 8-10 µg/ml (7.1). Se developează cromatograma conform indicațiilor de la 5.4. În lumină UV, cromatograma ar trebui să prezinte un singur spot, fără ca vreo fluorescență să fie detectabilă la nivelul zonei originale de depunere.

8. **Repetabilitate**

Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele efectuate pe aceeași probă, de către același analist, nu trebuie să depășească:

— 25 %, raportat la cel mai mare conținut de aflatoxină B_1, între 10 și 20 µg/kg;

— 5 µg, în valoare absolută, pentru un conținut de peste 20 și până la 50 µg/kg;

— 10 %, raportat la cea mai mare valoare pentru un conținut peste 50 µg/kg.

9. **Reproductibilitate**

A se vedea la „Observații”, partea C, punctul 2.

B. METODA CROMATOGRAFIEI BIDIMENSIONALE ÎN STRAT SUBȚIRE

1. **Obiectiv și domeniu de aplicare**

Metoda permite determinarea nivelului de aflatoxină B_1 în furaje care nu se încadrează în domeniul de aplicare al metodei A. Limita inferioară a determinării este 0,01 mg/kg (10 ppb). Metoda nu se aplică furajelor care conțin pulpă de citrice.

2. **Principiu**

Proba este supusă extracției cu cloroform. Extractul este filtrat și o parte alicotă este prelevată și purificată prin cromatografie în coloană, pe gel de siliciu. Eluatul este evaporat, iar reziduul este redizolvat într-un volum specific de cloroform sau într-un amestec de benzen și acetonitril. O parte alicotă din această soluție este supusă cromatografiei bidimensionale în strat subțire (TLC). Cantitatea de aflatoxină B_1 este determinată, în urma iradierii cu UV a cromatogramei, fie vizual, fie prin fluorodensitometrie, prin compararea cu cantități cunoscute de aflatoxină B_1 standard. Identitatea aflatoxinei B_1 extrasă din furaje trebuie confirmată prin procedura indicată.

3. **Reactivi**

NB: Toți reactivii trebuie să aibă calitatea de „reactiv analitic”, dacă nu este specificat altfel.

3.1. Acetonă.

3.2. Cloroform, stabilizat cu 0,5 până la 1 % etanol 96 % (v/v).

3.3. N-hexan.

3.4. Metanol.

3.5. Eter etilic anhidru, liber de peroxizi.

3.6. Amestec de benzen și acetonitril: 98/2 (v/v).

3.7. Amestec de cloroform (3.2) și metanol (3.4): 97/3 (v/v).

3.8. Gel de siliciu pentru cromatografie în coloană, dimensiunea particulelor 0,05-0,20 mm.

3.9. Vată absorbantă degresată în prealabil cu cloroform sau vată de sticlă.

3.10. Sulfat de sodiu anhidru, granular.

3.11. Gaz inert, de exemplu azot.

3.12. Acid clorhidric 1 N.

3.13. Kieselguhr (hyflosupercel), spălat în acid.

3.14. Gel de siliciu G-HR sau echivalent, pentru TLC.

3.15. Solvenți de developare.

3.15.1. Eter etilic (3.5)/metanol (3.4)/apă: 94/4,5/1,5 (v/v/v), rezervor saturat.

3.15.2. Cloroform (3.2)/acetonă (3.1): 9/1 (v/v), rezervor nesaturat.

3.16. Soluție standard cu aproximativ 0,1 µg/ml aflatoxină B_1 în cloroform (3.2) sau în amestec de benzen/acetonitril (3.6), preparat și verificat conform indicațiilor de la punctul 7 din metoda A.

4. **Aparatură**

A se vedea punctul 4 din metoda A.

5. **Procedură**

5.1. *Prepararea probei*
5.2. *Extracția*
5.3. *Curățarea coloanei*
} A se vedea punctele 5.1, 5.2 și 5.3 din metoda A.

5.4. *Cromatografie bidimensională în strat subțire*

5.4.1. Aplicarea soluțiilor (se respectă diagrama din figura 1)

Se trasează pe placă (4.8) două linii drepte, paralele prin cele două margini apropiate (la 5, respectiv 6 cm de la fiecare margine), pentru a limita migrarea fronturilor de solvenți. Se pun următoarele soluții pe placă, folosind pipete capilare sau microseringi:

— *în punctul A,* 20 µl din extractul de eșantion purificat obținut la 5.3;

— *în punctul B,* 20 µl din soluția standard (3.16);

— *în punctul C,* 10 µl din soluția standard (3.16);

— *în punctul D,* 20 µl din soluția standard (3.16);

— *în punctul E,* 40 µl din soluția standard (3.16).

Se usucă într-un curent ușor de aer sau de gaz inert (3.11). Spoturile obținute trebuie să aibă un diametru de aproximativ 5 mm.

5.4.2. Developarea (se respectă diagrama din figura 1)

Se developează cromatograma în direcția I, la întuneric, folosind solventul de developare (3.15.1) (strat de 1 cm într-un rezervor saturat) până când frontul de solvent ajunge la linia de limitare a acestuia. Se scoate placa din rezervor și se lasă să se usuce la întuneric la temperatura camerei timp de 15 minute.

Apoi se developează cromatograma în direcția II, la întuneric, folosind solventul de developare (3.15.2) (strat de 1 cm într-un rezervor nesaturat) până când frontul de solvent ajunge la linia de limitare a acestuia. Se scoate placa din rezervor și se lasă să se usuce la întuneric la temperatura camerei.

5.4.3. Interpretarea cromatogramei (se respectă diagrama din figura 2)

Se iradiază cromatograma cu radiații UV, poziționându-se placa la 10 cm de lampă (4.9). Se localizează poziția spoturilor fluorescente albastre B, C, D și E de aflatoxină B_1 din soluția standard. Se trasează două linii imaginare care trec prin aceste spoturi și în unghi drept față de direcțiile de developare. Intersecția P a acestor linii reprezintă locul în care se estimează să se găsească spotul de aflatoxină B_1 provenit din extractul de eșantion aplicat în punctul A (figura 1). Totuși, localizarea reală a spotului de aflatoxină B_1 poate fi în punctul Q la intersecția a două linii drepte imaginare care formează un unghi de aproximativ 100° între ele și care trec prin spoturile B, respectiv C. Se determină cantitatea de aflatoxină B_1 din extractul de eșantion conform indicațiilor de la 5.5.

5.4.4. Cromatografie suplimentară

Se trasează două linii drepte pe o placă nouă (4.8), paralele cu cele două margini apropiate conform indicațiilor din diagrama din figura 1 și se aplică în punctul A (a se vedea figura 1) 20 µl din extractul de eșantion purificat obținut la 5.3 și, peste acesta, 20 µl din soluția standard (3.16). Se developează conform indicațiilor de la 5.4.2. Se iradiază cromatograma cu radiații UV (4.9) și se verifică dacă:

— spoturile de aflatoxină B_1 din extract și din soluția standard se suprapun;

— fluorescența acestui spot este mai intensă decât cea a spotului de aflatoxină B_1 developat în punctul Q de pe prima placă.

5.5 *Determinări cantitative*

Se realizează fie vizual, fie prin fluorodensitometrie, conform indicațiilor menționate în continuare.

5.5.1. Măsurători vizuale

Se determină cantitatea de aflatoxină B_1 din extract prin compararea intensității fluorescenței spotului de extract cu cea a spoturilor de soluție standard C, D și E. Dacă este necesar se interpolează. Dacă intensitatea fluorescenței dată de cei 20 µl de extract este mai mare decât cea dată de 40 µl de soluție standard, se diluează

extractul de 10 sau 100 de ori cu cloroform (3.2) sau cu amestec benzen/acetonitril (3.6) înainte de a-l supune din nou cromatografiei în strat subțire.

5.5.2. Măsurători prin fluorodensitometrie

Se măsoară intensitatea fluorescenței spoturilor de aflatoxină B_1 cu ajutorul fluorodensitometrului (4.12) la o lungime de undă de sensibilizare de 365 nm și la o lungime de undă de emisie de 443 nm.

Se determină cantitatea de aflatoxină B_1 din spotul de extract prin compararea intensității fluorescenței acestuia cu cea a spoturilor de soluție standard din punctele C, D și E.

5.6. *Confirmarea identității aflatoxinei B_1*

A se vedea punctul 5.6 din metoda A.

6. **Calcularea rezultatelor**

A se vedea punctul 6 din metoda A.

7. **Repetabilitatea**

A se vedea punctul 8 din metoda A.

8. **Reproductibilitate**

A se vedea „Observații”, partea C, punctul 2.

C. OBSERVAȚII PRIVIND METODELE A ȘI B

1. **Degresare**

Probele care conțin mai mult de 5 % grăsimi trebuie degresate cu eter de petrol (bp 40 până la 60 °C) după prepararea descrisă la punctul 5.1.

În asemenea cazuri, rezultatele analitice sunt exprimate sub forma greutății probei nedegresate.

2. **Reproductibilitatea rezultatelor**

Reproductibilitatea rezultatelor, adică variațiile între rezultatele obținute de către două sau mai multe laboratoare pe același eșantion este estimată astfel:

± 50 % din valoarea medie, pentru valori medii de aflatoxină B_1 între 10 și 20 μg/kg;

± 10 μg/kg din valoarea medie, pentru valori medii între 20 și 50 μg/kg;

± 20 % din valoarea medie, pentru valori medii peste 50 μg/kg.

Apendice la anexă

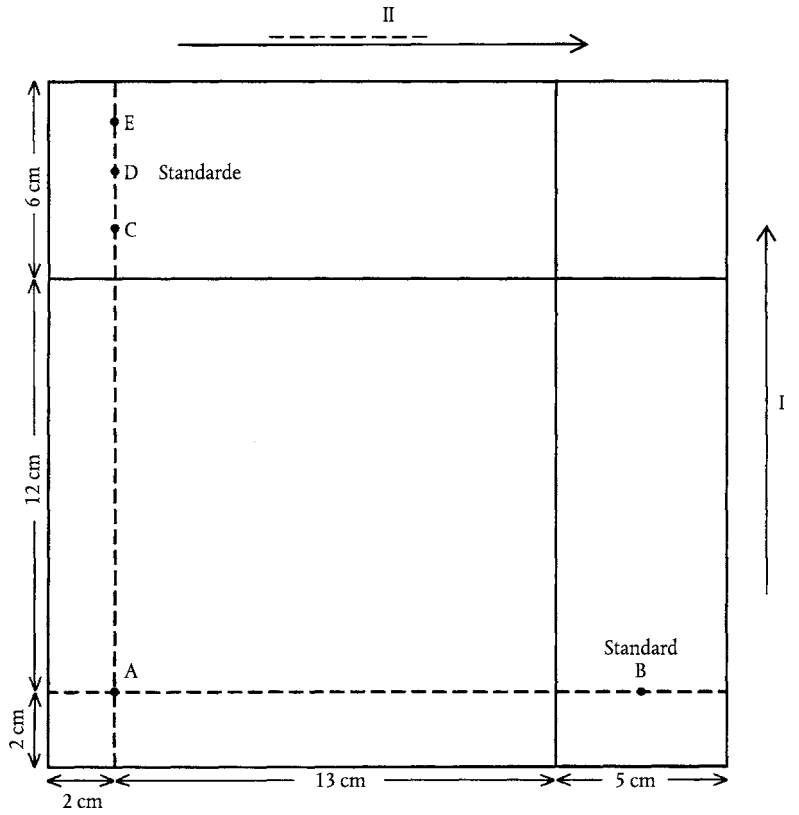


Figura 1

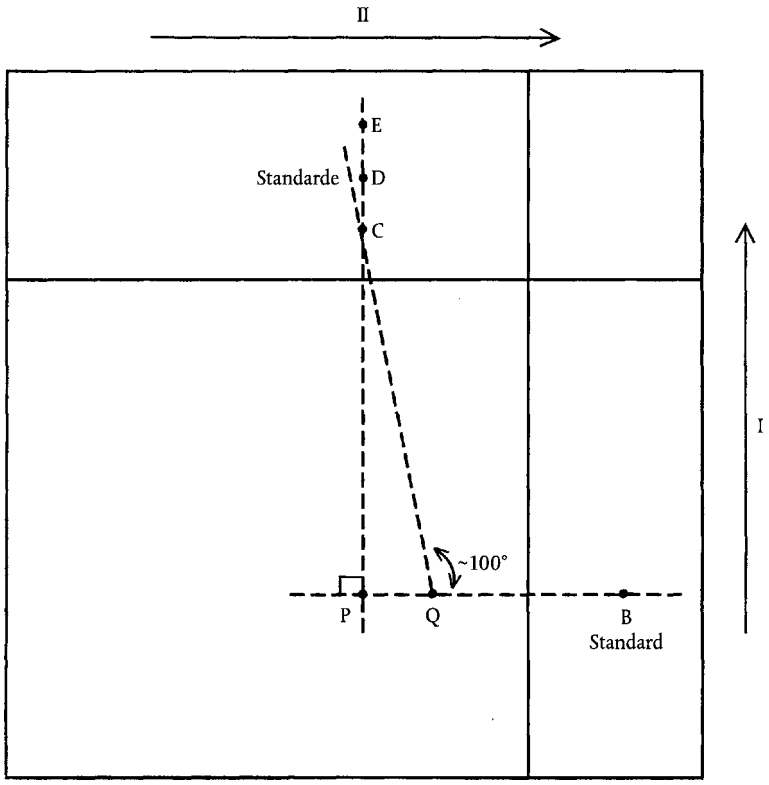


Figura 2

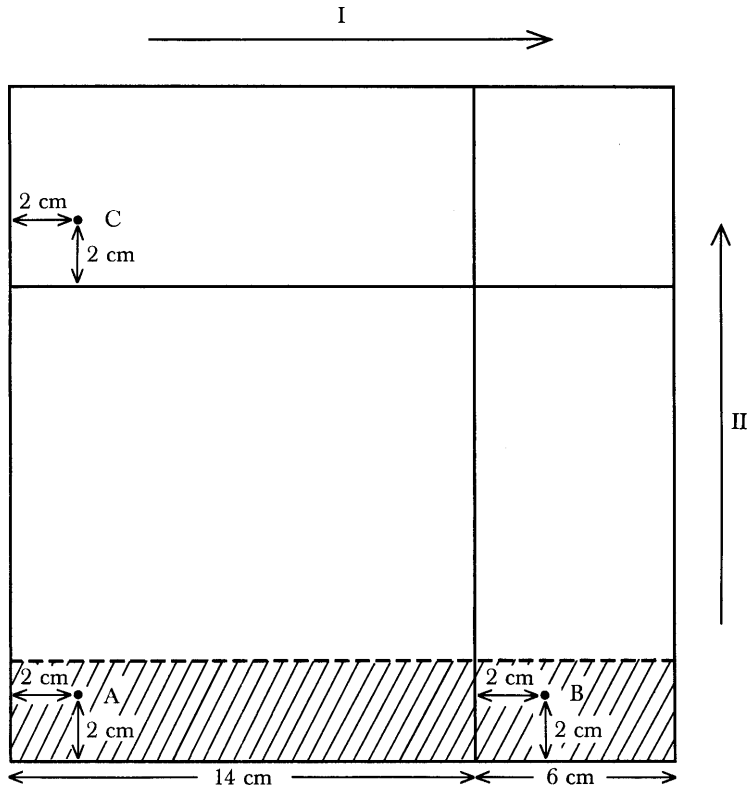


Figura 3