

СЕДМА ДИРЕКТИВА НА КОМИСИЯТА

от 1 март 1976 година

за установяване на методи на Общността за анализ за 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 Директива на Съвета от 20 юли 1970 г. за въвеждане на методи на Общността за взимане на проби и анализ за официалния контрол на храните за животни ¹, последно изменена с Акта за присъединяване ² и по-специално член 2 от него,

като има предвид, че директивата 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 закони, подзакони или административни 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

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.

Държавите-членки изискват анализът за официалния контрол на храните за животни по отношение на тяхното съдържание на Афлатоксин В1 да се извършва в съответствие с методите, описани в приложението към настоящата директива.

Общите разпоредби, посочени в част I (Въведение) на 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 не по-късно от 1 октомври 1976 г. въвеждат в сила законовите, подзаконови или административни разпоредби, необходими за да се съобразят с настоящата директива. Те уведомят незабавно 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

ПРИЛОЖЕНИЕ

ОПРЕДЕЛЯНЕ НА АФЛАТОКСИН В1

А. МЕТОД НА ЕДНОИЗМЕРНА ТЪНКОСЛОЙНА ХРОМАТОГРАФИЯ

1. Цел и обхват

Този метод позволява определяне на количеството Афлатоксин В1 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 В1 се определя с ултравиолетово облъчване на хроматограмата визуално или чрез флуороденситометрия, чрез сравняване с познати количества стандартен Афлатоксин В1. Идентичността на екстрахирания от храната Афлатоксин В1 трябва да бъде потвърдена по посочената процедура.

3. РЕАКТИВИ

Забележка: всички реактиви трябва да са с чистота за анализ A.R., освен когато е посочено друго.

3.1. Ацетон

3.2. Хлороформ, стабилизирани с 0.5 до 1.0% 96% етанол (o/o)

3.3. Нормален хексан

3.4. Метанол

3.5. Безводен диетилов етер, свободен от прекиси

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

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

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

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

3.10. Натриев сулфат, безводен, на гранули

3.11. Инертен газ, напр. азот

3.12. 1N солна киселина

3.13. 50% (o/o) сярна киселина

3.14. Кизелгур (хиплосуперсел), промит в киселина

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

3.16. Стандартен разтвор с около 0*1 mlg Афлатоксин В1 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*1mlg Афлатоксин В1 и В2 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 (o/o), ненаситена вана

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

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

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

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

4. АПАРАТУРА

4.1. Мелница-миксер

4.2. Апарат за бълникане /шейкър/ или магнитна бъркалка

4.3. Нагъната филтърна хартия, Schleicher and Schuell N 588, или равностойна, диаметър: 24 см

4.4. Стъклена тръба за хроматография /вътрешен диаметър: 22 мм, дължина: 300 мм/ с кран и 250 ml резервоар.

4.5. Ротационен вакуум изпарител, с 500 ml облодънна колба

4.6. 500 ml конусни колби със стъклени запушалки с шлиф

4.7. Апарат за ТСХ

4.8. Стъклени блюда за ТСЛ, 200x200 мм, приготвени както следва /посочените количества са достатъчни за пет блюда/. Поставете 30 г силикагел G-HR (3.15) в конусна колба. Добевете 60 ml вода, запушете и бълникайте една минута. Разстелете суспензията върху блюдата така, че да се получи равномерен слой с дебелина 0*25мм. Оставете да изсъхне на въздух и след това в ексикатор със силикагел. В момента на ползване активирайте блюдата, като ги държите 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 нм/. Интензитетът на облъчване трябва да позволява петно 1 нг Афлатоксин В1 да може ясно да се разграничава върху ТСХ блюдото на разстояние 10 см от лампата.

4.10. 10 ml градуирани епруветки с полиетиленови запушалки.

4.11. Ултравиолетов спектрофотометър

4.12. Флуороденситометър /по избор/

5. ПРОЦЕДУРА

5.1. Приготвяне на пробата /вж. при „Наблюдения”, част В, точка 1/
Смелете пробата така, че цялата да преминава през сито меш 1 мм /съгласно препоръка ISO R 565/.

5.2. Екстрахиране

Поставя се 50 г смляна, хомогенизирана проба в 500 ml конусна колба (4.6). Добавя се 25 г 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 нагънатата филтърна хартия (4.3). Изхвърлят се първите 10 ml от филтратата и после се събират 50 ml.

5.3. Колонно почистване

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

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

Смесва се 50 ml екстракт, събран в (5.2) с 100 ml нормален хексан (3.3) и сместа се прехвърля количествено в колоната. Изчакава се течността да спадне точно до над горната повърхност на слоя натриев сулфат. Изхвърлят се тези промивни води. След това се добавя 100ml диетилов етер (3.5) и отново се изчакава да спадне до над горната повърхност на слоя натриев сулфат. При тези операции се следи дебитът да е 8 до 12 ml в минута и колоната да не изсъхва. Изхвърля се течността, която изтича. След това се елуира с 150ml 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 (3.3649411) 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 см от долния ръб и на разстояния от 2 см обемите стандартен разтвор и екстракт, посочени по-долу:

- 10, 15, 20, 30 и 40 mlg от стандартния разтвор на Афлатоксин В1 (3.16);
- 10 mlg от екстракта, получен в 5.3 и на същото място отгоре 20 mlg от стандартния разтвор (3.16);
- 10 и 20 mlg 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 mlg от качествения стандартен разтвор (3.17) върху блюдото и след проверка дали Афлатоксин В1 и В2 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 см от лампата (4.9). Петната Афлатоксин В1 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 В1 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 mlg екстракта и трябва да има не повече от едно видимо петно. Ако интензитетът на флуоресценция, дадена от 10 mlg екстракта е по-голям от този на 40 mlg 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 В1 с флуороденситометъра (4.12) при дължина на вълната на възбуждане 365 нм и дължина на вълната на излъчване 443 нм. Определя се количеството Афлатоксин В1 в петната екстракт чрез сравняване на интензитета на флуоресценцията им с този на петната стандартен Афлатоксин В1.

5.6. ПОТВЪРЖДАВАНЕ ИДЕНТИЧНОСТТА НА АФЛАТОКСИН В1

Потвърждава се идентичността на Афлатоксин В1 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 В1 трябва да се превърне от синя в жълта при ултравиолетово облъчване.

5.6.2. Двудименсионална хроматография, свързана с образуване на Афлатоксин В1-полуацетал (Афлатоксин В2А)

Забележка: 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 см от всяка страна), за да се ограничи миграцията на фронтите разтворител. Капват се следните разтвори върху блюдото с капилярни пипети или микроспринцовки:

- върху точка А: обем от пречистен екстракт от пробата, получен в 5.3, съдържащ около 2*5 нм Афлатоксин В1;
- върху точки В и С: 25 mlg от стандартния разтвор (3.16).

5.6.2.2. ПРОЯВЯВАНЕ

Проявява се хроматограмата в направление I на тъмно, като се използва проявителя разтворител (3.18.1) (1 см 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*5см височина, покривайки точки А и В (показани със заштрихованата площ на фиг.3), докато потъмнее, като се защити останалата част от блюдото със стъкло. Остава 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 проявителя разтвор (3.18.1) (1 см 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 В1, с източник стандартния разтвор, нанесен във В (миграция в направление I).

б) Поява на синьо флуоресцентно петно на нереагирал /с/с солната киселина/ Афлатоксин В1 и по-интензивно синьо флуоресцентно петно на Афлатоксин В1-полуацетал, като и двете са с източник стандартния разтвор, нанесен в В (миграция в направление II).

в) Поява на петна, отговарящи на тези, описани в б), с източник екстракта от пробата, нанесен в А. Положението на тези петна се определя първо чрез миграционното отстояние на Афлатоксин В1 от точка А в направление I/ същото, като изминатото от стандарта, нанесен във В и след това чрез миграционните отстояния от там в направление II на Афлатоксин В1-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 измервания

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

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

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 В1 на милилитър в стандартния разтвор на (3.16);

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.

6.2. От флуороденситометричните измервания

Съдържанието Афлатоксин В1 в микрограмове на kg проба (PPB) се дава по формулата

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

където:

- Y = обемът в микролитри на екстракта, който е напръскан по блюдото (10 ml или 20 ml);
- S = количество в нанограми на афлатоксин В₁, 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 В1

Приготвя се стандартен разтвор на Афлатоксин В1 в хлороформ (3.2) или в смес бензол/ацетонитрил (3.6) с концентрация 8 до 10 mlg/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 В1 на 1 ml разтвор по следната формула

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

$$\frac{312 \times A \times 1000}{19800} \text{ да разтвора на смес бензол/ацетонитрил}$$

Разрежда се според необходимостта, далеч от дневна светлина, за да се получи работен стандартен разтвор с концентрация Афлатоксин В1 приблизително 0*1 mlg/ml. Когато се държи в хладилник при 4C, този разтвор е стабилен две седмици.

7.2. ПРОВЕРКА НА ХРОМАТОГРАФСКА ЧИСТОТА

Капва се върху блюдо (4.8) 5 mlg от стандартния разтвор Афлатоксин В₁, съдържащ от 8 до 10 mlg/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. ПОВТАРЯЕМОСТ

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 В1 от 10 и до 20 mg/kg;
- 5 mg , в абсолютна стойност, за съдържания по-големи от 20 и до 50 mg/kg;
- 10% по отношение най-високата стойност за съдържания над 50 mg/kg

9. ВЪЗПРОИЗВОДИМОСТ

Вж. под „Наблюдения”, част В, точка 2

Б.ДВУДИЗМЕРНА ТЪНКОСЛОЙНА ХРОМАТОГРАФИЯ

1. Цел и обхват

Този метод позволява определяне количеството Афлатоксин В1 в храни за животни, които не попадат в обхвата на метод А. Долната граница на определение е 0.01 mg/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 В1 се определя с ултравиолетово облъчване на хроматограмата или визуално, или чрез флуороденситометрия, чрез сравняване с познати количества стандартен Афлатоксин В1. Идентичността на екстрахирания от храната Афлатоксин В1 трябва да бъде потвърдена по посочената процедура.

3. Реактиви

Забележка: всички реактиви трябва да са с чистота за анализ A.R., освен когато е посочено друго.

3.1. Ацетон

3.2. Хлороформ, стабилизирани с 0.5 до 1.0% 96% етанол (o/o)

3.3. Нормален хексан

3.4. Метанол

3.5. Безводен диетилов етер, свободен от перекиси

- 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*20мм
- 3.9. Абсорбент памучна вата, предварително обезмаслена с хлороформ, или стъклена вълна
- 3.10. Натриев сулфат, безводен, на гранули
- 3.11. Инертен газ, напр. азот
- 3.12. 1N солна киселина
- 3.13. Кизелгур (хифлосуперсел), промит в киселина
- 3.14. Силикагел G-HR или равностоеен 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 mlg Афлатоксин В1 на милилитър в хлороформ (3.2) или смес бензин/ацетонитрил (3.6), приготвен и проверен както е посочено в точка 7 на метод А.

4. Апаратура

Вж. в точка 4 на метод А.

5. ПРОЦЕДУРА

5.1. Приготвяне на пробата -вж. точки 5.1,5.2 и 5.3 на метод А

5.2. Екстрахиране

5.3. Колонно почистване

5.4. Двумерна ТСХ

5.4.1. Нанасяне на разтворите /да се спазва схемата на фиг.1/

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

- върху точка А, 20 mlg от пречистения екстракт от пробата, получен в 5.3;
- върху точка Б, 20 mlg от стандартния разтвор (3.16);
- върху точка В, 10 mlg от стандартния разтвор (3.16)
- върху точка Г, 20 mlg от стандартния разтвор (3.16)
- върху точка Д, 40 mlg от стандартния разтвор (3.16)

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

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 см 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 см 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 см от (4.9). Локализира се положението на сините флуоресцентни петна Б, В и Г и Д на Афлатоксин В1 от стандартния разтвор. Прекарват се две въображаеми линии през тези петна и под прави ъгли към направленията на проявяване. Пресchnittа II на тези линии е мястото, където се очаква да се открие петното Афлатоксин В1 с източник екстракта на пробата, нанесен в А /фиг.1/. Действителното местоположение на петното Афлатоксин В, обаче може да бъде в точка Р в пресечницата на две въображаеми прави линии, образуващи ъгъл приблизително 100° между тях и преминаващи през петната Б и В съответно. Определя се количеството Афлатоксин В1 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 А /вж. фиг.1/ се нанасят 20 mlg от пречистения екстракт от пробата, получен в 5.3 и върху тях - 20 mlg 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 В1 от екстракта и от стандартния разтвор са насложени едно върху друго;

- флуоресценцията на това петно е по-интензивна от тази на петното Афлатоксин В1, проявено в точка Р 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 В1 в екстракта като се сравнят интензитета на флуоресценция на петната с екстракт с този на петната В, Г и Д 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 mlg екстракта и трябва да има не повече от едно видимо петно. Ако интензитетът на флуоресценция, дадена от 10 mlg екстракта е по-голям от този на 40 mlg 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 В1 с флуороденситометъра (4.12) при дължина на вълната на възбуждане 365 nm и дължина на вълната на излъчване 443nm.

Определя се количеството Афлатоксин В1 в петното екстракт, като се сравнява неговия интензитет на флуоресценция с този на петна В, Г и Д от стандартния разтвор.

5.6. ПОТВЪРЖДАВАНЕ ИДЕНТИЧНОСТТА НА АФЛАТОКСИН В1

Вж. точка 5.6 от метод А

6. ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Вж. точка 6 от метод А

7. ПОВТАРЯЕМОСТ

Вж. точка 8 от метод А

8. ВЪЗПРОИЗВОДИМОСТ

Вж. „Наблюдения”, част В, точка 2

В. 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 до 60 °C/ след приготвянето им по 5.1.

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

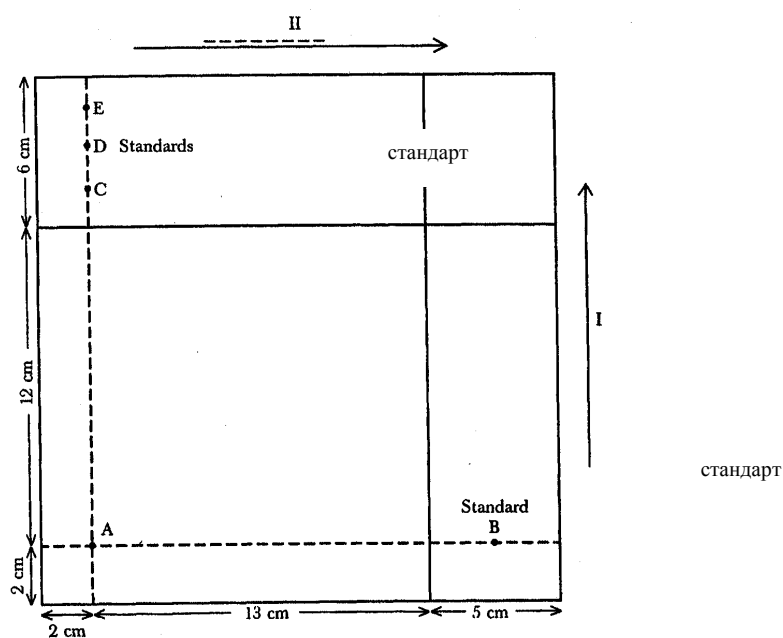
2. ВЪЗПРОИЗВОДИМОСТ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Възпроизводимостта на резултатите, т.е. разликите в резултатите, получени от две или повече лаборатории с една и съща проба, е била изчислена както следва: плюс-минус 50% от средната стойност за средни стойности Афлатоксин В1 от 10 и до 20 mlg/kg;

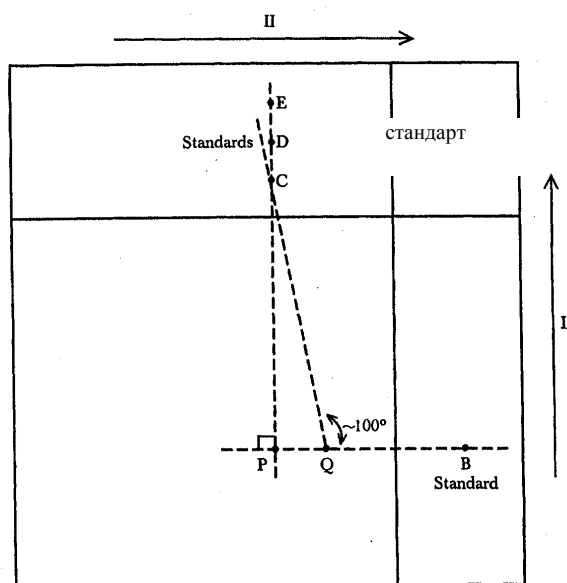
плюс-минус 10 mlg/kg върху средната стойност за средни стойности по-високи от 20 и до 50 mlg/kg;

плюс-минус 20% средната стойност за средни стойности над 50 mlg/kg

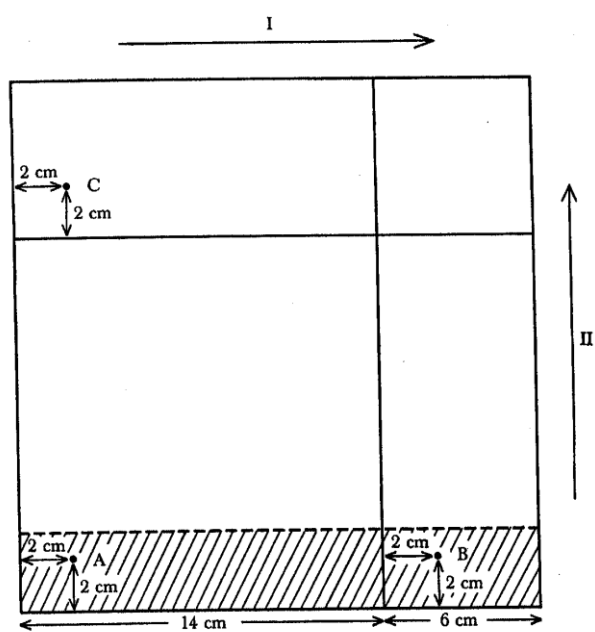
ДОПЪЛНЕНИЕ КЪМ ПРИЛОЖЕНИЕТО



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3