

31976L0372

L 102/8

ÚŘEDNÍ VĚSTNÍK EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ

15.4.1976

**SEDMÁ SMĚRNICE KOMISE**  
**ze dne 1. března 1976,**  
**kterou se stanoví analytické metody Společenství pro úřední kontrolu krmiv**  
(76/372/EHS)

KOMISE EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ,

s ohledem na Smlouvu o založení Evropského hospodářského společenství,

s ohledem na směrnici Rady ze dne 20. července 1970 o zavedení metod odběru vzorků a analytických metod Společenství pro úřední kontrolu krmiv<sup>(1)</sup>, naposledy pozměněnou aktem o přistoupení<sup>(2)</sup>, a zejména na článek 2 uvedené směrnice,

vzhledem k tomu, že uvedená směrnice stanoví, že úřední kontroly krmiv, jejichž cílem je ověřit dodržování požadavků stanovených právními a správními předpisy a týkajících se jakosti a složení krmiv, se provádějí podle metod odběru vzorků a analytických metod Společenství;

vzhledem k tomu, že směrnice Komise 71/250/EHS ze dne 15. července 1971<sup>(3)</sup>, 71/393/EHS ze dne 18. listopadu 1971<sup>(4)</sup>, 72/199/EHS ze dne 27. dubna 1972<sup>(5)</sup>, 73/46/EHS ze dne 5. prosince 1972<sup>(6)</sup>, 74/203/EHS ze dne 25. března 1974<sup>(7)</sup> a 75/84/EHS ze dne 20. prosince 1974<sup>(8)</sup> již stanovily řadu analytických metod Společenství; že s ohledem na stav doposud provedených prací je však nutné stanovit sedmou sérii analytických metod;

vzhledem k tomu, že opatření této směrnice jsou v souladu se stanoviskem Stálého výboru pro krmiva,

PŘIJALA TUTO SMĚRNICI:

*Článek 1*

Členské státy stanoví, že analýzy pro úřední kontroly krmiv, pokud jde o obsah aflatoxinu B<sub>1</sub>, se provádějí podle metod popsaných v příloze této směrnice.

Obecná ustanovení uvedená v části 1 (úvod) přílohy první směrnice Komise 71/250/EHS ze dne 15. července 1971, s výjimkou části týkající se přípravy vzorku k analýze, se použijí pro metody popsané v příloze této směrnice.

*Článek 2*

Členské státy uvedou v účinnost právní a správní předpisy nezbytné pro dosažení souladu s touto směrnicí nejpozději do 1. října 1976. Neprodleně o nich informují Komisi.

*Článek 3*

Tato směrnice je určena členskými státy.

V Bruselu dne 1. března 1976.

Za Komisi

P. J. LARDINOIS

člen Komise

<sup>(1)</sup> Úř. věst. L 170, 3.8.1971, s. 2.

<sup>(2)</sup> Úř. věst. L 73, 27.3.1971, s. 14.

<sup>(3)</sup> Úř. věst. L 155, 12.7.1971, s. 13.

<sup>(4)</sup> Úř. věst. L 279, 20.12.1971, s. 7.

<sup>(5)</sup> Úř. věst. L 123, 29.5.1972, s. 6.

<sup>(6)</sup> Úř. věst. L 83, 30.3.1973, s. 21.

<sup>(7)</sup> Úř. věst. L 108, 22.4.1974, s. 7.

<sup>(8)</sup> Úř. věst. L 32, 5.2.1975, s. 26.

## PŘÍLOHA

STANOVENÍ AFLATOXINU B<sub>1</sub>

## A. METODA JEDNOROZMĚRNÉ TENKOVRSŤVÉ CHROMATOGRRAFIE

## 1. Účel a rozsah

Tato metoda umožňuje stanovit obsah aflatoxinu B<sub>1</sub> v těchto krmivech: podzemnice olejná, kopra, lněná semena, sója, sezam, babassu palma a kukuřičné klíčky, obiloviny a výrobky z obilovin, hrachová mouka, bramborová pulpa a škrob. Spodní hranice pro stanovení je 0,01 mg/kg (10 ppb).

Pokud jsou přítomny rušivé látky, které ztěžují stanovení, je nutné opakovat analýzu podle metody B (dvourozměrná tenkovrstvá chromatografie).

## 2. Princip

Vzorek se extrahuje chloroformem. Extrakt se filtruje a jeho alikvotní část se odebere a přečistí kolonovou chromatografií na silikagelu. Eluát se odpaří a reziduum se rozpustí ve stanoveném objemu chloroformu nebo ve směsi benzenu a acetonitrilu. Alikvotní část tohoto roztoku se podrobí tenkovrstvé chromatografii. Množství aflatoxinu B<sub>1</sub> se stanoví z chromatogramu pod UV světlem buď vizuálně nebo fluorimetricky srovnáním se známými množstvími standardu aflatoxinu B<sub>1</sub>. Identita aflatoxinu B<sub>1</sub> extrahovaného z krmiv musí být potvrzena stanoveným postupem.

## 3. Činidla

*Poznámka:* Pokud není stanoveno jinak, všechna činidla musí být čistoty „p. a“.

- 3.1 Aceton.
- 3.2 Chloroform stabilizovaný 0,5 až 1,0 procentem 96 % (V/V) ethanolu.
- 3.3 N-hexan.
- 3.4 Methanol.
- 3.5 Diethylether, bezvodý, neobsahující peroxidy.
- 3.6 Směs benzenu a acetonitrilu: 98/2 (V/V).
- 3.7 Směs chloroformu (3.2) a methanolu (3.4): 97/3 (V/V).
- 3.8 Silikagel pro kolonovou chromatografii, velikost částic 0,05 až 0,20 mm.
- 3.9 Absorbent – vata, předem odtučněná chloroformem, nebo skelná vata.
- 3.10 Síran sodný, bezvodý, granulovaný.
- 3.11 Inertní plyn, např. dusík.
- 3.12 Kyselina chlorovodíková 1 N.
- 3.13 50 % (V/V) kyselina sírová.
- 3.14 Křemelina (hyflosupercel), promytá kyselinou.
- 3.15 Silikagel G–HR nebo ekvivalent, pro tenkovrstvou chromatografii.
- 3.16 Standardní roztok obsahující asi 0,1 µg aflatoxinu B<sub>1</sub> na 1 ml chloroformu (3.2) nebo směsi benzenu a acetonitrilu (3.6), připravený a zkontrolovaný, jak je uvedeno v bodu 7.

- 3.17 Standardní roztok pro testování jakosti obsahující asi 0,1 µg aflatoxinu B<sub>1</sub> a B<sub>2</sub> na 1 ml chloroformu (3.2) nebo směsi benzenu a acetonitrilu (3.6). Tyto koncentrace jsou orientační. Musí být upraveny tak, aby se získala stejná intenzita fluorescence u obou aflatoxinů.
- 3.18 Vytvájecí rozpouštědla:
- 3.18.1 Chloroform (3.2)/aceton (3.1): 9/1 (V/V), chromatografický tank s nenasycenou atmosférou;
- 3.18.2 Diethylether (3.5)/methanol (3.4)/voda: 96/3/1 (V/V), chromatografický tank s nenasycenou atmosférou;
- 3.18.3 Diethylether (3.5)/methanol (3.4)/voda: 94/4.5/1.5 (V/V), chromatografický tank s nasycenou atmosférou;
- 3.18.4 Chloroform (3.2)/methanol (3.4): 94/6 (V/V), chromatografický tank s nasycenou atmosférou;
- 3.18.5 Chloroform (3.2)/methanol (3.4): 97/3 (V/V), chromatografický tank s nasycenou atmosférou.

#### 4. Přístroje

- 4.1 Drtič – mixer.
- 4.2 Třepačka nebo magnetická míchačka.
- 4.3 Skládané filtrační papíry, Schleicher a Schüll č. 588 nebo ekvivalentní, průměr 24 cm.
- 4.4 Skleněná chromatografická trubice (vnitřní průměr 22 mm, délka 300 mm) s teflonovým kohoutem a 250 µl zásobníkem.
- 4.5 Rotační vakuová odparka, s baňkou o objemu 500 ml a kulatým dnem.
- 4.6 Erlenmeyerovy baňky o objemu 500 ml, se zábrusovými zátkami.
- 4.7 Zařízení pro tenkovrstvou chromatografii.
- 4.8 Skleněné desky pro tenkovrstvou chromatografii, 200 x 200 mm, se připraví takto (uvedená množství stačí pro pět desek): dát 30 g silikagelu G-HR (3.15) do Erlenmeyerovy baňky, přidat 60 ml vody, zazátkovat a protřepávat 1 minutu. Rozprostřít suspenzi na desky takovým způsobem, aby se vytvořila stejnoměrná vrstva o tloušťce 0,25 mm. Nechat uschnout na vzduchu a poté uchovat v desikátoru obsahujícím silikagel. Před použitím aktivovat desky jednu hodinu v sušárně při 110 °C.
- Desky připravené k použití jsou vyhovující, pokud vykazují podobné výsledky jako desky připravené podle uvedeného postupu.
- 4.9 UV lampa dlouhovlnná (360 nm). Intenzita záření musí být dostatečná, aby skvrna 1 ng aflatoxinu B<sub>1</sub> na desce pro tenkovrstvou chromatografii byla na vzdálenost 10 cm od lampy ještě jasně rozeznatelná.
- 4.10 Odměrné zkumavky o objemu 10 ml, s polyethylenovými zátkami.
- 4.11 UV spektrofotometr.
- 4.12 Fluorimetr (volitelný).

#### 5. Postup

- 5.1 Příprava vzorku (viz „Poznámky“, část C bod 1)

Rozmělnit vzorek takovým způsobem, aby celý prošel sítím s oky o velikosti 1 mm (v souladu s doporučením ISO R 565).

- 5.2 Extrakce

Do Erlenmeyerovy baňky o objemu 500 ml dát 50 g rozemletého a homogenizovaného vzorku. Přidat 25 g křemeliny (3.14), 25 ml vody a 250 ml chloroformu (3.2). Zazátkovat, protřepávat nebo promíchat 30 minut třepačkou (4.2) a přefiltrovat přes skládaný filtrační papír (4.3). Odstranit prvních 10 ml filtrátu, poté sebrat 50 ml.

### 5.3 Přechišťení na koloně

Do spodní části chromatografické trubice (4.4) vložit zátku z vaty nebo ze skelné vaty (3.9), naplnit trubici se do dvou třetin chloroformem (3.2), a poté přidat 5 g síranu sodného (3.10).

Ověřit, že horní povrch vrstvy síranu sodného je zcela rovný, a poté přidat po malých dávkách 10 g silikagelu (3.8). Po každém přidání opatrně zamíchat, aby se odstranily vzduchové bubliny. Nechat 15 minut stát, a poté opatrně přidat 15 g síranu sodného (3.10). Nechat kapalinu klesnout až k hornímu povrchu vrstvy síranu sodného.

Smíchat 50 ml extraktu získaného podle bodu (5.2) se 100 ml n-hexanu (3.3) a směs kvantitativně přelit do kolony. Nechat kapalinu klesnout až k hornímu povrchu vrstvy síranu sodného. Přidat 100 ml diethyl-theru (3.5) a znovu nechat kapalinu klesnout až k hornímu povrchu vrstvy síranu sodného. Během tohoto postupu dbát na to, aby rychlost průtoku byla 8 až 12 ml za minutu a aby kolona nevyschla. Odstranit vytečenou kapalinu. Poté eluovat 150 ml směsí chloroformu a methanolu (3.7) a sebrat celý eluát.

Odpařit eluát do sucha pod proudem inertního plynu (3.11) v rotační vakuové odparce (4.5) při teplotě nižší než 50 °C. Reziduum kvantitativně převést za použití chloroformu (3.2) nebo směsí benzenu a acetonitrilu (3.6) do odměrné zkumavky o objemu 10 ml (4.10). Koncentrovat roztok pod proudem inertního plynu (3.11), a poté doplnit objem na 2 ml za použití chloroformu (3.2) nebo směsí benzenu a acetonitrilu (3.6).

### 5.4 Tenkovrstvá chromatografie

Na desku pro tenkovrstvou chromatografii (4.8) nanést 2 cm od spodní hrany a v odstupech po 2 cm tyto objemy standardních roztoků a extraktu:

- 10, 15, 20, 30 a 40 µl standardního roztoku aflatoxinu B<sub>1</sub> (3.16),
- 10 µl extraktu získaného podle bodu 5.3 a k tomu 20 µl standardního roztoku (3.16),
- 10 a 20 µl extraktu získaného podle bodu 5.3.

Chromatogram se vyvíjí ve tmě za použití jednoho z vyvíjecích rozpouštědel (3.18). Výběr rozpouštědla se musí provést předem nanesením 25 µl jakostního standardního roztoku (3.1) na desku a musí se ověřit, zda jsou aflatoxiny B<sub>1</sub> a B<sub>2</sub> při vyvíjení zcela odděleny.

Nechat rozpouštědla odpařit ve tmě a poté ozářit desku UV paprsky ze vzdálenosti 10 cm od lampy (4.9). Skvrny aflatoxinu B<sub>1</sub> modře fluoreskují.

### 5.5 Kvantitativní stanovení

Stanovení se provádí buď vizuálně nebo fluorimetricky podle těchto pokynů:

#### 5.5.1 Vizuální měření

Množství aflatoxinu B<sub>1</sub> v extraktu se stanoví porovnáním intenzity fluorescence skvrn extraktu s intenzitou fluorescence skvrn standardního roztoku. V případě potřeby se interpoluje. Fluorescence získaná překrytím extraktu přes standardní roztok musí být silnější než fluorescence 10 ml extraktu a nesmí být viditelná více než jedna skvrna. Pokud je intenzita fluorescence 10 µl extraktu silnější než intenzita fluorescence 40 µl standardního roztoku, rozředit extrakt 10 krát nebo 100 krát chloroformem (3.2) nebo směsí benzenu a acetonitrilu (3.6) a poté znovu podrobit tenkovrstvé chromatografii.

#### 5.5.2 Fluorimetrické měření

Intenzita fluorescence skvrn aflatoxinu B<sub>1</sub> se měří fluorimetrem (4.12) při excitační vlnové délce 365 nm a emisní délce 443 nm. Množství aflatoxinu B<sub>1</sub> ve skvrnách extraktu se stanoví porovnáním jejich intenzit fluorescence s intenzitami skvrn standardního roztoku aflatoxinu B<sub>1</sub>.

### 5.6 Potvrzení identity aflatoxinu B<sub>1</sub>

Potvrzení identity aflatoxinu B<sub>1</sub> v extraktu se provede takto:

## 5.6.1 Ošetření kyselinou sírovou

Na chromatogram získaný podle bodu 5.4 nastříkat kyselinu sírovou (3.13). Fluorescence skvrn aflatoxinu B<sub>1</sub> se musí pod UV zářením změnit z modré na žlutou.

5.6.2 Dvourozměrná chromatografie zahrnující tvorbu aflatoxinu B<sub>1</sub> - hemiacetalu (aflatoxin B<sub>2a</sub>)

*Poznámky:* Níže popsané pracovní postupy se musí provádět přesně podle schématu uvedeném na obrázku 3.

## 5.6.2.1 Nanesení roztoků

Narýsovat na desku (4.8) dvě přímký rovnoběžné se dvěma přilehlými stranami (6 cm od každé strany), určené k vymezení migrace čel rozpouštědel. Nanést na desku pomocí kapilárních pipet nebo injekčních mikrostříkaček tyto roztoky:

— v bodu A: objem vyčištěného extraktu vzorku získaného podle bodu 5.3, který obsahuje asi 2,5 nm aflatoxinu B<sub>1</sub>,

— v bodech B a C: 25 µl standardního roztoku (3.16).5.6.2.2 Vyvíjení

Chromatogram se vyvíjí za použití vyvíjecího rozpouštědla (3.18.1) [vrstva o tloušťce 1 cm v chromatografickém tanku s nenasycenou atmosférou] ve tmě ve směru I, dokud čelo rozpouštědla nedosáhne k vymezuující linii.

Vyjmout desku z tanku a nechat oschnout pět minut ve tmě a při pokojové teplotě. Poté stříkat kyselinu chlorovodíkovou (3.12) na pásek o šířce 2,5 cm, který pokrývá body A a B (na obrázku 3 vyznačeno šrafovaně), dokud pásek neztmavne, přičemž zbytek desky je chráněn skelným papírem. Nechat působit 10 minut ve tmě, a poté vysušit desku proudem vzduchu při pokojové teplotě.

Poté se chromatogram vyvíjí za použití vyvíjecího rozpouštědla (3.18.1) [vrstva o tloušťce 1 cm v chromatografickém tanku s nenasycenou atmosférou] ve tmě ve směru II, dokud čelo rozpouštědla nedosáhne k vymezuující linii. Vyjmout desku z chromatického tanku a nechat oschnout pět minut ve tmě a při pokojové teplotě.

## 5.6.2.3 Interpretace chromatogramu

Pozorovat chromatogram pod UV světlem (4.9) a ověřit tyto znaky:

- Objevení se modré fluoreskující skvrny aflatoxinu B<sub>1</sub> pocházející ze standardního roztoku naneseného v bodu C (migrace ve směru I).
- Objevení se modré fluoreskující skvrny aflatoxinu B<sub>1</sub> (který nereagoval s kyselinou chlorovodíkovou) a intenzivnější modré fluoreskující skvrny aflatoxinu B<sub>1</sub> - hemiacetalu, přičemž obě skvrny pocházejí ze standardního roztoku naneseného v bodu B (migrace ve směru II).
- Objevení se podobných skvrn, jaké jsou popsány v bodu b), pocházejících ze vzorku extraktu naneseného v bodu A. Poloha těchto skvrn vychází jednak z migrační vzdáleností aflatoxinu B<sub>1</sub> od bodu A ve směru I (stejná vzdálenost jako u standardního vzorku naneseného v bodu C) a dále migrační vzdálenost aflatoxinu B<sub>1</sub> - hemiacetalu od bodu A ve směru II (stejná vzdálenost jako u standardního vzorku naneseného v bodu B). Fluorescenční intenzity skvrn hemiacetalu pocházejících z extraktu a ze standardního vzorku naneseného v bodu B by si měly odpovídat.

## 6. Výpočet výsledků

## 6.1 Na základě vizuálních měření

Obsah aflatoxinu B<sub>1</sub> v mikrogramech na 1 kg vzorku (ppb) se vypočítá pomocí vzorce:

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

kde:

X a Y jsou příslušné objemy standardního roztoku aflatoxinu B<sub>1</sub> v mikrolitrech (3.16) a extraktu, který má stejnou intenzitu fluorescence;

S = koncentrace, v mikrogramech na 1 ml, aflatoxinu B<sub>1</sub> ve standardním roztoku (3.16);

$V$  = konečný objem extraktu v mikrolitrech, s ohledem na případná ředění;

$W$  = hmotnost zkušební vzorku v gramech, s ohledem na objem extraktu použitý pro pročištění na koloně.

#### 6.2 Na základě fluorimetrického měření

Obsah aflatoxinu  $B_1$  v mikrogramech na 1 kg vzorku (ppb) se vypočítá pomocí vzorce:

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

kde:

$Y$  = objem extraktu, v mikrolitrech, naneseného na desku (10  $\mu$ l nebo 20  $\mu$ l);

$S$  = množství aflatoxinu  $B_1$ , v nanogramech, ve skvrně extraktu (poměrně k použité hodnotě  $Y$ ) odvozené z měření;

$V$  = konečný objem extraktu v mikrolitrech, s ohledem na případná ředění;

$W$  = hmotnost zkušební vzorku v gramech, s ohledem na objem extraktu použitý pro pročištění na koloně.

### 7. Příprava a testování standardního roztoku (3.16)

#### 7.1 Stanovení koncentrace aflatoxinu $B_1$

Připravit standardní roztok aflatoxinu  $B_1$  v chloroformu (3.2) nebo směsi benzenu a acetonitrilu (3.6), jehož koncentrace je od 8 do 10  $\mu$ g/ml. Stanovit absorpční spektrum mezi 330 a 370 nm za použití spektrofotometru (4.11).

Změřit optickou hustotu ( $A$ ) při 363 nm v případě chloroformového roztoku nebo při 348 nm v případě roztoku směsi benzenu a acetonitrilu.

Vypočítat koncentraci aflatoxinu  $B_1$  v mikrogramech na 1 ml roztoku pomocí tohoto vzorce:

$$\frac{312 \cdot A \cdot 1\,000}{20\,600} \text{ pro chloroformový roztok;}$$

$$\frac{312 \cdot A \cdot 1\,000}{19\,800} \text{ pro roztok ve směsi benzenu a acetonitrilu.}$$

Ve tmě provést příslušná ředění s cílem získat standardní pracovní roztok, jehož koncentrace aflatoxinu  $B_1$  je asi 0,1  $\mu$ g/ml. Pokud se roztok skladuje v chladničce při 4 °C, je stálý po dobu dvou týdnů.

#### 7.2 Testování chromatografické čistoty

Nanést na desku (4.8) 5  $\mu$ l standardního roztoku obsahujícího 8 až 10  $\mu$ l aflatoxinu  $B_1$  na 1 ml (7.1). Vyvinout chromatogram, jak je uvedeno v bodu 5.4. Při UV světle by měla být viditelná pouze jedna skvrna a v místě původního nanesení by neměla být zřetelná žádná fluorescence.

### 8. Opakovatelnost

Rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení, které u jednoho vzorku provedl stejný analytik, nesmí překročit:

- 25 % nejvyššího výsledku pro obsahy aflatoxinu  $B_1$  od 10 do 20  $\mu$ g/kg,
- 5  $\mu$ g absolutní hodnoty pro obsahy od 20 do 50  $\mu$ g/kg,
- 10 % nejvyššího výsledku pro obsahy vyšší než 50  $\mu$ g/kg.

### 9. Reprodukovatelnost

Viz „Poznámky“, část C bod 2.

## B. METODA DVOUROZMĚRNÉ TENKOVrstVÉ CHROMATOGRAFIE

## 1. Účel a rozsah

Tato metoda umožňuje stanovit obsah aflatoxinu B<sub>1</sub> v krmivech, které nespádají do oblasti působnosti metody A. Spodní hranice pro stanovení je 0,01 mg/kg (10 ppb). Tato metoda se nepoužije pro krmiva obsahující citrusovou pulpu.

## 2. Princip

Vzorek se extrahuje chloroformem. Extrakt se filtruje a jeho alikvotní část se odebere a přečistí kolonovou chromatografií na silikagelu. Eluát se odpaří a residuum se rozpustí ve stanoveném objemu chloroformu nebo ve směsi benzenu a acetonitrilu. Alikvotní část tohoto roztoku se podrobí dvojrozměrné tenkovrstvé chromatografii. Množství aflatoxinu B<sub>1</sub> se stanoví z chromatogramu pod UV světlem buď vizuálně nebo flourometricky srovnáním se známým množstvím standardního aflatoxinu B<sub>1</sub>. Identita aflatoxinu B<sub>1</sub> extrahovaného z krmiv musí být potvrzena stanoveným postupem.

## 3. Činidla

*Poznámka:* Pokud není stanoveno jinak, všechna činidla musí být čistoty „p.a“.

- 3.1 Aceton.
- 3.2 Chloroform stabilizovaný 0,5 - 1,0 procentem 96 % (V/V) ethanolu.
- 3.3 N-hexan.
- 3.4 Methanol.
- 3.5 Diethylether, bezvodý, neobsahující peroxidy.
- 3.6 Směs benzenu a acetonitrilu: 98/2 (V/V).
- 3.7 Směs chloroformu (3.2) a methanolu (3.4): 97/3 (V/V).
- 3.8 Silikagel pro kolonovou chromatografii, velikost částic 0,05 až 0,20 mm.
- 3.9 Absorbent – vata, předem odtučněná chloroformem, nebo skelná vata.
- 3.10 Síran sodný, bezvodý, granulovaný.
- 3.11 Inertní plyn, např. dusík.
- 3.12 Kyselina chlorovodíková 1 N.
- 3.13 Křemelina (hyflosuperpel) promytá kyselinou.
- 3.14 Silikagel G-HR nebo ekvivalent, pro tenkovrstvou chromatografii.
- 3.15 Vytvájecí roztoky.
  - 3.15.1 Diethylether (3.5)/methanol (3.4)/voda 94/4,5/1,5 (V/V), chromatografický tank s nenasycenou atmosférou.
  - 3.15.2 Chloroform (2.3)/aceton (3.1): 9/1 (V/V), chromatografický tank s nenasycenou atmosférou.
- 3.16 Standardní roztok obsahující asi 0,1 µg aflatoxinu B<sub>1</sub> na 1 ml chloroformu (3.2) nebo směsi benzenu a acetonitrilu (3.6), připravený a kontrolovaný jak je uvedeno v bodu 7 metody A.

## 4. Přístroje

Viz bod 4 metody A.

5. **Postup**

- |     |                             |   |                                   |
|-----|-----------------------------|---|-----------------------------------|
| 5.1 | <i>Příprava vzorku</i>      | } | viz body 5.1, 5.2 a 3.5 metody A. |
| 5.2 | <i>Extrakce</i>             |   |                                   |
| 5.3 | <i>Pročištění na koloně</i> |   |                                   |

5.4 *Dvourozměrná tenkovrstvá chromatografie*

## 5.4.1 Nanesení roztoků (podle schématu na obrázku 1)

Narýsovat na desku (4.8) dvě přímky rovnoběžné se dvěma přilehlými stranami (6 cm od každé strany), určené k vymezení migrace čel rozpouštědel. Nanést na desku pomocí kapilárních pipet nebo injekčních mikrostříkaček tyto roztoky:

- v bodu A: 20 µl vyčištěného extraktu vzorku získaného podle bodu 5.3;
- v bodu B: 20 µl standardního roztoku (3.16),
- v bodu C: 10 µl standardního roztoku (3.16),
- v bodu D: 20 µl standardního roztoku (3.16),
- v bodu E: 40 µl standardního roztoku (3.16).

Vysušit slabým proudem vzduchu nebo inertního plynu (3.11). Získané skvrny musí mít průměr asi 5 mm.

## 5.4.2 Vyvíjení (podle schématu na obrázku 1)

Chromatogramem se vyvíjí za použití vyvíjecího rozpouštědla (3.15.1) [vrstva o tloušťce 1 cm v chromatografickém tanku s nasycenou atmosférou] ve tmě ve směru I, dokud čelo rozpouštědla nedosáhne k vymezuující linii. Vymout desku z chromatografického tanku a nechat oschnout 15 minut ve tmě a při pokojové teplotě.

Poté se chromatogram vyvíjí za použití vyvíjecího rozpouštědla (3.15.1) [vrstva o tloušťce 1 cm v chromatografickém tanku s nenasycenou atmosférou] ve tmě ve směru II, dokud čelo rozpouštědla nedosáhne k vymezuující linii. Vymout desku z chromatografického tanku a nechat oschnout ve tmě a při pokojové teplotě.

## 5.4.3 Interpretace chromatogramu (podle schématu na obrázku 1)

Ozářit chromatogram UV světlem, přičemž se deska umístí do vzdálenosti 10 cm od lampy (4.9). Určit polohu modrých fluoreskujících skvrn aflatoxinu B<sub>1</sub> ze standardního roztoku B, C, D a E. Načrtnout dvě pomyslné přímky, které procházejí těmito skvrnami a svírají pravý úhel s vyvíjecími směry. Průsečík P těchto přímek určuje místo, kde lze očekávat skvrnu aflatoxinu B<sub>1</sub> pocházející z extraktu vzorku naneseného v bodu A (obrázek 1). Skutečná poloha skvrny aflatoxinu B<sub>1</sub> však může být v bodu Q umístěném na průsečíku dvou pomyslných přímek svírajících úhel asi 100 stupňů a protínajících body B a C. Množství aflatoxinu B<sub>1</sub> v extraktu vzorku se stanoví, jak je uvedeno v bodu 5.5.

## 5.4.4 Doplňující chromatografie

Narýsovat na novou desku (4.8) dvě přímky rovnoběžné se dvěma přilehlými stranami, jak je uvedeno ve schématu na obrázku 1, a nanést na bod A (viz obrázek 1) 20 µl přečištěného extraktu vzorku, který byl získán podle bodu 5.3, a k tomu 20 µl standardního roztoku (3.16). Vyvíjet jak je uvedeno v bodu 5.4.2. Ozářit chromatogram UV světlem (4.9) a ověřit zda:

- se skvrny aflatoxinu B<sub>1</sub> z extraktu a ze standardního roztoku překrývají,
- fluorescence těchto skvrn je silnější než fluorescence skvrn aflatoxinu B<sub>1</sub>, která se vyvinula v bodu Q na první desce.

5.5 *Kvantitativní stanovení*

Stanovení se provádí buď vizuálně nebo flourometricky podle těchto pokynů:



- 5.5.1 Vizuální měření  
Množství aflatoxinu B<sub>1</sub> v extraktu se stanoví porovnáním intenzity fluorescence skvrn extraktu s intenzitou skvrn C, D a E standardního roztoku. V případě potřeby se interpoluje. Pokud je intenzita fluorescence 20 µl extraktu silnější než intenzita 40 µl standardního roztoku, zředit roztok 10 krát nebo 100 krát chloformem (3.2) nebo směsí benzenu a acetonitrilu (3.6), a poté znovu podrobit tenkovrstvé chromatografii.
- 5.5.2 Fluorimetrické měření  
Intenzita fluorescence skvrn aflatoxinu B<sub>1</sub> se změří fluorimetrem (4.12) při excitační vlnové délce 365 nm a emisní vlnové délce 443 nm.  
Množství aflatoxinu B<sub>1</sub> ve skvrnách extraktu se stanoví porovnáním fluorescenční intenzity skvrny extraktu s intenzitou skvrn C, D a E standardního roztoku.
- 5.6 *Potvrzení identity aflatoxinu B<sub>1</sub>*  
Viz bod 5.6 metody A.
6. **Výpočet výsledků**  
Viz bod 6 metody A.
7. **Opakovatelnost**  
Viz bod 8 metody A.
8. **Reprodukovatelnost**  
Viz „Poznámky“, část C bod 2.

#### C. POZNÁMKY TÝKAJÍCÍ SE METOD A A B

##### 1. Odtučnění

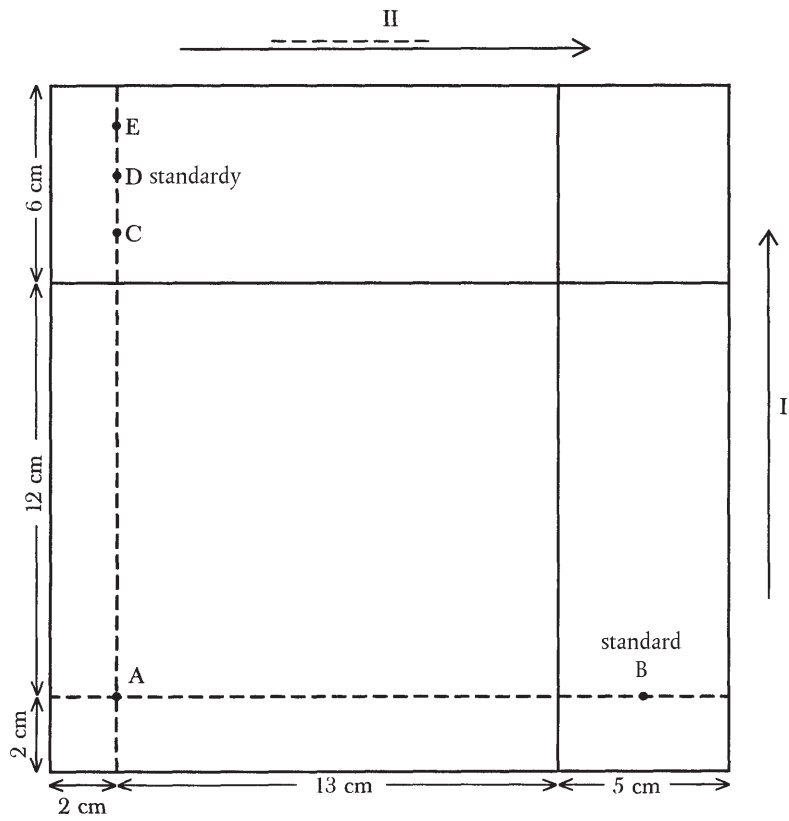
Vzorky obsahující více než 5 % tuku se musí po přípravě podle bodu 5.1 odtučnit petroletherem (b. v. 40 až 60 °C). V takových případech musí být analytické výsledky vyjádřeny jako hmotnost neodtučněného vzorku.

##### 2. Reprodukovatelnost výsledků

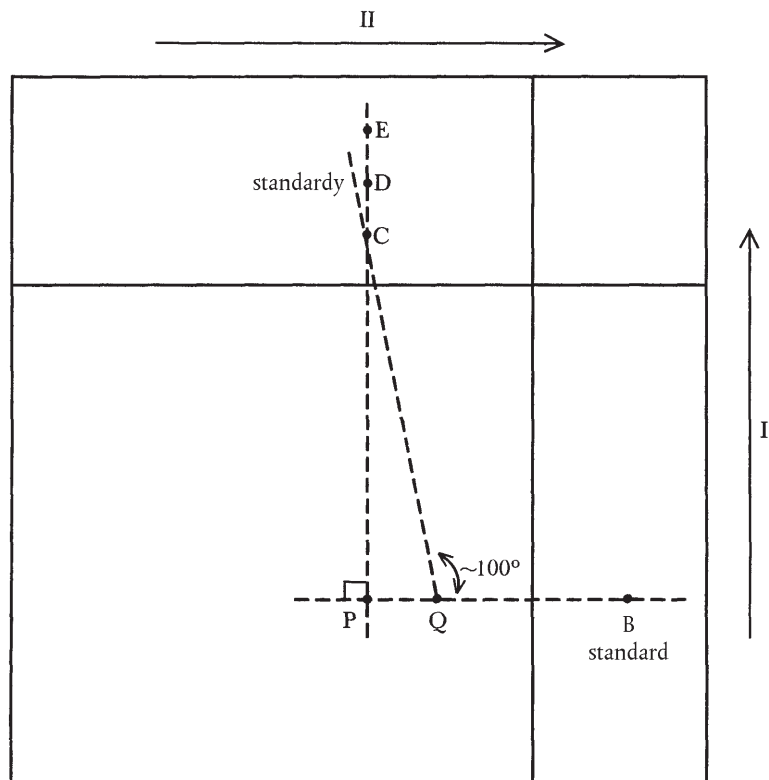
Reprodukovatelnost výsledků, tj. rozdíl mezi výsledky získanými dvěma nebo více laboratořemi ze stejného vzorku, se odhaduje na:

- ± 50 % střední hodnoty pro střední hodnoty aflatoxinu B<sub>1</sub> o 10 µg/kg až do 20 µg/kg;
  - ± 10 µg/kg na základě střední hodnoty pro střední hodnoty od 20 do 50 µg/kg;
  - ± 20 % střední hodnoty pro střední hodnoty vyšší než 50 µg/kg.
-

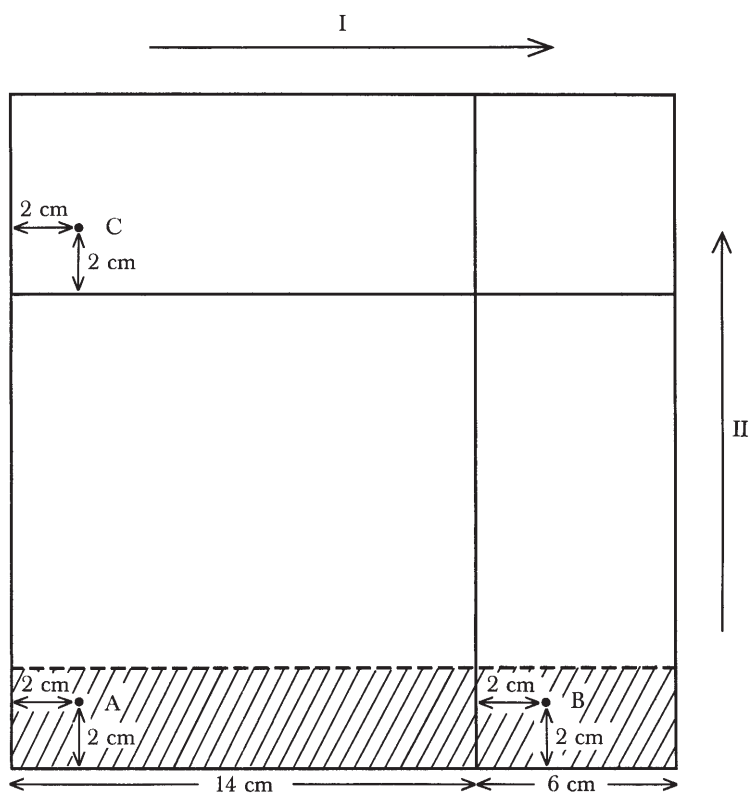
Dodatek k příloze



Obrázek 1



Obrázek 2



Obrázek 3