Ez a dokumentum kizárólag tájékoztató jellegű, az intézmények semmiféle felelősséget nem vállalnak a tartalmáért

►**B**

A BIZOTTSÁG HETEDIK IRÁNYELVE

(1976. március 1.)

a takarmányok hatósági ellenőrzésére szolgáló közösségi analitikai módszerek meghatározásáról

(76/372/EGK)

(HL L 102 , 15.4.1976, o. 8)

Módosította:

		Hivatalos Lap		
		Szám	Oldal	Dátum
►**M1**	A Bizottság irányelve (1981. július 30.)	L 246	32	29.8.1981
►**M2**	A Bizottság 92/95/EGK irányelve (1992. november 9.)	L 327	54	13.11.1992
►**M3**	A Bizottság 94/14/EK irányelve (1994. március 29.)	L 94	30	13.4.1994

▼B

A BIZOTTSÁG HETEDIK IRÁNYELVE

(1976. március 1.)

a takarmányok hatósági ellenőrzésére szolgáló közösségi analitikai módszerek meghatározásáról

(76/372/EGK)

AZ EURÓPAI KÖZÖSSÉGEK BIZOTTSÁGA,

tekintettel az Európai Gazdasági Közösséget létrehozó szerződésre,

tekintettel a legutóbb a csatlakozási okmánnyal ([1]) módosított, a takarmányok hatósági ellenőrzésénél alkalmazandó közösségi mintavételi és analitikai módszerek bevezetéséről szóló, 1970. július 20-i tanácsi irányelvre ([2]) és különösen annak 2. cikkére,

mivel az említett irányelv előírja, hogy a takarmányok hatósági ellenőrzését, amelynek célja a takarmányok minőségére és összetételére vonatkozó törvényi, rendeleti és közigazgatási rendelkezésekből eredő követelmények betartásának ellenőrzése, közösségi mintavételi és analitikai módszerek alkalmazásával kell végrehajtani;

mivel az 1971. június 15-i 71/250/EGK ([3]), az 1971. november 18-i 71/393/EGK ([4]), az 1972. április 27-i 72/199/EGK ([5]), az 1972. december 5-i 73/46/EGK ([6]), az 1974. március 25-i 74/203/EGK ([7]) és az 1974. december 20-i 75/84/EGK ([8]) bizottsági irányelv már számos közösségi analitikai módszert meghatározott; mivel az azóta eltelt időben, az adott területen elért fejlődés következtében tanácsos egy hetedik módszersorozat elfogadása;

mivel az ezen irányelvben előírt intézkedések összhangban vannak a Takarmányok Állandó Bizottsága véleményével,

ELFOGADTA EZT AZ IRÁNYELVET:

1. cikk

A tagállamok előírják, hogy a takarmányok hatósági ellenőrzésére szolgáló, a takarmányok aflatoxin B_1 tartalmára vonatkozó analitikai vizsgálatokat az e rendelet mellékletében leírt módszerek szerint kell végrehajtani.

▼M1

▼B

2. cikk

A tagállamok legkésőbb 1976. október 1-jéig hatályba léptetik azokat a törvényi, rendeleti és közigazgatási rendelkezéseket, amelyek szükségesek ahhoz, hogy ennek az irányelvnek megfeleljenek. Erről haladéktalanul tájékoztatják a Bizottságot.

3. cikk

Ennek az irányelvnek a tagállamok a címzettjei.

([1]) HL L 73., 1972.3.27., 14. o.
([2]) HL L 170., 1970.8.3., 2. o.
([3]) HL L 155., 1971.7.12., 13. o.
([4]) HL L 279., 1971.12.20., 7. o.
([5]) HL L 123., 1972.5.29., 6. o.
([6]) HL L 83., 1973.3.30., 21. o.
([7]) HL L 108., 1974.4.22., 7. o.
([8]) HL L 32., 1975.2.5., 26. o.

▼B

MELLÉKLET

AZ AFLATOXIN B_1 MEGHATÁROZÁSA

A. EGYDIMENZIÓS VÉKONYRÉTEG-KROMATOGRÁFIÁS MÓDSZER

▼M2

1. **Cél és alkalmazási terület**

Ez a módszer lehetővé tesz az aflatoxin B1 szintjének meghatározását a nyersanyagokban és egynemű takarmányokban. Ezt a módszert nem lehet alkalmazni citrusgyümölcsökből készült pép jelenlétében. A meghatározás alsó méréshatára 0,01 mg/kg (10 ppb).

Ha a meghatározást interferáló anyagok jelenléte hátráltatja, akkor a B. módszer (nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia) alkalmazásával meg kell ismételni az analízist.

▼B

2. **Vizsgálati alapelv**

A mintát kloroformmal extraháljuk. A kivonatot szűrjük, egy aliquot részét kivesszük és szilikagél oszlopkromatográfiával tisztítjuk. Az eluátumot bepároljuk, és a maradékot meghatározott térfogatú kloroformban, vagy benzol és acetonitril keverékében visszaoldjuk. Ezen oldat egy aliquot részén vékonyréteg-kromatográfiát (TLC) végzünk. Az aflatoxin B_1 mennyiségét a kromatogram UV-fénnyel történő megvilágítása mellett, vizuálisan vagy fluorodenzitométerrel, ismert mennyiségű standard aflatoxin B_1-el történő összehasonlítás alapján határozzuk meg. A takarmányból extrahált aflatoxin B_1 azonosítását a jelzett módszerrel kell megerősíteni.

3. **Reagensek**

Megjegyzés: Ha nincs másképp jelölve, minden reagens „analitikai tisztaságúnak”.

3.1. Aceton.

3.2. 0,5–1,0 %, 96 %-os (v/v) etanollal stabilizált kloroform.

3.3. n-Hexán.

3.4. Metil-alkohol.

3.5. Víz- és peroxidmentes dietil-éter.

3.6. Benzol és acetonitril 98/2 (v/v) arányú keveréke.

3.7. Kloroform (3.2.) és metil-alkohol (3.4.) 97/3 (v/v) arányú keveréke.

3.8. Szilikagél oszlopkromatográfiás célra, 0,05–0,20 mm közötti részecskeméretttel.

3.9. Előzetesen kloroformmal zsírtalanított hidrofil gyapot vagy üvegvatta.

3.10. Vízmentes, granulált nátrium-szulfát.

3.11. Inert gáz, pl. nitrogén.

3.12. 1 N sósav.

3.13. 50 %-os (v/v) kénsav.

3.14. Kieselguhr (hyflosupercel), savval mosva.

3.15. Szilikagél G-HR vagy ezzel egyenértékű a vékonyréteg-kromatográfiához.

3.16. A 7. pontban leírtak szerint elkészített és ellenőrzött standard oldat, amely kloroform (3.2.) vagy benzol/acetonitril keverék (3.6.) 1 milliliterében körülbelül 0,1 μg aflatoxin B_1-et tartalmaz.

3.17. Minőségi vizsgálat céljára szolgáló standard oldat, amely kloroform (3.2.) vagy benzol/acetonitril keverék (3.6.) 1 milliliterében körülbelül 0,1 μg aflatoxin B_1-et vagy B_2-t tartalmaz. A megadott koncentráció iránymutatásul szolgál. A koncentrációt úgy kell beállítani, hogy mindkét aflatoxin fluoreszcencia-intenzitása azonos legyen.

▼B

3.18. *Futtató oldószerek:*

3.18.1. Kloroform (3.2.)/aceton (3.1.): 9/1 (v/v), telítetlen kád;

3.18.2. Dietil-éter (3.5.)/metil-alkohol (3.4.)/víz: 96/3/1 (v/v/v), telítetlen kád;

3.18.3. Dietil-éter (3.5.)/metil-alkohol (3.4.)/víz: 94/4,5/1,5 (v/v/v), telített kád;

3.18.4. Kloroform (3.2.)/metil-alkohol (3.4.): 94/6 (v/v), telített kád;

3.18.5. Kloroform (3.2.)/metil-alkohol (3.4.): 97/3 (v/v), telített kád.

4. **Eszközök**

4.1. Daráló-keverő.

4.2. Rázógép vagy mágneses keverő.

4.3. Redős szűrőpapírok, Schleicher és Schüll No. 588 vagy azzal egyenértékű, átmérő: 24 cm.

4.4. Üvegcső a kromatográfiához (belső átmérő: 22 mm, hosszúság: 300 mm), PTFE csappal és 250 ml-es tárolótartállyal.

4.5. Rotációs vákuum-bepárló, 500 ml-es gömblombikkal.

4.6. 500 ml-es Erlenmeyer-lombikok, csiszolt üvegdugóval.

4.7. Vékonyréteg-kromatográfiás (TLC) felszerelés.

4.8. 200×200 mm-es üveglemezek a TLC-hez a következők szerint előkészítve (a megadott mennyiségek öt lemez bevonásához elegendőek). Helyezzünk 30 g szilikagél G-HR-t (3.15) egy Erlenmeyer-lombikba. Adjunk hozzá 60 ml vizet, zárjuk le és rázzuk egy percig. Terítsük szét a szuszpenziót a lemezeken úgy, hogy egy egyenletes, 0,25 mm vastag réteget kapjunk. Hagyjuk a levegőn száradni, majd tároljuk szilikagélt tartalmazó exszikkátorban. Felhasználáskor egy órán át 110 °C-os kemencében tartva, aktiváljuk a lemezeket.

A gyárilag kent kész lemezek akkor megfelelők, ha a fenti eljárás szerint elkészített lemezekéhez azonos eredményeket adnak.

4.9. Hosszú hullámhosszú (360 nm) UV-lámpa. A sugárzás intenzitása olyan legyen, hogy egy 1 ng-os aflatoxin B_1 foltot a lámpától 10 centiméterre lévő TLC lemezen egyértelműen meg lehessen különböztetni.

4.10. 10 ml-es osztott kémcsövek polietilén dugóval.

4.11. UV spektrofotométer.

4.12. Fluorodenzitométer (nem feltétlenül szükséges).

5. **A vizsgálat módja**

5.1. *A minta előkészítése (lásd az „Észrevételek” című C. rész 1. pontjában)*

Őröljük a mintát olyan finomságúra, hogy az teljes mennyiségben átmenjen egy 1 mm szemnagyságú szitán (az ISO R 565 ajánlás szerint).

5.2. *Extrahálás*

Helyezzünk 50 g őrölt, homogenizált mintát egy 500 ml-es Erlenmeyer-lombikba (4.6.). Adjunk hozzá 25 g Kieselguhr-t (3.14.), 25 ml vizet és 250 ml kloroformot (3.2.). Zárjuk le a lombikot, rázzuk vagy keverjük 30 percig a készülékkel (4.2.), és szűrjük át egy redős szűrőpapíron (4.3.). Öntsük el a szűrlet első 10 ml-ét, majd gyűjtsünk össze 50 ml szűrletet.

5.3. *Tisztítás oszlopkromatográfiával*

A kromatográfiás oszlop (4.4.) alsó végébe helyezzünk egy gyapot- vagy üvegvatta dugót (3.9.), töltsük fel az oszlopot kétharmad részig kloroformmal (3.2.) és adjunk hozzá 5 g nátrium-szulfátot (3.10.).

Ellenőrizzük, hogy a nátrium-szulfát réteg felszíne egyenes-e, majd kis adagokban adjunk hozzá 10 g szilikagélt (3.8.). Minden egyes adag hozzáadása után óvatosan keverjük meg, hogy eltávolítsuk a levegőbuborékokat. Hagyjuk állni 15 percig, azután óvatosan adjunk hozzá 15 g nátrium-szulfátot (3.10.). Hagyjuk a folyadékot lefolyni, amíg az éppen a nátrium-szulfát réteg felszíne fölé ér.

Keverjük össze az 5.2. pontban nyert kivonat 50 milliliterét 100 ml n-Hexánnal (3.3.) és az elegy teljes mennyiségét vigyük fel az oszlopra. Hagyjuk a folyadékot lecsöpögni, amíg az éppen a nátrium-szulfát réteg

▼B

felszínéhez ér. Öntsük el a mosófolyadékot. Ezután adjunk hozzá 100 ml dietil-étert (3.5.), és ismét hagyjuk lecsöpögni, amíg a nátrium-szulfát réteg felszínéhez ér. A fenti műveletek alatt figyeljünk arra, hogy az áramlási sebesség percenként 8–12 ml legyen és, hogy az oszlop ne száradjon ki. Öntsük el a mosófolyadékot. Ezután mossuk az oszlopot 150 ml kloroform/metil-alkohol keverékkel (3.7.), és gyűjtsük össze az eluátum teljes mennyiségét.

50 °C-ot meg nem haladó hőmérsékleten, inertgáz-áramban (3.11.), rotációs bepárlóval (4.5.), pároljuk az eluátumot majdnem szárazra. A maradékot teljes mennyiségben kloroform (3.2.) vagy a benzol/acetonitril keverék (3.6.) segítségével helyezzük át egy 10 ml-es osztott kémcsőbe (4.10.). Koncentráljuk az oldatot inertgáz-áram alatt, majd töltsük fel 2 ml-re kloroformmal (3.2.) vagy a benzol/acetonitril keverékkel (3.6.).

5.4. *Vékonyréteg-kromatográfia*

A standard oldat és a kivonat alábbiakban feltűntetett mennyiségeit cseppentsük a VRK lemezre (4.8.) úgy, hogy a foltok az alsó szélétől 2 cm-re és egymástól 2 cm-re legyenek:

– 10, 15, 20, 30 és 40 µl standard aflatoxin B_1 oldat (3.16.),

– az 5.3. pontban nyert kivonatból 10 µl és, ugyanarra a pontra, a standard oldatból (3.16.) 20 µl,

– az 5.3. pont szerint nyert kivonatból 10 és 20 µl.

Futtassuk a kromatogramot sötétben a futtató oldószerek (3.18.) egyikével. Az oldószert előre ki kell választani, 25 µl kvalitatív standard oldat (3.17.) lemezre helyezése után, annak ellenőrizésével, hogy a futtatás során az aflatoxin B_1 és B_2 teljesen különválik-e.

Hagyjuk az oldószereket sötétben elpárologni, azután világítsuk meg a lemezt UV-fénnyel 10 cm-re helyezve a lámpától (4.9.). Az aflatoxin B_1 foltok kéken fluoreszkálnak.

5.5. *Mennyiségi meghatározások*

A meghatározást vizuálisan vagy fluorodenzitométerrel végezzük a következők szerint.

5.5.1. Vizuális mérések

Határozzuk meg a kivonatban lévő aflatoxin B_1 mennyiségét úgy, hogy a kivonatfoltok fluoreszcenciájának erősségét összevetjük a standardoldat-foltok egyikénél mért fluoreszcencia erősségével. Szükség esetén interpoláljunk. A kivonat és a standardoldat egymásra helyezésével kapott fluoreszcenciának erősebbnek kell lennie, mint a 10 µl kivonatfolt által adott fluoreszcencia és nem szabad, hogy egynél több folt legyen látható. Ha a kivonat 10 µl-ének fluoreszcenciája erősebb, mint a 40 µl standardoldaté, akkor ismételjük meg a vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálatot kloroformmal (3.2.) vagy a benzol/acetonitril keverékkel (3.6.), 10- vagy 100-szorosára hígított kivonatot használva.

5.5.2. Fluorodenzitométeres mérések

Mérjük meg az aflatoxin B_1 foltok fluoreszcenciájának erősségét a fluorodenzitométerrel (4.12.), 365 nm gerjesztési és 443 nm emissziós hullámhosszon. Határozzuk meg a kivonatfoltokban lévő aflatoxin B_1 mennyiségét úgy, hogy fluoreszcenciájának erősségét összevetjük a standard aflatoxin B_1 foltok fluoreszcenciájának erősségével.

5.6. *Az aflatoxin B_1 azonosításának megerősítése*

Az alábbiakban leírt eljárással erősítsük meg a kivonatban lévő aflatoxin B_1 azonosítását.

5.6.1. Kénsavas kezelés

Permetezzünk kénsavat (3.13.) az 5.4. pont szerint nyert kromatográfiás lemezre. UV-fény alatt, az aflatoxin B_1 foltok fluoreszcenciája kékről sárgára kell, hogy változzon.

5.6.2. Kétdimenziós kromatográfia aflatoxin B_1-hemiacetál (aflatoxin B_{2a}) képzéssel

Megjegyzés:

Az alábbiakban leírt műveleteket a 3. ábrán látható diagram pontos követésével kell elvégezni.

5.6.2.1. Az oldatok felvitele

▼B

A lemez (4.8.) két szomszédos oldalával párhuzamosan húzzunk két egyenes vonalat (6 centiméterre a szélektől), melyek az oldószerfront migrációs határaként szolgálnak. Kapilláris pipettával vagy mikrofecskendővel cseppentsük fel a következő oldatokat a lemezre:

– *az A. pontra*: az 5.3. pont szerint nyert, tisztított kivonatot, amely körülbelül 2,5 nm aflatoxin B_1-et tartalmaz,

– *a B. és C. pontra*: a standardoldatból (3.16.) 25 µl-t.

5.6.2.2. Futtatás

A futtató oldószer használatával (3.18.1.) (1 centiméteres réteg telítetlen kádban) sötétben futtassuk a kromatogramot az I. irányba, amíg az oldószerfront eléri az oldószer határvonalát.

Vegyük ki a lemezt a tartályból, és sötétben, szobahőmérsékleten hagyjuk száradni öt percig. Azután permetezzük be sósavval (3.12.) 2,5 cm széles sávban az A. és B. pontok területét (a 3. ábrán a besatírozott terület jelzi), amíg elsötétedik úgy, hogy a lemez többi részét egy üveglappal védjük. Hagyjuk reagálni sötét helyen 10 percig, és szobahőmérsékleten levegőáramban szárítsuk meg.

Ezután a futtató oldószer használatával (3.18.1.) (1 centiméteres réteg telítetlen tartályban) sötétben futassuk a kromatogramot a II. irányba, amíg az oldószerfront eléri az oldószer határvonalát. Vegyük ki a lemezt a kádból, és hagyjuk megszáradni szobahőmérsékleten.

5.6.2.3. A kromatogram értelmezése

Vizsgáljuk meg a kromatogramot UV-fényben (4.9.), és ellenőrizzük a következők megjelenését.

a) A C. ponton felvitt standardoldatból származó aflatoxin B_1 kéken fluoreszkáló foltjának megjelenése (migráció az I. irányba).

b) A B. ponton felvitt standardoldatból származó, (sósavval) el nem reagált aflatoxin B_1 kéken fluoreszkáló foltjának és az ugyanonnan származó aflatoxin B_1-hemiacetál erősebb kéken fluoreszkáló foltjának megjelenése (migráció a II. irányba).

c) A A.. ponton felvitt mintakivonatból származó, a b) pontban leírtakkal megegyező foltok megjelenése. E foltok elhelyezkedését egyrészt az aflatoxin B_1-nek az A. pontból az I. irányba történt migráció távolsága (megegyezik a C. ponton felvitt standard migrációs távolsággal), másrészt az onnan az aflatoxin B_1-hemiacetál által a II. irányba tett migráció távolsága (megegyezik a B. ponton felvitt standard migrációs távolsággal) határozza meg. A kivonatból, illetve a B. ponton felvitt standardból származó hemiacetál-foltok fluoreszcencia-intenzitásának egyeznie kell.

6. Az eredmény kiszámítása

6.1. *A vizuális mérések esetén*

A minta µg/kg-ban kifejezett aflatoxin B_1 tartalma (ppb) a következő képlettel számítható ki:

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

ahol:

Az Y és az X az aflatoxin B_1 standardoldat (3.16.), illetve azonos fluoreszcencia-intenzitású kivonat µl-ben kifejezett térfogata;

S = a standardoldat aflatoxin B_1 koncentrációja µg/ml-ben (3.16.);

V = a kivonat végtérfogata µl-ben, figyelembe véve a szükségessé vált hígításokat;

W = az oszlopkromatográfiával tisztított kivonat térfogatának megfelelő minta tömege grammban.

6.2. *A fluorodenzitometriás mérések esetén*

A minta µg/kg-ban kifejezett aflatoxin B_1 tartalma a következő képlettel számítható ki:

▼B

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

ahol:

Y = a lemezre felvitt kivonat térfogata µl-ben (10 vagy 20 µl);

S = a kivonat foltjában lévő aflatoxin B_1, a mérések alapján kiszámított mennyisége ng-ban kifejezve (az alkalmazott Y mennységgel arányos),;

V = a kivonat végtérfogata µl-ben, figyelembe véve a szükségessé vált hígításokat;

W = az oszlopkromatográfiával tisztított kivonat térfogatának megfelelő minta tömege grammban.

7. **A standardoldat (3.16.) elkészítése és vizsgálata**

7.1 *Az aflatoxin B_1 koncentrációjának meghatározása*

Készítsünk egy 8–10 µg/ml koncentrációjú aflatoxin B_1 standardoldatot kloroformban (3.2.) vagy a benzol/acetonitril keverékben (3.6.). Spektrofotométerrel (4.11.) határozzuk meg az abszorpciós spektrumot 330 és 370 nm között.

Mérjük meg az optikai sűrűséget (A.) a kloroform oldat esetében 363 nm-nél, a benzol/acetonitril keverékkel készült oldat esetében 348 nm-nél.

Az oldat aflatoxin B_1, µg/ml-ben kifejezett koncentrációja az alábbi képletekkel számítható ki:

$\frac{312 \cdot A \cdot 1\,000}{20600}$ kloroformoldat esetében:;

$\frac{312 \cdot A \cdot 1\,000}{19800}$ benzol/acetonitril keverék oldata esetében:.

Fénytől elzárva hígítsuk fel úgy, hogy egy körülbelül 0,1 µg/ml koncentrációjú aflatoxin B_1 standard munkaoldatot kapjunk. Hűtőben tárolva 4 °C-on, ez az oldat két hétig marad stabil.

7.2 *A kromatográfiás tisztaság vizsgálata*

Vigyünk egy lemezre (4.8.) 5 µl, 8–10 µg/ml koncentrációjú aflatoxin B_1 standardoldatot (7.1.). Futtassuk a kromapogramot az 5.4. pontban leírtak szerint. UV-fényben a kromatogram csak egy foltot mutathat, és az eredeti felviteli zónában nem szabad fluoreszcenciát észlelnünk.

8. **Ismételhetőség**

Ugyanazon a mintán, ugyanazon analitikus által végzett két párhuzamos meghatározás eredménye közötti különbség nem haladhatja meg:

– a legmagasabb eredmény 25 %-át, 10–20 µg/kg aflatoxin B_1 tartalom esetén,

– abszolút értékben az 5 µg-t, 20–50 µg/kg aflatoxin B_1 tartalom esetén,

– a legmagasabb eredmény 10 %-át, 50 µg/kg-nál magasabb aflatoxin B_1 tartalom esetén.

9. **Reprodukálhatóság**

Lásd a „Észrevételek” C. részének 2. pontjában.

▼M2

B. AFLETOXIN B1 MEGHATÁROZÁSA. FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS MÓDSZER

1. **Cél és alkalmazási terület**

A jelen módszer alkalmas aflatoxin B1 meghatározására takarmányokban, beleértve a citrusgyümölcsökből készült pépet tartalmazó takarmányt is. A kimutatás alsó határa 0,001 mg/kg.

▼M2

2. **A módszer elve**

A mintát kloroformmal extraháljuk. A kivonatot leszűrjük, és egy meghatározott részét először Florisil, majd C18 SPE oszlopon tisztítjuk. Az elválasztás és a meghatározás nagy teljesítményű folyadékkromatográfiával (HPLC), fordított fázisú C18 oszlopon történik, vízben oldott jóddal végzett elválasztás utáni származékképzés és fluoreszcens detektálás alkalmazásával.

Megjegyzés:

A mikotoxinok erősen mérgező anyagok. A műveleteket e célra kijelölt elszívófülkében kell végezni. Különleges óvintézkedésekre van szükség, amikor a toxinok száraz állapotban vannak, és ebből következően hajlamosak a munkaterületen való szétszóródásra.

3. **Reagensek**

3.1. Kloroform, 0,5–1 tömeg % etanollal stabilizálva (Lásd a »Megjegyzések« 10.2. szakaszát.)

3.2. Metanol, HPLC tisztaságú, a 3.6. szerinti mobil fázis elkészítéséhez

3.3. Aceton

3.4. Acetonitril, HPLC tisztaságú

3.5. Oldószerelegyek: felhasználás előtt egy nappal készítendő, vagy az oldószerből a levegőt ultrahangos rázatással kell eltávolítani.

3.5.1. Aceton és víz 98:2 arányú elegye

3.5.2. Víz és metanol 80:20 arányú elegye

3.5.3. Víz és aceton 85:15 arányú elegye

3.6. Eluens oldat HPLC-hez

Víz, metanol és acetonitril 130:70:40 arányú elegye.

Megjegyzés: A rendelkezésre álló HPLC oszlop tulajdonságaitól függően szükségessé válhat a mobil fázis összetételének változtatása.

3.7. Telített jódoldat: Adjunk 2 g jódot 400 ml vízhez. Keverjük legalább 90 percig, majd szűrjük le membránszűrőn (4.15.) keresztül. A fény okozta bomlás elkerülése végett az oldatot fénytől védve tartjuk.

3.8. Savval mosott Celite 545 vagy azzal egyenértékű adszorbens.

3.9. Florisil SPE oszlop (Waters-SEP-PAK vagy azzal egyenértékű).

3.10. C18 SPE oszlop (Waters-SEP-PAK vagy azzal egyenértékű).

3.11. Inert gáz, pl. nitrogén.

3.12. Aflatoxin B1 standardoldat, 10 µg/ml koncentrációjú. Az oldat koncentrációját az alábbiak szerint ellenőrizzük: Vegyük fel az oldat spektrumát 330 és 370 nm között spektrofotométerrel (4.23.). Mérjük az abszorbanciát (A) a maximumhelyen, 363 nm-en. Az aflatoxin B1-oldat koncentrációját az alábbi képlet segítségével számítjuk ki és mikrogramm/ml-ben kapjuk meg:

$$\text{Concentration } (\mu g/ml) = \frac{312 \times A \times 1000}{22\,300} = 13{,}991 \times A$$

3.12.1. Aflatoxin B1 kloroformos standard törzsoldat

Az aflatoxin B1 standardoldat (3.12.) 2,5 ml-ét kvantitatíve vigyük át egy 50 ml-es mérőlombikba és kloroformmal (3.1.) állítsuk jelre az oldat térfogatát. Ezt az oldatot hűvös (4 °C), sötét helyen, jól lezárva és alufóliába csomagolva tároljuk.

3.13. Aflatoxin B1 HPLC kalibrálóoldatok

Megjegyzés:

Az oldatok készítéséhez savval mosott üvegárut (lásd 4. Eszközök) használjunk.

3.13.1. 4 ng/ml-es kalibrálóoldat

▼M2

A mérőlombikban lévő standard törzsoldatot (3.12.1.) alumíniumfóliába csomagolva állni hagyjuk addig, míg szobahőmérsékletűre melegszik (néhány órát). A törzsoldat 400 µl-ét (200 ng aflatoxin B1-et) 50 ml-es mérőlombikba visszük át, és inertgáz- (3.11.) áramban szárazra pároljuk.

Az így nyert maradékot kb. 20 ml víz/aceton elegyben (3.5.3.) oldjuk, víz/aceton eleggyel jelig töltjük a lombikot, és jól összerázzuk.

3.13.2. 3 ng/ml-es kalibrálóoldat

A kalibráló oldat (3.13.1.) 7,5 ml-ét kvantitatíve 10 ml-es mérőlombikba visszük át, jelig töltjük a víz/aceton eleggyel (3.5.3.), és jól összerázzuk.

3.13.3. 2 ng/ml-es kalibrálóoldat

A kalibrálóoldat (3.13.1.) 25 ml-ét kvantitatíve 50 ml-es mérőlombikba visszük át, jelig töltjük a víz/aceton eleggyel (3.5.3.), és jól összekeverjük.

Ez az oldat lesz az összehasonlító (referencia-) standard is, amelyet a HPLC vizsgálat során ismételten kell a rendszerbe injektálni.

3.13.4. 1 ng/ml-es stabilizálóoldat

A kalibrálóoldat (3.13.1.) 2,5 ml-ét kvantitatíve 10 ml-es mérőlombikba visszük át, jelig töltjük a víz/aceton eleggyel (3.5.3.), és jól összerázzuk.

3.14. 1 ml kloroformban oldott, 1 µg aflatoxin B1-et, 0,5 µg aflatoxin B2-t, 1 µg aflatoxin G1-et, és 0,5 µg aflatoxin G2-t tartalmazó ampulla.

3.14.1. Kromatográfiás tesztoldat

Az ampulla (3.14.) tartalmát vigyük át üvegdugós kémcsőbe vagy csavaros tetővel ellátott fiolába. Az oldat 40 µl-ét vigyük savval mosott üvegdugós kémcsőbe (4.21.). Inertgázáramban párologtassuk el a kloroformot, és a maradékot oldjuk újra 10 ml víz/aceton elegyben (3.5.3.).

3.15. A megerősítő teszt vegyszerei

3.15.1. Nátrium-klorid, telített oldat

3.15.2. Nátrium-szulfát, vízmentes, granulált

4. **Eszközök**

Figyelmeztetés: Vizes aflatoxinoldatok esetében a savval át nem mosott üvegedényzet veszteséget okozhat. Különös gonddal kell ügyelni az új és az egyszer használatos üvegárukra, mint az automata injektor mintatartó fiolái és Pasteur-pipetták. Ezért az aflatoxin vizes oldatával kapcsolatba kerülő laboratóriumi üvegedényzetet néhány órára híg savba (pl. 2 mol/l koncentrációjú kénsavba) kell áztatni, majd desztillált vízzel alaposan kiöblíteni a savnyomok eltávolítására (legalább háromszor öblítsünk, és az öblítővizet pH-papírral ellenőrizzük). Ezt a műveletet el kell végezni a vákuumbepárlóhoz használt gömblombikkal (4.4.), a mérőlombikokkal, mérőedényekkel, a kalibrálóoldatok és mérésre előkészített oldatok tárolására használt kémcsövekkel és fiolákkal is.

4.1. Őrlő-homogenizáló berendezés.

4.2. 1,0 mm lyukbőségű szita (ISO R565).

4.3. Mechanikai rázógép.

4.4. Rotációs vákuumlepárló, 150–250 ml-es gömblombikkal felszerelve.

4.5. HPLC készülék.

4.6. HPLC analitikai oszlop, 3 µm vagy 5 µm C18 töltettel.

4.7. Pulzálásmentes szivattyú a post-column jódreagens szállítására.

4.8. Zéró holttérfogatú Valco T idom, rozsdamentes acélból (1/16’ × 0,75 mm).

4.9. Spirális reaktor; teflon vagy rozsdamentes acél. Az 5 µm vagy 3 µm töltetméretű HPLC oszlopokhoz a 3 000 mm × 0,5 mm és 5 000 × 0,5 mm közötti méretek bizonyultak a legcélszerűbbnek.

4.10. 60 °C-ra beállított, 0,1 °C-os pontossággal szabályozható termosztát.

4.11. Fluoreszcens detektor, gerjesztési hullámhossz 365 nm, emissziós hullámhossz 435 nm (szűrős készülékeknél emissziós hullámhossz > 400 nm). Alkalmas legyen legalább 0,05 ng aflatoxin B1 kimutatására.

4.12. Rekorder.

▼M2

4.13. Integrátor (nem feltétlenül szükséges).

4.14. Redős szűrőpapír, átmérő: 24 cm, Macherey-Nagel 617 1/4 vagy azzal egyenértékű.

4.15. Membránszűrő, 0,45 μm pórusméretű, Millipore HAWP 04700 vagy azzal egyenértékű.

4.16. 500 ml-es üvegdugós Erlenmeyer-lombik.

4.17. Üvegoszlop (belső átmérő körülbelül 1 cm, hosszúság körülbelül 30cm, Luer véggel állátva.

4.18. Luer(R) kloroformmal szemben ellenálló csap (pl. Bio-Rad 7328017, Analytichem A1 6078, J.T.Baker 4514 vagy ezekkel egyenértékű).

4.19. Vegyszereknek ellenálló fecskendő, 10 ml-es, Luer csatlakozó résszel.

4.20. 250 μl-es, HPLC injektáláshoz alkalmas fecskendő (lásd 4.5.).

4.21. 100 μl-es mikrofecskendő a kalibrálóoldatok készítéséhez.

4.22. 10 ml-es üvegdugós kalibrált kémcsövek.

4.23. Spektrofotométer, amely alkalmas a spektrum UV tartományában mérések elvégzésére.

4.24. A megerősítő vizsgálathoz (6) szükséges felszerelés.

4.23.1. Savval öblített 100 ml-es rázótölcsér tefloncsappal.

4.23.2. Fűtőblokk, 40–50 °C közti hőmérséklettel.

5. **Vizsgálat**

5.1. *A minta előkészítése*

Daráljuk meg a jól homogenizált mintát úgy, hogy áthulljon az 1 mm lyukbőségű szitán (4.2.), majd újból homogenizáljuk.

5.2. *Bemérés*

Az előkészített vizsgálati mintából 50 g-ot az Erlenmeyer-lombikba mérünk.

5.3. *Extrakció*

Adjunk 25 g Celitet (3.8.), 250 ml kloroformot (3.1.) és 25 ml vizet a bemért vizsgálati mintához az Erlenmeyer-lombikba.Dugaszoljuk be a lombikot, rázassuk a rázógépen (4.3.) 30 percig. Szűrjük át redős szűrőpapíron (4.14.). Gyűjtsünk össze 50 ml szűrletet. Ha szükséges, hígítsuk a szűrletet kloroformmal úgy, hogy az aflatoxin B1 koncentrációja a 4 ng/ml-t ne haladja meg.

5.4. *Tisztítás (Az eljárást jelentősebb megszakítás nélkül kell elvégezni.)*

Figyelmeztetés:

– Azt a laboratóriumot, ahol a vizsgálatot végzik, megfelelően védeni kell a természetes fénytől. Ennek megfelelő eszközei az alábbiak:

  i. UV fényt elnyelő fólia az ablakokon, azzal kombinálva, hogy az ablakot direkt napfény nem éri;

  ii. függönyök vagy redőnyök és mesterséges fény (fluoreszcens csövek megfelelőek).

– Az aflatoxint tartalmazó oldatokat a lehető legjobban védeni kell a fénytől (sötét helyen tartjuk, alufóliába burkoljuk).

5.4.1. Tisztítás Florisil SEP-PAK oszlopon

5.4.1.1. Az oszlopkészlet előkészítése

Tegyünk a Florisil-készlet rövidebb végére (3.9.) zárósapkát (4.18.) (lásd az 1. ábrát). Mossuk a készletet és távolítsuk el a segédletet 10 ml kloroformmal (3.1.) és egy fecskendő (4.19.) használatával fecskendezzünk át gyorsan 8 ml-t a zárósapkán. Csatlakoztassuk a készlet hosszabb szárát az üvegoszlophoz (4.17.), és a maradék 2 ml kloroformot fecskendezzük be az oszlopba a készleten keresztül. Zárjuk a zárósapkát. Húzzuk ki a fecskendőt.

▼M2

5.4.1.2. Tisztítás

Adjuk az 5.3. szerint gyűjtött szűrletet az összeállított oszlopkészletbe és öntsük el. Öblítsük 5 ml kloroformmal (3.1.), majd 20 ml metil-alkohollal (3.2.). Öntsük el az eluátumot. E műveletek alatt biztosítsuk, hogy az oszlopkészlet-szerelék nem szárad ki.

Ezután mossuk az aflatoxin B1-et 40 ml aceton/víz keverékkel (3.5.1.), és gyűjtsük össze az eluátum teljes mennyiségét a rotációs bepárló gömblombikjába (4.4.). Koncentráljuk az eluátumot a rotációs bepárlón 40–50 °C között, amíg több aceton már nem desztillálódik. (Megjegyzés: Ekkorra körülbelül 0,5 ml folyadék marad a lombikban. Kísérletek kimutatták, hogy a további párologtatás nem káros, és amikor 0,5 ml folyadék marad, abban már nincs jelentős mennyiségű aceton. Az acetonmaradék az aflatoxin B1 elvesztéséhez vezethet a C18 készletben.) Adjunk hozzá 1 ml metil-alkoholt (3.2.), keverjük fel, hogy az aflatoxin B1 a lombik oldalán feloldódjon, adjunk hozzá 4 ml vizet és keverjük össze. Válasszuk le a készletet és dobjuk el. Öblítsük vízzel az üvegoszlopot és tartsuk vissza a C18 tisztítási lépéshez.

5.4.2. Tisztítás C18-as SPE oszlopon

5.4.2.1. Az oszlopkészlet összeállításának előkészítése.

Csatlakoztassunk egy zárósapkát (4.18.) a C18-készlet rövidebb végére (3,10) (lásd az 1. ábrát). Töltsük fel a készletet és távolítsunk el minden levegőt a zárósapkán 10 ml metil-alkohol gyors átfecskendezésével (4.19.). A készletben az egyébként szürke háttér előtt a légbuborékok világos pettyekként láthatók. Vegyünk 10 ml vizet és 8 ml-t nyomjunk át a készleten. (Kerüljük a levegő készletbe történő bejutását, amikor a metil-alkoholról vízre váltunk.) Csatlakoztassuk a készlet hosszabb szárát az üvegoszlophoz (4.17.), és a maradék 2 ml vizet fecskendezzük be az oszlopba a készleten keresztül. Zárjuk a zárósapkát. Húzzuk ki a fecskendőt.

5.4.2.2. Tisztítás

Vigyük fel az 5.4.1.2. pontban nyert kivonat teljes mennyiségét az üvegoszlopba (4.17.), öblítsük a lombikot kétszer 5 ml víz/metil-alkohol keverékkel (3.5.2.) és folyassuk el. E műveletek alatt biztosítsuk, hogy az oszlopkészlet-szerelék nem szárad ki. Ha légbuborékok fejlődnek a szűkületben a készlet mellett, állítsuk meg a folyamatot, és csapoljuk meg az üvegoszlop tetejét a légbuborékok eltávolítására. Majd folytassuk. Mossuk 25 ml víz/metil-alkohol keverékkel. Öntsük el az eluátumot. Ezután mossuk az aflatoxin B1-et 50 ml víz/aceton keverékkel (3.5.3.), és gyűjtsük össze az eluátum teljes mennyiségét egy 50 ml-es gömblombikba (4.4.). Öntsük fel a jelzésig vízzel és keverjük össze. A kapott vizsgálati oldatot használjuk a kromatográfiához (5.5.).

Figyelem: *Rendesen nem szükséges a végső* kivonat szűrése a HPLC előtt. Ha szükségesnek tartott, ne használjunk cellulózszűrőt, mert az aflatoxin B1 eltűnését okozhatják. A teflonszűrők elfogadhatók.

5.5. *Nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiás mérés*

(Lásd a 2. ábrát a felszerelés összeállításához) Biztosítsunk elegendő időt a műszerek kondicionálására és stabilizálására.

1. megjegyzés

A mobil fázis és a származékképző reagens áramlási sebességének értékei csak tájékoztató jellegűek. Ezeket a paramétereket az analitikai oszlop jellemzőitől függően szükség szerint változtatni lehet.

2. megjegyzés

Az aflatoxin B1 detektorjelének nagysága függ a hőmérséklettől, ezért annak folyamatos változását figyelembe kell venni (lásd a 3. ábrát). Azonos mennyiségű, aflatoxin B1 referencia kalibrálóoldat (3.13.3.) rendszeres időközönként történő injektálásával (pl. minden harmadik injektálás) a referencia kalibrálóoldatok között injektált aflatoxin B1 csúcs alatti területeit korrigálhatjuk, ha az átlagos értéket vesszük figyelembe a kiértékelésnél, feltéve hogy az egymást követő referencia kalibrálóstandardok által adott detektorjel között a különbség nagyon kicsi (< 10 %). Ezért az injektálásokat lehetőség szerint megszakítás nélkül kell végezni. Ha a mérést meg kell szakítani, akkor a megszakítás előtti utolsó és a megszakítás utáni első injektálás referencia kalibrálóoldat

▼M2

(3.13.3.) legyen. Mivel a kalibrációs görbe lineáris és áthalad a nullán, a mintakivonatban található aflatoxin B1 mennyiségét közvetlenül a megfelelő szabványokra utalással határozzák meg.

5.5.1. A HPLC pumpa beállítása

Állítsuk be a HPLC pumpát (4.5.) úgy, hogy a mobil fázis (3.6.) áramlási sebessége 5 μm-es analitikai oszlop esetén 0,5 ml/perc, 3 μm-es oszlop esetén 0,3 ml/perc legyen.

5.5.2. A származékképző reagens pumpájának beállítása

A pumpát (4.7.) úgy állítsuk be, hogy a telített vizes jódoldat (3.7.) áramlási sebessége 0,2 és 0,4 ml/perc között legyen. Irányelvnek tekinthető, hogy a mobil fázis 0,5 ml/perces áramlási sebességéhez 0,4 ml/perc reagens áramlási sebességet, a 0,3 ml/perces áramlási sebességhez pedig 0,2 ml/perc reagens áramlási sebességet célszerű beállítani.

5.5.3. Fluoreszcens detektor

A fluoreszcens detektort (4.11.) állítsuk 365 nm gerjesztési és 435 nm emissziós hullámhosszra (szűrős műszereknél: > 400 nm). A detektorleosztást úgy állítsuk be, hogy a rekorderen 1 ng aflatoxin B1-nek a teljes rekorderkitérés 80 %-a feleljen meg.

5.5.4. Injektor

Valamennyi oldatból 250 μl-es mennyiségeket injektáljunk az injektor gyártója által kiadott használati utasítás szerint.

5.5.5. A kromatográfiás elválasztás ellenőrzése

A kromatográfiás tesztoldatot (3.14.1.) a készülékbe injektáljuk.

5.5.6. A rendszer stabilitásának ellenőrzése

Minden vizsgálatsorozatot megelőzően addig injektáljuk az összehasonlító standardot (3.13.3.), amíg stabil csúcs alatti területeket kapunk. (Megjegyzés: Az egymást követő aflatoxin B1-injektálások által adott detektorjel nem különbözhet 6 %-nál nagyobb értékkel.) Ezután késedelem nélkül végezzük el a linearitás ellenőrzését (5.5.7.).

5.5.7. A linearitás ellenőrzése

Injektáljuk az aflatoxin B1 kalibrálóoldatokat (3.13.1.–3.13.4.). Minden harmadik injektálás a referencia kalibrálóoldat (3.13.3.) legyen, hogy a detektorjel folyamatos változását (drift) korrigálni lehessen. (Megjegyzés: A referencia kalibrálóoldatra kapott detektorjel változása 90 perc alatt nem haladhatja meg a 10 %-ot.) Korrigáljuk a detektorjel folyamatos változását a 7. szakaszban megadott képlet szerint. A kalibrációs görbének lineárisnak kell lennie, és át kell haladnia az origón a becsült Y érték kétszeres standardhibáján belül. A kapott értékek a nominális értéktől nem különbözhetnek 3 %-ot meghaladó mértékben. Ha ezek a követelmények teljesülnek, késedelem nélkül folytassuk a munkát. Ha a követelmények nem teljesülnek, azonosítsuk és szüntessük meg a hibaforrást, mielőtt továbbhaladnánk.

5.5.8. A mintaextraktok injektálása

Injektáljuk a tisztított mintakivonatokat (5.4.2.2.). Minden második injektálás után ismételjük meg az összehasonlító standard (3.13.3.) injektálását a következő sorrendben: referencia kalibrálóoldat, extrakt, extrakt, referencia kalibrálóoldat, extrakt, extrakt, referencia kalibrálóoldat stb.

6. **Megerősítő teszt**

6.1. *Az extrakt (5.4.2.2.) további kezelése*

Az 5.4.2.2. szerinti előkészített extrakthoz adjunk 5 ml nátrium-kloridoldatot (3.15.1.). Extraháljunk háromszor 2 ml kloroformmal (3.1.), mindannyiszor 1-1 percig rázva a választótölcsérben (4.24.1.). Az egyesített kloroformos extraktot töltsük kb. 1 g nátrium-szulfátra (3.15.2.) egy 10 ml-es kémcsőbe. Használhatunk kis (4 cm átmérőjű) tölcsért, amelynek nyakába kis gyapotvatta dugóra helyeztük a kb.

1 g mennyiségű nátrium-szulfátot. Mossuk át a nátrium-szulfát-réteget néhány ml kloroformmal, és gyűjtsük a mosófolyadékot ugyanabba a kémcsőbe. Pároljuk a kloroformos extraktot szárazra ugyanabban a kémcsőben a fűtőblokk (4.24.2.) alkalmazásával, a maradékot oldjuk vissza 1 ml kloroformban.

▼M2

6.2. *Származékkészítés és vékonyréteg-kromatográfia*

Lásd a 76/372/EGK tanácsi irányelv mellékletében az »A« módszer 5.6.2. pontját.

7. **Az eredmények kiszámítása**

Számítsuk a mintában lévő aflatoxin B1-tartalmat (μg/kg) az alábbi képlettel:

$$\text{Aflatoxin B1-tartalom } (\mu g/kg) = \frac{m \times V_{ext}}{V_m \times M \times \frac{V_f}{V_c}}$$

ahol

m = az aflatoxin B1 mennyisége ng-ban, amelyet a minta aflatoxin B1 csúcsa alapján a következőképpen számítunk ki:

$$m = \frac{P\ P\ (\text{minta})}{P\ (st_1) + P(st_2)} \times 2\ r(st)$$

Pminta = a minta aflatoxin B1 csúcsának területe

$P(st_1)$ = a mintát megelőző referencia kalibrálóoldat (3.13.3.) injektáláskor kapott aflatoxin B1 csúcs alatti területe

$P(st_2)$ = a mintát követő referencia kalibrálóoldat (3.13.3.) injektáláskor kapott aflatoxin B1 csúcs alatti területe

r(st) = a referencia kalibrálóoldatban (3.13.3.) injektált aflatoxin B1 mennyisége

V_m = az injektált minta kivonat térfogata, ml

V_{ext} = az előkészített mintakivonat végtérfogata, figyelembe véve az esetleges hígításokat (5.3.), ml

M = a minta tömege, g

V_f = a Florisil patronra felvitt szűrlet térfogata (5.4.1.2.), ml

V_c = a minta extrahálásához felhasznált kloroform térfogata, ml

Ha az ezen leírásban leírt eljárást követjük, a fenti képlet az alábbiakra egyszerűsíthető:

aflatoxin B1-tartalom, μg/kg = 20 × m

7.1. A számítást a lemért csúcsmagasságok alapján is el lehet végezni.

8. **Ismételhetőség**

Lásd 10.1.

9. **Reprodukálhatóság**

Lásd 10.1.

10. **Megállapítások**

10.1. *Pontosság*

Egy keveréktakarmányon végzett nemzetközi körvizsgálat ([1]) az ismételhetőségre és reprodukálhatóságra az 1. táblázatban megadott eredményeket adta. Az ismételhetőség (R) az itt használt fogalommeghatározás szerint azt a legnagyobb viszonyszámot jelenti, amely ugyanazon mintán, ugyanabban a laboratóriumban, hasonló körülmények között kapott két eredmény összehasonlításában 95 %-os valószínűségi szinten nem minősül szignifikánsnak. A reprodukálhatóság fogalommeghatározása a fentiekhez hasonló, de két különböző laboratóriumban kapott eredmény összehasonlítására vonatkozóan. Az ISO 3534-1977, 2.35 ([2]) és a 89/610/EGK ([3]) bizottsági határozat értelmében az r és R értékeket az 1. táblázat variációs koefficiensként kifejezve is feltünteti.

([1]) Egmond, H. P. van Heisterkamp, S. H. és Paulsch, W. E. (1991), Food additives and Contaminants 8, 17–29.
([2]) ISO 3534-1977.
([3]) HL L 351., 1989.12.2., 39. o.

▼**M2**

1. táblázat

Ismételhetőség és reprodukálhatóság

(15 laboratórium eredményei alapján)

Szint	r	R	CV_r(*)	CV_R
(μg/kg)			(%)	(%)
8–14	1,4	1,7	11	18

(*) CV = a változatok együtthatója

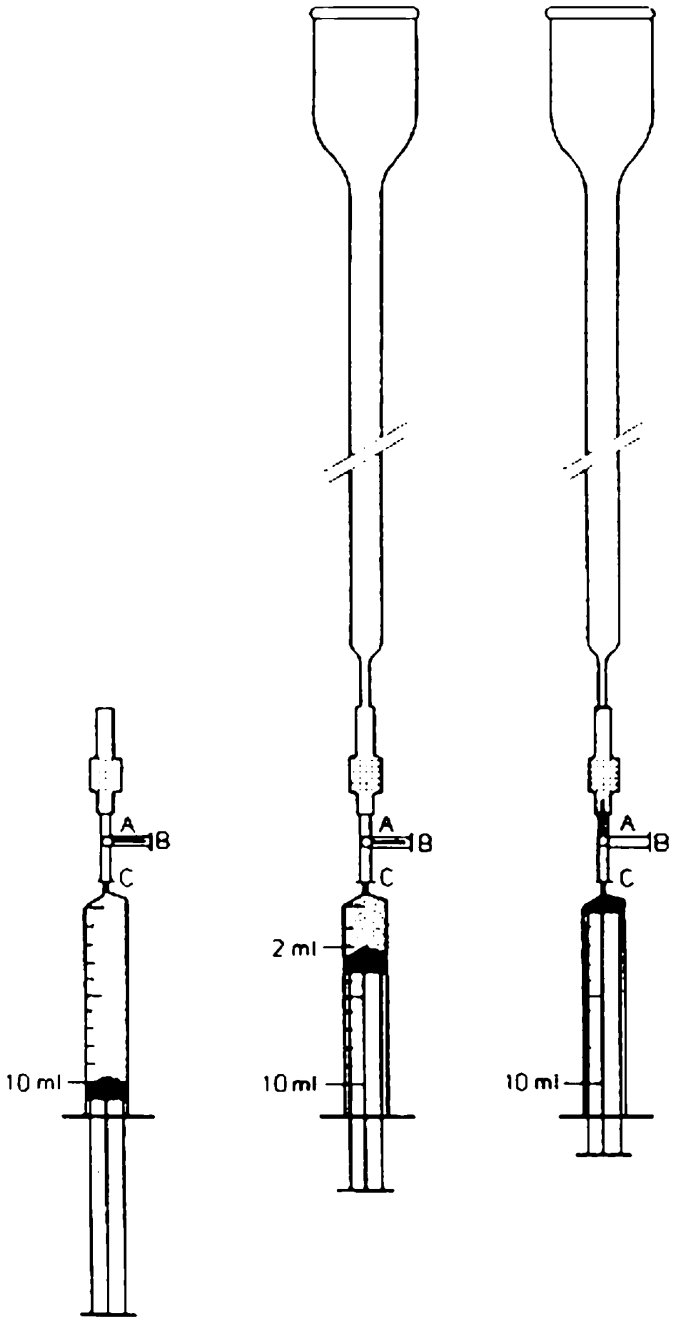
10.2. *A kloroform (3.1.) stabilitása*

A Florisil SPE oszlop adszorpciós jellemzői változhatnak, ha nem etanolt használnak stabilizátorként. Ha az előírt kloroform nem áll rendelkezésre, az adszorpciós tulajdonságokat a 10.3.-mal összhangban ellenőrizni kell.

10.3. *Validálás*

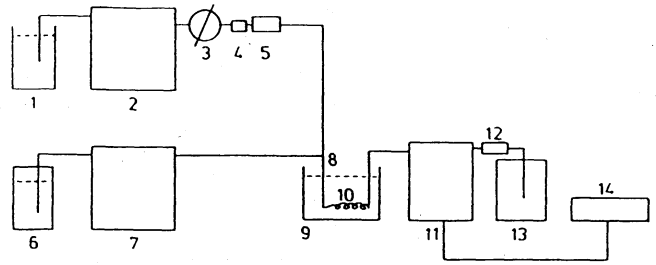
A módszer helyes alkalmazásáról hiteles anyagmintákon végzett ismételt vizsgálatokkal kell meggyőződni. Ha ilyenek nem állnak rendelkezésre, akkor fortifikált aflatoxinmentes mintákon végzett visszanyerési kísérletekkel kell ellenőrizni a módszer működését. Az eredmények átlagának eltérése a valós értéktől –20 és +10 % közé essen (a valós érték %-ában kifejezve).

▼M2



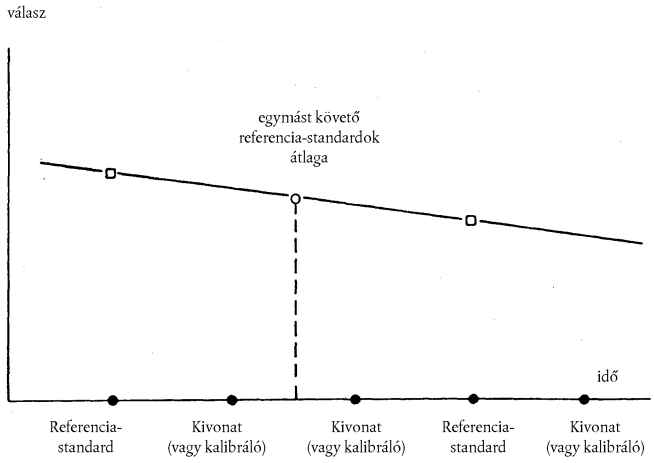
1. ábra: Oszlopkészlet összeszerelése

▼**M2**



1. HPLC eluens
2. HPLC pumpa
3. Injektor
4. Előtétoszlop
5. HPLC analitikai oszlop
6. Telített jódoldat
7. Reagens pumpa
8. T-csatlakozó
9. Termosztát (60 °C)
10. Reaktorcső
11. Fluoreszcens detektor
12. Szűkítőelem (restrictor)
13. Hulladék
14. Rekorder/integrátor

2. ábra: A jóddal végzett származékképzéssel történő folyadékkromatográfiás meghatározás rendszerének folyamatábrája



3. ábra: A hőmérséklet-változás figyelembevétele az aflatoxin B1 válaszban referencia kalibrálóoldat (3.13.3.) rendszeres időközönként történő injektálásával

▼**M3**

C. AZ A. ÉS B. MÓDSZERRE VONATKOZÓ ÉSZREVÉTELEK

1. **Zsírtalanítás**

Az 5 % nál több zsírt tartalmazó mintákat az 5.1. pontban leírt előkészítés után petroléterrel (fp 40–60 °C) zsírtalanítani kell.

Ilyen esetekben az analízis eredményét a nem zsírtalanított minta tömegére vonatkozóan kell kifejezni.

2. **Az A. módszer eredményeinek reprodukálhatósága**

Az eredmények reprodukálhatóságának, vagyis az azonos mintából, két vagy több laboratórium által kapott eredmények közötti eltérés becsült értékei a következők:

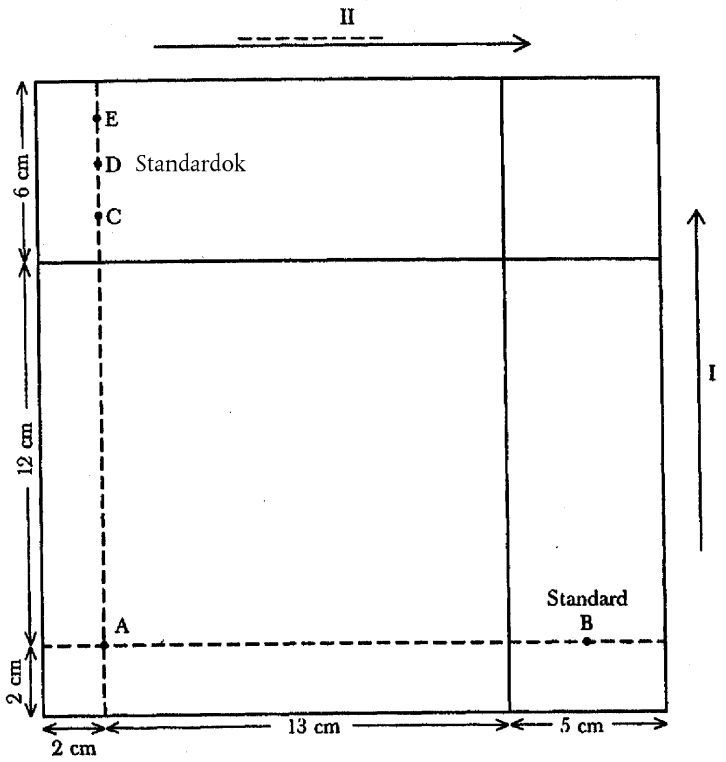
A középérték ± 50 %-a, ha aflatoxin B_1 – re kapott középérték 10 – 20 μg/kg közé esik;

± 10 μg/kg az aflatoxin B_1 középérték, ha 20 – 50 μg/kg közé esik;

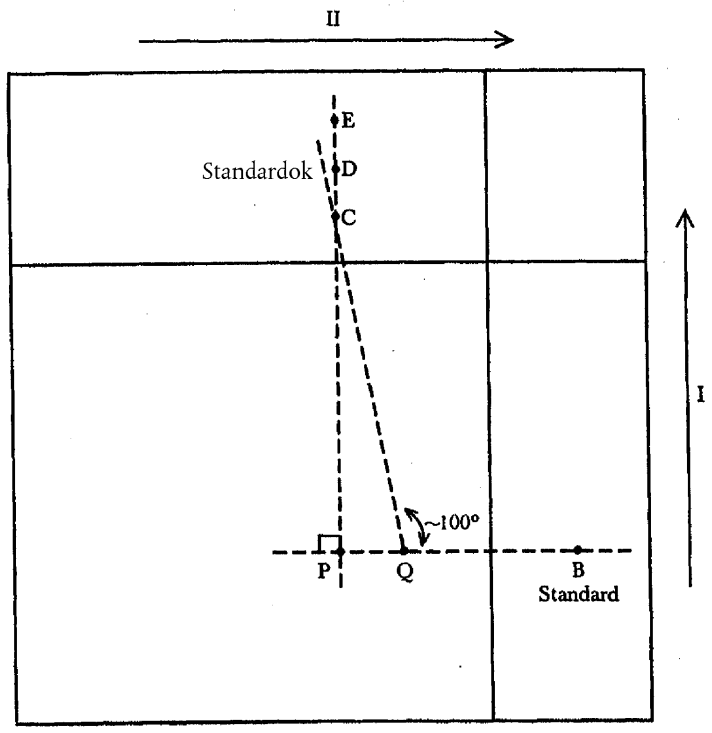
a középérték ± 20 %-a, ha az aflatoxin B_1 középérték több, mint 50 μg/kg.

▼B

A melléklet függeléke

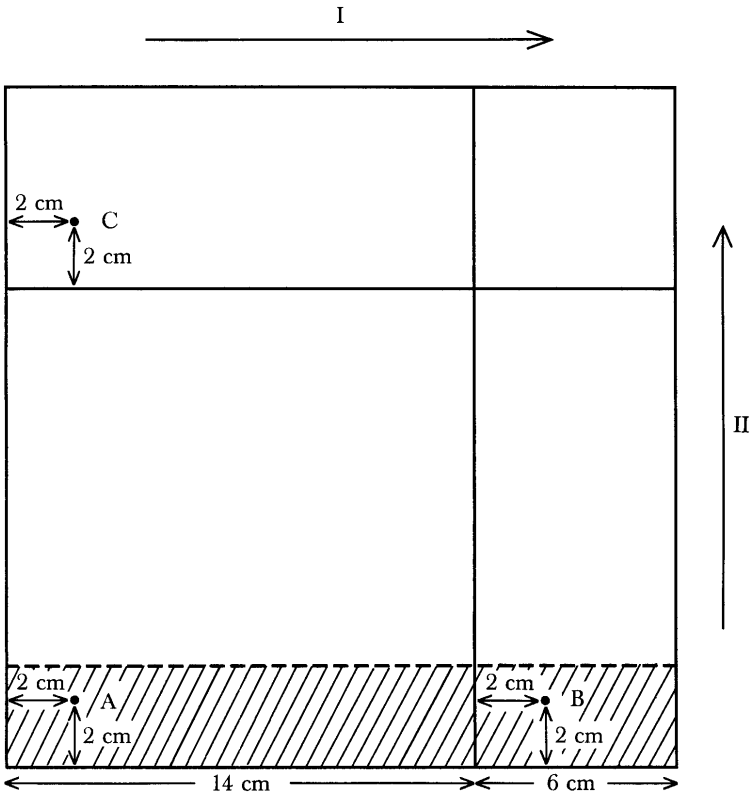


1. ábra



2. ábra

▼B



3. ábra