**Šis dokumentas yra skirtas tik informacijai, ir institucijos nėra teisiškai atsakingos už jo turinį**

►**B**

# SEPTINTOJI KOMISIJOS DIREKTYVA

**1976 m. kovo 1 d.**

**nustatanti oficialiai pašarų kontrolei taikytinus Bendrijos analizės metodus**

(76/372/EEB)

(OL L 102 , 15.4.1976, p. 8)

iš dalies keičiamas:

| | | Oficialusis leidinys | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Nr. | puslapis | data |
| ►**M1** | Komisijos direktyva 1981 m. liepos 30 d. | L 246 | 32 | 29.8.1981 |
| ►**M2** | Komisijos direktyva 92/95/EEB 1992 m. lapkričio 9 d. | L 327 | 54 | 13.11.1992 |
| ►**M3** | Komisijos direktyva 94/14/EB 1994 m. kovo 29 d. | L 94 | 30 | 13.4.1994 |

▼B

# SEPTINTOJI KOMISIJOS DIREKTYVA

**1976 m. kovo 1 d.**

**nustatanti oficialiai pašarų kontrolei taikytinus Bendrijos analizės metodus**

(76/372/EEB)

EUROPOS BENDRIJŲ KOMISIJA,

atsižvelgdama į Europos ekonominės bendrijos steigimo sutartį,

atsižvelgdama į 1970 m. liepos 20 d. Tarybos direktyvą dėl Bendrijos mėginių paėmimo ir analizės metodų, taikomų oficialiai pašarų kontrolei, įvedimo ([1]), su paskutiniais pakeitimais, padarytais Prisijungimo aktu ([2]) ir ypač į jos 2 straipsnį,

kadangi ta direktyva reikalauja, kad siekiant patikrinti, kaip laikomasi įstatymais ir kitais teisės aktais patvirtintų nuostatų dėl pašarų kokybės ir sudėties reikalavimų, oficialios pašarų kontrolės atlikimui būtų taikomi Bendrijos mėginių paėmimo ir analizės metodai;

kadangi 1971 m. birželio 15 d. Komisijos direktyva 71/250/EEB ([3]), 1971 m. lapkričio 18 d. Komisijos direktyva 71/393/EEB ([4]), 1972 m. balandžio 27 d. Komisijos direktyva 72/199/EEB ([5]), 1972 m. gruodžio 5 d. Komisijos direktyva 73/46/EEB ([6]), 1974 m. kovo 25 d. Komisijos direktyva 74/203/EEB ([7]) ir 1974 m. gruodžio 20 d. Komisijos direktyva 75/84/EEB ([8]) jau nustatė keletą analizės metodų, taikomų Bendrijoje; atsižvelgiant į nuo to laiko padarytą pažangą, tikslinga priimti septintą metodų rinkinį;

kadangi priemonės, numatytos šioje direktyvoje, atitinka Pašarų nuolatinio komiteto nuomonę,

PRIĖMĖ ŠIĄ DIREKTYVĄ:

*1 straipsnis*

Valstybės narės reikalauja, kad, oficialiai tikrinant pašarus, aflatoksinui $B_1$ pašaruose nustatyti būtų taikomi šios direktyvos priede aprašyti analizės metodai.

▼M1

---

▼B

*2 straipsnis*

Valstybės narės ne vėliau kaip iki 1976 m. spalio 1 d. priima įstatymus ir kitus teisės aktus, kurie įgyvendina šią direktyvą. Apie tai jos nedelsdamos praneša Komisijai.

*3 straipsnis*

Ši direktyva skirta valstybėms narėms.

---

([1]) OL L 170, 1970 8 3, p. 2.
([2]) OL L 73, 1972 3 27, p. 14.
([3]) OL L 155, 1971 7 12, p. 13.
([4]) OL L 279, 1971 12 20, p. 7.
([5]) OL L 123, 1972 5 29, p. 6.
([6]) OL L 83, 1973 3 30, p. 21.
([7]) OL L 108, 1974 4 22, p. 7.
([8]) OL L 32, 1975 2 5, p. 26.

▼B

*PRIEDAS*

**AFLATOKSINO $B_1$ NUSTATYMAS**

A. VIENMATĖS PLONASLUOKSNĖS CHROMATOGRAFIJOS METODAS

▼M2

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Šiuo metodu nustatomas aflatoksino $B_1$ kiekis žaliavose ir paprastuosiuose pašaruose. Šio metodo negalima taikyti, kai yra citrusų išspaudų. Apatinė nustatymo riba yra 0,01 mg/kg (10 ppb).

Jei yra trukdančių medžiagų, analizę būtina pakartoti, taikant B metodą (efektyviąją skysčių chromatografiją).

▼B

2. **Metodo esmė**

Mėginys ekstrahuojamas chloroformu. Ekstraktas filtruojamas, alikvotinė filtrato dalis gryninama, taikant kolonėlinę chromatografiją su silikageliu. Eliuatas išgarinamas, likutis ištirpinamas tam tikrame chloroformo arba benzeno ir acetonitrilo mišinio tūryje. Su alikvotine šio tirpalo dalimi atliekama plonasluoksnė chromatografija (PSCh). Chromatogramą apšvietus UV spinduliais, aflatoksino $B_1$ kiekis nustatomas vizualiai arba fluorodensitometru, fluorescencijos intensyvumą lyginant su žinomo kiekio etaloninio aflatoksino $B_1$ fluorescencija. Iš pašarų ekstrahuoto aflatoksino B1 identiškumas turi būti patvirtintas pagal pateikiamą procedūrą.

3. **Reagentai**

*NB*. Visi reagentai turi būti analiziškai gryni, jei nenurodyta kitaip.

3.1. Acetonas.

3.2. Chloroformas, stabilizuotas 0,5–1,0 % etanolio 96 % (v/v) tirpalu.

3.3. *n*-heksanas.

3.4. Metanolis.

3.5. Bevandenis dietileteris, neturintis peroksidų.

3.6. Benzeno ir acetonitrilo mišinys: 98/2 (v/v).

3.7. Chloroformo (3.2) ir metanolio (3.4) mišinys: 97/3 (v/v).

3.8. Silikagelis chromatografijai kolonėlėje, dalelių dydis 0,05–0,20 mm.

3.9. Higroskopinė vata, prieš tai nuriebalinta chloroformu, arba stiklo vata.

3.10. Natrio sulfatas, bevandenis, granuliuotas.

3.11. Inertinės dujos, pvz., azotas.

3.12. Druskos rūgšties 1 N tirpalas.

3.13. Sieros rūgšties 50 % (v/v) tirpalas.

3.14. Diatomitas (arba Hyflo Super Cel), išplautas rūgštyje.

3.15. Silikagelis G-HR arba panašus, skirtas plonasluoksnei chromatografijai (PSCh).

3.16. Standartinis apie 0,1 μg/ml aflatoksino tirpalas chloroforme (3.2) arba benzeno/acetonitrilo mišinyje (3.6), paruoštas ir patikrintas, kaip nurodyta 7 punkte.

3.17. Kokybiniam patikrinimui naudojamas standartinis tirpalas chloroforme (3.2) arba benzeno/acetonitrilo mišinyje (3.6), kuriame aflatoksino $B_1$ ir $B_2$ koncentracija būtų maždaug 0,1 μg/ml. Šios koncentracijos yra tik orientacinės. Jos turi būti parenkamos taip, kad abiem aflatoksinams būtų gaunamas toks pats fluorescencijos intensyvumas.

3.18. *Tirpiklių sistemos atskyrimui:*

3.18.1. chloroformas (3.2)/acetonas (3.1): 9/1 (v/v), chromatografinė kamera neprisotinama tirpiklių garais;

3.18.2. dietileteris (3.5)/metanolis (3.4)/vanduo: 96/3/1 (v/v/v), chromatografinė kamera neprisotinama tirpiklių garais;

▼B

3.18.3. dietileteris (3.5)/metanolis (3.4)/vanduo: 94/4,5/1,5 (v/v/v), chromatografinė kamera prisotinama tirpiklių garais;

3.18.4. chloroformas (3.2)/metanolis (3.4): 94/6 (v/v), chromatografinė kamera prisotinama tirpiklių garais;

3.18.5. chloroformas (3.2)/metanolis (3.4): 97/3 (v/v), chromatografinė kamera prisotinama tirpiklių garais.

4. **Įranga**

4.1. Laboratorinis malūnas.

4.2. Purtyklė arba magnetinis maišiklis.

4.3. Klostuotas filtro popierius, *Schleicher und Schüll*, Nr. 588 arba panašus, 24 cm skersmens.

4.4. Stiklinis vamzdis chromatografijai (vidinis skersmuo 22 mm, ilgis 300 mm) su PTFE čiaupu ir 250 ml tūrio talpa.

4.5. Sukamasis vakuuminis garintuvas su 500 ml tūrio apvaliadugne kolba.

4.6. 500 ml tūrio konusinės kolbos su šlifo kamščiais.

4.7. Įtaisas plonasluoksnei chromatografijai.

4.8. Stiklinės plokštelės plonasluoksnei chromatografijai atlikti, matmenys 200 mm × 200 mm, paruošiamos tokiu būdu (nurodyto kiekio užtenka padengti penkioms plokštelėms). Į konusinę kolbą įberiama 30 g silikagelio G-HR (3.15). Įpilama 60 ml vandens, kolba užkemšama ir kratoma vieną minutę. Suspensija paskleidžiama ant plokštelių, kad susidarytų vienodo 0,25 mm storio sluoksnis.

Plokštelės paliekamos džiūti ore, po to dedamos į eksikatorių su silikageliu. Prieš pat naudojimą plokštelės aktyvuojamos, laikant džiovinimo spintoje vieną valandą 110 °C temperatūroje. Tinka gatavos plokštelės, jei su jomis gaunami tokie patys rezultatai kaip su paruoštomis nurodytu būdu.

4.9. Ilgųjų bangų (360 nm) UV lempa. Spinduliavimo intensyvumas turi būti toks, kad plonasluoksnės chromatografijos plokštelėje 10 cm atstumu nuo lempos būtų matoma dėmė, palikta 1 ng aflatoksino $B_1$.

4.10. 10 ml tūrio graduoti mėgintuvėliai su polietileniniais kamščiais.

4.11. UV spektrofotometras.

4.12. Fluordensitometras (nebūtinas).

5. **Darbo procedūra**

5.1. *Mėginio paruošimas (žr. skyrių „Pastabos“, C dalis, 1 punktas)*

Mėginys sumalamas taip, kad jis visas persisijotų per sietą su 1 mm skersmens akutėmis. (pagal ISO R 565 rekomendaciją).

5.2. *Ekstrahavimas*

Į konusinę 500 ml talpos (4.6) kolbą dedama 50 g sumalto homogenizuoto mėginio. Įberiama 25 g diatomito (3.14), įpilama 25 ml vandens ir 250 ml chloroformo (3.2). Kolba užkemšama, 30 minučių kratoma arba maišoma ant purtyklės (4.2), turinys filtruojamas per klostuotą filtro popierių (4.3). Pirmieji 10 ml filtrato išpilami, po to surenkama 50 ml.

5.3. *Gryninimas kolonėlėje*

Į chromatografijai skirto vamzdžio (4.4) apačią įkišamas vatos arba stiklo vatos kamštis (3.9), du trečdaliai kolonėlės užpildoma chloroformu (3.2) ir įdedama 5 g natrio sulfato (3.10).

Patikrinama, ar viršutinis natrio sulfato sluoksnio paviršius yra lygus, mažomis dalimis įberiama 10 g silikagelio (3.8). Po kiekvienos įbertos silikagelio dalies vamzdis oro burbuliukams pašalinti atsargiai papurtomas. Paliekama stovėti 15 minučių ir atsargiai įdedama 15 g natrio sulfato (3.10). Skysčio išleidžiama tiek, kad jo būtų tik truputį virš natrio sulfato sluoksnio viršaus.

Pagal 5.2 punktą surinkto 50 ml ekstrakto sumaišoma su 100 ml *n*-heksano (3.3) ir mišinys kiekybiškai supilamas į kolonėlę. Skysčio išleidžiama tiek, kad jo liktų truputį virš natrio sulfato sluoksnio viršaus. Šis praplovimo skystis išpilamas. Toliau įpilama 100 ml dietileterio (3.5) ir vėl skystis išleidžiamas, kol jo lygis pasiekia natrio sulfato sluoksnio

▼B

viršų. Šių veiksmų metu reikia žiūrėti, kad debitas būtų 8–12 ml per minutę ir kad skystis iš kolonėlės neištekėtų visas. Ištekantis skystis išpilamas. Toliau plaunama 150 ml chloroformo/metanolio mišiniu (3.7), visas eliuatas surenkamas.

Pastarasis sukamajame vakuuminiame garintuve (4.5) inertinių dujų (3.11) aplinkoje išgarinamas beveik iki sauso likučio, temperatūrai neleidžiant pakilti virš 50 °C. Naudojant chloroformą (3.2) arba benzeno ir acetonitrilo mišinį (3.6), likutis kiekybiškai supilamas į 10 ml graduotą mėgintuvėlį (4.10). Tirpalas inertinių dujų (3.11) srovėje koncentruojamas ir chloroformu (3.2) arba benzeno ir acetonitrilo mišiniu (3.6) praskiedžiamas iki 2 ml.

5.4. *Plonasluoksnė chromatografija*

Ant plonasluoksnei chromatografijai skirtos plokštelės (4.8) 2 cm atstumu nuo apatinio krašto ir 2 cm tarpais užlašinami žemiau nurodyti standartinio tirpalo ir ekstrakto tūriai:

— 10, 15, 20, 30 ir 40 µl standartinio aflatoksino $B_1$ tirpalo (3.16),

— 10 µl pagal 5.3 punktą gauto ekstrakto ir *toje pačioje vietoje ant viršaus* 20 µl standartinio tirpalo (3.16),

— 10 ir 20 µl pagal 5.3 punktą gauto ekstrakto.

Chromatografuojama tamsoje viena iš tirpiklių sistemų (3.18). Tirpiklių sistema pasirenkama iš anksto, ant plokštelės užlašinant 25 µl kokybiniam patikrinimui naudojamo standartinio tirpalo (3.17). Tikrinama, ar po chromatografavimo aflatoksinas $B_1$ ir $B_2$ yra visiškai atsiskyrę.

Tirpikliai išgarinami tamsoje, po to plokštelė apšviečiama UV lempa (4.9), esančia 10 cm atstumu. Aflatoksino $B_1$ dėmės fluorescuoja žydra spalva.

5.5. *Kiekybiniai nustatymai*

Nustatoma vizualiai arba fluordensitometru, kaip nurodyta toliau.

5.5.1. Vizualūs matavimai

Aflatoksino $B_1$ kiekis ekstrakte nustatomas lyginant ekstrakto dėmių fluorescencijos intensyvumą su vienos iš standartinių tirpalų dėmių fluorescencijos intensyvumu. Prireikus daroma interpoliacija. Fluorescencija dėmės, kuri buvo gauta ant ekstrakto viršaus užlašinant standartinio tirpalo, turi būti intensyvesnė negu dėmės su 10 µl ekstrakto fluorescencija ir turi būti ne daugiau kaip viena matoma dėmė. Jei dėmės su 10 µl ekstrakto fluorescencijos intensyvumas yra didesnis nei dėmės su 40 µl etaloninio tirpalo, ekstraktas, prieš jį iš naujo chromatografuojant plonasluoksnės chromatografijos metodu, 10 arba 100 kartų praskiedžiamas chloroformu (3.2) arba benzeno ir acetonitrilo mišiniu (3.6).

5.5.2. Matavimai fluordensitometru

Aflatoksino $B_1$ dėmių fluorescencijos intensyvumas matuojamas fluorodensitometru (4.12), esant 365 nm sužadinimo bangos ilgiui ir 443 nm emisijos bangos ilgiui. Aflatoksino $B_1$ kiekis ekstrakto dėmėse nustatomas palyginant jų fluorescencijos intensyvumą su standartinių tirpalų dėmių fluorescencijos intensyvumu.

5.6. *Aflatoksino $B_1$ tapatumo patvirtinimas*

Aflatoksino $B_1$ buvimas ekstrakte patvirtinamas toliau nurodytais metodais.

5.6.1. Poveikis sieros rūgštimi

Pagal 5.4 punktą gauta chromatograma apipurškiama sieros rūgšties tirpalu (3.13). Ultravioletinėje šviesoje aflatoksino $B_1$ fluorescencija iš žydros turi pasikeisti į geltoną.

5.6.2. Dvimatė chromatografija, apimanti susidariusio aflatoksino $B_1$ hemiacetalio (aflatoksino $B_{2a}$) atskyrimą

*NB*. Toliau aprašomi veiksmai turi būti atliekami tiksliai pagal 3 paveiksle pavaizduotą brėžinį.

5.6.2.1. Tirpalų panaudojimas

Plokštelėje (4.8) tirpiklio sklidimui apriboti braukiamos dvi tiesės, lygiagrečios gretimiems kraštams (6 cm nuo atitinkamo krašto). Kapiliarine pipete ar mikrošvirkštu užlašinami tokie tirpalai:

— *A taške*: toks išgryninto mėginio ekstrakto (5.3) tūris, kuriame būtų apie 2,5 ng aflatoksino $B_1$,

▼B

— *B ir C taškuose*: 25 µl standartinio tirpalo (3.16).

5.6.2.2. Atskyrimas

Chromatografuojama tamsoje I kryptimi, su tirpiklių sistema (3.18.1) (1 cm storio sluoksnis kamera tirpiklio garais neprisotinama), kol tirpiklio frontas pasiekia tirpiklio kilimą ribojančią liniją.

Plokštelė išimama iš chromatografinės kameros, penkioms minutėms kambario temperatūroje paliekama džiūti tamsoje. Toliau druskos rūgštimi (3.12) apipurškiama 2,5 cm aukščio juosta, dengianti taškus A ir B, kol patamsės (3 paveiksle parodyta užbrūkšniuotu plotu). Likusi plokštelės dalis apsaugoma stikline plokštele. Paliekama tamsoje reaguoti 10 minučių, po to, kambario temperatūroje džiovinama oro srove.

Po to, chromatografuojama tamsoje II kryptimi, su tirpiklių sistema (3.18.1) (1 cm storio sluoksnis kamera tirpiklio garais neprisotinama), kol tirpiklio frontas pasieks tirpiklio kilimą ribojančią liniją. Plokštelė išimama iš chromatografinės kameros ir džiovinama kambario temperatūroje.

5.6.2.3. Chromatogramos aiškinimas

Chromatograma analizuojama UV šviesoje (4.9) ir ieškoma toliau aprašytų požymių.

a) Žydros aflatoksino $B_1$ fluorescencijos dėmės, atsirandančios dėl C taške užlašinto standartinio tirpalo (migracija I kryptimi).

b) Žydros nereagavusio (su druskos rūgštimi) aflatoksino $B_1$ dėmės ir intensyvesnės žydros aflatoksino $B_1$ hemiacetalio fluorescencijos dėmės, atsirandančių dėl B taške užlašinto standartinio tirpalo (migracija II kryptimi).

c) Dėmių, atsirandančių dėl A taške užlašinto mėginio ekstrakto, kurios atitiktų aprašytąsias (b) punkte. Šių dėmių padėtį apsprendžia pirmiausia aflatoksino $B_1$ migracijos atstumas iš A taško I kryptimi (kaip standartinio tirpalo, užlašinto C taške) bei aflatoksino $B_1$ hemiacetalio migracijos atstumai nuo šios vietos II kryptimi (kaip ir standartinio tirpalo, užlašinto B taške). Hemiacetalio dėmių, gautų iš ekstrakto, ir iš B taške užlašinto standartinio tirpalo, fluorescencijos intensyvumas turi sutapti.

## 6. **Rezultatų apskaičiavimas**

6.1. *Pagal vizualinius matavimus*

Aflatoksino $B_1$ kiekis mikrogramais viename kg mėginio (milijardosios dalys) apskaičiuojamas pagal formulę:

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

kurioje:

Y ir X yra atitinkamai aflatoksino $B_1$ standartinio tirpalo (3.16) ir ekstrakto, turinčio panašų fluorescencijos intensyvumą, tūriai µl;

S = aflatoksino $B_1$ standartinio tirpalo (3.16) koncentracija µg/ml;

V = ekstrakto galutinis tūris µl, atsižvelgiant į visus darytus būtinus praskiedimus;

W = mėginio masė g, atitinkanti kolonėlėje gryninto ekstrakto tūrį.

6.2. *Matuojant fluordensitometru*

Aflatoksino $B_1$ kiekis mikrogramais viename kg mėginio apskaičiuojamas pagal formulę:

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

kurioje:

Y = ant plokštelės užlašinto ekstrakto tūris (10 arba 20 µl);

S = aflatoksino $B_1$ kiekis ng ekstrakto dėmėje (proporcingas paimtam tūriui Y), nustatytas pagal matavimus;

▼B

V = ekstrakto galutinis tūris µl, atsižvelgiant į visus darytus būtinus praskiedimus;

W = mėginio masė g, atitinkanti kolonėlėje gryninto ekstrakto tūrį.

7. **Standartinio tirpalo (3.16) paruošimas ir tikrinimas**

7.1. *Aflatoksino $B_1$ koncentracijos nustatymas*

Paruošiamas chloroforme (3.2) arba benzeno ir acetonitrilo mišinyje (3.6) pradinis standartinis aflatoksino $B_1$ tirpalas, kurio koncentracija 8–10 µg/ml. Spektrofotometru (4.11) nustatomas absorbcijos spektras 330–370 nm bangų ilgių intervale.

Tirpalo chloroforme optinis tankis (A) matuojamas esant bangos ilgiui 363 nm; jei tirpalas ruošiamas benzeno ir acetonitrilo mišinyje, matuojama esant 348 nm bangos ilgiui.

Aflatoksino B1 koncentracija mikrogramais viename tirpalo ml apskaičiuojama pagal žemiau pateikiamas formules:

$\frac{312 \cdot A \cdot 1\,000}{20600}$ , tirpalo chloroforme atveju;

$\frac{312 \cdot A \cdot 1\,000}{19800}$ , tirpalo benzeno ir acetonitrilo mišinyje atveju.

Darbiniam etaloniniam tirpalui, kuriame aflatoksino $B_1$ koncentracija būtų maždaug 0,1 µg/ml, gauti šis tirpalas tamsoje kiek reikia praskiedžiamas. Laikomas šaldytuve 4 °C temperatūroje, tirpalas patvarus dvi savaites.

7.2. *Chromatografinio grynumo tikrinimas*

Ant plokštelės (4.8) užlašinama 5 µl etaloninio tirpalo, kuriame yra 8–10 µg/ml aflatoksino $B_1$ (7.1). Chromatografuojama, kaip nurodyta 5.4 punkte. UV šviesoje chromatogramoje turi matytis tik viena dėmė ir neturi būti matoma jokių fluorescencijos požymių lašo pradinio uždėjimo vietoje.

8. **Pakartojamumas**

Skirtumas tarp dviejų rezultatų, gautų tam pačiam analitikui atliekant du lygiagrečius matavimus su tuo pačiu mėginiu, turi neviršyti:

— 25 % didžiausios vertės, kai aflatoksino $B_1$ kiekis 10–20 µg/kg,

— 5 µg, absoliučia verte, esant kiekiams 20–50 µg/kg,

— 10 % didžiausios vertės, kai aflatoksino $B_1$ daugiau kaip 50 µg/kg.

9. **Atkartojamumas**

Žr. C skyriaus „Pastabos“ 2 punktą.

▼M2

B. AFLATOKSINO B1 NUSTATYMAS. EFEKTYVIOSIOS SKYSČIŲ CHROMATOGRAFIJOS METODAS

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Šiuo metodu nustatomas aflatoksino B1 kiekis gyvūnų pašaruose, įskaitant pašarus, turinčius citrusų išspaudų. Apatinė nustatymo riba yra 0,001 mg/kg (1 ppb).

2. **Metodo esmė**

Ėminys ekstrahuojamas chloroformu. Ekstraktas filtruojamas ir alikvotinė filtrato dalis gryninama, naudojant *Florisil* kasetę ir vėliau C18 kasetę. Galutinis atskyrimas ir nustatymas atliekamas efektyviosios skysčių chromatografijos (HPLC) metodu, naudojant atvirkštinių fazių C18 kolonėlę, iš kurios išleidžiamas tirpalas veikiamas jodo vandeniniu tirpalu jodo dariniui gauti ir jo fluorescencinei analizei atlikti.

*Pastaba.*

Mikotoksinai yra labai toksiškos medžiagos. Veiksmai su jomis turėtų būti atliekami tam skirtoje traukos spintoje. Dėl toksinų elektrostatinės prigimties, taigi dėl jų polinkio disperguotis darbo aplinkoje, reikėtų imtis specialių atsargumo priemonių, kai jie yra sausu pavidalu.

▼M2

3. **Reagentai**

3.1. Chloroformas, stabilizuotas 0,5–1,0 % masės etanolio tirpalu. Žr. 10.2.

3.2. HPLC grynumo metanolis, skirtas ruošti 3.6.

3.3. Acetonas.

3.4. HPLC grynumo acetonitrilas.

3.5. Eliuentai: reikia ruošti dieną iki naudojimo arba ultragarsu šalinti iš jų orą.

3.5.1. Acetono (3.3) ir vandens mišinys, 98 + 2 (V + V).

3.5.2. Vandens ir metanolio (3.2) mišinys, 80 + 20 (V + V).

3.5.3. Vandens ir acetono (3.3) mišinys, 85 + 15 (V + V).

3.6. HPLC judančioji fazė:

Vandens, metanolio (3.2) ir acetonitrilo (3.4) mišinys, 130 + 70 + 40 (V + V + V).

N.B.Judančiosios fazės tirpiklių sudėtį gali tekti keisti, atsižvelgiant į naudojamos HPLC kolonėlės charakteristikas.

3.7. Sotusis jodo tirpalas: į 400 ml vandens įdedama 2 g jodo. Maišoma mažiausiai 90 min ir filtruojama per membraninį filtrą (4.15). Sotųjį tirpalą reikia saugoti nuo šviesos, kad nevyktų fotoskaidymas.

3.8. Rūgštimi plautas *Celite 545* arba jo atitikmuo.

3.9. *Florisil* kasetė (*Waters SEP-PAK*) arba jos atitikmuo.

3.10. $C_{18}$ kasetė (*Waters SEP-PAK*) arba jos atitikmuo.

3.11. Inertinės dujos, pvz., azotas.

3.12. Etaloninis 10 µg/ml koncentracijos aflatoksino $B_1$ tirpalas chloroforme. Tirpalo koncentracija tikrinama taip: spektrofotometru matuojamas tirpalo sugerties spektras 330–370 nm bangų ilgių srityje (4.23). Optinis tankis (A) matuojamas arti didžiausios sugerties bangos ilgio — 363 nm. Aflatoksino $B_1$ koncentracija mikrogramais viename tirpalo ml apskaičiuojama pagal formulę:

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

3.12.1. Aflatoksino $B_1$ pradinis etaloninis tirpalas chloroforme.

2,5 ml aflatoksino $B_1$ etaloninio tirpalo (3.12) kiekybiškai įpilama į 50 ml matavimo kolbą ir skiedžiama iki žymės chloroformu (3.1). Šis tirpalas laikomas vėsioje vietoje (4 °C) tamsoje, sandariai uždarytas ir įvyniotas į aliuminio foliją.

3.13. Aflatoksino $B_1$ HPLC kalibravimo tirpalai.

N.B. Šiems tirpalams ruošti naudojami rūgštimi išplauti stikliniai indai (žr. 4 skyrių „Aparatūra“).

3.13.1. Kalibravimo tirpalas, 4 ng/ml.

Į aliuminio foliją įvyniota matavimo kolba su pradiniu etaloniniu tirpalu (3.12.1) paliekama sušilti iki kambario temperatūros (keletą valandų). 400 µl pradinio etaloninio tirpalo (200 ng aflatoksino B1) įpilama į 50 ml matavimo kolbą ir tirpalas išgarinamas iki sauso likučio inertinių dujų (3.11) srovėje.

Gautas likutis ištirpinamas maždaug 20 ml vandens/acetono mišinyje (3.5.3), skiedžiama iki žymės vandens/acetono mišiniu (3.5.3) ir gerai sumaišoma.

3.13.2. Kalibravimo tirpalas, 3 ng/ml.

7,5 ml kalibravimo tirpalo (3.13.1) kiekybiškai įpilama į 10 ml matavimo kolbą, skiedžiama iki žymės vandens/acetono mišiniu (3.5.3) ir gerai sumaišoma.

3.13.3. Kalibravimo tirpalas, 2 ng/ml.

▼M2

25 ml kalibravimo tirpalo (3.13.1) įpilama į 50 ml matavimo kolbą, skiedžiama iki žymės vandens/acetono mišiniu (3.5.3) ir gerai sumaišoma.

Be to, šis tirpalas vadinamas pamatiniu etalonu, skirtas kartotiniam įpurškimui, kai atliekama HPLC analizė (5.5).

3.13.4. Kalibravimo tirpalas, 1 ng/ml.

2,5 ml kalibravimo tirpalo (3.13.1) įpilama į 10 ml matavimo kolbą, skiedžiama iki žymės vandens/acetono mišiniu (3.5.3) ir gerai sumaišoma.

3.14. Ampulė su aflatoksinų $B_1$, $B_2$, $G_1$ ir $G_2$ mišiniu 1 ml chloroformo, kurių koncentracija yra maždaug 1, 0,5, 1 ir 0,5 µg/ml.

3.14.1. Chromatografinio atskyrimo tikrinimo tirpalas.

Ampulės (3.14) turinys supilamas į mėgintuvėlį su šlifo kamščiu arba į užsukamu kamščiu uždaromą buteliuką. 40 µl šio tirpalo įpilama į mėgintuvėlį su šlifo kamščiu (išplautą rūgštimi) (4.22). Chloroformas išgarinamas inertinių dujų srovėje (3.11) ir vėl ištirpinamas 10 ml vandens/acetono mišinio (3.5.3).

3.15. Reagentai patvirtinančiajam tyrimui (6).

3.15.1. Sotusis natrio chlorido tirpalas.

3.15.2. Natrio sulfatas, bevandenis, granuliuotas.

4. **Aparatūra**

*Įspėjimas*: vandeniniams aflatoksino tirpalams naudojant rūgštimi neišplautus stiklinius indus galima patirti nuostolių. Ypač atsargiai reikėtų elgtis su naujais stikliniais indais ir vienkartiniais stikliniais indais, pvz., automatinių ėmiklių buteliukais ir *Pasteur* pipetėmis. Todėl laboratoriniai stikliniai indai, kurie liečiasi su vandeniniais aflatoksinų tirpalais kelias valandas turėtų būti laikomi praskiestoje rūgštyje (pvz., 2 mol/l sieros rūgštyje), vėliau gerai išplaunami distiliuotu vandeniu, kad neliktų jokių rūgšties pėdsakų (pvz., tris kartus, tikrinama naudojant pH indikatorinį popierių). Praktiškai toks apdorojimas yra būtinas apvaliadugnėms kolboms (4.4), matavimo kolboms, matavimo cilindrams, buteliukams arba mėgintuvėliams, naudojamiems kalibravimo tirpalams arba gautiems ekstraktams (ypač automatinių ėmiklių buteliukams) ir *Pasteur* pipetėms, jei šie indai naudojami kalibravimo tirpalams arba ekstraktams įpilti.

4.1. Laboratorinis malūnas.

4.2. Sietas, kurio akučių dydis 1,0 mm (ISO R 565).

4.3. Mechaninė purtyklė.

4.4. Sukamasis vakuuminis garintuvas ir 150–250 ml apvaliadugnė kolba.

4.5. Chromatografas efektyviajai skysčių chromatografijai, inžektorius su kilpa, kuriuo galima įpurkšti 250 µl. Kaip iš dalies arba visiškai užpildyti kilpą, žr. gamintojų instrukcijas.

4.6. HPLC analizės kolonėlė: 3 µm arba 5 µm $C_{18}$ užpildas.

4.7. Nepulsuojantis siurblys jodo reagentui į tirpalą po kolonėlės tiekti.

4.8. Nulinio neveikiojo tūrio *Valco* trišakis iš nerūdijančiojo plieno (1/16" × 0,75 mm).

4.9. Reakcijos kapiliarinis gyvatukas iš teflono arba iš nerūdijančiojo plieno. Nustatyta, kad 5 µm arba 3 µm HPLC kolonėlėms tinka gyvatuko matmenys 3 000 × 0,5 mm — 5 000 × 0,5 mm.

4.10. Reguliuojamos temperatūros vandens vonia, nustatyta 60 °C, kurios temperatūrą būtų galima reguliuoti tiksliau kaip 0,1 °C.

4.11. Fluorescencinis detektorius, kurio sužadinimo bangos ilgis 365 nm, emisijos — 435 nm. (aparatams su filtru: emisijos bangos ilgis > 400 nm). Apatinė radimo riba — bent 0,05 ng aflatoksino B1. Rekomenduojama detektoriaus išėjime sukurti nedidelį priešslėgį (pvz., naudojant slėgio ribotuvą, gyvatuką iš teflono arba nerūdijančiojo plieno), kad būtų galima slopinti oro burbuliukų susidarymą matavimo kameroje.

4.12. Savirašis.

4.13. Elektroninis integratorius (neprivalomas).

▼M2

4.14. Rievėtas filtravimo popierius: 24 cm, *Macherey-Nagel 617* 1/4 arba atitikmuo.

4.15. Membraninis filtras, porų dydis 0,45 μm, *Millipore HAWP 04700* arba atitikmuo.

4.16. 500 ml kūginė kolba su šlifo kamščiu.

4.17. Stiklo kolonėlė (vidinis skersmuo maždaug 1 cm, ilgis maždaug 30 cm), su *Luer* antgaliu.

4.18. Chloroformui atsparus *Luer* čiaupas (pvz., Bio-rad 7328017, Analytichem A1 6078, J.T. Baker 4514 arba atitikmuo).

4.19. Chemiškai atsparus 10 ml švirkštas su *Luer* antgaliu.

4.20. Švirkštas 250 μl įpurkšti, vykdant HPLC analizę (žr. 4.5).

4.21. 100 μl mikrošvirkštas kalibravimo tirpalams ruošti (svėrimo būdu tikrinama, ar jo tikslumas lygus 2 %).

4.22. 10 ml kalibravimo tirpalų mėgintuvėliai su šlifo kamščiu.

4.23. Spektrofotometras, tinkamas matuoti spektro UV srityje.

4.24. Patvirtinamojo tyrimo įranga (6).

4.24.1. Rūgštimi išplautas 100 ml dalijamasis piltuvas su čiaupu iš teflono.

4.24.2. Kaitinimo blokas, 40–50 °C.

5. **Darbo eiga**

5.1. *Ėminio ruošimas*

Ėminys malamas, kad jį būtų galima nusijoti per sietą (4.2).

5.2. *Mėginys*

Pasveriama 50 g paruošto ėminio ir supilama į kūginę kolbą (4.16).

5.3. *Ekstrahavimas*

Į mėginį įpilama 25 g *Celite* (3.8), 250 ml chloroformo (3.1) ir 25 ml vandens (5.2). Kolba užkemšama ir 30 min purtoma mechanine purtykle (4.3). Filtruojama per rievėtą filtravimo popierių (4.14). Surenkama 50 ml filtrato. Prireikus imama alikvotinė dalis filtrato ir chloroformu skiedžiama iki 50 ml, kad aflatoksino B1 koncentracija būtų ne didesnė kaip 4 ng/ml.

5.4. *Gryninimas (procedūra turi būti atliekama be ilgesnių pertraukų).*

Įspėjimas:

— bandymų laboratorija turi būti tinkamai apsaugota nuo dienos šviesos. Efektyviai tai galima pasiekti taip:

  i) UV spindulius sugerianti folija ant langų, derinant su šviesos slopinimu (neturi būti tiesioginės saulės šviesos);

  ii) užuolaidos arba žaliuzės ir dirbtinis apšvietimas (tinka fluorescencinė lempa);

— aflatoksino turintys tirpalai turi būti kiek įmanoma apsaugoti nuo šviesos (laikomi tamsoje, naudojama aliuminio foliją).

5.4.1. *Florisil SEP-PAK* gryninimas

5.4.1.1. Kolonėlės ir kasetės sąrankos ruošimas

Prie trumpesnio *Florisil* kasetės galo (3.9) prijungiamas čiaupas (4.18) (žr. 1 paveikslą). Kasetė išplaunama ir pašalinamas oras, švirkštu (4.19) paimant 10 ml chloroformo (3.1), kurio 8 ml čiaupu greitai leidžiami per kasetę. Ilgesnis kasetės galas jungiamas prie stiklinės kolonėlės (4.17) ir likę 2 ml chloroformo per kasetę leidžiami į kolonėlę. Čiaupas uždaromas. Švirkštas išimamas.

5.4.1.2. Gryninimas

Pagal 5.3 surinktas filtratas supilamas į kolonėlės ir kasetės sąranką, iš kurios jis išteka, veikiamas sunkio jėgos. Plaunama 5 ml chloroformo (3.1), vėliau — 20 ml metanolio (3.2). Eliuatai išpilami. Atliekant šiuos veiksmus reikia užtikrinti, kad kolonėlės ir kasetės sąranka neliktų sausa.

▼M2

Aflatoksinas $B_1$ išplaunamas 40 ml acetono ir vandens mišinio (3.5.1) ir visas eliuatas surenkamas į sukamojo garintuvo apvaliadugnę kolbą (4.4). Esant 40–50 °C, eliuatas koncentruojamas sukamajame garintuve tol, kol baigiamas distiliuoti acetonas. (N.B. Tuo momentu kolboje lieka maždaug 0,5 ml skysčio. Bandymai parodė, kad tolesnis garinimas nekenkia ir kad 0,5 ml skysčio likutyje acetono nėra daug. Dėl acetono likučio galimi aflatoksino $B_1$ nuostoliai $C_{18}$ kasetėje). Įpilama 1 ml metanolio (3.2), kolba sukiojama, kad ištirptų ant kolbos sienelių esantis aflatoksinas $B_1$, įpilama 4 ml vandens ir sumaišoma. Kasetė atjungiama ir išmetama. Stiklinė kolonėlė skalaujama vandeniu ir paliekama $C_{18}$ gryninimo pakopai.

5.4.2. $C_{18}$ *SEP-PAK* gryninimas

5.4.2.1. Kolonėlės ir kasetės sąrankos ruošimas

Čiaupas (4.18) jungiamas prie trumpesnio $C_{18}$ kasetės galo (3.10) (žr. 1 pav). Kasetė užpildoma ir visas oras pašalinamas, naudojant švirkštą (4.19), iš kurio per čiaupą į kasetę greitai įleidžiama 10 ml metanolio (3.2) (oro burbuliukai kasetėje matomi kaip šviesios dėmelės pilkame fone). Imama 10 ml vandens ir 8 ml leidžiama per kasetę (reikia stengtis, kad į kasetę nepatektų oro, kai metanolis keičiamas vandeniu). Ilgesnis kasetės galas jungiamas prie stiklinės kolonėlės (4.17) ir likę 2 ml vandens leidžiami per kasetę, prijungtą prie kolonėlės. Čiaupas uždaromas. Švirkštas išimamas.

5.4.2.2. Gryninimas

Surinktas ekstraktas (5.4.1.2) kiekybiškai supilamas į stiklinę kolonėlę (4.17), kolba du kartus skalaujama 5 ml vandens/metanolio mišinio (3.5.2), ir ekstraktas išteka, veikiamas sunkio jėgos. Atliekant šiuos veiksmus reikia užtikrinti, kad kolonėlės ir kasetės sąranka neveiktų sausa. (Kai susiaurėjime prie kasetės susidaro oro burbuliukai, jiems pašalinti reikia sustabdyti srautą ir patapšnoti per stiklinės kolonėlės viršų. Tęsiama toliau). Plaunama 25 ml vandens/metanolio tirpalu. Eliuatas išpilamas. Aflatoksinas $B_1$ išplaunamas 50 ml vandens/acetono mišinio (3.5.3) ir visas eliuatas surenkamas į 50 ml matavimo kolbą. Skiedžiama vandeniu iki žymės ir sumaišoma: gautas tirpalas naudojamas chromatografijai (5.5).

*Įspėjimas.* *Paprastai prieš* atliekant HPLC galutinį ekstraktą filtruoti nebūtina. Jei manoma, kad filtravimas reikalaingas, celiuliozės filtrai neturi būti naudojami, kadangi gali būti aflatoksino $B_1$ nuostolių. Galima naudoti teflono filtrus.

5.5. *Efektyvioji skysčių chromatografija (HPLC)*

(Apie įrangos surinkimą žr. 2 paveikslą). Reikia skirti pakankamai laiko prietaisams kondicionuoti ir stabilizuoti.

*1 pastaba.*

Nurodyti judančiosios fazės ir po kolonėlės naudojamo reagento srautai yra tik orientaciniai. Juos reikia reguliuoti, atsižvelgiant į HPLC kolonėlės charakteristikas.

*2 pastaba.*

Detektoriaus atsakas į aflatoksiną $B_1$ priklauso nuo temperatūros, todėl būtina kompensuoti slinkį (dreifą) (žr. 3 pav). Reguliariais tarpais (pvz. kas trečią įpuškimą) įpurškiant nustatytą aflatoksino $B_1$ pamatinio etalono (3.13.3) kiekį, pagal vidutinį jo atsaką galima daryti aflatoksino $B_1$ smailės, esančios tarp šių pamatinių etalonų, vertės pataisą, jei gretimų pamatinių etalonų atsako skirtumas nėra didelis. Todėl įpurkšti reikia nepertraukiamai. Jei būtina nutraukti, paskutinį kartą prieš nutraukimą ir pirmą kartą po nutraukimo įpurškiama pamatinio etalono. Kadangi kalibravimo kreivė yra tiesinė ir eina per koordinačių pradžią, aflatoksino $B_1$ kiekiai mėginio ekstraktuose nustatomi tiesiogiai pagal gretimus etalonus.

5.5.1. HPLC siurblio parametrai

Naudojant judančiąją fazę (3.6), HPLC siurblys (4.5) nustatomas taip, kad srautas būtų 0,5 arba 0,3 ml/min atitinkamai 5 μm arba 3 μm HPLC kolonėlei (4.6).

▼M2

5.5.2. Po kolonėlės naudojamo reagento siurblio parametrai

Siurblys (4.7) nustatomas taip, kad sočiojo vandeninio jodo tirpalo (3.7) srautas būtų 0,2–0,4 ml/min. Apytikriai nurodymai: patartina maždaug 0,4 arba 0,2 ml/min srautus derinti atitinkamai su judančiosios fazės (3.6) 0,5 ir 0,3 ml/min srautais.

5.5.3. Fluorescencinis detektorius

Fluorescencinis detektorius (4.11) nustatomas taip, kad sužadinimas vyktų esant 365 nm, o emisija — 435 nm (prietaisas su filtru: > 400 nm). Detektoriaus silpnintuvas nustatomas taip, kad esant 1 ng aflatoksino $B_1$ savirašio plunksna pajudėtų maždaug 80 % viso skalės aukščio.

5.5.4. Inžektorius

Laikantis inžektoriaus gamintojo instrukcijų, visų tirpalų įpurškiama po 250 µl.

5.5.5. Chromatografinio atskyrimo patikrinimas

Įpurškiama chromatografinio atskyrimo tikrinimo tirpalo (3.14.1). Slėniai turėtų būti mažesni kaip 5 % gretimų smailių aukščių sumos.

5.5.6. Sistemos stabilumo patikrinimas

Prieš kiekvieną tyrimų seriją pamatinis etalonas (3.13.3) įpurškiamas tol, kol gaunamas pastovus smailės plotas (N.B. Aflatoksino $B_1$ atveju nuoseklių įpurškimų smailės neturėtų skirtis daugiau kaip 6 %). Toliau nedelsiant tikrinamas tiesiškumas (5.5.7).

5.5.7. Tiesiškumo tikrinimas

Įpurškiama aflatoksino $B_1$ kalibravimo tirpalų (3.13.1.–3.13.4). Atsako slinkio pataisai daryti kas trečią kartą įpurškiamas pamatinis etalonas (3.13.3) (N.B. Per 90 min šio pamatinio etalono smailės neturi skirtis daugiau kaip 10 %). Slinkio pataisa daroma pagal 7 skyriaus formulę. Kalibravimo kreivė turi būti tiesinė ir eiti per koordinačių pradžią, esant paklaidai mažesnei už dvigubą Y įverčio standartinį nuokrypį. Gauti dydžiai neturi skirtis daugiau kaip 3 % nuo vardinių dydžių. Jei šie reikalavimai vykdomi, nedelsiant tęsiama toliau. Jei ne, prieš dirbant toliau randamos ir pašalinamos problemos priežastys.

5.5.8. Mėginių ekstraktų įpurškimas

Įpurškiami išgryninti mėginių ekstraktai (5.4.2.2). Po dviejų mėginių ekstraktų įpurškiamas pamatinis etalonas (3.13.3) tokia seka: pamatinis etalonas, ekstraktas, ekstraktas, pamatinis etalonas, ekstraktas, ekstraktas, pamatinis etalonas ir t. t.

## 6. Patvirtinamasis tyrimas

6.1. *Tolesnis ekstrakto apdorojimas (5.4.2.2)*

Į galutinį ekstraktą, gautą 5.4.2.2, įpilama 5 ml natrio chlorido tirpalo (3.15.1). Ekstrahuojama dalijamajame piltuve (4.24.1) po vieną minutę tris kartus su 2 ml chloroformo (3.1). Sujungti chloroformo ekstraktai supilami į 10 ml mėgintuvėlį per maždaug 1 g natrio sulfato (3.15.2) sluoksnį. Galima naudoti mažą piltuvėlį (4 cm skersmens) su gabalėliu vatos susiaurėjimo vietoje, padengtu maždaug 1 g natrio sulfato.

Natrio sulfato sluoksnis plaunamas keliais ml chloroformo, o plovimo skystis surenkamas į tą patį mėgintuvėlį. Naudojant kaitinimo bloką (4.24.2), chloroformo ekstraktas garinamas iki sausojo likučio tame pačiame mėgintuvėlyje ir vėl tirpinamas 1 ml chloroformo.

6.2. *Darinio ruošimas ir plonasluoksnė chromatografija*

Žr. Tarybos direktyvos 76/372/EEB priedo A metodo 5.6.2. punktą.

## 7. Rezultatų apskaičiavimas

Mėginyje esančio aflatoksino $B_1$ kiekis (µg/kg) apskaičiuojamas pagal formulę:

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

kurioje:

m = aflatoksino $B_1$ kiekis ng, atitinkantis mėginio $B_1$ smailę, apskaičiuojamas taip:

▼**M2**

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

P(mėginio) = mėginio aflatoksino $B_1$ smailės plotas;

$P(st_1)$ = aflatoksino $B_1$ smailės plotas, gautas pirmiau įpurkštam pamatiniam etalonui (3.13.3);

$P(st_2)$ = aflatoksino $B_1$ smailės plotas, gautas vėliau įpurkštam pamatiniam etalonui (3.13.3);

r(st) = įpurkštas pamatinio etalono aflatoksino $B_1$ kiekis (3.13.3) ng;

$V_m$ = purškiamo mėginio ekstrakto tūris ml;

$V_{ext}$ = galutinis mėginio ekstrakto tūris, atsižvelgiant į pirmiau atliktą skiedimą (5.3), ml;

M = mėginio masė g

$V_f$ = iš *Florisil* kasetės (5.4.1.2) pernešto filtrato, tūris ml;

$V_c$ = chloroformo, naudojamo mėginiui ekstrahuoti, tūris ml.

Jei dirbama pagal šiame protokole nurodytą metodiką, formulė supaprastėja iki:

aflatoksino $B_1$ kiekis µg/kg = 20 × m.

7.1. Rezultatus taip pat galima apskaičiuoti matuojant smailės aukštį.

8. **Pakartojamumas**

Žr. 10.1.

9. **Atkuriamumas**

Žr. 10.1.

10. **Pastabos**

10.1. *Preciziškumas*

Tarplaboratoriniame tyrime ([1]), atliktame tarptautiniu lygiu su pašarų mišiniais, buvo gauti 1 lentelėje pateikti pakartojamumo ir atkuriamumo rezultatai. Vartojama sąvoka „pakartojamumas“ (r) apibrėžiamas kaip didžiausias santykis, kuris, esant 95 % tikimybės lygiui, nebėra reikšmingas lyginant du to paties mėginio rezultatus, gautus panašiomis sąlygomis vienoje laboratorijoje. Sąvoka atkuriamumas (R) apibrėžiama panašiai, lyginant dvi skirtingas laboratorijas. Be to, pagal ISO 3534:1977, 2.35 ([2]) ir Komisijos sprendimą 89/610/EEB ([3]), 1 lentelėje be r ir R pateikti jų variacijos koeficientai.

*1 lentelė*

**Pakartojamumas (r) ir atkuriamumas (R), išreikšti kaip santykiai ir atitinkami variacijos koeficientai**

(15 laboratorijų)

| Koncentracija | r | R | $CV_r$(*) | $CV_R$ |
|---|---|---|---|---|
| (µg/kg) | | | (%) | (%) |
| 8 ir 14 | 1,4 | 1,7 | 11 | 18 |

(*) CV = variacijos koeficientas.

([1]) Egmond, H.P. van, Heisterkamp, S.H. and Paulsch, W.E. (1991). Food Additives and Contaminants 8, 17–29.
([2]) ISO 3534:1977.
([3]) OL L 351, 1989 12 2, p. 39.

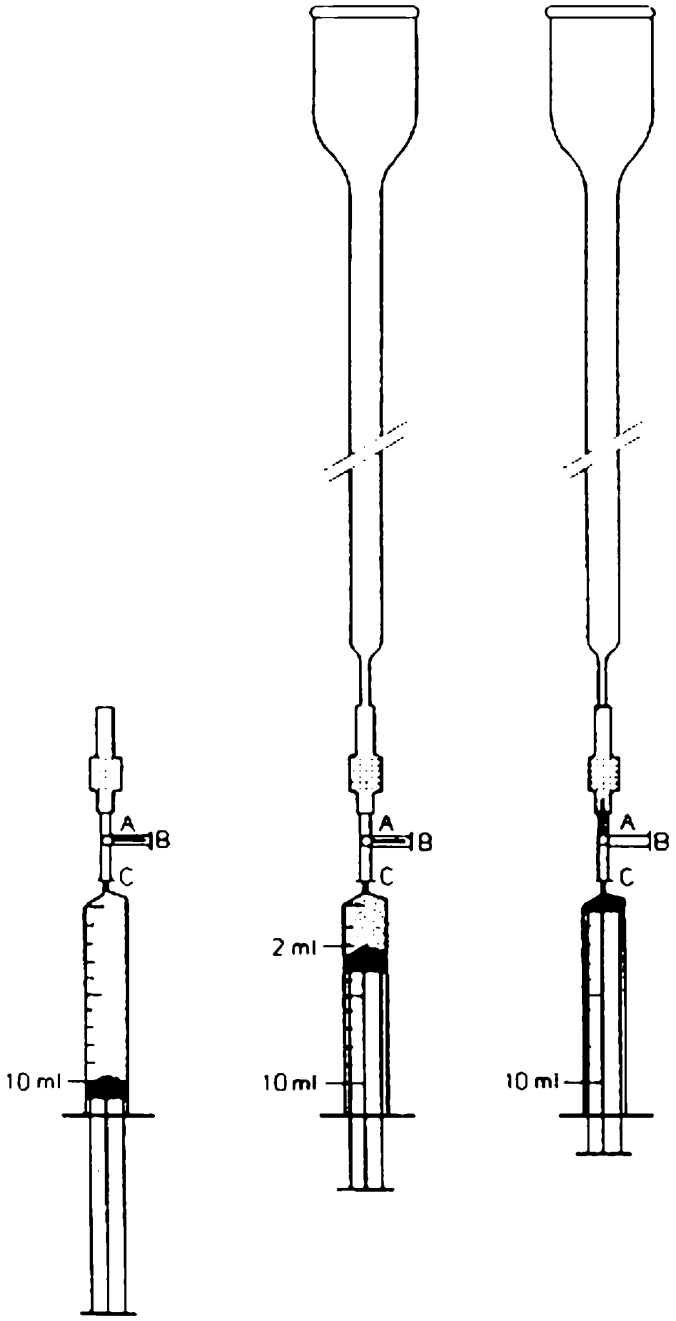
▼**M2**

10.2. *Chloroformo stabilizavimas (3.1)*

*Florisil* kasetės sugerties charakteristikos gali būti pakeistos, jei naudojamas ne etanolis, bet kiti stabilizatoriai. Tai reikia patikrinti pagal 10.3, kai neturima aprašytojo chloroformo.

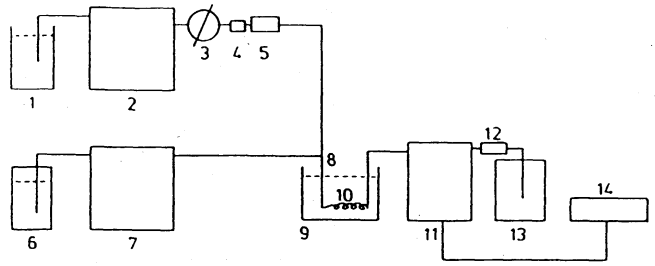
10.3. *Tikslumas*

Teisingas šio metodo taikymas patvirtinamas, atliekant kartotinus sertifikuotųjų pamatinių medžiagų matavimus. Jei jų neturima, metodo tinkamumas turėtų būti patikrinamas regeneravimo bandymais, daromais su sodrintais tuščiaisiais mėginiais. Vidurkio nuokrypis nuo tikrosios vertės, išreikštas tikrosios vertės procentine dalimi, turi atitikti ribines vertes nuo — 20 iki + 10 %.



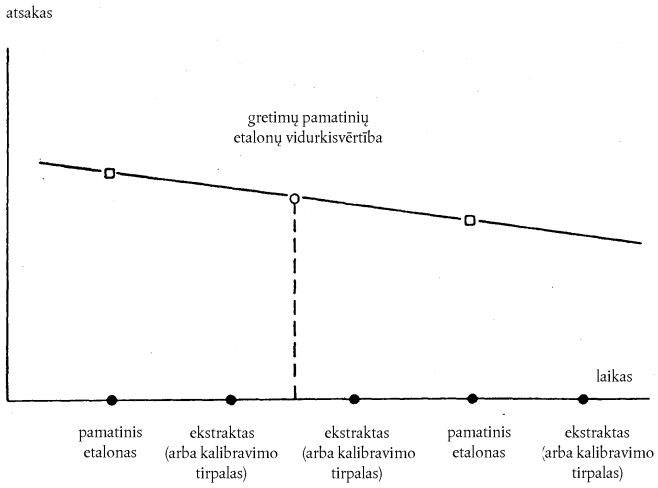

*1 paveikslas. Kolonėlės ir kasetės sąranka*

▼**M2**




1. judančioji fazė;
2. siurblys;
3. įšvirkštimo vožtuvas;
4. apsauginė kolonėlė;
5. HPLC analizės kolonėlė;
6. sotusis jodo tirpalas;
7. reagento siurblys;
8. trišakis;
9. reguliuojamos temperatūros vonia;
10. reakcijos kapiliarinis gyvatukas;
11. fluorescencinis detektorius;
12. ribotuvas;
13. atliekų indas;
14. sąvirašis/integratorius

*2 paveikslas. HPLC sistemos ir jodo darinio gamybos sistemos schema*




*3 paveikslas. Aflatoksino $B_1$ atsako slinkio kompensavimas, reguliariais intervalais įpurškiant pamatinio etalono (3.13.3)*

▼**M3**

C. PASTABOS, TAIKOMOS A IR B METODAMS

1. **Nuriebalinimas**

   Ėminiai, kuriuose yra daugiau kaip 5 % riebalų, po paruošimo pagal 5.1 punktą turi būti nuriebalinti petroleteriu (virimo temperatūra 40–60 °C).

   Tokiais atvejais analizės rezultatai turi būti apskaičiuojami nenuriebalinto ėminio masei.

2. **A metodo rezultatų atkuriamumas**

   Rezultatų atkuriamumas, t. y. dvejose ar daugiau laboratorijų tam pačiam ėminiui gautų rezultatų kintamumas yra įvertintas taip:

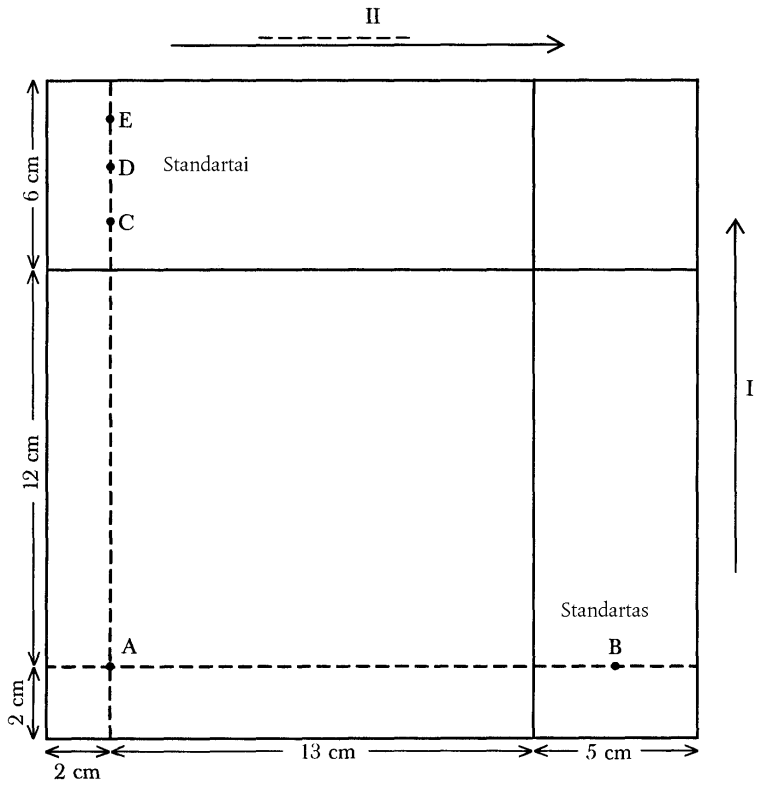
   ± 50 % vidutinės vertės, kai aflatoksino $B_1$ vidutinė vertė 10–20 μg/kg;

   ± 10 μg/kg vidutinės vertės, kai vidutinė vertė didesnė kaip 20–50 μg/kg;

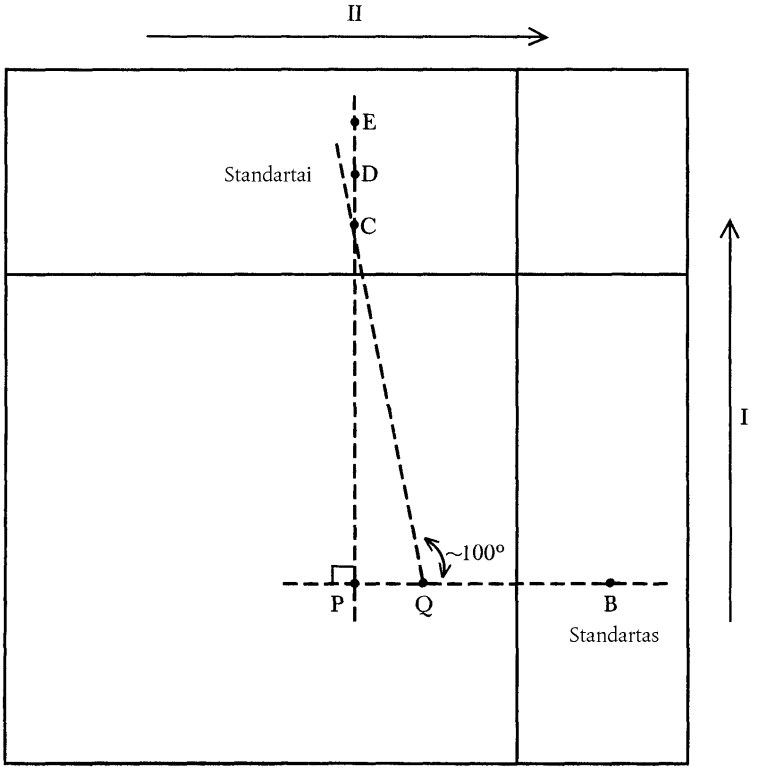
   ± 20 % vidutinės vertės, kai vidutinė vertė didesnė kaip 50 μg/kg.

▼B

*Priedo papildymas*

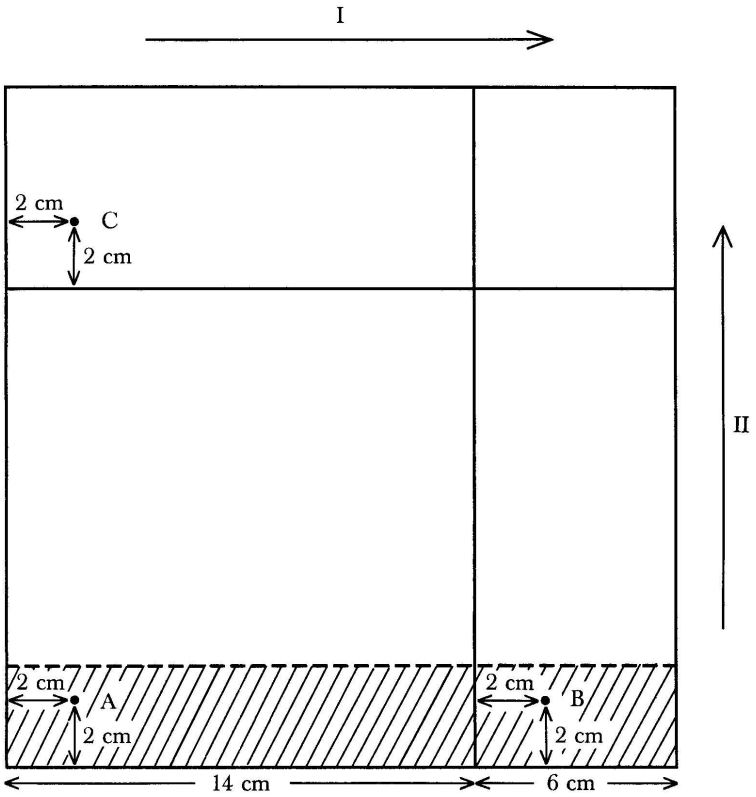



**1 paveikslas**




**2 paveikslas**

▼B




**3 paveikslas**