Šis dokuments ir izveidots vienīgi dokumentācijas nolūkos, un iestādes neuzņemas nekādu atbildību par tā saturu

►**B**

KOMISIJAS SEPTĪTĀ DIREKTĪVA

(1976. gada 1. marts),

ar ko nosaka Kopienas analīžu metodes barības oficiālajai kontrolei

(76/372/EEK)

(OV L 102 , 15.4.1976, lpp. 8)

Grozīta ar:

		Oficiālais Vēstnesis		
		Nr.	Lappuse	Datums
►**M1**	Komisijas Direktīva (1981. gada 30. jūlijs),	L 246	32	29.8.1981
►**M2**	Komisijas Direktīva 92/95/EEK (1992. gada 9. novembris),	L 327	54	13.11.1992
►**M3**	Komisijas Direktīva 94/14/EK (1994. gada 29. marts),	L 94	30	13.4.1994

▼B

KOMISIJAS SEPTĪTĀ DIREKTĪVA

(1976. gada 1. marts),

ar ko nosaka Kopienas analīžu metodes barības oficiālajai kontrolei

(76/372/EEK)

EIROPAS KOPIENU KOMISIJA,

ņemot vērā Eiropas Ekonomikas kopienas dibināšanas līgumu,

ņemot vērā Padomes 1970. gada 20. jūlija Direktīvu par paraugu ņemšanas un analīžu Kopienas metožu ieviešanu barības oficiālajai kontrolei ([1]), kurā jaunākie grozījumi izdarīti ar Pievienošanās aktu ([2]), un jo īpaši tās 2. pantu,

tā kā minētajā direktīvā ir prasīts veikt oficiālu barības kontroli, izmantojot paraugu ņemšanas un analīžu Kopienas metodes, lai pārbaudītu atbilstību prasībām, kas normatīvo un administratīvo aktu noteikumos paredzētas attiecībā uz barības kvalitāti un sastāvu;

tā kā ar Komisijas 1971. gada 15. jūnija Direktīvu 71/250/EEK ([3]), 1971. gada 18. novembra Direktīvu 71/393/EEK ([4]), 1972. gada 27. aprīļa Direktīvu 72/199/EEK ([5]), 1972. gada 5. decembra Direktīvu 73/46/EEK ([6]), 1974. gada 25. marta Direktīvu 74/203/EEK ([7]) un 1974. gada 20. decembra Direktīvu 75/84/EEK ([8]) jau ir noteiktas vairākas Kopienas analīžu metodes;

tā kā šajā direktīvā paredzētie pasākumi ir saskaņā ar Barības pastāvīgās komitejas sniegto atzinumu,

IR PIEŅĒMUSI ŠO DIREKTĪVU.

1. pants

Dalībvalstis prasa, lai analīzes, ar ko barības oficiālās kontroles nolūkā nosaka aflatoksīna B_1 saturu, izdara saskaņā ar šīs direktīvas pielikumā aprakstītajām metodēm.

▼M1

▼B

2. pants

Dalībvalstīs ne vēlāk kā līdz 1976. gada 1. oktobrim stājas spēkā normatīvie un administratīvie akti, kas vajadzīgi, lai nodrošinātu atbilstību šai direktīvai. Dalībvalstis par to tūlīt informē Komisiju.

3. pants

Šī direktīva ir adresēta dalībvalstīm.

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

▼B

PIELIKUMS

AFLATOKSĪNA B_1 NOTEIKŠANA

A. VIENDIMENSIJAS PLĀNSLĀŅU HROMATOGRĀFIJAS METODE

▼M2

1. **Mērķis un darbības joma**

Ar šo metodi kļūst iespējams noteikt aflatoksīna B1 līmeni izejvielās un vienkāršā dzīvnieku barībā. Šo metodi nevar pielietot, ja ir citrusaugļu mīkstuma klātbūtne. Zemākā noteikšanas robeža ir 0,01 mg/kg (10 ppb).

Ja ir traucējošu vielu klātbūtne, jāatkārto analīze, izmantojot B metodi (augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfija).

▼B

2. **Princips**

Paraugu ekstrahē ar hloroformu. Ekstraktu izfiltrē, ņem alikvotu daļu un attīra kolonnas hromatogrāfijā ar silikagelu. Eluātu ietvaicē un atlikumu no jauna izšķīdina noteiktā daudzumā hloroforma vai benzola un acetonitrila maisījuma. Alikvotu šā šķīduma daļu lieto plānslāņu hromatogrāfijā. Apstarojot hromatogrammu ar UV gaismu, aflatoksīna daudzumu nosaka vizuāli vai fluordensitometrijā, salīdzinot ar aflatoksīna B_1 standartiem, kuros aflatoksīna daudzums ir zināms. No barības ekstrahētā aflatoksīna B_1 identitāte jāapstiprina saskaņā ar norādīto procedūru.

3. **Reaģenti**

NB: Ja nav citu norādījumu, visiem reaģentiem jābūt "analītiska reaģenta" kvalitātei.

3.1. Acetons.

3.2. Hloroforms, kas stabilizēts ar 0, 5–1,0 % 96 % etanola (V/V).

3.3. N-heksāns.

3.4. Metilspirts.

3.5. Bezūdens dietilēteris, kas nesatur peroksīdus.

3.6. Benzola un acetonitrila maisījums: 98/2 (V/V).

3.7. Hloroforma (3.2.) un metilspirta (3.4.) maisījums: 97/3 (V/V).

3.8. Kolonnas hromatogrāfijai – silikagels, kura daļiņu lielums ir 0,05–0,20 mm.

3.9. Absorbējoša kokvilnas vate, kas iepriekš attaukota ar hloroformu, vai stikla vate.

3.10. Granulēts bezūdens nātrija sulfāts.

3.11. Inerta gāze, piemēram, slāpeklis.

3.12. 1 N sālsskābe.

3.13. 50 % (V/V) sērskābe.

3.14. Kizelgūrs (diatomīts), kas mazgāts skābē.

3.15. Silikagels G-HR vai līdzvērtīgs – plānslāņu hromatogrāfijai.

3.16. Standartšķīdums ar apmēram 0,1 µg aflatoksīna B_1 uz ml hloroforma (3.2.) vai benzola/acetonitrila maisījuma (3.6.), ko gatavo un pārbauda, kā norādīts 7. iedaļā.

3.17. Kvalitatīvai pārbaudei paredzēts standartšķīdums, kas satur apmēram 0,1 µg aflatoksīna B_1 un B_2 uz ml hloroforma (3.2.) vai benzola/acetonitrila maisījuma (3.6.). Šīs koncentrācijas ir orientējošas. Tās jāprecizē, lai abiem aflatoksīniem nodrošinātu vienādu fluorescences intensitāti.

3.18. *Attīstītāji:*

3.18.1. Hloroforms (3.2.)/acetons (3.1.): 9/1 (V/V), nepiesātināta kamera.

3.18.2. Dietilēteris (3.5.)/metilspirts (3.4.)/ūdens: 96/3/1 (V/V/V), nepiesātināta kamera.

▼B

3.18.3. Dietilēteris (3.5.)/metilspirts(3.4.)/ūdens: 94/4,5/1,5 (V/V/V), piesātināta kamera.

3.18.4. Hloroforms (3.2.)/metilspirts (3.4.): 94/6 (V/V), piesātināta kamera.

3.18.5. Hloroforms (3.2.)/metilspirts (3.4.): 97/3 (V/V), piesātināta kamera.

4. **Aparatūra**

4.1. Smalcinātājs – maisītājs.

4.2. Kratītājs vai magnētiskais maisītājs.

4.3. Šleihera un Šīla kroku filtri Nr. 588 vai līdzvērtīgi ar 24 cm diametru.

4.4. Hromatogrāfijas stikla caurule, kuras iekšējais diametrs ir 22 mm un garums 300 mm, ar politetrafluoretilēna (PTFE) krānu un 250 ml rezervuāru.

4.5. Rotācijas ietvaicētājs ar 500 ml apaļkolbu.

4.6. 500 ml koniskās kolbas ar šlifa aizbāžņiem.

4.7. Plānslāņu hromatogrāfijas iekārta.

4.8. Stikla plates plānslāņu hromatogrāfijai, 200 x 200 mm, sagatavotas kā norādīts tālāk tekstā (norādītie daudzumi ir pietiekami piecu plašu sagatavošanai). 30 g silikagela G-HR (3.15.) liek koniskā kolbā. Pievieno 60 ml ūdens, aiztaisa un krata vienu minūti. Suspensiju klāj uz platēm tā, lai izveidojas viendabīgs 0,25 mm slānis. Ļauj nožūt un liek eksikatorā ar silikagelu. Lietošanas laikā plates aktivē, turot vienu stundu žāvēšanas skapī 110 °C temperatūrā.

Var izmantot gatavas plates, ja tās dod līdzīgus rezultātus tiem, ko iegūst ar platēm, kuras gatavo, kā aprakstīts iepriekš.

4.9. UV lampa ar lielu viļņu garumu (360 nm). Gaismas intensitātei jānodrošina 1 ng aflatoksīna B_1 plankuma skaidra izšķiršana uz plānslāņu hromatogrāfijas plates 10 cm attālumā no lampas.

4.10. Graduētas 10 ml mēģenes ar polietilēna aizbāžņiem.

4.11. UV spektrofotometrs.

4.12. Fluordensitometrs (vēlams).

5. **Procedūra**

5.1. *Parauga sagatavošana* (sk. "Piezīmes" C daļas 1. punktā)

Samaļ paraugu tā, lai tas viss iet caur sietu ar 1 mm acu izmēru (saskaņā ar ISO R 565 ieteikumiem).

5.2. *Ekstrakcija*

50 g samalta un homogenizēta parauga liek koniskā 500 ml kolbā (4.6.). Pievieno 25 g kizelgūra (3.14.), 25 ml ūdens un 250 ml hloroforma (3.2.). Aiztaisa kolbu, krata vai maisa 30 minūtes ar aparātu (4.2.) un izfiltrē caur kroku filtru (4.3.). Izmet pirmos 10 ml filtrāta un savāc 50 ml.

5.3. *Kolonnas tīrīšana*

Hromatogrāfijas caurules (4.4.) apakšgalā ieliek kokvilnas vai stikla vates tamponu (3.9.), divas trešdaļas caurules piepilda ar hloroformu (3.2.) un pievieno 5 g nātrija sulfāta (3.10.).

Pārbauda, vai nātrija sulfāta slāņa augšējā virsma ir līdzena, un mazās porcijās pievieno 10 g silikagela (3.8.). Pēc katras porcijas pievienošanas labi samaisa, lai neveidojas gaisa burbuļi. Ļauj nostāties 15 minūtes un tad uzmanīgi pievieno 15 g nātrija sulfāta (3.10.). Ļauj šķidrumam tecēt uz leju, līdz tas ir nedaudz virs nātrija sulfāta slāņa augšējās virsmas.

Sajauc 50 ml ekstrakta, kas savākts, kā aprakstīts 5.2., ar 100 ml n-heksāna (3.3.), un maisījumu kvantitatīvi pārnes uz kolonnu. Ļauj šķidrumam tecēt uz leju, līdz tas ir nedaudz virs nātrija sulfāta slāņa augšējās virsmas. Šīs saskalas nolej. Tad pievieno 100 ml dietilētera (3.5.) un vēlreiz ļauj tecēt līdz nātrija sulfāta slāņa augšējai virsmai. Veicot šīs darbības, jāraugās, lai tecēšanas ātrums ir no 8 līdz 12 ml minūtē un lai kolonna neiztek sausa. Nolej iztekošo šķidrumu. Pēc tam eluē ar 150 ml hloroforma/metilspirta maisījuma (3.7.) un savāc visu eluātu.

▼B

Pēdējo ar rotācijas ietvaicētāju (4.5.) gandrīz līdz sausam stāvoklim ietvaicē inertas gāzes plūsmā (3.11.) temperatūrā, kas nepārsniedz 50 °C. Atlikumu, izmantojot hloroforma (3.2.) vai benzola un acetonitrila maisījumu (3.6.), kvantitatīvi pārnes uz graduētu 10 ml mēģeni (4.10.). Šķīdumu koncentrē inertas gāzes (3.11.) plūsmā un pēc tam papildina tilpumu līdz 2 ml ar hloroformu (3.2.) vai benzola un acetonitrila maisījumu (3.6.).

5.4. *Plānslāņu hromatogrāfija*

Uz plānslāņu hromatogrāfijas plates 2 cm no apakšējās malas ar 2 cm atstarpēm (4.8.) pārnes turpmāk norādītos standartšķīduma un ekstrakta tilpumus:

— 10, 15, 20, 30 un 40 µl aflatoksīna B_1 standartšķīduma (3.16.),

— 10 µl ekstrakta, ko iegūst, kā aprakstīts 5.3. punktā, un uzliek virsū tajā pašā vietā, 20 µl standartšķīduma (3.16.),

— 10 un 20 µl ekstrakta, ko iegūst, kā aprakstīts 5.3. punktā.

Hromatogrammu attīsta tumsā ar vienu no attīstītājiem (3.18.). Attīstītājs jāizvēlas iepriekš, liekot 25 µl kvalitatīvā standartšķīduma (3.17.) uz plates un pārbaudot, vai pēc attīstīšanas aflatoksīns B_1 ir pilnīgi atdalījies no B_2.

Ļauj attīstītājiem iztvaikot tumsā un pēc tam apstaro ar UV gaismu, liekot plati 10 cm attālumā no lampas (4.9.). Aflatoksīna B_1 plankumi fluorescē zili.

5.5. *Kvantitatīva noteikšana*

Nosaka vizuāli vai fluordensitometrijā, kā norādīts turpmāk.

5.5.1. Vizuālie mērījumi

Aflatoksīna B_1 daudzumu ekstraktā nosaka, salīdzinot ekstrakta plankumu fluorescences intensitāti ar standartšķīduma plankumu fluorescences intensitāti. Vajadzības gadījumā interpolē. Fluorescencei, kas rodas, ekstraktu uzliekot uz standartšķīduma, jābūt intensīvākai par 10 µl ekstrakta fluorescenci un nedrīkst būt vairāk par vienu redzamu plankumu. Ja 10 µl ekstrakta fluorescence ir intensīvāka par 40 µl standartšķīduma fluorescenci, ekstraktu pirms atkārtotas plānslāņu hromatogrāfijas atšķaida 10 vai 100 reižu ar hloroformu (3.2.) vai benzola un acetonitrila maisījumu (3.6.).

5.5.2. Fluordensitometrijas mērījumi

Aflatoksīna B_1 plankumu fluorescences intensitāti mēra ar fluordensitometru (4.12.) 365 nm garuma indukcijas viļņos un 443 nm garuma emisijas viļņos. Aflatoksīna B_1 daudzumu ekstrakta plankumos nosaka, salīdzinot to fluorescences intensitāti ar aflatoksīna B_1 standarta plankumu fluorescences intensitāti.

5.6. *Aflatoksīna B_1 identitātes apstiprināšana*

Aflatoksīna B_1 identitāti ekstraktā apstiprina turpmāk norādītajās procedūrās.

5.6.1. Apstrāde ar sērskābi

Saskaņā ar 5.4. iegūto hromatogrammu apsmidzina ar sērskābi (3.13.). Aflatoksīna B_1 plankumu zilajai fluorescencei jākļūst dzeltenai, apstarojot ar UV gaismu.

5.6.2. Divdimensiju hromatogrāfija ar aflatoksīna B_1 pusacetāla (aflatoksīna B_{2a}) veidošanos

NB: Turpmāk aprakstītās darbības jāveic, precīzi ievērojot diagrammu 3. attēlā.

5.6.2.1. Šķīdumu lietojums

Uz plates (4.8.) novelk divas taisnas līnijas, kas ir paralēlas divām blakuspusēm (6 cm uz iekšu no katras puses), lai ierobežotu šķīdinātāja frontu pārvietošanos. Ar kapilārpipetēm vai mikropipetēm uz plates uzpilina šādus šķīdumus:

— *punktā A*: tilpumu attīrīta parauga ekstrakta, kas iegūts, kā aprakstīts 5.3. punktā, un satur apmēram 2,5 nm aflatoksīna B_1,

— *punktā B un C*: 25 µl standartšķīduma (3.16.).

▼B

5.6.2.2. Attīstīšana

Hromatogrammu attīsta tumsā virzienā I ar attīstītāju (3.18.1.) (1 cm slānis nepiesātinātā kamerā), līdz šķīdinātāju fronte sasniedz šķīdinātāja robežlīniju.

Izņem plati no kameras un piecas minūtes ļauj žūt tumsā apkārtējās vides temperatūrā. Tad 2,5 cm augstā joslā izsmidzina sālsskābi (3.12.), noklājot punktus A un B, kas 3. attēlā parādīti iezīmētajā rajonā, līdz tā kļūst tumša, bet plates atlikušo daļu aizsedz ar stikla plāksni. Ļauj reaģēt tumsā 10 minūtes, žāvē ar gaisa plūsmu apkārtējās vides temperatūrā.

Pēc tam hromatogrammu attīsta tumsā virzienā II ar attīstītāju (3.18.1.) (1 cm slānis nepiesātinātā kamerā), līdz šķīdinātāju fronte sasniedz šķīdinātāja robežlīniju. Izņem plati no kameras un ļauj žūt apkārtējās vides temperatūrā.

5.6.2.3. Hromatogrammas interpretācija.

Hromatogrammu apskata UV gaismā (4.9.) un pārbauda, vai tai ir šādas iezīmes:

a) zils fluorescents aflatoksīna B_1 plankums, kas radies no standartšķīduma C punktā (pārvietošanās virzienā I);

b) zils fluorescents (ar sālsskābi) nereaģējuša aflatoksīna B_1 plankums un intensīvāk zils fluorescents aflatoksīna B_1-pusacetāla plankums, kuri abi radušies no standartšķīduma punktā B (pārvietošanās virziens II);

c) plankumi, kas atbilst b) punktā aprakstītajiem; radušies no parauga ekstrakta punktā A. Šo plankumu atrašanās vietu nosaka, pirmkārt, aflatoksīna B_1 pārvietošanās attālums no punkta A virzienā I (vienāds ar punktā C uzpilinātā standarta pārvietošanās attālumu) un, otrkārt, aflatoksīna B_1-pusacetāla pārvietošanās attālumi no tā virzienā II (vienādi ar punktā B uzpilinātā standarta pārvietošanās attālumu). To pusacetāla plankumu fluorescences intensitātei, kas radušies no ekstrakta un no standartšķīduma, kas uzpilināts punktā B, būtu jāsakrīt.

6. **Rezultātu aprēķināšana**

6.1. *Pēc vizuālajiem mērījumiem*

Saturu mikrogramos aflatoksīna B_1 uz kg parauga (ppb) aprēķina pēc formulas:

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

kur:

Y un X ir attiecīgi aflatoksīna B_1 standartšķīduma (3.16.) un ekstrakta ar līdzīgu fluorescences intensitāti tilpums mikrolitros,

S = koncentrācija mikrogramos aflatoksīna B_1 uz ml standartšķīduma (3.16.),

V = ekstrakta galīgais tilpums mikrolitros, no kura var sagatavot jebkuru vajadzīgo atšķaidījumu,

W = parauga svars gramos, kas atbilst kolonnas tīrīšanas ekstrakta tilpumam.

6.2. *Pēc fluordensitometrijas mērījumiem*

Saturu mikrogramos aflatoksīna B_1 uz kg parauga aprēķina pēc formulas:

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

kur:

Y = uz plates uzpilinātā ekstrakta tilpums mikrolitros (10 vai 20 µl),

S = aflatoksīna B_1 daudzums nanogramos ekstrakta plankumā (proporcionāls attiecīgajai Y vērtībai), ko izsecina no mērījumiem,

▼B

V = ekstrakta galīgais tilpums mikrolitros, no kura var sagatavot jebkuru vajadzīgo atšķaidījumu,

W = parauga svars gramos, kas atbilst kolonnas tīrīšanas ekstrakta tilpumam.

7. **Standartšķīduma (3.16.) gatavošana un pārbaude**

7.1 *Aflatoksīna B_1 koncentrācijas noteikšana*

Sagatavo aflatoksīna B_1 standartšķīdumu hloroformā (3.2.) vai benzola un acetonitrila maisījumā (3.6.) ar koncentrāciju no 8 līdz 10 µg/ml. Ar spektrofotometru (4.11.) nosaka absorbcijas spektru no 330 līdz 370 nm.

Izmēra optisko blīvumu (A) 363 nm līmenī hloroforma šķīdumā; vai 348 nm līmenī benzola un acetonitrila maisījuma šķīdumā.

Aprēķina aflatoksīna B_1 koncentrāciju mikrogramos uz ml šķīduma pēc formulām:

$\frac{312 \cdot A \cdot 1\,000}{20600}$ hloroforma šķīdumā,

$\frac{312 \cdot A \cdot 1\,000}{19800}$ benzola un acetonitrila maisījuma šķīdumā.

Pēc vajadzības, sargājot no dienasgaismas, atšķaida, lai iegūtu darba standartšķīdumu ar aflatoksīna B_1 koncentrāciju apmēram 0,1 µg/ml. Glabājot ledusskapī 4 °C temperatūrā, šis šķīdums ir stabils divas nedēļas.

7.2 *Hromatogrāfiskās tīrības pārbaude*

Uzpilina uz plates (4.8.) 5 µl aflatoksīna B_1 standartšķīduma, kas satur no 8 līdz 10 µg/ml (7.1.). Hromatogrammu attīsta, kā norādīts 5.4. punktā. UV gaismā hromatogrammā vajadzētu būt redzamam tikai vienam plankumam, un sākumpunktā nedrīkst būt uztverama fluorescence.

8. **Atkārtojamība**

No viena parauga viena analītiķa divās paralēlās noteikšanās iegūto rezultātu atšķirība nedrīkst pārsniegt:

— 25 % no lielākā rezultāta, ja aflatoksīna B_1 saturs ir no 10 līdz 20 µg/kg,

— 5 µg pēc absolūtā lieluma, ja saturs ir lielāks par 20 un mazāks par 50 µg/kg,

— 10 % no lielākā rezultāta, ja saturs pārsniedz 50 µg/kg.

9. **Reproducējamība**

Sk. "Piezīmes" C daļas 2. punktā.

▼M2

B. AFLATOKSĪNA B1 NOTEIKŠANA. AUGSTAS IZŠĶIRTSPĒJAS ŠĶIDRUMA HROMATOGRĀFIJAS METODE

1. **Mērķis un darbības joma**

Šī metode ir paredzēta, lai noteiktu aflatoksīnu B1 dzīvnieku barībā, tostarp tādā, kas satur citrusaugļu mīkstumu. Zemākā noteikšanas robeža ir 0,001 mg/kg (1 ppb).

2. **Princips**

Paraugu ekstrahē ar hloroformu. Ekstraktu filtrē un alikvoto daļu attīra ar florisila kaseti un pēc tam ar C18 kaseti. Galīgo atdalīšanu un noteikšanu panāk ar augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfiju (*HPLC*), izmantojot apgrieztās fāzes C18 kolonnu, pēc tam pēckolonnas derivatizāciju ar jodu ūdenī un fluorescences noteikšanu.

Piezīme:

mikotoksīni ir ārkārtīgi toksiskas vielas. Manipulācijas jāveic šim mērķim paredzētā velkmes skapī. Īpaši drošības pasākumi jāveic, kad toksīni ir sausā veidā, to elektrostatiskās specifikas un izrietošās tendences disperģēties darba zonās dēļ.

▼M2

3. **Reaģenti**

3.1. Hloroforms, kas stabilizēts ar 0,5 līdz 1,0 % etanola, pēc masas. Skatīt 10.2. apsvērumu.

3.2. Metanols ar *HPLC* tīrības pakāpi 3.6. punktā minētajam preparātam.

3.3. Acetons.

3.4. Acetonitrils ar *HPLC* tīrības pakāpi.

3.5. Eluenti: Sagatavojiet dienu pirms izmantošanas vai atdaliet gaisu no šķīdinātājiem ar ultraskaņas palīdzību.

3.5.1. Acetona (3.3.) un ūdens maisījums: 98 + 2 (v + v).

3.5.2. Ūdens un metanola (3.2.) maisījums: 80 + 20 (v + v).

3.5.3. Ūdens un acetona (3.3.) maisījums: 85 + 15 (v + v).

3.6. Kustīgā fāze augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfijai.

Ūdens, metanola (3.2.) un acetonitrila (3.4.) maisījums: 130 + 70 + 40 (v + v + v).

N.B.: kustīgās fāzes šķīdinātāju sastāvu var būt nepieciešams pielāgot atkarībā no izmantotās *HPLC* kolonnas īpašībām.

3.7. Piesātināts joda šķīdums: 400 ml ūdens pievienojiet 2 g joda. Maisiet vismaz 90 minūtes un filtrējiet caur mambrānfiltru (4.15.). Pasargājiet piesātināto šķīdumu no gaismas, lai nepieļautu fotosabrukšanu.

3.8. Ar skābi nomazgāts celīts 545 vai līdzvērtīgs.

3.9. Florisila kasete (*Waters SEP-PAK*) vai līdzvērtīga.

3.10. C_{18} kasete (*Waters SEP-PAK*) vai līdzvērtīga.

3.11. Inerta gāze, piemēram, slāpeklis.

3.12. Aflatoksīna B1 standartšķīdums hloroformā ar koncentrāciju 10 µg/ml. Šā šķīduma koncentrāciju pārbauda šādi: nosaka šķīduma absorbcijas spektru no 330 līdz 370 nm, izmantojot spektrofotometru (4.23.). Nomēra absorbciju (A) pēc maksimuma, kas ir tuvu 363 nm. Aprēķina aflatoksīna B1 koncentrāciju mikrogramos uz mililitru šķīduma pēc formulas:

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

3.12.1. Aflatoksīna B1 rezerves standartšķīdums hloroformā.

Kvantitatīvi pārnes 2,5 ml aflatoksīna B1 standartšķīduma (3.12.) uz 50 ml mērkolbu un koriģē līmeni līdz zīmei ar hloroformu (3.1.). Šo šķīdumu, labi noslēgtu un ietītu alumīnija folijā, uzglabā vēsā (4 °C) vietā tumsā.

3.13. Aflatoksīna B1 kalibrēšanas šķīdumi augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfijai.

N.B.: šo šķīdumu sagatavošanai izmanto stikla priekšmetus, kas nomazgāti ar skābi (skatīt 4. punktu “Aprīkojums”).

3.13.1. Kalibrēšanas šķīdums 4 ng/ml.

Mērkolbai ar rezerves standartšķīdumu alumīnija folijā (3.12.1.) ļauj uzsilt līdz istabas temperatūrai (dažas stundas). Uz mērkolbu ar 50 ml tilpumu pārnes 400 µl rezerves standartšķīduma (200 ng aflatoksīna B1) un šķīdumu ietvaicē inertas gāzes plūsmā līdz sausam stāvoklim (3.11.).

Iegūto atlikumu izšķīdina apmēram 20 ml ūdens/acetona maisījuma (3.5.3.), uzpilda līdz zīmei ar ūdens/acetona maisījumu un labi samaisa.

3.13.2. Kalibrēšanas šķīdums 3 ng/ml.

Mērkolbā ar 10 ml tilpumu kvantitatīvi pārnes 7,5 ml kalibrēšanas šķīduma (3.13.1.), uzpilda līdz zīmei ar ūdens/acetona maisījumu (3.5.3.) un labi samaisa.

3.13.3. Kalibrēšanas šķīdums, 2 ng/ml.

▼M2

Uz mērkolbu ar 50 ml tilpumu kvantitatīvi pārnes 25 ml kalibrēšanas šķīduma (3.13.1.), uzpilda līdz zīmei ar ūdens/acetona maisījumu (3.5.3.) un labi samaisa.

Šo šķīdumu arī dēvē par standartvielu, kas jāizmanto atkārtotai injekcijai *HPCL* (5.5.) laikā.

3.13.4. Kalibrēšanas šķīdums 1 ng/ml.

Uz mērkolbu ar 10 ml tilpumu kvantitatīvi pārnes 2,5 ml kalibrēšanas šķīduma (3.13.1.), uzpilda līdz zīmei ar ūdens/acetona maisījumu (3.5.3.) un labi samaisa.

3.14. Ampula, kas satur aflatoksīnus B1, B2, G1 un G2 maisījumu, kuru attiecīgā koncentrācija 1 ml hloroformā ir apmēram 1, 0,5, 1 un 0,5 µg/ml.

3.14.1. Hromatogrāfijas testa šķīdums.

Ampulas (3.14.) saturu pārnes mēģenē ar stikla aizbāzni vai stobriņā ar aizskrūvējamu vāku. Mēģenē ar stikla aizbāzni (kas izskalota ar skābi) (4.22.) pārnes 40 µl šā šķīduma. Hloroformu ietvaicē inertas gāzes (3.11.) plūsmā un atkārtoti izšķīdina 10 mililitros ūdens/acetona maisījuma (3.5.3.).

3.15. Reaģenti apstiprinājuma testam (6.).

3.15.1. Ar nātrija hlorīdu piesātināts šķīdums.

3.15.2. Granulēts bezūdens nātrija sulfāts.

4. **Aprīkojums**

Uzmanību: Ja aflatoksīnu šķīdumiem ūdenī izmanto stikla priekšmetus, kas nav noskaloti ar skābi, var rasties zaudējumi. Īpaši jāparūpējas par jauniem stikla priekšmetiem un vienreizlietojamiem stikla priekšmetiem, piemēram, par stobriņiem, ar ko automātiski ņem paraugus, un Pastēra pipetēm. Tādēļ laboratorijas stikla priekšmeti, kas nonāk saskarē ar aflatoksīnu šķīdumiem ūdenī, dažas stundas jāmērcē atšķaidītā skābē (piemēram, sērskābē = 2 mol/l), tad, lai likvidētu visas skābes paliekas, labi jānoskalo ar destilētu ūdeni (piemēram, trīs reizes, pārbauda ar pH papīru). Praksē šāda apstrāde ir vajadzīga apaļkolbai (4.4.), mērkolbām, mērcilindriem, stobriņiem vai mēģenēm, ko izmanto kalibrēšanas šķīdumiem un galīgajiem ekstraktiem, (īpaši stobriņiem, ko izmanto automātiskai paraugu ņemšanai) un Pastēra pipetēm, ja tās izmanto, lai pārnestu kalibrēšanas šķīdumus vai ekstraktus.

4.1. Smalcinātājs – maisītājs.

4.2. Siets ar 1,0 mm acojumu (ISO R 565).

4.3. Mehāniskais kratītājs.

4.4. Rotācijas ietvaicētājs, kas aprīkots ar 150 līdz 250 ml apaļkolbu.

4.5. Augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfs, inžektors ar gredzenu, kas piemērots 250 ml injekcijai. Skatīt ražotāja instrukcijas, lai daļēji vai pilnīgi aizvērtu gredzenu.

4.6. *HPLC* analītiskā kolonna: 3 µm vai 5 µm C18 pakojums.

4.7. Sūknis, kas nerada pulsācijas, lai pievadītu joda pēckolonnas reaģentu.

4.8. Nerūsējoša tērauda T-veida savienojums bez brīvā tilpuma (1/16" ×0,75 mm).

4.9. Spirālveida reakcijas spirāle no teflona vai nerūsējoša tērauda. Par piemērotiem ir atzīti 3 000 × 0,5 mm līdz 5 000 × 0,5 mm izmēri kombinācijā ar 5 µm vai 3 µm *HPLC* kolonnām.

4.10. Ar termostatu kontrolēta ūdens vanna, kura noregulēta uz 60 °C un kuras temperatūras regulēšana var būt precīzāka nekā 0,1 °C.

4.11. Fluorescences detektors ar 365 nm ierosas un 435 nm emisijas viļņu garumiem. (Filtra instrumentam: indukcijas viļņu garums > 400 nm). Ir iespējama vismaz 0,05 ng aflatoksīna B1 noteikšana. Zināms pretspiediens ir ieteicams (piemēram, izmantojot spiediena regulētāju vai teflona vai nerūsējoša tērauda spirāli, kas pievienota detektora izejas atverei), lai apslāpētu gaisa burbulīšus caurplūsmas šūnā.

4.12. Diagrammas lentes pašrakstītājs.

4.13. Elektronisks integrators (nav obligāts).

4.14. Kroku filtrpapīrs ar diametru 24 cm, *Macherey-Nagel 617 1/4* vai līdzvērtīgs.

▼M2

4.15. Membrānfiltrs ar poru izmēru 0,45 µm, *Millipore HAWP 04700* vai līdzvērtīgs.

4.16. Koniska 500 ml kolba ar stikla aizbāzni.

4.17. Stikla kolonna (iekšējais diametrs – apmēram 1 cm, garums – apmēram 30 cm), kas aprīkota ar Luira uzgali [*Luer tip*].

4.18. Pret hloroformu izturīgs Luira noslēdzošais krāns (piemēram, *Bio-rad 7328017*, Analytichem A1 6078, *J.T. Baker 4514* vai līdzvērtīgs).

4.19. Ķīmiski izturīga 10 ml šļirce ar Luira savienotāju.

4.20. Šļirce, kas piemērota *HPLC* 250 µl injekcijai (skatīt 4.5.).

4.21. Kalibrēšanas šķīdumu sagatavošanas 100 µl mikrošļirce (nosverot jāpārliecinās, ka precizitāte ir 2 % robežās).

4.22. Kalibrētas mēģenes ar 10 ml tilpumu un ar stikla aizbāžņiem.

4.23. Spektrofotometrs, kas piemērots mērījumu izdarīšanai spektra UV diapazonā.

4.24. Aprīkojums apstiprinājuma testam (6.).

4.24.1. Ar skābi izskalota 100 ml dalāmpiltuve ar noslēdzošu teflona krānu.

4.24.2. Karstuma kamera, 40 līdz 50 °C.

5. **Procedūra**

5.1. *Parauga sagatavošana.*

Sasmalcina paraugu, lai tas iet caur attiecīgo sietu (4.2.).

5.2. *Analizējamais paraugs.*

Nosver 50 g sagatavotā testa parauga koniskā kolbā (4.16.).

5.3. *Ekstrakcija.*

Analizējamajam paraugam (5.2.) pievieno 25 g celīta (3.8.), 250 ml hloroforma (3.1.) un 25 ml ūdens. Kolbu aiztaisa un ar mehānisku kratītāju krata 30 minūtes (4.3.). Filtrē caur kroku filtrpapīru (4.14.). Savāc 50 ml filtrāta. Ja vajadzīgs, ņem filtrāta alikvoto daļu un atšķaida ar hloroformu līdz 50 ml tilpumam, lai aflatoksīna B1 koncentrācija nav lielāka kā 4 ng/ml.

5.4. *Tīrīšana (procedūra jāveic ar būtiskiem pārtraukumiem).*

Uzmanību:

— laboratoriju, kurā tiek veikta analīze, atbilstoši pasargājiet no dienasgaismas. Šo mērķi var efektīvi sasniegt, izmantojot:

  i) UV absorbējošu foliju uz logiem kombinācijā ar samazinātu apgaismojumu (bez tiešas dienasgaismas);

  ii) aizkarus vai žalūzijas kombinācijā ar mākslīgo apgaismojumu (luminiscences spuldzes ir pieņemamas),

— šķīdumi, kas satur aflatoksīnu, pēc iespējas jāsargā no gaismas (jātur tumsā, jāizmanto alumīnija folija).

5.4.1. Florisila *SEP-PAK* attīrīšana

5.4.1.1. Kolonnas un kasetes komplekta sagatavošana

Noslēdzošo krānu (4.18.) pievieno florisila kasetes (3.9.) īsākajam galam (skatīt 1. attēlu). Nomazgā kaseti un likvidē skābekli, ņemot 10 ml hloroforma (3.1.) un ar noslēdzošā krāna starpniecību ātri izlaižot 8 ml cauri kasetei ar šļirces palīdzību (4.19.). Garāko kasetes galu pievieno stikla kolonnai (4.17.) un atlikušos 2 ml hloroforma cauri kasetei ielaiž kolonnā. Aizver noslēdzošo krānu. Atdala šļirci.

5.4.1.2. Attīrīšana

Kolonnas un kasetes komplektam pievieno filtrātu, kas savākts atbilstoši 5.3. punktam, un notecina ar gravitācijas palīdzību. Izskalo ar 5 ml hloroforma (3.1.) un pēc tam ar 20 ml metanola (3.2.). Eluātus izlej. Šo darbību laikā jānodrošina, ka kolonnas un kasetes komplekts nepaliek sauss.

Aflatoksīnu eluē ar 40 ml acetona un ūdens maisījuma (3.5.1.) un savāc visu eluātu rotācijas ietvaicētāja (4.4.) apaļkolbā. Eluātu koncentrē rotācijas ietvaicētājā 40 °C līdz 50 °C līdz brīdim, kad vairs netiek destilēts acetons. (*N.B.*: šajā brīdī kolbā paliek apmēram 0,5 ml šķidruma. Ekspe-

▼M2

rimenti ir parādījuši, ka turpmāka iztvaicēšana nav kaitīga un ka brīdī, kad palikuši 0,5 ml šķidruma, acetona daudzums nav būtisks. Acetona atlikums var izraisīt aflatoksīna B1 zaudējumus uz C18 kasetes). Pievieno 1 ml metanola (3.2.), kolbu sakrata, lai izšķīdinātu aflatoksīnu B1, kas atrodas uz kolbas sāniem, pievieno 4 ml ūdens un samaisa. Kaseti atvieno un izmet. Stikla kolonnu izskalo ar ūdeni un atstāj C18 attīrīšanas posmam.

5.4.2. C_{18} *SEP-PAK* attīrīšana

5.4.2.1. Kolonnas un kasetes komplekta sagatavošana.

Noslēdzošo krānu (4.18.) pievieno C18 kasetes (3.10.) īsākajam galam (skatīt 1. attēlu). Sagatavo kaseti un likvidē gaisu, ar noslēdzošā krāna starpniecību ātri izlaižot 10 ml metanola (3.2.) caur kaseti ar šļirci (4.19.). (Gaisa burbuļi kasetē ir redzami kā gaismas plankumi uz pārējā pelēcīgā fona.) Ņem 10 ml ūdens un izlaiž 8 ml cauri kasetei (pārslēdzoties no metanola uz ūdeni, nepieļauj gaisa iekļūšanu kasetē). Garāko kasetes galu pievieno stikla kolonnai (4.17.) un atlikušos 2 ml ūdens caur kaseti ielaiž kolonnā. Aizver noslēdzošo krānu. Atdala šļirci.

5.4.2.2. Attīrīšana

Ekstraktu, kas savākts atbilstoši 5.4.1.2., kvantitatīvi pārnes uz stikla kolonnu (4.17.), kolbu izskalo divreiz ar 5 ml ūdens/metanola maisījuma (3.5.2.) un notecina ar gravitācijas palīdzību. Šo darbību laikā jānodrošina, ka kolonnas un kasetes komplekts nepaliek sauss. (Kad gaisa burbuļiši izveidojas sašaurinājumā tuvu kasetei, aptur plūsmu un viegli uzsit pa stikla kolonnas augšdaļu, lai novāktu gaisa burbulīšus. Tad turpina.) Eluē ar 25 ml ūdens/metanola maisījuma. Eluātu izlej. Aflatoksīnu B1 eluē ar 50 ml ūdens/acetona maisījuma (3.5.3.) un savāc visu eluātu 50 ml mērkolbā. Uzpilda līdz zīmei ar ūdeni un sajauc: iegūto testa šķīdumu izmanto hromatogrāfijai (5.5.).

Uzmanību: *Galīgā* ekstrakta filtrācija pirms *HPLC* parasti nav vajadzīga. Ja to uzskata par vajadzīgu, nedrīkst izmantot celulozes filtrus, jo tie var izraisīt aflatoksīna B1 zaudējumus. Pieņemami ir teflona filtri.

5.5. *Augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfija*

(Aprīkojuma uzstādīšanai skatīt 2. attēlu.) Jāatvēl pietiekoši daudz laika instrumentu sagatavošanai un stabilizēšanai.

1. piezīme:

Plūsmas ātrumi, kas norādīti kustīgajai fāzei un pēckolonnas reaģentiem, ir tikai orientējoši. Iespējams, tie būs jāpielāgo, pamatojoties uz *HPLC* kolonnas rādītājiem.

2. piezīme:

Detektora reakcija uz aflatoksīnu B1 ir atkarīga no temperatūras, tādēļ jāveic kompensācija saistībā ar novirzēm (skatīt 3. attēlu). Injicējot noteiktu aflatoksīna B1 standartvielu (3.13.3.) ar regulāriem intervāliem (piemēram, katrā trešajā injekcijā), aflatoksīna B1 lielākās vērtības starp šīm standartvielām var tikt koriģētas, izmantojot vidējo reakciju, ja atšķirība starp reakcijām uz secīgām standartvielām ir ļoti maza (< 10 %). Tādēļ injekcijas jāveic bez pārtraukumiem. Ja pārtraukumi ir vajadzīgi, pēdējai injekcijai pirms pārtraukuma un pirmajai injekcijai pēc pārtraukuma jābūt standartvielas injekcijai (3.13.3.). Tā kā kalibrēšanas līkne ir līnijveida un tā šķērso koordinātu sākuma punktu, aflatoksīna B1 daudzumu parauga ekstraktos nosaka tieši ar atsauci uz blakus standartiem.

5.5.1. HPLC sūkņa iestatījumi

Uzstāda *HPLC* sūkni (4.5.), lai radītu plūsmu 0,5 vai 0,3 ml/min, attiecīgi 5 μm vai 3 μm *HPLC* kolonnā, izmantojot kustīgo fāzi (3.6.).

5.5.2. Pēckolonnas sūkņa iestatījumi

Uzstāda sūkni (4.7.), lai joda piesātinātajam ūdens šķīdumam (3.7.) piedotu 0,2 līdz 0,4 ml/min plūsmu. Aptuveni: apmēram 0,4 vai 0,2 ml/min plūsmas ir ieteicamas kombinācijā ar attiecīgi kustīgās fāzes (3.6.) 0,5 un 0,3 ml/min plūsmām.

▼M2

5.5.3. Fluorescences detektors

Fluorescences detektoram (4.11.) uzstāda indukcijas viļņa garumu 365 nm un emisiju viļņa garumu 435 nm (filtra instrumentam > 400 nm). Detektora vājinātāju noregulē tā, lai pašrakstītāja pildspalva fiksētu aptuveni 80 % novirzes pilnā mērā attiecībā uz 1 ng aflatoksīna B1.

5.5.4. Inžektors

Attiecībā uz visiem šķīdumiem injicē 250 µl daudzumus, ievērojot inžektora ražotāja instrukcijas.

5.5.5. Hromatogrāfiskās nošķiršanas pārbaude

Injicē hromatogrāfisko testa šķīdumu (3.14.1.). Signāla pavājinājumam jābūt mazākam nekā 5 % no blakus esošo līknes virsotņu augstuma summas.

5.5.6. Sistēmas stabilitātes pārbaude

Pirms katras analīžu virknes atbilstoši injicē standartvielu (3.13.3.), kamēr tiek panāktas stabilas līknes virsotņu zonas (*N.B.*: līknes virsotņu rādītājiem attiecībā uz aflatoksīnu B1 starp secīgām injekcijām nevajadzētu atšķirties par vairāk kā 6 %). Procesu nekavējoties turpina, pārbaudot linearitāti (5.5.7.).

5.5.7. Linearitātes pārbaude

Injicē aflatoksīna B1 kalibrēšanas šķīdumus (3.13.1. līdz 3.13.4.). Katrā trešajā injekcijā izmanto standartvielu (3.13.3.), lai īstenotu korekcijas saistībā ar novirzēm mērījumos (*N.B.*: standartvielas mērījumu maksimumi nedrīkst atšķirties par vairāk kā 10 % 90 minūtēs). Korekcijas saistībā ar novirzēm veic saskaņā ar formulu 7. punktā. Kalibrēšanas grafikam jābūt līnijveida un jāšķērso koordinātu sākuma punktu Y provizoriskās vērtības divkāršas standartnovirzes robežās. Konstatētie lielumi nedrīkst atšķirties no nominālajām vērtībām par vairāk kā 3 %. Ja ir izpildītas šīs prasības, procesu nekavējoties turpina. Ja nav, identificē un izlabo problēmas avotus pirms turpināšanas.

5.5.8. Parauga ekstraktu injekcija

Injicē attīrītus parauga ekstraktus (5.4.2.2.). Ik pēc diviem parauga ekstraktiem atkārto standartvielas (3.13.3.) injekciju, ievērojot šādu secību: standartviela, ekstrakts, ekstrakts, standartviela, ekstrakts, ekstrakts, standartviela utt.

6. Apstiprinājuma tests

6.1. *Turpmāka ekstrakta (5.4.2.2.) apstrāde*

Galīgajam ekstraktam, kas iegūts atbilstoši 5.4.2.2. punktam, pievieno 5 ml nātrija hlorīda šķīdumu (3.15.1.). Katru ekstrahē vienu minūti trīs reizes ar 2 ml hloroformu (3.1.) dalāmpiltuvē (4.24.1.). Uzlejiet apvienotos hloroforma ekstraktus apmēram 1 g nātrija sulfāta (3.15.2.) 10 ml mēģenē. Mazu piltuvi (diametrs – 4 cm) var izmantot ar vatējumu sašaurinājuma vietā, ko klāj apmēram 1 g nātrija sulfāta.

Nātrija sulfāta slāni nomazgā ar dažiem ml hloroforma un savāc mazgāšanas šķidrumu tajā pašā mēģenē. Hloroforma ekstraktu tajā pašā mēģenē ietvaicē līdz izžūšanai, izmantojot karstuma kameru (4.24.2.) un atkārtoti šķīdina 1 ml hloroforma.

6.2. *Derivāta un plānslāņa hromatogrāfijas sagatavošana*

Skatīt Padomes Direktīvas 76/372/EEK pielikuma 5.6.2. punkta A metodi.

7. Rezultātu aprēķināšana

Aflatoksīna B1 saturu (µm/kg) paraugā aprēķina, izmantojot šādu formulu:

$$\text{Aflatoksîna B1 saturs, izsakot µg/kg} = \frac{m \times V_{ext}}{V_m \times M \times \frac{V_f}{V_e}}$$

kur

m = aflatoksīna B1 daudzums ng, ko atspoguļo parauga B1 mērījumu maksimums un ko aprēķina šādi:

▼**M2**

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

P (paraugs) = parauga B1 maksimuma zona

$P(st_1)$ = aflatoksīna B1 maksimuma zona, kas rodas iepriekšējās standartvielas (3.13.3.) injekcijas rezultātā

$P(st_2)$ = aflatoksīna B1 maksimuma zona, kas rodas nākamās standartvielas (3.13.3.) injekcijas rezultātā

r(st) = standartvielā (3.13.3.) injicētais aflatoksīna B1 daudzums, izsakot ng

V_m = injicētā parauga ekstrakta daudzums mililitros

V_{ext} = parauga ekstrakta galīgais tilpums mililitros, no kura var sagatavot jebkuru vajadzīgo atšķaidījumu (5.3.)

M = parauga masa gramos

V_f = uz florisila kaseti (5.4.1.2.) pārnestā filtrāta tilpums mililitros

V_c = parauga ekstrahēšanai izmantotā hloroforma daudzums mililitros

Ja procedūru izpilda atbilstoši šim protokolam, formulu noīsinās līdz:

aflatoksīna B1 saturs, izsakot μg/kg = 20 × m.

7.1. Rezultātu aprēķināšanu var arī veikt, mērot pīķa augstumu.

8. **Atkārtojamība:**

skatīt 10.1. punktu.

9. **Reproducējamība:**

skatīt 10.1. punktu.

10. **Apsvērumi**

10.1. *Precizitāte*

Starptautiskā līmenī veiktais barības koppētījums ([1]) uzrādīja 1. tabulā norādītos rezultātus attiecībā uz atkārtojamību un reproducējamību. Termins "atkārtojamība" (r), kas izmantots šeit, ir definēts kā lielākā attiecība, kura nav nozīmīga 95 % iespējamības līmenī, salīdzinot divus viena parauga rādījumus tajā pašā laboratorijā līdzīgos apstākļos. Termins "reproducējamība" (R) ir līdzīgi definēts, salīdzinot divas dažādas laboratorijas. Saskaņā ar ISO 3534 – 1977, 2.35 ([2]) un Komisijas Lēmumu 89/610/EEK ([3]) r un R ir arī norādīti 1. tabulā variāciju koeficientu veidā.

1. tabula

Atkārtojamība (r) un reproducējamība (R), kas izteiktas kā attiecības un attiecīgie variāciju koeficenti

(15 laboratorijas)

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

(*) CV = variāciju koeficients

([1]) *Egmond, H.P. van, Heisterkamp, S.H.* un *Paulsch, W.E.* (1991). Pārtikas piedevas un piesārņotāji [*Food Additives and Contaminants*] 8, 17-29.
([2]) ISO 3534-1977.
([3]) OV L 351, 2.12.1989., 39. lpp.

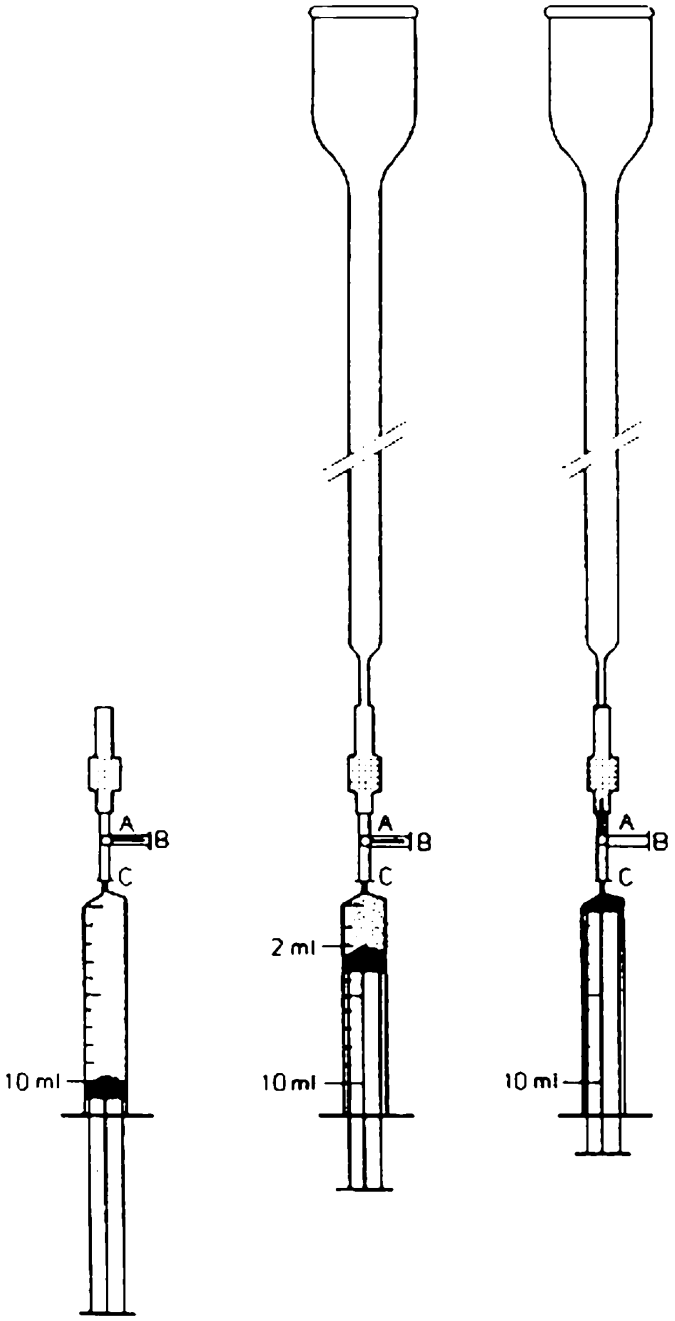
▼**M2**

10.2. *Hloroforma stabilizācija (3.1.)*

Florisila kasetes adsorbcijas raksturlielumi var izmainīties, ja izmanto stabilizētājvielas, kas nav etanols. Minētais ir jāpārbauda atbilstoši 10.3. punktam, ja nav pieejams aprakstītais hloroforms.

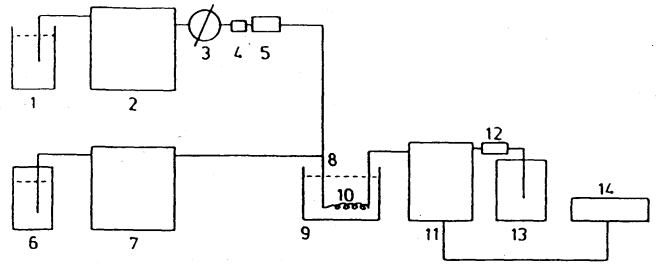
10.3. *Precizitāte*

Metodes izmantošanas pareizību pārbauda, ja iespējams, veicot vairākus sertificētu standarta materiālu mērījumus. Ja tie nav pieejami, metodes darbība jāpārbauda ar atgūstamības eksperimentiem, ko veic attiecībā uz pastiprinātiem tukšiem paraugiem. Tā vidējās vērtības novirze no faktiskās vērtības, kas izteikta procentuāli no faktiskās vērtības, nedrīkst pārsniegt – 20 līdz + 10 % robežas.



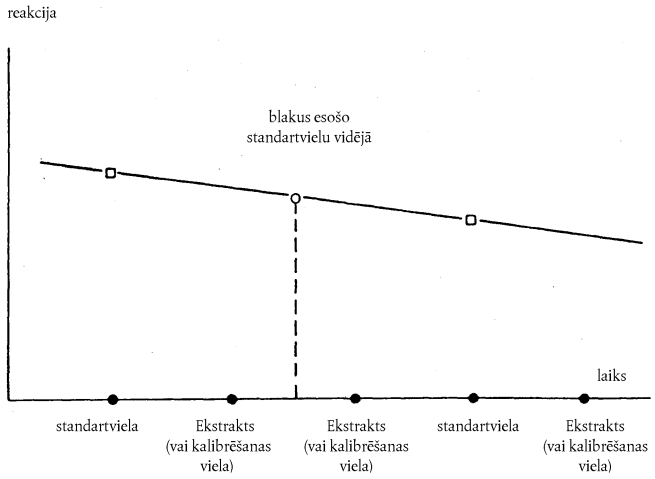
1. attēls. Kolonnas un kasetes komplekts.

▼**M2**



1. Kustīgā fāze
2. Sūknis
3. Injekcijas vārsts
4. Aizsargkolonna
5. *HPLC* analītiskā kolonna
6. Piesātināts joda šķīdums
7. Reaģenta sūknis
8. T-veida savienojums
9. Ar termostatu kontrolētā vanna
10. Spirālveida reakcijas spirāle
11. Fluorescences detektors
12. Spiediena regulētājs
13. Atkritumi
14. Diagrammas lentes pašrakstītājs/integrators.

2. attēls: Šķidruma hromatogrāfijas plūsmas shēma ar joda pēckolonnas derivatizāciju



3. attēls. Kompensācija par novirzēm reakcijā uz aflatoksīna B1, injicējot standartvielu (3.13.3.) pēc regulāriem intervāliem

▼**M3**

C. PIEZĪMES PAR A UN B METODI

1. **Attaukošana**

   Paraugi, kas satur vairāk par 5 % tauku, pēc sagatavošanas, kura aprakstīta 5.1. punktā, jāattauko ar petrolēteri (v.t. 40 — 60 °C).

2. **Tādos gadījumos analītiskie rezultāti jāizsaka neattaukotā parauga svara izteiksmē**

   Rezultātu sakritība A metodei.

   Rezultātu sakritība, t.i., no viena un tā paša parauga divās vai vairākās laboratorijās iegūto rezultātu atšķirība ir novērtēta šādi:

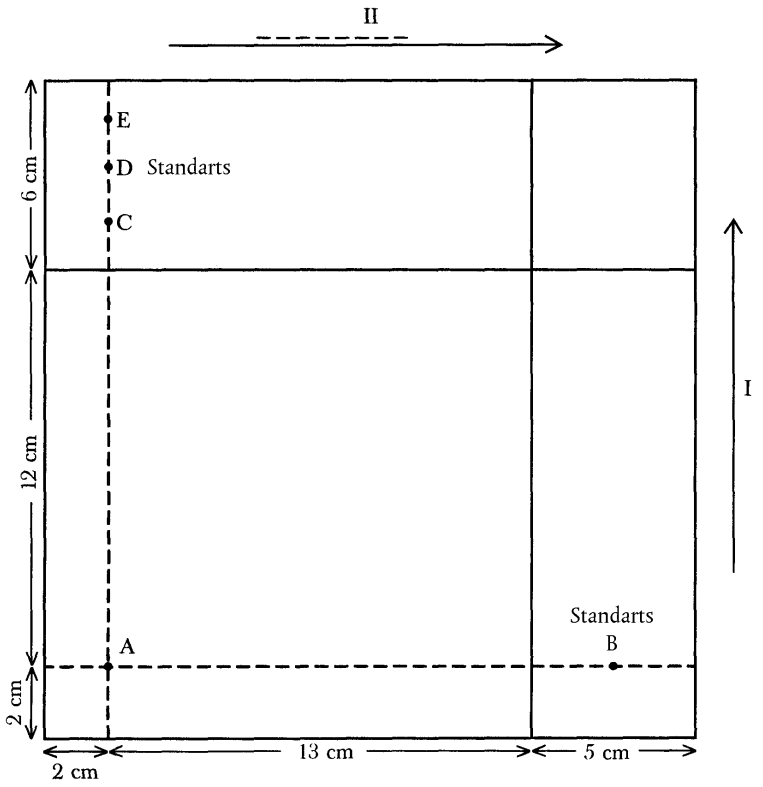
   ± 50 % no vidējās vērtības, ja aflatoksīna B_1 vidējā vērtība ir no 10 līdz 20 µg/kg;

   ± 10 µg/kg no vidējās vērtības, ja vidējā vērtība pārsniedz 20 µg/kg un ir mazāka par 50 µg/kg;

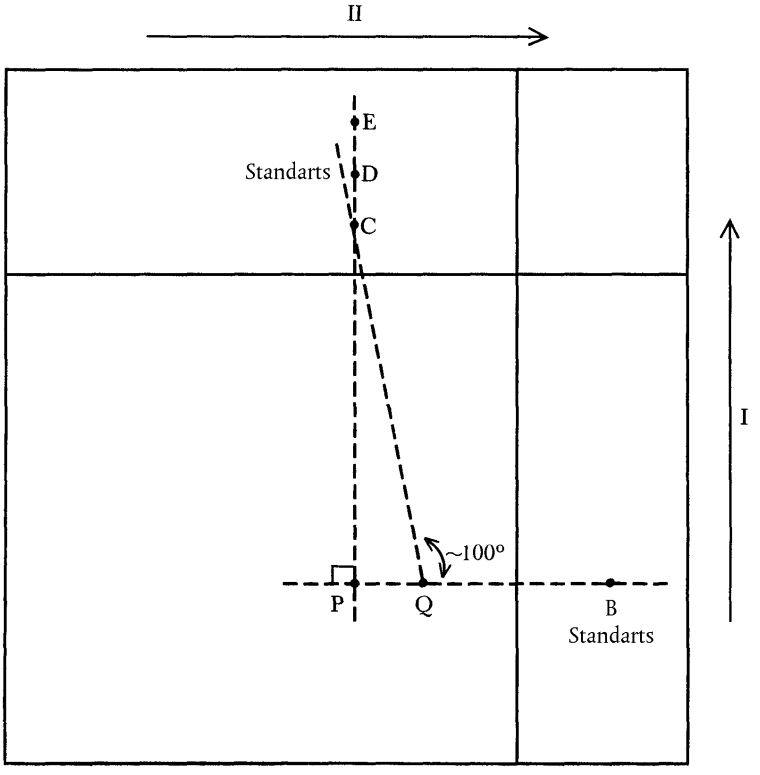
   ± 20 % no vidējās vērtības, ja vidējā vērtība pārsniedz 50 µg/kg.

▼B

Pielikuma papildinājums

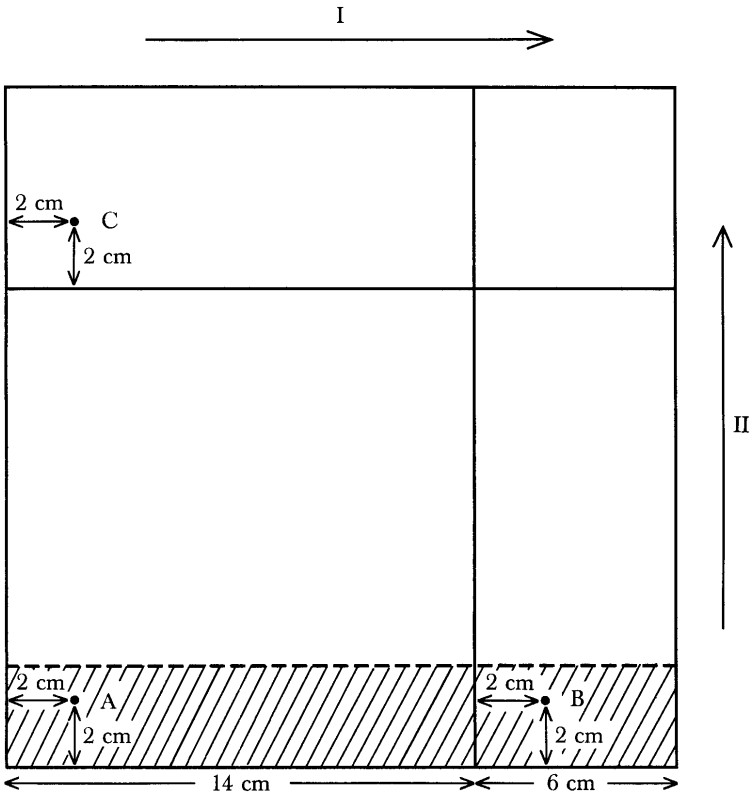


1. zīmējums



2. zīmējums

▼B



3. zīmējums