Dokument ten służy wyłącznie do celów dokumentacyjnych i instytucje nie ponoszą żadnej odpowiedzialności za jego zawartość

►**B**

SIÓDMA DYREKTYWA KOMISJI

z dnia 1 marca 1976 r.

ustanawiająca wspólnotowe metody analizy do celów urzędowej kontroli pasz

(76/372/EWG)

(Dz.U. L 102 z 15.4.1976, str. 8)

zmienione przez:

		Dziennik Urzędowy		
		nr	strona	data
►**M1**	Dyrektywa Komisji z dnia 30 lipca 1981 r.	L 246	32	29.8.1981
►**M2**	Dyrektywa Komisji 92/95/EWG z dnia 9 listopada 1992 r.	L 327	54	13.11.1992
►**M3**	Dyrektywa Komisji 94/14/WE z dnia 29 marca 1994 r.	L 94	30	13.4.1994

▼B

SIÓDMA DYREKTYWA KOMISJI

z dnia 1 marca 1976 r.

ustanawiająca wspólnotowe metody analizy do celów urzędowej kontroli pasz

(76/372/EWG)

KOMISJA WSPÓLNOT EUROPEJSKICH,

uwzględniając Traktat ustanawiający Europejską Wspólnotę Gospodarczą,

uwzględniając dyrektywę Rady z dnia 20 lipca 1970 r. w sprawie wprowadzenia wspólnotowych metod pobierania próbek i dokonywania analiz do celów urzędowej kontroli pasz ([1]), ostatnio zmienioną Aktem Przystąpienia ([2]), w szczególności jego art. 2,

a także mając na uwadze, co następuje:

dyrektywa wymaga, aby urzędowa kontrola pasz była przeprowadzana przy zastosowaniu wspólnotowych metod pobierania próbek i analiz w celu sprawdzenia zgodności z wymaganiami wynikającymi z przepisów ustawowych, wykonawczych i administracyjnych dotyczących jakości i składu pasz;

dyrektywy Komisji 71/250/EWG z dnia 15 czerwca 1971 r. ([3]), 71/393/EWG z dnia 18 listopada 1971 r. ([4]), 72/199/EWG z dnia 27 kwietnia 1972 r. ([5]), 73/46/EWG z dnia 5 grudnia 1972 r. ([6]), 74/203/EWG z dnia 25 marca 1974 r. ([7]) i 75/84/EWG z dnia 20 grudnia 1974 r. ([8]) ustanowiły już szereg wspólnotowych metod analizy; postęp prac od tamtego czasu wskazuje na celowość przyjęcia siódmego zestawu metod;

środki przewidziane w niniejszej dyrektywie są zgodne z opinią Stałego Komitetu ds. Pasz,

PRZYJMUJE NINIEJSZĄ DYREKTYWĘ:

Artykuł 1

Państwa Członkowskie wymagają, aby analizy do celów urzędowych kontroli pasz w odniesieniu do zawartości aflatoksyny B_1 w paszach były przeprowadzane przy użyciu metod opisanych w Załączniku do niniejszej dyrektywy.

▼M1

▼B

Artykuł 2

Państwa Członkowskie wprowadzą w życie, najpóźniej do dnia 1 października 1976 r., przepisy ustawowe, wykonawcze i administracyjne niezbędne do wykonania niniejszej dyrektywy i niezwłocznie powiadomią o tym Komisję.

Artykuł 3

Niniejsza dyrektywa skierowana jest do Państw Członkowskich.

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

▼B

ZAŁĄCZNIK

OKREŚLENIE ZAWARTOŚCI AFLATOKSYNY B_1

A. METODA JEDNOKIERUNKOWA CHROMATOGRAFII CIENKOWARSTWOWEJ

▼M2

1. **Cel i zakres**

Metoda ta umożliwia oznaczenie poziomu aflatoksyny B_1 w surowcach i paszach. Niniejsza metoda nie może być stosowana w obecności miąższu cytrusów. Dolna granica oznaczania wynosi 0,01 mg/kg (10 ppb).

W obecności mieszających się substancji, konieczne jest powtórzenie analizy wykorzystującej metodę B (metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej).

▼B

2. **Zasada**

Próbka jest ekstrahowana chloroformem. Ekstrakt jest filtrowany, pobierana jest odpowiednia porcja filtratu i oczyszczana metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym. Eluat jest odparowywany, a pozostałość rozpuszczana ponownie w określonej objętości chloroformu lub mieszaniny benzenu i acetonitrylu. Odpowiednia porcja tego roztworu jest poddawana chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Zawartość aflatoksyny B_1 określana jest metodą wizualną lub fluorodensytometryczną, po naświetleniu chromatogramu promieniami ultrafioletowymi, przez porównanie ze znanymi ilościami wzorcowej aflatoksyny B_1. Identyczność aflatoksyny B_1 ekstrahowanej z paszy musi zostać potwierdzona wskazaną procedurą.

3. **Odczynniki**

Notabene:

Wszystkie odczynniki muszą być „odczynnikami o czystości analitycznej”, chyba że określono inaczej.

3.1. Aceton.

3.2. Chloroform, stabilizowany 96-procentowym etanolem (v/v) w ilości 0,5–1,0 %.

3.3. N-heksan.

3.4. Metanol.

3.5. Bezwodny eter etylu wolny od peroksydów.

3.6. Mieszanina benzenu i acetonitrylu w stosunku 98:2 (v/v).

3.7. Mieszanina chloroformu (ppkt 3.2) i metanolu (ppkt 3.4) w stosunku 97:3 (v/v).

3.8. Żel krzemionkowy do chromatografii kolumnowej; wielkość cząstek 0,05–0,20 mm.

3.9. Wata absorpcyjna odtłuszczona chloroformem lub wata szklana.

3.10. Bezwodny, granulowany siarczan sodu.

3.11. Gaz obojętny, np. azot.

3.12. 1 N kwas solny.

3.13. 50 % (v/v) kwas siarkowy.

3.14. Ziemia okrzemkowa wymyta w kwasie.

3.15. Żel krzemionkowy G-HR lub równoważny do chromatografii cienkowarstwowej.

3.16. Roztwór wzorcowy, zawierający około 0,1 μg aflatoksyny B_1 na 1,0 ml chloroformu (ppkt 3.2) lub mieszaniny benzenu i acetonitrylu (ppkt 3.6), sporządzony i sprawdzony zgodnie z sekcją 7.

▼B

3.17. Roztwór wzorcowy do badania jakościowego, zawierający około 0,1 µg aflatoksyny B_1 i B_2 na 1,0 ml chloroformu (ppkt 3.2) lub mieszaniny benzenu i acetonitrylu (ppkt 3.6). Powyższe stężenia podane są orientacyjnie. Należy je dobrać tak, aby uzyskać to samo natężenie fluorescencji dla obydwu aflatoksyn.

3.18. *Rozpuszczalniki wywołujące:*

3.18.1. Chloroform (ppkt 3.2) i aceton (ppkt 3.1) w stosunku 9:1 (v/v), zbiornik nienasycony;

3.18.2. Eter etylu (ppkt 3.5), metanol (ppkt 3.4) i woda w stosunku 96:3:1 (v/v/v), zbiornik nienasycony;

3.18.3. Eter etylu (ppkt 3.5), metanol (ppkt 3.4) i woda w stosunku 94:4,5:1,5 (v/v/v), zbiornik nasycony;

3.18.4. Chloroform (ppkt 3.2) i metanol (ppkt 3.4) w stosunku 96:4 (v/v), zbiornik nasycony;

3.18.5. Chloroform (ppkt 3.2) i metanol (ppkt 3.4) w stosunku 97:3 (v/v), zbiornik nasycony;

4. Aparatura

4.1. Młynek-mieszarka.

4.2. Wytrząsarka lub mieszadło magnetyczne.

4.3. Bibuły do filtra harmonijkowego Schleicher i Schüll nr 588 lub równoważne, o średnicy 24 cm.

4.4. Rurka szklana (o średnicy wewn. 22 mm i długości 300 mm) do chromatografii z korkiem z policzterofluoroetylenu i 250-mililitrowym zbiornikiem.

4.5. Obrotowa parownica próżniowa z okrągłodenną kolbą o pojemności 500 ml.

4.6. Kolby stożkowe o pojemności 500 ml ze szlifowanymi korkami szklanymi.

4.7. Aparatura do chromatografii cienkowarstwowej.

4.8. Płytki szklane 200 × 200 mm do chromatografii cienkowarstwowej przygotowane w następujący sposób (podane ilości wystarczają do pokrycia 5 płytek): umieścić 30 g żelu krzemionkowego G-HR (ppkt 3.15) w stożkowej kolbie. Dodać 60 ml wody, kolbę zatkać i przez minutę wytrząsać. Rozprowadzić zawiesinę na płytkach tak, aby uzyskać równomierną warstwę o grubości 0,25 mm. Pozostawić do wyschnięcia na powietrzu, a następnie przechowywać w eksykatorze z żelem krzemionkowym. Bezpośrednio przed użyciem aktywować płytki, trzymając je w piecu w temperaturze 110 °C przez godzinę.

Płytki nadają się do użycia, jeśli dają wyniki podobne do wyników uzyskanych z płytek przygotowanych w opisany wyżej sposób.

4.9. Lampa UV o długości fali 360 nm. Natężenie napromieniania musi umożliwiać wyraźne odróżnianie na płytce TLC plamki aflatoksyny B_1 o masie 1 ng z odległości 10 cm od lampy.

4.10. Probówki miarowe o pojemności 10 ml z korkami z polietylenu.

4.11. Spektrofotometr UV.

4.12. Fluorodensytometr (nieobowiązkowo).

5. Procedura

5.1. *Przygotowanie próbki (patrz „Uwagi", część C pkt 1)*

Zemleć próbkę tak, aby w całości przechodziła przez sito o wielkości oczka 1 mm (zgodnie z zaleceniem ISO R 565).

5.2. *Ekstrakcja*

Umieścić 50 g zmielonej, jednolitej próbki w stożkowej kolbie o pojemności 500 ml (ppkt 4.6). Dodać 25 g ziemi okrzemkowej (ppkt 3.14), 25 ml wody i 250 ml chloroformu (ppkt 3.2). Zatkać kolbę, wstrząsać lub mieszać przez 30 minut przy użyciu urządzenia (ppkt 4.2) i przefiltrować przez bibułowy filtr harmonijkowy (pakt 4.3). Odrzucić pierwsze 10 ml filtratu, a następnie zebrać 50 ml.

▼B

5.3. *Oczyszczanie na kolumnie*

Do dolnego końca rurki chromatograficznej (ppkt 4.4) włożyć korek z waty lub wełny szklanej (ppkt 3.9), napełnić dwie trzecie rurki chloroformem (ppkt 3.2) i dodać 5 g siarczanu sodu (ppkt 3.10).

Sprawdzić, czy górna powierzchnia warstwy siarczanu sodu jest płaska, następnie dodać w małych porcjach 10 g żelu krzemionkowego (ppkt 3.8). Po każdej porcji dodania starannie zamieszać, aby usunąć bąbelki powietrza. Pozostawić na 15 minut do odstania, a następnie ostrożnie dodać 15 g siarczanu sodu (ppkt 3.10). Pozwolić cieczy opaść tak, aby znajdowała się dokładnie nad górną powierzchnią warstwy siarczanu sodu.

Wymieszać 50 ml ekstraktu, zebranego w ppkt 5.2, ze 100 ml paktheksanu (ppkt 3.3) i ilościowo przenieść mieszaninę na kolumnę. Pozwolić cieczy opaść tak, aby znajdowała się dokładnie nad górną powierzchnią warstwy siarczanu sodu. Zlać popłuczyny. Następnie dodać 100 ml eteru etylu (ppkt 3.5) i ponownie pozwolić cieczy opaść do górnej powierzchni warstwy siarczanu sodu. Podczas tych czynności pilnować, żeby tempo przepływu wynosiło 8–12 ml/min. i żeby kolumna nie pracowała na sucho. Zlewać ciecz wypływającą. Następnie wymyć kolumnę 150 ml mieszaniny chloroformu z metanolem (ppkt 3.7) i zebrać całość eluatu.

Odparować eluat prawie do suchości w wyparce obrotowej (ppkt 4.5), w temperaturze nieprzekraczającej 50 °C i w strumieniu gazu obojętnego (pakt 3.11). Pozostałość przenieść ilościowo, przy pomocy chloroformu (ppkt 3.2) lub mieszaniny chloroformu z acetonitrylem (ppkt 3.6), do 10-mililitrowej probówki miarowej (ppkt 4.10). Zagęścić roztwór pod strumieniem gazu obojętnego (ppkt 3.11), a następnie uzupełnić objętość do 2 ml chloroformem (ppkt 3.2) lub mieszaniną chloroformu z acetonitrylem (ppkt 3.6).

5.4. *Chromatografia cienkowarstwowa*

Nanieść punktowo na płytkę TLC (ppkt 4.8), w odległości 2 cm od dolnej krawędzi, w odstępach 2 cm, podane poniżej objętości roztworu wzorcowego i ekstraktu:

— 10, 15, 20, 30 i 40 µl wzorcowego roztworu aflatoksyny B_1 (ppkt 3.16),

— 10 µl ekstraktu uzyskanego w ppkt 5.3, i *nakładanego na ten sam punkt*, 20 µl roztworu wzorcowego (ppkt 3.16),

— 10 i 20 µl ekstraktu uzyskanego w ppkt 5.3.

Wywołać chromatogram w ciemności jednym z rozpuszczalników wywołujących (ppkt 3.18). Wyboru rozpuszczalnika należy dokonać wcześniej, nanosząc na płytkę 25 µl jakościowego roztworu wzorcowego (ppkt 3.17) i sprawdzając, czy aflatoksyny B_1 i B_2 są całkowicie oddzielone po wywołaniu.

Odczekać, aż rozpuszczalniki odparują w ciemności, a następnie naświetlić płytkę promieniami ultrafioletowymi, umieszczając ją w odległości 10 cm od lampy (ppkt 4.9). Miejsca z aflatoksyną B_1 świecą na niebiesko.

5.5. *Określenia ilościowe*

Określić wizualnie lub metodą fluorodensytometryczną w opisany poniżej sposób.

5.5.1. Pomiary wizualne

Określić ilość aflatoksyny B_1 w ekstrakcie, porównując natężenie fluorescencji plamki ekstraktu z natężeniem fluorescencji plamki roztworu wzorcowego. W razie potrzeby interpolować. Fluorescencja uzyskana w wyniku nałożenia ekstraktu na roztwór wzorcowy musi być intensywniejsza niż pochodząca od 10 µl ekstraktu i nie może być widoczna więcej niż jedna plamka. Jeśli natężenie fluorescencji wywołane przez 10 µl ekstraktu jest większe niż wywołane przez 40 µl roztworu wzorcowego, należy rozcieńczyć ekstrakt dziesięciokrotnie lub stukrotnie chloroformem (ppkt 3.2) lub mieszaniną benzenu i acetonitrylu (ppkt 3.6) przed ponownym poddaniem go chromatografii cienkowarstwowej.

5.5.2. Pomiary metodą fluorodensytometryczną

Zmierzyć natężenie fluorescencji plamki aflatoksyny B_1 fluorodensytometrem (ppkt 4.12) przy długości fali wzbudzenia 365 nm i długości fali emisji 443 nm. Określić ilość aflatoksyny B_1 w plamkach ekstraktu, porównując natężenie fluorescencji plamki ekstraktu z natężeniem fluorescencji plamki wzorcowej aflatoksyny B_1.

▼B

5.6. *Potwierdzenie identyczności aflatoksyny B_1*

Potwierdzić identyczność aflatoksyny B_1 w ekstrakcie, przeprowadzając opisane poniżej procesy.

5.6.1. Obróbka kwasem siarkowym

Rozpylić kwas siarkowy (ppkt 3.13) na chromatogram uzyskany w ppkt 5.4. Fluorescencja plamek aflatoksyny B_1 musi się zmienić z niebieskiej na żółtą pod wpływem napromieniania ultrafioletem.

5.6.2. Dwukierunkowa chromatografia z utworzeniem aflatoksyny B_1-półacetalu (aflatoksyny B_{2a})

Notabene: Poniższe operacje należy wykonać, przestrzegając dokładnie schematu na rysunku 3.

5.6.2.1. Nanoszenie roztworów

Zarysować dwie linie proste na płytce (ppkt 4.8) równolegle do dwóch sąsiednich krawędzi (w odległości 6 cm od każdej krawędzi), aby ograniczyć migrację czołowych części rozpuszczalnika. Pipetami kapilarnymi lub mikrostrzykawkami nanieść punktowo na płytkę następujące roztwory:

— *w pkt. A*: objętość oczyszczonego ekstraktu próbki, uzyskanego w ppkt 5.3, zawierającą około 2,5 nm aflatoksyny B_1,

— *w pkt. B i C*: 25 µl roztworu wzorcowego (ppkt 3.16).

5.6.2.2. Wywoływanie

Wywoływać w ciemności chromatogram w kierunku I, stosując rozpuszczalnik wywołujący (ppkt 3.18.1) (1-centymetrowa warstwa w zbiorniku nienasyconym), dopóki czoło rozpuszczalnika nie osiągnie linii granicznej.

Wyjąć płytkę ze zbiornika i pozostawić w ciemności do wyschnięcia na pięć minut, w temperaturze otoczenia. Następnie rozpylić na płytkę kwas solny (pakt 3.12) wzdłuż pasa o wysokości 2,5 cm pokrywającego pkt A i B (zakreskowany obszar na rysunek 3), dopóki nie ściemnieje, zakrywając pozostałą część płytki szklaną szybką. Odczekać 10 minut na przereagowanie kwasu w ciemności i wysuszyć płytkę w strumieniu powietrza, w temperaturze otoczenia.

Następnie wywoływać w ciemności chromatogram w kierunku II, stosując rozpuszczalnik wywołujący (ppkt 3.18.1) (1-centymetrowa warstwa w zbiorniku nienasyconym), dopóki czoło rozpuszczalnika nie osiągnie linii granicznej. Wyjąć płytkę ze zbiornika i pozostawić w ciemności do wyschnięcia, w temperaturze otoczenia.

5.6.2.3. Interpretacja chromatogramu

Zbadać chromatogram w świetle ultrafioletowym (ppkt 4.9) i sprawdzić pod kątem następujących właściwości:

a) Pojawienie się niebieskiej fluoryzującej plamki aflatoksyny B_1 pochodzącej z roztworu wzorcowego nałożonego w pkt C (migracja w kierunku I).

b) Pojawienie się niebieskiej fluoryzującej plamki nieprzereagowanej (z kwasem solnym) aflatoksyny B_1 i intensywniej fluoryzującej na niebiesko plamki aflatoksyny B_1-półacetalu pochodzących z roztworu wzorcowego, nałożonego w pkt B (migracja w kierunku II).

c) Pojawienie się plamek odpowiadających plamkom opisanym w lit. b) pochodzących z roztworu wzorcowego, nałożonego w pkt A. Położenie tych plamek jest określone najpierw przez odległość migracji aflatoksyny B_1 od pkt A w kierunku I (taka sama, jak odległość przebyta przez wzorzec nałożony w pkt C), a następnie przez odległości migracji aflatoksyny B_1-półacetalu stamtąd w kierunku II (takie same, jak odległości przebyte przez wzorzec nałożony w pkt B). Natężenia fluorescencji plamek półacetalu pochodzących z ekstraktu i z roztworu wzorcowego nałożonego w pkt B powinny pasować do siebie.

6. **Obliczanie wyników**

6.1. *Z pomiarów wizualnych*

Zawartość aflatoksyny B_1 w µg na kg próbki (ppb) jest wyrażona wzorem:

▼B

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

gdzie:

Y i X są odpowiednio objętościami w µl wzorcowego roztworu aflatoksyny B_1 (3.16) i ekstraktu o podobnym natężeniu fluorescencji;

S = stężenie wyrażone w µg aflatoksyny B_1 na ml roztworu wzorcowego (ppkt 3.16);

V = końcowa objętość ekstraktu w µl, umożliwiająca ewentualne niezbędne rozcieńczenie;

W = masa próbki w g odpowiadająca objętości ekstraktu poddanego oczyszczeniu na kolumnie.

6.2. *Z pomiarów metodą fluorodensytometryczną*

Zawartość aflatoksyny B_1 w µg na kg próbki jest wyrażona wzorem:

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

gdzie:

Y = objętość ekstraktu naniesionego na płytkę, w µl (10 lub 20 µl);

S = ilość aflatoksyny B_1 w ng w plamce ekstraktu (proporcjonalna do pobranej wartości Y);

V = końcowa objętość ekstraktu w µl, umożliwiająca ewentualne niezbędne rozcieńczenie;

W = masa próbki w g odpowiadająca objętości ekstraktu poddanego oczyszczeniu na kolumnie.

7. **Sporządzanie i sprawdzanie roztworu wzorcowego (ppkt 3.16)**

7.1 *Określenie stężenia aflatoksyny B_1*

Sporządzić wzorcowy roztwór aflatoksyny B_1 w chloroformie (ppkt 3.2) lub mieszaninie benzenu i acetonitrylu (ppkt 3.6) o stężeniu 8–10 µg/ml. Za pomocą spektrofotometru (ppkt 4.11) określić widmo absorpcyjne w zakresie długości fali 330–370 nm.

Zmierzyć gęstość optyczną (A) przy długości fali 363 nm w przypadku roztworu chloroformu lub 348 nm w przypadku roztworu w mieszaninie benzenu i acetonitrylu.

Z poniższych wzorów obliczyć stężenie aflatoksyny B_1 wyrażone w µg na ml roztworu:

$\frac{312 \cdot A \cdot 1000}{20600}$ dla roztworu chloroformu;

$\frac{312 \cdot A \cdot 1000}{19800}$ dla roztworu w mieszaninie benzenu i acetonitrylu.

Rozcieńczyć odpowiednio, z dala od światła dziennego, aby uzyskać roboczy roztwór wzorcowy o stężeniu aflatoksyny B_1 około 0,1 µg/ml. Trwałość roztworu wynosi dwa tygodnie, pod warunkiem że jest przechowywany w lodówce w temperaturze 4 °C.

7.2 *Sprawdzanie czystości chromatograficznej*

Nanieść punktowo na płytkę (ppkt 4.8) 5 µl wzorcowego roztworu aflatoksyny B_1 zawierającego 8–10 µg/ml (ppkt 7.1). Wywołać chromatogram zgodnie z ppkt 5.4. W świetle ultrafioletowym na chromatogramie powinna być widoczna tylko jedna plamka i nie powinna być widoczna żadna fluorescencja w pierwotnej strefie naniesienia.

8. **Powtarzalność**

Różnica między wynikami dwóch równoległych określeń przeprowadzonych na tej samej próbce, przez tę samą osobę, nie powinna przekraczać:

▼B

— 25 % największego uzyskanego pomiaru dla zawartości aflatoksyny B_1 10-20 µg/kg,

— 5 µg wartości bezwzględnej dla zawartości aflatoksyny B_1 20-50 µg/kg,

— 10 % największego uzyskanego pomiaru dla zawartości aflatoksyny B_1 powyżej 50 µg/kg.

9. **Odtwarzalność**

Patrz „Uwagi", część C pkt 2.

▼M2

B. OKREŚLENIE ZAWARTOŚCI AFLATOKSYNY B_1. WYSOKOSPRAWNA CHROMATOGRAFIA CIECZOWA

1. **Cel i zakres**

Niniejsza metoda służy oznaczeniu aflatoksyny B_1 w paszach zwierzęcych, włącznie z tymi zawierającymi miąższ cytrusów. Dolna granica oznaczania wynosi 0,001 mg/kg (1 ppb).

2. **Zasada**

Próbka jest ekstrahowana chloroformem. Ekstrakt jest filtrowany, podwielokrotna porcja jest oczyszczana na filtrze Florisil po filtrze C_{18}. Ostateczne oddzielenie i oznaczenie osiąga się poprzez wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) o odwróconej fazie kolumny C_{18}, po której otrzymywana jest pokolumnowa pochodna z jodem w wodzie oraz wykrywaniem fluoroscencji.

Uwaga:

Mikotoksyny są wyjątkowo toksycznymi substancjami. Działania na nich powinny być wykonywane w odpowiednim wyciągu. Kiedy toksyny są w suchej formie, powinny zostać podjęte szczególne środki ostrożności, z powodu ich elektrostatycznego charakteru i wynikającej z niej tendencji do rozprzestrzeniania się w miejscach pracy.

3. **Odczynniki**

3.1. Chloroform stabilizowany alkoholem etylowym o stężeniu 0,5–1 % masowego. Patrz: notka 10.2.

3.2. Metanol, stopień HPLC w celu przygotowania 3.6.

3.3. Aceton.

3.4. Acetonitryl, czystość HPLC.

3.5. Eluting solvents: Przygotować dzień przed użyciem, lub usunąć powietrze w roztworach ultradźwiękami.

3.5.1. Mieszanina acetonu (3.3) i wody, 98 + 2 (v + v).

3.5.2. Mieszanina metanolu i wody (3.2), 80 + 20 (v + v).

3.5.3. Mieszanina acetonu i wody (3.3), 85 + 15 (v + v).

3.6. Faza ruchoma do HPLC

Mieszanina wody, metanolu (3.2) i acetonitrylu (3.4), 130 + 70 + 40 (v + v + v).

Uwaga: Skład fazy ruchomej rozpuszczalnika może wymagać dostosowania, w zależności od charakterystyki wykorzystywanej kolumny HPLC.

3.7. Nasycony roztwór jodu: dodać 2 g jodu do 400 ml wody. Mieszać przez przynajmniej 90 min. i przefiltrować przez filtr membranowy (4.15). Chronić nasycony roztwór przed światłem w celu zapobieżenia fotodegradacji.

3.8. Celite 545 płukane kwasem, lub podobne.

3.9. Filtr Florisil (Waters SEP-PAK), lub podobny.

3.10. Filtr C_{18} (Waters SEP-PAK), lub podobny.

▼M2

3.11. Gaz obojętny, np. azot.

3.12. Roztwór mianowany aflatoksyny B_1 w chloroformie, stężenie 10 µg/ml. Sprawdzić stężenie roztworu w następujący sposób: ustalić widmo absorpcji roztworu między 330 i 370 nm za pomocą spektrofotometru (4.23). Zmierzyć wchłanianie (A) przy maksimum zbliżonym do 363 nm. Z wzoru obliczyć stężenie aflatoksyny B_1 wyrażone w mikrogramach na ml roztworu:

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

3.12.1. Przechowywanie roztworu mianowanego aflatoksyny B_1 w chloroformie.

Przelać ilościowo 2,5 ml roztworu mianowanego aflatoksyny B_1 (3.12) do 50 ml kolby miarowej oraz dostosować do oznaczenia chloroformem (3.1). Przechowywać ten roztwór w chłodnym i ciemnym miejscu (4 ° C), dobrze uszczelnionym i opakowanym w folię aluminiową.

3.13. Roztwory wzorcowe aflatoksyny B_1 HPLC.

Uwaga: Wykorzystać szkło płukane kwasem w celu przygotowania tych roztworów (patrz: 4, Aparatura).

3.13.1. Roztwór wzorcowy 4 ng/ml.

Pozwolić kolbie miarowej z przechowywanym roztworem mianowanym (3.12.1) ogrzać się do temperatury pokojowej w folii aluminiowej (kilka godzin). Przenieść 400 µl przechowywanego roztworu mianowanego (200 ng aflatoksyny B_1) do 50 ml kolby miarowej, oraz odparować roztwór do suchości w bieżącym gazie obojętnym (3.11).

Rozpuścić pozostałości otrzymane w około 20 ml mieszaninie wody/acetonu (3.5.3), dopełnić do oznaczenia mieszaniny wody/acetonu i dobrze wymieszać.

3.13.2. Roztwór wzorcowy, 3 ng/ml

Przelać ilościowo 7,5 ml roztworu wzorcowego (3.13.1) do 10 ml kolby miarowej, wykonać oznaczenie za pomocą mieszaniny wody/acetonu (3.5.3), i dobrze wymieszać.

3.13.3. Roztwór wzorcowy, 2 ng/ml

Przelać ilościowo 25 ml roztworu wzorcowego (3.13.1) do 50 ml kolby miarowej, wykonać oznaczenie za pomocą mieszaniny wody/acetonu (3.5.3) i dobrze wymieszać.

Niniejszy roztwór jest traktowany także jako wzorzec odniesienia jednostki miary, do wykorzystania w odniesieniu do powtarzających się wstrzyknięć podczas HPLC (5.5).

3.13.4. Roztwór wzorcowy, 1 ng/ml

Przelać ilościowo 2,5 ml roztworu wzorcowego (3.13.1) do 10 ml kolby miarowej, wykonać oznaczenie za pomocą mieszaniny wody/acetonu (3.5.3) i dobrze wymieszać.

3.14. Ampułka zawierająca mieszaninę stężeń aflatoksyn B_1 B_2, G_1 i G_2 około 1, 0,5, 1 i 0,5 µg/ml odpowiednio, w 1 ml chloroformie.

3.14.1. Chromatograficzny roztwór testowy.

Przelać zawartość ampułki (3.14) do zamykanej szklanym korkiem próbówki testowej lub zakręcanej fiolki. Przelać 40 µl tego roztworu do zamykanej szklanym korkiem próbówki testowej (płukanej kwasem) (4.22). Odparować chloroform w oparze gazu obojętnego (3.11) i ponownie rozpuścić w 10 ml mieszaniny wody/acetonu (3.5.3).

3.15. Odczynniki do testów potwierdzających (6).

3.15.1. Nasycony roztwór chlorku sodu.

3.15.2. Bezwodny, granulowany siarczan sodu.

4. **Aparatura**

Uwaga: wykorzystanie szkła niepłukanego kwasem do wodnych roztworów aflatoksyny może spowodować straty. Szczególną uwagę należy zwrócić na nowe szkło i szkło jednorazowe takie jak próbniki automatyczne lub pipety Pasteura. Dlatego szkło laboratoryjne wchodzące w kontakt z wodnymi roztworami aflatoksyn powinny moczone

▼M2

w być rozcieńczonym kwasie (np. kwasie siarkowym = 2 mol/1) przez kilka godzin, a później płukane wodą destylowaną w celu usunięcia wszelkich śladów kwasu (np. trzy razy, sprawdzić papierkiem pH). W praktyce, takie traktowanie jest konieczne w odniesieniu do kolby z okrągłym dnem (4.4), kolby miarowej, cylindrów pomiarowych, fiolek lub próbówek wykorzystywanych do roztworów wzorcowych oraz końcowego ekstraktu (szczególnie fiolki i próbniki próbne), oraz pipety Pasteura, jeżeli są wykorzystywane do przelewania roztworów wzorcowych lub ekstraktów.

4.1. Młynek — mieszarka.

4.2. Sitko o otworach rozmiaru 1,0 mm, (ISO R 565).

4.3. Wytrząsarka mechaniczna.

4.4. Obrotowy próżniowy aparat wyparny, wyposażony w 150 do 250 ml kolby o okrągłym dnie.

4.5. Wysokosprawny chromatograf cieczowy, iniektor z pętlą odpowiednią dla wtrysku 250 ml. Patrz instrukcje producentów do częściowych lub całkowitych wypełnień pętli.

4.6. Analityczna kolumna HPLC: 3 μm lub wypełnienie 5 μm C18.

4.7. Pompa bezimpulsowa w celu dostarczania jodowego odczynnika pokolumnowego.

4.8. Zawór Valco o zerowej objętości martwej w kształcie litery T, stal nierdzewna (1/16" x 0,75 mm).

4.9. Spiralna cewka; Teflon lub stal nierdzewna. Wymiary od 3 000 x 0,5 mm do 5 000 x 0,5 mm zostały ocenione jako właściwe w połączeniu z 5 μm lub 3 μm kolumną HPLC.

4.10. Termostatycznie kontrolowana kąpiel wodna wyregulowana do 60 °C, z możliwością regulowania temperatury do 0,1 °C.

4.11. Detektor fluorescencji, o czułości przy 365 nm oraz emisji przy 435 nm długości fali. (W odniesieniu do instrumentów filtrujących: długość fali emisji > 400 nm). Możliwe jest wykrywanie przynajmniej 0,05 ng aflatoksyny B_1. Można zastosować pewne ciśnienie tylne (np. restryktor, Teflon lub nakrętka ze stali nierdzewnej połączona z wylotem detektora), w celu likwidowania pęcherzyków powietrza w komorze przepływu.

4.12. Rejestrator paskowy.

4.13. Elektroniczny integrator (dodatkowo).

4.14. Żłobiona bibuła filtracyjna średnica: 24 cm, Macherey-Nagel 617 1/4 lub podobna.

4.15. Filtr membranowy z porami o rozmiarze 0,45 Jim, Millipore HAWP 04700 lub podobny.

4.16. 500 ml szklana kolba stożkowa z zatyczką.

4.17. Szklana kolumna (o wewnętrznej średnicy około 1 cm, długość około 30 cm), wyposażona w nasadkę typu Luer.

4.18. Zawór odcinający typu Luer odporny na chloroform (np. Bio-rad 7328017, Analytichem Al 6078, J.T. Baker 4514 lub podobny).

4.19. Odporna chemicznie strzykawka, 10 ml konektor typu Luer.

4.20. Strzykawka odpowiednia dla iniekcji 250 μl do HPLC (patrz: 4.5).

4.21. 100 ml mikrostrzykawka w celu przygotowania roztworów wzorcowych (Sprawdzić, że dokładność mieści się w 2 % wagowych).

4.22. 10 ml szklane skalowane próbówki z zatyczką.

4.23. Spektrofotometr odpowiedni dla dokonywania pomiarów w rejonie UV widma.

4.24. Wyposażenie do testu potwierdzającego (6).

4.24.1. 100 ml lejek rozdzielczy płukany kwasem z teflonowym zaworek odcinającym.

4.24.2. Blokada ogrzewania, od 40 do 50 °C.

▼M2

5. **Procedura.**

5.1. *Przygotowanie próbki*

Rozkruszyć próbkę tak, aby przeszła przez sitko (4.2).

5.2. *Porcja do badania*

Odważyć 50 g przygotowywanej próbki testowej do kolby stożkowej (4.16).

5.3. *Ekstrakcja*

Dodać 25 g Celite'u (3.8), 250 ml chloroformu (3.1) oraz 25 ml wody do porcji testowej (5.2). Zamknąć kolbę, i potrząsać przez 30 minut w mechanicznej wytrząsarce (4.3). Przefiltrować przez filtr karbowany. Zebrać 50 ml filtratu. Jeżeli jest to konieczne, wziąć podwielokrotność filtratu i rozcieńczyć do 50 ml chloroformem, tak aby stężenie aflatoksyny B1 nie było wyższe niż 4 ng/ml.

5.4. *Oczyszczanie (procedura powinna być przeprowadzana bez większych przerw).*

Uwaga:

— chronić laboratorium, jeżeli analizy są wykonane, odpowiednio od światła dziennego. Może zostać to skutecznie osiągnięte poprzez wykorzystanie:

  i) Folii absorbującej UV na oknach w połączeniu z przytłumionym światłem (nie bezpośrednie światło słoneczne);

  ii) Zasłony lub rolety w połączeniu ze sztucznym światłem (fluorescencyjne próbówki są akceptowalne);

— roztwory zawierające aflatoksynę muszą być chronione przed światłem jak tylko jest to możliwe (trzymać w ciemności, wykorzystać folię aluminiową).

5.4.1. Oczyszczanie Florisil SEP-PAK.

5.4.1.1. Przygotowanie montażu kolumny-filtra

Załączyć zawór odcinający (4.18) krótszego rdzenia filtra Florisil (3.9) (patrz: wykres 1). Umyć filtr i usunąć wspomaganie poprzez wzięcie 10 ml chloroformu (3.1) oraz przepuszczenie 8 ml przez zawór odcinający szybko poprzez filtr wykorzystujący strzykawkę (4.19). Załączyć dłuższy rdzeń filtra do szklanej kolumny (4.17) i przepuścić pozostałe 2 ml chloroformu przez filtr w kolumnie. Zamknąć zawór. Usunąć strzykawkę.

5.4.1.2. Oczyszczanie

Dodać filtrat zebrany w 5.3 do montażu kolumny-filtra i osuszyć poprzez ciążenie. Spłukać 5 ml chloroformu (3.1), a następnie przez 20 ml metanolu (3.2). Zlać popłuczyny. Podczas tych czynności, zapewnić że montaż kolumny-filtra nie staje się suchy.

Przepłukać aflatoksynę B_1 40 ml mieszaniny aceton-woda (3.5.1) oraz całość popłuczyn w kolbie o okrągłym dnie obrotowego aparatu wyparnego (4.4). Skupić popłuczyny na obrotowym aparacie wyparnym przy 40 °C do 50 °C do chyba że aceton nie jest już destylowany. (NB około 0,5 ml płynu pozostaje w kolbie w tym punkcie. Eksperymenty dowiodły, że dalsze parowanie nie jest szkodliwe i że kiedy pozostaje 0,5 ml płynu, nie ma żadnej wyraźnej ilości acetonu. Pozostałości acetonu mogą prowadzić do strat aflatoksyny B_1 na filtrze C_{18}). Dodać 1 ml metanolu (3.2), wirować kolbę w celu rozpuszczenia aflatoksyny B_1 na ścianach kolby, dodać 4 ml wody i wymieszać. Rozłączyć i wyrzucić filter. Spłukać kolumnę szklaną wodą i przejść do kroków oczyszczania C_{18}.

5.4.2. Oczyszczanie C_{18} SEP-PAK

5.4.2.1. Przygotowanie montażu kolumny-filtra.

Załączyć zawór odcinający (4.18) krótszego rdzenia filtra C^{18} (3.10) (patrz: wykres 1). Zalać filtr i usunąć wszelkie powietrze poprzez puszczenie 10 ml metanolu (3.2) przez zawór odcinający szybko poprzez filtr wykorzystujący strzykawkę (4.19) (bąbelki powietrza w filtrze widoczne są jako jasne punkty na szarawym tle). Weź 10 ml wody, i przepuść 8 ml przez filtr (Unikać wtłoczenia powietrza do filtra, w momencie zmiany z mentolu na wodę). Załączyć dłuższy rdzeń filtra do szklanej kolumny (4.17) i przepuścić pozostałe 2 ml wody przez filtr w kolumnie. Zamknąć zawór. Usunąć strzykawkę.

▼**M2**

5.4.2.2. Oczyszczanie

Przelać ekstrakt zebrany w 5.4.1.2 ilościowo do szklanej kolumny (4.17), płucząc kolbę dwukrotnie 5 ml mieszaniny wody/metanolu (3.5.2) i osuszyć poprzez ciążenie. Podczas tych czynności, zapewnić że montaż kolumny-filtra nie staje się suchy. (Jeżeli bąbelki powietrza zaczynają powstawać w konstrukcji w niewielkiej odległości od filtra, zatrzymać przepływ i odblokuj zawór kolumny szklanej w celu usunięcia bąbelków powietrza. Wtedy kontynuuj). Przepłukać 25 ml mieszaniny wody/metanolu. Zlać popłuczyny. Przepłukać aflatoksynę B_1 50 ml mieszaniną wody/metanolu (3.5.3), i zebrać całość popłuczyn do 50 ml kolby miarowej. Dopełnić do oznaczenia metanolem i wymieszać. Otrzymany roztwór testowy używany jest w chromatografii (5.5).

Uwaga: *Filtracja koń*cowego ekstraktu przed HPLC nie jest zwykle konieczna. Jeżeli uznana jest za niezbędną, nie należy używać filtrów celulozowych, ponieważ mogą one prowadzić do strat aflatoksyny B1. Można używać filtrów teflonowych.

5.5. *Wysokosprawna chromatografia cieczowa*

(patrz: wykres 2 w celu przygotowania wyposażenia). Dać odpowiedni czas na konfekcjonowanie i ustabilizowanie instrumentów.

Uwaga 1:

Tempo przepływu ustalone dla fazy ruchomej i odczynnika pokolumnowego są wyłącznie wskazówkami. Mogą być przystosowane zależnie od charakterystyki kolumny HPLC.

Uwaga 2:

Wskazanie detektora na aflatoksynę B_1 zależy od temperatury, dlatego należy zrekompensować za osad (Patrz wykres 3). Poprzez wstrzyknięcie określonej ilości wzorca odniesienia jednostki miary aflatoksyny B_1 (3.13.3) w regularnych odstępach czasu (tj. co trzecie wstrzyknięcie), piki aflatoksyny B_1 o wartości między wzorcem odniesienia jednostki miary mogą być poprawione wykorzystując środki odpowiedzi, pod warunkiem że różnice pomiędzy odpowiedziami kolejnych wzorców odniesienia jednostki miary są bardzo małe (< 10 %). Dlatego wstrzyknięcia muszą być dokonane bez przerw. Jeżeli przerwa jest konieczna, ostatnie wstrzyknięcie przed przerwaniem i pierwsze wstrzyknięcie po przerwie muszą być wzorcem odniesienia jednostki miary (3.13.3). Ponieważ krzywa kalibracyjna jest liniowa i przechodzi przez oryginał, ilości aflatoksyny B_1 w ekstraktach próbek ustalone są bezpośrednio poprzez odniesienie do odpowiedniego wzorca.

5.5.1. Ustawienia pompy HPLC

Ustawić pompę HPLC (4.5) w celu umożliwienia przepływu z prędkością 0,5 lub 0,3 ml/min w odniesieniu do 5 µm lub 3 µm kolumny HPLC (4.6) odpowiednio wykorzystującej fazę ruchomą (3.6).

5.5.2. Ustawienia pompy pokolumnowej

Ustawić pompę (4.7) w celu umożliwienia przepływu z prędkością 0,2 do 0,4 ml/min roztworu wody nasyconej jodem (3.7). Jako prosta wskazówka: zalecany jest przepływ z prędkością około 0,4 lub 0,2 ml/min w połączeniu z przepływem z prędkością 0,5 i 0,3 ml/min fazy ruchomej (3.6) odpowiednio.

5.5.3. Detektor fluorescencji

Ustawić detektor fluorescencji (4,11) do exc. = 365 nm i em = 435 nm (instrument filtrowy; > 400 nm). Dostosować wzmacniacz detektora w celu otrzymania około 80 % całkowitej skali odchyleń igły rejestratora w odniesieniu do 1 ng aflatoksyny B_1

5.5.4. Wtryskiwacz

W odniesieniu do wszystkich roztworów, wstrzyknąć ilości 250 µl zgodnie z instrukcjami producenta iniektora.

5.5.5. Kontrola rozdzielania metodą chromatograficzną

Wstrzyknij testowy roztwór do chromatografii (3.14.1). Doliny powinny być mniejsze niż 5 % sumy wysokości pików przylegających pików.

▼M2

5.5.6. Kontrola stabilizacji systemu

Przed każdą serią analiz, wstrzyknąć odpowiednio wzorzec odniesienia jednostki miary (3.13.3), dopóki stabilne zakresy pików nie zostaną osiągnięte (NB Odpowiedzi pików na aflatoksynę B_1 pomiędzy kolejnymi wstrzyknięciami nie powinny różnić się więcej niż o 6 %). Przystępować niezwłocznie do kontroli liniowości (5.5.7).

5.5.7. Kontrola liniowości

Wstrzyknąć roztwór wzorcowy aflatoksyny B_1 (3.13.1 do 3.13.4). co trzecie wstrzyknięcie wykorzystuje wzorzec odniesienia jednostki miary (3.13.3), w celu korekty osadu w odpowiedzi (NB Odpowiedzi pików na ten wzorzec odniesienia jednostki miary nie może różnić się o więcej niż 10 % w ciągu 90 minut). Poprawić osady zgodnie z wzorem w 7. Wykres kalibracji powinien być liniowy i przechodzić przez oryginał, w ramach dwóch standardowych błędów szacunków Y. Znalezione wartości nie mogą różnić się o więcej niż 3 % od wartości nominalnych. Jeżeli te wymagania zostaną spełnione, kontynuować niezwłocznie. Jeżeli nie, zidentyfikować i skorygować źródła problemu przed kontynuacją.

5.5.8. Wstrzyknięcie ekstraktów próbek

Wstrzyknąć oczyszczone ekstrakty próbek (5.4.2.2). Co dwa ekstrakty próbek powtórzyć wstrzyknięcie wzorca odniesienia jednostki miary (3.13.3) zgodnie z następującą sekwencją: wzorzec odniesienia jednostki miary, ekstrakt, ekstrakt, wzorzec odniesienia jednostki miary, ekstrakt, ekstrakt, wzorzec odniesienia jednostki miary itd.

6. Test potwierdzający

6.1. *Dalsze postępowanie z ekstraktem (5.4.2.2)*

Dodać 5 ml roztworu chlorku sodowego (3.15.1) do końcowego ekstraktu otrzymanego w 5.4.2.2. Ekstrahuj trzy razy każdą 2 ml chloroformu (3.1) na minutę, w lejku rozdzielczym (4.24.1). Wlać połączone ekstrakty chloroformudo około 1 g siarczanu sodowego (3.15.2) do 10 ml próbówki testowej. Mały lejek rozdzielczy (średnica: 4 cm) może być wykorzystany z kawałkiem bawełny w swojej konstrukcji, pokrytym około 1 g siarczanu sodowego.

Umyć warstwę siarczanu sodowego kilkoma ml chloroformu i zebrać je w tej samej próbówce testowej. Odparuj ekstrakt chloroformu do suchości w tej samej próbówce testowej wykorzystując blok grzewczy (4.24.2) i ponownie rozpuść w 1 ml chloroformu.

6.2. *Przygotowanie instrument pochodny oraz chromatografii cienkowarstwowej.*

Patrz Załącznik dyrektywy Rady 76/372/EWG metoda A, punkt 5.6.2.

7. Obliczanie wyników

Obliczyć zawartość aflatoksyny B_1 (mm/kg) obecnej w próbce, wykorzystując wzór:

$$\text{Zawartość aflatoksyny B1 w } \mu g/kg = \frac{m \times V_{ext}}{V_m \times M \times \frac{V_f}{V_c}}$$

gdzie:

m = ilość aflatoksyny B_1 w ng przedstawiona przez pik B1 próbki, obliczony następująco:

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

P (próbka) = powierzchnia piku aflatoksyny B_1 w odniesieniu do próbki

$P(st._1)$ = powierzchnia piku aflatoksyny B_1 wynikająca z poprzedniego wstrzyknięcia wzorca odniesienia jednostki miary (3.13.3)

$P(st._2)$ = powierzchnia piku aflatoksyny B_1 wynikająca z następującego wstrzyknięcia wzorca odniesienia jednostki miary (3.13.3)

r(st.) = wstrzyknięta ilość aflatoksyny B_1 we wzorcu odniesienia jednostki miary (3.13.3) w ng

V_m = ilość wstrzykniętego ekstraktu próbki w ml

▼M2

V_{ext} = końcowa wielkość ekstraktu próbki w ml, pozwalająca na każde dokonane rozcieńczenie (5.3)

M = masa próbki w g

V_f = ilość filtratu przelanego do filtra Florisil (5.4.1.2) w ml

V_c = ilość chloroformu, wykorzystywanego w wyekstrahowaniu próbki w ml

Jeżeli procedura następuje tak jak w protokole, wzór ogranicza się do:

Zawartości aflatoksyny B1 w µg/kg = 20 x m.

7.1. Obliczenia wyników mogą także dokonywane przez pomiar wysokości pików.

8. **Powtarzalność**

Patrz: punkt 10.1

9. **Odtwarzalność**

Patrz: punkt 10.1

10. **Uwagi**

10.1. *Dokładność*

Wspólne studium ([1]), przeprowadzone na poziomie międzynarodowym na mieszanych paszach dostarczyło wyników w odniesieniu do powtarzalności i odtwarzalności wskazanej w tabeli 1. Pojęcie powtarzalność r) użyte tutaj jest zdefiniowane jako największy stosunek, który nie jest istotny przy 95 % poziomu prawdopodobieństwa w odniesieniu do porównania dwóch odczytów tej samej próbki w tym samym laboratorium na podobnych warunkach. Pojęcie odtwarzalność (R) jest podobnie definiowane w odniesieniu do porównywania dwóch laboratoriów. Zgodnie z ISO 3534 — 1977, 2.35 ([2]) i decyzją Komisji 89/610/EWG ([3]) r oraz R podane są także w tabeli 1 w odniesieniu do wskaźników zróżnicowania.

Tabela 1

Powtarzalność (r) i odtwarzalność (R) wyrażona jako stopy i odpowiednie współczynniki zmian

(15 laboratoriów)

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

(*) CV = współczynnik zmienności

10.2. *Stabilizacja chloroformu (3.1)*

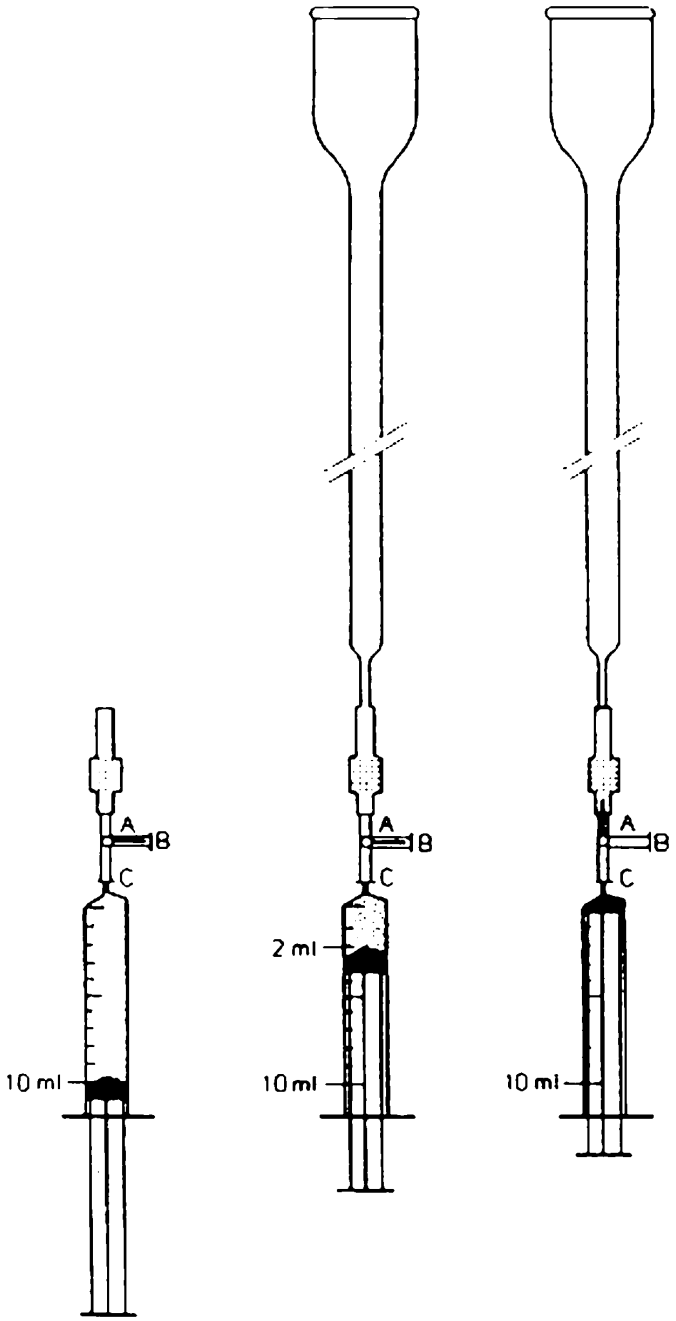
Charakterystyka adsorpcji filtra Florisil może zmieniać się jeżeli wykorzystywane są stabilizatory inne niż alkohol etylowy. Powinno to zostać zweryfikowane zgodnie z 10.3 jeżeli opisany chloroform nie jest dostępny.

10.3. *Dokładność*

Poprawne zastosowania metody powinny być zweryfikowane poprzez powielone pomiary certyfikowanego materiału odniesienia. Jeżeli nie jest to dostępne, wykonanie metody powinno być zweryfikowane przez wznowienie eksperymentów dokonane na wzmocnionych czystych próbkach. Odchylenie środka od wartości rzeczywistej, wyrażonej w procentach wartości rzeczywistej, nie mieści się poza granicami -20 do + 10 %.

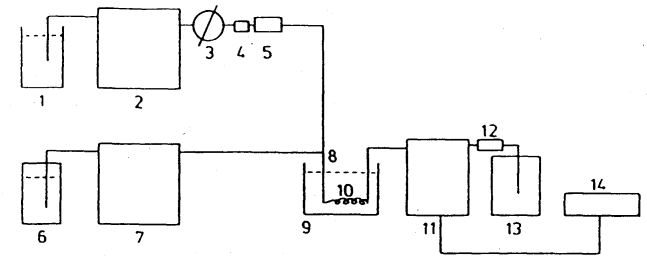
([1]) Egmond, H.P. van, Heisterkamp, S.H. and Paulsch, W.E. (1991). Zanieczyszczenia oraz dodatki do żywności 8, 17–29.
([2]) ISO 3534–1977.
([3]) Dz.U. L 351 z 2.12.1989, str. 39.

▼**M2**



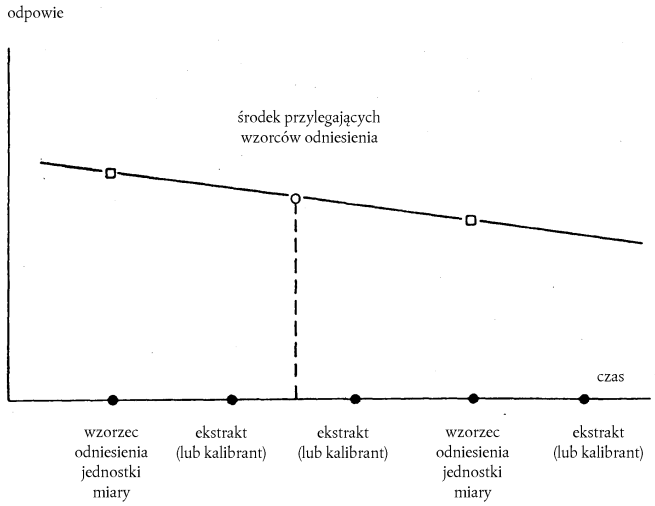
Rysunek 1: Montaż kolumna-filtr

▼**M2**



1. Faza ruchoma
2. Pompa
3. Zawór wstrzykiwania
4. Kolumna osłonowa
5. Kolumna analityczna HPLC
6. Nasycony roztwór jodu
7. Pompa odczynnika
8. Połączenie typu T
9. Termostatycznie kontrolowana kąpiel
10. Spiralna cewka
11. Detektor fluorescencji
12. Restryktor
13. Odpady
14. Rejestrator paskowy/integrator

Rysunek 2. Diagram przepływu systemu LC system z jodową pochodną postkolumnową



Rysunek 3. Skompensowanie osadów w odpowiedzi aflatoksyny B_1 poprzez wzorzec odniesienia jednostki miary (3.13.3) w regularnych odstępach

▼**M3**

C. UWAGI DOTYCZĄCE METOD A I B

1. **Odtłuszczanie**

Próbki zawierające więcej niż 5 % tłuszczów muszą zostać odtłuszczone lekką ropą naftową (temperatura wrzenia 40-60°C) po przygotowaniu wskazanym w ppkt 5.1.

W takich przypadkach uzyskane wyniki należy przedstawić w odniesieniu do masy nieodtłuszczonej próbki.

▼M3

2. **Odtwarzalność wyników w odniesieniu do metody A**

Odtwarzalność wyników, tj. różnica między wynikami uzyskanymi na tej samej próbce przez dwa laboratoria lub ich większą liczbę została oszacowana przy:

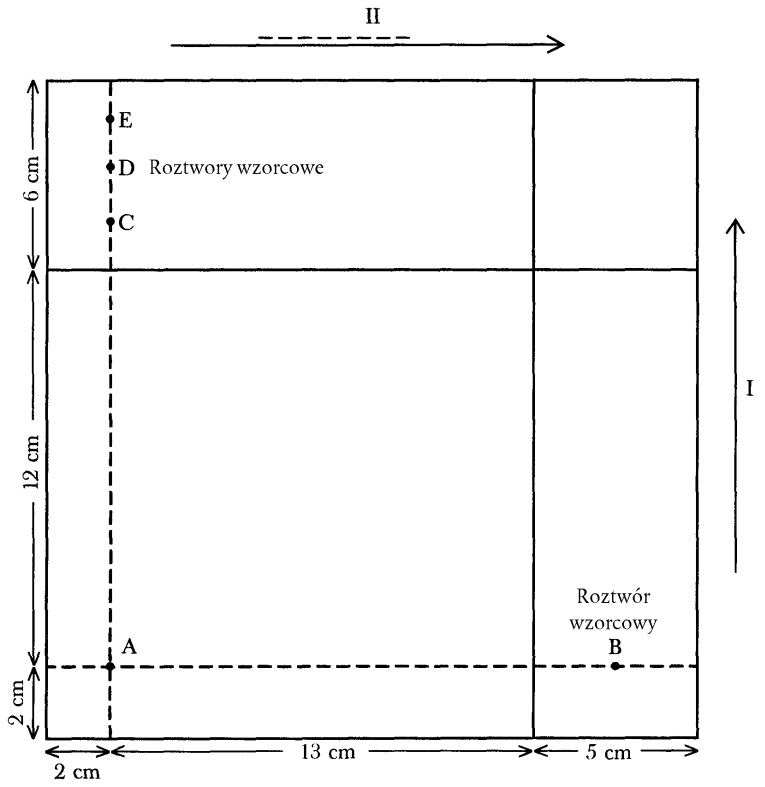
± 50 % średniej wartości dla średnich wartości aflatoksyny B_1 10-20 μg/kg;

± 10 μg/kg średniej wartości dla średnich wartości wyższych niż 20 oraz do 50 μg/kg;

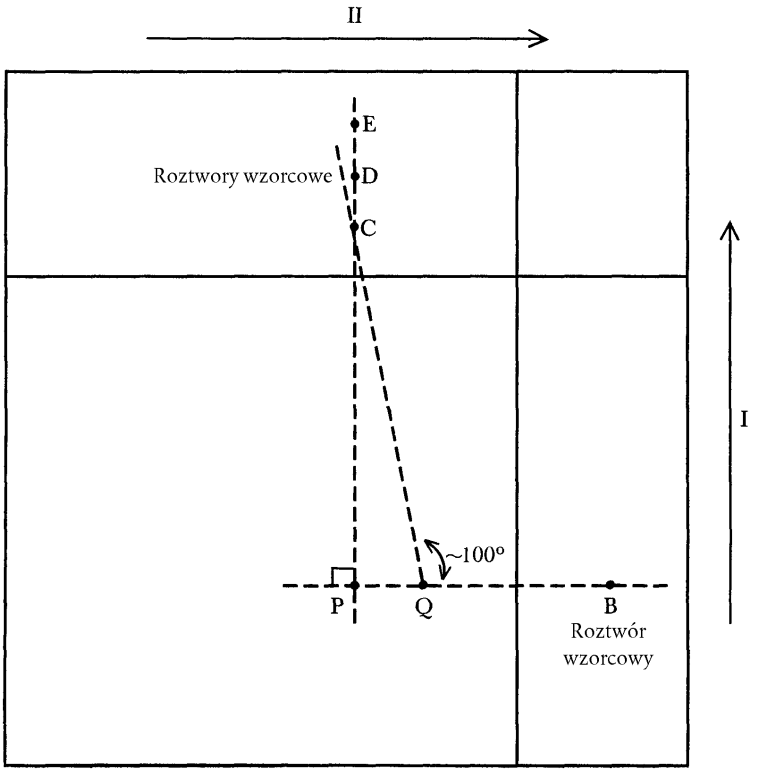
± 20 % średniej wartości dla średnich wartości powyżej 50 μg/kg.

▼B

Dodatek do Załącznika

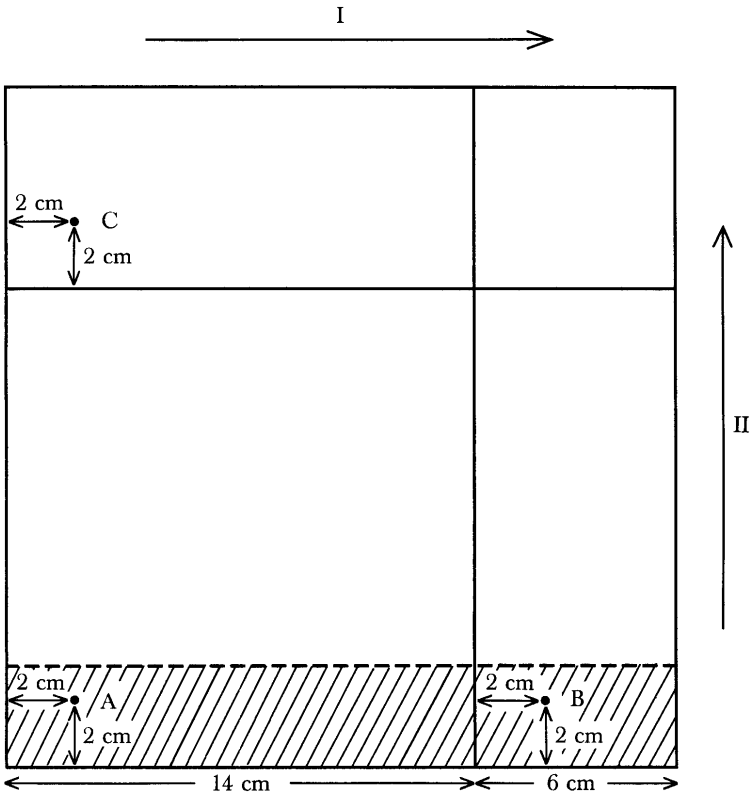


Rys. 1



Rys. 2

▼B



Rys. 3