31976L0372

L 102/8 *AZ EURÓPAI KÖZÖSSÉGEK HIVATALOS LAPJA* 1976.4.15.

A BIZOTTSÁG HETEDIK IRÁNYELVE

(1976. március 1.)

a takarmányok hatósági ellenőrzésére szolgáló közösségi analitikai módszerek meghatározásáról

(76/372/EGK)

AZ EURÓPAI KÖZÖSSÉGEK BIZOTTSÁGA,

tekintettel az Európai Gazdasági Közösséget létrehozó szerződésre,

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

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

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

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

ELFOGADTA EZT AZ IRÁNYELVET:

1. cikk

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

Az analizálandó minta előkészítéséről szóló rész kivételével, az 1971. június 15-i 71/250/EGK első bizottsági irányelv mellékletének 1. részében (Bevezetés) megállapított általános rendelkezéseket kell alkalmazni az ezen irányelv mellékletében leírt módszerek esetében.

2. cikk

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

3. cikk

Ennek az irányelvnek a tagállamok a címzettjei.

Kelt Brüsszelben, 1976. március 1-jén.

a Bizottság részéről

P. J. LARDINOIS

a Bizottság tagja

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

MELLÉKLET

AZ AFLATOXIN B_1 MEGHATÁROZÁSA

A. EGYDIMENZIÓS VÉKONYRÉTEG-KROMATOGRÁFIÁS MÓDSZER

1. **Cél és alkalmazási terület**

Ez a módszer lehetővé tesz az aflatoxin B_1 szintjének meghatározását a következő takarmányokban: földimogyoró, kopra, lenmag, szója, szezám, babaszu pálmaolaj és kukoricacsíra-olaj pogácsa, gabonafélék és gabonakészítmények, borsóliszt, burgonyapép és -keményítő. A meghatározás alsó méréshatára 0,01 mg/kg (10 ppb).

Ha a meghatározást interferáló anyagok jelenléte hátráltatja, akkor a B. módszer (kétdimenziós vékonyréteg-kromatográfia) alkalmazásával újra kell kezdeni az analízist.

2. **Vizsgálati alapelv**

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

3. **Reagensek**

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

3.1. Aceton.

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

3.3. n-Hexán.

3.4. Metil-alkohol.

3.5. Víz- és peroxidmentes dietil-éter.

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

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

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

3.9. Előzetesen kloroformmal zsírtalanított hidrofil gyapot vagy üvegvatta.

3.10. Vízmentes, granulált nátrium-szulfát.

3.11. Inert gáz, pl. nitrogén.

3.12. 1 N sósav.

3.13. 50 %-os (v/v) kénsav.

3.14. Kieselguhr (hyflosupercel), savval mosva.

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

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

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

3.18. Futtató oldószerek:

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

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

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

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

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

4. **Eszközök**

4.1. Daráló-keverő.

4.2. Rázógép vagy mágneses keverő.

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

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

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

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

4.7. Vékonyréteg-kromatográfiás (TLC) felszerelés.

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

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

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

4.10. 10 ml-es osztott kémcsövek polietilén dugóval.

4.11. UV spektrofotométer.

4.12. Fluorodenzitométer (nem feltétlenül szükséges).

5. **A vizsgálat módja**

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

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

5.2. *Extrahálás*

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

5.3. *Tisztítás oszlopkromatográfiával*

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

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

Keverjük össze az 5.2. pontban nyert kivonat 50 milliliterét 100 ml n-Hexánnal (3.3.) és az elegy teljes mennyiségét vigyük fel az oszlopra. Hagyjuk a folyadékot lecsöpögni, amíg az éppen a nátrium-szulfát réteg felszínéhez ér. Öntsük el a mosófolyadékot. Ezután adjunk hozzá 100 ml dietil-étert (3.5.), és ismét hagyjuk lecsöpögni, amíg a nátrium-szulfát réteg felszínéhez ér. A fenti műveletek alatt figyeljünk arra, hogy az áramlási sebesség percenként 8–12 ml legyen és, hogy az oszlop ne száradjon ki. Öntsük el a mosófolyadékot. Ezután mossuk az oszlopot 150 ml kloroform/metil-alkohol keverékkel (3.7.), és gyűjtsük össze az eluátum teljes mennyiségét.

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

5.4. *Vékonyréteg-kromatográfia*

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

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

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

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

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

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

5.5. *Mennyiségi meghatározások*

A meghatározást vizuálisan vagy fluorodenzitométerrel végezzük a következők szerint.

5.5.1. Vizuális mérések

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

5.5.2. Fluorodenzitométeres mérések

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

5.6. *Az aflatoxin B_1 azonosításának megerősítése*

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

5.6.1. Kénsavas kezelés

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

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

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

5.6.2.1. Az oldatok felvitele

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

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

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

5.6.2.2. Futtatás

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

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

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

5.6.2.3. A kromatogram értelmezése

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

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

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

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

6. Az eredmény kiszámítása

6.1. *A vizuális mérések esetén*

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

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

ahol:

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

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

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

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

6.2. *A fluorodenzitometriás mérések esetén*

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

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

ahol:

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

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

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

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

7. A standardoldat (3.16.) elkészítése és vizsgálata

7.1 *Az aflatoxin B_1 koncentrációjának meghatározása*

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

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

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

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

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

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

7.2 *A kromatográfiás tisztaság vizsgálata*

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

8. Ismételhetőség

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

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

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

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

9. Reprodukálhatóság

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

B. KÉTDIMENZIÓS VÉKONYRÉTEG-KROMATOGRÁFIÁS MÓDSZER

1. **Cél és alkalmazási terület**

Ez a módszer lehetővé teszi az aflatoxin B_1 szint meghatározását az A. módszer alkalmazási területén kívül eső takarmányokban. A meghatározás alsó méréshatára 0,01mg/kg (10 ppb). Ez a módszer nem alkalmazható a citrusgyümölcsökből készült pépet tartalmazó takarmányok esetében.

2. **Vizsgálati alapelv**

A mintát kloroformmal extraháljuk. A kivonatot leszűrjük, majd vesszük egy aliquot részét és szilikagél oszlop-kromatográfiával tisztítjuk. Az eluátumot bepároljuk és a maradékot meghatározott térfogatú kloroformban vagy benzol és acetonitril keverékében visszaoldjuk. Ezen oldat egy aliquot részén kétdimenziós vékonyréteg kromatográfiát (TLC) végzünk. Az aflatoxin B_1 mennyiségét a kromatogram UV-fénnyel történő megvilágításával, vizuálisan vagy fluorodenzitométerrel, standard aflatoxin B_1 ismert mennyiségeivel történő összehasonlítás alapján határozzuk meg. A takarmányból kivont aflatoxin B_1 azonosítását a jelzett módszerrel meg kell erősíteni.

3. **Reagensek**

Megjegyzés:
Az összes reagens „analitikai tisztaságú”, kivéve ha másként írják elő.

3.1. Aceton.

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

3.3. n-Hexán.

3.4. Metil-alkohol.

3.5. Víz- és peroxidmentes dietil-éter.

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

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

3.8. Szilikagél oszlop-kromatográfiához, 0,05–0,20 mm közötti részecskeméretttel.

3.9. Előzetesen kloroformmal zsírtalanított abszorbens gyapotvatta vagy üveggyapot.

3.10. Vízmentes, granulált nátrium-szulfát.

3.11. Inert gáz, pl. nitrogén.

3.12. 1 N sósav.

3.13. Savval mosott Kieselguhr (hyflosupercel).

3.14. Szilikagél G-HR vagy azzal egyenértékű a TLC-hez.

3.15. Futtató oldószerek.

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

3.15.2. Kloroform (3.2.)/aceton (3.1.): 9/1 (v/v) arányú keveréke, telítetlen kád.

3.16. Standardoldat, amely körülbelül 0,1 µg/ml aflatoxin B_1-et tartalmaz kloroformban (3.2.) vagy benzol/acetonitril keverékben (3.6.), az A. módszer 7. pontjában leírt módon elkészítve és ellenőrizve.

4. **Eszközök**

Lásd az A. módszer 4. pontjában.

5. **A vizsgálat módja**

5.1. A minta elkészítése
5.2. Extrahálás
5.3. Oszlop-kromatográfiás tisztítás
} Lásd az A. módszer 5.1., 5.2. és 5.3. pontjában.

5.4. *Kétdimenziós TLC*

5.4.1. Az oldatok felvitele (kövessük az 1. ábrán látható diagramot)

Húzzunk két egyenes vonalat a lemez (4.8.) két szomszédos oldalával párhuzamosan (5 és 6 centiméterre a szélektől), amelyek oldószerfront migrációs határaként szolgálnak. Kapilláris pipettával vagy mikrofecskendővel cseppentsük foltokban a lemezre a következő oldatokat:

– az A. pontra: az 5.3. pont szerint nyert tisztított mintakivonatból 20 µl-t,

– a B. pontra: a standardoldatból (3.16.) 20 µl-t,

– a C. pontra: a standardoldatból (3.16.) 10 µl-t,

– a D. pontra: a standardoldatból (3.16.) 20 µl-t,

– az E. pontra: a standardoldatból (3.16.) 40 µl-t.

Szárítsuk a lemezt levegő vagy inert gáz (3.11.) árammal. A kapott foltok átmérőjének körülbelül 5 mm-nek kell lennie.

5.4.2. A kromatogram kifejlesztése (kövessük az 1. ábrán látható diagramot)

A futtatószerrel (3.15.1.) (1 centiméteres réteg a telített kádban), sötét helyen fejlesszük ki a kromatogramot az I. irányba, amíg az oldószerfront eléri a határvonalat. Vegyük ki a lemezt a kádból és sötét helyen, szobahőmérsékleten hagyjuk száradni 15 percig.

Ezt követően a futtatószerrel (3.15.2.) (1 centiméteres réteg a telítetlen kádban), sötét helyen fejlesszük ki a kromatogramot a II. irányba, amíg az oldószerfront eléri a határvonalat. Vegyük ki a lemezt a kádból, és sötét helyen hagyjuk száradni szobahőmérsékleten.

5.4.3. A kromatogram értelmezése (kövessük a 2. ábrán látható diagramot)

A lemezt a lámpától (4.9.) 10 centiméterre helyezve világítsuk meg a kromatogramot UV-fénnyel. Határozzuk meg a standard oldatból származó aflatoxin B_1 fluoreszkáló B., C., D. és E. foltjainak elhelyezkedését. Húzzunk két, ezeken a foltokon áthaladó, illetve a futtatási irányra merőleges, képzeletbeli vonalat. E vonalak P. metszéspontja az a hely, ahol az A. ponton felvitt (1. ábra) mintakivonatból származó aflatoxin B_1 folt várhatóan megtalálható. Azonban az aflatoxin B_1 folt tényleges helye az egymással körülbelül 100°-os szöget bezáró, a B., illetve a C. ponton áthaladó képzeletbeli egyenesek Q. metszéspontjában is lehet. A mintakivonatban található aflatoxin B_1 mennyiségét az 5.5. pont szerint határozzuk meg.

5.4.4. Kiegészítő kromatográfia

Húzzunk két egyenes vonalat egy új lemez (4.8.) két szomszédos oldalával párhuzamosan az 1. ábrán látható diagram által jelzett módon, és az A. ponton (lásd az 1. ábrát) vigyünk fel az 5.3. pont szerint nyert tisztított mintakivonatból 20 µl-t, és erre ráhelyezve vigyünk fel a standard oldatból (3.16.) 20 µl-t. Fejlesszük ki az 5.4.2. pont szerint. Világítsuk meg a kromatogramot UV-fénnyel (4.9.), és ellenőrizzük azt, hogy:

– a kivonatból és a standard oldatból származó aflatoxin B_1 foltok egymáson vannak-e,

– ennek a foltnak a fluoreszcenciája erősebb-e, mint az első lemezen, a Q. ponton fejlesztett aflatoxin B_1 folt fluoreszcenciája.

5.5. *Mennyiségi meghatározások*

A meghatározást vizuálisan vagy fluorodenzitométerrel az alábbiakban leírt módon végezzük.

5.5.1. Vizuális mérések

Határozzuk meg a kivonatban lévő aflatoxin B_1 mennyiségét úgy, hogy a kivonatfolt fluoreszcenciájának erősségét összevetjük a standard oldat C., D. és E. foltok fluoreszcenciájának erősségével. Szükség esetén interpoláljunk. Ha a kivonat 20 µl-ének fluoreszcencia-intenzitása nagyobb, mint a standard oldat 40 µl-ének fluoreszcencia-intenzitása, akkor az ismételt vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálatot megelőzően hígítsuk fel a kivonatot 10- vagy 100-szorosára kloroformmal (3.2.) vagy a benzol/acetonitril keverékkel (3.6.).

5.5.2. Fluorodenzitometriás mérések

Mérjük meg az aflatoxin B_1 foltok fluoreszcencia-intenzitását a fluorodenzitométerrel (4.12.), 365 nm gerjesztési hullámhosszon és 443 nm emissziós hullámhosszon.

A kivonatfoltban lévő aflatoxin B_1 mennyiségét úgy határozzuk meg, hogy annak fluoreszcencia-intenzitását összevetjük a standard oldat C., D. és E. foltjainak fluoreszcencia-intenzitásával.

5.6. *Az aflatoxin B_1 azonosításának megerősítése*

Lásd az A. módszer 5.6. pontjában.

6. **Az eredmények kiszámítása**

Lásd az A. módszer 6. pontjában.

7. **Megismételhetőség**

Lásd az A. módszer 8. pontjában.

8. **Reprodukálhatóság**

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

C. AZ A. ÉS B. MÓDSZERRE VONATKOZÓ ÉSZREVÉTELEK

1. **Zsírtalanítás**

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

Ilyen esetekben az analízis eredményét a zsírtalanítás előtti minta tömegére vonatkozóan kell kifejezni.

2. **Az eredmények reprodukálhatósága**

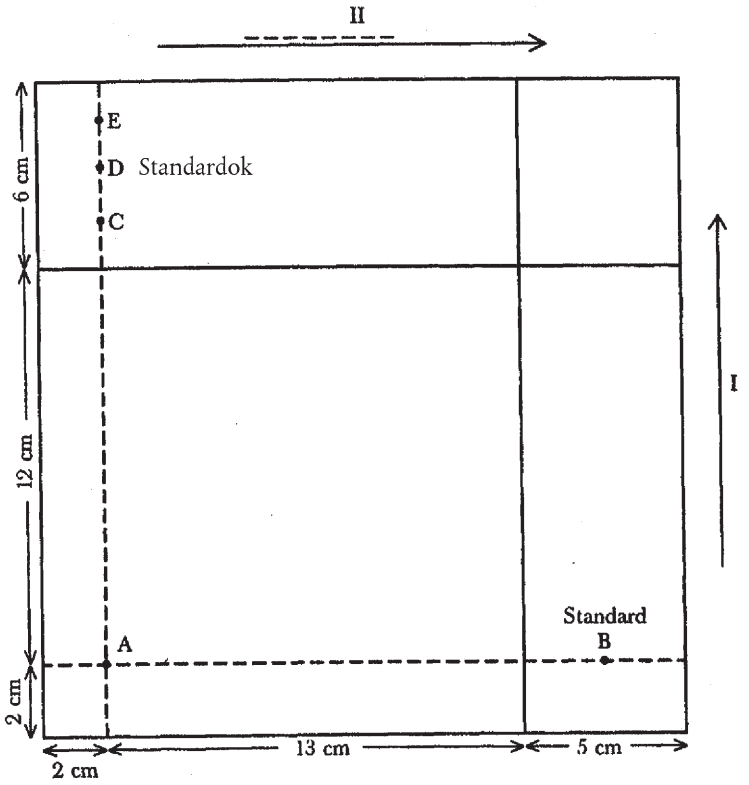
Az eredmények reprodukálhatóságának, vagyis az ugyanazon mintából két vagy több laboratórium által kapott eredmények közötti eltérés becsült értékei a következők:

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

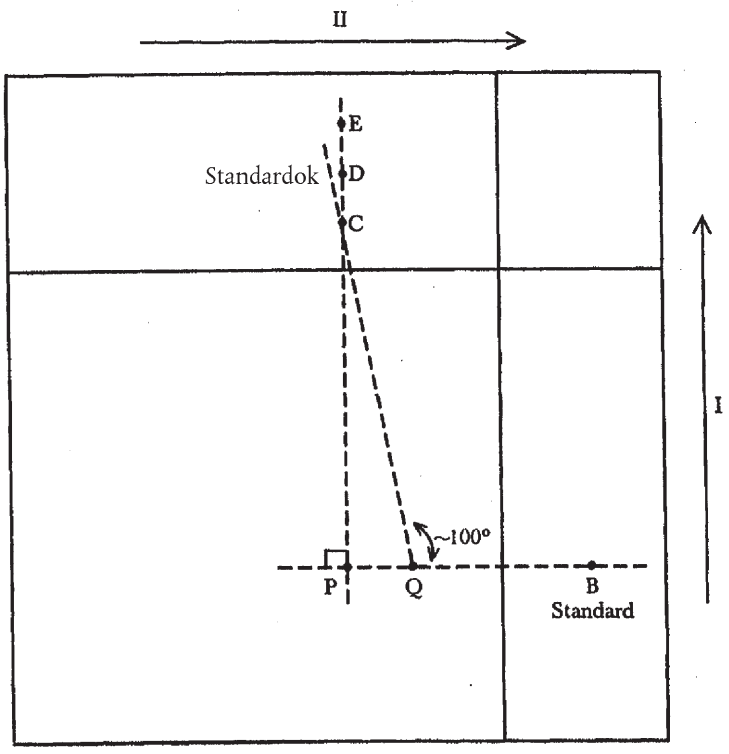
± 10 µg/kg, ha az aflatoxin B_1-re kapott középérték 20–50 µg/kg közé esik;

a középérték ± 20 %-a, ha az aflatoxin B_1-re kapott középérték az 50 µg/kg-ot meghaladja.

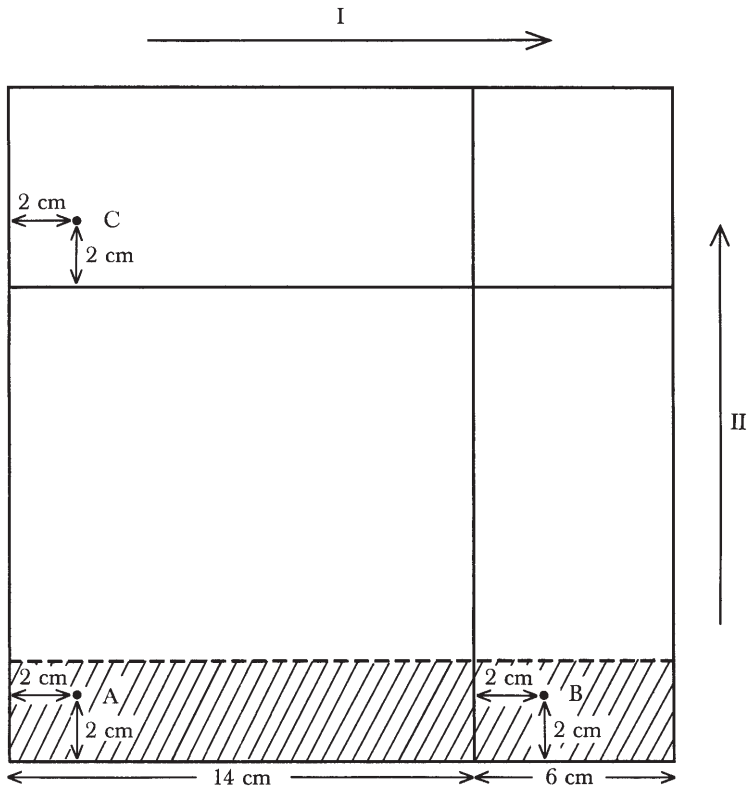
A melléklet függeléke



1. ábra



2. ábra



3. ábra