Το έγγραφο αυτό συνιστά βοήθημα τεκμηρίωσης και δεν δεσμεύει τα κοινοτικά όργανα

►**B**

ΕΒΔΟΜΗ ΟΔΗΓΙΑ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της 1ης Μαρτίου 1976

περί καθορισμού των κοινοτικών μεθόδων αναλύσεως για τον επίσημο έλεγχο των ζωοτροφών

(76/372/ΕΟΚ)

(ΕΕ L 102 της 15.4.1976, σ. 8)

Τροποποιείται από:

		Επίσημη Εφημερίδα		
		αριθ.	σελίδα	ημερομηνία
►**M1**	Οδηγία 81/680/ΕΟΚ της Επιτροπής της 30ής Ιουλίου 1981	L 246	32	29.8.1981
►**M2**	Οδηγία 92/95/ΕΟΚ της Επιτροπής της 9ης Νοεμβρίου 1992	L 327	54	13.11.1992
►**M3**	Οδηγία 94/14/ΕΚ της Επιτροπής της 29ης Μαρτίου 1994	L 94	30	13.4.1994

▼B

ΕΒΔΟΜΗ ΟΔΗΓΙΑ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της 1ης Μαρτίου 1976

περί καθορισμού των κοινοτικών μεθόδων αναλύσεως για τον επίσημο έλεγχο των ζωοτροφών

(76/372/ΕΟΚ)

Η ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΤΩΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ,

Έχοντας υπόψη:

τη συνθήκη περί ιδρύσεως της Ευρωπαϊκής Οικονομικής Κοινότητος,

την οδηγία του Συμβουλίου της 20ής Ιουλίου 1970 περί εισαγωγής κοινοτικών τρόπων λήψεως δειγμάτων και μεθόδων αναλύσεως για τον επίσημο έλεγχο των ζωοτροφών [1], όπως τροποποιήθηκε τελευταία με την πράξη προσχωρήσεως [2], και ιδίως με το άρθρο 2,

Εκτιμώντας:

ότι η παραπάνω οδηγία προβλέπει ότι οι επίσημοι έλεγχοι των ζωοτροφών για τη διαπίστωση του γεγονότος αν τηρούνται οι όροι που καθορίζονται δυνάμει των νομοθετικών, κανονιστικών και διοικητικών διατάξεων, οι οποίες αφορούν την ποιότητα και τη σύνθεση των ζωοτροφών, πραγματοποιούνται σύμφωνα με τους κοινοτικούς τρόπους λήψεως δειγμάτων και τις κοινοτικές μεθόδους αναλύσεως·

ότι οι οδηγίες 71/250/ΕΟΚ, 71/393/ΕΟΚ, 72/199/ΕΟΚ, 73/46/ΕΟΚ, 74/203/ΕΟΚ και 75/84/ΕΟΚ της Επιτροπής της 15ης Ιουνίου 1971 [3], 18ης Νοεμβρίου 1971 [4], 27ης Απριλίου 1972 [5], 5ης Δεκεμβρίου 1972 [6], 25ης Μαρτίου 1974 [7] και 20ής Δεκεμβρίου 1974 [8] έχουν ήδη καθορίσει έναν ορισμένο αριθμό κοινοτικών μεθόδων αναλύσεως· ότι λαμβανομένου υπόψη του βαθμού προόδου των πραγματοποιηθεισών από τότε εργασιών πρέπει να θεσπισθεί μια εβδόμη σειρά μεθόδων·

ότι τα προβλεπόμενα στην παρούσα οδηγία μέτρα είναι σύμφωνα με τη γνώμη της Μόνιμης Επιτροπής Ζωοτροφών,

ΕΞΕΔΩΣΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΟΔΗΓΙΑ:

Άρθρο 1

Τα Κράτη Μέλη ορίζουν ότι οι αναλύσεις για τους επισήμους ελέγχους των ζωοτροφών, σε ό,τι αφορά την περιεκτικότητά τους σε αφλατοξίνη B_1, πραγματοποιούνται σύμφωνα με τις μεθόδους που περιγράφονται στο παράρτημα της παρούσας οδηγίας.

▼M1

▼B

Άρθρο 2

Τα Κράτη Μέλη θέτουν σε ισχύ το αργότερο την 1η Οκτωβρίου 1976 τις νομοθετικές, κανονιστικές και διοικητικές διατάξεις που είναι αναγκαίες για να συμμορφωθούν με τις διατάξεις της παρούσας οδηγίας. Ενημερώνουν αμέσως περί αυτού την Επιτροπή.

---

[1] ΕΕ αριθ. Ν 170 της 3.8.1970, σ. 2.
[2] ΕΕ αριθ. Ν 73 της 27.3.1972, σ. 14.
[3] ΕΕ αριθ. Ν 155 της 12.7.1971, σ. 13.
[4] ΕΕ αριθ. Ν 279 της 20.12.1971, σ. 7.
[5] ΕΕ αριθ. Ν 123 της 29.5.1972, σ. 6.
[6] ΕΕ αριθ. Ν 83 της 30.3.1973, σ. 21.
[7] ΕΕ αριθ. Ν 108 της 22.4.1974, σ. 7.
[8] ΕΕ αριθ. Ν 32 της 5.2.1975, σ. 26.

▼B

Άρθρο 3

Η παρούσα οδηγία απευθύνεται στα Κράτη Μέλη.

▼B

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ B_1

Α. ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΕ ΜΟΝΟΔΙΑΣΤΑΤΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΟΙΒΑΔΟΣ

▼M2

1. **Σκοπός και αντικείμενο**

Η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό του επιπέδου της αφλατοξίνης B_1 σε πρώτες ύλες και απλές ζωοτροφές. Η μέθοδος αυτή δεν μπορεί να εφαρμοστεί στην παρουσία στεμφύλων εσπεριδοειδών. Το κατώτερο όριο προσδιορισμού είναι 0,01 mg/kg (10 ppb).

Εφόσον υπάρχουν παρεμβαλλόμενες ουσίες οι οποίες παρεμποδίζουν τον προσδιορισμό, η ανάλυση επαναλαμβάνεται χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Β (υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης).

▼B

2. **Αρχή**

Το δείγμα εκχυλίζεται με χλωροφόρμιο. Το εκχύλισμα διηθείται, λαμβάνεται κατάλληλη ποσότητα από αυτό και καθαρίζεται με χρωματογραφία σε στήλη silica gel. Το προϊόν της εκλούσεως εξατμίζεται και το υπόλειμμα λαμβάνεται εκ νέου με έναν καθορισμένο όγκο χλωροφορμίου ή μίγματος βενζολίου και ακετονιτριλίου. Κατάλληλη ποσότητα του διαλύματος αυτού υποβάλλεται σε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος. Η ποσότητα της αφλατοξίνης B_1 προσδιορίζεται από την υπεριώδη ακτινοβολία του χρωματογραφήματος είτε οπτικά είτε με φθοριοπυκνομετρία δια συγκρίσεως με γνωστές ποσότητες προτύπου αφλατοξίνης B_1. Η ταυτότητα της αφλατοξίνης B_1 που εξάγεται από την τροφή πρέπει να επιβεβαιούται δια των ενδεδειγμένων μεθόδων.

3. **Αντιδραστήρια**

NB: Όλα τα αντιδραστήρια είναι ποιότητος «για ανάλυση» εφ' όσον δεν δίδεται καμία άλλη οδηγία.

3.1. Ακετόνη.

3.2. Χλωροφόρμιο, σταθεροποιηθέν με 0,5 μέχρι 1,0% αιθανόλη 96% (όγκος/όγκο).

3.3. η-Εξάνιο.

3.4. Μεθανόλη.

3.5. Άνυδρος διαιθυλικός αιθέρας, απηλλαγμένος υπεροξειδίων.

3.6. Μίγμα βενζολίου και ακετονιτριλίου: 98/2 (όγκος/όγκο).

3.7. Μίγμα χλωροφορμίου (3.2) και μεθανόλης (3.4): 97/3 (όγκος/όγκο).

3.8. Silica gel για χρωματογραφία σε στήλη κοκκομετρικής συνθέσεως: 0,05 μέχρι 0,20 mm.

3.9. Υδρόφιλος βάμβαξ που έχει απολιπανθεί προηγουμένως με χλωροφόρμιο ή υαλοβάμβαξ.

3.10. Θειικό νάτριο, άνυδρο, σε κόκκους

3.11. Αδρανές αέριο, για παράδειγμα άζωτο.

3.12. Υδροχλωρικό οξύ 1 N.

3.13. Θειικό οξύ 50% (όγκος/όγκο).

3.14. Γη διατόμων (hyflosupercel), εκπλυθείσα με οξύ.

3.15. Silica gel G-HR ή ισοδύναμο, για χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος.

3.16. Πρότυπο διάλυμα (διάλυμα αναφοράς) 0,1 μg περίπου αφλατοξίνης B_1 ανά χιλιοστόλιτρο σε χλωροφόρμιο (3.2) ή σε μίγμα

▼B

βενζολίου/ακετονιτριλίου (3.6), παρασκευαζόμενο και ελεγχόμενο όπως ορίζεται στο σημείο 7.

3.17. Πρότυπο ποιοτικό διάλυμα 0,1 μg περίπου αφλατοξινών B_1 και B_2 ανά χιλιοστόλιτρο σε χλωροφόρμιο (3.2) ή σε μίγμα βενζολίου/ακετονιτριλίου (3.6). Οι πυκνότητες αυτές δίδονται ενδεικτικά. Πρέπει να ρυθμισθούν ώστε να ληφθεί η αυτή ένταση φθορισμού για τις δύο αφλατοξίνες.

3.18. Διαλύτες αναπτύξεως:

3.18.1. Χλωροφόρμιο (3.2)/ακετόνη (3.1): 9/1 (όγκος/όγκο), δοχείο μετά μη κεκορεσμένης ατμοσφαίρας·

3.18.2. Διαιθυλικός αιθέρας (3.5)/μεθανόλη (3.4)/ύδωρ: 96/3/1 (όγκος/όγκο/όγκο), δοχείο μετά μη κεκορεσμένης ατμοσφαίρας·

3.18.3. Διαιθυλικός αιθέρας (3.5)/μεθανόλη (3.4) /ύδωρ: 94/4,5/1,5 (όγκος/όγκο/όγκο), δοχείο μετά κεκορεσμένης ατμοσφαίρας·

3.18.4. Χλωροφόρμιο (3.2)/μεθανόλη (3.4): 94/6 (όγκος/όγκο), δοχείο με κεκορεσμένη ατμόσφαιρα·

3.18.5. Χλωροφόρμιο (3.2)/μεθανόλη (3.4): 97/3 (όγκος/όγκο), δοχείο με κεκορεσμένη ατμόσφαιρα.

4. **Συσκευές**

4.1. Συνθλίπτης — αναμίκτης.

4.2. Συσκευή αναδεύσεως ή μαγνητικός αναδευτήρας.

4.3. Πτυχωτός ηθμός Schleicher και Schüll αριθ. 588 ή παρόμοιος, διαμέτρου: 24 cm.

4.4. Υάλινοι σωλήνες χρωματογραφίας (εσωτερικής διαμέτρου: 22 mm μήκους: 300 mm), μετά κρουνού από πλαστική ύλη τεφλόν και δεξαμενή 250 ml.

4.5. Περιστροφική συσκευή εξατμίσεως σε κενό με σφαιρική φιάλη ζέσεως σφαιρικού πυθμένος 500 ml.

4.6. Κωνικές φιάλες των 500 ml με εσμυρισμένο πώμα.

4.7. Συσκευές για χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος.

4.8. Υάλινες πλάκες για χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος 200 × 200 mm, παρασκευαζόμενες ως ακολούθως (οι υποδεικνυόμενες ποσότητες αρκούν για την κάλυψη 5 πλακών): εισάγονται 30 g silica gel G-HR (3.15) σε μια κωνική φιάλη, προστίθενται 60 ml ύδατος, η φιάλη πωματίζεται και αναταράσσεται επί ένα λεπτό. Το εναιώρημα κατανέμεται στις πλάκες έτσι ώστε να δημιουργηθεί μια ομοιόμορφη στοιβάδα πάχους 0,25 mm. Αφήνεται να αποξηρανθεί στον αέρα και διατηρείται κατόπιν σε ξηραντήρα εφοδιασμένο με silica gel. Κατά τη στιγμή της χρήσεως οι πλάκες αναζωογονούνται δια τοποθετήσεως επί 1 ώρα σε κλίβανο και σε θερμοκρασία 110 ºC.

Οι πλάκες που είναι έτοιμες για χρήση είναι κατάλληλες εφ' όσον δίνουν αποτελέσματα παρόμοια με εκείνα των πλακών που έχουν παρασκευασθεί όπως αναφέρθηκε παραπάνω.

4.9. Λαμπτήρας υπεριώδης μακρών κυμάτων (360 nm). Η ένταση της ακτινοβολίας πρέπει να επιτρέπει να διακρίνεται ακόμη καθαρά μια κηλίδα 1,0 ng αφλατοξίνης B_1 σε πλάκα χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδος από μια απόσταση 10 cm από τον λαμπτήρα.

4.10. Σωλήνες των 10 ml, βαθμολογημένοι, με πώμα από πολυαιθυλένιο.

4.11. Φασματοφωτόμετρο UV.

4.12. Φθοριοπυκνόμετρο (ενδεχομένως).

5. **Τρόπος εργασίας**

5.1. *Παρασκευή του δείγματος (βλέπε παρατηρήσεις, τμήμα Γ, σημείο 1).*

Το δείγμα κονιοποιείται κατά τρόπο ώστε να διέρχεται ολόκληρο από κόσκινο, με άνοιγμα οπών του δικτυωτού 1 mm (σύμφωνα με τη σύσταση ISO R 565).

▼B

5.2. *Εκχύλιση*

50,0 g δείγματος λεπτοαλεσθέντος και ομογενοποιηθέντος εισάγονται σε μια κωνική φιάλη των 500 ml (4.6). Προστίθενται 25 g γης διατόμων (3.14), 25 ml ύδατος και 250 ml χλωροφορμίου (3.2). Η φιάλη πωματίζεται, αναδεύεται ή αναταράσσεται επί 30 λεπτά με τη βοήθεια της συσκευής (4.2) και διηθείται σε πτυχωτό ηθμό (4.3). Τα πρώτα 10 ml του διηθήματος απορρίπτονται και συλλέγονται κατόπιν 50 ml.

5.3. *Καθαρισμός σε στήλη*

Το κατώτερο άκρο ενός σωλήνα χρωματογραφίας (4.4) εφοδιάζεται με πώμα από βάμβακα ή υαλοβάμβακα (3.9), πληρούνται τα δύο τρίτα του σωλήνα με χλωροφόρμιο (3.2) και προστίθενται 5 g θειικού νατρίου (3.10).

Εξακριβώνεται ότι η επάνω επιφάνεια της στοιβάδος του θειικού νατρίου είναι επίπεδη και κατόπιν προστίθενται σε μικρές δόσεις 10 g silica gel (3.8). Ανακινείται με προσοχή μετά από κάθε προσθήκη για να αποβληθούν οι φυσαλίδες του αέρα. Αφήνεται να κατακαθίσει επί 15 λεπτά και προστίθενται στη συνέχεια με προσοχή 15 g θειικού νατρίου (3.10). Αφήνεται να κατέλθει το υγρό στην άμεσο προσέγγιση της επάνω επιφανείας της στοιβάδος του θειικού νατρίου.

Αναμιγνύονται τα ληφθέντα, στο 5.2, 50 ml εκχυλίσματος με 100 ml n-εξανίου (3.3) και μεταγγίζεται ποσοτικώς το μίγμα στη στήλη. Αφήνεται να κατέλθει το υγρό μέχρι την επάνω επιφάνεια της στοιβάδος του θειικού νατρίου. Απορρίπτεται το υγρό που έχει χυθεί. Προστίθενται στη συνέχεια 100 ml διαιθυλικού αιθέρα (3.5) και αφήνεται πάλι να κατέλθει το υγρό μέχρι την επάνω επιφάνεια της στοιβάδος του θειικού νατρίου. Κατά τη διάρκεια των εργασιών αυτών λαμβάνεται μέριμνα ώστε η ταχύτητα της ροής να είναι από 8 μέχρι 12 ml ανά λεπτό και η στήλη να μην αποξηρανθεί. Απορρίπτονται τα υγρά που έχουν χυθεί. Εκλούεται στη συνέχεια με 150 ml μίγματος χλωροφορμίου/μεθανόλης (3.7) και λαμβάνεται το σύνολο του προϊόντος εκλούσεως.

Εξατμίζεται αυτό μέχρι ξηρού, περίπου σε ρεύμα αδρανούς αερίου (3.11) και σε θερμοκρασία που να μην υπερβαίνει τους 50º Κελσίου, με τη βοήθεια μιας περιστροφικής συσκευής εξατμίσεως σε κενό (4.5).Το υπόλειμμα φέρεται ποσοτικώς με τη βοήθεια χλωροφορμίου (3.2) ή μίγματος βενζολίου/ακετονιτριλίου (3.6) σε ένα σωλήνα των 10 ml (4.10). Συμπυκνώνεται το διάλυμα σε ρεύμα αδρανούς αερίου (3.11) και κατόπιν φέρεται ο όγκος στα 2 ml με τη βοήθεια χλωροφορμίου (3.2) ή μίγματος βενζολίου/ακετονιτριλίου (3.6).

5.4. *Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος*

Εναποτίθενται ακριβώς σε μια πλάκα χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδος (4.8), σε απόσταση 2 cm από το κάτω άκρο και σε διαστήματα 2 cm οι παρακάτω αναφερόμενοι όγκοι του προτύπου διαλύματος και του εκχυλίσματος:

— 10, 15, 20, 30 και 40 μl προτύπου διαλύματος αφλατοξίνης B_1 (3.16)·

— 10 μl εκ του εκχυλίσματος που λαμβάνεται στο 5.3 και, τοποθετούμενα επάνω στα προηγούμενα στο ίδιο σημείο, 20 μl προτύπου διαλύματος (3.16)·

— 10 και 20 μl εκ του εκχυλίσματος που λαμβάνεται στο 5.3.

Αναπτύσσεται το χρωματογράφημα μακριά από το φως με τη βοήθεια ενός διαλύτου αναπτύξεως (3.18). Η επιλογή του διαλύτου πρέπει να γίνεται προηγουμένως με την εναπόθεση στην πλάκα 25 μl εκ του ποιοτικού προτύπου διαλύματος (3.17) και εξασφαλίζεται ότι κατά την ανάπτυξη οι αφλατοξίνες B_1 και B_2 είναι εντελώς διαχωρισμένες.

Αφήνονται οι διαλύτες να εξατμισθούν μακριά από το φως και ακτινοβολούνται κατόπιν με υπεριώδες φως, αφού τοποθετηθεί η πλάκα σε απόσταση 10 cm από το λαμπτήρα (4.9). Οι κηλίδες της αφλατοξίνης B_1 δίνουν γαλάζιο φθορισμό.

5.5. *Ποσοτικοί προσδιορισμοί*

Οι ποσοτικοί προσδιορισμοί διενεργούνται είτε οπτικά είτε με φθοριοπυκνόμετρο όπως αναφέρεται παρακάτω.

▼B

5.5.1. Οπτικές μετρήσεις

Προσδιορίζεται η ποσότητα της αφλατοξίνης B_1 του εκχυλίσματος δια συγκρίσεως της εντάσεως του φθορισμού της κηλίδος με εκείνη των κηλίδων του προτύπου διαλύματος. Παρεμβάλλεται αν είναι αναγκαίο. Ο φθορισμός που δημιουργείται με την εναπόθεση του εκχυλίσματος επάνω στο πρότυπο διάλυμα πρέπει να είναι περισσότερο ισχυρός από εκείνον των 10 μl εκχυλίσματος και δεν πρέπει να γίνεται αισθητή παρά μόνο μια κηλίδα. Αν η ένταση του φθορισμού που δημιουργείται από τα 10 μl εκχυλίσματος είναι ισχυρότερη από εκείνη των 40 μl του προτύπου διαλύματος, το εκχύλισμα διαλύεται 10 ή 100 φορές με χλωροφόρμιο (3.2) ή με μίγμα βενζολίου/ακετονιτριλίου (3.6) πριν υποβληθεί σε νέα χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος.

5.5.2. Μετρήσεις με φθοριοπυκνόμετρο

Μετράται η ένταση του φθορισμού των κηλίδων της αφλατοξίνης B_1 στο φθοριοπυκνόμετρο (4.12) χρησιμοποιουμένου ενός μήκους κύματος διεγέρσεως της τάξεως των 365 nm και ενός μήκους κύματος εκπομπής της τάξεως των 443 nm. Προσδιορίζονται οι ποσότητες της αφλατοξίνης B_1 των αποθεμάτων του εκχυλίσματος δια συγκρίσεως των εντάσεων του φθορισμού των κηλίδων του εκχυλίσματος και του προτύπου διαλύματος.

5.6. *Επιβεβαίωση της ταυτότητος της αφλατοξίνης B_1*

Επιβεβαιούται η ταυτότητα της αφλατοξίνης B_1 του εκχυλίσματος με τις παρακάτω μεθόδους.

5.6.1. Επεξεργασία με θειικό οξύ

Ψεκάζεται θειικό οξύ (3.13) στο χρωματογράφημα που έχει ληφθεί στο 5.4. Ο φθορισμός των κηλίδων της αφλατοξίνης B_1 πρέπει να μεταβάλλει χρώμα από το γαλάζιο μέχρι το κίτρινο με υπεριώδη ακτινοβολία.

5.6.2. Χρωματογραφία δύο διαστάσεων περιλαμβάνουσα το σχηματισμό αφλατοξίνης B_1-ημιακετάλης (hemiacetal) (αφλατοξίνη B_{2a})

NB: Οι εργασίες οι οποίες περιγράφονται παρακάτω πρέπει να πραγματοποιούνται σύμφωνα με το σχήμα που παρουσιάζεται στην εικόνα 3.

5.6.2.1. Εναπόθεση των διαλυμάτων

Χαράσσονται σε μια πλάκα (4.8) δύο ευθείες παράλληλοι σε δύο γειτονικές πλευρές (σε απόσταση 6 cm από τις πλευρές αυτές) οι οποίες προορίζονται να οριοθετήσουν τη μετατόπιση των μετώπων των διαλυτών. Εναποτίθενται σε μια πλάκα με τη βοήθεια τριχοειδών σιφωνίων ή μικροσυρίγγων τα διαλύματα που αναφέρονται παρακάτω:

— *στο σημείο Α:* όγκος καθαρισμένου εκχυλίσματος του δείγματος του παραχθέντος στο 5.3, που περιέχει περίπου 2,5 νανογραμμάρια αφλατοξίνης B_1·

— *στα σημεία Β και Γ:* 25 μl του προτύπου διαλύματος (3.16).

5.6.2.2. Ανάπτυξη

Αναπτύσσεται το χρωματογράφημα προς την κατεύθυνση I με τη βοήθεια του διαλύτου αναπτύξεως (3.18.1) (στοιβάδα 1 cm μέσα σε δοχείο με μη κεκορεσμένη ατμόσφαιρα) μακριά από το φως μέχρις ότου το μέτωπο του διαλύτου έλθει σε επαφή με τη γραμμή οριοθετήσεως.

Αποσύρεται η πλάκα από το δοχείο και αφήνεται να ξηρανθεί επί πέντε λεπτά μακριά από το φως και στη θερμοκρασία του περιβάλλοντος. Ψεκάζεται στη συνέχεια με υδροχλωρικό οξύ (3.12) σε μια λωρίδα ύψους 2,5 cm η οποία καλύπτει τα σημεία Α και Β (παρουσιάζεται με τις γραμμωτές σκιές στην εικόνα 3) μέχρις ότου το χρώμα γίνει σκοτεινό, προστατευομένου του υπολοίπου της πλακός με ένα φύλλο από γυαλί. Αφήνεται να αντιδράσει για δέκα λεπτά στο σκοτάδι και ξηραίνεται σε ρεύμα αέρος στη θερμοκρασία του περιβάλλοντος.

Αναπτύσσεται στη συνέχεια το χρωματογράφημα προς την κατεύθυνση II με τη βοήθεια του διαλύτου αναπτύξεως (3.18.1) (στοιβάδα 1 cm μέσα σε δοχείο με μη κεκορεσμένη

▼B

ατμόσφαιρα) μακριά από το φως, μέχρις ότου το μέτωπο του διαλύτου προσεγγίσει τη γραμμή οριοθετήσεως. Αφαιρείται η πλάκα από το δοχείο και αφήνεται να ξηρανθεί στη θερμοκρασία του περιβάλλοντος.

5.6.2.3. Ερμηνεία του χρωματογραφήματος

Εξετάζεται το χρωματογράφημα σε υπεριώδες φως (4.9) και εξακριβώνονται οι παρατηρήσεις που αναφέρονται παρακάτω:

α) Εμφάνιση μιας φθοριζούσης γαλάζιας κηλίδος αφλατοξίνης B_1 προερχομένης από το πρότυπο διάλυμα που έχει εναποτεθεί στο Γ (μετατόπιση προς την κατεύθυνση I).

β) Εμφάνιση μιας φθοριζούσης γαλάζιας κηλίδος αφλατοξίνης B_1 (η οποία δεν αντέδρασε με το υδροχλωρικό οξύ) και μιας εντονοτέρας φθοριζούσης γαλάζιας κηλίδος αφλατοξίνης B_1-ημιακετάλης (hemiacetal), προερχομένης από το πρότυπο διάλυμα που έχει εναποτεθεί στο Β (μετατόπιση προς την κατεύθυνση II).

γ) Εμφάνιση κηλίδων παρομοίων προς εκείνες που αναφέρονται στην περίπτωση β) οι οποίες προέρχονται από το εκχύλισμα του δείγματος που έχει εναποτεθεί στο Α. Η θέση των κηλίδων αυτών ορίζεται από την απόσταση μετατοπίσεως της αφλατοξίνης B_1 από το σημείο Α προς την κατεύθυνση I (η ίδια απόσταση με εκείνη που έχει διανυθεί από το πρότυπο που έχει εναποτεθεί στο Γ) ακολουθουμένη από τις αποστάσεις μετατοπίσεως που έχουν διανυθεί στην κατεύθυνση II από τη αφλατοξίνη B_1 (η οποία δεν αντέδρασε με το υδροχλωρικό οξύ) και από την αφλατοξίνη B_1-ημιακετάλη (hemiacetal) (οι αυτές αποστάσεις μ' εκείνες που έχουν διανυθεί από το πρότυπο που έχει εναποτεθεί στο Β). Οι εντάσεις φθορισμού των κηλίδων της ημιακετάλης που προέρχονται από το εκχύλισμα και το πρότυπο διάλυμα που έχει εναποτεθεί στο Β πρέπει να ανταποκρίνονται μεταξύ τους.

6. **Υπολογισμός των αποτελεσμάτων**

6.1. *Από τις οπτικές μετρήσεις*

Η περιεκτικότητα σε μικρογραμμάρια της αφλατοξίνης B_1 ανά χιλιόγραμμο δείγματος(ppb) δίδεται από τον τύπο:

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

στον οποίο:

Y και X είναι αντιστοίχως οι όγκοι σε μικρολίτρα του προτύπου διαλύματος αφλατοξίνης B_1 (3.16) και του εκχυλίσματος το οποίο έχει μια παρομοία ένταση φθορισμού·

S = συγκέντρωση σε μικρογραμμάρια αφλατοξίνης B_1 ανά χιλιοστόλιτρο του προτύπου διαλύματος (3.16)·

V = τελικός όγκος του εκχυλίσματος σε μικρολίτρα, υπολογιζομένων των ενδεχομένων διαλύσεων·

W = βάρος σε γραμμάρια του ληφθέντος δείγματος που αντιστοιχεί στον όγκο του εκχυλίσματος ο οποίος υποβλήθηκε σε καθαρισμό σε στήλη.

6.2. *Από τις μετρήσεις με φθοριοπυκνόμετρο*

Η περιεκτικότητα σε μικρογραμμάρια αφλατοξίνης B_1 ανά χιλιόγραμμο δείγματος (ppb) δίδεται από τον τύπο:

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

στον οποίο:

Y = όγκος σε μικρολίτρα του εκχυλίσματος που έχει εναποτεθεί στην πλάκα (10 ή 20 μl)·

▼B

S = ποσότητα σε νανογραμμάρια αφλατοξίνης B_1 του αποθέματος του εκχυλίσματος (υπολογιζομένου του όγκου Y), υπολογιζομένη από τους προσδιορισμούς·

V = τελικός όγκος του εκχυλίσματος σε μικρολίτρα, λαμβανομένων υπόψη των ενδεχομένων διαλύσεων·

W = βάρος σε γραμμάρια του ληφθέντος δείγματος που αντιστοιχεί στον όγκο του εκχυλίσματος ο οποίος υποβλήθηκε σε καθαρισμό σε στήλη.

7. **Προετοιμασία και έλεγχος του διαλύματος (3.16)**

7.1. *Προσδιορισμός της συγκεντρώσεως της αφλατοξίνης B_1*

Παρασκευάζεται ένα πρότυπο διάλυμα αφλατοξίνης B_1 σε χλωροφόρμιο (3.2) ή σε μίγμα βενζολίου/ακετονιτριλίου (3.6), του οποίου η συγκέντρωση είναι από 8 μέχρι 10 μικρογραμμάρια ανά χιλιοστόλιτρο. Ρυθμίζεται το φάσμα απορροφήσεως μεταξύ 330 και 370 nm με τη βοήθεια του φασματοφωτομέτρου (4.11).

Αυξάνεται η οπτική πυκνότητα (A) σε 363 nm στην περίπτωση του διαλύματος του χλωροφορμίου· σε 348 nm στην περίπτωση του διαλύματος σε μίγμα βενζολίου/ακετονιτριλίου.

Υπολογίζεται η συγκέντρωση σε μικρογραμμάρια αφλατοξίνης B_1 ανά χιλιοστόλιτρο διαλύματος από τους παρακάτω τύπους:

$\frac{312 \cdot A \cdot 1000}{20600}$ για το διάλυμα χλωροφορμίου·

$\frac{312 \cdot A \cdot 1000}{19800}$ για το διάλυμα σε μίγμα βενζολίου/ακετονιτριλίου.

Διενεργούνται μακράν του φωτός οι απαραίτητες διαλύσεις για να ληφθεί το πρότυπο διάλυμα εργασίας, του οποίου η συγκέντρωση σε αφλατοξίνη B_1 είναι περίπου 0,1 μικρογραμμάρια ανά χιλιοστόλιτρο. Διατηρούμενο το διάλυμα αυτό σε θερμοκρασία 4 ºC παραμένει σταθερό για δύο εβδομάδες.

7.2. *Έλεγχος χρωματογραφικής καθαρότητος*

Εναποτίθενται σε μια πλάκα (4.8) 5 μl προτύπου διαλύματος 8-10 μg αφλατοξίνης B_1 ανά χιλιοστόλιτρο (βλέπε 7.1). Αναπτύσσεται το χρωματογράφημα όπως αναφέρεται στο 5.4. Σε υπεριώδες φως ο φθορισμός δεν πρέπει να επιτρέπει να γίνεται αισθητή παρά μόνο μια κηλίδα και κανένας φθορισμός δεν πρέπει να γίνεται αισθητός στη ζώνη του αρχικού αποθέματος.

8. **Επαναληπτικότητα**

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων των δύο παραλλήλων προσδιορισμών που πραγματοποιούνται στο ίδιο δείγμα από τον ίδιο εργαστηριακό υπάλληλο (υπεύθυνο για την ανάλυση) δεν πρέπει να υπερβαίνει:

— το 25% εκ του πλέον υψηλού αποτελέσματος για τις περιεκτικότητες σε αφλατοξίνη B_1 από 10 μέχρι 20 μg/kg·

— 5 μg σε απόλυτη τιμή, για περιεκτικότητες από 20 έως 50 μg/kg·

— 10% εκ του πλέον υψηλού αποτελέσματος για τις περιεκτικότητες που είναι ανώτερες των 50 μg/kg.

9. **Αναπαραγωγικότητα**

Βλέπε «Παρατηρήσεις», τμήμα Γ, σημείο 2.

▼M2

Β. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ B_1. ΜΕΘΟΔΟΣ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

1. **Σκοπός και αντικείμενο**

Η μέθοδος αυτή είναι για τον προσδιορισμό αφλατοξίνης B_1 σε ζωοτροφές, συμπεριλαμβανομένων αυτών που περιέχουν στέμφυλα εσπεριδοειδών. Το κατώτερο όριο προσδιορισμού είναι 0,001 mg/kg (1 ppb).

2. **Αρχή**

Το δείγμα εκχυλίζεται με χλωροφόρμιο. Το εκχύλισμα διηθείται και μία υποπολλαπλάσια δόση καθαρίζεται μέσα στο φυσίγγιο Florisil, και ακολούθως μέσα από ένα φυσίγγιο C_{18}. Ο τελικός διαχωρισμός και προσδιορισμός επιτυγχάνεται με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) χρησιμοποιώντας μία C_{18} στήλη αντεστραμμένης φάσης, ακολουθούμενος από δημιουργία, μετά τη στήλη, παραγώγων με ιώδιο σε ύδωρ και ανίχνευση φθορισμού.

Σημείωση: Οι μυκοτοξίνες είναι εξαιρετικά τοξικές ουσίες. Οι χειρισμοί πρέπει να εκτελούνται σε ένα καθορισμένο απαγωγό. Ειδικές προφυλάξεις πρέπει να λαμβάνονται όταν οι τοξίνες ευρίσκονται σε ξηρή μορφή λόγω της ηλεκτροστατικής τους φύσης και της τάσης τους να διασκορπίζονται στους χώρους εργασίας.

3. **Αντιδραστήρια**

3.1. Χλωροφόρμιο, σταθεροποιημένο με 0,5 έως 1,0 % κατά μάζα αιθανόλης. Βλέπε παρατήρηση 10.2.

3.2. Μεθανόλη, βαθμού HPLC, για την παρασκευή του 3.6.

3.3. Ακετόνη.

3.4. Ακετονιτρίλιο, βαθμοί HPLC.

3.5. Διαλύτες έκλουσης: παρασκευάζονται μία ημέρα πριν τη χρήση ή απομακρύνεται ο αέρας από τους διαλύτες με υπερήχους.

3.5.1. Μείγμα ακετόνης (3.3) και ύδατος, 98 + 2 (v + v).

3.5.2. Μείγμα ύδατος και μεθανόλης (3.2), 80 + 20 (v + v).

3.5.3. Μείγμα ύδατος και ακετόνης (3.3), 85 + 15 (v + v).

3.6. Κινητή φάση για HPLC.

Μείγμα ύδατος μεθανόλης (3.2) και ακετονιτριλίου (3.4), 130 + 70 + 40 (v + v + v).

Σημείωση: Η σύνθεση των διαλυτών της κινητής φάσης ίσως χρειασθεί ρύθμιση εξαρτώμενη από τα χαρακτηριστικά της χρησιμοποιούμενης στήλης HPLC.

3.7. Κορεσμένο διάλυμα ιωδίου: Προστίθενται 2 g ιωδίου σε 400 ml ύδατος. Αναμειγνύονται επί τουλάχιστον 90 λεπτά και διηθούνται μέσα από ηθμό μεμβράνης (4.15). Το κορεσμένο διάλυμα προφυλάσσεται από το φως για να αποφευχθεί φωτοαποσύνθεση.

3.8. Celite 545 εκπλυθέν με οξύ, ή ισοδύναμο.

3.9. Φυσίγγιο Florisil (Waters SEP-PAK), ή ισοδύναμο.

3.10. Φυσίγγιο C_{18} (Waters SEP-PAK), ή ένα ισοδύναμο.

3.11. Αδρανές αέριο παραδείγματος χάρη άζωτο.

3.12. Πρότυπο διάλυμα αφλατοξίνης B_1 σε χλωροφόρμιο, συγκέντρωσης 10 μg/ml. Η συγκέντρωση του διαλύματος ελέγχεται ως εξής: Προσδιορίζεται με το φασματοφωτόμετρο (4.23) το φάσμα απορρόφησης του ανωτέρω διαλύματος μεταξύ 330 και 370 nm. Μετράται η απορρόφηση (A) στο μέγιστο πλησίον των 363 nm. Η συγκέντρωση αφλατοξίνης B_1 σε μικρογραμμάρια ανά χιλιοστόλιτρο διαλύματος υπολογίζεται από τη σχέση:

▼**M2**

$$\sum \text{υγκέντρωση } (\mu g/ml) = \frac{312 \times A \times 1\,000}{22\,300} = 13,991 \times A$$

3.12.1. Μητρικό πρότυπο διάλυμα αφλατοξίνης B_1 σε χλωροφόρμιο.

2,5 ml του προτύπου διαλύματος αφλατοξίνης B_1 (3.12) μεταφέρονται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με χλωροφόρμιο (3.1). Το διάλυμα αυτό διατηρείται σε δροσερό μέρος (4 ºC) στο σκοτάδι, καλά σφραγισμένο και τυλιγμένο σε αλουμινόχαρτο.

3.13. Βαθμονομικά διαλύματα αφλατοξίνης B_1 για HPLC.

Σημείωση: Προς παρασκευή αυτών των διαλυμάτων χρησιμοποιούνται γυάλινα σκεύη εκπλυθέντα με οξύ (βλέπε 4, όργανα).

3.13.1. Διάλυμα βαθμονόμησης 4 ng/ml.

Η ογκομετρική φιάλη με μητρικό διάλυμα (3.12.1), αφήνεται να ζεσταθεί σε θερμοκρασία δωματίου μέσα στο αλουμινόχαρτο (λίγες ώρες). Μεταφέρονται 400 μl του μητρικού διαλύματος (200 ng αφλατοξίνης B_1) μέσα σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml, και το διάλυμα εξατμίζεται μέχρι ξηρού σε ρεύμα αδρανούς αερίου (3.11).

Το αποκτηθέν ίζημα διαλύεται σε περίπου 20 ml νερού/ακετόνης (3.5.3), ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με νερό/ακετόνη (3.5.3) και αναμιγνύεται καλά.

3.13.2. Διάλυμα βαθμονόμησης 3 ng/ml.

Αραιώνονται 7,5 ml του διαλύματος βαθμονόμησης των 4 ng/ml (3.13.1) στα 10 ml με μείγμα ύδατος ακετόνης (3.5.3), και αναμιγνύονται καλά.

3.13.3. Διάλυμα βαθμονόμησης 2 ng/ml.

Μεταφέρονται ποσοτικά 25 ml του διαλύματος βαθμονόμησης (3.13.1) σε μια ογκομετρική φιάλη των 50 ml, συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με μείγμα ύδατος/ακετόνης (3.5.3) και αναμειγνύονται καλά.

Το διάλυμα αυτό επίσης χρησιμοποιείται για επαναλαμβανόμενη έγχυση κατά τη διάρκεια της HPLC, και αναφέρεται περαιτέρω ως το πρότυπο αναφοράς.

3.13.4. Διάλυμα βαθμονόμησης 1 ng/ml.

Μεταφέρονται ποσοτικά 2,5 ml του διαλύματος βαθμονόμησης των 4 ng/ml (3.13.1) σε μια ογκομετρική φιάλη των 10 ml, συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με μείγμα ύδατος/ακετόνης (3.5.3), και αναμειγνύονται καλά.

3.14. Φιαλίδιο περιέχον μείγμα αλφατοξινών B_1, B_2, G_1 και G_2, συγκεντρώσεων, κατά προσέγγιση, 1, 0,5, 1 και 0,5 μg/ml, αντίστοιχα, σε 1 ml χλωροφόρμιου.

3.14.1. Δοκιμαστικό διάλυμα χρωματογραφίας.

Το περιεχόμενο του φιαλιδίου (3.14) μεταφέρονται μέσα σε δοκιμαστικό σωλήνα με γυάλινο πώμα ή φιαλίδιο με βιδωτό πώμα. Μεταφέρονται 40 μl του διαλύματος αυτού μέσα ή σε δοκιμαστικό σωλήνα με γυάλινο πώμα (4.22) (εκπλυθέντα με οξύ). Το χλωροφόρμιο εξατμίζεται σε ρεύμα αδρανούς αερίου (3.11) και ακολουθεί επαναδιάλυση σε 10 ml μείγματος ύδατος/ακετόνης (3.5.3).

3.15. Αντιδραστήρια για δοκιμή επιβεβαίωσης (6).

3.15.1. Κορεσμένο διάλυμα NaCl.

3.15.2. Θειικό νάτριο, άνυδρο, κοκκώδες.

4. **Όργανα**

Προσοχή: Η χρήση γυάλινων σκευών, μη εκπλυθέντων με οξύ, για υδατικά διαλύματα αφλατοξίνης, μπορεί να προκαλέσει απώλεια αλφατοξινών. Πρέπει να λαμβάνεται ιδιαίτερη μέριμνα με τα καινούργια γυάλινα σκεύη και

▼M2

γυάλινα σκεύη μιας χρήσεως, όπως αυτοδειγματοληπτικά φιαλίδια και σιφώνια Pasteur. Επομένως, εργαστηριακός εξοπλισμός ερχόμενος σε επαφή με υδατικά διαλύματα αφλατοξινών πρέπει να βυθίζεται σε αραιό οξύ (π.χ. θειικό οξύ, 2 mol/l) επί αρκετές ώρες, μετά να εκπλύεται καλά με απεσταγμένο νερό για να απομακρυνθούν όλα τα ίχνη οξέος (π.χ. τρεις φορές, έλεγχος με πεχαμετρικό χάρτη). Πρακτικά, αυτή η μεταχείριση απαιτείται για τη φιάλη στρογγυλού πυθμένα (4.4), τις ογκομετρικές φιάλες, ογκομετρικούς κυλίνδρους, φιαλίδια ή σωλήνες που χρησιμοποιούνται για διαλύματα βαθμονόμησης και τελικά εκχυλίσματα (κυρίως φιαλίδια αυτόματου δειγματολίπτη) και σιφώνια Pasteur εάν αυτά χρησιμοποιούνται για μεταφορά διαλυμάτων βαθμονόμησης ή εκχυλισμάτων.

4.1. Μύλος άλεσης — αναμείκτης.

4.2. Κόσκινο μεγέθους ανοίγματος 1,0 mm (ISO R 565).

4.3. Μηχανικός αναδευτήρας.

4.4. Περιστροφικός εξατμιστής κενού, εξοπλισμένος με φιάλη στρογγυλού πυθμένα των 150 έως 250 ml.

4.5. Υγρός χρωματογράφος υψηλής απόδοσης, εγχυτής με βρόγχο κατάλληλο για την έγχυση 250 μl. Βλέπε οδηγίες κατασκευαστού για μερική ή ολική πλήρωση βρόγχου.

4.6. Αναλυτική στήλη HPLC, γέμιση C_{18} των 3 μm ή 5 μm.

4.7. Αντλία απηλλαγμένη παλμών για τροφοδοσία του αντιδραστήριου ιωδίου μετά τη στήλη.

4.8. Valco μηδενικού όγκου T, ανοξείδωτου χάλυβα (1/16″ ×0,75 mm).

4.9. Σπείραμα αντίδρασης τεφλόν ή ανοξείδωτος χάλυβας. Οι διαστάσεις 3 000 × 0,5 mm έως 5 000 × 0,5 mm έχουν βρεθεί να είναι κατάληλες σε συνδυασμό με στήλες HPLC των 5 μm ή 3 μm.

4.10. Θερμοστατικά ελεγχόμενο υδρόλουτρο, ρυθμισμένο στους 60º C, ικανό για ρύθμιση της θερμοκρασίας με ακρίβεια καλύτερη του 0,1º C.

4.11. Ανιχνευτής φθορισμού, ικανός να δίνει μήκη κύματος διέγερσης στα 365 nm περίπου και εκπομπής στα 435 nm (Για όργανο διήθησης: μήκος κύματος εκπομπής > 400 nm). Πρέπει να είναι δυνατή ανίχνευση τουλάχιστον 0,05 ng αλφατοξίνης B_1. Μπορεί να συσταθεί κάποια οπίσθια πίεση (παραδείγματος χάρη περιοριστής ή σπείραμα από τεφλόν ή ανοξείδωτου χάλυβα, συνδεδεμένο με την εξαγωγή του ανιχνευτή), προς καταστολή φυσαλίδων αέρα στην κυψελίδα ροής.

4.12. Καταγραφέας ταινίας χάρτου.

4.13. Ηλεκτρονικός ολοκληρωτής (προαιρετικός).

4.14. Πτυχωτός διηθητικός χάρτης 24 cm, Macherey-Nagel 617 1/4 ή ισοδύναμος.

4.15. Ηθμός μεμβράνης Millipore με μέγεθος πόρων 0,45 μm, Millipore HAWP. 04700 ή ισοδύναμος.

4.16. Κωνική φιάλη των 500 ml, με γυάλινο πώμα.

4.17. Γυάλινη στήλη (εσωτερική διάμετρος περίπου 1 cm, μήκους περίπου 30 cm) εξοπλισμένη με άκρη Luer.

4.18. Στρόφιγγα Luer ανθεκτική στο χλωροφόρμιο (παραδείγματος χάρη Bio-rad 7328017, Analytichem Al 6078, J.T. Baker 4514 ή ισοδύναμη).

4.19. Χημικοανθεκτική σύριγγα, Luer 10 ml σύνδεσμος.

4.20. Σύριγγα κατάλληλη για HPLC ένεση 250 μl (βλέπε 4.5).

4.21. Μικροσύριγγα των 100 μl για παρασκευή των διαλυμάτων βαθμονόμησης (ελέγχεται ώστε η ακρίβεια να είναι εντός του 2 %, κατά τη ζύγιση).

4.22. Βαθμονομημένοι υάλινοι σωλήνες των 10 ml, με γυάλινο πώμα.

▼M2

4.23. Φασματοφωτόμετρο, κατάλληλο για μετρήσεις στην υπεριώδη περιοχή του φάσματος.

4.24. Εξοπλισμός για δοκιμή επιβεβαίωσης (6).

4.24.1. Χοάνη διαχωρισμού των 100 ml, εκπλυθείσα με οξύ, στρόφιγγα από τεφλόν.

4.24.2. Συγκρότημα θέρμανσης στους 40-50º C.

5. **Εκτέλεση**

5.1. *Προετοιμασία του δείγματος*

Το δείγμα αλέθεται έτσι ώστε να περνά μέσα από το κόσκινο (4.2).

5.2. *Αναλυτική δόση*

Ζυγίζονται 50,0 g του προετοιμασμένου δείγματος προς ανάλυση μέσα στην κωνική φιάλη (4.16).

5.3. *Εκχύλιση*

Προστίθενται 25 g Celite (3.8), 250 ml χλωροφόρμιου (3.1) και 25 ml νερού. Η φιάλη πωματίζεται και ανακινείται επί 30 λεπτά σε μηχανικό αναδευτήρα (4.3). Γίνεται διήθηση μέσα από πτυχωτό διηθητικό χάρτη (4.14). Συλλέγονται 50 ml του διηθήματος. Εάν είναι απαραίτητο, λαμβάνεται ένα ορισμένο μέρος του διηθήματος και αραιώνεται στα 50 ml με χλωροφόρμιο, ώστε η συγκέντρωση της αφλατοξίνης B_1 να μη είναι μεγαλύτερη από 4 ng/ml.

5.4. *Καθαρισμός (η διαδικασία πρέπει να εκτελείται χωρίς σημαντικές διακοπές).*

Προσοχή:

— Το εργαστήριο, στο οποίο γίνονται οι αναλύσεις, να προστατεύεται επαρκώς από το φυσικό φως. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί αποτελεσματικά χρησιμοποιώντας:

1) απορροφητικό φύλλο για το υπεριώδες πάνω στα παράθυρα σε συνδυασμό με χαμηλό φωτισμό (όχι άμεσο ηλιακό φως),

2) κουρτίνες ή στορ σε συνδυασμό με τεχνητό φως (είναι αποδεκτοί σωλήνες φθορισμού)·

— πρέπει να προστατεύονται όσο το δυνατόν περισσότερο από το φως διαλύματα περιέχοντα αφλατοξίνη (φύλαξη στο σκοτάδι, χρήση αλουμινόχαρτου).

5.4.1. Καθαρισμός μέσα από Florisil SEP-PAK

5.4.1.1. Προετοιμασία της διάταξης στήλης-φυσίγγιου

Προσαρμόζεται στρόφιγγα (4.18) στο βραχύτερο στέλεχος φυσίγγιου Florisil (3.9) (βλέπε σχήμα 1). Το φυσίγγιο εκπλύεται και απομακρύνεται ο αέρας λαμβάνοντας 10 ml χλωροφόρμιου (3.1) και διοχετεύοντας ταχέως 8 ml χλωροφόρμιου από τη στρόφιγγα μέσα από το φυσίγγιο με μία σύριγγα (4.19). Προσαρμόζεται το μακρύτερο στέλεχος του φυσίγγιου σε γυάλινη στήλη (4.17) και διοχετεύονται τα εναπομένοντα 2 ml χλωροφόρμιου μέσα από το φυσίγγιο στη στήλη. Κλείνεται η στρόφιγγα. Απομακρύνεται η σύριγγα.

5.4.1.2. Καθαρισμός

Το συλλεχθέν στην 5.3 διήθημα προστίθεται στη διάταξη στήλης-φυσίγγιου και αποστραγγίζεται με την επίδραση της βαρύτητας. Εκπλύεται με 5 ml χλωροφόρμιου (3.1), ακολουθούμενα από 20 ml μεθανόλης (3.2). Τα εκπλύματα απορρίπτονται. Κατά τη διάρκεια αυτών των ενεργειών, εξασφαλίζεται ότι δεν θα στεγνώσει η διάταξη στήλης-φυσίγγιου.

Η αφλατοξίνη B_1 εκλούεται με 40 ml του μείγματος ακετόνης/ύδατος (3.5.1), και το σύνολο του εκλούσματος συλλέγεται στη φιάλη στρογγυλού πυθμένα των 150 ml του περιστρεφόμενου εξατμιστή (4.4). Το έκλουσμα συμπυκνώνεται επί του περιστρεφόμενου εξατμιστή στους 40-50 ºC, έως ότου σταματήσει να αποστάζεται η ακετόνη (*προσοχή:* περίπου 0,5 ml υγρού παραμένουν στη φιάλη στο σημείο αυτό. Πειράματα έχουν δείξει ότι περαιτέρω εξάτμιση δεν βλάπτει και ότι όταν απομένουν 0,5 ml υγρού, δεν υπάρχει σημαντική

▼**M2**

ποσότητα ακετόνης. Υπολείμματα ακετόνης μπορεί να οδηγήσουν σε απώλειες B_1 στο φυσίγγιο C_{18}). Προστίθεται 1 ml μεθανόλης (3.2), η φιάλη στροβιλίζεται για να διαλυθεί η αφλατοξίνη B_1 στα τοιχώματα της φιάλης, προστίθενται 4 ml ύδατος και αναμειγνύονται. Αποσυνδέεται και απορρίπτεται η φύσιγγα. Η γυάλινη στήλη εκπλύεται με νερό και διατηρείται για το βήμα καθαρισμού μέσα από C_{18}.

5.4.2. Καθορισμός μέσα από C_{18} SEP-PAK

5.4.2.1. Προετοιμασία της διάταξης στήλης-φυσίγγιου

Προσαρμόζεται στρόφιγγα (4.18) στο βραχύτερο άκρο του φυσίγγιου C_{18} (3.10) (βλέπε σχήμα 1). Το φυσίγγιο γεμίζεται και τυχόν αέρας απομακρύνεται με ταχεία διοχέτευση 10 ml μεθανόλης (3.2) από τη στρόφιγγα μέσα από το φυσίγγιο με μία σύριγγα (4.19) (φυσαλίδες αέρα μέσα από το φυσίγγιο φαίνονται σαν ανοικτόχρωμα σημάδια στο διαφορετικά φαιόχρωμο υπόβαθρο). Λαμβάνονται 10 ml ύδατος, και διοχετεύονται 8 ml μέσα από το φυσίγγιο. (Αποφεύγεται η εισαγωγή αέρα στο φυσίγγιο κατά την αλλαγή από μεθανόλη σε νερό). Το μακρύτερο στέλεχος του φυσίγγιου προσαρμόζεται σε γυάλινη στήλη (4.17) και διοχετεύονται τα εναπομείναντα 2 ml ύδατος μέσα από το φυσίγγιο στη στήλη. Κλείνεται η στρόφιγγα. Απομακρύνεται η σύριγγα.

5.4.2.2. Καθαρισμός

Το συλλεχθέν στην 5.4.1.2 εκχύλισμα μεταφέρεται ποσοτικά στη γυάλινη στήλη (4.17), εκπλύοντας τη φιάλη δύο φορές με 5 ml μείγματος νερού/μεθανόλης (3.5.2) και αποστραγγίζοντας με την επίδραση της βαρύτητας. Κατά τη διάρκεια αυτών των ενεργειών, εξασφαλίζεται ότι δεν θα στεγνώσει η διάταξη στήλης-φυσίγγιου. (Όταν αναπτύσσονται φυσαλίδες αέρα στη σύσφιξη κοντά στο φυσίγγιο, διακόπτεται η ροή και πωματίζεται η κορυφή της γυάλινης στήλης, για να απομακρυνθούν οι φυσαλίδες αέρα. Μετά συνεχίζουμε). Γίνεται έκλουση με 25 ml μείγματος ύδατος/μεθανόλης. Τα εκλούσματα απορρίπτονται. Η αφλατοξίνη B_1 εκλούεται με 50 ml ύδατος/ακετόνης (3.5.3) και το σύνολο του εκλούσματος συλλέγεται σε μία ογκομετρική φιάλη 50 ml. Ο όγκος συμπληρώνεται στα 50 ml ύδατος και αναμειγνύεται: το προκύπτον αναλυτικό διάλυμα χρησιμοποιείται για χρωματογραφία (5.5).

Προσοχή: Κανονικά δεν χρειάζεται διήθηση του τελικού εκχυλίσματος πριν από HPLC. Εάν κριθεί απαραίτητο, δεν πρέπει να χρησιμοποιηθούν ηθμοί από κυτταρίνη, επειδή μπορεί να οδηγήσουν σε απώλειες αφλατοξίνης B_1. Ηθμοί από téflon είναι αποδεκτοί.

5.5. *Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης*

(Βλέπε σχήμα 2 συναρμολόγηση του οργάνου). Αφήνεται επαρκής χρόνος για προθέρμανση και σταθεροποίηση των οργάνων πριν από τη χρήση.

Σημείωση 1:

Οι ταχύτητες ροής που δίνονται για την κινητή φάση και το αντιδραστήριο μετά τη στήλη είναι μόνο ενδεικτικές. Μπορεί να χρειαστεί να προσαρμοστούν ανάλογα με τα χαρακτηριστικά της στήλης HPLC.

Σημείωση 2:

Η απόκριση του ανιχνευτή στην αφλατοξίνη εξαρτάται από τη θερμοκρασία, επομένως πρέπει να γίνεται διόρθωση για μετατόπιση (βλέπε σχήμα 3). Εγχέοντας μία προκαθορισμένη ποσότητα πρότυπου αναφοράς αφλατοξίνης B_1 (3.13.3), σε τακτικά διαστήματα (παραδείγματος χάρη κάθε τρίτη έγχυση), οι τιμές κορυφής της αφλατοξίνης B_1 μεταξύ αυτών των πρότυπων αναφοράς μπορούν να διορθωθούν χρησιμοποιώντας τη μέση απόκριση, εφόσον η διαφορά μεταξύ των αποκρίσεων διαδοχικών πρότυπων αναφοράς είναι πολύ μικρή (< 10 %). Επομένως οι εγχύσεις πρέπει να γίνονται χωρίς διακοπές. Εάν χρειάζεται διακοπή, η τελευταία έγχυση πριν από τη διακοπή και η πρώτη μετά τη διακοπή πρέπει να είναι το πρότυπο αναφοράς (3.13.3). Επειδή η καμπύλη βαθμονόμησης είναι γραμμική και διέρχεται μέσα από την αρχή, οι ποσότητες αφλατοξίνης B_1 στα εκχυλίσματα του δείγματος

▼M2

προσδιορίζονται άμεσα με αναφορά στα παρακείμενα πρότυπα.

5.5.1. Ρυθμίσεις αντλίας HPLC

Η αντλία HPLC (4.5) ρυθμίζεται να δίνει ροή 0,5 ή 0,3 ml/λεπτό για στήλη HPLC των 5μm ή των 3 μm (4.6) αντίστοιχα χρησιμοποιώντας κινητή φάση (3.6).

5.5.2. Ρυθμίσεις αντλίας μετά τη στήλη

Η αντλία (4.7) ρυθμίζεται να δίνει ροή 0,2-0,4 ml/λεπτό του κορεσμένου υδατικού διαλύματος ιωδίου (3.7). Ως γενικός κανόνας: ροές περίπου 0,4 ή 0,2 ml/λεπτό συνιστώνται σε συνδυασμό με ροές 0,5 και 0,3 ml/λεπτό αντίστοιχα της κινητής φάσης (3.6).

5.5.3. Ανιχνευτής φθορισμού

Ο ανιχνευτής φθορισμού (4.11) ρυθμίζεται σε διέγερση = 365 nm και εκπομπή = 435 nm (όργανο διήθησης: > 400 nm). Ο μειωτής του ανιχνευτή ρυθμίζεται ώστε να αποκτά περίπου 80 % της πλήρους κλίμακας εκτροπής της γραφίδας του καταγραφέα για 1 ng αφλατοξίνης B_1.

5.5.4. Εγχυτής

Για όλα τα διαλύματα, εγχέονται ποσότητες των 250 μl, ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή του εγχυτήρα.

5.5.5. Έλεγχος χρωματογραφικού διαχωρισμού

Εγχέεται το αρωματικό δοκιμαστικό διάλυμα (3.14.1). Οι κοιλότητες πρέπει να είναι λιγότερες από 5 % του συνόλου των υψών κορυφών των παρακειμένων κορυφών.

5.5.6. Έλεγχος της σταθερότητας του συστήματος

Πριν από κάθε σειρά αναλύσεων, εγχέεται επανειλημένα το πρότυπο αναφοράς (3.14.3), έως ότου επιτευχθούν σταθερές περιοχές κορυφών (*Σημείωση:* αποκρίσεις κορυφών για αφλατοξίνη B_1 μεταξύ διαδοχικών εγχύσεων πρέπει να διαφέρουν λιγότερο από 6 %). Προχωρούμε χωρίς καθυστέρηση στον έλεγχο της γραμμικότητας (5.5.7).

5.5.7. Έλεγχος γραμμικότητας

Τα διαλύματα βαθμονόμησης αφλατοξίνης B_1 (3.13.1 έως 3.13.4) εγχέονται. Σε κάθε τρίτη έγχυση χρησιμοποιείται το πρότυπο αναφοράς (3.13.3), για διόρθωση της μετατόπισης της απόκρισης (*Σημείωση:* αποκρίσεις κορυφών για το πρότυπο αναφοράς πρέπει να διαφέρουν λιγότερο από 10 % μέσα σε 90 λεπτά). Γίνεται διόρθωση για μετατόπιση σύμφωνα με τη σχέση στην 7. Το διάγραμμα βαθμονόμησης πρέπει να είναι γραμμικό και να διέρχεται από την αρχή, με τυπικό σφάλμα 2X ως προς Y. Οι ευρισκόμενες τιμές πρέπει να διαφέρουν λιγότερο από 3 % από τις ονομαστικές τιμές. Εάν εκπληρώνονται οι προϋποθέσεις, συνεχίζουμε χωρίς καθυστέρηση. Εάν όχι, πριν συνεχίσουμε αναγνωρίζονται και διορθώνονται οι πηγές του προβλήματος.

5.5.8. Έγχυση εκχυλισμάτων δείγματος

Εγχύονται τα καθαρισμένα εκχυλίσματα δείγματος (5.4.2.2). Μετά από κάθε δύο εκχυλίσματα δείγματος, επαναλαμβάνεται η έγχυση του πρότυπου αναφοράς (3.13.3) σύμφωνα με την ακόλουθη σειρά: πρότυπο αναφοράς, εκχύλισμα, εκχύλισμα, πρότυπο αναφοράς, εκχύλισμα, εκχύλισμα, πρότυπο αναφοράς κ.λπ.

6. **Δοκιμή επιβεβαίωσης**

6.1. *Περαιτέρω επεξεργασία του εκχυλίσματος (5.4.2.2)*

Προστίθενται 5 ml διαλύματος NaCl (3.15.1) στο τελικό εκχύλισμα που αποκτήθηκε στην 5.4.2.2. Γίνεται εκχύλιση τρεις φορές με 2 ml χλωροφόρμιου (3.1) επί ένα λεπτό, χρησιμοποιώντας τη χοάνη διαχωρισμού (4.24.1).

Το συλλεχθέν εκχύλισμα χλωροφόρμιου εκχύεται σε περίπου 1 g θειικού νατρίου (3.15.2) μέσα σε δοκιμαστικό σωλήνα των 10 ml. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί μικρή χοάνη διαμέτρου

▼M2

4 cm με κομμάτι ακατέργαστου βάμβακα στη σύσφιξη, καλυμμένο με περίπου 1 g θειικού νατρίου.

Η στοιβάδα του θειικού νατρίου εκπλύεται με λίγα ml χλωροφόρμιου και συλλέγεται το έκπλυμα στον ίδιο δοκιμαστικό σωλήνα. Το εκχύλισμα χλωροφόρμιου εξατμίζεται μέχρι ξηρού στον ίδιο δοκιμαστικό σωλήνα χρησιμοποιώντας το συγκρότημα θέρμανσης (4.24.2) και επαναδιαλύουμε σε 1 ml χλωροφόρμιου.

6.2. *Παρασκευή παραγώγου και χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας*

Βλέπε οδηγία 76/372/ΕΟΚ του Συμβουλίου παράρτημα, μέθοδος Α, σημείο 5.6.2.

7. **Υπολογισμός αποτελεσμάτων**

Η περιεκτικότητα σε αφλατοξίνη B_1 (μg/kg) που υπάρχει στο δείγμα υπολογίζεται χρησιμοποιώντας τη σχέση:

$$\text{Περιεκτικότητα αφλατοξίνης } B_1 \text{ σε μg/kg} = \frac{m \times V_{ext}}{V_m \times M \times \frac{V_f}{V_c}}$$

όπου:

m = ποσότητα αφλατοξίνης B_1, σε ng, αντιπροσωπευόμενη από την κορυφή B_1 του δείγματος, υπολογιζόμενη ως εξής:

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

P(δείγμα) = εμβαδόν κορυφής αφλατοξίνης B_1 του δείγματος

$P(st_1)$ = εμβαδόν κορυφής αφλατοξίνης B_1 στο προηγούμενο πρότυπο αναφοράς (3.13.3)

$P(st_2)$ = εμβαδόν κορυφής αφλατοξίνης B_1 στο επόμενο πρότυπο αναφοράς (3.13.3)

r(st) = εγχυθείσα ποσότητα προτύπου αναφοράς (3.13.3) σε ng

V_m = όγκος του εγχυθέντος εκχυλίσματος του δείγματος, σε ml

V_{ext} = τελικός όγκος εκχυλίσματος δείγματος, ml, λαμβάνοντας υπόψη κάθε αραίωση που έγινε (5.3)

M = μάζα δείγματος σε g

V_f = όγκος διηθήματος μεταφερθέντος στο φυσίγγιο Florisil (5.4.1.2) σε ml

V_c = ποσότητα χλωροφόρμιου που χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση του δείγματος, ml

Εάν η μέθοδος ακολουθήθηκε όπως σε αυτή την πρότυπη περιγραφή, η σχέση μειώνεται στην:

Περιεκτικότητα σε αφλατοξίνη B_1, σε μg/kg = 20 × m.

7.1. Οι υπολογισμοί των αποτελεσμάτων μπορεί να γίνουν επίσης με μέτρηση ύψους κορυφών.

8. **Επαναληπτικότητα**

Βλέπε το σημείο 10.1.

9. **Αναπαραγωγικότητα**

Βλέπε το σημείο 10.1.

10. **Παρατηρήσεις**

10.1. *Ακρίβεια (Précision)*

Μία μελέτη συνεργασίας, εκτελεσθείσα σε παγκόσμιο επίπεδο σε σύνθετες ζωοτροφές, έδωσε τα προαναφερόμενα

▼**M2**

στον πίνακα 1 αποτελέσματα [1] επαναληπτικότητας και αναπαραγωγιμότητας. Ο όρος επαναληπτικότητα (r) χρησιμοποιούμενος εδώ ορίζεται ως ο υψηλότερος λόγος που δεν είναι σημαντικός σε επίπεδο πιθανότητας 95 %, για σύγκριση δύο μετρήσεων στο ίδιο δείγμα στο ίδιο εργαστήριο κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Ο όρος αναπαραγωγιμότητα (R) ορίζεται όμοια για σύγκριση δύο διαφορετικών εργαστηρίων. Σύμφωνα με την ISO 3534-1977, 2.35 [2] και την απόφαση 89/610/ΕΟΚ της Επιτροπής [3], οι r και R δίνονται επίσης στον πίνακα 1 σε όρους συντελεστών διακύμανσης.

Πίνακας 1

Επαναληπτικότητα (r) και αναπαραγωγιμότητα (R) εκφρασμένες ως λόγοι και αντίστοιχοι συντελεστές διακύμανσης

(15 εργαστήρια)

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

(*) CV = συντελεστής διακύμανσης

10.2. *Σταθεροποίηση του χλωροφόρμιου (3.1)*

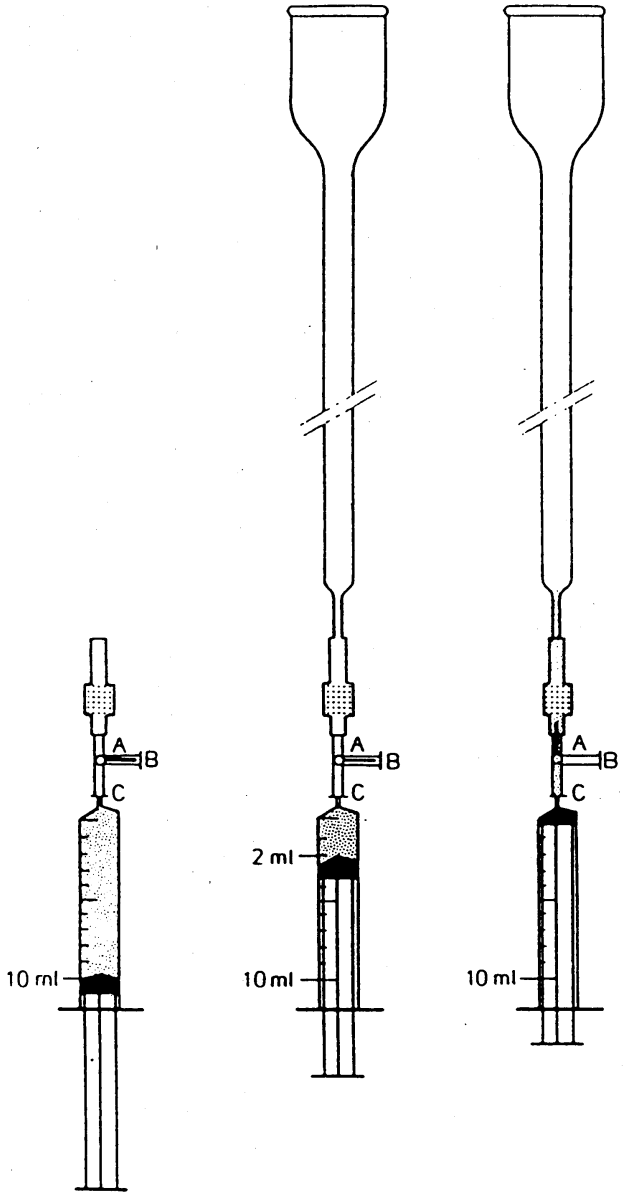
Τα χαρακτηριστικά απορρόφησης του φυσιγγίου Florisil μπορεί να αλλάζουν εάν χρησιμοποιούνται σταθεροποιητές εκτός της ανθανόλης. Αυτό μπορεί να επαληθευτεί σύμφωνα με το σημείο 10.3 όπου το περιγραφόμενο χλωροφόρμιο δεν είναι διαθέσιμο.

10.3. *Ακρίβεια (Exactitude)*

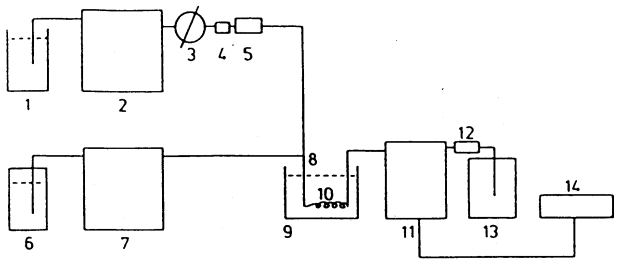
Η ορθή εφαρμογή της μεθόδου πρέπει να πιστοποιείται παίρνοντας επαναλαμβανόμενες μετρήσεις σε πιστοποιημένα υλικά αναφοράς. Εάν αυτά δεν είναι διαθέσιμα, η απόδοση της μεθόδου πρέπει να πιστοποιηθεί με πειράματα επανάκτησης σε λευκά δείγματα· η απόκλιση από το μέσο της πραγματικής τιμής, εκφρασμένη ως ποσοστό επί της πραγματικής τιμής, δεν πρέπει να κείται εκτός των ορίων του −20 % έως +10 %.

(1) Egmond, H.P. van, Heisterkamp, S.H. and Paulsch, W.E. (1991). *Food Additives and Contaminants* 8, 17-29.
(2) ISO 3534-1977.
(3) ΕΕ αριθ. L 351 της 2. 12. 1989, σ. 39.

▼**M2**



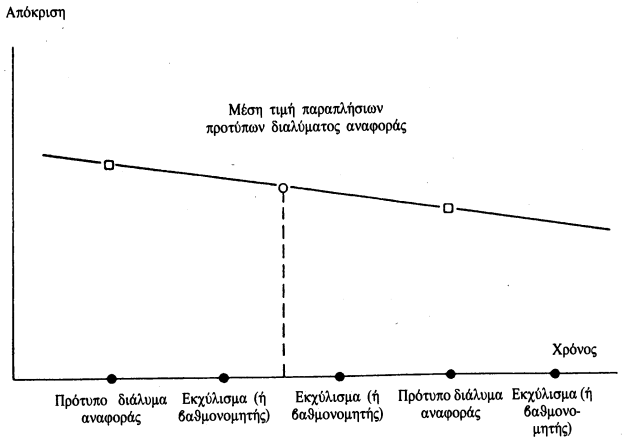
Σχήμα 1: Διάταξη στήλης-φυσιγγίου



1. Κινητή φάση
2. Αντλία
3. Βαλβίδα έκχυσης
4. Στήλη ασφαλείας
5. Αναλυτική στήλη HPLC
6. Κορεσμένο διάλυμα ιωδίου
7. Αντλία αντιδραστηρίου
8. Σύνδεσμος T
9. Θερμοστατικά ελεγχόμενο λουτρό
10. Σπείραμα αντίδρασης
11. Ανιχνευτής φθορισμού
12. Περιοριστής
13. Απόρριμμα
14. Καταγραφέας/ολοκληρωτής ταινίας χάρτου

Σχήμα 2: Διάγραμμα ροής του συστήματος LC με δημιουργία παραγώγου με ιώδιο μετά τη στήλη

▼**M2**



Σχήμα 3: Διόρθωση για μετατόπιση απόκρισης αφλατοξίνης B_1 με έγχυση πρότυπου αναφοράς (3.13.3) σε τακτικά διαστήματα

▼**M3**

Γ. ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΙΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ Α ΚΑΙ Β

1. **Αφαίρεση λίπους**

   Στα δείγματα που περιέχουν λίπη σε ποσοστό άνω του 5 %, πρέπει να αφαιρείται το λίπος με πετρελαϊκό αιθέρα (bp 40 έως 60 ºC) μετά από την προετοιμασία που ενδείκνυται στο σημείο 5.1.

   Σε αυτές τις περιπτώσεις, τα αναλυτικά αποτελέσματα πρέπει να εκφράζονται υπό τη μορφή βάρους του δείγματος πριν από την αφαίρεση του λίπους.

2. **Αναπαραγωγιμότης των αποτελεσμάτων της μεθόδου Α**

   Η αναπαραγωγιμότης των αποτελεσμάτων, δηλαδή η διαφορά αποτελεσμάτων μεταξύ δύο ή περισσοτέρων εργαστηρίων για το ίδιο δείγμα, εκτιμήθηκε ως:

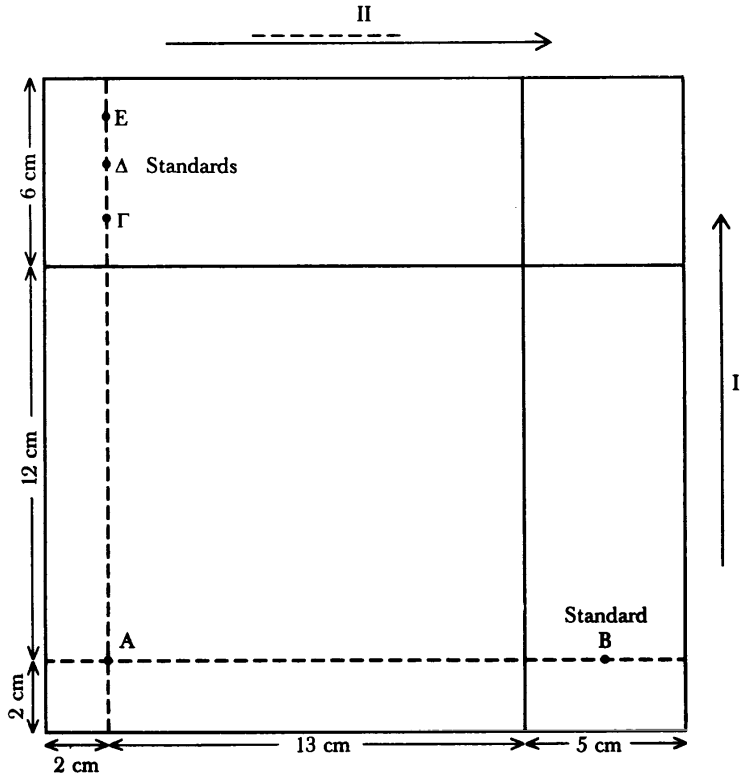
   ± 50 % της μέσης τιμής για μέσες τιμές αφλατοξίνης B_1 από 10 έως 20 μg/kg,

   ± 10 μg/kg της μέσης τιμής για μέσες τιμές μεγαλύτερες από 20 έως 50 μg/kg,

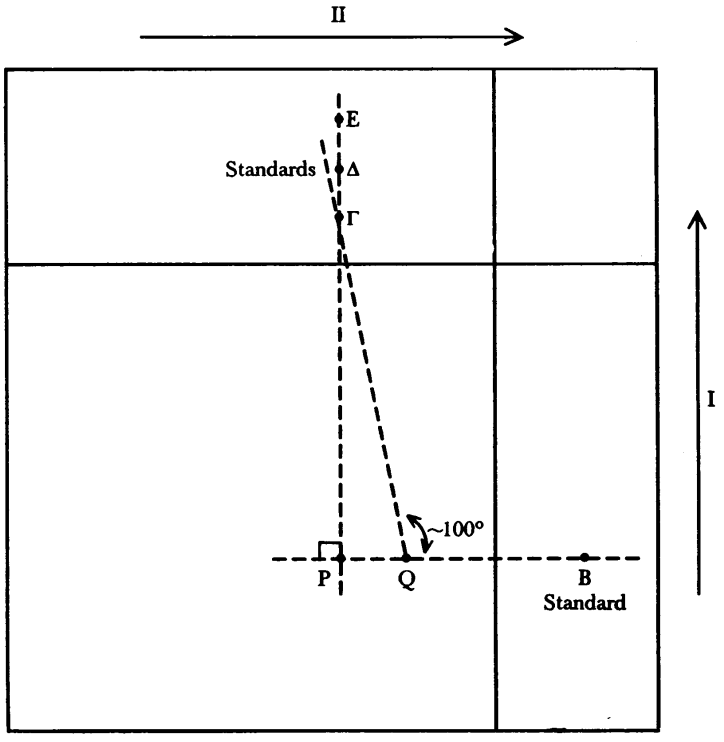
   ± 20 % της μέσης τιμής για μέσες τιμές άνω των 50 μg/kg.

▼B

Προσάρτημα στο παράρτημα

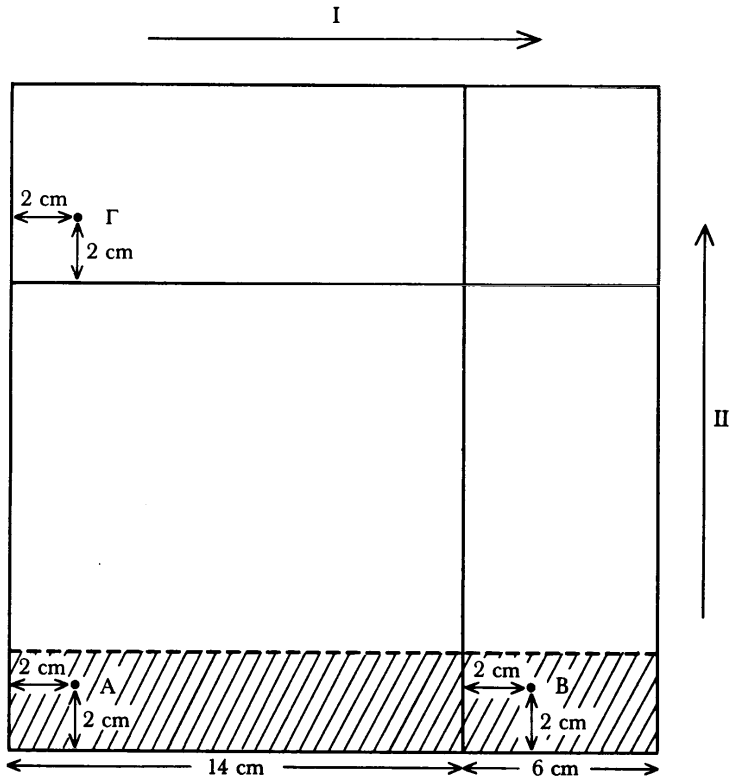


Εικόνα 1



Εικόνα 2

▼B



Εικόνα 3