Dan id-dokument ġie magħmul bil-ħsieb li jintuża bħala għodda ta' dokumentazzjoni u l-istituzzjonijiet ma jassumu l-ebda responsabbiltà għall-kontenut tiegħu

►**B** **IS-SEBA' DIRETTIVA TAL-KUMMISSJONI**

ta' l-1 ta' Marzu 1976

li tistabbilixxi l-metodi Komunitarji għall-analiżi tal-kontroll uffiċjali ta' l-għalf

(76/372/KEE)

(ĠU L 102 , 15.4.1976, p. 8)

Emendata minn:

		Ġurnal Uffiċjali		
		Nru	Paġna	Data
►**M1**	Id-Direttiva tal-Kummissjoni tat-30 ta' Lulju 1981	L 246	32	29.8.1981
►**M2**	Id-Direttiva tal-Kummissjoni 92/95/KEE tad-9 ta' Novembru 1992	L 327	54	13.11.1992
►**M3**	Id-Direttiva tal-Kummissjoni 94/14/EC tad-29 ta'Marzu 1994	L 94	30	13.4.1994

▼B

IS-SEBA' DIRETTIVA TAL-KUMMISSJONI

ta' l-1 ta' Marzu 1976

li tistabbilixxi l-metodi Komunitarji għall-analiżi tal-kontroll uffiċjali ta' l-għalf

(76/372/KEE)

IL-KUMMISSJONI TAL-KOMUNITAJIET EWROPEJ,

Wara li kkunsidrat it-Trattat li jistabbilixxi l-Komunità Ekonomika Ewropea,

Wara li kkunsidrat id-Direttiva tal-Kunsill ta' l-20 ta' Lulju 1970 dwar l-introduzzjoni tal-metodi Komunitarji ta' teħid ta' kampjuni u analiżi għall-kontroll uffiċjali ta' l-għalf ([1]), kif l-aħħar emendata bl-Att ta' l-Adeżjoni ([2]), u b'mod partikolari l-Artikolu 2 tagħha,

Billi dik id-Direttiva teħtieġ il-kontroll uffiċjali ta' l-għalf jitwettaq bl-użu ta' metodi Komunitarji ta' teħid ta' kampjuni u analiżi bl-iskop li tiġi vverifikata konformità mal-ħtiġiet li joriġinaw taħt id-disposizzjonijiet stabbiliti bil-liġi, b'regolament jew b'azzjoni amministrattiva li jikkonċernaw il-kwalità u l-kompożizzjoni ta' l-għalf;

Billi d-Direttivi tal-Kummissjoni 71/250/KEE tal-15 ta' Ġunju 1971 ([3]), 71/393/KEE tat-18 ta' Novembru 1971 ([4]), 72/199/KEE tas-27 ta' April 1972 ([5]), 73/46/KEE tal-5 ta' Diċembru 1972 ([6]), 74/203/KEE tal-25 ta' Marzu 1974 ([7]) u 75/84/KEE ta' l-20 ta' Diċembru 1974 ([8]) diġà stabbilew numru ta' metodi Komunitarji ta' analiżi; billi l-progress tax-xogħol minn dak iż-żmien jagħmlu ta' min jiġi adottat is-seba' sett ta' metodi;

Billi l-miżuri previsti f'din id-Direttiva huma skond l-opinjoni tal-Kumitat Permanenti għall-Għalf,

ADOTTAT DIN ID-DIRETTIVA

Artikolu 1

L-Istati Membri għandhom jeħtieġu li analiżi għall-kontrolli uffiċjali ta' l-għalf, fir-rigward tal-kontenut tagħhom ta' aflatossiku B_1, jitwettqu skond il-metodi deskritti fl-Anness ma' din id-Direttiva.

▼M1

▼B

Artikolu 2

L-Istati Membri għandhom, sa mhux iktar tard mill-1 ta' Ottubru 1976, iġibu fis-seħħ il-liġijiet, ir-regolamenti jew disposizzjonijiet amministrattivi neċessarji biex jikkonformaw ma' din id-Direttiva.

Artikolu 3

Din id-Direttiva hija indirizzata lill-Istati Membri.

([1]) ĠU L 170, tat-3.8.1970, p. 2.
([2]) ĠU L 73, tas-27.3.1972, p. 14.
([3]) ĠU L 155, tat-12.7.1971, p. 13.
([4]) ĠU L 279, ta' l-20.12.1971, p. 7.
([5]) ĠU L 123, tad-29.5.1972, p. 6.
([6]) ĠU L 83, tat-30.3.1973, p. 21.
([7]) ĠU L 108, tat-22.4.1974, p. 7.
([8]) ĠU L 32, tal-5.2.1975, p. 26.

▼B

ANNESS

DETERMINAZZJONI TA' L-AFLATOSSIKU B_1

A. METODU B'DIMENSJONI WAĦDA TA' SAFF IRQIQ KROMATOGRAFIKU

▼M2

1. **Għan u skop**

Il-metodu jagħmilha possibbli li jkun determinat il-livell ta' aflatossin B1 f'materji primi u materjali sempliċi ta' l-għalf. Dan il-metodu ma jistgħax ikun applikat fil-preżenta ta' polpa taċ-ċitru. Id-determinazzjoni tal-limitu l-baxx hija 0,10 mg/kg (10 ppb).

Gil-preżenza ta' sustanzi ta' tfixkil huwa meħtieġ li tkun repetuta l-analiżi bl-użu tal-metodu B (kromatografija likwida ta' mġieba għolja).

▼B

2. **Il-Prinċipju**

Il-kampjun hu suġġett għall-estrazzjoni bil-kloroform. L-estratt huwa ffiltrat, u jittieħed porzjon alikwot u ppurifikat b'kolonna kromatografija fuq ġel silika. L-elwat hu evaporat u r-residwi maħlula għal darb'oħra f'volum speċifiku ta' kloroform jew ta' taħlita ta' benżina u aċetonitrile. Porzjon alikwot ta' din is-soluzzjoni huwa suġġett għal kromatografija b'saff irqiq (TLC). Il-kwantità ta' aflatossiku B_1 hija ddeterminata taħt ir-radjazzjoni UV tal-kromatogramma, jew viżwalment jew bi fluorodensitometrija, b'paragun ma' kwantitajiet magħrufa ta' aflatossiku standard B_1. L-identità ta' l-aflatossiku B_1 estratt mill-għalf għandha tiġi kkonfermata bil-proċedura indikata.

3. **Riaġenti**

NB: Ir-riaġenti kollha għandhom ikunu ta' kwalità ta' "riaġent analitiku" sakemm mhux iddikjarat xort' oħra.

3.1. Aċetun.

3.2. Kloroform stabilizzat b'0.5 sa 1.0 % ta' 96 % etanol (v/v).

3.3. N-*hexane*.

3.4. Metanol.

3.5. Eteru anidridu tad-dietil, ħieles minn perossidi.

3.6. Taħlita ta' benżina u aċetonitrile: 98/2 (v/v).

3.7. Taħlita ta' kloroform (3.2) u metanol (3.4): 97/3 (v/v).

3.8. Ġel silika, għal kolonna kromatografija, daqs tal-partiċella 0.05 sa 0.20mm.

3.9. Tajjar assorbenti, bix-xaħam imneħħi minn qabel bil-kloroform, jew tajjar tal-ħġieġ.

3.10. Sulfat tas-sodju, anidridu, granulari.

3.11. Gass inert, eż. nitroġenu.

3.12. 1 N Aċidu idrokloriku.

3.13. 50 % (v/v) aċidu tal-kubrit.

3.14. Kieselguhr (*hyflosupercel*), maħsul fl-aċidu.

3.15. Ġel silika G-HR jew ekwivalenti, għal TLC.

3.16. Soluzzjoni standard b'madwar 0 71 µg aflatossiku B_1 għal kull ml fi kloroform (3.2) jew it-taħlita *benzene*/aċetonitrile (3.6), ippreparata u kkontrollata kif indikat fit-Taqsima 7.

3.17. Soluzzjoni standard għal skopijiet ta' kontrolli kwalitattivi li jikkontjenu madwar 0.71 µg ta' aflatossiku B_1 u B_2 għal kull ml fi kloroform (3.2) jew it-taħlita *benzene*/aċetonitrile (3.6). Dawn il-konċentrazzjonijiet huma mogħtija bħala gwida. Għandhom jiġu aġġustati sabiex tiġi ottenuta l-istess intensità ta' florexxenza għaż-żewġ aflotossiċi.

▼B

3.18. *Solventi żviluppanti:*

3.18.1. Kloroform (3.2)/aċetun (3.1): 9/1 (v/v), *tank* mhux saturat;

3.18.2. Eteru tad-dietil (3.5)/metanol (3.4)/ilma: 96/3/1 (v/v/v), *tank* mhux saturat;

3.18.3. Eteru tad-dietil (3.5)/metanol (3.4)/ilma: 94/4.5/1.5 (v/v/v), *tank* saturat;

3.18.4. Kloroform (3.2)/metanol (3.4): 94/6 (v/v), *tank* saturat;

3.18.5. Kloroform (3.2)/metanol (3.4): 97/3 (v/v), *tank* saturat.

4. **Apparat**

4.1. *Mixer* tad-dħin.

4.2. Apparat li jħallat jew *stirrer* manjetiku.

4.3. Karti tal-filtru mmewġa, *Schleicher* i *Schüll* Nru 588 jew ekwivalenti, dijametru: 24 ċm

4.4. Tubu tal-ħġieġ għall-kromatografija (dijametru intern: 22 mm, tul: 300 mm), b'valv PTFE u kontenitur ta' 250-ml.

4.5. Evaporatur vakwu *rotary*, bi fjasketta tal-qiegħ ċatt ta' 500-ml.

4.6. 500-ml fjasketti koniċi, b'egħluq tal-ħġieġ mitħun.

4.7. Apparat TLC

4.8. Pjanċi tal-ħġieġ għal TLC, 200 × 200 mm, ippreparati kif ġej (il-kwantitajiet indikati huma suffiċjenti biex ikopru ħames pjanċi). Qiegħed 30g ta' ġel silika G-HR (3.15) fi fjasketta konika. Żid 60ml ilma, agħlaq u ħawwad għal minuta. Xerred is-sospensjoni fuq il-pjanċi sabiex tottjeni saff unifromi ta' ħxuna ta' 0.25mm Ħallih jinxef fl-arja u mbagħad aħżen f'dessikatur li jikkontjeni l-ġel silika. Fil-ħin ta' l-użu, attiva l-pjanċi billi żżommhom fil-forn f'110 °C għal siegħa.

Pjanċi lesti għall-użu huma xierqa jekk jagħtu riżultati simili għal dawk ottenuti bil-pjanċi ppreparati kif indikat fuq.

4.9. *Wavelength* twil (360 nm) lampa UV. L-intensità ta' l-ir-radjazzjoni għandha tagħmilha possibbli biex żona ta' 1 ng ta' aflatossiku B_1 tibqa' tiġi distinta b'mod ċar fuq pjanċa TLC f'distanza ta' 10ċm mil-lampa.

4.10. 10 ml tubi gradwati b'egħluq tal-polietilin.

4.11. UV spettrofotometru.

4.12. Florodensitometru (mhux ta' bilfors).

5. **Proċedura**

5.1. *Preparazzjoni tal-kampjun (ara taħt "Osservazzjonijiet", Parti Ċ, il-punt 1).*

Itħan il-kampjun sabiex kollu kemm hu jgħaddi minn passatur b'toqba ta' 1mm skond ir-rakkomandazzjoni ISO R 565).

5.2. *Estrazzjoni*

Qiegħed 50g tal-kampjun mitħun, omoġenizzat fi fjasketta konika ta' 500ml (4.6). Żid 25 g Kieselguhr (3.14), 25 ml ilma u 250 ml kloroform (3.2). Agħlaq il-fjasketta ħawwad jew ħallat għal 30 minuta bl-apparat (4.2) u ffiltra minn karta tal-filtru mmewġa (4.3). Armi l-ewwel 10ml tal-filtrat u iġbor 50ml.

5.3. *Tindif tal-kolonna*

Daħħal fit-tarf 'l iktar 'l isfel ta' tubu tal-kromatografija (4.4) tajjara jew biċċa tajjara tal-ħġieġ (3.9), imla żewġ terzi tat-tubu bil-kloroform (3.2) u żid 5g tas-sulfat tas-sodju (3.10).

Ikkontrolla li s-superfiċi ta' fuq tas-saff tas-sulfat tas-sodju huwa ċatt, imbagħad żid 10g tal-ġel silika (3.8) f'porzjonijiet żgħar. Ħawwad b'attenzjoni wara kull addizzjoni sabiex telimina l-bżieżaq ta' l-arja. Ħallih joqgħod għal 15-il minuta u mbagħad żid bil-mod 15g tas-sulfat tas-sodju (3.10). Ħalli l-likwidu jaqa' sakemm huwa kemm kemm fuq is-superfiċi ta' fuq tas-saff tas-sulfat tas-sodju.

Ħallat 50ml ta' l-estratt miġbur f'5.2 b'100ml ta' n-*hexane* (3.3) u ttrasferixxi kwantitattivament it-taħlita mal-kolonna. Ħalli l-likwidu jaqa' sakemm huwa kemm kemm 'il fuq mis-superfiċi ta' fuq tas-saff tas-sulfat tas-sodju. Armi l-ħasil. Imbagħad żid 100ml tad-dietileteru (3.5) u

▼B

mbagħad ħallih jaqa' għas-superfiċi ta' fuq tas-saff tas-sulfat tas-sodju. Matul dawn l-operazzjonijiet ara li r-rata tat-tnixxija hija 8 sa 12-il ml għal kull miuta u li l-kolonna ma tinxifx. Armi l-likwidu li joħroġ. Imbagħad neħħi b'150ml tat-taħlita ta' kloroform/metanol (3.7).

Evapora lil ta' l-aħħar sa kważi nixfa f'temperatura li ma taqbiżx il-50 ° C u taħt nixxiegħa ta' gass inert (3.11) b'evaporatur *rotary* (4.5). Kwantitattivament ittrasferixxi r-residwu, bl-użu tal-kloroform (3.2) jew it-taħlita *benzene*-aċetonitrile (3.6), għal tubu gradwat f'10ml (4.10) Ikkonċentra s-soluzzjoni taħt nixxiegħa ta' gass inert (3.11) u mbagħad aġġusta l-volum għal 2 ml bil-kloroform (3.2) jew bit-taħlita *benzene*/aċetonitrile (3.6).

5.4. *Kromatografija b'saff irqiq*

Żona fuq pjanċa TLC (4.8), 2ċm mit-tarf l-iktar baxx u f'intervalli ta' 2ċm, il-volumi indikati taħt is-soluzzjoni standard u l-estratt:

— 10, 15, 20, 30 and 40 µl tas-soluzzjoni aflatossika B1 standard (3.16);

— 10 µl ta' l-estratt ottenut f'5.3 u, superimpost fuq l-istess punt, 20 µl tas-soluzzjoni standard (3.16);

— 0 u 20 µl ta' l-estratt ottenut f'5.3.

Żviluppa l-kromatogramma fid-dlam b'waħda mis-solventi ta' żvilupp (3.18). L-għażla tas-solvent għandha ssir minn qabel, billi tiġi ddepożitata 25 µl tas-soluzzjoni standard kwalitattiva (3.17) fuq il-pjanċa u jiġi kkontrollat li, meta żviluppat, l-aflatossiċi B_1 u B_2 huma kompletament isseparati.

Ħalli s-solventi jevaporaw fid-dlam u mbagħad irradja b'dawl UV, billi tqiegħed il-pjanċa 10ċm mil-lampa (4.9). Iż-żoni ta' aflatossiku B_1 jagħtu florexxenza blu.

5.5. *Determinazzjonijiet kwantitattivi*

Iddetermina jew viżwalment jew bi fluorodensitometrija kif indikat taħt.

5.5.1. Miżuri viżwali

Iddetermina l-kwantità ta' aflatossiku B_1 fl-estratt billi tqabbel l-intensità tal-florexxenza taż-żoni ta' l-estratt b'dik taż-żoni ta' soluzzjoni standard. Il-florexxenza ottenuta bis-superimpożizzjoni ta' l-estratt fis-soluzzjoni standard għandha tkun iktar intensa minn dik ta' 10 µl ta' l-estratt u m'għandux ikun hemm iktar imm żona viżibbli waħda. Jekk l-intensità tal-florexxenza mogħtija bl-10µl ta' l-estratt hija akbar minn dik ta' l- 40 µl tas-soluzzjoni standard, iddiluwixxi l-estratt 10 jew 100 darba bil-kloroform (3.2) jew it-taħlita tal-*benzene*/aċetonitrile (3.6) qabel ma jissoġġettawh darb'oħra għal kromatografu ta' saff irqiq.

5.5.2. Kejl ta' florodensitometrija

Kejjel l-intensità tal-florexxenza taż-żoni B_1 aflatossiċI bil-florodensitometru (4.12) f'*wavelength* ta' eċitazzjoni ta' 365nm u *wavelength* ta' emissjoni ta' 443nm. Iddetermina l-kwantità ta' l-aflatossiku B_1 fiż-żoni ta' estrazzjoni b'paragun ma' l-intensitajiet tal-florexxenza tagħhom ma' dak taż-żoni aflatossiċi standard B_1.

5.6. *Konferma ta' l-identità ta' l-aflatossiku B_1.*

Ikkonferma l-identità ta' l-aflatossiku B_1 fl-estratt bil-proċessi indikati taħt.

5.6.1. Trattament b'aċidu tal-kubrit.

Aċidu sulfuriku ta' l-isprej (3.13) fuq il-kromatogramma ottenuta f'5.4. Il-florexxenza taż-żoni aflatossiċi B_1 għandha titbiddel minn blu għal isfar taħt ir-radjazzjoni UV.

5.6.2. Kromatografija b'żewġ dimensjonijiet li tinvolvi l-formazzjoni ta' aflatossiku B_1-*hemiacetal* (aflatossiku B_{2a}).

NB:

L-operazzjonijiet deskritti hawn taħt għandhom jitwettqu billi tiġi segwita b'attenzjoni t-tpinġija fil-figura 3.

5.6.2.1. Applikazzjoni tas-soluzzjonijiet

Pinġi żewġ linji dritti fuq il-pjanċa (4.8) parallela għal żewġ ġnubijiet kontigwi (6ċm 'l ġewwa minn kull naħa) biex il-migrazzjoni tiġi llimitata għall-quddimijiet tas-solvent Immarka s-soluzzjonijiet li ġejjin fuq il-pjanċa bl-użu ta' pipetti kapillari jew mikrosiringi.

▼B

— fil-punt A: volum ta' l-estratt ippurifikat tal-kampjun, ottenut f'5.3, li jikkontjeni madwar 2 75 nm ta' l-aflatossiku B_1;

— fil-punti B u Ċ: 25 µl tas-soluzzjoni standard (3.16).

5.6.2.2. L-Iżvilupp

Żviluppa l-kromatogramma fid-direzzjoni I, fid-dlam, bl-użu tas-solvent ta' żvilupp (3.18.1) (saff ta' 1ċm f'tank mhux saturat) sakemm is-solvent jilħaq il-linja ta' limitu tas-solvent.

Neħħi l-pjanċa mit-tank u ħalliha tinxef fid-dlam f'temperatura ambjentali għal ħames minuti. Imbagħad sprejja aċidu idrokloriku (3.12) tul faxx għoli 2.5ċm, li jkopri l-punti A u B (indikati biż-żona mħażża fil-figura 3) sakemm jiskura, u jipproteġi l-bqija tal-pjanċa b'folja tal-ħġieġ. Ħalliha tirreaġixxi għal 10 minuti fid-dlam u nixxef b'nixxiegħa ta' arja f'temperatura ambjentali.

Imbagħad, żviluppa l-kromatogramma fid-direzzjoni II, fid-dlam, bl-użu tas-solvent ta' żvilupp (3.18.1) (saff ta' 1ċm f'tank mhux saturat) sakemm is-solvent jilħaq il-linja tal-limitu tas-solvent. Neħħi l-pjanċa mit-tank u ħalliha tinxef f'temperatura ambjentali.

5.6.2.3. Interpretazzjoni tal-kromatogramna.

Eżamina l-kromatogramma taħt dawl UV (4.9) u kkontrolla għall-fatturi li ġejjin.

(a) Id-dehra ta' żona florexxenti blu ta' aflatossiku Bċ li toriġina mis-soluzzjoni standard applikata f'Ċ (il-migrazzjoni fid-direzzjoni I).

(b) Dehra ta' żona florexxenti blu ta' aflatossiku mingħajr reazzjoni B_1 (bl-aċiduidrokloriku) u żona iktar intensa florexxenti blu ta' aflatossiku B_1-emiaċetali, li t-tnejn joripinaw mis-soluzzjoni standard applikata f'B (migrazzjoni fid-direzzjoni II).

(ċ) Dehra taż-żoni li jaqblu ma' dawk deskritti f'(b); li joriġinaw mill-estratt tal-kampjun applikat f'A. Il-pożizzjoni ta' dawn iż-żoni hija l-ewwel definite bid-distanza ta' migrazzjoni ta' l-aflatossiku B_1 mill-punt A fid-direzzjoni I (l-istess bħal dik ivvjaġġata mill-istandard applikat f'Ċ), u mbagħad mid-distanzi ta' migrazzjoni minn hemm fid-direzzjoni II ta' l-aflatossiku B-emiaċetali (l-istess bħal dawk ivvjaġġati mill-istandard applikat f'B). L-intensitajiet tal-florexxenza ta' punti emiaċetali li joriġinaw mill-estratt u mill-istandard applikat f'B għandhom jaqblu.

6. Il-Kalkolu tar-riżultati

6.1. *Mill-kejl viżwali*

Il-kontenut f'mikrogrammi ta' aflatossiku B_1 għal kull kg tal-kampjun (ppb) hu mogħti bil-formula:

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

fejn:

Y u X huma rispettivament volum f'mikrolitri tas-soluzzjoni standard ta' aflatossiku B_1(3.16) u ta' l-estratt li jkollu intensità ta' florexxenza.

S = konċentrazzjoni f'mikrogrammi ta' aflatossiku B_1 għal kull ml fis-soluzzjoni standard (3.16);

V = volum finali ta' l-estratt f'mikrolitri, li jippermetti għal kull diluwizzjoni li kienet neċessarja;

W = piż fi grammi tal-kampjun li jikkorrispondi għall-volum ta' l-estratt soġġett għall-kolonna ta' tindif.

6.2. *Mill-kejl florodensitometriku*

Il-kontenut f'mikrogrammi ta' aflatossiku B_1 għal kull kg tal-kampjun hu mogħti bil-formula:

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

fejn:

▼B

Y = volum f'mikrolitri ta' l-estratt imnebbaħ fuq il-pjanċa (10 jew 20 µl);

S = kwantità f'nanogrammi ta' aflatossiku B_1 fil-punt ta' l-estratt (proporzjonali għall-valur ta' Y meħud), imnaqqas mill-kejl;

V = volum finali ta' l-estratt f'mikrolitri, li jippermetti għal kull diluwizzjoni li kienet neċessarja;

W = piż fi grammi tal-kampjun li jikkorrispondu għall-volum ta' estratt soġġett għat-tindif ta' kolonna.

7. **Il-Preparazzjoni u t-*testing* tas-sokuzzjoni standard (3.16).**

7.1 *Id-Determinazzjoni tal-konċentrazzjoni ta' aflatossiku B_1*

Ipprepara s-soluzzjoni standard ta' l-aflatossiku B_1 fil-kloroform (3.2) jew it-taħlita tal-*benzene*/aċetonitrile (3.6) b'konċentrazzjoni ta' 8 sa 10 µg/ml. Iddetermina l-ispektrum ta' assorbizzjoni bejn 330 u 370nm bl-għajnuna ta' l-ispettrofotometru (4.11).

Kejjel id-densità ottika (A) f'363nm fil-każ tas-soluzzjoni tal-kloroform; jew f'348nm fil-każ tas-soluzzjoni fit-taħlita *benzene*/aċetonitrile.

Ikkalkola l-konċentrazzjoni f'mikrogrammi ta' l-aflatossiku B_1 għal kull ml tas-soluzzjoni mill-formuli hawn taħt:

$\frac{312 \cdot A \cdot 1\,000}{20\,600}$ Għas-soluzzjoni tal-kloroform

$\frac{312 \cdot A \cdot 1\,000}{19\,800}$ Għas-soluzzjoni fit-taħlita benzene/aċetonitrile,

Iddiluwixxi kif approprjat, 'il bogħod mid-dawl tal-jum, sabiex tottjeni soluzzjoni standard b'konċentrazzjoni ta' aflatossiku B_1 ta' madwar 0.1 µg/ml Jekk miżmum fi friġġ f'4 °C, din is-soluzzjoni hija stabbli għal ġimgħatejn.

7.2 *Il-kontroll tal-purità kromatografika*

Immarka fuq pjanċa (4.8) 5 µl tas-soluzzjoni standard ta' l-aflatossiku B_1 li jikkontjeni 8 sa 10 µg/ml (7.1). Żviluppa l-kromatogramma kif indikat f'5.4. F'dawl UV il-kromatogramma għandha turi biss punt wieħed u ebda florexxenza ma għandha tkun perċepibbli fiż-żona oriġinali ta' depożitu.

8. **Ir-rata ta' repetizzjoni**

Id-differenza bejn ir-riżultati taż-żewġ determinazzjonijiet paralleli mwettqa fuq l-istess kampjun mill-istess analist m'għandhiex teċċedi:

— 25 % irrelatat ma' l-ogħla riżultat għall-kontenuti ta' aflatossiku B_1 minn 10 u sa 20 µg/kg;

— 5 µg, f'valur assolut, għall-kontenuti ikbar minn 20 u sa 50 µg/kg;

— 10 % irrelatat ma' l-ogħla valur għall-kontenuti 'l fuq minn 50 µg/kg.

9. **Ir-Riproduċibbiltà**

Ara taħt "Osservazzjonijiet", il-Parti Ċ, il-punt 2.

▼M2

B. DETERMINAZZJONI TA' L-AFLATOSSIN B1. METODU KROMATOGRAFIKU LIKWIDU TA' MĠIEBA GĦOLJA

1. **L-Għan u l-iskop ta' dan**

il-metodu huwa għad-determinazzjoni ta' l-aflaatoxin B1 fil-materjali ta' l-għalf ta' l-annimali, inklużi dawk li jkun fihom il-polpa taċ-ċitru. Id-determinazzjoni tal-limitu l-baxx hija 0,001 mg/kg (1 ppb).

2. **Prinċipju**

Il-kampjun huwa estratt bil-kloroform. L-estratt huwa iffiltrat u porzjon ta' alikwot huwa purifikat f'kapsula Florisil segwit b'kapsula C18. Is-separazzjoni u d-detrminazzjoni finali tkun akkwistata bil-kromatografija

▼M2

likwida ta' mġieba għola (HPLC) bl-użu ta' kolonna C18 fazi maqluba, segwita bid-derivatizzazzjoni ta' wara-l-kolonna bil-jodju fl-ilma, u s-sejbien floroxxenti.

Nota:

Il-mikotossini huma sustanzi estremament tossiċi. Il-manipulazzjoni għandha tkun imwettqa f'armarju speċifiku tad-dħaħen. Prekwazzjonijiet speċjali għandhom jittieħdu meta t-tossini ikunu f'għamla xotta minħabba li l-natura elettrostatika tagħhom u t-tendenza li tirriżulta li jinfirxi ma l-uċuħ tal-bank tax-xogħol.

3. **Reaġenti**

3.1. Kloroform, stabilizzat bi 0,5 sa 1,0 % ta' etanol, bil-massa. Ara l-osservazzjoni 10.2.

3.2. Metanol, grad HPLC għall-preatazzjoni ta' 3.6.

3.3. Aċetun.

3.4. Aċetonitril, grad HPLC.

3.5. Solventi elutenti: Ipprepara jum bil-quddiem qabel l-użu, jew neħħi l-arja mis-solventi b'mod ultrasoniku.

3.5.1. Taħlita ta' aċetun (3.3) u ilma, 98 + 2 (v + v).

3.5.2. Taħlita ta' ilma u metanol (3,2), 80 + 20 (v + v).

3.5.3. Taħlita ta' ilma u aċetun (3.3), 85 + 15 (v + v).

3.6. Fażi mobbli għal Taħlita HPLC ta' ilma,

metanol (3.2) u aċetonitril (3.4), 130 + 70 + 40 (v + v + v).

NB: Il-komposizzjoni tas-solvent fil-fażi mobbli tista tkun teħtieġ li tġi aġġustata, jiddependi mill-karatteristiċi tal = kolonna HPLC kif użta.

3.7. Taħlita ta' jodju saturat: żid 2 g ta' jodju ma 400 ml ilma. Ħallat għal mill-anqas 90 min u iffiltra minn filtru tal-membrana (4.15). Ipprotieġi t-taħlita saturata mid-dawl sabiex ma tħallix li jkun hemm fotodegradazzjoni.

3.8. Ċellulit maħsul bl-aċidu 545, jew ekwivalenti.

3.9. Kapsula florisil (ilmijiet SEP-PAK), jew ekwivalenti.

3.10. Kapsula C18 (ilmijiet SEP-PAK), jew ekwivalenti.

3.11. Gass inert, e.ġ. nitroġenu.

3.12. Taħlita normali ta' l-aflatossin B1 fil-kloroform, konċentrazzjoni 10 mg/ml. Ivverifika l-konċentrazzjoni tat-taħlita kif ġej: Iddetermina l-ispektru ta' l-assorbazzjoni tat-taħlita bejn 330 u 370 nm permezz tal-ispektrofotometru (4.23). Kejjel l-assorbenza (A) fil-massimu qrib 363 nm. Ikkalkola l-konċentrazzjoni ta' l-aflatossin B1 fi mikrogrammi kull millilitru ta' taħlita mill-formula:

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

3.12.1. Aflatossin B1 ħażna ta' taħlita normali fil-kloroform

Trasferixxi b'mod kwanitattiv 2,5 ml tat-taħlita normali ta' l-aflatossin B1 (3.12) lejn garafina volumetrika 50 ml u aġġusta l-marka bil-kloroform (3.1). Aħżen din it-taħlita f'post fil-frisk (4 °C), fid-dlam, issiġillata sewwa u mgeżwra fil-liga ta' l-aluminju.

3.13. Taħlitiet tal-kalibrazzjoni aflatossin B1 HPLC.

NB Uża utenti tal-ħġieġ maħsula bl-aċidu għall-preparazzjoni ta' dawn it-taħlitiet (ara 4, Apparat).

3.13.1. Taħlita tal-kalibrazzjoni 4mg/ml.

Ippermetti l-garafina volumetrika bit-taħlita normali tal-ħażna (3.12.1) li tidħon sat-temperatura tal-kamra fil-liega ta' l-aluminju (għal ftit siegħat). Ittrasferixxi 400 ml mit-taħlita normali tal-ħażna (200 ng aflatossin Bi) lejn garafina volumetrika 50 ml, u evapora t-taħlita lejn tnixxif f'kunnert ta' gass inert (3.11).

▼M2

Dewweb ir-residu akkwistat fi madwar 20 ml ta' taħlita ilma. Aċetun (3.5.3), wassal sal-marka bit-taħlita ta' ilma/aċetun u ħawwad sewwa.

3.13.2. Taħlita tal-kalibrazzjoni 3 ng/ml.

Ittrasferixxi b'mod kwantitattiv 7,5 ml tat-taħlita tal-kalibrazzjoni (3.13.1) lejn garafina volumetrika 10 ml, wassal sal-marka bit-taħlita ta' ilma/aċetun (3.5.3), u ħawwad sewwa.

3.13.3. Taħlita tal-kalibrazzjoni 2 ng/ml.

Ittrasferixxi b'mod kwantitattiv 25 ml tat-taħlita tal-kalibrazzjoni (3.13.1) lejn garafina volumetrika 50 ml, wassal sal-marka bit-taħlita ta' ilma/aċetun (3.5.3), u ħawwad sewwa.

Din it-taħlita hija referuta wkoll bħala in-norma ta' referenza, li għandha tkun użata għal injezzjoni repetittiva matul HPLC (5.5).

3.13.4. Taħlita tal-kalibrazzjoni 1 ng/ml.

Ittrasferixxi b'mod kwantitattiv 2,5 ml tat-taħlita tal-kalibrazzjoni (3.13.1) lejn garafina volumetrika 10 ml, wassal sal-marka bit-taħlita ta' ilma/aċetun (3.5.3), u ħawwad sewwa.

3.14. Ampula li jkun fih taħlita ta' aflatossini B1, B2, G1 u G2 bi konċentrazzjonijiet ta' madwar 1, 1.5. 1 u 0,5 mg/ml rispettivament, fi 1 ml kloroform.

3.14.1. Taħlita tat-test kromatografiku.

Ittrasferixxi l-kontenut ta' l-ampula (3.14) lejn tubu-tat-testijiet b'tapp tal-ħġieġ jew fjal bit-tapp tal-kamin. Ittrasferixxi 40 ml ta' din it-taħlita lejn tubu-tat-testijiet b'tapp tal-ħġieġ (imlaħlaħ bl-aċidu) (4.22). Evapora l-kloroforma f'kurrent ta' gass inert (3.11) u dewweb mill-ġdid f'taħlita ta' 10 ml ta' ilma/aċetun (3.5.3).

3.15. Reaġenti għat-test tal-konformità (6).

3.15.1. Taħlita ta' klorid tas-sodju saturat.

3.15.2. Sulfat tas-sodju, anidridu, granulari.

4. **Twissija dwar l-apparat:**

L-użu ta'apparat tal-ħġieġ mħux maħsul bl-aċidu għal taħlitiet akweji ta' l-aflatossin jistgha jaħloq telfien. Kura partikolari għandha tittieħed b'apparat tal-ħġieġ ġdid u apparat tal-ħġieġ li jintuża darba biss vħal ma huma l-fjali ta' kampjunar awtomatiku u l-pipetti Pasteur. Għalhekk l-apparat tal-ħġieġ tal-laboratorju li jkun f'kuntatt ma taħlitiet akweji ta' l-aflatossin għandu jkun mgħaddas f'aċidu mrattab (e.g. aċidu sulfuriku = 2 mol/l) għal diversi siegħat, imbaghad imlaħlaħ seww b'ila distillat sabiex jitneħħew kull traċċi ta' l-aċidu (e.g. tlett darbiet, b'verifika b'karta-pH). Fil-prattika, dan it-trattament huwa meħtieġ għal garafini bil-qiegħ tond (4.4), il-garafini volumetriċi, ċilindri tal-kejl, fjali u tubi użati għat-taħlitiet tal-kalibrazzjoni u l-estratti finali (partikolarment il-fjali ta' kampjunar awtomatiku), u l-pipetti Pasteur, jekk dawn ikunu wżati għat-trasferiment tat-taħlitiet tal-kalibrazzjoni jew estratti.

4.1. Taħlit-tħin.

4.2. Għarbiel b'toqob ta' daqs 1,0 mm, (ISO R 565).

4.3. Ċekċieka mekkanika

4.4. Evaporatur rotanti tal-vakwu, mgħammar bi 150 sa 250 ml garafina bil-qiegħ tonf.

4.5. Kromatografiku likwidu ta; mġieba għolja, injettur bid-dawra tajjeb għall-injezzjoni ta' 250 ml. Ara l-istruzzjonijiet tal-manifattur għall-mili parzjali jew komplut tad-dawra.

4.6. Kolonna analitika HPLC: 3 mm jew 5 mm ippakkjar C18.

4.7. Pompa mingħajr skossi għall-forniment tar-reaġent tal-jodju ta' wara l-kolonna.

4.8. Tee b'volum mejjet ta' Valco żero, azzar inossidabbli (1/16 ×0,75 mm).

4.9. Tkebbib spirali tar-reazzjoni; Teflon jew azzar inossidabbli. Qisien ta' 3 000 × 0,5 mm to 5 000 × 0,5 mm kienu nstabu li huma xierqa flimkien ma kolonni 5 mm jew 3 mm HPLC.

4.10. Banju ta' l-ilma ikkontrollat b'mod termostatiku aġġustat għall-60 °C, li jkista jkun bit-temperatura irregolata ta' aħjar minn 0,1 °C.

▼M2

4.11. Sejjiebu floroxxenti, b'eċitament fi 365 nm u emissjoni fi 435 nm *wavelengths*. (Għall-istrument tal-filtraġġ: emissjoni *wavelength* > 400 nm). Sejbien ta' mill-anqas 0,05 ng aflatossin għandu jkun possibbli. Xi pressjoni b-lura tista tkun rakkommandabbli (e.g. restrittur, tkebbib tat-Teflon jew ta' l-azzar inossidabbli fit-tarf tas-sejjiebi), sabiex inaqqas il-bżieżaq ta' l-arja fiċ-ċellola tan-nixxija.

4.12. Reġistratur tal-grafika tat-tqaxxir.

4.13. Integratur elettroniku (voluntarju).

4.14. Karta ta' filtru skanalaturata, dijametru: 24 cm, Macherey-Nagel 617 1/4 jew ekwivalenti.

4.15. Filtru tal-membrana bil-pori tad-daqs 0,45 mm, Millipore HAWP 04700 jew ekwivalenti.

4.16. Garafina konika bit-tapp tal-ħġieg, 500 ml.

4.17. Kolonna tal-ħġieġ (diametru interna ta' madwar 1 cm, tul ta' madwar 30 cm) mgħammra bil-ponta Luer.

4.18. Stopcock (vit) Luer reżistenti għall-klorofilla (e.g. Bio-rad 7328017, Analytichem A1 6078, J.T. Baker 4514 jew ekwivalenti).

4.19. Siringa reżistenti għall-kimika, connettur 10 ml Leur.

4.20. Singa tajba għall-injezzjoni HPLC ta' 250 ml (ara 4.5).

4.21. Mikrisiringa 100 ml għall-preparazzjoni tat-taħlitiet tal-kalibrazzjoni (ivverifika li l-eżattezza tkun fi ħdan 2 %, permezz ta' l-użin).

4.22. Tubi ikkalibrati 10 ml bit-tapp tal-ħġieġ.

4.23. Spektrofotometru, tajjeb biex iwettaq kejl fir-reġjun UV tal-ispektru.

4.24. Apparat għat-test tal-konformità (6).

4.24.1. Lembut tas-separazzjoni, 100 ml, imlaħlaġ bl-aċidu, bil-vit tat-Teflon.

4.24.2. Blokka tas-sħana, 40 sa 50 °C.

5. **Proċedura**

5.1. *Tħejjija tl-kampjun.*

Isħaq il-kampjun hekk li jkun jista jgħaddi mill-għarbiel (4.2).

5.2. *Porzjon tat-test.*

Iżen 50 g tal-kampjun ippreparat tat-test għal ġewwa garafina konika (4.16).

5.3. *Estrazzjoni;*

Żid 25 g ta' Ċelit (3.8), 250 ml ta' kloroform (3.1.) u 25 ml ta' ilma mal-porzjon tat-test (5.2). Għamel it-tapp fuq il-garafina, u ċekċek għal 30 minuta fuq ċekċieka mekkanika (4.3). Iffiltra mill-karta skanalaturata tal-filtru (4.14). Iġbor 50 ml tal-filtrat. Jekk meħtieġ, hu alikwott tal-filtratt u dewbu għall-50 ml bil-kloroform hekk li l-konċentrazzjoni ta' l-aflatossin B1 ma tkun akbar minn 4 ng/ml.

5.4. *Naddaf (il-proċedura għandha tkun imwettqa mingħajr interruzzjonijiet sinifikanti).*

Attenzjoni:

— ipprottieġi l-laboratorju, ta; fejn isseħħ l-analiżi, b'mod adekwat mid-dawl tal-jum. Dan jista jseħħ b'mod effettiv bl-użu ta':

  (i) Liega li tassorbixxi l-UV għal fuq it-twieqi flimkien ma dawl baxx (l-ebda dawl dirett tax-xemx);

  (ii) Purtieri jew dendili flimkien ma dawl artifiċjali (tubi florixxenti huma aċċettabbli);

— Taħlitiet li jkun fihom l-aflatossin għandhom ikunu mħarsa mid-dawl kemm jista jkun possibbli (żommhom fid-dlan, uża l-liega ta' l-aluminju).

5.4.1. Purifikazzjoni Florisil SEP-PAK

5.4.1.1. Preparazzjoni ta' l-assemblea tal-kartuċċa kolonna:

Waħħal it-vit (4.18) ma l0istemma l-qasirata' kartuċċa Florisil (3.9) (ara l-figura 1). Aħsel il-kartuċċa u neħħi l-għajnuna billi tieħu 10 ml kloroform (3.1) u għaddi malajr 8 ml mil-vit matul il-kartuċċa bl-użu ta'

▼M2

siringa (4.19). Waħħal l-istemma t-twila tal-kartuċċa ma kolonna tal-ħġieġ (4.17) u għaddi il-kumplament ta' 2 ml klororofm mill-kartuċċa lejn il-kolonna. Għalaq il-vit. Neħħi s-siringa.

5.4.1.2. Purifikazzjoni:

Żid il-filtrat miġbur fi 5.3 ma l-assemplea tal-kartuċċa-kolonna u saffi bil-gravità. Laħlaħ bi 5 ml ta' kloroform (3.1), segwi bi 20 ml ta' metanol (3.2). Warrab it-tisfija. Matul dawn l-operazzjonijiet, assigura li l-assemblea tal-kartuċċa-kolonna ma tinxiefx.

Saffi l-aflatossin B1 bi 40 ml tat-taħlita aċetun-ilma (3.5.1) u iġbor it-tisfija kollha fil-garafina tal-qiegħ tond ta' l-evaporatur rotanti (4.4). Ikkonċentra t-tisfija fuq l-evaporatur rotanti fi 40 °C sa 50 °C sa kemm l-ebda aċetun ma jkun aktar distillat. (NB. F'dan il-punt, madwar 0,5 ml tal-likwidu jibqa fil-garafina. Esperimenti wrew li aktar evaporazzjoni ma tkunx ta' ħsara u li meta jkun baqa' 0,5 ml tal-likwidu, ma jkun hemm l-ebda ammont sinifikati ta' aċetun. Residwi ta' l-aċetun jistgħu iwasslu għal-telfien ta' l-aflatossin B1 fuq il-kartuċċa C18). Żid 1 ml ta' metanol (3.2), obrom il-garafina sabiex iddewweb l-aflatossin B1 fuq il-ġemb tal-garafina, żid 4 ml ilma, u ħawwad. Neħħi u warrab il-kartuċċa. Laħlaħ il-kolonna tal-ħġieġ bl-ima u żomm għal pass tal-purifikazzjoni C18.

5.4.2. Purifikazzjoni C_{18} SEP-PAK

5.4.2.1. Preparazzjoni ta' l-assemblea tal-kartuċċa-kolonna.

Waħħal il-vit (4.18) ma l-istemma l-qasira tal-kartuċċa C18 (3.10) (ara l-figura 1). Ikkarga l-kartuċċa u neħħi kwalunkwe arja billi tgħaddi 10 ml metanol (3.2) b'ħeffa mill-vit matul il-kartuċċa bis-siringa (4.19) (Il-bżieżaq ta' l-arja fil-kartuċċa huma viżibbli bħala tikkek tad-dawl jew inkella fuq sfond griż). Ħu 10 ml ilma, u għaddi 8 ml matul il-kartuċċa (Evita l-introduzzjoni ta' l-arja fil-kartuċċa, meta tkun qiegħed taqleb mill-metanol għall-ilma). Waħħal l-istemma t-twila tal-kartuċċa ma kolonna tal-ħġieġ (4.17) u għaddi il-kumplament ta' 2 ml mill-kartuċċa lejn il-kolonna. Għalaq il-vit. Neħħi s-siringa.

5.4.2.2. Purifikazzjoni:

Trasferixxi l-estratt miġbur fi 5.4.1.2 b'mod kwantitattiv lejn kolonna tal-ħġieġ (4.17), laħlaħ darbtejn il-garafina bi 5 ml taħlita ta' ilma/metanol (3.5.2) u saffi bil-gravità. Matul dawn l-operazzjonijiet, assigura li l-assemblea tal-kartuċċa-kolonna ma tinxiefx. (Meta jiżviluppaw il-bżieżaq ta' l-arja fil-kostrizzjoni qrib il-kartuċċa, waqqaf in-nixxija u taptap in-naħa ta' fuq tal-kolonna, sabiex tneħħi l-bżieżaq ta' l-arja. Imbagħad kompli). Saffi bi 25 ml taħlita ilma/metanol. Warrab it-tisfija. Saffi l-aflatossin B1 bi 50 ml taħlita ilma/aċetun (3.5.3), u iġbor it-tisfija kollha f'garafina volumetrika 50 ml. Wassal sal-marka bl-ima u ħawwad. It-taħlita riżultanti tat-test hija wżata għall-kromatografija (5.5).

Attenzjoni: *Il-filtrazzjoni ta' l-estratt finali qabel il-HPLC normalment ma jkunx meħtieġ.* Jekk ikun meqjus bħala meħtieġ, filtri taċ-ċellulosi ma jkunux użati, minħabba li dan jista jwassal għal telf ta' l-aflatossin B1. Filtri tat-Teflon huma aċċettabbli.

5.5. *Kromatografija likwida ta' mġieba għolja*

(Ara l-Figura 2 għall-assemblar ta' l-apparat). Ippermetti żmien biżżejjed għall-kondizzjonar u l-istabbilizzar tal-istrumenti.

Nota 1:

Ir-rati tan-nixija kif mhurija għall-fażi mobbli u r-reaġent ta' wara-il-kolonna huma biss indikattivi. Dawn jistgħu ikunu jeħtieġu aġġustament, jiddependi mill-karatteristiċi tal-kolonna HPLC.

Nota 2:

Ir-reazzjoni tas-sejjiebi għall-aflatossin B1 tiddependi mit-temperatura, għalhekk kumpens għandu jsir għaċ-ċaqlieq (ara l-Figura 3). Bl-injezzjoni ta' ammont fiss ta' l-aflatossin B1 bġala referenza normali (3.13.3) matul intervalli regulari (i.e. kull tlett injezzjonijiet), il-valuri quċċata ta' l-aflatossin B1 bejn dawn ir-referenzi normali jistgħu ikunu ikkorreġuti bl-użu tar-reazzjoni medja, basta li d-differenza bejn ir-reazzjoni konsekuttivi tan-normi ta' referenza tkun ferm żgħira (< 10 %). Għalhekk l-injezzjonijiet għandhom iseħħu mingħajr interruzzjonijiet. Jekk interruzzjoni tkun meħtieġa, l-aħħar injezzjoni qabel l-interruzzjoni u l-ewwel injezzjoni wara l-interruzzjoni għandhom ikunu n-norma ta' referenza

▼**M2**

(3.13.3). Minħabba li l-kurva tal-kalibrazzjoni hija lineari u tgħaddi matul l-oriġini, l-ammonti ta' l-aflatossin B1 fl-estratti tal-kampjun huma determinati direttament b'referenza għan-normi tal-biswit.

5.5.1. It-tqegħid tal-pompa HPLC:

Ikkalibra l-pompa HPLC (4.5) sabiex ikun hemm nixxija 0,5 jew 0,3 ml/min għal 5 mm jew 3 mm kolonna HPLC (4.6) rispettivament bl-użu tal-faži mobbli (3.6).

5.5.2. Ikkalibrar tal-pompa ta' wara-il-kolonna:

Ikkalibra l-pompa (4.7) sabiex ikun hemm nixxija ta' 0,2 sa 0,4 ml/min ta' taħlita ta' ilma saturat bil-jodju (3.7). Bħala gwida ġenerali: Nixxijiet ta' madwar 0,4 jew 0,2 ml/min huma rakkommandabbli flimkien ma nixxijiet ta' 0,5 u 0,3 ml/min tal-paži mobbli (3.6) rispettivament.

5.5.3. Sejjiebi florixxenti:

Ikkalibra s-sejjiebi florixxenti (4.11) sabiex iwettaq = 365 nm u em = 435 nm (strument tal-filtraġġ; > 400 nm). Aġġusta l-attwnnatur tas-sejjiebi sabiex takkwista madwar 80 % diflezzjoni ta' skala sħiħa tal-pinna tar-reġistratur għal kull 1 ng ta' aflatossin B1.

5.5.4. Injettur:

Għas-soluzzjonijiet kollha, injetta 250 ml ammonti skond l-istruzzjonijiet tal-manifattur ta' l-injettur.

5.5.5. Verifika tas-separazzjoni kromatografika

Injetta t-taħlita tat-test kromatografiku (3.14.1). In-niżliet għandhom ikunu anqas minn 5 % tas-somma ta' l-għoljiet tal-quċċata ta' quċċata taal-biswit.

5.5.6. Ivverifika l-istabbilita tas-sistema:

Qabel kull serje ta' l-analiżi, rispettivament injetta t-taħlita normali ta' referenza (3.13.3), sakemm żoni ta' quċċata stabbli jkunu akkwistati (NB. Reazzjonijiet quċċata għall-aflatossin B1 bnejn injezzjonijiet konsekuttivi m'għandhomx ikollom differenza ta' aktar minn 6 %). Ipproċedi mingħajr dewmien bill-verifika lineari (5.5.7).

5.5.7. Verifika tal-linearità:

Injetta t-taħlitiet tal-kalibrazzjoni aflatossin B1 (3.13.1 sa 3.13.4). Kull tielet injezzjoni uża t-taħlita normali ta' referenza (3.13.3), għaċ-ċaqlieq tal-korrezzjoni b'reazzjoni (NB. Ir-reazzjonijiet tal-quċċata għal din it-taħlita normali ta' referenza m'għandhiex tkun tiddifferixxi b'aktar minn 10 % fi 90 minuta). Ikkorreġi ċ-ċaqlieq skond il-formula fi 7. Il-grafika tal-kalibrazzjoni għandha tkun lineari u tgħaddi matul l-oriġini, fi ħdan darbtejn l-iżball normali ta' Y-stima. Il-valuri misjuba m'għandomx jiddifferixxu b'aktar minn 3 % mill-valuri nominali. Jekk dawn il-ħtiġiet ikunu mwettqa, kompli mingħajr dewmien. Jekk le, identifika u ikkorreġi s-sorsi tal-problema qabel ma tkompli.

5.5.8. Injezzjoni ta' l-estratti tal-kampjun:

Injetta l-estratti tal-kampjun purifikat (5.4.2.2). Wara kull żewġ estratti tal-kampjun, irrepeti l-injezzjoni tat-taħlita normali ta' referenza (3.13.3) skond is-sekwenza li ġejja: Taħlita normali ta' referenza, estratt, estratt, taħlita normali ta' referenza, estratt, estratt, taħlita normali ta' referenza, eċċ.

6. **Test tal-konferma**

6.1. *Aktar trattament ta' l-estratt (5.4.2.2).*

Żid 5 ml taħlita tal-klorat tas-sodju (3.15.1) sa l-estratt finali akkwistat fi 5.4.2.2. Ħu estratt tlett darbiet kull waħda bi 2 ml kloroform (3.1) għal minuta waħda, fil-lembut tas-separazzjoni (4.24.1). Ferra l-estratti magħquda tal-kloroform matul madwar 1 g sulfat tas-sodju (3.15.2) għal ġewwa 10 ml tubu tat-testijiet. Lembut żgħir (diametru: 4 cm) jista jkun wżat ma biċċa tajjar fil-kostrizzjoni, mgħotti b'madwar 1 g sulfat tas-sodju.

Aħsel is-saff tas-sulfat tas-sodju fi ftit ml ta' kloroform u iġbor il-ħasil fl-istess tubu tat-testijiet. Evapora l-estratt tal-kloroform għal tnixxif fl-istess tubu tat-testijiet bl-użu ta' blokka tas-sħana (2.24.2) u dewweb mill-ġdid fi 1 ml ta' kloroform.

▼M2

6.2. *Preparazzjoni tad-derivattiva u kromatografija tas-saff irqieq:*

Ara l-Anness tad-Direttiva tal-Kunsill 76/372/KEE, il-metodu A, il-punt 5.6.2.

7. **Kalkolazzjoni tar-riżultati tal-kontenut**

aflatossin B1 (mm/kg) preżenti fil-kampjun, bl-użu tal-formula:

$$\text{Kontenut aflatossin B1 fi mg/kg} = \frac{m \times V_{ext}}{V_m \times M \times \frac{V_f}{V_c}}$$

meta:

M = l-ammont ta' aflatossin B1 fi ng rapreżentat bi B1 quċċata tal-kampjun ikkalkolat kif ġej:

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

P (kampjun) = żona tal-quċċata ta' aflatossin B1 tal-kampjun

$P\ (st_1)$ = żona tal-quċċata ta' aflatossin B1 li tiorriżulta mill-injezzjoni preċedenti tat-taħlita normali ta' referenza (3.13.3)

$P\ (st_2)$ = żona tal-quċċata ta' aflatossin B1 li tirriżulta mill-injezzjoni segwentu tat-taħlita normali ta' referenza (3.13.3)

r (st) = ammont in jettat ta' aflatossin B1 fit-taħlita normali ta' referenza (3.13.3) fib g

V_m = volum ta' l-estratt tal-kampjun injettat fi ml

V_{ext} = volum final ital-kampjun estratt fi ml, billi tippermetti għal xi trattib li kien sar (5.3)

M = massa tal-kampjun fi g

V_f = volum tal-filtrat trasferit lejn il-kartuċċa Florisil (5.4.1.2) fi ml

V_c = volum tal-kloroform, użat għall-estrazzjoni tal-kampjun fi ml.

Jekk il-proċedura tkun segwita bħal f'dan il-protokoll, il-formula tkun imqassra għal:

Kontenut aflatossin B1 fi mg/kg = 20 × m.

7.1. Kalkozzajonijiet tar-riżultati tista wkoll titwettaq bil-kejl ta' l-għoli tal-quċċata.

8. **Repetabbilità:**

Ara taħt 10.1

9. **Reproduċibbiltà:**

Ara taħt 10.1

10. **Osservazzjonijiet:**

10.1. *Preċiżjoni:*

Studju kollaborattiv ([1]) imwettaq f'livell internazzjonali fuq materjali mħallta ta' l-għalf taw riżultati għar-repetabbilità u reproduċibbiltà indikati fit-Tabella 1. It-terminu repetabbiltà (r) użat hawnhekk huwa definit bħala l-akbar relattivita li ma tkunx sinifikanti b'livell ta' probabbiltà ta' 95 % għat-tqabbil maż-żewġ qari ta' l-istess kampjun fl-istess laboratorju bl-istess kondizzjonijiet. It-terminu reproduċċibbiltà (R) huwa l-istess definit għal tqabbil bejn żewġ laboratorji differenti. Bi qbil ma ISO 3534 - 1977, 2.35 ([2]) u d-Deċiżjoni tal-Kummissjoni 89/610/KEE ([3]) r u R huma wkoll mogħtija fit-Tabella 1 f'termini ta' ko-effiċjenti ta' varjazzjoni.

([1]) Egmond, H.P. van, Heisterkamp, S.H. and Paulsch, W.E. (1991). Additivi u Kontaminati ta' l-Ikel 8, 17-29.
([2]) ISO 3534-1977.
([3]) ĠU L 351, tat-2.12.1989, p. 39.

▼**M2**

Tabella 1:

Repetabbiltà (r) u reproduċċibbiltà (R) espressi bħala relattivitajiet u ko-effiċjenti korrespondenti tal-varjazzjoni

(15 il-laboratorju)

Livell	r	R	CVr (*)	CVR
(mg/kg)			(%)	(%)
8 & 14	1,4	1,7	11	18

(*) CV = varjazzjoni tal-ko-effiċjent.

10.2. *Stabbilizzazzjoni tal-kloroform (3.1):*

Il-karatteristiċi ta' assorbazzjoni tal-kartiċċa Florisil jistgħi jinbidlu jekk stabilizzaturi oħrajn, apparti milli etanol, ikunu wżati. Dan għandu jkun verifikat bi qbil ma 10.3 meta l-kloroform deskritt ma jkunx disponibbli.

10.3. *Eżatezza:*

L-applikazzjonijiet korretti tal-metodu għandhom ikunu verifikati billi jkun hemm kejn repetut fuq materjali ċertifikati ta' referenza. Jekk dawn ma jkunux disponibbli; l-imġieba tal-metodu għandha tkun verifikata bl-irkupru ta' l-esperimenti imwettqa fuq kampjuni fl-imbjank. Id-devjazzjoni tal-medja mill-valur aattwali, espressa bħala persentaġġ tal-valur attwali, m'għandhiex tkun il-barra mill-limiti 20 sa + 10 %.

▼M2

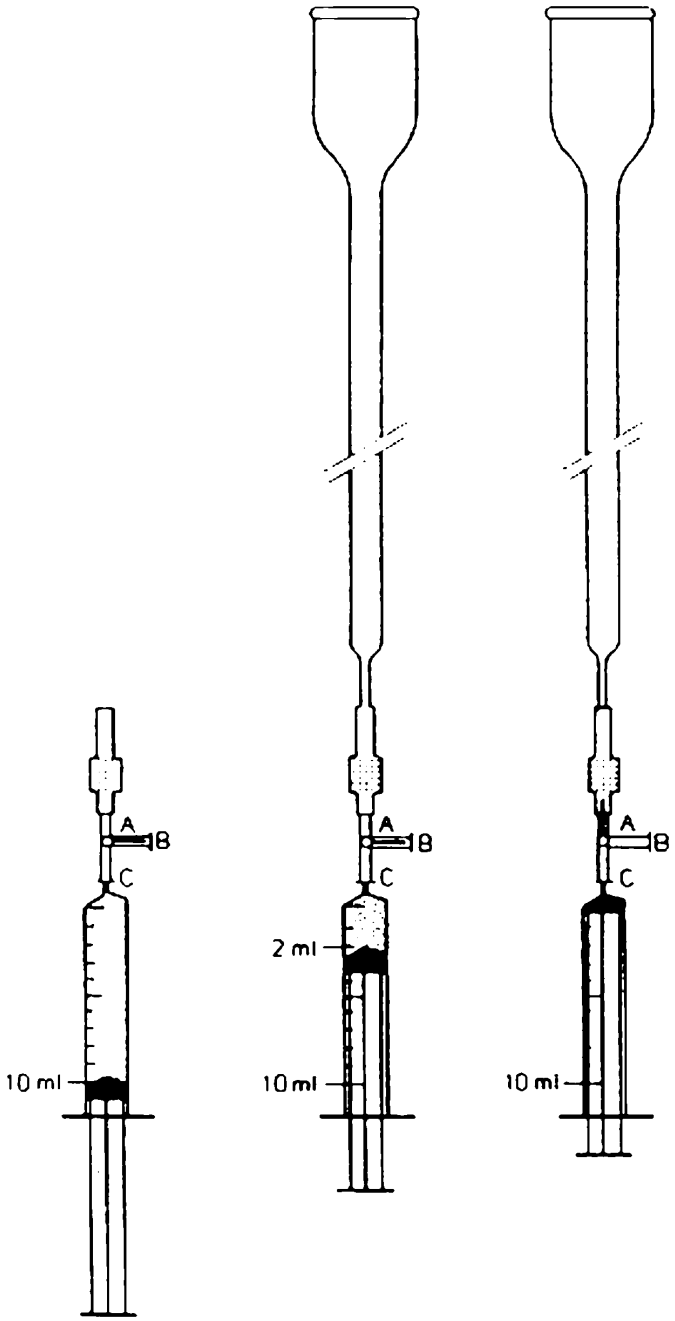
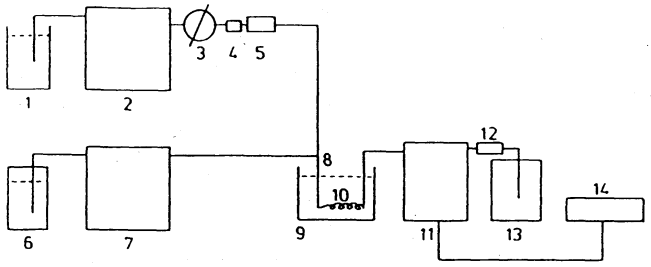


Figura 1: Assemblea tal-kartuċċa-kolonna

▼**M2**



1. Faži mobbli
2. Pompa
3. Valvola ta' l-injezzjoni
4. Kollonna ta' harsien
5. Kolonna analitika HPLC
6. Tahlita ta' jodju saturat
7. Pompa tar-reaġent
8. Ġonta-T
9. Banju ikkontrollat b'mod termostatiku
10. Tkebbib spirali tar-reazzjoni
11. Sejjiebi florixxenti
12. Restritattur
13. Skart
14. Reġistratur/integratur tal-grafika tat-tqaxxir.

Figura 2: Diagramma tan-nixxija tas-sistema LC bil-wara-kolonna tal-jodju, reazzjoni tad-devjazzjoni tal-medja ta' normi ta' referenza tal-biswit, referenza taż-żmien ta' l-estratt normali (jew kalibrant) estratt (jew kalibrant) estratt normali ta' referenza (jew kalibrant).

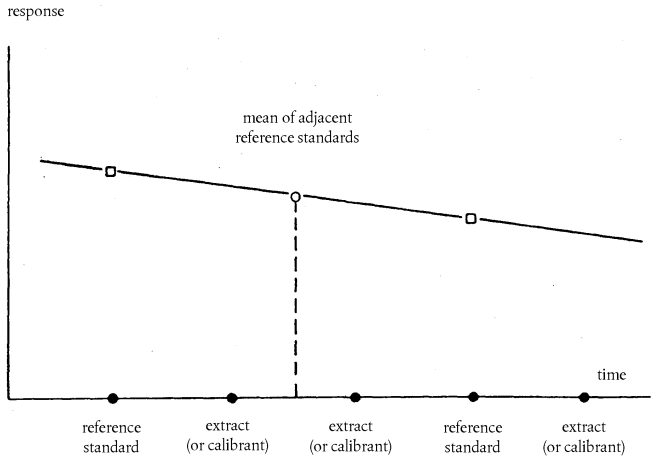


Figura 3:Kummpens għaċ-ċaqlieq fir-reazzjoni ta' l-aflatossin B1 bl-injezzjoni tan-norma ta' referenza (3.13.3) matul intervalli regolari'

▼**M3**

Ċ. OSSERVAZZJONIJIET LI JIKKONĊERNAW IL-METODI A U B

1. **Tneħħija ta' xaħam**

Kampjuni li jkun fihom aktar minn 5 % ta' xaħmijiet għandu jitneħħilhom ix-xaħam b'pitrolju ħafif (bp 40 to 60 °C) wara l-preparazzjonijiet indikati fil-5.1.

F'dawk il-każijiet, r-riżultati analitiċi għandhom jiġi espressi f'termini tal-piż tal-kampjun bix-xaħam mhux imneħħi.

2. **Reproduċibilita tar-riżultati għall-Metodu A**

Ir-riproduċibilità tar-riżultati, jiġifieri il-varjazzjoni bejn ir-riżultati miksuba minn żewġ laboratorji jew aktar fuq l-istess kampjun tkun ġiet stmata bħala:

± 50 % tal-valur medju tal-valuri medji ta' aflatoxin B, minn 10 u sa 20 µg/kg;

± 10 µg/kg tal-valur medju għall-valuri medji akbar minn 20 sa 50 µg/kg;

± 20 % tal-valur medju għall-valuri medjiss 'l fuq minn 50 µg/kg'.

▼B

Appendiċi ma' l-Anness

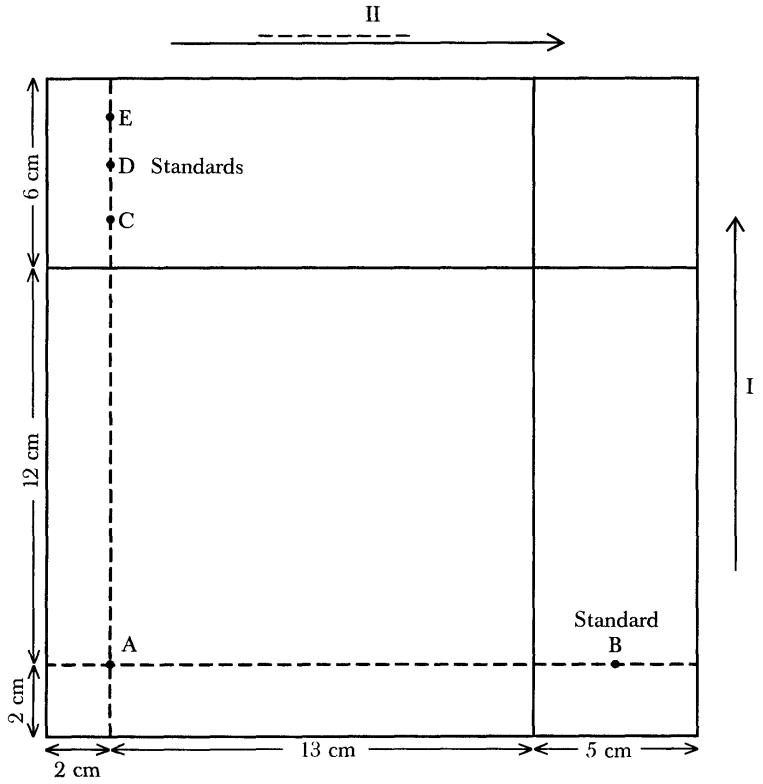


Figura 1

Figura 1

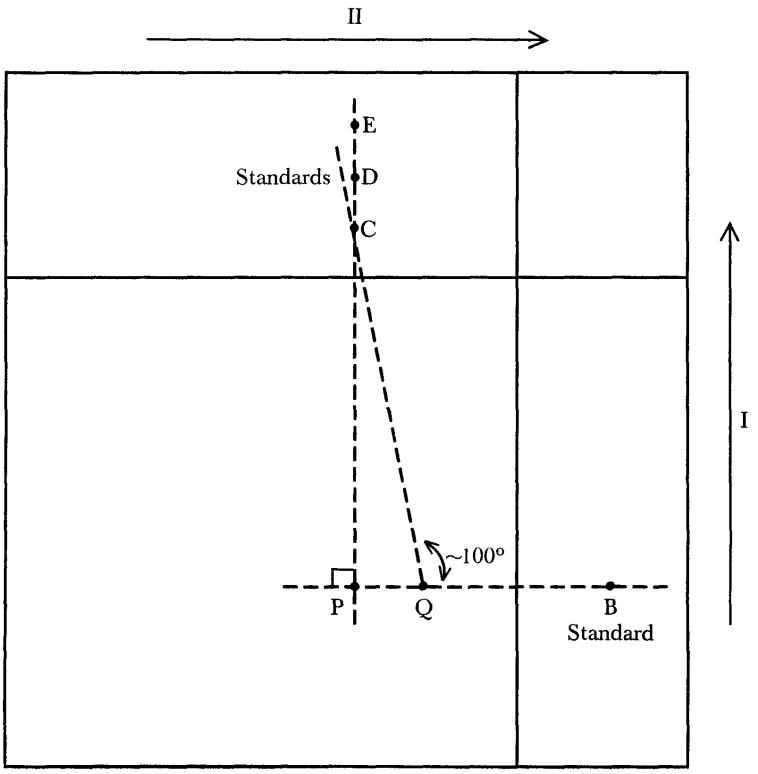


Figura 2

Figura 2

▼B

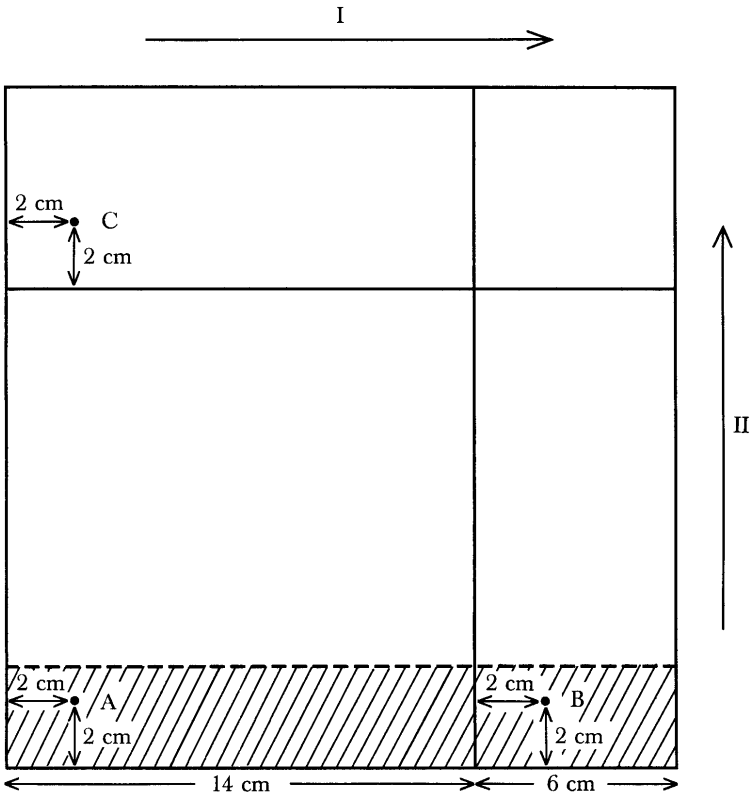


Figura 3

Figura 3