II

(Actos cuya publicación no es una condición para su aplicabilidad)

COMISIÓN

DIRECTIVA 92/95/CEE DE LA COMISIÓN

de 9 de noviembre de 1992

por la que se modifica el Anexo de la séptima Directiva 76/372/CEE que establece métodos de análisis comunitarios para el control oficial de piensos

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Económica Europea,

Vista la Directiva 70/373/CEE del Consejo, de 20 de julio de 1970, relativa a la introducción de métodos para la toma de muestras y de métodos de análisis comunitarios para el control oficial de la alimentación animal (1), modificada en último lugar por el Acta de adhesión de España y de Portugal, y, en particular, su artículo 2,

Considerando que la séptima Directiva 76/372/CEE de la Comisión, de 1 de marzo de 1976, sobre determinación de métodos de análisis comunitarios para el control oficial de la alimentación animal (2), modificada por la Directiva 81/680/CEE (3), prescribe métodos para la determinación de aflatoxina B_1;

Considerando que se deben adaptar estos métodos a la evolución de los conocimientos científicos y técnicos; que es conveniente en especial poder contar con un método que permita controlar los bajos límites de aflatoxina fijados por la Directiva 74/63/CEE del Consejo, de 17 de diciembre de 1973, relativa a la fijación de contenidos máximos para las sustancias y productos indeseables en la alimentación animal (4), modificada en último lugar por la Directiva 91/132/CEE (5);

Considerando que, por otro lado, es conveniente contar con un método que permita el análisis de la aflatoxina B_1 en presencia de sustancias que interfieren en los análisis tales como los agrios;

Considerando que las medidas previstas en la presente Directiva se ajustan al dictamen del Comité permanente de alimentación animal,

HA ADOPTADO LA PRESENTE DIRECTIVA:

Artículo 1

El Anexo de la Directiva 76/372/CEE quedará modificado conforme al Anexo de la presente Directiva.

Artículo 2

Los Estados miembros pondrán en vigor las disposiciones legislativas, reglamentarias y administrativas necesarias para cumplir las disposiciones de la presente Directiva a más tardar el 1 de octubre de 1993, e informarán inmediatamente de ello a la Comisión.

Cuando los Estados miembros adopten dichas disposiciones, éstas harán referencia a la presente Directiva o irán acompañadas de dicha referencia en su publicación oficial. Los Estados miembros establecerán las modalidades de la mencionada referencia.

Artículo 3

Los destinatarios de la presente Directiva serán los Estados miembros.

Hecho en Bruselas, el 9 de noviembre de 1992.

Por la Comisión

Ray MAC SHARRY

Miembro de la Comisión

(1) DO nº L 170 de 3. 8. 1970, p. 2.
(2) DO nº L 102 de 15. 4. 1976, p. 8.
(3) DO nº L 246 de 29. 8. 1981, p. 32.
(4) DO nº L 38 de 11. 2. 1974, p. 31.
(5) DO nº L 66 de 13. 3. 1991, p. 16.

ANEXO

I. En la parte A. « método por cromatografía monodimensional en capa fina » el texto del punto 1. « Objeto y campo de aplicación » se sustituye por el texto siguiente :

« 1. **Objeto y campo de aplicación**

El método permite determinar el contenido en aflatoxina de las materias primas y piensos simples. Este método no puede ser utilizado en presencia de pulpas de cítricos. El límite inferior de determinación es 0,01 mg/kg (10 ppb).

En presencia de sustancias interferentes que dificulten las determinaciones, se volverá a iniciar el análisis según el método B (por cromatografía de líquidos de alta resolución). »

II. En la Parte B « método por cromatografía bidimensional en capa fina » el texto se sustituye por el texto siguiente :

« B. DETERMINACIÓN DE LA AFLATOXINA B_1 MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

1. **Objeto y ámbito de aplicación**

La presente propuesta describe un método para la determinación de la aflatoxina B_1 en los piensos, incluidos los que contienen pulpa de cítricos. El límite inferior de determinación es de 0,001 mg/kg.

2. **Principio**

El método se basa en la separación mediante cromatografía de líquidos de alta resolución con detección por fluorescencia. La extracción de la muestra se realiza con cloroformo. Se filtra el extracto y una parte alícuota de éste se purifica en un cartucho de Florisil y, a continuación, en un cartucho C_{18}. La separación y determinación finales se realizan mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) utilizando una columna de fase inversa C_{18}, seguida de una reacción post-columna con solución acuosa de yodo y detección por fluorescencia.

Nota :

Las micotoxinas son extremadamente tóxicas. Las manipulaciones deben llevarse a cabo en campana extractora de humos. Deben tomarse precauciones especiales cuando las toxinas están en forma sólida, ya que debido a su naturaleza electrostática tienden a dispersarse en las áreas de trabajo.

3. **Reactivos**

3.1. Cloroformo estabilizado con 0,5 a 1,0 % de etanol, en masa. Ver observación 10.2.

3.2. Metanol, grado HPLC para preparación de 3.6.

3.3. Acetona.

3.4. Acetonitrilo, grado HPLC.

3.5. Disolventes de elución : preparar un día antes de su utilización o eliminar mediante ultrasonidos el aire que contengan.

3.5.1. Mezcla de acetona (3.3) y agua, 98 + 2 (v + v).

3.5.2. Mezcla de agua y metanol (3.2), 80 + 20 (v + v).

3.5.3. Mezcla de agua y acetona (3.3), 85 + 15 (v + v).

3.6. Fase móvil para la HPLC.

Mezcla de agua, metanol (3.2) y acetonitrilo (3.4), 130 + 70 + 40 (v + v + v).

Nota : Puede ser necesario ajustar la composición de los disolventes de la fase móvil, de acuerdo con las características de la columna HPLC utilizada.

3.7. Solución acuosa saturada de yodo. Añadir 2 g de yodo a 400 ml de agua. Mezclar durante 90 minutos como mínimo y filtrar a través de un filtro de membrana (4.15). Proteger de la luz la solución saturada, a fin de evitar la fotodegradación.

3.8. Celite 545 lavada con ácido, o equivalente.

3.9. Cartucho de Florisil (Waters SEP-PAK) o equivalente.

3.10. Cartucho C_{18} (Waters SEP-PAK) o equivalente.

3.11. Gas inerte, por ejemplo nitrógeno.

3.12. Solución patrón de aflatoxina B_1 en cloroformo con una concentración de 10 µg/ml. Comprobar la concentración de la solución del siguiente modo: Determinar el espectro de absorción de la solución citada entre 330 y 370 nm por medio del espectrofotómetro (4.23). Medir la absorbancia (A) en el máximo cercano a 363 nm. Calcular la concentration de aflatoxina B_1 en microgramos por mililitro de solución, empleando la fórmula siguiente:

$$\text{Concentración (µg/ml)} = \frac{312 \times A \times 1000}{22300} = 13{,}991 \times A$$

3.12.1. Solución madre de aflatoxina B_1 en cloroformo.

Transferir cuantitativamente 2,5 ml de la solución patrón de aflatoxina B_1 (3.12) a un matraz aforado de 50 ml y enrasar con cloroformo. Almacenar esta solución en un lugar fresco (4° C) al abrigo de la luz, adecuadamente tapada y envuelta en una hoja de aluminio.

3.13. Soluciones de aflatoxina B_1 para calibración de HPLC.

Nota: para la preparación de estas soluciones deberá utilizarse material de vidrio lavado con ácido (véase el punto 4. Aparatos).

3.13.1. Solución para calibración de 4 ng/ml.

Dejar reposar (algunas horas) la solución madre (3.12.1). Contenida en el matraz aforado envuelto en la hoja de aluminio, hasta que alcance la temperatura ambiente. Transferir 400 µl de la solución madre (200 ng aflatoxina B_1) a un matraz aforado de 50 ml y evaporar la solución hasta sequedad en corriente de gas inerte (3.11). Disolver el residuo obtenido en 20 ml aproximadamente de mezcla de agua y acetona (3.5.3), enrasar con mezcla de agua y acetona (3.5.3) y mezclar completamente.

3.13.2. Solución para calibración de 3 ng/ml.

Transferir cuantitativamente 7,5 ml de la solución para calibración (3.13.1) a un matraz aforado de 10 ml con la mezcla de agua y acetona (3.5.3) y mezclar completamente.

3.13.3. Solución para calibración de 2 ng/ml.

Transferir cuantitativamente 25 ml de la solución para calibración (3.13.1) a un matraz aforado de 50 ml, enrasar con la mezcla de agua y acetona (3.5.3) y mezclar completamente.

Esta solución se denomina también « Patrón de referencia » y se usa, en particular, para efectuar inyecciones repetidas durante el procedimiento de HPLC.

3.13.4. Solución para calibración de 1 ng/ml.

Transferir cuantitativamente 2,5 ml de solución para calibración (3.13.1.) a un matraz aforado de 10 ml, enrasar con la mezcla de agua y acetona (3.5.3) y mezclar completamente.

3.14. Una mezcla de aflatoxinas B_1, B_2, G_1 y G_2 en concentraciones aproximadas de 1 ; 0,5 ; 1 y 0,5 µg/ml, respectivamente, en 1 ml de cloroformo.

3.14.1. Solución de comprobación cromatográfica.

Transferir la mezcla (3.14) a un tubo de ensayo con tapón de vidrio o a un frasco con tapón de rosca. Transferir 40 µl de esta solución a un tubo de ensayo con tapón de vidrio — lavado con ácido — (4.2.2.). Evaporar el cloroformo en una corriente de gas inerte (3.11.) y disolver de nuevo en 10 ml de la mezcla de agua y acetona (3.5.3.).

3.15. Reactivos para la prueba de confirmación (6).

3.15.1. Solución acuosa saturada de cloruro de sodio.

3.15.2. Sulfato de sodio anhidro, granular.

4. Aparatos

Atención: El uso de material de vidrio que no se haya lavado con ácido, para las soluciones acuosas de aflatoxina, puede originar pérdidas de aflatoxinas. Deberán tomarse precauciones especiales con el material de vidrio nuevo o desechables, por ejemplo los frascos para muestreador automático y las pipetas Pasteur. Por lo tanto, el material de vidrio que vaya a estar en contacto con las soluciones acuosas de aflatoxinas deberá sumergirse durante varias horas en un ácido diluido (por ejemplo, ácido sulfúrico, C= 2 mol/1) y, a continuación, lavarse a fondo con agua destilada para suprimir todo resto de ácido (por ejemplo, 3 enjuagues, seguidos de una comprobación con papel pH). En concreto, este tratamiento deberá aplicarse a los matraces redondos (4.4), a los matraces aforados, probetas, a los frascos o tubos utilizados para soluciones para calibración y extractos finales (en particular, los frascos para muestreador automático) y a las pipetas Pasteur si se utilizan para transferir soluciones para calibración o extractos.

4.1. Triturador/mezclador.

4.2. Tamiz de malla de 1,0 mm (ISO R 565).

4.3. Agitador mecánico.

4.4. Evaporador rotatorio a vacío provisto de un matraz redondo de 150 ml a 250 ml.

4.5. Cromatógrafo de líquidos de alta resolución, con bucle de inyección que permita inyectar 250 µl. Ver instrucciones del fabricante para el llenado parcial o total del bucle.

4.6. Columna analítica para HPLC: relleno C_{18} de 3 o 5 µm.

4.7. Bomba libre de pulsos que suministre el reactivo yodado para la reacción postcolumna, por ejemplo, bomba para HPLC o concebida para reacción postcolumna.

4.8. Conexión en T Valco de volumen muerto nulo, de acero inoxidable (1/16" × 0,75 mm).

4.9. Serpentín de reacción, de teflón o de acero inoxidable. Las dimensiones comprendidas entre 3 000 x 0,5 mm y 5 000 x 0,5 mm resultan apropiadas en combinación con columnas HPLC de 5 o 3 µm.

4.10. Baño de agua termostatizado a 60 °C, con una variación de temperatura de menos de 0,1 °C.

4.11. Detector de fluorescencia que proporcione longitudes de onda de excitación de 365 nm aproximadamente y de emisión de 435 nm aproximadamente. (Para los aparatos de filtro: longitud de onda de emisión < 400 nm.) Deberá ser posible efectuar la detección de 0,05 ng de B_1, como mínimo. Se recomienda aplicar cierta contrapresión (por ejemplo, un constrictor o una espiral de teflón o acero inoxidable conectada al orificio de salida del detector) a fin de suprimir las burbujas de aire en la célula de flujo.

4.12. Registrador de banda de papel.

4.13. Integrador electrónico (facultativo).

4.14. Filtro de pliegues 24 cm. Macherey-Nagel 617 1/4 o equivalente.

4.15. Filtro de membrana con un tamaño de poro de 0,45 µm, Millipore HAWP 04700 o equivalente.

4.16. Erlenmeyer de 500 ml con tapón de vidrio.

4.17. Columna de vidrio (con un diámetro interior de 1 cm aproximadamente y una longitud de 30 cm aproximadamente) provista de una punta Luer.

4.18. Llave Luer de nailon resistente al cloroformo (por ejemplo, Bio-rad 7328017, Analytichem A1 6078, J.T. Baker 4514 o equivalente).

4.19. Jeringa de 10 ml resistente a productos químicos, con llave Luer.

4.20. Jeringa de 250 µl adecuada para la inyección en HPLC (ver 4.5).

4.21. Microjeringa de 100 µl para la preparación de soluciones de calibración (comprobar, mediante pesada, que su precisión es del 2 %).

4.22. Tubos calibrados de 10,0 ml con tapón de vidrio.

4.23. Espectrofotómetro adecuado para realizar medidas en la región U.V. del espectro.

4.24. Equipo para efectuar la prueba de confirmación (6).

4.24.1. Embudo de decantación de 100 ml (con llave de teflón), lavado con ácido.

4.24.2. Fuente de calor a 40-50 °C.

5. Procedimiento

5.1. *Preparación de la muestra*

Triturar la muestra de manera que pueda pasar a través del tamiz (4.2).

5.2. *Porción de ensayo.*

Pesar en el erlenmeyer (4.16.) 50,0 g de la muestra problema preparada.

5.3. *Extracción*

Añadir a la porción de ensayo 25 g de Celite (3.8.) 250 ml de cloroformo (3.1.) y 25 ml de agua. Tapar el matraz y agitar durante 30 minutos en el agitador mecánico (4.3.). Filtrar a través de filtro de pliegues (4.14.). Recoger 50 ml de filtrado. Si fuera necesario, tomar una alícuota del filtrado y diluir a 50 ml con cloroformo de forma que la concentración de aflatoxina B_1 no sea mayor de 4 ng/ml.

5.4. *Purificación* (el procedimiento debe seguirse sin interrupciones significativas)

Deberán tomarse las siguientes precauciones:

— proteger convenientemente de la luz natural el laboratorio de análisis. Para ello se pueden utilizar:

1) hojas que absorban los rayos UV para cubrir las ventanas y una luz tamizada (evítese la luz solar directa);

2) cortinas o persianas en combinación con luz artificial (pueden utilizarse tubos fluorescentes).

— proteger de la luz todo lo posible las soluciones que contengan aflatoxina (conservar en la oscuridad y utilizar hojas de aluminio).

5.4.1. Purificación con SEP-PAK de florisil.

5.4.1.1. Preparación del conjunto columna-cartucho

Acoplar una llave (4.18.) a la rama más corta de un cartucho de Florisil (3.9.) (véase la figura 1). Lavar el cartucho y eliminar el aire tomando con una jeringa (4.19.) 10 ml de cloroformo (3.1) y haciendo pasar rápidamente 8 ml de cloroformo por la llave a través del cartucho. Unir la rama más larga del cartucho a la columna de vidrio (4.17.) e introducir en la columna a través del cartucho los 2 ml de cloroformo restantes. Cerrar la llave y sacar la jeringa.

5.4.1.2. Purificación

Introducir en el conjunto columna-cartucho el filtrado recogido con arreglo al punto 5.3. y dejar escurrir por gravedad. Lavar con 5 ml de cloroformo (3.1.) y, a continuación, con 20 ml de metanol (3.2.). Desechar los eluatos. Durante estas operaciones, evitar que el conjunto columna-cartucho se quede seco. Eluir la aflatoxina B_1 con 40 ml de la mezcla acetona/agua (3.5.1.) y recoger la totalidad del eluato en el matraz redondo (150 ml) del evaporador rotatorio (4.4.). Concentrar el eluato en el evaporador rotatorio a una temperatura de 40-50 °C hasta que cese la destilación de la acetona. *(Nota:* en ese momento quedan en el matraz 0,5 ml de líquido aproximadamente. Se ha demostrado experimentalmente que el continuar la evaporación no tiene consecuencias nocivas y que cuando quedan 0,5 ml de líquido la cantidad de acetona presente no es significativa. La presencia de residuos de acetona podría provocar pérdidas de la aflatoxina B_1 en el cartucho C_{18}.) Añadir 1 ml de metanol (4.2.), agitar el matraz para disolver la aflatoxina B_1 adherida a sus paredes, añadir 4 ml de H_2O y mezclar. Desconectar y desechar el cartucho. Lavar con agua la columna de vidrio y conservarla para efectuar la purificación C_{18}.

5.4.2. Purificación con SEP-PAK C_{18}.

5.4.2.1. Preparación del conjunto columna-cartucho

Acoplar una llave (4.18.) a la rama más corta de un cartucho C_{18} (3.10.) (véase la figura 1). Purgar el cartucho y extraer el aire haciendo pasar rápidamente con una jeringa (4.19.) 10 ml de metanol (3.2.) por la llave a través del cartucho. (Las burbujas de aire del cartucho son visibles en forma de manchas de luz sobre un fondo grisáceo.) Tomar 10 ml de agua y hacer pasar 8 ml a través del cartucho (evítese introducir aire cuando se pase del metanol al agua). Unir la rama más larga del cartucho a una columna de vidrio e introducir en la columna a través del cartucho los 2 ml de agua restantes. Cerrar la llave y sacar la jeringa.

5.4.2.2. Purificación

Transferir cuantitativamente a la columna (4.17.) el extracto recogido en el punto 5.4.1.2., lavando dos veces el matraz con 5 ml de la mezcla de agua y metanol (3.5.2.), y dejar escurrir por gravedad. Durante estas operaciones, evitar que el conjunto columna-cartucho se quede seco. (Si se forman burbujas de aire en el estrechamiento próximo al cartucho, detener el flujo y golpear la parte superior de la columna de vidrio para eliminar las burbujas. Reanudar de inmediato las operaciones.) Eluir con 25 ml de la mezcla de agua y metanol (3.5.2). Desechar los eluatos. Eluir la aflatoxina B_1 con 50 ml de la mezcla de agua y acetona (3.5.3.) y recoger la totalidad del eluato en un matraz aforado de 50 ml. Enrasar con agua hasta 50 ml y mezclar: la solución de ensayo obtenida se utiliza para la cromatografía (5.5.)

Atención: normalmente no es necesario filtrar el extracto final antes de efectuar la HPLC. Cuando sea necesario filtrar, deberán evitarse los filtros de celulosa, dado que pueden dar lugar a pérdidas de aflatoxina B_1. Pueden utilizarse filtros de teflón.

5.5. *Cromatografía de líquidos de alta resolución*

(Véase la figura 2 para el montaje del equipo). Dejar transcurrir el tiempo suficiente para que los instrumentos se calienten y estabilicen antes del uso.

Nota 1:

Los caudales que se citan para la fase móvil de HPLC y el reactivo postcolumna son meramente indicativos. Puede ser necesario realizar un ajuste en función de las características de la columna de HPLC.

Nota 2:

La respuesta del detector para la aflatoxina B_1 depende de la temperatura, por lo que debe efectuarse la compensación por la deriva (véase la Figura 3). La invección de una cantidad fija del patrón de referencia de la aflatoxina B_1 (3.13.3.) a intervalos regulares (por ejemplo, cada tres enyecciones) permite corregir, utilizando la respuesta media, los valores de los picos de la aflatoxina B_1 entre estos patrones de referencia, siempre y cuando la diferencia entre las respuestas de patrones de referencia consecutivos sea muy pequeña (< 10 %). Por lo tanto, las inyecciones deberán efectuarse sin interrupciones. Si es necesaria una interrupción, la última inyección antes de la interrupción y la primera después de ésta deberán ser inyecciones del patrón de referencia (3.13.3.). Dado que la curva de calibración es lineal y pasa por el origen, las cantidades de aflatoxina B_1 presentes en los extractos de la muestra se determinan directamente por referencia a los patrones adyacentes.

5.5.1. Ajuste de la bomba HPLC.

Ajustar la bomba HPLC (4.5.) de manera que se obtenga un caudal de 0,5 o 0,3 ml/min para una columna HPLC de 5 µm o 3 µm (4.6.), respectivamente utilizando la fase móvil (3.5.).

5.5.2. Ajuste de la bomba para la reacción postcolumna.

Ajustar la bomba (4.7.) de manera que se obtenga un caudal de 0,2-0,4 ml/min de solución acuosa saturada de yodo (3.7.). Información a título indicativo : se recomiendan caudales de 0,4 o 0,2 ml/min, aproximadamente, en asociación con caudales de 0,5 y 0,3 ml/min de la fase móvil, respectivamente.

5.5.3. Detector de fluorescencia.

Establecer el detector (4.11.) a una longitud de onda de excitación de 365 nm y de emisión de 435 nm (aparato de filtro : > 400 nm). Ajustar el atenuador del detector de manera que el 80 % aproximadamente del recorrido máximo de la plumilla registradora corresponda a 1 ng de aflatoxina B_1.

5.5.4. Inyector.

Para todas las soluciones inyectar cantidades de 250 µl siguiendo las instrucciones del fabricante del aparato.

5.5.5. Comprobación de la separación cromatográfica.

Inyectar la solución cromatográfica (3.14.1.). Los valles deberán ser inferiores al 5 % de la suma de las alturas de los picos adyacentes.

5.5.6. Comprobación de la estabilidad del sistema.

Antes de llevar a cabo cada una de las series de análisis, efectuar inyecciones repetidas del patrón de referencia (3.13.3.) hasta que se estabilicen las áreas de los picos *(Nota :* los picos producidos por la aflatoxina B_1 entre inyecciones consecutivas deberán presentar diferencias inferiores al 6 %). Proceder inmediatamente a efectuar la comprobación de la linearidad (5.5.7).

5.5.7. Comprobación de la linearidad.

Inyectar las soluciones de aflatoxina B_1 para calibración (3.13.1. y 3.13.4.). Utilizar el patrón de referencia (3.13.3.) a intervalos de 3 inyecciones, a fin de corregir la deriva en las respuestas *(Nota :* las respuestas de los picos del patrón de referencia deberán presentar diferencias inferiores al 10 % en 90 minutos). Corregir la deriva aplicando la fórmula que se indica en el punto 7. La gráfica de calibración deberá ser lineal y pasar por el origen, dentro de los límites de 2 veces el valor del error típico de la estimación de Y. Los valores hallados deberán diferir en menos del 3 % de los valores nominales. Si se cumplen estas condiciones, continuar las operaciones inmediatamente. En caso contrario, identificar y corregir las causas del problema antes de continuar.

5.5.8. Inyección de extractos de muestra.

Inyectar los extractos de muestra purificados (5.4.2.2.). Repetir la inyección del patrón de referencia (3.13.3.) después de dos inyecciones de extracto de muestra de acuerdo a la siguiente secuencia : patrón de referencia, extracto, extracto, patrón de referencia, extracto, extracto, patrón de referencia, etc.

6. Prueba de confirmación

6.1. *Tratamiento ulterior del extracto (5.4.2.2.)*

Añadir 5 ml de la solución de cloruro de sodio (3.15.1.) al extracto final obtenido como se describe en el punto 5.4.2.2.. Extraer 3 veces con 2 ml de cloroformo durante 1 minuto, utilizando el embudo de decantación (4.24.1.). Verter los extractos combinados de cloroformo en un tubo de ensayo de 10 ml a través de 1 g aproximadamente de sulfato de sodio (3.15.2.). [Se puede utilizar un embudo pequeño (4 cm de diámetro) colocando en el estrechamiento un algodón recubierto de 1 g de sulfato de sodio aproximadamente.]

Lavar la capa de sulfato de sodio con unos ml de cloroformo y recoger los lavados en el mismo tubo de ensayo. Evaporar en dicho tubo el extracto de cloroformo hasta sequedad utilizando la fuente de calor (4.24.2.) y disolverlo de nuevo en 1 ml de cloroformo.

6.2. *Preparación de los derivados y cromatografía en capa fina*

Véase la Directiva 76/372/CEE del Consejo, Anexo, método A, punto 5.6.2.

7. **Cálculo de los resultados**

Calcular el contenido de aflatoxina B_1 (µg/kg) de la muestra mediante la fórmula siguiente :

$$\text{contenido de aflatoxina } B_1 \text{ en } \mu g/kg = \frac{m \times V_{ext}}{V_m \times M \times \frac{V_f}{V_c}}$$

siendo :

m = cantidad, en ng, de aflatoxina B_1 representada por el pico B_1 de la muestra, calculada del siguiente modo :

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

P(muestra) = área del pico de la aflatoxina B_1 de la muestra

$B(st_1)$ = área del pico de la aflatoxina B_1 del patrón de referencia anterior (3.13.3.)

$P(st_2)$ = área del pico de la aflatoxina B_1 del patrón de referencia siguiente (3.13.3.)

r(st) = cantidad inyectada de patrón de referencia (3.13.3.) expresada en ng

V_m = volumen del extracto de muestra inyectado, en ml

V_{ext} = volumen final del extracto de muestra, en ml (5.3.)

M = masa de la muestra en g

V_f = volumen del filtrado transferido al cartucho de Florisil (5.4.1.2.), en ml

V_c = volumen de cloroformo utilizado para la extracción de la muestra, en ml

Si se aplica el procedimiento expuesto, la fórmula se reduce a :

$$\text{contenido de aflatoxina } B_1 \text{ en } \mu g/kg = 20 \times m.$$

7.1. El cálculo de los resultados también puede efectuarse midiendo la altura de los picos.

8. **Repetibilidad :**

véase el punto 10.1. (observaciones).

9. **Reproducibilidad :**

véase el punto 10.1.

10. **Observaciones**

10.1. *Precisión*

En el Cuadro 1 figuran los resultados de la repetibilidad y reproducibilidad obtenidos en un ensayo colaborativo (1) sobre piensos compuestos realizado a escala internacional. El término repetibilidad (r) utilizado aquí se define como la mayor diferencia no significativa, con una probabilidad del 95 %, entre dos lecturas de una misma muestra efectuadas en el mismo laboratorio y en condiciones similares. El término reproducibilidad (R) se define de manera análoga y se refiere a la comparación entre los resultados obtenidos en dos laboratorios diferentes. Con arreglo a la norma ISO 3534-1977, 2.35 (2) y a la Decisión 89/610/CEE de la Comisión (3), tanto r como R también figuran en el Cuadro 1 en forma de coeficientes de variación.

Cuadro 1

Repetibilidad (r) y reproducibilidad (R) expresadas en diferencias y en coeficientes de variación

(15 laboratorios)

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

(*) CV = Coeficiente de variación.

(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) DO nº L 351 de 2. 12. 1989, p. 39.

10.2. *Estabilidad del cloroformo (3.1)*

Las características de adsorción del cartucho de florisil pueden verse modificadas si se utiliza un estabilizador diferente del etanol. Esto debe ser verificado con arreglo al punto 10.3. cuando no se disponga del cloroformo descrito.

10.3. *Exactitud*

La aplicación correcta del método deberá comprobarse efectuando mediciones repetidas con materiales de referencia certificados. Si no se dispone de estos materiales, la validez del método deberá comprobarse mediante experimentos de recuperación en muestras en blanco. La diferencia entre la media y el valor real no deberá rebasar los límites de – 20 % a 10 % del valor real.

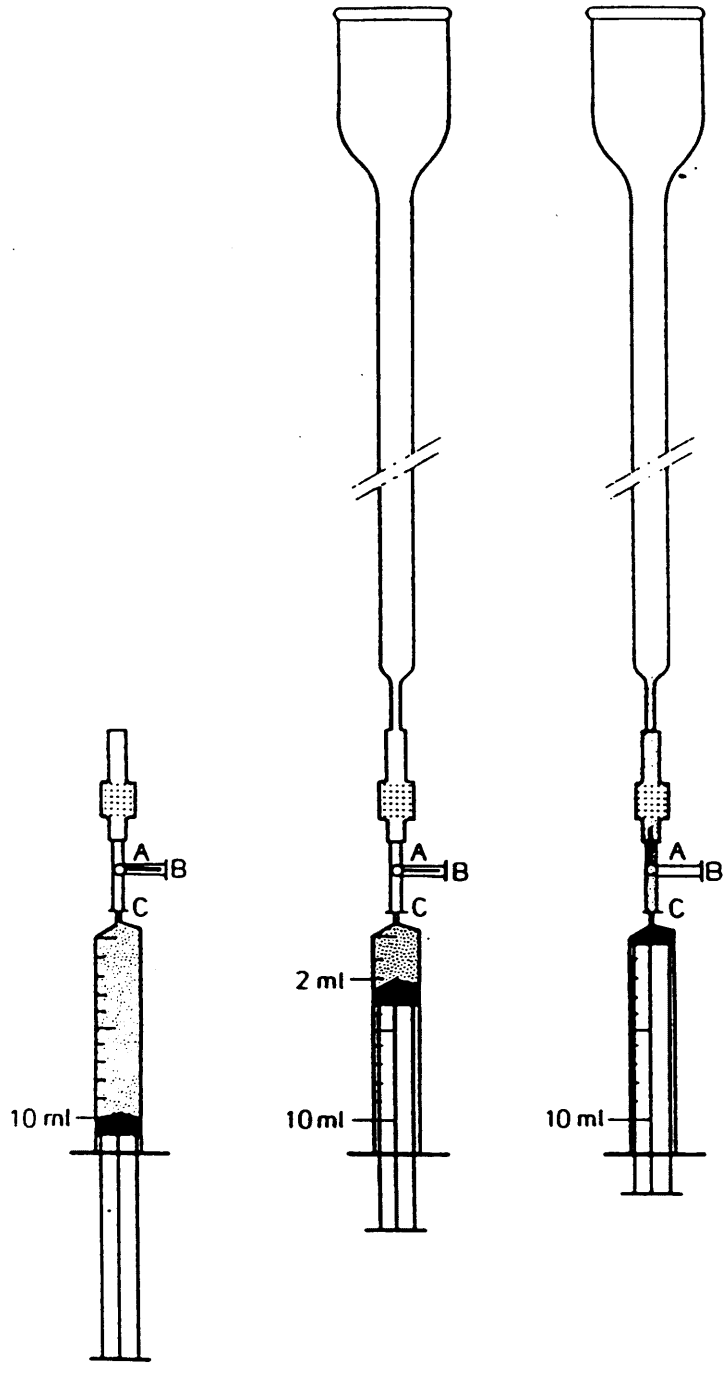
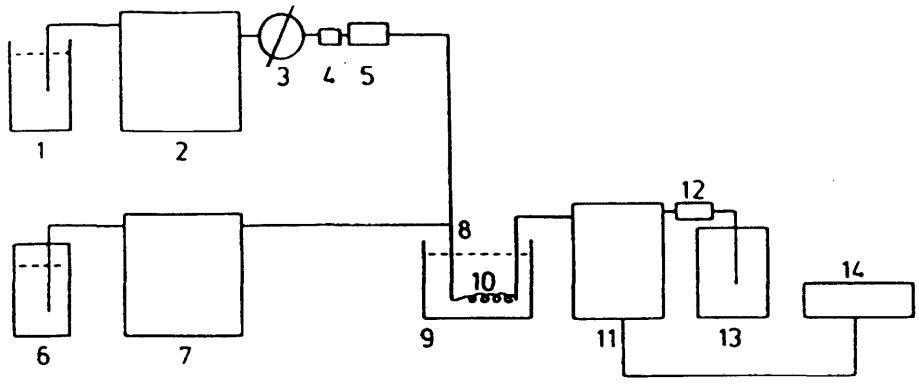


Figura 1 : Conjunto columna-cartucho



1. Fase móvil
2. Bomba
3. Válvula de inyección
4. Precolumna
5. Columna analítica para HPLC
6. Solución saturada de yodo
7. Bomba de reactivo
8. Conexción en T
9. Baño termostatizado
10. Serpentín de reacción
11. Detector de fluorescencia
12. Restrictor
13. Drenaje
14. Registrador/Integrador

Figura 2 : Diagrama de los flujos del sistema de cromatografía de líquidos con reacción con yodo en postcolumna

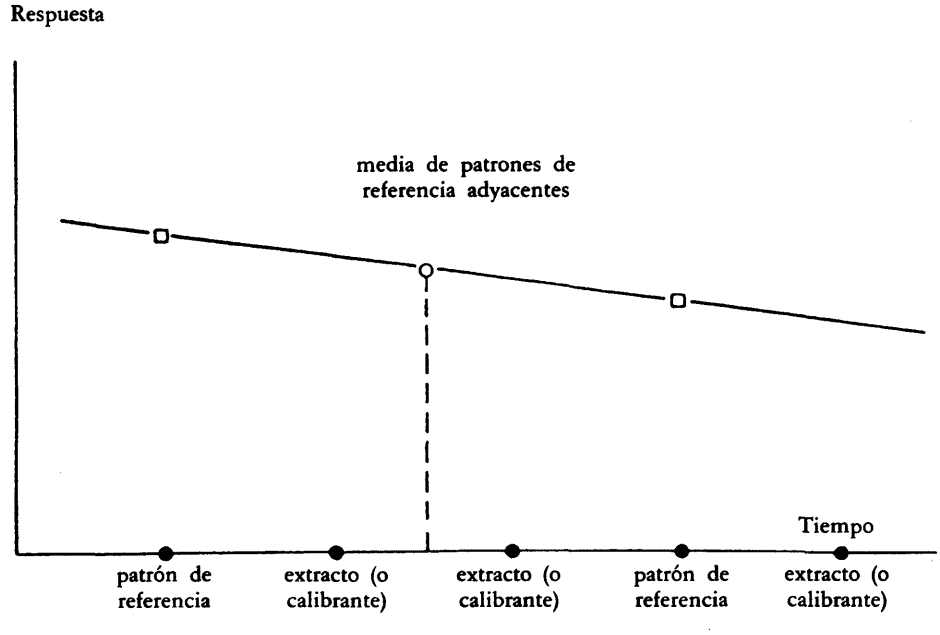


Figura 3 : Compensación de la deriva de la respuesta de la aflatoxina B_1 mediante inyección del patrón de referencia a intervalos regulares (3.13.3) »