376L0372

Ἀριθ. N 102/8 Ἐπίσημη Ἐφημερίδα τῶν Εὐρωπαϊκῶν Κοινοτήτων 15.4.76

ΕΒΔΟΜΗ ΟΔΗΓΙΑ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

τῆς 1ης Μαρτίου 1976

περί καθορισμοῦ τῶν κοινοτικῶν μεθόδων ἀναλύσεως γιά τόν ἐπίσημο ἔλεγχο τῶν ζωοτροφῶν

(76/372/ΕΟΚ)

Η ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΤΩΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ,

Ἔχοντας ὑπόψη:

τή συνθήκη περί ἱδρύσεως τῆς Εὐρωπαϊκῆς Οἰκονομικῆς Κοινότητος,

τήν ὁδηγία τοῦ Συμβουλίου τῆς 20ῆς Ἰουλίου 1970 περί εἰσαγωγῆς κοινοτικῶν τρόπων λήψεως δειγμάτων καί μεθόδων ἀναλύσεως γιά τόν ἐπίσημο ἔλεγχο τῶν ζωοτροφῶν(1), ὅπως τροποποιήθηκε τελευταῖα μέ τήν πράξη προσχωρήσεως(2), καί ἰδίως μέ τό ἄρθρο 2,

Ἐκτιμώντας:

ὅτι ἡ παραπάνω ὁδηγία προβλέπει ὅτι οἱ ἐπίσημοι ἔλεγχοι τῶν ζωοτροφῶν γιά τή διαπίστωση τοῦ γεγονότος ἄν τηροῦνται οἱ ὅροι πού καθορίζονται δυνάμει τῶν νομοθετικῶν, κανονιστικῶν καί διοικητικῶν διατάξεων, οἱ ὁποῖες ἀφοροῦν τήν ποιότητα καί τή σύνθεση τῶν ζωοτροφῶν, πραγματοποιοῦνται σύμφωνα μέ τούς κοινοτικούς τρόπους λήψεως δειγμάτων καί τίς κοινοτικές μεθόδους ἀναλύσεως·

ὅτι οἱ ὁδηγίες 71/250/ΕΟΚ, 71/393/ΕΟΚ, 72/199/ΕΟΚ, 73/46/ΕΟΚ, 74/203/ΕΟΚ καί 75/84/ΕΟΚ τῆς Ἐπιτροπῆς τῆς 15ης Ἰουνίου 1971(3), 18ης Νοεμβρίου 1971(4), 27ης Ἀπριλίου 1972(5), 5ης Δεκεμβρίου 1972(6), 25ης Μαρτίου 1974(7) καί 20ῆς Δεκεμβρίου 1974(8) ἔχουν ἤδη καθορίσει ἕναν ὁρισμένο ἀριθμό κοινοτικῶν μεθόδων ἀναλύσεως· ὅτι λαμβανομένου ὑπόψη τοῦ θαθμοῦ προόδου τῶν πραγματοποιηθεισῶν ἀπό τότε ἐργασιῶν πρέπει νά θεσπισθεῖ μία ἑβδόμη σειρά μεθόδων·

ὅτι τά προβλεπόμενα στήν παρούσα ὁδηγία μέτρα εἶναι σύμφωνα μέ τή γνώμη τῆς Μόνιμης Ἐπιτροπῆς Ζωοτροφῶν,

ΕΞΕΔΩΣΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΟΔΗΓΙΑ:

Ἄρθρο 1

Τά Κράτη Μέλη ὁρίζουν ὅτι οἱ ἀναλύσεις γιά τούς ἐπισήμους ἐλέγχους τῶν ζωοτροφῶν, σέ ὅ,τι ἀφορᾶ τήν περιεκτικότητά τους σέ ἀφλατοξίνη B_1, πραγματοποιοῦνται σύμφωνα μέ τίς μεθόδους πού περιγράφονται στό παράρτημα τῆς παρούσας ὁδηγίας.

Οἱ γενικές διατάξεις πού ἐμφαίνονται στό τμῆμα 1 (εἰσαγωγή) τοῦ παραρτήματος τῆς πρώτης ὁδηγίας 71/250/ΕΟΚ τῆς Ἐπιτροπῆς τῆς 15ης Ἰουνίου 1971, μέ ἐξαίρεση τό τμῆμα τό ὁποῖο ἀφορᾶ τήν παρασκευή τοῦ δείγματος γιά ἀνάλυση, ἐφαρμόζονται στίς μεθόδους πού περιγράφονται στό παράρτημα τῆς παρούσας ὁδηγίας.

Ἄρθρο 2

Τά Κράτη Μέλη θέτουν σέ ἰσχύ τό ἀργότερο τήν 1η Ὀκτωβρίου 1976 τίς νομοθετικές, κανονιστικές καί διοικητικές διατάξεις πού εἶναι ἀναγκαῖες γιά νά συμμορφωθοῦν μέ τίς διατάξεις τῆς παρούσας ὁδηγίας. Ἐνημερώνουν ἀμέσως περί αὐτοῦ τήν Ἐπιτροπή.

Ἄρθρο 3

Ἡ παρούσα ὁδηγία ἀπευθύνεται στά Κράτη Μέλη.

Ἔγινε στίς Βρυξέλλες, τήν 1η Μαρτίου 1976.

Γιά τήν Ἐπιτροπή

P. J. LARDINOIS

Μέλος τῆς Ἐπιτροπῆς

(1) ΕΕ ἀριθ. N 170 τῆς 3.8.1970, σ. 2.
(2) ΕΕ ἀριθ. N 73 τῆς 27.3.1972, σ. 14.
(3) ΕΕ ἀριθ. N 155 τῆς 12.7.1971, σ. 13.
(4) ΕΕ ἀριθ. N 279 τῆς 20.12.1971, σ. 7.
(5) ΕΕ ἀριθ. N 123 τῆς 29.5.1972, σ. 6.
(6) ΕΕ ἀριθ. N 83 τῆς 30.3.1973, σ. 21.
(7) ΕΕ ἀριθ. N 108 τῆς 22.4.1974, σ. 7.
(8) ΕΕ ἀριθ. N 32 τῆς 5.2.1975, σ. 26.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ B_1

Α. ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΕ ΜΟΝΟΔΙΑΣΤΑΤΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΟΙΒΑΔΟΣ

1. **'Αντικείμενο καί τομέας ἐφαρμογῆς**

'Η μέθοδος ἐπιτρέπει τόν προσδιορισμό τῆς περιεκτικότητος σέ ἀφλατοξίνη B_1 τῶν ἀκολούθων τροφῶν: πλακούντων ἀραχίδος, κοκκοκαρύου (Copra), λίνου, σόγιας, σησάμου, φοινικοκαρύου (Babassu) καί σπερμάτων ἀραβοσίτου, δημητριακῶν καί προϊόντων ἀλεύρου πίσσου, πούλπας καί ἀλεύρου γεωμήλων. Τό κατώτερο ὅριο τῆς δόσεως εἶναι 0,01 mg/kg (10 p.p.b).

'Εφ' ὅσον ὑπάρχουν παρεμβαλλόμενες οὐσίες οἱ ὁποῖες παρεμποδίζουν τόν προσδιορισμό τῆς περιεκτικότητος, πρέπει νά ἀρχίσει ἐκ νέου ἡ ἀνάλυση σύμφωνα μέ τή μέθοδο Β (χρωματογραφία λεπτῆς στοιβάδος, δύο διαστάσεων).

2. **'Αρχή**

Τό δεῖγμα ἐκχυλίζεται μέ χλωροφόρμιο. Τό ἐκχύλισμα διηθεῖται, λαμβάνεται κατάλληλη ποσότητα ἀπό αὐτό καί καθαρίζεται μέ χρωματογραφία σέ στήλη silica gel. Τό προϊόν τῆς ἐκλούσεως ἐξατμίζεται καί τό ὑπόλειμμα λαμβάνεται ἐκ νέου μέ ἕναν καθορισμένο ὄγκο χλωροφορμίου ἤ μίγματος βενζολίου καί ἀκετονιτριλίου. Κατάλληλη ποσότητα τοῦ διαλύματος αὐτοῦ ὑποβάλλεται σέ χρωματογραφία λεπτῆς στοιβάδος. 'Η ποσότητα τῆς ἀφλατοξίνης B_1 προσδιορίζεται ἀπό τήν ὑπεριώδη ἀκτινοβολία τοῦ χρωματογραφήματος εἴτε ὀπτικά εἴτε μέ φθοριοπυκνομετρία διά συγκρίσεως μέ γνωστές ποσότητες προτύπου ἀφλατοξίνης B_1. 'Η ταυτότητα τῆς ἀφλατοξίνης B_1 πού ἐξάγεται ἀπό τήν τροφή πρέπει νά ἐπιβεβαιοῦται διά τῶν ἐνδεδειγμένων μεθόδων.

3. **'Αντιδραστήρια**

NB: "Ολα τά ἀντιδραστήρια εἶναι ποιότητος «γιά ἀνάλυση» ἐφ' ὅσον δέν δίδεται καμία ἄλλη ὁδηγία.

3.1. 'Ακετόνη.

3.2. Χλωροφόρμιο, σταθεροποιηθέν μέ 0,5 μέχρι 1,0% αἰθανόλη 96% (ὄγκος/ὄγκο).

3.3. η-'Εξάνιο.

3.4. Μεθανόλη.

3.5. "Ανυδρος διαιθυλικός αἰθέρας, ἀπηλλαγμένος ὑπεροξειδίων.

3.6. Μίγμα βενζολίου καί ἀκετονιτριλίου: 98/2 (ὄγκος/ὄγκο).

3.7. Μίγμα χλωροφορμίου (3.2) καί μεθανόλης (3.4): 97/3 (ὄγκος/ὄγκο).

3.8. Silica gel γιά χρωματογραφία σέ στήλη κοκκομετρικῆς συνθέσεως: 0,05 μέχρι 0,20 mm.

3.9. 'Υδρόφιλος βάμβαξ πού ἔχει ἀπολιπανθεῖ προηγουμένως μέ χλωροφόρμιο ἤ ὑαλοβάμβαξ.

3.10. Θειικό νάτριο, ἄνυδρο, σέ κόκκους

3.11. 'Αδρανές ἀέριο, γιά παράδειγμα ἄζωτο.

3.12. 'Υδροχλωρικό ὀξύ 1 N.

3.13. Θειικό ὀξύ 50% (ὄγκος/ὄγκο).

3.14. Γῆ διατόμων (hyflosupercel), ἐκπλυθείσα μέ ὀξύ.

3.15. Silica gel G-HR ἤ ἰσοδύναμο, γιά χρωματογραφία λεπτῆς στοιβάδος.

3.16. Πρότυπο διάλυμα (διάλυμα ἀναφορᾶς) 0,1 μg περίπου ἀφλατοξίνης B_1 ἀνά χιλιοστόλιτρο σέ χλωροφόρμιο (3.2) ἤ σέ μίγμα βενζολίου/ἀκετονιτριλίου (3.6), παρασκευαζόμενο καί ἐλεγχόμενο ὅπως ὁρίζεται στό σημεῖο 7.

3.17. Πρότυπο ποιοτικό διάλυμα 0,1 μg περίπου ἀφλατοξινῶν B_1 καί B_2 ἀνά χιλιοστόλιτρο σέ χλωροφόρμιο (3.2) ἤ σέ μίγμα βενζολίου/ἀκετονιτριλίου (3.6). Οἱ πυκνότητες αὐτές δίδονται ἐνδεικτικά. Πρέπει νά ρυθμισθοῦν ὥστε νά ληφθεῖ ἡ αὐτή ἔνταση φθορισμοῦ γιά τίς δύο ἀφλατοξίνες.

3.18. Διαλύτες ἀναπτύξεως:

3.18.1. Χλωροφόρμιο (3.2)/ἀκετόνη (3.1): 9/1 (ὄγκος/ὄγκο), δοχεῖο μετά μή κεκορεσμένης ἀτμοσφαίρας·

3.18.2. Διαιθυλικός αἰθέρας (3.5)/μεθανόλη (3.4)/ὕδωρ: 96/3/1 (ὄγκος/ὄγκο/ὄγκο), δοχεῖο μετά μή κεκορεσμένης ἀτμοσφαίρας·

3.18.3. Διαιθυλικός αἰθέρας (3.5)/μεθανόλη (3.4) /ὕδωρ: 94/4,5/1,5 (ὄγκος/ὄγκο/ὄγκο), δοχεῖο μετά κεκορεσμένης ἀτμοσφαίρας·

3.18.4. Χλωροφόρμιο (3.2)/μεθανόλη (3.4): 94/6 (ὄγκος/ὄγκο), δοχεῖο μέ κεκορεσμένη ἀτμόσφαιρα·

3.18.5. Χλωροφόρμιο (3.2)/μεθανόλη (3.4): 97/3 (ὄγκος/ὄγκο), δοχεῖο μέ κεκορεσμένη ἀτμόσφαιρα.

4. **Συσκευές**

4.1. Συνθλίπτης – ἀναμίκτης.

4.2. Συσκευή ἀναδεύσεως ἤ μαγνητικός ἀναδευτήρας.

4.3. Πτυχωτός ἠθμός Schleicher καί Schüll ἀριθ. 588 ἤ παρόμοιος, διαμέτρου: 24 cm.

4.4. 'Υάλινοι σωλῆνες χρωματογραφίας (ἐσωτερικῆς διαμέτρου: 22 mm μήκους: 300 mm), μετά κρουνοῦ ἀπό πλαστική ὕλη τεφλόν καί δεξαμενή 250 ml.

4.5. Περιστροφική συσκευή ἐξατμίσεως σέ κενό μέ σφαιρική φιάλη ζέσεως σφαιρικοῦ πυθμένος 500 ml.

4.6. Κωνικές φιάλες τῶν 500 ml μέ ἐσμυρισμένο πῶμα.

4.7. Συσκευές γιά χρωματογραφία λεπτῆς στοιβάδος.

4.8. 'Υάλινες πλάκες γιά χρωματογραφία λεπτῆς στοιβάδος 200 × 200 mm, παρασκευαζόμενες ὡς ἀκολούθως (οἱ ὑποδεικνυόμενες ποσότητες ἀρκοῦν γιά τήν κάλυψη 5 πλακῶν): εἰσάγονται 30 g silica gel G-HR (3.15) σέ μία κωνική φιάλη, προστίθενται 60 ml ὕδατος, ἡ φιάλη πωματίζεται καί ἀναταράσσεται ἐπί ἕνα λεπτό. Τό ἐναιώρημα κατανέμεται στίς πλάκες ἔτσι ὥστε νά δημιουργηθεῖ μία ὁμοιόμορφη στοιβάδα πάχους 0,25 mm. 'Αφήνεται νά ἀποξηρανθεῖ στόν ἀέρα καί διατηρεῖται κατόπιν σέ ξηραντήρα ἐφοδιασμένο μέ silica gel. Κατά τή στιγμή τῆς χρήσεως οἱ πλάκες ἀναζωογονοῦνται διά τοποθετήσεως ἐπί 1 ὥρα σέ κλίβανο καί σέ θερμοκρασία 110 °C.

Οἱ πλάκες πού εἶναι ἕτοιμες γιά χρήση εἶναι κατάλληλες ἐφ' ὅσον δίνουν ἀποτελέσματα παρόμοια μέ ἐκεῖνα τῶν πλακῶν πού ἔχουν παρασκευασθεῖ ὅπως ἀναφέρθηκε παραπάνω.

4.9. Λαμπτήρας ὑπεριώδης μακρῶν κυμάτων (360 nm). 'Η ἔνταση τῆς ἀκτινοβολίας πρέπει νά ἐπιτρέπει νά διακρίνεται ἀκόμη καθαρά μία κηλίδα 1,0 ng ἀφλατοξίνης B_1 σέ πλάκα χρωματογραφίας λεπτῆς στοιβάδος ἀπό μία ἀπόσταση 10 cm ἀπό τόν λαμπτήρα.

4.10. Σωλῆνες τῶν 10 ml, βαθμολογημένοι, μέ πῶμα ἀπό πολυαιθυλένιο.

4.11. Φασματοφωτόμετρο UV.

4.12. Φθοριοπυκνόμετρο (ἐνδεχομένως).

5. **Τρόπος ἐργασίας**

5.1. *Παρασκευή τοῦ δείγματος* (βλέπε παρατηρήσεις, τμῆμα Γ, σημεῖο 1).

Τό δεῖγμα κονιοποιεῖται κατά τρόπο ὥστε νά διέρχεται ὁλόκληρο ἀπό κόσκινο, μέ ἄνοιγμα ὀπῶν τοῦ δικτυωτοῦ 1 mm (σύμφωνα μέ τή σύσταση ISO R 565).

5.2. *'Εκχύλιση*

50,0 g δείγματος λεπτοαλεσθέντος καί ὁμογενοποιηθέντος εἰσάγονται σέ μία κωνική φιάλη τῶν 500 ml (4.6). Προστίθενται 25 g γῆς διατόμων (3.14), 25 ml ὕδατος καί 250 ml χλωροφορμίου (3.2). 'Η φιάλη πωματίζεται, ἀναδεύεται ἤ ἀναταράσσεται ἐπί 30 λεπτά μέ τή βοήθεια τῆς συσκευῆς (4.2) καί διηθεῖται σέ πτυχωτό ἠθμό (4.3). Τά πρῶτα 10 ml τοῦ διηθήματος ἀπορρίπτονται καί συλλέγονται κατόπιν 50 ml.

5.3. *Καθαρισμός σέ στήλη*

Τό κατώτερο ἄκρο ἑνός σωλήνα χρωματογραφίας (4.4) ἐφοδιάζεται μέ πῶμα ἀπό βάμβακα ἤ ὑαλοβάμβακα (3.9), πληροῦνται τά δύο τρίτα τοῦ σωλήνα μέ χλωροφόρμιο (3.2) καί προστίθενται 5 g θειικοῦ νατρίου (3.10).

'Εξακριβώνεται ὅτι ἡ ἐπάνω ἐπιφάνεια τῆς στοιβάδος τοῦ θειικοῦ νατρίου εἶναι ἐπίπεδη καί κατόπιν προστίθενται σέ μικρές δόσεις 10 g silica gel (3.8). 'Ανακινεῖται μέ προσοχή μετά ἀπό κάθε προσθήκη γιά νά ἀποβληθοῦν οἱ φυσαλίδες τοῦ ἀέρα. 'Αφήνεται νά κατακαθίσει ἐπί 15 λεπτά καί προστίθενται στή συνέχεια μέ προσοχή 15 g θειικοῦ νατρίου (3.10). 'Αφήνεται νά κατέλθει τό ὑγρό στήν ἄμεσο προσέγγιση τῆς ἐπάνω ἐπιφανείας τῆς στοιβάδος τοῦ θειικοῦ νατρίου.

'Αναμιγνύονται τά ληφθέντα, στό 5.2, 50 ml ἐκχυλίσματος μέ 100 ml n-ἑξανίου (3.3) καί μεταγγίζεται ποσοτικῶς τό μίγμα στή στήλη. 'Αφήνεται νά κατέλθει τό ὑγρό μέχρι τήν ἐπάνω ἐπιφάνεια τῆς στοιβάδος τοῦ θειικοῦ νατρίου. 'Απορρίπτεται τό ὑγρό πού ἔχει χυθεῖ. Προστίθενται στή συνέχεια 100 ml διαιθυλικοῦ αἰθέρα (3.5) καί ἀφήνεται πάλι νά κατέλθει τό ὑγρό μέχρι τήν ἐπάνω ἐπιφάνεια τῆς στοιβάδος τοῦ θειικοῦ νατρίου. Κατά τή διάρκεια τῶν ἐργασιῶν αὐτῶν λαμβάνεται μέριμνα ὥστε ἡ ταχύτητα τῆς ροῆς νά εἶναι ἀπό 8 μέχρι 12 ml ἀνά λεπτό καί ἡ στήλη νά μήν ἀποξηρανθεῖ. 'Απορρίπτονται τά ὑγρά πού ἔχουν χυθεῖ. 'Εκλούεται στή συνέχεια μέ 150 ml μίγματος χλωροφορμίου/μεθανόλης (3.7) καί λαμβάνεται τό σύνολο τοῦ προϊόντος ἐκλούσεως.

'Εξατμίζεται αὐτό μέχρι ξηροῦ, περίπου σέ ρεῦμα ἀδρανοῦς ἀερίου (3.11) καί σέ θερμοκρασία πού νά μήν ὑπερβαίνει τούς 50° Κελσίου, μέ τή βοήθεια μιᾶς περιστροφικῆς συσκευῆς ἐξατμίσεως σέ κενό (4.5).Τό ὑπόλειμμα φέρεται ποσοτικῶς μέ τή βοήθεια χλωροφορμίου (3.2) ἤ μίγματος βενζολίου/ἀκετονιτριλίου (3.6) σέ ἕνα σωλήνα τῶν 10 ml (4.10). Συμπυκνώνεται τό διάλυμα σέ ρεῦμα ἀδρανοῦς ἀερίου (3.11) καί κατόπιν φέρεται ὁ ὄγκος στά 2 ml μέ τή βοήθεια χλωροφορμίου (3.2) ἤ μίγματος βενζολίου/ἀκετονιτριλίου (3.6).

5.4. *Χρωματογραφία λεπτῆς στοιβάδος*

'Εναποτίθενται ἀκριβῶς σέ μία πλάκα χρωματογραφίας λεπτῆς στοιβάδος (4.8), σέ ἀπόσταση 2 cm ἀπό τό κάτω ἄκρο καί σέ διαστήματα 2 cm οἱ παρακάτω ἀναφερόμενοι ὄγκοι τοῦ προτύπου διαλύματος καί τοῦ ἐκχυλίσματος:

— 10, 15, 20, 30 καί 40 μl προτύπου διαλύματος ἀφλατοξίνης B_1 (3.16)·

— 10 μl ἐκ τοῦ ἐκχυλίσματος πού λαμβάνεται στό 5.3 καί, τοποθετούμενα ἐπάνω στά προηγούμενα στό ἴδιο σημεῖο, 20 μl προτύπου διαλύματος (3.16)·

— 10 καί 20 μl ἐκ τοῦ ἐκχυλίσματος πού λαμβάνεται στό 5.3.

'Αναπτύσσεται τό χρωματογράφημα μακριά ἀπό τό φῶς μέ τή βοήθεια ἑνός διαλύτου ἀναπτύξεως (3.18). 'Η ἐπιλογή τοῦ διαλύτου πρέπει νά γίνεται προηγουμένως μέ τήν ἐναπόθεση στήν πλάκα 25 μl ἐκ τοῦ ποιοτικοῦ προτύπου διαλύματος (3.17) καί ἐξασφαλίζεται ὅτι κατά τήν ἀνάπτυξη οἱ ἀφλατοξίνες B_1 καί B_2 εἶναι ἐντελῶς διαχωρισμένες.

'Αφήνονται οἱ διαλύτες νά ἐξατμισθοῦν μακριά ἀπό τό φῶς καί ἀκτινοβολοῦνται κατόπιν μέ ὑπεριῶδες φῶς, ἀφοῦ τοποθετηθεῖ ἡ πλάκα σέ ἀπόσταση 10 cm ἀπό τό λαμπτήρα (4.9). Οἱ κηλίδες τῆς ἀφλατοξίνης B_1 δίνουν γαλάζιο φθορισμό.

5.5. *Ποσοτικοί προσδιορισμοί*

Οἱ ποσοτικοί προσδιορισμοί διενεργοῦνται εἴτε ὀπτικά εἴτε μέ φθοριοπυκνόμετρο ὅπως ἀναφέρεται παρακάτω.

5.5.1. 'Οπτικές μετρήσεις

Προσδιορίζεται ἡ ποσότητα τῆς ἀφλατοξίνης B_1 τοῦ ἐκχυλίσματος διά συγκρίσεως τῆς ἐντάσεως τοῦ φθορισμοῦ τῆς κηλίδος μέ ἐκείνη τῶν κηλίδων τοῦ προτύπου διαλύματος. Παρεμβάλλεται ἄν εἶναι ἀναγκαῖο. 'Ο φθορισμός πού δημιουργεῖται μέ τήν ἐναπόθεση τοῦ ἐκχυλίσματος ἐπάνω στό πρότυπο διάλυμα πρέπει νά εἶναι περισσότερο ἰσχυρός ἀπό ἐκεῖνον τῶν 10 μl ἐκχυλίσματος καί δέν πρέπει νά γίνεται αἰσθητή παρά μόνο μία κηλίδα. "Αν ἡ ἔνταση τοῦ φθορισμοῦ πού δημιουργεῖται ἀπό τά 10 μl ἐκχυλίσματος εἶναι ἰσχυρότερη ἀπό ἐκείνη τῶν 40 μl τοῦ προτύπου διαλύματος, τό ἐκχύλισμα διαλύεται 10 ἤ 100 φορές μέ χλωροφόρμιο (3.2) ἤ μέ μίγμα βενζολίου/ἀκετονιτριλίου (3.6) πρίν ὑποβληθεῖ σέ νέα χρωματογραφία λεπτῆς στοιβάδος.

5.5.2. Μετρήσεις μέ φθοριοπυκνόμετρο

Μετρᾶται ἡ ἔνταση τοῦ φθορισμοῦ τῶν κηλίδων τῆς ἀφλατοξίνης B_1 στό φθοριοπυκνόμετρο (4.12) χρησιμοποιουμένου ἑνός μήκους κύματος διεγέρσεως τῆς τάξεως τῶν 365 nm καί ἑνός μήκους κύματος ἐκπομπῆς τῆς τάξεως τῶν 443 nm. Προσδιορίζονται οἱ ποσότητες τῆς ἀφλατοξίνης B_1 τῶν ἀποθεμάτων τοῦ ἐκχυλίσματος διά συγκρίσεως τῶν ἐντάσεων τοῦ φθορισμοῦ τῶν κηλίδων τοῦ ἐκχυλίσματος καί τοῦ προτύπου διαλύματος.

5.6. *'Επιβεβαίωση τῆς ταυτότητος τῆς ἀφλατοξίνης B_1*

'Επιβεβαιοῦται ἡ ταυτότητα τῆς ἀφλατοξίνης B_1 τοῦ ἐκχυλίσματος μέ τίς παρακάτω μεθόδους.

5.6.1. 'Επεξεργασία μέ θειικό ὀξύ

Ψεκάζεται θειικό ὀξύ (3.13) στό χρωματογράφημα πού ἔχει ληφθεῖ στό 5.4. 'Ο φθορισμός τῶν κηλίδων τῆς ἀφλατοξίνης B_1 πρέπει νά μεταβάλλει χρῶμα ἀπό τό γαλάζιο μέχρι τό κίτρινο μέ ὑπεριώδη ἀκτινοβολία.

5.6.2. Χρωματογραφία δύο διαστάσεων περιλαμβάνουσα τό σχηματισμό ἀφλατοξίνης B_1-ἡμιακετάλης (hemiacetal) (ἀφλατοξίνη B_{2a})

NB: Οἱ ἐργασίες οἱ ὁποῖες περιγράφονται παρακάτω πρέπει νά πραγματοποιοῦνται σύμφωνα μέ τό σχῆμα πού παρουσιάζεται στήν εἰκόνα 3.

5.6.2.1. 'Εναπόθεση τῶν διαλυμάτων

Χαράσσονται σέ μιά πλάκα (4.8) δύο εὐθεῖες παράλληλοι σέ δύο γειτονικές πλευρές (σέ ἀπόσταση 6 cm ἀπό τίς πλευρές αὐτές) οἱ ὁποῖες προορίζονται νά ὁριοθετήσουν τή μετατόπιση τῶν μετώπων τῶν διαλυτῶν. 'Εναποτίθενται σέ μιά πλάκα μέ τή βοήθεια τριχοειδῶν σιφωνίων ἤ μικροσυρίγγων τά διαλύματα πού ἀναφέρονται παρακάτω:

— *στό σημεῖο A*: ὄγκος καθαρισμένου ἐκχυλίσματος τοῦ δείγματος τοῦ παραχθέντος στό 5.3, πού περιέχει περίπου 2,5 νανογραμμάρια ἀφλατοξίνης B_1·

— *στά σημεῖα B καί Γ*: 25 μl τοῦ προτύπου διαλύματος (3.16).

5.6.2.2. 'Ανάπτυξη

'Αναπτύσσεται τό χρωματογράφημα πρός τήν κατεύθυνση I μέ τή βοήθεια τοῦ διαλύτου ἀναπτύξεως (3.18.1) (στοιβάδα 1 cm μέσα σέ δοχεῖο μέ μή κεκορεσμένη ἀτμόσφαιρα) μακριά ἀπό τό φῶς μέχρις ὅτου τό μέτωπο τοῦ διαλύτου ἔλθει σέ ἐπαφή μέ τή γραμμή ὁριοθετήσεως.

'Αποσύρεται ἡ πλάκα ἀπό τό δοχεῖο καί ἀφήνεται νά ξηρανθεῖ ἐπί πέντε λεπτά μακριά ἀπό τό φῶς καί στή θερμοκρασία τοῦ περιβάλλοντος. Ψεκάζεται στή συνέχεια μέ ὑδροχλωρικό ὀξύ (3.12) σέ μιά λωρίδα ὕψους 2,5 cm ἡ ὁποία καλύπτει τά σημεῖα A καί B (παρουσιάζεται μέ τίς γραμμωτές σκιές στήν εἰκόνα 3) μέχρις ὅτου τό χρῶμα γίνει σκοτεινό, προστατευομένου τοῦ ὑπολοίπου τῆς πλακός μέ ἕνα φύλλο ἀπό γυαλί. 'Αφήνεται νά ἀντιδράσει γιά δέκα λεπτά στό σκοτάδι καί ξηραίνεται σέ ρεῦμα ἀέρος στή θερμοκρασία τοῦ περιβάλλοντος.

'Αναπτύσσεται στή συνέχεια τό χρωματογράφημα πρός τήν κατεύθυνση II μέ τή βοήθεια τοῦ διαλύτου ἀναπτύξεως (3.18.1) (στοιβάδα 1 cm μέσα σέ δοχεῖο μέ μή κεκορεσμένη ἀτμόσφαιρα) μακριά ἀπό τό φῶς, μέχρις ὅτου τό μέτωπο τοῦ διαλύτου προσεγγίσει τή γραμμή ὁριοθετήσεως. 'Αφαιρεῖται ἡ πλάκα ἀπό τό δοχεῖο καί ἀφήνεται νά ξηρανθεῖ στή θερμοκρασία τοῦ περιβάλλοντος.

5.6.2.3. 'Ερμηνεία τοῦ χρωματογραφήματος

'Εξετάζεται τό χρωματογράφημα σέ ὑπεριῶδες φῶς (4.9) καί ἐξακριβώνονται οἱ παρατηρήσεις πού ἀναφέρονται παρακάτω:

α) 'Εμφάνιση μιᾶς φθοριζούσης γαλάζιας κηλίδος ἀφλατοξίνης B_1 προερχομένης ἀπό τό πρότυπο διάλυμα πού ἔχει ἐναποτεθεῖ στό Γ (μετατόπιση πρός τήν κατεύθυνση I).

β) 'Εμφάνιση μιᾶς φθοριζούσης γαλάζιας κηλίδος ἀφλατοξίνης B_1 (ἡ ὁποία δέν ἀντέδρασε μέ τό ὑδροχλωρικό ὀξύ) καί μιᾶς ἐντονοτέρας φθοριζούσης γαλάζιας κηλίδος ἀφλατοξίνης B_1-ἡμιακετάλης (hemiacetal), προερχομένης ἀπό τό πρότυπο διάλυμα πού ἔχει ἐναποτεθεῖ στό B (μετατόπιση πρός τήν κατεύθυνση II).

γ) 'Εμφάνιση κηλίδων παρομοίων πρός ἐκεῖνες πού ἀναφέρονται στήν περίπτωση β) οἱ ὁποῖες προέρχονται ἀπό τό ἐκχύλισμα τοῦ δείγματος πού ἔχει ἐναποτεθεῖ στό A. 'Η θέση τῶν κηλίδων αὐτῶν ὁρίζεται ἀπό τήν ἀπόσταση μετατοπίσεως τῆς ἀφλατοξίνης B_1 ἀπό τό σημεῖο A πρός τήν κατεύθυνση I (ἡ ἴδια ἀπόσταση μέ ἐκείνη πού ἔχει διανυθεῖ ἀπό τό πρότυπο πού ἔχει ἐναποτεθεῖ στό Γ) ἀκολουθουμένη ἀπό τίς ἀποστάσεις μετατοπίσεως πού ἔχουν διανυθεῖ στήν κατεύθυνση II ἀπό τή ἀφλατοξίνη B_1 (ἡ ὁποία δέν ἀντέδρασε μέ τό ὑδροχλωρικό ὀξύ) καί ἀπό τήν ἀφλατοξίνη B_1-ἡμιακετάλη (hemiacetal) (οἱ αὐτές ἀποστάσεις μ' ἐκεῖνες πού ἔχουν διανυθεῖ ἀπό τό πρότυπο πού ἔχει ἐναποτεθεῖ στό B). Οἱ ἐντάσεις φθορισμοῦ τῶν κηλίδων τῆς ἡμιακετάλης πού προέρχονται ἀπό τό ἐκχύλισμα καί τό πρότυπο διάλυμα πού ἔχει ἐναποτεθεῖ στό B πρέπει νά ἀνταποκρίνονται μεταξύ τους.

6. **'Υπολογισμός τῶν ἀποτελεσμάτων**

6.1. *'Από τίς ὀπτικές μετρήσεις*

'Η περιεκτικότητα σέ μικρογραμμάρια τῆς ἀφλατοξίνης B_1 ἀνά χιλιόγραμμο δείγματος

(ppb) δίδεται ἀπό τόν τύπο:

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

στόν ὁποῖο:

Y καί X εἶναι ἀντιστοίχως οἱ ὄγκοι σέ μικρολίτρα τοῦ προτύπου διαλύματος ἀφλατοξίνης B_1 (3.16) καί τοῦ ἐκχυλίσματος τό ὁποῖο ἔχει μία παρομοία ἔνταση φθορισμοῦ·

S = συγκέντρωση σέ μικρογραμμάρια ἀφλατοξίνης B_1 ἀνά χιλιοστόλιτρο τοῦ προτύπου διαλύματος (3.16)·

V = τελικός ὄγκος τοῦ ἐκχυλίσματος σέ μικρολίτρα, ὑπολογιζομένων τῶν ἐνδεχομένων διαλύσεων·

W = βάρος σέ γραμμάρια τοῦ ληφθέντος δείγματος πού ἀντιστοιχεῖ στόν ὄγκο τοῦ ἐκχυλίσματος ὁ ὁποῖος ὑποβλήθηκε σέ καθαρισμό σέ στήλη.

6.2. *Ἀπό τίς μετρήσεις μέ φθοριοπυκνόμετρο*

Ἡ περιεκτικότητα σέ μικρογραμμάρια ἀφλατοξίνης B_1 ἀνά χιλιόγραμμο δείγματος (ppb) δίδεται ἀπό τόν τύπο:

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

στόν ὁποῖο:

Y = ὄγκος σέ μικρολίτρα τοῦ ἐκχυλίσματος πού ἔχει ἐναποτεθεῖ στήν πλάκα (10 ἤ 20 μl)·

S = ποσότητα σέ νανογραμμάρια ἀφλατοξίνης B_1 τοῦ ἀποθέματος τοῦ ἐκχυλίσματος (ὑπολογιζομένου τοῦ ὄγκου Y), ὑπολογιζομένη ἀπό τούς προσδιορισμούς·

V = τελικός ὄγκος τοῦ ἐκχυλίσματος σέ μικρολίτρα, λαμβανομένων ὑπόψη τῶν ἐνδεχομένων διαλύσεων·

W = βάρος σέ γραμμάρια τοῦ ληφθέντος δείγματος πού ἀντιστοιχεῖ στόν ὄγκο τοῦ ἐκχυλίσματος ὁ ὁποῖος ὑποβλήθηκε σέ καθαρισμό σέ στήλη.

7. **Προετοιμασία καί ἔλεγχος τοῦ διαλύματος (3.16)**

7.1. *Προσδιορισμός τῆς συγκεντρώσεως τῆς ἀφλατοξίνης B_1*

Παρασκευάζεται ἕνα πρότυπο διάλυμα ἀφλατοξίνης B_1 σέ χλωροφόρμιο (3.2) ἤ σέ μίγμα βενζολίου/ἀκετονιτριλίου (3.6), τοῦ ὁποίου ἡ συγκέντρωση εἶναι ἀπό 8 μέχρι 10 μικρογραμμάρια ἀνά χιλιοστόλιτρο. Ρυθμίζεται τό φάσμα ἀπορροφήσεως μεταξύ 330 καί 370 nm μέ τή βοήθεια τοῦ φασματοφωτομέτρου (4.11).

Αὐξάνεται ἡ ὀπτική πυκνότητα (A) σέ 363 nm στήν περίπτωση τοῦ διαλύματος τοῦ χλωροφορμίου· σέ 348 nm στήν περίπτωση τοῦ διαλύματος σέ μίγμα βενζολίου/ἀκετονιτριλίου.

Ὑπολογίζεται ἡ συγκέντρωση σέ μικρογραμμάρια ἀφλατοξίνης B_1 ἀνά χιλιοστόλιτρο διαλύματος ἀπό τούς παρακάτω τύπους:

$\frac{312 \cdot A \cdot 1000}{20600}$ γιά τό διάλυμα χλωροφορμίου·

$\frac{312 \cdot A \cdot 1000}{19800}$ γιά τό διάλυμα σέ μίγμα βενζολίου/ἀκετονιτριλίου.

Διενεργοῦνται μακράν τοῦ φωτός οἱ ἀπαραίτητες διαλύσεις γιά νά ληφθεῖ τό πρότυπο διάλυμα ἐργασίας, τοῦ ὁποίου ἡ συγκέντρωση σέ ἀφλατοξίνη B_1 εἶναι περίπου 0,1 μικρογραμμάρια ἀνά χιλιοστόλιτρο. Διατηρούμενο τό διάλυμα αὐτό σέ θερμοκρασία 4 °C παραμένει σταθερό γιά δύο ἑβδομάδες.

7.2. *Ἔλεγχος χρωματογραφικῆς καθαρότητος*

Ἐναποτίθενται σέ μιά πλάκα (4.8) 5 μl προτύπου διαλύματος 8-10 μg ἀφλατοξίνης B_1 ἀνά χιλιοστόλιτρο (βλέπε 7.1). Ἀναπτύσσεται τό χρωματογράφημα ὅπως ἀναφέρεται στό 5.4. Σέ ὑπεριῶδες φῶς ὁ φθορισμός δέν πρέπει νά ἐπιτρέπει νά γίνεται αἰσθητή παρά μόνο μία κηλίδα καί κανένας φθορισμός δέν πρέπει νά γίνεται αἰσθητός στή ζώνη τοῦ ἀρχικοῦ ἀποθέματος.

8. **Ἐπαναληπτικότητα**

Ἡ διαφορά μεταξύ τῶν ἀποτελεσμάτων τῶν δύο παραλλήλων προσδιορισμῶν πού πραγματοποιοῦνται στό ἴδιο δεῖγμα ἀπό τόν ἴδιο ἐργαστηριακό ὑπάλληλο (ὑπεύθυνο γιά τήν ἀνάλυση) δέν πρέπει νά ὑπερβαίνει:

— τό 25% ἐκ τοῦ πλέον ὑψηλοῦ ἀποτελέσματος γιά τίς περιεκτικότητες σέ ἀφλατοξίνη B_1 ἀπό 10 μέχρι 20 μg/kg·

— 5 μg σέ ἀπόλυτη τιμή, γιά περιεκτικότητες ἀπό 20 ἕως 50 μg/kg·
— 10% ἐκ τοῦ πλέον ὑψηλοῦ ἀποτελέσματος γιά τίς περιεκτικότητες πού εἶναι ἀνώτερες τῶν 50 μg/kg.

9. **'Αναπαραγωγικότητα**

Βλέπε «Παρατηρήσεις», τμῆμα Γ, σημεῖο 2.

Β. ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΟΙΒΑΔΟΣ, ΔΥΟ ΔΙΑΣΤΑΣΕΩΝ

1. **'Αντικείμενο καί τομέας ἐφαρμογῆς**

'Η μέθοδος ἐπιτρέπει τόν προσδιορισμό τῆς περιεκτικότητος σέ ἀφλατοξίνη B_1 τῶν ζωοτροφῶν οἱ ὁποῖες δέν ἐμπίπτουν στόν τομέα ἐφαρμογῆς τῆς μεθόδου Α. Τό κατώτερο ὅριο προσδιορισμοῦ τῆς δόσεως εἶναι 0,01 mg/kg (10 ppb). 'Η μέθοδος δέν ἐφαρμόζεται στίς ζωοτροφές οἱ ὁποῖες περιέχουν πούλπα ἐσπεριδοειδῶν.

2. **'Αρχή**

Τό δεῖγμα ἐκχυλίζεται μέ χλωροφόρμιο. Τό ἐκχύλισμα διηθεῖται, κατάλληλη ποσότητα λαμβάνεται καί καθαρίζεται μέ χρωματογραφία σέ στήλη silica gel. Τό προϊόν τῆς ἐκλούσεως ἐξατμίζεται καί τό ὑπόλειμμα λαμβάνεται πάλι μέ ἕναν καθορισμένο ὄγκο χλωροφορμίου ἤ μίγματος βενζολίου καί ἀκετονιτριλίου. Κατάλληλη ποσότητα αὐτοῦ τοῦ διαλύματος ὑποβάλλεται σέ χρωματογραφία δύο διαστάσεων λεπτῆς στοιβάδος. 'Η ποσότητα τῆς ἀφλατοξίνης B_1 προσδιορίζεται μέ τήν ὑπεριώδη ἀκτινοβολία τοῦ χρωματογραφήματος εἴτε ὀπτικά εἴτε μέ φθοριοπυκνομετρία, διά συγκρίσεως μέ γνωστές ποσότητες προτύπου ἀφλατοξίνης B_1. 'Η ταυτότητα τῆς ἀφλατοξίνης B_1 πού ἐξάγεται ἀπό τήν τροφή πρέπει νά ἐπιβεβαιώνεται μέ τίς ἐνδεδειγμένες μεθόδους.

3. **'Αντιδραστήρια**

NB: "Ολα τά ἀντιδραστήρια πρέπει νά εἶναι ποιότητος «γιά ἀνάλυση» ἐφ' ὅσον δέν δίδεται καμιά ἄλλη ὁδηγία.

3.1. 'Ακετόνη.

3.2. Χλωροφόρμιο σταθεροποιηθέν μέ 0,5 μέχρι 1,0% αἰθανόλης 96% (ὄγκος/ὄγκο).

3.3. η-'Εξάνιο.

3.4. Μεθανόλη.

3.5. "Ανυδρος διαιθυλικός αἰθέρας ἀπηλλαγμένος ὑπεροξειδίων.

3.6. Μίγμα βενζολίου καί ἀκετονιτριλίου: 98/2 (ὄγκος/ὄγκο).

3.7. Μίγμα χλωροφορμίου (3.2) καί μεθανόλης (3.4): 97/3 (ὄγκος/ὄγκο).

3.8. Silica gel γιά χρωματογραφία σέ στήλη, κοκκομετρικῆς συνθέσεως: 0,05 μέχρι 0,20 mm.

3.9. 'Υδρόφιλος βάμβαξ, ὁ ὁποῖος ἔχει προηγουμένως ἐκχυλισθεῖ μέ χλωροφόρμιο, ἤ ὑαλοβάμβαξ.

3.10. "Ανυδρο θειικό νάτριο σέ κόκκους.

3.11. 'Αδρανές ἀέριο, γιά παράδειγμα ἄζωτο.

3.12. 'Υδροχλωρικό ὀξύ 1 N.

3.13. Γῆ διατόμων (hyflosupercel) ἐκπλυθεῖσα μέ ὀξύ.

3.14. Silica gel G-HR ἤ ἰσοδύναμο γιά χρωματογραφία λεπτῆς στοιβάδος.

3.15. Διαλύτες ἀναπτύξεως.

3.15.1. Διαιθυλικός αἰθέρας (3.5)/μεθανόλη (3.4)/ὕδωρ: 94/4,5/1,5 (ὄγκος/ὄγκο/ὄγκο), δοχεῖο μετά κεκορεσμένης ἀτμοσφαίρας.

3.15.2. Χλωροφόρμιο (3.2)/ἀκετόνη (3.1): 9/1 (ὄγκος/ὄγκο), δοχεῖο μέ μή κεκορεσμένη ἀτμόσφαιρα.

3.16. Πρότυπο διάλυμα (διάλυμα ἀναφορᾶς) περίπου 0,1 μικρογραμμαρίου ἀφλατοξίνης B_1 ἀνά χιλιοστόλιτρο σέ χλωροφόρμιο (3.2) ἤ μέσα σέ μίγμα βενζολίου/ἀκετονιτριλίου (3.6), παρασκευασθέν καί ἐλεγχθέν κατά τό σημεῖο 7 τῆς μεθόδου Α.

4. **Συσκευές**

Βλέπε σημεῖο 4 τῆς μεθόδου Α.

5. **Τρόπος ἐργασίας**

5.1. *Παρασκευή τοῦ δείγματος*

5.2. *'Εκχύλιση*

5.3. *Καθαρισμός σέ στήλη*

} Βλέπε σημεῖα 5.1, 5.2 καί 5.3 τῆς μεθόδου Α.

5.4. *Χρωματογραφία δύο διαστάσεων λεπτῆς στοιβάδος*

5.4.1. 'Εφαρμογή τῶν διαλυμάτων (ἀκολουθεῖται τό σχῆμα τό ὁποῖο παρουσιάζεται στήν εἰκόνα 1)

Χαράσσονται σέ μιά πλάκα (4.8) δύο εὐθεῖες παράλληλες σέ δύο γειτονικές πλευρές (σέ ἀποστάσεις ἀντιστοίχως 5 καί 6 cm ἀπό τίς πλευρές αὐτῶν) οἱ ὁποῖες προορίζονται νά ὁριοθετήσουν τή μετατόπιση τῶν μετώπων τῶν διαλυτῶν. 'Εναποτίθενται στήν πλάκα μέ τή βοήθεια τριχοειδῶν σιφωνίων ἤ μικροσυρίγγων τά διαλύματα τά ὁποῖα ἀναφέρονται παρακάτω:

— *στό σημεῖο Α*, 20 μl ἐκ τοῦ καθαρισθέντος ἐκχυλίσματος τοῦ δείγματος, παραχθέντος στό 5.3·

— *στό σημεῖο Β*, 20 μl ἐκ τοῦ προτύπου διαλύματος (3.16)·

— *στό σημεῖο Γ*, 10 μl ἐκ τοῦ προτύπου διαλύματος (3.16)·

— *στό σημεῖο Δ*, 20 μl ἐκ τοῦ προτύπου διαλύματος (3.16)·

— *στό σημεῖο Ε*, 40 μl ἐκ τοῦ προτύπου διαλύματος (3.16).

Ξηραίνεται μέ τή βοήθεια ἐλαφροῦ ρεύματος ἀέρος ἤ ἀδρανοῦς ἀερίου (3.11). Οἱ παραγόμενες κηλίδες πρέπει νά ἔχουν διάμετρο 5 mm περίπου.

5.4.2. 'Ανάπτυξη (ἀκολουθεῖται τό σχῆμα τό ὁποῖο παρουσιάζεται στήν εἰκόνα 1)

'Αναπτύσσεται τό χρωματογράφημα πρός τήν κατεύθυνση I μέ τή βοήθεια τοῦ διαλύτου ἀναπτύξεως (3.15.1) (στοιβάς 1 cm μέσα σέ δοχεῖο μέ κεκορεσμένη ἀτμόσφαιρα) μακριά τοῦ φωτός, μέχρις ὅτου τό μέτωπο τοῦ διαλύτου ἔλθει σέ ἐπαφή μέ τή γραμμή ὁριοθετήσεως. 'Αφαιρεῖται ἡ πλάκα ἀπό τό δοχεῖο καί ἀφήνεται νά ξηρανθεῖ γιά δεκαπέντε λεπτά τουλάχιστο μακριά τοῦ φωτός καί στή θερμοκρασία τοῦ περιβάλλοντος.

'Αναπτύσσεται στή συνέχεια τό χρωματογράφημα στήν κατεύθυνση II μέ τή βοήθεια τοῦ διαλύτου ἀναπτύξεως (3.15.2) (στοιβάς 1 cm μέσα σέ δοχεῖο μέ μή κεκορεσμένη ἀτμόσφαιρα) μακριά τοῦ φωτός, μέχρις ὅτου τό μέτωπο τοῦ διαλύτου ἔλθει σέ ἐπαφή μέ τή γραμμή ὁριοθετήσεως. 'Αποσύρεται ἡ πλάκα ἀπό τό δοχεῖο καί ἀφήνεται νά ξηρανθεῖ μακριά τοῦ φωτός καί στή θερμοκρασία τοῦ περιβάλλοντος.

5.4.3. 'Ερμηνεία τοῦ χρωματογραφήματος (ἀκολουθεῖται τό σχῆμα τό ὁποῖο παρουσιάζεται στήν εἰκόνα 2)

'Ακτινοβολεῖται τό χρωματογράφημα μέ ὑπεριῶδες φῶς τοποθετώντας τήν πλάκα σέ ἀπόσταση 10 cm ἀπό τόν λαμπτήρα (4.9). 'Εντοπίζεται ἡ θέση τῶν κηλίδων τοῦ γαλάζιου φθορισμοῦ Β, Γ, Δ καί Ε τῆς ἀφλατοξίνης B_1 πού προέρχονται ἀπό τό πρότυπο διάλυμα καί χαράσσονται δύο ὑποθετικές εὐθεῖες οἱ ὁποῖες διέρχονται ἀπό αὐτές τίς κηλίδες καί εἶναι κάθετες πρός τίς κατευθύνσεις ἐμφανίσεως. Τό σημεῖο τομῆς Ρ τῶν εὐθειῶν αὐτῶν εἶναι ἡ θέση στήν ὁποία θά ἔπρεπε νά βρίσκεται ἡ κηλίδα τῆς ἀφλατοξίνης B_1 ἡ ὁποία προέρχεται ἀπό τό ἐκχύλισμα τοῦ δείγματος πού τοποθετεῖται στό Α (εἰκόνα 1). 'Εν τούτοις, ἡ πραγματική θέση αὐτῆς τῆς κηλίδος μπορεῖ νά εὑρεθεῖ σέ ἕνα σημεῖο Q, εὑρισκόμενο στήν τομή τῶν δύο ὑποθετικῶν εὐθειῶν οἱ ὁποῖες σχηματίζουν μεταξύ τους μία γωνία 100 μοιρῶν περίπου καί οἱ ὁποῖες διέρχονται ἀντιστοίχως ἀπό τίς κηλίδες Β καί Γ. Καθορίζεται, ὅπως ἀναφέρεται στό 5.5, ἡ ποσότητα ἀφλατοξίνης B_1 τοῦ ἐκχυλίσματος τοῦ δείγματος.

5.4.4. Συμπληρωματική χρωματογραφία

Χαράσσονται σέ μιά πλάκα (4.8) δύο παράλληλες εὐθεῖες σέ δύο γειτονικές πλευρές, ὅπως φαίνεται στό σχῆμα τῆς εἰκόνας 1 καί ἐναποτίθενται στό σημεῖο Α (βλέπε εἰκόνα 1) 20 μl καθαρισθέντος ἐκχυλίσματος δείγματος παραγομένου στό 5.3 καί πάνω ἀπό αὐτά 20 μl προτύπου διαλύματος (3.16). 'Αναπτύσσεται ὅπως ἀναφέρεται στό 5.4.2. 'Ακτινοβολεῖται τό χρωματογράφημα μέ ὑπεριῶδες φῶς (4.9) καί ἐξακριβώνεται ὅτι:

— οἱ κηλίδες τῆς ἀφλατοξίνης B_1 τοῦ ἐκχυλίσματος καί τοῦ προτύπου διαλύματος ὑπερκάθηνται ἡ μιά τῆς ἄλλης,

— ὁ φθορισμός αὐτῆς τῆς κηλίδος εἶναι πλέον ἔντονος ἀπό ἐκεῖνον τῆς κηλίδος τῆς ἀφλατοξίνης B_1 πού ἀναπτύσσεται στό σημεῖο Q τῆς πρώτης πλάκας.

5.5. *Ποσοτικοί προσδιορισμοί*

Διενεργοῦνται οἱ προσδιορισμοί εἴτε ὀπτικά εἴτε μέ φθοριοπυκνομετρία ὅπως φαίνεται παρακάτω.

5.5.1. 'Οπτικές μετρήσεις

Προσδιορίζεται ἡ ποσότητα τῆς ἀφλατοξίνης B_1 τοῦ ἐκχυλίσματος διά συγκρίσεως τῆς ἐντάσεως τοῦ φθορισμοῦ τῆς κηλίδος τοῦ ἐκχυλίσματος μέ ἐκείνην τῶν κηλίδων Γ, Δ καί Ε τοῦ προτύπου διαλύματος. Παρεμβάλλεται ἄν εἶναι ἀναγκαῖο. "Αν ἡ ἔνταση τοῦ φθορισμοῦ πού προκαλεῖται ἀπό τά 20 μl τοῦ ἐκχυλίσματος εἶναι περισσότερο ἔντονη ἀπό ἐκείνη τῶν 40 μl τοῦ προτύπου διαλύματος, διαλύεται τό ἐκχύλισμα 10 ἤ 100 φορές σέ χλωροφόρμιο (3.2.) ἤ σέ μίγμα βενζολίου/ἀκετονιτριλίου (3.6) πρίν ὑποβληθεῖ σέ μία νέα χρωματογραφία λεπτῆς στοιβάδος.

5.5.2. Μετρήσεις μέ φθοριοπυκνομετρία

Μετρᾶται ἡ ἔνταση τοῦ φθορισμοῦ τῶν κηλίδων τῆς ἀφλατοξίνης B_1 μέ τό φθοριοπυκνόμετρο (4.12) χρησιμοποιουμένου ἑνός μήκους κύματος διεγέρσεως τῆς τάξεως τῶν 365 nm καί ἑνός μήκους κύματος ἐκπομπῆς τῆς τάξεως τῶν 443 nm.

Προσδιορίζεται ἡ ποσότητα τῆς ἀφλατοξίνης B_1 τοῦ ἀποθέματος τοῦ ἐκχυλίσματος διά συγκρίσεως τῆς ἐντάσεως τοῦ φθορισμοῦ τῆς κηλίδος τοῦ ἐκχυλίσματος μέ ἐκείνη τῶν κηλίδων Γ, Δ καί Ε τοῦ προτύπου διαλύματος.

5.6. *'Επιβεβαίωση τῆς ταυτότητος τῆς ἀφλατοξίνης B_1*

Βλέπε σημεῖο 5.6 τῆς μεθόδου Α.

6. **'Υπολογισμός τῶν ἀποτελεσμάτων**

Βλέπε σημεῖο 6 τῆς μεθόδου Α.

7. **'Επαναληπτικότητα**

Βλέπε σημεῖο 8 τῆς μεθόδου Α.

8. **'Αναπαραγωγικότητα**

Βλέπε «Παρατηρήσεις», τμῆμα Γ, σημεῖο 2.

Γ. ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ ΠΟΥ ΑΦΟΡΟΥΝ ΤΙΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ Α ΚΑΙ Β

1. **'Απομάκρυνση λιπῶν**

Τά δείγματα τά ὁποῖα περιέχουν περισσότερο ἀπό 5 τοῖς ἑκατό λιπαρές οὐσίες πρέπει νά ἀπολιπαίνονται μέ πετρελαϊκό αἰθέρα (eb. 40-60° Κελσίου) μετά τήν παρασκευή πού ἐμφαίνεται στό 5.1.

Στίς περιπτώσεις αὐτές τά ἀποτελέσματα τῆς ἀναλύσεως πρέπει νά ἀνάγονται στό βάρος τοῦ μή ἀπολιπανθέντος δείγματος.

2. **'Αναπαραγωγικότητα τῶν ἀποτελεσμάτων**

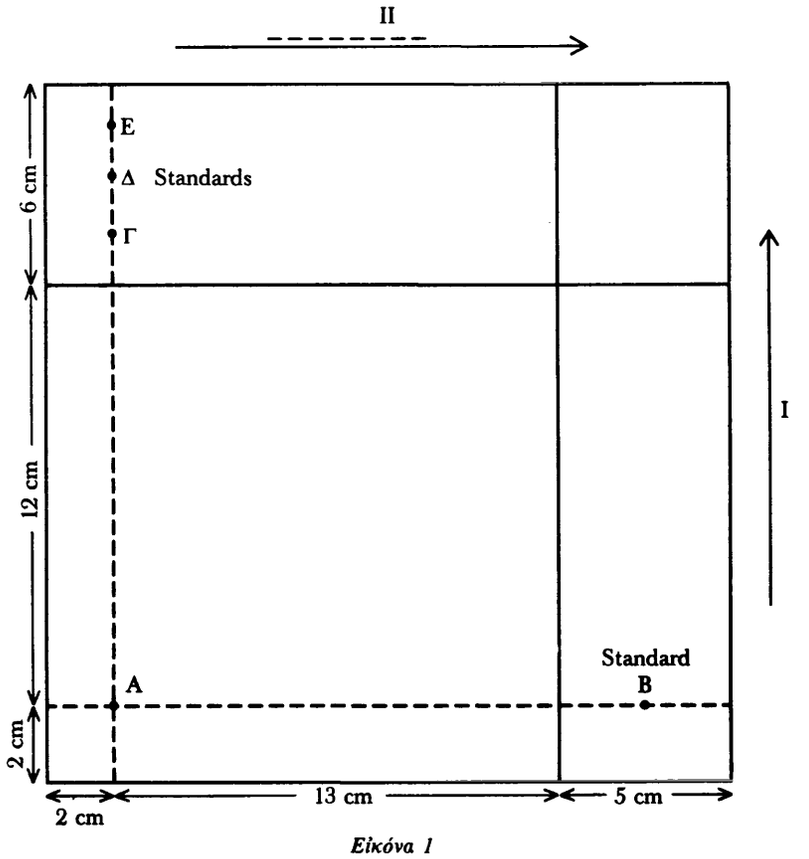
'Η ἀναπαραγωγικότητα τῶν ἀποτελεσμάτων, δηλαδή ἡ διαφορά μεταξύ τῶν ἀποτελεσμάτων πού ἔχουν ληφθεῖ σέ δύο ἤ περισσότερα ἐργαστήρια γιά τό ἴδιο δεῖγμα ἔχει ἐκτιμηθεῖ σέ:

± 50 τοῖς ἑκατό τῆς μέσης τιμῆς τῶν ἀποτελεσμάτων γιά μέσες τιμές σέ ἀφλατοξίνη B_1 ἀπό 10 μέχρι 20 μg/kg·

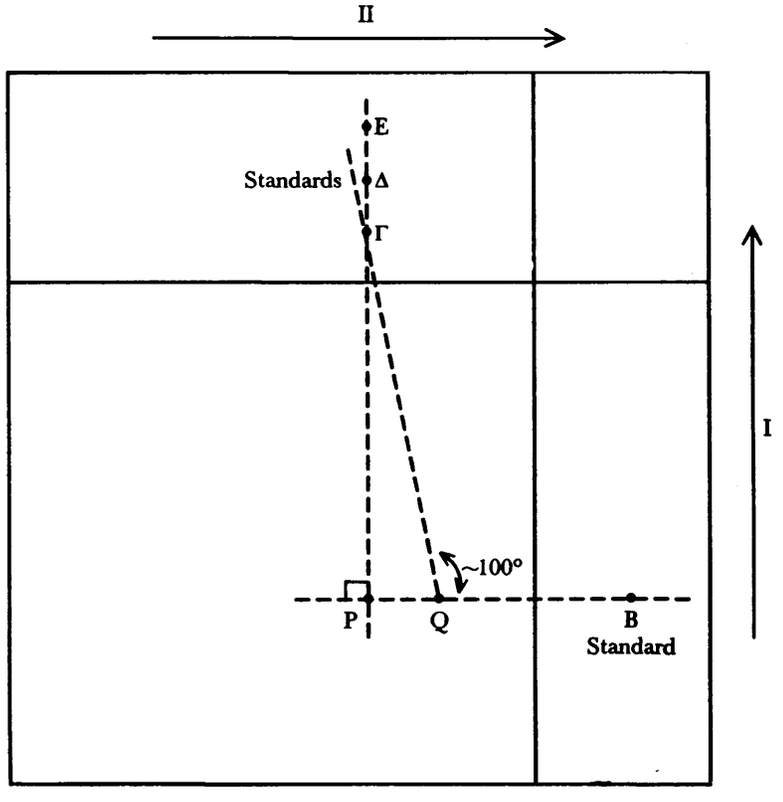
± 10 μg/kg ἀπό τή μέση τιμή γιά μέσες τιμές ἀπό 20 μέχρι 50 μg/kg·

± 20 τοῖς ἑκατό τῆς μέσης τιμῆς γιά μέσες τιμές πού εἶναι ἀνώτερες τῶν 50 μg/kg.

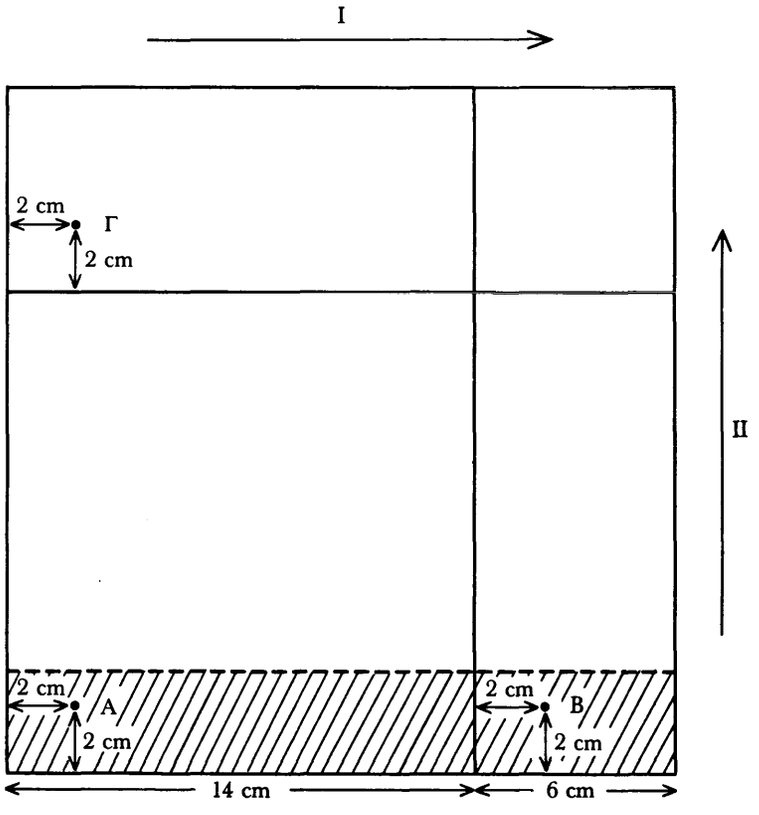
Προσάρτημα στό παράρτημα



Εἰκόνα 1



Εἰκόνα 2



Εἰκόνα 3