31976L0372

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.

Id-disposizzjonijiet ġenerali stabbiliti fil-Parti 1 (L-Introduzzjoni) ta' l-Anness ma' l-ewwel Direttiva tal-Kummissjoni 71/250/KEE tal-15 ta' Ġunju 1971, bl-eċċezzjoni tal-parti li titratta l-preparazzjoni tal-kampjun li għandu jiġi analizzat, għandhom ikunu applikabbli għall-metodi deskritti fl-Anness mad-Direttiva.

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.

Magħmula fi Brussel, fl-1 ta' Marzu 1976.

Għall-Kummissjoni

P.J. LARDINOIS

Membru tal-Kummissjoni

---

[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.

ANNESS

DETERMINAZZJONI TA' L-AFLATOSSIKU B_1

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

1. **L-Iskop u l-qasam ta' l-applikazzjoni**

Il-metodu jagħmilha possibbli li jiġi ddeterminat il-livell ta' l-aflatossiku B_1 fl-għalf li ġej: *groundnut*, kopra, żerriegħa tal-kittien, soja, *sesame*, babassu palm u ċapep ta' żejt taż-żerriegħa tal-qamħirrum, ċereali u prodotti taċ-ċereali, żerriegħa tal-piżelli, polpa tal-patata u lamtu. Il-limitu l-iktar baxx tad-determinazzjoni huwa 0.01 mg/kg (10 ppb).

Jekk il-preżenza ta' sustanzi interferenti timpedixxi d-determinazzjoni, huwa neċessarju li l-analiżi tinbeda għal darb'oħra bl-użu tal-metodu B (kromatografija ta' żewġ dimensjonijiet b'saff irqiq).

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 għażżewġ aflotossiċi.

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 miħun.

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).*

Iħan 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 miħun, 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 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.

— 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:

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.

B. METODU TA' SAFF IRQIQ KROMATOGRAFIKU B'ŻEWĠ DIMENSJONIJIET

1. **L-Iskop u l-qasam ta' l-applikazzjoni**

Il-metodu jagħmilha possibbli li jiġi ddeterminat il-livell ta' aflatossiku B_1 f'għalf li ma jaqax fil-qasam ta' l-applikazzjoni tal-metodu A. Il-limitu 'l iktar baxx tad-determinazzjoni huwa 0.01mg/kg (10 ppb) skop. Il-metodu mhuwiex applikabbli għall-għalf li jikkontjeni polpa taċ-ċitru.

2. **Il-Prinċipju**

Il-kampjun huwa soġġett għal estrazzjoni bil-kloroform. L-estratt huwa ffiltrat, u porzjon alikwot meħud u ppurifikat mill-kolonna tal-kromatografija fuq ġel silika. L-elwat huwa evaporat u r-residwu maħlul għal darb'oħra f'volum speċifiku ta' kloroform jew ta' taħlita ta' *benzene* u aċetonitrile. Porzjon alikwot ta' din is-soluzzjoni huwa soġġett għal kromatografija b'saff irqiq ta' żewġ dimensjonijiet (TLC). Il-kwantità ta' aflatossiku B_1 hija ddeterminata taħt ir-radjazzjoni UV tal-kromatogramma, jew viżwalment jew permezz ta' florodensitometrija, 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. **Ir-Riaġenti**

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

3.1. L-Aċetun.

3.2. Kloroform, stabilizzat b'0.5 sa 1 % ta' 96 % etanol (v/v).

3.3. N-*hexane*.

3.4. Metanol.

3.5. Eteru anidridu tad-dietil, mingħajr perossidi.

3.6. Taħlita ta' *benzene* 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 kromatografija tal-kolonna, daqs ta' partiċella 0.05 sa 0.20 mm.

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

3.10. Sulfat tas-sodju, anidridu, granulari.

3.11. Gass inert, eż. nitroġenu.

3.12. 1 aċidu n-idrokloriku.

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

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

3.15. Solventi żviluppanti.

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

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

3.16. Soluzzjoni standard b'madwar 0.1 µg aflatossiku B_1 għal kull ml fil-kloroform (3.2) jew it-taħlita *benzene*/aċetonitrile (3.6), ippreparata u kkontrollata kif deskritt fil-punt 7 tal-metodu A.

4. **Apparat**

Ara taħt il-punt 4 tal-metodu A.

5. **Proċedura**

5.1. Preparazzjoni tal-kampjun
5.2. Estrazzjoni
5.3. Tindif tal-kolonna
} Ara taht il-punti 5.1, 5.2 u 5.3 tal-metodu A.

5.4. *TLC b'żewġ dimensjonijiet*

5.4.1. Applikazzjoni tas-soluzzjonijiet (segwi t-tpinġija fil-figura 1)

Aqta' żewġ linji dritti fuq pjanċa (4.8) paralleli għal żewġ ġnubijiet kontigwi (5 u 6ċm minn kull ġenb rispettivament), sabiex tillimita l-migrazzjoni għas-solvent. Immarka s-soluzzjonijiet li ġejjin fuq il-pjanċa bl-użu tal-pipetti kapillari jew mikro-siringi:

— fuq il-punt A, 20µl ta' l-estratt tal-kampjun ippurifikat ottenut f'5.3;

— fil-punt B, 2µl tas-soluzzjoni standard;

— fil-punt Ċ, 10 µl tas-soluzzjoni standard;

— fil-punt D, 20 µl tas-soluzzjoni standard (3.16);

— fil-punt E, 40 µl tas-soluzzjoni standard (3.16).

Nixxef f'żiffa bil-mod ta' arja jew gass inert (3.11). It-tikek ottenuti għandu jkollhom dijametru ta' madwar 5 mm.

5.4.2. L-Iżvilupp (segwi t-tpinġija fil-figura 1)

Żviluppa l-kromatogramma fid-direzzjoni I, fid-dlam, bl-użu tas-solvent żviluppanti (3.15.1) (saff ta' 1ċm f'tank 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 15-il minuta.

Imbagħad żviluppa l-kromatogramma fid-direzzjoni II, fid-dlam, bl-użu tas-solvent żviluppanti (3.15.2) (saff 1ċm f'tank mhux saturat) sakemm is-solvent jilħaq il-linja tal-limitu tas-solvent. Neħħi l-pjanċa mit-tank u ħalliha tinxef, fid-dlam, f'temperatura ambjentali.

5.4.3. Interpretazzjoni tal-kromatogramma (segwi t-tpinġija fil-figura 2)

Irradja l-kromatogramma b'dawl UV billi tqiegħed il-pjanċa 10ċm mill-(4.9). Alloka l-pożizzjoni taż-żoni florexxenti blu B, Ċ, D u E ta' l-aflatossiku B_1 mis-soluzzjoni standard. Ipproġetta żewġ linji immaġinarji li jgħaddu minn dawn iż-żoni u f'angoli perpendikolari għad-direzzjonijiet ta' żvilupp. L-intersezzjoni P ta' dawn il-linji hija l-post li fih wieħed jistenna li jsib iż-żona aflatossiku B_1 li joriġina mill-estratt tal-kampjun applikat f'A (figura 1). Madanakollu, il-post attwali taż-żona ta' l-aflatossiku B_1 jista' jkun f'punt Q fl-intersezzjoni ta' żewġ linji dritti immaġinarji li jiffurmaw angolu ta' madwar 100° bejniethom u li jgħaddi miż-żoni B u Ċ rispettivament. Iddetermina l-kwantità ta' aflatossiku B_1 fl-estratt tal-kampjun indikat f'5.5.

5.4.4. Kromatografija supplimentari

Iġbed żewġ linji dritti fuq pjanċa ġdida (4.8) paralleli għaż-żewġ ġnubijiet kontigwi, kif indikat fit-tpinġija fil-figura 1, u applika fil-punt A (ara l-figura 1) 20µl ta' l-estratt tal-kampjun ippurifikat ottenut f'5.3. u, superimpost fuqha, 20µl tas-soluzzjoni standard (3.16). Żviluppa kif indikat f'5.4.2. Irradja l-kromatogramma b'dawl UV (4.9) u kkontrolla li:

— iż-żoni aflatossiċi B_1 mill-estratt u s-soluzzjoni standard huma superimposti,

— il-florexxenza ta' din iż-żona hija iktar intens minn dik ta' l-aflatossiku B_1, żona żviluppata fi Q fuq l-ewwel pjanċa.

5.5. *Determinazzjonijiet kwantitattivi*

Iddetermina jew viżwalment jew b'florodensitometrija kif indikat taħt.

5.5.1. Kejl viżwali

Iddetermina l-kwantità ta' aflatossiku B_1 fl-estratt billi tqabbel l-intensità tal-florexxenza taż-żona ta' l-estratt ma' dik taż-żoni Ċ, D u E tas-soluzzjoi standard. Interpola kif neċessarju. Jekk l-intensità tal-florexxenza mogħtija minn 20 µl 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 *benzene*/aċetonitrile (3.6) qabel ma tissuġġettaha darb'oħra għal kromatografija b'saff irqiq.

5.5.2. Kejl bil-florodensitometrija

Kejjel l-intensità tal-florexxenza taż-żoni aflatossiċi B_1 bil-florodensitometru (4.12), bl-użu ta' *wavelength* ta' *excitation* ta' 365nm u *wavelength* ta' emissjoni ta' 443 nm.

Iddetermina l-kwantità ta' l-aflatossiku B_1 fiż-żona ta' estrazzjoni b'paragun ta' l-intensità tal-florexxenza tagħha ma' dik taż-żoni Ċ, D u E tas-soluzzjoni standard.

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

Aara taħt il-punt 5.6 tal-metodu A.

6. **Il-Kalkolu tar-riżultati**

Ara taħt il-punt 6 tal-metodu A.

7. **Rata ta' repetizzjoni**

Ara taħt il-punt 8 tal-metodu A.

8. **Ir-riproduċibbiltà**

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

Ċ. OSSERVAZZJONIJIET LI JIKKONĊERNAW IL-METODI A U B

1. **It-tneħħija tax-xaħam**

Kampjunu li jikkontjenu iktar minn 5 % xaħmijiet għandu jitneħħa x-xaħam minnhom bil-petrolju ħafif (bp 40 sa 60 °C) wara l-preparazzjoni indikata f'5.1.

F'dawn il-każijiet, ir-riżultati analitiċi għandhom jiġu espressi f'termini tal-piż tal-kampjun bix-xaħam mhux imneħħi.

2. **Ir-riproduċibbiltà tar-riżultati**

Ir-riproduċibbiltà tar-riżultati, jiġifieri, l-varjazzjoni bejn ir-riżultati otenuti b'żewġ laboratorji jew iktar fuq l-istess kampjun ġiet stmata b':

± 50 % tal-valur medju għall-valuri medji ta' aflatossiku B_1 minn 10 u sa 20 µg/kg;

± 10 µg/kg fuq il-valur medju għal valuri medji akbar minn 20 u sa 50 µg/kg;

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

Appendiċi ma' l-Anness

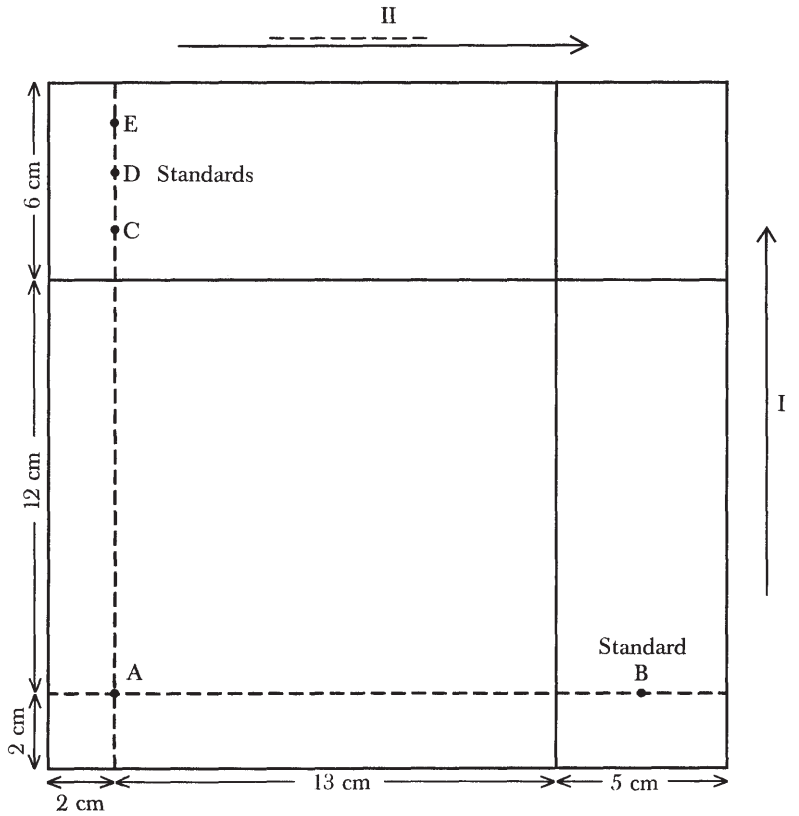


Figura 1

Figura 1

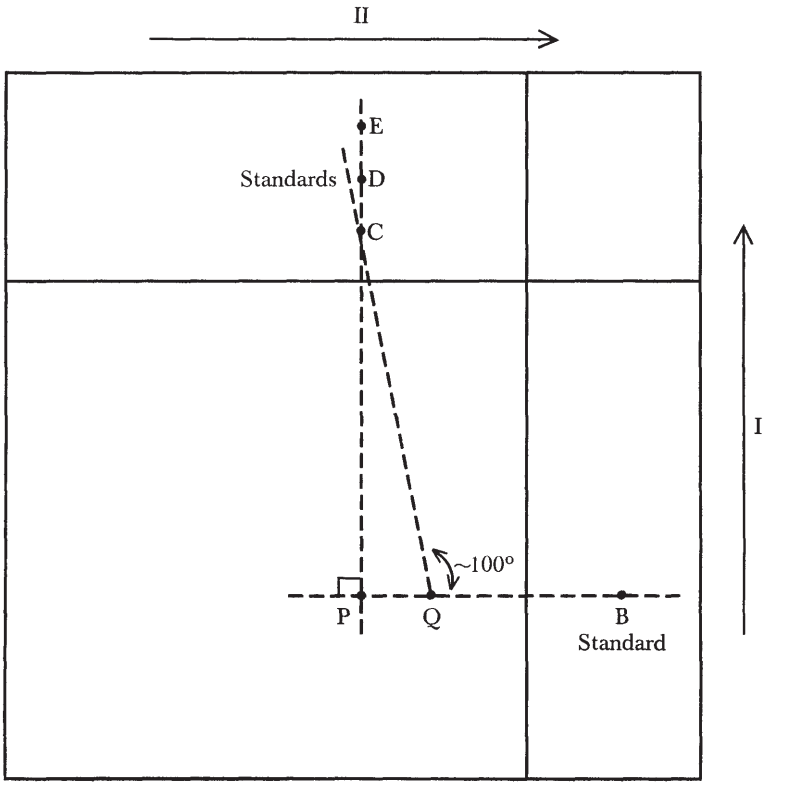


Figura 2

Figura 2

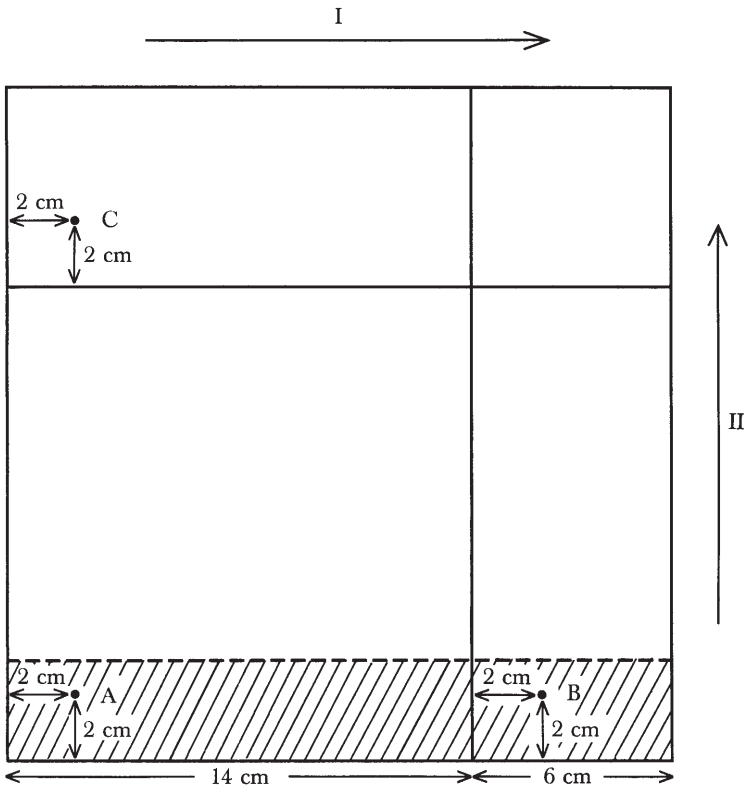


Figura 3

Figura 3