

II

(Atti per i quali la pubblicazione non è una condizione di applicabilità)

COMMISSIONE

DIRETTIVA 92/95/CEE DELLA COMMISSIONE

del 9 novembre 1992

che modifica l'allegato della settima direttiva 76/372/CEE che fissa i metodi d'analisi comunitari per il controllo ufficiale degli alimenti per animali

LA COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

visto il trattato che istituisce la Comunità economica europea,

vista la direttiva 70/373/CEE del Consiglio, del 20 luglio 1970, relativa all'introduzione di modi di prelievo di campioni e di metodi di analisi comunitari per il controllo ufficiale degli alimenti per animali⁽¹⁾, modificata da ultimo dall'atto di adesione della Spagna e del Portogallo, in particolare l'articolo 2,

considerando che la settima direttiva 76/372/CEE della Commissione, del 1° marzo 1976, che fissa i metodi di analisi comunitari per i controlli ufficiali degli alimenti per gli animali⁽²⁾, modificata dalla direttiva 81/680/CEE⁽³⁾, prescrive i metodi da applicare per il dosaggio dell'aflatossina B₁;

considerando che è necessario adeguare questi metodi all'evolversi delle conoscenze scientifiche e tecniche; che è opportuno in particolare disporre di un metodo che consenta di controllare i limiti molto scarsi di aflatossina fissati dalla direttiva 74/63/CEE del Consiglio, del 17 dicembre 1973, relativa alla fissazione di quantità massime per le sostanze e per i prodotti indesirabili negli alimenti per gli animali⁽⁴⁾, modificato da ultimo dalla direttiva 91/132/CEE⁽⁵⁾;

considerando che è utile inoltre disporre di un metodo atto a dosare l'aflatossina B₁ in presenza di sostanze interferenti che ostacolano le determinazioni, ad esempio gli agrumi;

considerando che le misure previste dalla presente direttiva sono conformi al parere del comitato permanente degli alimenti per gli animali,

HA ADOTTATO LA PRESENTE DIRETTIVA:

Articolo 1

L'allegato della direttiva 76/372/CEE è modificato conformemente all'allegato della presente direttiva.

Articolo 2

Gli Stati membri mettono in vigore le disposizioni legislative, regolamentari e amministrative, necessarie per conformarsi alle disposizioni della presente direttiva entro e non oltre il 1° ottobre 1993. Essi ne informano immediatamente la Commissione.

Quando gli Stati membri adottano tali disposizioni, queste contengono un riferimento alla presente direttiva o sono corredate da un siffatto riferimento all'atto della pubblicazione ufficiale. Le modalità di tale riferimento sono decise dagli Stati membri.

Articolo 3

Gli Stati membri sono destinatari della presente direttiva.

Fatto a Bruxelles, il 9 novembre 1992.

Per la Commissione

Ray MAC SHARRY

Membro della Commissione

⁽¹⁾ GU n. L 170 del 3. 8. 1970, pag. 2.

⁽²⁾ GU n. L 102 del 15. 4. 1976, pag. 8.

⁽³⁾ GU n. L 246 del 29. 8. 1981, pag. 32.

⁽⁴⁾ GU n. L 38 dell'11. 2. 1974, pag. 31.

⁽⁵⁾ GU n. L 66 del 13. 3. 1991, pag. 16.

ALLEGATO

- I. Nella parte A, « Metodo per cromatografia monodimensionale su strato sottile », il testo del punto 1, « Scopo e campo d'applicazione », viene sostituito dal testo seguente :

« 1. Scopo e campo d'applicazione

Il metodo permette di determinare il tasso di aflatoossina B₁ delle materie prime e dei prodotti per l'alimentazione semplici degli animali. Questo metodo non si applica in presenza di polpe di agrumi. Il limite inferiore del dosaggio è di 0,01 mg/kg (10 ppb).

In presenza di sostanze interferenti che intralciano le determinazioni, occorre ripetere l'analisi secondo il metodo B (cromatografia liquida ad alta pressione). »

- II. Nella parte B « Metodo di analisi su strato sottile bidimensionale », il testo viene sostituito dal seguente :

« B. DETERMINAZIONE DELL'AFLATOSSINA B₁ — METODO PER CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA RISOLUZIONE

1. Scopo e campo di applicazione

Viene proposto un metodo per la determinazione dell'aflatoossina B₁ negli alimenti di uso animale, inclusi quelli contenenti pastazzo di agrumi. Il limite minimo di determinazione è 0,001 mg/kg (1 ppb).

2. Principio

Il campione viene estratto con cloroformio. L'estratto è filtrato ed un'aliquota è purificata su cartuccia di florisil e poi su cartuccia di C₁₈. La separazione finale e determinazione sono ottenute per cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC) usando una colonna C₁₈ in fase inversa, seguita da una reazione di derivatizzazione post-colonna con soluzione acquosa di iodio e rivelazione per fluorescenza.

Nota :

Le microtossine sono sostanze molto tossiche. La determinazione si dovrebbe eseguire sotto cappa per fumi adibita a questo scopo. Speciali precauzioni si dovrebbero prendere quando le tossine si trovano allo stato secco a causa della loro natura elettrostatica e la tendenza a disperdersi nell'area di lavoro.

3. Reattivi

- 3.1. Cloroformio, stabilizzato con 0,5 %-1 % di etanolo, in peso. Vedere osservazione al punto 10.2.
- 3.2. Metanolo, grado HPLC, per la preparazione della miscela al punto 3.6.
- 3.3. Acetone.
- 3.4. Acetonitrile, grado HPLC.
- 3.5. Solventi eluenti : da preparare 1 giorno prima dell'uso, oppure degassarli mediante bagno ad ultrasuoni.
 - 3.5.1. Miscela di acetone (3.3) e acqua, 98 + 2 (v + v).
 - 3.5.2. Miscela di acqua e metanolo (3.2), 80 + 20 (v + v).
 - 3.5.3. Miscela di acqua e acetone (3.3), 85 + 15 (v + v).
- 3.6. Fase mobile per HPLC.

Miscela di acqua, metanolo (3.2) e acetonitrile (3.4), 130 + 70 + 40 (v + v + v).

N.B. : La composizione della fase mobile può essere modificata a seconda delle caratteristiche della colonna HPLC usata.
- 3.7. Soluzione acquosa satura di iodio. Aggiungere 2 g di iodio a 400 ml di acqua. Agitare mediante agitatore magnetico per almeno 90 minuti e filtrare attraverso filtro a membrana (4.15). Proteggere la soluzione satura dalla luce per prevenire effetti dovuti a fotodegradazione.
- 3.8. Celite 545 o equivalente trattata con acidi.
- 3.9. Cartuccia di florisil (Waters SEP-PAK), o equivalente.
- 3.10. Cartuccia C₁₈ (Waters SEP-PAK) o equivalente.
- 3.11. Gas inerte, per esempio azoto.

- 3.12. Soluzione standard di aflatoxina B₁ in cloroformio, concentrazione 10 µg/ml. Controllare la concentrazione della soluzione come segue: determinare lo spettro di assorbimento della soluzione fra 330 e 370 nm mediante spettrofotometro (4.23); misurare l'assorbanza (A) al massimo vicino a 363 nm; calcolare la concentrazione di aflatoxina B₁ in microgrammi per millilitro di soluzione mediante la formula:

$$\text{concentrazione } (\mu\text{g/ml}) = \frac{312 \times A \times 1000}{22300} = 13,991 \times A$$

- 3.12.1. Soluzione standard stock in aflatoxina B₁ in cloroformio.

Trasferire quantitativamente 2,5 ml della soluzione standard di aflatoxina B₁ (3.12) in un matraccio tarato da 50 ml portando a volume con cloroformio (3.1). Conservare questa soluzione, ben chiusa ed avvolta in un foglio di alluminio, in un posto fresco (4 °C) al buio.

- 3.13. Soluzione di calibrazione di aflatoxina B₁ per HPLC.

N.B.: Per la preparazione di questa soluzione usare vetreria preventivamente lavata con acido (vedi al punto 4, apparecchiatura).

- 3.13.1. Soluzione di calibrazione, 4 ng/ml.

Lasciar condizionare per qualche ora a temperatura ambiente la soluzione standard stock (3.12.1) avvolta in un foglio di alluminio. Trasferire 400 µl di questa soluzione (200 ng di aflatoxina B₁) in un pallone tarato da 50 ml ed evaporare la soluzione fino a secchezza per mezzo di una corrente di gas inerte (3.11). Sciogliere il residuo ottenuto con circa 20 ml della miscela acqua-acetone e miscelare bene, portare quindi a volume.

- 3.13.2. Soluzione di calibrazione 3 ng/ml.

Trasferire quantitativamente 7,5 ml della soluzione di calibrazione (3.13.1) in un matraccio da 10 ml e portare a volume con la miscela acqua-acetone (3.5.3) e miscelare bene.

- 3.13.3. Soluzione di calibrazione, 2 ng/ml.

Trasferire quantitativamente 25 ml della soluzione di calibrazione (3.13.1) in un matraccio da 50 ml e portare a volume con la miscela acqua-acetone (3.5.3) e miscelare bene.

Questa soluzione viene usata anche durante l'analisi per HPLC come standard di riferimento per le iniezioni ripetitive (5.5).

- 3.13.4. Soluzione di calibrazione 1 ng/ml.

Trasferire quantitativamente 2,5 ml della soluzione di calibrazione (3.13.1) in un matraccio da 10 ml e portare a volume con la miscela acqua-acetone (3.5.3) e miscelare bene.

- 3.14. Fiala contenente una miscela delle aflatoxine B₁, B₂, G₁ e G₂ la cui concentrazione è approssimativamente di 1, 0,5, 1 e 0,5 µg/ml rispettivamente in 1 ml di cloroformio.

- 3.14.1. Soluzione per il controllo cromatografico.

Trasferire il contenuto della fiala (3.14) in una provetta con tappo di vetro o in una fiala con tappo a vite. Trasferire 40 µl di questa soluzione in un matraccio da 10 ml o in una provetta con un tappo di vetro (lavati con acido). Evaporare il cloroformio mediante una corrente di gas inerte (3.11) e ridisciogliere in 10 ml della miscela acqua-acetone (3.5.3).

- 3.15. Reagenti per la prova controllo di conferma (6).

- 3.15.1. Soluzione acquosa satura di cloruro di sodio.

- 3.15.2. Solfato di sodio anidro, granulare.

4. Apparecchiatura

Attenzione: L'uso di vetreria non lavata con acidi può causare perdite di aflatoxina in soluzione acquosa. Particolare attenzione necessitano la vetreria nuova, le pipette Pasteur e la vetreria dei dispensatori automatici come ad esempio le fiale degli autocampionatori. Per questa ragione la vetreria da usare con le soluzioni acquose di aflatoxina dovrà essere immersa in acidi diluiti (ad esempio acido solforico 2 moli/l) per parecchie ore e sciacquata poi bene con acqua distillata per rimuovere ogni traccia di acido (ad esempio tre volte e controllo con cartine al tornasole). In pratica, questo trattamento è necessario per i matracci a fondo tondo (4.4), palloni tarati, cilindri graduati, fiale e provette per soluzioni di calibrazione ed estratti finali (in particolare, fiale per autocampionatori) e pipette Pasteur se usate per il prelievo di soluzioni di calibrazione o di estratti.

- 4.1. Mulino/miscelatore.

- 4.2. Setaccio con fori da 1,0 mm di diametro (ISO R 565).
- 4.3. Agitatore meccanico.
- 4.4. Evaporatore rotante da vuoto, munito di pallone a fondo tondo da 150-250 ml.
- 4.5. Apparecchiatura per cromatografia liquida ad alta risoluzione, iniettore con un avvolgimento a spirale adatto per iniezione da 250 µl. Vedere le istruzioni della ditta costruttrice per il parziale e completo riempimento dell'avvolgimento a spirale.
- 4.6. Colonna analitica per HPLC: C₁₈ impaccata, granuli da 3 o 5 µm.
- 4.7. Pompa a pulsazioni libere per l'erogazione post-colonna della soluzione di iodio.
- 4.8. Tubo a T per volume morto Valco zero, acciaio inossidabile (1/16" × 0,75 mm).
- 4.9. Sistema di reazione a spirale: teflon o acciaio inossidabile. Le dimensioni da 3 000 × 0,5 mm a 5 000 × 0,5 mm sono risultate appropriate in combinazione con colonne HPLC da 3 o 5 µm.
- 4.10. Bagno ad acqua con termostato regolato a 60 °C, capace di una regolazione di temperatura superiore a 0,1 °C.
- 4.11. Rivelatore a fluorescenza, regolato alla lunghezza d'onda di 365 nm di eccitazione ed a 435 nm di emissione (per strumento a filtri utilizzare un filtro con lunghezza d'onda maggiore di 400 nm). Devono essere possibili rivelazioni di almeno 0,05 ng di aflatossina B₁. Una leggera contropressione può essere consigliabile (ad esempio per mezzo di restrizione o connessione dell'uscita del rivelatore con una spirale di teflon o acciaio inossidabile) allo scopo di evitare formazione di bolle d'aria nella fotocellula.
- 4.12. Registratore con stampante.
- 4.13. Integratore elettronico (opzionale).
- 4.14. Filtro di carta pieghettato di diametro 24 cm del tipo Macherey-Nagel 617 1/4 o equivalente.
- 4.15. Filtro a membrana con porosità 0,45 µm, (HAWP 04700) Millipore o equivalente.
- 4.16. Beuta da 500 ml con tappo a smeriglio.
- 4.17. Colonna di vetro (diametro interno circa 1 cm, lunghezza circa 30 cm) con serbatoio superiore da 50 ml.
- 4.18. Rubinetto di materiale resistente al cloroformio (per esempio Bio-rad 7328017, Analytichem A1 6078, J.T. Baker 4514 o equivalente).
- 4.19. Siringa chimicamente resistente, capacità 10 ml.
- 4.20. Siringa idonea per iniezioni in HPLC di 250 µl.
- 4.21. Microsiringa da 100 µl per la preparazione delle soluzioni di calibrazione (controllare mediante pesata che l'accuratezza sia entro il 2 %).
- 4.22. Palloncini tarati da 10 ml con tappo a smeriglio.
- 4.23. Spettrofotometro, idoneo per misure nella regione UV.
- 4.24. Apparecchiatura per la prova di conferma (6).
- 4.24.1. Imbutto separatore da 100 ml, lavato con acidi, con rubinetto in teflon.
- 4.24.2. Piastra riscaldante, 40-50 °C.

5. Procedimento

5.1. Preparazione del campione

Macinare il campione in modo che esso passi attraverso i fori da 1 mm di luce del setaccio (4.2).

5.2. Porzione di campione per l'analisi

Pesare 50 g del campione in esame in una beuta (4.16).

5.3. Estrazione

Aggiungere 25 g di celite (3.8), 250 ml di cloroformio (3.1) e 25 ml di acqua. Tappare la beuta ed agitare per 30 minuti su agitatore meccanico (4.3). Filtrare su carta da filtro pieghettata (4.14). Raccogliere 50 ml del filtrato. Per campioni che richiedono diluizioni prelevare un'aliquota del filtrato e diluire fino a 50 ml con cloroformio in modo che la concentrazione di aflatossina B₁ non superi i 4 ng/ml.

5.4. Purificazione (il procedimento non dovrà subire significative interruzioni)

Attenzione:

— proteggere adeguatamente il laboratorio dove viene eseguita l'analisi dalla luce diurna con i seguenti accorgimenti:

- 1) Fogli assorbenti raggi UV sulla finestra in presenza di luce attenuata (evitare la luce diretta del sole);
 - 2) tende o persiane in combinazione con luce artificiale (sono idonei anche i tubi fluorescenti),
- le soluzioni contenenti aflatossina debbono essere protette il più possibile dalla luce (tenere al buio con fogli di alluminio).

5.4.1. Plurificazione con florisil SEP-PAK

5.4.1.1. Preparazione dell'assemblaggio colonna-cartuccia

Attaccare un rubinetto (4.18) al gambo più corto della cartuccia di florisil (3.8) (vedi figura 1). Lavare la cartuccia e rimuovere l'aria con 10 ml di cloroformio facendone passare 8 ml attraverso la cartuccia con l'aiuto di una siringa (4.19). Collegare il gambo lungo della cartuccia alla colonna (4.17) e far passare i rimanenti 2 ml della cartuccia alla colonna. Chiudere il rubinetto. Rimuovere la siringa.

5.4.1.2. Purificazione

Aggiungere il filtrato raccolto in 5.3 alla colonna-cartuccia già assemblate e scaricare per gravità. Lavare con 5 ml di cloroformio (3.1) seguiti da 20 ml di metanolo (3.2). Scartare gli eluati. Durante queste operazioni l'assemblaggio colonna-cartuccia non deve rimanere a secco. Eluire l'aflatossina B₁ con 40 ml della miscela acetone-acqua (3.5.1) e raccogliere l'intero eluato nel pallone da 150 ml dell'evaporatore rotante (4.4). Concentrare l'eluato nell'evaporatore a 40-50 °C sino al termine della distillazione dell'acetone (*NB*: A questo punto rimangono nel pallone circa 0,5 ml di liquido. Prove sperimentali hanno dimostrato che un'ulteriore evaporazione è opportuna e che nei rimanenti 0,5 ml di liquido non c'è significativa traccia di acetone. Residui di acetone potrebbero causare perdite di aflatossina B₁ nella cartuccia C₁₈). Aggiungere 1 ml di metanolo (3.2), agitare il pallone allo scopo di dissolvere l'aflatossina sulle pareti nel pallone, aggiungere 4 ml di acqua e miscelare. Disinserire e scartare la cartuccia. Lavare la colonna di vetro con acqua e conservarla per la successiva purificazione su C₁₈.

5.4.2. Purificazione su SEP-PAK C₁₈

5.4.2.1. Preparazione dell'assemblaggio colonna-cartuccia

Collegare un rubinetto (4.18) al gambo più corto di una cartuccia C₁₈ (3.10) (vedi figura 1). Caricare la cartuccia rimuovendo l'aria e facendo passare rapidamente 10 ml di metanolo (3.2) via rubinetto con l'aiuto della siringa (4.19) (le bolle d'aria nella cartuccia sono visibili come macchie di luce sul fondo altrimenti uniformemente grigiastro). Aspirare 10 ml di acqua e farne passare 8 ml nella cartuccia (nel passaggio da metanolo ad acqua evitare introduzioni di aria nella cartuccia). Collegare il gambo più lungo della cartuccia alla colonna di vetro (4.17) e far passare i rimanenti 2 ml dalla cartuccia alla colonna. Chiudere il rubinetto. Rimuovere la siringa.

5.4.2.2. Purificazione

Trasferire quantitativamente l'estratto raccolto in 5.4.1.2 nella colonna di vetro (4.17) lavando due volte il matraccio con 5 ml della miscela acqua-metanolo (3.5.2) e scaricare per gravità. L'insieme colonna-cartuccia non deve rimanere mai secco. (Se le bolle d'aria si sviluppano in prossimità della cartuccia interrompere il flusso e picchiettare la sommità della colonna per rimuovere le bolle d'aria. Poi continuare). Eluire con 25 ml della miscela acqua-metanolo. Scaricare l'eluato. Eluire l'aflatossina B₁ con 50 ml della miscela acqua/acetone (3.5.3), e raccogliere l'intero eluato in un palloncino tarato da 50 ml. Portare a volume con acqua ed agitare: questa soluzione è usata per la cromatografia (5.5).

Attenzione: Generalmente non è necessaria la filtrazione di questo estratto finale. In caso contrario non usare filtri di cellulosa perché causerebbero perdite di aflatossina ma, per esempio, filtri di teflon.

5.5. Cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC)

(Vedi figura 2 per la messa in opera dell'apparecchiatura). Prima dell'uso far condizionare per un tempo sufficiente lo strumento.

Nota 1:

Le velocità di flusso indicata per i solventi ed i reagenti post-colonna sono indicative. Esse possono essere variate in dipendenza del tipo di colonna disponibile.

Nota 2:

I picchi della aflatoxina B₁ dipendono dalla temperatura, quindi si dovrà effettuare una compensazione della deriva (vedi figura 3). Iniettando ad intervalli regolari una quantità fissa dello standard di riferimento di aflatoxina (3.13.3) (per esempio ogni tre iniezioni), i valori dei picchi di aflatoxina B₁ tra due successive iniezioni di standard possono essere corretti usando il valore medio dei risultati, sempreché la differenza fra i due valori delle risposte sia molto piccola (< 10 %). Perciò debbono essere fatte iniezioni senza interruzioni. Se è necessaria un'interruzione, l'ultima iniezione prima dell'interruzione e la prima iniezione dopo l'interruzione devono essere considerate standard di riferimento (3.13.3). Dato che la curva di calibrazione è lineare e passa per l'origine, le quantità di aflatoxina B₁ nei campioni estratti sono determinate direttamente riferendosi agli standards adiacenti.

5.5.1. Messa in funzione della pompa HPLC

Regolare la pompa HPLC (4.5) per avere un flusso di 0,5 o 0,3 ml/min per una colonna HPLC, rispettivamente di μm o 3 μm (4.6) usando la fase mobile indicata al punto 3.6.

5.5.2. Messa in funzione della pompa post-colonna

Regolare la pompa (4.7) in modo da avere un flusso di 0,2-0,4 ml/min della soluzione acquosa saturata di iodio (3.7). Come guida approssimativa: Flussi di circa 0,4 o 0,2 ml/min circa sono consigliati in combinazione con flussi della fase mobile (3.6) di 0,5 o 0,3 ml/min rispettivamente.

5.5.3. Rivelatore a fluorescenza

Regolare il rivelatore e fluorescenza (4.11) ad un'eccitazione = 365 nm ed un'emissione = 435 nm (per strumenti a filtri, lunghezza d'onda > 400 nm). Regolare l'attenuatore del rivelatore in modo da ottenere, per 1 ng di aflatoxina B₁, circa l'80 % di deflessione dell'intera scala del pennino del registratore.

5.5.4. Iniettore

Iniettare, per tutte le soluzioni, 250 μl seguendo sempre le indicazioni della ditta costruttrice dello strumento.

5.5.5. Controllo della separazione cromatografica

Iniettare la soluzione di controllo cromatografico (3.14.1). Le valli dei picchi dovrebbero essere meno del 5 % della somma delle altezze dei picchi adiacenti.

5.5.6. Controllo della stabilità del sistema

Prima di ogni serie di analisi iniettare ripetutamente lo standard di riferimento (3.14.3) sino al raggiungimento della stabilità del valore delle aree dei picchi (*NB*: la risposta dei picchi per l'aflatoxina B₁ tra due iniezioni consecutive dovrà essere meno del 6 %. Procedere senza ritardo con il controllo della linearità) (5.5.7).

5.5.7. Controllo della linearità

Iniettare le soluzioni di calibrazione dell'aflatoxina B₁ (3.13.1-3.13.4). Ogni 3 iniezioni usare lo standard di riferimento (3.13.3) per la correzione della deriva nella risposta (*NB*: in 90 minuti i valori dei picchi degli standards di riferimento non devono differire più del 10 %). Correggere per la deriva secondo le indicazioni delle formule al punto 7. Il grafico di calibrazione dovrebbe essere lineare e passare per l'origine entro $2 \times$ l'errore standard del valore di Y stimato. I valori trovati non devono differire più del 3 % dei valori teorici. Se quanto richiesto è soddisfatto, proseguire senza ritardo. Se non, identificare e quindi correggere le cause dell'anomalia prima di continuare.

5.5.8. Iniezione dei campioni estratti

Iniettare gli estratti dei campioni purificati (5.4.2.2). Dopo ogni due campioni estratti ripetere l'iniezione dello standard di riferimento (3.13.3) secondo tale sequenza: standard di riferimento, estratto, estratto, standard di riferimento, estratto, estratto, standard di riferimento, ecc.

6. Prova di conferma**6.1. Ulteriore trattamento dell'estratto (5.4.2.2)**

Aggiungere 5 ml della soluzione di cloruro di sodio (3.15.1) all'estratto finale ottenuto al punto 5.4.2.2. Estrarre 3 volte con 2 ml di cloroformio (3.1) per 1 minuto, usando un imbuto separatore (4.24.1).

Filtrare gli estratti di cloroformio su 1 gr circa di solfato di sodio (3.15.2) e raccogliere in una provetta da 10 ml. Si può usare un piccolo imbuto (diametro: 4 cm) ponendo un batuffolo di cotone nel punto di restrizione dell'imbuto che viene coperto con 1 gr di solfato di sodio. Lavare lo strato di solfato di sodio con pochi ml di cloroformio che vengono raccolti nella stessa provetta e portati a secco usando la piastra riscaldante (4.24.2) e riprendere con 1 ml di cloroformio.

6.2. *Preparazione della derivativa e cromatografia su strato sottile*

Vedi direttiva 76/372/CEE del Consiglio, allegato, metodo A, punto 5.6.2.

7. **Calcolo dei risultati**

Calcolare il contenuto dell'aflatossina B₁ (µg/kg) presente nel campione usando la formula:

$$\text{aflatossina B}_1 (\mu\text{g/kg}) = \frac{m \times V_{\text{ext}}}{V_m \times M \times \frac{V_f}{V_c}}$$

dove:

m = quantità di aflatossina B₁ in ng, rappresentata dal picco del campione e calcolata nel modo seguente:

$$m = \frac{P(\text{campione})}{P(\text{st}_1) + P(\text{st}_2)} \times 2 r(\text{st})$$

P(campione)

= area picco aflatossina B₁ del campione

P(st₁) = area picco aflatossina B₁ risultante dalla precedente iniezione dello standard di riferimento (3.13.3)

P(st₂) = area picco aflatossina B₁ risultante dalla successiva iniezione dello standard di riferimento (3.13.3)

r(st) = quantità di aflatossina B₁ dello standard di riferimento (3.13.3) iniettato in g

V_m = volume del campione estratto iniettato in ml

V_{ext} = volume finale dell'estratto del campione in ml, conseguente ad ogni diluizione effettuata (vedi punto 5.3)

M = massa del campione in g

V_f = volume del filtrato trasferito sulla cartuccia di florisil (5.4.1.2) in ml

V_c = volume del cloroformio, usato per l'estrazione del campione, in ml

Se il procedimento seguito è lo stesso di questo protocollo, la formula ridotta finale è la seguente:

il contenuto di aflatossina B₁ in (µg/kg) = 20 × m

7.1. Il calcolo dei risultati si può fare anche misurando l'altezza dei picchi.

8. **Ripetibilità**

Vedi al punto 10.1 (osservazioni).

9. **Riproducibilità**

Vedi al punto 10.1.

10. **Osservazioni**

10.1. *Precisazione*

Un studio collaborativo⁽¹⁾, condotto a livello internazionale su mangimi composti, ha fornito i valori relativi alla ripetibilità e riproducibilità, i cui risultati sono indicati in tabella 1. Il termine ripetibilità (r), qui usato, è definito come il rapporto più ampio non significativo al livello di probabilità del 95 %, confrontando due letture dello stesso campione nel medesimo laboratorio alle stesse condizioni. Il termine riproducibilità (R) è definito allo stesso modo confrontando due diversi laboratori. In base a quanto stabilito da ISO 3534-1977, 2.35⁽²⁾ e dalla decisione 89/610/CEE della Commissione⁽³⁾, r e R sono anche indicate in tabella 1 in termini di coefficienti di variazione.

Tabella 1

Ripetibilità (r) e riproducibilità (R) espresse come rapporti e coefficienti di variazione corrispondenti

(15 laboratori)

Livello	r	R	CV _r (%)	CV _R
(µg/kg)			(%)	(%)
8 e 14	1,4	1,7	11	18

(%) CV = coefficiente di variazione.

⁽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⁾ GU n. L 351 del 2. 12. 1989, pag. 39.

10.2. Stabilizzazione del cloroformio (3.1)

Le caratteristiche di assorbimento della cartuccia di florisil si possono cambiare se vengono usati altri stabilizzatori diversi dall'alcol. Ciò si può verificare in accordo al punto 10.3 quando non è disponibile il cloroformio indicato.

10.3. Accuratezza

La corretta applicazione del metodo dovrà essere verificata facendo ripetute analisi su materiali di riferimento certificati. Se questi non sono disponibili, l'idoneità del metodo si verificherà con altre prove di recuperi effettuati su campioni di controllo. La deviazione della media dal valore reale, espressa come percentuale del valore reale, non dovrà porsi fuori dai limiti $- 20 \%$, $+ 10 \%$.

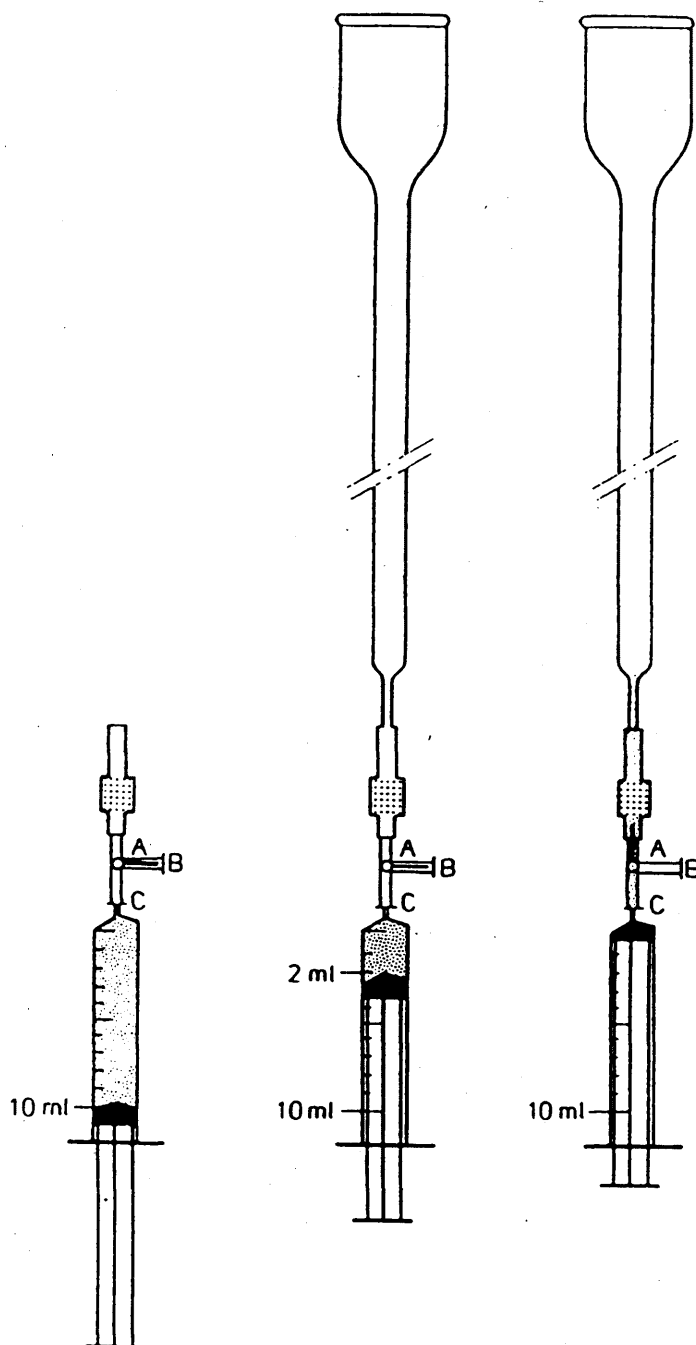
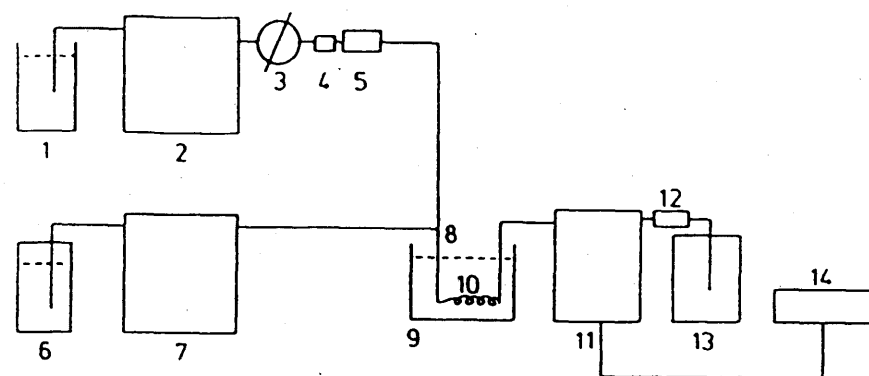


Figura 1: Assemblaggio colonna-cartuccia



- | | |
|--------------------------------|--|
| 1. Fase mobile | 8. Giunto a T |
| 2. Pompa | 9. Bagno con controllo termostatico |
| 3. Valvola d'iniezione | 10. Avvolgimento di reazione a spirale |
| 4. Precolonna (salvacolonna) | 11. Rivelatore di fluorescenza |
| 5. Colonna analitica HPLC | 12. Tubo di restringimento |
| 6. Soluzione saturata di iodio | 13. Scarico |
| 7. Pompa del reagente | 14. Registratore, integratore |

Figura 2: Diagramma di flusso del sistema di cromatografia liquida (CL) e derivatizzazione post-colonna con iodio

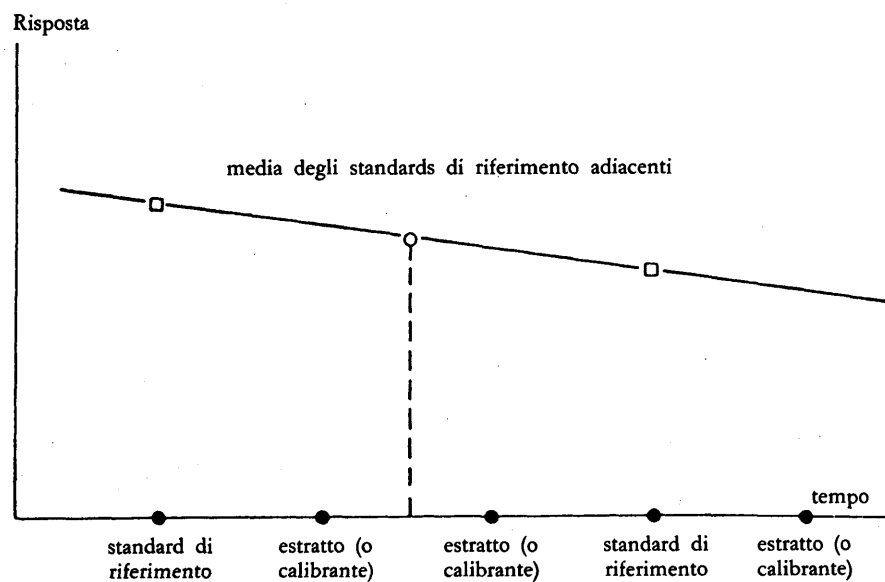


Figura 3: Compensazione per la deriva nella risposta di aflatossina B₁ all'iniezione dello standard di riferimento (3.13.3) ad intervalli regolari »