

31992L0095

L 327/54

IL-ĠURNAL UFFIĊJALI TAL-KOMUNITAJIET EWROPEJ

13.11.1992

ID-DIRETTIVA TAL-KUMMISSJONI 92/95/KEE**tad-9 ta' Novembru 1992****Li temenda l-Anness tas-Seba' Direttiva 76/372/KEE li tistabbilixxi l-metodi tal-Komunità ta' l-analiżi għall-kontroll uffiċjali tal-materjali ta' l-għalf**

IL-KUMMISSJONI TAL-KOMUNITAJIET EWROPEJ,

Wara li kkonsidrat it-Trattat li jstabbilixxi il-Komunità Ekonomika Ewropea,

Wara li kkonsidrat id-Direttiva tal-Kunsill 70/373/KEE ta' l-20 ta' Lulju 1970 dwar l-introduzzjoni tal-metodi tal-Komunità tal-kampjunar u l-analiżi għall-kontroll uffiċjali tal-materjali ta' l-għalf ⁽¹⁾, kif l-aħhar emendata bl-Atti ta' l-Adeżjoni ta' Spanja u l-Portugall, u partikolarment l-Artikolu 2 tagħha,

Billi s-Seba' Direttiva tal-Kummissjoni 76/372/KEE ta' l-1 ta' Marzu 1976 tistabbilixxi metodi ta' l-analiżi tal-Komunità għall-kontroll uffiċjali tal-materjali ta' l-għalf ⁽²⁾, kif emendata bid-Direttiva 81/680/KEE ⁽³⁾, tippreskrivi l-metodi li għandhom ukunu wżati għad-determinazzjoni ta' l-aflatossin B1;

Billi hemm bażi għal adattazzjoni ta' dawn il-metodi fid-dawl ta' l-avvanzi fit-tgħarif xjentifiku u tekniku; billi huwa partikolarment rakkommandabbli li jkun hemm metodu disponibbli għall-kontroll ta' limiti ferm baxxi ta' l-aflatossin kif stabbiliti bid-Direttiva tal-Kunsill 74/63/KEE tas-17 ta' Diċembru 1973 dwar l-iffissar tal-livelli massimi permissibbli għal sustanzi u prodotti mhux mixtieqa fin-nutrimenti ta' l-annimaliu ⁽⁴⁾, kif l-aħhar emendata bid-Direttiva 91/132/KEE ⁽⁵⁾;

Billi huwa wkoll rakkommandabbli li jkun hemm disponibbli metodu għad-determinazzjoni ta' l-aflatossin B1 fil-preżenza ta' sustanzi li jfixxlu, bħal ma hija l-polpa taċ-ċitru;

Billi l-miżuri li hemm dispożizzjoni dwarhom f'din id-Direttiva huma bi qbil ma l-opinjoni tal-Kumitat Permanenti tal-Materjali ta' l-Għalf;

ADDOTTAT DIN ID-DIRETTIVA:

Artikolu 1

L-Anness tad-Direttiva 76/372/KEE huwa emendat bi qbil ma l-Anness ta' din id-Direttiva.

Artikolu 2

Istati Membri għandhom idahhlu fid-dehh sa mhux aktar tard mill-1 ta' Ottubru 1993, ir-regolamenti u disposizzjonijiet amministrattivi mehtieqa sabiex dawn ikunu konformi ma' din id-Direttiva. Għandhom minnufieh jinfurmaw lill-Kummissjoni dwar dan.

Meta Stati Membri jadottaw dawn id-dispożizzjonijiet, dawn għandhom ikollhom referenza għal din id-Direttiva jew għandhom ikunu akkumpanjati b'tali referenza fil-waqt tal-publikazzjoni uffiċjali tagħhom. Il-proċedura għal din ir-referenza għandha tkun adottata mill-Istati Membri.

Artikolu 3

Din id-Direttiva hija ndirizzata lill-Istati Membri.

Magħmula fi Brussel, fid-9 ta' Novembru 1992.

Għall-Kummissjoni

Ray MAC SHARRY

Membri tal-Kummissjoni

⁽¹⁾ ĠU L 170, tat-3.8.1970, p. 2.

⁽²⁾ ĠU L 102, tal-15.4.1976, p. 8.

⁽³⁾ ĠU L 246, tad-29.8.1981, p. 32.

⁽⁴⁾ ĠU L 38, tal-11.2.1974, p. 31.

⁽⁵⁾ ĠU L 66, tat-13.3.1991, p. 16.

L-ANNESS

- I. Taht il-Parti A "Il-metodu kromatografiku ta' saff irqieq dimensjoni-unika" it-test fil-punt 1 "Għan u Skop" huwa mibdul bit-test li ġej:

"1. Għan u skop

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

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

- II. Taht il-Parti B "Il-metodu kromatografiku ta' saff irqieq dimensjoni-doppja" it-test huwa mibdul b'dan li ġej:

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

1. L-Għan u l-iskop ta' dan

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

2. Prinċipju

Il-kampjun huwa estratt bil-kloroform. L-estratt huwa iffiltrat u porzjon ta' alikwot huwa purifikat f'kapsula Florisil segwit b'kapsula C18. Is-separazzjoni u d-determinazzjoni finali tkun akkwistata bil-kromatografija likwida ta' mġieba għola (HPLC) bl-użu ta' kolonna C18 fażi maqluba, segwita bid-derivattizzazzjoni ta' wara-l-kolonna bil-jodju fl-ilma, u s-sejbien floroxxenti.

Nota:

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

3. Reaġenti

- 3.1. Kloroform, stabilizzat bi 0,5 sa 1,0 % ta' etanol, bil-massa. Ara l-osservazzjoni 10.2.
- 3.2. Metanol, grad HPLC għall-preatazzjoni ta' 3.6.
- 3.3. Aċetun.
- 3.4. Aċetonitril, grad HPLC.
- 3.5. Solventi elutenti: Ipprepara jum bil-quddiem qabel l-użu, jew nehhi l-arja mis-solventi b'mod ultrasoniku.
 - 3.5.1. Tahlita ta' aċetun (3.3) u ilma, 98 + 2 (v + v).
 - 3.5.2. Tahlita ta' ilma u metanol (3.2), 80 + 20 (v + v).
 - 3.5.3. Tahlita ta' ilma u aċetun (3.3), 85 + 15 (v + v).
- 3.6. Fażi mobbli għal Tahlita HPLC ta' ilma, metanol (3.2) u aċetonitril (3.4), 130 + 70 + 40 (v + v + v).

NB: Il-komposizzjoni tas-solvent fil-fażi mobbli tista tkun teħtieġ li tgi aġġustata, jiddependi mill-karatteristiċi tal = kolonna HPLC kif użta.
- 3.7. Tahlita ta' jodju saturat: zid 2 g ta' jodju ma 400 ml ilma. Hallat għal mill-anqas 90 min u iffiltra minn filtru tal-membrana (4.15). Ipprotiegi t-tahlita saturata mid-dawl sabiex ma thallix li jkun hemm fotodegradazzjoni.
- 3.8. Ċellulit maħsul bl-aċidu 545, jew ekwivalenti.
- 3.9. Kapsula florisil (ilmijiet SEP-PAK), jew ekwivalenti.
- 3.10. Kapsula C18 (ilmijiet SEP-PAK), jew ekwivalenti.
- 3.11. Gass inert, e.g. nitroġenu.

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

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

- 3.12.1. Aflatossin B1 hażna ta' tahlita normali fil-kloroform

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

- 3.13. Tahlitiet tal-kalibrazzjoni aflatossin B1 HPLC.

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

- 3.13.1. Tahlita tal-kalibrazzjoni 4mg/ml.

Ippermetti l-garafina volumetrika bit-tahlita normali tal-ħażna (3.12.1) li tidhon sat-temperatura tal-kamra fil-liga ta' l-aluminju (għal fiit siegħat). Ittrasferixxi 400 ml mit-tahlita normali tal-ħażna (200 ng aflatossin B1) lejn garafina volumetrika 50 ml, u evapora t-tahlita lejn tnixxif f'kunnert ta' gass inert (3.11).

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

- 3.13.2. Tahlita tal-kalibrazzjoni 3 ng/ml.

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

- 3.13.3. Tahlita tal-kalibrazzjoni 2 ng/ml.

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

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

- 3.13.4. Tahlita tal-kalibrazzjoni 1 ng/ml.

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

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

- 3.14.1. Tahlita tat-test kromatografiku.

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

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

- 3.15.1. Tahlita ta' klorid tas-sodju saturat.

- 3.15.2. Sulfat tas-sodju, anidridu, granulari.

4. Twissija dwar l-apparat:

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

- 4.1. Tahlit-thin.

- 4.2. Gharbiel b'toqob ta' daqs 1,0 mm, (ISO R 565).
- 4.3. Ċekċieka mekkanika
- 4.4. Evaporatur rotanti tal-vakwu, mghammar bi 150 sa 250 ml garafina bil-qiegh tonf.
- 4.5. Kromatografiku likwidu ta; mġieba għolja, injettur bid-dawra tajjeb għall-injezzjoni ta' 250 ml. Ara l-istruzzjonijiet tal-manifattur għall-mili parzjali jew komplut tad-dawra.
- 4.6. Kolonna analitika HPLC: 3 mm jew 5 mm ippakkjar C18.
- 4.7. Pompa mingħajr skossi għall-forniment tar-reagent tal-jodju ta' wara l-kolonna.
- 4.8. Tee b'volum mejjet ta' Valco zero, azzar inossidabbli (1/16 × 0,75 mm).
- 4.9. Tkebbib spirali tar-reazzjoni; Teflon jew azzar inossidabbli. Qisien ta' 3 000 × 0,5 mm to 5 000 × 0,5 mm kienu nstabu li huma xierqa flimkien ma kolonni 5 mm jew 3 mm HPLC.
- 4.10. Banju ta' l-ilma ikkontrollat b'mod termostatiku agġustat għall-60 °C, li jkista jkun bit-temperatura irregolata ta' ahjar minn 0,1 °C.
- 4.11. Sejjebu floroxxenti, b'eċitament fi 365 nm u emissjoni fi 435 nm *wavelengths*. (Għall-istrument tal-filtragg: emissjoni *wavelength* > 400 nm). Sejbien ta' mill-anqas 0,05 ng aflatossin għandu jkun possibbli. Xi pressjoni b-lura tista tkun rakkommandabbli (e.g. restrittur, tkebbib tat-Teflon jew ta' l-azzar inossidabbli fit-tarf tas-sejjebi), sabiex inaqqas il-bżieža ta' l-arja fiċ-ċellola tan-nixxija.
- 4.12. Reġistratur tal-grafika tat-tqaxxir.
- 4.13. Integratur elettroniku (voluntarju).
- 4.14. Karta ta' filtru skanalaturata, dijametru: 24 cm, Macherey-Nagel 617 1/4 jew ekwivalenti.
- 4.15. Filtru tal-membrana bil-pori tad-daqs 0,45 mm, Millipore HAWP 04700 jew ekwivalenti.
- 4.16. Garafina konika bit-tapp tal-ħġieg, 500 ml.
- 4.17. Kolonna tal-ħġieg (diametru interna ta' madwar 1 cm, tul ta' madwar 30 cm) mghammra bil-ponta Luer.
- 4.18. Stopcock (vit) Luer rezistenti għall-klorofilla (e.g. Bio-rad 7328017, Analytichem A1 6078, J.T. Baker 4514 jew ekwivalenti).
- 4.19. Siringa rezistenti għall-kimika, connettur 10 ml Leur.
- 4.20. Singa tajba għall-injezzjoni HPLC ta' 250 ml (ara 4.5).
- 4.21. Mikrisiringa 100 ml għall-preparazzjoni tat-tahlitiet tal-kalibrazzjoni (ivverifika li l-eżattezza tkun fi hdan 2 %, permezz ta' l-użin).
- 4.22. Tubi ikkalibrati 10 ml bit-tapp tal-ħġieg.
- 4.23. Spektrofotometru, tajjeb biex iwettaq kejl fir-reġjun UV tal-ispektru.
- 4.24. Apparat għat-test tal-konformità (6).
- 4.24.1. Lembut tas-separazzjoni, 100 ml, imlaħaġ bl-aċidu, bil-vit tat-Teflon.
- 4.24.2. Blokk tas-shana, 40 sa 50 °C.

5. Proċedura

5.1. Thejjija tl-kampjun.

Ishaq il-kampjun hekk li jkun jista jghaddi mill-għarbiel (4.2).

5.2. Porzjon tat-test.

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

5.3. Estrazzjoni;

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

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

Attenzjoni:

— ipprottiġi l-laboratorju, ta; fejn issehh l-analizi, b'mod adegwat mid-dawl tal-jum. Dan jista jsehh b'mod effettiv bl-użu ta':

- (i) Liega li tassorbixxi l-UV għal fuq it-twieqi flimkien ma dawl baxx (l-ebda dawl dirett tax-xemx);
- (ii) Purtieri jew dendili flimkien ma dawl artifiċjali (tubi florixxenti huma aċċettabbli);

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

5.4.1. Purifikazzjoni Florisil SEP-PAK

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

Wahhal it-vit (4.18) ma l-oistemma l-qasirata' kartuċċa Florisil (3.9) (ara l-figura 1). Aħsel il-kartuċċa u nehhi l-ghhajnuna billi tiehu 10 ml kloroform (3.1) u għaddi malajr 8 ml mil-vit matul il-kartuċċa bl-użu ta' siringa (4.19). Wahhal l-oistemma t-twila tal-kartuċċa ma kolonna tal-ħġieġ (4.17) u għaddi il-kumplement ta' 2 ml kloroform mill-kartuċċa lejn il-kolonna. Ghalaq il-vit. Nehhi s-siringa.

5.4.1.2. Purifikazzjoni:

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

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

5.4.2. Purifikazzjoni C₁₈ SEP-PAK

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

Wahhal il-vit (4.18) ma l-oistemma l-qasira tal-kartuċċa C18 (3.10) (ara l-figura 1). Ikkarga l-kartuċċa u nehhi kwalunkwe arja billi tghaddi 10 ml metanol (3.2) b'heffa mill-vit matul il-kartuċċa bis-siringa (4.19) (il-bzieżaq ta' l-arja fil-kartuċċa huma vizibbli bhala tikkek tad-dawl jew inkella fuq sfond griż). Hu 10 ml ilma, u għaddi 8 ml matul il-kartuċċa (Evita l-introduzzjoni ta' l-arja fil-kartuċċa, meta tkun qiegħed taqleb mill-metanol għall-ilma). Wahhal l-oistemma t-twila tal-kartuċċa ma kolonna tal-ħġieġ (4.17) u għaddi il-kumplement ta' 2 ml mill-kartuċċa lejn il-kolonna. Ghalaq il-vit. Nehhi s-siringa.

5.4.2.2. Purifikazzjoni:

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

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

5.5. Kromatografija likwida ta' mġieba għolja

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

Nota 1:

Ir-rati tan-nixxija kif mħurija għall-fażi mobbli u r-reagent ta' wara-il-kolonna huma biss indikattivi. Dawn jistgħu ikunu jehtieġu aġġustament, jiddependi mill-karatteristiċi tal-kolonna HPLC.

Nota 2:

Ir-reazzjoni tas-sejjebi għall-aflatossin B1 tiddependi mit-temperatura, għalhekk kumpens għandu jsir għaċ-ċaqlieq (ara l-Figura 3). Bl-injezzjoni ta' ammont fiss ta' l-aflatossin B1 b'għala referenza normali (3.13.3) matul intervalli regolari (i.e. kull tlett injezzjonijiet), il-valuri quċċata ta' l-aflatossin B1 bejn dawn ir-referenzi normali jistgħu ikunu ikkorreġuti bl-użu tar-reazzjoni medja, basta li d-differenza bejn ir-reazzjoni konsekuttivi tan-normi ta' referenza tkun ferm żgħira ($< 10\%$). Għalhekk l-injezzjonijiet għandhom isehhu mingħajr interruzzjonijiet. Jekk interruzzjoni tkun mehtieġa, l-aħħar injezzjoni qabel l-interruzzjoni u l-ewwel injezzjoni wara l-interruzzjoni għandhom ikunu n-norma ta' referenza (3.13.3). Minhabba li l-kurva tal-kalibrazzjoni hija lineari u tgħaddi matul l-orijini, l-ammonti ta' l-aflatossin B1 fl-estratti tal-kampjun huma determinati direttament b'referenza għan-normi tal-biswit.

5.5.1. It-tqegħid tal-pompa HPLC:

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

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

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

5.5.3. Sejjebi florixxenti:

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

5.5.4. Injettur:

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

5.5.5. Verifika tas-separazzjoni kromatografika

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

5.5.6. Ivverifika l-istabbilita tas-sistema:

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

5.5.7. Verifika tal-linearità:

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

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

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

6. Test tal-konferma

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

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

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

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

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

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

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

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

meta:

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

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

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

P (st₁) = żona tal-quċċata ta' aflatossin B1 li tiorriżulta mill-injezzjoni preċedenti tat-tahlita normali ta' referenza (3.13.3)

P (st₂) = żona tal-quċċata ta' aflatossin B1 li tiorriżulta mill-injezzjoni segwenti tat-tahlita normali ta' referenza (3.13.3)

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

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

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

M = massa tal-kampjun fi g

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

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

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

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

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

8. **Repetabbiltà:**

Ara taht 10.1

9. **Reproduċibbiltà:**

Ara taht 10.1

10. **Osservazzjonijiet:**

10.1. *Preciżjoni:*

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

Tabella 1:

Repetabbiltà (r) u reproduċibbiltà (R) espressi bħala relattivitàjiet u ko-effiċjenti korrespondenti tal-varjazzjoni (15 il-laboratorju)

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

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

⁽¹⁾ Egmond, H.P. van, Heisterkamp, S.H. and Paulsch, W.E. (1991). Additivi u Kontaminati ta' l-Ikel 8, 17-29.

⁽²⁾ ISO 3534-1977.

⁽³⁾ ĠU L 351, tat-2.12.1989, p. 39.

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

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

10.3. *Eżattezza:*

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

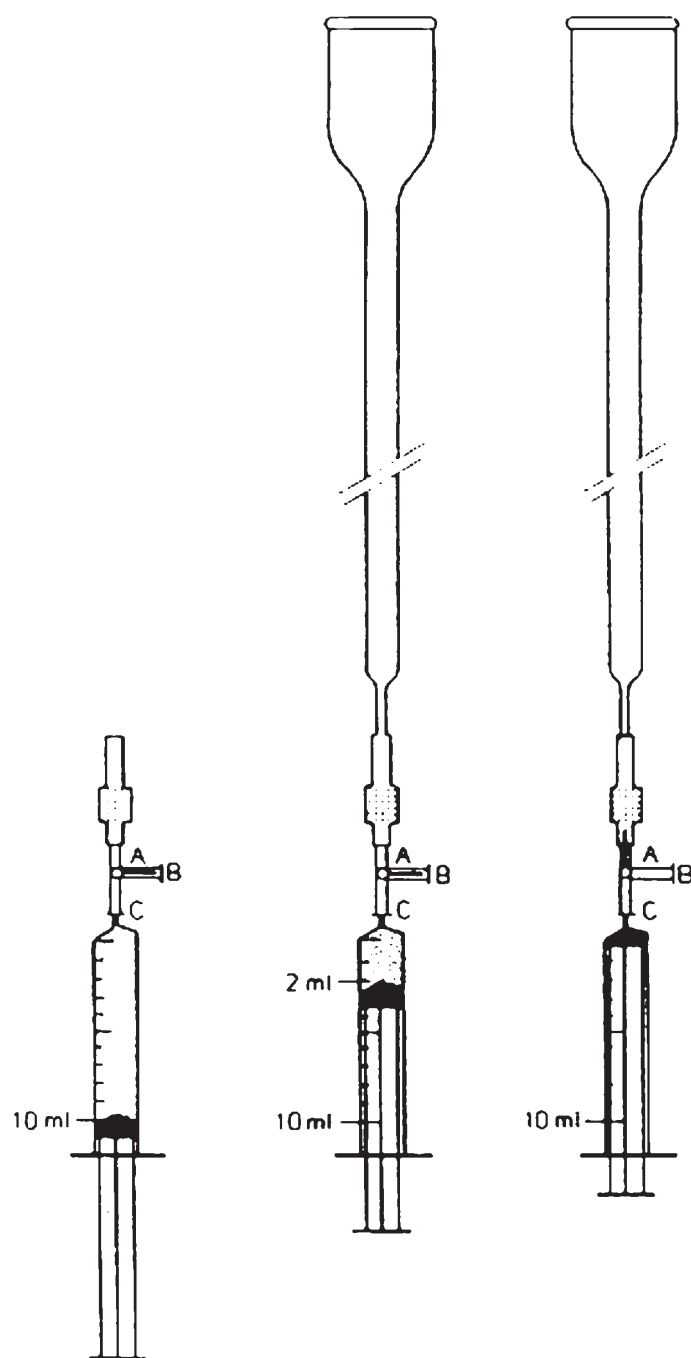
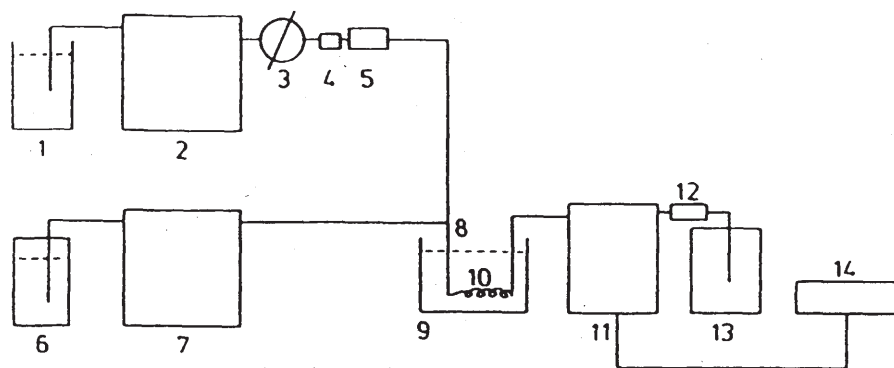


Figura 1: Assemblea tal-kartuċċa-kolonna



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

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

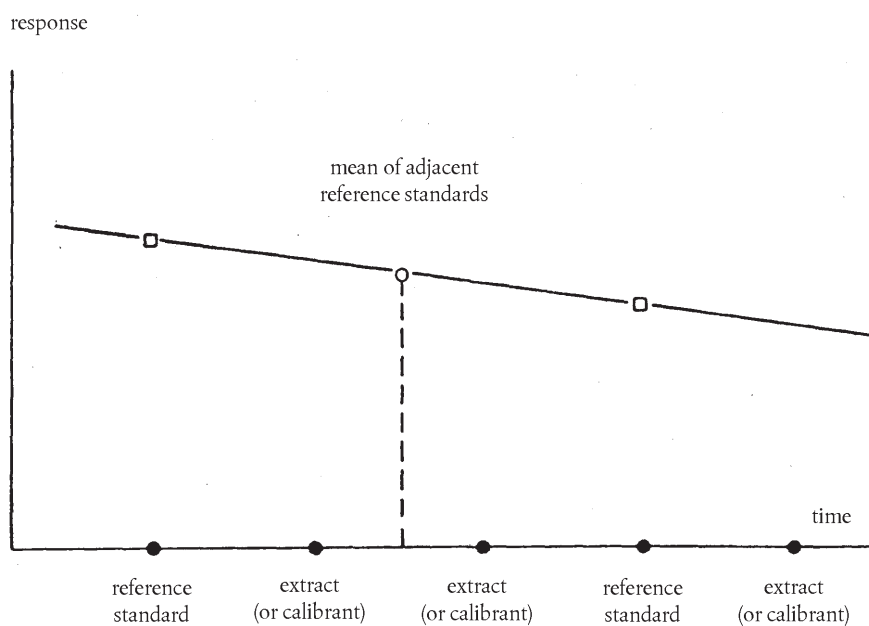


Figura 3: Kummpens għaċ-ċaqlieq fir-reazzjoni ta' l-aflatossin B1 bl-injezzjoni tan-norma ta' referenza (3.13.3) matul intervalli regolari