A.L. 285 ta' l-2005

ATT DWAR IS-SERVIZZI VETERINARJI
(KAP. 437)

Regoli ta' l-2005 dwar Metodi ta' Analiżi għall-Kontroll Uffiċjali ta' l-Għalf

BIS-SAĦĦA tas-setgħat mogħtija bl-artikolu 25 ta' l-Att dwar is-Servizzi Veterinarji, il-Ministru ta' l-Affarijiet Rurali u l-Ambjent għamel dawn ir-regoli li ġejjin:-

Titolu u skop.

1. (1) It-titolu ta' dawn ir-regoli hu Regoli ta' l-2005 dwar Metodi ta' Analiżi għall-Kontroll Uffiċjali ta' l-Għalf.

(2) L-iskop ta' dawn ir-regoli hu l-implimentazzjoni tar-regoli mniżżlin taħt id-Direttiva tal-Kunsill ta' l-Unjoni Ewropea 76/372/KEE dwar il-metodi ta' analiżi għall-kontroll uffiċjali ta' l-għalf.

Tifsir.

2. Għall-għan ta' dawn ir-regoli –

"awtorità kompetenti" tfisser is-Servizzi Veterinarji f'Malta kif provdut bl-artikolu 2 ta' l-Att dwar is-Servizzi Veterinarji, jew kull awtorità oħra fejn dik ir-responsabbiltà tkun ġiet delegata lilha mis-Servizzi Veterinarji.

Analisi tal-kontenut ta' *aflatoxin* B_1.

3. L-awtorità kompetenti għandha tara li kull analisi ta' għalf għall-kontroll uffiċjali, fir-rigward tal-kontenut tagħhom ta' *aflatoxin* B_1, issiru skond il-metodi deskritti fl-Iskeda li tinsab ma' dawn ir-regoli.

SKEDA

KIF JIĠI STABBILIT L-AFLATOXIN B_1

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

1. Għan u skop

Il-metodu jagħmilha possibli li jkun determinat il-livell ta' aflatoxin B_1 f'materjal mhux ipproċessat u f'għalf mhux maħdum. Dan il-metodu ma jistax jiġi applikat fil-preżenza ta' polpa taċ-ċitru. L-inqas limitu li għandu jiġi stabbilit huwa 0,01 mg/kg (10 ppb).

Fil-preżenza ta' sustanzi li jinterferixxu huwa neċessarju illi tkun ripetuta l-analisi billi jintuża metodu B (kromatografija likwida f'attività għolja)

2. Prinċipju

Il-kampjun huwa soġġett għall-estrazzjoni bil-kloroform. L-estratt jiġi ffiltrat, u porzjon ta' *aliquot* huwa meħud u purifikat b'kromotografija kolonizzata fuq ġel tas-silika. L-*eluate* huwa evaporat u r-residwu jiġi mħoll mill-ġdid f'volum ta' kloroform speċifikat jew f'taħlita ta' *benzene* u *acetonitrile.* Proporzjon ta' *aliquot* ta' din it-taħlita jiġi assoġġettat għall-kromotografija ta' saff irqiq (TLC). Il-kwantità ta' *aflatoxin B_1* jiġi stabbilit taħt irradjazzjoni UV tal-kromatogramm, kemm visibbli jew bi *fluorodensitrometry,* f'paragun ma' kwantitajiet magħrufa ta' *standard* ta' *aflatoxin B_1*. L-identita' ta' *aflatoxin B_1* estratt mill-għalf għandu jkun konfermat bil-proċedura indikata.

3. Ri-aġenti

NB: Ir-riaġenti kollha għandhom ikunu ta' kwalità ta' 'riaġent analitiku' sakemm mhux imniżżel mod ieħor.

3.1 *Acetone.*

3.2 Kloroform, stabilizzat b' 0·5 sa 1·0 % ta' 96 % ta' etanol (v/v).

3.3 *N-hexane*.

3.4 Metanol.

3.5 Eteru a*nhydrous diethyl*, liberu minn *peroxides*.

3.6 Taħlita ta' *benzene* u *acetonitrile*: 98/2 (v/v).

3.7 Taħlita ta' kloroform (3.2) u metanol (3.4): 97/3 (v/v).

3.8 Ġel tas-silika, bil-qies ta' partiċella minn 0·05 sa 0·20 mm, għal kromatografija f'forma ta' kolonna.

3.9 Tajjar assorbenti, li ġie trattat minn qabel bil-kloroform jew suf tal-ħġieġ *(glass wool).*

3.10 Sulfat tas-sodju, *anhydrous,* kristallizzat.

3.11 Gass inert, eż. nitroġenu.

3.12 1 N *Hydrochloric acid.*

3.13 50% (v/v) aċtu tal-kubrit.

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

3.15 Ġel tas-silika G-HR jew ekwivalenti, għat-TLC.

3.16 Taħlita *standard* b'xi 0·1 µg ta' *aflatoxin* B_1 kull ml fil-kloroform (3.2) jew fit-taħlita ta' *benzene/acetonitrile* (3.6), preparata u kkontrollata kif indikat f'Sezzjoni 7.

3.17 Taħlita *standard* għal skopijiet ta' testijiet kwalitattivi li fiha xi 0·1 µg ta' *aflatoxin* B_1 u B_2 kull ml fil-kloroform (3.2) jew fit-taħlita ta' *benzene/acetonitrile* (3.6). Dawn il-konċentrazzjonijiet huma mogħtija bħala gwida. Huma għandhom ikunu aġġustati sabiex tinkiseb l-istess intensità ta' florexxent għaż-żewġ *aflatoxins.*

3.18 Solventi li jiżviluppaw:

3.18.1 Kloroform (3.2)/*acetone* (3.1): 9/1 (v/v), tank mhux saturat;

3.18.2 Eteru *diethyl* (3.5)/metanol (3.4)/ilma: 96/3/1 (v/v/v), tank mhux saturat;

3.18.3 Eteru *diethyl* (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. *Grinder-mixer.*

4.2. Apparat li jħawwad jew kalamita li tħawwad.

4.3. Karta xuga f'forma ta' lembut, *Schleicher and Schüll No 588* jew ekwivalenti, dijametru: 24 ċm.

4.4. Tubu tal-ħġieġ għall-kromatografija (dijametru intern: 22 mm, tul: 300 mm), b'tapp tal-PTFE u kontenitur ta' riserva ta' 250 ml.

4.5. *Rotary vacuum evaporator,* bi flixkun bil-qiegħ tond ta' 500-ml.

4.6. Fliexken konikali qies 500-ml, b'tappijiet ta' *ground-glass.*

4.7. Apparat TLC

4.8. Platti tal-ħġieġ għat-TLC, 200 x 200 mm, preparati kif ġej (il-kwantitajiet indikati huma suffiċjenti biex ikopru ħames platti). Poġġi 30 g ta' ġel tas-silika G-HR (3.15) fi flixkun konikali. Żid 60 ml ta' ilma, għalaq u ħawwad għal minuta. Ferrex is-sospensjoni fuq il-platti biex tikseb saff uniformi ta' ħxuna 0·25mm. Ħalli jinxef fl-arja u wara aħżnu f'dessikkatur li fih il-ġel tas-silika. Matul l-użu, attiva l-platti billi żżommhom fil-forn għal siegħa f'temperatura ta'110 ^{o}C.

Platti lesti biex jintużaw huma adatti jekk jagħtu riżultati simili għal dawk miġburin minn platti preparati kif indikat hawn fuq.

4.9. Lampa UV b'*wavelength* twila (360 nm). L-intensità ta' l-irridazzjoni għandha tagħmilha possibli illi tikka ta' 1 ng ta' *aflatoxin* B_1 tibqa' tingħaraf ċar fuq platt tat-TLC f'distanza ta 10 ċm mil-lampa.

4.10. Tubi gradwati ta' 10 ml b'tappijiet tal-*polyethylene*.

4.11. Spektrofotometru UV.

4.12. *Fluorodensitometer* (jista' jintgħażel).

5. Proċedura

5.1. *Preparazzjoni tal-kampjun (ara taħt 'Osservazzjonijiet', Parti C, punt 1).*

Farrak il-kampjun biex jgħaddi kollu kemm hu minn passatur b'xibka ta' 1 mm (skond ir-rakkomandazzjoni ta' ISO R 565).

5.2.. Estrazzjoni

Poġġi 50 g ta' kampjun omoġeniku mfarrak fi flixkun konikali ta' 500-ml (4.6). Żid 25 g ta' *Kieselguhr* (3.14), 25 ml ta' ilma u 250 ml ta' kloroform (3.2). Għalaq il-flixkun, ħawwad għal 30 minuta bl-apparat (4.2) u iffiltra minn karta xuga f'forma ta' lembut (4.3). .Warrab l-ewwel 10 ml tal-filtrat u wara iġbor 50 ml.

5.3 Tindif tal-kolonna

Fit-tarf nett tat-tubu kromatografu (4.4) daħħal tajjara jew plagg tas-suf tal-ħġieġ (3.9), imla' żewġ-terzi tat-tubu bil-kloroform (3.2) u żid 5 g ta' sulfat tal-kubrit (3.10).

Iċċekkja li l-wiċċ ta' fuq tas-saff tas-sulfat tal-kubrit huwa ċatt, u wara żid 10 g ta' ġel tas-silika (3.8) f'porzjonijiet żgħar. Ħawwad sewwa wara kull żieda biex telimina l-bżieżaq ta' l-arja. Ħalli jistrieħ għal 15-il minuta u wara żid b'attenzjoni 15 g ta' sulfat tal-kubrit (3.10). Ħalli l-likwidu jaqa' sakemm ikun il-fuq mill-wiċċ ta' fuq tas-saff tas-sulfat tal-kubrit.

Ħawwad il-50 ml ta' estratt miġbur f'5.2 b'100 ml ta' *n-hexane* (3.3) u ittrasferixxi b'mod kwantitattiv it-taħlita għall-kolonna. Ħalli l-likwidu jaqa' sakemm ikun 'il fuq mill-għola wiċċ tas-saff tas-sulfat tal-kubrit. Warrab dan il-ħasil. Wara żid 100 ml ta' *diethylether* (3.5) u erġa ħalli l-likwidu jaqa' sakemm ikun il-fuq mill-għola wiċċ tas-saff tas-sulfat tal-kubrit. Matul dawn l-operazzjonijiet ara illi r-rata ta' ċirkolazzjoni tkun minn 8 sa 12 ml kull minua u li l-kolonna ma tinxifx. Warrab il-likwidu illi joħroġ barra. Wara għamel *elute* b'150 ml ta' taħlita ta' klorofom/metanol (3.7) u iġbor l-*eluate* kollu.

Ivvaporizza ta' l-aħħar kważi sa ma jinxef, f'temperatura ta' mhux aktar minn 50°C u taħt nixxiegħa ta' gass inert (3.11) bir-*rotary evaporator* (4.5). Ittrasferixxi l-bqija b'mod

kwantitattiv, bl-użu ta' kloroform (3.2) jew it-taħlita ta' *benzene-acetonitrile* (3.6), għal tubu gradwat (4.10). Ikkonċentra s-soluzzjoni taħt nixxiegħa ta' gass inert (3.11) u wara irranġa l-volum għal 2 ml bil-kloroform (3.2) jew bit-taħlita ta' *benzene-acetonitrile* (3.6).

5.4. Kromotografija ta' saff irqiq

Osserva fuq platt TLC (4.8), żewġ ċm mill-inqas xifer u f'intervalli ta' żewġ ċm, il-volumi indikati hawn taħt tas-soluzzjoni *standard* u ta' l-estratt:

— 10, 15, 20, 30 u 40 µl tas-soluzzjoni *standard* ta' l-*aflatoxin* B_1 (3.16);

— 10 µl ta' l-estratt ottenut f'5.3 u, *superimposed* fl-istess punt, 20 µl tas-soluzzjoni *standard* (3.16);

— 10 u 20 µl ta' l-estratt ottenut f'5.3.

Żviluppa il-kromatogram fid-dlam b'wieħed mis-solventi li jiżviluppaw (3.18). L-għażla tas-solvent għandu jsir minn qabel, billi jkun depożitat 25 µl tas-soluzzjoni *standard* kwalitattiva (3.17) fuq il-platt u tikkontrolla illi *aflatoxin* B_1 u B_2 huma separati kompletament meta jiżviluppaw.

Ħalli s-solventi jevaporaw fid-dlam u wara għamillhom radjazzjoni bid-dawl UV, billi tpoġġi il-platt għaxar ċm mil-lampa (4.9). It-tikek ta' *aflatoxin* B_1 jagħtu florexxenza blu.

5.5. *Determinazzjonijiet kwantitattivi*

Stabbilihom jew viżibilment jew bi *fluorodensitometry* kif indikat hawn taħt.

5.5.1. Miżuri viżwali

Stabbilixxi l-kwantità ta' aflatoxin B_1 fl-estratt billi tqabbel l-intensità florexxenti tat-tikek estratti ma' dik il-waħda tas-soluzzjoni *standard* tat-tikek. Jekk neċessarju għandha ssir interpolazzjoni. Il-florexxent ottenut mis-superimposizzjoni ta' l-estratt fuq is-soluzzjoni *standard* għandha tkun iktar intensa minn 10 µl ta' l-estratt u ma għandux ikun hemm iktar minn tikka waħda viżibli. Jekk l-intensità florexxenti mogħtija mill-10 µl ta' l-estratt hija iktar minn 40 µl tas-soluzzjoni *standard*, ħallat l-estratt għaxar jew mitt darba bil-kloroform

(3.2) jew bit-taħlita ta' *benzene/acetonitrile* (3.6) qabel ma tassoġġettah mill-ġdid għall-kromotografija f'saff irqiq.

5.5.2. Miżuri bi*fluorodensitometry*

Iżen l-intensità tal-florexxent tat-tikek ta' l-*aflatoxin B_1* bil-*fluorodensitometer* (4.2) f'*excitation wavelength* ta' 365 nm u *emission wavelength* ta' 433 nm. Stabbilixxi l-kwantità ta' *aflatoxin B_1* fit-tikek estratti billi jkunu komparati l-intensitajiet florexxenti tagħhom ma' dawk tat-tikek *standard* tal-*aflatoxin B_1*.

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

Ikkonferma l-identità ta' l-*aflatoxin B_1* fl-estratt bil-proċessi mniżżlin hawn taħt.

5.6.1. *Trattament bl-aċtu tas-sulfur*

Roxx l-aċtu tas-sulfur (3.13) fuq il-kromatogramm miġjub f' 5.4. Il-florexxent tat-tikek ta' l-*aflatoxin B_1* għandu jinbidel minn blu għal isfar taħt ir-radjazzjoni UV.

5.6.2. Kromatografija bidimensjonali li tinvolvi l-formazzjoni tal-*aflatoxin B_1-hemiacetal (aflatoxin B_{2a})*

NB: L-operati deskritti hawn taħt għandhom isiru billi jkun segwit sewwa id-disinn fil-figura 3.

5.6.2.1. Applikazzjoni tas-soluzzjonijiet

Għamel żewġ linji dritti fuq il-platt (4.8) paralleli maż-żewġ naħat kontinġenti (6 ċm il-ġewwa minn kull naħa) biex tillimita migrazzjoni taż-żewġ naħat solventi. Osserva s-soluzzjonijiet li ġejjin fuq il-platt bl-użu ta' pipetti kapillaru jew mikro-siringi:

— *fuq punt A:* volum ta' estratt purifikat tal-volum, ottenut f'5.3, li fih madwar 2·5 ta' *aflatoxin B_1*;

— *fuq punti B u C:* 25 µl tas-soluzzjoni *standard* (3.16).

5.6.2.2. Żvilupp

Żviluppa il-kromatogramm fid-direzzjoni 1, fid-dlam, bl-użu tas-solvent li jiżviluppa (3.18.1) (saff ta' ċentimetru f'tank mhux saturat) sakemm il-wiċċ tas-solvent jasal sal-linja tal-limitu tas-solvent.

Neħħi l-platt mit-tank u ħallieh jinxef fid-dlam f'temperatura ambjentali għal ħames minuti. Wara roxx *hydrochloric acid* (3.12) matul faxxa għolja 2·5 ċm, li tkopri punti A u B (indikati biż-żona mdawra fil-figura 3) sakemm tiskura, u ipproteġi l-bqija tal-platt b'lastra tal-ħġieġ. Ħalli li jirreaġixxi għal għaxar minuti fid-dlam u nixxef b'nixxiegħa ta' arja f'temperatura ambjentali.

Wara, żviluppa il-kromatogramm f'direzzjoni II, fid-dlam, bl-użu tas-solvent li jiżviluppa (3.18.1) (saff ta' ċentimetru f'tank mhux saturat) sakemm il-wiċċ tas-solvent jasal sal-linja tal-limitu tas-solvent. Neħħi l-platt mit-tank u ħalli jinxef f'temperatura ambjentali.

5.6.2.3. Interpretazzjoni tal-kromatogram

Eżamina il-kromatogram taħt dawl UV (4.9) u ivverifika għal karatteristiċi li ġejjin:

(a) Apparenza ta' spot blu aflorexxenti ta' *aflatoxin B_1* li joriġina mis-soluzzjoni *standard* applikat f'C (migrazzjoni f'direzzjoni 1).

(b) Apparenza ta' tikka blu florexxenti ta' *aflatoxin B_1* li ma jkunx irreaġġixxa (mal-*hydrochloric acid*) u tikka blu florexxenti iktar intensa ta' *aflatoxin B_1 –hemiacetal*, it-tnejn ġejjin mis-soluzzjoni *standard* applikat f'B (migrazzjoni fid-direzzjoni II).

(c) Apparenza ta' tikek li huma ugwali ma dawk deskritti f'(b), li joriġinaw mill-kampjun estratt applikat f'A. Il-posizzjoni ta' dawn it-tikek hija definita l-ewwel bid-distanza ta' migrazzjoni ta' l-*aflatoxin B_1* minn punt A fid-direzzjoni 1 (l-istess bħal dik li ivvjaġġat bi *standard* applikat f'C), u wara bid-distanzi ta' migrazzjoni minn hemm fid-direzzjoni II ta' *aflatoxin B_1-hemiacetal*) l-istess bħal dik li ivvjaġġat bi *standard* applikat f'B). L-intensitajiet florexxenti tat-tikek *hemiacetal* oriġinati mill-estratt u mimm *standard* applikat f'B għandhom ikunu jaqblu.

6. Kalkoli tar-riżultati

6.1. *Mill-miżuri viswali*

Il-kontenut ta' mikrogrammi ta' *aflatoxin B_1* kull kilo ta' kampjun (ppb) huwa mogħti bil-formula:

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

fejn:

Y u X huma rispettivament il-volumi f'mikrolitri tas-soluzzjoni *standard* ta' *aflatoxin B_1* (3.16) u ta' l-estratt li għandu l-istess intensità ta' florexxent.

S = konċentrazzjoni f'mikrogrammi ta' *aflatoxin B_1* kull ml fis-soluzzjoni *standard* (3.16);

V = volum finali ta' l-estratt f'mikrolitri, b'parametri għal diluzzjoni fejn din tkun meħtieġa;

W = piż fi grammi tal-kampjun li jikkorrispondi għall-volum ta' l-estratt soġġett għat-tindif tal-kolonna.

6.2. Mill-miżuri *fluorodensitometric*

Il-kontenut f'mikrogrammi ta' *aflatoxin B_1* kull kg tal-kampjun huwa mogħti bil-formula:

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

fejn:

Y = volum f'mikrolitri ta' l-estratt misjub fuq il-platt (10 jew 20 µl);

S = kwantità f'nanogrammi ta' *aflatoxin B_1* fl-ispot estratt (fi proporzjon tal-valur meħud ta' Y), dedott mill-miżuri;

V = volum finali ta' l-estratt f'mikrolitri, b'parametri għal diluzzjoni fejn din tkun meħtieġa;

W = piż fi grammi tal-kampjun li jikkorrispondi għall-volum ta' l-estratt soġġett għat-tindif tal-kolonna.

7. Preparazzjoni u testijiet tas-soluzzjoni *standard* (3.16)

7.1. *Determinazzjoni tal-konċentrazzjoni ta' aflatoxin B_1*

Ipprepara soluzzjoni *standard* ta' *aflatoxin B_1* fil-kloroform (3.2) jew it-taħlita ta' *benzene/acetonitrile* (3.6) b'konċentrazzjoni ta' 8 sa 10 µg/ml. Stabilixxi l-ispektrum assorbenti bejn 330 u 370 nm bl-għajnuna ta' spektrofotometru (4.11).

Kejjel id-densità optikali (A) fi 363 nm fil-każ tas-soluzzjoni ta' kloroform; jew fi 348 nm fil-każ ta' soluzzjoni fit-taħlita *benzene/acetonitrile*.

Ikkalkula l-konċentrazzjoni f'mikrogrammi ta' *aflatoxin B_1* kull ml tas-soluzzjoni mill-formuli hawn taħt:

$\frac{312 \cdot A \cdot 1000}{20600}$ għas-soluzzjoni ta' kloroform;

$\frac{312 \cdot A \cdot 1000}{19800}$ għas-soluzzjoni fit-taħlita ta' *benzene/acetonitrile*.

Ħallat kif imiss, 'il bogħod mid-dawl tax-xemx, biex tikseb soluzzjoni *standard* li taħdem b'konċentrazzjoni ta' ta' *aflatoxin* B_1 ta' madwar 0·1 µg/ml. Jekk miżmuma f'refriġeratur b' 4 °C, din is-soluzzjoni tinżamm stabbli għal ġimagħatejn.

7.2. Ittestjar tal-purità tal-kromotografija

Poġġi tikka fuq platt (4.8) 5 µl tas-soluzzjoni *standard* ta' *aflatoxin* B_1 ta' 8 sa 10 µg/ml (7.1). Żviluppa l-kromatogram kif indikat fi 5.4. Fid-dawl UV, il-kromatogram għandu juri tikka waħda u l-ebda florexxent ma għandu jkun perċepit fiż-żona ta' depositu oriġinali.

8. Rata ta' ripetizzjoni

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ determinazzjonijiet paralleli magħmula fuq l-istess kampjun mill-istess analista ma għandux jeċċedi:

— 25 % relatati ma' l-ogħla riżultat għall-kontenuti ta' *aflatoxin* B_1 mill-10 sa 20 µg/kg;

— 5 µg/kg, fil-valur assolut, għall-kontenuti ogħla minn 20 sa 50 µg/kg;

— 10 % relatati ma' l-ogħla valur għall-kontenuti il-fuq minn 50 µg/kg.

9. Rata ta' produċibilità

Ara taħt 'Osservazzjonijiet', Parti Ċ, punt 2.

B. DETERMINAZZJONI TA' AFLATOXIN B_1. METODU TA' KROMATOGRAFIJA LIKWIDA F'ATTIVITÀ GĦOLJA

1. Għan u skop

Dan il-metodu huwa għad-determinazzjoni ta' *aflatoxin* B_1 fl-għalf ta' l-annimali li jinkludi dawk li fihom polpa taċ-ċitru. L-inqas limitu ta' determinazzjoni huwa 0,001 mg/kg (1 ppb).

2. Prinċipju

Il-kampjun huwa estratt bil-kloroform. L-estratt jiġi ffiltrat, u porzjon ta' *aliquot* huwa purifikat fuq *Florisil cartridge* segwit b' C_{18} *cartridge*. Is-separazzjoni finali u determinazzjoni hija miksuba b'kromotografu likwidu f'attività għolja (HPLC) bl-użu ta'

kolonna C_{18} fil-faża riversata, segwit b'derivatizzazzjoni *post-column* b'jodju fl-ilma, u kxif florexxenti.

Nota: Mikotossini huma sustanzi estremament tossiċi. Il-manipulazzjonijiet għandhom isiru f'armarju tad-duħħan apposta. Prekawzjonijiet speċjali għandhom jittieħdu meta tossiċi huma fil-forma niexfa minħabba fin-natura elettrostatika tagħhom u t-tendenza tar-riżultat li jitferrex fiż-żona tax-xogħol.

3. Riaġenti

3.1. Kloroform, stabilizzat b' 0,5 sa 1,0 % ta' etanol, bil-massa. Ara osservazzjoni 10.2.

3.2. Metanol, grad HPLC għall-preatazzjoni ta' 3.6.

3.3. *Acetone*

3.4 *Acetonitril*, grad HPLC.

3.5. *Eluting solvents*: Ipprepara ġurnata qabel l-użu, jew neħħi l-arja mis-solventi b'mod ultrasoniku.

3.5.1. Taħlita ta' *acetone* (3.3) u ilma, 98 + 2 (v+v).

3.5.2. Taħlita ta' ilma u metanol (3.2), 80 + 20 (v+v).

3.5.3. Taħlita ta' ilma u *acetone* (3.3), 85 + 15 (v+v).

3.6. Faża mobbli għal HPLC

Taħlita ta' ilma, metanol (3.2) u *acetonitril* (3.4), 130 + 70 + 40 (v+v+v).

NB Il-komposizzjoni tas-solvent fil-faża mobbli jista' jkollu bżonn li jkun aġġustat, skond il-karatteristiċi tal-kolonna HPLC użata.

3.7. Soluzzjoni saturata ta' jodju: żid 2 g ta' jodju ma' 400 ml ta' ilma. Ħallat ta' lanqas għal disgħin minuta u ffiltra minn filtru tal-*membrane* (4.15). Ipproteġi is-soluzzjoni saturata mid-dawl biex tipprevjeni fotodegradazzjoni.

3.8. *Celite 545* maħsul bl-aċtu, jew ekwivalenti.

3.9. *Florisil cartridge (Waters SEP-PAK*), jew ekwivalenti.

3.10. *C_{18} cartridge* (*Waters SEP-PAK*), jew ekwivalenti.

3.11. Gass inert eż, nitroġenu.

3.12. Soluzzjoni *standard* ta' aflatoxin B_1 fil-kloroform, konċentrazzjoni ta' 10 µg/ml. Iċċekkja l-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni kif ġej: stabbilixxi l-ispektrum ta' assorbent tas-soluzzjoni bejn 330 u 370 nm b'mezz ta' spektrofotometru (4.23). Kejjel l-assorbent (A) fil-massimu viċin 363 nm. Ikkalkula l-konċentrazzjoni ta' *aflatoxin B_1* f'mikrogrammi kull millilitru ta' soluzzjoni mill-formula:

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

3.12.1. Soluzzjoni *standard* ta' stokk ta' aflatoxine B_1 fil-kloroform.

Ittrasferixxi kwantitattivament 2,5 ml tas-soluzzjoni *standard* tal-*aflatoxin B_1* (3.12) għal-flixkun volumetriku ta' qies 50 ml u aġġusta l-marka bil-kloroform (3.1). Aħżen din is-soluzzjoni f'post frisk (4 ºC) fid-dlam, issiġillat sewwa u mgeżwer fil-fojl ta' l-aluminiju.

3.13. Soluzzjonijiet HPLC għall-kalibrazzjoni tal-*aflatoxin B_1*.

NB Uża apparat tal-ħġieġ maħsul fl-aċtu għall-preparazzjoni ta' dawn is-soluzzjonijiet (ara 4, Apparat).

3.13.1. Soluzzjoni għall-kalibrazzjoni 4ng/ml.

Ħalli l-flixkun volumetriku b'soluzzjoni *standard* (3.12.1) biex jisħon għat-temperatura tal-kamra fil-fojl ta' l-aluminju (ftit sigħat). Ittrasferixxi 400 µl ta' l-istokk tas-soluzzjoni *standard* (200 ng *aflatoxin B_1*) fi flixkun volumetriku ta' qies ta' 50 ml, u evaporizza s-soluzzjoni sakemm tinxef f'kurrent ta' gass inert (3.11).

Iddissolvi ir-residwu ottenut f'approssimament ta' 20 ml bit-taħlita ta' l-ilma/*acetone* (3.5.3), għamel sal-marka bit-taħlita ta' l-ilma/*acetone*,u ħawwad sewwa.

3.13.2. Soluzzjoni għall-kalibrazzjoni 3 ng/ml.

Ittrasferixxi kwantitattivament 7,5 ml tas-soluzzjoni kalibrata (3.13.1) fi flixkun volumetriku li jesa 10 ml, għamel sal-marka bit-taħlita ta' l-ilma/*acetone* (3.5.3),u ħawwad sewwa.

3.13.3. Soluzzjoni għall-kalibrazzjoni, 2 ng/ml.

Ittrasferixxi kwantitattivament 25 ml tas-soluzzjoni kalibrata (3.13.1) fi flixkun volumetriku li jesa 50 ml, għamel sal-marka bit-taħlita ta' l-ilma/*acetone* (3.5.3),u ħawwad sewwa.

Din is-soluzzjoni hija msemmija wkoll bħala r-riferenza *standard*, biex tkun użata għall-injezzjoni ripetittiva matul HPLC (5.5).

3.13.4. Soluzzjoni għall-kalibrazzjoni 1 ng/ml.

Ittrasferixxi kwantitattivament 2,5 ml tas-soluzzjoni kalibrata (3.13.1) fi flixkun volumetriku li jesa 10 ml, għamel sal-marka bit-taħlita ta' l-ilma/*acetone* (3.5.3),u ħawwad sewwa.

3.14. *Ampoule* li tikkontjeni taħlita ta' *aflatoxins* B_1, B_2, G_1 u G_2 konċentrazzjonijiet approssimattivi ta' 1, 0,5, 1 u 0,5 µg/ml rispettivament, fi 1 ml ta' kloroform.

3.14.1. Soluzzjoni tat-test kromatografu.

Ittrasferixxi l-kontenut tal-*ampoule* (3.14) fi *glass-stoppered test-tube* jew *screw-capped vial*. Ittrasferixxi 40 µl ta' din is-soluzzjoni fi *glass-stoppered test-tube* (maħsul fl-aċtu) (4.22). Ivvaporizza l-kloroform f'nixxiegħa ta' gass inert (3.11) u ddissolvi mill-ġdid fi 10 ml tat-taħlita ta' l-ilma/*acetone* (3.5.3).

3.15. Riaġenti għat-test ta' konferma (6).

3.15.1. Soluzzjoni saturata tas-sulfat tal-klorin.

3.15.2. Sulfat tal-kubrit, *anhydrous,* granulat.

4. Apparat

Twissija: Użu ta' apparat tal-ħġieġ mhux maħsul fl-aċtu għas-soluzzjonijiet *aqueous aflatoxin* jista' jikkawża telf. Għandha tittieħed kura partikolari b'apparat tal-ħġieġ ġdid u apparat tal-ħġieġ li jintuża u jista' jintrema bħal *autosampler vials* u pipetti *Pasteur*. Għalhekk, apparat tal-ħġieġ tal-laboratorju li jkun f'kuntatt ma soluzzjonijiet *aqueous* ta' *aflatoxins* għandhom ikunu mgħaddsa f'aċtu mħallat (eż. aċtu tas-sulfur = 2 mol/l) għal bosta sigħat, wara mlaħlaħ sewwa b'ilma distillat biex jitneħħew it-traċċi kollha ta' aċtu (eż.

tlett darbiet, iċċekkja b'karta-pH). Fil-prattika, dan it-trattament huwa neċessarju għal fliexken bil-qiegħ tond (4.4), il-fliexken volumetriki, ċilindri li jintużaw għall-kejl, *vials* jew tubi għas-soluzzjonijiet użati għall-kalibru u estratti finali (partikolarment *vials* għall-*autosamplers*), u pipetti *Pasteur*, jekk huma użati biex jittrasferixxu soluzzjonijiet użati għall-kalibru jew estratti.

4.1. *Grinder-mixer.*

4.2. Passatur bil-qies ta' l-apertura 1,0 mm, (ISO R 565).

4.3. *Shaker* mekkaniku

4.4. *Rotary vacuum evaporator*, armat bi flixkun bil-qiegħ tond ta' 150 sa 250 ml.

4.5. Kromatografu likwidu f'attività għolja, injettur b'ħolqa tajba għall-injezzjoni ta' 250 ml. Ara l-istruzzjonijiet tal-manifatturi għall-mili parzjali jew komplut tal-ħolqa.

4.6. Kolonna analitika HPLC: pakkettar ta' 3 µm jew 5 µm C_{18}.

4.7. *Pulse-free pump* għat-trasport ta' *iodine post-column reagent*.

4.8. *Valco zero dead volume Tee, stainless steel* (1/16" x 0,75 mm).

4.9. *Spiral reaction coil*; Teflon jew *stainless steel*. Dimensjonijiet ta' 3 000 × 0,5 mm sa 5 000 × 0,5 mm ġew misjuba illi huma approprjati f'kombinazzjoni ma 5 µm jew 3µm kolonni HPLC.

4.10. Banju ta' l-ilma kkontrollat termostatikament aġġustat għal 60 ºC, kapaċi li jkun regolat għal temperature ta' aħjar minn 0,1 ºC.

4.11. *Fluorescence detector*, b'eċċitazzjoni ta' 365 nm u emmissjoni ta' *wavelengths* ta' 435 nm. (Għall-istrument ta' filteraġġ: *wavelength* ta' l-emmissjoni > 400 nm). Kxif ta' lanqas 0,05 ng *aflatoxin* B_1 għandu jkun possibli. Jista' jkun hemm xi pressa minn wara (eż. *restrictor*, Teflon jew *stainless steel coil* mqabbad mal-fetħa tad-*detector*), biex ma jħallux bżieżaq ta' l-arja fil-*flow-cell*.

4.12. *Strip chart recorder.*

4.13. Integratur elettroniku (mhux ta' bilfors).

4.14. Karta xuga forma ta' lembut b'dijametru ta' 24ċm, *Macheroy-Nagel* 617 ¼ jew ekwivalenti.

4.15. Filter tal-*membrane* b'qies tal-pori ta' 0,45 µm, *Millipore HAWP 04700* jew ekwivalenti.

4.16. Flixkun konikali ta' 500 ml magħluq b'tapp tal-ħġieġ.

4.17. Kolonna tal-ħġieġ (dijametru intern approsimu ta' 1 ċm, tul approssimu ta' 30 ċm) mgħammar b' *Luer tip*.

4.18. *Luer chloroform-resistant stopcock* (eż. *Bio-rad 7328017, Analytichem a1 6078, J.T. Baker 4514* jew ekwivalenti).

4.19. Siringa resistenti għall-kimika, 10 ml

4.20. Siringa tajba għall-injezzjoni HPLC ta'250 µl (ara 4.5).

4.21. Mikro-siringa ta' 100 µl għall-preparazzjoni tas-soluzzjonijiet tal-kalibru (iċċekja illi l-eżattezza hija fil-2 % billi tiżen).

4.22. Tubi kalibrati magħluqa b'tapp tal-ħġieġ ta' 10 ml.

4.23. Spektrofotometru, adatt biex jittieħdu miżuri fir-reġjun UV ta' l-ispektrum.

4.24. Apparat għat-test tal-konferma (6).

4.24.1. Lembut għas-separazzjoni ta' 100 ml maħsul bl-aċtu b' *Teflon stopcock*.

4.24.2. *Heating block*, 40 sa 50 ^{o}C.

5. Proċedura

5.1. *Preparazzjoni tal-kampjun*

Farrak il-kampjun biex ikun jista' jgħaddi mill-passatur (4.2).

5.2. Porzjon tat-test

Iżen 50 g tal-kampjun preparat għat-test fil-flixkun konikali (4.16).

5.3. Estrazzjoni

Żid 25g ta' *Celite* (3.8), 250ml ta' kloroform (3.1) u 25ml ta' ilma għall-porzjoni tat-test (5.2). Issiġġilla l-flixkun, u ħawwad għal 30 minuta b'*shaker* mekkaniku (4.3). Iffiltra minn karta xuga forma ta' lembut (4.14). Iġbor 50 ml ta' filtrat. Jekk ikun meħtieġ, ħu *aliquot* tal-

filtrat u ħallat ma 50 ml ta' kloroform biex il-konċentrazzjoni ta' *aflatoxin B_1* ma tkunx iktar minn 4 ng/ml.

5.4. *Tindif (din il-proċedura għandha ssir mingħajr interruzzjonijiet sinifikanti).*

Twissija:

— ipproteġi l-laboratorju, fejn l-analiżi huma magħmula, adegwatament mid-dawl tax-xemx. Dan jista' jsir billi effettivament tuża:

(i) Fojl fuq it-twieqi li jassorbi l-UV f'kombinazzjoni ma' dawl taħt kontroll (mhux bid-dawl tax-xemx dirett);

(ii) Purtieri jew persjani f'kombinazzjoni ma' dawl artifiċjali (tubi florexxenti huma aċċetabbli);

— *Aflatoxin* li jikkontjeni soluzzjonijiet għandu jkun protett mid-dawl kemm jista' jkun (żommu fid-dlam uża fojl ta' l-aluminju).

5.4.1. Purifikazzjoni ta' *Florisil SEP-PAK*

5.4.1.1. Preparazzjoni ta' *column-cartridge assembly*

Waħħal *stopcock* (4.18) ma' l-iqsar *stem* tal-*Florisil cartridge* (3.9) (ara figura 1). Aħsel il-*cartridge* u neħħi l-apparat ta' l-għajnuna billi tieħu 10 ml ta' kloroform (3.1) u għaddi malajr 8 ml minn *stopcock* minn ġol-*cartridge* bl-użu ta' siringa (4.19). Waħħal l-itwal *stem* tal-*cartridge* ma' kolonna tal-ħġieġ (4.17) u għaddi l-bqija 2 ml ta' kloroform mill-*cartridge* għal ġol-kolonna. Għalaq li *stopcock*. Neħħi mis-siringa.

5.4.1.2. Purifikazzjoni

Żid il-filtrat miġbur f'5.3 mal-*column-cartridge assembly* u żvojta bil-gravità. Laħlaħ b' 5 ml ta' kloroform (3.1), segwit minn 20 ml ta' *methanol* (3.2). Neħħi l-*eluates*. Matul dawn l-operati, żgura illi l-*column-cartridge assembly* ma tinxifx.

Elute aflatoxin B_1 b' 40 ml tat-taħlita magħmula mill-*acetone* u l-ilma (3.5.1) u iġbor l-*eluate* kollu fil-flixkun bil-qiegħ tond tar-*rotary evaporator* (4.4). Ikkonċentra l-*eluate* fuq ir-*rotary evaporator* f' 40 ºC sa 50 ºC sakemm l-ebda *acetone* iktar ma jkun distillat.

(*NB* approssimament ta' 0,5 ml ta' likwidu jibqa' fil-flixkun f'dan il-punt. Esperimenti urew illi aktar evaporizzazzjoni ma tagħmilx ħsara u li meta 0,5 ml tal-likwidu jibqa', hemm ma hemmx ammont ta' *acetone* sinjifikanti. Residwi ta' *acetone* jistgħu jwasslu għat-telf ta' *aflatoxin B_1* fuq il-*C_{18} cartridge*). Żid 1 ml ta' metanol (3.2), dawwar il-flixkun biex tidissolvi l-*aflatoxin B_1* fuq in-naħat tal-flixkun, żid 4 ml ta' ilma, u ħawwad. Aqla' u neħħi l-*cartridge*. Laħlaħ il-kolonna tal-ħġieġ bl-ilma u żommu għall-pass ta' purifikazzjoni ta' C_{18}.

5.4.2. Purifikazzjoni ta' C_{18} SEP-PAK

5.4.2.1. Preparazzjoni ta' muntaġġ tal-*column-cartridge*.

Waħħal *stopcock* (4.18) ma' l-iqsar *stem* tal-*C_{18}-cartridge* (3.10) (ara figura 1). Ipprepara l-*cartridge* u neħħi kull arja billi tgħaddi malajr 10 ml ta' methanol (3.2) minn *stopcock* minn ġol-*cartridge* b'siringa (4.19) (Bżieżaq ta' l-arja fil-*cartridge* huma viżibbli bħala tikek żgħar fuq l-isfond li għandu jkun griż). Hu 10 ml ta' ilma, u għaddi 8 ml mill-*cartridge* (Evita l-introduzzjoni ta' l-arja fil-*cartridge*, meta tbiddel il-metanol għall-ilma). Waħħal l-itwal *stem* tal-*cartridge* ma' kolonna tal-ħġieġ (4.17) u għaddi iż-żewġ ml ta' ilma li baqa' mill-*cartridge* għal ġol-kolonna. Għalaq l-apparat *stopcock*. Neħħi s-siringa.

5.4.2.2. Purifikazzjoni

Ittrasferixxi l-estratt miġbur f' 5.4.1.2 kwantitattivament għall-kolonna tal-ħġieġ (4.17), laħlaħ il-flixkun darbtejn b' ħames ml tat-taħlita ta' l-ilma u metanol (3.5.2) u żvojtja bil-gravità. Matul dawn l-operazzjonijiet, żgura illi l-*column-cartridge assembly* ma tinxifx. (Meta l-bżieżaq ta' l-arja jiżviluppaw fl-għafsa viċin il-*cartridge*, waqqaf in-nixxiegħa u għalaq il-quċċata tal-kolonna tal-ħġieġ, sabiex tneħħi l-bżieżaq ta' l-arja. Kompli). *Elute* bi 25 ml ta' ilma/metanol. Neħħi l-*eluate*. *Elute* l-*aflatoxin B_1* b' 50 ml tat-taħlita ta' l-ilma u *acetone* (3.5.3), u iġbor l-ammont kollu tal-*eluate* fi flixkun volumetriku ta' 50 ml. Għamel sal-marka bl-ilma u ħawwad: is-soluzzjoni ta' test li tirriżulta hija użata għall-kromatografija (5.5).

Twissija: Filtrazzjoni ta' l-estratt finali qabel HPLC m'huwiex normalment neċessarju. Jekk jitqies li jkun neċessarju, ma għandhomx jintużaw *cellulose filters*, għaliex dawn jistgħu iwasslu għal telf ta' *aflatoxin B_1*. *Teflon filters* huma aċċettabli.

5.5. *Kromatografu likwidu f'attività għolja*

(Ara Figura 2 għall-prepararazzjoni ta' l-apparat). Halli ħin suffiċenti għall-ikkundizjonar u stabilizzar ta' l-istrumenti.

Nota 1:

Ir-rati ta' *flow* mogħtija għall-faži mobbli u riaġent ta' wara l-kolonna huma biss indikattivi. Jista' jkun li jkollhom jiġu aġġustati skond il-karatteristiċi tal-kolonna HPLC.

Nota 2:

Ir-rispons tad-*detector* ta' *aflatoxin B_1* jiddependi fuq it-temperatura, għalhekk għandha ssir kompensazzjoni għad-direzzjoni (ara Figura 3). Billi tinjetta ammont fiss ta' *standard* ta' riferenza ta' *aflatoxin B_1* (3.13.3) f'intervalli regolari (i.e. ma kull tielet injezzjoni), l-*aflatoxin B_1* b'valuri ottimali bejn dawn ir-referenzi *standard* jistgħu ikunu irranġati bl-użu ta' rispons medju, sakemm id-differenza bejn ir-respons ta' referenzi *standard* konsekuttivi hu żgħir ħafna (< 10 %). Għalhekk l-injezzjonijiet għandhom isiru mingħajr interruzzjonijiet. Jekk l-interruzzjoni hija neċessarja, l-aħħar injezzjoni qabel l-interruzzjoni u l-ewwel injezzjoni wara l-interruzzjoni għandhom ikunu *standard* ta' referenza (3.13.3). Minħabba li l-kurva ta' kalibrazzjoni hija lineari u tgħaddi mill-oriġini, l-ammonti ta' *aflatoxin* B_1 fl-estratti tal-kampjuni huma determinati direttament b'riferenza għal *standards* adjaċenti.

5.5.1. Iffissar tal-pompa HPLC

Irranġa l-pompa HPLC (4.5) biex tagħti ċirkolazzjoni ta' 0,5 jew 0,3 ml/min għal 5 µm jew 3 µm kolonna HPLC (4.6) rispettivament bl-użu ta' faži mobbli (3.6).

5.5.2. Irranġar tal-*Post–column pump*

Irranġa l-pompa (4.7) biex tagħti ċirkolazzjoni ta' 0,2 sa 0,4 ml/min tas-soluzzjoni ta' jodin-ilma saturat (3.7). Bħala gwida ġenerali: Ċirkolazzjoni ta' bejn wieħed u ieħor 0,4 jew 0,2 ml/min dejjem tista' ssir b'kombinazzjoni ma ċirkulazzjonijiet ta' 0,5 u 0,3 ml/min tal-faża mobbli (3.6) rispettivament.

5.5.3. *Fluorescence detector*

Irranġa l-*fluorescence detector* (4,11) għal exc. = 365 nm u em = 435 nm (strument tal-filtru; > 400 nm). Aġġusta l-*detector attenuator* biex tikseb bejn wieħed u ieħor 80 % tad-diflezzjoni ta' l-iskala kollha tal-pinna li tirrekordja għal 1 ng ta' *aflatoxin* B_1.

5.5.4. Injettur

Għas-soluzzjonijiet kollha, injetta ammonti ta' 250 µl billi timxi ma' l-istruzzjonijiet tal-manifattur ta' l-injettur.

5.5.5. Iċċekkja għas-seprazzjoni kromatografika

Injetta s-soluzzjoni tat-test kromatografiku (3.14.1). Widien m'għandhomx ikunu inqas minn 5 % tas-somma ta' l-aqwa għoli ta' l-għoli adjaċenti.

5.5.6. Iċċekja l-istabilità tas-sistema

Qabel kull serje ta' analiżi, rispettivament injetta li *standard* ta' referenza (3.13.3), sakemm *peak areas* stabbli huma milħuqa (*NB* Rispons ottimali għal *aflatoxin* B_1 bejn injezzjonijiet konsekuttivi ma għandhomx ikunu differenti b'aktar minn 6 %). Ipproċedi mingħajr dewmien bl-iċċekjar tal-linearità (5.5.7).

5.5.7. Kontroll ta' linearità

Injetta s-sulzzjonijiet ta' kalibrazzjoni ta' *aflatoxin* B_1 (3.13.1 to 3.13.4). Ma' kull tielet injezzjoni uża *standard* ta' referenza (3.13.3), għal kollezzjoni ta' differenza fir-rispons (*NB* Rispons ottimali għal *standard* ta' riferenza bħal dan ma għandhomx ikunu differenti b'iktar minn 10 % f' 90 minuta). Irranġa d-differenza skond il- formula f' 7. Il-*graph* tal-kalibrazzjoni għandha tkun linejari u tgħaddi mill-oriġini, bi żball *standard* doppju ta' *Y-estimate*. Valuri misjuba ma għandhomx ikunu differenti minn 3 % tal-valuri nominali.

Jekk dawn ir-rekwiżiti huma milħuqa, kompli mingħajr dewmien. Jekk le, identifika u irranġa s-sorsi tal-problema qabel tkompli.

5.5.8. Injezzjoni ta' l-estratti tal-kampjuni

Injetta l-estratti purifikati tal-kampjuni (5.4.2.2). Wara kull żewġ kampjuni ta' l-estratt irrepeti l-injezzjoni tar-riferenza *standard* (3.13.3) skond is-sekwenza li ġejja: riferenza *standard*, estratt, estratt, riferenza *standard*, estratt, estratt, riferenza *standard* etc.

6. Testijiet ta' konferma

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

Żid 5 ml ta' soluzzjoni ta' *sodium chloride* (3.15.1) ma' l-estratt finali miksub f' 5.4.2.2. Neħħi tlett darbiet, kull darba b' 2 ml ta' kloroform (3.1) għal minuta waħda, fil-lembut li jissepara (4.24.1). Ferra l-estratti ta' kloroform kombinati fuq approssimament 1 g sulfat tal-kubrit (3.15.2) f'*test tube* ta' 10 ml. Lembut żgħir (dijametru: 4 ċm) jista' jintuża b'biċċa tajjara fl-għeluq, u mgħotti bejn wieħed u ieħor b' 1 g sulfat tal-kubrit.

Aħsel is-saff tas-sulfat tal-kubrit bi ftit ml ta' kloroform u iġbor il-ħasil fl-istess *test tube*. Ħalli l-kloroform estratt jevaporizza sakemm jinxef fl-istess *test-tube* bl-użu ta' *heating block* (4.24.2) u ddissolvi mill-ġdid f' 1 ml ta' kloroform.

6.2. *Preparazzjoni tad-derivattiv u thin layer chromatography:*

Ara l-Anness għad-Direttiva tal-Kunsill ta' l-Unjoni Ewropea 76/372/KEE metodu A, punt 5.6.2.

7. Kalkoklu tar-riżultati

Ikkalkola l-kontenut ta' *aflatoxin B_1* (µm/kg) preżenti fil-kampjun, bl-użu tal-formula:

$$\text{Kontenut ta' } aflatoxin\ B_1 \text{ f' èmg/kg} = \frac{m \times V_{ext}}{V_m \times M \times \frac{V_f}{V_c}}$$

fejn:

m = ammont ta' *aflatoxin B_1* f' ng rappreżentat bil-quċċata tal-kampjun B_1, kalkolat kif ġej:

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

P(kampjun) = *peak area* ta' *aflatoxin B_1* għall-kampjun

$P(st_1)$ = *peak area* ta' *aflatoxin B_1* riżultant mill-injezzjoni preċedenti ta' *standard* ta' riferenza (3.13.3)

$P(st_2)$ = *peak area* ta' *aflatoxin B_1* riżultant mill-injezzjoni ta' wara tar-riferenza *standard* (3.13.3)

r(st) = ammont ta' *aflatoxin B_1* injettat fir-riferenza *standard* (3.13.3) f'ng

V_m = volum tal-kampjun estratt injettat f'ml

V_{ext} = volum finali tal-kampjun ta' l-estratt f'ml, li jħalli għat-taħlit li sar (5.3)

M = toqol tal-kampjun fi g

V_f = volum ta' filtrat trasferit għal *Florisil cartridge* (5.4.1.2) f' ml

V_c = volum ta' kloroform, użat għall-estrazzjoni tal-kampjun f' ml

Jekk il-proċedura bħal ta' dan il-protokoll hija segwita, il-formula tirriduċi għal:

aflatoxin B_1 kontenut fi µg/kg = 20 × m.

7.1. Kalkoli tar-riżultati jistgħu isiru wkoll b'miżuri ta' l-għoli massimi.

8. Ripetizzjoni:

ara taħt 10.1

9. Riproduċibilità:

ara taħt 10.1

10. Osservazzjonijiet

10.1. *Preċiżjoni*

Studju kollaborattiv ([1]), magħmul fuq livell internazzjonali fuq għalf imħallat ta ir-riżultati għar-repetizzjoni u riproduċibilita' indikati f'Tabella 1. Il-fraži ripetizzjoni (r) hija definita hawn bħala l-ikbar proporzjon li mhux sinjifikanti bħala livell ta' probabilita' ta' 95 % biex ikun komparat żewġ qari ta' l-istess kampjun fl-istess laboratorju taħt l-istess kondizzjonijiet. Il-fraži riproduċibilità (R) hija definita b'mod simili biex ikunu komparati żewġ laboratorji differenti. Skond ISO 3534 — 1977, 2.35 ([2]) u d-Deċiżjoni tal-Kummissjoni ta' l-Unjoni Ewropea 89/610/KEE, r u R huma mogħtija wkoll f'Tabella 1 skond ko-effiċjenzi ta' varjazzjoni.

Tabella 1

Ripetizzjoni (r) u riproduċibilità (R) espressi bħala proporzjon ko-effiċjenzi ta' varjazzjoni korrispondenti (15-il laboratorji)

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

(*) CV = ko-effixjenza ta' varjazzjoni

10.2. *Stabbilizzazzjoni tal-kloroform (3.1)*

Il-karatteristiċi ta' l-assorbiment tal-*florisil cartridge* jistgħu jinbidlu jekk huma użati stabilizzanti li mhumiex ethanol. Dan għandu jkun verifikat ma 10.3 fejn il-kloroform deskritt m'huwiex disponibbli.

[1] Egmond, H.P. van, Heisterkamp, S.H. u Paulsch, W.E. (1991). *Food Additives and Contaminants* 8, 17-29

[2] ISO 3534-1977.

10.3. *Eżattezza*

L-applikazzjonijiet korretti tal-metodu għandhom ikunu verifikati bl-użu ta' miżuri doppji fuq materjal ta' referenza kif ċertifikat. Jekk dawn mhux disponibbli, l-andament tal-metodu għandu jkun verifikat b'esperimenti ta' rkupru magħmulin fuq il-kampjuni vojta fortifikati. Id-devjazzjoni tal-medju mill-valur attwali, espress f'perċentwali tal-valur attwali, ma għandux jaqa' barra mill-limiti ta' −20 sa +10 %.

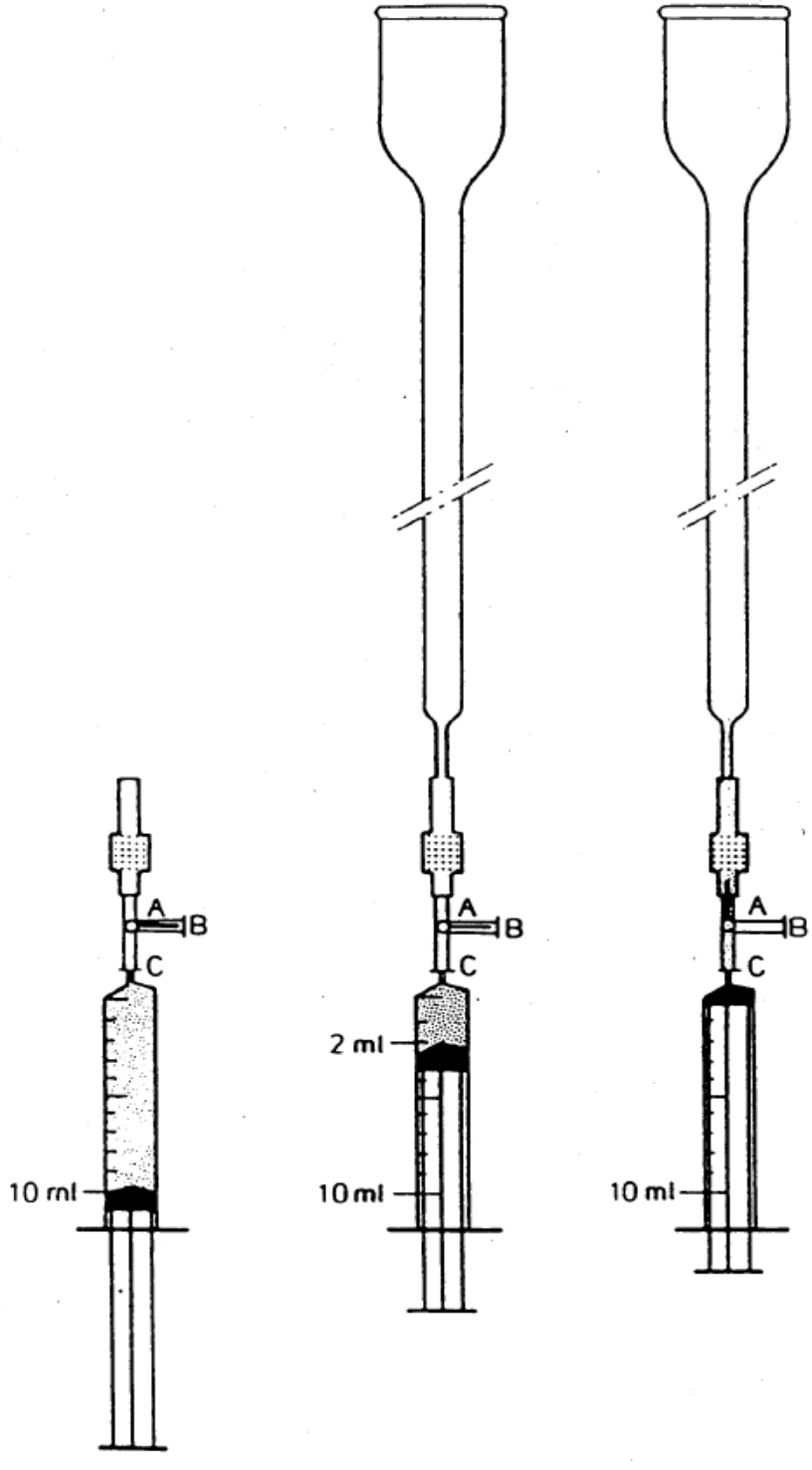
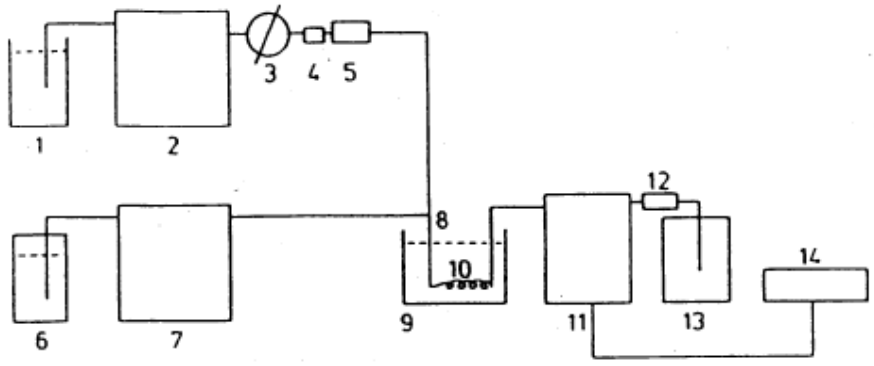


Figura 1: Column-cartridge assembly



1. Fażi mobbli
2. Pompa
3. Valv ta' l-injezzjoni
4. *Guard column*
5. Kolonna analitika HPLC
6. Soluzzjoni ta' jodin saturat
7. Pompa tar-riaġent
8. *T-joint*
9. Banju kkontrollat termostatikament
10. *Spiral reaction coil*
11. Kxif tal-florexxent
12. *Restrictor*
13. Fdal
14. *Strip chart recorder/integrator*

Figura 2: Skema taċ-ċaqliq tas-sistema LC bil-iodine post-column derivatization

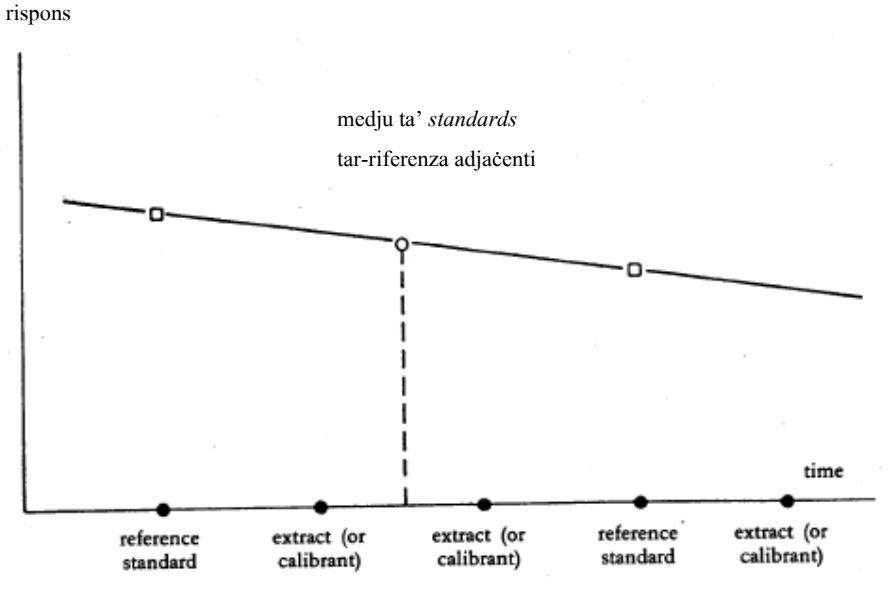


*Figura 3: Kompensazzjoni għad-direzzjoni tar-rispons ta' l-*aflatoxin B_1 *billi tinjetta* standard *ta' riferenza (3.13.3) f'intervalli regolari*

C. OSSERVAZZJONIJIET LI JIRRIGWARDAW METODI A U B

1. Tneħħija tax-xaħam

Kampjuni li għandhom iktar minn 5 % ta' xaħam għandu jitneħħielhom ix-xaħam b'pitrolju ħafif (bp 40 sa 60 ºC) wara l-preparazzjonijiet indikati f' 5.1.

F'dawn il-każijiet, ir-riżultati analitiċi għandhom ikunu espressi skond il-piż tal-kampjun li ma jkunx tneħħielu x-xaħam.

2. Riproduċibilità tar-riżultati għall-Metodu A

Ir-riproduċibilità tar-riżultati, i.e. il-varjazzjoni bejn ir-riżultati miksubin minn żewġ laboratorji jew aktar fuq l-istess kampjun ġiet stmata fi:

± 50 % tal-valur medju għall-valuri medji ta' *aflatoxin* B, minn 10 u sa 20 µg/kg;

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

± 20 % tal-valur medju għall-valuri medji ikbar minn 50 µg/kg.

Appendiċi għall-Iskeda

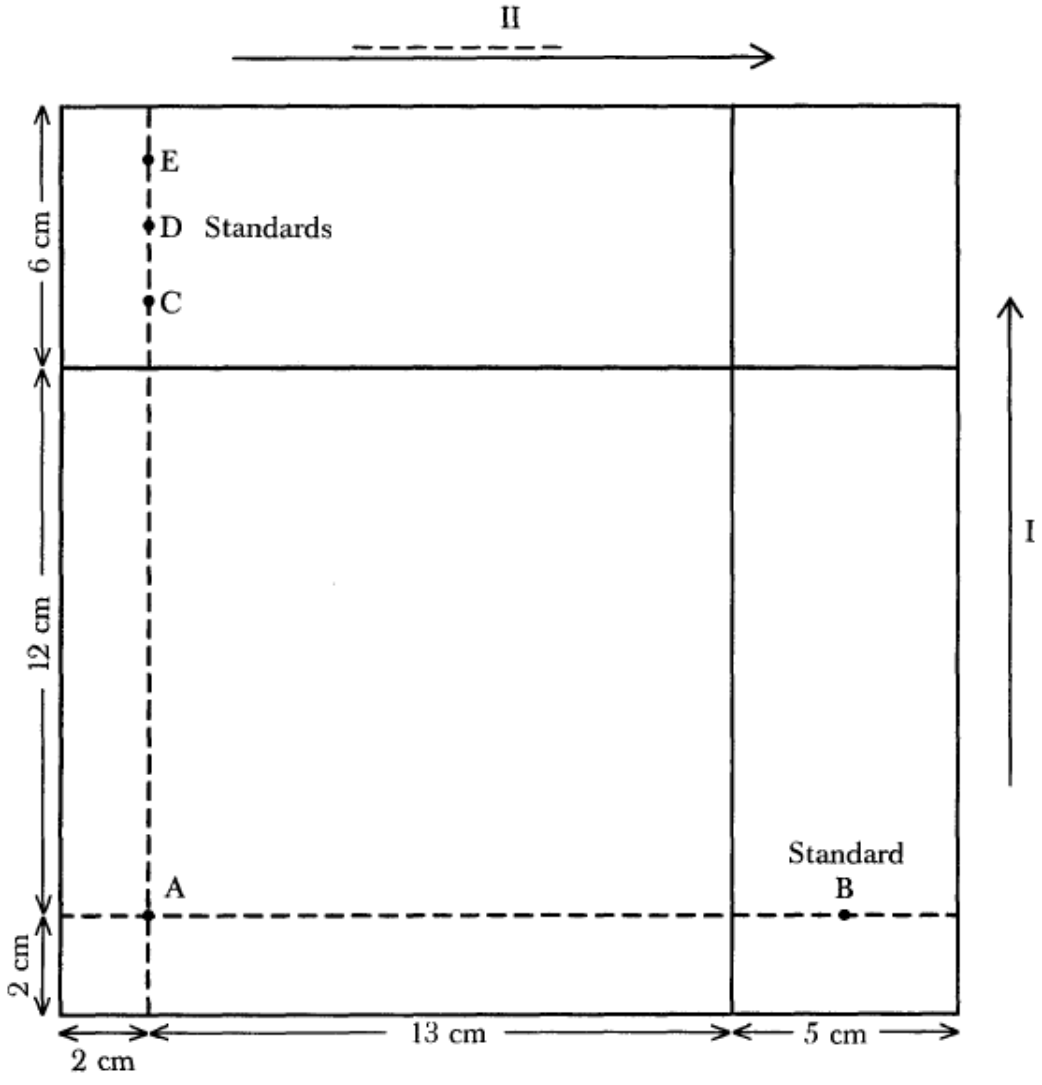


Figura 1

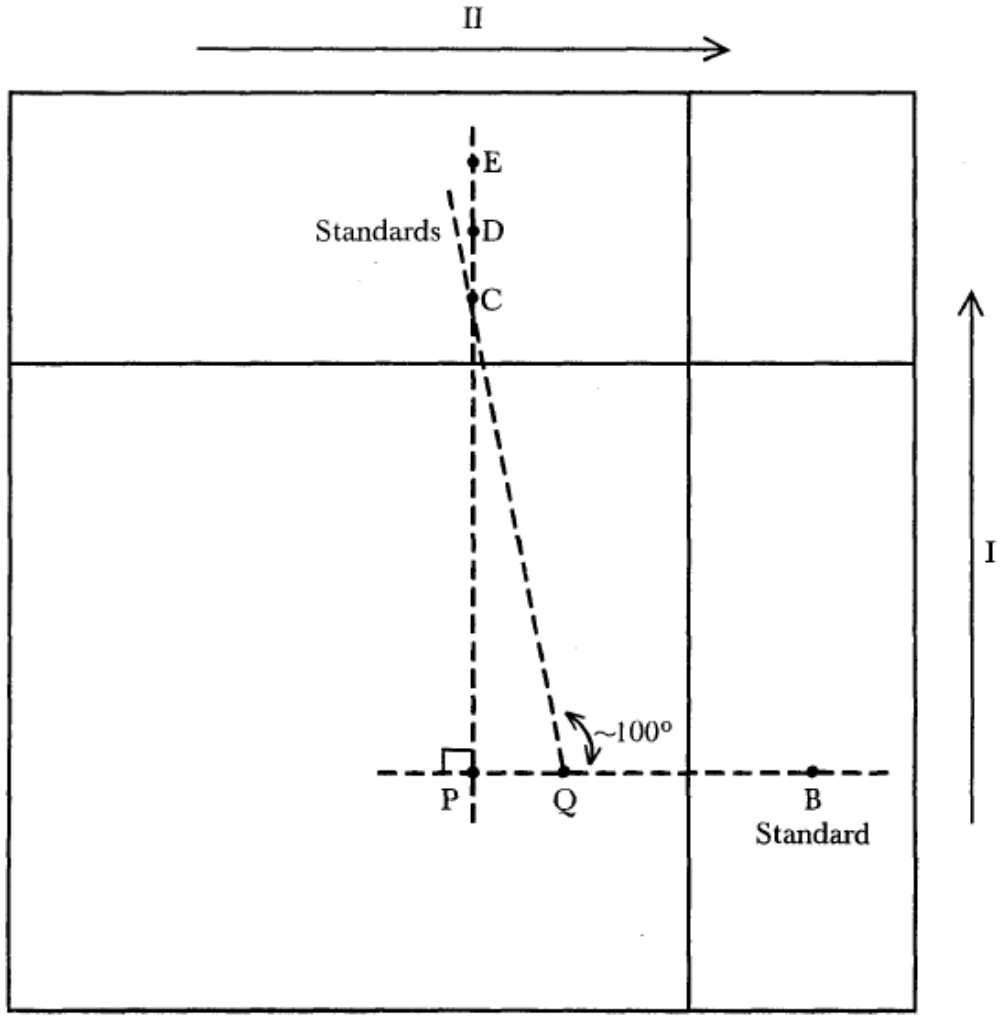


Figura 2

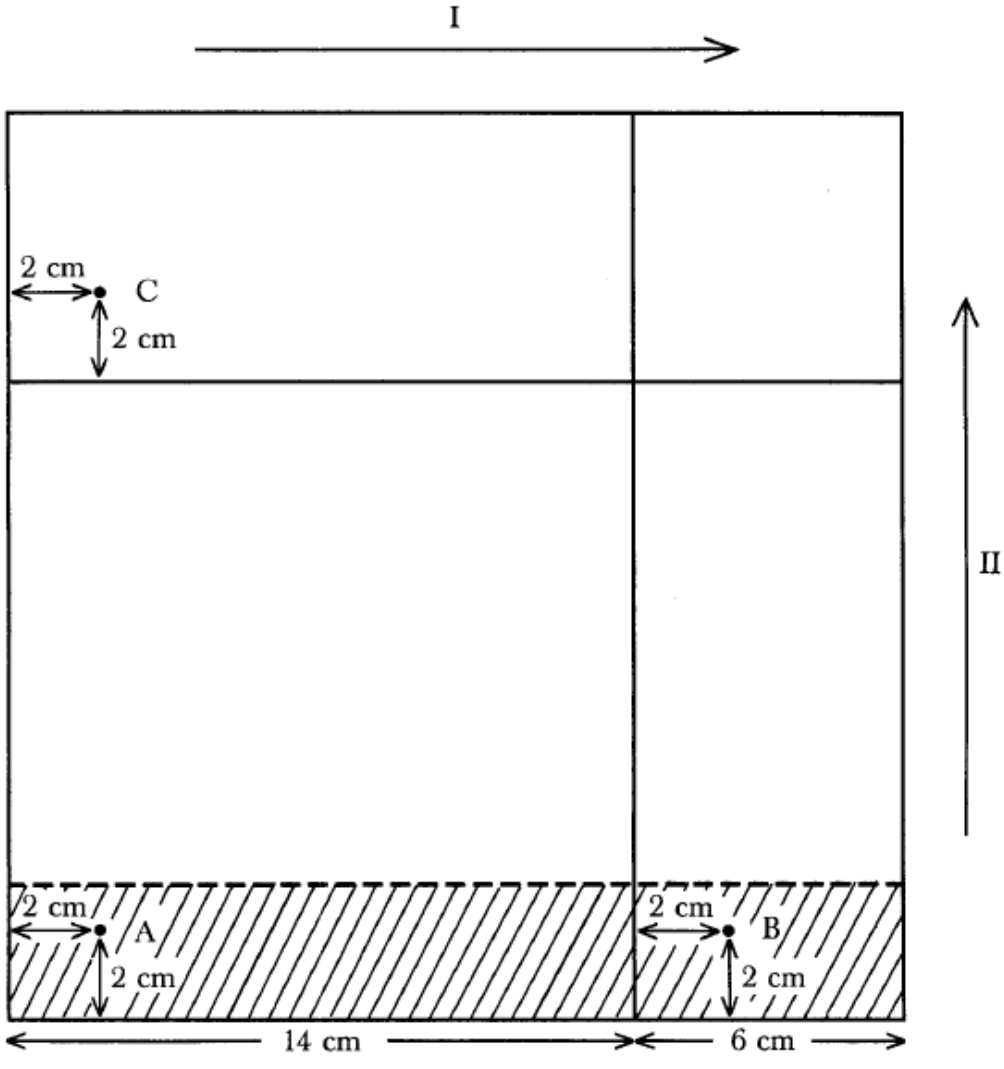


Figura 3